

STUDIUL MICROORGANISMELOR STRUGURILOR DIN PODGORIILE REPUBLICII MOLDOVA: INFLUENȚA FACTORILOR UMAN ȘI NATURALI

CZU: 663.25.03(478)

DOI: <https://doi.org/10.52673/18570461.23.3-70.08>Doctorandă **Meiling YAO**¹E-mail: meilingyao2019@gmail.comORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5531-5518>Doctorand **Fei WANG**¹E-mail: fei.wang@saiem.utm.mdORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7788-0662>Doctor habilitat în științe tehnice **Gheorghe ARPENTIN**²E-mail: gheorghearpentin@gmail.comORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5984-7375>¹ Universitatea Tehnică din Moldova² Departamentul Cercetare, Dezvoltare și Inovare, Vinăria Purcari

STUDY OF GRAPE MICROORGANISMS IN MOLDOVAN VINEYARDS: INFLUENCE OF HUMAN AND NATURAL FACTORS

Summary. The objective of this study was to investigate the microbial diversity on the grape berries under different climate conditions. Sixteen samples from ten vineyards were taken from three PGI regions in Republic of Moldova during years 2018–2020. The year of harvest had a significant effect on the amount of yeasts, but the geographical location did not significantly influence this criterion. As natural factors, the influence of temperature and precipitation during both the growing season and the month of grape harvest was studied. The selected methods for vineyard plant protection were as follows: fungicides to control powdery mildew, fungicides to control mangle and insecticides. The total yeast population per grape ranged from $3.8E+04$ to $2.3E+07$ CFU/berry and the culturable yeast population ranged from $1.7E+03$ to $8.0E+06$. The harvest month temperature affects the yeast population the most, fungicide use in mealybug control reduces the culturable yeast population but increases the total yeast population; insecticide treatment only increases the total yeast population but has no impact on culturable yeasts. In addition, six species yeast have been identified: *A. pullulans*, *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, *R. glutinmis*, *R. graminis* and *S. cerevisiae*. The *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from the 2020 crop is totally different from the 2018 and 2019 crops. The bacteria population is at a low level, except for a few samples, *P. damnosus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *G. oxydans* were isolated.

Keywords: grape microorganisms, climate condition, phytosanitary products, PGI regions, Republic Moldova.

Rezumat. Obiectivul acestui studiu a fost să investigheze diversitatea microbiană de pe boabele de strugure în diferite condiții climatice și de gestionare a viței-de-vie. 16 eșantioane din zece podgorii au fost prelevate din trei regiuni cu indicație geografică protejată ale Republicii Moldova, în perioada 2018–2020. Anul recoltei a avut un efect important asupra cantității de drojdii, dar amplasarea geografică nu a influențat semnificativ asupra acestui criteriu. În calitate de factori naturali a fost studiată influența temperaturii și precipitațiilor atât în perioada vegetativă, cât și în luna de recoltare a strugurilor. Drept metode au fost selectate metodele de protecție fitosanitară a viței-de-vie: fungicide pentru combaterea făinării, fungicide pentru combaterea manei și insecticidele. Populația totală de drojdii pe strugure variază de la $3.8E+04$ până la $2.3E+07$ UFC/boabă, iar populația de drojdii cultivabile variază de la $1.7E+03$ până la $8.0E+06$. Temperatura lunii de recoltare afectează cel mai mult populația de drojdii, utilizarea fungicidului la combaterea făinării reduce populația de drojdii cultivabile, dar crește populația totală de drojdii; tratamentul cu insecticide crește doar populația totală de drojdii, dar nu are un impact asupra drojdiilor cultivabile. În plus, au fost identificate șase specii de drojdii: *A. pullulans*, *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, *R. glutinmis*, *R. graminis* și *S. cerevisiae*. Tulpina de *Saccharomyces cerevisiae* izolată din recolta anului 2020 este complet diferită față de recoltele din 2018 și 2019. Cu excepția câtorva eșantioane, populația de bacterii este la un nivel scăzut. În cadrul studiului au fost izolate tulpinile de bacterii *P. damnosus*, *L. brevis*, *L. fermentum* și *G. oxydans*.

Cuvinte-cheie: microorganismele strugurilor, condițiile climatice, produse fitosanitare, regiuni cu indicație geografică protejată (IGP), Republica Moldova.

INTRODUCERE

Conceptul de *terroir*, în oenologie, se referă la o zonă geografică caracterizată în principal prin factorii săi naturali și umani care contribuie la producerea vinurilor tipice podgoriei [1]. Termenul „terroir microbial” a câștigat recent interesul în studiile viticole pentru a indica importanța compoziției microbiomului podgoriei asupra tipicității vinului regional [2]. În procesul de vinificație, drojdiile *S. cerevisiae* sunt cele mai importante, asigurând transformarea zahărului în alcool etilic. Drojdiile *non-saccharomyces* contribuie semnificativ la formarea calităților organoleptice ale produselor vitivinicole, în special la complexitatea aromei și a gustului. Menționăm ca multe dintre cercetările anterioare s-au axat asupra studiului bacteriilor de interes oenologic, în special al bacteriilor acetice și bacteriilor lactice prezente în microbiota boabei [3; 4].

Suprafața strugurilor este un habitat instabil care se modifică odată cu condițiile climatice și este în dependență de mai mulți factori naturali: temperatură, umiditate, radiații UV [5]. Printre factorii umani, deseori sunt luați în considerare tehnicile agronomice și de protecție fitosanitară, în particular lucrarea solului, folosirea îngrășămintelor, combaterea ierburilor, bolilor și dăunătorilor. Acești factori au influență semnificativă asupra drojdiilor la nivel cantitativ și calitativ [6].

