

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Utilização de técnicas microbiológicas
na avaliação da eficiência de um
sistema de HACCP a nível de adega**

Flávio Manuel Dos Santos Melo

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



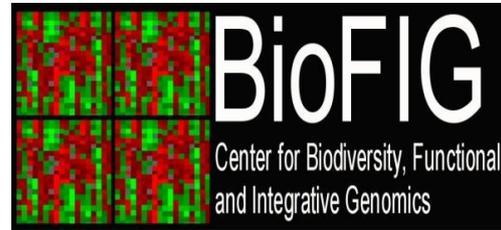
Utilização de técnicas microbiológicas na avaliação da eficiência de um sistema de HACCP a nível de adega

Dissertação orientada por Professor Doutor Manuel Malfeito Ferreira (UTL-ISA)
e Professora Doutora. Lélia Chambel (FCUL-BioFIG)

Flávio Manuel Dos Santos Melo

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011



Quinta do
Monte d'Oiro

Utilização de técnicas microbiológicas na avaliação da eficiência de um sistema de HACCP a nível de adega

Flávio Manuel Dos Santos Melo

TESE DE MESTRADO

2011

Esta tese foi realizada com a parceria do Departamento de Botânica e Engenharia Biológica do Instituto Superior De Agronomia sob a directa supervisão do Professor Doutor Manuel Malfeito Ferreira.

Professora Doutora Lélia Chambel foi a designada Orientadora Interna no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e Co-orientadora relativamente à caracterização das bactérias.

Agradecimentos

A realização desta dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma directa ou indirecta, de várias pessoas e instituições, às quais gostaria de manifestar os meus sinceros agradecimentos e profundo reconhecimento.

Ao Professor Doutor Manuel Malfeito Ferreira, Orientador desta tese de Mestrado, pelas facilidades concedidas no desenvolvimento do trabalho, pela disponibilidade, ensinamentos, críticas e sugestões, bem como pela amizade e estímulo sempre demonstradas ao longo desta minha jornada Pós-Licenciatura. Agradeço também pelos ensinamentos neste “mundo dos vinhos” e, que de uma forma muito natural me fomentou “o bichinho” do gosto pela vinha, vinhos, e tudo que envolva a enologia. Obrigado! Só de um grande amor nascem grandes vinhos.

À Professora Doutora Lélia Chambel a minha gratidão pela co-orientação desta tese, pela incansável orientação científica, pela revisão crítica do texto, pelos profícuos comentários, esclarecimentos, opiniões e sugestões sempre oportunas, pela cedência e indicação de alguma bibliografia relevante para a temática em análise, pelos oportunos conselhos, pela acessibilidade, cordialidade e simpatia demonstradas, pela confiança que sempre me concedeu e pelo permanente estímulo que, por vezes, se tornaram decisivos em determinados momentos da elaboração desta tese. Por todo o interesse evidenciado ao longo desta dissertação, o meu Muito Obrigado.

Gostaria de agradecer à Quinta Monte d’Oiro, pela disponibilidade e cedência das instalações para recolha de amostras que permitiram assim a realização desta tese. Em especial, gostaria de agradecer a Sra. Engenheira Graça Gonçalves e ao Ricardo por todo apoio, informação técnica, disponibilidade, acompanhamento prestado na adega e pelas amostras concedidas.

Uma palavra de apreço, ao excelentíssimo Professor Doutor Rogério Tenreiro, coordenador do mestrado de MAP, pela sua simpatia, disponibilidade e auxílio que sempre senti desde o primeiro dia que entrei para a instituição (FCUL), para a realização desta formação académica.

A todos os docentes que, de uma forma ou de outra, me acompanharam ao longo da minha vida, agradeço todo o apoio prestado e as suas palavras sempre cheias de sabedoria. Assim como a todos os Amigos e Colegas que ao longo da minha vida, vocês sabem quem são, me apoiaram e ajudaram a ser o que sou hoje, o meu muito obrigado!

Gostaria de agradecer ao pessoal do ISA, nomeadamente ao André Barata, por todo apoio, atenção, paciência, simpatia e partilha de conhecimento. Aprendi imenso contigo mas adquiri, sobretudo, a persistência, mesmo quando os resultados não são os mais satisfatórios, que há que insistir, voltar a tentar e repetir as vezes que forem necessárias. Uma palavra de agradecimento para o António, a Carla, a colega de laboratório Ana Filipa e as funcionárias, pelo apoio e simpatia sempre prestados.

De igual forma, agradeço ao Staff que encontrei no ICAT-FCUL que, deste os professores (Sandra Chaves, Ana Tenreiro, etc.) até aos colegas de Laboratório e alguns de mestrado, me ajudaram e fizeram que os “momentos mortos” fossem mais animados. Agradeço, em particular, ao Daniel McGuire e ao Bernardo por toda a ajuda, ensinamentos e disponibilidade prestada.

À Filipa (tolipa), que para além de uma óptima colega, é também uma excelente amiga. Revelou-se ainda ser uma excelente ouvinte, e mostrou-me que apesar de estar a mais de 400km de casa, eu não estava sozinho.

Não me podia esquecer de agradecer e mostrar a minha gratidão a todos os meus colegas residentes. Em especial, ao indiano Ayush que, apesar de ser de cultura totalmente diferente, muito me ensinou e me fez valorizar vários aspectos da vida. Ao Henrique, que através das nossas discussões e longas conversas permitiu-me atingir novos “horizontes”. Ao Madeira (Teotónio), Shiv e ao Hugão, os quais neste último ano foram os meus colegas e amigos que me fizeram companhia através dos nossos famosos “coffes”, CS e futebolada e até idas ao Hospital. A todos, Obrigado! Por me ajudarem a ultrapassar a saudade e o tédio que por vezes se instaura nas nossas vidas. Agradeço também os momentos bem-dispostos e as nossas conversas parolas mas divertidas, e por terem aturado, por vezes, os meus maus humores. Deixo ainda uma palavra de apreço à Sra. Palmira e as funcionárias da Residência António Aleixo. Um obrigado também ao André pela ajuda que me prestou em algumas questões linguísticas.

À “minha” Taninha Santos (Pa****)... Pela atenção, pelo apoio, pelo encorajamento, pelos alertas, pelas palavras doces e carinhosas nos momentos certos, e pelas duras quando é preciso. Pelo carinho, pelo amor e compreensão, mesmo quando te retirei tempo para dedicar à tese, peço desculpa por isso, e espero algum dia ser capaz de te compensar. Agradeço ainda pela ajuda que me prestaste na correção dos textos (ao nível do português). Pela tua infinita paciência (mesmo quando dizes “estou farta das tuas criancices”) e por todas as pequenas coisas. Sei que não sou perfeito, longe disso, mas sei que me motivas e ajudas e ajudarás a ser algo mais, e melhor, portanto agradeço-te por nunca teres desistido de mim e por confiares plenamente em mim, MUITO OBRIGADO. Obrigado também por seres como és e pelo que és e de TUDO que representas para mim. (Odeio o amor, mas adoro amar-te). AMT*!!

Por fim, dedico esta tese aos meus pais, por tudo o que fizeram e o que fazem por mim. Por me aconselharem, apoiarem, pelas palmadas na cabeça e pelas festinhas no ego, pela infinita compreensão e inspiração, imprescindíveis à consecução desta etapa tão importante da minha vida. O meu muito obrigado, sei que não sou um filho perfeito mas espero um dia poder retribuir tudo que fizeram por mim. Dedico também à minha irmã, a qual sempre teve enorme admiração, amor e carinho por mim, e que sempre me apoiou. Sei que estarás sempre ao meu lado, tal como estarei ao teu.

Sem esquecer a minha ‘piolhita’, Ana Sofia, que muitas vezes me fez pensar, através das suas inocentes brincadeiras, do sorriso despreocupado e da pureza das suas palavras, que o estudo, a busca da verdade, da beleza e da felicidade são domínios que nos são consentidos, sendo nós crianças por toda a vida.

Àqueles a quem eu “magoei”, durante este percurso, as minhas sinceras desculpas e o meu muito obrigado pela paciência e compreensão.

A todos que, por lapso, possam ter sido omitidos, aqui fica o meu sincero agradecimento.

Resumo

É por demais conhecida a importância que o vinho tem, desde longa data, na agricultura, na gastronomia, na economia e na sociedade. Assim, nos últimos séculos, a produção de vinho tem sofrido significativos progressos tornando-se, desta forma, objecto de interesse científico que visa o conhecimento das inúmeras variáveis que alteram o processo de vinificação.

Leveduras e bactérias são responsáveis pelas fermentações alcoólica e maloláctica mas desempenham também um papel central na deterioração de alimentos e bebidas. Deste modo, demonstra-se essencial ter um melhor conhecimento da microbiota das uvas e do ambiente microbiológico da adega, para estabelecer a origem das leveduras de deterioração dos vinhos, as suas rotas de contaminação, os seus pontos críticos, e, claro, do seu controlo.

Nesta dissertação, procedeu-se à avaliação microbiológica dos procedimentos de higiene em diversas áreas críticas de contaminação de uma adega (Quinta Monte d'Oiro), enquadradas nos pré-requisitos de um sistema de HACCP. Em dois períodos do mesmo ano, após os procedimentos de higiene, fez-se a análise de microrganismos existentes nos equipamentos. Para uma melhor compreensão da flora microbiana, e na tentativa de conhecer as vias/fontes de contaminação, foram utilizados métodos fenotípicos e técnicas moleculares que permitiram, deste modo, identificar e/ou diferenciar as espécies ou estirpes responsáveis pela contaminação/degradação do produto final.

Este trabalho foi dividido em três fases, procedendo-se inicialmente à recolha e inoculação das amostras, e purificação e caracterização morfológica e bioquímica dos isolados; permitindo agrupar os isolados com base nas suas características fenotípicas. Numa segunda etapa, identificaram-se 14 espécies diferentes de leveduras através da técnica de RFLP-PCR e da sequenciação da região D1/D2 do rDNA 26S. As espécies que mais se evidenciam foram *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida ishiwadae*, por terem capacidade de causar maus paladares e por algumas delas se encontrarem em concentrações elevadas nos respectivos locais de amostragem. Finalmente, procedeu-se à identificação das bactérias, utilizando-se o método do csM13-PCR. Numa análise global, consideraram-se as estirpes de cada 'cluster' (ao nível de 77%) formados pelos perfis de csM13-PCR 'fingerprinting'. Após análise conjunta dos resultados obtidos pela abordagem polifásica permitida pelos perfis de csM13-PCR, sequenciação de rDNA 16S a partir de alguns isolados de cada 'cluster' e tipificação morfológica foi possível a identificação de isolados revelando 18 espécies diferentes.

De acordo com o objectivo principal desta dissertação, e na sequência da estratégia adoptada, foi exequível retirar ilações sobre o nível de higiene dos equipamentos, matérias e outros elementos existentes na adega e quais os principais pontos críticos que se deve ter em conta para evitar contaminações enológicas e recomendações ao melhoramento do plano de HACCP implementado nesta adega.

"Ce sont les qui ont le micróbios dernier mot"
(Louis Pasteur)

Palavras-Chave: Vinificação, Quinta Monte d'Oiro, Microrganismos contaminantes e de deterioração, RFLP-PCR, csM13-PCR 'fingerprinting', Sequenciação de rDNA 16S, HACCP, Pontos críticos.

Abstract

The importance of the wine in agriculture, food, economy and society it is well known for a long time. In the last centuries, the wine production has progress significantly and becoming the subject of scientific interest in order to understand the many variables that affect the winemaking process.

Yeasts and bacteria are responsible for the alcoholic and malolactic fermentations but also play a central role in the deterioration of foods and drinks. Thus, it is essential to have a better knowledge of the microbiota of the grapes and of the microbial environment of the wine cellar to establish the origin of the wine deterioration microorganisms, their routes of contamination, critical points, and of course it's control.

In this dissertation, we proceeded to the microbiological evaluation of hygiene procedures in several critical areas of contamination of a wine cellar (Quinta Monte d'Oiro), framed in the prerequisites of a HACCP system. In two periods of the same year, after the hygiene procedures, the analysis of microorganisms in the equipment was performed. For characterization of the microbial flora and an insight of the routes/sources of contamination, we applied phenotypic methods and molecular techniques that allowed to identify and/or differentiate the species or strains responsible for the contamination/degradation of the final product.

This work was divided into three phases. The collection and inoculation of samples, purification, biochemical and morphological characterization of isolates allowed grouping the isolates based on phenotypic characteristics.

In a second step, we identified 14 different species of yeasts based on the PCR-RFLP technique and by sequencing D1/D2 region of 26S rDNA.

The species that were more noted were *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Candida ishiwadae* due to their potential to cause bad taste and also because some of them are in high concentrations in the respective sampling sites.

Finally, we proceeded to the identification of bacteria using the csM13-PCR fingerprinting and evaluated the clusters formed at 77% similarity. The polyphasic approach by the csM13-PCR profiles, sequencing of 16S rDNA for some isolates of each csM13-PCR cluster and morphological typification, allowed the identification of isolates, revealing 18 different species.

According to the main objective of this dissertation, and following the adopted strategy, it was feasible to conclude about the level of hygiene of the equipments, raw materials and other elements in the cellar and identify the main critical points that should be taken into account to avoid oenological contamination as well as some recommendations to improve the HACCP plan implemented in the cellar.

"Ce sont les qui ont le micróbios dernier mot"
(Louis Pasteur)

Keywords: Winemaking, Quinta Monte d'Oiro, Contamination and spoilage microorganisms, PCR-RFLP, csM13-PCR, Fingerprinting, 16S rDNA sequencing, HACCP, Critical points.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 O microbioma da uva e do vinho	2
1.2 Leveduras e bactérias como agentes de alteração do vinho.....	4
1.3 Sistema de HACCP em adega.....	9
Análise de risco	10
Identificação de pontos críticos de controlo	10
Estabelecimento de critérios para os pontos críticos de controlo	10
Processos de monitorização de pontos críticos de controlo	10
Registos e verificações nos sistemas de HACCP	10
Parâmetros a ter em conta na higienização de uma adega	11
1.4 Técnicas e métodos de análise microbiológica.....	15
2. Material e Métodos	19
2.1 Recolha de amostras	19
2.2 Isolamento e purificação	21
Zaragatoas e águas de enxaguamento	21
Ambiente de sala de barricas	21
Placas de contacto	21
2.3 Caracterização morfológica e contagem das colónias	22
2.4 Métodos de identificação de espécies de leveduras	23
Obtenção dos lisados celulares e PCR de leveduras Ascomycota	24
Restrição dos fragmentos com as enzimas <i>CfoI</i> , <i>HinfI</i> e <i>HaeIII</i>	25
Sequenciação de leveduras Basidiomycota e algumas Ascomycota	25
2.5 Métodos de identificação de espécies de bactérias	28
Lise das células e M13-PCR 'fingerprinting'	28
Extracção de DNA genómico	28
Sequenciação parcial de rDNA 16S.....	30
3. Resultados e discussão	31
3.1 Avaliação da eficiência dos procedimentos de higienização utilizados na adega	31
3.2 Identificação de leveduras.....	34
3.3 Identificação de Bactérias	38
3.4 Comparação dos microrganismos identificados nos dois períodos de amostragem.....	40
4. Conclusões gerais e perspectivas futuras	41
5. Bibliografia	44
6. Anexos.....	48

1. Introdução

A arte da vinificação pode ser vista como uma das tecnologias mais antigas da humanidade, inclusive anterior à produção de pão (Ribéreau-Gayon, 1985), o que comprova que a evolução do vinho acompanha a da civilização há já milhares de anos. Apesar de pouco se saber sobre a história inicial do vinho e da sua exacta localização, através de vestígios arqueológicos é possível apontar que a produção do vinho remonta a 6000 A.C. nas regiões do Cáucaso e Mesopotâmia. Assim, ao longo dos tempos, foram encontradas diversas referências e vestígios da domesticação de vinhas e da produção de vinho em distintos pontos do globo (König, 2009).

A evolução da vinha e do vinho em Portugal remonta a tempos bem antigos, sendo provável que tenha sido introduzida através do império romano (século III A.C.). Posteriormente, com a fundação de Portugal, o vinho tornou-se um produto de excelência até aos dias de hoje. Actualmente, estão reconhecidas e protegidas 32 Denominações de Origem Controlada e oito Indicações Geográficas em Portugal (<http://www.ivv.pt>). A Quinta do Monte d'Oiro, localizada na Estremadura, na região de Alenquer, insere-se num vasto aglomerado de excelentes adegas existentes em Portugal. Esta adega é uma referência desde o séc. XVII na produção de vinhos notáveis entrando, em 2006, numa nova fase da sua história ao produzir vinhos provenientes de agricultura biológica. As amostras utilizadas ao longo deste estudo foram provenientes desta quinta.

Hoje em dia, o vinho é sinónimo de cultura e de um determinado estilo de vida complementando a comida, entretenimento e artes. Desempenha um papel enorme na economia de inúmeras nações, estando estimada uma produção de mais de 26 mil milhões de litros de vinho anualmente. Os produtores modernos oferecem uma vasta variedade de vinhos durante todo ano, independentemente da localização ou estação do ano. Uma acrescida competição a nível de mercado levou a uma elevada diversificação de produto e inovação nas técnicas ancestrais (Pretorius, 2000). O produto final é o resultado de uma miríade de interações sensoriais influenciadas por inúmeras variáveis. Entre estas, encontram-se a casta da uva, as condições geográficas e ambientais do cultivo, o microbioma da uva e as práticas de fermentação de vinificação (Fleet, 2003; König *et al.*, 2009). Desta forma, torna-se evidente que os microrganismos têm um papel predominante na determinação da constituição química do vinho, já que afecta a qualidade da uva antes da vindima e durante a fermentação. Os avanços da segunda metade do século XX mostraram, claramente, que a fermentação do mosto de uvas e a produção de vinho não é tão simples como Pasteur, o fundador da enologia moderna, sugeriu há mais de um século. Assim, em 1866, Pasteur demonstrou que as leveduras eram responsáveis por metabolizar os açúcares das uvas (glucose e frutose) e outros compostos formando etanol, dióxido de carbono e centenas de produtos secundários que, colectivamente, contribuem para a subtilidade e individualidade do vinho (Fleet, 2003). A partir de então, ficou claro que as fermentações alcoólicas realizadas espontaneamente não são provocadas pela acção de uma única levedura, e sim que se tratam do resultado da acção combinada de diversas espécies de leveduras, que crescem em diferentes proporções, ao longo de uma fermentação.

1.1 O microbioma da uva e do vinho

A conversão do mosto de uva em vinho é um processo ecológico e bioquímico complexo que envolve a interação de muitas espécies microbianas. Esta transformação depende de diversos agentes como leveduras, bactérias, fungos filamentosos, assim como de micovírus e bacteriófagos, que afectam uvas e microrganismos associados a um processo de vinificação (Fleet, 1993 & 2001; Moreno-Arribas & Polo, 2005). Verifica-se, portanto, que o microbioma autóctone (nativo) é altamente variável. Isolamentos das leveduras existentes nas superfícies das uvas revelam uma predominância de espécies pertencentes aos géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Aureobasidium*, *Torulaspora* e *Rhodotorula*. Por seu lado, *Saccharomyces cerevisiae*, a principal espécie usada nas fermentações alcoólicas, é a mais apta e a escolhida para consumir açúcares fermentáveis e, portanto, assegurar esse processo, embora se encontre em baixas concentrações celulares na uva (<50 ufc/ml) (Cataluña, 1984; Fleet *et al.*, 1984; Heard & Fleet 1985; Joshi & Pandey, 1999; Fleet, 2001).

Concebeu-se também que a presença de determinadas bactérias, particularmente as bactérias lácticas (predominantemente *Oenococcus oeni*), tem um papel predominante no processo biológico da vinificação, visto que são as responsáveis por um processo secundário, nomeadamente a fermentação maloláctica (van Rensburg & Pretorius, 2000; Alexandre *et al.*, 2004; Moreno-Arribas & Polo, 2005; Renouf *et al.*, 2007).

Os estudos sobre a dinâmica, quantificação e composição da microbiota responsável pelas fermentações espontâneas mostram diferenças tanto qualitativas como quantitativas das leveduras isoladas de uma mesma área vitivinícola. Diversos factores encontram-se na origem desta variabilidade afectando a predominância das leveduras na superfície das uvas e, conseqüentemente, a sua presença/ausência no mosto. Salientam-se o método de vindima; as diferenças do ecossistema, como a composição do solo, condições climáticas e variedade das uvas; possíveis contaminações ao longo de todo processo e as circunstâncias de transporte (temperatura, distância e sulfitação).

Estas diferenças ocorrem não somente entre diferentes regiões, mas também dentro da mesma região, em diferentes vindimas, prejudicando a qualidade e reprodutibilidade na obtenção do vinho (Lopes *et al.*, 2002). Para além de diminuir a reprodutibilidade do vinho, estas leveduras têm uma influência no aroma, tornando-se desta forma um produto altamente variável (Fleet, 2001). Para além disso, podem ainda ocorrer fermentações interrompidas (não conversão total do açúcar em etanol), potenciando o aparecimento de microrganismos contaminantes que podem levar a vultos prejuízos económicos ao produtor vinícola, visto que vinhos com elevado teor de açúcar residual (> 2 g/L) são altamente susceptíveis a deterioração microbiológica. Fermentações alcoólicas lentas ou incompletas são o calcanhar de Aquiles da indústria enóloga (McGuire, 2010).

