

Утверждаю
Первый заместитель Министра
здравоохранения России
Г.Г. ОНИЩЕНКО
7 апреля 1997 года

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ МИНЕРАЛЬНЫХ ВОД ПО ХИМИЧЕСКИМ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ № 96/225

Директор - академик РАМН, профессор В.М. Боголюбов

Отдел курортных ресурсов и методов их охраны, руководитель отдела - доктор геолого-минералогических наук В.Б. Адилов

Составители: Адилов В.Б., Афанасьева М.И., Зотова В.И., Куликов Г.В., Петрова Н.Г., Трухина Г.М.

Методические рекомендации по контролю за качеством минеральных вод содержат основные сведения, определяющие состав и качество лечебных минеральных вод по химическим и микробиологическим показателям, новый метод обеззараживания бальнеотехнических систем, метод микробиологического анализа минеральных вод. Методические рекомендации разработаны и внедряются с целью повышения эффективности применения и осуществления контроля за качеством минеральных вод, используемых в лечебных целях и для промышленного розлива, и предназначены для всех пользователей минеральных вод, экологов, организаций, осуществляющих контроль за их состоянием.

Формула метода - методические рекомендации разработаны на основе нормативных документов, принятых различными министерствами и ведомствами, содержат сведения по определению качества минеральных вод по химическим и микробиологическим показателям, новый эффективный способ обеззараживания бальнеотехнических систем от бактериального загрязнения отечественным полисептом, унифицированный метод санитарно-микробиологического анализа минеральных вод.

Материально-техническое обеспечение метода основано на применении апробированных методик с использованием необходимого стандартного оборудования и приборов в аккредитованных лабораториях; препарат полисепт разрешен к применению Минздравом и серийно выпускается в виде гранул и брикетов Покровским заводом биопрепаратов.

Технология метода.

1. Общие положения

1.1. Настоящие Методические рекомендации "Контроль качества и безопасности минеральных вод по химическим и микробиологическим показателям" подготовлены в соответствии с Федеральным законом "О природных лечебных ресурсах, лечебно-оздоровительных местностях и курортах", № 26-83 от 23 февраля 1995 года и содержат сведения, определяющие состав и качество минеральных вод, а также систему контроля за их состоянием.

1.2. Методические рекомендации предназначены для всех пользователей минеральных вод производящих их разведку, добычу и эксплуатацию, а также уполномоченных на то служб государственного и ведомственного контроля.

2. Нормативные ссылки

Настоящие Методические рекомендации базируются на следующих документах:

2.1. Федеральный закон "О природных лечебных ресурсах, лечебно-оздоровительных местностях и курортах" (Собрание законодательства Российской Федерации, 1995, № 9, ст. 713).

- 2.2. Санитарные правила для предприятий по обработке и розливу питьевых минеральных вод, М., 1987, № 4416-87.
- 2.3. Санитарные правила и нормы. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества, М., 1996, СанПиН 2.1.4.559-96.
- 2.4. Санитарные правила и нормы. Требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников, М., 1996, СанПиН 2.1.4.544-96.
- 2.5. ГОСТ 13273-88. Воды минеральные, питьевые, лечебные и лечебно-столовые.
- 2.6. ГОСТ 2874-82. Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством.
- 2.7. ГОСТ 18963-73. Методы санитарно-бактериологического анализа.
- 2.8. ГОСТ 23268.18-78. Воды минеральные питьевые лечебные, лечебно-столовые и природные столовые. Правила приемки и методы анализа.
- 2.9. Руководство по контролю качества питьевой воды. Том I, II; Всемирная организация здравоохранения, Женева, 1986, 1987, 1992, 1994 .
- 2.10. Технологическая инструкция по транспортировке, хранению и реализации населению из изотермических автоцистерн и стационарных трубопроводов минеральных столовых вод. ТУ 10-5032536-112-91.
- 2.11. Воды минеральные питьевые лечебные и лечебно-столовые источников РСФСР ТУ-10 РСФСР 363-88.
- 2.12. Методические рекомендации. "Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях)", М., 1984.
- 2.13. Унифицированные санитарно-микробиологические методы исследования воды в странах - членах СЭВ, Москва, 1988.
- 2.14. Курортология и физиотерапия. Руководство под редакцией В.М. Боголюбова. Т. I-М, Медицина, 1985.
- 2.15. Инструкция по применению классификации эксплуатационных запасов подземных вод к месторождениям лечебных минеральных вод. Государственная комиссия по запасам ископаемых (ГКЗ РФ), 1984.

