

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова
Российской академии наук

На правах рукописи

Сотников Иван Владимирович

**Функциональная активность почвенных сапрофагов в
широтном градиенте обилия и таксономического разнообразия**

Специальность: 1.5.15 – «экология» (Биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН
Тиунов Алексей Владимирович

Москва – 2026

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1 Методы изучения функциональной активности почвенных сапрофагов.....	11
1.1.1 Методы изучения трофической активности и роли сапрофагов в деструкции растительных остатков.....	11
1.1.2 Методы оценки биотурбационной активности.....	13
1.1.3. Подходы для выявления связи между обилием беспозвоночных и их экологическими функциями.....	15
1.2. Связь разнообразия с экосистемными функциями почвенных сапрофагов.....	17
1.3. Метабаркодинг как метод анализа биоразнообразия.....	20
1.3.1. Использование метабаркодинга для анализа сообществ почвенной фауны.....	22
1.3.2 Интерпретация результатов метабаркодинга средовой ДНК.....	23
1.3.3 Подходы к выделению ДНК для метабаркодинга почвенных беспозвоночных ..	24
1.3.4 Обработка результатов метабаркодинга	27
1.3.5. Сведения об обилии беспозвоночных в результатах метабаркодинга.....	28
Глава 2. Материалы и методы.....	30
2.1 Места проведения экспериментов	30
2.2 Учёт обилия и метаболизма почвенных беспозвоночных	34
2.3. Измерения скорости деструкции опада и трофической активности	36
2.3.1. Вклад макросапрофагов в деструкцию опада (мешки с опадом, litter bags)	36
2.3.2. Трофическая активность (bait lamina test, BLT)	37
2.4. Методы измерения биотурбационной активности	38
2.4.1. Оценка интенсивности биотурбации с помощью трассирующих частиц.....	38
2.4.2. Анализ изотопного профиля почвы	40
2.5 Метабаркодинг сообществ почвенных беспозвоночных	41
2.5.1 Эксперимент с искусственными сообществами почвенных беспозвоночных.	42
2.5.2 Эксперимент с естественными сообществами почвенных беспозвоночных	45

2.5.3. Разработка методики выделения средовой ДНК почвы.....	47
2.5.4. Оценка разнообразия почвенных беспозвоночных на модельных площадках с помощью метабаркодинга средовой ДНК.....	50
2.6. Анализ зависимости между обилием, разнообразием и функциональной активностью почвенных сапрофагов.....	51
Глава 3. Зависимость функциональной активности сапрофагов от их обилия и метаболизма.....	53
3.1. Вклад в деструкцию опада и трофическая активность.....	53
3.1.1. Результаты.....	53
3.1.2. Обсуждение.....	60
3.2. Связь активности дождевых червей с биотурбацией.....	64
3.2.1 Результаты.....	64
3.2.2. Обсуждение.....	66
3.3. Связь обилия и метаболизма макросапрофагов с распределением стабильных изотопов углерода и азота в почвенном профиле.....	68
3.3.1. Результаты.....	68
3.3.2. Обсуждение.....	70
3.4. Заключение.....	72
Глава 4. Метабаркодинг сообществ почвенных беспозвоночных.....	74
4.1. Влияние методов выделения ДНК и процедур фильтрации на результаты метабаркодинга искусственной смеси почвенных беспозвоночных.....	74
4.1.1. Результаты.....	74
4.1.2. Обсуждение.....	81
4.2. Эксперимент с естественными сообществами почвенных беспозвоночных.....	84
4.2.1. Результаты.....	85
4.2.2. Обсуждение.....	88
4.3. Методика выделения средовой ДНК из почвы для анализа разнообразия и обилия почвенных беспозвоночных.....	89
4.3.1. Результаты.....	90

4.3.2. Обсуждение.....	97
4.4. Оценка разнообразия почвенных беспозвоночных на экспериментальных площадках с помощью метабаркодинга средовой ДНК.....	100
4.4.1. Результаты.....	100
4.4.2. Обсуждение.....	107
4.5. Заключение.....	110
Глава 5. Связь разнообразия и функциональной активности почвенных сапрофагов.....	112
5.1. Результаты	112
5.2. Обсуждение	114
Заключение	117
Выводы	119
Список литературы	120

Введение

Актуальность темы исследования и степень её разработанности. Почвенные беспозвоночные играют ключевую роль в процессах деструкции органического вещества, формирования структуры почвы, регулируют активность микроорганизмов, что определяет функционирование и устойчивость наземных экосистем (Стриганова, 2003; Lavelle et al., 2006). Роль беспозвоночных в экосистемных процессах изучалась как до появления, так и весь период существования почвенной зоологии как науки (Вернадский, 1939; Гиляров, 1939; Докучаев, 1883; Стриганова, 2000; Darwin, 1881). Вклад животного населения почвы в функционирование экосистем определяется характером и интенсивностью выполняемой им деятельности – функциональной активностью. Так, простое перемещение организмов по полостям между почвенными частицами мало влияет на экосистемные процессы. Однако перенос почвенных частиц или прокладывание ходов при питании и перемещении более крупных животных, являются важными процессами, которые приводят к изменению структуры почвы. Под **функциональной активностью** мы понимаем любой процесс, связанный с жизнедеятельностью организма, который приводит к прямому или косвенному изменению скорости или направления происходящих в почве процессов, свойств среды, либо оказывает влияние на другие организмы. Процессы, которые модулируются функциональной активностью животных, являются их **экосистемными функциями**. Так, функции дождевых червей включают участие в разложении органического вещества и формировании почвенной структуры, тогда как скорость потребления растительных остатков, интенсивность образования копролитов, длина прокладываемых ходов или объём перемещаемой почвы являются количественными характеристиками их функциональной активности. Ключевая функция коллембол, питающихся грибным мицелием, состоит в регуляции микробных сообществ, тогда как количественными характеристиками их функциональной активности может быть интенсивность потребления грибов или переноса конидий (и, например, связанное с этим участие в контроле патогенов).

В этой работе мы выделяем в функциональной активности две большие тесно взаимосвязанные группы явлений – трофическую и биотурбационную активность. Такое разделение является в определённой степени условным, однако позволяет разграничить основные механизмы воздействия животных на почвенную среду. **Трофическая активность** связана с потреблением беспозвоночными пищи – растительного опада, микроорганизмов, других беспозвоночных. Экосистемные функции, которые осуществляются в результате данного типа активности, заключаются, прежде всего, в поддержании процессов деструкции

органического вещества, в том числе посредством физического измельчения свежих растительных остатков, за счёт чего они становятся более доступными для микробной деструкции (Frouz, 2018; Swift et al., 1979). Подземные фитофаги за счёт своей трофической активности регулируют биомассу и благополучие растений, а хищники контролируют численность потенциально вредоносных (или полезных) групп животных (Beretta et al., 2022; Johnson and Rasmann, 2015). **Биотурбационная активность** связана с процессами перемещения организмов по почвенному профилю и формирования ими зоогенных структур разного масштаба. Данный тип активности характерен для крупных представителей почвенного населения – дождевых червей, муравьёв, термитов, других насекомых, некоторых многоножек и ракообразных (Стриганова, 2000). Большую роль в биотурбационных процессах и создании отдельных типов микрорельефа могут играть роющие позвоночные (суслики, полёвки, кроты, амфибии и даже птицы), однако они, как правило, не рассматриваются в рамках классической почвенной зоологии. Биотурбационная активность приводит к формированию нор и ходов, увеличению порового пространства и изменению структуры почвы, что связано с увеличением аэрации, инфильтрации воды и изменениями в трофических взаимодействиях почвенных организмов (Erktan et al., 2020; Lavelle and Spain, 2024). Кроме того, биотурбационная активность приводит к перемешиванию почвенных горизонтов, оказывая влияние на формирование почвенного профиля и динамику запасов органического вещества почвы. Во многих случаях разделение разных типов активности невозможно. Например, питание почвенных дождевых червей часто связано с их перемещением в почвенном профиле.

В данном исследовании основное внимание мы сосредоточили на почвенных сапрофагах, которые оказывают прямое и наиболее очевидное влияние на процессы биотурбации и трансформации органического вещества в почве.

