

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.140.01

при Мурманском морском биологическом институте

Кольского научного центра

Российской академии наук

от 21 февраля 2017 г., протокол № 92

Председательствующий: заместитель председателя диссертационного совета Д 002.140.01, д.б.н., профессор П.Р. Макаревич.

Секретарь: ученый секретарь диссертационного совета Д 002.140.01, к.г.н. И.С. Усягина.

ПОВЕСТКА ДНЯ:

Защита диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук **ПУГОВКИНА Дмитрия Витальевича (РФ)** по теме «**Эпифитные бактериоценозы *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря и их роль в деградации нефтяных загрязнений**» специальность 25.00.28 – «океанология».

Официальные доктор биологических наук *Г.А. Евдокимова;*

оппоненты: кандидат биологических наук *О.В. Степаньян;*

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»

На заседании присутствовали следующие члены диссертационного совета Д 002.140.01:

1. МАКАРЕВИЧ П.Р., д.б.н., 25.00.28 – зам. председателя диссертационного совета,
2. УСЯГИНА И.С., к.г.н., 25.00.28 – секретарь диссертационного совета
3. ЛЕБЕДЕВА Н.В., д.б.н., 25.00.28
4. ДЖЕНЮК С.Л., д.г.н., 25.00.28
5. ДАУВАЛЬТЕР В.А., д.г.н., 25.00.28
6. КРАСНОВ Ю.В., д.б.н., 25.00.28
7. ДЕНИСОВ В.В., д.г.н., 25.00.28
8. ТАРАСОВ Г.А., д.г.-м.н., 25.00.28
9. ЖУРАВЛЕВА Н.Г., д.б.н., 25.00.28
10. ШОШИНА Е.В., д.б.н., 25.00.28
11. ВОСКОБОЙНИКОВ Г.М., д.б.н., 25.00.28
12. ДОЛГОВ А.В., д.б.н., 25.00.28
13. МАКАРОВ М.В., д.б.н., 25.00.28
14. КАВЦЕВИЧ Н.Н., д.б.н., 25.00.28
15. ТИТОВ О.В. д.г.н., 25.00.28
16. КАРАМУШКО Л.И. д.б.н., 25.00.28

17. ИВАНОВ Г.И. д.г.-м.н., 25.00.28

На заседании присутствовал *официальный оппонент* кандидат биологических наук О.В. Степаньян.

На заседании также присутствовали: сотрудники Мурманского морского биологического института КНЦ РАН – к.б.н. И.В. Рыжик, к.б.н. А.А. Фролов, к.б.н. В.В. Куклин, к.б.н. В.В. Ларионов, к.г.н. А.П. Жичкин, к.б.н. А.А. Олейник, к.б.н. О.Ю. Кудрявцева, А.В. Кузнецов, М.П. Клиндух, Д.О. Салахов, О.В. Бондарев, П.С. Вашенко, М.А. Павлова, М.П. Венгер, О.Л. Зиминая, А.Р. Трошичев; коллеги из других организаций г. Мурманска – научный сотрудник лаборатории биохимии и технологии ФГБНУ «ПИНРО» к.б.н. К.С. Рысакова, студент МАГУ Е.К. Цыганова, студент МАГУ А.А. Мацукевич.

Макаревич П.Р. (Председательствующий): Прошу всех членов диссертационного совета расписаться в явочном листе. Напоминаю, что идет трансляция и запись.

Макаревич П.Р.: Коллеги, дальше работаем по регламенту. На основании явочного листа я извещаю членов совета о правомочности нашего заседания. По Положению о порядке присуждения ученых степеней на заседании должно присутствовать две трети от всего состава совета, то есть 14 человек. По настоящему списку – 17. Кворум имеется, и мы можем начать заседание. Итак, сегодня слушается защита диссертации Пуговкина Дмитрия Витальевича на тему «Эпифитные бактериоценозы *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря и их роль в деградации нефтяных загрязнений». Диссертация представлена на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 25.00.28 – «океанология». Официальные оппоненты: Евдокимова Галина Андреевна, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе Института проблем промышленной экологии севера КНЦ РАН (город Апатиты), и Степаньян Олег Владимирович кандидат биологических наук, заведующий отделом изучения экстремальных природных явлений и техногенных катастроф Южного научного центра Российской академии наук (город Ростов-на-Дону). Ведущая организация – Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)».

По регламенту предоставляю слово ученому секретарю Усягиной Ирине Сергеевне.

Усягина И.С.: Зачитывает данные о соискателе по материалам личного дела и сообщает, что представленные документы соответствуют требованиям ВАК.

Макаревич П.Р.: Спасибо. Прежде чем заслушать доклад, я попрошу отключить телефоны, так как может быть нарушено нормальное течение заседания. Итак, прошу, Дмитрий Витальевич. По регламенту предоставляется до 20 минут.

Пуговкин Д.В.: Оглашает основные положения диссертации:

Глубокоуважаемый председатель и члены диссертационного совета, а также коллеги, присутствующие сегодня в этом зале! Позвольте представить доклад по кандидатской диссертации «Эпифитные бактериоценозы *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря и их роль в деградации нефтяных загрязнений».

В связи с развитием добычи, переработки и транспортировки углеводородов в Арктических морях особую актуальность приобретает вопрос очистки прибрежных акваторий, в которой большую роль играют углеводородокисляющие микроорганизмы. Однако, вместе с тем, бактериальные сообщества, в том числе эпифитные, являются одними из наименее изученных компонентов биоты Мирового океана. Но прогресс не стоит на месте, методы биологических исследований развиваются. Развитие и использование современных методов исследования, в том числе молекулярно-генетического анализа, обеспечивает получение новых данных о таксономическом составе и структуре эпифитных бактериальных сообществ. Результаты подобных исследований создают основу для новых подходов к мониторингу состояния водной среды, а также позволяют разработать методы ее очистки от нефтяного загрязнения.

Цель работы – определить таксономическую структуру культивируемых и некультивируемых эпифитных бактериальных сообществ бурой водоросли *Fucus vesiculosus* в акваториях, различающихся по степени нефтяного загрязнения, а также выявить углеводородокисляющую способность эпифитных бактериоценозов фукуса.

Для достижения этой цели в работе были определены следующие задачи:

1. Разработать оптимальный метод удаления эпифитных бактерий с поверхности талломов макрофитов.
2. В эпифитных бактериальных сообществах *F. vesiculosus* в районах, различающихся по степени антропогенного загрязнения, определить:
 - общую численность бактерий;
 - численность культивируемых бактерий;
 - количественное распределение культивируемых бактерий по таллomu фукуса;
 - таксономический состав культивируемых углеводородокисляющих;
 - таксономический состав некультивируемых бактерий.
3. Экспериментально оценить углеводородокисляющую способность эпифитных бактериоценозов в лабораторных условиях.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Загрязнение водной среды нефтепродуктами вызывает значительное увеличение количества эпифитных микроорганизмов у водорослей *F. vesiculosus*, в первую очередь углеводородокисляющих бактерий, и также оказывает влияние на таксономическую

структуру бактериальных сообществ. В присутствии нефтяного загрязнения доминантными являются бактерии, относящиеся к типу *Proteobacteria* и классу *Gammaproteobacteria*, среди которых преобладают представители рода *Acinetobacter*.

2. Эпифитные бактериальные сообщества фукусовых водорослей способны к утилизации нефтяных углеводородов и, по сравнению с пелагическими бактериоценозами, вносят более значимый вклад в процессы деструкции нефтепродуктов в морской среде.

Результаты представляемой работы докладывались на международных и российских конференциях и представлены в печатных изданиях, в том числе из перечня ВАК.

В качестве *объектов исследования* были выбраны эпифитные бактерии, обитающие на поверхности бурых водорослей *F. vesiculosus* L. (*Phaeophyta*). Почему был выбран именно этот представитель макрофитов? Дело в том, что данный вид широко распространен и является доминирующим на литорали Баренцева моря. Кроме того, он достаточно хорошо изучен в плане морфологии, физиологии, экологии. В научной литературе показана его высокая устойчивость к неблагоприятным факторам среды и антропогенному воздействию, в том числе к нефтяному загрязнению. Также известно о взаимоотношениях между бактериальными сообществами, обитающими на поверхности водорослей и самими водорослями. Взаимоотношения могут быть как антагонистическими, так и взаимовыгодными. Пример *взаимовыгодного* существования: водоросли представляют субстрат для развития бактерий, выделяют органические вещества и кислород, необходимый для жизни микроорганизмов, а бактерии, в свою очередь, фиксируют и ассимилируют азот и препятствуют заселению патогенов. *Антагонистическое* взаимодействие: избыточное выделение кислорода и ряда веществ уменьшает возможность развития бактерий, которые, проникая во внутренние структуры водорослей, могут вызывать заболевания. За счет образования бактериальной пленки уменьшается доступность фотосинтетически активной радиации.

Материал для исследований отбирался в губе Зеленецкой и на двух станциях в Кольском заливе – в районе поселка Абрам-мыс и «Морского вокзала» Мурманского морского порта.

В ходе работы использовались как «классические» (стандартные) методы микробиологии (в частности, метод предельных разведений с применением жидких питательных сред для культивирования бактерий, агаризованных питательных сред для выделения чистых культур, метод эпифлюоресцентной микроскопии для учета численности), так и современные методы генетического анализа. Обработка результатов молекулярно-генетического анализа проводилась при помощи программного обеспечения и международных online баз.

Для определения эффективности деструкции нефтяных углеводородов эпифитными бактериальными сообществами проведены экспериментальные исследования с целью:

1. Определить способность углеводородокисляющих эпифитных бактерий, десорбированных с водорослей, к деструкции нефтяных углеводородов (дизельное топливо летнее).

