



## Laboratoris Lamter

# Determinació de *Staphylococcus aureus* 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>3</b>
<b>3. Procediment</b>	<b>3</b>
3.1. Mostra	3
3.2. Material	3
3.3. Reactius/Medis	4
3.4. Càlculs previs	4
3.5. Procediment experimental	5
<b>4. Resultats</b>	<b>6</b>
<b>5. Discussió de resultats/Conclusions</b>	<b>9</b>
<b>6. Tractament de residus</b>	<b>10</b>
<b>7. Bibliografia</b>	<b>11</b>

## **1. Introducció**

Staphylococcus és un gènere de bacteris anaerobis àmpliament distribuïda en el medi ambient. El seu principal reservori són els animals i les persones, trobant-se habitualment a la pell i mucoses, la qual cosa fa que gairebé tota la població humana pugui ser portadora, augmentant la probabilitat de contaminació dels aliments. (Elika Seguridad Alimentaria)<sup>1</sup>.

La subespècie *Staphylococcus Aureus* és molt persistent al medi ambient i es pot trobar a l'aire, aigua, residus, maquinària i superfícies de la indústria alimentària. Pot sobreviure llargs temps en ambients secs i en aliments amb alt contingut de sals i sucres. (Elika Seguridad Alimentaria)<sup>1</sup>.

*S. aureus* és un bacteri coc grampositiu, immòbil i no formador d'espores, capaç de viure en condicions aeròbiques i anaeròbiques (Institut Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo)<sup>2</sup>; (AESAN)<sup>3</sup>. Creix en un rang ampli de temperatura (6-48 °C) i pH (4-10), amb condicions òptimes entre 35-41 °C i pH 6-7 (Mapa de Perills Alimentaris)<sup>4</sup>. La seva capacitat de produir enterotoxines només es manifesta quan les seves concentracions als aliments són elevades (superiors a 10.000 UFC/g), destacant la importància de la seva detecció per garantir la seguretat alimentària (BC Centre for Disease Control)<sup>5</sup>.

La determinació de *S. aureus* en begudes és fonamental perquè la seva presència indica possibles deficiències en les condicions higièniques durant l'elaboració, manipulació o neteja dels equips. Aquest bacteri es pot transmetre per consum d'aliments o begudes contaminades i per contaminació creuada en processos posteriors, la qual cosa fa imprescindible controlar la seva presència. (Elika Seguridad Alimentaria)<sup>1</sup>. Els conservants, naturals o afegits durant el procés de fabricació, com àcid sòrbic i àcid benzoic actuen com a barrera addicional per inhibir el creixement de *S. aureus* i altres microorganismes responsables de la generació de toxines. (Arshine Food)<sup>6</sup>; (Amerex)<sup>7</sup>.

*S. aureus* i altres estafilococs poden produir enterotoxines, toxines estables que afecten la mucosa intestinal i que són resistents a la calor, congelació i irradiació, fent-les difícils d'eliminar una vegada formades (AESAN)<sup>3</sup>; (Mapa de Perills Alimentaris)<sup>4</sup>. Aquestes toxines no alteren les propietats organolèptiques dels aliments, i només provoquen intoxicació quan la concentració del bacteri és elevada (105-108 UFC/g) (Elika Seguridad Alimentaria)<sup>1</sup>. Les intoxicacions alimentàries solen ser lleus, amb nàusees, vòmits i diarrea, tot i que poden ser més greus en nens, persones grans o immunodeprimides (AESAN)<sup>3</sup>.

Segons la normativa Decret 407/1975, de 7 de març, pel qual s'aprova la Reglamentació Tecnosanitària per a l'Elaboració i Venda de Begudes Refrescants (Decreto 407/1975)<sup>8</sup> que ha estat derogada, en l'aigua potable preparada que s'utilitza per a la preparació de les begudes refrescants hi havia d'haver de *Staphylococcus Aureus* absència en 100 ml d'aigua.

Per a la detecció de *S. aureus* s'utilitza el medi Agar Baird-Parker, un medi selectiu i diferencial que permet identificar el bacteri mitjançant el creixement de colònies característiques. És recomanable realitzar controls positius per assegurar la viabilitat del medi i verificar que les colònies observades corresponen realment a *S. aureus*, encara que en aquest cas no s'ha realitzat el control positiu perquè no n'hi havia.

