

**Всероссийский конкурс научно-исследовательских, проектных и творческих
работ обучающихся
«НАУКА, ТВОРЧЕСТВО, ДУХОВНОСТЬ»**

Секция: ЭКОЛОГИЯ

**Тема: Микробиологические риски рекреационного водопользования в
Восточном Подмосковье (исследование р. Клязьма)**

**Автор: Давыдова Софья Александровна – студентка биолого-химического
факультета, 2 курс**

**Научный руководитель: Коротков Олег Владимирович– кандидат
биологических наук, доцент кафедры биологии и экологии**

**Место выполнения работы: ГОУ ВО МО ГГТУ, Московская область,
г. Орехово-Зуево**

Оглавление

Оглавление.....	2
1.Введение.....	3
2.Мембранные технологии.....	7
3.Мембранный фильтр из ацетата целлюлозы 11104 90 N.....	7
4.Мембранный фильтр из ПТФЭ (политетрафторэтилена) 11803 47 N.....	7
5.Мембранный фильтр из нейлона 25006 293 N.....	7
6.Отбор, хранение и транспортирование проб воды.....	11
7.Приготовление питательных сред и реактивов.....	12
8.Характеристика географического объекта.....	12
9.Характеристика кишечной палочки.....	13
10.Определение числа лактозоположительных кишечных палочек.....	17
11.Метод мембранных фильтров.....	18
12.Учет результатов.....	18
13.Результаты исследования.....	19
14.Заключение.....	24
15. Список используемой литературы.....	25

1. Введение.

Антропогенная эксплуатация природных ресурсов демонстрирует устойчивую тенденцию к интенсификации, достигая критических значений в отношении гидросферы. Водные ресурсы занимают центральное положение в системе ресурсного обеспечения человечества: отсутствие доступа к чистой воде делает невозможным функционирование промышленных комплексов, сельскохозяйственных систем и даже базовой инфраструктуры населённых пунктов. Эффективное решение задач рационального водопользования и предотвращения деградации водных экосистем предполагает формирование трёхуровневой системы: непрерывного мониторинга гидрологических параметров, количественной оценки текущего состояния водных объектов и прогнозного моделирования их динамики. Только на основе объективных данных о качестве водной среды и научно обоснованной оценки масштабов антропогенного пресса возможно выработка сбалансированной стратегии, гармонизирующей потребности экономического развития с принципами экологической устойчивости.

Под загрязнением водных ресурсов понимают антропогенно обусловленную трансформацию гидрохимических, физико-химических и биоценологических характеристик водной среды вследствие поступления в водоёмы твёрдых взвесей, жидких стоков или газообразных компонентов. Такие изменения проявляются в модификации ионного состава воды, смещении рН, повышении температуры, снижении прозрачности, появлении посторонних запахов и привкусов, а также в нарушении естественного видового разнообразия гидробионтов. Последствия подобных трансформаций многоаспектны: снижение пригодности воды для питьевых и технологических целей, дестабилизация трофических цепей в водных экосистемах, сокращение биоразнообразия и формирование угрозы для здоровья населения. Таким образом, загрязнение воды следует рассматривать не как локальное изменение отдельных параметров, а как системный фактор, подрывающий экологическую устойчивость водных объектов и ограничивающий их ресурсный потенциал.

В зависимости от природы загрязняющих агентов выделяют три основные категории водных загрязнений:

— химическое загрязнение, обусловленное присутствием органических и неорганических соединений токсичного (тяжёлые металлы, пестициды, нефтепродукты) и нетоксичного действия (биогенные элементы в избыточных концентрациях);

— микробиологическое загрязнение, характеризующееся повышенной концентрацией патогенных микроорганизмов (бактерии, вирусы), условно-патогенных грибов и массовым развитием фитопланктона;

— механическое загрязнение, выражающееся в увеличении содержания взвешенных частиц минерального и органического происхождения, преимущественно в поверхностных слоях водной

толщи.

Ведущую роль среди факторов, деградирующих качество водных экосистем, играют неочищенные или недостаточно очищенные сточные воды промышленных предприятий и коммунально-бытового сектора. Их сброс в водные объекты инициирует каскадные изменения: снижение прозрачности за счёт взвешенных частиц, появление характерных привкусов и запахов, формирование нефтепродуктовых плёнок на поверхности, накопление осадка на дне с последующим развитием анаэробных процессов. Одновременно происходит накопление токсичных соединений, способных к биоаккумуляции и трансформации в более опасные формы в условиях водной среды.

Вода — основа жизни: на её долю приходится от 70 до 85 % массы большинства живых существ. Она не просто наполняет клетки, а обеспечивает саму возможность существования — растворяет питательные вещества и продукты обмена, смягчает температурные колебания благодаря высокой теплоёмкости, участвует в расщеплении сложных соединений и поддерживает водно-солевой баланс внутри клеток. Для человека вода давно вышла за рамки биологической необходимости: она орошает поля, охлаждает промышленные агрегаты, перемещает грузы по каналам, становится основой химических синтезов. А там, где нет артезианских скважин, реки и озёра остаются главным источником питьевой воды. Эта двойственная роль — и среда обитания для природы, и ресурс для хозяйства — делает контроль за микробной чистотой водоёмов не просто рекомендацией, а обязательным условием безопасности. Особенно пристально следят за бактериями группы кишечной палочки (БГКП): их обнаружение в воде — чёткий сигнал о попадании фекальных масс, что указывает либо на сбой в работе очистных сооружений, либо на несанкционированные сбросы. А значит, в такой воде могут оказаться и возбудители опасных кишечных инфекций.

Современное состояние водных объектов отражает общую картину воздействия человека на природу. Индустриализация, рост транспортных потоков, расширение энергетики, повсеместное применение химикатов в быту и сельском хозяйстве, а также увеличение численности населения — всё это создаёт непрерывную нагрузку на реки, озёра и подземные горизонты. Особенно страдают открытые водоёмы: их вода контактирует с атмосферой, почвой, стоками, и любое нарушение санитарного режима мгновенно сказывается на качестве. Основную угрозу представляют бытовые стоки, прошедшие недостаточную очистку, и отходы специфических производств — мясокомбинатов, кожевенных заводов, предприятий микробиологической промышленности, крупных животноводческих комплексов. Попадая в реку, такие стоки резко ухудшают микробиологические показатели воды и создают условия для распространения целого спектра заболеваний: от бактериальных инфекций (холера, брюшной тиф, сальмонеллёз) до вирусных болезней (гепатит А, энтеровирусные инфекции) и паразитарных поражений. Поэтому регулярная проверка воды в местах отдыха — это не формальность для отчётности, а реальная защита здоровья

тысяч людей.

Искать в каждой пробе воды все возможные болезнетворные микроорганизмы — задача нереалистичная. Такие анализы слишком дороги, требуют много времени и специализированного оборудования. Гораздо разумнее использовать «маячки» — микроорганизмы, которые сами по себе не всегда опасны, но их присутствие однозначно указывает на фекальное загрязнение и, как следствие, на возможное присутствие патогенов. В кишечнике человека и животных постоянно живут бактерии, которые при попадании в водную среду становятся надёжным индикатором нарушения санитарных норм. Среди них бесспорным лидером считается кишечная палочка (*Escherichia coli*) — её выявление в пробе воды служит основанием для запрета купания и проведения дополнительных мероприятий по очистке.

