



## Laboratoris Lamter

# Determinació d'enterobactèries en Monster Original, Monster Zero sucre i Monster Mangoloco



Yohalis Cuevas  
Andrea Martínez  
David Barrientos

# ÍNDEX

|  |          |
|--|----------|
| <b>1. Introducció</b>                      | <b>2</b> |
| <b>2. Prevenció de riscos</b>              | <b>3</b> |
| <b>3. Procediment</b>                      | <b>3</b> |
| 3.1. Mostra                                | 3        |
| 3.2. Material                              | 3        |
| 3.3. Reactius                              | 3        |
| 3.4. Càlculs previs                        | 3        |
| 3.5. Procediment experimental              | 4        |
| <b>4. Lectura de resultats</b>             | <b>4</b> |
| <b>5. Discussió de resultats/Conclusió</b> | <b>7</b> |
| <b>6. Tractament de residus</b>            | <b>8</b> |
| <b>7. Bibliografia</b>                     | <b>8</b> |
| <b>8. Annex 1</b>                          | <b>9</b> |
| 8.1 Introducció                            | 9        |
| 8.2 Anàlisis causes d'investigació         | 9        |
| 8.2.1 Introducció i causes                 | 9        |
| 8.2.2 Càlculs previs                       | 10       |
| 8.2.3 Procediment                          | 10       |
| 8.2.4 Resultats                            | 12       |
| 8.2.5 Discussió resultats                  | 12       |
| 8.3 Acció correctiva                       | 13       |

## **1. Introducció**

Els enterobacteris (família *Enterobacteriaceae*), són una família de bacteris gramnegatius, inclouen diferents gèneres com *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* o *Salmonella*, els quals poden causar malalties gastrointestinals o intoxicacions alimentàries, diarrea sanguinolenta i síndrome urèmica hemolítica (HUS) en *E. Coli*, Gastroenteritis per la salmonella per exemple. La seva detecció en un producte de consum directe com la *Monster* podria indicar un risc potencial per a la salut del consumidor, especialment si es tracta de soques patògenes. D'altra banda, la seva absència confirma bones pràctiques higièniques i un control adequat del procés productiu. (CDC)<sup>1</sup>, (UK Health Security Agency, 2024)<sup>2</sup> i (Food Safety Authority of Ireland)<sup>3</sup>. Són fermentadors de la glucosa, això vol dir que en el medi VRBG les colònies presents de enterobacteries són de color violeta i al voltant tenen un halo de color violeta, degut a la precipitació de les sals biliars (Manual Of Microbiological Culture Media)<sup>4</sup>

En l'anàlisi microbiològica d'aliments i begudes és essencial per garantir-ne la seguretat i la qualitat. En aquest context, s'ha dut a terme l'estudi de la presència d'enterobacteries en la beguda energètica *Monster*, amb la finalitat de verificar-ne la innocuïtat i comprovar si compleix amb els estàndards establerts per la normativa sanitària vigent (REGLAMENTO (CE) n° 2073/2005)<sup>5</sup>, la qual estableix com a valor de referència l'absència d'enterobacteris en criteris generals microbiològics aplicables a productes alimentaris. S'ha realitzar d'aquest anàlisi degut el fet de que els enterobacteris són indicadors de possibles contaminacions fecals o deficiències en el procés de fabricació, manipulació o emmagatzematge del producte. Tot i que es tracta d'una beguda amb un contingut elevat de sucres i additius àcids, que dificulten el creixement microbià, la seva anàlisi continua sent rellevant per confirmar si en el procés industrial es garanteix l'absència d'aquests microorganismes.

El mètode de determinació habitual es basa en la detecció i enumeració d'enterobacteris mitjançant cultiu en medi VRBG (Violet Red Bile Glucose agar), on aquests microorganismes fermenten la glucosa amb producció d'àcid i gas, provocant un canvi de color al medi, de vermell rosat a groc. (PanReac)<sup>6</sup>.

En conjunt, aquest anàlisi permet avaluar la qualitat higiènic-sanitària de la beguda *Monster* i verificar que el producte compleix els requisits de seguretat alimentària exigits per la legislació europea (REGLAMENTO (CE) n° 2073/2005)<sup>5</sup>, garantint així la confiança i la seguretat del consumidor.