Pentru a explica influența climei, în studiul de față au fost selectate trei podgorii din diferite regiuni cu indicație geografică protejată. Cercetările au fost realizate pe parcursul a trei recolte consecutive: 2018, 2019 și 2020. Printre factorii climatici au fost studiate suma de temperaturi active în perioada de vegetație, temperatura medie a lunii de recoltare

(septembrie), precipitațiile în perioada de vegetație, precum și precipitațiile lunii septembrie. Impactul factorului uman a fost evaluat prin intermediul indicelui de frecvență a tratamentelor fitosanitare (IFT). Indicele respectiv a fost deja utilizat pentru studiul podgoriilor [7], considerându-se că este un instrument util pentru cuantificarea utilizării produselor fitosanitare în protejarea viei-de-vie. În prezentul studiu au fost calculate IFT din podgoriile situate în trei indicații geografice ale Republicii Moldova, inclusiv două podgorii cultivate în viticultura ecologică.

Analiza cantitativă a populației de microorganisme a fost realizată prin numărarea directă pe mediu selectiv, dar pentru cuantificarea microorganismelor viabile și non-cultivabile s-a utilizat microscopia cu epifluorescență. De asemenea, în cadrul studiului a fost realizată cercetarea morfologică a microorganismelor prin microscopie, urmată de secvențierea unor tulpini izolate de drojdiile relevante pentru regiunile geografice din Republica Moldova.

MATERIALE ȘI METODE

Obiectul studiului și eșantionarea. Probele de struguri pentru studiu au fost obținute din zece podgorii amplasate în trei indicații geografice protejate: IGP Codru (C), IGP Valul lui Traian (VLT) și IGP Ștefan Vodă (SV). Detaliile colectării mostrelor pentru analiză sunt prezentate în tabelul 1. Prelevarea a avut loc în perioada când strugurii au atins maturitatea tehnologică. Procesul de colectare a probelor a fost efectuat în condiții sterile, acestea fiind transportate în laboratorul de analiză la temperatura de -20 °C. Fiecare probă a fost colectată în cantitate de 1 kg de struguri.

Tabelul 1
Caracteristica eșantionului de struguri

Codul probelor	Soiul	Anul recoltei	Indicația geografică	Coordonatele de prelevare a probei
FN_C	Feteasca Neagră	2018, 2019, 2020	IGP Codru (C)	(E47.31,N27.98)
FA_C	Feteasca Albă	2020		(E47.06,N28.51)
SA_C	Sauvignon	2020		(E47.22,N28.52)
FN_VLT	Feteasca Neagră	2018, 2019, 2020	IGP Valul lui Traian (VLT)	(E46.39,N28.73)
FA_VLT	Feteasca Albă	2020		(E46.19,N28.47)
ME_VLT	Merlot	2020		(E45.65,N28.47)
FN_SV	Feteasca Neagră	2018, 2019, 2020	IGP Ștefan Vodă (CV)	(E46.53,N29.87)
PN_SV	Pinot Noir	2020		(E46.48,N29.94)
VI_SV	Viorica	2020		(E46.53,N29.87)
HY_SV	Hybrid	2020		-

Pentru studiul factorilor climatici s-a folosit soiul Feteasca Neagră (cod FN_C, FN_VLT, FN_SV) cultivat în trei regiuni geografice în cadrul a trei recolte consecutive. Influența tratamentelor fitosanitare (factorul uman) a fost cercetată pe baza strugurilor care provin din zece podgorii ale celor trei regiuni geografice.

Metodele de izolare și de cuantificare a microorganismelor. Strugurii au fost colectați aleatoriu din parcelele experimentale și transportați imediat (timp de 4 ore în medie) spre analiză microbiologică. Pentru aceasta, suprafața a 300 g boabe de struguri au fost spălate folosind 500 ml soluție care conține 10 g/L Bacto Soytone, 2 ml/L Tween 80. Procesul de spălare a boabelor s-a realizat la temperatura de +30 °C cu agitare timp de 3 ore conform metodei descrise în [8].

Metoda 1: Analiza cantitativă prin microscopia cu epifluorescență.

Microorganismele viabile sunt cuantificate conform protocolului și materialelor dezvoltate de Chemunex. Probele de diluare sunt filtrate printr-o membrană de tip Chemfilter CB04, care este apoi incubată timp de 30 de minute la întuneric și la temperatura de +30 °C. Substratul inițial nefluorescent este scindat de un sistem enzimatic celular care permite eliberarea fluorocromului. Acesta din urmă, excitat de radiația luminoasă de lungime de undă ultraviolete la 480 nm, emite o fluorescență de culoare verde. În continuare, membrana este studiată cu ajutorul unui microscop cu epifluorescență (Olympus BX51), folosind o mărire de x1000 și un filtru de tip Olympus 467803 [9].

Metoda 2: Analiza cantitativă pe medii de cultură specifice.

Pentru cuantificarea drojdiei, diluția corespunzătoare de microorganisme a fost plasată pe plăci care conțineau extract de drojdie 10 g/L, bacteripton 10 g/L, glucoză 20 g/L, agar 25 g/L și bifenil 0,015 %. Pentru cuantificarea bacteriilor malolactice, mediul de cultură conține 500 ml/L suc de struguri, 5 g/L extract de drojdie, 2 ml/L Tween 80 și 20 g/L agar. La cultivarea bacteriilor acetice s-a folosit un mediu de cultură similar, doar suplimentat cu 30 mg/L penicilină.