3. Требования

К минеральным водам относятся природные воды, оказывающие на организм человека лечебное действие, обусловленное либо повышенным содержанием полезных биологических активных компонентов, их ионного или газового состава, либо общим ионно-солевым составом воды.

Основные бальнеологические показатели значимости минеральных вод - общая минерализация, ионный состав, наличие растворенных и спонтанных газов, содержание органических веществ и микроэлементов, обладающих биологической активностью; радиоактивность, показатель реакции воды, характеризуемой величиной рН, температура. Бальнеологическое значение перечисленных показателей и признаков определяется экспериментально и изучается клинически.

Бальнеотерапия предусматривает внутреннее (питьевое) и наружное применение минеральных вод в виде общих и местных ванн, орошений, купаний в бассейнах. Питьевые природные минеральные воды подразделяют на лечебные и лечебно-столовые.

К минеральным питьевым лечебно-столовым водам относят воды с минерализацией от 1 до 10 г/дм³ или при меньшей минерализации, содержащие биологически активные микрокомпоненты, массовая концентрация которых не ниже бальнеологических норм, принятых в Российской Федерации (таблица 1).

Таблица 1

Наименование минеральной воды	Наименование биологически активного компонента	Значение массовой концентрации компонента, мг/дм, не менее
1	2	3
Углекислая	Свободная двуокись углерода (растворимая)	500,0

Железистая	Железо	10,0
Мышьяковистая	Мышьяк	0,7
Борная	Ортоборная кислота H_3BO_3	35,0
Кремнистая	Метакремнистая кислота H_2SiO_3	50,0
Бромная	Бром	25,0
Йодная	Йод	5,0
Содержание органического вещества	Органические вещества (в расчете на углерод)	5,0

К минеральным питьевым лечебным водам относятся воды с минерализацией от 10 до 15 г/дм³ или при меньшей минерализации при наличии в них повышенных количеств мышьяка, бора и некоторых других биологически активных микрокомпонентов. Допускается применение лечебных вод и более высокой минерализации.

Лечебно-столовые минеральные воды применяются как лечебное средство при курсовом назначении и не систематически в качестве столового напитка. Лечебные питьевые воды обладают выраженным лечебным действием на организм человека и применяются только по назначению врача и в определенной дозировке.

В целях удовлетворения потребности населения в качественной питьевой воде в Российской Федерации организуется производство и реализация минеральных природных столовых вод (часто называемых в мировой практике - "минеральные столовые" воды). К минеральным природным столовым относятся подземные воды с минерализацией до 1,0 г/дм³, и отвечающие по химическим показателям требованиям действующих нормативных документов, а также рекомендациям Руководства по контролю качества питьевой воды (ВОЗ, Женева, 1987, 1992, 1994).

Минеральные воды, применяющиеся для наружных процедур, имеют минерализацию от 15 г/дм³ и выше, вплоть до рассолов с минерализацией 100 - 200 г/дм³ преимущественно хлоридного натриевого состава, или более низкую минерализацию при содержании биологически активных компонентов - брома, йода, сероводорода, уголекислоты. Оптимальный интервал минерализации бальнеологических вод для отпуска процедур 20 - 40 г/дм³.

По физическим показателям к минеральным лечебным относятся природные воды, имеющие температуру не ниже 20°C или активность радона не ниже 5 нКи/дм³ (при значительных ресурсах минеральной воды и возможности организации процедур в проточных ваннах или бассейнах содержание радона может составлять 3 - 5 нКи/дм³).

Отнесение природных вод к минеральным, имеющим лечебное значение, производится Российским научным центром реабилитации и физиотерапии или другими научно-исследовательскими институтами курортологии и физиотерапии, определенных Минздравом России.

3.1. Контроль за качеством минеральных вод по химическим показателям

Качественный состав питьевых минеральных вод по химическим показателям должен соответствовать требованиям ГОСТ 13273-88 "Воды минеральные питьевые лечебные и лечебно-столовые". В минеральных водах массовая концентрация ниже перечисленных компонентов не должна превышать значений, указанных в таблице 2.