2. Оценить эффективность деструкции нефтяных углеводородов эпифитными бактериями в ассоциации с водорослями.

На первом этапе работ стояла задача подобрать наиболее оптимальный метод, который позволяет учитывать наибольшее количество культивируемых бактерий. В результате проведенных работ было показано, что метод, основанный на использовании ватных аппликаторов и среды Зобелла, является оптимальным (позволяет учитывать наибольшее количество культивируемых бактерий). Использование ватных аппликаторов, является наиболее щадящим по отношению к бактериальным клеткам, и, в отличие от применения ультразвука или мешалки – диспергатора позволяет сохранить целостность клеток и их жизнеспособность.

Именно поэтому данный метод был использован нами при дальнейших исследованиях, связанных с культивированием бактерий.

Анализ различных частей таллома показал, что количественно бактерии распределяются по таллomu неравномерно. Их количество уменьшается от апикальной части, к основанию. Объясняется это характером роста фукуса. Он растет от апикальной части. То есть данная зона является более молодой. Здесь интенсивно идут обменные процессы, а, кроме того, структура поверхности просто не позволяет бактериальным клеткам активно заселяться.

В то же время в основании таллома жизненные процессы замедляются, поверхность становится более рельефной, что создает условия для заселения микроорганизмов.

В течение года характер распределения бактерий по таллomu сохраняется.

При этом, необходимо отметить, что заметных колебаний численности бактерий в течение года не было отмечено. У пелагических форм бактерий численность может различаться на несколько порядков. Это говорит о том, что водоросли представляют собой более стабильный субстрат, нежели толща воды, и бактерии на них меньше подвержены влиянию океанологических факторов, чем пелагические формы.

При сравнении культивируемых бактерий из «чистой» и «загрязненной» акваторий, сделан вывод, что в загрязненной акватории Кольского залива численность культивируемых бактерий заметно выше, чем в чистой акватории. В губе Зеленецкой количество углеводородокисляющих бактерий было минимальным. Они присутствовали в среде, однако их количество было ниже пороговой чувствительности метода.

В 2008 году в губе Зеленецкой в районе причала произошло затопление судна, в результате чего нефтяные углеводороды попали в морскую среду. В районе инцидента содержание нефтяных углеводородов в воде составляло 0.26 мг/л (в 5 раз выше ПДК), а при удалении от места затопления более чем на 500 м – снижалось до 0.04 мг/л (данная акватория была выбрана в качестве фоновой точки). Исследование последствий загрязнения среды позволило оценить влияние нефтяных углеводородов на бактериальное сообщество. Выявлено, что общая численность эпифитных бактерий увеличивается в загрязненном участке губы. Различия в численности бактерий в «загрязненных» и «чистых» акваториях можно подтверждены электронно-микроскопическими исследованиями. Значения общей численности бактерий, обнаруженные в пробах воды, взятых на обеих станциях в губе Зеленецкой, значительно не отличались. При рассмотрении количества культивируемых бактерий наблюдается схожая картина. На загрязненном участке численность гетеротрофных и углеводородокисляющих бактерий увеличивается.

Чем можно объяснить тот факт, что в воде количества бактерий не различались? Дело в том, что разлив носил краткосрочный характер, около недели. Пелагические формы бактерий взаимодействуют, как правило, с растворенными в воде нефтепродуктами, которые вымывались из акватории. В то же время, на водорослях налипает пленка нефтепродуктов, создавая специфические условия для развития бактерий. Если бы разлив носил более длительный характер, то число бактерий, как на фукусе, так и в воде бы увеличилось.

В результате исследований были получены чистые культуры бактерий, отнесенные к четырем видам трех разных родов: *Pseudomonas fluorescens* и *Ochrobactrum anthropi*, *Rhodococcus fascians*, *Pseudomonas guinea*. В сообществе существуют десятки родов. Тот факт, что выделяется столь незначительное количество бактерий, в очередной раз подтверждает, что большая часть микробного сообщества представляет собой некультивируемые формы микроорганизмов, для изучения таксономического состава которых требуются совсем иные подходы. Позже были проведены более детальные исследования таксономического состава бактерий в «чистых» и «загрязненных» акваториях. Молекулярно-генетический анализ выявил около одиннадцати тысяч нуклеотидных последовательностей, принадлежащих 82-м родам, 16 классам, 11 типам. Независимо от места отбора проб всегда доминировали бактерии типов *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*. Причем в губе Зеленецкой отмечалось наименьшее количество типов бактерий – 5.

Уровень классов. В губе Зеленецкой отмечено 8 классов, при этом массово представлены *Gamma*proteobacteria (*Proteobacteria*), *Alphaproteobacteria* (*Proteobacteria*) и *Flavobacteria* (*Bacteroidetes*). В морском порту отмечено 16 классов. При этом высока была

доля гаммапротеобактерий. В районе поселка Абрам-мыс соотношение основных групп было примерно равным, однако увеличивается доля альфапротеобактерий.

Что касается родов, то их в губе Зеленецкой отмечено 28. Наиболее массово представлены *Arenicella*, *Ulvibacter*, *Maribacter*, *Cytophaga* и ряд других. В Морском порту наблюдалось 62 рода. При этом доминировали бактерии рода *Acinetobacter*, которые составляли около 32 % от всего бактериального сообщества. В районе поселка Абрам-мыс обнаружено 66 родов. Представлены практически те же рода, что и в районе порта. Но их соотношения различаются.

Сравнение полученных результатов с данными литературы показало, что бактериальное сообщество губы Зеленецкой представляет собой сбалансированный биоценоз, характерный для незагрязненных прибрежных районов Мирового океана. Обнаруженные в губе бактерии выделяются из морских вод и грунтов. Они ассоциируются с частицами взвеси, а также с поверхностью водных растений.

В районе Мурманского морского порта доминирование рода *Acinetobacter* указывает на высокую концентрацию нефтепродуктов в воде. Присутствие данного рода характерно для районов с хроническим нефтяным загрязнением.

В районе поселка Абрам-мыс преобладание альфа-протеобактерий в эпифитных сообществах литорали указывает на высокое содержание в воде легкоокисляемых органических соединений.

Для определения эффективности деструкции нефтяных углеводородов были проведены лабораторные эксперименты. Результаты эксперимента показали, что эпифитные бактерии, десорбированные с поверхности фукуса, произрастающего как в загрязненной, так и в чистой среде, способны к деструкции нефтяных углеводородов, при этом эффективность деструкции различается незначительно (53 и 57 %). Бактерии, извлеченные из чистой акватории, проявили высокую адаптивную способность к нефтяным углеводородам.

Визуальные наблюдения в ходе лабораторного эксперимента показали, что в загрязненной среде эпифитные углеводородокисляющие бактерии удаляют нефтяную пленку с поверхности талломов фукусов в течение 21 суток. В чистой среде за указанный период пленка не разрушается. Пленочные формы нефтепродуктов труднее поддаются микробному окислению, поэтому бактерии из чистой акватории в основном питаются растворенными формами углеводородов.

Помимо этого, определена эффективность деструкции нефтепродуктов ассоциацией водорослей и бактерий. Было показано, что ассоциация водорослей и бактерий за одну неделю снижает содержание нефтепродуктов в воде более чем на 60 % от первоначального количества.

Необходимо отметить, что наибольшие негативные последствия от попадания нефтепродуктов в водную среду наблюдаются в первые дни после разлива, поэтому способность

микроорганизмов в ассоциации с водорослями включаться в процессы деструкции именно в этот период позволяют значительно снизить токсический эффект на экосистемы.

В заключение отмечу, что в ходе исследования были выявлены различия в структуре и таксономическом составе эпифитных бактериоценозов *F. vesiculosus* из чистых и загрязненных нефтепродуктами районов моря.

Экспериментально показана углеводородокисляющая способность эпифитных бактериальных сообществ *F. vesiculosus*.

Полученные данные будут способствовать созданию новых и модернизации уже существующих технологий очистки прибрежных зон Мирового океана от нефтяного загрязнения и позволят оценить роль прибрежных фитоценозов в процессах самоочищения экосистем Арктических морей.

Спасибо за внимание!

Макаревич П.Р.: Спасибо. 18 минут, в регламент уложился. Следующим пунктом идут вопросы к соискателю. Прошу задавать. Николай Николаевич, пожалуйста!

Кавцевич Н.Н.: Можно ли основываясь в том числе и на ваших результатах: во-первых, судить о том, какое максимальное количество эпифитных углеводородокисляющих бактерий может поселяться на фукусовых водорослях; во-вторых, каким-то образом пытаться повлиять на это население эпифитных микроорганизмов водорослей; и, в-третьих, в практических целях из видов углеводородокисляющих бактерий, представленных на фукусах, выделять отдельные виды или штаммы, которые наиболее эффективно окисляют углеводороды, и впоследствии заселять ими водоросли тем самым увеличивая эффективность нефтеокисления?

Пуговкин Д.В.: Спасибо за вопрос. По поводу первого вопроса, можно ли учесть максимальное количество? Дело в том, что бактерии могут неограниченно размножаться на поверхности водорослей. Ограничивается это только самими водорослями. Чрезмерное развитие бактерии приведет к гибели водорослей. По поводу второго вопроса. Еще раз напомните, пожалуйста.

Кавцевич Н.Н.: Каким образом можно повлиять на сообщество.

