



**SUEMIS MARIA PARENTI DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO *TERROIR* BACTERIANO DE  
VINHEDOS DO SUL DE MINAS GERAIS**

**LAVRAS - MG  
2018**

**SUEMIS MARIA PARENTI DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO *TERROIR* BACTERIANO DE VINHEDOS DO SUL DE  
MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Co-orientadora

Prof. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

**LAVRAS - MG  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Suemis Maria Parendi de.  
Caracterização *terroir* bacteriano de vinhedos do Sul de Minas  
Gerais / Suemis Maria Parendi de Souza. - 2017.  
55 p.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.  
Coorientador(a): Cristina Ferreira Silva e Batista.  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.  
Bibliografia.

1. Metagenômica. 2. Vitis Vinífera. 3. Bactéria. I. Batista, Luís  
Roberto. II. Batista, Cristina Ferreira Silva e. III. Título.

**SUEMIS MARIA PARENTI DE SOUZA**

**CARACTERIZAÇÃO *TERROIR* BACTERIANO DE VINHEDOS DO SUL DE  
MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 05 de setembro de 2017.

Dra. Cintia Lacerda Ramos – UFVJM  
Dra. Sarah S. Costa Guimarães - UFLA

Prof(A). Dr(A) Luís Roberto Batista.  
Orientador

Prof(A). Dr(A) Cristina Ferreira Silva e Batista.  
Co-orientadora

**LAVRAS - MG  
2018**

*A Deus, que trilhou o meu caminho com pessoas que me ajudaram a chegar até aqui,  
me fez vir a este mundo em uma família cheia de amor, que sempre me incentivou a  
prosperar e realizar meus sonhos. Aos meus pais que me deixaram de herança o melhor  
conselho da vida, que pelos estudos eu teria o melhor caminho.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, pelo seu cuidado e amor em realizar meus sonhos e projetos.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Biologia, pela oportunidade. À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado. Isso só foi possível pelo esforço conjunto de vários servidores de diferentes áreas, que trataram o caso de forma especial e com afinco. Saibam que serei eternamente grata por isso.

A meu orientador, professor Dr. Luís Roberto Batista, pela oportunidade e confiança de realizar esse projeto. Por todos os ensinamentos e oportunidades, o meu muito obrigada.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Programa de Microbiologia Agrícola, pela oportunidade em fazer parte dessa estrutura e excelência de ensino, me ajudando a crescer profissionalmente.

A todos os Mestres, pelo conhecimento transmitido, em especial a Professora Dra. Cristina Ferreira Batista, por me acolher como co-orientada, pela sua paciência, disponibilidade em sempre me ajudar, participando diretamente do meu trabalho e a Dra. Suzana Reis Evangelista pela ajuda na dissertação. Meu muito obrigada.

Agradeço meus pais, que mesmo ausentes, com todo amor, carinho, me fizeram chegar até aqui. Graças a eles, eu sei o quanto uma vitória depois de muito esforço vale a pena.

Aos meus irmãos Arthur, Pâmela e Ana Carolina, por sempre estarem do meu lado, me incentivando e comemorando comigo a cada conquista.

A Eda, meu anjo da guarda, que nenhuma palavra descreve o que significa pra mim, a maior responsável por todas minhas melhores conquistas. Por realizar meus sonhos, por me amar como uma filha, me entender como uma filha, me ouvir como uma filha e por acreditar em mim como uma filha. O melhor de cada conquista, não é a minha satisfação, é saber que de alguma forma, consegui realizar os seus sonhos.

Ao meu marido Gustavo, que sempre foi meu incentivador, me fez acreditar na minha capacidade. Por toda ajuda, nas análises, nas noites perdidas de sono me ajudando a estudar. Por aguentar meus dias de irritação e ansiedade. Meu muito obrigada.

Aos meus “filhos” de quatro patas, que todos os dias me recebiam de rabinho abanando, lambidas e carinho. Passando as noites de estudo ao meu lado.

A todos meus familiares, que vibram com cada vitória e me ajudam nas dificuldades encontradas no caminho.

Aos meus colegas de trabalho, tanto do NETAX, quanto do NEMAI, vocês me ajudaram e nesse momento gostaria muito de dividir com vocês minha alegria.

As minhas amigas de disciplina, por todas as tardes e noites de estudo, por sempre se alegrarem com meu sucesso, vocês sabem o quanto sou grata a vocês. Anielli, Tenille, Joice, Rafaela, Michele Gonçalves, Luara, Natalia, Cibele e Michele Aragão, vocês são lindas e muito queridas.

A Cris, por toda ajuda na realização do projeto, pela paciência e amizade.

Agradeço a Rose, pela sua compreensão, pelo profissionalismo e sempre disposta a ajudar. A Ivani, pela disponibilidade em ajudar. A Jajá, por todo carinho e amizade nesses anos.

A meus amigos que fiz em Lavras, por todas cervejas, festas, churrascos e momentos de amizade compartilhada. Por ajudar nas mudanças, por todos os dias que longe da família, se tornaram minha família. A república Tokaia, República Desapego, República Touro Mecânico e Republica Tindoida. Depois do mestrado, já tem mais uma caixa garantida pra vocês.

Enfim, graças a Deus, tenho muito a agradecer. Muitas pessoas são responsáveis por eu conseguir chegar até aqui. Agradeço muito a Deus, por me proporcionar conhecer e dividir momentos de alegria com todas essas pessoas.

Que venha o Doutorado, se Deus quiser!

*“...você precisa desaprender o que aprendeu” – Mestre Yoda, Star Wars*

*“A penicilina cura os homens, mas o vinho que os torna felizes.”*

*A. Flemming (Nobel de Medicina)*

*“Abrir uma garrafa de vinho, é quase como abrir uma Dissertação, não sabemos o que iremos encontrar, mas se estivermos inspirados a descobrir, a experiência valerá à pena.*

*(Suemis Parenti)*

## RESUMO GERAL

O cultivo de uvas viníferas no sul do Estado de Minas Gerais é uma cultura ainda em expansão a qual demanda diversas pesquisas para auxiliar no seu desenvolvimento. É uma atividade que vem se consolidando devido a qualidade dos seus produtos em principal dos vinhos, com destaque a casta Syrah, a qual apresentou melhor adaptação as condições edafoclimáticas da região. Assim, o conhecimento da microbiota *terroir* é de fundamental importância devido aos já conhecidos efeitos benéficos dos microrganismos em relação tanto a produção dos vinhos como no cultivo das plantas. Em especial as bactérias apresentam importante atuação nesse contexto, como na fermentação malolática, produção de fito-hormônios, produção de compostos voláteis e degradação de micotoxinas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o *terroir* bacteriano das uvas viníferas, através de isolamento e identificação de bactérias cultiváveis e análises de metagenômica, utilizando sequenciamento de nova geração para identificação. Os dados gerados foram analisados por análise de componentes principais e demonstraram que as bactérias identificadas na metagenômica apresentam uma distribuição uniforme nos dois vinhedos estudados. Sendo os principais filos identificados os *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacterias* e *Proteobacterias*, em relação as espécies que apresentaram maior predominância no vinhedo 1 foram *Fusobacterium* sp. e *Streptococcus* sp. e para o vinhedo 2 *Lactobacillus salivarius* e *Rothia aerea*. Assim, com o presente trabalho, pode-se identificar as bactérias presentes nos vinhedos, os quais são responsáveis pelo *terroir* bacteriano, e interferem na qualidade dos vinhos e conseqüentemente nos processos de denominação de origem.

Palavras-chave: metagenômica; bactéria; *Vitis vinifera*.

## GENERAL ABSTRACT

The cultivation of grapes in southern of Minas Gerais state is a culture still in expansion which demand several researches for help in it's development. Is an activity that's consolidation due the quality of it's products in principally the wine, with highlighting the Syrah cultivate, that's showed the best adaptation of edafoclimatic conditions. Thus, the knowledge of microbial terroir is of fundamental importance due the already known beneficial effects of microorganisms in relation both the wine production as in plants cultivate. In special the bacteria show important actuation in these context, as in malolatic fermentation, phytohormones production, volatile compunds production and micotoxins degradation. Thus, the present work had as objective characterize the bacterial terroir of grape wines, through the isolament and identification of cultivated microorganisms and metagenomic analyze, utilizing the new generation sequence for identification. The date were analyzed by principal component, showing that bacteria identified in metagenomic showed a uniformed distribution in two vineyard. Being the main phylum identified as Fusobacteria, Actinobacteria, Bactereoidetes, Firmicutes, Fusobacterias and Proteobacterias, in relation the species that showed the major predominance in vineyard 1 was Fusobacterium sp. and Streptococcus sp. and for vineyard 2 Lactobacillus salivarius and Rothia aeria. Thus, with the present work, one can identify as in a presentation of the vineyards, those that are responsible for having bacterial, and interfere in the quality of the wines and, consequently, in the processes of denomination of origin.

**Keywords:** Metagenomic, bacteria, Vitis vinifera

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Identificação geográfica dos municípios Três Pontas-MG e Três Corações-MG, onde estão presentes os vinhedos 1 e 2 respectivamente. Fonte: autor..... 35
- Figura 2. Análise de componentes principais, utilizando os fatores 1 e 2 da análise dePCA, demonstrando os valores obtidos para os autovetores dos vinhedos 1 e 2. .... 46
- Figura 3. Análise de componentes principais, utilizando os fatores 1 e 2 da análise de PCA, demonstrando os valores obtidos para os autovetores referentes a frequência dos microrganismos nos vinhedos. .... 47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras nos Vinhedos 1 e 2, nos municípios de Três Pontas e Três Corações respectivamente. .... 36
- Tabela 2. Identificação dos Morfotipos pela técnica de MALDI-TOF relacionando a população das amostras de solo e uva nas vinícolas 1 e 2..... 40
- Tabela 3. Classificação taxonômica das bactérias identificadas por seqüenciamento de nova geração nas amostras de uva nos vinhedos 1 e 2. .... 41
- Tabela 4. Classificação físico-química do solo dos vinhedos 1 e 2.**Erro! Indicador não definido.**

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL .....	13
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 JUSTIFICATIVA .....	15
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	18
4.1 VITIVINICULTURA EM MINAS GERAIS.....	18
4.2 <i>TERROIR</i> .....	19
4.3 MICROBIOTA <i>TERROIR</i> .....	20
4.4 METAGENÔMICA .....	23
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	25
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26
<u>CAPÍTULO 2:</u> Caracterização do <i>terroir</i> bacteriano de vinhedos da região Sul de Minas Gerais.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Resumo .....	31
Abstract.....	32
1. Introdução.....	33
2. Materiais e métodos.....	35
2.1. Amostragem das uvas e solo .....	35
2.2. Caracterização físico-química do solo de cultivo.....	36
2.3. Isolamento e caracterização dos microrganismos .....	37
2.4. Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF.....	38
2.5. Análise genética das amostras de uva.....	39
2.5.1. Extração do DNA total das uvas.....	39
2.5.2. Sequenciamento de nova geração (NGS) .....	39
2.6. Análises estatísticas .....	39
3.1. Isolamento e identificação dos microrganismos cultiváveis .....	39
3.2. Análise do sequenciamento de nova geração .....	40
3.3. Análise de Componentes Principais (PCA).....	46

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

### 1 INTRODUÇÃO

A ação dos microrganismos é de grande importância na escala produtiva da videira, desde o cultivo de uvas, até o vinho, como produto final. Para o desenvolvimento de frutas em condições ideais, os microrganismos contribuem de diversas formas, no controle de microrganismos patogênicos, na rizosfera atuam na ciclagem de nutrientes que são importantes para o desenvolvimento da planta, atuam na promoção de crescimento, no controle de pragas e alguns nematóides, entre outros. (PHILIPPOT et al., 2013; ZARRAONAINDIA et al., 2015; MOREIRA et al., 2006).

Na etapa da fermentação das uvas, as leveduras realizam a fermentação alcoólica e influenciam no aroma e sabor do vinho. As bactérias, em especial as bactérias do ácido lático, participam da fermentação malolática, etapa importante para a qualidade do produto final, pois ocorre a conversão do ácido málico em ácido lático, que resulta em diminuição da acidez e contribuindo para melhoria do sabor e aroma do vinho. (LERM et al., 2010, REVEL et al., 1999).

Alguns autores apresentaram resultados positivos, quando observaram a relação genética dos microrganismos e sua localização geográfica, na qualidade do vinho. Os autores conseguiram identificar características de algumas leveduras, que se incorporaram ao vinho, proporcionando atributos sensoriais exclusivos. Resultados como esses, evidenciam a importância de conhecer microrganismos específicos de determinadas regiões, e compreender como podem influenciar nas características específicas dos vinhos. (KNIGHT et al., 2015).

Sendo assim, vinhos produzidos em uma determinada região, podem demonstrar aspectos únicos, já que microrganismos presentes naturalmente no ambiente apresentam relevante importância no *terroir*. Com isso, é evidente a possibilidade de propostas de assinaturas geográficas desses microrganismos, tornando possível a qualidade e uniformidade na produção (KNIGHT et al., 2015).

