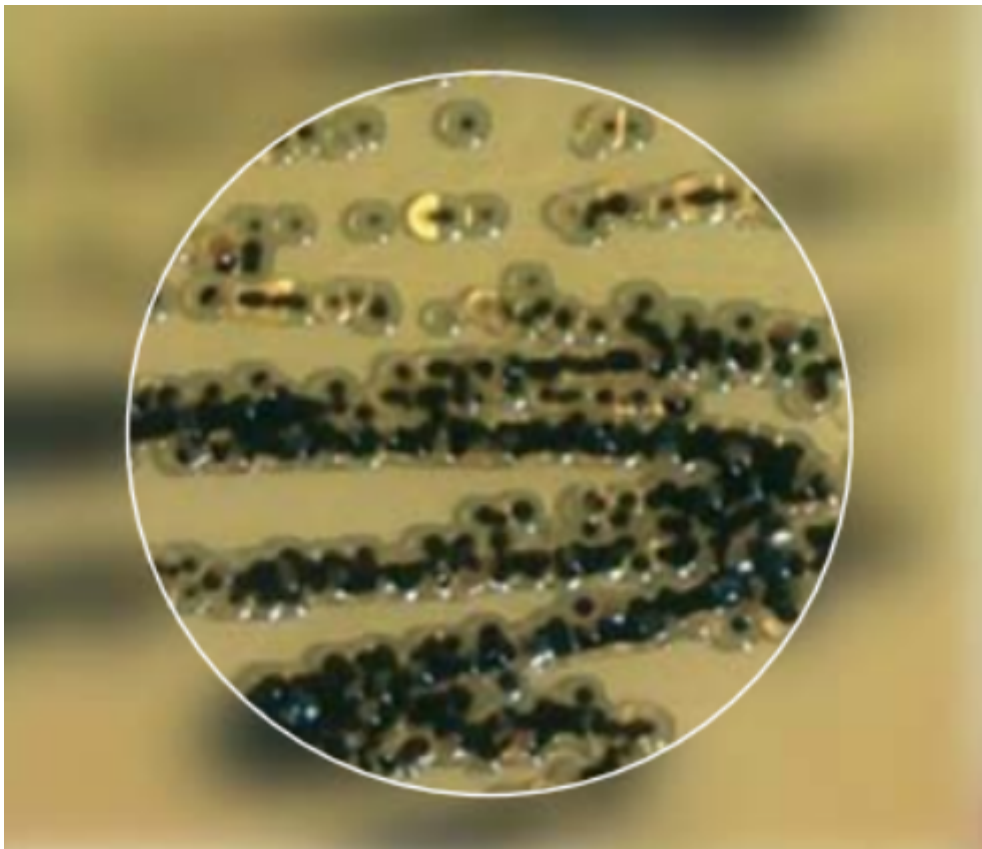




Laboratoris Lamter

Determinació de Clostridium sulfit-reductors en Monster Original, Monster Zero Ultra White i Monster Mango Loco



Yohalis Cuevas
Andrea Martinez
David Barrientos

ÍNDEX

1. Introducció	2
2. Prevenció de riscos	3
3. Procediment	3
3.1. Mostra	3
3.2. Material	3
3.3. Reactiu/Medis	4
3.4. Càlculs previs	4
3.5. Procediment experimental	5
4. Resultats	6
5. Discussió de resultats/Conclusions	7
6. Tractament de residus	8
7. Bibliografia	8

1. Introducció

Els *Clostridium* sulfit-reductors són bacteris àmpliament distribuïts en la natura: es troben a l'intestí d'humans i animals, però també en el sòl, sediments i aigües (Opportunistic foodborne Pathogen)¹. Cal destacar que la seva contaminació no és exclusivament d'origen fecal; en el context agroalimentari, l'ús de fertilitzants orgànics com purins o compost en les matèries primeres representa una font de contaminació igual de rellevant (International Journal Of environmental Research and public health)².