## **2. Previsió de riscos**

- EPI's (bata, ulleres de seguretat, guants)
- Autoclau
- Placa calefactora

## **3. Procediment**

### **3.1. Mostra**

- Monster Original (Monster Energy Original Green)
- Monster Sense Sucre (Monster Energy Zero Ultra White)
- Monster Mango Loco

### **3.2. Material**

- 3 Vasos de precipitats petits
- Vas de precipitats gran
- 3 Flascons ISO petits
- Flascó ISO gran
- Proveta
- Espàtula
- Vidre de rellotge
- Mosca
- Autoclau
- Bany termostàtic
- Pipeta Pasteur
- 10 plaques de petri
- Nansa de Digrafsky
- Micropipeta 100  $\mu$ l
- Punes
- Estufa
- Placa calefactora + agitador
- Balança
- Vareta de vidre
- Aigua desionitzada
- Pipeta de 1 mL
- Pipeta de 10 mL
- Pipeta de 20 mL
- Cabina de bioseguretat

### **3.3. Reactius**

- Medi de cultiu VRBG (Ref: 610059)
- Aigua desionitzada
- Aigua de peptona (Ref: 611014)
- Soca Escherichia Coli (WDCM 00012 Trazable a MKTN 12)

### **3.4. Càlculs previs**

$$12 \text{ plaques} \cdot \frac{20 \text{ ml}}{1 \text{ placa}} = 240 \text{ ml H}_2\text{O} \quad 240 \text{ ml} + 15\% = 276 \text{ ml} \approx 280 \text{ ml H}_2\text{O}$$

$$280 \text{ ml} \cdot \frac{40,5 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} = 11,34 \text{ g VRBG}$$

Es suma un 15% per a assegurar que es té el medi suficient degut a que quan aquest s'autoclava a 121 °C s'evapora una part.

### **3.5. Procediment experimental**

- Preparació del medi VRBG
  - Agitar fins a dissolució completa i bullir durant 2 min.
  - Posar el medi al bany maria a 48 °C.
- Realitzar la sembra (es fan 3 plaques per cada mostra de Monster)
  - Agafar els tubs del bany termostàtic
  - Posar les plaques buides i el medi al costat del Bunsen.
  - Sembrar en cada placa buida 1 ml de mostra amb micropipeta.
  - Afegir 20 ml de medi a cada placa
  - Portar el medi restant al bany maria.
  - Deixar solidificar les plaques.
  - Afegir 5 ml de medi a cada placa i deixar refredar. (Sobre capa de medi per crear condicions anaeròbiques, i s'eviti el creixement excessiu de colònies).
- Incubar a 37 °C durant 24 hores.
- Fer la lectura dels resultats.

### **4. Lectura de resultats**

| <b>Placa</b> | <b>Monster Original</b> | <b>Monster Zero Ultra White (Sense Sucre)</b> | <b>Monster Mango Loco</b> |
|--------------|-------------------------|---|---------------------------|
| <b>1</b>     | Absència                | Absència                                      | Absència                  |
| <b>2</b>     | Absència                | Absència                                      | Absència                  |
| <b>3</b>     | Absència                | Absència                                      | Absència                  |

Taula 1. Resultats de les plaques

A totes les plaques s'ha observat que hi ha hagut absència de creixement d'enterobacteris però, en el moment d'afegir el medi VRBG a les plaques hi va haver un excés bombolles que no es van treure.

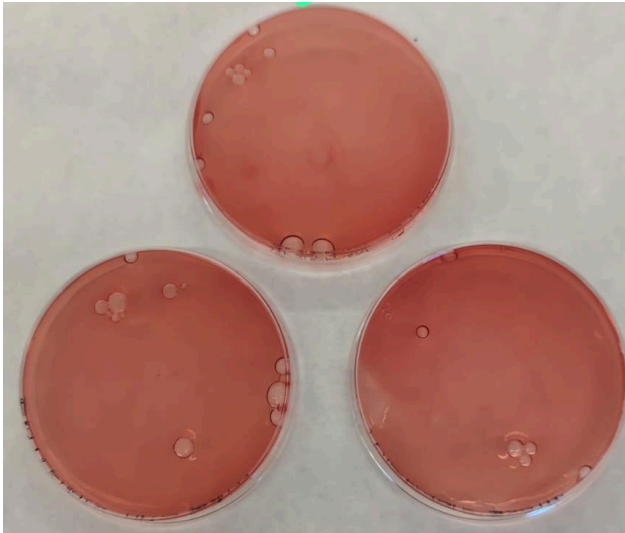


Foto 1. Plaques Enterobacteris Monster Original.

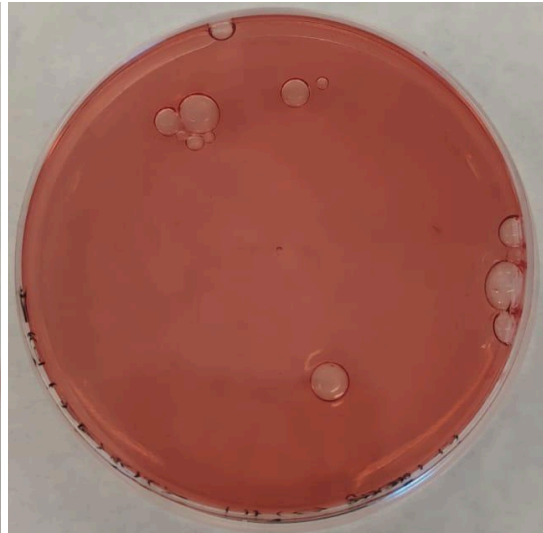


Foto 2. Placa Enterobacteris 1 Monster Original.

