



## Laboratoris Lamter

# Determinació de fongs en Monster Original, Monster Zero Ultra White i Monster Mango Loco



Yohalis Cuevas  
Andrea Martínez  
David Barrientos

# ÍNDEX

<b>1. Introducció</b>	<b>2</b>
<b>2. Prevenció de riscos</b>	<b>4</b>
<b>3. Procediment</b>	<b>4</b>
3.1. Mostra	4
3.2. Material	4
3.3. Medis	4
3.4. Reactius	4
3.5. Càlculs previs	5
3.6. Procediment experimental	5
<b>4. Lectura de resultats</b>	<b>6</b>
<b>5. Discussió de resultats/conclusions</b>	<b>8</b>
<b>6. Tractament de residus</b>	<b>8</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>9</b>

## **1. Introducció**

L'anàlisi microbiològica de fongs en aliments i begudes és fonamental per garantir la seguretat alimentària, ja que alguns fongs poden deteriorar els productes, produir micotoxines perilloses i representar un risc per a la salut del consumidor (Fungal mycotoxins in food commodities)<sup>1</sup>. Per aquest motiu, és imprescindible disposar de mètodes fiables per detectar-los i quantificar-los (Toxicology Reports)<sup>2</sup>. S'ha estudiat la presència de fongs en la beguda energètica Monster per verificar-ne la innocuïtat i el compliment de la normativa sanitària vigent establerta pel Reglament (CE) n° 2073/2005 de la Comissió de 15 de novembre de 2005 (Reglament (CE) n° 2073/2005)<sup>3</sup>, relatiu als criteris microbiològics aplicables als productes alimentaris. Diversos estudis científics han demostrat contaminació fúngica en begudes ensucrades i carbonatades: l'estudi de Silva al 2022 (Archives of Microbiology)<sup>4</sup> va identificar espècies com *Aspergillus flavus*, *Penicillium citrinum* i *Paecilomyces* en begudes comercials brasileres i bolivianes, i l'estudi d'Oridikitorusinyaa al 2024 (Journal of Advances in Microbiology Research)<sup>5</sup> va detectar recomptes de  $1,3\text{--}2,2 \times 10^3$  UFC/ml amb *Aspergillus niger* (27,4%) com el més prevalent en begudes refrescants. Tot i que el pH àcid (2,5–4,0), sucres elevats i conservants dificulten el creixement microbià, alguns fongs osmofílics poden sobreviure, com ara *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailii* i *Candida versatilis*, sent els fongs indicadors de deficiències en fabricació o emmagatzematge.

Els fongs són organismes eucariotes heteròtrofs que inclouen llevats unicel·lulars i floridures filamentoses, que són els que s'han de vigilar a la indústria alimentària (Fungal mycotoxins in food commodities)<sup>1</sup>. En el medi Agar Sabouraud Dextrosa (pH 5,6), els fongs poden metabolitzar la dextrosa i hidrolitzen les peptones formant colònies visibles: les llevats formen colònies cremoses i brillants, mentre que les floridures presenten miceli aeri amb diversos colors (Toxicology Reports)<sup>2</sup>. Per exemple, *Aspergillus* produeix colònies verdes o negres amb textura polsosa, *Penicillium* forma colònies verdes-blavoses vellutades, i *Càndida*, el qual és un llevat no autèntic, origina colònies blanquinoses i cremoses (Toxicology Reports)<sup>2</sup>.

Els fongs osmofílics són microorganismes capaços de créixer en ambients amb una activitat d'aigua molt baixa i una elevada concentració d'osmolit, com sucres o sals (Toxicology Reports)<sup>2</sup>. Aquesta tolerància es deu a mecanismes osmoreguladors que els permeten mantenir el balanç hídric intracel·lular en condicions hostils, com l'acumulació de soluts compatibles com el glicerol (International Journal of Food Microbiology)<sup>6</sup>. La seva presència en begudes ensucrades com Monster és rellevant tant des del punt de vista de la seguretat com de la qualitat, ja que espècies com *Zygosaccharomyces bailii* poden fermentar sucres i produir CO<sub>2</sub> i etanol, alterant el sabor, l'olor i la pressió interna de l'envàs (SCISPACE)<sup>7</sup>. Pel que fa a la detecció en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA), aquest medi no és l'òptim

per a fongs osmofílics, atès que conté un 2% de dextrosa, una concentració molt inferior a la requerida per simular l'estrès osmòtic en què viuen. Medis específics com el Malt Extract Agar suplementat amb un 50% de sacarosa (MEA50) o el Dichloran Glycerol Agar (DG18) estan dissenyats expressament per a la seva recuperació (Applied and Environmental Microbiology)<sup>8</sup>, (Toxicology Reports)<sup>2</sup>. Malgrat això, en el context d'aquest estudi l'ús del SDA es justifica perquè l'objectiu principal és avaluar la qualitat higiènico-sanitària general de la beguda i detectar fongs potencialment toxigènics; els fongs osmofílics, si bé poden comprometre les qualitats organolèptiques del producte, no solen produir micotoxines en concentracions perilloses i el seu creixement queda en part inhibit pels conservants presents a Monster.