Quant a la seva taxonomia i morfologia, pertanyen a la família *Clostridiaceae* i es presenten com a bacils grampositius amb una paret gruixuda de peptidoglicà, formadors d'espores, no mòbils i anaerobis estrictes, és a dir, no poden viure ni créixer en presència d'oxigen (*Clostridium perfringens* Infection)³.

La característica més destacada d'aquest grup bacterià és precisament la formació d'espores extremadament resistents, capaces de sobreviure durant mesos o fins i tot anys en l'ambient, suportant temperatures elevades, tractaments amb desinfectants com el clor i condicions ambientals adverses (Journal Of Applied Microbiology)⁴. Aquesta resistència és especialment significativa en el context dels tractaments convencionals de desinfecció de l'aigua i dels processos tèrmics aplicats en la indústria alimentària, ja que poden persistir quan la resta de microbiota ja ha estat eliminada (Opportunistic foodborne Pathogen)¹.

Gràcies a aquesta excepcional resistència, els clostridis sulfit-reductors s'utilitzen com a indicadors de contaminació fecal passada, complementant els indicadors clàssics com *E. coli* o els coliformes totals. Mentre que *E. coli* i els enterococs desapareixen de l'ambient en un període relativament curt, les espores de clostridis es mantenen viables molt més temps. Així, la seva presència en una mostra on ja no es detecta *E. coli* indica que va existir una contaminació fecal en el passat que els indicadors convencionals ja no podrien revelar (Journal of Water and Health)⁵, (IWA)⁶.

Pel que fa a la rellevància per a les nostres mostres (tres variants de begudes energètiques de la marca Monster: Monster Energy Original Green, Monster Energy Zero Ultra White i Monster Mango Loco) la detecció de *Clostridium* sulfit-reductor és pertinent per diverses raons. Durant el procés d'elaboració, les begudes energètiques passen per processos de mescla, carbonatació i envasat que poden implicar contacte amb superfícies, equips o matèries primeres contaminades amb espores. Si aquestes espores sobreviuen als tractaments tèrmics o de desinfecció aplicats durant la producció, poden germinar en condicions anaeròbiques i produir toxines o causar deteriorament del producte (International Journal Of environmental Research and public health)². Les llaunes, per la seva naturalesa hermètica, ofereixen precisament les condicions d'anaerobiosi que afavoreixen el creixement d'aquests microorganismes un cop les espores han germinat. A diferència de *Salmonella* o

Listeria, que com a formes vegetatives són sensibles als tractaments tèrmics convencionals, les espores de clostridis poden resistir aquests processos i quedar com a contaminants únics en el producte final (Opportunistic foodborne Pathogen)¹. A més, ingredients com els extractes de fruita presents al Monster Mango Loco, o altres components d'origen vegetal, poden haver estat en contacte amb sòls tractats amb fertilitzants orgànics, que constitueixen una font significativa de clostridis no necessàriament d'origen fecal (International Journal Of environmental Research and public health)². Finalment, la presència de clostridis en les mostres, fins i tot en absència d'*E. coli*, podria indicar un episodi de contaminació fecal anterior en algun punt de la cadena de producció que els indicadors convencionals ja no serien capaços de revelar (Journal of Water and Health)⁵.

Quant a la metodologia de detecció, atès que els clostridis sulfit-reductors són anaerobis estrictes, la seva detecció requereix condicions específiques. Durant la inoculació s'utilitza la tècnica d'inoculació profunda i s'aplica vaselina a la superfície del tub en acabar, aïllant el medi de l'atmosfera exterior i evitant la inhibició del creixement per l'oxigen. El medi de cultiu emprat és el SPS Agar (*Sulfite Polymyxin Sulfadiazine Agar*), un medi selectiu i diferencial que inhibeix la flora acompanyant i permet identificar els clostridis per la reducció del sulfit a sulfur, visible com a colònies de color negre (Polish Journal of Microbiology)⁷.