Pentru metoda de enumerare directă, soluția diluată de microorganisme este filtrată și transferată într-o eprubetă. Populația de drojdie a fost calculată folosind criteriul CFU – unități formatoare de colonii, calculat prin următoarea formulă [8]:

$$\text{CFU/bob} = \frac{C \times V \times m}{M}$$

unde,

C – numărul de colonii pe ml,

V – volumul soluției diluate (ml),

m – greutatea medie a unei boabe (g),

M – greutatea totală a boabelor (g).

Identificarea microorganismelor. Pentru identificarea drojdiilor și bacteriilor a fost analizată în prealabil morfologia lor. Patru tulpini de drojdie prezintă rezultate originale și interesante și au fost în continuare supuse secvențierii. Tulpinile de bacterii, pe baza morfologiei lor, aparțin evident bacteriilor acetice și bacteriilor malolactice.

Purificarea tulpinilor microbiotilor a fost realizată în trei etape. ADN-ul a fost extras folosind kit-ul Qiaquick (Qiagen) și conform protocolului de secvențiere descris de către Millegen (Franța).

Calcularea indicelui de frecvență a tratamentelor fitosanitare. Indicele de frecvență a tratamentelor fitosanitare (TFI) este de obicei folosit pentru a măsura utilizarea produselor fitosanitare în protecția culturilor agricole. Acest indice include frecvența de aplicare a produselor fitosanitare pe hectar [7], luând în considerare doza aplicată și doza de referință a produselor comerciale și recomandate de către producător, precum și suprafața tratată din suprafața totală a parcelei.

$$\text{TFI} = \sum \frac{\text{doza aplicata}}{\text{doza de referinta}} * \frac{\text{suprafata tratata}}{\text{suprafata totala}}$$

În acest studiu, produsele fitosanitare au fost împărțite în trei clase: produse pentru combaterea fâinării (TFI_F), produse pentru combaterea manei (TFI_M) și produse pentru combaterea insectelor/dăunătorilor (TFI_I).

Informațiile privind doza aplicată, suprafața tratată și suprafața totală au fost colectate din registrele de prelucrare a podgoriilor din cadrul rețelei parcelelor experimentale. Informațiile privind doza de referință a produselor fitosanitare au fost obținute de pe site-ul www.pesticide.md.

Datele climatice. Achiziția datelor climatice s-a realizat folosind rețeaua de stațiuni meteo (i-meteos) instalate pe parcelele experimentale cu suportul Oficiului Național al Viei și Vinului în cadrul proiectului „Struguri de calitate” (ng.fieldclimate.com).

În baza datelor primare au fost calculați următorii indici: suma de temperaturi active în perioada de vegetație (ΣT_{veg} , °C), cantitatea de precipitații în perioada de vegetație (ΣR_{veg} , mm), temperatura medie a lunii de recoltare (ΣT_{har} , °C), cantitatea de precipitații din luna de recoltare (ΣR_{har} , mm).

Analize statistice. Evaluarea datelor experimentale a fost efectuată conform testelor ANOVA, analiza de corelație Pearson, în ambele cazuri când $P < 0,05$ rezultatele sunt considerate semnificative. Toate analizele de date au fost realizate folosind programul R 4.0.4.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din figura 1 deducem că diferența populației de drojdie în anii de recoltă 2018, 2019, 2020 (P_Metoda 1 = 0,00321, P_Metoda 2 = 0,0342) este evidentă, în timp ce diferența populației de drojdie în funcție de indicațiile geografice studiate nu poate fi observată.

Datele experimentale (tabelul 2) atestă că anul recoltei are un impact semnificativ asupra populației și structurii microbiene, în special asupra drojdiilor, și confirmă rezultatele obținute de alți cercetători în acest domeniu. Regiunea de cultivare a viței-de-vie este, de asemenea, un factor de impact important [10], deși în prezentul studiu pentru indicațiile geografice din Republica Moldova nu a fost posibilă confirmarea existenței unei astfel de dependențe. Acest lucru se explică probabil prin faptul că distanța dintre podgoriile indicațiilor geografice studiate nu sunt atât de importante în Republica Moldova.

I. Chalvantzi et al. [11] au utilizat o abordare de model liniar bazat pe distanță pentru a evalua corelațiile dintre ansamblurile de drojdii și variabilele de mediu individuale. Studiul lor a relevat că dintre diferiți factori, temperatura, precipitațiile și altitudinea au prezentat cele mai semnificative influențe.

În prezentul studiu s-a constatat lipsa influenței semnificative a precipitațiilor asupra cantității populației de drojdii (totale și cultivabile). În schimb, s-a stabilit o influență semnificativă a temperaturii medii a lunii de recoltare a strugurilor asupra populațiilor de drojdii determinate prin ambele metode de analiză. Cu alte cuvinte, în luna de recoltare cu cele mai înalte temperaturi, atât populația totală de drojdii, cât și populația de drojdii cultivabile sunt mai importante din punct de vedere cantitativ și calitativ (figura 2).