В нашей работе для подсчёта колиформных бактерий применялись два общепринятых метода — титрование и мембранная фильтрация. К колиформам относят грамотрицательные палочки без спор, не содержащие фермента оксидазы и способные расщеплять лактозу с образованием кислоты и газа. По температуре инкубации их делят на две группы: общие колиформные бактерии активны при 35–37 °С, термотолерантные — при повышенной температуре 44–44,5 °С. В эту категорию входят не только представители рода *Escherichia*, но и близкие к ним микроорганизмы — цитробактеры, энтеробактеры и клебсиеллы.

Цель работы — определить микробиологическую чистоту воды в реке Клязьма с помощью мембранной фильтрации, выявить концентрацию колиформных бактерий и сделать вывод о возможности использования реки для купания и отдыха.

Задачи исследования:

- освоить технику мембранной фильтрации как основной метод санитарно-бактериологического анализа воды;
- отобрать пробы в характерных точках русла Клязьмы и провести их исследование на наличие бактерий группы кишечной палочки;
- сравнить полученные цифры с предельно допустимыми концентрациями по санитарным нормам для рекреационных водоёмов;
- дать заключение о безопасности воды реки Клязьма для рекреационного водопользования.

2. Мембранные технологии.

Мембранная фильтрация — один из самых востребованных методов разделения жидкостей и газов как в лабораторной практике, так и в промышленных масштабах. Суть процесса заключается в использовании тонких полимерных плёнок с системой микроскопических пор, диаметр которых варьируется от долей микрона до нескольких микрометров. Благодаря точному контролю размера пор такие мембраны позволяют реализовывать технологии высокотонкого разделения, недоступные при традиционных способах очистки.

Идея фильтрации как способа очистки жидкостей сопровождает человечество на протяжении тысячелетий. Ещё в Древнем Египте вино процеживали через тканевые фильтры, а в древнекитайских источниках описан многоступенчатый метод очистки рассола поваренной соли: раствор последовательно пропускали через циновки с особо плотным переплетением волокон, чтобы удалить механические примеси.

Современная мембранная фильтрация отличается от классических методов тем, что в качестве фильтрующего элемента выступает ультратонкая перегородка толщиной менее 0,1 мм с чётко регламентированной пористостью. При производстве мембран диаметр пор строго стандартизируется и контролируется на всех этапах, что обеспечивает воспроизводимость результатов. Несмотря на древние корни самой идеи фильтрации, именно мембранный вариант получил широкое распространение лишь во второй половине XX века — после Второй мировой войны, когда были разработаны надёжные синтетические полимеры и отработаны технологии их модификации. Сегодня этот метод стал неотъемлемой частью систем водоподготовки, пищевой промышленности и фармацевтики.

Мембранные фильтры имеют следующие преимущества:

1. они не требуют какого-то особого обращения с ними, и их можно легко доставить в любое место;
2. вследствие высокой пористости через них можно пропускать жидкость с большой скоростью потока;
3. при помощи мембранного фильтра можно задерживать частицы размерами порядка размеров бактерий и меньше;
4. некоторые из них могут работать как сита, то есть разделять частицы разных размеров.

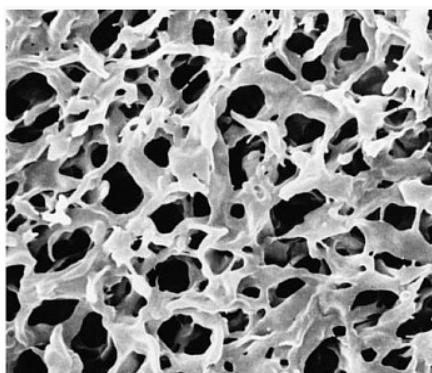
Мембранные фильтры давно перестали быть узкоспециализированным инструментом — сегодня их можно встретить практически в каждой лаборатории и на многих промышленных предприятиях. В научной среде они незаменимы: с их помощью получают стерильные питательные среды для выращивания микроорганизмов, выделяют бактерии и вирусы из сложных образцов, а также быстро выявляют патогены или индикаторные организмы, сигнализирующие о загрязнении воды или почвы. Не менее важна их роль в подготовке проб — мембраны позволяют надёжно отделить твёрдые частицы от жидкости, обеспечивая чистоту образцов для дальнейшего анализа.

В промышленности спрос на мембранные технологии не менее высок. Лидером по их применению традиционно остаётся фармацевтика: именно здесь мембранная фильтрация стала основным способом стерилизации растворов, которые нельзя подвергать термической обработке из-за чувствительности активных компонентов. Отдельного внимания заслуживает производство сверхчистых материалов — без мембран невозможно обеспечить ту степень очистки, которая требуется в микроэлектронике, при изготовлении компьютерных чипов или в аэрокосмической

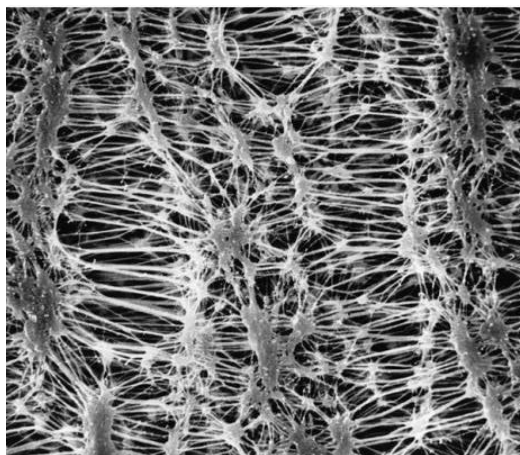
отрасли. Не обошла эта технология и пищевую промышленность: с помощью мембран фильтруют соки, пиво, вино и другие напитки, продлевая их срок годности без использования консервантов.

Что касается материалов, из которых изготавливают сами фильтры, то выбор довольно широк: регенерированная целлюлоза, поливинилхлорид, акрилонитрил, винилполимеры. Однако подавляющее большинство коммерческих мембран производят из целлюлозных эфиров — преимущественно нитрата и ацетата целлюлозы. Эти материалы сочетают хорошую химическую стойкость, механическую прочность и возможность точно регулировать размер пор при производстве, что и определило их доминирующее положение на рынке.

3.Мембранный фильтр из ацетата целлюлозы 11104 90 N



4.Мембранный фильтр из ПТФЭ (политетрафторэтилена) 11803 47 N



5.Мембранный фильтр из нейлона 25006 293 N

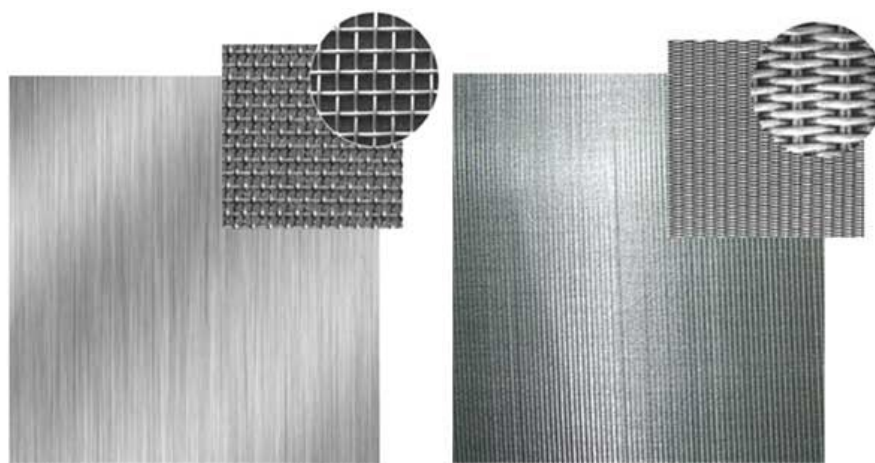
История мембранных технологий началась с воды: первые мембраны использовали для просвечивания водных образцов — выявления и подсчёта взвешенных частиц и микроорганизмов. Лишь спустя время исследователи осознали потенциал этой технологии для газовой фазы, и мембраны стали надёжным барьером для аэрозолей и микрофлоры в воздухе.