2. Prevenció 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

- Vas de precipitat
- Tubs amb rosca
- Pipetes estèrils
- Vaselina (parafina líquida)
- Bany termostàtic
- Vidre de rellotge
- Espàtula
- Proveta
- Autoclau
- Balança
- Flascons
- Mosca estèril

3.3. Reactiu/Medis

- Medi de cultiu SPS

S'utilitza el medi SPS Agar per determinar el *Clostridium* sulfít-reductor, ja que aquest medi és selectiu i diferencial. El SPS Agar, també conegut com a *Sulfite Polymyxin Sulfadiazine Agar*, és un medi selectiu utilitzat principalment per a l'aïllament i enumeració del *Clostridium perfringens* a partir de mostres d'aliments i aigua (Polish Journal of Microbiology)⁷. Conté citrat fèrric i sulfít sòdic com a indicadors de H₂S, mentre que la polimixina B sulfat i la sulfadiacina actuen com a inhibidors dels microorganismes no desitjats, inhibint el creixement de microorganismes no desitjats i permetent l'aïllament dels *Clostridium* sulfít-reductors (Polish Journal of Microbiology)⁷.

El *C. perfringens* és un bacteri anaeròbic Gram-positiu formador d'espores que, en condicions d'anaerobiosi, redueix el sulfít sòdic a sulfur d'hidrogen (Polish Journal of Microbiology)⁷. Aquest sulfur d'hidrogen reacciona amb el citrat fèrric i es forma el precipitat de sulfur de ferro de color negre, que dona el color característic a les colònies de *Clostridium* (Polish Journal of Microbiology)⁷.

- Aigua de peptona
- Aigua desionitzada estèril

3.4. Càlculs previs

- **Medi SPS Agar**

41,3 g medi SPS Agar en 1000 ml

$$11 \text{ tubs} \cdot \frac{10 \text{ ml medi SPS agar}}{1 \text{ tub}} = 110 \text{ ml medi SPS Agar}$$

$$110 \cdot 0,15 = 16,5 \rightarrow 110 + 16,5 = 126,5 \text{ ml}$$

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.

$$126,5 \text{ ml H}_2\text{O} \cdot \frac{41,3 \text{ g medi SPS Agar}}{1000 \text{ ml H}_2\text{O}} = 5,224 \text{ g medi SPS Agar}$$

5,224 g medi SPS Agar amb 126,5 ml d'Aigua desionitzada

- **Aigua de peptona**

20 g en 1000 ml

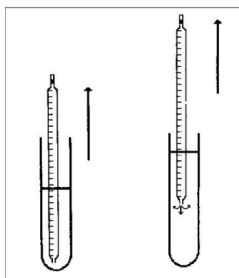
$$(1 \text{ ml mostra} \times 9 \text{ ml Aigua peptona}) \times 3 \text{ mostres} = 27 \text{ mL Aigua de Peptona} \approx 30 \text{ mL}$$

$$30 \text{ mL Aigua Peptona} \times \frac{20 \text{ g Aigua de Peptona}}{1000 \text{ mL}} = 0,6 \text{ g Aigua de Peptona}$$