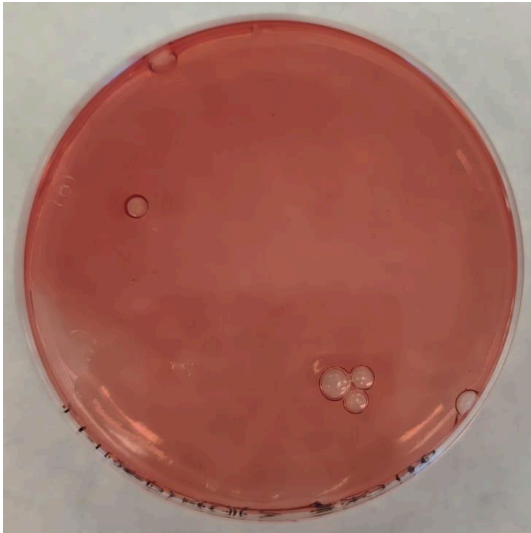


Foto 3. Placa Enterobacteris 2 Monster Original

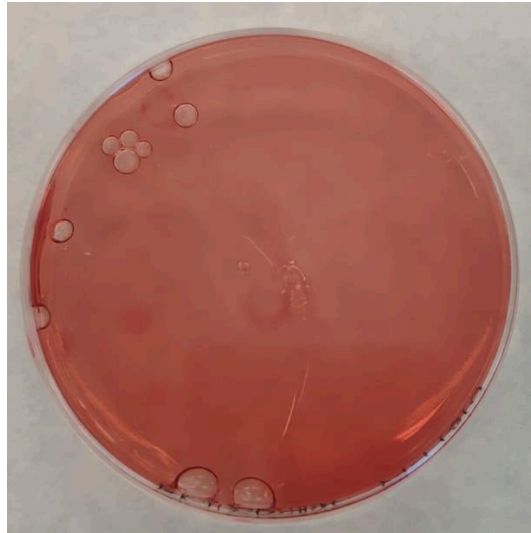


Foto 4. Placa Enterobacteris 3 Monster Original

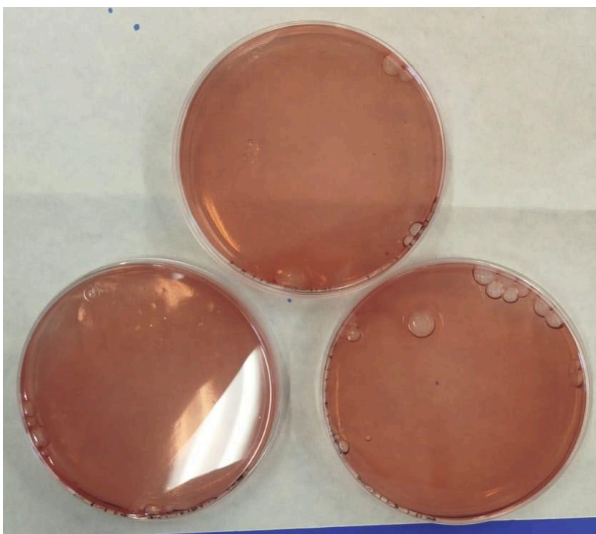


Foto 5. Plaques Enterobacteris Monster Zero Ultra White (Sense sucre)

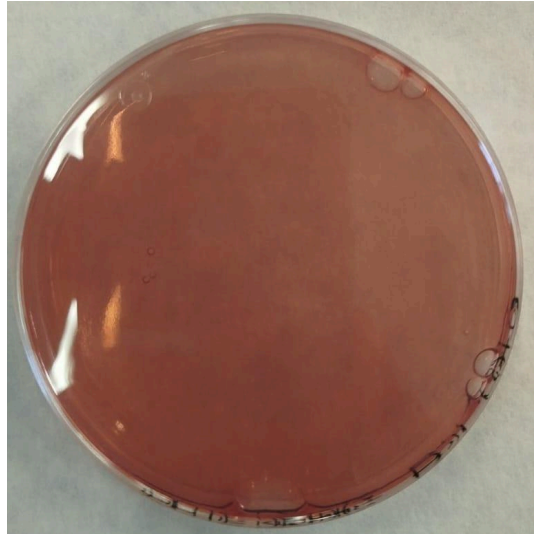


Foto 6. Placa Enterobacteris 1 Monster Zero Ultra White (Sense sucre)

