

Contaminação microbiológica em adega

O conhecimento e controlo dos microrganismos associados às fermentações, bem como de possíveis contaminantes em todo o processo produtivo, é essencial para garantir a qualidade e segurança alimentar do vinho.

Alguns microrganismos surgem como agentes biológicos que participam nas transformações bioquímicas que se sucedem durante a produção do vinho, como as leveduras, principalmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, envolvidas na fermentação alcoólica, e as bactérias lácticas da espécie *Oenococcus oeni*, responsáveis pela fermentação malolática. No entanto, podem surgir espécies de leveduras, fungos e bactérias que em determinadas condições poderão desenvolver-se e ser prejudiciais ao vinho.

Um controlo microbiológico eficiente passa por minimizar a carga microbiana proveniente de fontes internas e externas ao processo (e.g. contaminações cruzadas), um controlo eficiente em locais microbiologicamente vulneráveis (e.g. estágio em barricas), minimizar a introdução de oxigénio associada a algumas operações e uma adequada limpeza e desinfecção dos equipamentos e instalações.

Monitorização da contaminação em adega

O INIAV Dois Portos tem realizado diversos ensaios de controlo de contaminações em adega com especial incidência sobre as linhas de engarrafamento. Embora o controlo deva incidir sobre todo o processo produtivo, especial atenção deve ser dada ao risco de contaminação durante o engarrafamento, tendo em conta que este é o último processo tecnológico do vinho.

No caso da avaliação da contaminação em equipamentos e superfícies, as amostras são recolhidas com passagem de zaragatoa sobre a superfície a avaliar. A zaragatoa é posteriormente colocada numa solução para permitir a passagem dos microrganismos recolhidos para o líquido, que é depois analisado por filtração ou por espalhamento à superfície. No caso das análises de vinho, geralmente com cargas reduzidas, são realizadas por filtração por membrana.

Para estimar a quantidade de microrganismos viáveis utiliza-se a técnica de contagem de microrganismos por cultura, de acordo com a Resolução OIV-Oeno 206/2010 (<http://www.oiv.int/public/medias/1224/oiv-oeno-206-2010-en.pdf>) da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV – <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/resolutions-oiv/oenology-resolutions>). A enumeração é feita através da contagem de colónias crescidas num meio de cultura sólido adequado após incubação. A utilização de meios gerais ou seletivos permite a enumeração e diferenciação dos principais grupos de microrganismos: leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas.

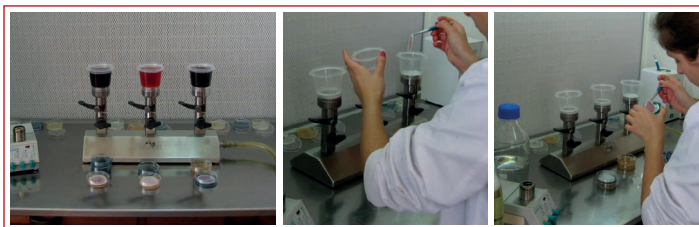


Figura 1 – Filtração de amostras de vinho por membrana para contagem por cultura em placa.

Os resultados obtidos têm demonstrado níveis de contaminação elevados em controlos microbiológicos em adegas, em particular associados aos equipamentos de enchimento e rolhadora. Foram frequentes as situações em que os vinhos apresentaram contaminação forte após a enchedora, sobretudo por leveduras e bactérias acéticas, apesar de terem sido muito baixos os níveis detetados após a filtração. Estes níveis de contaminação encontrados prendem-se nomeadamente com a dificuldade de lavagem e desinfecção de locais como bicos/tubos da enchedora e maxilas da rolhadora.

Deteção de leveduras em linhas de engarrafamento

No controlo microbiológico em adega, a identificação de leveduras assume primordial importância no processo de estabilidade microbiológica de vinhos, em especial pela resistência que possuem às condições adversas de conservação do vinho, podendo levar à sua degradação. Através da identificação dos isolados ao longo de todo o processo é possível determinar qual o ponto de origem dos contaminantes detetados. Esta avaliação permite redefinir os processos de higienização, conforme se discute mais à frente neste artigo.