0,6 g aigua de peptona amb 30 ml d'aigua desionitzada

3.5. Procediment experimental

- Preparar el material i el medi, autoclavar els tubs de vidre, mosca, flascons...
- Preparació del medi de cultiu SPS agar.
 - Pesar 5,224 g de medi SPS Agar en un vas de precipitats i abocar 126,5 ml d'aigua desionitzada.
 - Escalfar i agitar fins a ebullició i bullir durant 1 minut.
 - Introduir el medi a un flascó.
 - Esterilitzar a 121 °C durant 15-20 min.
 - Distribuir 10 ml de medi en els 11 tubs.
- Desgasificar les tres Monster
 - Col·locar tres vasos de precipitats estèrils i abocar aproximadament 20 ml de cada mostra de Monster en ampolles Pyrex diferents:
 - Primer vas: Monster Original.
 - Segon vas: Monster Ultra White (sense sucre).
 - Tercer vas: Monster Mango Loco.
 - Col·locar el vas amb una mosca estèril dins (ha estat autoclavada prèviament) i agitar fins que no hi hagi gas a la mostra (no hi havia presència de bombolles o escuma als vasos). (fer per cada mostra)
- Realitzar les dilucions 1:10 de cada Monster
 - Agafar 1 ml de la Monster Original desgasificada abocar-lo a un flascó i afegir 9 ml d'aigua de peptona. Repetir el mateix procediment per a les mostres de Monster Ultra White (sense sucre) i Monster Mango Loco.
- Realitzar la sembra per triplicat.
 - Amb una pipeta estèril agafar 1 ml de mostra i realitzar la sembra utilitzant la tècnica d'inoculació profunda, que consisteix començar a posar la mostra al final del medi que hi ha al tub i anar pujant progressivament, mentre es va posant la mostra, per repartir la mostra al llarg de tot el medi que és al tub:



- 1 ml de la mostra Monster Original i inocular-la al medi. (x3)

- 1 ml de la mostra Monster Zero Ultra White i inocular-la al medi. (x3)
- 1 ml de la mostra Monster Mango Loco i inocular-la al medi. (x3)
- Refredar ràpidament els tubs sota l'aixeta en posició vertical, per a que el medi se solidifiqui.
- Afegir amb una pipeta estèril una capa de vaselina estèril en cada tub per aconseguir condicions d'anaerobiosi.
- Tancar els tubs i no agitar-los.
- Incubar a 37 °C durant 72 hores.
- Fer la lectura dels resultats

4. Resultats

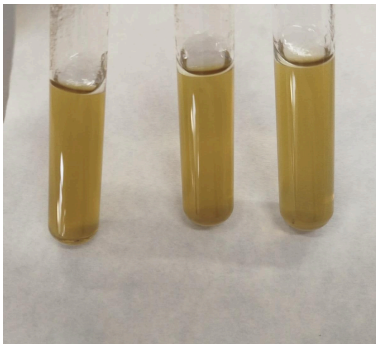


Foto 1. Tubs Clostridium Monster Original

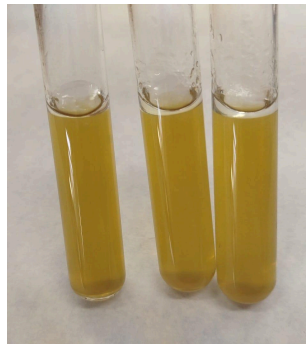


Foto 2. Tubs Clostridium Monster Zero Ultra White (sense sucre)

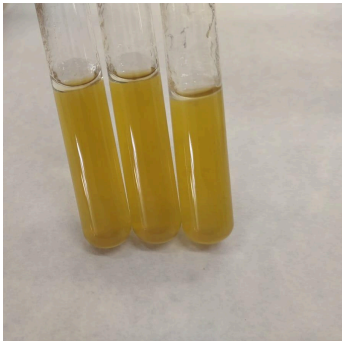


Foto 3. Tubs Clostridium Monster Mango Loco



Foto 4. Tub Clostridium Control Negatiu

Absència de colònies de Clostridium sulfit reductors als tubs complint així amb la normativa degut a que la presència de clostridis en les mostres podria indicar un episodi de contaminació anterior en algun punt de la cadena de producció que els indicadors convencionals ja no serien capaços de revelar (Journal of Water and Health)⁵.

Placa	Monster Original	Monster Zero Ultra White (Sense Sucre)	Monster Mango Loco
1	Absència	Absència	Absència
2	Absència	Absència	Absència
3	Absència	Absència	Absència

Taula 1. Resultats

5. Discussió de resultats/Conclusions

L'anàlisi microbiològica de les tres begudes energètiques Monster Original, Monster Zero Ultra White i Monster Mango Loco ha mostrat l'absència de colònies als tubs després de 72 hores d'incubació a 37°C, la qual cosa suggereix l'absència de clostridis sulfit-reductors en les mostres analitzades.