Segundo Handelsman (2004) a análise de metagenômica é uma ferramenta importante que permite a compreensão da ecologia microbiana em diversos ambientes, desde plantas, solo, ar, como de locais extremos como, águas termais, profundas e ácidas, solo desértico, congelados e também na microbiota humana. Além disso, permite compreender a relação entre microrganismos, plantas e outros organismos. Desse modo, a partir do avanço dessa

tecnologia, desperta a necessidade de melhorar a compreensão desses sistemas, fornecendo dados, além de pesquisas para resolver diversos problemas como a descoberta de novos antibióticos e enzimas, sendo alvo para descoberta de novas aplicações biotecnológicas (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003).

Alguns estudos, em áreas de vinhedo, relacionados com a ecologia microbiana, têm como objetivo selecionar alguns microrganismos que ao serem inoculados na região de plantio, melhorem a qualidade do solo e conseqüentemente a qualidade da produção. Práticas como essas, podem alterar o *terroir* microbiano e elaborar vinhos com atributos únicos e específicos. Porém, é necessário realizar mais estudos que caracterizem melhor as relações entre as videiras e os microrganismos (GILBERT et al., 2014).

Portanto, sabendo-se da grande influência dos microrganismos na qualidade do vinho, a metagenômica apresenta ser uma técnica essencial, pois auxilia no entendimento dessa relação. Ela proporciona, análise da composição taxonômica e abundância dos microrganismos na videira, e suas classes funcionais, que são influenciadas por fatores abióticos como temperatura, umidade e ventilação (SALVETI et al., 2016).

## 2 JUSTIFICATIVA

A atividade de cultivo de uvas *Vitis vinífera* e a fabricação de vinhos é definida como vitivinicultura. A vitivinicultura no Brasil foi estabelecida principalmente na região Sul, devido suas características climáticas. (ROSA; SIMÕES, 2004). No Brasil, algumas regiões produtoras de vinho, possuem apenas um ciclo de produção. E geralmente o momento da maturação da uva e da colheita, coincide com os meses de maior volume de chuvas, conseqüentemente esses fatores climáticos acarretam problemas na produção de uvas impedindo que a atinjam a completa maturação, comprometendo a qualidade dos vinhos (REGINA et al., 2006). Porém, nas condições climáticas do Sul de Minas Gerais, tornou-se possível a produção da cultivar Syrah, apresentando a obtenção de um ciclo de outono para a videira com resultados de produção satisfatória (AMORIM et al., 2005).

Para a obtenção de um vinho de qualidade, é necessária a presença de uvas com condições ideais para a produção, as quais, podem ser afetadas pelas condições de clima e solo (ROSA; SIMÕES, 2004). Entretanto, a presença de microrganismos é fundamental para a qualidade da videira, uva e conseqüentemente do vinho. A influência dos microrganismos na qualidade pode ocorrer de diferentes formas dentre elas está a interação entre eles como, ação contra patógenos, degradação de substâncias produzidas por fungos como algumas micotoxinas e controle natural de microrganismos deterioradores (CAPOZZI et al., 2015; BARATA et al., 2012).

As características fisiológicas dos microrganismos afetam diretamente a qualidade do vinho, podendo ser encontrados nas uvas diversos microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias que apresentam características fisiológicas completamente diferentes, compondo assim, uma ecologia microbiana complexa (BARATA et al., 2012). Mendonza et al. (2010), relata que ocorre efeitos antagonistas da levedura *Saccharomyces* sp. sobre as cepas de *Oenococcus oeni*, os autores demonstram que os efeitos antagonistas apresentados são provenientes de compostos produzidos pela fermentação alcoólica. Sendo que esses compostos inibem o crescimento das bactérias mas não afetam a capacidade de transformação do ácido málico em ácido lático através da fermentação maloláticas pelas cepas de *O. oeni*.

Outro fator que pode interferir no crescimento da *O. oeni* é a presença do etanol, o qual afeta o transporte de metabolitos, parede celular e síntese de membrana celular, demonstrando que a membrana celular na bactéria apresenta uma função importante para a proteção celular em casos de estresses causados pelo etanol. Sendo que um dos mecanismos utilizados pela

bactéria me estresse causado pelo etanol é o recrutamento de proteínas de membranas, sendo esse estudo comprovado por análises proteômicas (OLGUIN et al., 2014).

A microbiota *terroir* do vinho caracteriza-se como a biodiversidade microbiana correlacionada com as características edafoclimáticas específicas de uma determinada região, a qual apresenta influência direta na qualidade e nas características sensoriais da bebida (CAPOZZI et al., 2015; BOKULICH et al., 2013).

Na produção do vinho, os microrganismos apresentam função essencial devido aos processos fermentativos, através da fermentação alcoólica, realizado por leveduras e na fermentação malolática, onde há a transformação do ácido málico em ácido lático por bactérias lácticas (LERM et al., 2010), proporcionando as características sensoriais do vinho, diminuindo a sua acidez e melhorando o seu sabor e aroma (REVEL et al., 1999).

Os processos industriais utilizam-se normalmente culturas iniciadoras na fermentação, as quais são caracterizadas por microrganismos isolados e selecionados, refletindo a biodiversidade de uma área específica. Nesse sentido, culturas iniciadoras são isoladas e purificadas a partir da microbiota natural (microrganismos autóctones) presente ao longo do processo produtivo, apoiando assim, a ideia de que esses microrganismos autóctones podem estar associados com o *terroir* característico de cada região (GILBERT et al., 2014).

Dentre os microrganismos as bactérias apresentam consolidada relevância nas propriedades sensoriais do vinho. Diversas são as influências da microbiota bacteriana na escala produtiva que ocorre deste a videira, uva até o produto final. Na videira, pode influenciar em parâmetros de desenvolvimento da planta, ciclagem dos nutrientes na rizosfera, fixação de nitrogênio e controle de microrganismos patogênicos através de competição e antagonismo. Assim, estudos que visam o conhecimento da microbiota do ambiente que se encontra a videiras abrangendo a uva, flores, folhas, caule, solo e rizosfera são de grande importância. (ZARRAONAINDIA et al., 2015).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar o *terroir* bacteriano em áreas de vinhedo no Sul de Minas Gerais.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Isolar e identificar bactérias presentes nas amostras de uva e solo das áreas de vinhedo, em diferentes meios de cultura.
- Análise do DNA das amostras por análise de metagenômica e sequenciamento de nova geração.
- Correlacionar a importância da identificação dos microrganismos com o *terroir* bacteriano dos vinhos

## 4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Algumas transformações na vitivinicultura no Brasil foram apresentadas nas últimas décadas, principalmente pela mudança de hábitos na preferência dos consumidores, abrindo assim, espaço para maior consumo de vinhos Brasileiros (ROSA; SIMÕES, 2004). Segundo os mesmos autores, a vitivinicultura no Brasil, que é a atividade de plantio de uvas viníferas e a produção de vinhos, foi estabelecida principalmente na região Sul, devido suas características climáticas. Entretanto, com técnicas de produção extemporânea, utilizando-se de uma segunda poda anual, nas condições climáticas do Sul de Minas Gerais, foi possível a produção da cultivar Syrah, apresentando a obtenção de um ciclo de outono para a videira com índices de produção satisfatória (AMORIM et al., 2005).

A vitivinicultura no Brasil está correlacionada com a vinda dos imigrantes italianos, os quais inicialmente cultivavam uvas americanas, elaborando o vinho de mesa. Entretanto, a partir da década de 30, houve a iniciação da produção de vinhos a partir de uvas viníferas (MOLINARI; NETO, 2016).

### 4.1 Vitivinicultura em Minas Gerais

A região Sudeste do Brasil apresenta um alto potencial para produção de vinhos finos. O Sul de Minas Gerais, apesar de ser considerada uma região cafeeira, há um grande cultivo de uvas *Vitis vinifera*, que podem ser plantadas nas áreas mais baixas das fazendas de café, que geralmente não são utilizadas pelo fato dessa cultura ser sensível às geadas (DIAS, 2011).

A produção de vinhos finos em Minas Gerais concentra-se na região sul do Estado. Como na maioria das regiões produtora de vinhos finos do País, nesses municípios o período da colheita também ocorre nos meses de janeiro e fevereiro, período de maior volume de chuva. Entretanto, estudos realizados na região cafeeira do sul de Minas Gerais, precisamente no município de Três Corações, demonstraram que a cultivar Syrah apresentou condições favoráveis para produção, quando o ciclo foi alternado para os meses de janeiro a julho, possibilitando a colheita no período seco (FAVERO et al., 2008).

A cultivar Syrah, ou ainda Shiraz, é uma uva tinta que permite que o vinho envelheça até por meio século. Muito bem adaptada aos climas tropicais, e com ótima adaptação em terras australianas para onde foi levada em 1832. Foi disseminada por outras partes do mundo após 1970. É uma casta de difícil cultivo nas condições ambientais da região Sul do país, devido a sua alta sensibilidade a podridões do cacho, entretanto é muito vigorosa e produtiva,

quando cultivada em condições favoráveis. Nas condições semiáridas do Nordeste, na região do submédio São Francisco e no sul de Minas Gerais tem mostrado excelente adaptação (ALBERT, et al, 2012).

Essa cultivar resulta na produção de vinhos escuros, ricos, fortes, com um elevado grau alcoólico e ligeiramente apimentados. Combina na perfeição com várias outras castas e envelhece de forma sublime, conferindo ao produto final o estatuto de um vinho tinto verdadeiramente clássico (REGINA, et al, 2006).

A vitivinicultura na região sul de Minas Gerais apesar de relativamente recente, está em constantemente crescimento já que as condições edafoclimáticas são favoráveis. O manejo diferenciado, intitulado dupla-poda, permite que o ciclo de produção ocorra no primeiro semestre e a colheita aconteça no inverno, período favorável à maturação das uvas já que coincide com o menor índice de chuva no Sudeste brasileiro (REGINA et al., 2006).

A dupla-poda é um manejo idealizado pela EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), que consiste na mudança do ciclo da videira para o período de outono e inverno, de forma a evitar as temperaturas elevadas e os excessos de chuvas do verão. Nesse manejo, são realizadas duas podas: poda de formação dos ramos produtivos e poda de produção. A poda de formação dos ramos é executada em agosto com poda curta (duas gemas) e aplicação de produtos para uniformizar a brotação. (AMORIM, 2005).

O manejo da dupla poda permite a diferenciação do cultivo de uva para vinho do sul de Minas Gerais e de outras regiões vitivinícolas brasileiras. E seu cultivo de inverno permite a expansão da cultura para outros municípios do sul do estado, como é o caso da cidade de Três Pontas que, apesar de ser forte produtor de café, possui a vitivinicultura como uma atividade alternativa. (GONÇALVES, 2015).

Portanto, a vitivinicultura é considerada uma alternativa altamente rentável nesta região e isso se dá pelo manejo diferenciado denominado dupla-poda.

#### **4.2 Terroir**

O termo “*Terroir*” é uma palavra de origem francesa, não possui tradução em nenhum outro idioma. Está relacionada diretamente ao solo e ao microclima particular de uma região o qual irá proporcionar um tipo de matéria prima, que irá expressar a qualidade, tipicidade e identidade de um determinado produto (GILBERT et al, 2014).

A palavra *Terroir* na viticultura, que é o termo utilizado para produção de vinhos, envolve diversos fatores como clima, solo, cultivar, práticas humanas e o local onde todos esses fatores interagem e se relacionam. Além disso, considera os atributos sensoriais do

vinho com as condições ambientais onde as uvas são cultivadas. O ambiente natural de uma determinada região produtora de vinhos, onde todos os aspectos do ambiente como também do ser humano estão relacionados, contribuirá para a especificidade do vinho. Com essas características, permite-se ao produtor agregar valor ao seu produto (BOKULICH et al, 2013).

A produção de vinhos finos está ligada à noção de *terroir*, cuja expressão considera uma determinada região geográfica como uma característica distintiva que diferencia o produto das demais regiões produtoras. Ou seja, um vinho produzido em uma determinada região ele apresenta características únicas não podendo ser reproduzido em outros lugares mesmo utilizando as mesmas técnicas de vinificação (ANESI, et al., 2015).

Os principais fatores que afetam na identidade dos vinhos são em grande maioria as castas, região de origem, trações culturais. No entanto condições climáticas são determinantes no período de crescimento da videira, assim como para o desenvolvimento do broto até o momento da colheita, são fatores que estão intimamente ligados a qualidade do fruto assim como do vinho (SANTOS et al., 2011).

As propriedades físicas e químicas que o solo apresenta, estão diretamente relacionadas com a nutrição da videira e conseqüentemente com o fruto que influenciará no produto final o vinho (PRADO et al., 2007) esses elementos minerais, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e aromas são fatores intimamente ligados as características das uvas de cada região, acarretando mudanças nas propriedades sensoriais e químicas (GUERRA et al., 2005).

### **4.3 Microbiota *Terroir***

Para a elaboração de um vinho de qualidade, é necessário a se obter uvas com características favoráveis, a qual é condicionada pelas condições de clima e solo (ROSA; SIMÕES, 2004). Entretanto, a presença de microrganismos é fundamental para a qualidade da videira, da uva e conseqüentemente do vinho, devido sua importância na ação contra patógenos, degradação de substâncias produzidas por fungos e controle natural de microrganismos deterioradores (CAPOZZI et al., 2015; BARATA et al., 2012).