Современная мембранная фильтрация — это не единый процесс, а целая иерархия методов разделения, выстроенных по принципу «от крупного к мельчайшему». На верхнем уровне стоит микрофильтрация: её задача — удержать взвешенные частицы размером от долей до десятков

микрометров. Ниже по шкале — ультрафильтрация, проверенный десятилетиями инструмент химиков и биохимиков, позволяющий «отсеивать» отдельные молекулы, особенно белки и другие макромолекулярные структуры. Ещё тоньше работает диализ — процесс, ориентированный на разделение ионов и низкомолекулярных соединений за счёт различий в скорости диффузии. А на самом глубоком уровне — обратный осмос, по сути «перевернутый» естественный осмос, при котором под давлением из раствора извлекаются даже одиночные ионы, оставляя за мембраной практически дистиллированную воду.

В основе всех этих процессов лежат пористые перегородки четырёх базовых типов: сеточные, глубинные, а также специализированные мембраны для микро- и ультрафильтрации. Самый элементарный из них — сеточный (ситовый) фильтр, где разделение происходит за счёт простого механического отсева на поверхности проволочной ткани. В качестве материала для таких сеток традиционно используют низкоуглеродистые и легированные стали, медь, латунь, бронзу, никель и их сплавы. Их производство строго регламентировано ГОСТ 3187-76, ГОСТ 6613-73 и ГОСТ 3584-73, что гарантирует воспроизводимость размера ячеек и механическую стабильность. Преимущество сеточных фильтров — в универсальности: они сохраняют работоспособность в диапазоне температур от 0 до 1000 К и устойчивы как к агрессивным химическим средам, так и к нейтральным условиям. Однако здесь действует фундаментальный компромисс: уменьшая размер ячеек для повышения степени очистки, неизбежно увеличиваешь гидравлическое сопротивление, что требует больших энергозатрат на прокачку фильтруемой среды. Этот баланс между чистотой и энергоэффективностью определяет выбор фильтра в каждом конкретном случае.

Сетки бывают тканного и саржевого плетений. Внешний вид металлических сеток из нержавеющей стали приведен на рис.



Сетка тканого плетения

Сетка саржевого плетения

Современные сетчатые фильтрующие элементы обеспечивают абсолютную степень очистки в диапазоне 5–20 мкм, что приближается к физическим пределам механического разделения методом геометрического отсева. Однако при эксплуатации в условиях резких перепадов

гидродинамического давления возникает деформация фильтрующего полотна: проволочные нити смещаются относительно друг друга, геометрия ячеек нарушается, что приводит к локальному увеличению эффективного диаметра пор и снижению селективности фильтрации. Для стабилизации структуры применяется технология синтеризации — термодиффузионное соединение узлов переплетения после формирования сетчатого полотна. Последующая калибрующая прокатка позволяет стандартизировать размер пор по всей поверхности фильтрующего элемента. Синтерированные сетки сохраняют постоянство порометрических характеристик даже при высоких рабочих давлениях, однако дополнительные технологические операции значительно повышают сложность и себестоимость производства.

В качестве альтернативы металлическим фильтрующим элементам используются полимерные сетки, изготавливаемые из синтетических материалов: полиамида (капрон), полиэтилентерефталата (лавсан), полипропилена, фторопласта и других термопластичных полимеров. Производство осуществляется двумя основными методами. Тканые сетки формируются путём переплетения моноволокон по принципу основы и утка, что создаёт структуру, морфологически идентичную металлическим проволочным аналогам. Сварные сетки производятся соединением волокон в точках пересечения методом термопластичной сварки с применением нагревательных штампов, обеспечивающих локальное расплавление и диффузионное сцепление полимерных нитей.

Номинальная степень очистки полимерных сетчатых фильтров, как правило, составляет 10 мкм, хотя современные технологии позволяют получать структуры с размером ячеек в диапазоне десятых долей микрометра. Ключевое преимущество таких материалов — исключительная устойчивость к химической коррозии, что обеспечивает длительный срок службы в агрессивных средах, где металлические аналоги быстро деградируют.

В системах водоподготовки сетчатые фильтры работают на «передовой» — они первыми встречают поток воды и берут на себя удар крупного мусора. Их задача не в том, чтобы сделать воду кристально чистой, а в том, чтобы «отсеять» грубые примеси: песчинки и илистые частицы, обрывки водорослей, волокна и другой детрит. Такая грубая очистка выполняет защитную функцию — она предотвращает преждевременный износ и засорение более чувствительных элементов системы: мембранных модулей, ионообменных фильтров и насосного оборудования.

Чтобы повысить шансы на удержание частиц, инженеры иногда укладывают сетки слоями, один за другим. Каждый дополнительный слой заставляет воду «петлять» между нитями, увеличивая вероятность, что примесь застрянет в лабиринте пор. Но эта хитрость имеет свою цену: с каждым новым слоем растёт сопротивление потоку, и насосам приходится работать с большей нагрузкой, расходуя больше энергии.

Несмотря на такие преимущества сеток, как чёткая геометрия ячеек и стабильность

характеристик в процессе эксплуатации, по общей эффективности удержания частиц они проигрывают тканевым и войлочным фильтрам. Даже при идеальном производстве в сетчатом полотне неизбежно встречаются отдельные «слабые» места — ячейки с чуть увеличенным размером. Из-за этих дефектных пор суммарная селективность сетчатых фильтров редко превышает 70 %, тогда как более «пушистые» материалы за счёт хаотичной структуры волокон задерживают значительно больше загрязнений.

Отдельную нишу занимают фильтры из нейлона (полиамида), широко применяемые в гидробиологических исследованиях для концентрирования зоопланктона или фитопланктона из природных водоёмов. Такие фильтры рассчитаны на удержание частиц размером около 60 мкм, что соответствует нижней границе размеров многих микроорганизмов и мелких беспозвоночных, обитающих в озёрных и морских экосистемах.

Другим широко известным фильтром, является глубинный фильтр, используемый для обычного осветления. Он представляет собой, сделанный из бумаги, асбеста или стекловолокна, волокнистый лист или мат, причём расположение волокон относительно друг друга является произвольным. Действие глубинного фильтра основано на том, что частицы по мере прохождения ими через него задерживаются в извилистых каналах, пронизывающих всю толщину фильтра. Для изготовления глубинных фильтров используют бумажное, шелковое, шерстяное, асбестовое, стеклянное, полиэфирное, вязкое, металлическое, мех или волос, нейлоновое, графитовое, керамическое, кварцевое и каучуковое волокно, пеньку, джут, холст, титанат калия. В отдельных случаях волокна скрепляются пластиковым жгутом или клеем, после чего спрессовываются в круглые листы или слои, либо формуются в патроны.

По сравнению с мембранными фильтрами глубинные фильтры, которыми можно извлекать из систем маленькие частицы, подобные вирусам или бактериям, имеют значительные ограничения. Они применяются в целях задержки крупных частиц, чтобы уменьшить забивание мембранных фильтров в процессе предварительной фильтрации.