К настоящему времени накоплен значительный объем данных об обилии и разнообразии почвенных беспозвоночных во всех биотах планеты. Однако оценки связей между функциональной ролью сапрофагов в разных экосистемах с их обилием и разнообразием остаётся нерешённой задачей. Такие оценки, как правило, основываются на результатах метаанализов или экстраполяции на естественные экосистемы лабораторных оценок количества потребляемого опада или массы пропускаемой через кишечник почвы (Heděnec et al., 2022; van den Hoogen 2020). Получаемые в ходе таких работ результаты часто противоречивы (Peng et al., 2023; Xiao et al., 2020). Скоординированные межрегиональные исследования вклада сапрофагов в экосистемные процессы очень редки (Gongalsky et al., 2004; Wall et al., 2008) и охватывают ограниченный набор функций. Это определяет необходимость проведения комплексных полевых экспериментов,

позволяющих непосредственно сопоставить обилие и разнообразие почвенных сапрофагов с параметрами их функциональной активности в широком ряду экосистем.

Существующий набор полевых методов для измерения функциональной активности почвенных сапрофагов очень ограничен и направлен почти исключительно на оценку их вклада в деструкцию растительных остатков. Вклад сапрофагов в другие экосистемные процессы, в особенности в формирование почвенного профиля, с трудом поддается количественной оценке. Единственным широко применяемым полевым методом оценки биотурбации остаётся подсчёт поверхностных биогенных структур (Wu et al., 2025), который отражает деятельность лишь некоторых групп почвенных инженеров. Таким образом, актуальной задачей становится разработка и тестирование новых методов количественной оценки биотурбации.

Исследование функциональной роли биологического разнообразия было и остается в фокусе экологических исследований конца XX и начала XXI века (Букварева и Алещенко, 2005; Tilman et al., 2019). Классические представления о механизмах влияния биоразнообразия на функционирование экосистем традиционно разрабатывались на примере растительных сообществ, однако ряд работ показывают, что разнообразие других компонентов биоты, в том числе почвенной, может быть не менее значимым (Eisenhauer et al., 2019; Hättenschwiler et al., 2005). Учитывая, что почва представляет собой крупнейший резервуар органического углерода, понимание связи между разнообразием почвенного населения и почвенными процессами приобретает особую актуальность.

Почвенные сообщества характеризуются исключительно высоким таксономическим разнообразием (Anthony et al., 2023; Ghilarov, 1977), что осложняет проведение крупномасштабных экспериментов. Традиционные почвенно-зоологические методы обладают рядом ограничений, связанных как с трудностями извлечения беспозвоночных из почвы, так и с их последующей морфологической идентификацией (André et al., 2002). Современные молекулярно-генетические методы существенно расширяют возможности выявления таксономического разнообразия, и резко снижает трудозатраты при анализе большого числа образцов (Paula, 2021; Taberlet et al., 2012a). Однако данный подход также обладает существенными техническими ограничениями, связанными в первую очередь с эффективностью выделения ДНК, и отсутствием количественного характера данных (Elbrecht and Leese, 2015; Kageyama and Toju, 2022). В связи с этим актуальной задачей является разработка и совершенствование методических подходов к оценке биоразнообразия почвенных беспозвоночных.

Цель работы. Соотнести вклад почвенных сапрофагов в экосистемные процессы с обилием и разнообразием ключевых таксономических групп.

Задачи.

1. В серии модельных биотопов, расположенных в широком климатическом градиенте, установить связь между обилием почвенных сапрофагов с полевыми оценками их трофической активности и вклада в деструкцию растительного опада.
2. Протестировать новые полевые методы оценки биотурбационной активности и установить связь этой активности с обилием почвенных сапрофагов.
3. Протестировать эффективность оценки разнообразия почвенных беспозвоночных с помощью метабаркодинга и оптимизировать методику выделения средовой ДНК.
4. Оценить зависимость вклада сапрофагов в экосистемные процессы от их таксономического разнообразия.

Научная новизна. Впервые в широком климатическом градиенте экспериментально продемонстрирована возможность использования данных об обилии и метаболизме почвенных сапрофагов для количественной оценки их вклада в экосистемные процессы, связанные с деструкцией опада и биотурбацией почвы. Показана связь между интенсивностью биотурбации почвы и активностью дождевых червей. Предложена методика выделения ДНК из почвы, существенно повышающая полноту выявления разнообразия сообществ почвенных беспозвоночных по сравнению с существующими методами. Впервые продемонстрированы значимые корреляции между обилием основных групп почвенных членистоногих и их встречаемостью в серии проб, проанализированных с помощью метабаркодинга средовой ДНК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Современные модели динамики круговорота биогенных элементов, как правило, включают климатические, эдафические параметры и измеренные скорости деструкции опада, но практически не используют данные об обилии и активности почвенной фауны. Полученные в работе значимые связи показывают принципиальную возможность трансляции данных об обилии и метаболизме почвенных беспозвоночных в их вклад в экосистемные процессы. Такой подход может быть использован для построения более точных глобальных моделей динамики биогенных элементов, прежде всего углерода. Разработан и апробирован новый полевой метод оценки биотурбационной активности, который позволяет оценивать вклад почвенных инженеров в вертикальное перемешивание почвы. Разработанная в работе методика анализа состава и обилия почвенной фауны с использованием метабаркодинга средовой ДНК будет востребована при проведении

экологических исследований, а также в программах мониторинга разнообразия почвенного населения.

Методология и методы исследования:

Работа основана на широкомасштабном полевом эксперименте, который позволил выявить коррелятивные зависимости, связывающие обилие почвенных сапрофагов с их экосистемными функциями. Для оценки обилия беспозвоночных были использованы традиционные почвенно-зоологические методы, а для оценки их разнообразия — комбинация традиционных методов морфологической идентификации и современных молекулярно-генетических методов. При обработке данных использованы современные статистические методы, включая непараметрический дискриминантный анализ и линейную регрессию в программной среде R.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав и заключения. Работа изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы, 41 рисунок. Список литературы включает 376 наименований, в том числе 352 на иностранных языках.

Положения, выносимые на защиту.

1. Экспериментально продемонстрирована зависимость вклада почвенных макросапрофагов в ключевые экосистемные процессы (деструкция наземного опада и биотурбация почвы) от их обилия и метаболизма. Учёт зависимости активности беспозвоночных от температуры позволяет значимо увеличить силу связи между обилием беспозвоночных и интенсивностью выполнения ими экосистемных функций.

2. Вертикальное перемещение трассирующих частиц в почвенном профиле может служить легким в применении количественным полевым методом оценки интенсивности биотурбации. Экспериментальная проверка метода в широком ряду экосистем показала статистически значимую связь между интенсивностью биотурбации и активностью (скорректированным на температуру обилием) дождевых червей.

3. Выделение средовой ДНК из больших навесок почвы по разработанной методике позволяет выявить в 2-2,5 раза большее разнообразие беспозвоночных по сравнению с классическими методами экстракции средовой ДНК. Встречаемость таксонов в серии проанализированных метабаркодингом проб средовой ДНК может быть использована для оценки обилия основных групп почвенных беспозвоночных.

Апробация работы. По теме диссертации опубликовано 4 работы в изданиях, входящих в Перечень ВАК. Результаты работы были представлены на XIX Международном коллоквиуме по почвенной зоологии (ЮАР, Кейптаун, 2024), VII и IX конференции молодых учёных

“Почвоведение: Горизонты будущего” (Москва, 2023 и 2025), Конгрессе исследователей симбиотических систем (Москва, 2025), XX Всероссийском совещании по почвенной зоологии и экологии (Екатеринбург, 2026).

Личный вклад соискателя. Планирование исследования осуществлялось совместно автором диссертации и его научным руководителем. Автором выполнен сбор основной части материала, предварительная таксономическая идентификация животных и подготовка образцов, анализ литературных данных, статистическая, биоинформатическая и графическая обработка данных, их интерпретация, подготовка текстов публикаций. Идентификация почвенных беспозвоночных была проведена совместно с Л.Б. Рыбаловым, А.Ю. Короткевич, В.Д. Леоновым, О.Л. Макаровой, М.Г. Кривошеиной, А.В. Танасевичем. Планирование экспериментов для оценки эффективности и разработки методик метабаркодинга средовой ДНК была проведена совместно с Е.С. Гусевым, Н.А. Мартыненко, А.А. Беловым и В.С. Чепцовым.