Els fongs d'interès inclouen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Candida*, que poden deteriorar aliments o produir micotoxines perilloses com aflatoxines (hepatotòxiques i carcinogèniques), ocratoxina A (nefrotòxica) i fumonisines (càncer esofàgic) (Applied and Environmental Microbiology)<sup>8</sup>. La seva detecció en Monster indicaria risc per a la salut, mentre que la seva absència confirma que es fan servir bones pràctiques higièniques.

El mètode utilitzat es basa en cultiu amb Agar Sabouraud Dextrosa (pH 5,6), que inhibeix bacteris i afavoreix fongs (Toxicology Reports)<sup>2</sup>. Es prepara una dilució 1/10 de cada mostra amb aigua de peptona bufferitzada i s'incuben les plaques sembrades a una estufa a 22 °C durant 5 dies, formant colònies comptables en cas que la mostra contingui fongs viables.

Aquest anàlisi avalua la qualitat higiènico-sanitària de la beguda energètica Monster prenent com a referència principal el Reglament (CE) n° 2073/2005 (Reglament (CE) n° 2073/2005)<sup>3</sup>, que estableix els criteris microbiològics aplicables als productes alimentaris comercialitzats a la Unió Europea. A títol orientatiu, i per contextualitzar els recomptes obtinguts, també es consideren els criteris de Jay al 2005 (Modern Food Microbiology)<sup>9</sup>: <math>10^2</math> UFC/g (acceptables), fins <math>10^3</math> UFC/g (tolerables) i ><math>10^4</math>–<math>10^5</math> UFC/g (rebuig). Cal precisar que aquests criteris orientatius no substitueixen la normativa vigent, sinó que complementen la interpretació dels resultats. El Reial Decret 140/2003 (Reial Decret 140/2003)<sup>10</sup>, en canvi, s'aplica exclusivament a l'aigua de consum humà i no és directament extrapolable a begudes energètiques; s'esmenta únicament com a referència del nivell d'exigència sanitària en matrius aquoses, on s'exigeix absència total de fongs.

## **2. Prevenció de riscos**

- Autoclau
- Placa Calefactora
- Guants
- Bata
- Ulleres de seguretat

## **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
- 11 plaques de petri
- Nansa de Digralsky
- Micropipeta 100 l
- Punes
- Estufa
- Placa calefactora + agitador
- Balança
- Vareta de vidre
- Aigua desionitzada
- Pipeta d'1 mL
- Pipeta de 10 mL
- Pipeta de 20 mL
- Cabina de bioseguretat

### **3.3. Medis**

- Medi Sabouraud

### **3.4. Reactius**

- Aigua desionitzada
- Aigua de peptona

### **3.5. Càlculs previs**

- Medi Sabouraud

$$11 \text{ plaques} \times \frac{20 \text{ mL}}{1} = 220 \text{ mL H}_2\text{O} \quad 220 \text{ mL} + 15\% = 253 \text{ mL H}_2\text{O}$$

$$253 \text{ mL} \times \frac{65 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = 16,45 \text{ g Medi Sabouraud}$$

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

- Aigua de Peptona

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

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

### **3.6. Procediment experimental**

- Preparar el medi de cultiu Sabouraud.
  - Pesar 16,445 g de Medi Sabouraud en un vas de precipitats i abocar 253 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.
  - Posar el medi a la cabina de bioseguretat.
  - Posar les 11 plaques buides a la cabina de bioseguretat.
  - Aboca 20 ml de medi a cada placa:
    - 3 plaques per Monster Original
    - 3 plaques per Monster Zero Ultra White
    - 3 plaques per Monster Mango Loco
    - 1 placa per control negatiu
    - 1 placa per de més per utilitzar-la com a reserva per si en el moment de sembrar les plaques que s'utilitzen per l'anàlisi es trenca el medi, per a que les colònies creixin a la superfície del medi i no a la part trencada.
  - Deixar solidificar el medi.