Пуговкин Д.В.: Опять же, теоретически, повлиять на структуру сообщества можно, например, внесением новых штаммов, выведенных в лабораторных условиях. Однако, как показывает практика, данные штаммы вытесняются теми, что обитают в сообществе изначально. То есть они не выдерживают конкуренции. Либо нужно вносить чрезмерное количество этих штаммов.

Кавцевич Н.Н.: То есть никаких стимуляторов здесь применить невозможно? Каких-нибудь удобрений?

Пуговкин Д.В. Теоретически, можно добавлять витамины, минеральные вещества, однако это все будет вымываться. В условиях эксперимента это все возможно. А вот в условиях природной среды... Это дискуссионный вопрос. И он, действительно, требует дальнейших исследований.

Что касается того, можно ли выделить конкретные штаммы культивируемых и некультивируемых бактерий. Они на то и называются культивируемые и некультивируемые. Какие-то выделяются, какие-то нет. Однако работы над этим ведутся. Примером может быть представленный в диссертации тип ТМ 7, так называемый. Я его не озвучивал. Это кандидат в тип *Saccharibacteria*. Он долгое время не выделялся на питательных средах. Изначально его выделили с помощью генетического анализа. Получили ДНК, принадлежащую какой-то бактерии. Какой? Ее никто никогда не видел. В последние годы методы определения совершенствуются и уже появились статьи о том, что данный тип возможно выделять. Но такие культуры микроорганизмов долго не живут в условиях лаборатории. При пересеве и при хранении они могут погибнуть.

Кавцевич Н.Н.: А потом засеять водоросли этими штаммами можно?

Пуговкин Д.В.: Принципиально, можно. Можно создать, например, суспензию бактерий с высокой численностью и заселить их на водоросли.

Кавцевич Н.Н.: Спасибо.

Макаревич П.Р.: Я еще раз напоминаю, что задавать вопросы можно как в устном, так и в письменном виде. Да, Елена Васильевна.

Шошина Е.В.: Скажите, пожалуйста, Вы приводите сравнение численности бактерий, для меня всегда было вопросом, если сравнивать одного и трех медведей, то понятно где больше, а если численность бактерий семь миллионов и пять миллионов, то это одно и тоже, я считаю. Какова скорость деления бактерий? Во сколько раз увеличивается численность бактерий за сутки? Я думаю, что для бактерий при разнице на порядок еще можно говорить больше/меньше.

Пуговкин Д.В.: Порядок это не совсем «больше». Спасибо за вопрос. Действительно, с медведями был хороший пример. Колебания численности эпифитных бактерий плюс-минус десять тысяч – это незначительные колебания. Объект довольно мелкий. В среде существуют миллионы бактерий.

По поводу того как быстро развиваются бактерии, то это зависит от условий в которых развиваются бактерии. В теплых широтах развиваются быстрее, в холодных – медленнее.

Шошина Е.В.: Мой следующий вопрос о температурных условиях в экспериментах.

Пуговкин Д.В.: Я могу сразу ответить на этот вопрос. Эксперименты проводились при температуре, характерной для среды обитания бактерий в летний период – 8-10°C.

Влияние температурного фактора на бактерий тоже дискуссионный вопрос. В литературе встречается информация о том, что углеводородокисляющие бактерии в северных морях могут разлагать нефть быстрее, чем в южных.

Сами водоросли, как я уже говорил, являются более устойчивым субстратом для бактерий, чем толща воды (пелагиаль). Поэтому этот вопрос требует дальнейших исследований. Численность бактерий колеблется незначительно, колебания составляли около порядка.

Шошина Е.В.: Это незначительно.

Пуговкин Д.В.: В загрязненных акваториях численность бактерий увеличивается. Если в чистой губе, скажем, 100 клеток на сантиметр квадратный, то в загрязненных акваториях отмечались уже десятки миллионов клеток. Я думаю, что это показательно.

Макаревич П.Р.: Еще вопросы? Пожалуйста.

Долгов А.В.: Если позволите три вопроса. Первый – в продолжение вопроса о скорости развития микробного сообщества. В губе Зеленецкой ответ сообщества на загрязнение был в течение пяти дней. Я не думаю, что скорость развития фукуса будет выше, чем 1-2 см в пять-шесть дней. Тогда возникает вопрос, почему тогда бактерии не могут поселяться на растущих довольно-таки медленно частях этого фукуса?

Пуговкин Д.В.: Я не говорил, что они не поселяются, просто количество бактерий на данных участках фукуса было минимальным, меньше, чем в основании таллома, где уже и жизненные процессы медленнее протекают (на старых участках). Но это не значит, что они не присутствуют на апикальной части. Присутствуют, и довольно много, но их гораздо меньше, чем в нижней части таллома.

Долгов А.В.: Второй вопрос. Вы не сказали, в какие сезоны отбирались пробы. Судя по картинке, у Вас были данные по разным сезонам. Численность в разные сезоны сильно не различалась, но как насчет видового состава? Были ли различия в различные сезоны или нет?

Пуговкин Д.В.: Спасибо за вопрос. Я начну с конца. Мы, к сожалению, не смотрели изменения в таксономическом составе в разные сезоны года, т.к. были ограничены ресурсами. Пробы на таксономический состав, материал для экспериментов и влияние аварийного разлива в губе Зеленецкой отбирались в августе-сентябре. Исследования распределения бактерий по таллому фукуса и изменение их количества проводились в разные сезоны года.

Долгов А.В.: Ясно. Учитывая данные по фито- и зоопланктону, можно сказать, что они подвержены очень значительным изменениям в видовом составе. И последний третий вопрос. Можно ли на основании Ваших данных выделить культуру бактерий, например, в сухом виде, суспензии, или в растворе, и при загрязнении акватории нефтяную пленку обрабатывать раствором или порошком? И возможно ли, что действие данного препарата будет более эффективным, чем создание плантации фукуса в этом районе.

Пуговкин Д.В.: Выделить культуру бактерий в условиях лаборатории возможно, но это требует дополнительных работ, потому что не все штаммы выделяются методами, которые на данный момент существуют. Нужно подбирать питательную среду, создавать оптимальный температурный режим, чтобы они росли в лаборатории. Например, *Acinetobacter* является труднокультивируемым организмом. И когда мы выделяли из загрязненного района культивируемые бактерии, *Acinetobacter* не присутствовал. Однако он является доминирующим при нефтяном загрязнении, как вы видели.

Конечно, можно создать и суспензию, и лиофилизированные препараты бактерий. Их можно распылять на поверхности нефтяных углеводородов, если они в воде находятся. Но нефть выбрасывается на берег и тут уже работает комплекс факторов, в том числе и водоросли. Есть информация, что и водоросли способны принимать участие в этом процессе. И углеводородокисляющие бактерии делают нефтяные углеводороды более доступными для водорослей. Поэтому да, создать препарат можно, распылить его можно и он будет работать, но вот будет ли он более эффективным? Предположительно, ассоциация более эффективна. И как показали представленные эксперименты, пелагические бактерии менее эффективно разлагают нефтепродукты, чем ассоциация.

Макаревич П.Р.: Да, пожалуйста.

Лебедева Н.В.: У меня такой вопрос. Вот вы много говорили о численности, и коллеги вопросы задавали. Когда Вы оперируете понятиями «больше» и «меньше», то не ясно какие Вы использовали статистические методы для того чтобы сказать, что различия достоверны или не достоверны. Не совсем понятно. Это первый вопрос. Использовали ли Вы статистические оценки и проверяли ли статистические гипотезы, чтобы делать выводы? И второй вопрос, какой был план эксперимента? Сколько было повторностей? Это непонятно из диссертации и автореферата.

Пуговкин Д.В.: Что касается статистики, то это довольно сложный вопрос, так как методы, позволяющие учитывать численность микроорганизмов, уже несут в себе довольно большую ошибку. Основными методами определения численности бактерий являются: 1) метод предельных разведений, позволяющий учитывать конкретные группы, такие как эвтрофы, мезотрофы, углеводородокисляющие и так далее; 2) метод прямого счета, который позволяет учитывать общую численность бактерий. Однако эти методы

субъективны. Глядя в микроскоп, один человек видит сто клеток, другой сто десять, а учитывая, что нужно просмотреть сорок полей зрения, ошибка вырастает. Поэтому вопрос использования статистических методов сложный. В представленной работе использовались стандартные методы, представленные в пакете Microsoft Office.

Лебедева Н.В.: По плану эксперимента.

Пуговкин Д.В.: В каждом эксперименте использовались три повторности и контроль. Эксперимент проходил в течение трех недель. Периодичность отбора проб – раз в неделю. Концентрации нефтепродуктов пересчитывались в проценты от исходной.

Лебедева Н.В.: Спасибо.

Макаревич П.Р.: Лариса Ивановна!

Карамушко Л.И.: Я в продолжение температурного фактора. Вы в функциональных блоках работы не говорите о температуре. Например, бактерии удаляли пленку в течение 21 суток. При какой температуре? Говорится, что природная, а какая именно: 0°C или 5°C? Углеводородокислительная активность – это ферментативная реакция, и она зависит от температуры.

Пуговкин Д.В.: Спасибо за вопрос. Я озвучивал уже цифры. Эксперименты проводились при 8–10°C. Эта температура является оптимальной для микробного разложения. Существует предположение, что бактерии способны разлагать углеводороды при температуре до –1°C. Спорный момент, но данные такие существуют. Это, безусловно, ферментативный процесс, который зависит от температуры, но используемая для эксперимента температура вполне приемлема. Наверное, если бы мы ставили эксперимент при более высокой температуре, этот процесс происходил бы быстрее, но в этом случае мы могли бы потерять из эксперимента психрофильных бактерий, которые при высоких температурах не обитают.