A contaminação na indústria vínica tem uma elevada importância, visto que pode ocorrer em diversos níveis: nas próprias uvas, no transporte das diversas matérias-primas; na atmosfera da adega, nos trabalhadores, nos equipamentos, nas superfícies sujas, na má monitorização

das condições a que o produto é sujeito; no engarrafamento/rolhas e acidentes que podem ocorrer no processo de armazenamento (Peppler, 1976; Panezai, 1984). Estes tipos de contaminantes podem inicialmente manter-se estáticos, mas variar durante o processo, dependendo principalmente dos seguintes factores: natureza da matéria-prima (uvas), condições da colheita, tipo de fermentação, processamento e operações tecnológicas [clarificação, contacto com as películas, trasfega, termovinificação e adição de substâncias preservantes, a estabilização por frio, entre outros (Wibowo *et al.*, 1985)], engarrafamento e condições de armazenamento.

Assim, a presença de microrganismos em produtos alimentares pode ter três consequências: os microrganismos podem ser patogénicos e pôr em risco a saúde pública (problema ausente em vinhos); os microrganismos podem alterar as características organolépticas dos produtos, até ao ponto destes serem considerados inaceitáveis; e algumas espécies podem conferir aos produtos características desejadas, como é o caso da fermentação de alguns alimentos e bebidas (Fleet, 1992).

A detecção de microrganismos ao longo do processo de fabrico de alimentos é uma área da microbiologia alimentar que tem merecido particular atenção, dadas as possíveis repercussões a nível da preservação de alimentos e de saúde pública. Neste sentido, a implementação de programas que englobam a avaliação de riscos de contaminações e a detecção de pontos críticos ('Hazard Analysis Critical Control Point', HACCP) em linhas de produção contribuiu para uma melhoria significativa da qualidade microbiológica dos alimentos.

A deterioração de alimentos por microrganismos não patogénicos como, por exemplo, fungos e leveduras, foi sempre considerado como um "inconveniente" desagradável. Contudo, o vinho, por si só, apresenta características, tais como o pH baixo, teor alcoólico e dióxido de enxofre, que lhe conferem resistência a um elevado número de microrganismos, impedindo mesmo o crescimento dos microrganismos patogénicos (Rosa, 2008). Posto isto, esta bebida raramente levanta problemas de saúde pública mas existem determinados microrganismos, nomeadamente, leveduras, que são responsáveis por sérios danos nas características organolépticas do vinho.

O crescimento de determinadas espécies de leveduras, em algumas circunstâncias, pode aumentar a complexidade do vinho, outras há em que a sua distribuição pode ser desastrosa (Serranito, 2004). Existem também algumas leveduras que, quando produzem determinados compostos em baixa concentração, favorecem a complexidade aromática do vinho; mas quando essa concentração é elevada, torna o vinho completamente depreciado (Chatonnet *et al.*, 1992 e 1993). Uma vez que este produto se preza pela qualidade, as boas práticas ao longo de todo o processo produtivo limitam o desenvolvimento de microrganismos no vinho, e consequentemente, limitam alterações organolépticas, garantindo a qualidade do produto, satisfação do consumidor e salvaguarda da marca (Rosa, 2008).

A higienização dos equipamentos enológicos pode considerar-se um exemplo dos pré-requisitos no âmbito do HACCP, que mais influencia a qualidade do vinho. O conjunto de procedimentos, detergentes e anti-sépticos utilizados nas práticas de higiene, convergem no

sentido de diminuir, ou até mesmo eliminar por completo, microrganismos responsáveis pela deterioração dos vinhos.

Devido ao considerável aumento da produção de alimentos e bebidas nas últimas décadas, a sua deterioração tornou-se um problema económico de grande preocupação para a indústria alimentar, nomeadamente vínica. Esta é actualmente confrontada com um consumidor cada vez mais exigente, preferindo vinhos com melhores qualidades organolépticas. Este facto tem também contribuído para uma maior preocupação por parte da indústria vínica, devido à acção dos inúmeros microrganismos provocarem elevados riscos de degradação (Schuller, 1998) o que tem levado a indústria vínica a investir em diversas técnicas e métodos de análise microbiológica e molecular.

1.2 Leveduras e bactérias como agentes de alteração do vinho

De forma muito geral, entende-se por Biodiversidade ou diversidade biológica a diversidade da natureza viva. Embora não exista uma definição exacta e consensual, a biodiversidade pode ser rudimentarmente descrita como uma medida da diversidade relativa entre organismos presentes em diferentes ecossistemas. Esta definição inclui diversidade dentro de espécie, entre espécies e diversidade comparativa entre ecossistemas (McGuire, 2010). Assim, verifica-se que, durante o processo de vinificação, a existência de culturas mistas (leveduras, fungos filamentosos, bactérias acéticas e lácticas, bacteriófagos) promove o estabelecimento de relações antagonísticas e sinérgicas entre os diferentes microrganismos (Wibowo *et al.*, 1985; Fleet, 2003; Arnick & Henick-Kling, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Na maioria dos casos, os compostos dos alimentos/bebidas constituem uma fonte de carbono e/ou energia para o crescimento microbiano, permitindo a proliferação dos microrganismos presentes. Este processo provoca alterações do próprio alimento/bebida, nomeadamente a produção de maus sabores devido à degradação ou síntese de novos compostos. O alimento assim alterado considera-se como degradado ou deteriorado, frequentemente impróprio para consumo humano. Por este motivo, torna-se necessário conhecer não só a flora indígena do produto alimentar, mas também a flora contaminante específica para cada tipo de alimento ou bebida com capacidade de provocar alterações.

Assim, muitas espécies de fungos, leveduras e bactérias são conhecidas na indústria alimentar como microrganismos indesejáveis, que podem ser detectados em ingredientes utilizados no fabrico de alimentos e bebidas, na superfície de equipamentos, nos produtos finais e em locais de armazenamento (Sculler, 1998). A presença destes microrganismos em tais ambientes está, fundamentalmente, associada a factores intrínsecos e extrínsecos. Os factores intrínsecos são os que derivam da natureza e composição do produto (actividade da água, inibidores e nutrientes disponíveis, pH, acidez, potencial redox) e como comenta Panezai (1984), não são fáceis de alterar. Os factores extrínsecos são variáveis introduzidas durante o processamento, engarrafamento, armazenamento e distribuição, nomeadamente, a temperatura, filtrações, compostos físico-químicos, natureza (estado físico e número de microrganismos contaminantes). Estes devem ser de fácil controlo (Batchelor, 1984). Em 1991, Deák refere que existem também factores implícitos que condicionam a actividade microbiana.

Esses factores referem-se aos atributos fisiológicos, adquiridos através de selecção natural, apresentados pelos microrganismos que conseguem sobreviver sob certas condições ambientais (factores intrínsecos e extrínsecos). Além disso, os efeitos antagónicos e sinérgicos entre membros de uma população são também factores implícitos de grande importância (Pina, 2000).

Compreende-se por alteração microbiana de um vinho uma mudança na sua composição química normal por acção de determinados microrganismos. As leveduras desempenham um papel central no que diz respeito à deterioração de alimentos e bebidas, que na maior parte apresentam uma elevada acidez e uma reduzida actividade da água. Algumas espécies são inclusive capazes de danificar alimentos que são produzidos de acordo com as boas práticas de fabrico (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). O vinho constitui um meio muito apropriado para o desenvolvimento de um grande número de microrganismos; a sua riqueza em ácidos orgânicos, aminoácidos, resíduos de açúcares, factores de crescimento e sais minerais contribuem em muito para esse desenvolvimento. Todavia, existem três factores que limitam o desenvolvimento de determinados microrganismos no vinho: o teor alcoólico, uma vez que o etanol, em determinadas concentrações é um excelente anti-séptico; pH baixo (normalmente inferior a 3,5) apesar de, por vezes, o crescimento de leveduras poder alterar o pH inicial do substrato para um valor favorável ao seu crescimento (em geral 4-6,5) (Mislivec *et al.*, 1992) e as baixas temperaturas a que esta bebida está sujeita após a época de vinificação, paralisam um vasto leque de seres microbianos (Lepe e Leal, 1992). Para além destes parâmetros, existem outras características do vinho que se destacam particularmente, como o dióxido de enxofre, oxigénio e dióxido de carbono.

Desde há milénios que *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada intencionalmente ou inadvertidamente na produção de vinhos. No entanto, existem outras leveduras presentes nos processos iniciais de estágios fermentativos que podem influenciar as principais características enológicas de cada zona produtora de vinho, tal como as propriedades organolépticas finais do vinho (Pretorius *et al.*, 1999; Ganga & Martinez, 2004; Estevinho *et al.*, 2005). Esses géneros incluem *Kloeckera*, *Cryptococcus*, *Torulaspota*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Metschnikowia*, *Issatchenkia* e *Rhodotorula*. Assim, a flora microbiana na superfície das uvas é muito diversificada (Martini *et al.*, 1996) e no mosto é variável ao longo da fermentação alcoólica. Observa-se uma sucessão de populações cujo crescimento e eliminação é promovido pela alteração das condições físico-químicas associadas à conversão do mosto em vinho. Os taxonomistas reconhecem, actualmente, 600 espécies de leveduras, das quais aproximadamente 20% são facilmente isoladas de vinhos, mosto de uva ou ambiente de adega. Contudo, só algumas parecem assumir um papel significativo como agentes de alteração (Loureiro, 1996). As leveduras que têm a capacidade de se desenvolver no vinho designam-se normalmente por leveduras de contaminação. As leveduras contaminantes podem conduzir à formação de aromas desagradáveis no vinho, como é o caso do acetato de etilo ou de outros ésteres voláteis. O sabor também pode sofrer alterações devido à utilização de ácido láctico ou ácido cítrico pelas leveduras contaminantes, que se encontram fisiologicamente bem

adaptadas as condições presentes nas bebidas alcoólicas. Assim, estas leveduras contaminantes provocam um concomitante aumento do pH, criando deste modo condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias (Thomas, 1993). O organograma da Figura 1 reúne todos os tipos de leveduras que podem ser isoladas do vinho.



Figura 1- Tipos de leveduras de contaminação do vinho (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 1993).

As leveduras adventícias ou inocentes surgem esporadicamente no vinho, não tendo a capacidade de crescimento. Contrariamente, as leveduras de alteração (Tabela 1, em Anexo) crescem facilmente no produto em questão, provocando alterações na sua constituição e nas suas características organolépticas (Malfeito-Ferreira & Loureiro, 1995).

Nos casos das bebidas que sofrem fermentação alcoólica, o conceito de alteração por leveduras tem um significado mais complexo do que no caso dos alimentos não fermentados. Nas bebidas alcoólicas a actividade das leveduras é essencial durante o processo de fermentação, contrariamente, nos alimentos não fermentados qualquer levedura com capacidade de alterar sensorialmente estes alimentos pode ser vista como levedura de alteração. Na indústria enológica, onde o processo de fermentação alcoólica ocorre na presença de muitas espécies de leveduras e bactérias (estas últimas, são maioritariamente lácticas e acéticas), é muito difícil traçar uma linha entre a actividade benéfica da fermentação e a actuação das leveduras de alteração. Por esta razão, raramente se observam alterações do vinho durante este processo, sendo na maioria das vezes observadas durante o armazenamento, envelhecimento ou processo de engarrafamento (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003).

Conforme consta na Figura 1, as leveduras de alteração podem ainda ser subdivididas em leveduras de alteração *sensu lato* e leveduras de alteração *sensu stricto* (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 1993). As primeiras englobam as espécies capazes de alterar as características organolépticas do vinho, independentemente da sua resistência aos processos tecnológicos de estabilização e aos vários tipos de conservantes usados na indústria. As leveduras *sensu stricto* são as mais perigosas, uma vez que dispõem de mecanismos de grande resistência a condições ambientais de stress, podendo mesmo afectar vinhos que foram processados e engarrafados de acordo com as boas práticas de fabrico (Loureiro, 1994).

No caso de bebidas alcoólicas, como por exemplo vinhos, não existem normas legislativas relativamente aos parâmetros microbiológicos, dado que os vinhos não costumam ser contaminados por microrganismos patogénicos. Além disso, embora a presença de leveduras de deterioração seja indesejável, não constitui um potencial risco para a saúde do consumidor, como seria no caso da ingestão de microrganismos patogénicos. Mas, por outro lado, como o consumidor é cada vez mais exigente em relação à qualidade do produto, as adegas podem

optar por fixar normas internas no âmbito do seu sistema de controlo de qualidade (Schuller, 1998). Na maioria das adegas da Austrália, por exemplo, o vinho é aceitável quando não apresenta leveduras numa garrafa de 750 mL. Algumas adegas toleram até 30 leveduras em 750 mL do produto. Quando a análise rotineira indica a possível presença de *Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora* ou *Zygosaccharomyces bailii*, os resultados deverão ser confirmados por um especialista antes da implementação de um plano de acção, com o objectivo de identificar a possível origem das leveduras contaminantes e de as eliminar (Andrews, 1992).

No entanto, sabe-se que ao longo de toda a vida de um vinho existem determinadas alterações na sua composição química que lhe são favoráveis. Normalmente, essas alterações acontecem durante a fase de estágio e posteriormente na fase de envelhecimento, tendo as leveduras um papel determinante na formação de compostos aromáticos benéficos.

Contudo, existem algumas alterações negativas em que o produto fica muito danificado, levando à depreciação por parte dos consumidores e a consequentes perdas económicas para os produtores. As principais alterações pela acção de leveduras, que põem em causa a qualidade do vinho, são a refermentação, a formação de biofilmes (também conhecidos por véus) e a produção de fenóis voláteis (Pina, 2000).

A levedura *S. cerevisiae* é considerada a principal responsável pela fermentação alcoólica e consequente transformação do mosto em vinho. Mas, por outro lado, também pode ter o papel de microrganismo de refermentação, principalmente quando os vinhos apresentam uma quantidade de açúcares residuais superior a 2 g/L. Esta alteração, que é notada pela produção de dióxido de carbono e ocorrência de turvação, advém da permanência de algumas leveduras activas, muitas vezes, mesmo após o engarrafamento (Kunkee & Bisson, 1993). Tendo isto em conta, as leveduras responsáveis (Tabela 1, Anexo) podem surgir apenas no final da fermentação, como *Saccharomyces* spp., ou de contaminação, nomeadamente *Zygosaccharomyces bailii* (Gomes, 2000).

A formação de biofilmes na superfície do vinho acontece, normalmente, durante o seu armazenamento em barricas, depósitos e garrafas com excessiva camada de ar, sendo as leveduras dos géneros *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Metchikowia* e *Debaryomyces*, as responsáveis por este tipo de alteração (Kunkee & Bisson, 1993). A produção de fenóis voláteis nos vinhos tem origem microbiana e está normalmente associada a condições de difícil higienização dos equipamentos. Como exemplo, as barricas de madeira, devido à sua estrutura e à porosidade do próprio material, são muito difíceis de higienizar correctamente (Gomes, 2000). No entanto, muitos efeitos prejudiciais podem ocorrer antes mesmo da fermentação [e.g. acetato de etilo produzido por *Pichia anomala* (Plata *et al.*, 2003) ou na fase inicial de fermentação (e.g. a produção de acetato por *Kloeckera apiculata* / *Hansaniaspora uvarum* (Romano *et al.*, 1992)].

Apesar de as leveduras assumirem um papel preponderante na contaminação e nas possíveis alterações do vinho, espécies de bactérias (principalmente láctico e acético) não estão isentas de uma possível propagação nefasta na indústria de vinho.

As bactérias acéticas são as responsáveis pela fermentação acética (transformação do etanol por oxidação em ácido acético) conferindo o gosto característico de vinagre. Inicialmente, as bactérias acéticas foram designadas por *Micoderma vini*. Depois, em relação ao aspecto morfológico, foram classificadas em três espécies: *Bacterium aceti*, *Bacterium pasteurianum* e *Bacterium kurtzingianus*. Somente em 1898 foram classificadas como sendo do género *Acetobacter*. Actualmente, as bactérias acéticas pertencem à família *Pseudomonodaceae*; aos géneros *Acetobacter* e *Gluconobacter*. As principais espécies de bactérias acéticas são: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter schützenbachii* e *Gluconobacter oxydans*. Estas são particularmente instáveis, com variações de propriedades bioquímicas e um acentuado polimorfismo. As principais espécies de *Acetobacter* apresentam-se nas formas de bastonetes e cocos, formando cadeias e filamentos.

Para além destas, existem também as bactérias do ácido láctico (BAL) que são usualmente incluídas no grupo das gram positivos, formando bacilos ou cocos, não formam endósporos e são imóveis (ou raramente móveis). São microrganismos quimioorganotróficos com metabolismo estritamente fermentativo (Stamer, 1979; Kandler, 1983; Wood e Holzapfel, 1995). As BAL têm um potencial de aplicação muito diversificado e são extremamente importantes na fermentação de diversos produtos alimentares (Chambel, 2001). Estas podem encontrar-se em ambientes muito diversos (e.g. alimentos e bebidas fermentados, plantas, frutos, solo, águas residuais) e também fazem parte da microflora dos tractos respiratório, intestinal e genital do homem e de animais (Wood & Holzapfel, 1995; Chambel, 2001). No vinho, este grupo de microrganismos é responsável por um processo fermentativo secundário e está envolvido na libertação de compostos aromáticos. Ocasionalmente, a produção de metabolitos indesejáveis por parte destes microrganismos pode provocar alterações das propriedades organolépticas e das características toxicológicas/higiénicas do produto final (Lonvaud-Funel, 1999). De acordo com os dados obtidos por Lafon-Lafourcade *et al.* (1983), no final da maturação das uvas as BAL isoladas são pouco diversificadas e bastante reduzidas em número (10^0 a 10^1 ufc/mL), aumentando ligeiramente após a prensagem e encontrando-se no mosto de 10^2 a 10^4 ufc/mL (Wibowo *et al.*, 1985; Lonvaud-Funel, 1995; Lonvaud-Funel, 1999). As principais espécies de BAL já referenciadas por diversos investigadores como tendo sido isoladas nesta fase do processo de vinificação são: *Lactobacillus plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. hilgardii*, *Lb. brevis*, *Lb. confusus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus damnosus* e *Oenococcus oeni* (esta última é a espécie que domina nesta fase e realiza a fermentação malo-láctica) (Costello *et al.*, 1983; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983; Fleet *et al.*, 1984; Pardo e Zuñiga 1992; Fleet, 1993; Fugelsang, 1997).

As leveduras, por competirem pelos nutrientes e por produzirem substâncias inibidoras (etanol, SO₂, ácidos gordos de cadeia média), retardam o crescimento das BAL durante a fermentação alcoólica (Wibowo *et al.*, 1985; Carreté *et al.*, 2002; Carreté *et al.*, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Contudo, as leveduras também podem ter um papel estimulante no crescimento das BAL e na actividade malo-láctica (Capucho & San Romão, 1994).

1.3 Sistema de HACCP em adega

Durante muito tempo, o conceito do controlo de qualidade na indústria alimentar baseou-se apenas no controlo do produto final. A aplicação do conceito 'Hazard Analysis Critical Control Point' (HACCP), que pode ser designado por análise de risco e definição de pontos críticos, constitui um sistema preventivo para a garantia de qualidade. A utilização deste conceito, no caso da indústria alimentar, significa a aplicação de conhecimentos de microbiologia alimentar no desenvolvimento de regras definidas para o controlo da qualidade microbiológica.

Para implantar o sistema HACCP numa empresa é preciso aplicar os sete princípios estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, que é o Comité Conjunto 'Food and Agriculture Organization/World Health Organization' (FAO/WHO), cuja função principal é estabelecer normas e padrões para alimentos. Para além deste comité, outras entidades redigiram normas e directivas para a higiene e qualidade dos produtos. Os perigos à segurança alimentar são classificados em microbiológicos, químicos e físicos (Guia, 2000). Na vinificação, os perigos microbiológicos referem-se àqueles relacionados com as "doenças do vinho" e a microrganismos deteriorantes, oriundos do ambiente, dos equipamentos usados no processo e dos trabalhadores da área vinícola. Assim, uma incontrolada proliferação de microrganismos pode, eventualmente, levar a uma deterioração do produto e, conseqüentemente, a perdas económicas elevadas. No vinho há um risco reduzido de contaminação por patogéneos, devido ao seu baixo pH, ao alto teor alcoólico e à presença de dióxido de enxofre. O dióxido de enxofre tem sido considerado uma importante ferramenta no controlo do crescimento microbiano. Contudo, a sua adição no vinho tem vindo a diminuir nos últimos anos, facilitando disseminação de microrganismos quando as práticas de higiene não são eficientes. A higienização dos equipamentos é uma tarefa que, ao ser bem executada, permite a redução da maioria dos problemas microbianos. Esta prática é usualmente definida como um procedimento que permite reduzir o número de células viáveis a um nível aceitável, distinguindo-se da esterilização que tem por objectivo a eliminação da totalidade das células viáveis. Adicionalmente, a higienização tem um segundo objectivo que é eliminar os ambientes propícios ao crescimento dos microrganismos (Fugelsang, 1997). A higiene deve ser preventiva em detrimento de uma abordagem correctiva podendo-se, na maioria dos casos, evitar procedimentos agressivos para os materiais, com custos económicos elevados. As instalações da adega e os equipamentos devem ser limpos regularmente de acordo com os procedimentos estabelecidos nos planos de higiene. Estes planos definem os procedimentos a executar, a sua periodicidade, os produtos e os respectivos parâmetros de utilização. Por sua vez, inserem-se no sistema de autocontrolo e responsabilizam os dirigentes pelas tarefas de higiene na adega (Rosa, 2008).

