



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TAYNARA ELLEN ROMERO BATISTELA

**INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS
DE *Allium sativum* FRESCO E ARMAZENADO**

Londrina
2022

TAYNARA ELLEN ROMERO BATISTELA

**INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS
DE *Allium sativum* FRESCO E ARMAZENADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Daniele Sartori

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B333i	<p>Batistela, Taynara Ellen Romero. Incidência e identificação de fungos e bactérias de <i>Allium sativum</i> fresco e armazenado / Taynara Ellen Romero Batistela. - Londrina, 2022. 56 f. : il.</p> <p>Orientador: Daniele Sartori. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2022. Inclui bibliografia.</p> <p>1. <i>Allium sativum</i> - Tese. 2. Incidência - Tese. 3. Microrganismos - Tese. 4. Identificação - Tese. I. Sartori, Daniele. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.</p>
-------	---

TAYNARA ELLEN ROMERO BATISTELA

**INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS E BACTÉRIAS
DE *Allium sativum* FRESCO E ARMAZENADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Cristiani Baldo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dr. Doumit Camilios Neto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 04 de março de 2022.

Ao Pai Celestial, que colocou as pessoas certas no meu caminho para me ajudar em cada obstáculos da vida. Aos meus pais Kelly e Alexandre e irmão Junior, que sempre apoiaram minhas decisões e se orgulham das minhas escolhas. Ao meu marido Guilherme que está sempre ao meu lado. E não menos importante, a minha orientadora, Daniele Sartori, que foi corpo e mente em todo meu aprendizado, apoiou, ensinou e foi extremamente compreensível nos momentos difíceis!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me possibilitou a decisão de realizar o mestrado, iluminou meus pensamentos, me concedeu sabedoria e colocou professores íntegros e dedicados em minha jornada nessa fase.

A Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Além da CAPES pelo financiamento deste estudo.

Aos docentes e demais funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, por todo ensinamento compartilhado, pela dedicação e atenção. De forma especial, a Professora Dra. Fabiana Gasparin, por me incentivar desde a especialização.

A minha orientadora Dra. Daniele Sartori que foi extremamente dedicada enquanto orientadora e professora, que ajudou e apoiou em cada passo dessa pesquisa. Agradeço pela paciência em compreensão nos momentos difíceis, além da confiança que teve em meu trabalho.

Aos membros Dr. Doumit Camilios Neto, Dra. Cristiani Baldo, Dr. Marcelo Rodrigues de Melo e Dra. Fabiana Guillen Moreira Gasparin da banca de qualificação e de defesa, pela disponibilidade e atenção.

À professora Dra. Claudete de Fátima Ruas e as pesquisadoras Dra. Sara Mataroli de Godoy e Ms. Daniele Cassiano Feliciano pela colaboração nesse estudo, com dedicação na hora de realizar o trabalho, pelos ensinamentos em laboratório e pela paciência em me explicar cada passo das análises.

A minha amiga e colega de pesquisa Dâmaris C. Landgraf, pela paciência, ajuda e conforto. Por dividir as dificuldades no laboratório, dar conselho nos momentos de angústia e por ser meu braço direito em toda a pesquisa. De nossa amizade construída nesses dois anos irei guardar risadas e memórias!

Aos meus pais Alexandre S. Batistela e Kelly C. Y. R. Batistela que me ensinaram sobre respeito, amor, dedicação e principalmente sobre ser trabalhadora e abraçar as oportunidades da vida. Se me tornei a mulher que sou é graça aos princípios deles!

São exemplos como pessoas e meu espelho em todas as decisões, obrigada por tanto!

Ao meu irmão Alexandre S. Batistela Jr. que é meu companheiro desde que nasceu, que me ouve, que escuta os desabafos. Sempre se manteve ao meu lado e sempre apoia as minhas escolhas.

Ao meu marido Guilherme Alves da Silva que está presente em todas as minhas conquistas, que me acompanha nos momentos de alegria e angustias. Partilha a vida ao meu lado e comemora e vibra comigo a cada passo conquistado. É meu apoio e meu braço direito.

Aos meus familiares, em especial a minha avó Linda A. Yamamoto que é o pilar e exemplo de perseverança dessa família. Aos meus tios Willian Miura e Karyne E. Y. Romero, duas pessoas que são como pais, irmãos e amigos, me viram crescer, amadurecer e realizar sonhos, também não poderia deixar de agradecer a minha priminha Alice Miura de apenas 3 anos, uma menina de luz e amor que alegra meus dias mesmo sem entender.

Aos amigos que fiz no mestrado, Mayara T. Pessoa, Jaquellyne Bittencourt, João M. Kafer e Mariane Campos, agradeço infinitamente pelas horas de conversa, pelo companheirismo, pelas aflições compartilhadas e os momentos de descontração. Vocês foram luz!

A um grande amigo, irmão e padrinho Vinicius Augusto, que me apoiou e soube sempre usar as palavras certas, soube dar conselhos e identificou cada momento em que precisei de um “ombro” amigo. Além da minha melhor amiga Andressa Frasson que sempre me acompanhou e me apoiou mesmo a quilômetros de distâncias.

Não poderia deixar de agradecer a Laura G. de Campos e Matheus Mertz que foram pessoas essenciais para esse trabalho se concretizar. Além de todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para esse trabalho ser concretizado.

Sou extremamente grata a todos!

BATISTELA, Taynara Ellen Romero. **Incidência e identificação de fungos e bactérias de *Allium sativum* fresco e armazenado**. 2022. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O alho (*Allium sativum*) é uma hortaliça muito consumida, principalmente in natura. Devido ao alto consumo no Brasil, existe a necessidade de importar este produto de outros países. Associado ao alto consumo, sabe-se que o alho brasileiro é cultivado duas vezes ao ano. Assim, o mercado brasileiro é abastecido com alho armazenado por longos períodos, favorecendo a infecção por microrganismos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência e identificar fungos e bactérias em alhos fresco e armazenado coletados em diferentes regiões de Londrina-PR. No alho armazenado, houve predominância de fungos do gênero *Aspergillus* sp (50,3%), seguido de *Penicillium* sp (34,1%). *Aspergillus* section *Nigri* (58,86%) foi encontrada em maior quantidade, seguida de *Aspergillus* section *Cremeri* (39,14%) e *Aspergillus* section *Circumdati* (3,98%). Em contraste, no alho fresco, não houve presença de nenhum fungo. Em relação à incidência de bactérias, foram detectadas 4,68x10⁶ UFCs em amostras frescas e 3,60x10⁶ UFCs em armazenadas. Um total de 154 UFCs de bactérias foram organizados em 7 grupos de acordo com a análise de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado. Os grupos I, II e III abrigaram maior número de UFCs e foram identificados representantes desses grupos. As UFC do grupo I foram identificadas como *Staphylococcus epidermis* e *Staphylococcus warneri*, as UFC do grupo II foram identificadas como *Pantoea vagans* e as UFC do grupo III foram identificadas como *Bacillus spizizenii*/ *Bacillus tequilensis* e *Acinetobacter radioresistens*. Foi possível verificar que não houve distinção entre as bactérias identificadas nas amostras de alho fresco das amostras de alho armazenado. Por outro lado, em relação à microbiota, houve distinção entre alho fresco e armazenado. A identificação desses microrganismos representa uma fonte para futuros estudos biotecnológicos e podem auxiliar na busca de novas alternativas de armazenamento e formas de comercialização do alho.

Palavras-chave: *allium sativum*; incidência; fungos; bactérias; identificação.

BATISTELA, Taynara Ellen Romero. **Incidência e identificação de fungos e bactérias de *Allium sativum* fresco e armazenado**. 2022. 54 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum*) is a very consumed vegetable, mainly in natura. Due to the high consumption in Brazil, there is a need to import this product from other countries. Associated with high consumption, it is known that Brazilian garlic is cultivated twice a year. Thus, the Brazilian market is supplied with garlic stored for long periods, favoring infection by microorganisms. In this sense, the objective of this study was to evaluate the incidence and identify fungi and bacteria in fresh and stored garlic. In stored garlic, there was a predominance of fungi of the genus *Aspergillus* sp (50.3%), followed by *Penicillium* sp (34.1%). *Aspergillus* section *Nigri* (56,86%) was found in greater quantity, followed by *Aspergillus* section *Cremeri* (39,14%) and *Aspergillus* section *Circumdati* (3,98%). In contrast, in fresh garlic, there was no presence of any fungus. Regarding the incidence of bacteria, 4,68x10⁶ CFUs were detected in fresh samples and 3,60x10⁶ CFUs in stored. A total of 154 CFUs of bacteria were organized into 7 groups according to amplified fragment length polymorphism analysis. Groups I, II and III harbored a greater number of CFUs and representatives of these groups were identified. Group I CFUs were identified as *Staphylococcus epidermis* and *Staphylococcus warneri*, group II CFUs were identified as *Pantoea vagans*, and group III CFUs were identified as *Bacillus spizizenii*/ *Bacillus tequilensis* and *Acinetobacter radioresistens*. It was possible to verify that there was no distinction between bacteria identified in samples of fresh and stored garlic. On the other hand, regarding the microbiota, there was a distinction between fresh and stored garlic. These microorganisms represent a source for future biotechnological studies and can help in the search for new storage alternatives and ways of selling garlic.

Key-words: *allium sativum*; incidence; fungi; bacteria; identification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Contribuição dos estados brasileiros na produção de alho no ano de 2018	17
Figura 2 – A) Folhas estreitas e pontiagudas B) Bulbilhos C) Bulbos D) Bulbos envoltos por túnicas	19
Figura 3 – Estrutura química dos principais componentes bioativos do alho A-Estrutura química da alicina; B-Estrutura química da aliina.....	22
Figura 4 – Incidência de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de fungos em <i>Allium sativum</i> armazenado.....	33
Figura 5 – Incidência de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de fungos de amostras de <i>Allium sativum</i> armazenado	34
Figura 6 – Identificação morfológica de Unidades Formadoras de Colônias de <i>Aspergillus</i> sp. em <i>Allium sativum</i> armazenado	35
Figura 7 – Incidência de Unidades formadoras de colônias em amostras de alho armazenado e alho fresco.	37
Figura 8 – Incidência de Unidades Formadoras de Colônias de bactérias em amostras de <i>Allium sativum</i> fresco e armazenado.....	38
Figura 9 – Dendrograma construído a partir de 154 isolados de bactérias de <i>Allium sativum</i> fresco e armazenado. O método UPGMA foi utilizado com base em uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard. Os isolados foram agrupados em 7 grupos e 2 subgrupos (Grupos I, II, III, V, VI e VII. Subgrupos Ia e Ib). * Isolados sequenciados.	41
Figura 10 – Árvore filogenética construída com base em dados de sequência parcial da região 16S do DNA ribossomal, utilizando dados de distância Neighbor-Joining (NJ) e análise de bootstrap de 1.000 repetições. Utilizou-se <i>Pantoea agglomerans</i> como grupo externo.	43
Figura 11 – Árvore filogenética construída com base em dados de sequência parcial da região 16S do DNA ribossomal, utilizando dados de distância Neighbor-Joining (NJ) e análise de bootstrap de 1.000 repetições. Utilizou-se <i>Pseudomonas putida</i> como grupo externo (AB681215).	44

- Figura 12** – Árvore filogenética construída com base em dados de sequência parcial da região 16S do DNA ribossomal, utilizando dados de distância *Neighbor-Joining* (NJ) e análise de bootstrap de 1.000 repetições. Utilizou-se *Acinetobacter radioresistens* como grupo externo (NR 026210).....46
- Figura 13** – Árvore filogenética construída com base em dados de sequência parcial da região 16S do DNA ribossomal, utilizando dados de distância *Neighbor-Joining* (NJ) e análise de bootstrap de 1.000 repetições. Utilizou-se *Bacillus subtilis* como grupo externo (NR 112116.2).....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de compostos bioativos presentes no alho	20
Tabela 2 – Unidades Formadoras de Colônias isolados de <i>Allium sativum</i> Fresco e Armazenado	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	ASPECTOS ECONÔMICOS DA PRODUÇÃO DE ALHO NO BRASIL	17
3.2	ASPECTOS GERAIS DO ALHO	18
3.3	COMPOSTOS BIOATIVOS DO ALHO	21
3.4	INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS EM ALHO.....	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	27
4.2	INCIDÊNCIA E ISOLAMENTO DE FUNGOS EM AMOSTRAS DE ALHO FRESCO E ARMAZENADO	27
4.3	INCIDÊNCIA E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE ALHO FRESCO E ARMAZENADO	28
4.4	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE BACTÉRIAS	28
4.5	ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO AMPLIFICADO (AFLP)	29
4.6	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S DO DNA RIBOSSOMAL	30
4.7	SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA REGIÃO 16S DO DNA RIBOSSOMAL.....	31
4.8	ANÁLISE DE DADOS DO SEQUENCIAMENTO	32
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	33
5.1	INCIDÊNCIA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE FUNGOS EM <i>Allium sativum</i> ARMAZENADO E FRESCO	33
5.2	INCIDÊNCIA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS DE <i>Allium sativum</i> FRESCO E ARMAZENADO	37
5.3	SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE BACTÉRIAS.....	38
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	50

1 – INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores consumidores de alho (*Allium sativum*) do mundo, sendo o alho *in natura* a forma mais consumida. Devido a esse alto consumo, a produção brasileira é insuficiente uma vez que o plantio ocorre apenas 2 vezes ao ano, havendo necessidade de importação do alho de países como Argentina, China e Espanha. O longo período de armazenamento do alho, favorece a infecção por microrganismos.