Карамушко Л.И.: Почему Вы это не указали в автореферате? Поэтому возникает ряд вопросов.

Пуговкин Д.В.: В тексте диссертации указана температура, при которой ставился эксперимент. К сожалению, в автореферате не указал, это моя ошибка. Согласен.

Макаревич П.Р.: Олег Владимирович.

Титов О.В.: Дмитрий Витальевич, большая часть вашей работы основана на методах молекулярно-генетического анализа. Можно несколько подробнее разъяснить, в чем состоит данный анализ, на чьей базе он проводился? И отразите Ваш личный вклад в проведение этого анализа.

Пуговкин Д.В.: Если позволите, я подробно не буду рассказывать. Для выделения ДНК использовался фенол-хлороформный метод экстракции. Результаты, представленные

в работе, были получены с помощью пиросеквенирования. Это достаточно современный метод. Данная работа проводилась на базе Арктического университета Норвегии (Университет Тромсе) на кафедре морской и арктической биологии. Мой личный вклад – выделение ДНК, подготовка к секвенированию. Так как был большой объем работ, для секвенирования материал передавался в компанию Macrogen. Принадлежность полученных цепочек проверялась по базам NCBI, Ribosomal database project, Silva rRNA database project. Это базы, связанные с генетикой микроорганизмов.

Макаревич П.Р.: Я хочу добавить, что Дмитрий Витальевич был надолго откомандирован в Университет Тромсе и там этими вопросами занимался, а не просто передавал пробы.

Еще вопросы?

Шошина Е.В.: В продолжение обсуждения методики проведения эксперимента. Как ставился контроль? С фукусом и без фукуса? Для бактерий важна просто площадь поверхности. Ставился ли контроль с какой-то поверхностью, но не с фукусом? Почему в качестве субстрата использовали именно фукусовые водоросли?

Пуговкин Д.В.: Нет, контроль с простой поверхностью, не фукуса, не ставился.

Шошина Е.В.: То есть, контроль – чистая вода.

Пуговкин Д.В.: Да, чистая вода. Был также вариант чистая вода с фукусом. Без нефтепродуктов.

Шошина Е.В.: Следующий вопрос. Вы говорите, что уменьшение содержания нефтепродуктов в контроле удаляется за счет испарения. Каков вклад этого процесса по сравнению с другими вариантами?

Пуговкин Д.В.: За счет испарения уходит довольно много нефтепродуктов.

Шошина Е.В.: 25 процентов.

Пуговкин Д.В.: Для этого и ставился контроль. Но дело в том, что в присутствии эпифитных бактерий с водорослями содержание нефтепродуктов снижается гораздо сильнее. Вообще, при разливах, нефтепродукты удаляются из среды не только за счет испарения. Часть их оседает на грунты, часть уносится водными массами, часть, конечно, испаряется.

Шошина Е.В.: Тогда следовало скоррелировать проценты между опытными вариантами и контролем. И чисто познавательный вопрос. Нефтеоокисляющие бактерии разлагают нефтепродукты, а водоросли поглощают образовавшиеся вещества. Какие?

Пуговкин Д.В.: Здесь имеется ввиду, что углеводородоокисляющие бактерии разрушают длинные цепочки нефтепродуктов до более коротких. В литературе имеются данные, что некоторые бактерии вообще могут расщеплять нефтепродукты до CO₂ и воды.

При проведении эксперимента этот вопрос не учитывался. Исследование процесса расщепления углеводов бактериями до полного их распада требует проведения дополнительного ряда работ.

Шошина Е.В.: Вы утверждаете, что водоросли поглощают углеводороды?

Пуговкин Д.В.: Да, поглощают углеводороды, которые были разрушены бактериями до более простых веществ.

Шошина Е.В.: То есть Вы сторонник гетеротрофного питания водорослей.

Пуговкин Д.В.: Да.

Макаревич П.Р.: Миксотрофия это, наверное. Присуще всем водорослям и микро-, и макро-. Еще вопросы? Я бы хотел практический вопрос задать. Как я понимаю, нефтеокисляющие бактерии могут быть индикаторами нефтяного загрязнения. Это понятно. А вот то, что находится в пелагиали, может отражать уровни содержания нефтепродуктов? Есть ли соотношения между количеством таких бактерий и концентрацией загрязняющих веществ?

Пуговкин Д.В.: Конечно, пелагические бактерии тоже реагируют на нефтяное загрязнение. В работе не исследована данная группа микроорганизмов, но, безусловно, при разливе нефтепродуктов также могут изменяться таксономический состав бактерий и их численность. Если это не краткосрочный разлив. В литературе имеется довольно большое количество материала, связанного с вопросом, который Вы задали, с участием бактериопланктона в деструкции нефтяных углеводов. Подобные работы проводятся группами Коронелли из Московского государственного университета, Ильинского, и многими зарубежными коллегами. Результаты исследований подтверждают влияние нефтяного загрязнения на таксономический состав пелагических форм микроорганизмов, на соотношение доминирующих групп. Существуют методы, которые позволяют проводить мониторинг среды по численности бактерий.

Макаревич П.Р.: Я хотел бы узнать по видовому составу и численности можно ли определить конкретный уровень, степень загрязнения?

Пуговкин Д.В.: По таксономической структуре можно, так как есть бактерии, которые развиваются на раннем этапе нефтяного загрязнения. Есть другие, такие как акинетобактерии, которые развиваются при хроническом загрязнении. Количество бактерий со временем тоже будет увеличиваться. Но есть и лимитирующие факторы.

При сильном загрязнении количество бактерий будет резко увеличиваться. Численность бактерий в морской воде с высоким содержанием нефтепродуктов может достигать десятков миллионов, эти значения считаются достаточно высокими.

Макаревич П.Р.: А что более выгодно и менее трудоемко? Сделать бактериальный анализ, либо отобрать пробы и оценить уровень концентрации нефтепродуктов в воде?

Пуговкин Д.В.: Я считаю, что показательным будет применение этих методов в совокупности.

Макаревич П.Р.: Так как генетические исследования очень дорогостоящие.

Пуговкин Д.В.: Это так, генетический анализ дорогостоящий. Если не изменяет память, получить один сиквенс стоило порядка 300 евро.

Макаревич П.Р.: Ну тогда у меня вопрос снимается. Легче сделать химический анализ и не прибегать к столь дорогостоящим методам. Еще вопросы? Если больше вопросов нет, то мы поблагодарим Дмитрия Витальевича!

Отзыв научного руководителя ИЛЬИНСКОГО Владимира Викторовича. Так как он не присутствует, то мы заслушаем секретаря совета.

Усягина И.С.: Зачитывает *отзыв научного руководителя (текст отзыва прилагается)*.

Макаревич П.Р.: Спасибо. Далее мы должны заслушать заключение организации, где выполнялась диссертационная работа, должны заслушать отзыв ведущей организации и поступившие в диссертационный совет отзывы на диссертацию и автореферат. Слово предоставляется ученому секретарю. Пожалуйста, Ирина Сергеевна.

Усягина И.С.: Зачитывает *заключение организации, где выполнялась работа (текст заключения прилагается)*. Сообщает, что в диссертационный совет поступило заключение Мурманского морского биологического института КНЦ РАН, в котором была оценена выполненная соискателем работа, удостоверено личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации, а также определена степень достоверности проведенных исследований и указана научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Проведенное исследование соответствует области исследования современной океанологии в соответствии с п. 11 «антропогенные воздействия на экосистемы океана». Диссертация соискателя ученой степени кандидата биологических наук была рекомендована к защите по специальности 25.00.28 – «океанология». Заключение принято на заседании Ученого совета ФГБУН ММБИ КНЦ от 13 мая 2016 г., протокол № 03. Принято единогласно.

Усягина И.С.: Далее сообщает, что в диссертационный совет на диссертацию Д.В. Пуговкина поступил *положительный отзыв ведущей организации* и зачитывает этот отзыв *(текст отзыва прилагается)*. В отзыве отмечено, что научная новизна не вызывает сомнений и заключается в доказательстве способности симбиотической ассоциации макрофитов (фукуса пузырчатого) и эпифитных бактерий к деструкции нефтяных

углеводородов. Получены новые данные о таксономической структуре бактериоценозов водорослей и ее изменениях в условиях нефтяного загрязнения. На практике результаты могут быть использованы для оценки роли симбиотической ассоциации водорослей и эпифитных микроорганизмов в биоремедиации морской среды. Знания об изменении таксономической структуры эпифитных бактериальных сообществ, и их роли в процессах разложения нефтепродуктов могут стать основой разработки новых и усовершенствования уже существующих технологий для борьбы с нефтяным загрязнением, а кроме этого позволят увеличить эффективность очистки прибрежных районов северных морей от нефтепродуктов. Замечания и рекомендации:

В разделе исследования, посвященном таксономической структуре эпифитных бактерий отмечено, что наименьшее количество родов отмечалось в губе Зеленецкой, максимальное - в акваториях Кольского залива. За счет чего происходит увеличение родов в загрязненных районах? В работе не обсуждается наличие биопленок микроорганизмов на водорослях. Для выделения биопленок микроорганизмов используемый метод не подходит. Вероятно, обрастание водорослей эпифитными микроорганизмами представляет из себя многослойную биопленку.

Диссертантом в экспериментальной части работы по определению способности к нейтрализации нефтепродуктов ассоциацией макрофитов и бактерий показано, что в присутствии водорослей содержание нефтепродуктов активно снижается в первую неделю, однако в дальнейшем (начиная со второй недели) их содержание в опытных емкостях с макрофитами и без, различается незначительно. Объяснение выявленному феномену в тексте не приводится. Возможно, это объясняется отсутствием смены воды в экспериментальных емкостях. Было бы интересно провести подобные эксперименты в естественных условиях, либо приближенных к ним.