Com o objetivo de identificar leveduras de interesse enológico, têm sido desenvolvidos diversos métodos baseados em técnicas de biologia molecular. A análise de perfis de restrição de rDNA tem sido desenvolvida e aplicada no nosso laboratório. Esta técnica consiste na amplificação de regiões que codificam o RNA ribossómico através da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), seguida de digestão por enzimas de restrição e posterior análise dos fragmentos de restrição (Baleiras-Couto *et al.*, 2005; Zanol *et al.*, 2010).

O INIAV Dois Portos construiu uma base de dados de perfis de restrição com cerca de 1200 entradas e respetiva Biblioteca de perfis de restrição composta por 78 isolados autenticados (36 estirpes-tipo) pertencentes a 53 espécies diferentes de leveduras associadas a ambientes vínicos. A identificação de novos isolados é fornecida pelo *software* GelCompar II, a partir da introdução do respetivo perfil de restrição, com base na Biblioteca de perfis de restrição construída. Esta técnica tem permitido obter perfis de restrição específicos da espécie, com identificação da maioria das espécies não *Saccharomyces* isoladas de ambientes vínicos. Outro resultado positivo do método é a de diferenciar claramente as espécies de leveduras de deterioração *Dekkera anomala* e *D. bruxellensis* das restantes espécies de leveduras. Também as espécies *Z. bailii* e *Z. lentus* se agrupam num *cluster*, separadas das restantes espécies. Estes resultados são importantes para fins de controlo de qualidade do vinho.

Através destas metodologias foi possível, num ensaio realizado numa adega, detetar leveduras de espécies de elevada perigosidade para os vinhos: leveduras das espécies *Torulaspora delbrueckii*, *Z. bailii* e *D. bruxellensis*, detetadas em diferentes fases do processo de engarrafamento e no produto final (Baleiras-Couto *et al.*, 2011). Um ponto importante de contaminação identificado neste estudo foram as maxilas da rolhadora, onde foram detetadas leveduras de espécies como *Filobasidium uniguttulatum*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus carnescens* e *Candida norvegica*, indiciando processos de higienização deficientes.

Remoção de *Dekkera/Brettanomyces* por filtração

As leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* são uma das principais preocupações da contaminação em adega, pela difi-

culdade de controlo, após deteção num vinho por via sensorial. Estas leveduras têm a capacidade de deteriorar vinhos, em particular vinhos tintos, produzindo compostos muito ativos sensorialmente (baixo limiar de deteção), como os fenóis voláteis, com aromas depreciativos a estrebaria, suor de cavalo e medicinal. A dimensão do problema é global e tem vindo a aumentar, o que levou a que a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (<http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/resolutions-oiv/oenology-resolutions>) propusesse um Código de Boas Práticas Vitivinícolas Destinadas a Prevenir ou a Limitar a Contaminação por *Brettanomyces bruxellensis* (<http://www.oiv.int/public/medias/1640/oiv-oeno-462-2014-en.pdf>).



Figura 2 – Placas com contagens de leveduras e tubos com meio de cultura seletivo líquido após incubação.

Embora o ideal seja a prevenção do aparecimento desta levedura, quando o enólogo se depara com este problema tem de ter ferramentas que o ajudem a ultrapassá-lo. Nesse sentido, fomos contactados pela empresa Multifiltra – Filtração e Equipamentos Industriais, Lda. para a realização de ensaios laboratoriais de diferentes tipos de filtros para a remoção de *Brettanomyces bruxellensis*. Os ensaios foram realizados com vinho adicionado desta levedura e testados filtros de polipropileno, fibra de vidro (com polipropileno) e polietersulfona, de diferentes porosidades. O teste realizado foi bastante exigente, seguindo-se os procedimentos preconizados para a indústria farmacêutica para produtos que têm de garantir uma esterilidade absoluta, nomeadamente produtos injetáveis, sendo a carga de leveduras de 10 milhões de células por centímetro quadrado de área de filtro.