Благодарности. Данное исследование было бы невозможно без помощи моих коллег и друзей. Выражаю глубокую благодарность научному руководителю д.б.н. А.В. Тиуну за всестороннюю помощь в работе. Благодарю Д. Д. Виноградова, И. Д. Цвелева, К. В. Савельеву, О. Л. Розанову, А. В. Колотей, к.б.н. А. О. Звезда, к.б.н. А. А. Кудрина, а также к.б.н. Ф. А. Пландина, и И. Г. Довгобрда за помощь в проведении полевых работ. Благодарю к.б.н. С. М. Цурикова и К. В. Савельеву за проведение изотопного анализа почвы.

Выражаю благодарность к.б.н. Е.С. Гусеву, к.б.н. Н.А. Мартыненко, к.б.н. В.С. Чепцову, к.б.н. А.А. Белову за помощь в планировании и проведении экспериментов по оценке эффективности метабаркодинга для характеристики разнообразия почвенных беспозвоночных. Благодарю Б.Д. Ефеевину за организацию высокопроизводительного секвенирования. Проведение экспериментов по сопоставлению результатов метабаркодинга с классическими методами исследования было бы невозможно без специалистов, проводивших идентификацию беспозвоночных – к.б.н. Л.Б. Рыбалова (основные таксоны макрофауны), к.б.н. В.Д. Леонова и к.б.н. В.Б. Колесникова (Sarcoptiformes), к.б.н. О.Л. Макаровой (Mesostigmata, Trombidiformes), к.б.н. А.Ю. Короткевич (Collembola), к.б.н. А.В. Танасевича (Araeae), д.б.н. М.Г. Кривошеиной (Diptera).

Я благодарен сотрудникам Полярно-альпийского ботанического сада имени Н. А. Аврорина Е. А. Боровичеву и Е. И. Копеиной за возможность проведения работ на площадках горной тундры; к.б.н. И.В. Палько и Nguyễn Trung Đức (Российско-Вьетнамский тропический центр) за возможность проведения работы на территориях национальных парков Бидуп-Нуйба и Каттхен; к.б.н. Б.И. Шефтелю за предоставление возможности работы на Енисейской экологической станции «Мирное».

Глава 1. Обзор литературы

В данной главе представлен обзор литературы по трём ключевым направлениям работы. В первом разделе описаны наиболее распространённые методы оценки основных компонентов функциональной активности почвенных беспозвоночных — трофической и биотурбационной. Основное внимание уделено подходам, использованным в настоящем исследовании. Обсуждаются существующие методы, применяемые для сопоставления обилия почвенных беспозвоночных с выполняемыми ими экосистемными функциями. Вторая часть главы посвящена краткому обзору современных теорий, описывающих влияние разнообразия почвенных беспозвоночных на поддержание экосистемных функций. В заключительном разделе главы рассматривается применение метабаркодинга для анализа разнообразия и состава сообществ почвенных беспозвоночных. Особое внимание уделено подходу, основанному на использовании ДНК, выделенной из почвы, как наиболее перспективному для изучения педобионтов. Обозначены основные ограничения метода и факторы, приводящие к ошибкам при интерпретации результатов.

1.1 Методы изучения функциональной активности почвенных сапрофагов

1.1.1 Методы изучения трофической активности и роли сапрофагов в деструкции растительных остатков

Трофическая активность почвенных сапрофагов влияет на интенсивность физической и биохимической деструкции растительного опада. Соответственно, скорость разложения растительных остатков в присутствии и в отсутствии сапрофагов служит удобной мерой их трофической активности. Наиболее широко применяемым подходом для такой оценки является метод сетчатых мешков с опадом (litter bags). Для изоляции растительных остатков от беспозвоночных в большинстве работ используют разный размер ячеек, с помощью которого можно избирательно ограничивать доступ к субстрату сапрофагов разного размера или полностью исключать влияние фауны (Frouz et al., 2015b; Kampichler and Bruckner, 2009). Альтернативным способом исключения влияния животных является обработка растительных остатков нафталином (Wall et al., 2008). Это позволяет уравнивать потерю фрагментированного опада из мешков с разным размером ячеек и избежать изменения микроклиматических условий в мешках с сеткой менее 1 мм (Bokhorst and Wardle, 2013; Bradford et al., 2002). Поскольку исключение любой размерной фракции почвенных беспозвоночных не исключает микробную

компоненту, влияние фауны на деструкцию опада учитывают по разнице или отношению деструкции опада в мешках с доступом и без доступа беспозвоночных. Применение сетчатых мешков обеспечивает возможность изучения влияния беспозвоночных на деструкцию опада в широком временном диапазоне — от нескольких недель до многих лет. В качестве оптимизации данного метода Айзенбайс с соавторами в 1999 предложил использовать пластиковые цилиндрические контейнеры объёмом 1,5 см³, закрытые с двух сторон сеткой. Эти миниконтейнеры располагаются в отверстиях пластиковых кольшков (от 12 до 36 контейнеров на кольшек), которые помещают на поверхность почвы или в почвенный профиль (Eisenbeis et al., 1999). Данный метод позволяет использовать значительно большее количество экспериментальных единиц измерения скорости деструкции (Hagemann and Moroni, 2015). К недостаткам этой модификации относятся сложность изготовления и небольшой объём миниконтейнеров. Вследствие последнего растительный опад приходится помещать в них в предварительно фрагментированном виде, что может приводить к искажению оценок скорости его деструкции.

Использование разных типов растительного опада в мешках позволяет не только исследовать процессы разложения растительных остатков разного качества (Sánchez-Galindo et al., 2021), но и выделять активность разных типов сапрофагов. Так, для оценки влияния термитов используют фрагменты древесины (Cheesman et al., 2018; Griffiths et al., 2019).

Наиболее популярной метрикой, отражающей степень разложения растительного материала, является потеря массы, которая по большей части связана с физическим измельчением опада. Альтернативный подход включает измерение эмиссии CO₂, отражающей биохимическое разложение органического вещества. Этот метод часто используется в лабораторных условиях (Lubbers et al., 2020) и при комбинировании с изотопной меткой позволяет рассчитывать долю ассимилированного беспозвоночными растительного углерода (Myer et al., 2021). Однако, ввиду разнообразия источников эмиссии CO₂ и технологической сложности долговременных измерений, этот подход мало применим в полевых экспериментах.

Ускорение физической или биохимической деструкции растительного опада – наиболее подробно исследованное следствие трофической активности почвенных сапрофагов. Исследование иных аспектов питания почвенных животных, т.е. состава пищи, интенсивности ее поглощения и эффективности ассимиляции требует привлечения широкого круга разнообразных методов, от оценки интенсивности дыхания животных до серологической или молекулярной идентификации содержимого кишечника, исследования профиля жирных кислот и др. (Стриганова, 1980; Тиунов, 2014; Jiachen Wang et al., 2025; Ruess and Chamberlain, 2010). Однако

большинство этих методов малоприменимо для количественного мониторинга трофической активности почвенных сапрофагов непосредственно в полевых условиях.

Почти единственным методом, широко применяемым для измерения трофической активности почвенных сапрофагов *in situ*, является метод приманочных пластин - bait lamina test (von Törne, 1990). Он основан на количественной оценке потребления стандартизированной пастообразной пищевой приманки, размещённой в отверстиях тонких пластиковых пластин, экспонируемых в почве. Bait lamina test (BLT) отражает трофическую активность в кратковременный период, поскольку оптимальный срок экспозиции пластин составляет около 10 суток (Gongalsky et al., 2004; Vorobeichik and Bergman, 2020). В силу этого вклад микроорганизмов в разложение приманки в отверстиях BLT минимален, что делает данный метод специфичным для оценки трофической активности макро и мезосапрофагов (Helling et al., 1998). Метод широко применяется в задачах экотоксикологии (André et al., 2009) и ремедиации экосистем (Fateeva and Kudrin, 2026; Ortiz et al., 2022), поскольку позволяет получить быструю оценку активности почвенных сапрофагов.