Таблица 2

Наименование компонентов	Предельно допустимая концентрация компонента, мг/дм ³
1	2
Нитраты (по NO_3)	50,0
Нитриты (по NO_2)	2,0
Свинец (Pb)	0,1
Селен (Se)	0,05
Мышьяк (As) в расчете на металлический мышьяк:	
в лечебных водах	2,0
в лечебно-столовых водах	1,5
Фтор (F):	
в лечебных водах	15,0

в лечебно-столовых водах	10,0
Фенолы	0,001
Другие органические вещества (в расчете на углерод, $C_{орг}$):	
в лечебных водах	15,0
в лечебно-столовых водах	10,0
Радий (Ra)	$5,0 \cdot 10^{-10}$ Ки/дм ³

По органолептическим показателям минеральные воды должны соответствовать следующим требованиям: внешний вид - минеральные воды должны быть прозрачными, без посторонних включений, возможно с незначительным естественным осадком минеральных солей; цвет - бесцветная жидкость или с оттенком от желтоватого до зеленоватого; вкус и запах - характерные для комплекса растворенных в воде веществ.

Перманганатная окисляемость минеральных вод должна находиться в пределах 0,5 - 5 мг/дм³ потребленного кислорода и в исключительных случаях может достигать 10,0 мг/дм³ потребленного кислорода. Расхождения между значениями окисляемости в источнике и в готовой продукции не должны превышать 15%.

Химико-аналитические исследования минеральных вод проводятся при курортологическом обследовании территории, разведке и оценке запасов минеральных вод, гидрорежимных наблюдениях, разработки месторождений минеральных вод для санаторно-курортных целей и промышленного розлива и выполняются в аккредитованных для этих целей лабораториях.

Пробы для оценки качественного состава минеральных вод отбираются на устье скважины или непосредственно из каптажа источников (колодца, галереи и т.д.), а также из бальнеотехнических систем. Периодичность отбора проб определяется технологической схемой эксплуатации месторождения минеральных вод, утвержденной в установленном порядке. В случае обнаруженных отклонений от установленных норм, отбор проб проводится по всей технологической линии с целью выявления причин, влияющих на изменение качества минеральной воды и их устранения.

Полный химический анализ производится один раз в год, краткий - не реже одного раза в квартал для вод глубокого формирования и надежно защищенных от антропогенного воздействия, ежемесячно для вод неглубокого залегания и слабозащищенных.

В случае несоответствия качественного состава минеральной воды по химическим и органолептическим показателям водоисточник не подлежит использованию. Дальнейшая эксплуатация водоисточника разрешается по согласованию с территориальными учреждениями Госсанэпидслужбы.

3.2. Контроль за качеством минеральных вод по санитарно - микробиологическим показателям

К основным санитарно-микробиологическим показателям, характеризующим качество минеральных вод относятся: колиформные бактерии, содержание мезофильных, мезотрофных аэробов и факультативных анаэробов (общее микробное число), синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*).

Санитарно-микробиологический анализ минеральной воды проводится в следующих случаях: при разведке и оценке запасов минеральных вод; при контроле за санитарным состоянием на месторождениях минеральных вод; при использовании минеральных вод в лечебных целях и при промышленном их розливе. Санитарно - микробиологический анализ минеральных вод проводится по методикам, изложенным в Приложении 4.1.

Санитарно-микробиологический контроль качества воды источника и бальнеосистемы осуществляется территориальными учреждениями Госсанэпидслужбы, а также аккредитованными для этих целей бактериологическими лабораториями.

При разведке нового месторождения минеральных вод проводится санитарно-микробиологический анализ, включающий определение помимо вышеназванных показателей, фекальных колиформных бактерий, патогенных энтеробактерий и вирусов.