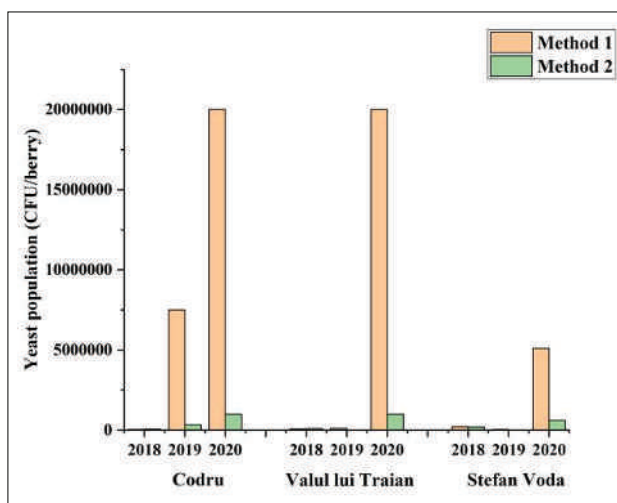


Figura 1. Populația de drojdie (CFU/boabă) în trei indicații geografice și trei ani de recoltă. Metoda 1: *microscopia cu epifluorescență*; Metoda 2: *medii de cultură specifice*.

Rezultatele obținute arată un nivel scăzut al populației bacteriene, fapt ce creează dificultăți în stabilirea relațiilor asociate cu factorii de impact (uman și climatici). Trebuie menționat că în pofida acestui fenomen, două mostre analizate, una din soiul Fe-teasca Neagră produs în IGP Codru și cealaltă Fe-teasca Neagră din IGP Ștefan Vodă, recolta 2019, posedă o cantitate mai mare de bacterii (totale și viabile) în comparație cu alte soiuri, regiuni geografice și ani de recoltă.

Diversitatea microbiană reflectă metodele agrotehnice și de management ale podgoriilor [12], iar utilizarea produselor fitosanitare provoacă creșterea populației de drojdii pe boabele de struguri. Un rezultat total diferit a fost obținut de A. Viviani-Nauer [13], autorul stabilind că utilizarea pesticidelor redu-

Tabelul 2
Influența factorilor climatici asupra populației de drojdii și bacterii (CFU/boabă), metodele aplicate

Codul	Anul recoltei	$\sum T_{veg}$, °C	$\sum R_{veg}$, mm	$\sum T_{har}$, °C	$\sum R_{har}$, mm	Populația de drojdie (metoda 1)	Populația de drojdie (metoda 2)	Populația de bacterii (metoda 1)	Populația de bacterii (metoda 2)
FN_C	2018	1669	310,2	16,61	34,4	3.80E+04	6.00E+04	<8.9E+02	<10
	2019	1529	378,2	17,28	24	7.50E+06	3.30E+05	4.8E+05	<10
	2020	1427	230,6	20,29	10,2	2.00E+07	1.00E+06	<8.9E+02	<10
FN_VLT	2018	1849	257,8	17,66	41,8	7.80E+04	1.00E+05	<8.9E+02	<10
	2019	1725	245,6	18,25	27,2	1.10E+05	1.70E+03	<8.9E+02	<10
	2020	1760	283,6	20,63	87,2	2.00E+07	1.00E+06	<8.9E+02	<10
FN_SV	2018	1951	155,6	18,03	4,57	2.10E+05	2.00E+05	<8.9E+02	<10
	2019	1844	245,4	18,81	5,9	3.20E+04	1.90E+03	3.5E+03	<10
	2020	1798	201,2	20,56	8,8	5.10E+06	6.00E+05	<8.9E+02	1E+1

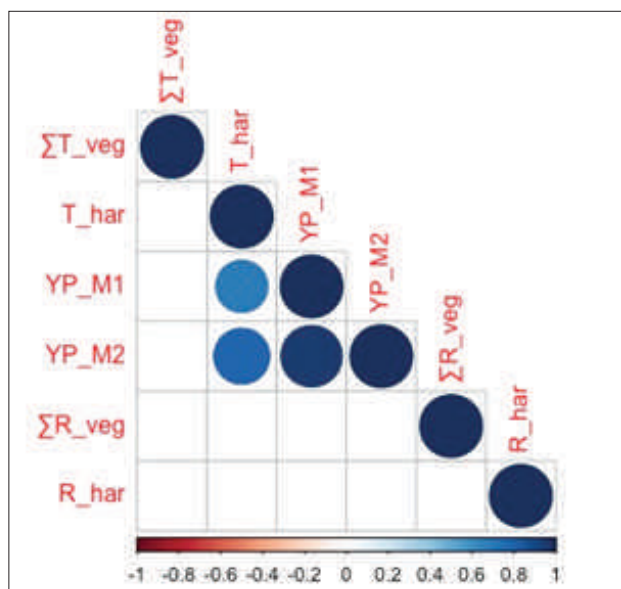


Figura 2. Coeficienții de corelație Pearson între factorii climatici și populația de drojdii

(YP_M1 – populația de drojdii determinată prin metoda 1; YP_M2 – populația de drojdii determinată prin metoda 2; în cazul $p < 0,05$, cercul albastru indică o corelație pozitivă, cercul roșu indică o corelație negativă; când $p > 0,05$, cercul lipsește).

ce populația de drojdii. Trecerea de la starea viabilă și cultivată la starea VNBC (Viabil, dar Nu Cultivabil) rezultă în principal dintr-o reacție de apărare a celulelor împotriva stresului mediului [14]. S-a constatat că produsele fitosanitare utilizate în combaterea făinării reduc semnificativ populația cultivabilă de drojdii, dar sporesc populația totală de drojdii (tabelul 3). Un studiu recent [15] a sugerat că utilizarea fungicidelor poate afecta anumite drojdii specifice, cum ar fi cantitatea de drojdie de fermentație *H. uvarum*,

care a fost corelată invers cu utilizarea fungicidelor. În acest studiu, tratamentele organice au afectat *direct Issachenkia terricola la strugurii Montepulciano și Debaryomyces hansenii și Pichia hansenii la strugurii Vidicchio*. În contrast, tratamentele organice au avut efecte negative asupra *Metschnikowia pulcherrima și Starmerella bacillaris*.