1.1.2 Методы оценки биотурбационной активности

В отличие от методов оценки трофической активности почвенных сапрофагов, общепринятые полевые методы для изучения их биотурбационной активности практически отсутствуют. Количество поверхностных биогенных структур (копролитов, термитников, муравейников) часто используют в качестве показателя, отражающего активность почвенных средообразователей (инженеров), ключевым компонентом которой, как правило, является биотурбация. Так, глобальный метаанализ показал, что количество формируемых беспозвоночными поверхностных биогенных структур связано с основными химическими и физическими свойствами почвы, биомассой растений и микробным дыханием (Wu et al., 2025). Однако визуальная оценка количества биогенных структур невозможна или трудна во многих типах экосистем. К тому же многие ключевые представители роющих беспозвоночных (почвенные термиты, эндогеиные дождевые черви) почти не оставляют следов на поверхности почвы (van der Meij et al., 2025). Для преодоления этих недостатков были предложены довольно трудоёмкие методики учета биогенных структур непосредственно в толще почвенного профиля (напр. Kretzschmar, 1978). Пирон с соавторами разработали типы биотурбации на основе соотношения биогенных структур разного типа в стенках почвенного профиля (Piron et al., 2012, 2017). Однако такая оценка требует высокого уровня квалификации исследователя. Для точной оценки длины, объёма нор, их связности и пространственного распределения используют подходы с применением компьютерной томографии (Helliwell et al., 2013). Использование таких точных методов позволяет, в частности, получить подробную информацию об объёме

дрилосферы (Саровиез et al., 2021; Cheik et al., 2019; Schrader et al., 2007), которая является «горячей точкой» микробного разнообразия и активности (Hoang et al., 2016). Такие подходы требуют дорогостоящего оборудования и в основном используются в лабораторных условиях (Саровиез et al., 2024), а выделение биогенных структур в естественных почвенных монолитах не всегда возможно. Традиционным, но довольно редко применяемым подходом к оценке биотурбации является прослеживание перемещения частиц, контрастно-отличающихся от почвенной толщи (Darwin, 1881; Jimenez et al., 2020).

Для совокупной оценки инженерной и трофической активности почвенной фауны применяют метод полевых мезокосмов (Frouz et al., 2006). В контейнер с бедной органическим веществом почвой добавляют растительный опад и размещают эту конструкцию в верхнем горизонте почвы. Размер отверстий в контейнере, как и в случае с классическими экспериментами с мешками с опадом, регулирует доступ почвенных беспозвоночных к содержимому мезокосмов. Это позволяет количественно оценить два процесса: вынос органического вещества из контейнера и его перенос почвенной фауной в нижележащие минеральные горизонты. Сопоставление этих показателей даёт возможность рассчитать баланс между деструкцией и стабилизацией органического углерода, опосредованной деятельностью почвенных животных (Frouz et al., 2023). Исследования с подобными микрокосмами редки. В метанализе Frouz et al. (2015b) было найдено всего четыре работы аналогичного дизайна, которые показали, что беспозвоночные способствуют накоплению органического вещества в минеральном слое почвы.

Несмотря на существенную модификацию условий разложения растительных остатков в полевых микрокосмах, полученные результаты согласуются с известными закономерностями, согласно которым почвенные животные способствуют стабилизации органического вещества и увеличению его содержания в почвенном профиле (Frouz, 2018; Li et al., 2026). Индуцированное беспозвоночными увеличение содержания органического вещества связано с двумя основными процессами: (i) с переводом органического вещества в микробную некромассу и запечатыванием её в органоминеральных комплексах в копролитах (Angst et al., 2022; Puche et al., 2022); и (ii) с прямым переносом свежего растительного материала вглубь почвенного профиля (Angst et al., 2024; Chamberlain et al., 2006). Такой прямой перенос, помимо увеличения общего содержания углерода и азота в минеральных горизонтах, должен сопровождаться и изменением изотопного состава органического вещества в почвенном профиле. Увеличение доли тяжёлых (^{13}C и ^{15}N) стабильных изотопов с глубиной по мере снижения концентрации углерода и азота из-за микробного разложения является общей закономерностью (Hobbie and Ouimette, 2009; Krüger et al., 2024; Wynn, 2007). Кроме того, содержание тяжёлых стабильных изотопов в почвенном

профиле увеличивается с увеличением активности микроорганизмов в градиенте температуры (Soldatova et al., 2024; Wang et al., 2018). Перемещение почвенными животными свежего органического вещества из подстилки, с пониженным содержанием ^{13}C и ^{15}N , может влиять на эти зависимости. Моделирование в работе Acton et al. (2013) показало, что физическое перемешивание почвы является важным процессом в формировании распределения изотопов. Однако в качестве фактора, способствующего физическому перемещению органических соединений, авторы использовали только среднегодовое количество осадков; участие беспозвоночных в этом процессе не анализировалось. В работе Jonsson et al. (2025) было показано, что присутствие инвазивных дождевых червей приводило к значимому снижению величины $\delta^{13}\text{C}$ почвы на глубине 5 см в арктических тундровых экосистемах. Однако авторы связывают это скорее с увеличением биомассы корней, чем с прямым влиянием дождевых червей. Прямых сопоставлений обилия почвенных экосистемных инженеров и распределения стабильных изотопов в почвенном профиле не проводилось.

1.1.3. Подходы для выявления связи между обилием беспозвоночных и их экологическими функциями

В настоящее время накоплено значительное количество лабораторных данных об интенсивности питания беспозвоночных (Стриганова, 1980; Стриганова и др., 1987; Стриганова и Тиунов, 1994; Ardestani et al., 2019; Curry and Schmidt, 2007; David and Gillon, 2002; Heděnec et al., 2023; Kamdem et al., 2021; Rota et al., 2022), количестве потребляемой и переносимой беспозвоночными почвы (Bolton and Phillipson, 1976; Taylor and Taylor, 2014), их обилии и биомассе (Potapov et al., 2023; Rutgers et al., 2016; van den Hoogen et al., 2020). Интеграция этих данных позволяет проводить оценки функциональной активности животных, в различных экосистемах (Frouz et al., 2015a; Heděnec et al., 2022; Nyffeler and Birkhofer, 2017; Rutgers et al., 2016). Так, Тейлор с соавторами, используя лабораторные оценки количества потребляемой дождевыми червями почвы, скорости их развития при разных температурах и оценки биомассы, рассчитали интенсивность потребления почвы в 15 - 34 тонн сухой почвы на гектар в год в лесных и луговых экосистемах Швеции (Taylor et al., 2019). Используя аналогичный подход, Фруз с коллегами оценили годовое потребление опада личинками мух *Penthetria holosericea* (Bibionidae) в ольховом лесу — оно составило 137 г сухого опада в год, что соответствует 40% от его ежегодной продукции (Frouz et al., 2015a). Подобные подходы позволили выполнить глобальную оценку, согласно которой максимальная доля опада, потребляемого беспозвоночными, характерна для умеренных и тропических лугов, за которыми следуют умеренные и тропические леса, тогда как наименьшие значения отмечены в бореальных, тундровых и пустынных биомах

(Heděnes et al., 2022). Получаемые таким путём обобщения имеют высокую ценность и составляют основу современных представлений о вкладе почвенных сапрофагов в деструкционные процессы. Однако экстраполяции, основанные на лабораторных оценках трофической и тем более биотурбационной активности, не могут учитывать весь комплекс факторов, оказывающих влияние на активность беспозвоночных в природных условиях, что может приводить к существенному искажению результатов.

Сопоставление показателей обилия животных и их активности, измеренной непосредственно в полевых условиях, может помочь получить более точные оценки вклада сапрофагов в экосистемные процессы, чем экстраполяция лабораторных данных. Как ни странно, подобные работы редки. Большинство исследований, посвящённых оценке роли беспозвоночных в деструкции опада в качестве показателя обилия используют их количество непосредственно в мешках litter bags (Peng et al., 2023; Wall et al., 2008). Однако сапрофагам, играющим значительную роль в процессах деструкции, таким как термиты, норные дождевые черви, диплоподы, имаго и личинки жуков свойственно активное перемещение из-за чего они могут не обнаруживаться в мешках litter bags. Редкие метаанализы, базирующиеся на опубликованных данных об обилии почвенной фауны и интенсивности экосистемных процессов, предполагают, что скорость деструкции опада имеет положительную связь с общим обилием почвенной фауны (Xiao et al., 2020) и с обилием дождевых червей (Huang et al., 2020). Handa et al., (2014) и Torsekar et al., (2024) отмечали более высокие скорости разложения опада в экосистемах с высокой плотностью термитов и многоножек, хотя и не строили прямых зависимостей. Однако другие работы (Castillo-Figueroa and Castillo-Avila, 2025; Peng et al., 2023) показывают, что скорость деструкции растительных остатков имеет слабую связь с обилием почвенной фауны.