No Brasil existem dois tipos principais de cultivo de alho (*Allium sativum* L.): o alho nobre roxo mais aceito comercialmente, devido a seus bulbos arredondados e com bulbilhos grandes que se tornam atrativos de forma visual para o consumidor, agregando um alto valor ao produto, e o alho roxo comum, também conhecido como semi-nobre ou tropical cujos bulbos são menores contem bulbilhos estreitos e com pouca uniformidade, sendo menos atrativos.

O alho possui diversos compostos antimicrobianos e antioxidantes, como a alicina e aliina que desempenham um papel importante na defesa da planta e contribuem com a prevenção e risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Geralmente, os compostos bioativos vão diminuindo conforme o tempo de armazenamento do alho favorecendo a infecção por microrganismos.

A presença de microrganismos no alho pode contribuir com a perda da qualidade do produto. A quantidade, bem como as espécies de microrganismo pode diferir quanto as práticas de manuseio do produto como a colheita transporte, armazenamento, processamento do produto.

O estudo em relação a incidência de microrganismos em alhos é escasso, assim como a identificação de bactérias isolados desse vegetal. Para identificação de microrganismos existem diversas técnicas, como métodos tradicionais de identificação microbiana que requerem o reconhecimento de diferenças na morfologia, crescimento, atividade enzimática e metabolismo para definir gêneros e espécies. Sendo assim, métodos como o de sequenciamento total e parcial do gene 16 rRNA surgiram como ferramentas úteis para identificar microrganismos.

Diante do exposto, o estudo teve como objetivo analisar a incidência de microrganismos no alho roxo e identificar os isolados do *Allium sativum* fresco e armazenado.

2- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Identificar fungos e bactérias em alho fresco e armazenado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar a incidência de fungos no alho fresco e armazenado;
- Verificar a incidência de bactérias no alho fresco e armazenado
- Identificar as Unidades Formadoras de Colônias de fungos e bactérias obtidos do alho fresco e alho armazenado;

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

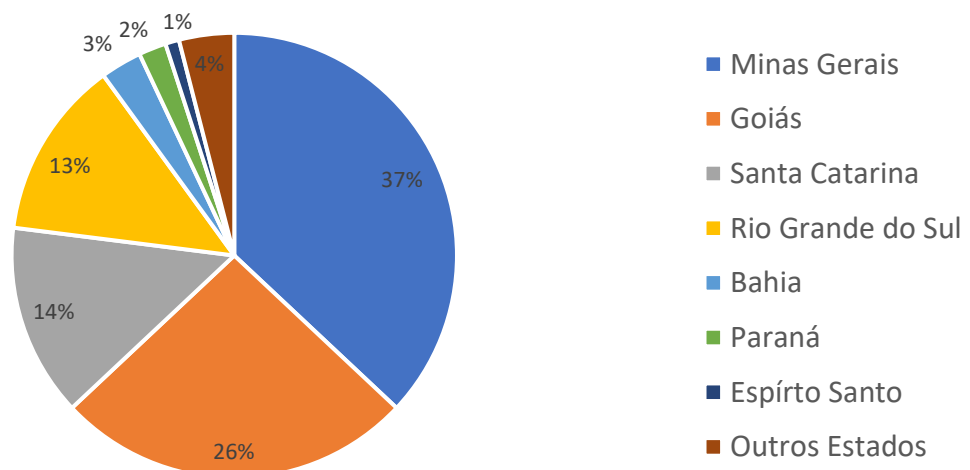
3.1 ASPECTOS ECONÔMICOS DA PRODUÇÃO DE ALHO NO BRASIL

O alho (*Allium sativum*) é uma das hortaliças de grande demanda no país. Em 2020 o consumo do alho cresceu 20% comparado com o ano de 2018, atingindo um número de 360 mil toneladas (HONORATO *et al*, 2013; EMBRAPA, 2018; EMBRAPA, 2020).

Mundialmente, no ano de 2010, a produção dessa hortaliça atingiu 22.592.581 toneladas, com participação brasileira de 104.124 toneladas. Já no ano de 2011, a produção nacional de alho atingiu 143.293 toneladas (HONORATO *et al*, 2013). Em 2017 e 2018, houve pequena queda na produção brasileira de alho atingindo 125 mil e 118 mil toneladas, respectivamente (RUBIN, 2020).

A maior contribuição nacional na produção de alho no ano de 2018 foi dada pelos estados de Minas Gerais, Goiás, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo responsáveis por 90% do alho produzido no Brasil (Figura 1) (RUBIN, 2020).

Figura 1– Contribuição dos estados brasileiros na produção de alho no ano de 2018



Fonte: Rubin (2020)

Apesar do Brasil ser um bom produtor de alho, a produção nacional ainda é insuficiente para atender a demanda havendo necessidade de importar o produto de outros países (EMBRAPA, 2018). A importação do alho é feita principalmente de

países como Argentina, China e Espanha, esse alho fica armazenado por longos períodos (RESENDE, 2018).

Embora o solo e clima brasileiro apresentem condições favoráveis ao plantio de alho, ainda há predomínio do cultivo artesanal (HONORATO *et al*, 2013; SANTOS, GOMES e GOMES, 2015).

3.2 ASPECTOS GERAIS DO ALHO

O alho (*Allium sativum* L.) pertence à família das *Lilaceae*, possuindo em torno de 700 espécies, incluindo a cebola, alho poró e cebolinha (LORENZI e MATOS, 2002). O alho, foi cultivado inicialmente em regiões da Sicília, Ásia Central e diversos locais da Europa e Ocidente, sendo muito utilizado desde a antiguidade na culinária e de grande interesse para fins terapêuticos e medicinais (MOTA *et al.*, 2015).

A hortaliça é uma planta herbácea que atinge de 0,40 a 0,70 m de altura, possui folhas estreitas e pontiagudas, e possui um bulbo, com formato arredondado ou oval. O bulbo é composto por bulbilhos conhecidos como “dentes de alho”, podendo ter formato comprido, ovoides e arqueados, os quais ficam agrupados e envoltos por um involúcro de túnicas esbranquiçadas que são facilmente destacáveis como é possível visualizar na figura 2 (RESENDE, HEBER e PINHEIRO, 2016; OLIVA *et al*, 2017).

Figura 2 – A) Folhas estreitas e pontiagudas B) Bulbilhos C) Bulbos D) Bulbos envoltos por túnicas;



Fonte: Resende, Heber e Pinheiro (2016).

O plantio do alho no Brasil é realizado duas vezes ao ano e depende de ambientes específicos da região. Nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, os meses de março e abril são favoráveis ao plantio do alho, enquanto que, a colheita ocorre entre os meses de julho a outubro. Já na região Sul, o plantio ocorre entre os meses de maio a julho, enquanto que a colheita em novembro e dezembro (SOBRINHO *et al*, 1993; OLIVA *et al*, 2017).

A colheita do alho ocorre geralmente quando cerca de 2/3 das folhas estão amarelas ou secas, indicando que os bulbos estão maduros. Após a colheita a hortaliça deve passar por um processo de secagem. Os bulbos são distribuídos lados a lado, ficando expostos ao sol por três a cinco dias, seguido de exposição à sombra

por 20 a 50 dias para posterior armazenamento. Quando armazenados por longo período os bulbos devem ser mantidos com folhas e raízes (RESENDE, HEBER & PINHEIRO, 2016).

No Brasil, há principalmente a circulação de dois grupos de cultivares, o alho roxo nobre e semi-nobre. As cultivares de alho roxo nobre, apresentam bulbos arredondados e uniformes com túnicas de coloração branca e película rósea ou roxa e bulbilhos grandes com película de coloração roxo intenso. Os números de bulbilhos variam de 8 a 12 e os bulbos produzidos são de alto valor comercial. Em algumas regiões do país o alho nobre tem sido cultivado com vernalização (SOBRINHO *et al*, 1993; MOTA *et al*, 2004; LUCINI, 2008; HONORATO *et al*, 2013).

A vernalização ou frigorificação é um processo que consiste em submeter as sementes de alho a baixa temperatura por um determinado período, com a finalidade de reduzir a necessidade de manter as cultivares por longo fotoperíodo, que é o tempo que a planta necessita de luz do sol, e regiões de temperaturas mais baixas como o Sul do país (FREDDO, 2016; LOPES *et al*, 2016). Desta forma, a vernalização possibilita a diferenciação e formação de bulbos em locais que possuem climas mais quentes para aquelas cultivares que possuem algumas necessidades específicas. A vernalização possibilitou ampliar as regiões e épocas de cultivos diferentes (RESENDE *et al*, 2011).

O alho roxo comum, conhecido por semi-nobre ou tropical, apresenta bulbos com formato e aparência menos atrativa comercialmente (MACÊDO *et al.*, 2006). Estes cultivares possuem formato ovalado e variação de cor branco a creme e leve coloração roxa. Os bulbilhos possuem película branca e levemente rósea, e apresentam em média 15 bulbilhos por bulbos de tamanho reduzido. Estes cultivares dispensam vernalização para produção em climas tropicais e é resistente ao superbrotamento, um indicativo da baixa adaptação ao local de cultivo, que diminui a produtividade (MACÊDO *et al.*, 2006; HONORATO *et al*, 2013; RESENDE, 2018). Ainda no país, existe a circulação do alho denominado *Super White* ou *White* de coloração branco a levemente roxo/rosa, respectivamente (ANAPA, 2018).

3.3 COMPOSTOS BIOATIVOS DO ALHO

Nutricionalmente o alho é rico em compostos bioativos, como óleos essenciais; compostos organossulfurados; ácidos fenólicos; flavonóides; vitaminas e sais minerais (CHEN *et al*, 2013; OLIVA *et al*, 2017), sendo classificado como alimento funcional e até mesmo pode ser utilizado na síntese de produtos aplicados a saúde (CHEN *et al*, 2013; KOPÉC *et al*, 2020). Os compostos de enxofre são os responsáveis por propriedades medicinais do alho, como atividade antidiabética, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, cardioprotetora e imunomoduladora (RAHMAN, 2007; TSAI *et al*, 2012; MARTINS, PETROPOULOS e FERREIRA, 2016).

Na tabela 1 é possível observar a quantidade de alguns compostos bioativos presentes no alho. Em geral, um bulbo de alho contém 65% de água, 28% de carboidratos, 2,3% de compostos organossulfurados, 2% de proteína, 1,2% de aminoácidos livres, 1,5% de fibras e uma baixa quantidade de lipídeos (0,2%) (OMAR e AL-WEBEL, 2009).

Tabela 1 - Quantidade de compostos bioativos do alho

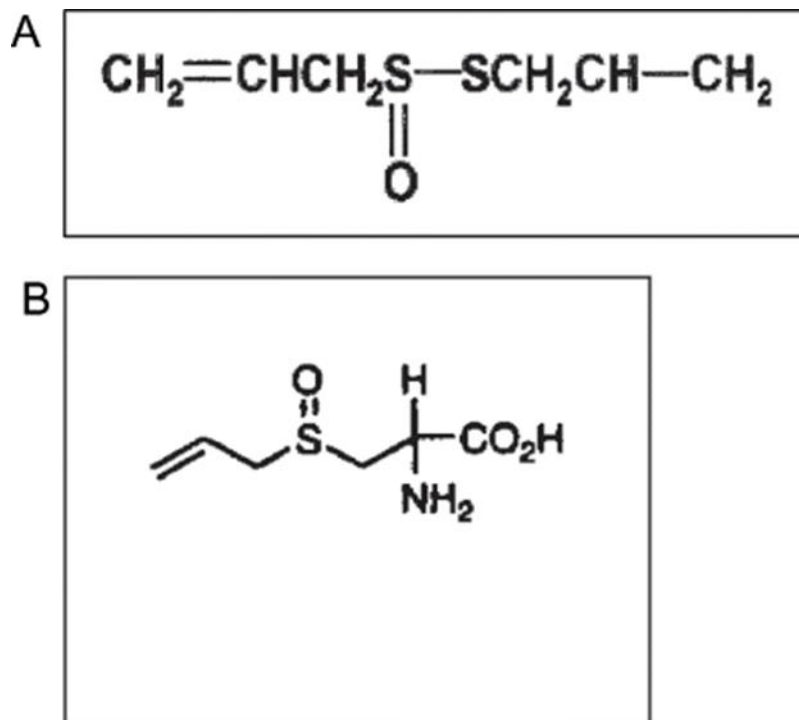
COMPOSTO QUÍMICO	QUANTIDADE (ppm)
Alicina	1.500 - 27.800
Aliina	5.000 - 10.000
Dissulfeto de alil-propil	36 – 216
Anilina	10
Ácido ascórbico	100 – 788
Ácido aspártico	4.890 - 11.736
Betacaroteno	0,17
Biotina	22
Cálcio	180 - 4.947
Carboidratos	274.000 - 851.000
Cistina	650 - 1.560
Dissulfeto de dialila	16 – 613
Fibra	7.000 - 39.00
Lisina	2.730 - 6.552
Ácido P-cumático	58

Potássio	3.730 - 13.669
Proteína	35.000 - 179.000
S-alil-cisteína	10
Riboflavina	0,5 – 3
Água	585.000 - 678.000
Zinco	15,3

Fonte: Omar e Al-Wabel (2009).

Dentre os compostos bioativos do alho, estão os compostos sulfurados como aliina e alicina. A alicina (dialiltiosulfato) (Fig. 3-A) é o tiosulfato encontrado em maior abundância no alho. A formação da alicina se dá após a ação da alinase (C-liase) sobre a aliina, decorrente de algum dano físico no bulbilho (Fig. 3-B). Aliina e alinase estão originalmente presentes nos bulbilhos intactos, no entanto, a alinase é ativada somente quando o bulbilho é danificado (RAHMAN, 2007; RATTI *et al.*, 2007; ARZANLOU e BOHLOOLI, 2009).