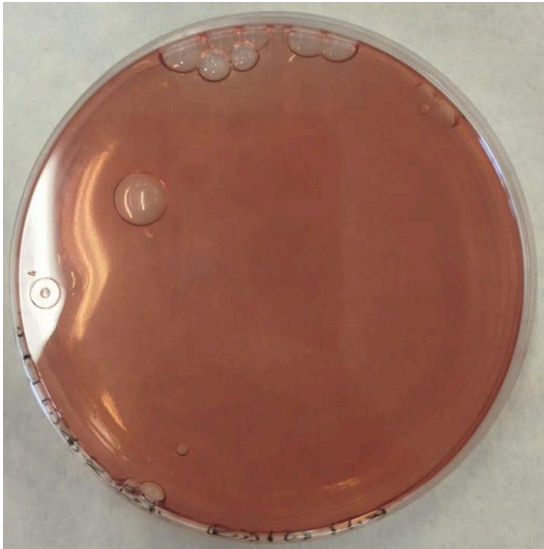


Foto 7. Placa Enterobacteris 2 Monster Zero Ultra White (Sense sucre)

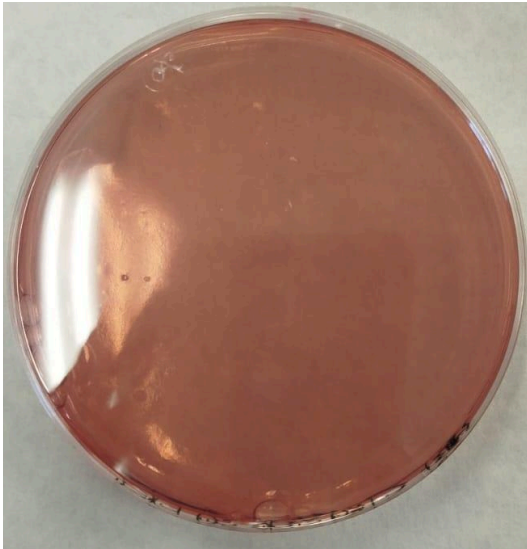


Foto 8. Placa Enterobacteris 3 Monster Zero Ultra White (Sense sucre)