În general, produsele fitosanitare pe bază de sulf sunt destul de eficiente pentru a proteja strugurii de făinare. În recolta 2020, produsele cele mai des folosite pentru combaterea făinării au fost Cosavet și Kumulus (principiu activ (S) – 80 % g/g). S-a demonstrat că sulful poate avea un efect antimicrobian asupra drojdiilor inoculate, probabil că acest fungicid provoacă o situație când drojdiile sunt viabile dar necultivabile (VBNC).

Influența produselor fitosanitare anti-mană (TFI_M) asupra populației de drojdie (totale și cultivabile) nu a fost stabilită în cadrul acestui studiu. Impactul tratamentelor anti-insecte (TFI_I) duce la creșterea populației totale de drojdie, dar nu influențează cantitatea de drojdie cultivabilă. Presupunem că acest fenomen se datorează produselor insecticide folosite în rețeaua de parcele experimentale. De exemplu, insecticidul Pyrus, folosit în FN_SV, care este cunoscut și ca fungicid pentru *Botrytis cinerea*, poate acționa asupra unor specii de drojdii, conducând în acest fel la populații mai mici de drojdie cultivabilă.

În figura 3 sunt reprezentați coeficienții de corelație ai produselor fitosanitare anti-făinare (TFI_F). Datele confirmă o corelație negativă semnificativă între produsele anti-făinare și populația de drojdie cultivabilă.

Tabelul 3

Influența Indicelui de Frecvență a Tratatelor (TFI) asupra populației de drojdii și bacterii (CFU/boabă), metodele aplicate

Codul	TFI_M antimana	TFI_F antifăinare	TFI_I insecticide	Total TFI	Populația de drojdie (metoda 1)	Populația de drojdie (metoda 2)	Populația de bacterii (metoda 1)	Populația de bacterii (metoda 2)
FN_C	5,23	11,12	2,72	19,07	2.00E+07	1E+06	<8.9E+02	<10
FA_C	5,60	6,86	0,00	12,46	1.00E+06	5E+06	<8.9E+02	1E+01
SA_C	2,00	4,00	0,00	6,00	4.70E+06	1E+06	<8.9E+02	<10
FN_VLT	5,23	11,12	2,72	19,07	2.00E+07	8E+05	<8.9E+02	<10
FA_VLT	2,07	8,33	1,11	11,51	1.40E+07	1E+06	<8.9E+02	<10
ME_VLT	4,58	5,33	1,00	10,91	8.20E+06	4E+06	<8.9E+02	<10
FN_SV	4,71	7,08	2,08	13,87	5.10E+06	6E+05	<8.9E+02	1E+01
PN_SV	0,80	5,00	0,00	5,80	9.30E+05	2E+05	<8.9E+02	1E+03
VI_SV	6,00	8,13	1,00	15,13	2.30E+07	2E+06	<8.9E+02	<10
HY_SV	0,00	0,00	0,00	0,00	9.10E+05	8E+06	<8.9E+02	<10

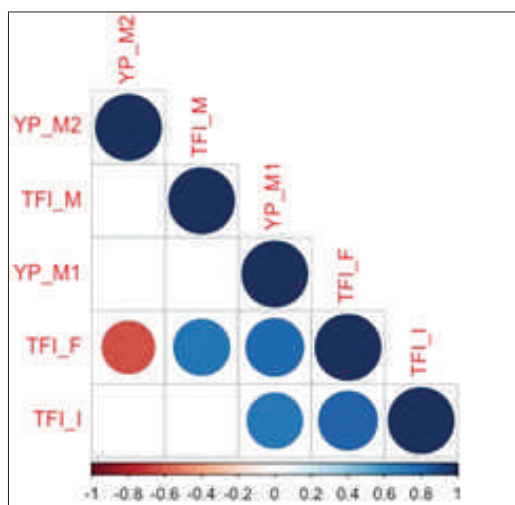


Figura 3. Coeficienții de corelație Pearson între indicele de frecvență a tratamentelor fitosanitare (TFI) și populația de drojdie (YP_M1 – populația de drojdie determinată prin metoda 1, YP_M2 – populația de drojdie determinată prin metodă 2, în cazul $p < 0,05$ cercul albastru indică o corelație pozitivă, cercul roșu indică o corelație negativă, când $p > 0,05$, cercul lipsește).

După cum arată analiza comparativă a influenței tratamentelor fitosanitare folosite în podgoriile de vie gestionate în mod convențional (folosirea fungicidelor de sinteză, penetrante) și ale viței-de-vie conduse în mod organic (folosirea exclusivă a fungicidelor de contact pe bază de cupru), cuprul poate crea stres pentru diferite specii de microorganisme [16]. Acest fapt poate explica fenomenul paradoxal de ce podgoria condusă organic posedă o populație mai mică de drojdie cultivabilă. Menționăm că structura calitativă și cantitativă a microorganismelor la cele două metode de conducere a viței-de-vie (organică și convențională) nu este clară și necesită efectuarea unor cercetări mai profunde.

