



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

VINY XAVIER LANZA

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE COGUMELOS E MODELAGEM DO
COMPORTAMENTO DE *Listeria monocytogenes* EM *Pleurotus ostreatus* var.
BRANCO E PRETO.

CAMPINAS

2019

VINY XAVIER LANZA

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE COGUMELOS E MODELAGEM DO
COMPORTAMENTO DE *Listeria monocytogenes* EM *Pleurotus ostreatus* var.
BRANCO E PRETO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de alimentos da Universidade
de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Mestre
em Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Anderson De Souza Sant'Ana

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO PRELIMINAR DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO VINY XAVIER
LANZA ORIENTADO PELO PROF. DR.
ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

L297q Lanza, Viny Xavier, 1992-
Qualidade microbiológica de Cogumelos e modelagem do comportamento de *Listeria monocytogenes* em *Pleurotus ostreatus* var. Branco e Preto em diferentes temperaturas / Viny Xavier Lanza. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cogumelos. 2. *Listeria monocytogenes*. 3. Qualidade. 4. Modelagem preditiva. I. Sant'Ana, Anderson de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Microbiological quality of mushrooms and modeling of *Listeria monocytogenes* Behavior in *Pleurotus ostreatus* var. White and Black in different temperatures

Palavras-chave em inglês:

Mushrooms

Quality

Listeria monocytogenes

Predictive modeling

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Títuloção: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Anderson de Souza Sant'Ana [Orientador]

Liliana de Oliveira Rocha

Adriane Elisabete Antunes de Moraes

Data de defesa: 05-12-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2858-0687>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3907362516450935>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana (FEA/Unicamp) – Orientador

Prof. Dr. Liliana de Oliveira Rocha (FEA/Unicamp) – Membro Titular

Prof. Dr. Adriane Elisabete Antunes De Moraes (FCA/Unicamp) – Membro
Titular

ATA da Defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora consta no
processo de vida acadêmica do aluno

Agradeço a todos que contribuíram para a realização desta dissertação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Foram avaliadas 195 amostras de 5 espécies de cogumelos frescos vendidos nos supermercados e distribuidores da cidade de Campinas, SP para quantificar Bactérias aeróbicas mesófilas, Enterobacterias, Bactérias ácido lácticas, Bacterias psicotróficas e bolores e leveduras e presença de *Listeria monocytogenes*. As contagens médias variaram de 1,9 a 7,9 log CFU/g, sendo para Enterobactérias para shitake e psicotróficos para porto belo respectivamente. O cogumelo com maior carga microbiológica foi o Shimeji preto. Foi isolado *Listeria monocytogenes* de 1 (0.51%) amostra de shimeji preto. Ambos cogumelos foram um meio ideal para o crescimento da *L. monocytogenes*. A *L. monocytogenes* em 20 e 30°C em shimeji preto se multiplica rapidamente, obtendo-se os resultados de $0,141 \pm 0,001$ e $0,282 \pm 0,032$, há uma diferença significativa ($p < 0,05$) para o crescimento dos cogumelos em 20 e 30°C, após esta faixa de temperatura há uma redução na taxa e a 5°C não é suportada a sobrevivência da *L. monocytogenes* no shimeji branco e no shimeji preto obteve-se um valor de μ de $0,007 \pm 0,002$. Para λ obteve-se valores sem diferença significativa, apresentando um tempo de adaptação parecido entre os dois tipos de cogumelos. Os valores de κ obtiveram uma maior população no shimeji branco tendo um máximo de $8,19 \pm 0,200$ log CFU/g. O modelo da raiz quadrada foi ajustado aos dados obtidos e podemos observar que o shimeji preto sofreu muito mais influência da temperatura que o shimeji branco e para o tempo de adaptação foi observado o mesmo comportamento. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que em cogumelos comercializados na região de Campinas, SP podem abrigar a *L. monocytogenes* e sustentar seu crescimento.

ABSTRACT

195 samples of 5 species of fresh mushrooms sold in supermarkets and distributors in the city of Campinas, SP, were evaluated to quantify aerobic mesophilic bacteria, enterobacteria, lactic acid bacteria, psychrotrophic bacteria and molds and yeasts and the presence of *Listeria monocytogenes*. The average counts ranged from 1.9 to 7.9 log CFU / g, being for Enterobacteria for shitake and psychrotrophic for porto belo respectively. The mushroom with the highest microbiological load was the black Shimeji. *Listeria monocytogenes* was isolated from 1 (0.51%) sample of black shimeji. Both mushrooms were an ideal medium for the growth of *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* at 20 and 30°C in black shimeji multiplies quickly, obtaining the results of μ 0.141 \pm 0.001 and 0.282 \pm 0.032, there is a significant difference ($p < 0.05$) for the growth of mushrooms at 20 and 30°C, after this temperature range there is a reduction in the rate and at 5°C the survival of *L. monocytogenes* in the white shimeji and in the black shimeji is not obtained a μ value of 0.007 \pm 0.002. For λ , values without significant difference were obtained, presenting a similar adaptation time between the two types of mushrooms. The κ values obtained a larger population in white shimeji having a maximum of 8.19 \pm 0.200 log CFU / g. The square root model was adjusted to the data obtained and we can see that the black shimeji was much more influenced by temperature than the white shimeji and for the adaptation time the same behavior was observed. The results obtained in this work show that in mushrooms commercialized in the region of Campinas, SP they can shelter *L. monocytogenes* and sustain its growth.

Sumário

1.Introdução Geral	9
2.Revisão Bibliográfica.....	10
2.1Cultivo de cogumelos.....	10
2.3 <i>Listeria monocytogenes</i> em cogumelos	15
2.4 Legislação brasileira.....	16
2.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	16
2.6 Surtos vinculados aos cogumelos	19
3.Objetivos	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
CAPÍTULO 1	21
1. Introdução.....	22
2 Material e métodos	25
2.1. Amostragem.....	25
2.1.1 Análises microbiológicas.....	26
2.2.1. Cepa de <i>L. monocytogenes</i> e preparo da suspensão de células	27
2.2.2. Amostras de shimeji branco e shimeji preto, procedimentos de inoculação e enumeração de <i>L. monocytogenes</i> ao longo da estocagem.....	28
2.2.3 Modelagem dos parâmetros cinéticos de multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> em shimeji branco e shimeji preto	29
2.3 Análises estatísticas.....	30
3. Resultados.....	30
3.1. Análises microbiológicas.....	30
3.2. Modelagem do crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i>	32
4. Discussão	33
4.1. Análises microbiológicas.....	33
4.2. Isolamento de <i>L. monocytogenes</i> em cogumelos.....	37
4.3 Modelos preditos para <i>L. monocytogenes</i> em cogumelos frescos.....	38
5 Conclusão	41
7.Referencias.....	41
CONCLUSÕES GERAIS	59
Referências Bibliográficas.....	60

1.Introdução Geral

Os cogumelos são utilizados para alimentação e fins medicinais desde os primórdios da humanidade. A China foi a pioneira no cultivo e é datado por mais de dois mil anos. A China conseguiu cultivar diversas espécies de cogumelos diferentes. Na Europa o *Agaricus bisporus* era o principal cogumelo cultivado. Existem 14.000 espécies de cogumelos reconhecidas e dentre elas 3.000 espécies são comestíveis e apenas 10 são produzidas em escala industrial (Wasser 2003).

A produção mundial de cogumelos em 2014 ultrapassou 10 milhões de toneladas e este número vem crescendo anualmente (FAO 2014). Isso se deve ao seu valor nutricional, como baixo teor de gordura e alto teor de fibras alimentares e compostos funcionais (Manzi, Aguzzi, and Pizzoferrato 2001). A espécie *Agaricus bisporus* (*champignon*) predominava o mercado de cogumelos, mas nos últimos anos houve um aumento de cultivos de outras espécies como *Pleurotus ostreatus* (*shimeji*), *Lentinula edodes* (*shiitake*) e *A. bisporus* var. *Portobello* (*Portobello*) (Venturini et al. 2011).

Cogumelos são macrofungos que pertencem ao filo basidiomicota, produtores de basidioesporos, formam corpos frutificados quando encontram um ambiente favorável, tais como umidade alta e baixa temperatura, caso estes fatores não contribuam, passam parte da sua vida crescendo no solo como micélio simples. Utilizam folhas e troncos em decomposição como fonte de nutriente para o crescimento (Brock and Madigan 2004; Strina 2015; Tortora, Funke, and Case 2005).

Cogumelos frescos têm o potencial de transportar bactérias em várias etapas do seu cultivo. Os cogumelos podem ser contaminados por bactérias patogênicas no crescimento, colheita e triagem. O substrato onde o cogumelo é cultivado pode ser uma fonte de contaminação (Venturini et al. 2011). O substrato passa por tratamento

de pasteurização (Vieira and Andrade 2016), mas em solo descontaminado, microrganismos patogênicos tem maior potencial de crescimento (Venturini et al. 2011)

2.Revisão Bibliográfica

2.1Cultivo de cogumelos

O mundo tem produzido diversos resíduos do agronegócio, como: palha de cereais e borra de café, esses subprodutos às vezes são apenas descartados, apesar disso, eles podem ser utilizados como matéria prima para cultivo de cogumelos como substratos. Os cogumelos utilizam enzima ligninolíticas para obter seus nutrientes do substrato (Mandeeel, Al-Laith, and Mohamed 2005; Sánchez 2010).

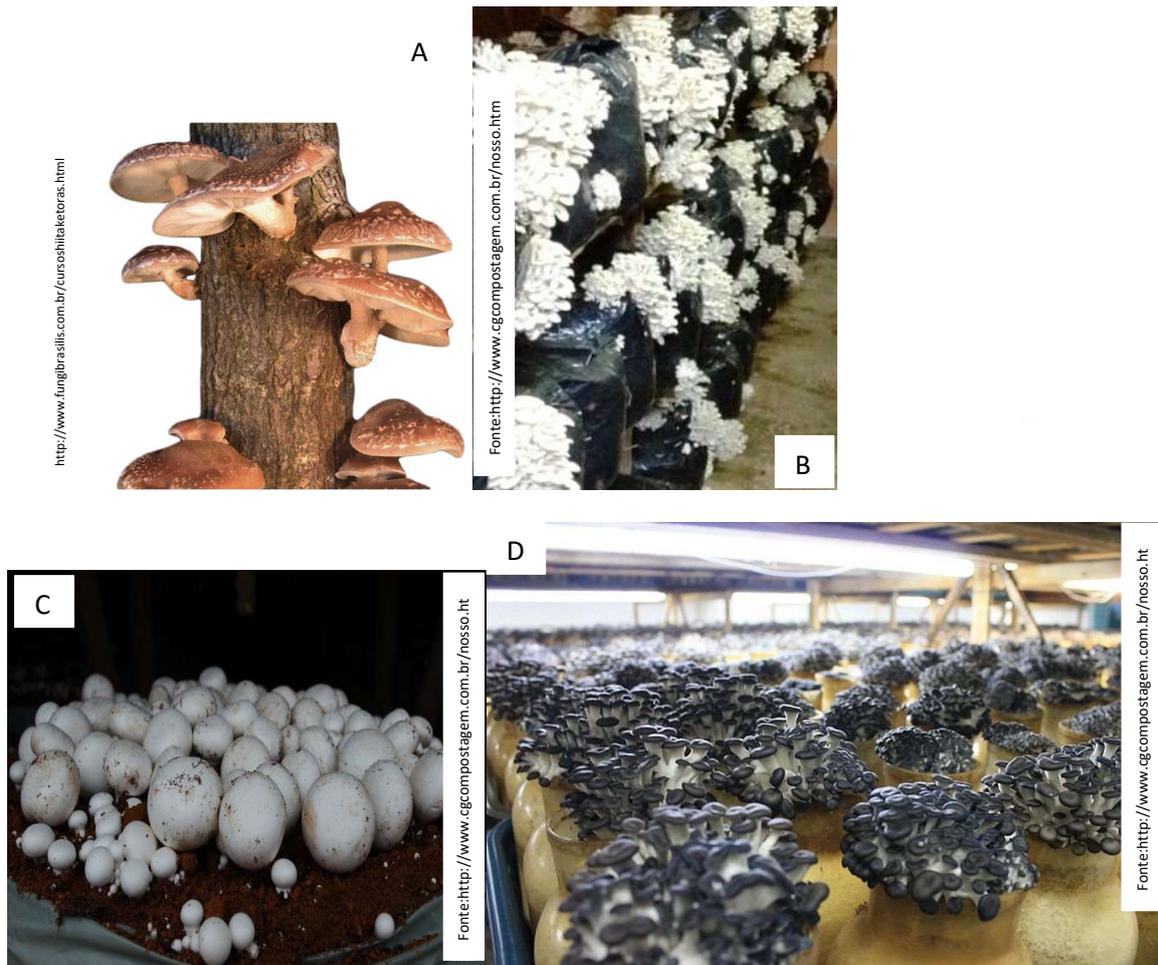
O Brasil adquiriu o costume de cultura de cogumelos após a imigração de japoneses e chineses na metade do século XX; muitos destes imigrantes se instalaram em áreas rurais, principalmente em São Paulo. O Estado logo se tornou um dos maiores produtores de cogumelos do Brasil, porém era utilizado um método de cultivo doméstico e era restrito a uma pequena escala, para consumo dos próprios produtores. Hoje em dia o cultivo de cogumelo tem recebido mais atenção e o Brasil tem desenvolvido cultivos mais elaborados, utilizando-se de tratamentos térmicos e melhores substratos para otimizar a produção. (Dias 2010).

O cultivo de cogumelos envolve diferentes etapas as quais devem ser realizadas de modo meticuloso. Tais etapas diferem significativamente de acordo com a espécie de cogumelos que está se cultivando. Deste modo, a preparação do substrato, inoculação, incubação e condições de produção tem uma variedade considerável. O primeiro estágio, contempla a obtenção do micélio puro a partir dos esporos de um cogumelo específico ou adquiridos comeciralmente. Para a obtenção

do inóculo é necessário crescer o micélio no grão de cereal tais como trigo, centeio ou painço. O propósito dessa técnica de crescimento é de rapidamente colonizar o substrato de crescimento específico a granel, para que se tenha um resultado satisfatório para a produção de cogumelos. Esta produção está intimamente ligada a capacidade de preparação do despejo do inóculo em condições de esterilidade que minimizem as contaminações do substrato (Sánchez 2010).

Na preparação básica, é necessário que o substrato seja cortado. Os substratos mais utilizados são formados por uma mistura, como por exemplo, as cascas do algodão com palha de trigo, que possuem uma melhor performance de retenção de água do que as cascas de algodão utilizadas de forma isolada (Sánchez 2010)).

A pasteurização largamente utilizada na produção de substrato para cogumelos é feita de modo que os ingredientes sejam colocados em misturadores giratórios juntamente com a adição de água e de vapor durante o processo. Após o processo de pasteurização, o substrato é esfriado e colocado juntamente com os esporos desejados. O substrato pasteurizado deve ser adicionado a sacos plásticos de polietileno ou de outras formas, dependendo de outras matérias, conforme a figura 1 (Sánchez 2010).



- A- Shitake cultivado em toras.
- B- Shimeji branco cultivado em sistemas de sacos.
- C- Champignon cultivados em sacos
- D- Shimeji preto cultivado em jarras

Nota-se que o cogumelo começa a se formar ao entorno das bordas de perfuração dos sacos. As bolsas são mantidas em temperatura e umidade ótimas para o crescimento do micélio e favorecimento da frutificação. Diversos estudos centrados em diversas etapas do cultivo de cogumelos têm sido realizados ao longo dos anos para definição das melhores práticas e instrumentos para a produção, tais como o uso de diferentes cepas, diferentes substratos de lignocelulose, diferentes modos de despejo do inóculo no substrato, umidade, condições físico-químicas e entre outros. Os cogumelos são colhidos do substrato aproximadamente em 3 a 4

semanas após inoculação, podendo variar do inóculo, do suplemento utilizado, da temperatura e entre outros (Sánchez 2010).