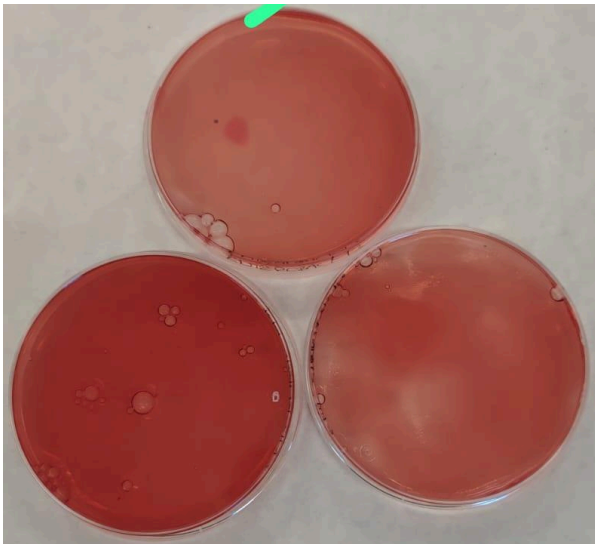


Foto 9. Plaques Enterobacteris Monster Mango Loco

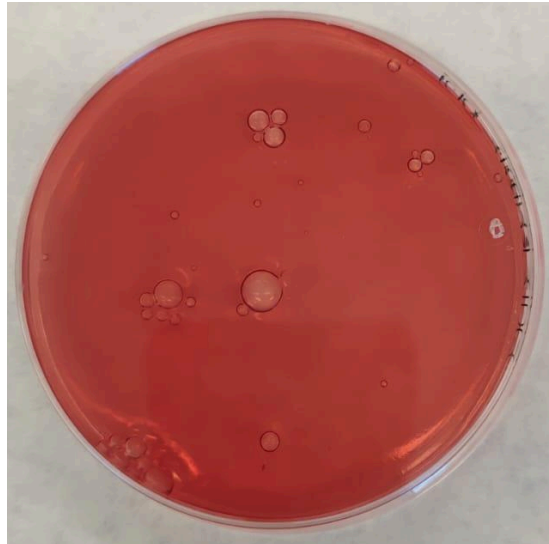


Foto 10. Placa Enterobacteris 1 Monster Mango Loco

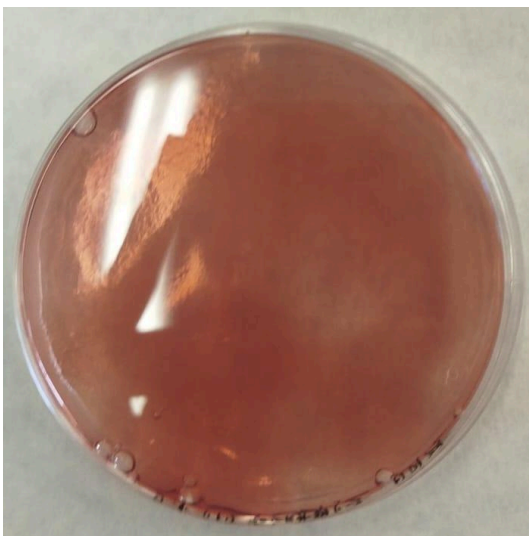


Foto 11. Placa Enterobacteris 2 Monster Mango Loco

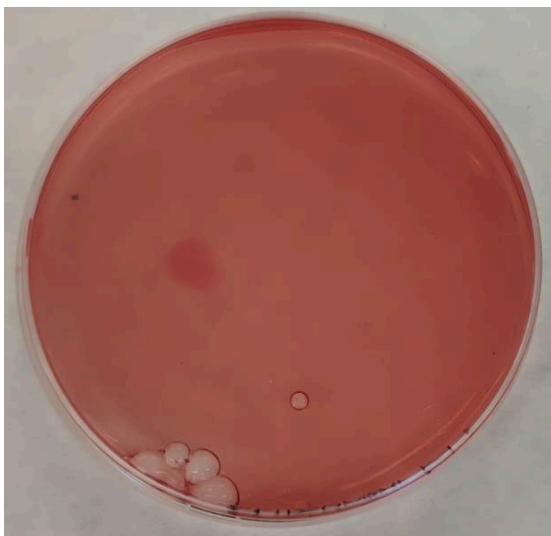


Foto 12. Placa Enterobacteris 3 Monster Mango Loco

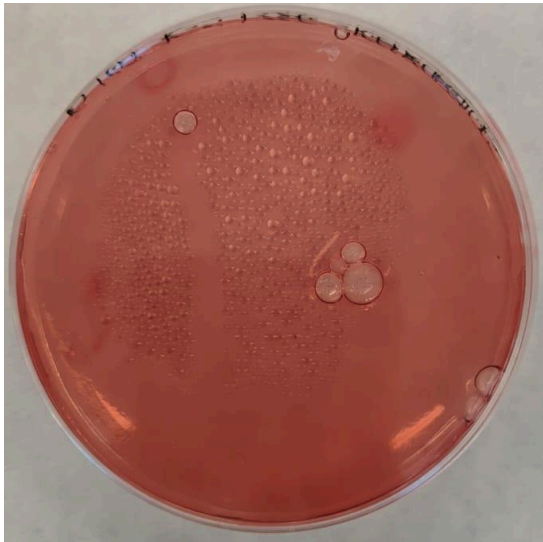


Foto 13. Control Negatiu Enterobacteris

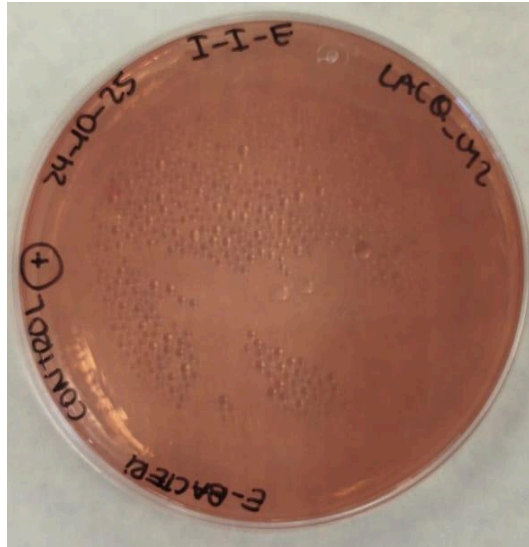


Foto 14. Control Positiu Enterobacteris (es descarta) (veure Anexe 1)

## **5. Discussió de resultats/Conclusió**

Els resultats obtinguts en l'anàlisi microbiològica de les tres variants de beguda energètica Monster (Monster Original, Monster Zero Ultra White i Monster Mango Loco) mostren absència total d'enterobacteris en totes les plaques analitzades mitjançant medi VRBG (n=3 per mostra).

Aquests resultats indiquen que les tres begudes compleixen amb el Reglament (CE) n° 2073/2005 (REGLAMENTO (CE) n° 2073/2005)<sup>2</sup>, el qual estableix l'absència d'enterobacteris en productes alimentaris. L'absència d'aquests microorganismes confirma bones pràctiques higièniques durant el procés de fabricació i l'efectivitat dels controls de qualitat del fabricant.