Determinados equipamentos de adega apresentam uma estrutura complexa nas canalizações de passagem do vinho, que dificulta muitas vezes a eficiência da higienização. Isto deve-se ao facto de existirem estreitamentos, onde pode haver facilidade de acumulação de resíduos de vinho, com o conseqüente crescimento de microrganismos que, numa posterior utilização dos equipamentos, se disseminam no vinho.

Análise de risco

A primeira intervenção na elaboração de um sistema de HACCP é a descrição completa do produto, o modo da sua utilização, bem como a elaboração de um diagrama de fluxo detalhado relativamente ao seu processo de produção. Neste diagrama, devem ser especificadas possíveis origens de riscos e alguns destes encontram-se inseridos nos seguintes pontos:

- Matérias-primas ou ingredientes que podem apresentar microrganismos ou metabolitos indesejáveis;
- O potencial de contaminação nas várias fases de processamento;
- Produtos intermediários que permitam o crescimento ou a sobrevivência de microrganismos;
- Medidas de controlo de riscos como, por exemplo, a introdução de processos letais ou bacteriostáticos.

Identificação de pontos críticos de controlo

Os pontos críticos de controlo, por definição, referem-se aos locais ou processos tecnológicos onde é possível exercer controlo sobre os riscos anteriormente identificados, com o objectivo de os minimizar ou eliminar. Um dado processo de aquecimento ou de redução de pH pode ser identificado como ponto crítico (Schuller, 1998)

Estabelecimento de critérios para os pontos críticos de controlo

Para cada um dos pontos devem definir-se critérios de avaliação, bem como limites críticos que indicam se o processo tecnológico está a decorrer conforme planeado. Possíveis critérios podem ser, por exemplo, a temperatura, pH, actividade da água, concentração de sal ou a textura de um produto intermediário.

Processos de monitorização de pontos críticos de controlo

A introdução de processos de monitorização (no caso ideal, serão processos de monitorização contínua) permite a detecção de eventuais desvios de limites críticos previamente estabelecidos. Em geral, os critérios microbiológicos não são aplicados em processos de monitorização, devido ao longo período de tempo desde a inoculação até à obtenção de resultados. Pode aplicar-se este tipo de análise na avaliação da matéria-prima. O actual desenvolvimento de métodos microbiológicos rápidos, em especial na detecção de bactérias específicas, vai constituir futuramente uma ferramenta valiosa no processo de monitorização de pontos críticos (Vanne *et al.*, 1996).

Registos e verificações nos sistemas de HACCP

O sistema HACCP deve ser documentado e sempre actualizado, incluindo todo o sistema de monitorização, intervenções e alterações. O bom funcionamento do sistema HACCP deve ser controlado por inspecções periódicas, que incluem a verificação dos processos de limpeza do equipamento, bem como dos produtos intermediários e produtos finais, por análises microbiológicas detalhadas, que fornecem informações quantitativas e qualitativas (Pichhardt 1993; Adams & Moss 1995).

Parâmetros a ter em conta na higienização de uma adega

Um parâmetro muito importante para a higiene de uma adega é a qualidade da água. Este solvente universal é o principal recurso quando se efectua uma higienização, servindo tanto para a aplicação dos detergentes e anti-sépticos como para o enxaguamento dos equipamentos. Sendo assim, parte-se do princípio que a água deve estar isenta de microrganismos patogénicos e de deterioração do vinho. Águas com muito cálcio e/ou magnésio, ou seja águas de dureza elevada, interferem com a eficiência dos detergentes (particularmente os bicarbonatos), contribuindo para a formação de precipitados. Além deste aspecto, a água não poderá também ter sabores ou cheiros estranhos e não ultrapassar o número de bactérias superior a 50 ufc/100ml, nem conter bactérias coliformes (Pina, 2000). A Quinta Monte d'Oiro possui filtros esterilizantes em todas as saídas de água, assim como, procede às diversas análises rotineiras, para que, desta forma, a água seja utilizada com segurança e em diversas tarefas e actividades enológicas.

Alguns precipitados apresentam estrutura ideal à acumulação de resíduos orgânicos e, conseqüentemente, de microrganismos tornando a higienização mais difícil (Zoecklein *et al.*, 1999). Para aumentar a eficiência da higienização convém que os materiais utilizados nos equipamentos apresentem uma superfície higiénica, ou seja, superfície em que a adesão da sujidade não aconteça facilmente. O aço inoxidável de baixa rugosidade está considerado como o melhor material higiénico, uma vez que a sua formação é constituída por fissuras de menor tamanho e, por sua vez, menor acumulação de sujidades e menor tempo de limpeza. O cimento é um material de revestimento ainda muito encontrado e o facto de ser muito rugoso dificulta a sua higienização. É também de ter em conta que este material é rico em ferro e cálcio, constituintes inconvenientes para o vinho. Normalmente este material é revestido com resinas 'epoxi' pois, para além de facilitar as operações de higiene, evitam possíveis causas féricas, assim como formação de cristais neutros de tartarato de cálcio (Rosa, 2008).

Um outro material contactado pelo vinho é a madeira. Maioritariamente de carvalho, este material é bastante utilizado nos vinhos tintos e em alguns brancos. A madeira é, de facto, muito difícil de higienizar, uma vez que este material é constituído por inúmeros poros que facilmente acumulam sujidades, formando um habitat propício ao desenvolvimento de determinados microrganismos de contaminação (Yap, 2008). A sujidade orgânica resulta dos resíduos de vinho, leveduras, bactérias e fungos, pigmentos e tartaratos. Durante a fermentação alcoólica algumas substâncias formadas por processos bioquímicos e físicos precipitam e aderem às paredes interiores dos tanques. Quimicamente, são resíduos de fermentação, proteínas, produtos de decomposição de proteínas precipitadas, normalmente combinados com taninos. Quando os resíduos resultam dos sais que compõem a dureza temporária da água estamos perante uma sujidade inorgânica. Os sais de cálcio e magnésio presentes na água reagem com os componentes do mosto originados pela fermentação e formam oxalatos insolúveis de cálcio e magnésio. Estes contaminantes combinam-se frequentemente com a sujidade orgânica (Rosa, 2008).

Com o uso dos equipamentos de adega, nomeadamente os que entram em contacto com o vinho e/ou mosto, aumenta a facilidade de acumulação de sujidade e potencial propagação de

microrganismos. As operações de lavagem consistem em remover essa sujidade e devem ser feitas imediatamente após a utilização dos equipamentos, recorrendo ao uso de químicos eficientemente adequados e compatíveis com os materiais. Certas adegas utilizam a técnica de limpeza preliminar, em que a remoção da maior quantidade dos detritos é efectuada antes do recurso aos detergentes. Pode ser necessária a utilização manual de escovas, no entanto, é importante ter em conta a resistência dos materiais à acção mecânica. Os detergentes são, posteriormente, adicionados com o intuito de eliminar os depósitos não visíveis (Fugelsang, 1997). Outro factor a ter em conta, no que diz respeito à eficiência da lavagem, é o tempo de contacto, que quanto maior, melhor a qualidade da limpeza. Porém, devem ter-se em consideração as necessidades da produção, que normalmente exigem higienizações rápidas que garantam a mais rápida disponibilização do equipamento para produção.

Uma vez removida a maior quantidade de resíduos utilizam-se os detergentes, com o objectivo de solubilizar os detritos mais difíceis de remover. Cada detergente tem propriedades de acção únicas, o que permite seleccionar o químico em função do tipo de sujidade. O incremento da temperatura da água e a sua aplicação no processo a alta pressão proporcionam uma melhoria no desempenho, redução da quantidade de água utilizada e no tempo do procedimento. A formulação de um determinado detergente é, normalmente, composta por diferentes componentes e possuem diferentes finalidades nas operações de lavagem. Os que mais se destacam são os alcalinos, polifosfatos (quelantes), agentes tensioactivos e os ácidos.

A higienização é uma importante operação que deve ser feita após a limpeza dos equipamentos. Apesar da maioria dos microrganismos serem eliminados durante o processo de limpeza, assim como os resíduos que lhes servem de suporte, é muito importante considerar que os microrganismos que restam representam uma elevada percentagem e risco. A higienização serve para eliminar todos os microrganismos resistentes aos procedimentos de limpeza.

Na indústria enológica é comum a utilização de produtos com acção combinada detergente e anti-séptica, pois tornam as operações de higiene menos morosas. Contudo, a sua eficiência é inferior quando comparada com os procedimentos de higiene em que os passos de limpeza e desinfecção são executados em separado e com produtos específicos a cada operação. Os produtos mais utilizados na actualidade são derivados de cloro, iodo, componentes quaternários de amónia e o dióxido de enxofre (SO₂).

Existem ainda determinados procedimentos que permitem higienizar fisicamente, sem se recorrer ao uso de produtos químicos; o vapor de água, a aplicação de raios ultravioleta, o ozono (O₃) e, mais recentemente, os ultra-sons são os principais métodos de higienização física (Yap, 2008).

Os anti-sépticos alcalino-clorados, embora com tendência de abandono progressivo nos últimos anos devido ao serem potenciadores de problemas organolépticos no vinho, continuam a ser muito usados e reconhecidos pelo facto de eliminarem todos os microrganismos, bacteriófagos e esporos (Fugelsang, 1997).

O dióxido de enxofre, composto muito utilizado na indústria enológica como agente inibidor do desenvolvimento de microrganismos no vinho, pode também ser utilizado como anti-séptico de equipamentos. Porém, a sua eficiência está muito dependente do pH, das características físicas das superfícies e do nível de detritos orgânicos (Fugelsang, 1997).

Posto isto, existe um elevado número de técnicas e produtos químicos, levando à possibilidade do enólogo poder optar pela conjugação que considere mais eficiente. A Quinta Monte d'Oiro aplica algumas das técnicas e produtos usados actualmente e que foram anteriormente referenciados, respeitando todos os procedimentos auto implementados.

Relativamente a procedimentos de higiene, a adega pode ser dividida em cinco zonas: material de vindima e recepção de uvas; vinificação e armazenagem (Cubas); sala de barricas/estágio; laboratório e Armazém. O presente trabalho teve como objectivo estudar somente as zonas de vinificação, armazenagem e laboratório. A maioria dos equipamentos a higienizar numa adega requerem procedimentos denominados 'clean *in place*' (CIP). Este é geralmente utilizado em situações em que a limpeza manual não pode ser realizada facilmente, ou mesmo em situações de total impossibilidade de alcance manual. Este sistema permite a higienização das partes e peças de uma instalação de produção de uma indústria, sem necessidade de desmontagem dos equipamentos e tubulações, através da circulação da solução química. Basicamente, um sistema CIP é composto por bombas centrífugas radiais (provocam tubulações para avanço e retorno de solução), tanque de solução CIP (onde é armazenada a solução de limpeza) e dispositivos aspersores (Forni, 2008).

Normalmente, o ciclo de higienização é composto pelas etapas de pré-enxaguamento, aplicação de detergente, eliminação do detergente por enxaguamento, aplicação do anti-séptico e enxaguamento final. Nalguns casos, em que se utilizam bases fortes, é aplicado ácido cítrico, que actua como neutralizante de pH antes do enxaguamento final. Nas cubas de armazenamento pode ser utilizado o sistema de limpeza CIP mas existem determinados pontos nos quais a possibilidade de acumulação de sujidade é maior. São exemplos as torneiras de amostra, escalas, juntas e válvulas. Nestes locais, pode recorrer-se ao auxílio de escovas apropriadas para o procedimento. Na higienização de barricas existem determinados equipamentos que permitem efectuar uma boa limpeza e eliminar parcialmente a carga microbiana. Actuam com o auxílio de água a elevada temperatura e pressão por meio de um aspersor rotativo que é introduzido dentro da barrica. O equipamento permite variar bruscamente a temperatura da água, sendo efectuados diversos ciclos consoante o estado de sujidade da barrica.

A zona de enchimento é a área onde o vinho entra, pela última vez, em contacto com os equipamentos, sendo por isso uma zona onde os cuidados de higiene são muito importantes, quer a nível de circuitos internos (membranas/filtros, bicos de enchimento, o injector de azoto e a rolhadora) quer dos exteriores dos equipamentos. A aplicação de um sistema de limpeza CIP permite um melhoramento na totalidade do procedimento de higiene, contudo pode não ser eficaz (Rosa, 2008).

Existem, dentro do âmbito da enologia, determinadas técnicas de monitorização que permitem verificar a qualidade dos procedimentos de higiene. O principal objectivo é, sem dúvida, tentar pesquisar deficiências nos procedimentos, para se pôr de parte os problemas que advêm do desenvolvimento de microrganismos não desejáveis. Também deve ser sempre controlada a qualidade da última água do enxaguamento final do processo, com o intuito de se verificar se resta algum químico no equipamento no final do procedimento que possa depois ser arrastado pelo vinho. Este tipo de controlo deve ser efectuado em laboratório ou na adega através de *kits* apropriados. Parte-se do princípio que, quando aplicados os procedimentos de higiene, os resultados serão uma redução significativa na população microbiana do equipamento. Contudo, dependendo do grau de acumulação dos detritos e do esforço despendido na limpeza, os procedimentos poderão não ser eficientes. O método mais simples para a avaliação das operações de higiene é o sensorial, podendo verificar-se irregularidades através da visão, tacto e olfacto. Contudo, esta avaliação sensorial rápida serve simplesmente para um controlo básico e impreciso e não pode ser aplicada a todos os equipamentos. Para um controlo preciso deve recorrer-se a análises microbiológicas. Neste tipo de análises, utilizam-se normalmente zaragoas de algodão para recolher os microrganismos, utilizando-se uma área de recolha padrão. Contudo, estes métodos apresentam algumas limitações que tornam a contagem difícil, entre as quais: a natureza das superfícies (mais problemáticas as irregulares); definição da área de recolha de amostra; a quantidade de pressão exercida na zaragatoa durante a recolha; o tempo que demora todo o processo e a incerteza da recolha da totalidade dos microrganismos na superfície.

É também de se ter em conta o facto de as superfícies terem fungos filamentosos provenientes da atmosfera da adega que, ao contaminarem as amostras, influenciam os resultados das análises.

Os métodos de recolha de amostras por zaragatoa envolvem a aplicação de um algodão esterilizado sobre uma superfície e transferido para um diluente, que é posteriormente agitado para se separarem as células viáveis da zaragatoa. O diluente é depois filtrado por uma membrana com tamanho de poro muito reduzido (0,45 μm), sendo essa membrana transferida para um meio de cultura apropriado. Nas superfícies lisas pode recolher-se a amostra de microrganismos por placas de contacto, ou seja, pressionando placas com um meio de cultura específico contra as superfícies higienizadas. Em teoria, as células viáveis são transferidas directamente para a placa. Contudo, o tempo de contacto entre a superfície e o meio é uma variável que afecta o sucesso dos resultados (Fugelsang, 1997). Neste trabalho, para além da análise de superfícies analisaram-se águas de enxaguamento. Estas são recolhidas após o equipamento ter sofrido uma acção química para sua higienização e ocorrer o enxaguamento final (3ª lavagem, com água).

1.4 Técnicas e métodos de análise microbiológica

Na área da vinificação, é de extrema importância prática a identificação correcta e a diferenciação ou tipificação dos microrganismos envolvidos nas diferentes etapas de processamento, desde a matéria-prima até ao produto final, incluindo quer os responsáveis por processos fermentativos, quer os contaminantes ou os microrganismos de deterioração (Inês, 2007).

A escolha de um desenho de um meio de cultura torna-se fundamental e de elevada importância apesar de, na prática, considerar-se que não existe um meio de cultura ideal que satisfaça todos os requisitos para uma enumeração e identificação de toda flora dos alimentos e/ou bebidas (Hocking & Pitt, 1992; Baumgart, 1993). No entanto, existe um elevado número de meios de cultura que permitem avaliar com uma boa aproximação as populações de leveduras/bactérias presentes num determinado produto. Assim, os meios de cultura para o isolamento de microrganismos podem ser classificados como meios de cultura gerais ou de selectivos. Os primeiros permitem o desenvolvimento da maior parte dos principais grupos de microrganismos. No entanto, é importante salientar que não se dispõe de um meio "universal" que permita a recuperação de qualquer tipo de microrganismo com elevada eficiência e a sua composição deverá ser, sempre que possível, a mais parecida com as características do "habitat" natural dos microrganismos em estudo. Neste trabalho utilizou-se particularmente o meio GYP (Leveduras) e o TSA-YE (bactérias). Posteriormente, usou-se um meio designado DBDM, um meio de cultura selectivos e diferencial. Este meio selectivo permite a proliferação de grupos específicos de microrganismos, enquanto inibem o crescimento de outros. A selectividade deve-se à utilização de compostos inibidores, escolha do pH apropriado ou à omissão de nutrientes específicos. Poder-se-á ainda incorporar antibióticos como oxitetraciclina, clorotetraciclina, cloranfenicol, gentamicina e estreptomicina, incorporados nos meios de cultura a concentrações de 10 a 100 mg/L, sendo estes uns eficientes inibidores do crescimento bacteriano. O cloranfenicol é utilizado preferencialmente, dado que apresenta uma actividade antimicrobiana contra uma vasta gama de bactérias e uma vez que pode ser adicionado ao meio de cultura antes da autoclavagem, representando uma vantagem do ponto de vista laboratorial para identificação de leveduras (Beuchat, 1993; Jarvis e Williams, 1987).

Actualmente, a indústria alimentar necessita de recorrer a diversas técnicas e métodos de análises microbiológicas e moleculares que permitam a identificação de contaminantes. Estes métodos podem ser utilizados na discriminação dos diferentes *taxa* (géneros, espécies e estirpes) de microrganismos e que podem ser classificados em fenotípicos (clássicos), que se baseiam em caracteres morfológicos, bioquímicos e fisiológicos; e genotípicos (ou moleculares), se têm como alvo os ácidos nucleicos.

Uma vez que os métodos convencionais/clássicos, tradicionalmente usados na identificação de espécies de microrganismos, conduzem, em alguns casos, a incorrectas classificações de espécies ou a falsas identificação ao nível da estirpe, procedeu-se por parte da indústria do vinho a uma particular procura de técnicas moleculares. Assim, estas visam colmatar os métodos clássicos e, que sejam ao mesmo tempo, relativamente mais rápidas, simples, com

maior fiabilidade e reprodutibilidade. Estas técnicas baseiam-se fundamentalmente na técnica de amplificação de DNA por reacção em cadeia da polimerase (Swaminathan & Barrett, 1995; van der Vossen *et al.*, 1996).

Pode afirmar-se que a técnica de ('polimerase chain reaction' – PCR), constitui uma ferramenta básica para inúmeras metodologias de análise do DNA, consistindo fundamentalmente na amplificação de determinados segmentos de DNA. O processo é iniciado com a desnaturação da dupla hélice da molécula de DNA por aplicação de temperatura elevada. Após o abaixamento da temperatura, dois oligonucleótidos de cadeia simples, complementares às regiões flanqueadoras do segmento que se quer amplificar e que funcionam como iniciadores ou primers, ficam orientados de modo a que a síntese de DNA actue na região limitada por estes e que lhes permita assim ligar-se a essas regiões, dando início à síntese do DNA por acção de uma DNA polimerase termostável (enzima *Taq*). Ciclos de desnaturação, de ligação dos primers e de extensão dos mesmos por acção da DNA polimerase são repetidos várias vezes, resultando na amplificação do segmento alvo. A grande vantagem da utilização da técnica de PCR baseia-se na necessidade de uma pequena quantidade de DNA para efectuar a análise, o qual não necessita de estar muito purificado. A amplificação pode mesmo ser efectuada a partir de células lisadas sem posterior extracção ou purificação do DNA (Casal *et al.*, 2004).

As metodologias que têm por base o PCR permitem diferenciar microrganismos, nomeadamente leveduras e bactérias, a diferentes níveis, que variam desde género a sub-espécie (Ness *et al.*, 1993), sendo o nível de discriminação determinado pelo método utilizado (van der Vossen *et al.*, 1996). Assim sendo, o poder discriminante de um método de diferenciação ou tipificação define a sua capacidade para distinguir entre isolados muito semelhantes da mesma espécie, reconhecendo cada isolado não relacionado como único, e depende da variabilidade do alvo para o qual está direccionado no grupo particular de microrganismos em estudo. O potencial identificativo de um método de caracterização é determinado pela sua capacidade de permitir o posicionamento de isolados não identificados numa classificação pré-existente, *i.e.* permitir a discriminação dos isolados de uma determinada espécie relativamente a isolados pertencentes a espécies próximas. O potencial identificativo de um método depende assim do grupo de microrganismos em estudo e do sistema de classificação subjacente (Tenreiro, 1995; Chambel, 2001). Um determinado método pode ter potencial identificativo e/ou poder discriminante e a selecção dos métodos a aplicar deve ser feita tendo em consideração o seu poder discriminante no grupo particular de microrganismos em estudo e o fim a que se destinam, identificação ou diferenciação (Inês *et al.*, 2009).