Ультрафильтры используются для выделения частиц, которые на размерной шкале принадлежат области ультрафильтрации. Обычно это полимерные плёнки, имеющие плотную структуру с размерами пор порядка размеров молекул, причём поры распределены регулярно и плотно. Такой фильтр оказывает очень большое сопротивление потоку жидкости. Наконец, микрофильтры, применяемые в обычных процессах фильтрации частиц, имеют очень сложную открытую структуру коллоидного типа.

Изотропными называют мембраны достаточно однородные по своей толщине: от верхней их стороны к нижней. В других случаях структура мембраны от одной их стороны до другой может сильно отличаться, и тогда её называют анизотропной. В действительности мембранная фильтрация очень сложна, хотя и кажется процессом простым.

При прохождении через мембрану жидкости, содержащей частицы другого вещества, образуется сложная проточная система; через поры мембраны перемещаются маленькие струйки жидкости, которые выходят с противоположной стороны. Жидкость свободно проходит через более крупные поры, поэтому они первыми вовлекаются в процесс фильтрации. Взвешенные в жидкости частицы, движутся в её потоке по инерции. Если частицы достаточно малы, чтобы пройти сквозь поры мембраны, то они покидают последнюю с противоположной стороны и становятся частью фильтрата. Остальные частицы либо задерживаются внутри матрицы, либо остаются на поверхности мембраны.

То, что частицы, размеры которых больше размеров пор, задерживаются мембраной, вполне понятно, однако мембраной извлекаются также многие из частиц с размерами, меньшими, чем размеры пор. Как же это происходит? Если частица немного меньше поры и проходит неподалёку от нее, то существует определённая вероятность того, что она коснётся матрицы мембраны своим краем.

Если сила сцепления достаточно велика, то частица захватится матрицей. Извлечение частиц, размеры которых значительно меньше размеров пор, возможно лишь в том случае, если на них действует некоторая сила притяжения со стороны поверхности мембраны. Мембрана - не просто сито. В задержке частиц важную роль играют капиллярный эффект и явление адсорбции. Так, в случае, когда размеры пор мембраны больше размеров частиц, последние не всегда свободно проходят через мембрану. Большое влияние могут оказывать на взаимодействие частиц с матрицей мембраны электростатические и вандервальсовы силы. Если рН смачивающей мембрану жидкости превышает 2-3, то в большинстве случаев поверхность мембраны имеет отрицательный заряд, а поскольку клетки, вирусы, и большая часть макромолекул в нейтральной области рН также заряжены отрицательно, начинают действовать электростатические силы отталкивания, которые могут превышать вандервальсовы силы притяжения. Особенно значительно этот эффект появляется при фильтрационных работах с вирусами. Отрицательный заряд мембраны можно снизить или даже снять его вовсе, повышая ионную силу фильтруемого раствора. Используя такой приём, при помощи мембран с минимальным размером пор порядка 5-10 мкм из воды можно извлекать частицы с размерами порядка размеров бактерий.

6.Отбор, хранение и транспортирование проб воды.

Отбор поверхностных проб воды проводят на глубине 10–15 см ниже нижней кромки ледяного покрова либо ниже зеркала свободной воды. При вертикальном профилировании водоёма придонные пробы отбирают на расстоянии 30–50 см от донной поверхности. В зонах купания воду набирают непосредственно с поверхности, не погружая горлышко бутылки в водную толщу. Точка отбора должна находиться в месте, где глубина составляет не менее 0,5 м; забор проб непосредственно с береговой линии не допускается.

Процедура отбора требует соблюдения стерильной техники. Перед работой руки обрабатывают антисептиком. Стерильную ёмкость вскрывают только в момент погружения в воду: пробку снимают одновременно с защитным колпачком, не допуская контакта горлышка и пробки с любыми поверхностями. Предварительное ополаскивание ёмкости водой из водоёма запрещено.

После заполнения ёмкость герметично закрывают стерильной пробкой — ватной, резиновой или корковой (в последнем случае пробку дополнительно оборачивают алюминиевой фольгой), — и фиксируют стерильным колпачком. Для бактериологического анализа на индикаторные микроорганизмы объём отбираемой пробы должен составлять 500 мл.

7. Приготовление питательных сред и реактивов.

Фуксин-сульфитную среду Эндо готовят из сухого препарата по прописи на этикетке. Состав среды Эндо: пептона — 1%, лактозы — 1 %, двузамещенного фосфорнокислого калия (K_2HPO_4) — 0,35%, агар-агара — 1,5%. За исключением лактозы все ингредиенты растворяют в воде в автоклаве или при кипячении. Лактозу добавляют после растворения всех остальных компонентов среды, во избежание карамелизации сахара. Среда не должна содержать никаких других углеводов, кроме лактозы, поэтому при ее изготовлении можно применять любой пептон или гидролизат белков, однако не рекомендуется использование мясной воды.

В готовую и охлажденную до 60-70° С среду перед разливкой в чашки допускается прибавлять на 100 мл среды: 0,2 мл 10% спиртового раствора основного фуксина для повышения дифференцирующих свойств среды.

Перед посевом чашки Петри с питательной средой подсушивают в случае наличия видимых капель конденсата на поверхности агара. Максимальный срок хранения готовых чашек со средой — 2–3 суток в темноте; раствор фуксина сохраняет пригодность не более одного месяца.

При анализе методом мембранных фильтров воды с низкой и средней степенью загрязнения, где численность фоновой водной микрофлоры, активно растущей на среде Эндо, значительно превышает количество бактерий группы кишечных палочек, допускается частичное подавление роста сопутствующих микроорганизмов. Для этого помимо фуксина в 100 мл среды Эндо дополнительно вносят 0,4–0,5 мл 5%-ного водного раствора фенола и 1,8 мл этилового спирта.

8. Характеристика географического объекта.

Клязьма — река в Европейской части России, протекающая по территории города Москва, Московской, Владимирской, Ивановской и Нижегородской областей, левый приток Оки.

Длина — 686 км, площадь бассейна — 42,5 тыс. км². Среднегодовой расход воды — в 185 км от устья, у города Коврова, равняется 139—147 м³/с. Питание преимущественно снеговое. Замерзает в ноябре, вскрывается в первой половине апреля.

Река берёт начало в пределах Московской возвышенности, близ Солнечногорска. От истока течёт на

юго-восток, по территории Солнечногорского района, а затем по границе Молжаниновского района Москвы, где у села Черкизова круто поворачивает на восток. Берега в верхнем течении Клязьмы высокие, долина узкая. У впадения в Клязьминское водохранилище ширина реки достигает 12 м. Далее протекает через Клязьминское и Пироговское водохранилища, где смешивается с водами Волги. Ниже названных водохранилищ сток Клязьмы регулируется, ширина её у платформы Клязьма Ярославского направления Московской железной дороги — около 20 м.

Течёт в основном по Мещёрской низменности. В пределах Мещёры правый берег реки значительно ниже левого. Ниже устья Тезы по низкому левому берегу начинается Балахнинская низменность, по правому — крутой берег (до 90 метров), относящийся к Гороховецкому отрогу Цнинского вала. Ширина в Ногинске — 50 м, во Владимире — 130 м. Кое-где Клязьма имеет ширину, превышающую 200 м. Максимальная глубина 8 м, преобладает небольшая (1—2 м). Местами река пререзает известняковые толщи. Дно глинистое, местами песчаное.

