

## Диагностический метод окраски свежего мяса по Гансу Кристиану Граму

*П.А. Кулясов, к.в.н., А.И. Мушаева, бакалавр, Е.Д. Новиченко, бакалавр, Е.А. Юдина, бакалавр, К.А. Имашев, бакалавр, ФГБОУ ВО Калмыцкий ГУ*

С начала XV и до XIX вв. включительно в научной среде велись ожесточённые споры о причинах возникновения брожения, гниения и известных на тот период времени инфекционных

патологий. Знаменитый немецкий химик Юстус Либих утверждал, что первоисточником всех вышеперечисленных процессов является химическая реакция, происходящая как между компонентами забродившей жидкости и приводящая её к порче, так и химические изменения в самом живом или мёртвом теле. Другой химик-мыслитель француз Луи Пастер утверждал, что возможной причиной

этих явлений является наличие индивидуального для каждого отдельно взятого природного процесса в живой и мёртвой среде биологического возбудителя. Пытаясь опровергнуть нерушимую догму авторитетного немецкого химика, Луи Пастер показал биологическую роль бродильных и гнилостных процессов. Позже его высказывания были доказаны как им самим, на основании лично выполненных экспериментов, так и другими выдающимися учёными. Были найдены живые биологические возбудители всех видов брожения – дрожжевые грибки и бактерии, гниения – гнилостные микробы, а также инфекционных болезней – патогенная микрофлора и фильтрующие вирусы [1, 2].

Гниение, или разложение – это микробиологический процесс распада производных животных и растений под влиянием микроскопических микробов и дрожжей с выделением конечных продуктов их жизнедеятельности – скатола, индола, сероводорода и меркаптана, вплоть до аммиака. При гнилостном распаде любой животный продукт в условиях повышенной температуры внешней окружающей среды и оптимальной влажности начинает скоротечно портиться, от него исходит неприятный гнилостный запах испорченного мяса за счёт постоянно увеличивающегося числа гнилостных микробов, и он способен находиться в таком состоянии долгий период времени. Возбудителем гниения мясных продуктов животного происхождения является живой биологический возбудитель – гнилостный микроб [3, 4].

В Калмыцком государственном университете им. Б.Б. Городовикова было проведено исследование микробной обсеменённости свежего мяса и полученных из него мясных изделий.

**Цель исследования** – микробиологический анализ мяса и мясных продуктов, рекомендуемых для употребления в пищу, на наличие в них гнилостной микрофлоры.

**Материал и методы исследования.** Микробиологическими методами было исследовано товарное свежее мясо, полученное от убойных животных (крупный рогатый скот) на убойном пункте, с целью выявления причин гнилостного распада мышечных волокон.

Для проведения исследования брали несколько чистых стеклянных ёмкостей объёмом 250 мл, помещали в каждую из них несколько мелко нарезанных кусочков мяса, заливали до половины дистиллированной водой, закрывали сверху ватной пробкой, ставили в термостат на 24 часа при температуре 25°C. Термостат представляет собой металлическое оборудование, в котором длительный период времени поддерживается постоянная плюсовая температура, что даёт возможность за короткий срок вырастить чистые микробные культуры [5].

Для диагностики живого возбудителя использовали широко известный метод окрашивания по Граму, упрощённый современный вариант окраски

красителями, когда вместо генцианвиолета для красочности изображения применили метиленовый синий, а фуксин Пфейффера поменяли на красный краситель – сафранин.

Вначале из смеси Никифорова (равные части 96-процентного этилового спирта и наркотического эфира, 1:1) металлическим пинцетом доставали предметное стекло и подносили его к пламени огня спиртовки [6]. Происходило фламбирование стекла от микробов (полное сгорание этилена и эфира на огне). Далее предметное стекло размещали на мостике кюветки и после его лёгкого остывания наносили на его верхнюю поверхность несколько капель микробного бульона, размером с одну-рублёвую монетку. Добивались того, чтобы пятно было как можно шире, так как чем шире будет пятно, тем больше можно обнаружить микробов.

Держа пинцетом за свободный край предметное стекло, производили аккуратное высушивание препарата над пламенем огня спиртовки, культурой вверх. После его высыхания помещали предметное стекло обратно на мостик стеклянной кюветки и на высохшее пятно накладывали ровный квадратик белой фильтровальной бумаги. Можно использовать квадратiki фильтровальной бумаги, заранее окрашенные красителем по методу Синева или метиленовой синькой [7–9].