O objectivo deste trabalho foi avaliar microbiologicamente os procedimentos de higiene, em diversas áreas críticas de contaminação de uma adega (Quinta Monte d'Oiro), enquadradas nos pré-requisitos de um sistema de HACCP. Para isso, fez-se a análise de microrganismos existentes nos equipamentos (depois de se efectuarem os procedimentos de higiene) em dois períodos do mesmo ano, especificamente em Junho e Setembro 2010. Para uma melhor compreensão da flora microbiana, e na tentativa de conhecer as vias/fontes de contaminação,

foi utilizado um agregado de métodos/técnicas, que permitiram, deste modo, identificar e/ou diferenciar as espécies ou estirpes responsáveis pela contaminação/degradação do produto final. Optou-se, portanto, pelos **Métodos Fenotípicos Clássicos** (i) características morfológicas, (ii) com base em alguns itens do 'Simplified Identification Method' (Método de Identificação Simplificado - SIM); e **Técnicas Moleculares** (ou genotípicos). Para leveduras foi utilizada a técnica de análise de polimorfismos de dimensão de fragmentos de restrição após amplificação por PCR (PCR-RFLPs) enquanto que, nas bactérias foi utilizada a técnica de amplificação de DNA pelo primer csM13 (M13-PCR 'fingerprinting'). Posteriormente utilizou-se, para ambos os microrganismos, a sequenciação parcial do rDNA (rDNA 16S para bactérias e rDNA 26S para as levedura) que apesar de ser utilizada com objectivos diferentes, teve como principal intuito a identificação desses isolados ao nível da espécie.

Em 1994, Stackebrandt e Goebel apresentaram um estudo de correlação entre os resultados obtidos por **Sequenciação de rRNA 16S** e hibridação DNA-DNA. De acordo com este estudo, valores de homologia de rRNA 16S inferiores a 97% correspondem a valores de semelhança DNA-DNA inferiores a 50%, enquanto valores de homologia superiores a 97% podem corresponder a valores de semelhança DNA-DNA, que variam entre 10-100%. Apesar de reconhecerem as vantagens práticas da sequenciação de rRNA em relação à hibridação DNA-DNA, estes autores concluem que o potencial de aplicação da análise de sequências de rRNA 16S está na determinação do nível a partir do qual é necessário realizar ensaios de hibridação DNA-DNA, que fixam em 97% de homologia. Estes autores propuseram ainda a inclusão da sequência de rRNA 16S numa descrição polifásica de espécie. Actualmente, a dimensão das bases de dados disponíveis permite a identificação a nível de espécie por comparação de sequências de rDNA 16S (para valores de homologia superiores a 97%) (Inês *et al.*, 2009). Com o objectivo de identificar os isolados de algumas leveduras (Basidiomycota e Ascomycota), procedeu-se à amplificação por PCR da região D1/D2 do gene do DNA ribossomal da subunidade maior (rDNA 26S). A região D1/D2 engloba uma porção de cerca de 600 nucleótidos e apresenta uma conservação intra-específica que a torna, hoje em dia, alvo de excelência para identificação molecular de leveduras. Actualmente, um dos conceitos de identificação de espécie de leveduras (Kurtzman & Robnett, 1998) define espécie como um grupo de estirpes que mostrem menos de 1% de diferenças nucleotídicas do domínio D2 (c.a 300 nucleótidos).

A técnica do 'Restriction Fragment Length Polymorphisms' (**PCR-RFLPs**) baseia-se na amplificação de uma região genómica por PCR, seguida de digestão com enzimas restrição de corte frequente (4-6 bp). A separação dos fragmentos obtidos é normalmente realizada por electroforese convencional em gel de agarose (Inês *et al.*, 2009). Neste trabalho, recorreu-se à análise de restrição da região 5,8S-ITS do rRNA das leveduras vínicas, provindo uma identificação ao nível da espécie de isolados anteriormente analisados fenotípicamente. As regiões do complexo ITS (regiões codificantes e regiões variáveis) e o gene 5,8S do rRNA são

extremamente úteis para determinar relações geneológicas próximas, uma vez que exibem uma grande variabilidade interespecífica comparativamente com os genes rRNA 18S e rRNA 28S (Barata, 2008). Para além disso, devido à existência de sequências conservadas dentro dessa região, a baixa variação intraespecífica revelou-se muito útil para a identificação ao nível da espécie (Valente *et al.*, 1996). De referir ainda que quase todos os locais de restrição que permitiram a discriminação de estirpes individuais se encontram localizados na região hipervariável dos espaçadores intergénicos.

Pelo seu lado, o **PCR 'fingerprinting'** é uma designação genérica aplicada a metodologias baseadas em PCR e que originam um 'fingerprint' (impressão digital) de cada microrganismo. Existe uma grande diversidade de técnicas de PCR 'fingerprint', sendo comum a todas o facto de se basearem na amplificação de diferentes regiões do genoma por PCR, utilizando apenas um único primer e em condições de PCR pouco restritas ('low stringency'). Estas técnicas podem ser agrupadas de acordo com a região alvo do primer no genoma. Assim, nas técnicas de 'Random Amplified Polimorphic DNA' (RAPD) e 'Arbitrarily Primed PCR' (AP-PCR) o primer utilizado liga-se em diferentes regiões do genoma, enquanto que nas restantes técnicas (BOX-, ERIC-, REP-, M13-, 'microsatellite-primed'-PCR) o primer é dirigido para sequências repetidas, espalhadas pelo genoma. Deste modo, a ligação do primer a regiões específicas permite a amplificação de sequências genómicas entre esses mini/microsatélites. Consoante o tipo de sequência repetida, as técnicas adquirem designações diferentes (Inês, 2007).

Após uma abordagem polifásica, baseada numa caracterização fenética, foi utilizado neste trabalho o M13-PCR 'fingerprinting' para agrupar os inúmeros isolados de bactérias em 'clusters' de organismos com elevado nível de semelhança. A utilização do primer csM13, derivado da sequência 'core' do gene da proteína III da cápside do bacteriófago csM13, detectada em cópia múltipla nos genomas bacterianos, permite a obtenção de um 'fingerprint' complexo característico de cada microrganismo. Esta técnica tem-se revelado uma ferramenta útil na diferenciação de estirpes pertencentes a uma mesma espécie, apresentando simultaneamente uma elevada reprodutibilidade (Gadanhó, 2005; Valério *et al.*, 2005; Chambel *et al.*, 2007). No entanto, em todas estas técnicas, o conteúdo informativo fornecido por um primer pode ser completamente diferente de uma espécie para outra. Assim, pode ser mais ou menos discriminante, já que depende da presença, número e localização de sequências complementares ao primer no genoma dos microrganismos a caracterizar, o que causa, por vezes, a falha de obtenção de alguns perfis de amplificação (van der Vossen *et al.*, 1996; Inês, 2007). O produto final consiste numa série de fragmentos de massa molecular variável que, quando separados por electroforese em gel de agarose, geram perfis de bandas característicos do microrganismo (Soll, 2000). De salientar ainda que é uma técnica rápida, de razoável implementação e de relativos baixos custos.

2. Material e Métodos

Sempre que não haja outra especificação, todos os tampões e soluções utilizados, bem como as metodologias usadas, habituais na prática da biologia molecular, estão descritos em Sambrook *et al.* (1989) e em Rodeia *et al.* (2011). De igual forma, todas as manipulações microbiológicas foram realizadas com os devidos cuidados de assépcia.

2.1 Recolha de amostras

Neste trabalho, após um período/estágio de envolvimento pessoal na apreensão das diversas tarefas e metodologias de enologia praticadas na Quinta Monte d'Oiro, procedeu-se a recolha de amostras, efectuadas durante duas visitas à adega, nomeadamente no dia 28/Julho e 7/Setembro de 2010. Estes pontos de amostragem foram efectuados após uma higienização dos equipamentos e afins, com o intuito de se contabilizar a redução da carga microbiana após a implementação do Plano de HACCP desenvolvido pela adega. Também foram recolhidas amostras da água da rede da adega, da água de enxaguamento dos equipamentos e do ambiente da sala de barricas através de placas de ambiente.

As recolhas (Tabela 2) foram efectuadas em zonas específicas dos equipamentos, recipientes e acessórios de vindima, assim como objectos/materiais existentes nas áreas de vinificação e armazenagem da Quinta Monte d'Oiro.

Na maior parte dos equipamentos, em ambas amostragens, procedeu-se à recolha de amostras através de zaragatoas, tendo em conta a área da superfície de passagem. Após a recolha, as zaragatoas foram colocadas em tubos de vidro, com tampa de algodão, contendo 10 mL de solução de Ringer, esterilizada. Procedeu-se ainda a recolha de águas de enxaguamento provenientes do último enxaguamento de cada processo de higienização, nomeadamente a 3ª lavagem. Para além destas recolhas, ainda se empregaram placas de impressão/contacto com meios DBDM (selectivo para leveduras do género *Dekkera*) e placas com meio GYP.

Foi também realizada uma amostragem ao ambiente da sala de barricas. Para este efeito foram colocadas na sala seis placas de Petri abertas contendo meio YM-Agar durante 10 min. Decorrido este tempo as placas foram fechadas e seladas com película parafilme. Todas as amostras foram transportadas em malas refrigeradas. Devido à impossibilidade de se realizarem as análises no próprio dia, as amostras foram acondicionadas 4°C, e analisadas sempre no dia a seguinte à recolha.

Tabela 2. Locais de recolha das amostras e localização na adega. * As letras correspondem aos locais assinalados na planta da adega apresentada em Anexo.

Data de amostragem	Equipamentos	Pontos de Amostragem	Localização na planta da adega *
28 de Julho 2010	Cuba 1 F	Torneira	(a)
		Parede da Cuba	
	Cuba 23	Base	(d)
		Torneira	
		Tampão/Borracha	
		Parede da Cuba	
		Câmara-de-ar	
	Cuba 1	Provadeira	(b)
		Torneira do Nível	
		Base	
	Linha de Enchimento	Bomba Peristáltica (união da mangueira, cima)	(e)
		Bomba Peristáltica (união da mangueira, baixo)	
		União da Bomba (saída 1)	
		União da Bomba (saída 2)	(f)
União da mangueira			
Material de vindima	Balde	(c)	
	Recipiente/Caneco		
7 de Setembro 2010	Cuba 1	Provadeira	(b)
		Torneira do nível	
		Base	
	Material de vindima	Densímetro	(g)
		Refractómetro /termómetro	
		Caixa de colheita 1	(h)
		Caixa de colheita 2	
		Caixa de colheita 3	
		Tapete (uvas)	(i)
		Tapete (escada)	
		Avental da Prensa	(j)
		Prensa	
		Desengaçador	(l)
		Esmagador (vinho)	
	Balde	(c)	
	Linha de Enchimento	Bomba Peristáltica (união da mangueira, cima)	(e)
		Bomba Peristáltica (união da mangueira, baixo)	
União da Bomba (saída 1)			
União da Bomba (saída 2)		(f)	
União da mangueira			
Mangueira			

2.2 Isolamento e purificação

O processo de isolamento dos microrganismos (leveduras e bactérias) aplicado esteve directamente relacionado com o tipo de recolha.

Zaragatoas e águas de enxaguamento

Em todos os equipamentos e acessórios de vindima em que se usaram as zaragatoas foram utilizados três meios de cultura para isolamento e quantificação de leveduras e bactérias. Para o isolamento e quantificação de leveduras totais foi utilizado o meio GYP (Wickerham) composto por 5 g/L de extracto de levedura (Oxoid), 5 g/L de peptona (Oxoid), 20 g/L de glucose (Merck) e 20 g/L de agar, pH 6,0. Para a detecção de leveduras pertencentes ao género *Dekkera* foi utilizado, posteriormente, um meio selectivo e diferencial desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia (Rodrigues *et al.*, 2001), designado por DBDM (*Dekkera/Brettanomyces* differential medium). No isolamento e quantificação de bactérias empregou-se o meio TSA-YE, constituído por 30 g/L de TSB (Oxoid), 6 g/L de extracto de levedura (Oxoid) e 20 g/L de agar. Assim, os 10 mL de solução de Ringer de cada recolha foram divididos em 5 mL para inocular em meio GYP e 5 mL para o meio TSA-YE. Em ambas as situações, as soluções de Ringer foram agitadas vigorosamente e depois filtradas com o auxílio de uma bomba de vácuo, através de filtros estéreis de diâmetro de poro igual a 0,2 µm. Os filtros foram colocados sobre os meios TSA-YE e GYP. Procedeu-se de forma equivalente para as águas de enxaguamento filtrando 25 mL e inoculando em PCA, com uma composição de 5 g/L de peptona de caseína, 2,5 g/L de extracto de levedura, 1 g/L de dextrose e 15 g/L de agar e 25 mL GYP. A incubação foi feita numa estufa a 25°C e o crescimento foi acompanhado ao longo do tempo. No caso das placas de meio GYP, TSA-YE e PCA os resultados foram anotados ao fim de 5 dias e nas placas de meio DBDM após 12 dias.

Ambiente de sala de barricas

Em ambos os pontos de amostragem, realizou-se a uma amostragem ao ambiente da sala de barricas e da adega (vários pontos aleatórios da adega, nomeadamente, junto às cubas). Para este efeito foram colocadas, no conjunto das duas datas de amostragem, 8 placas abertas contendo meio PCA, durante 10 min. Posteriormente, as placas foram fechadas e seladas com película parafilme. Após o transporte, retirou-se o parafilme e foram incubadas a 25°C durante uma semana.

Placas de contacto

Os meios das placas de contacto/impressão foram o GYP e o DMBM, com o intuito de poder encontrar leveduras nas superfícies planas dos diversos equipamentos. Procedeu-se a nove amostras de recolha na 1ª data de amostragem e seis na 2ª data ponto de amostragem. De salientar que deve exercer-se sempre a mesma “força” nas placas de contacto com a superfície do material/equipamentos em questão para uniformizar os resultados das recolhas.

Após o período de incubação, todas as placas foram examinadas tendo em conta as diferentes morfologias das colónias, com o objectivo de se poder contar, agrupar e diferenciar o maior número de colónias. Este método de discriminação apresenta algumas limitações, uma

vez que espécies diferentes poderão possuir características morfológicas idênticas, ou então essas características serem diferentes e a espécie ser a mesma (Miller *et al.*, 1978).

Para a purificação dos isolados foi utilizada a técnica de riscado em superfície (Rodeia, 2011). Com o auxílio de uma ansa de inoculação esterilizada, retirou-se a colônia pretendida para uma placa de Petri com o meio de cultura correspondente, ou seja, GYP se levedura ou TSA-YE se bactéria. As placas foram incubadas a 25°C e as culturas consideraram-se puras ao fim de 4-5 repetições dos riscados, quando as colônias já se apresentavam visualmente homogêneas e isentas de quaisquer contaminações. As diferentes leveduras/bactérias isoladas foram igualmente sujeitas a observação microscópica, na qual foram captadas imagens fotográficas dos microrganismos que serviram de auxílio na identificação das várias espécies. As culturas foram mantidas a uma temperatura de 4°C até 15 dias, após o que se repetiram os riscados para manter as culturas frescas.

2.3 Caracterização morfológica e contagem das colônias

Na observação e caracterização morfológica das colônias, após 5 dias de incubação a 25°C em TSA-YE, PCA e GYP, os parâmetros tidos em conta nas leveduras e bactérias foram o tamanho, a forma, a margem, a elevação, a cor, a superfície, o brilho (Gonçalves, 1996; Deák, 1996). No caso específico das bactérias, a morfologia celular e a mobilidade/tipo flagelar foram igualmente observadas.

Porém, ainda foram analisados alguns testes bioquímicos, nomeadamente, para as leveduras teste da urease, crescimento em glucose, maltose, ciclohexamida 0,1%, nitrato, cloreto de sódio (NaCl) 10%, ácido acético 1% e para as bactérias como o teste Gram, Catalase e Oxidase.

Tendo em conta os diferentes parâmetros, foram sempre contadas todas as colônias existentes nas placas. Quando a contaminação com fungos filamentosos era elevada, não se podia tomar como verdadeiro o número de colônias existentes, pois o crescimento dos fungos filamentosos se sobrepor às colônias em desenvolvimento. Para a detecção de *Dekkera* spp. foram tidos em conta os parâmetros expressivos que indicam claramente a sua presença em meio DBDM, tais como a mudança de cor do meio de cultura de azul para amarelo e a presença de aroma fenólico (suor de cavalo). Também foi verificada a morfologia das colônias, tendo em conta que as deste género apresentam uma cor creme amarelada, mudando frequentemente para uma coloração esverdeada com o aumento do período de incubação (Rodrigues *et al.*, 2001). Igualmente teve-se em conta o lento crescimento destes microrganismos, ficando as placas até 20 dias em estufa, para evitar quaisquer equívocos por crescimentos morosos. Neste caso, todos os resultados relativamente à presença de *Dekkera* spp. foram negativos.

A contagem de leveduras totais foi baseada na norma internacional ISO 18593, sendo os resultados expressos em unidades formadoras de colônias (ufc) por mL de suspensão inicial. A fórmula utilizada é expressa da seguinte forma:

$$Ns = \frac{N \times F}{A} \times D$$

em que,

N é o número de unidades formadoras de colónias existentes em 1 mL de líquido diluente;

F é o volume de diluente utilizado na recolha de cada amostra;

A é a área da superfície investigada por cm^2 ;

D é o inverso da diluição utilizada.

Como no procedimento laboratorial só foi utilizado metade do volume de cada tubo, considerou-se que a área recolhida nos vários equipamentos também é metade da área na qual se passou a zaragatoa. Nos casos em que não foi investigada uma área, ou seja, nos utensílios em que foi impossível determinar a área da superfície analisada, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$N_{sw} = N \times F \times D$$

2.4 Métodos de identificação de espécies de leveduras

As leveduras isoladas e purificadas da Quinta Monte d'Oiro, foram separadas em dois grandes grupos, Ascomycota e Basidiomycota, consoante, o teste da hidrólise da ureia, (apesar de este meio não oferecer uma infalibilidade no resultado obtido, devido a falsos positivos, entre outros). O seu meio amarelo com tons de laranja tem como constituintes a peptona 1 g/L, glucose 1 g/L, NaCl 2 g/L, vermelho de fenol 12 mg e agar 20 g, a pH 6,8. Após a pesagem, o meio é homogeneizado e cozido, seguindo-se posteriormente uma distribuição de 4,5 mL por tubo e uma esterilização no autoclave a 120°C durante 15 min. Quando ainda quente, adiciona-se asepticamente 0,5 mL de uma solução de ureia em água destilada a 20% (2 g/L), previamente esterilizada por filtração. Agitam-se e inclinam-se os tubos. Depois do arrefecimento do meio, o inóculo é feito com uma ansada da suspensão de células procedentes das placas anteriormente purificadas. A incubação realiza-se a 25°C e a leitura deverá ser realizada após 48 h e confirmada após 5 dias, considerando-se o teste positivo para Basidiomycota sempre que se observe a mudança de cor de amarelo para rosa intenso. Caso a tonalidade do meio se mantenha presume-se que a suspensão de células é de Ascomycota.

Como já foi anteriormente referido, os métodos moleculares, baseados na análise de polimorfismos na região do DNA que codificam os genes do rRNA (5S, 5,8S, 18S, 26 e 28S) e as regiões ITS (*'Intergenic Transcribed Spacer'*) e IGS (*'Intergenic Spacer'*), têm sido usados com sucesso na maioria de identificação de leveduras. Assim, seguidamente à amplificação destas regiões e respectiva análise dos fragmentos de restrição dos produtos de amplificação evidenciou-se que o RFLP-PCR é uma técnica viável na identificação de leveduras, nomeadamente as Ascomycota (Wyder & Puhán, 1997). Desta forma, devido à robustez da parede das células Basidiomycota, optou-se apenas por se usar o método de PCR-RFLP, através da região 5,8S-ITS do gene rRNA nas Ascomycota. Os primers utilizados na reacção de PCR na amplificação da região referida anteriormente foram: o primer directo ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e o primer reverso ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

Obtenção dos lisados celulares e PCR de leveduras Ascomycota

Os lisados celulares foram obtidos por duas formas distintas, uma vez que algumas leveduras (Basidiomycota) apresentaram uma membrana bastante resistente, o que impede a obtenção do DNA.

O primeiro método foi directamente efectuado nos tubos de PCR que já continham uma mistura reaccional denominada *master-mix*. As células de cada isolado de levedura foram recolhidas (1/2 ansada) a partir de uma colónia isolada na placa de meio de cultura (GYP), contendo a cultura pura e jovem. Em seguida estas foram ressuspensas directamente no tubo de PCR contendo 96 µL de *master-mix*.