Para cultivo de *Agaricus bisporus* é utilizado um substrato a base de compostagem. Base deste substrato é de esterco de galinha e cavalo e consiste em três fases de compostagem e leva entorno de 13 dias para o preparo, também há opção de utilizar resíduos de cereais, como casca de trigo e esterco de galinha, ou palha de milho(Sánchez 2010; Wei et al. 2019).

Em *Lentinula edodes*, seu cultivo se deve em troncos de madeiras, porém hoje em dia é substituído por troncos feitos de serragem de madeira (Sánchez 2010).

Na tabela 1 abaixo apresenta-se dados de substrato, tratamento térmico do substrato e temperatura e umidade de cultivo de cada espécie de cogumelo:

Tabela 1 – Substrato e método de preparo

Espécie	Substratos	Tratamento térmico	Temperatura e umidade	Referência
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Resíduos de milho. <i>Brachiaria dictyoneurae</i> , Bagaço-de-cana, farelo de arroz e trigo.	Autoclavado 121°C 30 minutos. Sistema de semi compostagem de 2 fases seguido de pasteurização a 72-65 ° C por 12 horas (mais utilizado em produção comercial).	26 ° C a 28 °C 70% a 75% de umidade	(Carrasco-Cabrera, Bell, and Kertesz 2019; Ding, Wang, and Li 2019; Zied et al. 2019)
<i>Lentinula edodes</i>	Madeira, blocos de lascas de madeira, serragem compactada	Autoclavado 121 ° C por 90 min	20° C 90% de umidade	(Ogawa and Yashima 2019; Schimpf et al. 2019)
<i>Agaricus bisporus</i>	Palha de milho, esterco de galinha, esterco de galinha, farelo de feijão	Processo de compostagem de 2 fases seguido de pasteurização a 58 ° C por 20 horas	21 a 25° C 75 % de umidade	(Figueirêdo and Dias 2014; Sánchez 2010; Wei et al. 2019)

2.3 *Listeria monocytogenes* em cogumelos

A *L. monocytogenes* está presente em áreas de cultivo de cogumelos e até mesmo em áreas de processamento de cogumelos, sendo isolada em áreas de lavagem, corte e embalagem de cogumelos, em pisos úmidos e também encontrada na área de compostagem de matéria-prima (Murugesan et al. 2015; Viswanath et al. 2013).

Em um estudo de Chen et al (2014), foram analisadas várias etapas de cultivo de cogumelo da espécie *Flammulina velutipes* e em 3 de 4 amostras, foram isoladas cepas de *L. monocytogenes* e verifico-se que na etapa de estimulação do micélio, ela é a responsável por contaminação da amostra. Na China, cepas de *L. monocytogenes* foram isoladas de várias amostras de cogumelos, sendo que a maioria destas amostras eram da espécie *Flammulina velutipes* (Chen et al. 2015; Wu et al. 2015a)

Embalagens de PVC com a atmosfera controlada são eficazes para aumentar o tempo de prateleira de cogumelos embalados, mas estas embalagens não são capazes de impedir o crescimento da *L. monocytogenes*. Essa bactéria foi capaz de crescer nestas embalagens em temperatura de 4° a 10°C (González-Fandos et al. 2001).

De acordo com Venturine et al (2011), uma grande quantidade de bactérias gram negativas foi encontrada em cogumelos fresco, como *Pseudomonas* e Enterobacteriaceae e em algumas espécies de cogumelos selvagens, além de ter grande quantidade de bactérias gram negativas foi isolada o patógeno *L. monocytogenes*.destes cogumelos.

2.4 Legislação brasileira

Os cogumelos são regulamentados pela Resolução da diretoria Colegiada (RDC) nº 272 de 22/09/2005. A RDC define o que são cogumelos e a forma que podem ser vendidos, além disso é definido que os cogumelos refrigerados devem conter no máximo 10^2 de coliformes a 45° por grama de alimento e 10^3 de estafilococos coagulasse positiva por grama de alimento e ausência de *Salmonella* em 25 gramas de alimento.

A legislação brasileira não abrange a ausência de *L. monocytogenes*, como sendo um problema para a segurança dos cogumelos, pois como dito anteriormente esta bactéria sempre portanto estar presente em qualquer ambiente do cultivo do cogumelo como no próprio cogumelo.

No Brasil os cogumelos são vendidos sob refrigeração e geralmente tem data de 7 a 10 dias de validade depois de embalados, dependendo da marca e o tipo de cogumelo. Majoritariamente, os cogumelos são consumidos cozidos, porém em alguns países os cogumelos são consumidos *in natura* em saladas ou apenas cozido brevemente podendo apresentar risco se houver a presença da *L. monocytogenes*.

2.5 *Listeria monocytogenes*

Listeria spp é um bacilo gram positivo, anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, móveis em temperaturas de 10 a 25 °C. São encontradas em diversos ambiente como solo, água, afluentes e uma grande variedade de alimentos e fezes de animais e humanos. O gênero *Listeria* inclui as espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua* e *L. welshimeri*.e *L. grayi* . Apenas a *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são patogênicas. Dentre estas apenas a *L. monocytogenes* está ligada a maioria dos casos de doenças ocasionadas em

humanos decorrente do consumo de alimentos contaminados com esta bactéria (Goebel et al. 2013; Nguyen-the and Carlin 1994; Schlech et al. 1983; Serbina et al. 2008; Vázquez-Boland et al. 2001).

Listeria monocytogenes foi inicialmente descoberta por Murray e Swann (1926) sendo causadora de septicemia em coelhos. Foi chamada de *Bacterium monocytogenes*. Esta bactéria dependendo da quantidade injetada na circulação do coelho, levava a morte em pouco tempo e, também, foi relatado que o organismo do coelho quando entra em contato com esta bactéria gera um aumento significativo de monócitos (Serbina et al. 2008).

A infecção por *L. monocytogenes* é uma das infecções bacterianas com maiores índices de mortalidade, variando a taxas de 20 a 30%. Ela pode ocorrer como listeriose perinatal ou em adultos. (Vázquez-Boland et al. 2001; Schlech et al 1983)

Em infecção perinatal, a *L. monocytogenes* invade o feto através da placenta, podendo levar ao aborto ou ao nascimento do feto natimorto com infecção generalizada ou com síndrome de granulomatose infantiseptica. A mãe em muitos dos casos é assintomática ou apresenta uma síndrome gripal (Vázquez-Boland et al. 2001; Schlech et al 1983)

Em adultos a forma mais frequente é a infecção do sistema nervoso central (SNC) e ocorre meningite. Outra forma que ocorre em adultos é a septicemia com altas taxas de mortalidade, essas formas mais graves ocorrem em adultos com sistema imune comprometido, como portadores de HIV, transplantados e idosos. Crianças podem contrair essas formas mais graves de listeriose. Também estão associados a listeriose síndromes gastrointestinais, sintomas de vômito, febre e diarreias (Vázquez-Boland et al. 2001; Schlech et al 1983).

L. monocytogenes está distribuída amplamente pela natureza. Animais, homem e ambientes servem de reservatório para este microrganismo e ela já foi isolada de diversos animais. Tornou-se um dos principais patógenos veiculados por alimentos na década de 80, onde houve vários surtos de listeriose ocasionado por este microrganismo (Franco and Landgraf 2002).

A *L. monocytogenes* é persistente a diversos fatores, como altas concentrações de sais, acidez, umidade e baixo teor de oxigênio (Chen, Wu, Zhang, Guo, et al. 2014). A *L. monocytogenes* é comumente encontrada em ambientes agrícolas e tem sido isolada de solos próximos à água, irrigados e em amostras de águas coletadas de fazendas (Strawn et al. 2013).

É psicrótrófica, cresce em uma faixa de 2 – 45 °C e é capaz de se multiplicar até alguns graus abaixo de 0 ° C, dificultando o seu controle de crescimento. Isso é possível porque à temperaturas abaixo de 7 ° C a *L. monocytogenes* altera os ácidos graxos da sua membrana, com o aumento da proporção de ácido graxos com 17 carbonos e aumenta o número de ácidos graxos insaturados. Pode crescer e resistir entre pH 4,6 e 9,5, ou seja, sobreviver a alimentos ácidos, passagem gástrica e a fagocitose por macrófagos. (Gandhi e Chikindas, 2007; Cotter & Hill, 2003; Walker et al. 1989). Encontra condições de crescimento favoráveis nos pavimentos, nos esgotos e nos equipamentos das instalações da indústria alimentar (Carpentier and Cerf 2011).

L. monocytognes é encontrada em diversos alimentos, no início da sua descoberta os surtos de listerioses estavam relacionados a leites e derivados, como queijos. Hoje em dia é sabido que ela pode ser contaminante de diversos tipos de alimentos, como na Tabela 2.

Tabela 2 – Ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos

Amostra	Autor
Carne de porco cozida	(Chen, Wu, Zhang, Yan, et al. 2014)
Produtos de carne	(Chen, Wu, Zhang, Yan, et al. 2014; Garrido, Vitas, and García-Jalón 2009; Kramarenko et al. 2013)
Vegetais em molho	(Chen, Wu, Zhang, Yan, et al. 2014)
Mix de salada	(Sant'Ana et al. 2012)
Alface	(Sant'Ana et al. 2012)
Mix Para Yakisoba	(Sant'Ana et al. 2012)
Escarola	(Sant'Ana et al. 2012)
Repolho	(Sant'Ana et al. 2012)
Espinafre	(Sant'Ana et al. 2012)
Mix para sukiyaki	(Sant'Ana et al. 2012)
Frutas e Vegetais	(Kramarenko et al. 2013)
Grãos	(Kramarenko et al. 2013)
Peixe frescos e defumados	(Garrido, Vitas, and García-Jalón 2009; Kramarenko et al. 2013)Garrido et al, 2009
Leite	(Kramarenko et al. 2013)
Derivados de leite	(Kramarenko et al. 2013)Vitas et al, 2009
Carnes Frescas	(Garrido, Vitas, and García-Jalón 2009)
Vegetais congelados	(Garrido, Vitas, and García-Jalón 2009)

2.6 Surtos vinculados aos cogumelos

Não foram registrados surtos relacionados ao consumo de cogumelos, apenas um registro que um homem de 80 anos de idade após consumir cogumelos salgados apresentou um quadro de septicemia por *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes*

foi encontrada nestes cogumelos com uma contagem de 10^6 CFU (Junttila and Brander 1989).

No Brasil o consumo de cogumelos tem aumentado junto com o cultivo, porém até o momento não foram observados estudos avaliando qualidade das amostras brasileiras e nem dos processos de cultivos e processamento de cogumelos. Estudos com foco em avaliar a qualidade microbiológica destes alimentos, irão contribuir para obtermos alimentos mais seguros e de qualidade.

3.Objetivos

3.1 Objetivo geral

Determinar a qualidade microbiológica dos cogumelos comercializados na cidade de Campinas, SP e avaliar os parâmetros cinéticos de crescimento e inativação da *L. monocytogenes*.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar Bactérias mesófilas, bactérias psicotróficas, Bactérias ácido-lácticas, Enterobacterias, bolores e levedura nos cogumelos comercializados nos supermercados da cidade de Campinas, SP
- Determinar a incidência *L. monocytogenes* nos cogumelos comercializados na cidade de Campinas, SP
- Determinar os parâmetros cinéticos de crescimento e inativação de *L. monocytogenes* artificialmente inoculados em Shimeji branco e Shimeji preto durante a estocagem entre 5-30°C, utilizando-se o modelo preditivo de Barany e Biglow. Avaliar a influência da temperatura sobre os parâmetros cinéticos estudados, utilizando-se um modelo secundário.

CAPÍTULO 1

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE COGUMELOS E MODELAGEM DO
COMPORTAMENTO DE *Listeria monocytogenes* EM *Pleurotus ostreatus* var.
BRANCO E PRETO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

MICROBIOLOGICAL QUALITY OF MUSHROOMS AND MODELING OF *Listeria*
monocytogenes BEHAVIOR IN *Pleurotus ostreatus* var. WHITE AND BLACK IN
DIFFERENT TEMPERATURES

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista
“Food Control”

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE COGUMELOS E MODELAGEM DO
COMPORTAMENTO DE *Listeria monocytogenes* EM *Pleurotus ostreatus* var. BRANCO E
PRETO EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

Viny Xavier Lanza¹, Rafaela de Carvalho Baptista¹, Marcela Capuzzo Alvarez¹, Anderson de
Souza Sant'Ana^{1*}

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil

*Autor correspondente: Prof. Anderson de Souza Sant'Ana: and@unicamp.br

Rua Monteiro Lobato, 80. Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862. Campinas,
SP, Brasil

Resumo

Foram avaliadas 195 amostras de 5 espécies de cogumelos frescos vendidos nos supermercados e distribuidores da cidade de Campinas, SP para quantificar Bactérias aeróbicas mesófilas, Enterobacterias, Bactérias ácido lácticas, Bacterias psicrotróficas e bolores e leveduras e presença de *Listeria monocytogenes*. As contagens médias variaram de 1,9 a 7,9 log CFU/g, sendo para Enterobactérias para shitake e psicrotróficos para porto belo respectivamente. O cogumelo com maior carga microbiológica foi o Shimeji preto. Foi isolado *Listeria monocytogenes* de 1 (0.51%) amostra de shimeji preto. Ambos cogumelos foram um meio ideal para o crescimento da *L. monocytogenes*. A *L. monocytogenes* em 20 e 30°C em shimeji preto se multiplica rapidamente, obtendo-se os resultados de $0,141 \pm 0,001$ e $0,282 \pm 0,032$, há uma diferença significativa ($p < 0,05$) para o crescimento dos cogumelos em 20 e 30°C, após esta faixa de temperatura há uma redução na taxa e a 5°C não é suportada a sobrevivência da *L. monocytogenes* no shimeji branco e no shimeji preto obteve-se um valor de μ de $0,007 \pm 0,002$. Para λ obteve-se valores sem diferença significativa, apresentando um tempo de adaptação parecido entre os dois tipos de cogumelos. Os valores de κ obtiveram uma maior população no shimeji branco tendo um máximo de $8,19 \pm 0,200$ log CFU/g. O modelo da raiz quadrada foi ajustado aos dados obtidos e podemos observar que o shimeji preto sofreu muito mais influência da temperatura que o shimeji branco e para o tempo de adaptação foi observado o mesmo comportamento. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que em cogumelos comercializados na região de Campinas, SP podem abrigar a *L. monocytogenes* e sustentar seu crescimento.

1. Introdução

Os cogumelos comestíveis são as estruturas frutíferas de espécies fúngicas que podem crescer no solo ou acima dele. Os cogumelos comestíveis são

amplamente consumidos a nível mundial devido a seu reconhecido valor nutricional (Agrahar-Murugkar and Subbulakshmi 2005; Mocan et al. 2018) sabor (Aisala et al. 2018; Kong et al. 2019) e compostos que promovem benefícios à saúde (Amirullah, Zainal Abidin, and Abdullah 2018; Sande et al. 2019)

Mais de 2 mil espécies de cogumelos já foram catalogadas, porém, em torno de 25 espécies têm sido produzidas comercialmente, sendo largamente consumidas em diferentes países do mundo (Miles and Chang 2008). Os cogumelos mais estudados e conhecidos são o *Agaricus bisporus* (cogumelo botão branco), cuja origem é europeia, *Pleurotus ostreatus* (cogumelo ostra) e *Lentinula edodes* (shiitake), que possuem origem asiática (Chang and Wasser 2012; Manzi, Aguzzi, and Pizzoferrato 2001; Wasser 2003).