Вывод 3 в тексте диссертации не соответствуют таковому в автореферате. При этом смысл вывода 3 в автореферате и в полном тексте диссертации не изменен. Отличаются лишь формулировки.

В тексте диссертационного исследования присутствуют грамматические ошибки, опечатки, стилистические погрешности и повторения.

Приведенные выше замечания, ничуть не умаляют значимости работы. Диссертационная работа ПУГОВКИНА Д.В. является законченной научно-квалификационной работой, полностью соответствует паспорту специальности 25.00.28 - океанология (биологические науки) и требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор достоин присуждения искомой степени кандидата биологических наук. Отзыв на диссертацию

обсужден и утвержден на заседании кафедры технологии микробиологического синтеза «Санкт-Петербургского государственного технологического института (технический университет)» 2 февраля 2017 г., протокол № 9.

Усыгина И.С.: Теперь, с вашего позволения, я сделаю обзор критических замечаний из других отзывов на автореферат.

На диссертацию и автореферат поступили **шесть положительных отзывов**, из них **два без замечаний** от зав. лабораторий микробиологии ФГБУН «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина» к.б.н. Косолапова и проф. кафедры микробиологии и биохимии Естественно-технического института ФГБОУ ВО «Мурманский государственный технический университет» к.б.н. Богдановой.

Краткий обзор замечаний:

Старший научный сотрудник лаборатории флоры и растительных ресурсов Полярно-альпийского ботанического сада имени Аврорина **к.б.н. Д.А. Давыдов** считает, что автор сузил тему исследования до изучения эпифитов только одного вида водорослей. Однако, в сообществах макрофитов литорали доминируют и другие виды бурых водорослей. Сравнение эпифитов разных видов водорослей дало бы более объективную оценку.

В отзыве ведущего научного сотрудника лаборатории аквакультуры и воспроизводства ценных видов рыб ФГБНУ, ГосНИОРХ **к.б.н. В.А. Богдановой** отмечено, что в автореферате углеводородокисляющие и сапротрофные бактерии рассматриваются как две обособленные группы. Углеводородокисляющие бактерии являются частью сапротрофного сообщества. Следовало бы провести исследование соотношения основных групп бактерий (эвтрофы, мезотрофы, олиготрофы) в бактериоценозе.

Замечание старшего научного сотрудника лаборатории аналитической фитохимии БИН РАН **к.б.н. М.А. Виноградской** и ведущего научного сотрудника лаборатории аналитической фитохимии БИН РАН **к.б.н. Е.Р. Котловой** к трактовке понятия «нефтепродукты», которые включают в себя широкий состав углеводов, различные виды топлива и нефтехимического сырья. В лабораторных экспериментах, в качестве источника углеводов, представлено только дизельное топливо. Действие других углеводов на ассоциацию водоросли/бактерии в работе не обсуждается.

В отзыве старшего научного сотрудника лаборатории водных экосистем ФГБУН Института промышленной экологии Севера КНЦ РАН **к.б.н. Д. Б. Денисова** отмечено, что в автореферате не указан период, в течение которого осуществлялись исследования. Данные, характеризующие эффективность потребления углеводов в загрязненных и чистых участках целесообразно подтверждать статистическими критериями.

Выбор оппонентов обосновывается их высокой научной квалификацией и близостью области их научных интересов направлению исследований соискателя. Выбор ведущей

организации обосновывается научными академическими интересами, а также опытом фундаментальных и прикладных научных исследований в области биотехнологий с использованием микроорганизмов и водорослей.

Макаревич П.Р.: Спасибо, Ирина Сергеевна. По правилам ВАК мы можем сейчас предоставить Дмитрию Витальевичу возможность ответить на вопросы и замечания. Или сделаем это после того, как заслушаем оппонентов.

Пуговкин Д.В.: После оппонентов.

Макаревич П.Р.: Тогда мы заслушаем *оппонентов*. Начнем с Олега Владимировича Степаньяна, так он сегодня здесь присутствует. Прошу Олег Владимирович.

Степаньян О.В.: Уважаемые коллеги, разрешите озвучить отзыв *официального оппонента* на диссертацию Дмитрия Витальевича, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук под названием «Эпифитные бактериоценозы *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря и их роль в деградации нефтяных загрязнений» по специальности 25.00.28. – океанология (**отзыв положительный, текст отзыва прилагается**).

В заключении я хотел бы добавить. Этого нет в отзыве. Мне особенно интересно было читать эту работу, так как многие вещи, которые затронуты в этой работе уже давно обсуждались, но упирались в микробиологический блок. Было понимание, что нужно развивать этот блок. И очень приятно, что появился молодой специалист, который объединил усилия научного руководителя профессора В.В. Ильинского и специалистов лаборатории альгологии под руководством Г.М. Воскобойникова, что позволило получить очень хорошую работу, которая сочетает указанные достоинства. Спасибо.

Макаревич П.Р.: Следующий отзыв оппонента д.б.н. Евдокимовой Галины Андреевны. По правилам ВАК в ее отсутствие зачитывает секретарь. Пожалуйста.

Усягина И.С.: зачитывает отзыв *оппонента* д.б.н. Евдокимовой Г.А. (**отзыв положительный, текст отзыва прилагается**).

Макаревич П.Р.: Спасибо, Ирина Сергеевна. Сейчас слово Дмитрию Витальевичу. Я прошу коротко, лапидарно, по существу.

Пуговкин Д.В.: Прежде всего, скажу, что я полностью согласен с вопросами и замечаниями, касающимися оформления, опечаток и неточностей. Моя оплошность. Учту. В дальнейшем буду более тщательно вычитывать свои произведения.

Я начну с ответа на отзыв *Г.А. Евдокимовой*. Полностью согласен с вопросами, посвященными методикам. Галина Андреевна предлагала поставить вариант со стерильной водой и дизельным топливом. Хотя получение таких объемов воды невозможно. Если это 100–200 миллилитров, то вполне реально, а вот литрами получать уже проблематично, т.к. в ходе эксперимента может произойти заселение воды бактериями, которые к концу

эксперимента разовьются и в чистых емкостях и в опытных. Ультрафильтрация могла бы помочь получить стерильную воду, но в воде присутствуют фильтрующиеся формы бактерий, которые, в свое время, описаны были у Т.И. Широколобовой. И эти бактерии также дадут рост.

По результатам. Действительно, метаболическая активность – широкое понятие. В наших исследованиях она определялась оптическим методом по концентрации формазана.

Выбор штаммов, использованных при идентификации культивируемых форм бактерий, определялся культуральными свойствами, типом и формой колоний, массовостью развития этих колоний на питательных средах.

В качестве референтных использовались штаммы, представленные в организации, где проводился анализ.

По поводу депонирования в базе NCBI. В настоящее время ведется подготовка к депонированию.

Не совсем согласен с замечанием по написанию групп протеобактерий. В представленной работе название групп прописывается полностью. Галина Андреевна предложила использовать буквы греческого алфавита. Действительно, можно их использовать, и в литературе встречается подобное написание. Однако во многих литературных источниках используется и полное написание. В частности, последнее издание наиболее известного определителя бактерий Берджи предлагает именно такой вариант написания. Уточню, что некоторые авторы используют написание через дефис (например, гамма-протеобактерии).

Ответ на отзыв *О.В. Степаньяна*. Некоторые замечания совпали с предыдущим оппонентом. О методе предельных разведений. Это действительно не точный метод и он имеет высокую степень ошибки. Однако он позволяет выделить конкретные физиологические группы микроорганизмов (глядя в микроскоп, мы не можем утверждать, например, углеводородокисляющий или эвтрофный это микроорганизм). При использовании методов микроскопии это невозможно. Именно использование питательных сред позволяет выделить отдельные группы. Поэтому данный метод использовался в работе.

По поводу названия ламинарии сахаристой, в тексте диссертации упоминается ее современное название (*Saccharina latissima*). Мы же использовали название *Laminaria saccharina* так как в публикациях, на которые идут ссылки, данный вид водоросли описывался как *Laminaria saccharina*. Поэтому в дальнейшем использовалось именно это название, чтобы избежать лишней путаницы.

Ответ на замечания *ведущей организации*.

Чем можно объяснить *увеличение родов* в загрязненной акватории? Имеются два объяснения. В первую очередь – издержки метода. При секвенировании мы могли получить последовательности, которые либо испорчены, либо машина их не прочитывает, либо прочитывает не полностью. Такие последовательности отбраковываются. Может быть, среди них были те бактерии, которые не представлены в других сообществах.

Однако я склонен считать, что увеличение родов связано с привнесением их с загрязнителем, так как любые нефтепродукты содержат какое-то количество бактерий.

И было бы интересно посмотреть таксономический состав бактерий, обитающих в нефтепродуктах. Я считаю, что именно с этим фактором связано увеличение количества родов в загрязненных акваториях. Что опять же подтверждает тот факт, что нефтяное загрязнение влияет на бактериальные сообщества не только фукусовых водорослей, но и экосистем в целом.

О биопленках. Биопленки в работе не обсуждаются, однако, в диссертации делается небольшой обзор о том, как происходит заселение субстрата бактериями. Автором отзыва отмечено, что биопленка это многослойное образование. В представленной работе исследуются бактерии, которые не смываются, прикреплены к поверхности водорослей. Поэтому и подбирался метод позволяющий извлечь бактерии с поверхности.