Figura 3 – Estrutura química dos principais componentes bioativos do alho A- Estrutura química da alicina; B-Estrutura química da aliina.



A alicina é responsável pelo odor e sabor característico do alho (MITROVA *et al.*, 2018). A quantidade de alicina no alho fresco é variável (1,60 a 13,03 mg/g), e essa

variação pode estar relacionada a região de cultivo e aos parâmetros agrônômicos (tamanho e peso dos bulbos e número de bulbilhos) (BAGHALIAN *et al.*, 2005).

Os compostos bioativos estão relacionados com os mecanismos de defesa das plantas contra diversos patógenos, uma vez que sua liberação é associada com danos celulares (MARTINS, PETROPOULOS e FERREIRA, 2016). A quantidade de compostos bioativos no alho pode diminuir ao longo do tempo e associado ao mau armazenamento, ocorre maior susceptibilidade a infecção por microrganismos (FONTENELE *et al.*, 2015; KOPÉČ *et al.*, 2020).

Baghalian *et al.* (2005) analisaram a quantidade de alicina em alhos de diferentes tamanhos e pesos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os autores verificam que em bulbos com maior peso (52,87 g) há maior quantidade de alicina (4,5 mg/g).

Arzanlou e Bohlooli (2009), analisaram a quantidade de alicina em extrato aquosos de folhas, brotos e bulbos verde de alho por HPLC. Os autores verificaram que a maior quantidade (0,48 mg/mL) de alicina ocorreu nos extratos obtidos de bulbos verdes de alho.

Silva, Moretti e Mattos (2010), determinaram o teor de compostos funcionais presentes em bulbilhos de alho, durante o período pós-colheita até sessenta dias. Os autores detectaram a quantidade inicial de alicina de 6,55 mg.g⁻¹, e após 60 dias a quantidade de alicina detectada foi de 5,11 mg.g⁻¹.

3.4 INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS EM ALHO

A presença de microrganismos no alho pode contribuir com a perda da qualidade do produto. A quantidade de microrganismos, bem como as espécies de microrganismos pode diferir de acordo com as práticas de manuseio do produto como a colheita transporte, armazenamento, processamento.

Poucos são os relatos quanto às espécies de bactérias encontradas em alho. Qiu *et al.* (2017), identificaram bactérias endofíticas em alho branco armazenado e em alho negro (fermentado) através do sequenciamento parcial da região 16S do DNA ribossomal. Os autores verificaram a incidência de 10³ UFCs e 10² no 15º dia do alho fermentado. As espécies identificadas foram: *Bacillus aryabhatai*, *B.*

methylophilus, *B. altitudinis*, *B. siamensis*, *B. pumilus* e *B. subtilis*). Em alho armazenado e em alho negro as espécies predominantes foram *B. subtilis* (22%) e *B. methylophilus* (22%).

Costa Junior *et al.* (2020), ao buscarem bactérias promotoras de crescimento vegetal em raiz de alho originários de Lavras (Minas Gerais), verificaram incidência média de 10^6 - 10^7 UFCs. A identificação dos gêneros por sequenciamento parcial da região 16S do DNA ribossomal mostrou haver predominância de *Bacillus* sp. e *Enterobacter* sp., 48% e 21%, respectivamente. Os gêneros *Rhizobium* (6%), *Rhodococcus* (4%), *Kosakonia* (4%), *Pantoea* (4%), *Microbacterium* (2%), *Paenibacillus* (2%), *Lactobacillus* (2%), *Streptomyces* (2%) e *Cellulosimicrobium* (2%) também foram identificados.

Estudos envolvendo cebolas e outros representantes da família *Liláceae* foi realizado por Yurgel *et al.* (2018). Os autores verificaram a incidência e identificaram bactérias via região 16S do DNA ribossomal e fungos através da região ITS do DNA ribossomal em bulbos saudáveis e doentes de cebolas. Os gêneros *Burkholderia* (31%), *Enterobacteriaceae* (38%), *Pseudomonas* (3%), *Gluconobacter* (12%) e *Acinetobacter* (5%) foram predominantes em bulbos doentes. Em contraste *Enterobacteriaceae* (31%), *Pseudomonas* (26%), *Erwinia* (8%) e *Gluconacetobacter* (8%) foram predominantes em bulbos saudáveis. Quanto aos fungos, os autores identificaram *Botrytis* (21%), *Penicillium* (17%), *Saccharomyces* (15%), *Wickerhamomyces* (11%) e *Stemphylium* (9%) em bulbos saudáveis e em bulbos doentes foram identificados *Nectriaceae* (40%), *Botrytis* (25%), *Wickerhamomyces* (17%), *Penicillium* (9%) e *Candida* (13%).

O estudo de Wouters *et al.* (2013), identificaram bactérias através do sequenciamento parcial da região 16S do DNA ribossomal em alho poró *in natura* e demonstraram incidência 10^2 a 10^5 UFCs de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*.

Alguns estudos relacionados à identificação de bactérias fazem uso de caracteres morfológicos (como colorações de Gram), bioquímicos (como produção de enzimas e fermentação de açúcares) e ou moleculares (como sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal) para a identificação das espécies.

O estudo de Leôncio e Botelho (2017), isolou 27 bactérias das raízes de alho em Santa Catarina e identificou 14 isolados por sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal. Inicialmente, os autores utilizaram análise de caracteres bioquímicos e morfológicos como critério de seleção para posterior identificação dos 14 isolados como *Bacillus subtilis*.

Outros estudos como o de WANG *et al.* (2019), optaram por identificar espécies diretamente por caracteres moleculares. Os autores isolaram 35 bactérias de bulbos de alho saudáveis e identificaram utilizando o sequenciamento da região 16S DNA ribossomal. As espécies identificadas foram, *Acinetobacter lwoffii*, a mais predominante, seguido por *Bacillus siamensis*, *Streptomyces rochei*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeuruginosa*, *Streptomyces flavoviridis*, *Streptomyces setonii* e *Bacillus safensis*.

Embora ainda existam poucos relatos relacionados à presença de microrganismos no alho, alguns estudos têm demonstrado diversificada microbiota de fungos neste produto (GHANGAONKAR, 2013; MOHARAM, FARRAG E MOHAMED, 2013; VANZELA *et al.*, 2020).

Ghangaonkar (2013), ao relatar microrganismos em dois tipos de alhos frescos, branco e alho-rosado, encontrou *Alternaria porri* (15% em alho branco e 5% em alho rosado), *Stemphylium botryosum* (40% em alho branco e 10% em alho rosado), *Cladosporium ali* (30% em alho branco e 10% em alho rosado), *Helmenthosporium ali* (20% em alho branco e 10 em alho rosado), *Colletotrichum circinace* (10% somente em alho branco) e *Curvularia luneta* (27% em alho branco e 21%, alho rosado). Em alhos armazenados o autor detectou espécies como *Aspergillus niger* (90% em ambas as amostras), *Fusarium oxysporum* (40% em alho branco e 20% em alho rosado), *Macrophomina phaseolina* (30% somente em alho branco), *Botrytis ali* (20% somente em alho branco), *Penicillium corymbiferum* (90% em alho branco e 79% em alho rosado), *Aspergillus flavus* (63% em alho branco e 93% em alho rosado), *Rhizopus stolonifer* (71% em alho branco e 88% em alho rosado), *Chaetomium globosum* (30% em alho branco e 42% em alho rosado). O autor ainda relatou ocorrência de algumas espécies apenas nos bulbos fresco como o *Colletotrichum circinace* e *Curvularia luneta*. A espécie mais predominante em alho rosado e branco foi *Aspergillus niger*.

Ainda em 2013, Moharam, Farrag e Mohamed detectaram quatro gêneros de fungos em alhos originários da Ásia através da identificação morfológica de esporos e caracteres de colônia, sendo eles *Aspergillus* (12,2%), *Botrytis* (14,8%), *Fusarium* (57,4%) e *Penicillium* (14,8%). Os isolados de *Fusarium oxysporum* (18,5%) e *Fusarium proliferatum* (22%) foram as espécies predominantes. No mesmo ano de 2013, Gnonlonfin *et al.*, fizeram um estudo com especiarias da África Ocidental, incluindo o alho e relataram os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Curvularia*. O gênero predominante foi *Aspergillus* (48,5%).

Fontenele *et al.* (2015), identificaram infecção fúngica através de características macroscópicas e microscópicas em alhos da região do Piauí e em alhos importados. Os autores relataram a presença dos seguintes gêneros: *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chrysonilia*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Moniliella* e *Penicillium*. Os gêneros predominantes foram *Cladosporium* (24,13% e 31,81% - respectivamente) e *Aspergillus* (21,83% e 31,81% - respectivamente).

Vanzela *et al.* (2020), identificaram fungos do gênero *Aspergillus* através da amplificação parcial do gene da calmodulina, com predomínio do *Aspergillus niger/Aspergillus welwitschiae*. Os autores analisaram trinta e seis amostras de alhos comercializados em doze estados brasileiros, das quais trinta e duas amostras estavam infectadas com fungos, havendo predominância do gênero *Aspergillus* (50,3%).

Em 2021, o estudo realizado por Gálvez e Palmero em alhos da Espanha identificou fungos a partir de caracteres morfológicos e molecular (regiões ITS do DNA ribossomal). Foram identificados os gêneros: *Fusarium* (76%), *Penicillium* (5,8%) e *Rhizopus* (3,8%). O gênero predominante nas amostras foi *Fusarium* (76%) e a espécie predominante o *Fusarium proliferatum* (85,5%).

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletadas 5 amostras de alhos frescos de produtores rurais da região de Londrina, as amostras foram coletadas e imediatamente refrigeradas à -4°C . As amostras foram nomeadas como UELAsF01 a UELAsF05. As amostras de alhos armazenados foram coletadas de 5 mercados diferentes da mesma região.

4.2 INCIDÊNCIA E ISOLAMENTO DE FUNGOS EM AMOSTRAS DE ALHO FRESCO E ARMAZENADO

Aproximadamente 200 gramas de bulbilhos de alho roxo foram fragmentados (cortados longitudinalmente em dois fragmentos) e imersos em 400 mL de solução salina 1%, durante 1 minuto. Em seguida, os fragmentos de bulbilhos foram retirados e a salina resultante reservada para posterior plaqueamento. Cerca de 100 fragmentos de bulbilhos de cada amostra foram plaqueados em meio de cultura DG18 (10 g de glicose, 5 g de peptona, 1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 220 g de glicerol, 15 g de ágar, 2 mg de dicloran, 100 mg de cloranfenicol, 1 L de água destilada), como descrito por Pitt e Hocking (1997), e as placas foram incubadas a 28°C até 10 dias.

A incidência de fungos em cada amostra foi obtida pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias Fúngicas (UFCfs). As UFCs representantes de gêneros e amostras distintas foram isoladas conforme critérios morfológicos, descritos por Pitt e Hocking (2009).

As UFCfs de interesse foram transferidas para meio de cultura Czapek Yeast Extract Agar - CYA [1 g de K_2HPO_4 , 10 mL de Czapek concentrado (30 g de NaNO_3 , 5 g de KCl, 5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para 100 mL água destilada), 1 mL de solução metais (1 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para 100 mL de água destilada), 5 g de extrato de levedura, 15 g ágar, 30 g de sacarose, para 1 L de água destilada] e incubadas a 28°C durante 7 dias. E após esse período, foram identificadas morfolologicamente conforme os critérios descritos por Pitt e Hocking (2009).

4.3 INCIDÊNCIA E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE ALHO FRESCO E ARMAZENADO

A salina de cada amostra obtida no item 4.2 foi diluída em série e plaqueada em 10 placas/amostra contendo meio de cultura Dextrose Yeast Glutamato – DYGS modificado (2 g de glicose, 1,5 g de peptona, 2g de extrato de levedura, 0,5 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g de ágar para 1 L de água destilada) conforme descrito por Rodrigues Neto *et al.* (1986). Todas as placas foram incubadas por 48h a 28 °C

A incidência de UFCs de cada amostra foi obtida pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias de bactérias (UFCbs). Os isolados foram selecionados de acordo com critério morfológico, como coloração e textura das colônias.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE BACTÉRIAS

As UFCbs selecionadas tiveram o DNA genômico extraído conforme descritos por Doyle e Doyle (1987) com modificações. Inicialmente, as UFCbs foram inoculadas em 5mL de meio DYGS e incubadas a 37°C a 100 rpm, até uma D.O de 600nm. Após esse período a cultura foi centrifugado *NanoSpinPlus* (Loccus®) a 3.000 rpm por 7 minutos. Ao pellet obtido foi adicionado 1 mL de tampão de extração (SDS 1%; NaCl 100 mM; Tris-HCL (pH 8,0) 10 mM; EDTA (pH 8,0) 1 mM; CTAB 1%; PVP 2% e água ultra pura). Em seguida o material foi incubado a -80°C por 30 minutos, seguido de incubação a 65°C em banho-maria por 1 hora, com homogeneizações a cada 10 minutos. Os microtubos foram incubados a -20°C por 5 minutos e centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm. À fase aquosa foram adicionados 600 µL de clorofórmio e álcool isoamílico 24:1 (v/v), seguido de homogeneização e centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. Essa mesma etapa foi realizada duas vezes. À fase aquosa resultante foi transferida para um tubo de 1,5 mL em seguida adicionado 2/3 do volume de isopropanol -20°C, homogeneizando levemente por inversão e incubado a -20°C por 2 horas. Os microtubos foram centrifugados durante 10 minutos à 14.000 rpm. e ao *pellet* foram adicionados 500 µL de etanol 70 %, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 25 µL de tampão TE (Tris-HCl 1 M (pH 8,0); EDTA 0,5 M (pH 8,0) e armazenado em -20°C. O DNA genômico foi tratado com 3 µL de RNase (110 mg/mL) com incubação a 37°C por 30 minutos, seguido de posterior armazenamento a -20°C. Ao tubo contendo o DNA extraído foi adicionado 3

μL de enzima RNase (110 mg/mL) sendo homogeneizado e incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram armazenadas em -20°C . O DNA genômico foi quantificado em Nanodrop (Thermo Scientific).