A microbiota *terroir* do vinho caracteriza-se como a biodiversidade microbiana correlacionada com as características edafoclimáticas específicas de uma determinada região, a qual apresenta influência direta na qualidade e nas características sensoriais do produto (CAPOZZI et al., 2015; BOKULICH et al., 2013).

O conceito de *terroir* envolve características distintas da microbiota de uma localização geográfica além de diferentes propriedades sensoriais. Microrganismos

desempenham papéis fundamentais na produção de commodities agrícolas de qualidade, através de suas características de disponibilidade de nutrientes agrícolas através de interações rizosféricas, supressão de doenças das culturas e promoção do crescimento vegetal (PHILIPPOT et al, 2013).

Uma vez que os microrganismos apresentam relevante importância no *terroir* dos produtos produzidos em uma determinada região, proporcionando características únicas ao produto, é indiscutível a importância de propostas de assinaturas geográficas desses microrganismos, garantindo assim, a qualidade e uniformidade na produção (KNIGHT et al., 2015).

Principalmente os fungos influenciam significativamente as características do vinho, afetando o desenvolvimento da videira e da fruta, como também o sabor, aroma entre outras características do vinho, devido principalmente suas ações durante os processos fermentativos (SWIEGERS, 2009). Durante a fermentação alcoólica a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, não apenas converte açúcares em etanol, mas também produz uma variedade de metabólitos secundários, incluindo compostos voláteis, que são importantes para o aroma do vinho (LAMBRECHTS, 2000). Entretanto, compostos derivados das uvas também podem interferir nessas características sensoriais.

Os microrganismos desempenham um papel crucial na produção do vinho, principalmente nos processos fermentativos. As leveduras contribuem através da fermentação alcoólica e na fermentação malolática, a contribuição por bactérias lácticas ocorre onde há transformação do ácido málico em ácido láctico (LERM et al., 2010), influenciando nas características sensoriais do vinho, reduzindo a sua acidez e favorecendo o seu sabor e aroma (REVEL et al., 1999).

Estudos baseados em métodos independentes de cultura, investigaram as comunidades microbianas associadas com uvas e o vinho (BOKULICH et al., 2013; TAYLOR et al., 2014). Alguns autores enfatizam, que a comunidade microbiana indígena associada a variedades de uvas de locais específicos, consistem em uma fonte de metabólitos distintos e reproduzem um autêntico *terroir* na região (HEARD 1999). A distribuição geográfica dos microrganismos associados ao vinho foi estudada em vinhedos de diferentes regiões BOKULICH et al., 2013, TAYLOR et al., 2014, SETATI et al., 2012). A partir desses estudos, pode-se afirmar que a dinâmica e biodiversidade dos vinhos é resultado de uma caracterização espacial e temporal dos microrganismos.

O conhecimento do microbioma e sua dinâmica para compreender os fatores ecológicos que explicam essa biodiversidade, são considerados um desafio para a enologia. Um estudo

recente utilizou uma abordagem metagenômica para descrever as comunidades microbianas naturais, tanto fungos como bactérias, associados a fermentações espontânea de vinho. O microbioma do vinho, de algumas vinícolas portuguesas, com denominação de origem, foi totalmente caracterizado em diferentes estágios de fermentação: início e término das fermentações alcoólicas. Durante o processo de fermentação do vinho ocorreu um maior impacto nas populações de fungos quando comparados com as comunidades bacterianas, e a evolução da fermentação demonstrou uma perda dos microrganismos ambientais (PINTO et al.; 2015).

Além do controle contra plantas daninhas, microrganismos rizosféricos isolados de áreas de cultivo de videiras, apresentam importância quanto a supressão de patógenos como os nematóides, sendo demonstrado por Erwin et al. (2011), que diversos microrganismos apresentaram potencial de controle da população e densidade dos nematóides, bem como na promoção do crescimento vegetal, devido a produção de hormônios de crescimento, sendo indicado sua inoculação em solos de vinhedos ou mesmo como inoculantes em mudas de videiras, a fim de, controlar os nematóides e também auxiliar no crescimento e desenvolvimento das mudas.

Alterações ambientais globais influenciam na estrutura e função dos seres vivos nos ambientes, estudos têm demonstrado que a adaptação das plantas a condições adversas está correlacionada com a simbiose microbiana, através de grupos funcionais como fungos micorrízicos, bactérias fixadoras de nitrogênio, bactérias diazotróficas, entre outros microrganismos endofíticos (GODDARD, 2008), auxiliando as plantas em respostas rápidas a ambientes que mudam rapidamente.

Estudos em ecologia microbiana em áreas de vinhedos têm como objetivo definir microrganismos que ao serem inoculados melhorem a qualidade do solo e conseqüentemente a qualidade da produção. Essas práticas alteram o *terroir* microbiano e ajudam a produzir um *terroir* adequado em outras regiões, gerando vinhos com características diferentes e particulares. Entretanto, para se obter sucesso na inserção de determinados microrganismos no ambiente, são necessários estudos que caracterizem melhor as relações entre as videiras e os microrganismos; o conhecimento do papel funcional desses microrganismos e uma análise da microbiota presente com elementos regulatórios, associados as plantas e também nas fases de fermentação do vinho (GILBERT et al., 2014).

#### 4.4 Metagenômica

Análises da metagenômica representa uma impressão digital específica de determinado habitat, através genes específicos daquele ambiente e de análises comparativas. Esta análise pode nos dar resposta em relação a complexidade de determinado local, definindo assim um diagnóstico ambiental (TRINGE et al., 2005).

Os progressos em relação a análise molecular da ecologia microbiana tem demonstrado que os métodos tradicionais de cultivo não representam uma diversidade microbiana real, subestimando as populações reais, devido as dificuldades encontradas pelos métodos de cultivo. Desta forma com o desenvolvimento dos métodos independente de cultivo de análise moleculares, se torna possível estudos entendimento da fisiologia e função dos microrganismos no ambiente (RONDON et al., 2000).

De acordo com Handelsman (2004) a metagenômica refere-se a toda comunidade genômica de determinado ambiente. Em relação a estudos da metagenômica dos microrganismos, os trabalhos envolvem a extração e clonagem do DNA para posterior identificação. Assim, o desenvolvimento dessa técnica demonstrou evidencias que microrganismos, não cultiváveis, representam a maior diversidade de organismos da Terra. Com isto fica claro que os estudos da diversidade microbiana no solo ainda são pouco explorados, uma vez que, a maioria da diversidade microbiana ainda não foi descoberta, a estimativa que há cerca de  $4-6 \times 10^{30}$  células de microrganismos procarióticos na Terra. Entretanto, cerca de 95% desses microrganismos ainda não foram caracterizados, portanto é uma fonte inesgotável de diversidade metabólica e genética (FIERER et al., 2007; VAKHLU et al., 2012).

Segundo Handelsman (2004) a metagenômica pode ajudar a compreender a ecologia de microrganismos principalmente em locais extremos como em águas termais, profundas e ácidas, solo desértico, congelados, microbiota humana e a relação entre microrganismos, plantas e outros organismos. Assim, com o avanço dessa tecnologia, surge campo para diversos cientistas melhorarem a compreensão desses sistemas, fornecendo suporte através da expressão dos genes a construção de livrarias, desenho de vetores, além de pesquisas descoberta de novos antibióticos e enzimas, sendo alvo de novas aplicações biotecnológicas (SCHLOSS E HANDELSMAN, 2003).

Outras aplicações dos estudos de metagenômica são em relação as atividades agrícolas, as quais podem auxiliar na avaliação de impactos causados pela atividade antrópica em ecossistemas frágeis, como os solos de cerrado (SOUZA et al., 2016). Além da relação do

impacto no solo, a metagenômica em regiões agrícolas também pode servir de ferramenta para entender a dinâmica dos microrganismos e sua relação com plantas, e conseqüentemente com o sistema produtivo. Como é o caso das videiras, a qual discutida anteriormente, a qualidade do vinho apresenta extrema relação com os microrganismos presentes nesses ambientes (BARATA et al., 2012).

Estudos de metagenômica em áreas de vinhedos podem apresentar além do conhecimento dos microrganismos que se relacionam com a qualidade do vinho, possíveis fitopatógenos que podem prevalecer em determinadas regiões. Segundo Setati et al. (2015) o ecossistema de fungos fitopatogênicos em vinhedos diverge muito significativamente de acordo com a região e a vinha.

Existe uma importante influência dos microrganismos na qualidade do vinho, e a metagenômica é uma ferramenta que pode auxiliar no entendimento dessa relação. Devido a análise da composição taxonômica e abundância dos microrganismos nas uvas, apresenta, não somente valores de abundância de microrganismos como também suas classes funcionais, os quais são afetadas diretamente por fatores abióticos como temperatura, umidade e ventilação (SALVETI et al., 2016). Castañeda e Barbosa (2017) avaliando a diversidade funcional e taxonômica dos microrganismos do solo, em regiões de vinhedo orgânicos com solo de florestas no Chile, demonstraram que o microbioma das videiras era semelhante ao da floresta. Entretanto, os dois habitats apresentaram diferenças na composição funcional da microbiota, podendo esses resultados estar correlacionados com uma fonte de microrganismos das áreas de floresta para as regiões dos vinhedos, os quais permitem o desenvolvimento sustentável desses vinhedos, mantendo as características típicas dos vinhos dessa região.

A abordagem para a classificação microbiológica desses ambientes, através da metagenômica, ocorre pela amplificação dos genes conservados entre os microrganismos como o 16S para bactérias e a região ITS para eucariotos, envolve além do sequenciamento e identificação dos microrganismos, podendo definir tanto a composição filogenética dos ambientes, bem como pela construção do genoma funcional (VAKHLU et al., 2012). A identificação dos microrganismos procariotos consiste no sequenciamento da subunidade menor do ribossomo (16S rRNA) a qual é amplificada através de *primers* universais que são baseados nas sequências conservadas desses organismos, com os genomas amplificado, é realizado um depósito em uma livraria de clones. Esses clones são posteriormente identificados, podendo ser utilizados para essa identificação os sequenciadores de Sanger ou os sequenciadores de nova geração (NGS) (MARDIS, 2007), com essa identificação é possível realizar uma análise da composição filogenética do ambiente, bem como pela sua

composição funcional (VAKHLU et al., 2012). Entretanto, com o avanço das tecnologias para identificação, possibilitou uma identificação mais rápida e eficiente do genoma, gerando assim, certa complexidade devido ao alto volume de dados, requerendo análises específicas de bioinformática para tratamento, análise e interpretação dos resultados (HARDWICK et al., 2017).

## **5 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Devido a grande importância dos microrganismos na escala produtiva da videira, a partir do presente trabalho, pode-se compreender a dinâmica da microbiota bacteriana nas uvas viníferas em um determinado período, através das técnicas de metagenômica e de isolamento de algumas bactérias. Além disso, pode-se constatar que é de fundamental importância, estudos nesse sentido, para auxiliar na determinação da denominação de origem dos vinhos da região Sul de Minas Gerais, considerando que propriedades únicas e favoráveis podem ser encontradas nessas localidades, devido a presença de microrganismos adaptados a essa região.

O isolamento e cultivo de algumas bactérias demonstraram que existe uma variedade de espécies bacterianas, que podem auxiliar em estudos futuros para conhecer as características fisiológicas e possíveis aplicações biotecnológicas das mesmas.

Para o maior conhecimento da diversidade bacteriana presentes nos vinhedos, a identificação molecular dos isolados obtidos é de extrema importância. A partir desses resultados, será possível, através de trabalhos futuros, uma seleção de culturas iniciadoras, para o desenvolvimento de um produto com qualidade e uniformidade de produção.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, A. Z. **Syrah/Shiraz: uma mesma uva no velho e no novo mundo**. Disponível em: . Acesso em: 28/08/2017
- AMORIM, D. A.; FAVERO, A. C.; REGINA, M. A. Produção extemporânea da videira, cv. Syrah, nas condições do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 327-331, 2005.
- ANDRADE, M. J. et al. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 48-58, 2006.
- ANDRÉS-DE-PRADO, R., YUSTE-ROJAS, M., SORT, X., ANDRÉS-LACUEVA, C., TORRES, M., & LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Effect of soil type on wines produced from *Vitis vinifera* L. cv. Grenache in commercial vineyards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 55, p 779- 786, 2007.
- ANESI, A.; STOCCHERO, M.; SANTO, S. D.; COMISSO, M; ZENONI, S.; CEOLDO, S.; TORNIELLI, G. B.; SIEBERT, T. E.; HERDERICH, M.; PEZZOTI, M.; GUZZO, F. Towards a scientific interpretation of the terroir concept: plasticity of the grape berry metabolome. **Plant biology**, v.15, p. 1-17, 2005.
- BAE, S.; FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Occurrence and significance of *Bacillus thuringiensis* on wine grapes. **International journal of food microbiology**, v. 94, p. 301-312, 2004.
- BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International journal of food microbiology**, v.153, p.243-259, 2012.
- BERG, G.; EBERL, L.; HATMANN, A.; Minireview The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1673-1685, 2005.
- BOKULICH, N. A.; THORNGATE, J. H.; RICHARDSON, P. M. MILLS, D. A. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **PNAS**, v. 25, p. 139-148, 2013.
- CAPOZZI, V.; GAROFALO, C.; CHIRIATTI, M. A.; GRIECO, F.; SPANO, G. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. **Microbial research**, v. 181, p.75-83, 2015.
- DIAS, F. A. N. Desempenho da videira Syrah sobre diferentes porta-enxertos em ciclo de inverno no Sul de Minas Gerais. 2011. 74p. **Dissertação** (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- DOORNBOS, R. F.; LOON, L.C.; VAN, L.C.; BAKKER, P.A. H. . Impacto f root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. **Agron. Sustain. Dev**, v. 32, p. 227-243, 2012.