На левом берегу между Ковровом и устьем Тезы расположен государственный природный заказник «Клязьминский» (до 1978 года здесь были 2 боброво-выхухолевых заказника местного значения: Южский в Ивановской и Ковровский во Владимирской области).



Бассейн Клязьмы

9. Характеристика кишечной палочки.

Колибактерия (лат. *Escherichia coli*) — грамотрицательная палочковидная бактерия с несколько закруглёнными концами. Её размеры составляют 0,4–0,8 мкм в ширину и 1–3 мкм в длину, объём отдельной клетки — около 0,6–0,7 мкм³. Микроорганизм относится к факультативным анаэробам и не образует эндоспор.

С точки зрения систематики, *E. coli* входит в род *Escherichia*, семейство *Enterobacteriaceae*, порядок *Enterobacterales*, класс гамма-протеобактерий (*γ-Proteobacteria*), тип *Proteobacteria*,



царство *Bacteria*.

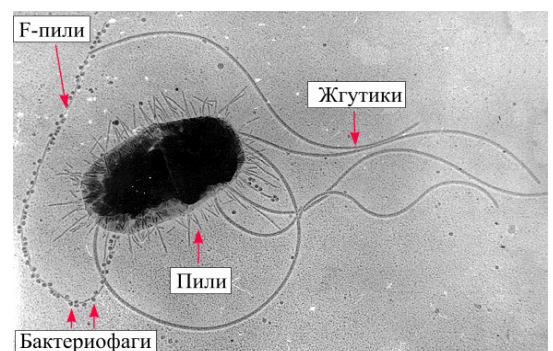
В природе существует множество вариантов кишечной палочки, включая свыше ста патогенных (энтеровирулентных) штаммов. Их объединяют в четыре основные группы: энтеропатогенные (ЭПКП), энтеротоксигенные (ЭТКП), энтероинвазивные (ЭИКП) и энтерогеморрагические (ЭГКП).

E. coli проявляет метаболическую пластичность: в анаэробных условиях основными продуктами её жизнедеятельности становятся лактат, сукцинат, этанол, ацетат и углекислый газ. Параллельно образуется молекулярный водород, который ингибирует дальнейшее накопление метаболитов. Чтобы избежать самоторможения, кишечная палочка часто вступает в симбиотические отношения с микроорганизмами-«потребителями» водорода — метаногенными археями или сульфатовосстанавливающими бактериями.

Оптимальная температура для размножения большинства штаммов — 37 °С, хотя отдельные линии способны делиться даже при 49 °С. Рост культуры возможен как за счёт аэробного, так и анаэробного дыхания с использованием различных окислительно-восстановительных пар: окисление пирувата, формиата, водорода, аминокислот в сочетании с восстановлением кислорода, нитрата, диметилсульфоксида или триметиламин N-оксида.

Подвижные штаммы оснащены перитрихальными жгутиками. На вершине каждого жгутика расположен адгезивный белок FimH, распознающий сахара на поверхности субстрата. Сам жгутик представляет собой спирально закрученную цепочку белковых субъединиц, функционирующую как упругая пружина: при механическом воздействии он способен растягиваться, сохраняя при этом целостность структуры.

Электроннограмма клетки кишечной палочки, напыленной платинопалладиевым сплавом: x 6000.

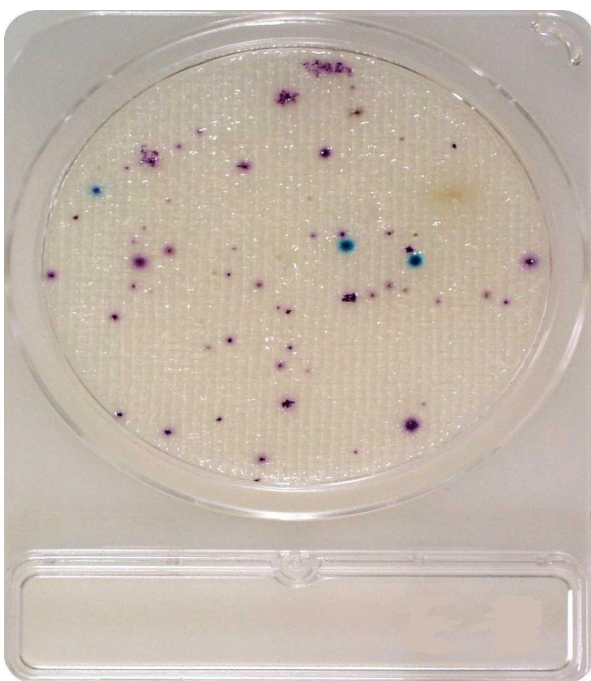


Штамм — это выделенная внутри вида группа микроорганизмов, обладающая устойчивыми признаками, отличающими её от других представителей того же вида. Эти различия нередко проявляются лишь на молекулярном уровне — например, в нюансах строения поверхностных белков или метаболических путей, — но при этом оказывают реальное влияние на физиологические особенности бактерии или особенности её жизненного цикла.

У кишечной палочки (*E. coli*) разные штаммы часто демонстрируют узкую привязанность к определённому виду-хозяину: одни штаммы преимущественно обитают в кишечнике человека, другие — у крупного рогатого скота, третьи — у птиц. Эта специфичность лежит в основе метода определения источника фекального загрязнения водоёмов. Анализируя штаммовый состав *E. coli* в пробе воды, специалисты могут установить, от кого именно поступили загрязнения — от человека, домашних животных или диких птиц, — что позволяет точнее локализовать источник сброса и принять целенаправленные санитарные меры.

Новые штаммы *E. coli* появляются в результате мутаций и горизонтального переноса генов. На жидких средах *E. coli* дает диффузное помутнение, на плотных средах образует S- и R- формы колоний. На основной для эшерихий среде Эндо лактозоферментирующие кишечные палочки образуют интенсивно красные колонии с металлическим блеском, не ферментирующие - бледно-

розовые или бесцветные колонии с более темным центром, на среде Плоскирева - красные с желтоватым оттенком, на среде Левина - темно- синие с металлическим блеском.



Кишечная палочка в большинстве случаев ферментирует углеводы (глюкозу, лактозу, маннит, арабинозу, галактозу и др.) с образованием кислоты и газа, образует индол, но не образует сероводород, не разжижает желатин.

Какие-либо существенные морфологические различия между патогенными и непатогенными кишечными палочками не обнаружены. Их дифференциация основана на изучении антигенных свойств. Среди поверхностных антигенов выделяют полисахаридные O-антигены, жгутиковые H-антигены и капсульные полисахаридные K-антигены. Известно более 170 вариантов O-антигенов (это соответствует принадлежности возбудителя к определенной серогруппе) и 57 - H-антигенов (принадлежность к серовару). В состав диареогенных (вызывающих диарею) кишечных палочек входят 43 O-группы и 57 OH-вариант.

Патогенные свойства диареогенных штаммов *Escherichia coli* определяются комплексом факторов вирулентности, которые можно разделить на несколько ключевых групп:

Адгезивные и инвазивные факторы. К ним относятся пилевые и фимбриальные структуры, а также белки наружной мембраны, обеспечивающие прикрепление бактерий к эпителию кишечника. Большинство генов, кодирующих эти структуры, локализованы на плазидах. Благодаря им микроорганизмы колонизируют преимущественно нижние отделы тонкой кишки, закрепляясь на поверхности слизистой оболочки.