Минеральная вода должна отвечать следующим требованиям по санитарно-микробиологическим показателям: - индекс колиформных бактерий составляет не более 3, количество мезофильных, мезотрофных аэробов и факультативных анаэробов не превышает 100 бактериальных клеток в 1 см³*, синегнойная палочка не обнаруживается в 300 см³ (при анализе минеральной воды непосредственно из источника, скважины или каптажного сооружения

синегнойная палочка должна отсутствовать в 1 дм³). Допускается 5% нестандартных проб по индексу колиформных бактерий, при этом индекс не должен превышать 10 и ни в одной из проб не должны содержаться фекальные колиформные бактерии. При превышении нормативных санитарно-микробиологических показателей отбор проб производится повторно. В случае повторных неблагоприятных анализов при оценке качества воды источника минеральных вод, водоисточник запрещается к эксплуатации. Дальнейшая эксплуатация месторождения разрешается территориальными учреждениями Госсанэпидслужбы.

* Норматив 100 бактериальных клеток в 1 см³ определяется специфичностью состава большинства минеральных вод (присутствие органических соединений, физиологических групп микроорганизмов).

При неблагоприятных санитарно-микробиологических анализах воды из бальнеосистем отпуск процедур прекращается, минеральная вода из всей технологической линии (или ее части) выпускается и проводится внеплановая дезинфекция в соответствии с рекомендациями, изложенными в Приложении 4.2.

Частота отбора проб на санитарно-микробиологический анализ определяется в соответствии с технологической схемой, но не реже одного раза в месяц на месторождениях минеральных вод, один раз в сутки в питьевом бьюете, 1 раз в неделю в бальнеологических системах. Санитарно-микробиологический контроль оборудования и продукции предприятия розлива минеральных вод осуществляется в соответствии с Санитарными правилами для предприятий по обработке и розливу питьевых минеральных вод № 4416-87.

4. Приложения

Приложение 4.1 (Обязательное)

Методы санитарно-микробиологического анализа минеральных вод

4.1.1. Отбор, хранение и транспортировка проб

Для отбора проб воды используют стерильные бутылки емкостью 0,5 - 0,75 см³ с плотными пробками. Пробы отбираются с соблюдением правил стерильности: после предварительного обжигания кранов пламенем горящего тампона, смоченного спиртом и последующего спуска воды в течение 10 - 15 минут. Наполняют бутылки с таким расчетом, чтобы при транспортировке отобранная вода не касалась пробки. Каждая бутылка должна иметь этикетку, где указано: точное наименование места отбора проб; дату отбора пробы (с указанием времени); цель исследования (режимный контроль, по эпидпоказаниям).

Проба должна быть исследована не позднее чем через 2 часа после ее отбора. При невозможности выполнения данных требований, анализ проводить не позже чем через 6 часов после отбора пробы, при условии сохранения пробы при температуре от 4 до 6° С.

4.1.2. Санитарно-микробиологический анализ минеральных проб

Санитарно-микробиологический анализ минеральных вод проводят методом мембранных фильтров или титрационным методом. (Рецептура питательных сред приводится в методических рекомендациях "Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях)" М., 1984; ГОСТ 18963-73. Методы санитарно-микробиологического анализа. Определение микробиологических показателей в водах, насыщенных двуокисью углерода, проводится после их дегазации.

4.1.2.1. Метод мембранных фильтров заключается в концентрировании бактерий из определенного объема анализируемой воды на мембранном фильтре с последующей идентификацией и учетом выросших бактерий в 1 дм³ воды. Анализируется 333 см³ воды, профильтровывая этот объем не менее чем через два фильтра последовательно.

Для фильтрования используют мембранные фильтры со средним диаметром 0,5 мкм. Фильтр после окончания фильтрации промывают 2 - 3 см³ стерильной водопроводной водой. Если фильтруется минеральная вода с общей минерализацией 4 г/дм³ и выше, то мембранный фильтр промывают дважды 5 см³ стерильной водопроводной водой.

После окончания фильтрования, фильтр переносят на поверхность чашки Петри со средой Эндо, сохраняя его положение при фильтрации. Чашки с фильтрами помещают в термостат и инкубируют при $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ в течение 18 - 24 ч. Далее проводится идентификация выросших бактерий (п. 4.1.2.3). Количество колиформных бактерий или синегнойной палочки подсчитывают, умножают на 1000 и делят на исследуемый объем. Полученный результат выражают в виде, коли - индекса или индекса синегнойной палочки, т.е. количестве бактерий в 1 дм^3 воды.