Spre deosebire de studiul influenței factorilor climatici, în studiul influenței produselor fitosanitare asupra populației de microorganisme, în probele de struguri Feteasca Albă cultivate în IGP Codru, Feteasca Neagră și Viorica cultivate în IGP Ștefan-Vodă a fost confirmată existența bacteriilor cultivabile. Însă din cauza numărului de probe limitat nu a fost posibilă stabilirea corelației dintre criteriul folosirii produselor fitosanitare și populația de microorganisme (totală + cultivabilă).

Rezultatele de izolare și de identificare a microorganismelor.

În trei recolte au fost izolate 6 specii de drojdie: în recolta 2018 *A. pullulans*, *M. pulcherrima*, *H. uarum* și *R. glutinmis*; în recolta 2019 *A. pullulans*, *R. glutinmis*, *R. graminis*; spectrul drojdiilor din recolta 2020 este similar cu cel din recolta 2018 – *A. pullulans*, *M.*

pulcherrima și *R. glutinmis*. Menționăm că în cadrul tuturor recoltelor analizate (2018–2020), a fost izolată *S. cerevisiae*, a cărei rezultate de identificare sunt prezentate în figura 4.

După cum se observă din electroforegramele obținute, tulpina *S. cerevisiae* izolată din recolta 2020 este total diferită de tulpina *S. cerevisiae* izolată din recoltele 2018 și 2019. Acest fapt justifică studiarea diferitelor tulpini *S. cerevisiae* autohtone care reflectă biodiversitatea unei anumite regiuni viticole [17] și care susțin ideea că anumite tulpini de drojdie native pot fi asociate cu un *terroir* și cu specificitatea vinurilor obținute.

În general, specia *A. pullulans* este considerată una dintre cele mai abundente specii de pe suprafața boabelor strugurilor [18]. În calitatea sa de drojdie oligotrofică, aceasta preferă mediul sărac în nutrienți. Compușii organici volatili (COV) produși de *A. pullulans* au fost investigați pentru acțiuni antagoniste împotriva *Alternaria alternata* și *Botrytis cinerea* [19]. Specia *Rhodotorula* este cunoscută după potențialul său de a produce exo-polizaharide, care la rândul lor pot proteja celulele împotriva stresului mediului, în special în situația în care se folosesc produse fitosanitare pe bază de sulf [20]. Deși este o modalitate puternică de control împotriva *B. cinerea*, utilizarea acestui fungicid afectează compoziția microbiotei benefice,

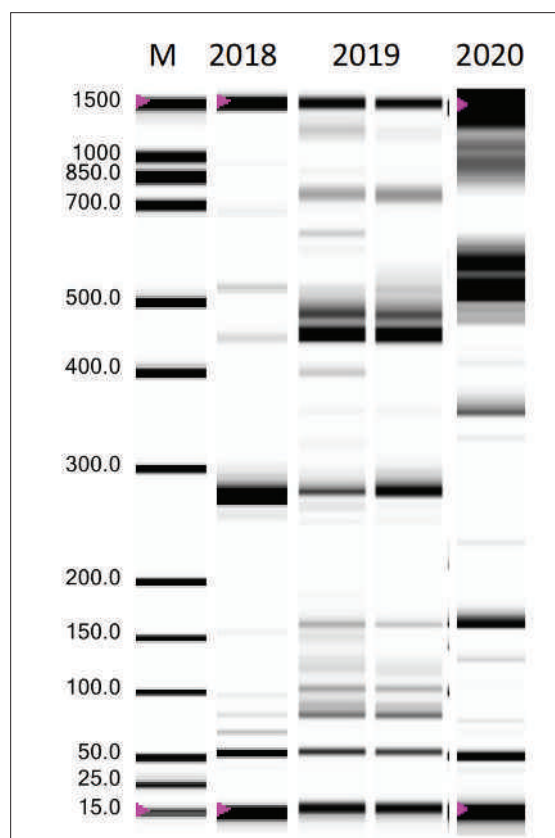


Figura 4. Rezultatul identificării speciei de drojdie *S. cerevisiae*, recoltele din anii 2018–2020.

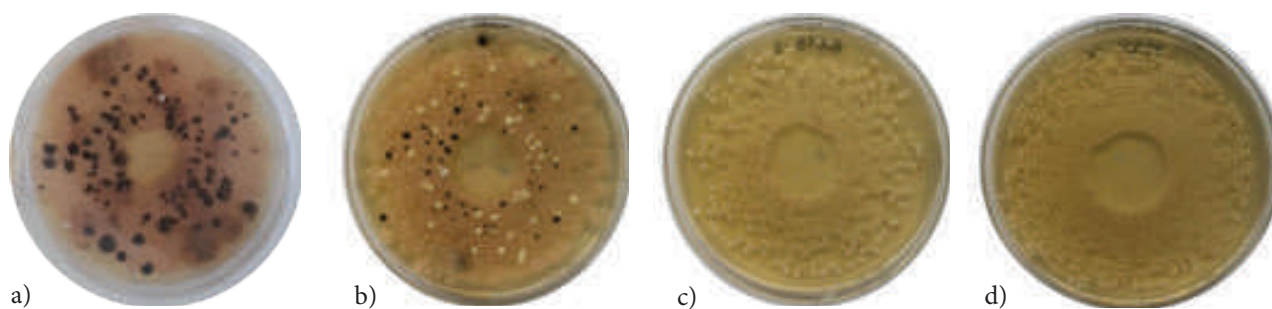


Figura 5. Morfologia bacteriilor izolate și identificate:
a) FN_VLT, recolta din 2018; b), c), d) – PN_SV, ME_VLT și FN_SV, recolta din 2020.

cum ar fi ciupercile cu proprietăți micorizale. Agenții de control biologic (BCA) sunt o alternativă eficientă la fungicide, cunoașterea diversității microbiene locale a strugurilor este foarte importantă pentru dezvoltarea strategiei de folosire a antagoniștilor nativi.