Окраску фильтровальной бумаги и подготовку препаратов к исследованию осуществляли по определённой схеме.

1. Окрашивание метиленовой синькой (метиленовый синий) – на 2 мин. Исходное время отмеряли песочными часами или секундной стрелкой наручных часов.

2. Окрашивание раствором Люголя – на 2 мин. (состав: 1 г кристаллического йода, 2 г калия йодида, 300 мл дистиллированной воды. Раствор готовят заранее: 1 г йода и 2 г йодистого калия растворяют в 10 мл дистиллированной воды, ставят на сутки (24 часа) в термостат, после чего добавляют 290 мл воды).

3. Обработка спиртом этиловым 96-процентной концентрации – 30 сек.

4. Первый промыв – обильно дистиллированной водой.

5. Окрашивание фуксином Пфейффера – 2 мин. (состав: фуксин Циля, 1 мл + 9 мл дистиллированной воды). Фуксин Пфейффера готовится из фуксина Циля (фуксин основной кристаллический красный – 1 г, спирт этиловый 96-процентной концентрации – 10 мл, карболовая кислота (фенол) кристаллический порошок – 5 г, глицерин (тягучая жидкость) – 5 мл и дистиллированная вода – 100 мл). Вместо фуксина Пфейффера рекомендуется использовать красный краситель сафранин.

6. Второй промыв – обильно дистиллированной водой.

7. Фиксация микробного препарата. Проводится с целью убить возбудителя болезни, т.к. мёртвые

микробы лучше окрашиваются, удержать культуру возбудителя на предметном стекле. Фиксация бывает физической (над пламенем огня спиртовки) и химической (раствор Никифорова — 96-процентный этиловый спирт + наркотический эфир). Нами проведена физическая фиксация мазка.

Чтобы избежать быстрого растрескивания высушающего красителя, нельзя близко приближать мазок к пламени огня спиртовки. Если это правило будет нарушено, то при микроскопии под световым микроскопом в поле видимости окуляра ( $7\times$ ,  $10\times$ ,  $15\times$ ) будут чётко видны тонкие и заострённые с обоих противоположных концов прямые палочки тёмного цвета, слегка изогнутые с концов (рис. 1).

8. Изучение с помощью светового бинокулярного микроскопа (окуляр  $10\times$  умножается на иммерсионный объектив  $100\times$  = увеличение 1000 раз) микробной культуры на предметном стекле, используя иммерсионное (кедровое) масло так, чтобы одна его капля попала на мазок микробной

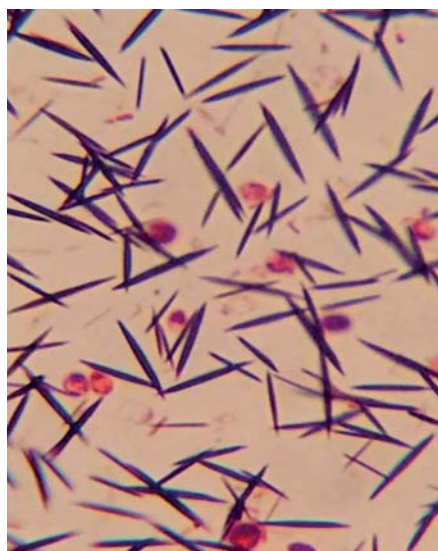


Рис. 1 – Неправильно фиксированный микробный мазок, сожжённый на пламене огня спиртовки

культуры. Линза иммерсионного объектива  $100\times$  должна коснуться поверхности капли иммерсионного (кедрового) масла, лежащего на мазке микробной культуры предметного стекла, и погружившись в него, дать изображение микробов, которые могут быть палочковидными или цилиндрическими. Грамотрицательные окрашиваются в красный (розовый) цвет.