Экзотоксины. Выделяют две основные разновидности:

— цитотоксины, стимулирующие гиперсекрецию жидкости энтероцитами и нарушающие водно-солевой обмен, что приводит к развитию водянистой диареи;

— энтероцитотоксины, повреждающие клетки кишечного эпителия и эндотелий капилляров.

Эндоксин. Представлен липополисахаридом наружной мембраны грамотрицательных бактерий, обладающим пирогенным и провоспалительным действием.

Бактериоцины (колицины). Многие патогенные штаммы синтезируют белковые соединения, подавляющие рост родственных бактерий, что даёт им конкурентное преимущество в микробном сообществе кишечника.

В зависимости от комбинации этих факторов диареогенные *E. coli* подразделяют на пять основных патотипов:

— **Энтеротоксигенные (ЭТКП)** продуцируют термолabileный токсин, сходный по механизму действия с холерогеном. Вызывают холероподобную диарею: водянистые испражнения без примеси крови и лейкоцитов. Распространённая причина «диареи путешественников» и гастроэнтеритов у детей раннего возраста.

— **Энтероинвазивные (ЭИКП)** способны проникать внутрь эпителиальных клеток кишечника и размножаться в их цитоплазме. Клинически проявляются профузной диареей с примесью крови и большим количеством лейкоцитов в кале — признаками инвазивного воспалительного процесса. Картина заболевания напоминает бактериальную дизентерию.

— **Энтеропатогенные (ЭПКП)** — классические возбудители диарейных заболеваний у грудных детей. Патогенез основан на адгезии к энтероцитам с последующей деструкцией микроворсинок («стирающаяся щётка»), что нарушает всасывание и приводит к водянистой диарее и выраженному обезвоживанию.

— **Энтерогеморрагические (ЭГКП)** вызывают геморрагический колит — диарею с примесью крови без лейкоцитов. Наиболее опасный серотип O157:H7 ассоциирован с развитием гемолитико-уремического синдрома (ГУС): триады гемолитической анемии, тромбоцитопении и острой почечной недостаточности. Особенно тяжело заболевание протекает у детей младшего возраста, пожилых людей и лиц с ослабленным иммунитетом; возможны летальные исходы.

— **Энтероадгезивные (ЭАКП)** отличаются способностью к агрегативной адгезии на поверхности эпителия, не проникая внутрь клеток. Не продуцируют классических цитотоксинов; патогенез и клиническая значимость изучены недостаточно.

E. coli часто используют в качестве модельного организма в микробиологических исследованиях. Культивируемые штаммы, например, *E. coli* K12 хорошо приспособлены к росту в лабораторных условиях, и, в отличие от штаммов дикого типа, неспособны заселять кишечник. Многие лабораторные штаммы утратили способность образовывать биологические плёнки. Описанные особенности предохраняют штаммы дикого типа от антител и химических агентов, но требуют больших затрат вещества и энергии.

В 1946 году Джошуа Ледерберг и Эдуард Тейтем описали явление конъюгации бактерий, используя кишечную палочку в качестве модельного организма. *E. coli* остаётся одним из наиболее востребованных бактерий при изучении конъюгации и в настоящее время. *E. coli* была важным компонентом первых экспериментов по генетике бактериофагов, ранние исследователи, например, Сеймор Бензер, использовали *E. coli* и фаг Т4 для изучения структуры генов. До исследований Бензера не было известно, имеет ли линейную или разветвлённую структуру.

Кишечная палочка *E. coli* была одним из первых организмов, чей геном был полностью секвенирован. Последовательность нуклеотидов в геноме штамма K12 *E. coli* была опубликована в журнале *Science* в 1997 году.

Долговременный эксперимент по эволюции *E. coli* был начат Ричардом Ленски в 1988 году и позволил непосредственно наблюдать эволюционные изменения в лабораторных условиях. В данном эксперименте одна популяция *E. coli* получила возможность аэробно метаболизировать цитрат. Такая способность встречается у *E. coli* в норме крайне редко. Неспособность к росту в аэробных условиях используют для того, чтобы отличить *E. coli* от других, родственных бактерий, например, *Salmonella*. В ходе данного эксперимента в лабораторных условиях удалось наблюдать процесс видообразования. [2]

10. Определение числа лактозоположительных кишечных палочек.

Для оценки уровня фекального загрязнения водоёмов в санитарной практике ключевым индикатором служат лактозоположительные кишечные палочки (ЛКП). К этой группе относят граммотрицательные неспорообразующие палочки, которые в течение 24 часов при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ферментируют лактозу с образованием кислоты и газа и дают отрицательную реакцию на оксидазу. Количественное определение ЛКП в пробах воды проводят методом мембранных фильтров, который позволяет точно подсчитать количество колониеобразующих единиц на единицу объёма.

11.Метод мембранных фильтров.

Объем воды для посева.

Объём воды выбирают в зависимости от степени её предполагаемого загрязнения с таким расчётом, чтобы не менее, чем на двух фильтрах выросли изолированные колонии, среди которых не более 30 колоний относятся к бактериям группы кишечных палочек. При исследовании воды неизвестной степени бактериального загрязнения следует засеивать не менее четырёх десятикратных её объёмов.

Выполнение анализа.

Для анализа применяют мембранные фильтры с номинальным диаметром пор 0,5 мкм. Перед использованием фильтры подготавливают в соответствии с рекомендациями производителя.

Фильтрацию воды проводят на вакуумных установках, строго соблюдая требования асептики. При обработке нескольких проб с разным объёмом сначала фильтруют меньшие порции, затем — большие, каждый раз устанавливая новый стерильный фильтр. Для фильтрации 1 мл пробы в воронку сначала вносят 5–10 мл стерильной воды, затем добавляют анализируемую пробу и включают вакуумный насос.

По завершении фильтрации вакуум не отключают сразу: фильтр оставляют под разрежением на несколько секунд, чтобы удалить избыточную влагу с его нижней поверхности. Затем фильтр аккуратно переносят на поверхность агара Эндо, не переворачивая, и прижимают так, чтобы он полностью прилегал к среде без воздушных пузырей.

На одну чашку Петри допускается помещать несколько фильтров при условии, что между ними сохраняется свободное пространство и они не соприкасаются друг с другом.

Если анализируемая вода содержит большое количество взвешенных веществ или клеток фитопланктона, то её фильтруют сначала через фильтр со средним диаметром пор 4 мкм для удаления крупной взвеси, который помещают в фильтровальный прибор, накладывая на фильтр с диаметром пор 0,5 мкм. После окончания фильтрования фильтры переносят на среду Эндо отдельно и при выведении результатов анализа учитывают колонии, выросшие на обоих фильтрах.

Индикация посевов.

Чашки с посевами помещают в термостат дном вверх и инкубируют при температуре $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ в течение 16-18 часов.

12.Учет результатов.

Для количественного учёта отбирают фильтры с изолированными колониями, при этом количество колоний, типичных для лактозоположительных кишечных палочек, не должно превышать 30. В случае отсутствия фильтров с оптимальной плотностью роста допускается подсчёт по одиночному фильтру или по фильтрам с более густым засевом с последующей корректировкой

результатов.

Для подтверждения принадлежности колоний к группе кишечных палочек проводят оксидазный тест. Фильтр с выросшими колониями переносят на кружок фильтровальной бумаги, превышающий его диаметр и предварительно пропитанный реактивом для определения оксидазной активности. Спустя 2–5 минут, после появления чёткой сине-фиолетовой окраски по краю или по всей поверхности колоний (признак оксидазоположительных бактерий), фильтр возвращают на питательную среду и завершают подсчёт.