4.5 ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO AMPLIFICADO (AFLP)

As UFCbs selecionadas, foram submetidas a técnica de AFLP conforme descrito por Vos *et al.* (1995) – com modificações. A restrição do DNA genômico foi realizado simultaneamente à ligação aos adaptadores. Foi utilizado 500 ng de DNA genômico de cada UFCb previamente selecionado a fase de restrição, foi utilizada 1 U de enzimas de restrição *MseI* (New England Biolab Inc); 5 U *EcoRI* (Thermo Scientific). A ligação dos adaptadores aos fragmentos restringidos foi feita com 2 U de T4 DNA ligase, 1,0 μL de tampão ECO, 1,0 μL de tampão T4 DNA ligase (5X), 1,0 μL de NaCl, 0,5 μL de BSA e 0,5 μL de DTT, q.s.p 23 μL . As reações foram submetidas a um termociclador programado para um ciclo inicial de 4h a 37°C , seguido por uma etapa de 1h e 15 minutos a 22°C , e uma última etapa de 10 minutos a 70°C . O padrão de restrição-ligação foi verificado em gel de agarose 1%.

Em seguida, a reação de amplificação pré-seletiva foi preparada utilizando 3,5 μL de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega); 0,3 mM dos *primers* pré-seletivos *EcoRI* e *MseI*, contendo as sequências de bases dos respectivos adaptadores acrescentados a base pré-seletiva A para *EcoRI* e C para *MseI*; 3,0 μL da diluição (1:5) da restrição-ligação e água ultrapura q.s.p 10 μL . A amplificação pré-seletiva ocorreu nos seguintes ciclos: um ciclo inicial de 72°C por 2 minutos, vinte ciclos de 94°C cada ciclo ocorrendo por 1 segundo, seguido de 56°C por 30 segundos, e 2 minutos a 72°C e um ciclo final de 60°C por 30 minutos. O resultado da amplificação pré-seletiva foi visualização em gel de agarose 1% e o produto amplificado foi diluído (5 ng/ μL) em água ultrapura.

As reações de amplificação seletiva foram realizadas em um volume final de 10 μL contendo 3,5 μL de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega); 0,27 μM de *primer MseI*; 0,0054 μM de *primer EcoRI* marcado com fluoróforo (FAM; NED; VIC; PET); 2,5 μL da reação de pré-amplificação seletiva diluída (5 ng/ μL) em água ultrapura. A amplificação foi realizada em termociclador, ocorrendo um ciclo inicial de 94°C por 2 min, 65°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos; seguido de oito ciclos de 94°C por 1 segundo, 64°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos; vinte e três ciclos de 94°C

por 1 segundo, 56°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, sendo finalizado por um ciclo de 60°C por 30 minutos.

Para a resolução das reações realizadas pela amplificação seletiva com *primers EcoRI* marcados com fluoróforos as reações foram combinadas (2 µL de 6-FAM; 2µL de NED; 2 µL de VIC; 2 µL de PET e 2 µL de água ultrapura) e utilizou 1 µL desta mistura, 2,5 µL da amplificação seletiva e adicionou-se 0,2 µL de *size standard* 600-LIZ (*GeneScan v 2.0*) e 8,8 µL de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*). Em seguida as amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 minutos e foram submetidas à eletroforese capilar em sistema automatizado ABI 3500 xL *Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

A detecção de picos dos eletroferogramas e a determinação do número de fragmentos, gerados partir dos dados de AFLP, foram realizadas pelo software GeneMaPPer® v.4.1 (*Applied Biosystems*). Os picos foram definidos com base em uma unidade de fluorescência relativa mínima de 200 RFU, light smooth e detecção automática de bins. Fragmentos com tamanho variando de 75 a 400 pares de bases, provenientes dos quatro pares de primers, foram combinados em uma única matriz binária de presença (1) e ausência (0). A partir do coeficiente de similaridade de Jaccard foi construído um dendrograma, utilizando-se o método Neighbor Joining, por meio dos pacotes ade4 (Dray e Dufour, 2007) e poppr (Kamvar et al., 2014; Kamvar et al., 2015), implementados no R v. 4.0.1 (R Core Team, 2020).

4.6 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 16S DO DNA RIBOSSOMAL

A partir dos resultados obtidos por AFLP, UFCbs representantes de agrupamentos foram selecionadas para sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal. Para as reações de amplificação foram utilizados os primers 16Sd (5' GCTGGCGGCATGCTTAACACAT 3') e 16Sr (5' GGAGGTGATCCAGCCCGCAGGT 3')

As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL, composto por: 2,5 µL de tampão (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCL 10x concentrado), 2,5 µL de dNTPs (Invitrogen Life Technologies, USA – 2,5 mM), 1 µL de cada um dos respectivos primers (10 pmol/µL), 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,1 µL de Taq DNA polimerase, 0,06 µL de DMSO, 2 µL da amostra de DNA (5 ng/µL).

As reações foram submetidas a um termociclador *Mastercycler gradiente* (Eppendorf®), programado para um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 57°C por 40 segundos, 1 minuto a 72°C, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos. Após o término da reação de amplificação, o produto amplificado foi visualizado em eletroforese em gel de agarose 1,0 % (p/v).

O produto amplificado foi purificado com EXOSAP-IT conforme protocolo do fabricante. Foi incubado a 37°C por 15 minutos para degradação dos primers e nucleotídeos remanescentes. Seguido de outro período de incubação a 80°C por 15 minutos para inativação do reagente EXOSAP-IT®.

4.7 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DA REGIÃO 16S DO DNA RIBOSSOMAL

Os produtos amplificados e purificados foram sequenciados segundo o método de Sanger et al. (1977), utilizando-se o mesmo par de primer descrito no item 4.6.

As reações de sequenciamento foram preparadas em um volume final de 10 µL sendo composta por: 1 µL de tampão 1x (Invitrogen Life Technologies, USA – 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCL), 1 µL de primer *forward* ou *reverse* (10 pmol/ µL), 2 µL de DNA (20 ng/µL), 1 µL do Kit *BigDye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA) e 5 µL de água ultrapura. As reações foram submetidas ao termociclador VERITI® 96 *Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, USA), programado para um ciclo de desnaturação inicial de 95 °C a 1 minuto, seguido de 30 ciclos de amplificação constituídos de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, pareamento a 50 °C por 15 segundos e extensão a 60 °C por 1 minuto e 30 segundos seguido de um ciclo final de 60°C por 1 minuto e 30 segundos. O produto amplificado foi precipitado com 1 µL de acetato de amônio 7,5 M e 27,5 µL de etanol absoluto. O material foi incubado a temperatura de -20 °C por aproximadamente 40 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 4.000 rpm, por 45 minutos, a 20 °C. Ao pellet foi adicionado 130 µL de etanol 70 % seguido de centrifugação a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 20 °C. Na etapa seguinte, foi acrescentado 0,2 µL de acetato de amônio 7,5 M e 80 µL de isopropanol 80%, mantendo a amostra por 10 minutos a 25 °C, seguido de centrifugação a 4.000 rpm, 20°C por 40 minutos. Logo após foram adicionados 80 µL de álcool 70 % ao pellet seguido de nova etapa de centrifugação a 4.000 rpm, por 15 minutos a 20 °C. Após a secagem do pellet o material foi ressuspendido em 10 µL de

formamida, e em seguida a placa foi submetida ao sequenciador ABI 3500XL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA).

4.8 ANÁLISE DE DADOS DO SEQUENCIAMENTO

O processamento das sequências obtidas foi realizado através do software *Electropherogram Quality Analysis* (EMBRAPA). As sequências obtidas foram alinhadas com as sequências disponíveis no National Center for Biotechnology Information – NCBI. A análise filogenética foi realizada através do software MEGA 7 (KUMAR, STECHER, TAMURA, 2015), com construção de árvore filogenética modelo Kimura de 2 parâmetro (K2+G), utilizando dados de distância do método *Neighbor-Joining* (NJ) e análise de bootstrap de 1.000 repetições.

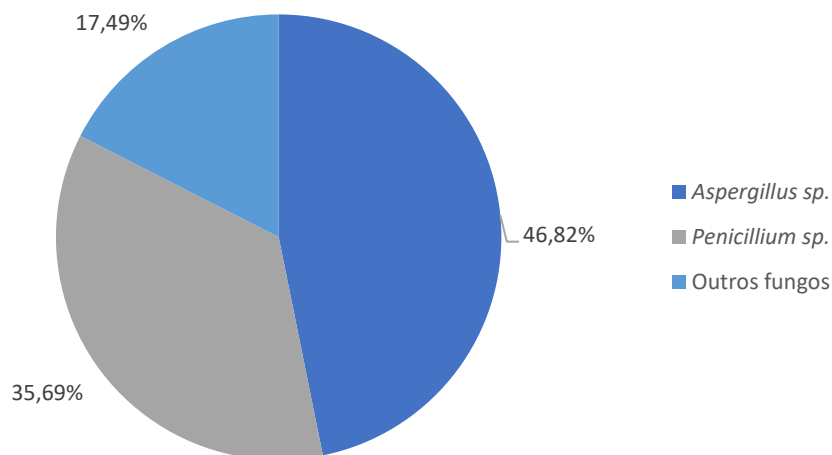
5- RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 INCIDÊNCIA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE FUNGOS EM *Allium sativum* ARMAZENADO E FRESCO

Nas 5 amostras de alho armazenado (bulbilhos), foram encontrados 100% de infecção por fungos. Houve predomínio de Unidades Formadoras de Colônias de fungos (UFCfs) correspondentes aos gêneros *Aspergillus* sp. (46,82%) e *Penicillium* sp. (35,69%) (Figura 4).

Esses dados estão de acordo com o estudo de Vanzela *et al.* (2020) que encontraram maior incidência de *Aspergillus* sp. (50,3%) e *Penicillium* sp. (34,7%) em alhos comercializados no Brasil. Ghangaonkar (2013), ao estudar alho rosado e alho branco da Índia também encontraram maior incidência de *Aspergillus* sp. (90% em alho branco e 90% em alho rosado).

Figura 4 – Incidência de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de fungos em *Allium sativum* armazenado



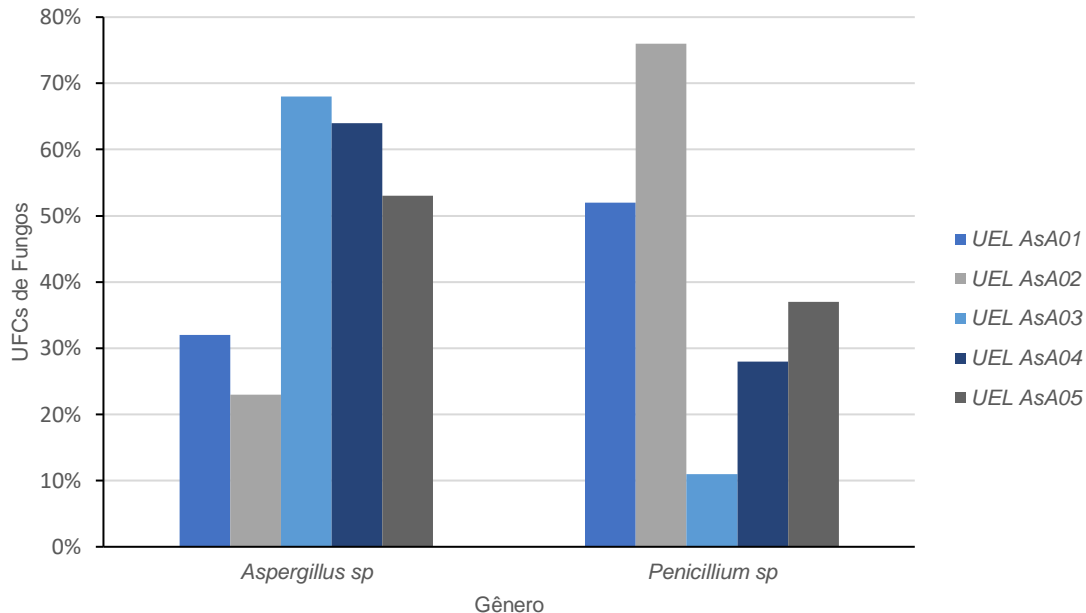
Fonte:

Próprio autor, 2021.

Nas amostras UEL AsA01 e UEL AsA02 houve maior incidência de UFCs do gênero *Penicillium* sp. (52% e 76%, respectivamente), seguido pelo gênero *Aspergillus* sp. (32% e 23%, respectivamente). Por outro lado, nas amostras UEL AsA03, UEL AsA04 e UEL AsA05 houve maior incidência de *Aspergillus* sp. (68%, 64% e 53% respectivamente). Representantes do gênero *Penicillium* sp. foram

encontrados como o segundo gênero mais incidente nessas amostras (UELA03 – 11%, UELAsA04 – 28% e UELAsA05 – 37%), como observado na figura 5.