Что касается *постановки эксперимента в природных условиях*, то основной проблемой здесь является вымывание нефтепродуктов из среды. В этом случае, мы не сможем измерить их концентрации. Даже если мы будем добавлять новые порции нефтепродуктов, они будут вымываться водными массами. Это, конечно, окажет влияние на бактериальные сообщества, в них произойдут изменения, но с измерением количества нефтяных углеводородов возникнут проблемы.

В ходе эксперимента происходит уменьшение нефтепродуктов в первые семь дней. Это действительно важный результат, так как именно в первое время после разлива наблюдается наиболее деструктивное влияние бактерий на нефтяные углеводороды. И то, что водоросли и бактерии включаются в данный процесс именно в это время, значительно снижает токсическое воздействие разливов нефти на морские организмы.

Ответ на отзыв *Д.А.Давыдова* о сужении темы до только одного вида водорослей. Безусловно, исследование других водорослей могло бы дать более объективную картину. Однако в работе был использован только фукус пузырчатый. Мы отбирали водоросли не на одной станции, и этот вид доминирует во всех точках, где производились работы. Другие фукусовые водоросли не являются доминантами.

Ответ на отзыв *В.А. Богдановой* о том, что сапротрофные и углеводородокисляющие бактерии рассматриваются как обособленные группы. К сожалению, в автореферате это не указано, но в работе говорится, что

углеводородокисляющие бактерии являются частью сапротрофного и гетеротрофного, в целом, бактериального сообщества. Подобное разделение сделано намеренно, чтобы показать, что увеличиваются как количество сапротрофных бактерий в целом, так и углеводородокисляющих бактерий в частности.

Возможно, было бы интересно показать соотношение мезотрофов, эвтрофов и олиготрофов в сообществе, но здесь могут возникнуть трудности. Во-первых, граница между данными группами размыта. Водоросли представляют субстрат, на котором бактерии растут при довольно высоком содержании органики. Будет наблюдаться смещение бактерий в область эвтрофов. Поэтому в работе рассматривались сапротрофные бактерии как представители сообщества.

Ответ на отзыв *Е. Р. Котловой и М. А. Виноградской*. В ходе работы использовался термин «нефтепродукты», однако в экспериментальных работах используется дизельное топливо, причем летнее дизельное топливо. Я считаю, что термин «нефтепродукты» допустимо использовать, так как, дизельное топливо само является нефтепродуктом. Кроме того нами исследовались эпифитные бактериальные сообщества в акваториях, которые были загрязнены не только дизельным топливом, но и другими нефтепродуктами (мазутом, нефтью, и так далее). Поэтому данный термин правомерно использовать в работе.

На вопросах, связанных с экспериментами, я останавливаться не буду, так как они уже обсуждались в докладе и в дискуссии, которая была после. Я отмечу только еще раз, что эксперимент проводили в августе-сентябре на биостанции ММБИ в губе Зеленецкой. Температура была озвучена, в качестве контроля использовались емкости без водорослей с дизельным топливом, чтобы определить, насколько пелагические формы бактерий разрушают нефтяные углеводороды. Спасибо.

Макаревич П.Р.: Спасибо, Дмитрий Витальевич. Прошу занять место. Следующим пунктом идет дискуссия. Прошу высказывать свое мнение. Для протокола прошу представляться перед тем, как изложить свое мнение и пожелания. Прошу. Михаил Владимирович, начинайте.

Макаров М.В.: Михаил Владимирович Макаров, член совета. Диссертант в лабораторию пришел в 2008 году, 8 лет назад. Вся эта работа происходила у меня на глазах. Пришел он заниматься непосредственно этим направлением. Слушая сегодня доклад, я поймал себя на мысли, что вроде бы, мало сделано. Но за каждым графиком или рисунком стоит немало работы, ведь направление, действительно, практически неисследованное. Диссертант выступал частично пионером в этой области. Нужно было разработать методы, подобрать условия, питательные среды. Первое время ушло на разработку и подготовку методов. Задача стояла выявить, определить, как бактериальные сообщества поведут себя в условиях загрязнения. И в конце мы получили ответы на вопросы. Многие спрашивают, а почему это не сделано, это не сделано, но много работы впереди, я надеюсь, что диссертант не собирается увольняться, или переключаться

на другую работу. Я рассчитываю, что он продолжит работу и на других водорослях, в других акваториях, расширит зону своих интересов. Я удовлетворен работой и диссертацией. Да, есть мелкие недочеты, помарки, которые не снижают качество самой работы и полученные результаты. Я буду голосовать за предоставление диссертанту искомой степени и также остальных призываю. Спасибо.

Макаревич П.Р.: Спасибо, Михаил Владимирович. Кто еще? Могут высказываться и не члены спецсовета. Да, Наталья Викторовна.

Лебедева Н.В.: Лебедева Наталья Викторовна, член совета. Я бы хотела сказать, что мне очень симпатична была сегодняшняя защита. Интересное, новое для института направление. Я буду голосовать «за». Но дальше я хотела бы высказать некоторые замечания, которые у меня возникли. Очень часто у нас сложная работа, у нас у всех условия работы очень сложные. Часто нам приходится разрабатывать методики и искать новое. Мы – ученые и для этого мы работаем. Поэтому лучше опустить, что здесь мы не смогли сделать что-либо, или наоборот, совершили подвиг. Потому что главное – какой результат мы получили. Результат получили неплохой. Но когда мы говорим, что видим какую-то закономерность, мы должны ее подкрепить не только правильно организованным экспериментом, и правильно заложенной в основу методикой, но и правильным статистическим анализом. И когда мы на аргументы о численности говорим, что невозможно посчитать, так как методики дают большую ошибку, но говорим, что здесь больше, а здесь – меньше, или есть такая тенденция, то не противоречим ли мы сами себе? Поэтому я бы хотела призвать нашего сегодняшнего соискателя, и пожелать, конечно же, дальнейших успехов, очень тщательно подходить к этому вопросу. Потому что любой эксперимент, который мы приводим в результатах, кто-то, может быть, захочет повторить. А когда мы не строго относимся к описанию экспериментов, например, тут уже говорилось о температуре, это может создать трудности. Интересно было бы проанализировать бактериальные сообщества. Есть статистический инструментарий, который позволил бы более красиво и наглядно выделить доминирующие группы, хотя они, конечно, и так выделены. Но, может быть, это можно было сделать на статистической основе, чтобы подтвердить, что это не случайно. Я уже сказала, что буду голосовать «за». Работа оставила очень приятное впечатление. Спасибо.

Макаревич П.Р.: Спасибо. Еще кто бы хотел сказать? Да, Елена Васильевна.

Шошина Е.В.: Елена Васильевна Шошина, член совета. Мне работа понравилась. Автор хорошо знает предмет исследования, работа хорошо представлена. Мои замечания касаются сокращений в автореферате, трудно читать. Есть замечания к постановке опытов, контролю, как он ставился. В автореферате, к сожалению, это не полностью отражено. И замечание по численности. Что касается бактерий, когда приводятся цифры семьдесят миллионов и двадцать клеток, или пятьдесят миллионов и две клетки, то возникают вопросы. Для меня нет разницы

пятьдесят или семьдесят миллионов бактериальных клеток. Количество пересчитывается сложным образом, а уж когда еще 2 клетки, это интересно. А так, работа понравилась. Спасибо.

Макаревич Д.В.: Спасибо Елена Васильевна. Да, Олег Владимирович.

Титов О.В.: Титов Олег Владимирович, член совета. Я в первый раз присутствую на защите в качестве члена спецсовета. Можно считать везением, что в первый же раз я столкнулся с оценением столь крепкой научной работы. Больше всего мне импонировало в работе то, что Дмитрий Витальевич освоил столь широкий спектр разнонаправленных в технологическом плане научных методов исследований, от молекулярно-генетических анализов, до классических методов микробиологии. Всегда хорошо, когда человек делает что-то вначале руками, потом анализирует это головой. Поэтому я буду голосовать «за», и всех остальных призываю также. Спасибо.

Макаревич П.Р.: Спасибо Олег Владимирович. Да, Григорий Михайлович.

Воскобойников Г.М.: Воскобойников Григорий Михайлович, член совета. Нужно сказать, что исследовалась ассоциация микроорганизмов и водорослей, и можно только поражаться, насколько все оказалось непросто. Начинаешь понимать, что нас ждет впереди. Ведь на самом деле, поставлено большое количество новых вопросов. Мы изучаем водоросли много лет, начинали с Еленой Васильевной в Баренцевом море много лет назад. Измеряли скорость роста, фотосинтез и прочее. И, честно говоря, мы практически не задумывались над ролью эпифитов, над ролью обрастателей, над взаимосвязью между водорослями, которые не только являются субстратом, но и вносят живую струю в жизнь эпифитных бактерий. И когда сегодня спрашивали, почему не исследовались другие виды, то, несомненно, они должны быть исследованы, и, думаю, что настоящая работа будет толчком к этому. Почему такие температуры? В среде это оптимальный режим для функционирования фукуса пузырчатого. Для большинства водорослей в Баренцевом море оптимальной является такая температура. Есть водоросли тропического происхождения, скажем, *Cladophora*, у которой температурный оптимум, по моему, около 26 градусов. Но это уже другой разговор.