- ERWIN, A.; MARTENSSON, A.; PERSSON, P. Screening of rhizosphere bacteria from grapevine for their suppressive effect on *Xinphinema index* Thorne & Allen on in vitro grape plants. **Plant soil**, v. 347, p. 313-325, 2011.
- FAVERO, A.C.; AMORIM, D. A.; MOTA, R. V.; SOARES, A. M.; REGINA, M. A. Viabilidade de produção da videira 'Syrah', em ciclo de outono inverno, na região sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n3, p.685-690, 2008.
- FELDER, D.; BURNS, D.; CHANG, D. Defining microbial terroir: the use of native fungi for the study of traditional fermentative process. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 1, p. 64-69, 2012.
- FLEET, G. H. **Yeasts in food and beverages** eds A. QUEROL, A; FLEET, G. H. in **The yeast handbook** v. 2, p. 1–12 Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2006.
- FLORES-VARGAS, R. D.; O'HARA, G. W. Isolation and characterization of rhizosphere bacteria with potential for biological control of weeds in vineyards. **Journal of applied microbiology**, v. 100, p.946-954, 2006.
- GERMIDA, J. J.; SCILIANO, S. D.; FREITAS, J. D.; SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) **Federation of European microbiological societies**, v. 26, p. 43-50, 1998.
- GILBERT, J. A.; LELIE, D. V. D.; ZARRAONAINDIA, I. Microbial *terroir* for wine grapes. **PNAS**, v. 111, p. 5-6, 2014.
- GLICK, B. R. Plant growth promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963-401, 2012.
- GODDARD, M. R.; ANFRANG, N.; TANG, N.; GARDNER, R. C.; A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. **Environ Microbiol**, v. 12, p. 63-73, 2010.
- GONÇALVES, D. A. R. Aspectos fisiológicos de videiras sob o manejo da dupla-poda no Sul de Minas gerais. 2015. 59 f. **Dissertação** (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- GREEN, J. L.; BOHANNAN, B..J.M., WHITAKER, R. J. Microbial Biogeography: From Taxonomy to Traits. **Science**, v. 320, p. 1039-1042, 2008.
- GUERRA, C.C. Compostos fenólicos do vinho. In: Vinho e Saúde: vinho como alimento natural, 2005, Bento Gonçalves. Simpósio Internacional Vinho e Saúde. Bento Gonçalves: **Ibravin**, 2005. p. 39-40.
- HALLMANN, J.; HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 914, p. 895-914, 1997.
- HEARD, G. Novel yeast in winmaking – looking to the future. **Food Australia**, v. 51, p 347-352, 1999.

KNIGHT, S.; KLAERE, S.; FEDRIZZI, B.; GODDARD, M. R. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-10, 2015.

LAMBRECHTS, M. G. & PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance to wine aroma - a review. **South African Journal of Enology and Viticulture** v. 21, p. 97–129, 2000.

LERM, E.; ENGELBRECHT, L.; TOIT, M. Malolactic Fermentation: The ABCs of MLF. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 31, p. 186-212, 2010.

MATEO, E. M.; MEDINA, A.; MATEO, F.; VALLE-ALGARRA, F. M.; PARDO, I.; JIMENES, M. Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. **Food control**, v. 21, p. 23-28, 2010.

MENDONZA, L. M. NADRA, M. C. M.; FARÍAS, M. E. Antagonistic interaction between yeast and lactic acid bacteria of oenological relevance. Partial characterization of inhibitory compounds produced by yeasts. **Food research international**, v. 43, p. 1990-1998, 2010.

MOLINARIA, G.; NETO, J. P. J. Perspectivas do mercado da vitivinicultura e desafios para os vinhos brasileiros. **Anais do VII salão internacional de ensino, pesquisa e extensão – Universidade Federal do Pampa**. 2016.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras, Universidade Federal Lavras, 2006. 729p.

NIELSEN, D. S. et al..The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 168e186, 2001.

OLGUIN, N. CHAMPOMIOER-VERGES, M.; ANGLADE, P.; BARAIGE, F.; CORDERO-OTERO, R.; BORDONS, A.; ZAGOREC, M.; REGUANT, C. Transcriptomic and proteomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 response to ethanol shock. **Food microbiology**, v. 51, p. 87-95, 2015.

PEIFFER, J. A.; KOREN, O.; JIN, Z.; TRINGE, S.G.; DANGL, J. L.; BUCKLER, E. S.; LEY, R. E.. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. 6548-6553, 2013.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; VAN DER PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 789-799, 2013.

PINTO, C.; PINHO, D.; CARDOSO, R.; CUSTODIO, V.; FERNANDES, J.; SOUSA, S.; PINHEIRO, M.; EGAS, C.; GOMES, A., C. Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-13, 2015.

PRADO, R. A.; ROJAS, M. Y.; SORT, X.; LACUEVA, A.; TORRES, M.; RAVENTOS, R. M. Effect of soil type on wines produced from *Vitis vinifera* L. Cv. Grenache in commercial vineyards. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 779-786, 2007.

REGINA, M. A.; AMORIM, D. A.; FAVERO, A. C.; MOTA, R. V.; RODRIGUES, D. J. Novos pólos vitícolas para produção de vinhos finos em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 234, p. 111-118, 2006.

REGINA, M. A.; FRAGUAS, J. C.; ALVARENGA, A. A.; SOUZA, C. R.; AMORIM, D. A.; MOTA, R. V.; FAVERO, A. C. Implantação e manejo do vinhedo para produção de vinhos de qualidade. **Informe Agropecuário**, v.27, n.234, p.7-15, 2006.

REVEL, G.; MARTIN, N.; PRIPS-NICOLAU, L.; LOUNVAUD-FUNEL, A.; BERTRAND, A. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. **Journal agriculture and food chemistry**, v. 47, p. 4003-4008, 1999.

ROSA, S. E. S.; SIMÕES, P. M. Desafios da vitivinicultura brasileira. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 19, p. 67-90, 2004.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **Federation of European microbiological societies**, v. 278, p. 1-9, 2008.

SANTOS, A.O.; HERNANDES, J.L.; PEDRO JÚNIOR, M.J.; PEREIRA, S.E. Composição da produção e qualidade da uva em videira cultivada sob dupla poda e regime microclimático estacional contrastante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.1135-1154.

SANTOYO, G., MORENO-HAGELSIEB, G., OROZCO-MOSQUEDA, M., GLICK, B. R.; Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, 2016.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, p. 303-310, 2003.

SCHWEITZER, J. A.; BAILEY, J. K.; FISCHER, D. G.; LEROY, J. C.; LONSDORF, E. V.; WHITHAM, T., G.; HART, S. C. Plant–soil–microorganism interactions: heritable relationship between plant genotype and associated soil microorganisms. **Ecological Society of America**, v. 89, p. 773–781, 2008.

SETATI, M.; JACOBSON, D.; ANDONG, U.; BAUER, F.; The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. **PLOS ONE**, v. 7, p. 1-11.

SOUZA, R. C. ; MENDES, I. C.; JUNIOR, F. B. R.; CARVALHO, F. M.; NOGUEIRA, M. A.; VASCONCELOS, A. T. R.; VICENTE, V. A.; HUNGRIA, M. Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: How fragile in the Brazilian cerrado? **BMC microbiology**, v. 16, p. 1-15, 2016.

SUZZI, G. From wild strain to domesticated strain: the philosophy of microbial diversity in foods, **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1-3, 2011.

SWIEGERS, J. H.; KIEVIT, R. L.; SIEBERT, T.; LATTEY, K. A.; BRAMLEY, B. R.; FRANCIS, I. L.; KING, E. S.; PRETORIUS, I. S. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. **Food microbiology**, v. 26, p. 204–211, 2009.

TAYLOR, M. W., TSAI, P., ANFANG, N., ROSS, H. A., AND GODDARD, M. R. Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. **Environmental Microbiology**, v.16, p. 2848–2858, 2014.

ZARRAONAINDIA, I.; OWENS, S. M.; WEISENHORN, P.; WEST, K.; HAMPTON-MARCELL, J.; LAZ, S.; BOKULICH, N. A.; MILLS, D. A.; MARTIN, G.; TAGHAVI, S.; LELIE, D. V. D.; GILBERT, J. A. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. **mBio**, v. 6, p. 1-10, 2015.

## **CAPÍTULO 2: Caracterização do *terroir* bacteriano de vinhedos da região Sul de Minas Gerais**

### **Resumo**

O cultivo de uvas viníferas no sul do Estado de Minas Gerais é uma cultura ainda em expansão a qual demanda diversas pesquisas para auxiliar no seu desenvolvimento. É uma atividade que vem se consolidando devido a qualidade dos seus produtos em principal dos vinhos, com destaque a casta Syrah, a qual apresentou melhor adaptação as condições edafoclimáticas da região. Assim, o conhecimento da microbiota *terroir* é de fundamental importância devido aos já conhecidos efeitos benéficos dos microrganismos em relação tanto a produção dos vinhos como no cultivo das plantas. Em especial as bactérias apresentam importante atuação nesse contexto, como na fermentação malolática, produção de fitohormônios, produção de compostos voláteis e degradação de micotoxinas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o *terroir* bacteriano das uvas viníferas, através de isolamento e identificação de bactérias cultiváveis e análises de metagenômica, utilizando sequenciamento de nova geração para identificação. Os dados gerados foram analisados por análise de componentes principais e demonstraram que as bactérias identificadas na metagenômica apresentam uma distribuição uniforme nos dois vinhedos estudados. Sendo os principais filos identificados os *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Bactereoidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacterias* e *Proteobacterias*, em relação as espécies que apresentaram maior predominância no vinhedo 1 foram *Fusobacterium* sp. e *Streptococcus* sp. e para o vinhedo 2 *Lactobacillus salivarius* e *Rothia aeria*. Assim, com o presente trabalho, pode-se identificar as bactérias presentes nos vinhedos, os quais são responsáveis pelo *terroir* bacteriano, e interferem na qualidade dos vinhos e conseqüentemente nos processos de denominação de origem.

**Palavras-chave:** Metagenômica; Bactéria; *Vitis vinifera*.

**Abstract**  
**GENERAL ABSTRACT**

The cultivation of grapes in southern of Minas Gerais state is a culture still in expansion which demand several researches for help in it's development. Is an activity that's consolidation due the quality of it's products in principally the wine, with highlighting the Syrah cultivate, that's showed the best adaptation of edafoclimatic conditions. Thus, the knowledge of microbial terroir is of fundamental importance due the already known beneficial effects of microorganisms in relation both the wine production as in plants cultivate. In special the bacteria show important actuation in these context, as in malolatic fermentation, fito-hormones production, volatile compunds production and micotoxins degradation. Thus, the present work had as objective characterize the bacterial terroir of grape wines, through the isolament and identification of cultivated microorganisms and metagenomic analyze, utilizing the new generation sequence for identification. The date were analyzed by principal component analyze, showing that bacteria identified in metagenomic showed a uniformed distribution in two vineyard. Being the main phylum identified as Fusobacteria, Actinobacteria, Bactereoidetes, Firmicutes, Fusobacterias and Proteobacterias, in relation the species that showed the major predominance in vineyard 1 was Fusobacterium sp. and Streptococcus sp. and for vineyard 2 Lactobacillus salivarius and Rothia aeria. Thus, with the present work, one can identify as in a presentation of the vineyards, those that are responsible for having bacterial, and interfere in the quality of the wines and, consequently, in the processes of denomination of origin.

**Keywords:** Metagenomic, bacteria, Vitis vinifera

## 1. Introdução

A região Sul do estado de Minas Gerais no Brasil vem se destacando na produção de vinhos finos, utilizando para a produção das uvas uma técnica denominada dupla poda, a qual permite a produção das uvas em um ciclo diferenciado, denominado ciclo de inverno, devido as características climáticas serem mais favoráveis a produção, destacando-se a variedade Syrah, a qual melhor se adaptou as características edafoclimáticas dessa região (FAVERO et al., 2008). Estudos demonstram que a região Sudeste do Brasil, como em Minas Gerais, após a inversão do ciclo produtivo da videira, as uvas apresentaram maior concentração de açúcar, maturação plena e compostos fenólicos que contribuem para a produção de um vinho fino de qualidade. O manejo de dupla poda demonstrou uma ferramenta eficaz para melhorar as condições de matéria prima e tornar a região do Sudeste do Brasil, promissora para a produção de vinhos de qualidade (FAVERO et al., 2011).