Figura 5 - Incidência de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de fungos de amostras de *Allium sativum* armazenado

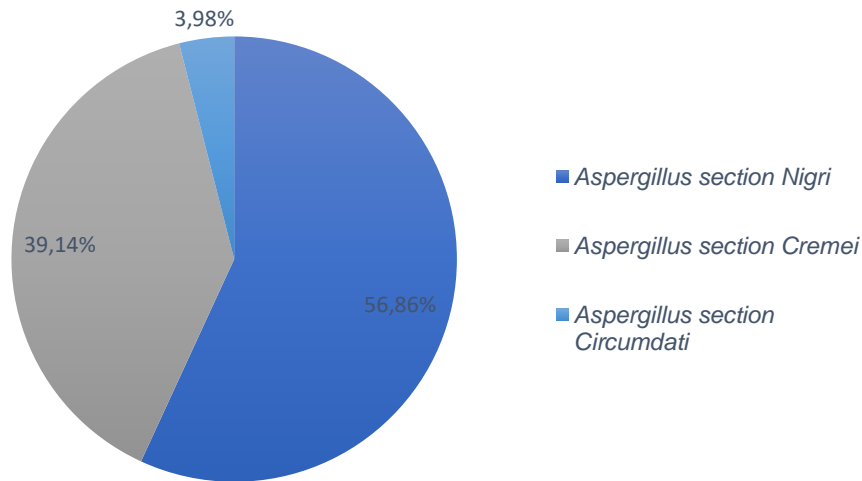


Fonte: Próprio autor, 2021.

O gênero *Aspergillus* é constituído por aproximadamente 300 espécies segundo Samson, *et al.* (2014). As espécies deste gênero são agrupadas em seções conforme similaridade entre caracteres morfológicos, bioquímicos e moleculares (SAMSON *et al.*, 2014). Dentre as seções que compõe o gênero *Aspergillus* e que foram encontradas em alho, tem-se relatos da presença de *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus* section *Cremeri*, *Aspergillus* section *Circumdati* e *Aspergillus* section *Flavi* (GHANGAONKAR, 2013; FONTENELE *et al.*, 2015; MONTEIRO, 2018 e VANZELA *et al.*, 2020).

Dentre os *Aspergillus sp.* identificados morfológicamente nas 5 amostras de alho armazenado, 56,86 % pertencem à *Aspergillus* section *Nigri*, 39,14 % à *Aspergillus* section *Cremeri* e 3,98 % à *Aspergillus* section *Circumdati* (Figura 6).

Figura 6 - Identificação morfológica de Unidades Formadoras de Colônias de *Aspergillus* sp. em *Allium sativum* armazenado



Fonte: Próprio autor, 2021.

Foi observado maior incidência de UFCfs pertencentes à *Aspergillus* section *Nigri* na amostra UEL AsA05 (90%), seguido pela amostra UEL AsA01 (88%), UEL AsA04 (50%) e UEL AsA03 (41%). Interessantemente, nenhuma UFCf pertencente à *Aspergillus* section *Nigri* foi encontrada na amostra UEL AsA02.

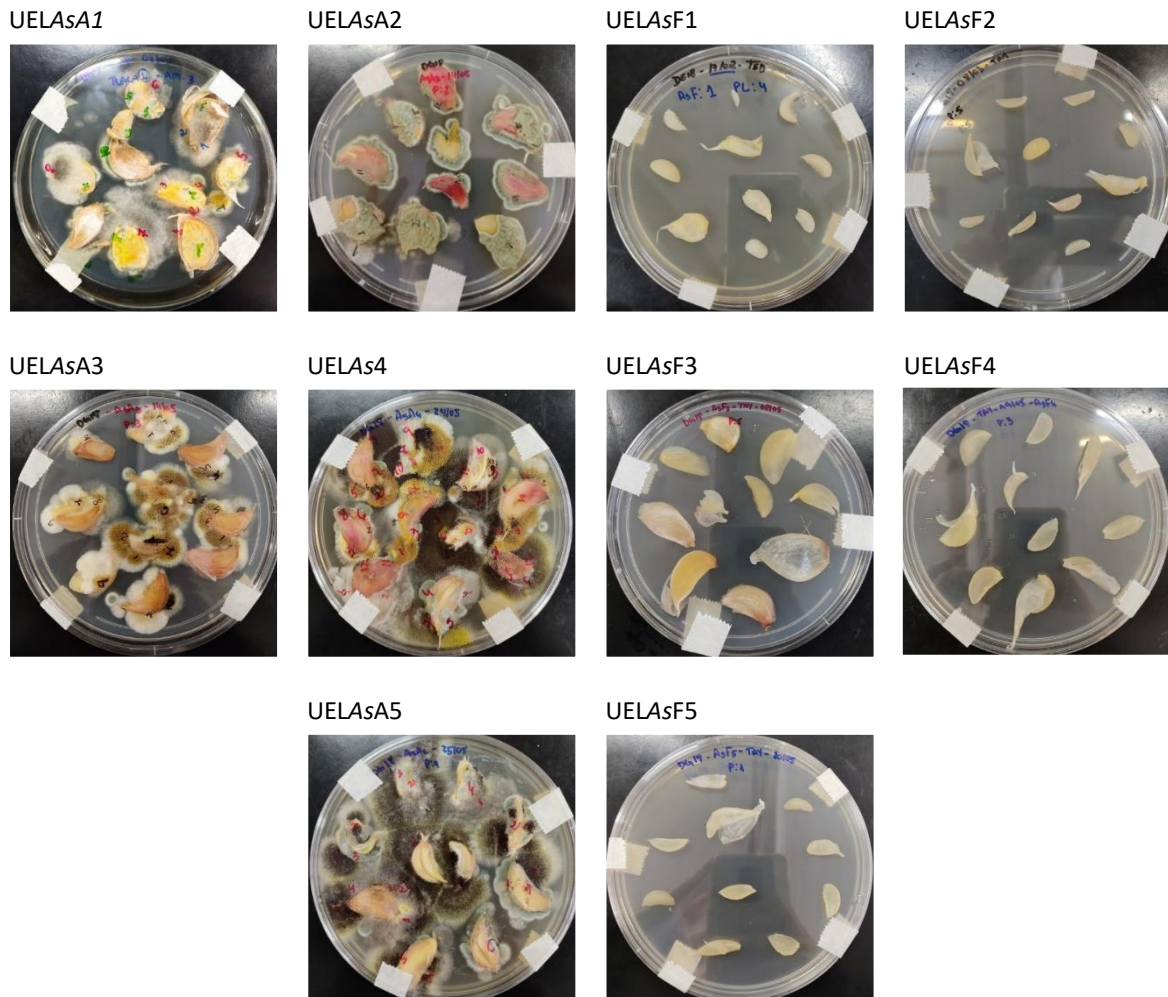
Vanzela *et al.* (2020), verificaram a incidência de fungos em alhos comercializados no Brasil e identificaram predominância do gênero *Aspergillus* (50,3%), sendo *Aspergillus* section *Nigri* (63%) mais incidente, seguido de *Aspergillus* section *Flavi* (19,5%), e *Aspergillus* section *Circumdati* (17,7%). Em contraste com esse estudo, nenhuma UFC de *Aspergillus* section *Flavi* foi relatada. Ainda similarmente a este estudo Massi *et al.* (2016), também encontraram maior incidência de *Aspergillus* section *Nigri* em cebolas.

Aspergillus section *Cremei* foi a segunda seção mais incidente (39,14%) em amostras de alho armazenado. A maior incidência foi encontrada na amostra UEL AsA02 (92%), seguido da amostra UEL AsA03 (53%). *Aspergillus* section *Cremei* foi encontrado pela primeira vez em alho por Monteiro (2018) e a espécie mais incidente foi *Aspergillus europaeus*, descrita por Hubka *et al.* (2016).

E por fim, *Aspergillus* section *Circumdati* foi a seção menos incidente (UEL AsA02 – 8%, UEL AsA03 – 6%, UEL AsA04 – 4% e UEL AsA05 – 2%) nas amostras de alho. Na amostra UEL AsA01 não houve presença de *Aspergillus* section *Circumdati*.

Quanto a incidência de fungos em *Allium sativum* fresco, nenhuma UFC foi encontrada neste estudo como é possível observar na figura 7. Em contraste com Ghangaonkar (2013) que encontrou espécies como *Alternaria porri*, *Stemphylium botryosum*, *Cladosporium alli*, *Helmenthosporium alli*, *Colletotrichum circinace* e *Curvularia lunata* em alho fresco. No entanto, o autor associou a presença de tais espécies aos danos nos bulbos de alho analisados. E, de fato, espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* foram detectadas até o momento em amostras de alho fresco.

Figura 7- Incidência de Unidades formadoras de colônias em amostras de alho armazenado e alho fresco.



Fonte: Próprio autor (2022);

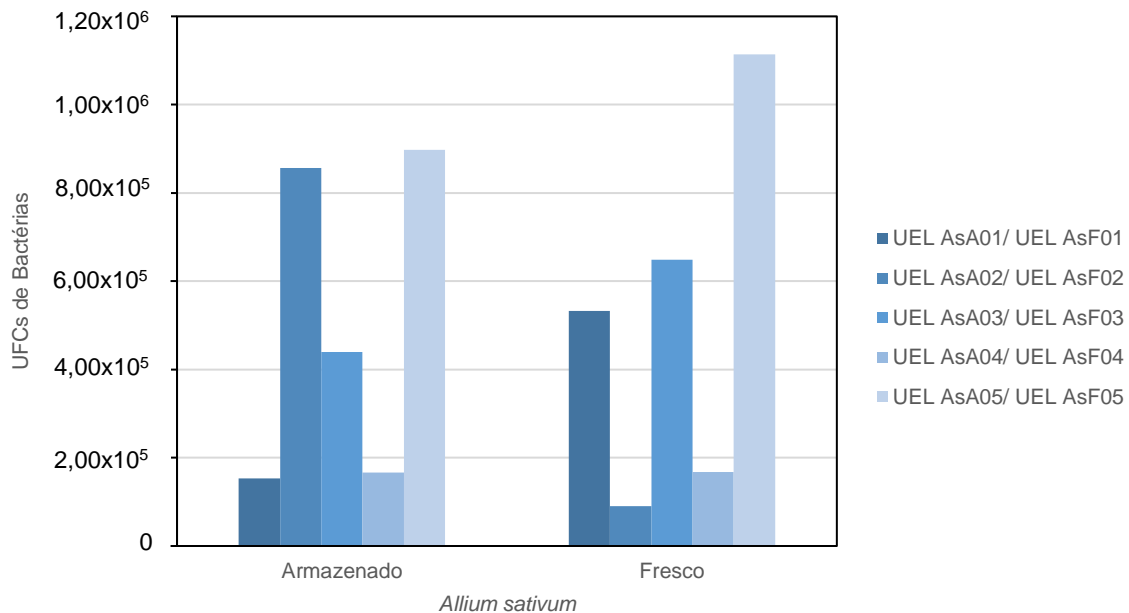
Alguns relatos tem associado o período de armazenamento do alho com a consequente queda dos compostos bioativos e infecção por microrganismos (FEI *et al.*, 2015; DUFOO *et al.*, 2015). No entanto, segundos estes relatos a infecção por microrganismos parece estar mais associada a danos nos bulbos.

5.2 INCIDÊNCIA DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS DE *Allium sativum* FRESCO E ARMAZENADO

Dentre as 5 amostras de alho armazenado todas apresentaram UFCbs ($5,02 \times 10^5$). A maior incidência de UFCb foi encontrada nas amostras UELAsA02 e UELAsA05 (Fig. 8) Por outro lado, as amostras UEL AsA01 e UEL AsA04 apresentaram menor incidência de UFCbs (Figura 8).

Quanto às amostras de alho fresco, a maior incidência de UFCbs foi encontrada nas amostra UEL AsF05. Por outro lado, as amostras UEL AsF03 e UEL AsF04 apresentaram a menor incidência de UFCbs (Fig. 8).

Figura 8 - Incidência de Unidades Formadoras de Colônias de bactérias em amostras de *Allium sativum* fresco e armazenado.



Fonte: Próprio autor, 2021

Ao comparar a incidência total de UFCb em amostras de alho fresco e armazenado, foi possível verificar uma pequena diferença de incidência de UFCbs de amostras de alho fresco ($4,68 \times 10^6$), em relação a UFCbs de amostras de alho armazenado ($3,60 \times 10^6$). Estes dados corroboram com Junior *et al.* (2020) que encontraram $10^6 - 10^7$ UFC em raiz de alho, assim como com o estudo de Wang *et al.* (2019), isolaram 35 bactérias de bulbos de alho armazenado e identificaram 10^2 a 10^5 UFCs.

Até o momento, somente o estudo de Qiu *et al.* (2017), relataram a incidência de UFCbs em alho armazenado, essa incidência foi de 10^2 UFC.

5.3 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE BACTÉRIAS

Com o critério de representar todas as amostras de alho utilizados nesse estudo, foram selecionadas e isoladas 154 UFCbs (tabela 2).