Apesar da produção comercial dos cogumelos comestíveis envolver diversas práticas modernas (Sánchez 2004), a manutenção de sua qualidade ao longo da comercialização, estocagem e consumo ainda é um desafio (Azevedo et al. 2017; Burton and Noble 1993; Jacobsson, Bower, and Amos 2001; Li et al. 2019; Roy, Anantheswaran, and Beelman 1995; Wu et al. 2015a). Devido às técnicas de produção e composição, os cogumelos são susceptíveis a deterioração causada por microorganismos, sendo que a microbiota dominante parece ser composta por bactérias Gram-negativas, representadas principalmente por *Pseudomonas* (Fermor 1987; Qiu et al. 2019; Rossouw and Korsten 2017), com contagens variando de aproximadamente 10^3 até 10^9 UFC/g (Venturini et al. 2011). *Pseudomonas* é uma bactéria psicrotrófica, capaz de se multiplicar em baixas temperaturas, causando uma deterioração conhecida como “descoloração marrom” (“*brown discoloration*”) (Abou-Zeid 2012), que leva ao descarte ou a perda de valor de mercado dos cogumelos (Fermor 1987). As contagens de *Pseudomonas* tendem a aumentar quanto maior a

temperatura de estocagem (Santana, Vanetti, and Kasuya 2008) e quanto maior a manipulação pós-colheita dos cogumelos comestíveis (H. Jiang et al. 2018). Apesar disso, sabe-se que o microbioma cultivável dos cogumelos comestíveis parece ter um papel relevante para evitar a multiplicação de bactérias patogênicas (Chen et al. 2014; Rossouw and Korsten 2017; Strawn et al. 2013). Todavia, devido à necessidade de prevenir/controlar a ocorrência de doenças pós-colheita dos cogumelos comestíveis (Fermor 1987), pode ocorrer perturbação do balanço do microbioma devido as intervenções aplicadas (Carrasco et al. 2019; H. Jiang et al. 2018; Rossouw and Korsten 2017).

Devido a estocagem e comercialização dos cogumelos comestíveis ocorrer à temperatura de refrigeração, no caso de perturbação do equilíbrio da microbiota natural, bactérias patogênicas psicrotróficas tais como *Listeria monocytogenes* poderiam encontrar condições adequadas para multiplicação, culminando em potencial risco à saúde pública se o produto for consumido sem cozimento (Buchanan et al. 2017). *L. monocytogenes* tem distribuição ubíqua no ambiente, incluindo instalações de processamento de alimentos (Tan et al. 2019). Esta bactéria tem sido isolada de cogumelos cultivados (Leong, Alvarez-Ordóñez, and Jordan 2014; Samadpour et al. 2006), como *Agaricus bisporus*, *Velutipes Flammulina* (Pennone et al. 2018; Wu et al. 2015b), assim como de cogumelos selvagens, tais como *Boletus edulis*, *Calocybe gambosa*, *Hygrophorus limacinus* e *Lactarius deliciosus* (Venturini et al. 2011). Além de ser isolada do próprio cogumelo, a *L. monocytogenes* está presente dentro das unidades de cultivo de cogumelos comestíveis (Chen et al. 2014; Murugesan et al. 2015; Viswanath et al. 2013). Adicionalmente, *L. monocytogenes* tem demonstrado capacidade de multiplicação em uma grande variedade de alimentos (Bover-Cid et al. 2019; Sant'Ana, Franco, and Schaffner 2012; Schwartzman et al.

2014; Scolforo et al. 2017). Apesar de sua incidência e potencial para multiplicação nos cogumelos comestíveis, até o momento somente um caso de infecção relacionado ao consumo de cogumelos comestíveis foi reportado (Junttila and Brander 1989).

Apesar de seu amplo consumo a nível mundial, são escassos os estudos sobre a qualidade microbiológica (Rossouw and Korsten 2017; Venturini et al. 2011) e inexistem estudos sobre a prevalência e os parâmetros cinéticos de multiplicação de *L. monocytogenes* em diferentes cogumelos comestíveis estocados numa ampla faixa de temperatura em que estes produtos são comercializados. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar a qualidade microbiológica de cogumelos de diferentes espécies comercializados na cidade de Campinas, SP – Brasil. Além disso, a prevalência e parâmetros cinéticos de multiplicação de *L. monocytogenes* inoculados em shimeji branco (*Plerotus ostreatus* var. White) e shimeji preto (*Plerotus ostreatus* var. black) estocados entre 5-30°C.

2 Material e métodos

2.1. Amostragem

Um total de 195 amostras de 5 tipos de cogumelos frescos de diferentes marcas e lotes foram analisadas, conforme mostrado na *Tabela 1*. Os cogumelos embalados em bandejas envoltas por filmes de PVC foram adquiridos em diferentes mercados de varejo e de rua localizados na cidade de Campinas, SP, Brasil, no período de julho de 2017 a novembro de 2018. Após a coleta, as amostras foram transportadas para o laboratório e armazenadas sob refrigeração e analisadas em até 48h após armazenamento.

2.1.1 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas incluíram a enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, bactérias aeróbias psicrótróficas, enterobactérias, bactérias lácticas, bolores e leveduras e detecção de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*. As análises foram conduzidas utilizando-se os métodos preconizados pela ISO: ISO 4833:2003, ISO 17410:2001, ISO 21528-2:2004, ISO 15214:1998, ISO 7954:1998, ISO 7954:1998, e ISO 11290-1:1996 (Anon, 1996, 1998, 2001, 2003, 2004, 2008). Antes da abertura, as embalagens foram desinfectadas com álcool 70% e então um total de 25 gramas de amostra foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada 0.1% estéril (Neogen, Michigan, EUA). Diluições decimais seriadas foram preparadas usando-se 9 mL de água peptonada 0.1% estéril, seguindo-se plaqueamento por *pour plate* em Plate count agar – PCA (Neogen, Michigan, EUA), Violet Red Bili Glucose ágar – VRBG (Merck, Darmstadt, Alemanha), Man, Rogosa e Sharpe agar - MRS - com sobrecamada (Merck, Darmstadt, Alemanha), para enumeração de bactérias aeróbias mesófilas, enterobactérias e bactérias lácticas, respectivamente. Já para enumeração de bactérias aeróbias psicrótróficas e bolores e leveduras, utilizou-se a técnica de spread plate com os meios PCA e Dichloran Rose Bengal Chlortetracycline – DRBC (Merck, Darmstadt, Alemanha), respectivamente. As placas para contagem de bactérias aeróbias mesófilas e bactérias lácticas foram incubadas a 30°C/48h, enquanto as placas para contagem de enterobactérias, bactérias aeróbias psicrótróficas e bolores e leveduras foram incubadas a 37°C / 24h, 7°C / 10 dias e 25°C / 5 dias, respectivamente.

Para detecção de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* utilizou-se 225 mL de Half-Fraser (HF) (Merck, Darmstadt, Alemanha) contendo o suplemento seletivo (SR0166, Oxoid, Basingstoke, UK), seguindo-se incubação a 30°C por 24 horas.

Então, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para tubos contendo Fraser Broth (FB) (Merck, Darmstadt, Alemanha), seguindo-se incubação a 37 ± 1 °C/48h. Uma alçada do FB foi semeada em placas de ágar Palcam (Oxoid, Basingstoke, UK) e Oxford (Oxoid, Basingstoke, UK) contendo suplementos seletivos (SR0150 e SR0140, respectivamente - Oxoid, Basingstoke, UK). As placas foram então incubadas a 37 ± 1 °C /48h e até cinco (n=5) colônias típicas foram selecionadas e semeadas em Tryptic soy agar suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE - Neogen, Michigan, EUA), seguindo-se incubação a 37°C/24h. A confirmação de *L. monocytogenes* foi realizada por testes bioquímicos (Anon, 1996) e por polymerase chain reaction (PCR) para amplificação do gene da listeriolisina (*hlyA*), utilizando os primers A (TAG CAT TGG AAA GAT GGA ATG) e B (TCC GTA TCC AGA GTG ATC GA) (Blais et al., 2008).

2.2 Determinação dos parâmetros cinéticos de multiplicação de *L. monocytogenes* em shimeji branco (*Plerotus ostreatus* var. White) e shimeji preto (*Plerotus ostreatus* var. black)

2.2.1. Cepa de *L. monocytogenes* e preparo da suspensão de células

L. monocytogenes ATCC 7644 foi utilizada no presente estudo. Para o preparo de suspensão de células, *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi ativada em 10 mL de Tryptic Soy Broth (TSB) (Neogen, Michigan, EUA) suplementado com 0.6% de extrato de levedura (TSB-YE) (Neogen, Michigan, EUA), seguindo-se incubação a 37°C por 24 horas. Posteriormente, os 10 mL de TSB-YE foram transferidos para 90 mL de caldo TSB-YE, seguindo-se incubação a 37°C por 12 horas. Após o período de incubação, os 100 mL de TSB-YE foram centrifugados a $2,810 \times g$ à 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado e a massa de células foi lavada com solução salina 0,85% (Sigma Aldrich, St Louis, EUA). As etapas de centrifugação,

lavagem e ressuspensão foram repetidas três vezes e a concentração final de células foi ajustada em 10^8 UFC/mL a uma densidade óptica 0,630 (OD_{630}) e confirmada por contagem em Palcam ágar (Sant'Ana et al. 2012, 2013; Sant'Ana, Franco, and Schaffner 2012).

2.2.2. Amostras de shimeji branco e shimeji preto, procedimentos de inoculação e enumeração de *L. monocytogenes* ao longo da estocagem

As amostras de shimeji branco e shimeji preto foram adquiridas em distribuidor central de frutas hortaliças localizado na cidade de Campinas, SP, Brasil. As amostras foram cortadas com um auxílio de uma tesoura esterilizada sob condições assépticas e foram colocadas em sacos plásticos esterilizados e armazenados a 5°C até a inoculação com *L. monocytogenes*. As amostras foram submetidas a análise para confirmar ausência de *L. monocytogenes*, conforme ISO 11290-2:1996 (Anon, 1996)

As amostras de shimeji branco e shimeji preto foram imersas em água destilada estéril contendo suspensão de células de *L. monocytogenes* (proporção 500 mL de inóculo para 200 g de cogumelo). Os cogumelos foram deixados imersos por 15 minutos na solução, sendo posteriormente retirados e o excesso de líquido removido com auxílio de centrífuga manual (Le Bisquit, China). A concentração de células de *L. monocytogenes* nos cogumelos obtida foi $10^2 - 10^3$ UFC/mL. Posteriormente, as amostras inoculadas de cogumelos foram dispostas em sacos plásticos estéreis (tipo-stomacher) e armazenadas à 5, 12, 20 e 30°C. Em diferentes tempos, amostras de 10 gramas de cada cogumelo (e de cada temperatura de armazenamento) foram homogeneizadas em 90 ml de água peptonada tamponada seguindo-se homogeneização em aparelho tipo-stomacher, diluições seriadas e plaqueamento por *spread plate* em ágar Palcam e incubação 37°C por 48 horas.

Após o período de incubação, colônias características de *L. monocytogenes* foram contadas e os resultados expressos como UFC/g. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes.

2.2.3 Modelagem dos parâmetros cinéticos de multiplicação de *L.*

monocytogenes em shimeji branco e shimeji preto

O modelo de Baranyi foi utilizado para ajustar os dados de multiplicação de *L. monocytogenes* em shimeji branco e shimeji preto estocados a 5, 10, 20 e 30 °C (Barany e Roberts, 1994) (Eqs. (1), (2), (3) usando o DMFit versão 2.1 do Excel® add-in (www.ifr.ac.uk/safety/DMfit).

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{max}A(t) - \ln \left[1 + \frac{e^{\mu_{max}A(t)} - 1}{e^{(N_{max} - N_0)}} \right] \quad (1)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left(\frac{e^{(-\mu_{max}t) + q_0}}{1 + q_0} \right) \quad (2)$$

$$\lambda = \frac{\ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right)}{\mu_{max}} \quad (3)$$

Uma vez que os parâmetros cinéticos de multiplicação de *L. monocytogenes* foram determinados, o modelo de Ratkowsky (Ratkowsky et al., 1982) foi usado para descrever μ e λ em uma função da temperatura de estocagem (Eq. (4)):

$$\sqrt{r} \text{ or } \ln(\lambda) = b \times (T - T_{min}) \quad (4)$$

O Modelo de Bigelow foi utilizado para ajustar os dados para de inativação de *L. monocytogenes* em shimeji branco e shimeji preto estocados a 5, 10, 20 e 30 °C (Bigelow and Esty, 1920) (Eqs. (5) utilizando GlnaFIT Versão 1.6 Excel® add-in (<https://cit.kuleuven.be/biotec/software/GlnaFit>).

$$\log_{10} N(t) = \log_{10} N(0) - \frac{t}{D} \quad (5)$$

2.3 Análises estatísticas

Os dados de contagem das análises microbiológicas foram expressos em gráfico de box plot utilizando o software R-Studio e verificada a diferença estatística significativas ($p \leq 0,05$) das médias das contagens de cada grupo de microrganismos e cogumelos utilizando a análise de variância de fator único (ANOVA) seguida do teste de Scott-Knott. As análises estatísticas foram realizadas no software SISVAR versão 5.6 (Ferreira 2014).

Os parâmetros cinéticos de multiplicação de *L. monocytogenes* foram verificados quanto a diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) empregando uma análise de variância de fator único (ANOVA) seguida do teste de Scott-Knott. As análises estatísticas foram realizadas no software SISVAR versão 5.6 (Ferreira 2014).

3. Resultados

3.1. Análises microbiológicas

A figura 1 mostra a contagem de microrganismos mesófilos, enterobactérias, bactérias lácticas, bactérias aeróbicas psicotróficas e bolores e leveduras encontradas nas amostras de cogumelos frescos.

A contagem de micro-organismos mesófilos variou de 2,7 a 9,7 log UFC/g, as espécies *P. ostreatus* var. Shimeji preto (BS) e *A. bisporus* var. Portobello (PB) foram as espécies com maior contaminação, a média de microrganismos mesófilos encontrada foram de 8 e 8.3 log UFC/g, respectivamente. *P. ostreatus* brasileiros tem uma contagem maior tendo uma variação de 3 log UFC/g, . *A. bisporus* (WB) e *P. ostreatus* var. cogumelo ostra (OM) apresentaram uma contaminação intermediária neste estudo, tendo uma média de 6,9 e 6,6 log UFC/g respectivamente).

As bactérias aeróbicas psicotróficas estavam presentes em grande quantidade, todas as espécies apresentaram alta carga microbiana, algumas espécies

ultrapassaram 9 log UFC/g, as médias variaram de 3,1 a 7,9 log UFC/g. O ST teve a menor carga, tendo uma variação de 2,2 a 4,3 log UFC/g, sendo que em algumas amostras não foram detectadas a presença destes microrganismos ou continha uma carga menor de 100 UFC/g. O OM e o WB apresentaram uma contaminação intermediária correlacionada com as demais espécies, apresentando uma média de 6,7 e 6,9 log UFC/g respectivamente. O BS e o PB foram o que apresentaram maior carga de contaminação de bactérias aeróbicas psicrófilas, as médias foram de 7,7 e 7,9 log UFC/g respectivamente.

A maioria das espécies teve uma alta carga de enterobactérias, porém com uma variação muito grande dentro da própria espécie fazendo com que a média ficasse baixa. A carga microbiana variou de 1 a 8,7 log UCF/g. Enterobactérias não foram detectadas no *L. edodes*, apenas uma amostra obteve a contagem de 1,9 log UFC/g, demonstrando uma carga muito menor que os da Espanha. A carga de enterobactérias apresenta uma variação de 3,2 a 7,7 log UFC/g, sendo que algumas amostras não foram detectadas estes microrganismos. Os cogumelos BS e PB apresentaram a maior contaminação com as médias de 6,4 e 5,7 log UFC/g respectivamente.

As bactérias ácido lácticas apresentaram contagens médias de 5,7 a 3,3 UFC/g. A carga microbiana variou de <10 a 8,2 UFC/g. O PB e o OS apresentaram maior contagem de bactérias ácido lácticas, apresentando uma média de 5,0 e 5,7 UFC/g respectivamente. E o ST e o WB apresentaram uma média de 3,3 UFC/g, sendo os cogumelos que apresentaram menor contagem para bactérias ácido lácticas.

As amostras apresentaram quantidades baixas de bolores e leveduras, apresentando uma média de 2,3 a 5,0 log UFC/g, o BS foi o que apresentou maior

contagem (5,0 log UFC/g) seguido do ST (4,5 log UFC/g) e OM (4,3 log UFC/g), a espécie *A. bisporus* apresentou a menor contaminação.

L. monocytogenes foi detectada em 0,51% das amostras, apenas o BS estava contaminado por este microrganismo conforme a Tabela 2.

3.2. Modelagem do crescimento de *Listeria monocytogenes*

A escolha do Shimeji Branco e Shimeji preto, foi pela presença de *Listeria spp.* durante as análises da qualidade microbiológica somente nesse tipo de cogumelo.