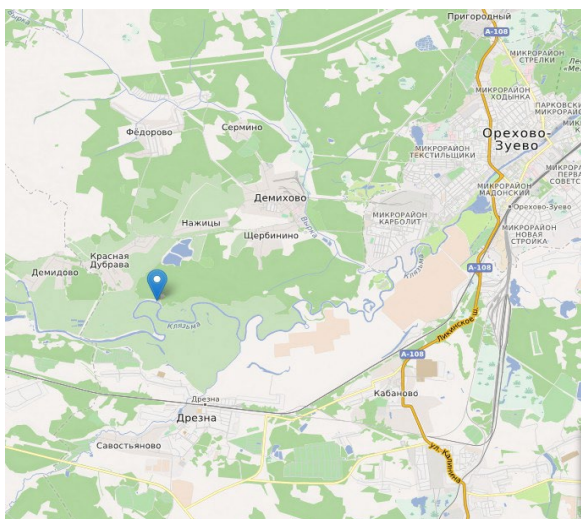
В расчёт принимают только те колонии, которые сохранили исходную окраску и не проявили сине-фиолетового окрашивания. Все колонии, изменившие цвет на сине-фиолетовый в ходе теста, исключают из учёта как не принадлежащие к группе кишечных палочек.

13. Результаты исследования.

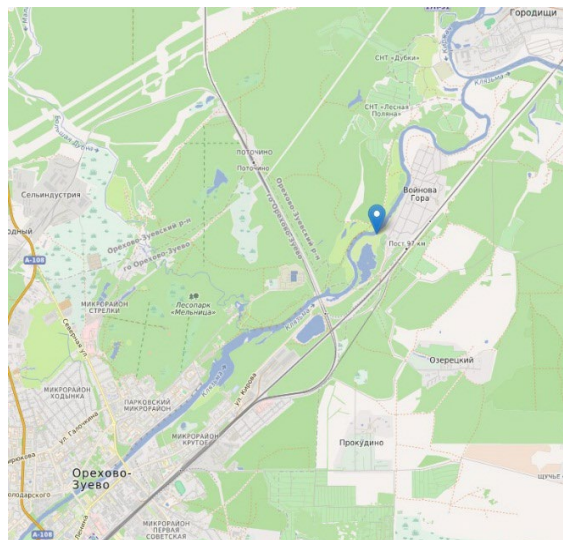
Целью работы было определение общих колиформных бактерий методом мембранной фильтрации.

Общие колиформные бактерии (ОКБ) - граммотрицательные оксидазоотрицательные, не образующие спор палочки, способные расти на лактозных средах, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре 37°C в течение 24-48 часов.

Исследовалась вода открытого водоема реки Клязьмы.

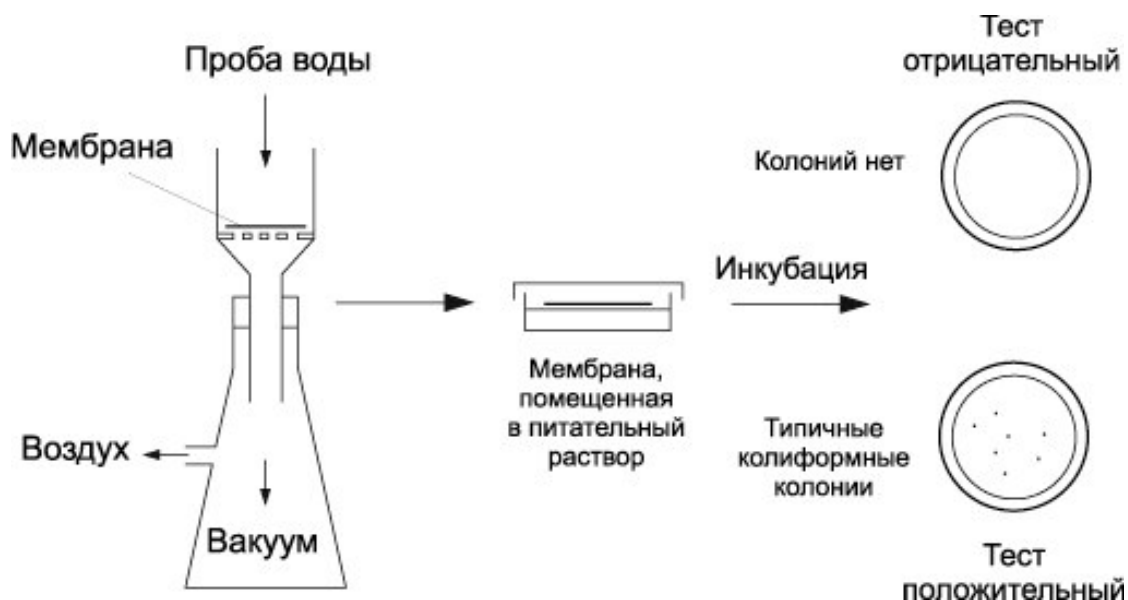


р. Клязьма до города (в районе Желтая гора)



р. Клязьма после сброса (перед д. Войнова гора)

Отбиралась проба, объемом 500 мл в стерильную посуду. Для анализа методом мембранной фильтрации использовался объем 1 мл. Далее фильтры помещали на фуксин-сульфитную среду Эндо. Чашки Петри с фильтрами ставили в термостат дном вверх и инкубировали посевы при температуре 37°C в течение 24 часов.



Если на фильтрах не было роста или росли колонии пленчатые, губчатые, плесневые, прозрачные, расплывчатые, то результат отрицательный: отсутствие ОКБ в 100 мл исследуемой воды.

Если на фильтрах был обнаружен рост изолированных типичных лактозоположительных колоний: темно-красных, красных с металлическим блеском или без него или других подобного типа колоний, то подсчитывали.

Число колонии каждого типа отдельно и приступали к подтверждению их принадлежности к ОКБ.

Каждая выбранная колония исследовалась на:

1. наличие оксидазной активности;
2. принадлежность к Граму (микроскопия окрашенного по Граму препарата или постановка теста Греггера);
3. ферментацию лактозы до кислоты и газа.

Постановку оксидазного теста проводили как описано ранее. Реакция считалась положительной, если в течение 1 минуты появлялось фиолетово-коричневое или синее окрашивание штриха. Такие колонии из анализа исключались. При отрицательной реакции цвет в месте нанесения колонии не менялся. Эти колонии подвергались учёту.

Окраска по Граму нами была заменена тестом Греггера, не требующим использования оптики.

Тест Греггера.

В капле 3% раствора КОН на предметном стекле эмульгируют бактериальную массу, взятую с плотной среды. После нескольких секунд перемешивания петлёй взвесь ослизняется, и за петлёй тянутся слизистые нити, что указывает на принадлежность колоний к грамотрицательному виду.

У грамположительных бактерий слизистые нити не образуются - реакция отрицательная.

Определение ферментации лактозы.

Оставшуюся часть оксидазоотрицательной грамотрицательной изолированной колонии засевают в пробирку с лактозной средой. Для подтверждения наличия ОКБ посев инкубировали при температуре $(37^{\circ} \pm 1)$ °С в течение 48 часов.