Aquest resultat és coherent amb una bona qualitat microbiològica dels productes pel que fa a aquest paràmetre concret. L'absència de Clostridium Sulfit Reductors podria indicar una certa eficàcia dels processos de fabricació, tractament de l'aigua i envasament, ja que aquests microorganismes, en ser anaerobis esporulats extremadament resistents, només s'eliminen mitjançant tractaments tèrmics intensos, una filtració adequada de l'aigua utilitzada en la producció i unes condicions d'envasament que evitin la contaminació posterior del producte. Per tant, no detectar-ne la presència suggereix que, almenys en les mostres analitzades, els processos de control aplicats haurien estat suficients per prevenir-ne la supervivència o introducció. No obstant això, cal tenir en compte que l'absència de CSR per si sola no permet afirmar de manera concloent l'excel·lència microbiològica global dels productes, ja que caldria considerar altres indicadors microbiològics [com coliformes totals, llevats i floridures, o aerobis mesòfils totals] per disposar d'una valoració completa (Journal of Applied Microbiology)⁴.

Pel que fa al marc normatiu, el Decret 407/1975, de 7 de març (BOE-A-1975-5121)⁸, pel qual s'aprovava la Reglamentació Tecnicosanitària per a l'Elaboració i Venda de Begudes Refrescants establia l'absència de *Clostridium* sulfit-reductors en 100 ml d'aigua potable preparada destinada a l'elaboració de begudes refrescants. Encara que aquesta normativa ja no estigui en vigor, els resultats obtinguts s'hi alineen, cosa que reflecteix el compliment dels estàndards de qualitat microbiològica que històricament han regit el sector (IWA)⁶.

La concordança dels resultats en les tres mostres analitzades suggereix una certa consistència en els processos industrials de producció, tot i que no es pot generalitzar ni afirmar de manera definitiva l'absència de risc per a la salut pública basant-se únicament en aquest paràmetre (Polish Journal of

Microbiology)⁷. Cal mantenir controls de qualitat continus i exhaustius, que incloguin una bateria àmplia d'anàlisis microbiològiques, per poder garantir adequadament la seguretat dels consumidors.

6. Tractament de residus

En acabar, els tubs es posen en lleixiu durant 30 minuts, després, es treu el medi de cultiu dels tubs i es llença a la paperera, els tubs es renten amb sabó i es guarden.

7. Bibliografia

1. *Clostridium perfringens: Opportunistic Foodborne Pathogen, Its Diversity and Epidemiological Significance*. (2023, 26 mayo). <https://www.mdpi.com/2076-0817/12/6/768>
2. Derongs, L., Druilhe, C., Ziebal, C., Maréchal, C. L., & Pourcher, A. (2020). Characterization of Clostridium Perfringens Isolates Collected from Three Agricultural Biogas Plants over a One-Year Period. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 17(15), 5450. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155450>
3. Yao, P. Y., & Annamaraju, P. (2023, 8 agosto). *Clostridium perfringens Infection*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559049/>
4. Setlow, P. (2006). Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal Of Applied Microbiology*, 101(3), 514-525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x>
5. Stelma, G. N. (2018). Use of bacterial spores in monitoring water quality and treatment. *Journal Of Water And Health*, 16(4), 491-500. <https://doi.org/10.2166/wh.2018.013>
6. *Biofilm forming ability of Sphingomonas paucimobilis isolated from community drinking water systems on plumbing materials used in water distribution*. (2017). IWA. <https://iwaponline.com/jwh/article/15/6/942/37973/Biofilm-forming-ability-of-Sphingomonas>
7. Matuszewska, R., & Mała, Ł. (2023). Comparison of mCP and TSC Media to Enumerate Clostridium perfringens in Surface Water Samples. *Polish Journal Of Microbiology*, 72(4), 413-419. <https://doi.org/10.33073/pjm-2023-039>
8. BOE-A-1975-5121 Decreto 407/1975, de 7 de marzo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración y Venta de Bebidas Refrescantes. (s. f.). <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-1975-5121>