A figura 2 apresenta as curvas de crescimento de *Listeria monocytogenes* em cogumelos das variedades de *shimeji preto* e *shimeji branco*, sob diferentes condições de temperaturas. As curvas foram ajustadas ao modelo de Barany e Roberts obtendo-se os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 3. Nas amostras controles não foram observados crescimento de *L. monocytogenes*. A população inicial de *L. monocytogenes* foi de 3 log UFC/g com valores de população máxima na faixa de 5.81-8.19 log CFU/g.

As curvas de crescimento apresentaram um bom ajuste ao modelo com valores de R^2 superiores a 0.96. Todos os parâmetros cinéticos: densidade populacional máxima (Nmax), taxa de crescimento (μ) e tempo de adaptação (λ) foram significativamente correlacionados com a temperatura ($P < 0,05$). De maneira geral, para ambas as variedades de Shimeji, foi possível observar que o aumento da temperatura conduziu à elevação da taxa de crescimento do patógeno (na faixa de temperatura de 12 a 30 °C) e à redução do tempo de adaptação (na faixa de temperatura de 5 a 20 °C). Em relação à densidade populacional máxima, observou-se os maiores valores Nmax na faixa de temperatura entre 12 e 20 °C.

A variedade de Shimeji também influenciou nos valores de μ e N_{max} , observando-se que temperaturas superiores a 20 °C, o shimeji preto apresentou as maiores taxas de crescimento; enquanto na faixa de temperatura entre 12 e 30 °C, observou-se os menores valores de N_{max} , quando comparado com o shimeji branco. O shimeji branco não sustentou crescimento na temperatura de 5°C e apresentou um K_{max} de 0,05 e um valor D de 46,05 horas, os valores estão presentes na tabela 6.

O modelo secundário (Figura 3) para listeria foi derivado do modelo secundário da raiz quadrada. O modelo descreve a relação dos parâmetros de crescimento e tempo de lag e a temperatura para o crescimento de *L. monocytogenes* em cogumelos armazenados entre °C, são mostrados na Tabela 5

4. Discussão

4.1. Análises microbiológicas

O presente estudo avaliou a carga microbiológica de cogumelos comercializados nos pontos de venda (atacado e varejo) da cidade de Campinas. Essa informação é particularmente relevante para avaliar a qualidade e o nível de segurança do produto comercializado, além de contribuir para a escassa literatura sobre os níveis microbiológicos do produto vendido no varejo.

No presente trabalho, elevadas contagens foram observadas para mesófilos e psicotróficos, sendo superiores aos encontrados na literatura (tabela 4), cujas contagens variaram entre 3,16 a 5 Log CFU/g (com exceção de Han et al. 2015) e 1,63 a 3,35 Log CFU/g, respectivamente. Comparando com a literatura, observa-se que os cogumelos adquiridos junto aos produtores obtiveram as menores contagens, seguido pelo cogumelo colhido em bosque, e a maior carga microbiológica foi observada para os cogumelos adquiridos nos pontos de comercialização. Segundo

Han et al. (2015), o local de colheita e o processamento são fatores que podem influenciar na carga microbiológica inicial obtida.

Apesar da legislação brasileira não determinar um limite máximo para a contagem dos micro-organismos estudados, elevados níveis de mesófilos e psicotróficos em cogumelo, populações microbianas entre 7-8 log UFC/g, estão associados à deterioração microbiana, resultando em escurecimento e amolecimento do tecido (T. Jiang, Feng, and Li 2012). Estes resultados foram observados para todas as variedades, com exceção de ST.

Apesar das elevadas contagens de mesófilos e psicotróficos, conforme as informações de rotulagem das amostras, todos os produtos foram adquiridos no primeiro dia de fabricação e apresentavam uma vida útil de 10 dias. Considerando que o cogumelo é um alimento altamente perecível e sua vida útil varia de 1-3 dias úteis em temperatura ambiente, e pode ser armazenado por 7 a 8 dias sob refrigeração (Fernandes et al. 2013). Com exceção para o cogumelo *Pleurotus eryngii* que pode apresentar uma vida de prateleira de 15 a 18 dias (Park and Jhune 2010). Podemos esperar que a data de fabricação das amostras analisadas realmente corresponda ao dia da colheita do cogumelo junto ao produtor ou um dia posterior.

Deste modo, pode-se assumir que as elevadas contagens de mesófilos nas amostras analisadas são um indicativo das condições higiênicas sanitárias inadequadas em alguma(s) etapa(s) na cadeia de produção (Cardoso et al. 2005). Como o cogumelo não foi avaliado junto ao produtor, não é possível afirmar se as práticas sanitárias inadequadas são oriundas do processo produtivo e/ou do local de comercialização.

Sabe-se que o cogumelo é um alimento altamente perecível, perdendo imediatamente a sua qualidade no período pós colheita (Fernandes et al. 2013). Deste

modo, as condições higiênico sanitárias são fatores críticos para fornecer cogumelos seguros e de qualidade ao mercado consumidor, e devem ser mantidas ao longo de toda a cadeia, desde a colheita até a venda no varejo. Isto implica ter um controle rigoroso da cadeia de frio, o elemento chave para inibir a multiplicação microbiana e a atividade enzimática, o controle da umidade e das condições de manipulação higiênica. O controle deste último fator pode evitar novas fontes de contaminação ou o aumentar da carga microbiana existente (LaBorde, 2002; EC, 2005)

As elevadas contagens de mesófilos não estão associadas a um risco à saúde, mas sua presença está relacionada com a taxa de degradação do produto, sendo facilmente afetada por sua carga microbiológica inicial. Elevadas contagens microbiológicas em cogumelos resultam em manchas escuras e a rápida deterioração (T. Jiang, Feng, and Li 2012). O principal micro-organismo deteriorante de cogumelos são bactérias psicotróficas gram-negativas, em particular a família *Pseudomonadaceae* (T. Jiang, Feng, and Li 2012). Vários gêneros de *Pseudomonas* estão associados ao composto e aos diferentes materiais de cobertura do solo (Colauto and Eira 1998). As *Pseudomonas* são responsáveis por ocasionar a descoloração da superfície, que posteriormente se transformam em manchas marrons escuras (Rainey, Brodey, and Johnstone 1992). A espécie *Pseudomonas tolaasii* é reconhecida como o principal deteriorante em quase todas as espécies de cogumelos, sendo responsável pela produção da toxina tolaasin e compostos orgânicos voláteis. A toxina está associada ao efeito de descoloração do produto (Cantore, Giorgio, and Iacobellis 2015).

A presença de leveduras e bolores no presente estudo está próxima ao relatado na literatura (tabela 4). Um índice elevado nos alimentos também pode indicar condições higiênicas deficientes de equipamentos, falha no processamento ou armazenamento e matéria prima com contaminação excessiva (Siqueira 1995).

Diversas espécies de fungos têm sido isoladas em cogumelos, tais como: *Aspergillus spp.*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Talaromyces spp.*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Mucor spp.* e outras *Mucorales* (Jonathan 2010; Rokni and Goltapeh 2019; Soković and van Griensven 2006). As espécies de *Aspergillus spp.* (*A. flavus*, *A. parviscleroti*, *A. tamari* e outras espécies de *Aspergillus*) destacam-se como as de maior ocorrência e contagens, observando-se valores próximos de 3 log CFU/g (Ezekiel et al. 2013). A degradação de cogumelos pelas espécies de *Aspergillus* é devido a produção de uma ampla gama de enzimas responsáveis pela degradação dos tecidos da planta. Apesar do gênero *Aspergillus* ser um produtor de micotoxinas, sua presença no alimento não implica na produção da toxina (Ezekiel et al. 2013).

As contagens de Enterobactérias e Bactérias ácido lácticas (BAL) também foram determinadas, mas não foram encontrados muitos artigos para comparação dos resultados. Enterobactérias é uma bactéria gram negativa que tem sido identificada em amostras de solo, mesmo após o tratamento de descontaminação do composto (Malheiros, Paula, and Tondo 2007). Segundo Peters et al. (2000), as enterobactérias são bactérias importantes no adubo, auxiliando na complementação da fixação do nitrogênio e na solubilização e disponibilização de fósforo. Contudo, sua presença no solo contribui para sua colonização no cogumelo, tornando-se um contaminante na pós colheita (Cho et al. 2003). Em relação aos valores de BAL, o valor encontrado foi superior ao observado por Venturini et al. (2011) e Wang, Chu, Kou (2017). Segundo (Wang, Chu, and Kou (2017), as BALs normalmente apresentam baixas contagens devido a inibição das mesmas pela microbiota antagonista. Esta microbiota associada é capaz de metabolizar com maior eficiência os nutrientes, crescendo e se multiplicando com maior velocidade, adquirindo vantagens sobre as BAL. (Wang, Chu, and Kou 2017).

O cogumelo é um alimento altamente perecível, perdendo imediatamente a sua qualidade no período pós colheita (Fernandes, Antonio, Oliveira, Martins, & Ferreira, 2012; Jiang et al., 2011; Wrona, Bentayeb, & Nerín, Nasiri 2015). Sua elevada atividade metabólica, caracterizada pela alta taxa respiratória e elevada atividade enzimática (proteases e polifenoloxidasas), bem como a falta de proteção física contra a perda de água e o ataque microbiológico (Fattahifar, 2018; Jiang, 2010) são os fatores que contribuem para sua rápida deterioração, limitando a sua comercialização e seu valor econômico.

A microbiota deterioradora é oriunda do solo e facilmente se multiplica nos cogumelos devido o pH neutro, a elevada umidade (85%–95%) e a abundância de nutrientes Wang 2017 Kumar, Singh, & Singh, 2013 Zang 2018.

4.2. Isolamento de *L. monocytogenes* em cogumelos

Existe pouca informação sobre a presença de *Listeria monocytogenes* em cogumelos comercializados, a maioria dos estudos relatam uma frequência relativa na faixa de 1 a 6,5 % (Samadpour et al. 2006; Venturini et al. 2011; Viswanath et al. 2013), sendo a maior prevalência relatado por Wu et al. (2015) em cogumelos frescos comercializados na China, com uma porcentagem de 23.2%, particularmente na variedade de *Flammulina velutipes*. Os valores relatados na literatura são superiores ao encontrado no presente trabalho de 0,51% observada na variedade BS. A presença de *L. monocytogenes* é de extrema relevância para a segurança alimentar, por aumentar o risco de listeriose, uma doença severa que pode causar meningite, encefalite, septicemia, aborto e apresenta taxa de mortalidade entre 20-30% nos pacientes infectados (WHO/FAO, 2004; Abdollahzadeh et a., 2017).

A *Listeria spp* está amplamente distribuída no cultivo de cogumelos, ela pode contaminar os cogumelos em qualquer etapa do seu cultivo (Murugesan et al. 2015 e

Viswanath et al. 2013). Os cogumelos podem ser contaminados devido as práticas de higiene e saneamento inadequada dos manipuladores no período de colheita ou pós colheita, indicando falhas na segurança e qualidade do produto (LaBorde, 2002). O potencial para o desencadear um surto de origem alimentar agrava-se pelo fato do patógeno crescer nas temperaturas de refrigeração durante a estocagem e por ser capaz de tolerar a atmosfera da embalagem rica em CO₂ e pobre em O₂ (González-Fandos et al. 2001).

4.3 Modelos preditos para *L. monocytogenes* em cogumelos frescos

Conforme relatado, *L. monocytogenes* pode ser isolada de amostras de cogumelos frescos o que pode resultar em um risco a saúde do consumidor e contribuir para surtos de origem alimentar. Neste sentido, no presente estudo, modelos matemáticos foram desenvolvidos para prever o comportamento do patógeno no alimento e poder garantir a segurança alimentar ao consumidor.

Para o estudo dos modelos de crescimento, as amostras de shitake preto e branco foram inoculadas com 10³ CFU/g de *L. monocytogenes*, a fim de simular a contagem inicial obtida nas amostras de cogumelo analisadas. A temperatura foi escolhida como variável a ser estudada, por ser um dos fatores ambientais mais importantes no desenvolvimento de *L. monocytogenes*. Um abuso/flutuação das temperaturas nos pontos de comercialização ou transporte podem contribuir para o crescimento do patógeno e afetar a segurança do produto.

As curvas de crescimento de *L. monocytogenes* foram modeladas até o final da fase estacionária conforme o modelo de Baranyi and Roberts (1994), sendo obtido altos valores de R² > 0.96 o que indica o bom ajuste dos dados experimentais ao modelo estatístico. Conforme esperado, verificamos a dependência da temperatura com os parâmetros cinéticos de crescimento, observando que o aumento da

temperatura de armazenamento contribuiu para a elevação das taxas de crescimento exponencial, bem como para a redução do tempo de adaptação dos micro-organismos ao meio.

O patógeno é capaz de se multiplicar em ambientes com temperaturas entre -0,4 e 45°C, apresentando temperaturas ótimas de crescimento entre 30 a 37 °C (Guenther et al., 2009). Essa faixa de temperatura (30 a 37 °C) corresponde as maiores taxas de crescimento por ser a faixa de atividade ótima de suas enzimas, contribuindo para o metabolismo acelerado (Lado and Yousef 2007). Portanto, quanto maior a temperatura de armazenamento, maiores as taxas de multiplicação. Destaca-se que na faixa de temperatura de 5 a 12 °C há o aumento da taxa de crescimento de 0,018 h⁻¹, porém não significativo ($p < 0,05$). Pode-se sugerir que a microbiota indígena do meio supere a habilidade do patógeno em se multiplicar nas temperaturas de refrigeração.

Por outro lado, a redução da temperatura prolonga a tempo e adaptação devido a inibição das enzimas, o que conduz a um metabolismo reduzido, ou devido à injúrias provocadas na célula (Malheiros, Paula, and Tondo 2007). Destaca-se que o aumento de temperatura na faixa de 20 a 30 °C resultou na redução no tempo de adaptação de *L. monocytogenes*, porém não significativo ($p < 0,05$). A resistência às baixas temperaturas depende de um sistema de transporte de elétrons resistente ao frio, sendo capaz de manter o metabolismo sobre baixas temperaturas e produzir altas concentrações de substratos intracelulares (Germano and Germano, 2008).

Comparando as variedades de cogumelo, na variedade de shimeji preto, *L. monocytogenes* apresentou as maiores taxas de crescimento na faixa de temperatura de 20 a 30 °C, apresentando um μ de 1,66 e 2,29 h⁻¹ vezes maior que o shimeji branco, respectivamente. As diferentes taxas de crescimento podem estar relacionadas a

inibição de *L. monocytogenes* pela microbiota indígena de cada variedade de cogumelo, como elevadas contagens de bactérias ácido lácticas e *enterococcus*, metabolizando e excretando substâncias inibidoras ao crescimento de *L. monocytogenes*. Adicionalmente, diferenças marcadas na densidade populacional máxima foram encontradas nas temperaturas de 12 e 30 °C. A variedade de shimeji branco apresentou maiores valores de *L. monocytogenes*, observando-se um aumento médio de 1,80 log CFU/g. Pode-se sugerir que uma rápida multiplicação do patógeno nas amostras de shimeji preto pode consumir rapidamente os nutrientes do meio e/ou produzir metabólitos que inibem o próprio patógeno, reduzindo a densidade populacional máxima a valores menores em comparação com a variedade de shimeji branco.

Os dados dos parâmetros cinéticos (μ e λ) preditos para *L. monocytogenes* no modelo de Baranyi (1994) foram utilizados para construir o modelo secundário de Ratkowsky et al. (1982). Os modelos da raiz quadrada estão apresentados na Tabela 5. Novamente os gráficos reforçam a dependência da taxa de crescimento e da fase lag com a temperatura de armazenamento, apresentando uma forte correlação linear para a taxa de crescimento de *L. monocytogenes*, com valores de R^2 superiores a 0,97, confirmando a acurácia do modelo para ambas as variedades de cogumelo. O tempo de adaptação apresentou valores de R^2 de 0,87 e 0,98 para a variedade de shimeji preto e branco, respectivamente. Contudo, a taxa de crescimento resultou em melhor ajuste do para o modelo da raiz quadrada em função da temperatura.