Еще более редки исследования, связывающие обилие почвенных сапрофагов с параметрами их инженерной деятельности, хотя она может оказывать глубокое влияние на экосистемные процессы и состояние почвенной биоты (Тиунов, 2007; Jones et al., 1996). В единичных работах показана положительная связь обилия дождевых червей с объёмом нор (Capowiez et al., 2014; Nahmani et al., 2005) и количеством копролитов (Escudero et al., 2023; Suthar, 2011). Таким образом, связь между функциональной активностью и обилием сапрофагов редко исследуется в полевых экспериментах и пока не привела к выявлению четких количественных зависимостей.

Помимо обилия, ключевым параметром, определяющим вклад беспозвоночных в экосистемные процессы, является состав и разнообразие их сообществ, рассмотрению которого посвящен следующий раздел. Однако классические методы почвенной зоологии, основанные на выделении беспозвоночных из почвенных проб и их морфологической идентификации,

чрезвычайно трудоёмки и особенно сложны в применении при работе с богатыми видами и слабоизученными тропическими сообществами. Это обуславливает необходимость разработки и применения современных молекулярных подходов к оценке разнообразия почвенной фауны, которые рассмотрены в разделе 1.3.

1.2. Связь разнообразия с экосистемными функциями почвенных сапрофагов

Почва относится к числу наиболее богатых видами местообитаний. Согласно последним оценкам, около 60 % видов планеты обитают в почве постоянно или в отдельные фазы своего жизненного цикла (Anthony et al., 2023). Столь высокий уровень разнообразия играет ключевую роль в поддержании экосистемных процессов.

Высокий уровень разнообразия может быть обусловлен как увеличением числа функциональных групп, так и ростом видового богатства внутри них. Оба этих аспекта разнообразия почвенных беспозвоночных важны для поддержания экосистемных функций. Пространственная неоднородность почвы, обилие микроместообитаний и сложная структура пищевых сетей позволяют разным видам с перекрывающимися нишами сосуществовать без выраженной конкуренции (Cole et al., 2006). Высокая степень всеядности многих почвенных беспозвоночных также способствует дублированию функций между видами. Для сообществ почвенных беспозвоночных неоднократно была показана высокая степень функциональной избыточности, т.е. принадлежности большого числа видов к одной функциональной группе (Potapov et al., 2019; Setälä et al., 2005). Вследствие этого прямая связь между общим разнообразием почвенных беспозвоночных и интенсивностью экосистемных процессов часто не выявляется (Hättenschwiler et al., 2005; Nielsen et al., 2011). Вместе с тем функциональная избыточность повышает устойчивость экосистем к изменяющимся условиям среды (Briones, 2014; Heemsbergen et al., 2004). Виды, которые являются «функционально избыточными» для данного экосистемного процесса в данный момент времени, могут перестать быть избыточными в изменившихся условиях (Briones, 2014; Hodkinson and Wooley, 1999). Благодаря этому сообщества с высоким видовым богатством способны проявлять большую устойчивость к изменениям условий среды или усилению пресса хищников (Liu et al., 2016). Подобные закономерности хорошо подтверждены для микробных сообществ почв (Barnett and Shade, 2025; Tardy et al., 2014), однако для сообществ почвенных беспозвоночных выявляются не всегда (Liiri et al., 2002).

Следует отметить, что современные исследования с использованием секвенирования гена 18S из образцов средовой ДНК показывают связь между общим разнообразием, разнообразием отдельных групп крупных почвенных организмов и ряда экосистемных функций в городских и естественных экосистемах (Delgado-Baquerizo et al., 2020; Fan et al., 2023; Zeng et al., 2025). Однако, в качестве функций в данных работах используются процессы разложения отдельных соединений, деструкция хитина, гемицеллюлозы, а также почвенное дыхание, которые больше связаны с микробной активностью, чем с деятельностью беспозвоночных, а связь разнообразия беспозвоночных с деструкцией опада или биотурбацией вовсе не рассматривается.

Высокое разнообразие функциональных групп почвенных беспозвоночных определяет разнообразие механизмов их воздействия на почвенные процессы (Jayaramaiah et al., 2026). Одним из таких механизмов является фасилитация – процесс при котором одни организмы преобразуют среду или пищевой субстрат, делая его более доступным для других организмов (Wright et al., 2017). В сообществах почвенных беспозвоночных фасилитация проявляется, например, в физической фрагментации растительного опада, а также через ферментативную обработку пищи в кишечнике животных, что увеличивает удельную поверхность субстрата и его доступность для микробной деструкции и последующего потребления другими детритофагами (Frouz et al., 2003).

Другие механизмы, которые обеспечивают важность разнообразия функциональных групп связаны с разделением ресурсов (нишевой комплементарностью), при котором разные организмы используют пищевые субстраты различного происхождения или качества. Так, в лабораторном эксперименте было показано, что мокрицы и дождевые черви предпочитают различные типы растительного опада (Zimmer et al., 2005). Для сообществ нематод и микроартропод также показано, что нишевая комплементарность играет важную роль в поддержании экосистемных функций (Tu et al., 2026).

Значение функционального разнообразия подтверждается рядом крупномасштабных исследований и метаанализов. Так, на глобальном уровне показано, что интенсивность деструкции растительного опада возрастает с увеличением разнообразия термитов (Zeng et al., 2024). Метаанализ 69 исследований продемонстрировал, что совместное присутствие трёх экологических групп дождевых червей обеспечивает более высокую скорость разложения опада по сравнению с присутствием одной или двух групп, причём наибольший вклад вносили норные формы (Huang et al., 2020). В глобальном эксперименте Wall et al., (2008) была выявлена положительная связь между интенсивностью деструкции опада и таксономическим богатством крупных групп почвенной фауны (отрядов и классов) внутри мешков с опадом. Разнообразие на таких крупных таксономических уровнях часто связано с большим числом именно

функциональных групп (Potapov et al., 2019). Современные исследования подчёркивают особую важность трофического разнообразия для поддержания экосистемных функций. Так, экосистемы с большим числом трофических уровней и большим разнообразием хищников накапливали больше энергии в звене первичных консументов и сапрофагов, что может свидетельствовать о большей эффективности потребления растительных остатков (Barnes et al., 2026).

Несмотря на важность нишевой комплементарности, способствующей высокому почвенному биоразнообразию и поддержанию экосистемных функций, многие процессы могут определяться присутствием относительно небольшого числа ключевых функциональных групп, которые могут быть представлены единичными видами. В этом заключается концепция ключевых видов (*keystone species*). Согласно классическому определению, ключевые виды — это виды, которые оказывают непропорционально сильное по сравнению с их обилием влияние на структуру и функционирование сообществ, а их исчезновение приводит к значительным изменениям экосистемы (Bond, 1994; Paine, 1969). В сообществах почвенных беспозвоночных многие функционально важные виды одновременно являются доминантами по численности или биомассе. Однако определяющим критерием значимости вида в таком случае выступает не его численность, а уникальность выполняемых им функций, что соответствует концепции ключевых процессных видов (*keystone process species*) (Bengtsson, 1998; Folke et al., 1996). Во многих экосистемах наиболее значимыми группами, включающими ключевые для почвенных систем виды, являются дождевые черви и термиты (Holtmeier, 2015; Kooch et al., 2025). Ключевые виды отмечены также среди других групп почвенной макрофауны, включая мокриц (Bredon et al., 2018; Crowther et al., 2013) и многоножек (David and Handa, 2010).

Таким образом, согласно существующим концепциям, влияние разнообразия почвенных беспозвоночных на экосистемные функции в значительной мере определяется присутствием ключевых функциональных групп или видов, действие которых часто носит комплементарный характер. Однако функциональная значимость разнообразия существенно зависит от типа экосистемы, исследуемых экосистемных функций и совокупности экологических факторов, определяющих локальные условия (Ekschmitt and Griffiths, 1998; Zeng et al., 2025). Установление связи между присутствием и разнообразием ключевых функциональных групп, определяющих протекание почвенных процессов, в прямых полевых экспериментах, представляет собой важную задачу для прогнозирования последствий утраты биоразнообразия вследствие антропогенных нарушений и биологических инвазий.

1.3. Метабаркодинг как метод анализа биоразнообразия

Традиционные методы исследования почвенных беспозвоночных сопряжены с рядом методических трудностей. Высокое таксономическое разнообразие и высокая численность организмов обуславливают значительные временные затраты на их определение. Идентификация до низких таксономических рангов требует привлечения специалистов по отдельным узким группам животных, а диагностические признаки часто доступны только для определённых возрастных стадий, каст или полов (Pfingstl and Krisper, 2011). Важные для диагностики морфологические структуры могут быть повреждены как в природе, так и в ходе лабораторной обработки. Пространственная неоднородность сообществ требует сбора большого числа образцов, что кратно увеличивает время анализа (Chen et al., 2026; Rossi et al., 2006) и делает проведение масштабных полевых экспериментов крайне затруднительным, особенно при включении слабо изученных тропических регионов.