При образовании кислоты и газа среда меняла цвет с зелёного на жёлтый и содержала пузырьки газа. При отсутствии кислоты и газа цвет питательной (оксидазоотрицательных) подсчитывают количество тёмно-красных и красных с металлическим блеском и без него, а также розовых слизистых крупных выпуклых, розовых с тёмно-красным центром (с отпечатками на обратной стороне фильтра до выполнения оксидазного теста).

При изучении проб, анализ может быть завершён на этом этапе. При отсутствии достаточно чёткой дифференциации лактозоположительных колоний и некоторых других случаях анализ продолжают дальше.

По 2-3 колонии каждого подсчитанного типа оксидазоположительных колоний пересевают в полужидкую среду с лактозой.

На мембранных фильтрах, на которых выросли изолированные колонии и число колоний кишечных палочек не более 30, подсчитывают отдельно каждый тип колоний, которые по морфологии и окраске можно предположительно отнести к ферментирующим лактозу кишечным палочкам (тёмно-красные с металлическим блеском, тёмно-красные без блеска, красные; розовые с красным центром, розовые выпуклые слизистые и других оттенков с отпечатками на обратной стороне мембранных фильтров).

По 3-4 колонии каждого подсчитанного отдельного типа микроскопируют после окраски по Граму, пересеивают уколом до дна пробирки в полужидкую среду с лактозой. Посевы инкубируют в течение 5-6 часов при температуре $37^{\circ} \pm 0,5$ °С. Через 5-6 часов учитывают результат. При наличии кислоты и газа исследуемую колонию относят к лактозоположительным кишечным палочкам, при отсутствии изменения среды - не учитывают. При наличии кислоты посевы оставляют в термостате и окончательный учёт производят через 24 часа. В тех лабораториях, где учёт результатов на полужидкой среде с лактозой не может производиться через 5-6 часов, следует применять лактозо-пептонную среду с поплавками. В этом случае учёт результатов производят через 18-24 часа.

Учёт результатов проводился по формуле:

$$X = A \times 100 / V, \text{ где}$$

x - число колоний в 100 мл;

V- профильтрованный объём воды через фильтры, на которых вёлся учёт (1мл);

A – число, подсчитанных на этих фильтрах колоний в сумме.

Результаты анализа выражают в виде числа лактозоположительных кишечных палочек в 1 литре воды (коли-индекс). Суммируют количество колоний лактозоположительных кишечных палочек на таких фильтрах, где выросли изолированные колонии и число кишечных палочек не

превышает 30, и делят на объём воды, профильтрованный через эти фильтры, выраженный в литрах.

При отсутствии на фильтрах колоний кишечных палочек, коли-индекс будет меньше той величины, которая была бы определена в случае обнаружения в анализируемом объёме одной клетки кишечной палочки.

Перечень сокращений в таблице:

Группы колоний:

0⁻ - оксидазоотрицательный тест

Г⁻ – грам отрицательные бактерии

К⁺, Г⁺- наличие газа и кислоты в питательной среде **КОЕ-** колониеобразующие единицы

ОКБ- общие коли формные бактерии **ПДК-** предельно допустимая концентрация

Дата	Объект	Разведение пробы	Фильтры на среде Эндо (кол-во колоний)	Оксидазный тест	Окраска по Грамму	Ферментация лактозы до кислоты и газа	ОКБ КОЕ в 100 мл	Превышение ПДК (раз)
17.11.24	р. Клязьма до города	1,0 0,1 0,01 0,001	0,01 5 4 5 8 2 1	0 ⁻ 0 ⁻ 0 ⁻ 0 ⁻ 0 ⁻ 0 ⁻	Г ⁻ Г ⁻ Г ⁻ Г ⁻ Г ⁻ Г ⁻	К ⁺ Г ⁺ К ⁺ Г ⁺ К ⁺ Г ⁺ К ⁺ Г ⁺ К ⁺ Г ⁺ К ⁺	0,25*10 ⁵	50
	р. Клязьма после города	1,0 0,1 0,01 0,001	0,01 1 2 1 1 2	0 ⁻ 0 ⁻ 0 ⁻ 0 ⁻ 0 ⁻	Г ⁻ Г ⁻ Г ⁻ Г ⁻	К ⁺ Г ⁺ К ⁺ Г ⁺ К ⁺ Г ⁺ К ⁺ Г ⁺ К ⁺ Г ⁺ К ⁺	0,09*10 ⁵	18

21.04.25	р. Клязьма до города	1,0 0,1 0,01 0,001	0,01 10 6 9 8 7	0- 0- 0- 0- 0-	Г- Г- Г- Г- Г-	Г+ Г+ Г+ Г+ Г+ Г+	К+ К+ К+ К+ К+ К+	0,40*10 ⁵	80
	р. Клязьма после города	1,0 0,1 0,01 0,001	0,01 3 3 2 2 1	0- 0- 0- 0- 0-	Г- Г- Г- Г- Г-	Г+ Г+ Г+ Г+ Г+ Г+ Г+	К+ К+ К+ К+ К+ К+ К+	0,11*10 ⁵	22

14. Заключение.

В результате проведенных исследований было установлено превышение предельно допустимых концентраций колиформных бактерий:

1) в ноябре 2024 г. в пробах до города в 50 раза, а после сброса очистных сооружений в 18 раз;

2) в апреле 2025 г. в пробах до города в 80 раза, после сброса очистных сооружений – в 22 раза.

Многократное превышение ПДК колиформных бактерий в пробах воды до города в апреле 2025 г. (в 80 раза) свидетельствуют о возможно недостаточной очистке бытовых сточных вод городов расположенных выше по течению реки и смыве талыми водами органических удобрений с полей поймы реки Клязьмы и других земель сельскохозяйственного назначения.

В тоже время, пробы воды после сброса очистных сооружений характеризуются существенным снижением содержания колиформных бактерий, что свидетельствует о возможности самоочистки реки и эффективности работы очистных сооружений города Орехово-Зуево.

Таким образом, в результате проведенных исследований обнаружилось превышение предельно допустимых значений колиформных бактерий в анализируемых пробах в 18-80 раз.

Из всего вышеперечисленного следует, что река Клязьма не может быть использована в качестве рекреационного водоема. Это возможно только после снижения концентрации микроорганизмов до установленных санитарных норм.

Список используемой литературы

1. Бочкарев, А. В. Химия воды : учебник для вузов / А. В. Бочкарев. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2022. — 241 с. — (Высшее образование).
2. Петрова, Ю. С. Анализ объектов окружающей среды : учебное пособие / Ю. С. Петрова, С. В. Темерев. — Барнаул : Изд-во Алт. ун-та, 2019. — 156 с.
3. Родин, А. А. Анализ загрязненной воды : практическое руководство / А. А. Родин, А. С. Другов. — Санкт-Петербург : НПО «Профессионал», 2023. — 520 с.
4. Анализ воды. Справочник / под ред. Л. М. Л. Ноллета, Л. С. П. де Гелдера ; пер. с англ. — 3-е изд. — Санкт-Петербург : ЦОП «Профессия», 2020. — 912 с.
5. Химия воды. Аналитическое обеспечение лабораторных работ : учебно-методическое пособие для бакалавров / сост. И. В. Грошева. — Тюмень : ТюмГУ, 2021. — 88 с.
6. Муравьев, А. Г. Руководство по гидрохимическому анализу поверхностных вод суши / А. Г. Муравьев. — 4-е изд., перераб. и доп. — Санкт-Петербург : Крисмас+, 2021. — 254 с.