4.1.2.2. Сущность титрационного метода заключается: в посеве определенных объемов анализируемой воды и подращивании при 37°C в средах накопления с последующим посевом бактерий на агаризованные питательные среды; дифференцирование выросших бактерий; определение наиболее вероятного числа (НВЧ) идентифицированных бактерий в 1 дм^3 воды проводится по таблице ГОСТа 18963-73. Вода питьевая. Методы санитарно - бактериологического анализа.

В качестве накопительной универсальной среды для определения колиформных бактерий и *P.aeruginosa* используется лактозо-пептонная среда. Анализируются параллельно три объема воды по 100 см^3 , три объема по 10 см^3 и три объема по 1 см^3 , которые помещают во флаконы с лактозо-пептонной средой, снабженные поплавками или комочками ваты, погруженными на дно сосудов.

Посев 100 см^3 и 10 см^3 воды производится во флаконы и пробирки с 10 и 1 см^3 концентрированной среды ЛПС соответственно. Посев $1,0$, $0,1 \text{ см}^3$ и т.д. производится в пробирки с 10 мл среды нормальной концентрации. Инкубируют посевы при 37°C в течение 24 часов.

Из всех объемов, где отмечено образование кислоты и газа производят посев на плотную питательную среду - Эндо (для выделения колиформных бактерий). Для выделения *P.aeruginosa* высев производится на среды Эндо или Блеск их 3-х объемов по 100 мл , где отмечается рост бактерий (помутнение среды). Посев производят с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии. Чашки со средой Эндо инкубируют при температуре 37°C . Чашки со средой Блеск инкубируют при температуре 42°C в течение 18 - 24 часов.

4.1.2.3. Определение колиформных бактерий

Колиформные бактерии - граммотрицательные, не образующие спор палочки, ферментирующие лактозу с образованием кислоты и газа в течение 24 - 32 часа при 37°C , с отрицательным оксидазным тестом. Относятся к семейству Enterobacteriaceae. Оно включает представителей следующих основных родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и др.

У лактозоположительных колоний на среде Эндо образуется редукционная зона, которая проявляется красным окрашиванием агара под колонией вокруг них. При наличии характерных для кишечных палочек темно-красных колоний с металлическим блеском и без него, а также розовых (лактозоположительных колоний), из нескольких колоний каждого типа готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют, а также проверяют оксидазную активность (п. 4.1.2.7).

Грамотрицательные и оксидазоотрицательные колонии (не изменившие первоначального цвета) по 2 - 3 каждого типа пересевают в полужидкую среду с лактозой или пептонную воду с СИБ-лактозой. Учет проводят через 4 - 5 часов инкубации при $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

При образовании кислоты и газа результат анализа считают положительным. При отсутствии кислоты и газа получают отрицательный результат. При наличии только кислоты пробирки оставляют в термостате для окончательного учета через 24 часа. Анализ заканчивается через 24 - 48 часов. При отсутствии газообразования через 24 часа получают окончательный отрицательный отчет, при наличии газообразования - положительный.

Для подтверждения способности бактерий ферментировать лактозу можно использовать лактозо-пептонную среду накопления с поплавками или комочками ваты. Учет результатов в этом случае следует проводить через 24 часа.

4.1.2.4. Определение фекальных колиформных бактерий

При превышении нормативных уровней основных показателей проводят дополнительные исследования по определению фекальных колиформных бактерий для выявления источников и характера загрязнения. Фекальные колиформные бактерии граммотрицательные, не образующие спор палочки, разлагающие лактозу до кислоты и газа при температуре $43 - 44,5^\circ \text{C}$, за время инкубации 24 - 48 часов. К ним относятся в первую очередь *Escherichia Coli*, *Klebsiella* и др.

Для отнесения лактозоположительных колоний к фекальным колиформным бактериям со среды Эндо снимают темно-красные колонии с металлическим блеском и по 2 - 3 колонии

засевают в лактозный бульон с борной кислотой или желчно-лактозный бульон с бриллиантовым зеленым. Среда должна быть нагрета на водяной бане до температуры 44° С. Засеянные пробирки вместе с водяной баней переносят в термостат и инкубируют при температуре 44 ± 0,5° С. Ферментация лактозы с образованием кислоты и газа при 43 - 44 ± 0,5° С в течение 24 часов подтверждает наличие фекальных колиформных бактерий.