С развитием молекулярных технологий такой метод, как ДНК-баркодинг (ДНК-штрихкодирование), позволил получать данные о таксономическом положении организма по коротким нуклеотидным последовательностям ДНК - генам-баркодам (Шеховцов и др., 2019; Hebert et al., 2003). Маркерный участок, используемый для баркодирования, должен обладать рядом строгих ограничений (Воронова и др., 2012). Во-первых, он должен быть одновременно достаточно консервативным, чтобы оставаться неизменным у всех представителей одного вида и, в то же время, достаточно вариабельным, чтобы разные виды, даже близкие, отличались друг от друга. Во-вторых, маркерный ген должен находиться в гомозиготном состоянии и не иметь аллелей, для получения уникальных последовательностей для каждого вида. В-третьих, маркерный ген должен присутствовать у всех организмов. В-четвёртых, баркодирующий регион должен иметь малую длину (до 1000 п.н.) для возможности его массового секвенирования. На основе обширных эмпирических данных для разных крупных групп организмов были подобраны отдельные фрагменты баркодирующих регионов: 18S для одноклеточных эукариот (Zimmermann et al., 2024), 16S для прокариот (Bartoš et al., 2024) ITS для грибов (Seifert, 2009). Для многоклеточных организмов наиболее универсальным оказался фрагмент гена, кодирующий первую субъединицу белка электрон-транспортной цепи митохондрий цитохром оксидазы I – COI (Folmer et al., 1994). Хотя нередко используют и другие маркерные гены – 16S для дождевых червей (Bienert et al., 2012), 18S для всех беспозвоночных и в особенности для нематод (Ahmed et al., 2019; Capra et al., 2016), 12S для позвоночных (Riaz et al., 2011).

Выбранные фрагменты не в полной мере удовлетворяют всем требованиям во всех группах. В частности, частота возникновения мутаций у разных фрагментов генов у разных

таксонов отличается, из-за чего выбор порогового уровня сходства между последовательностями организмов одного вида становится затруднительным (Bonin et al., 2023). Уровень различий в 3% от общего числа нуклеотидов был выбран в качестве среднего порога для разграничения видов и используется для разных генетических маркеров (Edgar, 2018; Zhang and Bu, 2022). Данный уровень различий получил название «*barcoding gap*»; однако он может сильно различаться у разных групп организмов (Phillips et al., 2022; Wiemers and Fiedler, 2007). Если скорость мутаций в выбранном фрагменте слишком велика, то внутривидовые различия будут превышать 3%, что будет приводить к ложноотрицательным результатам идентификации (Hebert et al., 2004; Le Cadre et al., 2024). Если же скорость мутации слишком мала или разделение видов произошло относительно недавно и внутривидовые различия баркодирующего региона составляют менее 3% то одна и та же последовательность может быть ошибочно отнесена к разным видам (Meier et al., 2006; Velzen et al., 2012). В результате корректная аннотация на основе только генетического сходства становится невозможной, что может привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам. Аналогичные механизмы могут влиять на результаты не только идентификации видов, но и надвидовых таксонов (Juan et al., 2015).

Высокая генетическая вариация внутри одной таксономической группы в значительной степени осложняют процесс пополнения баз данных, поскольку требуют секвенирования не только каждого вида организма, но и отдельных популяций этого вида (Fueyo et al., 2024; Mugnai et al., 2023). В настоящее время всё чаще используют разные пороги сходства для разных генов (Bonin et al., 2023) и анализируют большие эмпирические наборы данных для подбора различных порогов сходства в разных группах и для разных таксономических уровней (Pappalardo et al., 2025). Однако выбор отдельных генетических маркеров и уровней сходства по-прежнему остаётся компромиссом между высоким таксономическим разрешением и точностью результатов.

Ключевым ограничением классического ДНК-баркодинга является необходимость предварительного сбора и секвенирования отдельных особей или видов. Появление технологий секвенирования нового поколения (NGS) сняло это ограничение, обеспечив возможность параллельной обработки сотен тысяч последовательностей из одного образца, одновременного анализа десятков проб (Paula, 2021; Shokralla et al., 2012) и переход от баркодинга единичных особей и видов к метабаркодингу – анализу смешанных образцов ДНК разных видов или ДНК, выделенной напрямую из любого субстрата или среды обитания – воды, почвы, воздуха, экскрементов или содержимого кишечника (средовая ДНК). Метабаркодинг средовой ДНК активно применяется в крупных программах мониторинга биоразнообразия (Orgiazzi et al., 2022;

Stat et al., 2017; Tournayre et al., 2025) и фундаментальных экологических работах (Cordier et al., 2022; Ferrín et al., 2024). Однако такое увеличение эффективности получения данных неизбежно связано с другими методическими ограничениями. Таксономическое покрытие при метабаркодинге определяется широким спектром технических параметров, включая выбор маркерных генов, условия подготовки библиотек и биоинформатическую обработку данных. Наиболее распространённым методом подготовки библиотек является классическая полимеразно-цепная реакция (ПЦР). Ключевым параметром ПЦР является температура отжига праймеров, от которой зависит эффективность и специфичность увеличения количества копий целевого фрагмента. В общем случае повышение температуры отжига увеличивает строгость гибридизации: праймеры связываются исключительно с полностью комплементарными участками матрицы, что снижает вероятность неспецифического связывания. Это, однако, может приводить к уменьшению эффективности выявления разнообразия за счёт потери вариантов с единичными заменами (Ishii and Fukui, 2001). Напротив, снижение температуры отжига повышает вероятность связывания праймеров с не полностью комплементарными участками, что увеличивает риск образования неспецифических продуктов амплификации, но при этом расширяет таксономический охват выявляемого разнообразия. Вместе с тем литературные данные свидетельствуют о том, что указанная закономерность не является универсальной: в некоторых случаях повышение температуры отжига может парадоксальным образом способствовать появлению неспецифических ампликонов (Rychlik et al., 1990), тогда как её снижение, напротив, обеспечивает более точную видовую идентификацию (Aylagas et al., 2016). Таким образом, оптимизация температуры отжига представляет собой важный этап при разработке протокола метабаркодинга, требующий эмпирического подбора для каждой комбинации праймеров и целевой таксономической группы.

1.3.1. Использование метабаркодинга для анализа сообществ почвенной фауны

В применении метабаркодинга к анализу разнообразия почвенных беспозвоночных можно выделить два подхода. Первый основан на предварительной экстракции беспозвоночных традиционными почвенно-зоологическими методами и выделении ДНК из смеси животных с дальнейшим высокопроизводительным секвенированием (Сотников и др., 2023; Contos et al., 2023). Использование такого подхода позволяет получить чистую биомассу беспозвоночных, что значительно облегчает выделение ДНК. Однако оно осложнено комплексом хорошо известных недостатков традиционных методов, прежде всего невысокой и варьирующей в разных условиях эффективностью экстракции животных из почвы (André et al., 2002). Другой подход подразумевает прямое выделение нуклеиновых кислот из почвы, что снимает ограничения, связанные с предварительной изоляцией беспозвоночных (Brunetti et al., 2024; Sapkota et al., 2025), однако имеет ряд методических сложностей, которые рассмотрены в следующих разделах.