O presente trabalho encontrou valores de T_{min} de 1.31 e 4.27 para o crescimento de *L. monocytogenes* nas variedades de shimeji preto e branco, respectivamente encontrados na literatura, com valores na faixa de 0,4 e 1,5 °C, by Guenther et al., (2009) e Lado and Yousef (2007), respectivamente. E para o tempo

de fase lag os valores encontrados de T_{min} forem de 34,59 e 37,70 nas variedades de shimeji preto e branco, respectivamente. As equações estão presentes na tabela 5

5 Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a contagem de diversos microrganismos apresentam-se superiores em todos os tipos de cogumelos, apresentando um tempo de prateleira reduzido e também mostram que o shimeji preto tem a capacidade de abrigar a *L. monocytogenes*. Embora a incidência deste patógeno tenha sido baixa, a presença de *L. monocytogenes* é preocupante, pois os cogumelos apresentam um ótimo substrato para crescimento em uma ampla faixa de temperatura de armazenamento. O crescimento foi mais substancial no shimeji preto, devido a maior concentração de nutrientes em relação ao shimeji branco. Os dados de qualidade microbiológica e de patógenos e surtos em cogumelos são escassos, os dados de qualidade microbiológica, incidência e comportamento de patógenos são de suma importância para desenvolver métodos de cultivo e manipulação para garantir sua segurança e qualidade microbiana.

6.Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

7.Referencias

- Abou-Zeid, Mohamed A. 2012. "Pathogenic Variation in Isolates of Pseudomonas Causing the Brown Blotch of Cultivated Mushroom, Agaricus Bisporus ." *Brazilian Journal of Microbiology* 43: 1137–46.
- Agrahar-Murugkar, D, and G Subbulakshmi. 2005. "Nutritional Value of Edible Wild Mushrooms Collected from the Khasi Hills of Meghalaya." *Food Chemistry* 89(4): 599–603. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604002572>.
- Aisala, Heikki et al. 2018. "Sensory Properties of Nordic Edible Mushrooms." *Food Research International* 109: 526–36.

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918303430>.
- Amirullah, Nur Amalina, Nurhayati Zainal Abidin, and Noorlidah Abdullah. 2018. "The Potential Applications of Mushrooms against Some Facets of Atherosclerosis: A Review." *Food Research International* 105: 517–36. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917307895>.
- Anonymous. 1996. "ISO 11290-2:1996 - Horizontal Methods for the Detection and Enumeration of *Listeria Monocytogenes* Part 2."
- . 1998. "ISO 15214:1998 - Horizontal Methods for the Enumeration of Mesophilic Lactic Acid Bacteria – Colony-Count Technique at 30 °C."
- . 2001. "ISO 17410:2001 - Horizontal Methods for the Enumeration of Psychrotrophic Microorganisms."
- . 2003. "ISO 4833:2003 - Horizontal Methods for the Enumeration of Microorganisms. Colony-Count Technique at 30 °C."
- . 2004. "ISO 21528-2:2004 – Horizontal Methods for the Detection and Enumeration of Enterobacteriaceae."
- . 2008. "ISO 21527-1:2008 - Horizontal Methods for the Enumeration of Yeast and Moulds."
- Azevedo, Sílvia et al. 2017. "Modelling the Influence of Time, Temperature and Relative Humidity Conditions on the Mass Loss Rate of Fresh Oyster Mushrooms." *Journal of Food Engineering* 212: 108–12. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877417302388>.
- Baranyi, József, and Terry Roberts. 1994. "A Dynamic Approach to Predicting Bacterial-Growth in Food." *International journal of food microbiology* 23: 277–94.
- Bigelow, W D, and J R Esty. 1920. "The Thermal Death Point in Relation to Time of Typical Thermophilic Organisms." *The Journal of Infectious Diseases* 27(6): 602–17. <https://doi.org/10.1093/infdis/27.6.602>.
- Blais, B.W., L.M. Phillippe, F. Pagotto, and N. Corneau. 2008. "Identification of Presumptive Positive *Listeria Monocytogenes* from Foods and Environmental Samples by the Polymerase Chain Reaction." *The compendium of analytical methods* 3. www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume3/mflp78-02-eng.php.
- Bover-Cid, Sara et al. 2019. "New Insights on *Listeria Monocytogenes* Growth in Pressurised Cooked Ham: A Piezo-Stimulation Effect Enhanced by Organic Acids during Storage." *International Journal of Food Microbiology* 290: 150–58. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160518307724>.
- Buchanan, Robert L et al. 2017. "A Review of *Listeria Monocytogenes*: An Update on Outbreaks, Virulence, Dose-Response, Ecology, and Risk Assessments." *Food Control* 75: 1–13. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516306892>.
- Burton, K S, and R Noble. 1993. "The Influence of Flush Number, Bruising and Storage Temperature on Mushroom Quality." *Postharvest Biology and Technology* 3(1): 39–47. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/092552149390025X>.

- Cantore, Pietro, Annalisa Giorgio, and Nicola Sante Iacobellis. 2015. "Bioactivity of Volatile Organic Compounds Produced by *Pseudomonas Tolaasii*." *Frontiers in Microbiology* 6.
- Cardoso, A.L.S.P., E.N.C. Tessari, A.G.M. Castro, and A.M.I. Kanashiro. 2005. "Pesquisa de Salmonella Spp, Coliformes Totais, Coliformes Fecais, Mesófilos, Em Carcaças e Cortes de Frango." *Higiene Alimentar* 19: 144–50.
- Carrasco, Jaime et al. 2019. "Casing Microbiome Dynamics during Button Mushroom Cultivation: Implications for Dry and Wet Bubble Diseases." *Microbiology* 165(6): 611–24.
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000792>.
- Chang, Shu-Ting, and Solomon P. Wasser. 2012. "The Role of Culinary-Medicinal Mushrooms on Human Welfare with a Pyramid Model for Human Health." *International Journal of Medicinal Mushrooms* 14(2): 95–134.
- Chen, Moutong et al. 2014. "Prevalence and Contamination Patterns of *Listeria Monocytogenes* in *Flammulina Velutipes* Plants." *Foodborne pathogens and disease* 11(8): 620–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24824447>.
- Colauto, N.B., and A.F Eira. 1998. "Avaliação Quantitativa Da Comunidade Bacteriana Na Camada de Cobertura de *Agaricus Bisporus*. Energia." *Energia na Agricultura* 13: 15–26.
- Ezekiel, C N et al. 2013. "Fungal and Mycotoxin Assessment of Dried Edible Mushroom in Nigeria." *International Journal of Food Microbiology* 162(3): 231–36. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513000718>.
- Fermor, T R. 1987. "Bacterial Diseases of Edible Mushrooms and Their Control." In *Cultivating Edible Fungi*, eds. P J Wuest, D J Royse, and R B B T - Developments in Crop Science Beelman. Elsevier, 361–70. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444427472500439>.
- Fernandes, Ângela et al. 2013. "Effects of Gamma Irradiation on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Lactarius Deliciosus* L. Wild Edible Mushroom." *Food and Bioprocess Technology* 6(10): 2895–2903. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0931-5>.
- Ferreira, Daniel Furtado. 2014. "Sisvar: A Guide for Its Bootstrap Procedures in Multiple Comparisons." *Ciência & Tecnologia em Agrotecnologia* 38: 109–12. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542014000200001&nrm=iso.
- González-Fandos, E. et al. 2001. "Behaviour of *Listeria Monocytogenes* in Packaged Fresh Mushrooms (*Agaricus Bisporus*)." : 795–805.
- Han, Linlei et al. 2015. "Evaluation of Biodegradable Film Packaging to Improve the Shelf-Life of *Boletus Edulis* Wild Edible Mushrooms." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 29: 288–94. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856415000764>.
- Jacobsson, A, J. Bower, and N. Amos. 2001. "QUALITY CHANGES OF MUSHROOMS DURING STORAGE." *Acta Horti* 553: 745–48.

- Jiang, Haiyang et al. 2018. "High Microbial Loads Found in Minimally-Processed Sliced Mushrooms from Italian Market." *Italian journal of food safety* 7(1): 7000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29732334>.
- Jiang, Tianjia, Lifang Feng, and Jianrong Li. 2012. "Changes in Microbial and Postharvest Quality of Shiitake Mushroom (*Lentinus Edodes*) Treated with Chitosan–Glucose Complex Coating under Cold Storage." *Food Chemistry* 131(3): 780–86. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611013045>.
- Jonathan, Gbolagade. 2010. "Fungi and Aflatoxin Detection in Two Stored Oyster Mushrooms (*Pleurotus Ostreatus* and *Pleurotus Pulmonarius*) from Nigeria." *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 9.
- Junttila, Jaana, and Minna Brander. 1989. "Listeria Monocytogenes Septicemia Associated with Consumption of Salted Mushrooms." *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 21(3): 339–42. <https://doi.org/10.3109/00365548909035707>.
- Kong, Yan et al. 2019. "Isolation and Identification of the Umami Peptides from Shiitake Mushroom by Consecutive Chromatography and LC-Q-TOF-MS." *Food Research International* 121: 463–70. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918309451>.
- Lado, B H, and A E Yousef. 2007. "Characteristics of Listeria Monocytogenes Important to Food Processors." In *Listeria, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition*, , 157–214.
- Leong, Dara, Avelino Alvarez-Ordóñez, and Kieran Jordan. 2014. "Monitoring Occurrence and Persistence of Listeria Monocytogenes in Foods and Food Processing Environments in the Republic of Ireland." *Frontiers in Microbiology* 5: 436. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00436>.
- Li, Tao et al. 2019. "The Molecular Mechanism for the Ethylene Regulation of Postharvest Button Mushrooms Maturation and Senescence." *Postharvest Biology and Technology* 156: 110930. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521419301334>.
- Malheiros, Patrícia da Silva, Cheila Minçã Daniel de Paula, and Eduardo Cesar Tondo. 2007. "Cinética de Crescimento de Salmonella Enteritidis Envolvida Em Surtos Alimentares No RS: Uma Comparação Com Linhagens de Outros Sorovares." *Food Science and Technology* 27: 751–55. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612007000400013&nrm=iso.
- Manzi, Pamela, Altero Aguzzi, and Laura Pizzoferrato. 2001. "Nutritional Value of Mushrooms Widely Consumed in Italy." *Food Chemistry* 73(3): 321–25. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814600003046> (March 2, 2017).
- Miles, Philip G., and Shu-Ting Chang. 2008. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. 2nd ed. Boca Raton, FLA: CRC Press.
- Mocan, Andrei et al. 2018. "Chemical Composition and Bioactive Properties of the Wild Mushroom Polyporus Squamosus (Huds.) Fr: A Study with Samples from Romania." *Food & Function* 9(1): 160–70.

<http://dx.doi.org/10.1039/C7FO01514C>.

- Murugesan, Latha, Zuzana Kucerova, Stephen J Knabel, and Luke F LaBorde. 2015. "Predominance and Distribution of a Persistent *Listeria Monocytogenes* Clone in a Commercial Fresh Mushroom Processing Environment." *Journal of food protection* 78(11): 1988–98. <http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2015/00000078/00000011/art00010>.
- Park, Youn-Moon, and Youn-Moon Jhune. 2010. "Quality Changes of King Oyster Mushroom as Influenced by Controlled Atmosphere Regimens during Storage and Shelf Temperature Conditions." *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 28.
- Pennone, V et al. 2018. "Diversity of *Listeria Monocytogenes* Strains Isolated from *Agaricus Bisporus* Mushroom Production." *Journal of Applied Microbiology* 125(2): 586–95. <https://doi.org/10.1111/jam.13773>.
- Qiu, Wanwei et al. 2019. "Microflora of Fresh White Button Mushrooms (*Agaricus Bisporus*) during Cold Storage Revealed by High-Throughput Sequencing and MALDI-TOF Mass Spectrometry Fingerprinting." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99(9): 4498–4503. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9695>.
- Rainey, P.B., C.L. Brodey, and K. Johnstone. 1992. "Biology of *Pseudomonas Tolaasii*, Cause of Brown Blotch Disease of Cultivated Mushroom." *Advances in Plant Pathology*, 8: 95–118.
- Ratkowsky, D A, J Olley, T A McMeekin, and A Ball. 1982. "Relationship between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures." *Journal of bacteriology* 149(1): 1–5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7054139>.
- Rokni, Nader, and Ebrahim Mohammadi Goltapeh. 2019. "Tolerance to Dry Bubble Disease (*Lecanicillium Fungicola*) in Iranian Wild Germplasm of Button Mushroom (*Agaricus Bisporus*)." *Mycoscience* 60(2): 125–31. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1340354018301220>.
- Rossouw, W, and L Korsten. 2017. "Cultivable Microbiome of Fresh White Button Mushrooms." *Letters in Applied Microbiology* 64(2): 164–70. <https://doi.org/10.1111/lam.12698>.
- Roy, S, R C Anantheswaran, and R B Beelman. 1995. "Sorbitol Increases Shelf Life of Fresh Mushrooms Stored in Conventional Packages." *Journal of Food Science* 60(6): 1254–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb04568.x>.
- Samadpour, M. et al. 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).
- Sánchez, Carmen. 2004. "Modern Aspects of Mushroom Culture Technology." *Applied microbiology and biotechnology* 64: 756–62.
- Sande, Denise et al. 2019. "Edible Mushrooms as a Ubiquitous Source of Essential Fatty Acids." *Food Research International* 125: 108524. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996919303953>.
- Sant'Ana, Anderson S. et al. 2012. "Prevalence, Populations and Pheno- and

- Genotypic Characteristics of *Listeria Monocytogenes* Isolated from Ready-to-Eat Vegetables Marketed in S?O Paulo, Brazil." *International Journal of Food Microbiology* 155(1–2): 1–9. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160512000037> (July 3, 2017).
- Sant'Ana, Anderson S., Mariza Landgraf, Maria Tereza Destro, and Bernadette D.G.M. Franco. 2013. "Growth Potential of *Salmonella* and *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Lettuce and Collard Greens Packaged under Modified Atmosphere and in Perforated Film." *Journal of Food Protection* 76(5): 888–91. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-479>.
- Sant'Ana, Anderson S, Bernadette D G M Franco, and Donald W Schaffner. 2012. "Modeling the Growth Rate and Lag Time of Different Strains of *Salmonella* Enterica and *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Lettuce." *Food Microbiology* 30(1): 267–73. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002011002711>.
- Santana, Cristiane Castro, Maria Cristina Dantas Vanetti, and Maria Catarina Megumi Kasuya. 2008. "Microbial Growth and Colour of Minimally Processed Shiitake Mushroom Stored at Different Temperatures." *International Journal of Food Science & Technology* 43(7): 1281–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01606.x>.
- Schvartzman, M Sol, Ursula Gonzalez-Barron, Francis Butler, and Kieran Jordan. 2014. "Modeling the Growth of *Listeria Monocytogenes* on the Surface of Smear- or Mold-Ripened Cheese." *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4: 90. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25072033>.
- Scolforo, Carmelita Z et al. 2017. "Modeling the Fate of *Listeria Monocytogenes* and *Salmonella* Enterica in the Pulp and on the Outer Rind of Canary Melons (*Cucumis Melo* (Indorus Group))." *LWT* 77: 290–97. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816307289>.
- Siqueira, R. S. 1995. *Manual de Microbiologia de Alimentos*. Brasília: EMBRAPA,.
- Soković, Marina, and Leo J L D van Griensven. 2006. "Antimicrobial Activity of Essential Oils and Their Components against the Three Major Pathogens of the Cultivated Button Mushroom, *Agaricus Bisporus*." *European Journal of Plant Pathology* 116(3): 211–24. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9053-0>.
- Strawn, Laura K. et al. 2013. "Landscape and Meteorological Factors Affecting Prevalence of Three Food-Borne Pathogens in Fruit and Vegetable Farms." *Applied and Environmental Microbiology* 79(2): 588–600.
- Tan, Xiaoqing et al. 2019. "The Occurrence of *Listeria Monocytogenes* Is Associated with Built Environment Microbiota in Three Tree Fruit Processing Facilities." *Microbiome* 7(1): 115. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0726-2>.
- Venturini, María E. et al. 2011. "Microbiological Quality and Safety of Fresh Cultivated and Wild Mushrooms Commercialized in Spain." *Food Microbiology* 28(8): 1492–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.007>.
- Viswanath, Prema et al. 2013. "Incidence of *Listeria Monocytogenes* and *Listeria* Spp. in a Small-Scale Mushroom Production Facility." *Journal of food protection* 76(4): 608–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23575122>.