Verificou-se que os filtros de polipropileno, de 0,6 e 1,0 µm e o filtro de fibra de vidro de maior porosidade não foram eficazes na remoção total de *B. bruxellensis*. No entanto, o filtro de fibra de vidro de menor porosidade e os filtros de polietersulfona de 0,45, 0,65 e 1,0 µm fizeram uma retenção total da elevada carga de leveduras a que foram submetidos. Este ensaio permitiu concluir que a porosidade dos filtros não é o fator mais relevante para a eficácia dos filtros. Existe todo um conjunto de mecanismos envolvidos na remoção de microrganismos, em que a interceção direta é apenas um deles, existindo ainda a inércia do impacto, tanto maior quanto o percurso tortuoso a efetuar pelo microrganismo, e

efeitos de carga que promovem uma adsorção deste à membrana. De salientar que estas operações de filtração têm de ser realizadas com elevado rigor para que, após a filtração, o vinho não volte a ser contaminado. Todo o material e equipamento que esteve em contacto com o vinho contaminado deve ser meticolosamente lavado e desinfetado.

Eficácia de produtos de higienização Avaliação em laboratório

O setor da microbiologia participou num estudo realizado no âmbito de um protocolo com a empresa Diversey (atualmente do grupo SealedAir) para avaliação de produtos de higienização em laboratório e em adega. A avaliação da eficácia de desinfetantes segue normas europeias e a generalidade dos produtos é validado para microrganismos da área clínica. No entanto, os microrganismos que interessa testar são os que podem alterar os vinhos. Para além disso, os testes são geralmente efetuados utilizando a albumina de soro bovino como interferente, pouco relacionado com as condições enológicas. A avaliação da eficácia destes produtos sobre microrganismos de alteração de vinhos, nomeadamente leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas, usando interferentes vínicos (nomeadamente mosto e vinho) reproduz melhor o *target* da utilização destes produtos. No nosso laboratório foi avaliada a eficácia de desinfetantes utilizados em adega segundo as normas europeias, utilizando *Brettanomyces bruxellensis*, *Acetobacter aceti* e *Pediococcus damnosus*, e como interferente, mosto e vinho. Embora haja variação da suscetibilidade aos biocidas, de espécie para espécie e até de estirpe para estirpe, os valores de concentração obtidos para os microrganismos avaliados são um indicador mais fiável das dosagens a aplicar pelos enólogos.

Como proceder em adega

Em adega, os ensaios foram realizados com um vinho no qual foi forçada uma forte contaminação e que permaneceu alguns meses em contacto com os depósitos. Como era expectável, a distribuição dos microrganismos pela superfície não foi homogênea, havendo amostragens em zonas idênticas com diferentes níveis de

microrganismos. Além disso, no caso dos nossos ensaios, havia uma contaminação do vinho à superfície muito forte, como pode ser observado na figura seguinte, verificando-se maior contaminação na parte superior dos depósitos do que na parte inferior dos mesmos (Duarte *et al.*, 2011).

Verificou-se que a lavagem com um detergente alcalino foi importante para a remoção da sujidade mais grosseira e diminuição importante da carga microbiana. No entanto, por si só, não consegue remover ou eliminar a totalidade dos microrganismos presentes. A ação dos desinfetantes sobre os microrganismos que inevitavelmente permanecem nas superfícies, devido, por exemplo, à formação de biofilmes que lhes dão maior proteção, é fundamental. No entanto, a ação dos detergentes é importante para iniciar a eliminação de microrganismos e permitir uma boa ação dos desinfetantes sem interferência de matéria orgânica. Além disso, células removidas por ação de detergentes poderão fixar-se numa outra zona do equipamento e só a ação do desinfetante conduzirá à sua eliminação. O uso de desinfetantes na dose e tempo de contacto adequados, bem como de mais do que um desinfetante numa base de rotatividade, é também muito importante para evitar o desenvolvimento de resistências por parte dos microrganismos.