Como se trata de uma produção nova nessa região, o conhecimento das características que interferem na qualidade da produção das uvas e do vinho ainda é incipiente, surgindo então, a necessidade do conhecimento do *terroir*, o qual pode ser definido pela relação entre fatores regionais e a qualidade sensorial do vinho (BOKULICH et al., 2016), entre esses fatores pode-se citar, as características físicas e químicas do solo, temperatura, tratos culturais, disponibilidade de água, além da presença de microrganismos (LEEUEWEN and SEGUIN, 2006). Bactérias, fungos e leveduras influenciam na qualidade do vinho, devido aos processos fermentativos, como a fermentação alcoólica e malolática (BLEVE et al., 2016), além da produção de compostos fenólicos (OKCU et al., 2016; JARA et al., 2016), diminuição da acidez e melhorias no sabor e aroma (REVEL et al., 1999).

A caracterização da microbiota *terroir* pode contribuir para o entendimento da dinâmica das comunidades microbianas, e influência nas alterações da composição química dos vinhos, gerando novas perspectivas em relação aos processos tradicionais de produção (SALVETTI et al., 2016). Além disso, permitindo a correlação das características dos vinhos com a região de cultivo (RIVIEZZO et al., 2017), uma vez que microrganismos autóctones podem apresentar características próprias devido a processos de seleção e características gênicas (BOKULICH et al., 2013; TOFALO et al., 2013). Com essa caracterização, surge a necessidade de uma padronização e segurança em relação à denominação de origem dos produtos, os quais são protegidos por órgãos como o *Protected Designation of Origin* na Europa e *American Viticultural Areas* nos Estados Unidos (BOKULICH et al., 2016).

Salveti et al. (2016) caracterizou a microbiota de uvas v niferas na região de Gargagnago na Itália, e demonstraram a importância dos microrganismos na produ o de metabólitos que quais influenciam diretamente na qualidade do vinho, identificando os principais g neros de bactérias como *Clostridium*, *Paenibacillus*, *Pantoeae* e *Pseudomonas*. Já Campanaro et al. (2014) identificaram os principais g neros de bactérias encontrados em uvas frescas como sendo *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Glucanacetobacter*, *Fructobacillus* e *Tatumella*. Entretanto, após 30 dias de fermenta o, houve uma redu o do número total de espécies apresentando um aumento e predominância de *Oenococcus* e *Lactobacillus*.

Estudos da dinâmica das comunidades microbianas ajudam a interpretar os processos biológicos realizados por esses microrganismos. Assim, favorece futuras utiliza es de microrganismos em processos biotecnológicos controlados, através do entendimento dos mecanismos de cada espécie, para atua o em processos fermentativos, degrada o de compostos de interesse, manuten o da qualidade das plantas e produ o de compostos secundários que melhoram a qualidade do vinho (CAMPANARO et al, 2014; MATEO et al., 2009; OKCU et al., 2016).

Uma das maneiras em se definir a comunidade microbiana de determina região ou amostra, são por estudos de metagenômica, que refere-se a toda comunidade genômica. Como esses estudos abrangem todo o material genético presente na amostra,   necessário uma filtragem em rela o aos *primers* que irão amplificar somente genes de interesse. No caso de bactérias, se utiliza apenas a região 16s do RNA ribossomal como marcador filogenético, envolvendo nesses trabalhos a extra o total da amostra, amplifica o e identifica o através de técnicas de seqüenciamento de nova gera o (NGS) (HANDELSMAN, 2004).

Com as técnicas de metagenômica,   possível evidenciar que os microrganismos, de uma forma independente de cultivo representa a maior diversidade de organismos da Terra. Entretanto, os estudos de diversidade microbiana do ambiente ainda não são muito explorados, uma vez que a maioria dos microrganismos ainda não foram cultivados, havendo estimativas que cerca de apenas 5% dos microrganismos presentes na Terra foram identificados, portanto,   uma fonte inesgotável de diversidade g nica e metabólica (FIERER et al., 2007; VAKHLU et al., 2008).

Segundo Handelsman (2004) estudos de metagenômica pode nos ajudar a compreender melhor a ecologia dos microrganismos, principalmente aqueles relacionados   ambientes extremos e também nas rela es entre microrganismos e plantas.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o *terroir* bacteriano de uvas v niferas no Sul do estado de Minas Gerais, através de metodologias dependente e

independente de cultivo, correlacionando os resultados com a qualidade das uvas e consequentemente do vinho.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Amostragem das uvas e solo

As uvas avaliadas no presente trabalho são pertencentes à *Vitis vinífera* da casta Shyrah, cultivadas nos municípios de Três Pontas (Vinhedo 1) e Três Corações no Sul do estado de Minas Gerais (Vinhedo 2) (Figura 1).

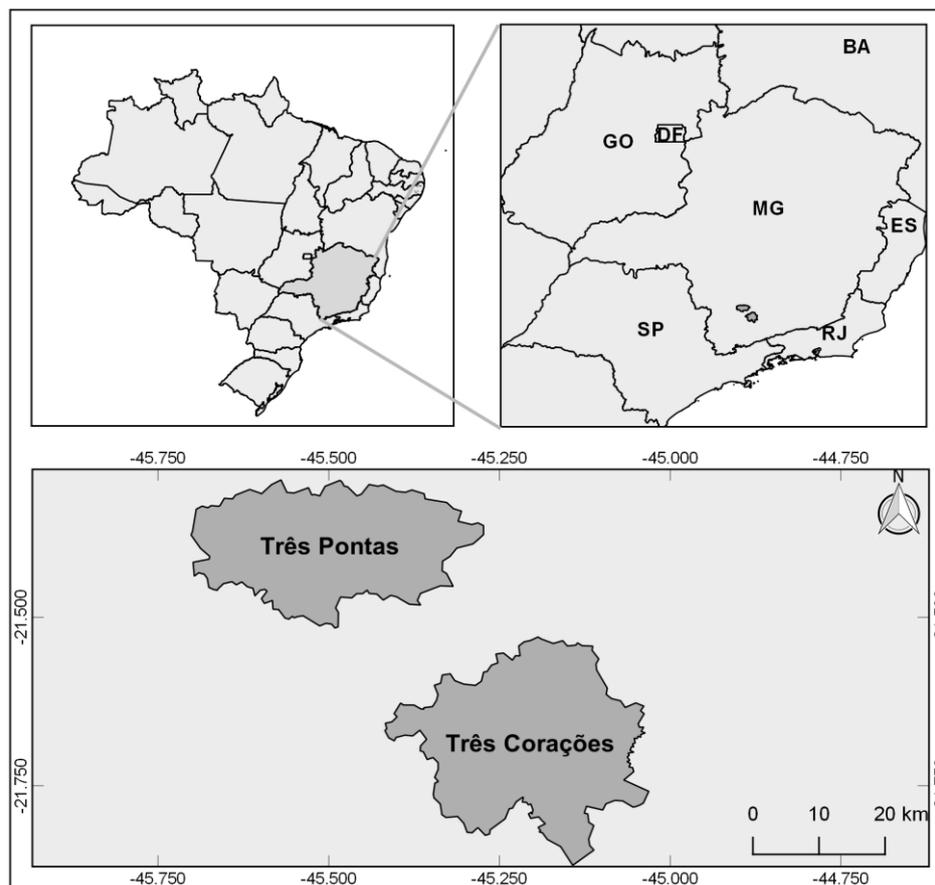


Figura 1. Identificação geográfica dos municípios Três Pontas-MG e Três Corações-MG, onde estão presentes os vinhedos 1 e 2 respectivamente. Fonte: autor.

As amostras foram coletadas ao final da safra do ano de 2015, utilizando um traçado em transecto diagonal ao longo dos vinhedos. Para caracterização da área amostral, foram coletadas amostras de uva e solo de três plantas equidistantes (P1, P2 e P3), desprezando-se as extremidades do vinhedo. A localização geográfica de cada ponto amostral está apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras nos Vinhedos 1 e 2, nos municípios de Três Pontas e Três Corações respectivamente.

Vinhedos	Município	Pontos	N/S	E/W	Altitude
		1	21°14'50,79"	45°34'98"	889
Vinhedo 1	Três Pontas	2	21°14'49"	45°34'94"	886
		3	21°14'48"	45°34'89"	883
		1	21°36'49"	45°07'42"	989
Vinhedo 2	Três Corações	2	21°36'47"	45°07'41"	988
		3	21°36'50"	45°07'40"	985

As amostras de solo foram coletadas em cada ponto, utilizando-se de quatro sub-amostras em uma profundidade de 0 -10 cm em um raio de 20 cm da base da planta, de forma a caracterizar os microrganismos rizosféricos. Para a coleta das bagas das uvas, foram escolhidos três cachos sadios por planta.

As amostras foram acondicionadas em sacos plástico estéreis e mantidas resfriadas e levadas ao Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos no departamento de ciência dos alimentos da Universidade Federal de Lavras.

## 2.2. Caracterização físico-química do solo de cultivo

O solo da região da rizosfera dos vinhedos 1 e 2 foram caracterizados quanto sua composição físico-quimicamente. O solo foi analisado no laboratório de fertilidade do solo da Universidade Federal de Lavras, utilizando a extração com Mehlich-1 para potássio, que foi determinado por fotometria e fósforo, analisado por espectrofotometria a 660 nm (DEFELIPO; RIBEIRO, 1997). O pH do solo foi medido a partir de 1:2.5 da suspensão solo:água, utilizando-se pHmetro de bancada (Micronal®). Teores de Ca e Mg foram determinados por espectrometria de absorção atômica, e Al, por titulação ácido-base (DEFELIPO; RIBEIRO, 1997). O potencial de acidez (H + Al) foi estimado por uma equação com base no pH determinado em solução de tampão (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 1997). O cálculo de bases trocáveis (SB) foi considerado como a soma dos teores de Ca, Mg, Na e K (MALAVOLTA et al., 1994).

Observa-se nas análises físico-químicas do solo (tabela 2) que a composição é praticamente a mesma nos dois vinhedos com exceção para o P e Mn no vinhedo 1 que

apresentou valores de 183,51 mg/dm<sup>3</sup> e 99,46 mg/dm<sup>3</sup> respectivamente, já o vinhedo 2 apresentou valores de 31,02 mg/dm<sup>3</sup> para o P e 10,9 mg/dm<sup>3</sup> para Mn. Assim, devido a padronização na fertilidade do solo com o objetivo de melhorar a produção das uvas, não há fatores determinantes que possa influenciar na distribuição dos microrganismos nas amostras.

Tabela 2. Classificação físico-química do solo dos vinhedos 1 e 2.

Atributos	Vinhedo 1	Vinhedo 2
pH	5,9	4,7
K (mg/dm <sup>3</sup> )	152	164
P (mg/dm <sup>3</sup> )	183,51	31,02
Ca (cmol/dm <sup>3</sup> )	5,2	3,1
Mg (cmol/dm <sup>3</sup> )	1,9	0,7
Al (cmol/dm <sup>3</sup> )	0	0,1
H+Al (cmol/dm <sup>3</sup> )	3,95	5,77
SB (cmol/dm <sup>3</sup> )	7,49	4,22
T (cmol/dm <sup>3</sup> )	7,49	4,32
T (cmol/dm <sup>3</sup> )	11,44	9,99
V (%)	65,47	42,25
M (%)	0	2,31
MO (dag/Kg)	3,84	3,7
P REM (mg/L)	15,35	7,42
Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	14,28	5,35
Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	31,14	32,76
Mn (mg/dm <sup>3</sup> )	99,46	10,97
Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	4,7	2,97
B (mg/dm <sup>3</sup> )	0,45	0,31
S (mg/dm <sup>3</sup> )	60,72	47,67
Argila (dag/Kg)	50	49
Silte (dag/Kg)	29	30
Areia (dag/Kg)	21	21

### 2.3. Isolamento e caracterização dos microrganismos

Para o plaqueamento, foi utilizado uma grama das amostras (solo e uva) diluídas em 9 ml de água peptonada (0,1%) estéril, procedendo-se a diluição seriada,. Posteriormente alíquotas de 0,1 µl de cada diluição foram semeadas em placas com meio de cultura. Todo o experimento realizado em triplicata. Para o crescimento de bactérias totais, foi utilizado o meio de cultura *Plate count agar* (PCA) (Triptona 5%, Extrato de levedura 2,5%, Glicose 1% e Ágar 15%) por 24 h a 28°C.

Para avaliação das enterobacterias foi utilizado o meio *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB) (Peptona de carne 10%, lactose 5%, Fosfato dipotássio 2%, Eosina y 0,4%, Azul de Metileno 0,065%, sacarose 5% e ágar 15%) por 24 horas a 28°C.

Para a avaliação das bactérias lácticas foi utilizado o meio de cultura MRS agar (Dextrose: 20 %, Agar 12 %, Peptona proteica 10 %, Extrato de carne 10 %, Extrato de

levedura 5 %, Acetato de sódio 5 %, Citrato de amônia 2 %, Fosfato dissódico 2 %, Tween 80 1%, Sulfato de magnésio 0,1%, Sulfato de manganês 0,05 %) por 24 horas a 28°C.

Para análise de actinobactérias no solo, foi utilizado o meio Aaronson (KNO<sub>3</sub> 2%; Caseína 0,8%; NaCl 2%; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 %; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,005%; CaCO<sub>3</sub> 0,002%; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,004%; Agar 15%), incubado por 7 dias a 28°C.