- Wang, Qiong, Lijun Chu, and Liping Kou. 2017. "UV-C Treatment Maintains Quality and Delays Senescence of Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*).” *Scientia Horticulturae* 225: 380–85. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423817304375>.
- Wasser, S. 2003. "Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(3): 258–74.
- Wu, Shi et al. 2015a. "Listeria Monocytogenes Prevalence and Characteristics in Retail Raw Foods in China.” *PLoS ONE* 10(8): 1–16.
- . 2015b. "Listeria Monocytogenes Prevalence and Characteristics in Retail Raw Foods in China.” *PLOS ONE* 10(8): e0136682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136682>.

Tabela 1 – Número de Amostra analisadas de acordo com espécie e marca

Marca	Shimeji Preto (OM)	Shimeji Branco (WS)	Porto Belo (PB)	Shitake (ST)	Champignon (WB)
A	60	24	11	9	8
B	10	8	N/U	5	6
C	2	6	N/U	N/U	N/U
D	N/U	7	N/U	N/U	N/U
E	N/U	N/U	N/U	N/U	N/U
F	N/U	6	N/U	N/U	N/U
G	4	5	N/U	N/U	N/U
H	3	N/U	N/U	N/U	N/U
J	21	N/U	N/U	N/U	N/U
Total	100	56	11	14	14

N/U – Marca não utilizada

Tabela 2- Prevalência de *Listeria sp* e *L. monocytogenes* em cogumelos

Amostra	N	<i>Listeria spp</i> (%)	<i>Listeria monocytogenes</i> (%)
Shimeji Preto	100	22(22)	1(1)
Shimeji Branco	56	N/D	N/D
Shitake	14	N/D	N/D
Champignon	14	N/D	N/D
Porto Belo	11	N/D	N/D
Total	195	22(11.3)	1(0.51)

N/D – Não detectado

Tabela 3: Parâmetros cinéticos de multiplicação (taxa máxima de crescimento, μ - 1/h; tempo de lag, λ - h; e população máxima, κ - log CFU/g) de *L. monocytogenes* em cogumelos (shimeji preto e shimeji branco).

Parâmetros cinéticos de crescimento	T °C	Cogumelos	
		shimeji preto	shimeji branco
μ	5	0.007±0.002 ^{Aa}	N/C
	12	0.025±0.004 ^{Aa}	0.034±0.004 ^{Aa}
	20	0.141±0.001 ^{Ba}	0.085±0.004 ^{Bb}
	30	0.282±0.032 ^{Ca}	0.123±0.009 ^{Cb}
λ	5	198.58±22 ^{Ca}	N/C
	12	57.23±3.93 ^{Ba}	38.30±12.3 ^{Ba}
	20	4.29±0.04 ^{Aa}	9.81±0.721 ^{Aa}
	30	3.81±0.456 ^{Aa}	3.14±0.783 ^{Aa}
κ	5	5.38±0.034 ^{Aa}	N/C
	12	5.81±0.525 ^{Aa}	7.64±0.010 ^{Ab}
	20	6.98±0.277 ^{Ba}	6.86±0.120 ^{Ba}
	30	6.42±0.207 ^{Ba}	8.19±0.200 ^{Bb}

¹Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna para o mesmo parâmetro indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Scott-Knott como uma função da temperatura de armazenamento. ²Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Scott-Knott para diferente cogumelos, numa mesma temperatura de armazenamento. N/C Não houve crescimento.

Tabela 4. Contagem de bactérias mesófilas, psicotróficas e bolores e leveduras obtidos na literatura.

Variedade de Cogumelo	Mesófilos (Log CFU/g)	Psicotróficos (Log CFU/g)	Bolores e leveduras (Log CFU/g)	Fonte	Referências
-	≈ 5,0	-	-	Produtor	Fattahifar et al., 2018
<i>Agaricus bisporus</i>	4,3	3,35	3,31	Produtor	Nasiri et al., 2018
<i>Agaricus bisporus</i>	4,3	3,35	3,31	Produtor	Nasiri et al., 2017
<i>Pleurotus ostreatus</i>	≈ 3,5	-	≈ 2,6	Produtor	Wang et al., 2017
<i>Flammulina velutipes</i>	3,16	2,17	2,87	Produtor	Donglu et al., 2016
<i>Boletus edulis</i>	6,88	1,89	-	Bosque	Han et al., 2015
<i>Agaricus bisporus</i>	4,4	3,4	3,2	Produtor	Gao et al., 2014
<i>Lentinula edodes</i>	3,97	3,34	3,32	Produtor	Jiang et al., 213
<i>Lentinus edodes</i>	4,12	1,63	3,81	Produtor	Jiang et al., 2012
<i>Agaricus bisporus</i>	7.7-8.4	-	1.8-2.7	Mercado	Venturini et al., 2011
<i>P. ostreatus</i>	5.3	-	2.9-3.4	Mercado	Venturini et al., 2011
<i>Lentinus edodes</i>	4.3	1.8	4.1	Produtor	Jiang et al., 2010

Tabela 5. Modelo secundário da raiz quadrada para *L. monocytogenes* em cogumelos frescos em função da temperatura de armazenamento (5-30°C).

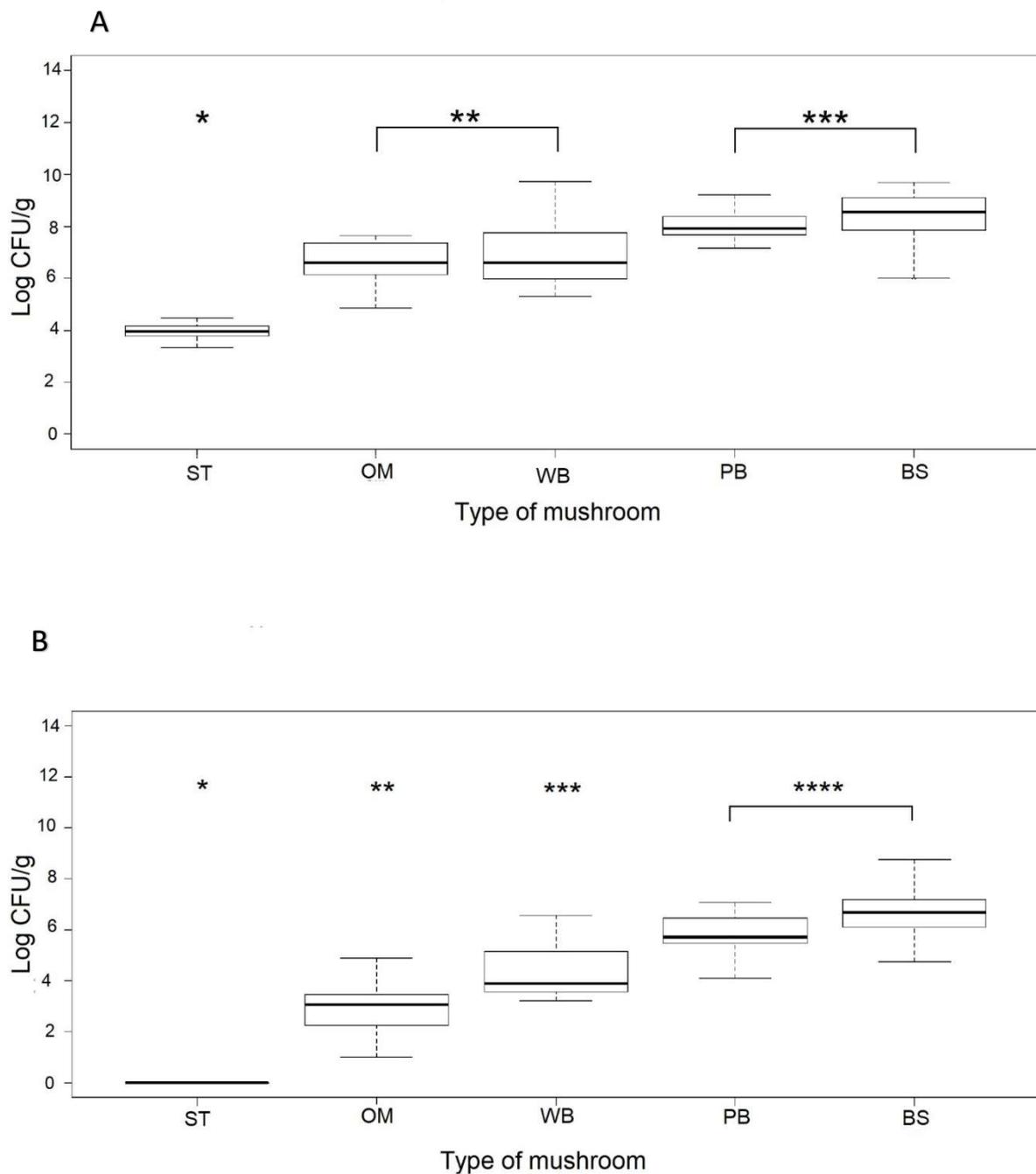
Amostra	Raiz quadrada	Tempo de Lag
Shimeji Preto	$\sqrt{\mu} = 0.0187(T - 1.31)$	$\ln(\lambda) - 0.17(T - 34.59)$
Shimeji Branco	$\sqrt{\mu} = 0.0049(T - 4.27)$	$\ln(\lambda) - 0.1386(T - 37.70)$

* μ_{\max} : taxa de crescimento máxima específica (h^{-1}), t_{Lag} : Tempo de duração da fase lag (dias), T: temperature (°C).

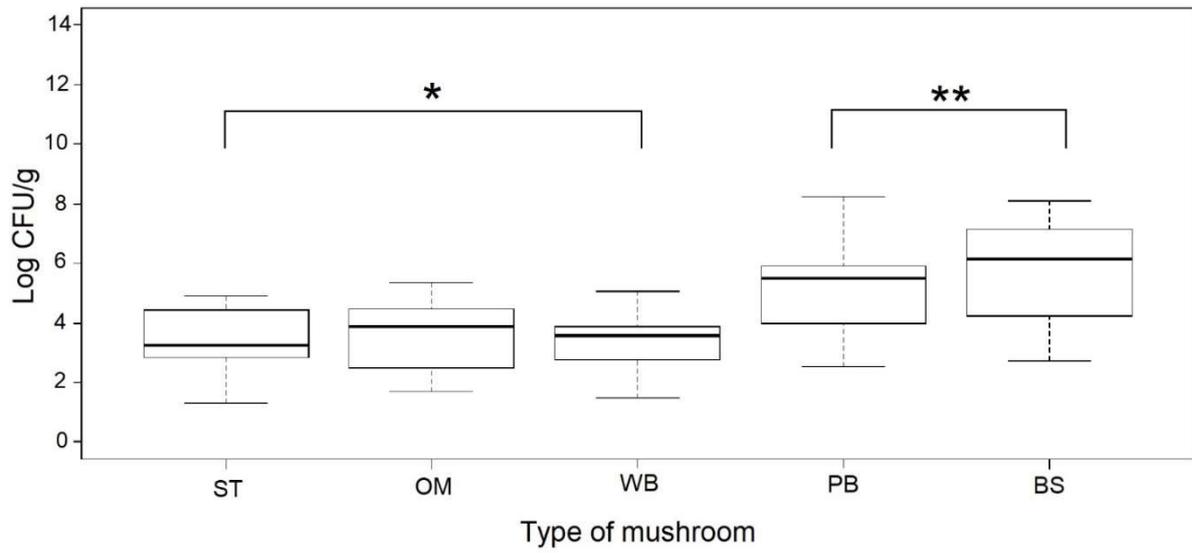
Tabela 6. Parâmetros cinéticos de inativação *L. monocytogenes* em cogumelo shimeji branco

Temperatura °C	Kmax	Valor D (h)	R ²
5	0.05	46,05	0,97

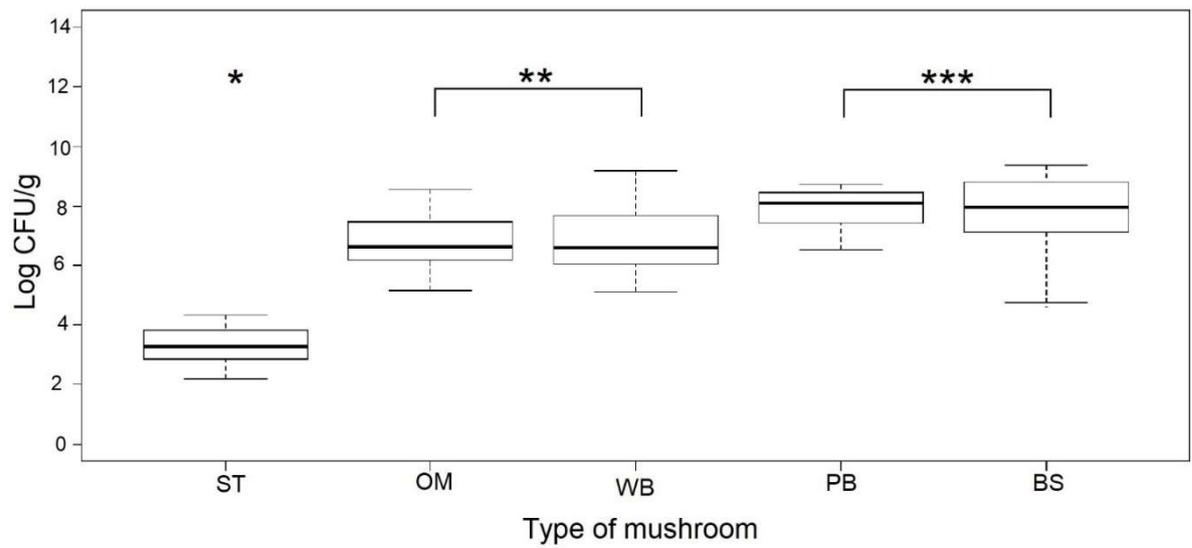
Figura 1: Contagem de bactérias aeróbicas mesófilas (A), Enterobactérias (B), bactérias lácticas (C), bactérias aeróbicas psicrotróficas (D) e bolores e leveduras (E) em diferentes tipos de cogumelos. ¹ * diferentes para o mesmo grupo de microrganismo indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias de contagem de acordo com o teste de Scott-Knott.