Tabela 3 – Componentes da reacção de PCR (adaptado de Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

Mix	Componente / Concentração da solução de trabalho	Concentração final	Volume
Master Mix	Tampão (Green Go Taq Buffer) / 5x	1x	20 µL
	MgCl ₂ (Biotools) / 25 mM	2 mM	4 µL
	dNTPs mix (Promega) / 10 mM	0,2 mM	2 µL
	Primer directo ITS1 / 50 mM	0,5 µM	1 µL
	Primer reverso ITS4 / 50 mM	0,5 µM	1 µL
	Água Mili-Q	-	78 µL
	Total		96 µL
Mix Taq	Go Taq DNA Polimerase (Biotools) / 2,5 U/µL	2,5 U	1 µL
	Água Mili-Q	-	3 µL
	Volume total		100 µL

Os tubos foram colocados num termociclador, no qual foram submetidos a uma temperatura inicial de 95°C, durante 15 min. Este tratamento térmico prévio à reacção de PCR permitiu o rompimento das paredes celulares das leveduras, libertando o DNA, que ficou desta forma no sobrenadante (*master-mix*). Depois deste processo, os tubos foram colocados em gelo efectuando em seguida o programa de PCR. Na Tabela 3, constam todos os componentes da reacção de amplificação de DNA (PCR), concentrações e volumes utilizados por amostra. A cada microtubo eppendorf, que já continha o *master-mix*, foram adicionados 4 µL de *Mix Taq* e foram efectuadas as reacções de PCR num termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

No segundo método (somente para as leveduras em que não se libertou o DNA pelo primeiro método), nomeadamente a amostra (23, 24, 25 e 26), adicionou-se ao protocolo anterior uma acção química (solução de lise) e física (térmica). Ou seja, após a preparação num tubo de PCR contendo 98 µL de *master-mix* (já com a Taq polimerase incluída), procedeu-se à preparação de uma solução de lise constituída com 25 µL de SDS 10%, 5 µL de NaOH 10 N e 970 µL de água Mili-Q. Desta solução de lise, foi utilizado um volume de 50 µL por cada amostra de levedura a identificar. Posteriormente, ressuspendeu-se bem a biomassa nos

respectivos tubos de PCR com o auxílio de uma ansa descartável estéril. Estes tubos foram bem isolados com parafilme e colocados num banho a 100°C durante 15 min. Após esta acção térmica, adicionou-se 2 µL de lisado a cada tubo de *master-mix*, correndo em seguida o programa de PCR. As reacções de PCR constaram de 40 ciclos: desnaturação a 94°C durante 1 min; emparelhamento a 55,5°C por 2 min; extensão a 72°C durante 2 min. No final dos 40 ciclos, o termociclador efectuou uma etapa de extensão complementar dos amplificados a uma temperatura de 72° C, durante 10 min. Foi também efectuado um controlo negativo, que serviu para verificar a ausência de contaminações. O controlo negativo foi efectuado utilizando um microtubo que foi sujeito a todas as condições do procedimento em que a amostra foi substituída por igual volume de água Mili-Q.

No final da reacção de PCR, para verificar o sucesso das amplificações dos fragmentos, as amostras foram sujeitas a uma electroforese em gel de agarose 1,4% em tampão TAE 1x. No procedimento, foram misturados 5 µL de cada amostra de PCR com 2 µL de tampão de amostra [50% glicerol, 0,1% (m/v) de azul de bromofenol] e 3 µL de água Mili-Q. O gel foi carregado com as amostras e usou-se 8 µL de um marcador de massa molecular de 100 bp + 1,5 kb DNA *ladder* (Bioron, GmbH). O tempo de corrida foi de 70 min a 2,4 V/cm. Passado o tempo da electroforese, o gel foi corado numa solução de TAE 1x com brometo de etídio (0,5 µg/mL), durante 30 min. No final, o gel foi visualizado no aparelho Bio-Rad Gel Doc 2000TM (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milão, Itália), com o qual foi retirada uma fotografia sob ultravioleta.

Restrição dos fragmentos com as enzimas *CfoI*, *HinfI* e *HaeIII*

Com o objectivo de se traçar o perfil de restrição das leveduras isoladas, cada amplificado foi digerido (em separado) por três enzimas de restrição. Em cada tubo foram adicionados 15 µL do amplificado e 5 µL de mistura de enzima que foi composto por: 2 µL de tampão de enzima, 2 µL de água Mili-Q e 1 µL de enzima (*CfoI*, *HinfI* ou *HaeIII*) com uma concentração de 10 U/µL. Os vários preparados foram incubados com agitação a 37°C, durante 5 h.

No final da incubação os vários perfis de restrição foram obtidos por electroforese. O procedimento efectuado foi semelhante ao da reacção de amplificação, variando somente a concentração do gel de agarose (3%) e as condições da corrida (170 min a 2,4 V/cm). Foram captadas as imagens fotográficas com o auxílio do mesmo aparelho utilizado nas amplificações.

Para se determinar cada espécie a dimensão, dos vários fragmentos obtidos pelo método de PCR-RFLP, foram analisadas cuidadosamente e comparados com a base de dados da CECT (Colecção Espanhola de Cultivos Tipo).

Sequenciação de leveduras Basidiomycota e algumas Ascomycota

Nas leveduras Basidiomycota, optou-se por uma estratégia diferente, visto que para além das suas características morfológicas, ainda se junta a escassez de base de dados (CECT), referentes aos diversos perfis de restrição característicos de cada espécie de levedura. Assim sendo, elegeu-se o método de sequenciação para identificar este grupo de leveduras. Para além das Basidiomycota, algumas Ascomycota para as quais se pretendia confirmar o

resultado obtido pelos mapas dos fragmentos de restrição, optou-se igualmente pelo uso da sequenciação.

Desta forma, as colónias das Basidiomycota foram incubadas em 10 mL de meio líquido GYP durante 4 dias. Após esse período de incubação, os 10 mL de meio de cada levedura foram centrifugados a 10000 rpm durante 10 min, o depósito que resultou da centrifugação foram ressuspensos com 0,5 mL de SE (Sorbitol 1M, EDTA 0,1 M e pH 7,5) e transferido para um microtubo eppendorf. Foram adicionados 20 µL de liticase a 5 mg/mL e a mistura foi incubada durante 1 h a 37°C, com agitação constante. Em seguida, cada microtubo foi sujeito a uma nova centrifugação a 13000 rpm, durante 1 min. Rejeitou-se o sobrenadante e o depósito foi ressuspensão com 500 µL de TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM e pH 7,4) e 50 µL de SDS 10%. Cada tubo foi incubado por mais 30 min a 65°C. Em seguida, foram adicionados 200 µL de KAc 5 M (60 mL de KAc 5 M; 11,5 mL de HAC; 28,5 mL de H₂O e pH 5,5) e a mistura foi incubada em gelo durante 1 h. Passado o tempo de incubação em gelo, cada tubo foi novamente centrifugado a 13000 rpm, a uma temperatura de 4°C e durante 5 min. O sobrenadante foi para um novo microtubo. Foram adicionados 750 µL de isopropanol, agitou-se vigorosamente cada mistura e deixou-se a repousar durante 5 min à temperatura ambiente. Centrifugou-se mais uma vez a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, foi removido o sobrenadante e deixou-se cada tubo aberto, até se evaporar todo o isopropanol. Foi ressuspensão o depósito em 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e pH 7,4), foram adicionados 30 µL de RNase (500 µg/mL) e cada tubo foi incubado a 37°C durante 30 min. Depois da incubação, foram adicionados 30 µL de NaAc 3 M (pH 6,9) e 200 µL de isopropanol. Cada tubo foi novamente centrifugado a 13000 rpm, a uma temperatura de 4°C durante 10 min, removendo-se em seguida os sobrenadantes e aguardou-se até o isopropanol evaporar. Para conservar as amostras de DNA, o depósito resultante da centrifugação foi finalmente ressuspensão em 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e pH 7,4) (Struhl *et al.*, 1979). Para se verificar se o DNA foi realmente extraído das células, foi realizada uma electroforese em gel de agarose a 1,4% em tampão TAE 1x, durante 70 min a 2,4 V/cm. Nos resultados em que, por este método, houve libertação do DNA continuou-se com o protocolo PCR-RFLP e, uma vez que foi possível visualizar a quantidade de DNA obtida em cada levedura pela espessura da banda (obtida na electroforese), utilizaram-se posteriormente diferentes volumes de DNA na reacção de PCR.

Depois de se obter DNA das leveduras (Basidiomycota e Ascomycota), avançou-se para a amplificação da região "D1D2" do gene do rRNA 26S. Na amplificação do domínio variável D1/D2, foram usados os 'primers' NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGAGGAAAAG) e NL-4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (Kurtzman & Robneet, 1998). As reacções de amplificação foram realizadas num volume de 50 µL com a composição apresentada na tabela 4.

Depois de realizada a Mistura, adicionou-se 5 µL de lisado/células de Ascomycota e 10 µL de extracção de DNA (Basidiomycota) nos respectivos tubos de PCR, previamente identificados e com a mix distribuída num volume de 16,4 µL. Neste caso, a variação de volume de DNA foi regulada com a água Mili-Q para perfazer um total de 50 µL de volume.

Tabela 4 - Componentes da reacção de PCR (adaptado de Barata, 2010).

Componente / Concentração da solução de trabalho	Concentração final	Volume
Tampão (Buffer 5x Go Taq)	1x	10 µl
MgCl ₂ (Biotools) / 25 mM	2 mM	4 µl
dNTPs mix (Promega) / 10 mM	0,2 mM	1 µl
Primer NL1 / 50 mM	0,5 µM	0,5 µl
Primer NL4 / 50 mM	0,5 µM	0,5 µl
Taq DNA Polimerase (Biotools) 50U / µL	2 Unidades	0,4 µl
	Total	16,4 µl

As condições de amplificação no termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), consistiram em: um ciclo inicial de 5 min a 94°C; 35 ciclos em 1min a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C e uma extensão final de 6 min a 72°C. Seguidamente, correu-se um gel exactamente igual ao executado anteriormente, para a confirmação da extracção de DNA.

Deste modo, procedeu-se à sequenciação do amplificado nos sentidos 'forward' e 'reverse', utilizando os respectivos 'primers'. Assim, após purificação dos produtos amplificados através de um kit 'Jetquick PCR product purification spin kit' (Genomed, Alemanha), os fragmentos foram tratados no Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos do ICAT-FCUL, sendo sequenciados num sequenciador capilar automático CEQ 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter) usando o kit ' (DTCS - Dye Terminator Cycle Sequencer Start Kit' (Beckman Coulter). Em seguida, foram analisados os cromatogramas no 'software' do equipamento, utilizando as opções de análise automática disponíveis para produtos de PCR e procedendo à truncagem das regiões 5' e 3' em zonas de menor qualidade. As sequências parciais editadas foram exportadas para ficheiros de texto e trabalhados no programa "Bioedit". Posteriormente, procedeu-se à análise de homologia com sequências disponíveis em base de dados públicas por BLAST nucleotídico, no site do 'Nacional Center for Biotechnology Information' (GenBank – NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para identificação a nível de espécie.

2.5 Métodos de identificação de espécies de bactérias

Antes da evolução da era genómica e dos estudos taxonómicos actuais, a identificação das diferentes espécies baseava-se em testes fenotípicos. Embora o fenótipo possa muitas vezes ser usado para identificar correctamente as espécies, os testes fenotípicos são de difícil implementação, morosos e tal como demonstrado por análises moleculares, muitas vezes resultam em identificações incorrectas (Kurtzman, 1998; Foschio *et al.*, 2004). Desta forma optou-se, após a purificação de culturas em meio TSA-YE, por observar e analisar alguns parâmetros fenotípicos e bioquímicos, com o intuito de ter uma percepção da diversidade de bactérias isoladas e diminuir o número de isolados a analisar por métodos moleculares ao não incluir isolados com iguais características fenotípicos e bioquímicas. A técnica de M13-PCR 'fingerprinting', foi aplicada para a formação/definição de 'clusters' de isolados. Em cada um destes 'clusters' foi seleccionado um representante para posterior amplificação do seu rDNA 16S e sequenciação para identificação a nível de espécie.

Lise das células e M13-PCR 'fingerprinting'

Após a confirmação da pureza dos isolados, refrescou-se a colónia em meio de cultura TSA-YE e, após crescimento, preparou-se num eppendorf uma suspensão densa de células num volume de 500 µL de água esterilizada. Os tubos foram colocados a - 20°C durante um dia. Assim, no dia seguinte colocaram-se os eppendorfs a 100°C durante 15 min. Deixou-se arrefecer ligeiramente e procedeu-se a uma centrifugação de 5 min, a 100000 rpm. Recuperou-se o sobrenadante para um novo tubo eppendorf.

Os perfis de M13-PCR 'fingerprinting' apresentados neste estudo foram obtidos de acordo com um protocolo adaptado de Meyer *et al.* (1993). As reacções de PCR foram realizadas contendo DNA genómico, 0,2 mM de cada desoxiribonucleótido, 3 mM de cloreto de magnésio, 25 pmoles de primer csM13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3'; Meyer *et al.*, 1993) e 1 U de Taq DNA polimerase, em água desionizada (1x). Todos os reagentes foram adquiridos à Invitrogen. As amplificações foram efectuadas num termociclador Biometra Tgradient de acordo com o seguinte programa: (i) desnaturação inicial de 3 min a 94°C; (ii) 35 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min de 'annealing' a 35°C e 2 min de extensão a 72°C; e (iii) extensão final de 4 min a 72°C. Os perfis de M13-PCR 'fingerprinting' foram resolvidos por electroforese em gel de 1,5% agarose (TBE 0,5x; 2,7 V/cm; 2h 30 min), em que se utilizou 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen) como marcador de massa molecular.

Extracção de DNA genómico

Visto que em algumas bactérias o DNA obtido por lise celular não foi suficiente para conduzir a um perfil de amplificação por csM13, recorreu-se a um método de extracção de DNA, nomeadamente uma adaptação do método de Pitcher *et al.* (1989) para bactérias Gram + e Gram - descrito por Tenreiro (1995) para isolados de *Oenococcus oeni*. Existe uma grande diversidade de sistemas comercializados actualmente e, na literatura, encontra-se descrita uma multiplicidade de métodos de extracção de DNA direccionados para diferentes tipos de células/amostras. A maioria dos protocolos de extracção de DNA genómico disponíveis consiste de três fases: (i) lise celular, (ii) desproteinização e (iii) purificação. Em qualquer

processo de extracção de DNA, é ainda necessário evitar a sua degradação enzimática por acção de nucleases celulares. Para tal, desde a fase inicial de recolha e lavagem das células, recorre-se à utilização de tampões com pH apropriado a que geralmente são adicionados agentes quelantes e/ou detergentes (Inês, 2007).

O processo de lise celular pode ser mais ou menos agressivo consoante o tipo de parede celular das células alvo. Os métodos mais comuns envolvem hidrólise enzimática, destabilização química (por calor ou adição de detergentes) ou quebra mecânica (por ruptura com micropérolas de vidro, sonicação ou ciclos de congelação/descongelação). A desproteínização é habitualmente realizada por extracção fenólica ou pela adição de agentes desproteínizantes, como os sais de guanidina. A fase de purificação corresponde geralmente à precipitação a frio dos ácidos nucleicos na presença de um álcool e de sais, podendo incluir a remoção de RNA por degradação enzimática (Sambrook *et al.*, 1989).

Os extractos de DNA total foram preparados a partir de culturas em TSA-YE com 12-24 h. As células foram recolhidas e lavadas duas vezes com TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), por centrifugação a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. Os 'pellets' celulares foram ressuspensos em 250 µL de TE contendo 10 mg/ml de lisozima (Sigma) e incubados a 37°C durante 1-2 h. Procedeu-se à adição de 500 µL de reagente GES (5 M tiocianato de guanidina, 100 mM EDTA pH 8,0, 0,5% lauril sarcosinato de sódio), agitou-se por inversão e realizou-se uma incubação em gelo durante 10 min (confirmou-se a lise, verificando que a solução ficou transparente). Após adição de 250 µL de acetato de amónio 10 M frio, e 10 min em gelo, efectuou-se a extracção com 1 mL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e misturaram-se por inversão. Posteriormente, centrifugou-se 10 min a 12000 rpm e recuperou-se o sobrenadante (evitou-se o arrastamento da interface) para um novo tubo eppendorf de 2 mL. Seguidamente, adicionou-se isopropanol frio e misturou-se por inversão com a formação de um novelo, em alguns casos. Enrolaram-se os novelos de ácidos nucleicos com uma ansa. Nos casos em que não se observou novelos, centrifugou-se 10 min a 12000 rpm. Em seguida lavaram-se os novelos ou pellets com 1mL de em etanol a 70%. Após 10 min de secagem, solubilizaram-se em 100 µL de TE. Para avaliar a quantidade e qualidade de DNA observou-se uma alíquota de 5 µL em gel de agarose.

Os extractos de DNA total foram conservados a 4-8°C e foram preparadas diluições em TE com concentrações apropriadas para utilizações posteriores (M13-PCR 'fingerprinting' e amplificação de rDNA 16S). Posteriormente, aplicaram-se as condições de PCR e de electroforese referidas no ponto anterior.

Após coloração com brometo de etídeo (2-2,5 g/mL), em ambos os métodos, o DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com o sistema KODAK 1D (Kodak, Rochester, NY, USA). As imagens foram analisadas no 'software' BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgica). Após normalização das imagens foram considerados todos os perfis e aplicado o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração hierárquico, baseado na média aritmética não ponderada (UPGMA). A avaliação da qualidade do dendrograma como

representação da matriz de semelhança foi efectuada pelo coeficiente de correlação cofenética.

Sequenciação parcial de rDNA 16S

Dependendo do grupo de bactérias em estudo e do grau de semelhança existente entre as espécies a discriminar, a sequenciação parcial do rDNA 16S pode permitir a identificação a nível de espécie ou pode ser necessário recorrer a sequenciação adicional no operão ribossomal (Patel, 2001; Cai *et al.* 2003; Clarridge, 2004; Mignard & Flandrois, 2006).

A amplificação por PCR do rDNA 16S, que será posteriormente sequenciado, foi realizada com base no protocolo desenvolvido por Rodas *et al.* (2003), que consiste na amplificação por PCR do rDNA 16S, directamente a partir de uma colónia isolada, usando os 'primers' universais, como o 104F (5' GGCGVAYGGGTGAGTAA 3'), 1392R (5' ACGGGCGGTGTGTRC 3') e o 907R (5' CCGTCAATTCCTTTGAGTTT 3') (Muyzer *et al.*, 1996). Neste estudo seguiu-se o procedimento experimental descrito por estes autores com a substituição de PCR a partir de colónia por utilização de DNA genómico (já disponível).

As reacções de PCR foram realizadas com DNA genómico (extraído pelo nas condições descritas anteriormente), 0,2 mM de cada desoxiribonucleótido, 3 mM de cloreto de magnésio, 30 pmoles de cada 'primer' e 1 U de Taq DNA polimerase em água desionizada (1x). O programa de amplificação consistiu num passo inicial de desnaturação de 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s a 52°C e 5 min a 72°C e de um ciclo final de extensão de 5 min a 72°C. Todos os reagentes foram adquiridos à Invitrogen e as amplificações foram efectuadas num termociclador Biometra Tgradient.

A amplificação do rDNA 16S foi confirmada por electroforese em gel de 1,2% de agarose (TBE 0,5x; 3 V/cm; 50 min). O marcador de massa molecular utilizado foi 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen) e os perfis de rDNA 16S foram visualizados por coloração com brometo de etídeo (2-2,5 g/mL), com a aquisição de imagem utilizando o sistema KODAK 1D.

Seguidamente, os produtos amplificados foram purificados utilizando um sistema comercial baseado em colunas de sílica (JETQUICK Spin Column Technique; Genomed) e analisados no Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos do ICAT-FCUL onde foram sequenciados, utilizando o método de terminação didesoxi com marcação por fluorescência (DTCS – Dye Terminator Cycle Sequencer Start Kit, Beckman Coulter). Os cromatogramas obtidos a partir do sequenciador automático CEQ 2000-XL (Beckman Coulter) foram analisados no 'software' do equipamento, utilizando as opções de análise automática disponíveis para produtos de PCR e procedendo à truncagem das regiões 5' e 3' em zonas de menor qualidade.

As sequências parciais de rDNA 16S editadas foram exportadas para ficheiros de texto e trabalhadas no Bioedit. Procedeu-se depois à comparação com sequências disponíveis nas bases de dados públicas (GenBank) utilizando o algoritmo BLASTN (Altschul *et al.*, 1990). A identificação a nível de espécie foi realizada de acordo com o critério de homologia máxima. Para cada sequência identificada, foram seleccionadas as três sequências com que apresentava maior percentagem de homologia e, sempre que possível, a sequência da estirpe tipo da espécie identificada.

3. Resultados e discussão

3.1 Avaliação da eficiência dos procedimentos de higienização utilizados na adega

No contexto desta dissertação, tentou avaliar-se a eficiência dos procedimentos de higienização praticados pela Quinta do Monte d'Oiro, através de análises microbiológicas específicas aos diversos equipamentos das distintas áreas da adega. O isolamento de bactérias e leveduras e a sua identificação a nível de espécie com base num percurso polifásico de caracterização fenética e molecular permitiu essa avaliação.