Após a contagem dos microrganismos nas placas com os meios de cultura, foi realizado uma caracterização morfológica das colônias. A análise da morfologia incluiu a observação de tamanho da colônia (análise comparativa), formato, elevação, borda, coloração, aparência, textura e brilho. Para representar os morfotipos obtidos, um total da raiz quadrada do número de isolado de cada morfotipo foi purificado, utilizando a técnica de estrias compostas. Após a caracterização morfológica das colônias, foi realizado uma caracterização das células, avaliando-se a coloração de gram e morfologia celular. Posteriormente, os isolados foram preservados em glicerol (20%) em freezer -20.

#### **2.4. Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF**

De acordo com a caracterização morfológica dos isolados bacterianos foi escolhido uma amostra representativa relativa a raiz quadrada do total de isolados por morfotipo para identificação no MALDI-TOF.

Os microrganismos isolados e purificados foram identificados através da técnica de MALDI-TOF a qual utiliza o perfil proteico conservado de cada espécie para identificação.

As bactérias selecionadas para identificação pelo MALDI-TOF, foram reativadas com 18 horas de cultivo. Após a reativação, cerca de 1 µg de biomassa foi adicionado a um tubo de 500 µg contendo 6 µL de uma solução orgânica, contendo 50 % de água , 47,5 % de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético 2,5% (v/v). As amostras foram agitadas em vortex durante 60s e depois centrifugadas durante 60 segundos a 4000 g em temperatura ambiente. O sobrenadante de cada amostra (1 µL) foi vista sobre a placa de aço inoxidável.

Após o preparo dos isolados, foi realizado o método MALDI-TOF. Esse método se dá pela espectrometria de massa onde as amostras são colocadas em uma placa com uma matriz que em seguida sob a incidência de um laser é evaporada. O sistema ioniza o material volatilizado, que ao chegar aos detectores, registram o tempo de detecção e sua quantidade. Assim, cada microrganismo apresenta um espectro característico que em seguida é analisado por um *software*. Esse método detecta e identifica proteínas pela determinação seu peso molecular individual e fragmentos específicos.

A cepa *Escherichia coli* K12 é normalmente utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF seguindo metodologia descrita por Lima-Neto et al. (2014).

## **2.5. Análise genética das amostras de uva**

### **2.5.1. Extração do DNA total das uvas**

O DNA total das amostras de uva foram extraídas utilizando o Kit para extração de solo MO-BIO, utilizando-se conforme manual de instruções do usuário, uma amostra de 0,25 g das uvas.

### **2.5.2. Sequenciamento de nova geração (NGS)**

A análise de sequenciamento de nova geração foi realizada no sequenciador Illumina pela empresa PontoLabor. Sendo a análise de bioinformática realizada pela própria empresa, onde foi realizada inicialmente a limpeza dos dados, retirando-se os *barcodes* que são as unidades inseridas no DNA extraído para separar as unidades taxonomicas operacionais (OTUs). Em seguida as OTUs foram analisadas e contabilizadas através da frequência obtida nas amostras. Os OTUs foram identificados através da ferramenta *blast* na base de dados do *National center of biotechnology information* (NCBI).

## **2.6. Análises estatísticas**

Para realizar as análises estatísticas multivariada de componentes principais (PCA) entre a distribuição dos grupos taxonômicos dos microrganismos identificados e os pontos amostrais (Vinhedo 1 e 2) foi utilizado o software Statistica 7.0.

## **3. Resultados**

### **3.1. Isolamento e identificação dos microrganismos cultiváveis**

Ao total foram obtidos 1013 isolados nas amostras de uva e solo rizosférico. Esses isolados foram divididos em 100 morfotipos, após classificação realizada por características fenotípicas como, morfologia das colônias e das células. Entretanto, com a técnica de MALDI-TOF não foi possível identificar todos os morfotipos encontrados, devido possivelmente ao banco de dados, não conter informações suficiente relacionada a microrganismos de amostras ambientais. Sendo identificados apenas 15 morfotipos, os quais estão relacionados na tabela 3.

Tabela 3. Identificação dos Morfotipos pela técnica de MALDI-TOF relacionando a população das amostras de solo e uva nas vinícolas 1 e 2.

Morfotipos	Espécie	População (log UFC/g amostra)	Amostra	Vinhedos	Meios de cultura
1	<i>Staphylococcus warneri</i>	3,53	Uva	1	PCA
2	<i>Pantoea agglomerans</i>	3,36	Uva	2	PCA
3	<i>Curtobacterium albidum</i>	3,32	Uva	1	PCA
4	<i>Pantoea agglomerans</i>	3,18	Uva	1	PCA
5	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	4,49	Uva	1	PCA
6	<i>Gluconobacter cerinus</i>	3,20	Uva	1	PCA
8	<i>Arthrobacter oxydans</i>	5,36	Solo	1	PCA
9	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	5,65	Solo	1	PCA
10	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	5,36	Solo	1	PCA
11	<i>Bacillus megaterium</i>	4,78	Solo	2	PCA
12	<i>Bacillus marisflavi</i>	2,70	Solo	2	PCA
13	<i>Bacillus cereus</i>	2,90	Solo	2	PCA
14	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	4,78	Solo	1	PCA
15	<i>Bacillus megaterium</i>	2,78	Solo	2	PCA

Com os dados obtidos de identificação dos microrganismos cultiváveis, foi possível através do MALDI-TOF identificar 15 espécies. Porém, para os outros morfotipos não foi possível a identificação por esta técnica e deverão ser identificados por técnicas moleculares, utilizando *primers* universais que amplificam a região 16S como o 27F e 1392R, que em seguida deverão ser sequenciados e identificados na base de dados do NCBI.

Entre os microrganismos identificados, apenas seis morfotipos foram obtidos nas amostras de uva e apresentaram uma população de cerca de  $10^3$  UFC/g de uva, já para o solo foram identificados 9 morfotipos, sendo que alguns isolados como *Arthrobacter oxidans*; *Arthrobacter polychromogenes*; *Microbacterium liquefaciens* apresentaram uma população de cerca de  $10^5$  UFC/g de solo.

### 3.2. Análise do sequenciamento de nova geração

Com o sequenciamento de nova geração foi possível identificar os principais microrganismos presentes nas bagas das uvas. Sendo possível identificar mesmo aqueles que não podem ser cultivados através dos métodos tradicionais.

A relação dos microrganismos identificados nos vinhedos 1 e 2 podem ser observada na tabela 3, onde esta relacionado a frequência (nº de tags) para cada unidade taxonômica operacional (OTU).

Nas amostras de uvas dos vinhedos 1 e 2 foi possível observar 210 OTUs, com um valor total de 5602 tags para as uvas do vinhedo 1 e 5553 tags para as uvas do vinhedo 2. Tanto para as amostras dos vinhedos 1 e 2 (tabela 4) pode-se observar a predominância de bactérias dos filos *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacterooidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacterias* e *Proteobacterias*.

Tabela 4. Classificação taxonômica das bactérias identificadas por seqüenciamento de nova geração nas amostras de uva nos vinhedos 1 e 2 (Continua)

Número De OTUs	Classificação taxonômica das OTUs	Número de leituras	
		Vinhedo 1	Vinhedo 2
1	<i>Fusobacterium</i> sp.	979	64
2	<i>Streptococcus</i> sp.	832	52
3	<i>Leptotrichia</i> sp.	234	178
4	<i>Leptotrichia</i> sp.	192	121
5	Família: <i>Comamonadaceae</i>	86	64
6	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	79	187
7	<i>Prevotella melaninogenica</i>	340	166
8	<i>Streptococcus agalactiae</i>	68	100
9	<i>Leptotrichia</i> sp.	135	126
10	<i>Corynebacterium</i> sp.	46	145
11	<i>Actinobacillus parahaemolyticus</i>	66	52
12	Família: <i>Rhodocyclaceae</i>	64	46
13	<i>Lactobacillus salivarius</i>	48	379
14	Família: <i>Gemellaceae</i>	50	105
15	<i>Campylobacter</i> sp.	29	40
16	<i>Leptotrichia</i> sp.	34	34
17	<i>Rothia aeria</i>	26	268
18	<i>Porphyromonas</i> sp.	35	33
19	<i>Rothia mucilaginosa</i>	8	97
20	<i>Gluconobacter</i> sp.	126	58
21	<i>Thalassospira xiamenensis</i>	79	58
22	<i>Paludibacter</i> sp.	46	135
23	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	27	26
24	<i>Marinicella</i> sp.	3	149
25	Família: <i>Halomonadaceae</i>	32	75
26	<i>Leptotrichia</i> sp.	47	12
27	<i>Pseudomonas baleárica</i>	50	39
28	<i>Erwinia</i> sp.	1	104
29	<i>Microbacterium</i> sp.	54	182
30	<i>Actinomyces</i> sp.	70	63
31	Classe: <i>Alphaproteobacteria</i>	77	54
32	<i>Streptococcus anginosus</i>	0	73
33	<i>Dialister</i> sp.	17	38

34	<i>Filifactor</i> sp.	33	43
35	<i>Parvimonas</i> sp.	35	18
36	<i>Shewanella</i> algae	8	20
37	Família: <i>Lachnospiraceae</i>	14	14
38	<i>Porphyromonas</i> sp.	20	28
39	<i>Prevotella nigrescens</i>	33	38
40	<i>Peptococcus</i> sp.	19	58
41	Família: <i>Lachnospiraceae</i>	1	126
42	<i>Arcobacter</i> sp.	22	22
43	<i>Prevotella intermédia</i>	21	22
44	<i>Lactobacillus reuteri</i>	36	34
45	<i>Prevotella</i> sp.	14	40
46	<i>Granulicatella</i> sp.	10	14
47	<i>Cardiobacterium</i> sp.	21	14
48	<i>Veillonella díspar</i>	10	8
49	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	18	25
50	<i>Tannerella</i> sp.	19	26
51	<i>Halomonas</i> sp.	7	12
52	Família: <i>Mogibacteriaceae</i>	42	31
53	<i>Neisseria</i> sp.	17	5
54	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	9	12
55	<i>Prevotella</i> sp.	28	13
56	<i>Selenomonas</i> sp.	0	31
57	<i>Aggregatibacter segnis</i>	7	9
58	<i>Thalassospira</i> sp.	2	37
59	Ordem: <i>Bacteroidales</i>	8	23
60	<i>Aggregatibacter</i> sp.	5	33
61	Ordem: <i>Clostridiales</i>	11	8
62	<i>Corynebacterium durum</i>	15	9
63	<i>Prevotella</i> sp.	16	8
64	<i>Lautropia</i> sp.	17	12
65	<i>Scardovia</i> sp.	25	64
66	Família: <i>Dethiosulfovibrionaceae</i>	5	8
67	<i>Peptostreptococcus</i> sp.	14	12
68	<i>Prevotella melaninogenica</i>	6	5
69	Ordem: <i>Actinomycetales</i>	11	6
70	<i>Treponema</i> sp.	10	12
71	<i>Aggregatibacter segnis</i>	16	26
72	<i>Atopobium</i> sp.	9	16
73	<i>Tannerella</i> sp.	4	12
74	<i>Neisseria subflava</i>	17	31
75	<i>Lactobacillus</i> sp.	6	9
76	<i>Wolinella succinogenes</i>	38	26
77	<i>Haemophilus</i> sp.	5	8
78	Família: <i>Hyphomicrobiaceae</i>	0	38
79	Família: <i>Coriobacteriaceae</i>	4	5

80	<i>Treponema</i> sp.	18	21
81	Família: <i>Rhodobacteraceae</i>	2	22
82	Família: <i>Neisseriaceae</i>	5	5
83	Ordem: <i>Chromatiales</i>	2	44
84	Ordem: <i>Bacteroidales</i>	8	12
85	Família: <i>Cytophagaceae</i>	7	6
86	<i>Megasphaera</i> sp.	13	10
87	<i>Pseudonocardia</i> sp.	10	13
88	<i>Desulfovibrio</i> sp.	8	10
89	Família: <i>Hyphomicrobiaceae</i>	19	22
90	Família: <i>Propionibacteriaceae</i>	10	9
91	Família: <i>Mogibacteriaceae</i>	6	6
92	<i>Moryella</i> sp.	3	21
93	<i>Capnocytophaga ochracea</i>	8	18
94	<i>Lactobacillus</i> sp.	8	5
95	<i>Sphingomonas</i> sp.	8	3
96	Família: <i>Veillonellaceae</i>	3	4
97	Família: <i>Lachnospiraceae</i>	7	29
98	Ordem: <i>Clostridiales</i>	6	6
99	<i>Mycoplasma</i> sp.	3	7
100	<i>Pseudoramibacter_Eubacterium</i> sp.	21	20
101	Família: <i>Phyllobacteriaceae</i>	4	17
102	<i>Actinomyces</i> sp.	6	8
103	Família: <i>Peptostreptococcaceae</i>	3	17
104	<i>Shuttleworthia satelles</i>	5	7
105	<i>Prevotella tannerae</i>	5	6
106	<i>Prevotella nanceiensis</i>	9	8
107	<i>Prevotella</i> sp.	7	8
108	<i>Sulfurimonas</i> sp.	3	31
109	<i>Anaerovorax</i> sp.	2	17
110	<i>Oceanibaculum indicum</i>	7	10
111	Ordem: <i>Flavobacteriales</i>	7	4
112	<i>Mycoplasma</i> sp.	30	52
113	Família: <i>Porphyromonadaceae</i>	8	5
114	<i>Campylobacter</i> sp.	8	4
115	<i>Treponema socranskii</i>	3	4
116	Família: <i>Dethiosulfovibrionaceae</i>	1	9
117	<i>Oribacterium</i> sp.	4	5
118	<i>Prevotella</i> sp.	9	5
119	<i>Desulfovibrio</i> sp.	11	14
120	<i>Catonella</i> sp.	3	11
121	Família: <i>Methylobacteriaceae</i>	4	3
122	Família: <i>Rhizobiaceae</i>	1	6
123	<i>Actinomyces</i> sp.	8	18
124	<i>Prevotella</i> sp.	27	29
125	<i>Prevotella</i> sp.	6	9