Aquest resultat era esperable tenint en compte les característiques intrínseques d'aquestes begudes que inhibeixen el creixement d'enterobacteris: pH àcid (2,5-4,0), presència de conservants (àcid benzoic, àcid sòrbic) i l'efecte bacteriostàtic del CO<sub>2</sub>. Els enterobacteris prefereixen ambients neutres (pH 6-8), per tant, el pH àcid actua com una barrera natural.

L'absència d'enterobacteris és especialment rellevant per la seguretat alimentària, ja que aquesta família inclou patògens com E. coli, Salmonella i Klebsiella, que poden causar malalties gastrointestinals greus. La seva absència descarta contaminació fecal i garanteix condicions higièniques adequades. (ScienceDirect)<sup>7</sup>

No obstant això, el control positiu va mostrar absència de creixement, fet que invalida l'anàlisi perquè això ens indica alguna problemàtica en el moment de realitzar-lo, lo qual s'explica a l'annexe 1, per a poder garantir que el medi VRBG es funcional i ens sigui capaç de permetre el creixement dels enterobacteris. Per tal de seguir el procediment d'una empresa s'obre una no-conformitat, d'un document que s'obre per desenvolupar el problema i buscar les solucions i quines han estat aquestes,

que s'explica detalladament en l'Annexe 1. Les possibles causes inclouen medi defectuós, soca inviable o errors en el procediment d'inoculació i incubació.

Malgrat aquesta limitació metodològica, els resultats obtinguts són coherents amb les expectatives teòriques basades en les característiques fisicoquímiques de Monster i els estàndards de qualitat habituals de la indústria de begudes energètiques, però, no es pot confirmar l'absència d'enterobacteris degut a que el control positiu va sortir negatiu i això no hauria d'haver passat.

Punt de millora, a l'hora de dispensar el medi a les plaques evitar que es formin bombolles.

## **6. Tractament de residus**

En acabar les plaques es posen en lleixiu durant 30 minuts després s'introdueixen a una bossa d'autoclau i es llencen a la paperera.

## **7. Bibliografia**

- 1) About Escherichia coli Infection. (2024, 14 mayo). E. Coli Infection (Escherichia Coli). Recuperado 7 de noviembre de 2025, de <https://www.cdc.gov/ecoli/about/index.html>
- 2) Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market. (2024). Recuperado 7 de noviembre de 2025, de <https://assets.publishing.service.gov.uk/media/66debd72e87ad2f1218265e1/UKHSA-ready-to-eat-guidelines-2024.pdf>
- 3) *Guidelines for the interpretation of results of microbiological testing of Ready-to-Eat foods placed on the market* (Revision 4). (s. f.). Recuperado 7 de noviembre de 2025, de <https://www.fsai.ie/getmedia/74524294-d92c-4471-9d90-9633d1915c35/guidance-note-3-guidelines-for-the-interpretation-of-results-of-microbiological-testing-of-ready-to-eat-foods-placed-on-the-market-4.pdf>
- 4) Difco&bbmanual: Manual of Microbiologicaal Culture Media (2.a ed.). (2009). pàgs visitades 619-621. Recuperat 07/11/25, de [https://fsl.nmsu.edu/documents/difcobbmanual\\_2nded\\_lowres.pdf?utm](https://fsl.nmsu.edu/documents/difcobbmanual_2nded_lowres.pdf?utm)
- 5) REGLAMENTO (CE) No 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativos los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (2005). Recuperado 7 de noviembre de 2025, de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20060101>
- 6) Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) (Ph. Eur.) (ISO21528) (Dehydrated Culture Media) for microbiology. (s. f.). En *PanReac Química S.L.U.* Recuperado 8 de noviembre de 2025, de [https://www.itwreagents.com/download\\_file/product\\_infos/413745/en/413745\\_en.pdf?utm](https://www.itwreagents.com/download_file/product_infos/413745/en/413745_en.pdf?utm)
- 7) Enterobacteriaceae. (s. f.). ScienceDirect. Recuperado 7 de noviembre de 2025, de <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/enterobacteriaceae>

## **8. Annex 1**

### **8.1 Introducció**

Durant l'anàlisi microbiològica d'enterobacteries en les begudes energètiques Monster, es va detectar una no conformitat crítica: el control positiu va mostrar absència de creixement en el medi VRBG (Violet Red Bile Glucose agar). El control positiu és essencial per verificar que el medi de cultiu és funcional i capaç de suportar el creixement dels microorganismes diana (PanReac)<sup>6</sup>. L'absència de creixement invalida els resultats obtinguts i requereix una investigació de les causes

### **8.2 Anàlisis causes d'investigació**

#### **8.2.1 Introducció i causes**

L'absència de creixement en el control positiu pot ser deguda a tres causes principals: medi VRBG defectuós (caducitat, pH inadequat, concentració excessiva d'agents inhibidors), soca bacteriana inviable (emmagatzematge inadequat, baixa viabilitat cel·lular) o errors en el procediment (inoculació incorrecta, condicions d'incubació inapropiades). (Manual of Microbiological Culture Media)<sup>4</sup> (PanReac)<sup>6</sup>.