Um aspeto muito relevante que pudemos confirmar no trabalho realizado foi a enorme importância da aplicação dos produtos com ação mecânica. Foi possível verificar que a aplicação estática dos produtos não foi eficaz para a eliminação dos microrganismos, tendo sido obtidas contagens elevadíssimas de microrganismos nas superfícies. Como é sabido, a ação mecânica assume importância fulcral, sobretudo na lavagem dos equipamentos, auxiliando os detergentes na remoção do sarro ou outras incrustações.

Como avaliar o resultado

A avaliação da eficácia dos procedimentos em adega deve ser preferencialmente realizada recorrendo a diferentes metodologias, dado não haver uma metodologia ideal e estas apenas reportarem aspetos diferentes de uma mesma realidade. No caso particular das contagens por cultura em placa, uma das desvantagens resulta dos produtos utilizados na higienização poderem causar *stress* às células, levando a que estas não se multipliquem nos meios de cultura usados em laboratório, embora não tenham perdido viabilidade. Assim, a contagem de microrganismos presentes nas superfícies poderá estar a ser subestimada. No entanto, estas metodologias são mais informativas quanto ao tipo de microrganismo, diferenciando por grandes grupos – leveduras, bactérias lácticas e bactérias acéticas. Outras metodologias, como a medição de ATP por bioluminescência, não dependem da culturabilidade dos microrganismos, mas também não dão tanta informação acerca dos contaminantes presentes. Por outro lado, também aqui, alguns

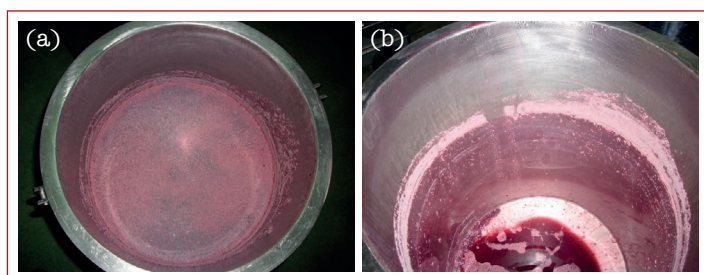


Figura 3 – Aspeto de um depósito: (a) com o vinho contaminado; (b) após a remoção do vinho.



Figura 4 – Aspeto do esmagador durante a aplicação de desinfetante.

dos produtos usados nos procedimentos de higienização poderão interferir com as reações associadas ao método de bioluminescência falseando o resultado.

O processo de higienização adotado por cada adega deve ter em conta as condições particulares da adega bem como os tipos de vinho produzidos. 🍷

*Margarida Baleiras-Couto e Filomena L. Duarte
INIAV, I.P. Dois Portos.*



Bibliografia.

- Baleiras Couto, M.M.; Reizinho, R.G.; Duarte, F.L. (2005) Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol* **102**: 49-56.
- Baleiras-Couto, M.M.; Gomes, A.S.; Casal, M.; Duarte, F.L. (2012) Survey of yeast diversity during wine bottling processes using restriction analysis of 26S ribosomal DNA (rDNA). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **18**: 39-42. doi: 10.1111/j.1755-0238.2011.00167.x
- Duarte, Filomena L.; López, Alberto; Alemão, M. Filomena; Santos, Rodrigo; Canas, Sara. (2011). Commercial Sanitizers Efficacy – A Winery Trial. *Ciência Téc. Vitiv* **26** (1): 45-52. (http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-02232011000100005&lng=en&tlng=en).
- Zanol, G.; Baleiras-Couto, M.M.; Duarte F.L. (2010) Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification. *Ciência Téc. Vitiv* **25**: 75-85.