C



D



E

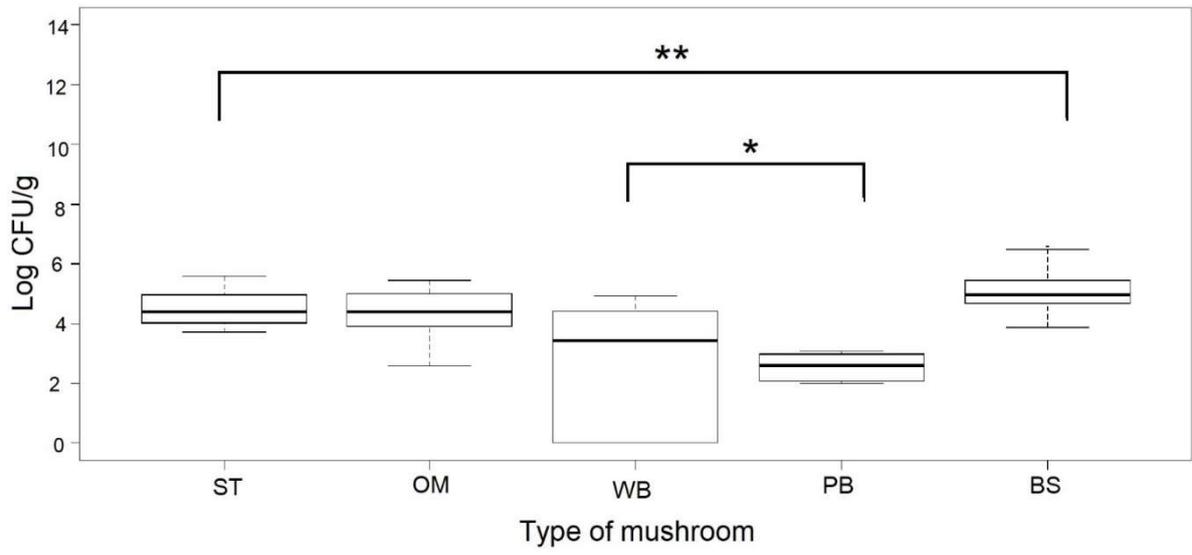
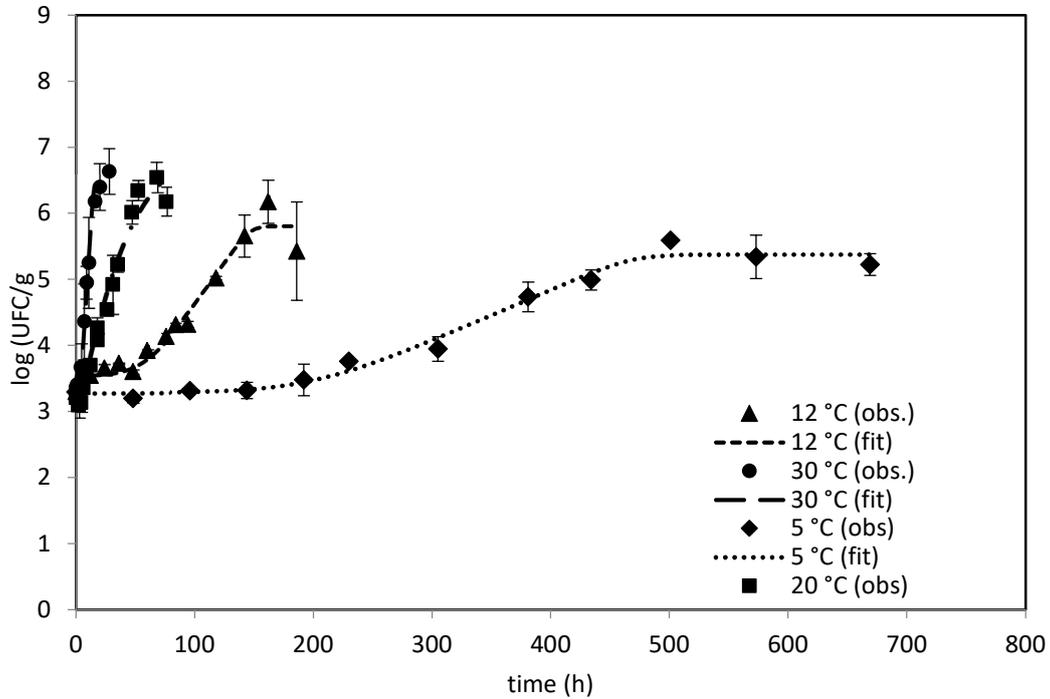


Figura 2- Crescimento e inativação de *Listeria monocytogenes* em shimeji Preto (A) e Shimeji Branco (B) armazenada a 5, 12, 20 e 30 ° C

A



B

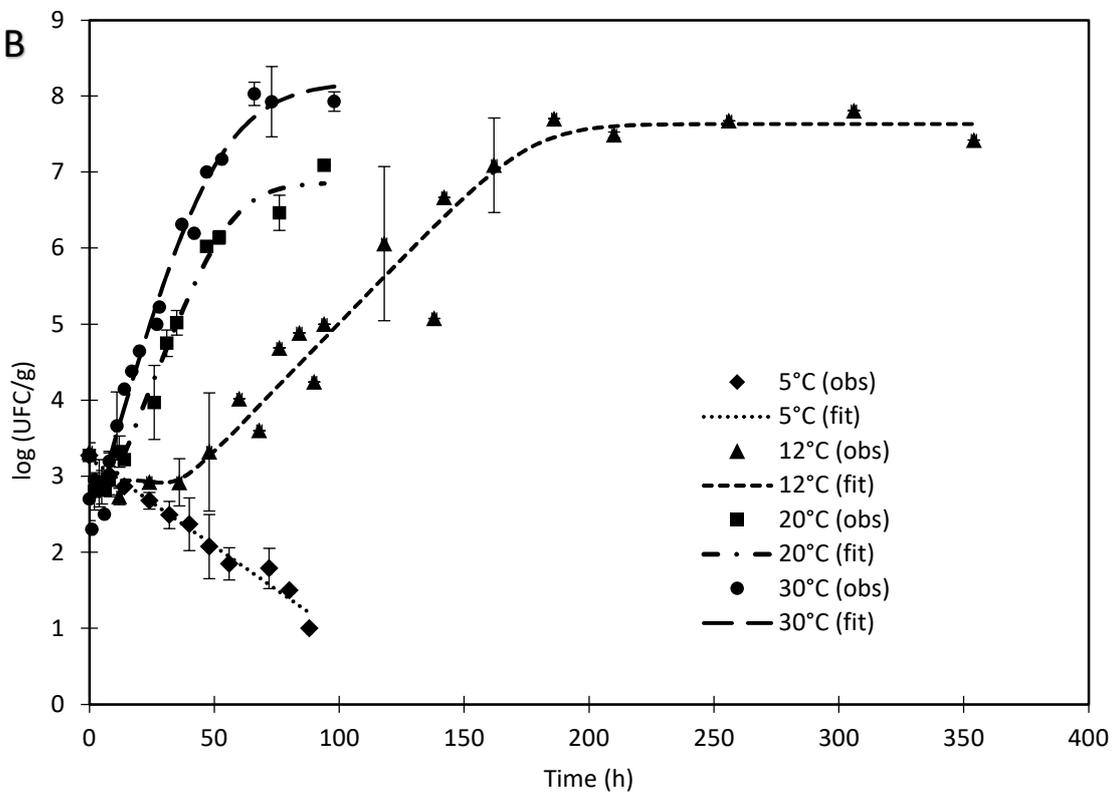
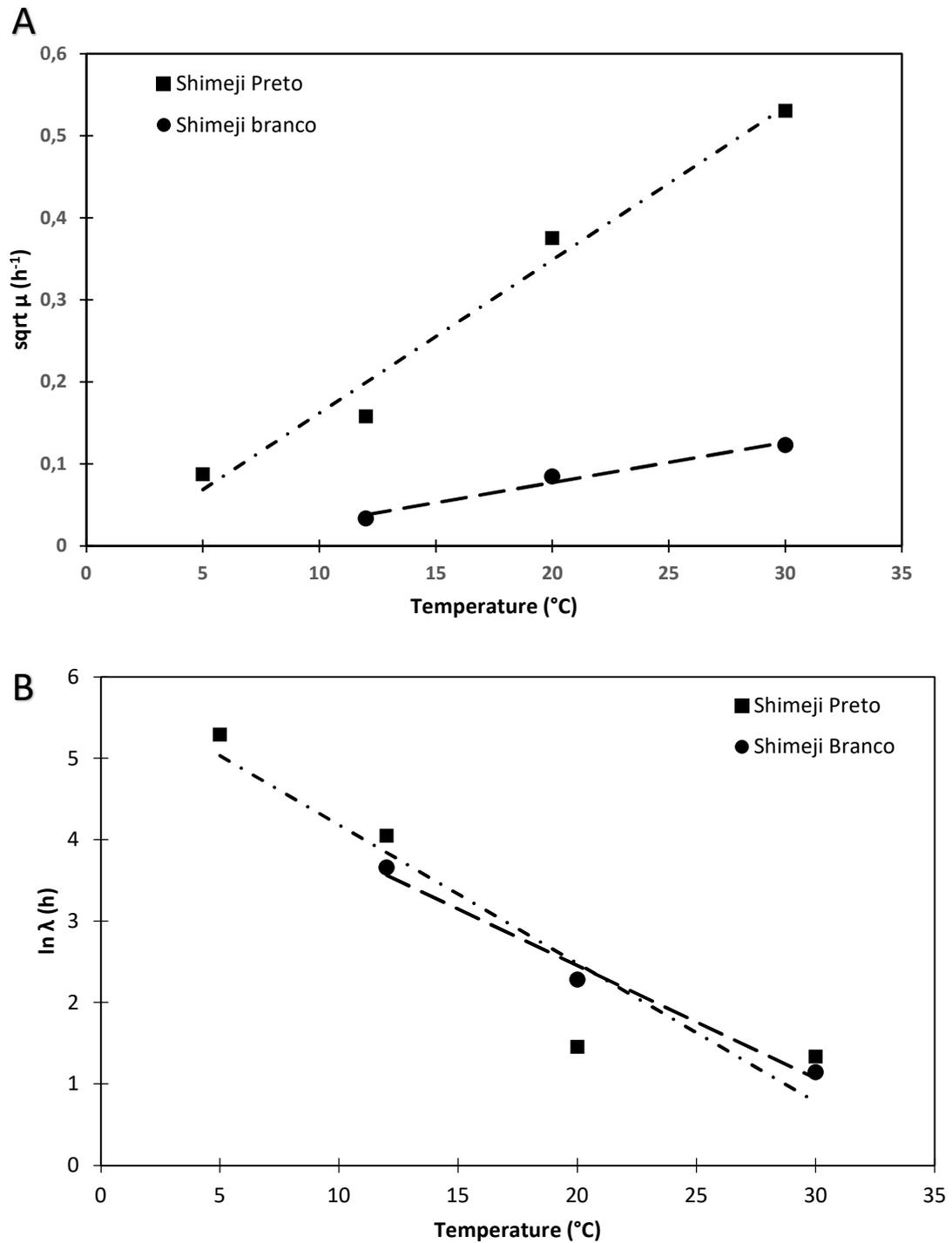


Figura 3 - Relação entre crescimento médio de *Listeria monocytogenes* (medido como μ e λ) em Shimeji Preto e Shimeji Branco, conforme afetado pela temperatura.



CONCLUSÕES GERAIS

A quantificação das análises microbiológicas resulta que os cogumelos comercializados têm uma alta contagem de microrganismos e que os cogumelos podem estar sendo vendidos deteriorados ou com o prazo de validade muito mais curto do que o rotulado, tendo em vista que as análises foram feitas até 48h de embalados. O cogumelo com maior carga microbiológica foi o shimeji preto e foi o único que apresentou uma incidência baixa de *L. monocytogenes*, podendo apresentar risco. Mais estudos devem ser conduzidos para avaliar os riscos de possíveis contaminações vinculados a este alimento. Os cogumelos shimeji branco e preto demonstraram-se ótimos substratos para crescimento da *L. monocytogenes*. O *L. monocytogenes* no shimeji preto nas faixas de 20 e 30°C apresentou o maior crescimento. Já o shimeji branco apresentou crescimento na faixa de 12 a 30°C, na faixa de 5 graus não foi capaz de sobreviver.

Referências Bibliográficas

- Abou-Zeid, Mohamed A. 2012. "Pathogenic Variation in Isolates of *Pseudomonas* Causing the Brown Blotch of Cultivated Mushroom, *Agaricus Bisporus* ." *Brazilian Journal of Microbiology* 43: 1137–46.
- Agrahar-Murugkar, D, and G Subbulakshmi. 2005. "Nutritional Value of Edible Wild Mushrooms Collected from the Khasi Hills of Meghalaya." *Food Chemistry* 89(4): 599–603. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604002572>.
- Aisala, Heikki et al. 2018. "Sensory Properties of Nordic Edible Mushrooms." *Food Research International* 109: 526–36. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918303430>.
- Amirullah, Nur Amalina, Nurhayati Zainal Abidin, and Noorlidah Abdullah. 2018. "The Potential Applications of Mushrooms against Some Facets of Atherosclerosis: A Review." *Food Research International* 105: 517–36. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996917307895>.
- Anonymous. 1996. "ISO 11290-2:1996 - Horizontal Methods for the Detection and Enumeration of *Listeria Monocytogenes* Part 2."
- . 1998. "ISO 15214:1998 - Horizontal Methods for the Enumeration of Mesophilic Lactic Acid Bacteria – Colony-Count Technique at 30 °C."
- . 2001. "ISO 17410:2001 - Horizontal Methods for the Enumeration of Psychrotrophic Microorganisms."
- . 2003. "ISO 4833:2003 - Horizontal Methods for the Enumeration of Microorganisms. Colony-Count Technique at 30 °C."
- . 2004. "ISO 21528-2:2004 – Horizontal Methods for the Detection and

Enumeration of Enterobacteriaceae.”

———. 2008. “ISO 21527-1:2008 - Horizontal Methods for the Enumeration of Yeast and Moulds.”

Azevedo, Sílvia et al. 2017. “Modelling the Influence of Time, Temperature and Relative Humidity Conditions on the Mass Loss Rate of Fresh Oyster Mushrooms.” *Journal of Food Engineering* 212: 108–12. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877417302388>.

Baranyi, József, and Terry Roberts. 1994. “A Dynamic Approach to Predicting Bacterial-Growth in Food.” *International journal of food microbiology* 23: 277–94.

Bigelow, W D, and J R Esty. 1920. “The Thermal Death Point in Relation to Time of Typical Thermophilic Organisms.” *The Journal of Infectious Diseases* 27(6): 602–17. <https://doi.org/10.1093/infdis/27.6.602>.

Blais, B.W., L.M. Phillippe, F. Pagotto, and N. Corneau. 2008. “Identification of Presumptive Positive *Listeria Monocytogenes* from Foods and Environmental Samples by the Polymerase Chain Reaction.” *The compendium of analytical methods* 3. www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume3/mflp78-02-eng.php.

Bover-Cid, Sara et al. 2019. “New Insights on *Listeria Monocytogenes* Growth in Pressurised Cooked Ham: A Piezo-Stimulation Effect Enhanced by Organic Acids during Storage.” *International Journal of Food Microbiology* 290: 150–58. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160518307724>.

Brock, Thomas D, and Michael T Madigan. 2004. *Microbiologia de Brock*. 10th ed. São Paulo, SP: Coautoria de John M. Martinko, Jack Parker.

- Buchanan, Robert L et al. 2017. "A Review of *Listeria Monocytogenes*: An Update on Outbreaks, Virulence, Dose-Response, Ecology, and Risk Assessments." *Food Control* 75: 1–13.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516306892>.
- Burton, K S, and R Noble. 1993. "The Influence of Flush Number, Bruising and Storage Temperature on Mushroom Quality." *Postharvest Biology and Technology* 3(1): 39–47. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/092552149390025X>.
- Cantore, Pietro, Annalisa Giorgio, and Nicola Sante Iacobellis. 2015. "Bioactivity of Volatile Organic Compounds Produced by *Pseudomonas tolaasii*." *Frontiers in Microbiology* 6.
- Cardoso, A.L.S.P., E.N.C. Tessari, A.G.M. Castro, and A.M.I. Kanashiro. 2005. "Pesquisa de *Salmonella* Spp, Coliformes Totais, Coliformes Fecais, Mesófilos, Em Carcaças e Cortes de Frango." *Higiene Alimentar* 19: 144–50.
- Carpentier, Brigitte, and Olivier Cerf. 2011. "Review - Persistence of *Listeria Monocytogenes* in Food Industry Equipment and Premises." *International Journal of Food Microbiology* 145(1): 1–8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.005>.
- Carrasco-Cabrera, Claudia P, Tina L Bell, and Michael A Kertesz. 2019. "Caffeine Metabolism during Cultivation of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with Spent Coffee Grounds." *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(14): 5831–41. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09883-z>.
- Carrasco, Jaime et al. 2019. "Casing Microbiome Dynamics during Button Mushroom Cultivation: Implications for Dry and Wet Bubble Diseases." *Microbiology* 165(6): 611–24.

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.0007>

92.

Chang, Shu-Ting, and Solomon P. Wasser. 2012. "The Role of Culinary-Medicinal Mushrooms on Human Welfare with a Pyramid Model for Human Health." *International Journal of Medicinal Mushrooms* 14(2): 95–134.

Chen, Moutong, Qingping Wu, Jumei Zhang, Ze'an Yan, et al. 2014. "Prevalence and Characterization of *Listeria Monocytogenes* Isolated from Retail-Level Ready-to-Eat Foods in South China." *Food Control* 38: 1–7.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513005185>.