1.3.2 Интерпретация результатов метабаркодинга средовой ДНК

Средовая ДНК представлена в двух формах: внутриклеточная ДНК, находящаяся внутри клеток живых организмов, и внеклеточная ДНК, которая либо адсорбирована на поверхности твердых частиц, либо остаётся в растворённом состоянии (Power et al., 2023). Адсорбированная на поверхности почвенных частиц ДНК стабильна и может сохраняться в течение длительного времени (Levy-Booth et al., 2007). Это, во-первых, позволяет получать информацию о разнообразии крупных организмов, которые отсутствуют в собранных образцах в момент взятия проб. Во-вторых, это даёт возможность получить «снимок» разнообразия за довольно длительный период времени. Это даёт преимущество обнаружения неактивных в период проведения работы животных. Однако при интерпретации результатов следует соблюдать осторожность, так как присутствие выявленных видов может объясняться только наличием их ДНК, в то время как сам организм уже отсутствует или не принадлежит к изучаемой системе (Lee et al., 2022; Trimbos et al., 2021). Так, чешуйки с крыльев могут объяснять выявление чешуекрылых насекомых в образах средовой ДНК почвы и пыли (Madden et al., 2016; Oliverio et al., 2018). Время сохранения, а затем и детекции ДНК в почве зависит от множества условий, включая количество ДНК, Г:Ц состав, температуру, влажность и физико-химические свойства почвы (Levy-Booth et al., 2007; Sirois and Buckley, 2019). Лабораторные эксперименты показывают, что более 90% внеклеточной ДНК, добавленной в почву, потребляется микроорганизмами в первые 7-30 дней (Morrisey et al., 2015; Sirois and Buckley, 2019). В естественных экосистемах внеклеточная средовая ДНК часто вводится в среду вместе с остатками клеток, которые могут способствовать её сорбции на поверхности почвенных минералов (Pietramellara et al., 2007) и обеспечивать большую устойчивость к микробному разложению. При инкубировании почвы с естественной средовой ДНК в постоянных условиях, сигнал отдельных видов животных сохранялся в течение года (Guthrie et al., 2024). Однако уже после 28 дней хранения в составе средовой ДНК происходят значительные изменения (Frøsløv et al., 2023). В отличие от контролируемых лабораторных условий, естественные экосистемы характеризуются сезонной и суточной динамикой абиотических факторов, а также сложной сетью биотических взаимодействий, что в совокупности влияет на высвобождение средовой ДНК и её сохранность в почве. Вследствие этого реальная продолжительность циркуляции ДНК в природных сообществах может существенно отличаться от оценок, полученных в лабораторных экспериментах. Так, в работе Kirse et al. (2021) при отслеживании сезонной динамики разнообразия насекомых по почвенной ДНК был зафиксирован выраженный летний пик разнообразия двукрылых, однако в остальные сезоны уровень выявляемого разнообразия оставался практически неизменным, что может быть связано с остаточной ДНК значительной части видов. Сходные эффекты, но в ином методологическом контексте, продемонстрированы в

работах на территории зоопарков. Благодаря документированной истории заселения вольеров существует возможность точно установить время присутствия и изъятия конкретных видов животных. Анализ почвенных образцов, взятых после переселения животных, показал, что их ДНК может детектироваться в течение двух месяцев (Andersen et al., 2012). Таким образом, «реликтовая ДНК» неизбежно включается в пул амплифицируемых молекул при проведении метабаркодинга, и степень её влияния на конечные результаты определяется совокупностью факторов, включая численность целевых таксонов и физико-химические свойства почвы. Для минимизации этого эффекта предложены два основных подхода. Первый основан на анализе средовой РНК, которая, в отличие от ДНК, характеризуется низкой стабильностью и быстро деградирует в окружающей среде, что позволяет оценивать исключительно метаболически активную часть сообщества (Sapkota et al., 2026). Второй подход предполагает предварительную обработку образцов пропидий-моноазидом (РМА), который избирательно связывается с ДНК повреждённых и мёртвых клеток, блокируя её последующую амплификацию (Carini et al., 2016; Deng et al., 2024). Теоретически, реликтовая ДНК создаёт риск завышения оценок актуального разнообразия, хотя это не всегда важно при исследовании очень консервативных почвенных сообществ. При метабаркодинге сообществ почвенных беспозвоночных именно внеклеточная фракция ДНК является важным источником информации, и повышение репрезентативности её выделения является серьезной методической задачей.

1.3.3 Подходы к выделению ДНК для метабаркодинга почвенных беспозвоночных

Выделение ДНК из любых субстратов включает этап перевода ДНК из внутриклеточного или сорбированного состояния в растворённую свободную форму и её очистку от остатков клеток, белков и других ингибиторов, которые могут препятствовать дальнейшим этапам анализа. Почва является одним из наиболее сложных субстратов для выделения ДНК, поскольку содержит высокую концентрацию соединений (например, гуминовых кислот), которые ингибируют активность полимераз, используемых в ПЦР при подготовке библиотек для секвенирования. Существует широкий спектр коммерческих наборов для выделения ДНК из почвы, включающих реагенты для удаления гуминовых веществ. Эти наборы первоначально разрабатывались для исследования микробных сообществ, и рекомендуемая масса обрабатываемой почвы обычно составляет 0,2–1,5 г. В таких объемах почвы количество средовой ДНК, доступной для анализа, различается в случае крупных и мелких организмов. Обилие почвенной фауны обратно пропорционально размеру их тела (Гиляров, 1944; Antunes et al., 2023; White et al., 2007). Микробные сообщества могут достигать плотности до 10^8 – 10^{10} клеток на грамм почвы (Portillo et al., 2013; Zhang et al., 2017) и их жизнедеятельность сосредоточена в пределах микрометровых объемов. Вследствие этого, при обработке стандартных почвенных

навесок внутриклеточная и внеклеточная ДНК экстрагируются совместно, что обеспечивает достаточное количество генетического материала для репрезентативной оценки микробного разнообразия (Dopheide et al., 2019; Kageyama and Toju, 2022). Беспозвоночные распределены в почвенном пространстве с гораздо меньшей плотностью; их численность на несколько порядков ниже, чем у микроорганизмов. Как следствие, вероятность попадания хотя бы одной особи в стандартную аликвоту почвы может быть крайне мала. В связи с этим ДНК животных, детектируемая в таких образцах, имеет преимущественно внеклеточное происхождение — это фрагментированные и деградированные молекулы, оставшиеся от погибших организмов или их прижизненных выделений. Её количество, по-видимому, недостаточно для достоверной оценки таксономического разнообразия почвенной фауны. Увеличение объёма анализируемой пробы не только повышает вероятность включения в анализ самих организмов, но и увеличивает количество внеклеточной ДНК, вводимой в анализ и, следовательно, позволяет выявить значительно более высокое таксономическое богатство (Dopheide et al., 2019; Hermans et al., 2018; Sapkota et al., 2025). Единственный доступный коммерческий набор, оптимизированный для крупных почвенных образцов (PowerMax Soil DNA Isolation Kit), ограничен 8–10 граммами почвы и имеет очень высокую стоимость. Для преодоления данного ограничения были разработаны альтернативные подходы для экстракции ДНК из крупных почвенных образцов. Во многих исследованиях использовались протоколы, включающие этап предварительной обработки образца почвы слабощелочными буферными растворами ($\text{pH} = 8$), которые десорбируют внеклеточную ДНК с частиц почвы (Taberlet et al., 2012b; Zinger et al., 2016). Небольшие аликвоты (0,7–1,5 мл) надосадочной жидкости, обогащенной десорбированной ДНК, впоследствии используются в качестве исходного материала для очистки ДНК с помощью стандартных коммерческих наборов. Использование 0,12 М фосфатно-солевого буфера (Taberlet et al., 2012b) широко применялось для десорбции внеклеточной ДНК в исследованиях сообществ почвенных беспозвоночных (Guerrieri et al., 2023; Rosero et al., 2021; Rota et al., 2020; Zinger et al., 2016).

Возможность и механизмы сорбции внеклеточной ДНК на поверхности почвенных частиц в значительной степени определяются кислотностью среды. Изоэлектрическая точка большинства глинистых минералов лежит в диапазоне pH 1,8–3,6, а у ДНК около 5 (Liu et al., 2023). Это означает, что при повышении pH от кислых значений к нейтральным ДНК сохраняет положительный заряд до $\text{pH} \sim 5$, тогда как поверхность минералов уже становится отрицательной. Это создаёт условия для прямого электростатического притяжения (Cai et al., 2006). Другой механизм, который способствует сорбции ДНК в кислой среде — лигандный обмен между фосфатными группами сахара-фосфатного остова молекулы ДНК и амфотерными

гидроксильными группами на краевых поверхностях слоистых силикатов (Kraevsky et al., 2023; Yu et al., 2013). Данная связь значительно сильнее ионной и может сохраняться даже в слабощелочных и нейтральных условиях (Liu et al., 2023). В щелочной среде отрицательно заряженные поверхности как ДНК, так и минеральных частиц отталкиваются, и связывание становится возможным только в присутствии поливалентных катионов металлов, которые выступают в роли ионных мостиков (Cai et al., 2006; Sheng et al., 2019).