4.1.2.5. Определение синегнойной палочки

Синегнойная палочка потенциально-патогенная, грамотрицательная облигатно-аэробная, не образующая спор палочка с единичными, полярно расположенными жгутиками, обладает оксидазной активностью, расщепляет глюкозу до кислоты, растет при температуре 42° С, образует сине-зеленый пигмент, относится к семейству *Pseudomonaceae*.

На среде "Блеск" колонии синегнойной палочки темно-красного цвета, плоские, покрытые золотистым налетом или содержат золотистые вкрапления. Культура синегнойной палочки издает специфический ароматический цветочный запах. На среде Эндо ее колонии плоские, с неровными краями, от бледно-сиреневого до темно-сиреневого цвета.

Для выделения синегнойной палочки типичные 2 - 3 колонии со среды Эндо или Блеск микрокопируют. Грамотрицательные колонии пересевают уколом в среду Хью-Лейфсона (О/Ф), а также блешки производят посев на среду Кинг А. Посевы со средой О/Ф и Кинг А инкубируют при температуре 37° С в течении 24 - 48 часов.

На среде Кинг А колонии синегнойной палочки плоские, с неровными краями, характерно наличие окрашивающего пигмента, который образуется вокруг колоний и диффундирует в толщу среды. *P.aeruginosa* на среде О/Ф окисляет глюкозу, но не ферментирует ее, при этом первоначальный зеленый цвет среды О/Ф изменяется в верхней части столбика на желтый, нижняя часть остается зеленой. Результат учитывается как О/Ф (±). *P.aeruginosa* изменяет среду О/Ф в желтый цвет и учитывается как (±).

Типичные колонии, выросшие на среде Кинг А, исследуют на оксидазный тест (п. 4.1.2.7). При наличии оксидазоположительных бактерий, оксидирующих глюкозу на среде О/Ф и продуцирующих пигмент, их относят к *P.aeruginosa*.

Апигментные колонии исследуют на подвижность, наличие нитратредуктазы и свободного азота. Для определения подвижности колоний бактерий сеют уколом в толщу 2% агара, сверху заливают 0,5% агаром, чашки оставляют при комнатной температуре, не переворачивая в течение 24 часов.

Веерообразный рост бактерий вокруг укола на поверхности агара свидетельствует о подвижности. Параллельно атипичные колонии сеют уколом в нитратную среду, после чего помещают в термостат и инкубируют при 42° С 24 часа. В результате развития *P.aeruginosa* происходит помутнение среды и наличие свободного азота в виде пены на поверхности среды и иногда пузырьков газа в толще среды.

4.1.2.6. Определение общего количества бактерий в воде

В 1 см³ воды определяется содержание мезофильных, мезотрофных аэробов и факультативно-анаэробных микроорганизмов, выросших на питательном агаре (МПА) при температуре 30 ± 0,5° С за 48 - 72 часа. Из каждой пробы воды должен быть сделан посев не менее двух различных объемов, выбранных с таким расчетом, чтобы на чашках выросло от 30 до 300 колоний. При анализе карбонизированной воды (из бутылок с линии розлива) отбирают объем около 50 см³ в стерильную емкость, встряхивают несколько раз и оставляют на 5 - 10 минут для дегазации. Пробирка или колба должна быть закрыта при этом ватно-марлевой стерильной пробкой.

Объемы минеральной воды по 1 см³ засевают на 2 чашки Петри. Для посева 0,1 см³ и меньших объемов используют разведения анализируемой воды. Посев каждого разведения воды производят также не менее чем на 2 чашки Петри по 1 см³ из соответствующих разведений.

После внесения воды в чашки Петри ее заливают расплавленным и остуженным до 45° С 1,8 - 2,0% МПА в количестве 10 - 12 см³. Воду быстро смешивают с агаром, наклоняя или вращая чашку по поверхности стола. После застывания агара чашки помещают в термостат и инкубируют при температуре 30° С в течение 48 - 72 часов. Оценивая только те разведения, при посеве которых на чашке выросло от 30 до 300 колоний. При посеве 1 см³ неразведенной пробы учитывают любые количества колоний, но не превышающие 300. Подсчитанное число колоний на каждой чашке делят на объем воды в см³, засеянный на те чашки, на которых велся подсчет и вычисляют среднее арифметическое. Результат выражают в числе колоний в 1 см³ исследуемой воды, округляя до 2-, 3-значных чисел.