Prezența și creșterea speciilor *M. pulcherrima* și *H. uvarum* se poate explica prin faptul eliberării mustului din boabe și se caracterizează printr-o populație importantă pe suprafața strugurilor atacați de mucegai. *M. pulcherrima* este o drojdie *non-Saccharomyces*, care începe procesul de fermentare înainte ca populațiile de drojdie *Saccharomyces* să atingă o densitate celulară suficientă pentru a defavoriza activitatea drojdiilor *non-Saccharomyces*. În prezent, drojdiile *non-Saccharomyces* tind să fie privite ca fiind favorabile fermentațiilor și contribuie la formarea complexității aromei și gustului vinului. Drojdiile *non-Saccharomyces* încep fermentațiile mai rapid și contribuie la prevenirea stabilirii altor microorganisme nefavorabile în etapele inițiale ale fermentației alcoolice. Structura diversității microbiene a strugurilor merită să fie investigată mai profund în Republica Moldova, pentru a dezvălui mai precis specificitatea micro *terroir*-ului local și a oferi sugestii pentru noi strategii de vinificație non-intervenționiste în industria vinicolă locală.

Populația de bacterii în majoritatea probelor este la un nivel foarte scăzut, comparativ cu populația de drojdii. În același timp, două probe de Feteasca Neagră (IGP Codru) și Feteasca Neagră (IGP Ștefan-Vodă) recolta 2019, precum și trei probe – Feteasca Albă (IGP Codru), Feteasca Neagră (IGP Ștefan Vodă) și Viorica (IGP Ștefan Vodă), recolta 2020 arată o populație totală de bacterii cultivabile mai mare. Trebuie menționat de asemenea că probele din recolta 2020 posedă o morfologie specifică, posibil aparținând speciilor bacteriilor lactice (LAB) sau bacteriilor acetice (AAB) (figura 5). În cadrul acestui studiu nu a fost posibilă identificarea bacteriilor *O. oeni*, care sunt asociate mai frecvent cu fermentarea malolactică (MLF) în vin.

După cum se poate observa din figura 5a, au fost identificate trei bacterii în strugurii recoltei 2018 – *Pediococcus damnosus* (gri), care este o specie LAB în formă de cocci sferici cu proprietăți nemobile, neformatoare de spori și homofermentative. O altă specie LAB identificată – *Lactobacillus brevis* (gri) – este o specie în formă de bastonașe (tijă). A treia specie identificată este *Lactobacillus fermentum* (roz), numită astfel pentru că provoacă fermentația, este o specie obligatoriu heterofermentativă și are formă de bastonașe (tijă). Colonii de bacterii din strugurii recoltei 2019 prezintă o morfologie foarte omogenă (nu se observă în imagini). Din strugurii recoltei 2020, a fost izolată *Gluconobacter oxydans* (figura 5b). *G. oxydans*, cunoscut anterior sub denumirea de *Acetobacter suboxydans*, este o bacterie în formă de bastonașe sau ovale. Speciile din Figura 5c și 5d au fost identificate ca *Lactobacillus brevis* și *Lactobacillus fermentum*. Trebuie menționat că speciile bacteriene *Lactobacillus*, *Pediococcus* și *Leuconostoc* sunt responsabile pentru producerea acidului acetic, principalul acid volatil din vin, și în concentrații sporite poate cauza apariția defectelor (izurilor) organoleptice în produsele vitivinicole.

CONCLUZII

Populația totală de drojdii pe strugure variază de la $3.8E+04$ până la $2.3E+07$ UFC/boabă, iar populația de drojdii cultivabile variază de la $1.7E+03$ până la $8.0E+06$. Anul recoltei a avut un efect considerabil asupra cantității de drojdii, dar PGI nu a avut un efect semnificativ. Au fost identificate șase specii de drojdie: *A. pullulans*, *M. pulcherrima*, *H. uvarum*, *R. glutinmis*, *R. graminis* și *S. cerevisiae*. Tulpina de *S. cerevisiae* izolată din recolta anului 2020 este total diferită față de recoltele anilor 2018 și 2019. S-a constatat că temperatura medie în luna recoltării strugurilor influențează în mod semnificativ creșterea atât a populației totale, cât și a populației cultivabile de drojdie. Produsele fitosanitare utilizate în combaterea fâinării reduc popu-

lația cultivabilă de drojdie, dar contribuie la creșterea populației totale de drojdie. Utilizarea insecticidelor contribuie la creșterea populației totale de drojdie, dar nu are un impact asupra drojdiilor cultivabile. Populația de bacterii se caracterizează printr-un nivel mai scăzut în comparație cu populația de drojdie, cu excepția probelor de Feteasca Neagră (IGP Codru) și Feteasca Neagră (IGP Ștefan Vodă) din recolta 2019, care prezintă o populație de bacterii cultivabile corespunzătoare de $4,8E+05$ și $3,5E+03$ UFC/boabă. Din strugurii recoltei 2019 nu a fost posibilă izolarea bacteriilor lactice și bacteriilor acetice.