A abordagem reflectiu-se numa estratégia de agrupamento e identificação dos isolados através da aplicação de metodologias com elevado potencial discriminante, de modo a permitir não só a identificação a nível de espécie, como também a caracterização da diversidade presente na adega em estudo.

Para pesquisar a carga microbiana presente na adega, após aplicação dos procedimentos de higienização, foram efectuadas várias amostragens através de diversos métodos, referidos no ponto 2.2, que conduziram ao isolamento de leveduras e bactérias totais. Sendo, ao mesmo tempo, procurada a presença de leveduras do género *Dekkera*, através do meio diferencial DBDM, uma vez que este último género é considerado como um dos mais prejudiciais ao vinho. De facto, não se verificou a presença de nenhuma espécie do género *Dekkera* em nenhuma amostra recolhida na adega, inclusive nas cubas e nos outros locais de armazenamento do vinho, propício ao desenvolvimento deste tipo de leveduras.

Os resultados das contagens de leveduras e bactérias totais (ufc/cm²) das amostras dos equipamentos encontram-se na Tabela 5, tal como a origem da recolha nos equipamentos e os pontos de amostragem.

Numa primeira análise dos resultados, constata-se que o número de microrganismos existentes nos diversos equipamentos não é, de maneira nenhuma elevado. Contudo, subsistem algumas excepções que retratam alguma ineficácia nos procedimentos de higiene, como é o caso das unioes da bomba / mangueiras, as tampas, as torneiras e as borrachas das cubas. Existem algumas explicações plausíveis para os dados, entre as quais se salienta a existência de zonas de fácil acumulação de detritos de vinho, que permitindo o desenvolvimento de microrganismos. Nestes casos, depreende-se que existe um considerável número de microrganismos mesmo depois da higienização. Por outro lado, não se pode pôr de parte a ideia das limitações do método utilizado, anteriormente descrito em procedimentos de higiene e monitorização (ponto 1.3), e que pode ter ocasionado um erro de amostragem.

Tabela 5- Contagem de bactérias e leveduras, provenientes de vários equipamentos existentes na adega Quinta do Monte d'Oiro, em que SC (sem crescimento / ausência de microrganismos) e TNTC (*Too numerous to count*)

Equipamentos	Ponto de amostragem	Data de amostragem	ufc/10 cm ²		Código dos isolados		
			Bactérias (TSA-YE)	Leveduras (GYP)	Bactérias	Leveduras	
Cuba 1 F	Torneira	29-07-2010	TNTC	TNTC	1	21	
	Parede da Cuba		18	<1	2	SC	
Cuba 1	Provadeira	29-07-2010	<1	<1	SC	SC	
			TNTC	<1	3	SC	
			TNTC	<1	4	SC	
	Torneira do nível	07-09-2010	536	380	5	20	
	Base		30	<1	21	SC	
	Provadora		417	<1	34	SC	
Cuba 23	Torneira nível	28-07-2010	226	<1	33	SC	
	Base		<1	<1	SC	SC	
	Base		TNTC	<1	17	SC	
	Torneira		TNTC	<1	16	SC	
Linha de Enchimento	Tampão/Borracha	28-07-2010	<1	<1	SC	SC	
	Parede da cuba		20	40	18	SC	
	Camera de ar		22	<1	22	SC	
	Bomba peristáltica		TNTC	<1	6	SC	
	União da mangueira		TNTC	<1	7	SC	
	União da bomba (saída 1)		16	<1	9	SC	
	07-09-2010	União da bomba (saída 2)	10	<1	10	SC	
		Mangueira	TNTC	<1	12	SC	
		União da mangueira	8	<1	13	SC	
		Bomba peristáltica	11	<1	14	SC	
		União da mangueira	19	<1	15	SC	
		União da mangueira	<1	<1	SC	SC	
Material e acessórios de vindima	Balde	28-07-2010	42	<1	8	SC	
	(Recipiente/Caneca)		<1	<1	SC	SC	
	Densímetro		9	<1	11	SC	
	Refratómetro /Termómetro	07-09-2010	<1	<1	SC	SC	
			União da bomba (saída 1)	TNTC	<1	41	SC
			União da bomba (saída 2)	<1	<1	SC	SC
	Caixa de colheita vermelha 1	9	<1	23	SC		
	Caixa de colheita vermelha 2	20	<1	19			
	Caixa de colheita vermelha 3	10	<1	20	19		
	Tapete (uvas)	TNTC	TNTC	31			
	Tapete (escada)	452	<1	32	36	SC	
	Avental da prensa	319	<1	37	37	SC	
	Prensa	102	58	SC	27	SC	
	Esmagador (vinho)	<1	<1	39	39	SC	
	Balde	07-09-2010	TNTC	<1	27	SC	
			22	<1	28	SC	
			TNTC	<1	29	SC	
			TNTC	<1	44	SC	
<1			<1	SC	SC		
25			<1	30	SC		
43	<1	40	SC				
0	<1	SC	SC				
<1	<1	SC	SC				
Balde	07-09-2010	TNTC	11	43	17		
		<1	SC				
		10	18				

Tabela 6-Contagem de leveduras provenientes das Águas de enxaguamento e placas de contacto.

Águas de enxaguamento					
Ponto de amostragem	Data de amostragem	ufc/10 cm ² (leveduras)		Código dos isolados	
		PCA	DBDM	PCA	DBDM
Cuba 1-F	28-07-2010	<1	<1	SC	SC
Cuba 1		<1	83	SC	22
		<1	TNTC	SC	23
		<1	54	SC	25
		<1	150	SC	26
Bomba		<1	<1	SC	SC
Balde	TNTC	<1	26	SC	
Caixa vermelha	07-09-2010	TNTC	TNTC	46	24
		12		47	
		23		48	
Balde		TNTC	<1	49	SC

Placas de impressão						
Ponto de amostragem	Data de amostragem	ufc/10 cm ² (leveduras)		Código dos isolados		
		GYP	DBDM	GYP	DBDM	
28-07-2010		No 1 ponto de amostragem não se obtiveram resultados, devido à ausência de crescimento de microrganismos.				
Caixa Uvas (vermelha 1)	07-09-2010	11	<1	24 (Bactéria) *	SC	
Caixa Uvas (vermelha 2)		15	<1	2	SC	
Prensa		TNTC	6	20	25 (Bactéria) *	3
			20			4
Balde		<1	<1	SC	SC	
Desengaçador		TNTC	TNTC	6	8	
		TNTC	TNTC	7	9	
Tapete (humedecido com uvas)		9	<1	10	SC	
		16	<1	11		
Caixas (com uvas)		<1	<1	SC	SC	
Esmagador (lamina)		<1	<1	SC	SC	
Tapete (humedecido com uvas)		7	TNTC	50 (Bactéria) *	12	
	4		13			
	TNTC		15			

excepções, onde isolaram-se bactérias em meio GYP.

Em algumas amostragens, verificou-se a impossibilidade de contabilizar o número total de microrganismos, devido a inúmeras contaminações ocorridas por fungos filamentosos que, ao cobrirem completamente as placas de Petri, impediram a contagem de leveduras e bactérias que se encontravam em crescimento. Devido ao facto de os fungos filamentosos serem, geralmente, contaminantes por via aérea, considerou-se que ocorreu uma deposição nas superfícies dos vários equipamentos durante o tempo em que estes não estavam a ser utilizados. Contudo, a higienização do interior dos equipamentos foi eficaz a nível destes fungos. Durante o período de recolha das amostras, foi constatado que a adega se encontrava em perfeitas condições de higiene, tanto a nível de equipamentos como de pavimentos. Na altura, a empresa encontrava-se a terminar todos os processos de implementação do sistema HACCP, estando a parte dos pré-requisitos de higiene dos equipamentos já a funcionar em

plenitude. Nunca foram encontrados resíduos de vinho, ou seja, locais ideais para o desenvolvimento de leveduras de alteração, tornando à partida menor a probabilidade de desenvolvimento destas no produto final.

As análises realizadas às placas de ambiente apresentaram, na sua maioria, a presença de bolores e fungos filamentosos. E, desta forma, foi impossível em ambos pontos de amostragem isolar leveduras ou bactérias.

Após a contagem total de colónias, procedeu-se à observação mais detalhada dos isolados de leveduras e bactérias que, posteriormente, foram agrupados em 8 e em 15 tipos, respectivamente, de acordo com as características morfológicas das colónias. As análises fenéticas destes isolados não tiveram como principal intuito a identificação dos isolados, mas sim o melhor conhecimento da diversidade das amostras e o agrupamento de algumas amostras. Estes isolados foram assim numerados e agrupados (Quadro 1 e 2, Anexos) para posterior tipificação molecular.

3.2 Identificação de leveduras

Um dos objectivos deste trabalho, foi tentar conhecer a flora das leveduras existente na adega, uma vez que existem várias estirpes que são extremamente prejudiciais ao vinho. Primeiramente, todas as colónias de leveduras com morfologia diferente foram observadas ao microscópio, repicadas, purificadas e, por último, fotografadas. Em relação à morfologia das colónias, ao longo do estudo, foi comprovado que em função do meio de cultura utilizado (GYP e DBDM) a mesma espécie de levedura (e.g. *Hanseniaspora guilliermondii*) apresenta uma morfologia diferente, mostrando ainda que o meio DBDM, não é totalmente selectivo para o género *Dekkera* uma vez que o meio permite o crescimento de leveduras de outras espécies.

A identificação das leveduras foi efectuada através do método PCR-RFLP, com a aplicação das enzimas de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*.

Nas Figuras 2, a título exemplificativo, são apresentados os perfis de amplificação, obtidos com os 'primer' ITS-1 e ITS-2, de isolados de leveduras (Ascomycota), obtidos nas duas visitas realizadas à adega.

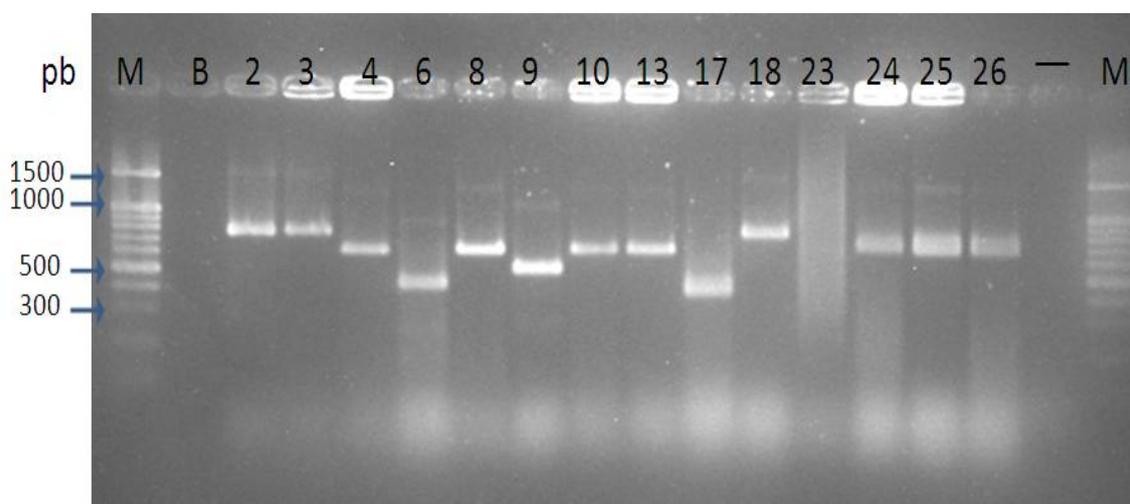


Figura 2 - Electroforese em Gel de agarose de alguns produtos de amplificação obtidos com o 'primer' ITS1 e ITS2. M corresponde ao marcador de massas moleculares 1kb plus DNA ladder (Bioron, GmbH).

Seguidamente à amplificação por PCR, procedeu-se à identificação das leveduras através do método PCR-RFLP, com a aplicação das enzimas de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*. Na Figura (3) encontram-se os perfis de restrição obtidos para algumas das leveduras isoladas na adega. Pode observar-se que os isolados 3 e 23 possuem um perfil de bandas diferente, indicando serem espécies de leveduras diferentes. No entanto, o isolado 23 tem o mesmo perfil de bandas que os isolados 24, 25 e 26, representando isolados da mesma espécie.

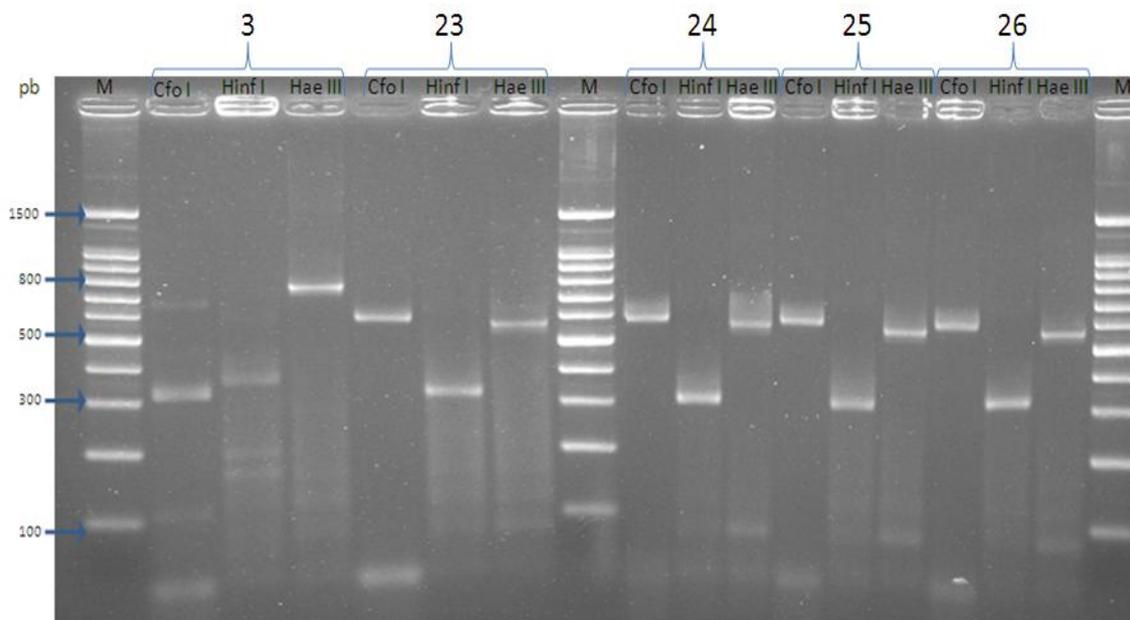


Figura 3- Electroforese em gel de agarose com os perfis de bandas obtidos pela restrição dos fragmentos amplificados por PCR de algumas leveduras isoladas, nomeadamente 3, 23, 24, 25 e 26 pelas enzimas de restrição *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI*. M corresponde ao marcador de massas moleculares 1kb plus DNA ladder (Bioron, GmbH).

Na Tabela 6, constam as dimensões dos amplificados pela reacção de PCR, tal como as dimensões dos fragmentos resultantes da acção das enzimas de restrição, pertencentes às leveduras Ascomycota. As espécies foram identificadas por análise pormenorizada da dimensão dos fragmentos, sendo posteriormente comparadas com a base de dados da CECT. Apresenta-se igualmente a identificação a nível de espécie obtida por sequenciação da região D1/D2 do rDNA 26S.

Tabela 6- Perfis de restrição das várias leveduras obtidos com as enzimas *CfoI*, *HaeIII* e *HinfI* e as identificações das respectivas espécies. Identificação da espécie por sequenciação da região D1/D2 do rDNA 26S. *Amplificado PCR (pb).

Código do Isolado	Teste da Urease		PCR					Espécies de Leveduras através de sequenciação D1/D2 (espécie)
	Ascomycota	Basidiomycota	AP*	Fragmentos de restrição (pb)				
				Cfo I	Hinf I	Hae III	Espécie	
2	X		775	315-315-100	340-180-160-70	775	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Hanseniaspora opuntiae</i> Seq. Acesso (NCBI) AB617980.1	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
3	X		780	320-120-50	380-200-170	780	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Hanseniaspora opuntiae</i> Seq. Acesso (NCBI) EF585437.1	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
4	X		650	320-320	320-150-120	600	<i>Zygoascus hellenicus</i>	-----
6	X		450	130-100-80	230-100-100	290-120	<i>Issatchenkia terricola</i>	-----
7		X	Seq. Acesso (NCBI) HQ149318.1					<i>Issatchenkia terricola</i>
8	X		680	340-340	360-170-130	650	<i>Zygoascus hellenicus</i>	-----
9	X		520	210-190-80	230-160-150	390-90	<i>Issatchenkia orientalis</i>	-----
10	X		650	320-320	360-170-120	630	<i>Zygoascus hellenicus</i>	-----
11		X	Seq. Acesso (NCBI) FN428887.1					<i>Pichia cribrica</i>
12		X	Seq. Acesso (NCBI) HQ262393.1					<i>Pichia kudriavzevii</i>
13	X		650	330-330	360-170-120	630	<i>Zygoascus hellenicus</i>	-----
15		X	Seq. Acesso (NCBI) HM450997.1					<i>Zygoascus meyeriae</i>
17	X		410	210-100	210-200	290-100	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-----
18	X		775	330-330-115	360-200-170-80	775	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Hanseniaspora opuntiae</i> seq. Acesso (NCBI) HQ149311.1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
19		X	Seq. Acesso (NCBI) EU642620.1					<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
20		X	Seq. Acesso (NCBI) DQ104717.1					<i>Pichia membranifaciens</i>
21		X	Seq. Acesso (NCBI) FR772353.1					<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
22		X	Seq. Acesso (NCBI) DQ862841.1					<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
23	X		700	600	320-320	590-80	<i>Candida ishiwadae</i> ou <i>Candida ponicola</i>	<i>Candida ishiwadae</i>
24	X		700	600	320-320	590-80		
25	X		Seq. Acesso (NCBI) HM988722.1					
26	X		700	600	320-320	590-80		
27		X	Seq. Acesso (NCBI) HQ199214.1					<i>Wickerhamomyces anomalus</i>

Nesta pesquisa, a flora das leveduras da adega foi relativamente pouco diversa, uma vez que só se conseguiram isolar e identificar 14 espécies diferentes. Embora não existam valores-guia para este tipo de indústria, a análise destes resultados permitiu classificar os procedimentos de higiene como aceitáveis, apesar de se encontrarem algumas leveduras nos materiais e equipamentos em análise, visto não terem sido isoladas espécies perigosas para a estabilidade dos vinhos (Lourerio e Malfeito-Ferreira, 2003). As leveduras encontradas na sua pluralidade podem ser consideradas adventícias ou inocentes mas não pertencendo, na sua maioria, à Tabela I (Anexo). No entanto, certos autores afirmam que, aparentemente, alguns microrganismos isolados não detêm a capacidade de prosperarem em vinhos (Dias *et al.*, 2003).

As leveduras encontradas em maiores quantidades, e em mais locais de amostragem, foram *Candida ishiwadae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Zigoascus hellenicus* e *Rhodotorula mucilaginosa*, havendo muitas situações em que o número de colónias excedeu as 300 ufc por placa, tornado impossível a sua contagem.

Atendendo à Tabela I (Anexo), as únicas leveduras que podem ser consideradas como preocupantes são *Pichia membranifaciens*, *Hanseniaspora uvarum* e *Candida ishiwadae*, uma vez que produzem fenóis voláteis, ésteres (aroma) e véu.

De salientar que o teste da urease, apesar de rápido e de fácil execução, não se evidenciou muito fiável visto que se obtiveram falsos positivos (em relação a alguns Basidiomycota). Através da sequenciação, foi então possível verificar que os isolados 7, 11, 12 e 20 eram efectivamente Ascomycota.

3.3 Identificação de Bactérias

A amplificação por PCR com o 'primer' csM13 conduziu a perfis polimórficos de bandas, que permitiram a comparação dos diversos isolados de bactérias analisadas. Como se pode observar, na figura 4, cada perfil consiste num padrão de bandas complexo, identificativo de cada microrganismo, e que pode ser utilizado para a diferenciação de estirpes.