- Desgasificar les tres Monsters a la cabina de bioseguretat.
  - Col·locar tres flascons petits, prèviament autoclavats, i abocar aproximadament 20 ml de cada mostra de Monster en flascons diferents:
    - Primer flascó: Monster Original.
    - Segon flascó: Monster Ultra White (sense sucre).
    - Tercer flascó: Monster Mango Loco.
  - Col·locar al flascó una mosca estèril dins i agitar fins que no hi hagi gas a la mostra, és a dir, fins que s'hagi eliminat completament les bombolles de CO<sub>2</sub>. (fer per cada mostra).
- Realitzar les dilucions 1:10 de cada Monster a la cabina de bioseguretat. La normativa no ho indica però es realitza per a minimitzar les interferències de la mostra com conservants, àcids orgànics com l'àcid cítric o l'àcid ascòrbic entre altres.
  - 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, a la cabina de bioseguretat.
  - Amb una micropipeta agafar 100 l de mostra i disposar-la sobre el medi:
    - 100 µl de la mostra Monster Original disposar-la sobre el medi. (x3)
    - 100 µl de la mostra Monster Zero Ultra White disposar-la sobre el medi. (x3)
    - 100 µl de la mostra Monster Mango Loco disposar-la sobre el medi. (x3)
  - Realitzar la sembra per extensió amb la nansa Digrafsky.
  - Tancar les plaques.
- Incubar a 22 °C durant 5 dies.
- Fer la lectura dels resultats.

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

Placa	Monster Original	Monster Zero Ultra White	Monster Mango Loco
1	Absència	Absència	Absència
2	Absència	Absència	Absència
3	Absència	Absència	Absència

Taula 1: Resultats de creixement a les plaques de SDA.