În cadrul studiului strugurilor recoltei 2020, din soiul Feteasca Albă (IGP Codru) și soiurile Feteasca Neagră (IGP Ștefan Vodă) și Viorica (IGP Ștefan Vodă) au fost izolate următoarele specii de bacterii: *G. oxydans*, *L. brevis*, *L. fermentum*, iar din strugurii recoltei 2018 au fost izolate speciile *P. damnosus*, *L. brevis* și *L. fermentum*.

Pentru a obține o înțelegere mai clară a terroirului microbial al strugurilor din Republica Moldova, în viitoarele cercetări trebuie identificată structura comunității microbiene.

BIBLIOGRAFIE

1. Pretorius I.S. Tasting the terroir of wine yeast innovation. In: FEMS yeast research, 2020, 20(1), foz084, 1-22.
2. Kazou M., Pagiati L., Dotsika E., Proxenia N., Kotseridis Y. & Tsakalidou E. The Microbial Terroir of the Nemea Zone Agiorgitiko cv.: A First Metataxonomic Approach. In: Australian Journal of Grape and Wine Research, 2023, 10-14.
3. Pinto L., Malfeito-Ferreira, M., Quintieri L., Silva A. C. & Baruzzi F. Growth and metabolite production of a grape sour rot yeast-bacterium consortium on different carbon sources. In: International journal of food microbiology, 2019, 296, 65-74.
4. Taroub B., Salma L., Manel Z., Ouzari H.I., Hamdi Z., & Moktar H. (2019). Isolation of lactic acid bacteria from grape fruit: antifungal activities, probiotic properties, and in vitro detoxification of ochratoxin A. In: Annals of microbiology, 2019, 69(1), 17-27.
5. Liu D., Zhang P., Chen D., & Howell K. From the vineyard to the winery: how microbial ecology drives regional distinctiveness of wine. In: Frontiers in Microbiology, 2019, 10, 2679.
6. Gava A., Emer C.D., Ficagna E., Fernandes de Andrade S. & Fuentesfria A.M. (2021). Occurrence and impact of fungicides residues on fermentation during wine production – A review. In: Food Additives & Contaminants: Part A, 2021, 38(6), 943-961.
7. Etienne L., Franck P., Lavigne C., Papaix J., Tolle P., Ostandie N., & Rusch A. Pesticide use in vineyards is affected by semi-natural habitats and organic farming share in the landscape. In: Agriculture, Ecosystems & Environment, 2022, 333, 107967.
8. Renouf V., Claisse O., & Lonvaud-Funel A. L. I. N. E. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. In: Australian Journal of Grape and Wine Research, 2005, 11(3), 316-327.
9. Renouf V., Claisse O. & Lonvaud-Funel A. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. In: Applied Microbiology and Biotechnology. 2007, 75, 149-164.
10. Oyuela Aguilar M., Gobbi A., Browne P.D., Ellegaard-Jensen L., Hansen L.H., Semorile L. & Pistorio M. Influence of vintage, geographic location and cultivar on the structure of microbial communities associated with the grapevine rhizosphere in vineyards of San Juan Province, Argentina. In: PLoS One, 2020, 15(12), e0243848.
11. Chalvantzi I., Banilas G., Tassou C., & Nisiotou A. Biogeographical regionalization of wine yeast communities in Greece and environmental drivers of species distribution at a local scale. In: Frontiers in Microbiology, 2021, 12, 705001.
12. Likar M., Stres B., Rusjan D., Potisek M., & Regvar M. Ecological and conventional viticulture gives rise to distinct fungal and bacterial microbial communities in vineyard soils. In: Applied Soil Ecology, 2017, 113, 86-95.
13. Viviani-Nauer A., Hoffmann-Boller P., & Gafner J. Characterization and identification of yeasts. In: Agrarforschung (Switzerland). 1996.
14. Olivier PB, Cottu JP, Ferret BB. Effects of cure cycle pressure and voids on some mechanical properties of carbon/epoxy laminates. In: Composites. 1995; 26(7):509-15.
15. Agarbati A., Canonico L., Ciani M., & Comitini F. The impact of fungicide treatments on yeast biota of Verdicchio and Montepulciano grape varieties. In: PLoS One, 2019, 14(6), e0217385.
16. Hinojosa M.B., García-Ruiz R., & Carreira J.A. Utilizing microbial community structure and function to evaluate the health of heavy metal polluted soils. In: Soil heavy metals, 2010, 185-224.
17. Merín M.G., & Morata de Ambrosini V.I. Highly cold-active pectinases under wine-like conditions from non-Saccharomyces yeasts for enzymatic production during winemaking. In: Letters in Applied Microbiology, 2015, 60(5), 467-474.
18. Don S.M.Y., Schmidtke L.M., Gambetta J.M., & Steel C.C. Volatile organic compounds produced by Aureobasidium pullulans induce electrolyte loss and oxidative stress in Botrytis cinerea and Alternaria alternata. In: Research in microbiology, 2021, 172(1), 103788.
19. Reis E.M., Guerra W.D., Reis A.C., Zanatta M., Carmona M., & Sautura F. Fungi resistance to multisite fungicides. In: Journal of Agricultural Science, 2021, 13(11), 141-152.
20. Ganga M.A., & Martínez C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-Saccharomyces yeasts. In: Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(1), 76-83.