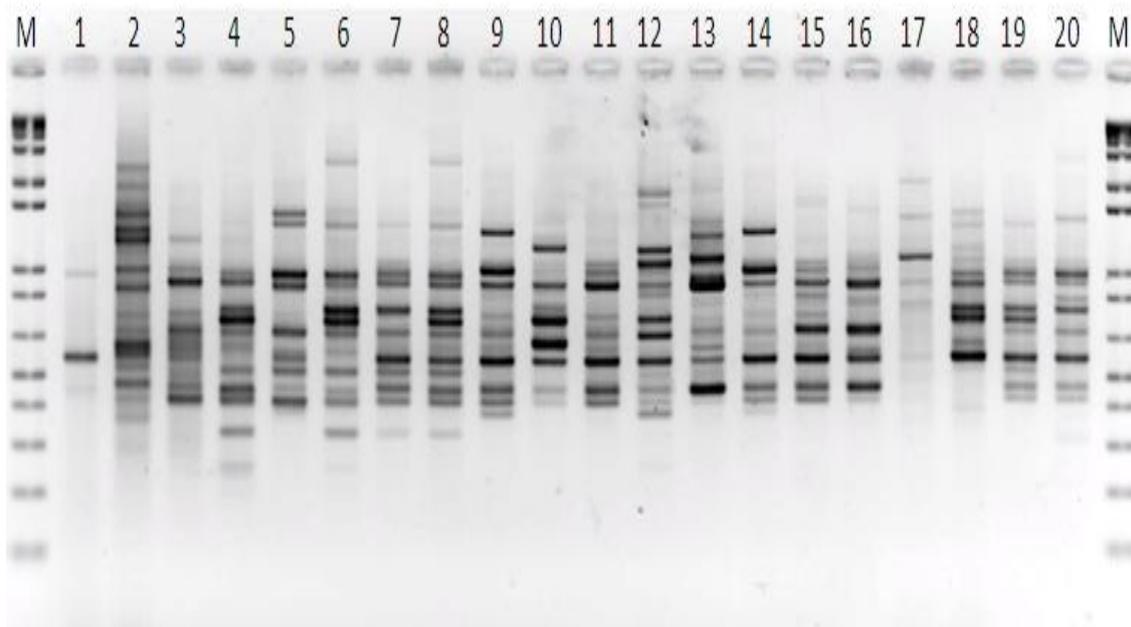


Figura 4- Gel de agarose com perfis de M13-PCR 'fingerprinting' obtidos em 20 isolados (1 a 20). M corresponde ao marcador de massas moleculares, 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Procedeu-se à análise densitométrica dos perfis com recurso ao 'software' BioNumerics 6.5 construindo-se um dendrograma global (Figura 5), representativo das relações de proximidade genómica entre isolados. A reprodutibilidade do método foi estimada como sendo o valor médio de semelhança a que se agruparam os perfis de cada par de réplicas (77%), num dendrograma construído apenas com base na análise dos perfis de 10% dos isolados.

A análise do dendrograma obtido e a organização em grandes grupos tiveram como objectivo a redução do número de estirpes a caracterizar por sequenciação do rDNA 16S, uma metodologia mais dispendiosa que acarretaria uma inviabilidade económica do estudo, se aplicada a todos os isolados.

Após a definição dos 'clusters' seleccionou-se como representantes uma ou mais estirpes de cada 'cluster' de forma a incluir estirpes com características fenotípicas distintas.

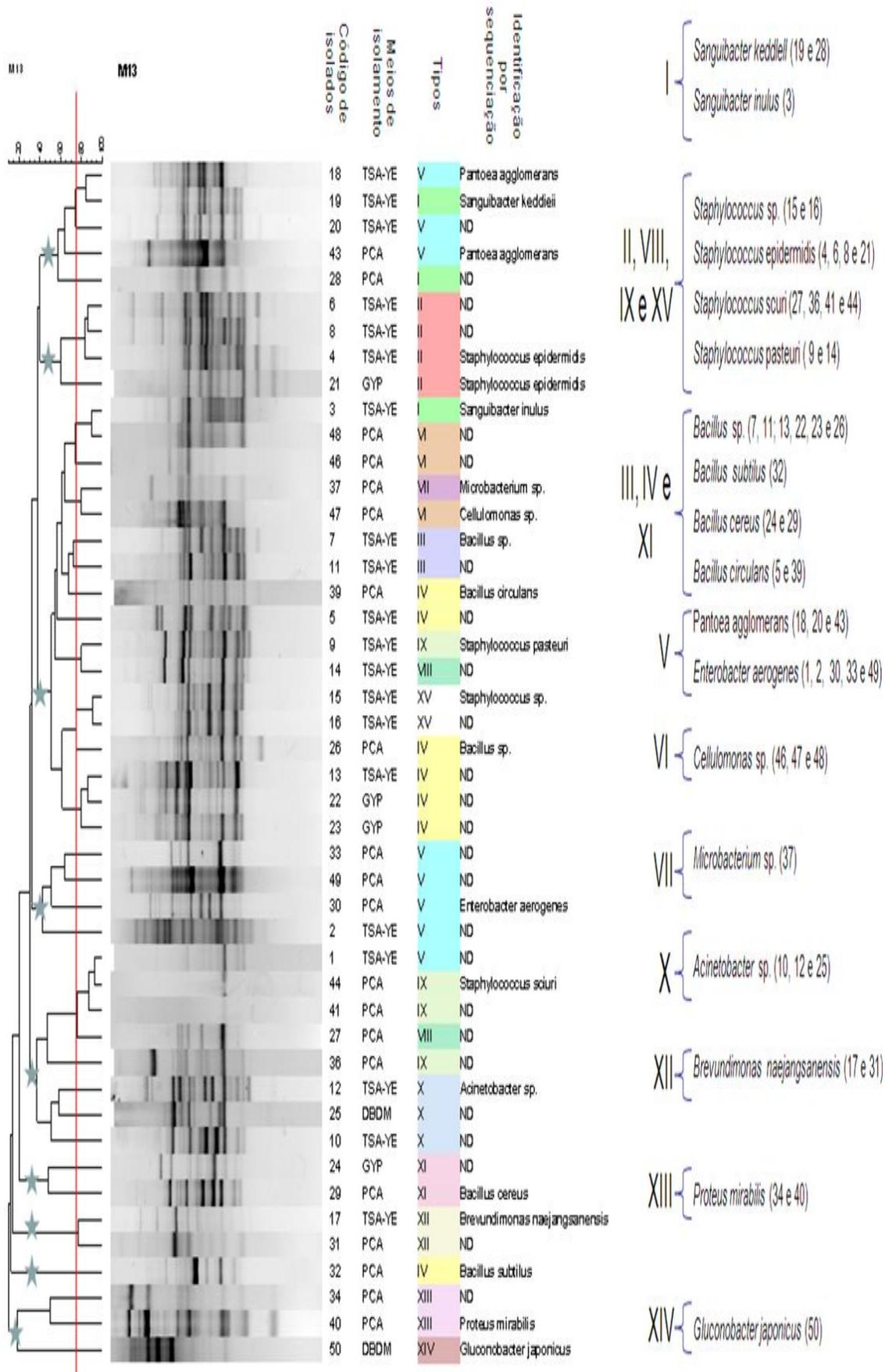


Figura 5- Dendrograma dos 46 isolados de bactérias, baseado nos perfis obtidos com o 'primer' csm13 utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA. Estão indicados os diferentes 'clusters' determinados no dendrograma com base nos quais foram seleccionados os isolados inicialmente sequenciados (☆). Inclui também, os diversos tipos morfológicos (I a XIV), os meios de isolamento e a identificação dos isolados (código de isolado). A linha a vermelho representa o valor médio de reprodutibilidade (77%). $p = 0,85$.

3.4 Comparação dos microrganismos identificados nos dois períodos de amostragem.

Na tabela 7, encontram-se todos os microrganismos isolados e identificados associados à sua proveniência. Devido à ausência do material e/ou ocupação deste (aquando da recolha das amostras), foi impossível comparar todos os pontos de amostragem, nos dois períodos (antes e durante a vindima). Contudo, verificou-se alteração na flora microbiana (excepto na bomba peristáltica). Averiguou-se também que, no período de vindimas, existe uma predominância de leveduras. Constatou-se ainda que mesmo após a desinfecção e lavagem das cubas, estas continuam a possuir contaminantes, especialmente bactérias, apesar de serem pouco “alarmantes” para a indústria vínica.

Tabela 7- Microrganismos isolados em ambiente de adega, em que as bactérias se encontram a azul e as leveduras a verde. ND (não determinado, devido a ausência/ocupação dos equipamentos em questão).

Antes da vindima	Origem		Durante a vindima
<i>Sanguibacter inulinus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Candida ishiwadae</i>	Cuba 1	Provadora	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Bacillus circulans</i> <i>Pichia membranifaciens</i>		Torneira nível	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		Base	----
<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bacillus sp.</i>	Linha de Enchimento	Bomba Peristáltica	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Staphylococcus pasteurii</i> <i>Acinetobacter sp.</i>		União da Mangueira	---
<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>		União da Bomba (saída 1)	<i>Bacillus sp.</i>
<i>Staphylococcus pasteurii</i> <i>Staphylococcus sp.</i>		União da Bomba (saída 2)	----
----		Mangueira	<i>Staphylococcus scuri</i>
<i>Bacillus sp.</i>		Balde	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Metschnikowia pulscherrim</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Sanguibacter keddele</i> <i>Pantoea agglomerans</i>	(Recipiente/CANECO)	ND	
ND	Material e acessórios de vindima	Densímetro	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
		Refratómetro /termómetro	<i>Staphylococcus scuri</i> <i>Microbacterium sp.</i> <i>Bacillus circulans</i>
		Desengaçador	<i>Issatchenkia terricola</i> <i>Zygoascus hellenicus</i> <i>Issatchenkia orientalis</i>
		Prensa	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> <i>Zygoascus hellenicus</i>
		Avental da prensa	<i>Proteus mirabilis</i>
		Caixa de colheita vermelha 1	<i>Staphylococcus scuri</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Sanguibacter keddele</i>
		Caixa de colheita vermelha 2	<i>Bacillus cereus</i> <i>Cellulomonas sp.</i> <i>Candida ishiwadae</i> <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
		Caixa de colheita vermelha 3	<i>Staphylococcus scuri</i>
		Tapete rolante (humedecido com uvas)	<i>Gluconobacter japonicus</i> <i>Zygoascus hellenicus</i> <i>Pichia crribbica</i> <i>Pichia kudriavzenvii</i> <i>Zygoascus meyeri</i> <i>Zygoascus hellenicus</i>
		<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Cuba 1 F
<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	Cuba 23	Base	ND
<i>Staphylococcus sp.</i>		Torneira	
<i>Pantoea agglomerans</i>		Parede da cuba	
<i>Bacillus sp.</i>		Câmara de ar	

4. Conclusões gerais e perspectivas futuras

De acordo com os objectivos e plano geral da tese, os estudos desenvolvidos foram dirigidos no sentido de avaliar, através de utilização de técnicas microbiológicas, a eficiência de um sistema de HACCP numa adega. Desta forma o trabalho foi dividido em três grandes fases.

Os estudos realizados na primeira fase basearam-se na recolha, purificação e aplicação de critérios morfológicos e bioquímicos, que permitiram agrupar e obter um conhecimento prévio de cada isolado a nível morfológico, através das suas características fenotípicas.

A segunda fase do trabalho, incidiu-se sobre a avaliação da flora e a identificação das leveduras existentes na adega. Devido à sua versatilidade nutricional, estas podem ser encontradas em 'habitats' ecológicos muito variados. A versatilidade fisiológica das leveduras, bem como a sua capacidade em tolerar condições adversas ao crescimento, tornam algumas espécies "especialistas" em termos de 'habitats' ecológicos que seriam, no presente caso, a vinha, o vinho e a adega. Assim, após análise dos resultados, constatou-se a não detecção do género *Dekkera* nos vários pontos de amostragem. No entanto, foram identificadas 14 espécies diferentes de leveduras, nomeadamente *Hanseniaspora guilliermondii*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygoascus hellenicus*, *Zygoascus meyeriae*, *Issatchenkia terricola*, *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia crribbica*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida ishiwadae* e *Wickerhamomyces anomalus*, através do método do RFLP-PCR e da sequenciação do rDNA 16S. Raramente estes microrganismos têm capacidade de alterar o vinho visto que são, na sua maioria, de origem ambiental ou oriundos da película da uva. Porém, deste aglomerado evidenciam-se as espécies *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida ishiwadae*, por terem uma certa capacidade de causar maus paladares e por algumas delas se encontrarem em concentrações elevadas nos respectivos locais de amostragem.

De salientar que o teste da urease não permite uma separação correcta das leveduras pertencentes aos Filos Ascomycota e Basidiomycota e que a restrição dos fragmentos com enzimas permite uma identificação ao nível de espécie. Em alguns casos, esta última abordagem só permite identificação a nível do género.

Por fim, e não menos importante, procedeu-se à identificação de bactérias, aplicando o método do csM13-PCR 'Fingerprinting', devido à sua grande capacidade de diferenciar de forma rápida e fácil os isolados, por gerar perfis suficientemente distintos. De uma forma geral, os perfis são constituídos por um elevado número de fragmentos facilmente detectáveis. Contudo, em alguns isolados o perfil não apresenta um grande número de bandas, o que leva posteriormente a um errado agrupamento destes isolados, por parte da análise. Estas ausências/presenças de bandas, podem dever-se apenas a variações na concentração de DNA molde usado na reacção (Fernández-Espinar *et al.* 2001). O recurso ao 'software' BioNumerics, permitiu um maior nível de diferenciação do que a simples observação directa dos perfis em gel. No entanto, a sua elevada sensibilidade pode ser uma desvantagem. Variações na coloração do gel, na qualidade da fotografia ou na normalização dos géis,

aquando da sua introdução no software, podem levar a variações cumulativas no resultado final que, por vezes, resultam numa maior diferenciação. Tendo em conta que o coeficiente de Pearson é um coeficiente com capacidade de avaliação de caracteres qualitativos, a ausência/presença de bandas ténues adquire uma importância acrescida, e é determinante não só na qualidade de perfis discriminativos, mas também nos valores dos índices de semelhança entre estes, durante a construção de dendrogramas.

Numa análise global, considerando as estirpes de cada 'cluster' (ao nível de 77%) formado pelos perfis de csM13-PCR 'fingerprinting' e a identificação ao nível de espécie obtida pela molécula de rDNA 16S não apresentaram uma concordância total. Esta observação foi fundamentada pela análise morfológica dos isolados. Após a sequenciação de mais alguns isolados de cada 'cluster', a análise conjunta dos resultados obtidos pela abordagem polifásica permitida pelos perfis de csM13, sequenciação de rDNA 16S e tipificação morfológica permitiu a identificação de isolados e conduziu à identificação de 18 espécies diferentes.

Visto que a este nível, as bactérias potencialmente perigosas ao vinho são as acéticas e as lácticas, nesta dissertação, a única que causa mais apreensão é do género *Gluconobacter* (isolado 50), que se encontra no grupo das bactérias lácticas. Porém, todas as outras bactérias isoladas, apesar de se encontrarem na adega, não se propagam no vinho aquando a sua fermentação.

Em situações pontuais, os procedimentos de higienização não mostraram ser totalmente eficazes na eliminação de todos os microrganismos, uma vez que existem microrganismos em alguns pontos dos vários equipamentos analisados. Todavia, as condições de higiene encontradas na adega ajudam a concluir que é uma empresa alimentar, que está muito bem colocada a este nível, e que o risco de contaminação dos vinhos é reduzido, aquando da aplicação das metodologias do HACCP.

Uma dificuldade que surgiu na análise dos resultados foi que nem sempre as amostragens eram do mesmo ponto de origem. Isto deveu-se a diversos factores, tais como: ausência do material no início da recolha, ocupação deste na segunda amostragem, desconhecimento da existência de algum deste material de vindima. Contudo, conclui-se que a flora microbiana se alterou nos dois momentos de análise, antes e durante a vindima.

Como era expectável, o "fluxo" de microrganismos encontrados nas amostragens foi diminuindo consoante o avançar ou evolução do processo de vinificação, assim como se observou um maior número de leveduras na segunda amostragem (já no período de vindimas), em relação à primeira amostragem.

A higienização dos equipamentos é uma prática que permite reduzir o número de células viáveis a um nível aceitável e permite ainda eliminar os ambientes propícios ao crescimento dos microrganismos. Com os resultados auferidos, conclui-se que ainda se podem melhorar alguns aspectos do plano de HACCP desta adega: (i) implementar novas técnicas e equipamentos de lavagem e desinfecção; (ii) evitar adquirir equipamentos que apresentam uma estrutura complexa nas canalizações de passagem do vinho, o que dificulta muitas vezes a eficiência da higienização; (iii) evitar correntes de ar e controlar entradas e saídas de ar, para

evitar contaminações aéreas/ambientais; (iv) aplicar de forma mais eficaz e eficiente os diversos factores que condicionam a higienização (temperatura, tempo, concentração e acção mecânica); (v) aplicar testes microbiológicos mais rápidos e eficientes, com a finalidade de identificar microrganismos existentes após higienização e, simultaneamente, diagnosticar quais as vias e fontes de contaminação.

Um grande vinho é conseguido através de um infindável conjunto de pormenores e a higiene é sem sombra de dúvidas um factor incontornável ligado à qualidade organoléptica do vinho e à imagem de marca do produtor. No entanto, uma abordagem preventiva e racionalizada de todos procedimentos é sempre o mais aconselhável.

Recomeça... se puderes, sem angústia e sem pressa e os passos que deres, nesse caminho duro do futuro, dá-os em liberdade, enquanto não alcanças não descanses, de nenhum fruto queiras só metade.

(Miguel Torga)

5. Bibliografia

- Adams, M.R. & Moss, M.O.** (1995) - Food Microbiology. *The Royal Society of Chemistry*.
- Alexandre, H.; Costello, P. J.; Remize, F.; Guzzo, J. & Guilloux-Benatier, M.** (2004) - *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int J Food Microbiol* **93** (2), 141-154.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D. J.** (1990) - Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25** (17), 3389-3402.
- Andrews, S.** (1992) - Specifications for yeasts in Australian beer, wine and fruit juice products. *Modern methods in food mycology*.
- Arnik, K.; & Henick-Kling, T.** (2005) - Influence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains on successful malolactic conversion in wine. *Am.J.Enol. Vitic.* **56** (3): 228-237.
- Barata, A.** (2010) - Identificação de isolados de leveduras pelo método de PCR-RFLP da região 5.8S-ITS do gene do rRNA. *Métodos Moleculares de Diagnóstico*. Instituto Superior de Agronomia (ISA), Lisboa.
- Batchelor, V. J.** (1984) - Further microbiology of soft drinks. In: Houghton, H. W. (ed.), *Developments in Soft Drinks Technology*, Schwepps International Ltd., London, UK. Vol. 3, 167-210.
- Baumgart, J.** (1993) - Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag.
- Beuchat, L.R.** (1993 a) - Selective media for detecting and enumerating foodborne yeasts. *Food Microbiology* **19**: 1-14.
- Cai, H.; Archambault, M.; Prescott, J. F.** (2003) - Ribosomal 16S RNA sequence-based identification of veterinary clinical bacteria. *J Vet Diagn Invest* **15** (5), 465-469.
- Capucho, I., & San Romão, M. V.** (1994) - Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**:391-395.
- Carreté, R.; Reguant, C.; Rozès, N.; Constantí, M. & Bordons, A.** (2006) - Analysis of *Oenococcus oeni* strains in simulated microvinifications with some stress compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**: 3.
- Carreté, R.; Vidal, M. T.; Bordons, A. & Constantí, M.** (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol Lett* **211** (2): 155-159.
- Casal, M.; Schuller D.; & Pais, C.** (2004) - Métodos moleculares de identificação de leveduras do vinho. Universidade do Minho, em <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/2237>. Braga.
- CATALUÑA, E.** (1984) - Uvas e vinhos. Rio de Janeiro: Ed. Globo.
- Chambel L.M.M.,** (2001) - Análise taxonómica polifásica em *Leuconostoc* e *Weissella*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Chambel, L.; Sol, M.; Fernandes, I.; Barbosa, M.; Zilhão, I.; Barata, B.; Jordan, S.; Perni, S.; Shama, G.; Adrião, A.; Faleiro, L.; Requena, T.; Peláez, C.; Andrew, P. & Tenreiro, R.** (2007) - Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *Int J Food Microbiol* **116**: 52-63.
- Chatonnet, P.; Boidron, J.; Dubourdieu, D.** (1993) - Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur le teneur en acide acétique et en ethyl-phenols. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **27**, 277-298.
- Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, N.; & Pons, M.** (1992) - The origin of thylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* **60**, 165-178.
- Clarridge, J. E.** (2004) - Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17** (4): 840-62.
- Costello, P. J.; Morrison, G. J.; Lee, T. H. & Fleet, G. H.** (1983) - Numbers and species of lactic acid bacteria in wine during vinification. *Food Technol. Austr.* **35**: 14-18.
- Deák, T.** (1991) - Food-borne Yeast. *Advance in applied Microbiology.* **36**: 178-278.
- Schuller, D. E.** (1998) - Desenvolvimento de um meio de cultura selectivo/diferencial para a levedurade contaminação alimentar *zygosaccharomyces bailii*. Universidade do Minho, Portugal.
- Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A.** (1999) - Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* Volume: **49**, 329-337.
- Estevinho, M. L.; Calhelha, C.R.; Andrade, V. J.; Ferreira, C. I.** (2006) - Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. *Food Microbiology* 393-398