И, конечно, вопросы были справедливые. И почему нет низких температур. Я должен открыть некоторую тайну. Дело в том, что многие ответы на вопросы есть, но они не вошли в диссертацию, так как работа была ограничена некоторыми рамками. Сейчас планируются к выходу статьи, где Дмитрий Витальевич является соавтором, и где показано какое количество нефтепродуктов находится на поверхности водорослей, и какое количество в тканях. Как меняется это соотношение в течение определенного времени. Динамика такая есть, и в принципе, водоросли способны к поглощению нефтепродуктов. Речь идет только о дизельном топливе. Но, что касается механизма, был такой вопрос, то это белое пятно. К сожалению, никто не может дать ответ на этот вопрос. Вместе с тем, с помощью изотопных методов показано, что именно то дизельное топливо, которое было нанесено на водоросли, оказалось внутри. Но Дмитрий Витальевич оказался очень

щепетильным, и некоторые вещи не стал вносить в диссертацию, потому, что мало повторностей, или еще по каким-то причинам. Но я думаю, что это как раз и делает честь диссертанту. И мне очень близко выступление оппонента Олега Владимировича Степаньяна, потому что невольно приходит мысль, что насколько взаимопользным является симбиоз водорослей и микроорганизмов, настолько оказался благодатным приход Дмитрия Витальевича Пуговкина в нашу лабораторию. Я бы даже сказал, произошло взаимообогащение. Но один момент диссертант не затронул в своем докладе и в автореферате. Я должен его отметить. К нам Дмитрий Витальевич пришел не белым листом. У него была за плечами кафедра микробиологии Мурманского государственного технического университета. Нужно отметить, что основы были заложены там. Конечно, развитие работа получила в нашем институте, где тоже эта проблема частично исследовалась. Есть работы Татьяны Ивановны Широколовой. И ее группа очень помогла в работе своими советами и рекомендациями. К тому же, у Татьяны Ивановны, по моему, дипломная работа посвящена углеводородокисляющим бактериям.

Макаревич П.Р.: Да, дипломная. Под руководством Коронелли. Это классика.

Воскобойников Г.М.: Поэтому много мам получилось у диссертации. Работа мне, несомненно, нравится, и я буду голосовать «за». Спасибо.

Макаревич П.Р.: Спасибо, Григорий Михайлович. Еще вопросы? Я тоже скажу пару слов. Заместитель председателя спецсовета Макаревич Павел Робертович. Мне очень понравились и форма доклада и ответы на вопросы, хотя, я, может быть, не специалист. Уже много что сказано. Действительно, микробиология это традиционное направление в научной деятельности Мурманского морского биологического института. Она была и до Дмитрия Витальевича. И уже было сказано, что это не новое направление – нефтеокисляющие бактерии. Но с приходом Дмитрия Витальевича это новый качественный шаг, очень серьезный и очень ощутимый для нашего института. Кооперация с зарубежными коллегами, с Московским университетом, с Мурманскими научными организациями, с Санкт-Петербургом, как раз дает уверенность, что работа сделана не местечково, не на уровне просто понимания этой проблемы, а на уровне, как российской науки, так и зарубежной. Это серьезный и сложный труд, многогранный. Это и постановка методологии, и генетический анализ, где Дмитрий Витальевич проявил полную компетентность. Конечно, как и любая работа, она не лишена замечаний узких специалистов. Но, в целом, эти замечания делают возможным продолжение этой работы, расширение ее, и, как сегодня уже сказал Михаил Владимирович, что диссертант продолжит работать в институте. Я вообще отрицаю уход Дмитрия Витальевича из института и этого направления. Но есть такая тенденция, что когда человек защищает кандидатскую, он успокаивается и пожинает те плоды, которые дает диплом. Я надеюсь,

что мы только в начале пути по этой тематике, и те замечания, и благосклонное к ним отношения делают возможным продолжение этой работы. Это хорошо, что у нас существует, теперь уже, не лаборатория, а группа микробиологии, и они ни в какой мере не конкурируют, а дополняют друг друга. Я думаю, что Дмитрий Витальевич эту группу микробиологов, под руководством Т.И. Широколовой, сможет перевести на генетический уровень, который дает возможности определения систематического списка как бактериопланктона, так и эпифитных бактерий, что важно для понимания экологии и биологии бактериальных сообществ. Поэтому я буду голосовать «за», и думаю, что мы не ошибемся в своем выборе и в том направлении, которое имеет большие перспективы.

Макаревич П.Р.: *Заключительное слово диссертанту.* Следующим этапом пойдет голосование, после него по общему согласию мы можем сделать технический перерыв.

Пуговкин Д.В.: В качестве заключительного слова я хотел бы выразить благодарность людям, которые принимали участие в подготовке работы и доклада. В первую очередь хочется выразить глубокую признательность своему научному руководителю Ильинскому Владимиру Викторовичу и неформальному руководителю Григорию Михайловичу Воскобойникову. Хотелось бы поблагодарить отсутствующих здесь сотрудников кафедры Арктической и морской биологии Арктического университета Норвегии Антона Ляймера и Джона Йенсена, которые предоставили возможность поработать с новыми методами и более детально изучить бактериальное сообщество.

Кроме того, выражаю благодарность за помощь в работе сотрудникам лаборатории альгологии Инне Валерьевне Рыжик, Михаилу Владимировичу Макарову, Марии Петровне Клиндух, не буду всех перечислять.

Отдельно хочется поблагодарить своего первого научного руководителя, отсутствующую здесь Перетрухину Алевтину Трофимовну, раньше заведующую кафедрой микробиологии, сейчас – профессора кафедры микробиологии и биохимии. Она явилась, фактически, научной мамой.

Также благодарю руководство Мурманского морского биологического института – Геннадия Григорьевича Матишова и Павла Робертовича Макаревича. Спасибо большое!

Макаревич П.Р.: Спасибо. Я возвращаюсь к процедурному вопросу. Напоминаю, что если мы переходим к голосованию, то члены спецсовета не могут покидать этот зал! Голосуем, подписываем, урна вскрывается здесь, в зале. Люди, пришедшие на слушания, и которым не интересен сам процесс голосования, могут покинуть зал.

Мы переходим к голосованию. Я предлагаю избрать счетную комиссию в составе председателя – Лебедевой Натальи Викторовны, членов комиссии Кавцевича Николая Николаевича и Дженюка Сергея Львовича. Кто «за»? Прошу голосовать.

Члены совета голосуют, поднимая руку. Принято единогласно.

Макаревич П.Р.: Прошу счетную комиссию приступить к своей работе.

Идет процедура голосования.

Макаревич П.Р.: Коллеги, прошу внимания. Слушаем счетную комиссию, которая зачитывает результаты.

Лебедева Н.В.: Уважаемые члены диссертационного совета! Протокол № 59 счетной комиссии Диссертационного совета Д 002.140.01 от 21 февраля 2017 г. Состав избранной комиссии: Лебедева Н.В. (председатель), Кавцевич Н.Н., Дженюк С.Л. Комиссия избрана для подсчета голосов при тайном голосовании по вопросу о присуждении Пуговкину Дмитрию Витальевичу ученой степени кандидата биологических наук. Состав диссертационного совета утвержден в количестве 21 человека, на срок действия номенклатуры научных специальностей научных работников Приказом Минобрнауки.

Присутствовало на заседании 17 членов совета, в том числе докторов наук по профилю рассматриваемой диссертации – 16, роздано бюллетеней – 17, осталось не розданных – 4, оказалось в урне 17. В результате голосования по вопросу о присуждении ученой степени кандидата биологических наук Пуговкину Дмитрию Витальевичу «за» – 17, «против» – 0, испорченных бюллетеней – нет. Подпись.

Макаревич П.Р.: Спасибо. По протоколу требуется две трети, голосование – единогласно. Теперь нам требуется проголосовать за принятие протокола счетной комиссии. Прошу голосовать.

Члены совета голосуют, поднимая руку. Принято единогласно.

Макаревич П.Р.: Единогласно! Теперь я хочу поздравить Дмитрия Витальевича. Сейчас совет должен остаться для подготовки Заключения. Объявляю 5 минут перерыва.

Технический перерыв.

Идет обсуждение проекта заключения.

Макаревич П.Р.: Последнее мероприятие – голосование за принятие предложенного проекта Заключения. Голосуем!

Члены совета голосуют, поднимая руку.

Заключение диссертационного совета по присуждению Д.В. Пуговкину ученой степени кандидата биологических наук по специальности 25.00.28 «океанология» принято единогласно.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.140.01
НА БАЗЕ МУРМАНСКОГО МОРСКОГО БИОЛОГИЧЕСКОГО
ИНСТИТУТА КОЛЬСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 21.02.2017 № 92

О присуждении **ПУГОВКИНУ Дмитрию Витальевичу** (РФ) ученой степени кандидата биологических наук. Диссертация «**Эпифитные бактериоценозы *Fucus vesiculosus* L. Баренцева моря и их роль в деградации нефтяных загрязнений**» по специальности 25.00.28 – «океанология» принята к защите 16.11.2016 г., протокол № 89, диссертационным советом Д 002.140.01 на базе ФГБУН Мурманского морского биологического института КНЦ РАН, 183010, Мурманск, ул. Владимирская, д. 17, приказ о создании № 105/нк от 11.04.2012, приказы об изменении состава № 1339/нк от 29.10.2015 г.; № 626/нк от 03.06.2016 г.

Соискатель **ПУГОВКИН Дмитрий Витальевич**, 1982 года рождения.

В 2004 г. соискатель окончил ФГОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет» по специальности «биология».

В 2008 г. окончил аспирантуру в ФГОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет» по специальности 03.00.16 «Экология». В 2014 г. прошел промежуточную аттестацию в качестве экстерна в аспирантуре ФГОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет» по направлению подготовки 25.00.28 «океанология».

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2016 г. ФГБУН Мурманским морским биологическим институтом КНЦ РАН.