## **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**

- 3 Vasos de precipitats petits
- 3 Flascos petits
- Proveta
- Espàtula
- Vidre de rellotge
- Rovell d'ou-tel·lurit
- Mosca
- Autoclau
- Pipeta Pasteur
- 10 Plaques de petri
- Nansa digralsky
- Micropipeta 100  $\mu$ l
- Punes
- Estufa
- Placa calefactora + agitador
- Balança
- Pipetes de 2 ml
- Pipeta de 20 ml
- Cabina de bioseguretat

### 3.3. Reactius/Medis

- Medi de cultiu Baird-Parker

S'utilitza el medi Agar Baird-Parker per a determinar si hi ha presència o absència de *Staphylococcus aureus*, ja que aquest medi és selectiu i diferencial. Aquest medi altament nutritiu, que conté peptona de caseïna i extracte de carn constitueixen la font de carboni i nitrogen, l'extracte de llevat aporta vitamines del complex B, també conté piruvat sòdic i glicina que afavoreixen el creixement de *Staphylococcus aureus*, a més conté clorur de liti i tel·lurit potàssic que inhibeixen el creixement de la flora acompanyant. Els *Staphylococcus aureus* tenen activitat lecitinasas. (Fitxa de producte, Britania)<sup>9</sup>

- Aigua desionitzada
- Aigua de peptona
- Rovell d'ou-tel·lurit

El rovell d'ou que no està al medi BP, se l'ha d'introduir després d'haver esterilitzat el medi, és el que fa que el medi sigui diferencial. Afegim el rovell d'ou per detectar si el bacteri produeix l'enzim lecitinasas, ja que el rovell d'ou conté lecitina (fosfolípid) i si el bacteri produeix lecitinasas, la lecitinasas degrada la lecitina del rovell d'ou i s'observa un halo opac al voltant de la colònia.

### 3.4. Càlculs previs

- Medi Baird-Parker

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

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.

$$280 \text{ ml H}_2\text{O} \cdot \frac{60 \text{ g BP}}{1000 \text{ ml}} = 16,8 \text{ g BP}$$

#### **16,8 g Baird-Parker amb 280 ml d'Aigua desionitzada**

- Rovell d'ou tel·lurit

$$280 \text{ ml} \cdot \frac{50 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} = 14 \text{ ml de rovell d'ou tel·lurit}$$

- 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 material volumètric (vasos de precipitats, proveta), vidre de rellotge, mosca, puntes de micropipetes.
- Preparació del medi de cultiu Baird-Parker.
  - Pesar 16,8 g de medi Baird-Parker en un vas de precipitats i abocar 280 ml d'aigua desionitzada.
  - Escalfar i agitar fins a ebullició i bullir durant 1 minut.
  - Traspasar el medi a un flascó.
  - Esterilitzar a 121 °C durant 15-20 min.
  - Afegir l'emulsió estèril rovell d'ou-tel·lurit al medi.
  - Barrejar uniformement i homogeneïtzar.
  - Posar el medi a la cabina de bioseguretat.
  - Posar les 10 plaques buides a la cabina de bioseguretat.
  - Abocar 20 ml de medi a cada placa amb una pipeta serològica estèril:
    - 3 plaques per Monster Original
    - 3 plaques per Monster Zero Ultra White
    - 3 plaques per Monster Mango Loco
    - 1 placa per control negatiu
    - 2 plaques per si de cas
  - Deixar solidificar el medi.
- Desgasificar les tres Monster
  - Col·locar tres vasos de precipitats i abocar aproximadament 20 ml de cada mostra de Monster en vasos 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 (ha estat autoclavada prèviament) dins i agitar fins que no hi hagi gas a la mostra (no hi havia presència de bombolles o escuma als vasos). Es fan aquest replicats 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 Zero Ultra White (sense sucre) i Monster Mango Loco.
- Realitzar la sembra per triplicat.
  - Amb una micropipeta agafar 100  $\mu$ l de mostra i disposar-la sobre el medi:
    - 100  $\mu$ l de la mostra Monster Original disposar-la sobre el medi. (x3)
    - 100  $\mu$ l de la mostra Monster Zero Ultra White disposar-la sobre el medi. (x3)
    - 100  $\mu$ l de la mostra Monster Mango Loco disposar-la sobre el medi. (x3)
  - Realitzar la sembra per extensió amb la nansa Digralsky.
  - Tancar les plaques
- Incubar a 37 °C durant 72 hores.
- Fer la lectura dels resultats