- Fernández-Espinar, M. T.; López, V.; Ramón, D.; Bartra, E.; & Querol, A.** (2001) - Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* **70**: 1-10.
- Fleet, G. H.; Lafon-Lafourcade, S.; & Ribéreau-Gayon, P.** (1984) - Evolution of yeasts and Lactic Acid Bacteria during fermentation and storage of Bordeaux Wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **48** (5): 1034-1038.
- Fleet, G.** (1992) - Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology.* **12**: 1-14.
- Fleet, G.H.**, (1993) - The microorganisms of winemaking – Isolation, enumeration and identification. In: FLEET, G.H. (ed.) Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers, Singapore. Pp. 1-25.
- Fleet, GH** (2001) - Fundamentals and Frontiers Wine. In *Food Microbiology* pp. 747-771. ASM Press, Washington, D.C.
- Fleet, G.H.** (2003) - Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*, **86** (1-2): 11-22.
- Forni, R.** (2008) - Projeto mecânico de um sistema de higienização cip (cleaning in place). Disponível em: http://www.poli.usp.br/d/pme2599/2007/Artigos/Art_TCC_005_2007.pdf, 10/10/2008
- Foschino, R.; Gallina, S.; Andrighetto, C.; Rossetti, L.; & Galli, A.**, (2004) - Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeast from sourdoughs for italian sweet baked products. *FEMS Yeast Research* **4**: 609-18.
- Fugelsang, K.** (1997) - Wine microbiology. The Chapman & Hall Enology Library, New York.
- Gadanhó, M.** (2005) - Polyphasic taxonomy and molecular characterization of yeast diversity from aquatic environments. PhD thesis, Universidade Nova de Lisboa.
- Ganga, M.A.; & Martinez, C.**, (2004) - Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 76–83.
- Gomes, S.** (2000) - Doenças e contaminações microbianas dos vinhos. Disponível em: GUIA para elaboração do Plano APPCC: pescado e derivados. 2. ed. Brasília, SENAI/DN, 2000. 120 p. (Série Qualidade e Segurança Alimentar). Projeto APPCC Indústria. Convênio CNI/SENAI/SEBRAE.
- Hocking, A.D. & Pitt, J.I.** (1992 a) - Introduction and summary of the first international workshop on standardization of methods for the mycological examination of foods. *Modern methods in food mycology*, pp. 3-7. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. e King, D.A. (Eds.) Elsevier. http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/geral/files/doencas_vinhos.pdf, 5/8/2008.
- Inês, A. F.** (2007) - Abordagem polifásica na caracterização e seleção de bactérias do ácido láctico de vinhos da Região Demarcada do Douro. Tese de Doutoramento, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real.
- Inês, A.; Tenreiro, T.; Tenreiro, R.; Mendes-Faia, A.** (2009) - Revisão: As Bactérias do Ácido Láctico do Vinho – Parte. *Ciência Téc. Vitiv.* **24** (1) 1-23.
- Jarvis, B. & Williams, A.P.** (1987) - Methods for detecting fungi in foods and beverages. In: *Food and beverage mycology*, pp. 599-636. Beuchat, L.R. (ed.); Van Nostrand Reinhold.
- JOSHI, V. K.; PANDEY, A.** (1999) - Biotechnology: food fermentation. New Delhi: Educational Publishers & Distributors. vol.2. p.647-744.
- Kandler, O.** (1983) - Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **49** (3): 209-224.
- König, H.; Uden, G.; Fröhlich, J.** (2009) - Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. *Springer* Heidelberg, Germany.
- Kurtzman, CP** (1998) - Yeast Systematics – from Phenotype to Genotype. *Food Technol. Biotechnol* **36**: 261-266.
- Kurtzman, CP, & Robnett, CJ** (1998) - Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 331-371.
- Lafon-Lafourcade, S.; Carre, E. & Ribéreau-Gayon, P.** (1983) - Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl Environ Microbiol* **46** (4): 874-880.
- Lonvaud-Funel, A.** (1995) - Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects *FEMS Microbiol.Lett.* **26**: 209-214.
- Lonvaud-Funel, A.** (1999) - Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76** (1-4): 317-331.
- Loureiro, V.** (1994) - Wine spoilage yeasts: A problem to be solved. Actas da Assemblée Générale de L'Office International de la Vigne et du Vin, Paris.

- Loureiro, V.** (1996) - Subtilezas aromáticas dos vinhos de qualidade. *Revista dos Vinhos*: 42-46.
- Loureiro, V.; & Malfeito-Ferreira, M.** 1993 - Yeasts in Food Spoilage. *Encyclopaedia of Food Science Technology and Nutrition*, London.
- Loureiro, V.; & Malfeito-Ferreira, M.** (2003) - Spoilage yeasts in wine industry. *International Journal of Food Microbiology*. Volume **86**: 23-50.
- Malfeito-Ferreira, M.; & Loureiro, V.** (1995) - Os problemas microbiológicos do engarrafamento de vinhos: uma questão ainda em aberto. Actas do 3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, Évora.
- Martini, A., Ciani, M. e Scorzetti, G.** (1996) - Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *J. Enol. Vitic.*, **47** (4): 435-440.
- McGuire, D. R. S.** (2010) - Selecção e caracterização de leveduras “starter” a partir de populações de mosto. Tese mestrado de Microbiologia Aplicada, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Meyer, W.; Mitchell, T. G.; Freedman, E. Z. & Vilgalys, R.** (1993) - Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin. Microbiol.* **31** (9): 2274-2280.
- Mignard, S. & Flandrois, J. P.** (2006) - 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J. Microbiol. Methods*. **67** (3): 574-581.
- Miller, W., Phaff, J. & Mrak M.** (1978) - Nutrition and Growth. In: *The life of yeasts*. Harvard University Press, Cambridge.
- Mislivec, P.B., Beuchat, L.R. e Cousin, M.A.** (1992) - Yeasts and molds. In: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* pp. 239-249. Vanderzant, C. e Splittstoesser D.F. (Eds.). American Public Health Association.
- Moreno-Arribas, M. V. & Polo, M. C.** (2005) - Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45** (4): 265-286.
- Muyzer, G.; Hottentrager, S.; Teske, A. & Wawer, C.** (1996) - Molecular Microbial Ecology Methods, *Kluwer Academic Publishers*, chapter Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities., pp. 3.4.4: 1-23.
- NCBI** (National Center for Biotechnology Information) - GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Ness, F.; Lavallé, F.; Dobourdiou, D.; Aigle, M.; Dulau, L.** (1993) - Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* **62**: 89-98.
- Panezai, A.K.**(1984) - Microbiology. In: Houghton, H.W. (ed), *Developments in Soft drinks Technology*, *Schwepps International Ltd, London, UK. Vol. 1, 209-228.*
- Patel, J. B.** (2001) - 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol. Diagn.* **6** (4): 313-321.
- Pardo, I. & Zuñiga, M.** (1992) - Lactic acid bacteria in Spanish red, rosé and white musts and wines under cellar conditions. *J. Food. Sci.* **57**: 392-405.
- Pichhardt, K.** (1993) - Lebensmittelmikrobiologie, 3rd Ed. *Springer Verlag*; Berlin, Heidelberg, New York.
- Pina, M. A. C.** (2000) - Diferenciação de estirpes de leveduras de contaminação numa linha de produção de um refrigerante por análise de perfis de amplificação com sequências iniciadoras aleatórias (“RAPD”). Relatório do trabalho de fim de curso de Eng. Agro-Industrial, Universidade Técnica de Lisboa (ISA). Lisboa.
- Plata, C.; Milla'n, C.; Mauricio, J.C.; Ortega, J.M.** (2003) - Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol.* **20**, 217– 224.
- Pretorius, I.; van der Westhuizen, T.; Augustyn, O.** (1999) - Yeast biodiversity in vineyard and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *South African J. Enology Viticulture* **20**, 61–74.
- Pretorius, IS** (2000) - Tailoring wine yeast for the new millennium : novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **2000** **16**: 675-729.
- Renouf, V.; Claisse, O. & Lonvaud-Funel, A.** (2007) - Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75** (1): 149-164.
- Ribereau-Gayon, P.** (1985) - New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* **36**: 1 -10.
- Ribereau-Gayon, P.; Dubourdiou, D.; Donèche, B. & Lonvaud, A.** (2006) - Handbook of Enology. *The Microbiology of Wine and Vinifications*, Vol. 1, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.

- Rodas, A. M.; Ferrer, S. & Pardo, I.** (2003) - 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* **26** (3): 412-422.
- Rodrigues, N.; Gonçalves, G.; Malfeito-Ferreira, M.; & Loureiro, V.** (2001) -Development and use of a differential medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *International Journal of Food Microbiology*. Volume **90**: 588–599.
- Romano, P.; Suzzi, G.; Comi, G.; Zironi, R.** (1992) - Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 126– 130.
- Rosa, H.**; (2008) - Higiene em enologia. Ecolab Hispano-Portuguesa – F&B Division. Disponível em:http://www.drapc.minagricultura.pt/base/geral/files/higiene_enologia.pdf, 19/10/2008
- Sambrook, J.; Fritsch, J. & Maniatis, T.** (1989) - *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY.
- Serranito, M.** (2004) - Efeito de condições climáticas adversas sobre a qualidade dos vinhos. Avaliação do efeito de deficientes características nas uvas sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais dos vinhos. Trabalho de fim de curso de Engenharia Agrícola. Universidade de Évora.
- Soll, DR.**, (2000) - The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infectious Fungi. *Clinical Microbiology Reviews* **13**:332-370.
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M.**, (1994) - A place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846– 849.
- Stamer, J. R.** (1979) - *Food Technology*, chapter The lactic acid bacteria: microbes of diversity, pp. 60-65.
- Swaminathan, B.; Barrett, T. J.** (1995) - Amplification methods for epidemiologic investigations of infectious diseases. *Journal of Microbiological Methods*. **23**: 129-139.
- Tenreiro R.**, (1995) - Análise taxonómica em *Leuconostoc oenos* - uma perspectiva polifásica. 284 p. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Thomas, D.S.** (1993) - Yeasts as spoilage organisms in beverages. In: *The Yeasts*. Vol 5 – *Yeast Technology*. pp. 517-553. Rose, A.H. e Harrison J.S. (Eds.). Academic Press; London, San Diego, New York.
- Valente, P.; Gouveia, F.C.; de Lemos, G.A.; Pimentel, D.; van Elsas, J.D.; Mendonça-Hagler, L.C.; Hagler, A.N.** (1996) - PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiol Lett*, **137**: 253-256.
- Valério, E.; Pereira, P.; Saker, M.; Franca, S. & Tenreiro, R.** (2005) - Molecular characterization of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains isolated from Portuguese fresh waters. *Harmful Algae* **4**: 1044-1052.
- Van der Vossen, J. M. B. M.; Bosch, C.; Hartog, B. J.; Hofstra, H.** (1996) - PCR-mediated methods for yeast typing and implementation in the food industry. In: International Dairy Federation (ed.), *Yeasts in the Dairy Industry: Positive and Negative Aspects*. 144-153.
- Van Rensburg, P. & Pretorius, I.** (2000) - Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations - A review. *South African J. Enol. Vitic.* **21**: 52-73.
- Vanne, L.; Karowski, M.; Karpinnen, S. & Sjöberg, A. M.**, (1996) - HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control*, **7** (6): 263-276.
- Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Davis, C.; Fleet, G. & Lee, T.** (1985) - Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **36** (4): 302-313.
- Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Davis, C.; Fleet, G. & Lee, T.** (1985) - Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **36** (4): 302-313.
- Wood, B. & Holzapfel, W.** (1995) - *The genera of lactic acid bacteria*. 1st ed. Chapman & Hall. Blackie Academic & Professional. Great Britain.
- Wyder, M.T. & Puhán, Z.** (1997) - A rapid method for the identification of yeasts from kefir at species level. *Milchwissenschaft*, **52** (6): 327-330.
- Yap, A.; Schmid, F.; Jiranek, V.; Grbin, P. & Bates, D.** (2008) - Inactivation of *Brettanomyces/ Dekkera* in wine barrels by high power ultrasound. *Wine industry journal*. Volume **23** nº5 Disponível em: <http://reignofterroir.com/wpcontent/uploads/2008/10/cavitusdownload.pdf>, 18/10/2008
- Zoecklein, B.; Fugelsang, K.; Gump, B. & Nury.** (1999) - *Wine analysis and production*. Aspen Publisher, Inc. Maryland.

Tipo	Dimensão (mm)	Forma	Margem	Elevação	Cor	Superfície	Brilho	Teste da Urease	Crescimento e assimilação em:						Isolamento Nº
									Glucose	Maltose	Ciclohexamida 0,1%	Nitrato	NaCl 10%	Acido Acético 1%	
I	7	Circular/Elíptica	Inteira	Convexa	Cor-de-Rosa/Verm.	Lisa	Brilhante	Basidiomycota	+	+	+	+	+	-	19 e 22
II	4	Circular	Inteira	Convexa	Branca	Lisa	Brilhante	Ascomyceta	+	+	+	-	+	-	4; 8; 10; 13 e 15
III	5	Circular	Inteira	Convexa	Branca	Lisa	Malte	Ascomyceta	+	+	+	-	+	-	23; 24; 25 e 26
IV	3	Limonada/ Lenticulada	Inteira	Convexa	Branca	Lisa	Malte	Basidiomycota	+	-	+	-	+	-	21 e 27
V	2	Punctiforme	Inteira	Plana	Branca	Lisa	Malte	Basidiomycota	+	-	-	-	+	+	11; 12 e 20
VI	3	Limonada	Inteira	Convexa	Branca	Lisa	Brilhante	Ascomyceta	+	-	+	-	+	-	2; 3 e 18
VII	2	Punctiforme	Inteira	Convexa	Branca	Lisa	Malte	Ascomyceta	+	-	-	-	+	-	17
VIII	4	Circular / Oval	Inteira	Convexa	Branca	Rugosa	Malte	Ascomyceta	+	-	-	-	-	-	6; 7 e 9

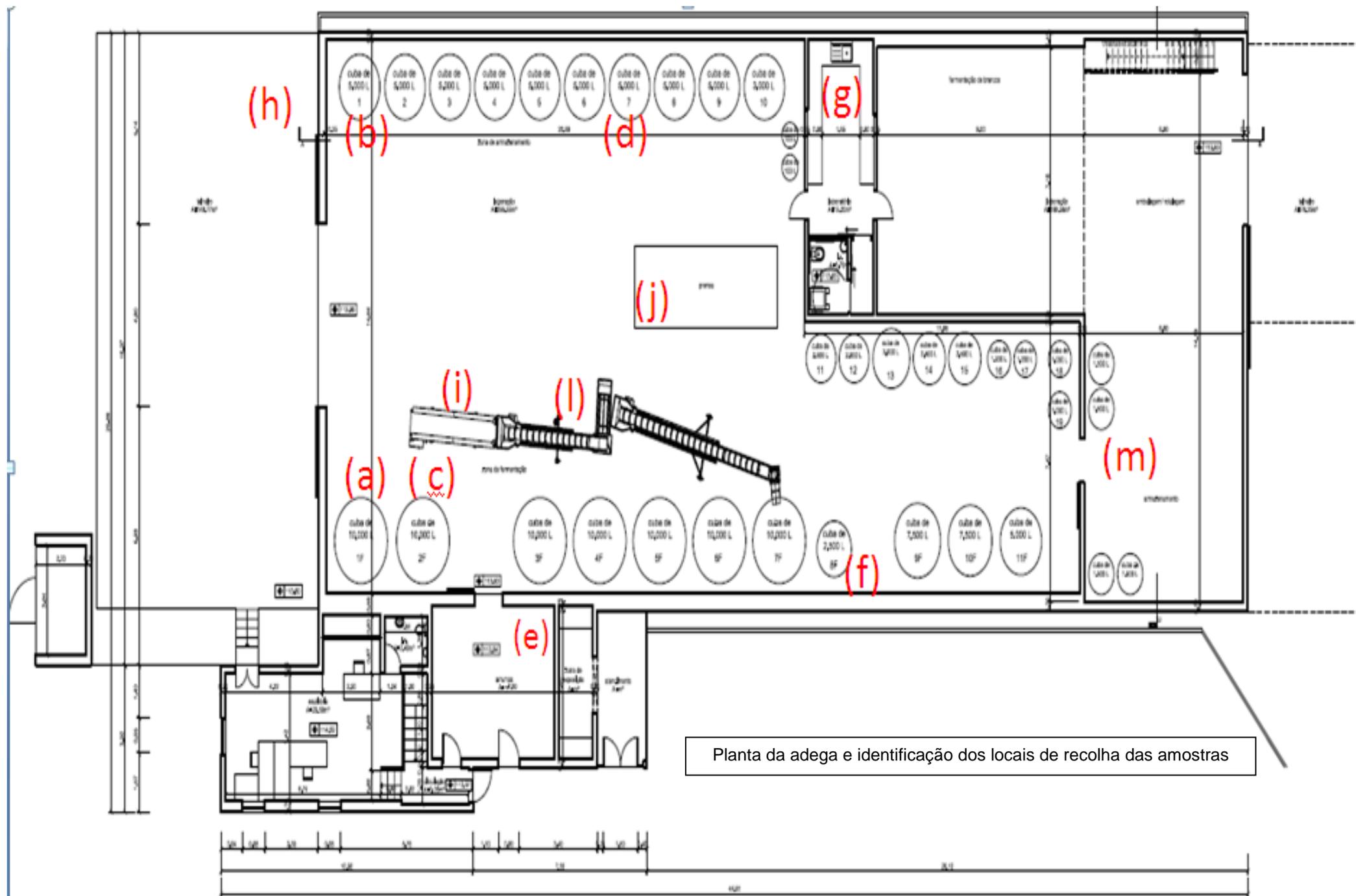
Quadro 1 – Tipos morfológicos das colónias de leveduras isoladas.

Tipo	Dimensão (mm)	Forma	Margem	Elevação	Morfologia Celular	Esporos	Cor	Superfície	Brilho	Gram	Catalase	Oxidase	Mobilidade Tipo Flagelar	Isolamento Nº
I	1,5	Irregular	Inteira	Convexa	Cachos de uva	Não	Amarela	Lisa	Malte	+	+	+	Com (peritricos)	3; 19 e 28
II	2	Irregular	Inteira	Convexa	Cachos de uva / cocos	Não	Branca	Lisa	Brilhante	+	+	-	Sem (imoveis)	4; 6; 8 e 21
III	6	Circular	Inteira	Plana	Bastonetes	Sim (endosporos)	Branca	Rugosa	Malte	+	+	+	Sem (imoveis)	7 e 11
IV	4	Punctiforme	Inteira	Convexa	Bastonetes	Sim (endosporos)	Branca	Lisa	Malte	+	+	+	Sem (imoveis)	5; 13; 22; 23; 32; 26 e 39
V	3	Cilindrica	Ondulada	Convexa	Bastonetes	Não	Creme	Lisa	Malte	-	+	-	Com (peritricos)	1; 2; 18; 20; 30; 33; 43 e 48
VI	5	Circular	Inteira	Convexa	Bastonetes	Não	Branca	Lisa	Brilhante	+	+	+	Sem (imoveis)	46, 47 e 48
VII	3	Punctiforme	Filamentosa	Convexa	Bastonetes	Não	Amarela	Lisa	Malte	+	+	+	Sem (imoveis)	37
VIII	2	Circular	Inteira	Convexa	Cocos	Não	Creme	Lisa	Malte	+	+	+	Sem (imoveis)	9, 14 e 27
IX	1,5	Circular	Inteira	Convexa	Cachos de uva	Não	Laranja	Lisa	Brilhante	+	+	+	Sem (imoveis)	36; 41 e 44
X	2	Circular	Inteira	Convexa	Cocos	Não	Branca	Lisa	Brilhante	-	+	-	Sem (imoveis)	10, 12 e 25
XI	5	Irregular	Ondulada	Plana	Bastonetes	Sim (endosporos)	Branca	Lisa	Malte	+	+	+	Sem (imoveis)	24 e 29
XII	3	Lenticular	Inteira	Umbilicada	Cocos	Não	Castanha	Lisa	Malte	-	+	+	Com flagelo	17 e 31
XIII	2	Irregular	Ondulada	Convexa	Bastonetes	Não	Creme	Lisa	Malte	-	+	-	Com (peritricos)	34 e 40
XIV	1	Circular/Oval	Inteira	Convexa	Bastonetes	Não	Branca	Lisa	Brilhante	-	+	-	Com flagelo	50
XV	1,5	Circular	Inteira	Convexa	Cachos de uva	Não	Branca	Lisa	Malte	+	+	-	Sem (imoveis)	15 e 16

Quadro 2 – Tipos morfológicos das colónias de bactérias isoladas.

Tabela 1- Leveduras de alteração mais representativas do vinho (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 1995). V- Vinificação; A- Armazenamento; E- Engarrafamento

Espécies	Problema/Composto	Ocorrência ^a
Espécies oxidativas		
<i>Pichia anomala</i>	Véu; cheiro (acetato de etilo)	V; A
<i>Pichia membranifaciens</i>	Véu; cheiro (ésteres)	V; A
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Cheiro a suor de cavalo e a rato; aumento da acidez volátil (etilfenol, piridinas e ácido acético)	A; E; V
<i>Candida</i> sp.	Véu; cheiro (ésteres)	A
Espécies fermentativas		
<i>Kloeckera apiculata</i>	Cheiro (ésteres)	V
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Cheiro (ésteres)	V
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	Escurecimento; cheiro (acetaldeído)	V; A; E
<i>saccharomyces</i> sp. (<i>S. cerevisiae</i>)	Escurecimento; refermentação	A; E
<i>Zygosaccharomyces</i> sp. (<i>Z. bailli</i> , <i>Z. bisporus</i> , <i>Z. rouxii</i> , <i>Z. microelipsoides</i>)	Sedimentos; escurecimento; refermentação	A; E
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	Sedimentos; escurecimento; refermentação	A; E
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Cheiro; perda de acidez fixa; aumento da acidez volátil	V; A
Várias espécies	Cheiro (H ₂ S e mercaptanos)	V; A



Planta da adega e identificação dos locais de recolha das amostras