Если в чашке с наиболее высоким разведением выросло свыше 300 колоний и анализ нельзя повторить, то допустимо вести подсчет с помощью счетной пластинки, разделенной на квадраты или трафарета, делящего чашку на сектора. Подсчитывают не менее 1/4 площади чашки в разных местах с последующим пересчетом на всю площадь чашки. Если рост подвижных бактерий распространился на всю поверхность чашки, в протоколе анализа отмечают "ползучий рост".

4.1.2.7. Постановка оксидазного теста

Оксидазный тест позволяет дифференцировать бактерии семейства Enterobacteriaceae от Pseudomonaceae (последние являются оксидазоположительными бактериями). Все посиневшие колонии или с синим ободком из учета исключаются.

При работе методом мембранных фильтров, фильтр с выросшими на нем колониями бактерий переносят пинцетом, не переворачивая на кружок фильтровальной бумаги несколько большего диаметра, чем фильтр, обильно смоченный реактивом для определения оксидазной активности бактерий. Через 2 - 4 минуты определяют результат. Колонии, не изменившие своего первоначального цвета, в подавляющем большинстве образуются бактериями группы кишечной палочки.

Учитывая бактерицидное действие реактива для определения оксидазной активности, мембранный фильтр сразу же после четкого появления реакции переносят обратно на среду Эндо и немедленно (не позднее чем через 5 минут) пересевают.

При использовании титрационного метода по 2 - 3 изолированные колонии каждого типа, выросших на секторах среды Эндо, снимают петлей или стеклянной палочкой и наносят штрихами на фильтровальную бумагу, смоченную реактивом для определения оксидазного теста. Оксидазный тест считается отрицательным, если в месте нанесения бактериальной массы бумага не изменяет цвета. Если в течение 1 минуты бумага синее - оксидазный тест положительный.

Если оксидазный тест проявляется недостаточно четко, то для подтверждения результата изолированные колонии можно пересеять на скошенный питательный агар и после подрачивания повторить оксидазный тест. Оксидазный тест также можно проводить системой индикаторных бумажек (СИБ).

Приложение 4.2 (Обязательное)

Способ обеззараживания водозаборных сооружений минеральной воды, средств ее транспортировки и бальнеотехнического оборудования

4.2.1. Полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ) или полисепт ($C_7H_{16}3Cl)_n$ - водорастворимый полимерный продукт применяется в качестве дезинфицирующего средства для обеззараживания бальнеосистем курортов. Препарат должен соответствовать требованиям ТУ 10-09-481:87, разрешен Минздравом России для широкого применения в качестве антисептика. (Методические указания по применению средства полисепт для дезинфекции, М., 1989). Дезинфектант производится Покровским заводом биопрепаратов и выпускается в виде гранул или брикетов, или в виде 25% раствора во флаконах.

4.2.2. Водные растворы полисепта обладают высокими бактерицидными свойствами в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры, в частности, синегнойной инфекции.

По скринингу токсикологических, микробиологических и санитарно-химических свойств препарат отнесен к классу малоопасных соединений и рекомендован также для обеззараживания питьевой воды в определенных концентрациях (Гигиенический сертификат № 1В-11/847 полигексаметиленгуанидин (ПГМГ) (флокулянт), 29 июля 1994 г.).

Бактерицидное действие полисепта в растворе возрастает с увеличением рН и температуры. Максимальная активность наблюдается при рН 10 - 11 и температуре 50 - 60° С. В водных растворах бактерицидный эффект зависит от концентрации полисепта и времени контакта. Растворы полисепта сохраняют бактерицидную активность в течение 1 года.

4.2.3. Для практического применения в условиях обеззараживания бальнеотехнического оборудования используют 0,1% водный раствор полисепта. Дезинфекция оборудования

проводится после слива минеральной воды, далее дезинфицируемые системы заливают 0,1% водным раствором полисепта и оставляют на контакт не менее 1 часа. Затем рабочий раствор сливают, систему промывают водопроводной водой, отбирают промывные воды на бактериологический анализ и остаточное содержание дезинфектанта (Приложение 4.3).