Tabela 2 - Unidades Formadoras de Colônias isolados de *Allium sativum* Fresco e Armazenado

ISOLADOS	ORIGEM	CLASSIFICAÇÃO
UEL AsA1.447	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA1.427	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA1.376	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA1.1316	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA1.433	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA1.776	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA1.1245	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA1.41	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA1.246	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA1.1251	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA1.6	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA1.248	LONDRINA/ PR	ARMAZENADO
UEL AsF1.20	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF1.1	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF1.6	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF1.483	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF1.27	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF1.14	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF1.109	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsA2.606	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA2.73	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA2.81	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA2.78	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA2.83	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA2.23	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA2.24	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA2.82	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA2.27	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA2.13	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA2.3	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsF2.59	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.42	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.45	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.47	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.79	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.2	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.1	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.13	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.32	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.33	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.8	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.110	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsF2.5	ARAPONGAS/ PR	FRESCO
UEL AsA3.7	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA3.1	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO

UEL AsA3.8	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA3.42	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA3.10	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA3.9	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA3.41	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA3.17	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA3.66	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA3.40	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA3.44	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA3.314	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA3.367	IBIPORÃ/ PR	ARMAZENADO
UEL AsF3.93	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.14	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.11	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.15	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.95	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.102	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.18	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.96	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.339	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.298	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.136	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.593	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF3.532	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsA4.51	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.49	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.54	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.50	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.63	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.62	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.61	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.21	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
ULE AsA4.2	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.1	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.23	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.11	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.40	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.1415	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsA4.86	LONDRINA / PR	ARMAZENADO
UEL AsF4.9	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF4.74	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF4.66	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF4.15	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF4.6	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF4.2	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF4.7	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF4.3	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF4.5	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsA5.40	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA5.6	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA5.31	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO

UEL AsA5.16	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA5.185	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA5.30	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA5.2	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA5.1	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA5.27	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA5.47	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA5.171	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA5.54	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsA5.60	JATAIZINHO/ PR	ARMAZENADO
UEL AsF5.3	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF5.187	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF5.1	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF5.20	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF5.4	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF5.328	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF5.53	ARAPONGAS / PR	FRESCO
UEL AsF5.21	ARAPONGAS / PR	FRESCO

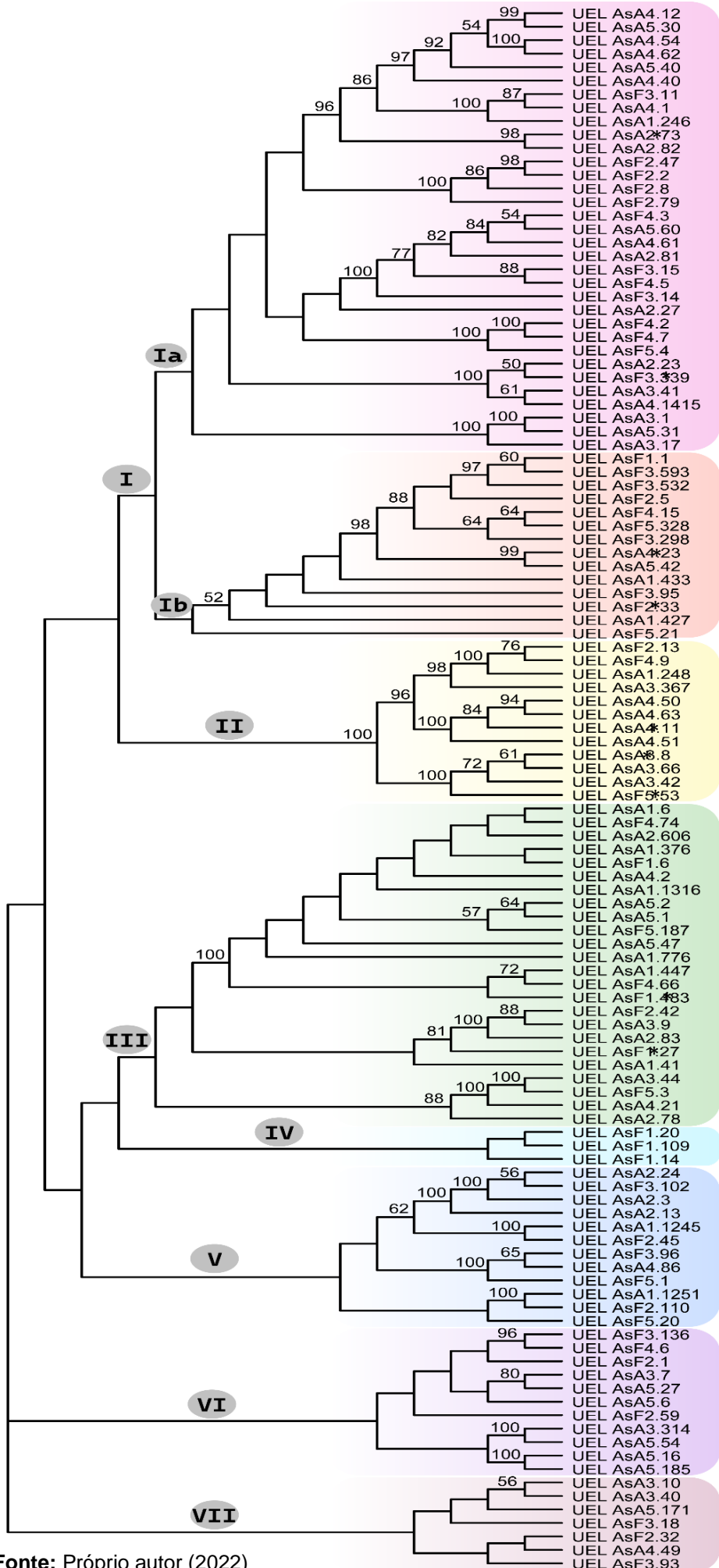
Fonte: Próprio autor

As UFCbs submetidas à análise de AFLP foram organizadas em 7 grupos (I, II, III, IV, V, VI, VII) (Fig. 9). Os grupos I e III apresentaram maior número de isolados (46 e 27 – respectivamente), enquanto que o grupo IV apresentou o menor número de isolados (3 isolados). Todos os grupos abrigaram isolados obtidos de amostras de alho fresco e armazenados, com exceção do grupo IV, formado apenas com isolados obtidos de amostras de alho fresco. Esse fato, no entanto, pode ser devido ao pequeno número de isolados abrigados nesse grupo.

O grupo I, foi subdivido em grupo I-a, com predomínio de isolados obtidos de amostras de alho armazenado e o grupo I-b, com predomínio de amostras obtidas de alho fresco.

Figura 9 - Dendrograma construído a partir de 154 isolados de bactérias de *Allium sativum* fresco e armazenado. O método UPGMA foi utilizado com base em uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard. Os isolados foram agrupados em 7 grupos e 2 subgrupos (Grupos I, II, III, V, VI e VII. Subgrupos Ia e Ib).

* Isolados sequenciados.

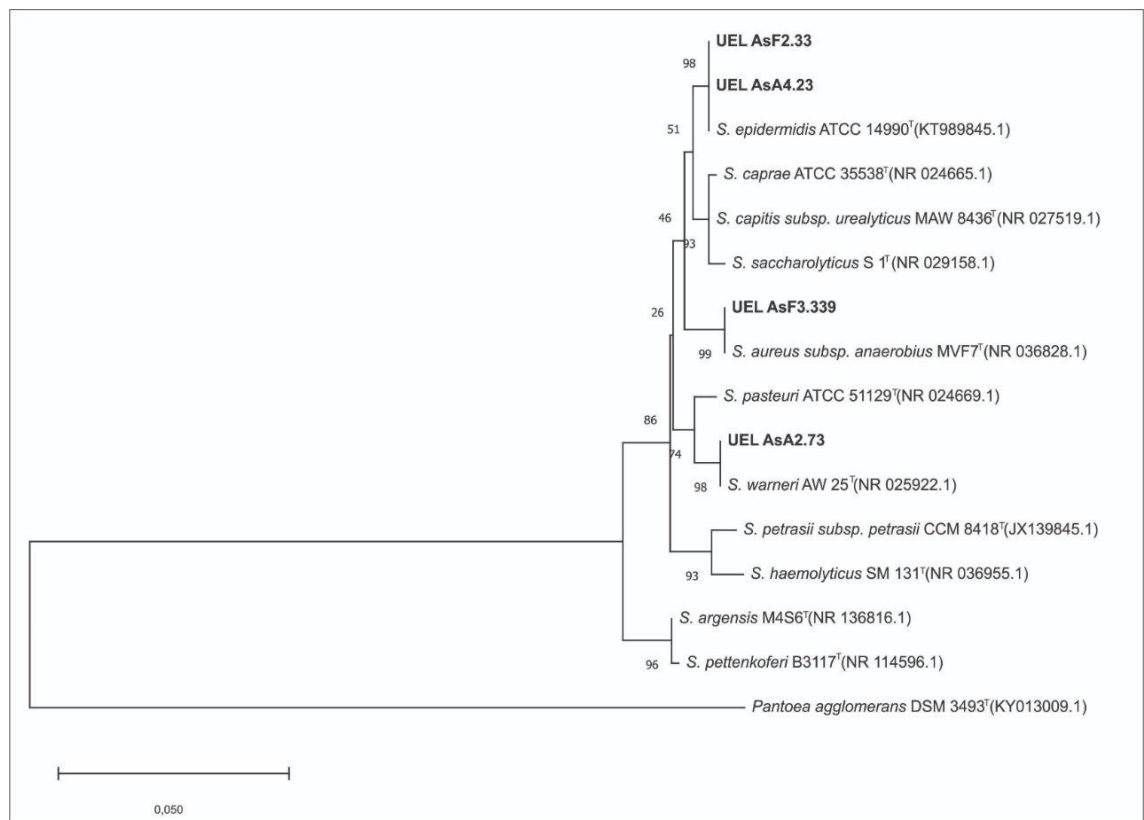


Fonte: Próprio autor (2022)

Com o agrupamento obtido por AFLP, foram selecionados isolados representantes dos grupos com maior número de isolados (grupos I, II e III), para identificação das espécies, a partir da região 16S do DNA ribossomal. Os isolados foram: UEL AsA2.73; UEL AsF3.399; UEL AsA4.23; UEL AsF2.33; UEL AsA4.11; UEL AsA3.8; UEL AsF5.53; UEL AsF1.483; e UEL AsF1.27.

Selecionados pertencentes ao grupo I (UEL AsA2.73; UEL AsF2.33; UEL AsF3.339; UEL AsF4.2; e UEL AsA4.23) foram agrupados com espécies do gênero *Staphylococcus*. Os isolados UEL AsF2.33 e UEL AsA4.23 pertencentes ao subgrupo I-b foram identificados como *Staphylococcus epidermidis*, (Fig. 9). Os isolados UEL AsF3.339 e UEL AsA2.73 pertencentes ao subgrupo I-a foram identificados como *Staphylococcus warneri*, respectivamente (Fig.10).

Figura 10 - Árvore filogenética construída com base em dados de sequência parcial da região 16S do DNA ribossomal, utilizando dados de distância Neighbor-Joining (NJ) e análise de bootstrap de 1.000 repetições. Utilizou-se *Pantoea agglomerans* como grupo externo.



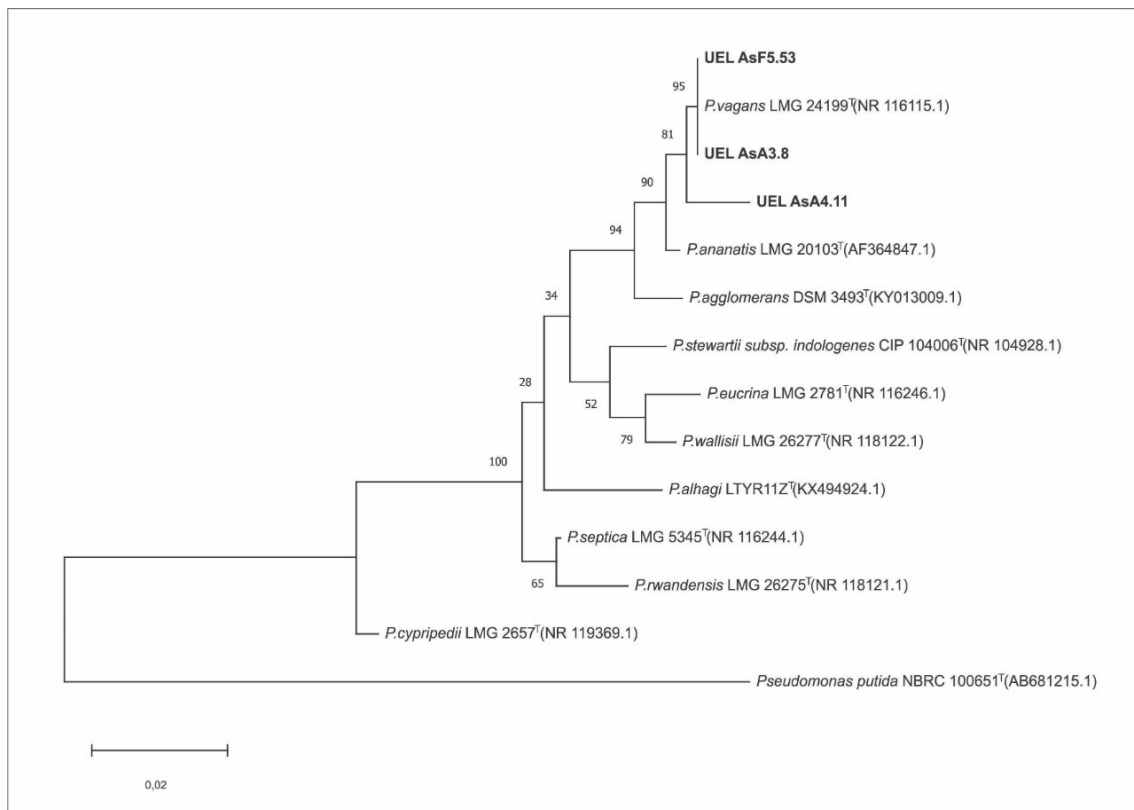
Fonte: próprio autor (2022)

Espécies do gênero *Staphylococcus* podem ser encontradas em alimentos, devido à infecção ambiental ou práticas inadequadas de manuseio (MARINO *et al.*,

2011; BENNETT, HAIT e TALENTT, 2013; KADARIYA, SMITH e THAPALIYA, 2014). Qiu *et al.* (2017), identificaram *Staphylococcus epidermis* em alhos na China. Espécies como *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri* e *Staphylococcus aureus* possuem relatos incidência em diferentes alimentos (frutas, carnes, vegetais e leite) (MARINO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2019).