Per identificar la causa del problema, es va dur a terme una investigació sistemàtica estructurada en tres blocs principals:

1. Verificació del medi VRBG: Es va comprovar la data de caducitat del medi per descartar que hagués superat el període d'ús recomanat. A més, es va realitzar una inspecció visual per detectar possibles alteracions en el color, la turbidesa o la textura que poguessin indicar una degradació o contaminació del medi. Un medi en mal estat podria inhibir el creixement bacterià o afavorir resultats falsos.
2. Verificació de la soca bacteriana: Es va avaluar la viabilitat i la identitat de la soca utilitzada mitjançant tres proves complementàries. En primer lloc, es va realitzar un cultiu en agar nutritiu per confirmar que els bacteris eren viables i capaços de créixer. En segon lloc, es va dur a terme una tinció de Gram per verificar la morfologia i les característiques tintorials esperades. Finalment, es va realitzar un enriquiment en TSB per afavorir la recuperació de cèl·lules bacterianes eventuais en baix nombre o en estat d'estrès.
3. Revisió del procediment experimental: Es va revisar detalladament el protocol seguit durant l'experiment per detectar possibles errors en la preparació de les dilucions, els temps d'incubació, les temperatures emprades o qualsevol altra variable que pogués haver compromès el resultat. Aquesta revisió va permetre identificar si la causa del problema era d'origen tècnic o humà.

### **8.2.2 Càlculs previs**

- **Quantitat d'aigua necessària per a tres tubs de 10 mL**

$$3 \text{ tubs} \times \frac{10 \text{ mL}}{1 \text{ tub}} = 30 \text{ mL H}_2\text{O}$$

- **Medi TSB 30 g en 1 L (segons l'etiqueta del medi)**

$$30 \text{ mL} \times \frac{30 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = 1 \text{ g medi TSB}$$

- **Aigua necessària per a dues plaques de petri**

20 mL/placa

$$2 \text{ plaques} \times \frac{20 \text{ mL}}{1 \text{ placa}} = 40 \text{ mL H}_2\text{O}$$

40 mL H<sub>2</sub>O + 15% (Volum extra es per a un medi sòlid (VRBG))

- **Medi VRBG 40,5 g en 1 L (segons l'etiqueta del medi)**

$$46 \text{ mL} \times \frac{40,5 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = 1,86 \text{ g}$$

### **8.2.3 Procediment**

- Preparar la dissolució salina 0,9%
  - Pesar 0,9 g de NaCl.
  - Dissoldre en 100 mL d'aigua destil·lada.
  - Esterilitzar en autoclau a 121 °C durant 15-20 minuts.
  - Deixar refredar abans d'utilitzar.
- Resuspendre la soca d'E. coli
  - Agafar el tub amb la soca bacteriana.
  - Afegir 1 mL de dissolució salina estèril amb pipeta estèril.
  - Treballar sempre prop del bec Bunsen per mantenir l'esterilitat.
- Homogeneïtzar la suspensió
  - Fer un vòrtex durant 10-15 segons.
  - Assegurar que la soca quedi ben resuspensa i homogènia.
- Preparar els tubs amb medi TSB
  - Agafar tubs de cultiu estèrils.
  - Afegir 10 mL de medi TSB (Tryptone Soya Broth) a cada tub.
  - Etiquetar els tubs amb data, mostra i identificació.
- Inocular la mostra
  - Amb pipeta estèril, transferir 0,1 mL de la suspensió bacteriana.
  - Inocular en un dels tubs amb TSB.
  - Agitar suaument per homogeneïtzar.