4.2.4. При отсутствии полисепта обеззараживание бальнеотехнического оборудования и систем проводится одним из существующих дезинфектантов (таблица 3).

Таблица 3

№	Препарат	Стандарт	Применяемая концентрация раствора
1	2	3	4
1.	Хлоридная известь	ГОСТ 1692-85	2,0 - 4,0% при содержании активного хлора, не менее 25,0%. В случае уменьшения концентрации активного хлора в исходном веществе необходимо делать соответствующий перерасчет
2.	Гипохлорид натрия	ГОСТ 11086-76	0,1 - 0,5 г/дм ³ (по активному хлору)
3.	Катамин-АБ	ТУ 6-01-816-75	0,5 - 0,1%
4.	Сульфохлорантин	ТУ 6-01-746-72	0,25 - 0,5%

Время экспозиции для всех дезинфицирующих растворов не менее 1 часа. После дезинфекции промывка оборудования от дезинфицирующего раствора питьевой водой до полного его исчезновения. Для контроля, после дезинфекции отбирают последние порции промывных вод для бактериологического анализа.

Приложение 4.3 (Обязательное)

Метод аналитического контроля остаточных концентраций полисепта

Метод основан на реакции полисепта с эозином. В результате взаимодействия гуанидиновых группировок ПГМГ с эозином происходит изменение водного раствора эозина от оранжевого до интенсивного розового цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации полисепта. Реакция протекает при pH 3,5.

4.3.1. Аппаратура: весы аналитические; ФЭК; кюветы с толщиной слоя 20 - 50 мм; рН-метр со стеклянным электродом; посуда мерная стеклянная.

4.3.2. Реактивы и растворы квалифицированы ч.д.а. (чистый для анализа): NaCl; вода дистиллированная; кислота HCl по ГОСТ 3168-77 раствор 0,1 N концентрации; эозин Н (индикатор) по ТУ 6-09-183-75, раствор массовой концентрации 0,05%; медный купорос CuSO₄ по ГОСТ 4265-78; глицин NH₃CH₂COOH ТУ 6-09-3525-74; стандартный раствор концентрации 10 мг/дм³.

4.3.3. Приготовление реактивов для анализа:

- приготовление 0,05% раствора эозина (50 мг эозина растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе 100 см³, добавляют 50 мг CuSO₄ и доводят до метки);

- приготовление глицинового буфера pH-3,5: в мерную колбу наливают 925 см³ раствора № 2 и доводят до 1 дм³ раствором № 1 - 75 см³;

- раствор № 1. 0,1 NHCl (в мерную колбу наливают дистиллированную воду, затем медленно добавляют 8 см³ концентрированной HCl и доводят до метки 1 дм³);

- раствор № 2. 7,507 г глицина (NH₃CH₂COOH) и 5,85 г NaCl растворяют в 1 дм³ дистиллированной воды. Необходимо контролировать значение pH глицинового буфера (3,5) на pH-метре;

- приготовление исходного раствора полисепта (концентрация 10 мг/дм³) 10 мг сухого полисепта растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл. Затем 10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой.

Приготовление стандартных разведений полисепта проводится по таблице 4.

Таблица 4

№ колбы	Количество исходного раствора ПГМГ (10 мг/дм ³), см ²	Количество воды, см ³	Полученная концентрация ПГМГ, мг/дм ³
1	2	3	4
1	0	10,0	0 (контроль)

2	0,5	9,5	0,5
3	1,0	9,0	1,0
4	3,0	7,0	3,0
5	5,0	5,0	5,0
6	7,0	3,0	7,0
7	10,0	0,0	10,0

После приготовления растворы перемешать.

4.3.4. Проведение анализа выполняется в следующем порядке: в приготовленные растворы полисепта добавляют 1 см³ глицинового буфера. Растворы перемешивают и оставляют на 5 - 10 минут для полного развития окраски; для каждого из растворов измеряют оптическую плотность на ФЭКе (при λ - 535 нм).

Результаты выражают посредством построения градуировочного графика, на котором на оси абсцисс откладывают концентрацию полисепта, а на оси ординат значения оптической плотности.

Количественное определение остаточного содержания полисепта в исследуемой пробе проводят используя калибровочную кривую, построенную на стандартном растворе полисепта. Чувствительность метода 0,1 мг/дм³.