Os isolados abrigados no grupo II (UEL AsA3.8; UEL AsA4.11; e UEL AsF5.53) foram identificados como *Pantoea vagans* (Fig.11).

Figura 11 - Árvore filogenética construída com base em dados de sequência parcial da região 16S do DNA ribossomal, utilizando dados de distância Neighbor-Joining (NJ) e análise de bootstrap de 1.000 repetições. Utilizou-se *Pseudomonas putida* como grupo externo (AB681215).



Fonte: Próprio autor (2022);

O gênero *Pantoea* pertence à família das *Enterobacteriaceae* gram-negativas e foi descrito a primeira vez por Gavini *et al.*, (1989). Algumas espécies do gênero *Pantoea* foram relatados como produtores de antibióticos, controle biológico de insetos, podem ser aplicados no congelamento de alimentos para obtenção de textura desejadas e na liofilização de alimentos (COUTINHO e VENTER, 2009; WALTERSON

e STAVRINIDES, 2015; 2019; DONI *et al.*, 2021). *Pantoea agglomerans* e *Pantoea vagans* são utilizadas para produção de antibióticos BlightBan C9-1™, BloomTime Biological™ e BlossomBless™ (SMITS *et al.*, 2019)

Pantoea agglomerans foi identificado em repolho, espinafre, tomate, kiwi, trigo, feijão verde e arroz (HAMILTON-MILLER e SHAH, 2001; SCHWAIGER *et al.*, 2011; WALTERSON e STAVRINIDES, 2015; AL-KHAROUSI *et al.*, 2016).

O gênero *Pantoea* também foi relatado em alho poró, cebolas e cebolinhas (WALTERSON e STAVRINIDES, 2015; YURGEL *et al.*, 2018). A espécie *Pantoea anatis* é mais comumente encontrada.

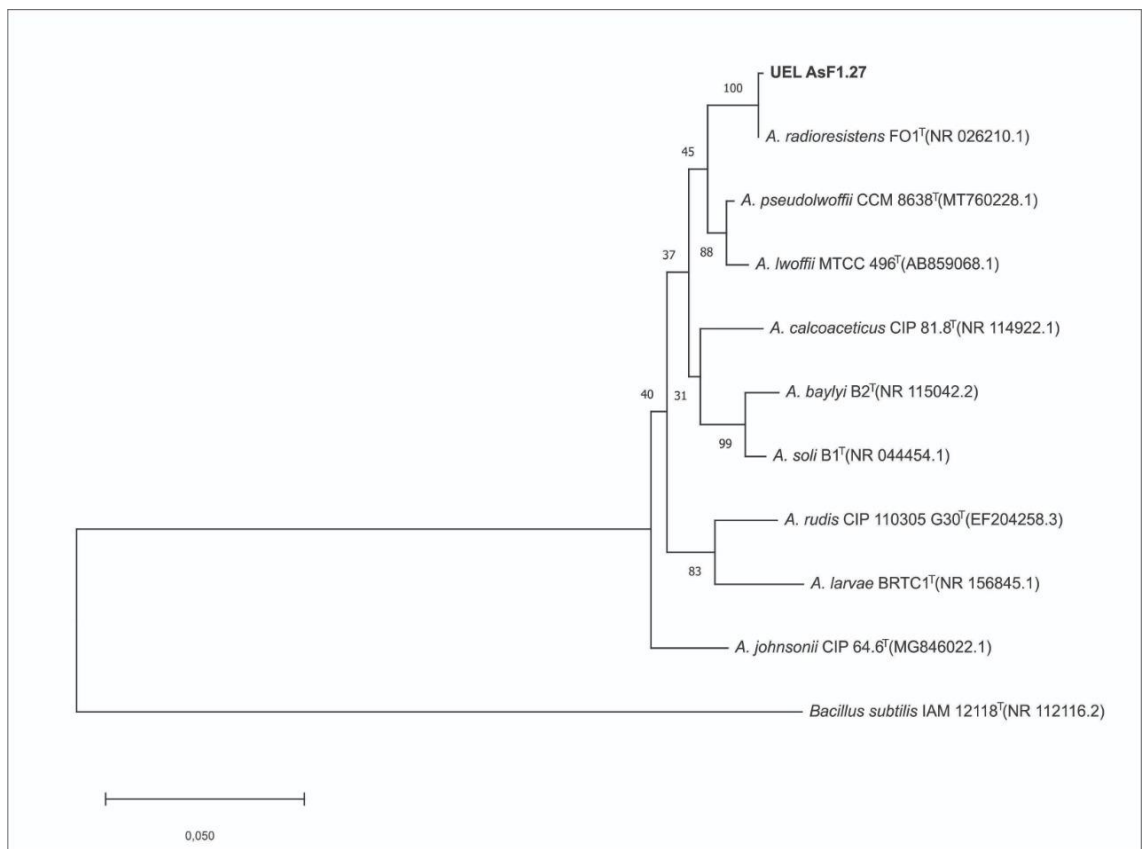
O isolado pertencente ao grupo III (UEL AsF1.483) foi identificado como *Bacillus spizizenii* / *Bacillus tequilensis* (Fig.12).

Bacillus cereus, *Bacillus subtilis*, *Bacillus aerius*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus aryabhatai* foram encontradas nesses vegetais (NITHYA e BABU, 2017).

Qiu *et al.* (2017), ao estudarem alho negro e alho saudável fresco, identificaram as espécies de *B. aryabhatai*, *B. methylotrophicus*, *B. altitudinis*, *B. siamensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* e *B. thuringiensis*

Ainda em relação ao grupo III, o isolado UEL AsF1.27 foi identificado como *Acinetobacter radioresistens* (Fig. 13).

Figura 13 - Árvore filogenética construída com base em dados de sequência parcial da região 16S do DNA ribossomal, utilizando dados de distância *Neighbor-Joining* (NJ) e análise de bootstrap de 1.000 repetições. Utilizou-se *Bacillus subtilis* como grupo externo (NR 112116.2).



Fonte: próprio autor (2022);

As bactérias pertencentes ao gênero *Acinetobacter* são características por serem gram-negativas, estritamente aeróbicas e não fermentadores. Esse gênero

possui espécies patogênicas e não patogênicas e prevalecem em muitos nichos ecológicos. São facilmente encontradas em vegetais, animais, humanos e áreas contaminadas (ATROUNI *et al.*, 2016; CARVALHEIRA, SILVA e TEIXEIRA, 2017; 2021).

A espécie mais relatada é *Acinetobacter baumannii* devido ao seu importante papel nas infecções humanas, por apresentar alta resistência antibiótica. O gênero *Acinetobacter* tem sido amplamente explorado quanto a produção de biosurfactante e bioemulsificante pela capacidade de degradação de poluentes e compostos orgânicos (RON e ROSENBERG, 2002; ATROUNI *et al.*, 2016; ADETUNJI e OLANIRAN, 2020).

As diferentes espécies de *Acinetobacter* são incidentes em amostras de peixe, carne, queijo, leite, frutas e vegetais (ATROUNI *et al.*, 2016; CARVALHEIRA, SILVA e TEIXEIRA, 2017). O estudo realizado em cebolas de Yurgel *et al.* (2018), relatou a presença desse gênero principalmente em cebolas doentes, em nosso estudo essas bactérias foram identificadas tanto em amostras frescas quanto em amostras armazenadas.

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho relataram maior incidência dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Quanto ao alho fresco, nenhuma UFCf foi identificada. UFCs de bactérias foram organizadas em 7 grupos de similaridade e os isolados representantes dos grupos com maior número de UFCs foram identificadas. As UFCs foram identificadas como: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri* (grupo I), *Pantoea vagans* (grupo II), *Bacillus spizizenii* / *Bacillus tequilensis* e *Acinetobacter radioresistens* (grupo III). Não foi possível distinguir espécies de bactérias características de alho fresco ou armazenado. Em contraste, este estudo demonstrou evidente distinção entre microbiota de alho fresco e armazenado.

7 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADETUNJI, A. I.; OLANIRAN, A. I. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: an overview. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 669-679, 2021.

AL-KHAROUSHI, Z. S.; GUIZANI, N.; AL-SADI, A. M.; AL-BULUSHI, I. M.; SHAHAROONA, B. Hiding in Fresh Fruits and Vegetables: opportunistic pathogens may cross geographical barriers. **International Journal Of Microbiology**, v. 2, p. 1-14, 2016.

ANAPA - ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO. Alho brasileiro sofre concorrência desleal, 2018.

ARTINS, Natália; PETROPOULOS, S; FERREIRA, Isabel C.F.R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: a review. **Food Chemistry**, v. 211, p. 41-50, 2016.

ARZANLOU, M.; BOHLOOLI, S. Introducing of green garlic plant as a new source of allicin. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 179-183, 2010.

ARZANLOU, M.; BOHLOOLI, S. Introducing of green garlic plant as a new source of allicin. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 179-183, 2010.

ATROUNI, A. A.; JOLY-GUILLOU, M.; HAMZE, M.; KEMPF, M. Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* species. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, n. 49, p. 1-12, 2016.

BAGHALIAN, K.; ZIAI, Seyed A.; NAGHAVI, M. R.; BADI, H. N.; KHALIGHI, A. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. **Scientia Horticulturae**, v. 103, n. 2, p. 155-166, 2005.

BENNETT, R. W.; HAIT, J. M.; TALLENT, S. M. *Staphylococcus aureus*. **Guide To Foodborne Pathogens**, p. 26-44, 26 jul. 2013.

BOTELHO, G. R.; LEONCIO, M. R. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria isolated from garlic (*Allium sativum*). **Scientia Agraria**, v. 18, n. 3, p. 95, 2017.

BOTELHO, G. R.; LEONCIO, M. R. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA ISOLATED FROM GARLIC (*allium sativum*). **Scientia Agraria**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 95, 29 set. 2017.

CAPLICE, E; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, [S.L.], v. 50, n. 1-2, p. 131-149, 1999.

CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C. Pathogen update: *Bacillus* species. **Advances In Microbial Food Safety**, p. 70-96, 2013.

CARR, E. A.; BONASERA, J. M.; ZAID, A. M.; LORBEER, J. W.; BEER, S. V. First Report of Bulb Disease of Onion Caused by *Pantoea ananatis* in New York. **Plant Disease**, v. 94, n. 7, p. 916-916, 2010.

CARVALHEIRA, A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. *Acinetobacter* spp. in food and drinking water – A review. **Food Microbiology**, v. 95, p. 2-12, 2021.

- CARVALHEIRA, A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Lettuce and fruits as a source of multidrug resistant *Acinetobacter* spp. **Food Microbiology**, v. 64, p. 119-125, 2017.
- CHEN, S.; SHEN, X.; CHENG, S.; LI, P.; CHANG, Y.; MENG, H. Evaluation of Garlic Cultivars for Polyphenolic Content and Antioxidant Properties. **Plos One**, v. 8, n. 11, online, 2013.
- COSTA JÚNIOR, P. S. P.; CARDOSO, F. P.; MARTINS, A. D.; BUTTRÓS, V. H. T.; PASQUAL, M.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; DÓRIA, J. Endophytic bacteria of garlic roots promote growth of micropropagated meristems. **Microbiological Research**, v. 241, p. 1-10, 2020
- COUTINHO, T. A.; VENTER, S. N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 3, p. 325-335, 2009.
- DALONSO, N.; IGNOWSKI, E.; MONTEIRO, C. M. A.; GELSLEICHTER, M.; WAGNER, T. M.; SILVEIRA, M. L.L.; SILVA, D. A. K. Extração e caracterização de carboidratos presentes no alho (*Allium sativum* L.) proposta de metodologia alternativa. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 4, p. 793-797, Campinas, 2009.
- DIVYA, J. B.; VARSHA, K. K.; NAMPOOTHIRI, K. M.; ISMAIL, B.; PANDEY, A. Probiotic fermented foods for health benefits. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, p. 377-390, 2012.
- DONI, F.; SUHAIMI, N. S. M.; IRAWAN, B.; MOHAMED, Z.; MISSPAN, M. S. Associations of *Pantoea* with Rice Plants: as friends or foes?. **Agriculture**, v. 11, n. 12, p. 1278, 2021.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L.; HORTORIUM, L.H.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p. 13-15, 1987.
- DRAY, S.; DUFOUR, A. **The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists**. Journal of Statistical Software, v. 22, p. 1-20, 2007.
- DUFOO-HURTADO, M. D.; HUERTA-OCAMPO, J. A.; BARRERA-PACHECO, A.; LAROSA, A. P. B.; MERCADO-SILVA, E. M. Low temperature conditioning of garlic (*Allium sativum* L.) "seed" cloves induces alterations in sprouts proteome. **Frontiers In Plant Science**, v. 6, p. 332, 2015.
- FEI, M. L.; TONG, L.; WEI, L.; YANG, L. Changes in antioxidant capacity, levels of soluble sugar, total polyphenol, organosulfur compound and constituents in garlic clove during storage. **Industrial Crops And Products**, v. 69, p. 137-142, 2015.
- FERNANDEZ, M.; HUDSON, J. A.; KORPELA, R.; de LOS REYES-GAVILAN, C. G. Impact on human health of microorganisms present in fermented dairy products: An overview. **BioMed Research International**, p. 1-13, online, 2015.
- FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal Of Biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.
- FONTENELE, L. M.S.; AZEVEDO, M. L.X.; CARDOSO FILHO, F. C.; MURATORI, M. C.S.; SÁ, L.R.S.; PEREIRA, M. M.G. Qualidade microbiológica do alho (*Allium*

sativum) produzido e comercializado em mercados públicos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.74, n.4, p. 420-425, 2015

FREDDO, A. R. L. F. Alho. **Conjuntura mensal**. CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento, maio, 2016.