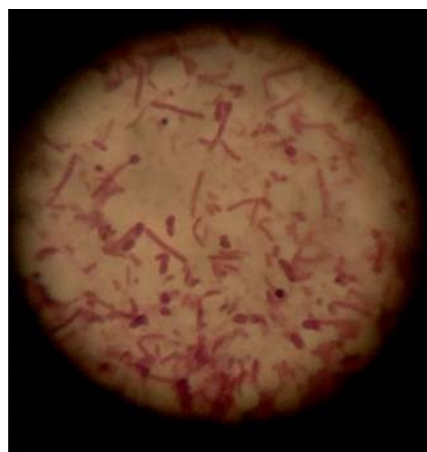
9. Получение фотографий и нанесение на них обозначений, учитывая масштаб и объём изображения (рис. 2).

**Результаты исследования.** Путём проведения эксперимента с применением диагностической окраски мясного бульона (МБ) при увеличении светового микроскопа до 1000–1500-кратности раз было отмечено множество мельчайших гнилостных микроорганизмов палочковидной формы. Они являлись основными виновниками порчи свежего сырого мяса при нахождении его в ненадлежащих условиях, связанных с нарушением требований ГОСТа по хранению и транспортировке мяса и мясных изделий.

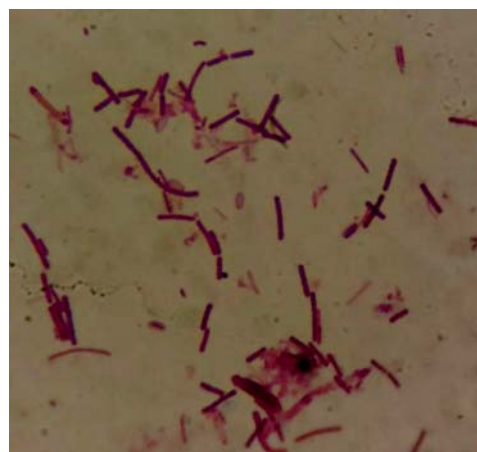
Окрашивают по методу Грама в основном сапрофитные микробы непатогенного характера. Палочковидные микробы живут совместно с другими живыми организмами (растениями или животными), выполняя двойную функцию: приносят ощутимый вред или характерную пользу. Микробная клетка имеет настолько малый микроскопический размер, что увидеть её возможно только с помощью светового или электронного микроскопов с определённым набором окуляров и объективов. При благоприятных для своей жизнедеятельности условиях внешней окружающей среды и внутренней среды микробы быстро размножаются в короткий срок (24 часа), образуя огромные колонии, достигающие в своем количестве сотни миллионов отдельных экземпляров.

#### Выводы

1. Основным виновником гнилостного распада свежего мяса при небрежном его хранении с



А



Б

Рис. 2 – Окрашенные по методу Г. Грама в красный цвет палочковидной формы микробы мяса:  
А – 1000-кратное увеличение светового микроскопа; Б – 1500-кратное увеличение светового микроскопа

нарушением соблюдения ГОСТа следует считать сапрофитную гнилостную микрофлору, зародыши которой в больших количествах находятся в воздушной среде.

2. Гнилостные микробы при соблюдении правильности использования красителей хорошо окрашиваются сложным диагностическим методом по Граму в красный цвет (грамотрицательные бактерии).

3. Процесс гниения мяса и мясных изделий протекает только при наличии тепла и обильной влажности.

4. В Республике Калмыкия резко континентальный климат, переходящий от влажности в осенне-зимний период в длительную засуху в весенне-летний период, что вызывает быструю порчу мяса и мясных изделий.

## Литература

1. Кулясов П.А., Босхомджиева Е.Д. Лабораторный практикум по микробиологии и микологии // Элиста: Изд-во Калм. ун-та, 2018. 243 с.
2. Босхомджиева Е.Д. Лабораторный практикум по микробиологии: учебное пособие. Элиста: Изд-во Калм. ун-та, 2014. 80 с.
3. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: Издательский центр «Академия», 2003. 464 с.
4. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии: учебное пособие. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. 307 с.
5. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. 215 с.
6. Кулясов П.А., Санджиева Э.Ц., Лизин И.В. Микробное и дрожжевое брожение зерновых и плодовоовощных культур растений // The scientific heritage 2017. N 13 (13). Budapest, Hungary. С. 9–16.
7. Мишустин Е.Н., Емцев В.Т. Микробиология. М.: Колос, 1970. 320 с.
8. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Агропромиздат, 1987. 239 с.
9. Черкес Ф.К. Руководство к практическим занятиям по микробиологическим исследованиям. М.: Изд-во «Медицина», 1974. 222 с.