Chen, Moutong, Qingping Wu, Jumei Zhang, Weipeng Guo, et al. 2014. "Prevalence and Contamination Patterns of *Listeria Monocytogenes* in *Flammulina Velutipes* Plants." *Foodborne pathogens and disease* 11(8): 620–27.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24824447>.

Chen, Moutong et al. 2015. "Prevalence, Enumeration, and Pheno- and Genotypic Characteristics of *Listeria Monocytogenes* Isolated from Raw Foods in South China." *Frontiers in Microbiology* 6(SEP): 1–12.

Colauto, N.B., and A.F Eira. 1998. "Avaliação Quantitativa Da Comunidade Bacteriana Na Camada de Cobertura de *Agaricus Bisporus*. Energia." *Energia na Agricultura* 13: 15–26.

Dias, Eustáquio Souza. 2010. "MUSHROOM CULTIVATION IN BRAZIL : CHALLENGES." *Ciência e Agrotecnologia* 34(4): 795–803.

Ding, Changhe, Xiang Wang, and Mengxing Li. 2019. "Evaluation of Six White-Rot Fungal Pretreatments on Corn Stover for the Production of Cellulolytic and

- Ligninolytic Enzymes, Reducing Sugars, and Ethanol.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(14): 5641–52. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09884-y>.
- Ezekiel, C N et al. 2013. “Fungal and Mycotoxin Assessment of Dried Edible Mushroom in Nigeria.” *International Journal of Food Microbiology* 162(3): 231–36. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513000718>.
- Fermor, T R. 1987. “Bacterial Diseases of Edible Mushrooms and Their Control.” In *Cultivating Edible Fungi*, eds. P J Wuest, D J Royse, and R B B T - Developments in Crop Science Beelman. Elsevier, 361–70. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444427472500439>.
- Fernandes, Ângela et al. 2013. “Effects of Gamma Irradiation on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Lactarius Deliciosus* L. Wild Edible Mushroom.” *Food and Bioprocess Technology* 6(10): 2895–2903. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0931-5>.
- Ferreira, Daniel Furtado. 2014. “Sisvar: A Guide for Its Bootstrap Procedures in Multiple Comparisons.” *Ciência e Agrotecnologia* 38: 109–12. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542014000200001&nrm=iso.
- Figueirêdo, Vinícius Reis de, and Eustáquio Souza Dias. 2014. “Cultivo Do Champignon Em Função Da Temperatura .” *Ciência Rural* 44: 241–46.
- Franco, Bernadette D. Gombossy de Melo, and Mariza Landgraf. 2002. *Microbiologia Dos Alimentos*. São Paulo, SP: Atheneu.
- Gandhi, Megha, and Michael L. Chikindas. 2007. “Listeria: A Foodborne Pathogen That Knows How to Survive.” *International Journal of Food Microbiology* 113(1):

1–15.

Garrido, V, A I Vitas, and I García-Jalón. 2009. “Survey of *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Products: Prevalence by Brands and Retail Establishments for Exposure Assessment of Listeriosis in Northern Spain.” *Food Control* 20(11): 986–991. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713508003228>.

Goebel, Werner, Bruno Gonza, Gustavo Domi, and Grupo De Patoge. 2013. “The Objectives of the Business Intelligence Project | InetSoft Webinar.” 14(3): 584–640.
https://www.inetsoft.com/business/solutions/objectives_of_business_intelligence_project/.

González-Fandos, E. et al. 2001. “Behaviour of *Listeria Monocytogenes* in Packaged Fresh Mushrooms (*Agaricus Bisporus*).” : 795–805.

Han, Linlei et al. 2015. “Evaluation of Biodegradable Film Packaging to Improve the Shelf-Life of *Boletus Edulis* Wild Edible Mushrooms.” *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 29: 288–94.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856415000764>.

Jacobsson, A, J. Bower, and N. Amos. 2001. “QUALITY CHANGES OF MUSHROOMS DURING STORAGE.” *Acta Horti* 553: 745–48.

Jiang, Haiyang et al. 2018. “High Microbial Loads Found in Minimally-Processed Sliced Mushrooms from Italian Market.” *Italian journal of food safety* 7(1): 7000.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29732334>.

Jiang, Tianjia, Lifang Feng, and Jianrong Li. 2012. “Changes in Microbial and Postharvest Quality of Shiitake Mushroom (*Lentinus Edodes*) Treated with

- Chitosan–Glucose Complex Coating under Cold Storage.” *Food Chemistry* 131(3): 780–86.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814611013045>.
- Jonathan, Gbolagade. 2010. “Fungi and Aflatoxin Detection in Two Stored Oyster Mushrooms (*Pleurotus Ostreatus* and *Pleurotus Pulmonarius*) from Nigeria.” *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 9.
- Junttila, Jaana, and Minna Brander. 1989. “*Listeria Monocytogenes* Septicemia Associated with Consumption of Salted Mushrooms.” *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 21(3): 339–42. <https://doi.org/10.3109/00365548909035707>.
- Kong, Yan et al. 2019. “Isolation and Identification of the Umami Peptides from Shiitake Mushroom by Consecutive Chromatography and LC-Q-TOF-MS.” *Food Research International* 121: 463–70.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918309451>.
- Kramarenko, Toomas et al. 2013. “*Listeria Monocytogenes* Prevalence and Serotype Diversity in Various Foods.” *Food Control* 30(1): 24–29.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512003799>.
- Lado, B H, and A E Yousef. 2007. “Characteristics of *Listeria Monocytogenes* Important to Food Processors.” In *Listeria, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition*, , 157–214.
- Leong, Dara, Avelino Alvarez-Ordóñez, and Kieran Jordan. 2014. “Monitoring Occurrence and Persistence of *Listeria Monocytogenes* in Foods and Food Processing Environments in the Republic of Ireland.” *Frontiers in Microbiology* 5: 436. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00436>.

- Li, Tao et al. 2019. "The Molecular Mechanism for the Ethylene Regulation of Postharvest Button Mushrooms Maturation and Senescence." *Postharvest Biology and Technology* 156: 110930. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925521419301334>.
- Malheiros, Patrícia da Silva, Cheila Min tia Daniel de Paula, and Eduardo Cesar Tondo. 2007. "Cinética de Crescimento de Salmonella Enteritidis Envolvida Em Surtos Alimentares No RS: Uma Compara o Com Linhagens de Outros Sorovares." *Food Science and Technology* 27: 751–55. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612007000400013&nrm=iso.
- Mandeel, Q. A., A. A. Al-Laith, and S. A. Mohamed. 2005. "Cultivation of Oyster Mushrooms (*Pleurotus* Spp.) on Various Lignocellulosic Wastes." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(4): 601–7.
- Manzi, Pamela, Altero Aguzzi, and Laura Pizzoferrato. 2001. "Nutritional Value of Mushrooms Widely Consumed in Italy." *Food Chemistry* 73(3): 321–25. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814600003046> (March 2, 2017).
- Miles, Philip G., and Shu-Ting Chang. 2008. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. 2nd ed. Boca Raton, FLA: CRC Press.
- Mocan, Andrei et al. 2018. "Chemical Composition and Bioactive Properties of the Wild Mushroom *Polyporus Squamosus* (Huds.) Fr: A Study with Samples from Romania." *Food & Function* 9(1): 160–70. <http://dx.doi.org/10.1039/C7FO01514C>.
- Murugesan, Latha, Zuzana Kucerova, Stephen J Knabel, and Luke F LaBorde. 2015.

- “Predominance and Distribution of a Persistent *Listeria Monocytogenes* Clone in a Commercial Fresh Mushroom Processing Environment.” *Journal of food protection* 78(11): 1988–98.
<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2015/00000078/00000011/art00010>.
- Nguyen-the, Christophe, and Frédéric Carlin. 1994. “The Microbiology of Minimally Processed Fresh Fruits and Vegetables.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34(4): 371–401. <https://doi.org/10.1080/10408399409527668>.
- Ogawa, Kuniyasu, and Takeshi Yashima. 2019. “MRI Visualization of Shiitake Mycelium Growing in Woodchip Blocks Used for Shiitake Mushroom Cultivation.” *Magnetic Resonance Imaging* 58: 90–96.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0730725X18304454>.
- Park, Youn-Moon, and Youn-Moon Jhune. 2010. “Quality Changes of King Oyster Mushroom as Influenced by Controlled Atmosphere Regimens during Storage and Shelf Temperature Conditions.” *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 28.
- Pennone, V et al. 2018. “Diversity of *Listeria Monocytogenes* Strains Isolated from Agaricus Bisporus Mushroom Production.” *Journal of Applied Microbiology* 125(2): 586–95. <https://doi.org/10.1111/jam.13773>.
- Qiu, Wanwei et al. 2019. “Microflora of Fresh White Button Mushrooms (*Agaricus Bisporus*) during Cold Storage Revealed by High-Throughput Sequencing and MALDI-TOF Mass Spectrometry Fingerprinting.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99(9): 4498–4503. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9695>.
- Rainey, P.B., C.L. Brodey, and K. Johnstone. 1992. “Biology of *Pseudomonas Tolaasii*,

- Cause of Brown Blotch Disease of Cultivated Mushroom.” *Advances in Plant Pathology*, 8: 95–118.
- Ratkowsky, D A, J Olley, T A McMeekin, and A Ball. 1982. “Relationship between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures.” *Journal of bacteriology* 149(1): 1–5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7054139>.
- Rokni, Nader, and Ebrahim Mohammadi Goltapeh. 2019. “Tolerance to Dry Bubble Disease (*Lecanicillium Fungicola*) in Iranian Wild Germplasm of Button Mushroom (*Agaricus Bisporus*).” *Mycoscience* 60(2): 125–31. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1340354018301220>.
- Rossouw, W, and L Korsten. 2017. “Cultivable Microbiome of Fresh White Button Mushrooms.” *Letters in Applied Microbiology* 64(2): 164–70. <https://doi.org/10.1111/lam.12698>.
- Roy, S, R C Anantheswaran, and R B Beelman. 1995. “Sorbitol Increases Shelf Life of Fresh Mushrooms Stored in Conventional Packages.” *Journal of Food Science* 60(6): 1254–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb04568.x>.
- Samadpour, M. et al. 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).
- Sánchez, Carmen. 2004. “Modern Aspects of Mushroom Culture Technology.” *Applied microbiology and biotechnology* 64: 756–62.
- . 2010. “Cultivation of *Pleurotus Ostreatus* and Other Edible Mushrooms.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(5): 1321–37.
- Sande, Denise et al. 2019. “Edible Mushrooms as a Ubiquitous Source of Essential

- Fatty Acids.” *Food Research International* 125: 108524.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996919303953>.
- Sant’Ana, Anderson S. et al. 2012. “Prevalence, Populations and Pheno- and Genotypic Characteristics of *Listeria Monocytogenes* Isolated from Ready-to-Eat Vegetables Marketed in S?O Paulo, Brazil.” *International Journal of Food Microbiology* 155(1–2): 1–9.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160512000037> (July 3, 2017).
- Sant’Ana, Anderson S., Mariza Landgraf, Maria Tereza Destro, and Bernadette D.G.M. Franco. 2013. “Growth Potential of *Salmonella* and *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Lettuce and Collard Greens Packaged under Modified Atmosphere and in Perforated Film.” *Journal of Food Protection* 76(5): 888–91.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-479>.
- Sant’Ana, Anderson S, Bernadette D G M Franco, and Donald W Schaffner. 2012. “Modeling the Growth Rate and Lag Time of Different Strains of *Salmonella* Enterica and *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Lettuce.” *Food Microbiology* 30(1): 267–73.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002011002711>.
- Santana, Cristiane Castro, Maria Cristina Dantas Vanetti, and Maria Catarina Megumi Kasuya. 2008. “Microbial Growth and Colour of Minimally Processed Shiitake Mushroom Stored at Different Temperatures.” *International Journal of Food Science & Technology* 43(7): 1281–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01606.x>.
- Schimpf, Ulrike et al. 2019. “Utilisation of Solid Digestate from Acidification Reactors of Continues Two-Stage Anaerobic Digestion Processes in *Lentinula Edodes*

- Cultivation.” *Bioresource Technology Reports* 8: 100322.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589014X19302129>.
- Schlech, Walter F et al. 1983. “Epidemic Listeriosis — Evidence for Transmission by Food.” *New England Journal of Medicine* 308(4): 203–6.
<https://doi.org/10.1056/NEJM198301273080407>.
- Schvartzman, M Sol, Ursula Gonzalez-Barron, Francis Butler, and Kieran Jordan. 2014. “Modeling the Growth of *Listeria Monocytogenes* on the Surface of Smear- or Mold-Ripened Cheese.” *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4: 90.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25072033>.
- Scolforo, Carmelita Z et al. 2017. “Modeling the Fate of *Listeria Monocytogenes* and *Salmonella Enterica* in the Pulp and on the Outer Rind of Canary Melons (*Cucumis Melo* (Indorus Group)).” *LWT* 77: 290–97.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816307289>.
- Serbina, Natalya V., Ting Jia, Tobias M. Hohl, and Eric G. Pamer. 2008. “Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens.” *Annual Review of Immunology* 26(1): 421–52.
- Siqueira, R. S. 1995. *Manual de Microbiologia de Alimentos*. Brasília: EMBRAPA,.
- Soković, Marina, and Leo J L D van Griensven. 2006. “Antimicrobial Activity of Essential Oils and Their Components against the Three Major Pathogens of the Cultivated Button Mushroom, *Agaricus Bisporus*.” *European Journal of Plant Pathology* 116(3): 211–24. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9053-0>.
- Strawn, Laura K. et al. 2013. “Landscape and Meteorological Factors Affecting Prevalence of Three Food-Borne Pathogens in Fruit and Vegetable Farms.”

Applied and Environmental Microbiology 79(2): 588–600.

Strina, Agostino. 2015. *Microbiología*. 6th ed. ed. Marina Baquerizo Martinez. Luiz Rachid Trabulsi, Flavio Alterthum. São Paulo, SP: Atheneu.

Tan, Xiaoqing et al. 2019. “The Occurrence of *Listeria Monocytogenes* Is Associated with Built Environment Microbiota in Three Tree Fruit Processing Facilities.” *Microbiome* 7(1): 115. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0726-2>.

Tortora, Gerard J., Berbell R. Funke, and Christine L. Case. 2005. *Microbiología*. 8th ed. Porto Alegre, RS: Artmed.

Vázquez-Boland, J A et al. 2001. “*Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants.” *Clinical microbiology reviews* 14(3): 584–640. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432815>.

Venturini, María E. et al. 2011. “Microbiological Quality and Safety of Fresh Cultivated and Wild Mushrooms Commercialized in Spain.” *Food Microbiology* 28(8): 1492–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.007>.

Vieira, Fabrício Rocha, and Meire Cristina Nogueira de Andrade. 2016. “Optimization of Substrate Preparation for Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*) Cultivation by Studying Different Raw Materials and Substrate Preparation Conditions (Composting: Phases I and II).” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(11).

Viswanath, Prema et al. 2013. “Incidence of *Listeria Monocytogenes* and *Listeria* Spp. in a Small-Scale Mushroom Production Facility.” *Journal of food protection* 76(4): 608–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23575122>.

Wang, Qiong, Lijun Chu, and Liping Kou. 2017. “UV-C Treatment Maintains Quality

and Delays Senescence of Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*)." *Scientia Horticulturae* 225: 380–85.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423817304375>.

Wasser, S. 2003. "Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides." *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(3): 258–74.

Wei, Jin-Kang et al. 2019. "Lignocellulose Utilization and Bacterial Communities of Millet Straw Based Mushroom (*Agaricus Bisporus*) Production." *Scientific Reports* 9(1): 1–13.

Wu, Shi et al. 2015a. "Listeria Monocytogenes Prevalence and Characteristics in Retail Raw Foods in China." *PLoS ONE* 10(8): 1–16.

———. 2015b. "Listeria Monocytogenes Prevalence and Characteristics in Retail Raw Foods in China." *PLOS ONE* 10(8): e0136682.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136682>.

Zied, Diego Cunha et al. 2019. "Study of Waste Products as Supplements in the Production and Quality of *Pleurotus Ostreatus* Var. Florida." *Indian Journal of Microbiology* 59(3): 328–35. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00805-1>.