## 4. Resultats

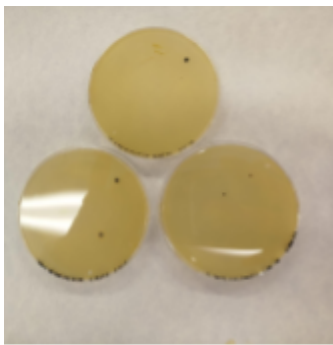


Foto 1. Plaques Monster Original

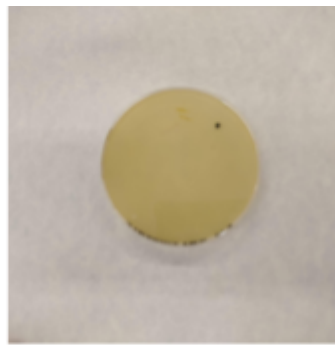


Foto 2. Placa 1 Monster Original

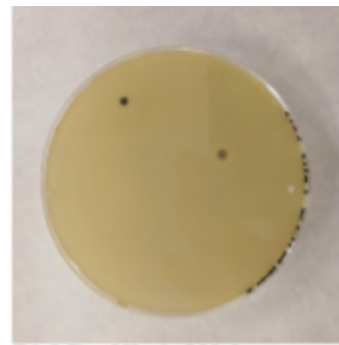


Foto 3. Placa 2 Monster Original

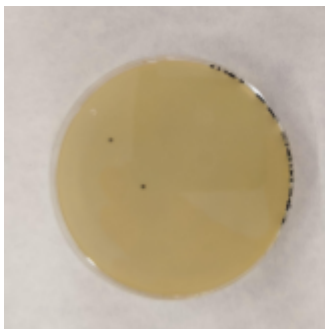


Foto 4. Placa 3 Monster Original

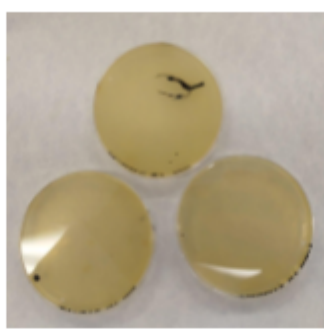


Foto 5. Plaques Monster Zero Ultra White

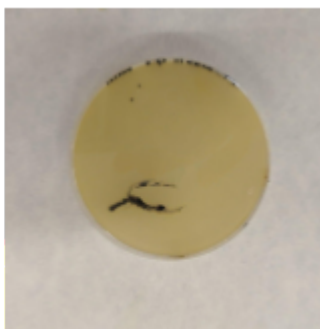


Foto 6. Placa 1 Monster Zero Ultra White

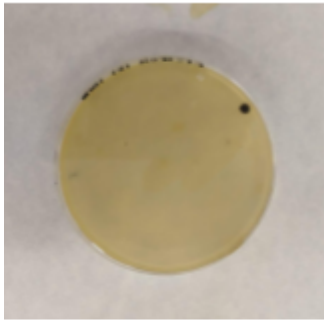


Foto 7. Placa 2 Monster Zero Ultra White

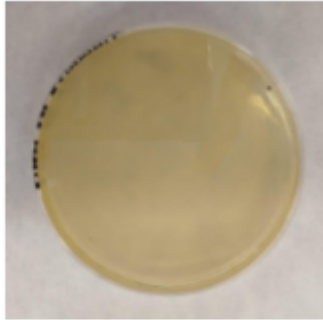


Foto 8. Placa 3 Monster Zero Ultra White

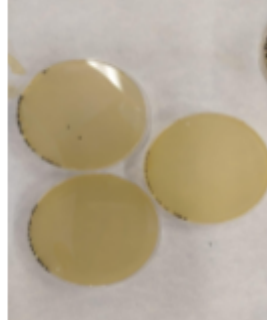


Foto 9. Plaques Monster Mango Loco

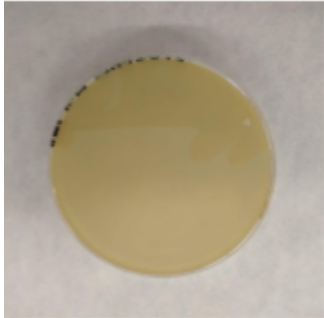


Foto 10. Placa 1 Monster Mango Loco

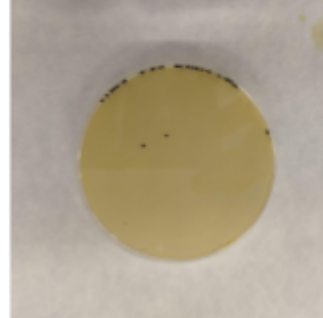


Foto 11. Placa 2 Monster Mango Loco

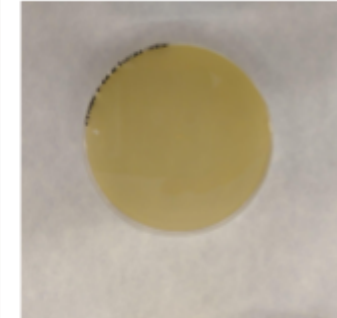


Foto 12. Placa 3 Monster Mango Loco

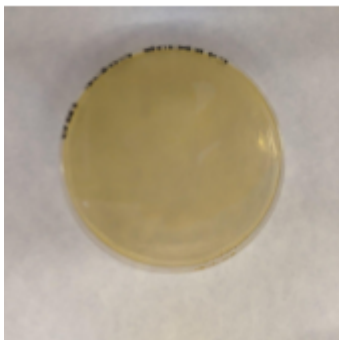


Foto 13. Placa Control Negatiu

- Presència de colònies de Staphylococcus Aureus a les plaques.