GÁLVEZ, L.; PALMERO, D. Incidence and Etiology of Postharvest Fungal Diseases Associated with Bulb Rot in Garlic (*Allium sativum*) in Spain. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 2-12, 2021

GAVINI, F.; MERGAERT, J.; BEJI, A.; MIELCAREK, C.; IZARD, D.; KERSTERS, K.; LEY, J. de. Transfer of Enterobacter agglomerans (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 3, p. 337-345, 1989.

GHANGAONKAR, N. Incidence of Microflora on Garlic (*Allium Sativum* L.) Bulbs. **International Research Journal of Bioblogical Sciences**, v. 2, n. 7, p. 64-66, online, 2013.

GNONLONFIN, G.J.B.; ADJOVI, Y.C.; TOKPO, A.F.; AGBEKPONOU, E.D.; AMEYAPOH, Y.; SOUZA, C. de; BRIMER, L.; SANNI, A. Mycobiota and identification of aflatoxin gene cluster in marketed spices in West Africa. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 115-120, 2013.

GUEVARA-FIGUEROA, T.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, L.; LOPEZ, M.G.; HURTADO, M.D. D.; VÁZQUEZ-BARRIOS, M.e.; GUEVARA-OLVERA, L.; GONZÁLEZ, R.G. G.; RIVERA-PASTRANA, D.M.; TORRES-ROBLES, H.; MERCADO-SILVA, E.M. Conditioning garlic “seed” cloves at low temperature modifies plant growth, sugar, fructan content, and sucrose sucrose fructosyl transferase (1-SST) expression. **Scientia Horticulturae**, v. 189, p. 150-158, 2015.

HAMILTON-MILLER, J.M.T; SHAH, S. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 18, n. 1, p. 81-83, 2001.

HONORATO, A. R. F; NEGREIROS, M. Z.; RESENDE, F. V.; LOPES, W. A. R.; SOARES, A. M. Avaliação de cultivares de alho na região de Mossoró. **Revista Caatinga**, v. 6, n. 3, p. 80 – 88, Mossoró, 2013.

HU, Q.; FANG, Y.; ZHU, J.; XU, W.; ZHU, K. Characterization of *Bacillus* species from market Foods in Beijing, China. **Process**, v. 9, n. 5, p. 2-12, 2021.

HUBKA, V.; NOVÁKOVÁ, A.; SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; SKLENÁŘ, F.; VARGA, J.; KOLAŘÍK, M. *Aspergillus europaeus* sp. nov., a widely distributed soil-borne species related to *A. wentii* (section *Cremeri*). **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, n. 6, p. 641-650, 2016

ICHIKAWA, M.; IDE, N.; YOSHIDA, J.; YAMAGUCHI, H.; ONO, K. Determination of seven organosulfur compounds in Garlic by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1535-1540, 2006.

IRKIN, R.; KORUKLUOGLU, M. Control of *Aspergillus niger* with Garlic, Onion and Leek Extracts. **African Journal of Biotechnology**, v.6, p. 384-387, 2007.

- KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: an ongoing challenge in public health. **Biomed Research International**, v. 2014, p. 1-9, 2014.
- KAMVAR, Z. N.; TABIMA, J.F.; GRÜNWALD, N.J. **Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction**. PeerJ, v.2, e281, 2014.
- KAMVAR, Z.N.; BROOKS, J. C.; GRÜNWALD, N.J. **Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality**. *Frontiers in Genetics*, v. 6, 208, 2015.
- KOPÉC, A.; SKOCZYLAS, J.; ELZBIETA, J.; FRANCIK, R.; BYSTROWSKA, B.; JERZY, Z. Chemical composition and concentration of bioactive compounds in garlic cultivated from air bulbils. **Agriculture**, n. 10, v. 40, p. 1-15, 2020.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* (submitted). 2015.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, v.4, p. 512, 2002.
- LUCINI, M.A. Alho roxo no Brasil: um pouco da história dos números desse nobre. In: Alho roxo, sua história em números. **Revista Nosso Alho**, v.1, n.1, p.16-22, 2008.
- MACÊDO, F. S.; SOUZA, R. J. D.; PEREIRA, G. M. Controle de superbrotamento e produtividade de alho vernalizado sob estresse hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 629-635, 2006.
- MARCO, M. I.; HEENEY, D.; BINDA, S.; CIFELLI, C. J.; COTTER, P. D.; FOLIGNÉ, B.; GANZLE, M.; KORT, R.; PASIN, G.; PIHLANTO, A.; SMID, E.J.; HUTKINS, R. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94-102, 2017.
- MARINO, M.; FRIGO, F.; BARTOLOMEOLI, I.; MAIFRENI, M. Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 2, p. 550-561, 2010.
- MASSI, F. P.; SARTORI, D.; FERRANTI, L. de S.; IAMANAKA, B. T.; TANIWAKI, M. H.; VIEIRA, M. L. C.; FUNGARO, Maria H. P. Prospecting for the incidence of genes involved in ochratoxin and fumonisin biosynthesis in Brazilian strains of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 19-28, 2016.
- MITROVÁ, K.; SVOBODA, P.; MILELLA, L.; OVESNÁ, J. Allinase and cysteine synthase transcription in developing garlic (*Allium sativum* L.) over time. **Food Chemistry**, v. 251, p. 103-109, 2019.
- MOHARAM, M. H.A; FARRAG, E. S.H; MOHAMED, M. D.A. Pathogenic fungi in garlic seed cloves and first report of *Fusarium proliferatum* causing cloves rot of

- stored bulbs in upper Egypt. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 46, n.17, p. 2096-2103, Egito, 2013.
- MOTA, J. H.; SOUZA, R.J.D.; YURI, J.E.; REZENDE, G.M.D.; TEIXEIRA, I.R. Similaridade morfológica de cultivares de alho (*Allium sativum* L.). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.4, n.8, 2005.
- NITHYA, A.; BABU, S. Prevalence of plant beneficial and human pathogenic bacteria isolated from salad vegetables in India. **Bmc Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 2-16, 2017.
- OLIVA, F. A.; AMIN, M. V.; FERNANDES, D.; POCAIA, A. P. V.; LIMA, B. C.; CARVALHO, L. O.; LIMA, M. A. ANÁLISE DE CUSTOS E LUCRATIVIDADE DA CULTURA DO ALHO. **Colloquium Agrariae**, v. 13, p. 30-34, 2017.
- OMAR, S.H, AL-WABEL N. Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 1, p. 51-58, jan. 2010.
- PETTI, C. A.; POLAGE, C. R.; SCHRECKENBERGER, P. The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6123-6125, 2005.
- PING, S.P; SHIH, S.C; RONG, C.T; KING, W.Q. Effect of isoflavone aglycone content and antioxidation activity in natto by various cultures of *Bacillus subtilis* during the fermentation period. **Jornal Nutrition Food Science**. v. 2, n.7, p. 1-5, 2012.
- PITT J.I.; HOCKING A.D. *Fungi and Food Spoilage*. **Springer**, Nova York, p. 53–142, 2009.
- QIU, Z.; LU, X.; LI, N.; ZHANG, M.; QUIAO Xuguang; Characterization of garlic endophytes isolated from the black garlic processing. **Microbiology**, v.7, n.1, 2017.
- R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021. Available at: <https://www.R-project.org/>. (Accessed 11 February 2022).
- RAHMAN, M. S. Allicin and Other Functional Active Components in Garlic: health benefits and bioavailability. **International Journal Of Food Properties**, v. 10, n. 2, p. 245-268, 25 abr. 2007.
- RATTI, C.; ARAYA-FARIAS, M.; MENDEZ-LAGUNAS, L.; MAKHLOUF, J. Drying of Garlic (*Allium sativum*) and Its Effect on Allicin Retention. **Drying Technology**, v. 25, n. 2, p. 349-356, 2007.
- RESENDE, F. V. Desafios da produção e inovações tecnológicas para cultura do alho no Brasil. **Hortaliças em Revista**, v. 7, n. 25, p. 16-17, online, 2018.
- RESENDE, F. V; HABER, L. L; PINHEIRO, J. B. **A cultura do alho**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2016. 35 p.
- RESENDE, F. V; HABER, L. L; PINHEIRO, J. B. **Como plantar alho**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2018.
- RESENDE, J.T. V; MORALES, R. G. F; RESENDE, F. V; FARIA, M. V; SOUZA R. J; MARCHESE A. Garlic vernalization and planting dates in Guarapuava. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 193-198, 2011.

- RIZWAN, H. M.; ZHIMIN, L.; HARSONOWATI, W.; WAHEED, A.; QIANG, Y.; YOUSEF, A. F.; MUNIR, N.; WEI, X.; SCHOLZ, S. S.; REICHEL, M. Identification of Fungal Pathogens to Control Postharvest Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Decays and Multi-Omics Comparative Pathway Analysis Reveals Purple Is More Resistant to Pathogens than a Yellow Cultivar. **Journal Of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 879, 2021.
- RODARTE, C. W. La Biotecnología Alimentaria Antigua: Los Alimentos Fermentados. **Revista Digital Universitaria**, v. 15, n. 8, online, 2014.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA Jr, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopatho**, v.12, p.16, 1986.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 249-252, 2002.
- RUBIN, C. Alho – Altos Preços, mas clima preocupa a próxima safra no sul. **Indicadores da Agropecuária**, n. 2, p. 1-4, 2020.
- SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S.-B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; SUSCA, A.; TANNEY, J.B. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies In Mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 74, p. 5463-5467, 1977
- SANLIER, N.; GOKCEN, B. B.; SEZGIN, A. C. Health benefits of fermented foods. **Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 3, p. 506-527, 2017.
- SANTOS, K. B.; GOMES, J. M. A.; GOMES, R. L. F.; FIGUEIREDO, L.S. O sistema de cultivo de alho (*Allium sativum* L.) na microrregião de Picos (PI). **Revista Espacios**, v. 38, n. 21, p. 19, Caracas, 2015.
- SANTOS, K. B.; GOMES, J. M.A.; GOMES, R. L.F. Repercussões da concorrência do Alho (*Allium sativum* L.) importado no mercado local. **Revista Espacios**. v. 37, n. 5, p. 11, Caracas, 2016.
- SATO, E.; KOHNO, M.; HAMANO, H.; NIWANO, Y. increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, p. 157-160, 2006.
- SCHWAIGER, K.; HELMKE, K.; HÖLZEL, C. S.; BAUER, J. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 3, p. 191-196, 2011.
- SILVA, E. Y. Y.; MORETTI, C. L.; MATTOS, L. M. Compostos Funcionais Presentes em bulbilhos de alhos Armazenados sob refrigeração provenientes de Cultivos no Brasil e na China. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2580-2587, Santa Maria, 2010.

SILVA, J. J.; BERTOLDO, R.; FUNGARO, M. H. P.; MASSI, F. P.; TANIWAKI, M. H.; SANT'ANA, A. S.; IAMANAKA, B. T. Black *Aspergilli* in Brazilian onions: from field to market. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 337, p. 108958, 2021.

SMITS, T. H. M.; DUFFY, B.; BLOM, J.; ISHIMARU, C. A.; STOCKWELL, V. O. Pantocin A, a peptide-derived antibiotic involved in biological control by plant-associated *Pantoea* species. **Archives Of Microbiology**, v. 201, n. 6, p. 713-722, 2019.

SOBRINHO, J. A. M.; LOPES, C.A; REIFSCHNEIDER, F. J. B.; CHARCHAR, J.M.; CRISÓSTOMO, L. A.; CARRIJO, O. A.; BARBOSA, S.; A cultura do alho. **EMBRAPA**, v.1, n. 2, p. 1-50, Distrito Federal, 1993.

SOUSA, A. M.; MACHADO, I.; NICOLAU, A.; PEREIRA, Maria Olívia. Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling. **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, n. 3, p. 327-335, 2013.

TAMANG, J. P.; SHIN, D.; JUNG, S.; CHAE, S. Functional properties of microorganisms in fermented foods. **Frontiers in Microbiology**. Online, abr. 2016.

TSAI, C.; CHEN, H.; SHEEN, L.; LII, C. Garlic: health benefits and actions. **Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 17-29, 2012.

VANZELA, D. O. A.; MASSI, F. P.; OLIVEIRA, A.L.M.; FUNGARO, M.H.P.; SARTORI, D. Isolation and identification of *Aspergillus* section *Nigri*, and genotype associated with ochratoxin A and fumonisin B2 production in garlic marketed in Brazil. **Current Microbiology**, 2020.

WALTERSON, A. M.; STAVRINIDES, J. *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the enterobacteriaceae. **Fems Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p. 968-984, 2015

WANG, J.; SHI, L.; WANG, D.; LI, L.; LOAKE, G. J.; YANG, X.; JIANG, J. White rot disease protection and growth promotion of garlic (*Allium sativum*) by endophytic bacteria. **Plant Pathology**, v. 68, n. 8, p. 1543-1554, 2019.

WOUTERS, D.; BERNAERT, N.; ANNO, N.; VAN DROOGENBROECK, B.; LOOSE, M. de; VAN BOCKSTAELE, E.; VUYST, L. de. Application' and validation of autochthonous lactic acid bacteria starter cultures for controlled leek fermentations and their influence on the antioxidant properties of leek. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 165, n. 2, p. 121-133, 2013.

YURGEL, S. N.; ABBEY, L.; LOOMER, N.; GILLIS-MADDEN, R.; MAMMOLITI, M. Microbial Communities Associated with Storage Onion. **Phytobiomes Journal**, v. 2, n. 1, p. 35-41, 2018.