Foto 1. Plaques Fongs Monster Original

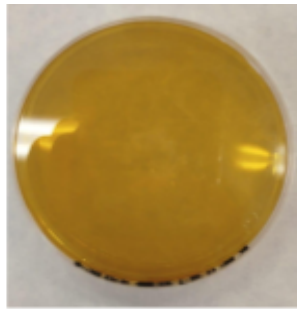


Foto 2. Placa Fongs 1 Monster Original

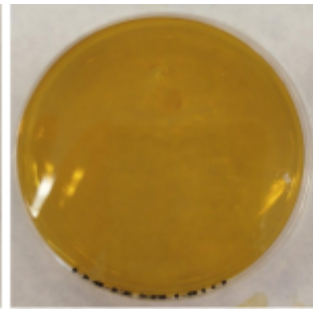


Foto 3. Placa Fongs 2 Monster Original

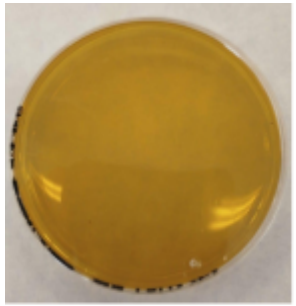


Foto 4. Placa Fongs 3 Monster Original

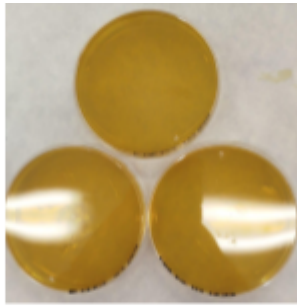


Foto 5. Plaques Fongs Monster Zero Ultra White

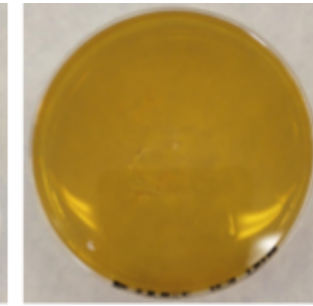


Foto 6. Placa Fongs 1 Monster Zero Ultra White

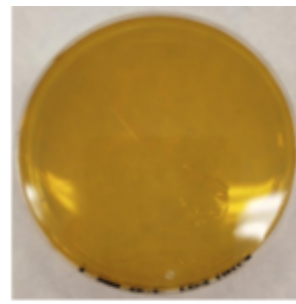


Foto 7. Placa Fongs 2 Monster Zero Ultra White

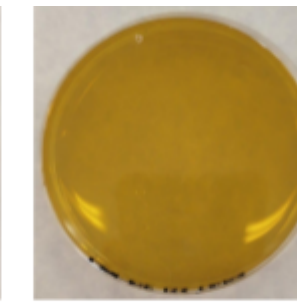


Foto 8. Placa Fongs 3 Monster Zero Ultra White

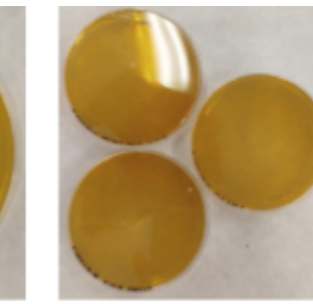


Foto 9. Plaques Fongs Monster Mango Loco

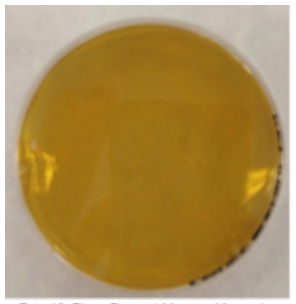


Foto 10. Placa Fongs 1 Monster Mango Loco

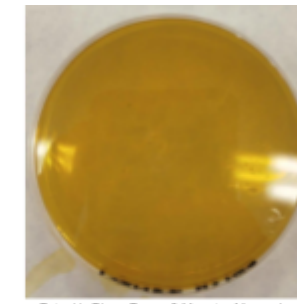


Foto 11. Placa Fongs 2 Monster Mango Loco

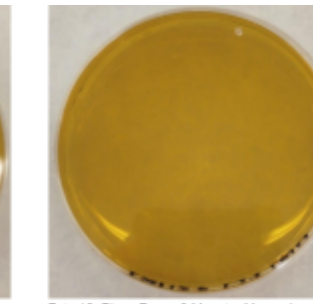


Foto 12. Placa Fongs 3 Monster Mango Loco

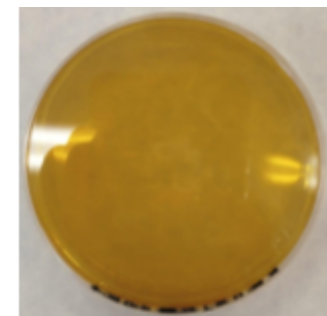


Foto 13. Control Negatiu Fongs

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

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 de fongs en totes les plaques analitzades (n = 3 per mostra).

Aquests resultats indiquen que les tres begudes compleixen amb criteris microbiològics satisfactoris pel que fa a contaminació fúngica, demostrant bones pràctiques higièniques durant el procés de fabricació, envasament i emmagatzematge. L'absència de fongs suggereix que les mesures preventives implementades pel fabricant són efectius i fan un seguiment correcte de les normes de correcte fabricació.

Aquest resultat és coherent amb les característiques intrínseques d'aquestes begudes que dificulten el creixement fúngic: pH àcid (2,5-4,0), presència de conservants (àcid benzoic i àcid sòrbic), i en el cas de les variants carbonatades, l'efecte inhibidor del CO<sub>2</sub>.

En conclusió, les tres variants de Monster analitzades són microbiològicament segures pel que fa a la presència de fongs, complint amb els estàndards de qualitat higiènic-sanitària i garantint la seguretat del consumidor segons el Reial Decret 140/2003 (Reial Decret 140/2003)<sup>10</sup>, que estableix l'absència de fongs com a criteri de qualitat microbiològica.

## **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. Bibliografía**

1. Pandey, A. K., Samota, M. K., Kumar, A., Silva, A. S., & Dubey, N. K. (2023). Fungal mycotoxins in food commodities: present status and future concerns. *Frontiers In Sustainable Food Systems*, 7. <https://www.frontiersin.org/journals/sustainable-food-systems/articles/10.3389/fsufs.2023.1162595/full>
2. Navale, V., Vamkudoth, K. R., Ajmera, S., & Dhuri, V. (2021). Aspergillus derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity. *Toxicology Reports*, 8, 1008-1030. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8363598/>
3. BOE.es - DOUE-L-2005-82539 Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. (s. f.). <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2005-82539>
4. Silva, M. M. N., Holanda, V. L., Pereira, K. S., & Coelho, M. A. Z. (2022). Microbiological contamination profile in soft drinks. *Archives Of Microbiology*, 204(3), 194. Recuperado 24 de abril de 2026 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35217916/>
5. Oridikitorusinyaa, O., Amaechi, G., & Emmanuel, O. O. (2024). Investigation of fungal contamination in soft drinks sold at Rivers State University. *Journal of Advances in Microbiology Research*, 5(2), 119–124. <https://www.microbiojournal.com/article/171/5-2-8-787.pdf>
6. Spoilage yeasts in the wine industry. (s. f.). En *International Journal Of Food Microbiology*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160503002460?via%3Dihub>
7. Food and Beverage Spoilage Yeasts. (2006, 1 enero). SCISPACE. Recuperado 24 de abril de 2026, de <https://scispace.com/papers/food-and-beverage-spoilage-yeasts-4qyu8944bk>
8. King, A. D., Hocking, A. D., & Pitt, J. I. (1979). Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied And Environmental Microbiology*, 37(5), 959-964. <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/aem.37.5.959-964.1979>
9. Modern Food Microbiology. (s. f.). Google Books. [https://books.google.es/books?id=KbTDBAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?id=KbTDBAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
10. BOE-A-2003-3596 Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. (s. f.). <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2003-3596>