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

Taula 1. Resultats presència/absència MO en les mostres

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

Les tres begudes energètiques analitzades (Monster Original, Monster Zero Ultra White i Monster Mango Loco) s'ha obtingut colònies de *Staphylococcus Aureus*, en la segona placa de la Monster Original es veu una colònia amb un halus brillant al voltant de la colònia negra, la colònia ja estava en una fase de creixement latent, a les altres plaques s'observen les colònies sense el halus, encara no havia aparegut.

La presència d'aquestes colònies de *Staphylococcus Aureus* a les begudes de Monster possiblement per una contaminació humana, hem pogut contaminar les tres mostres amb l'*Staphylococcus Aureus* que tenim present a les mucoses, mans... i que no són soques patogèniques. Tot i això, la presència de *Staphylococcus aureus* en begudes destinades al consum humà no és acceptable, llavors el nostre procés experimental no compleix la normativa, motiu pel qual aquest lot hauria de ser rebutjat fins a confirmar els resultats mitjançant una nova anàlisi, però no podem repetir la prova perquè no tenim temps.

Degut a aquest inconvenient, no és possible confirmar si la contaminació observada és pròpia del producte o conseqüència d'una contaminació creuada durant la manipulació. Per aquest motiu, no es pot afirmar que les begudes de Monster estiguin lliures de *Staphylococcus aureus*. Tal com s'ha comentat anteriorment, seria necessari repetir la prova sota condicions estrictament estèrils per determinar si la presència del microorganisme és deguda a una contaminació creuada.

Cal tenir en compte que les begudes energètiques analitzades passen per processos de pasteurització i contenen conservants com l'àcid bòrbic i l'àcid benzoic, els quals inhibeixen el creixement de microorganismes patògens, inclòs *Staphylococcus aureus*. Per tant, la detecció de colònies en aquest assaig podria no reflectir una contaminació del producte comercial, sinó una contaminació durant la manipulació experimental, per confirmar-ho s'hauria de repetir la prova.

Per a futures determinacions, cal tenir en compte mesures estrictament d'higiene i seguretat, tenir cura a l'hora de manipular/treballar en condicions estèrils, netejar-se les mans amb etanol durant la determinació a entrar i sortir de la cabina de bioseguretat, evitar parlar o respirar directament sobre les plaques de cultiu.

## **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. *Staphylococcus aureus* - ELIKA Seguridad Alimentaria. (2024, 5 julio). ELIKA Seguridad Alimentaria. Recuperado 24 de octubre de 2025, de <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/staphylococcus-aureus/>
2. Insst. (s. f.). *Staphylococcus aureus*. Portal INSST. <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/staphylococcus-aureus>
3. AESAN - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (s. f.). Recuperado 24 de octubre de 2025, de [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/intoxicacion\\_enterotoxinas\\_estafilococicas.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/intoxicacion_enterotoxinas_estafilococicas.htm)
4. *Staphylococcus aureus* - Mapa Perills. (2025, 30 abril). Mapa Perills. Recuperado 24 de octubre de 2025, de <https://mapaperills.uab.cat/perill/staphylococcus-aureus/>
5. *Staphylococcus aureus* (food poisoning). (s. f.). BC Center For Disease Control. <https://www.bccdc.ca/health-info/diseases-conditions/staphylococcus-aureus>
6. *Comparación de los conservantes comúnmente utilizados en condimentos y sus propiedades antibacterianas.-Información de la industria-Arshine Food Additives Co., Ltd.* (s. f.-b). <https://es.arshinefood.com/Industry-information/-the-comparison-of-commonly-used-preservatives-in-seasonings-and-their-antibacterial-properties>
7. Lázaro, N., & Lázaro, N. (2025, 19 mayo). *PREVENCIÓN DE TOXINAS ALIMENTARIAS MEDIANTE CONSERVANTES NATURALES.* Amerex Ingredientes. <https://amerexingredientes.com/prevencion-de-toxinas-alimentarias-mediante-conservantes-naturales/>
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>
9. *Baird Parker Agar Base.* (s. f.). [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_607060f71db9b.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607060f71db9b.pdf)