В период подготовки кандидатской диссертации с 2008 по 2016 гг. соискатель работал в лаборатории альгологии ФГБУН Мурманского морского биологического института КНЦ РАН в должности младшего научного сотрудника.

Диссертация выполнена в лаборатории альгологии ФГБУН Мурманского морского биологического института КНЦ РАН.

Научный руководитель – доктор биологических наук **ИЛЬИНСКИЙ Владимир Викторович**, профессор кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Официальные оппоненты:

ЕВДОКИМОВА Галина Андреевна, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе Института проблем промышленной экологии Севера КНЦ РАН (г. Апатиты);

СТЕПАНЬЯН Олег Владимирович, кандидат биологических наук, зав. отделом изучения экстремальных природных явлений и техногенных катастроф Южного научного центра РАН (г. Ростов-на-Дону) – дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)» в своем *положительном заключении, подписанном* заведующей кафедрой технологии микробиологического синтеза кандидатом технических наук доцентом Т.Б. Лисицкой, профессором кафедры доктором технических наук В. А. Галынкиным, и *утвержденном* проректором по научной работе доктором химических наук, проф. А.В. Гарабаджиу, указала, что научная новизна работы не вызывает сомнений и заключается в доказательстве способности симбиотической ассоциации макрофитов (фукуса пузырчатого) и эпифитных бактерий к деструкции нефтяных углеводородов. Соискателем получены новые данные о таксономической структуре бактериоценозов водорослей и ее изменениях в условиях нефтяного загрязнения. На практике результаты работы могут быть использованы для оценки роли симбиотической ассоциации водорослей и эпифитных микроорганизмов в биоремедиации морской среды.

Соискатель имеет 19 опубликованных работ по теме диссертации, из них 3 работы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 3 в соавторстве. Объем публикаций в рецензируемых научных изданиях составляет 1,4 уч. изд. л., авторский вклад – 0,5 уч. изд. л.

1. *Ильинский В.В., Воскобойников Г.М., Пуговкин Д.В., Комарова Т.И., Адейкина А.А.* Влияние нефтяного загрязнения среды на состав и численность гетеротрофных эпифитных бактерий бурой водоросли *Fucus vesiculosus* // Вестник Южного научного центра РАН. – 2010. – Т. 6, № 2. – С. 98–100.

2. *Воскобойников Г.М., Пуговкин Д.В.* О возможной роли *Fucus vesiculosus* в очистке прибрежных акваторий от нефтяного загрязнения // Вестник МГТУ. – 2012. – Т. 15, В. 4. – С. 716-720.

3. *Пуговкин Д.В., Ляймер А.В., Йенсен Дж.Б.* Эпифитные бактериальные сообщества водорослей *Fucus vesiculosus* в разных по степени загрязнения нефтепродуктами акваториях Баренцева моря // Доклады академии наук. – 2016. – Т. 471, № 3. – С. – С. 371–373.

4. *Воскобойников Г.М., Ильинский В.В., Лопушанская Е.М., Пуговкин Д.В.* О возможной роли морских макрофитов в очистке поверхности воды от нефтяного загрязнения // Нефть и газ арктического шельфа. Материалы международной конференции. – Мурманск, 2008. – С. 63-65.

На диссертацию и автореферат поступили 6 положительных отзывов, из них 2 отзыва без замечаний от зав. лаборатории микробиологии ФГБУН «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина» к.б.н. Косолапова Д.Б., и проф. кафедры микробиологии и биохимии Естественно-технического института ФГБОУ ВО «Мурманский государственный технический университет» к.б.н. Богдановой О.Ю.

Обзор критических замечаний из других отзывов на автореферат.

Старший научный сотрудник лаборатории флоры и растительных ресурсов полярно-альпийского ботанического сада-института им. Н.А. Аврорина КНЦ РАН к.б.н. Давыдова Д.А. считает, что автор сузил тему исследования до изучения только эпифитов одного вида водорослей, несмотря на то, что в сообществах макрофитов литорали доминируют и другие виды бурых водорослей. Сравнение эпифитов разных макрофитов дало бы более объективную оценку.

В отзыве ведущего научного сотрудника лаборатории аквакультуры и воспроизводства ценных видов рыб ФГБНУ ГосНИОРХ к.б.н. Богдановой В.А. отмечено, что в автореферате углеводородокисляющие и сапротрофные бактерии рассматриваются как две обособленные группы. Углеводородокисляющие бактерии являются частью сапротрофного сообщества. Следовало бы провести исследование соотношения основных групп бактерий (эвтрофы, мезотрофы, олиготрофы) в бактериоценозе.

В отзыве старшего научного сотрудника лаборатории аналитической фитохимии БИН РАН к.б.н. Виноградской М. А. и ведущего научного сотрудника лаборатории аналитической фитохимии БИН РАН к.б.н. Котловой Е. Р. указывается на неточность характеристики состава «нефтепродуктов», которые в действительности включают в себя различные углеводороды, виды топлива и нефтехимического сырья. В лабораторных экспериментах в качестве источника углеводородов представлено только дизельное топливо. Действие других углеводородов на ассоциацию водоросли/бактерии в работе не обсуждается.

В отзыве старшего научного сотрудника лаборатории водных экосистем ФГБУН Института промышленной экологии Севера КНЦ РАН к.б.н. Денисова Д. Б. отмечено, что в автореферате не указан период, в течение которого осуществлялись исследования. Данные, характеризующие эффективность потребления углеводородов в загрязненных и чистых участках, целесообразно подтверждать статистическими критериями.

Выбор оппонентов обосновывается их высокой научной квалификацией и близостью области их научных интересов направлению исследований соискателя. Выбор ведущей организации обосновывается научными академическими интересами, а также опытом фундаментальных и прикладных научных исследований в области биотехнологий с использованием микроорганизмов и водорослей.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных
соискателем исследований:**

Впервые на основе молекулярно-генетического анализа подробно описана таксономическая структура бактериоценозов фукусовых водорослей Мурманского побережья Баренцева моря и ее изменения в условиях нефтяного загрязнения. Определены доминирующие культивируемые представители эпифитного бактериального сообщества. Экспериментальными исследованиями и натурными наблюдениями показано влияние нефтяных углеводородов на количественные и качественные характеристики эпифитного бактериального сообщества водорослей. Определена возможная роль симбиотических ассоциаций углеводородокисляющих бактерий и водорослей-макрофитов в минимизации последствий разлива нефтепродуктов в прибрежных акваториях Баренцева моря.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Разработан метод десорбции эпифитных бактерий с поверхности водорослей, основанный на использовании ватных аппликаторов, который позволяет получить достоверные результаты при учете культивируемых и некультивируемых форм бактерий.

Доказано, что в присутствии ассоциации бактерий и фукусовых водорослей нефтяные углеводороды наиболее активно разрушаются в первую неделю, при этом их концентрация снижается на 60 – 70%.

Изложены результаты исследований изменения структуры эпифитных бактериальных сообществ фукуса пузырчатого в условиях загрязнения среды нефтепродуктами.

Показано, что загрязнение водной среды нефтепродуктами вызывает увеличение количества эпифитных микроорганизмов у водорослей *F. vesiculosus* и оказывает влияние на таксономическую структуру бактериальных сообществ. В присутствии нефтяного загрязнения доминантными являются бактерии, относящиеся к типу *Proteobacteria* и классу *Gammaproteobacteria*, среди которых преобладают представители рода *Acinetobacter*.

Раскрыта способность ассоциации эпифитных бактериальных сообществ фукусовых водорослей к утилизации нефтяных углеводородов.

Изучен характер количественного распределения культивируемых бактерий по талломам водорослей, в том числе и в условиях нефтяного загрязнения.

Определены основные представители эпифитного бактериального сообщества *F. vesiculosus*. Доминирующими видами культивируемых эпифитных бактерий являются *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas guinea*, *Ochrobactrum anthropi*, *Rhodococcus fascians*. При молекулярно-генетическом анализе бактериального сообщества загрязненной акватории показано, что доминирующими являлись представители рода *Acinetobacter*.

Проведена модернизация ряда приемов и методов исследований эпифитных бактериальных сообществ.

Результаты работы могут стать основой для разработки новых и усовершенствования существующих способов борьбы с нефтяным загрязнением среды. Полученные знания позволят увеличить эффективность очистки прибрежных акваторий от нефтепродуктов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

Материал получен автором с использованием современных методов, в том числе, молекулярно-генетических. Представленные автором *результаты* диссертации достоверны, проверены на практике и базируются на синтезе собственных *идей* и существующих подходов. Выводы соответствуют поставленной цели и задачам исследования. *Авторские результаты* подтверждены публикациями.

Личный вклад соискателя состоит в том, что:

Соискатель лично осуществлял сбор и обработку материала в период с 2008 по 2016 гг., выбирал и модифицировал методы микробиологических исследований, участвовал в постановке экспериментов, осуществлял обработку и интерпретацию полученных результатов.

На заседании 21.02.2017 диссертационный совет принял решение присудить **ПУГОВКИНУ Дмитрию Витальевичу** ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек из 21, утвержденных Приказами Минобрнауки РФ № 105/нк от 11.04.2012, № 1339/нк от 29.10.2015 г., № 626/нк от 03.06.2016 г. из них 16 докторов наук по специальности 25.00.28 – «океанология», участвовавших в заседании, проголосовал:

«ЗА» – 17, «ПРОТИВ» – 0, недействительных бюллетеней – нет.

Зам. председателя диссертационного совета
д.б.н. проф.

П.Р. Макаревич

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.г.н.

И.С. Усягина