- Incubar en fase líquida
  - Col·locar els tubs a l'estufa d'incubació.
  - Ajustar la temperatura a 37 °C.
  - Incubar durant 24-48 hores.
  - Això permet l'enriquiment i creixement bacterià.
- Realitzar la sembra en profunditat
  - Preparar plaques de Petri estèrils.
  - Inocular 0,1 mL del cultiu al centre de la placa buida.
  - Distribuir la mostra per tota la base de la placa.
  - Fondre el medi VRBG (Violet Red Bile Glucose Agar) al bany maria fins que estigui líquid però no massa calent (~45-50°C).
  - Afegir aproximadament 10-15 mL de medi VRBG líquid sobre la mostra.
  - Barrejar suaument amb moviments circulars de la placa.
  - Deixar solidificar sobre superfície plana i horitzontal.
  - Esperar que solidifiqui completament la primera capa (15-20 minuts).
  - Afegir 10 mL addicionals de medi VRBG (mantingut al bany maria a ~45-50°C).
  - Deixar solidificar completament.
- Incubar les plaques
  - Col·locar les plaques invertides (tapa a baix) a l'estufa.
  - Mantenir la temperatura a 37 °C.
  - Incubar durant 48 hores.

## **8.2.4 Resultats**



Foto 15. Control Negatiu Enterobacteris

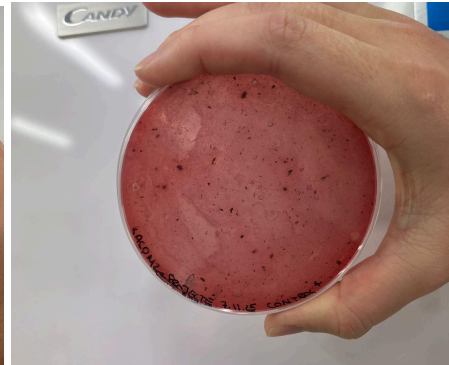


Foto 16. Control Positiu Enterobacteris

En ambdues plaques s'aprecia l'aparició de petites partícules de color fosc distribuïdes per la superfície del medi, que podrien ser confoses amb colònies bacterianes. Aquestes partícules corresponen a detritus, és a dir, restes de material no biològic o precipitats propis del medi VRBG, i no a creixement bacterià real.

El medi VRBG (Violet Red Bile Glucose) és un medi selectiu i diferencial que, per la seva composició, pot generar ocasionalment aquest tipus de precipitats durant la solidificació o l'incubació. És important saber distingir-los de les colònies autèntiques d'Enterobacteris, les quals presenten una morfologia definida, contorn regular i sovint un halo de precipitació de sals biliars al seu voltant.

Així doncs, la presència d'aquests detritus no invalida els resultats, però posa de manifest la importància d'una correcta interpretació visual de les plaques i de disposar sempre de controls ben identificats per fer una lectura fiable.

## **8.2.5 Discussió resultats**

Els resultats negatius obtinguts en les plaques de control positiu, malgrat haver utilitzat una soca *E. coli* enriquida, mitjançant enriquiment previ en medi TSB, confirmen que el problema no resideix ni en la soca bacteriana ni en el procediment experimental (Manual of Microbiological Culture Media)<sup>4</sup>. El fet que les condicions d'incubació fossin correctes i el procediment d'inoculació s'hagués seguit adequadament descarta errors humans.

Per tant, l'única causa plausible que explica l'absència persistent de creixement és un medi VRBG defectuós (PanReac)<sup>6</sup>. Els agents selectius del medi (sals biliars i violeta de genciana) podrien estar en concentracions excessives o el medi podria haver perdut les seves propietats nutritives, implicant així el creixement fins i tot d'una soca viable i enriquida. Aquesta situació compromet greument la fiabilitat de l'anàlisi microbiològica i fa impossible confirmar l'absència real d'enterobacteries en les mostres de begudes Monster analitzades.

### **8.3 Acció correctiva**

Davant aquests resultats negatius repetits i avent descartat les altres causes possibles, s'implementen les següents correccions per tenir un bon resultat en els següents lots:

- **Substitució del medi VRBG:** descart immediat del lot defectuós i adquisició d'un nou lot amb caducitat vigent i verificat.
- **Retirada del producte:** retirada preventiva del lot de begudes Monster del mercat segons el Reglament (CE) n° 2073/2005 (REGLAMENTO (CE) n° 2073/2005)<sup>5</sup>, ja que no es pot confirmar l'absència d'enterobacteries amb un sistema analític invàlid.
- **Reanàlisi obligatòria:** les mostres s'han de realitzar amb el nou medi abans de qualsevol alliberament del producte i enriquiment previ de la soca d'E. Coli en medi TSB.

Addicionalment, s'estableixen mesures preventives per evitar futures no conformitats: sistema de control de caducitats amb alertes automàtiques, controls de qualitat obligatoris de cada nou lot de medi abans del seu primer ús, i auditories periòdiques dels registres de controls positius i negatius (ScienceDirect)<sup>7</sup>.

Aquesta no conformitat evidencia la importància crítica del control de qualitat dels reactius en microbiologia alimentària. La retirada preventiva del lot garanteix la seguretat del consumidor i el compliment normatiu, aplicant el principi de precaució establert per la legislació europea en matèria de seguretat alimentària.