126	<i>Bulleidia moorei</i>	4	4
127	Família: <i>Rhodocyclaceae</i>	3	2
128	Ordem: <i>Rhizobiales</i>	7	8
129	<i>Methylobacterium</i> sp.	4	9
130	Família: <i>Methylocystaceae</i>	4	1
131	<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	6	0
132	Família: <i>Tissierellaceae</i>	2	26
133	Família: <i>Microbacteriaceae</i>	4	2
134	<i>Denitrobacter</i> sp.	10	2
135	<i>Streptococcus</i> sp.	23	25
136	<i>Leptotrichia</i> sp.	0	9
137	<i>Oribacterium</i> sp.	6	3
138	Família: <i>Actinomycetaceae</i>	3	7
139	Família: <i>Cryomorphaceae</i>	1	3
140	Família: <i>Actinomycetaceae</i>	4	12
141	Família: <i>Flavobacteriaceae</i>	2	4
142	Família: <i>Propionibacteriaceae</i>	1	8
143	Família: <i>Peptostreptococcaceae</i>	1	4
144	<i>Selenomonas</i> sp.	1	3
145	<i>Prevotella</i> sp.	6	2
146	<i>Capnocytophaga</i> sp.	1	20
147	Ordem: <i>Bacteroidales</i>	7	0
148	<i>Clostridium</i> sp.	12	18
149	Ordem: <i>Clostridiales</i>	0	6
150	<i>Actinomyces</i> sp.	4	7
151	<i>Brooklawnia cerclae</i>	1	7
152	<i>Dialister</i> sp.	4	2
153	<i>Sphingomonas</i> sp.	11	1
154	<i>Alicyciphilus</i> sp.	3	3
155	Família: <i>Flavobacteriaceae</i>	5	13
156	<i>Cardiobacterium</i> sp.	1	4
157	<i>Mogibacterium</i> sp.	3	0
158	<i>Capnocytophaga</i> sp.	1	1
159	<i>Treponema</i> sp.	2	1
160	Família: <i>Acidaminobacteraceae</i>	0	6
161	Ordem: <i>Bacteroidales</i>	2	1
162	<i>Ochrobactrum</i> sp.	2	1
163	<i>Buchnera</i> sp.	1	2
164	<i>Dechloromonas</i> sp.	3	4
165	<i>Vibrio</i> sp.	5	0
166	Ordem: <i>Bacteroidales</i>	3	0
167	Ordem: <i>Clostridiales</i>	5	0
168	<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i>	2	6
169	<i>Bacillus cereus</i>	3	4
170	<i>Azoarcus</i> sp.	8	15
171	Família: <i>Comamonadaceae</i>	4	6

172	<i>Acinetobacter</i> sp.	2	0
173	<i>Fusibacter</i> sp.	2	0
174	<i>Leptonema</i> sp.	2	0
175	<i>Enhydrobacter</i> sp.	283	160
176	<i>Arenibacter</i> sp.	37	23
177	<i>Sphingobium</i> sp.	1	3
178	<i>Prevotella melaninogenica</i>	0	2
179	<i>Anaerovorax</i> sp.	1	1
180	Família: <i>Flammeovirgaceae</i>	2	2
181	Classe: <i>Deltaproteobacteria</i>	0	9
182	<i>Syntrophomonas</i> sp.	0	5
183	Família: <i>Anaerolinaceae</i>	1	1
184	Ordem: <i>Actinomycetales</i>	2	1
185	<i>Actinomyces</i> sp.	2	1
186	<i>Propionibacterium acnes</i>	1	9
187	Classe: <i>Gammaproteobacteria</i>	12	6
188	<i>Magnetospirillum</i> sp.	2	2
189	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	5	3
190	Ordem: <i>Ignavibacteriales</i>	4	4
191	<i>Treponema</i> sp.	1	7
192	<i>Pseudomonas</i> sp.	1	2
193	Família: <i>Mogibacteriaceae</i>	1	4
194	<i>Clostridium</i> sp.	5	6
195	Família: <i>Mogibacteriaceae</i>	2	2
196	<i>Devosia</i> sp.	2	1
197	Classe: <i>Deltaproteobacteria</i>	1	3
198	<i>Muricauda</i> sp.	2	2
199	Família: <i>Solibacteraceae</i>	1	1
200	<i>Treponema</i> sp.	4	3
201	<i>Swaminathania</i> sp.	1	1
202	<i>Actinomycetospira</i> sp.	3	0
203	<i>Propionivibrio</i> sp.	2	12
204	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	2	4
205	Família: <i>Comamonadaceae</i>	0	2
206	<i>Sphingobium</i> sp.	1	1
207	Ordem: <i>Bacteroidales</i>	1	7
208	Família: <i>Nakamurellaceae</i>	2	2
209	Família: <i>Coriobacteriaceae</i>	1	4
210	<i>Paracoccus</i> sp._	1	1

(conclusão)

### 3.3. Análise de Componentes Principais (PCA)

Com o objetivo de identificar a correlação entre os diferentes grupos taxonômicos observados nas amostras nos diferentes vinhedos, foi realizado uma análise de componentes principais utilizando a presença e frequência de cada unidade taxonômica operacional para cada ponto amostral. Na figura 2 e 3 observa-se a distribuição dos auto vetores extraídos das componentes principais 1 e 2, as quais compõe de forma acumulada 100% da variância total dos dados.

Na figura 2 observa-se a distribuição dos auto vetores dos dois diferentes pontos amostrais (Vinhedo 1 e Vinhedo 2) e na figura 3 estão representados os valores da distribuição dos auto vetores que correlacionam a distribuição dos microrganismos. Cada ponto representado na figura 3 relaciona-se com os auto vetores observados para cada variável da PCA. Entretanto, só foi identificado na figura os taxons mais representativos e que apresentaram maior correlação com os pontos amostrais. As figuras 2 e 3 estão representadas de forma separada para facilitar a visualização e identificação das variáveis analisadas.

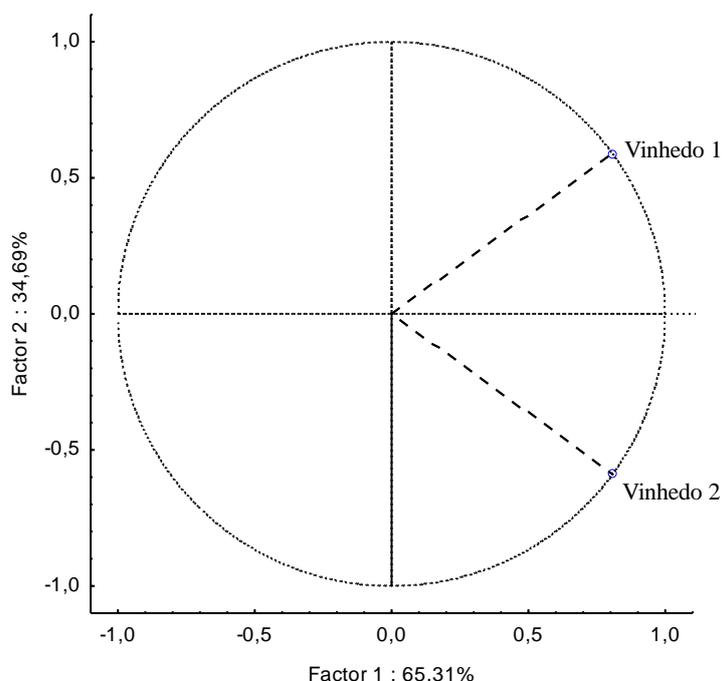


Figura 2. Análise de componentes principais, utilizando os fatores 1 e 2 da análise de componentes principais, demonstrando os valores obtidos para os auto vetores dos vinhedos 1 e 2.

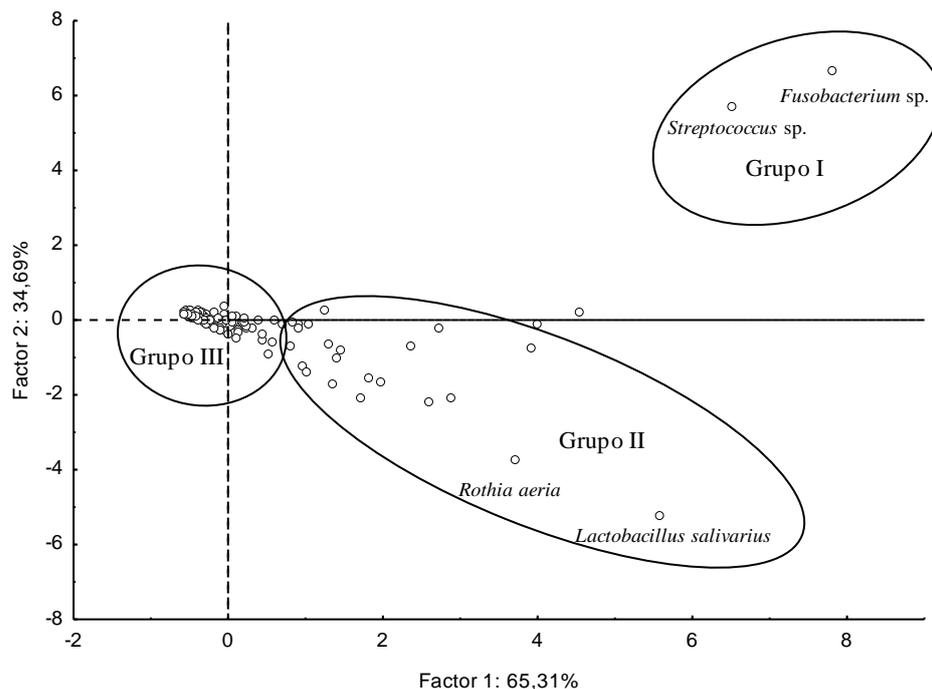


Figura 3. Análise de componentes principais, utilizando os fatores 1 e 2 da análise de PCA, demonstrando os valores obtidos para os auto vetores referentes a frequência dos microrganismos nos vinhedos.

Observa-se na figura 2 que as amostras do vinhedo 1 e 2 agrupam-se em quadrantes diferentes. As amostras do vinhedo 1 apresentaram forte correlação com a presença dos microrganismos *Fusobacterium sp.* e *Streptococcus sp.* que foram os taxons mais representativos da amostra com cerca de 979 e 832 unidades taxonômicas respectivamente (tabela 3).

O vinhedo 2 apresentou forte correlação principalmente com os microrganismos *Lactobacillus salivarius* e *Rothia aeria* (figura 3) com cerca de 379 e 268 unidades taxonômicas respectivamente.

Esses agrupamentos são resultados da correlação da presença e abundância das OTUs nas amostras de cada vinhedo. Mesmo apresentando uma diferença de agrupamento entre os vinhedos 1 e 2 e uma maior diversidade de microrganismos (grupo II) (figura 3) correlacionados ao quadrante do vinhedo 2 em comparação ao vinhedo I (Grupo I) (figura 3), observa-se que a correlação dos microrganismos nos vinhedos não ocorre de forma sistemática, devido a distribuição da maioria dos OTUs não se correlacionar especificamente com determinado vinhedo (grupo III) (figura 3).

#### 4. Discussão

O *terroir* bacteriano dos microrganismos não cultivados dos vinhedos do Sul de Minas Gerais apresentado no presente estudo identificou principalmente os filos *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Bactereoidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacterias* e *Proteobacterias*, os quais apresentam importantes indicadores de qualidade dos produtos, abordando dentro desses grupos tanto microrganismos benéficos as plantas e ao vinho (MARTINS et al., 2012).

Dentro do filo *Firmicutes* são classificados os microrganismos pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, conhecidas como bactérias do ácido lático (BAL) que são bactérias gram positivas, não formadoras de esporos. Apresentam metabolismo homo e heterofermentativo sendo responsáveis pela fermentação malolática, apresentando assim, importante função na produção e qualidade do vinho (RODAS et al., 2003).

Apesar da espécie *O. oeni* normalmente estar correlacionada a uvas viníferas e apresentar relativa importância na qualidade dos vinhos (GUERINI et al., 2003; MATEO et al., 2010), a mesma não foi identificada nas amostras utilizando técnica de NGS. Entretanto, entre os isolados obtidos, e que não foram identificados pela técnica de MALDI-TOF, podem conter essas bactérias. Nas amostras de uvas, as bactérias lácticas identificadas foram *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus reuteri* as quais estavam presentes nas amostras dos dois vinhedos (Tabela 3), estudos demonstraram que esses microrganismos, apesar de não apresentarem função em processos fermentativos na produção dos vinhos, elas podem ser consideradas probióticos, uma vez que apresentam características benéficas a saúde dos seres humanos e outros animais, melhorando o balanço microbiano intestinal (NEVILLE; TOOLE, 2010; LEE et al., 2008).

A caracterização dos compostos é de grande importância para determinar as características de determinados vinhos, podendo assim, caracterizá-los de acordo com a região de produção, nesse sentido, microrganismos são responsáveis pela manutenção da qualidade ou produção desses compostos. Como a atividade de bactérias do ácido acético que apresentam características indesejadas na qualidade do vinho, ou mesmo as bactérias do ácido lático, as quais apresentam características desejáveis, como a

fermentação malolática, sendo essa influência de grande importância para ajudar nos processos de denominação de origem dos vinhos (GIL et al., 2006).

Em trabalho realizado por Papotti et al. (2012) é demonstrado a utilização de compostos de interesse para determinar as características de vinhos protegidos por denominação de origem, como o caso dos vinhos tipo Lambrusco da região de Modena na Itália, entre os compostos observados, os que apresentaram maior correlação com as características dos vinhos foram 2-3 butanodiol e os ácidos láctico, málico e succínico. Assim, esses compostos são produzidos a partir da atividade de microrganismos (SONG; LEE, 2005), justificando a caracterização microbiana das uvas viníferas como auxílio na caracterização de denominação de origem dos vinhos (BARATA et al., 2012). Estando essa qualidade correlacionada com a biogeografia microbiana, que determina o *terroir* microbiano, apresentado por Bokulich et al. (2013), o qual determina que determinadas espécies de microrganismos além de serem responsáveis pela produção de características sensoriais dos vinhos, são únicos de determinada região, sendo o seu conhecimento importante para o estudo da interação entre os microrganismos, fatores climáticos, produção e conseqüentemente, gerando resultados para trabalhos em controle biológico, melhorando a qualidade dos vinhedos e também na qualidade dos vinhos, aumentando a aceitação pelo público.

Não só para o cultivo das plantas, a características físicas e químicas do solos, são importantes para determinar a relação com os microrganismos, os quais compõe o *terroir* microbiano, sendo demonstrado por Burns et al. (2015) efeito do clima, atributos químicos e topografia do solos de cultivo nas comunidades microbianas, como demonstrado por Compant et al. (2011) os microrganismos presentes nas uvas estão relacionados não só aos microrganismos que estavam presentes nas flores, bem como pelos microrganismos rizosféricos, que podem ser transportados para os órgão reprodutivos através dos vasos condutores.

Um fator determinante para a interação dos microrganismos que compõe o *terroir* microbiano é a transferência horizontal de genes, os quais confere características únicas de microrganismos de determinada região, como é o caso de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de vinhos, alguns desses microrganismos apresentam características específicas na parede células, que apresentam características associadas a absorção de aminoácidos que são importantes na síntese de compostos

voláteis específicos. Sendo evidenciado um processo de transferência horizontal desses genes, que estão correlacionados a outras leveduras não *Saccharomyces* e até mesmo de bactérias, obtendo assim, cepas de leveduras que apresentam características gênicas de um mesmo ancestral em comum, mas com características completamente distintas, formando assim, linhagens específicas para a produção de vinhos (TOFALO et al., 2013).

A identificação de microrganismos, tanto dos cultiváveis, quanto os não cultiváveis são de grande importância, não só para determinar a denominação de origem dos produtos, bem como para entender a dinâmica desses microrganismos nas uvas. Bactérias do ácido láctico, devido seus metabólitos de interesse na produção vinho, são focos de estudo, como de Bae et al. (2006) que demonstram uma baixa presença desse grupo nas uvas, e como no presente trabalho, também não foi encontrado espécies de *O. oeni*, podendo sugerir que essas bactérias normalmente não são encontradas nas uvas, salientando que as técnicas para identificação desses microrganismos em específico precisam ser otimizadas. Os autores ressaltam também que dependendo do estado de conservação dos frutos, é possível observar a presença de bactérias lácticas indesejáveis como os *L. lindineri* e *L. kunkeei*.

Além do conhecimento da dinâmica desses microrganismos ao longo do processo de maturação da planta, os quais apresentam um maior número de bactérias gram negativas no início da maturação e um aumento das gram positivas já nos processos finais de maturação, demonstrando também a influência das práticas agrícolas na dinâmica desses microrganismos, principalmente pela utilização de pesticidas a base de cobre o qual pode interferir negativamente na dinâmica desses microrganismos (MARTINS et al., 2014).

O isolamento de microrganismos cultiváveis é pouco expressivo quando comparado a identificação de microrganismos não cultiváveis, que são identificados somente por técnicas moleculares (LOPEZ et al., 2003). Entretanto, o isolamento e a identificação dos microrganismos cultiváveis apresentam a vantagem de futuras aplicações biotecnológicas nos processos de vinificação, controle biológico e manutenção da diversidade microbiana (MATTHEWS et al., 2004; BOKULICH et al. 2013).

## **Conclusões**

O *terroir* bacteriano das amostras de uvas foi caracterizado principalmente pela predominância dos filos *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Bactereoidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacterias* e *Proteobacterias*. Em relação as espécies que apresentaram maior predominância no vinhedo 1 foram *Fusobacterium* sp. e *Streptococcus* sp. e para o vinhedo 2 *Lactobacillus salivarius* e *Rothia aeria*.

Mesmo não sendo identificados todos os morfotipos dos microrganismos cultivados, pode-se observar uma grande variedade em relação ao número de bactérias que apresentou um total de 1063 isolados divididos em 100 morfotipos, os quais posteriormente a sua identificação apresentam uma proposta futura de estudos biotecnológicos, servindo como base para outros estudos, como fermentação, controle biológico, produção de hormônios, produção de compostos de interesse e degradação de toxinas.

A partir dos resultados obtidos com o presente trabalho, pode-se caracterizar a diversidade bacteriana presentes nos vinhedos. Através de trabalhos futuros, torna-se possível, realizar uma seleção de culturas iniciadoras, para o desenvolvimento de um produto com qualidade e uniformidade de produção.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a CAPES, CNPq, FAPEMIG, EPAMIG e EMBRAPA pelo financiamento de bolsa de pesquisa do primeiro autor, financiamento e parceria no projeto. E as fazendas Capetinga e Primeira Estrada pela disponibilidade das amostras.

## Referencias

- BAE, S.; FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. **Journal of applied microbiology**, v. 100, p. 712-727, 2006.
- BARATA, A.; FERREIRA, M. M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International journal of food microbiology**, v. 153, p. 2443-259, 2012.
- BLEVE, G.; TUFANIELLO, M.; VETRANO, C.; MITA, G.; GRIECO, F. Simultaneous alcoholic and malolactic fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* cells co-immobilized in alginate beads. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1-17, 2016.
- BOKULICH, N. A.; COLLINS, T. S.; MASARWEH, C.; ALLEN, G.; HEYMANN, H.; EBELER, S. E.; MILLS, D. A. Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. **Mbio**, v. 6, p. 1-12, 2016.
- BOKULICH, N. A.; THORNGATE, J. H.; RICHARDSON, P. M. MILLS, D. A. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **PNAS**, v. 25, p. 139-148, 2013.
- BURNS, K. N.; KLUEPFEL, D. A.; STRAUS, S. L.; BOKULICH, N. A.; CANTU, D.; STEENWERTH, K. L. Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16s rRNA genes: Differentiation by geographic features. **Soil biology and biochemistry**, v. 91, p. 232-247, 2015.
- CAMPANARO, S.; TREU, L.; VENDRAMIN, V.; BOVO, B.; ALESSI, G.; CORICH, V. Metagenomic analysis of the microbial community in fermented grape marc reveals that *Lactobacillus fabifermentans* is one of the dominant species: insights into its genome structure. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, p. 6015-6037, 2014.
- COMPANT, S.; MITTER, B.; MILL, J. G. C.; GANGL, H.; SESSITSCH, A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: Identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. **Microbial ecology**, v. 62, p. 188-197, 2011.
- FAVERO, A. C.; AMORIM, D. A.; MOTA, R. V.; SOARES, A. M.; REGINA, M. A. Double-pruning of 'Syrah' grapevines: a management strategy to harvest wine grapes during the winter in the Brazilian Southeast. **Revista Vitis**, v. 50, n. 4, p.151-158, 2011.
- FAVERO, A.C.; AMORIM, D. A.; MOTA, R. V.; SOARES, A. M.; REGINA, M. A. Viabilidade de produção da videira 'Syrah', em ciclo de outono inverno, na região sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n3, p.685-690, 2008.

FIERER, M.; BREITBART, M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; LOZUPONE, C.; JONES, R.; ROBESON, M. EDWARDS, R. A.; FELTS, B.; RAYHAWK, S.; KNIGHT, R.; ROHWER, F.; JACKSON, R. B. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archae, fungi, and viruses in soil. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, p. 7059-7066, 2007.

GIL, M.; CABELLO, J. M.; ARROYO, T.; PRODANOV, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the denomination of origin "Vinos de Madrid" (Spain). **Analytica chimica acta**, v. 563, p. 145-153, 2006.

GUERRINI, S.; BASTIANINI, A.; BLAIOTTA, G.; GRANCHI, L.; MASCHETTI, G.; COPPOLA, S.; ROMANO, P.; VINCENZINI, M. Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. **International journal of food microbiology**, v. 83, p. 1-14, 2003.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 68, p. 669-685, 2004.

JARA, C.; LAURIE, F. V.; MAS, A.; ROMERO, J. Microbial terroir in Chilean valleys: diversity of non-conventional yeast. **Frontiers in microbiology**, v.7, p. 1-10, 2016.

LEE, K.; LEE, H.; PI, K.; CHOI, Y. The effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. **Proteomics**, v. 8, p. 1624-1630, 2008.

LEEUWEN, C. V.; SEGUIN, G. The concept of terroir in viticulture. **Journal of wine research**, v. 17, n. 1, p.1-10. 2006.

LIMA-NETO, R.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SAMPAIO, P.; PAIS, C.; NEVES, R. P. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolate culture collection. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 515-522, 2014.

LOPEZ, I.; LARREA, R. F.; COCOLIN, L.; ORR, E.; PHISTER, T.; MASHALL, M.; GHEYNST, J. V.; MILLS, D. A. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, p. 6801-6807, 2003.

MARTINS, G.; SERTIER, C. M.; LAUGA, B. ; CLAISSE, O. ; FUNEL, A. L. ; SOULAS, G. ; POMAREDE, I. M. Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. **International journal of food microbiology**, v. 158, p. 93-100, 2012.

MATEO, E. M.; MEDINA, A.; MATEO, F.; ALGARRA, F. M. V.; PARDO, I.; JIMENEZ, M. Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. **Food control**, v. 21, p. 23-28, 2010.

MATTHEWS, A.; GRIMALDI, A.; WALKER, M.; BARTOWSKY, E.; GRBIN, P.; JIRANEK, V. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, p. 5715-5731, 2004.

NEVILLE, B.; TOOLE, P. Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* and closely related *Lactobacillus* species. **Future microbiology**, v. 5.; p. 759-774, 2010.

OKCU, G.; AYHAN, K.; ALTUNTAS, E. G.; VURAL, N.; POYRAZOGLU, E. S. Determination of phenolic acid decarboxylase produced by lactic acid bacteria isolates from shalgam (salgam) juice using green analytical chemistry method. **Food science and technology**, v.66, p.615-621, 2016.

PAPOTTI, G.; BERTELLI, D.; GRAZIOSI, R.; SILVESTRI, M.; BERTACCHINI, L.; DURANTE, C.; PLESSI, M. Application of one and two-dimensional NMR spectroscopy for the characterization of protected designation of origin lambrusco wines of modena. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, p. 1741-1746, 2013.

REVEL, G.; MARTIN, N.; NICOLAU, L. P.; FUNEL, A. L.; BERTRAND, A. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. **Journal of agriculture and food chemistry**, v. 47, p. 4003-4008, 1999.

RIVIEZZO, A.; GAROFANO, A.; GRANATA, J.; KAKAVAND, S. Using terroir to exploit local identify and cultural heritage in marketing strategies: An exploratory study among Italian and French wine producers. **Place branding and public diplomacy**, v. 13, p.136-149, 2017.

RODAS, A. M.; FERRER, S.; PARDO, I. 16-sARDRA, a tool for identification of Lactic Acid Bacteria isolated from grape must and wine. **Systematic and applied microbiology**, v. 26, p. 412-422, 2003.

SALVETTI, E.; CAMPANARO, S.; CAMPEDELLI, I.; FRACCHETTI, F.; GOBBI, A.; TOMIELLI, G. B.; TORRIANI, S.; FELIS, G. Whole-metagenome-sequencing based community profiles of *Vitis vinifera* L. cv corvina berries withered in two post-harvest conditions. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1-18, 2016.

SONG, H.; LEE, S. Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation. **Enzyme and microbial technology**, v. 39, p. 352-361, 2006.

TOFALO, R.; PERPETUINI, G.; SCHIRONE, M.; FASOLI, G.; AGUZZI, I.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods, **frontiers in microbiology**, v. 4, p. 1-13, 2013.

VAKHLU, J.; SUDAN, A.K.; JOHRI, B. N. Metagenomics: Future of microbial gene mining. **Indian journal of microbiology**, v. 48, p. 202-215, 2008.