Действие слабощелочного фосфатного буфера направлено на перевод ДНК в растворённую форму, а также на конкурентное замещение фосфатных групп ДНК на поверхности минеральных частиц фосфатными группами самого буфера. Некоторые авторы дополнительно использовали агенты, лизирующие клеточные мембраны, для включения в анализ внутриклеточной ДНК (Kageyama and Toju, 2022; Young and Hebert, 2022). Хотя такой подход позволил обнаружить примерно в 1,2 раза меньше эукариотических ридов, чем коммерческий набор Power Max (Zinger et al., 2016), он обеспечивал более репрезентативные оценки альфа- и бета-разнообразия нематод по сравнению с классическими наборами для экстракции ДНК из стандартных навесок почвы (Kageyama and Toju, 2022). Масштабируемость этого подхода позволяет обрабатывать навески почвы, которые на несколько порядков превышают навески классических наборов для выделения ДНК. Например, в работе (Jänsch et al., 2025) использовали 1700 граммов почвы. Значительная модификация этого подхода была реализована Lopes et al. (2021), которые предложили фильтровать значительный объём надосадочной жидкости с растворенной ДНК через нитрат-целлюлозные фильтры, и затем использовать фильтры для экстракции ДНК. Подходы с использованием фильтрации используются при исследованиях средней ДНК воды для концентрации клеток и мелких организмов (Power et al., 2023). Кроме того, сама нитрат-целлюлоза обладает сорбционной способностью к молекулам ДНК (Baker, 1977; Hudson, 1971). Фильтрация надосадочной жидкости была использована Лопесом для анализа сообществ эукариот подстилки и никогда не применялась для почвы и не верифицировалась классическими методами.

Проблема выбора оптимального набора для выделения ДНК актуальна не только для почвенных образцов, но и при работе со смесями животных, извлечённых из почвы. Коммерческие наборы, предназначенные для различных типов биологического материала (кровь, ткани животных, растительные ткани), различаются по составу лизирующих реагентов и протоколам очистки лизатов. В случае смесей беспозвоночных, выделенных из почвы, образец, помимо животных, может содержать минеральные частицы и органические соединения, в частности гуминовые кислоты, которые могут ингибировать последующие реакции. В связи с этим может потребоваться использование реагентов для удаления гуминовых веществ, которые

входят в состав специализированных почвенных наборов. В практике метабаркодинга смесей почвенных беспозвоночных применяются как наборы для выделения ДНК из тканей (Сотников и др., 2023; Beng et al., 2016), так и для выделения ДНК из почвы (Basset et al., 2022; Oliverio et al., 2018). В ряде случаев используются упрощённые протоколы, ограничивающиеся лизисом клеток и тканей без последующей очистки (Contos et al., 2023). Такие подходы позволяют сохранять изучаемые организмы неразрушенными и являются экономически более доступными.

1.3.4 Обработка результатов метабаркодинга

Метабаркодинг неизбежно сопровождается накоплением значительного числа ошибок и погрешностей, поэтому результаты секвенирования требуют тщательной обработки. Наличие остаточной ДНК организмов, избыточная вариация генов баркодов, ошибки ПЦР, секвенирования и баз данных нуклеотидных последовательностей могут приводить к ложному выявлению отдельных таксонов. Чтобы снизить количество ложноположительных результатов, данные метабаркодинга необходимо проводить через серию определённых процедур. Общеизвестно, что референтные базы данных остаются неполными, и это ограничение особенно значимо для таксонов, морфологическая идентификация которых затруднена (Kjærandsen, 2022; Kvist, 2013; Mioduchowska et al., 2018). Кроме того, разные базы данных отличаются по качеству и объёму. Так, база данных NCBI GenBank включает наибольшее количество аннотированных нуклеотидных последовательностей. Однако эта база включает значительное число ошибочных аннотаций (Meiklejohn et al., 2019; Mioduchowska et al., 2018). В отличие от неё, база данных BOLD, созданная специально для целей ДНК-баркодинга, отличается более строгим курированием, но уступает NCBI по объёму (Meiklejohn et al., 2019). Для контроля качества и полноты баз данных в ряде случаев используют либо собственные наборы последовательностей (Macheriotou et al., 2019), либо комбинируют данные из нескольких источников (Kirse et al., 2021). Такие подходы позволяют снизить количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Другим подходом, направленным на минимизацию ошибок, является удаление последовательностей с низким числом ридов (числом молекул ДНК, зафиксированных в ходе высокопроизводительного секвенирования). Низкое число ридов может быть обусловлено не фактическим присутствием организма в анализируемом образце, а случайным попаданием ДНК на этапах хранения или транспортировки. Наиболее серьёзную угрозу корректной интерпретации данных представляет кросс-контаминация между образцами, возникающая в ходе лабораторных процедур выделения ДНК и приготовления библиотек. В практике метабаркодинга широко распространено удаление последовательностей, представленных одним ридом (синглтоны) или десятью ридами. В работах, связанных с почвенными беспозвоночными, использовали как

абсолютные значения в 2 (McGee et al., 2020) или 3 (Oliverio et al., 2018) ридов, так и относительные величины в 1%, 0,5% или 0,005% от общего числа ридов (Arribas et al., 2021; Contos et al., 2023; Young and Hebert, 2022). Однако для надёжного контроля контаминации предпочтительным является порог, основанный на количестве ридов, выявленных в отрицательных контрольных образцах (не содержащих исходного материала) (Drake et al., 2022; McKnight et al., 2019).

Несмотря на применение описанных выше процедур в результатах метабаркодинга могут оставаться ложноположительные результаты. В некоторых случаях, они могут быть представлены организмами, которые не характерны для почвенной среды. Так, в результатах метабаркодинга средовой ДНК почвы отмечали присутствие Cnidaria и Porifera (Young and Hebert, 2022), Thecostraca, Cephalopoda (Lazić et al., 2025). Однако не исключены и случаи присутствия в результатах и почвенных видов, которые не характерны для исследованного региона. Причины появления подобных артефактов могут быть связаны с лабораторными контаминациями, ошибками ПЦР, секвенирования или наличием ядерных митохондриальных сегментов ДНК (NUMTs) в ядерном геноме (Hebert et al., 2023). Новейшие исследования показывают, что ДНК, переносимая в форме аэрозолей и тонких взвешенных частиц, также может детектироваться современными методами (Clare et al., 2022; Tournayre et al., 2025). Удаление подобных артефактов является важным этапом для получения надёжных данных.

1.3.5. Сведения об обилии беспозвоночных в результатах метабаркодинга

Одним из основных ограничений метабаркодинга является отсутствие надёжных данных об обилии или биомассе выявляемых таксонов (Sickel et al., 2023). Число ридов, получаемое в ходе высокопроизводительного секвенирования, нередко интерпретируется как количественная мера обилия. Однако на конечное число ридов влияет ряд факторов, включая вариабельность числа копий маркерного гена, количество клеток в организме (Jurburg et al., 2021), различная эффективность экстракции ДНК и селективность отжига праймеров к разным таксонам (Polz and Cavanaugh, 1998; Shaffer et al., 2025). Вследствие этого выявляемое число ридов не соответствует исходному количеству ДНК в образце, что ограничивает возможность прямых количественных оценок. Метаанализ исследований с анализом сообществ известного видового состава показал слабую связь между внесённой биомассой и количественными оценками на основе числа ридов (Lamb et al., 2019). Вместе с тем, в ряде работ с использованием различных поправочных процедур удавалось установить сильную корреляцию между относительным числом ридов и исходным обилием для отдельных групп, например, для коллембол (Saitoh et al., 2016), биомассой нематод (Schenk et al., 2019) и количеством ДНК отдельных таксонов беспозвоночных (Krehenwinkel et al., 2017). В случае почвенной средовой ДНК применение числа ридов для

оценки обилия многоклеточных организмов дополнительно осложняется гетерогенностью их пространственного распределения и различной вероятностью попадания ДНК разных таксонов в анализируемую пробу (Jurburg et al., 2021). Из-за этого данная метрика становится крайне ненадёжной. Например, в исследовании (Sapkota et al., 2025) из всего разнообразия почвенной фауны количество ридов коррелировало с обилием только для пяти видов коллембол. В работе (Jänsch et al., 2025) не было получено надёжных корреляций между относительным числом ридов и биомассой или обилием дождевых червей.

Избежать таких ошибок позволит переход к данным о встречаемости таксонов (присутствие/отсутствие) в образце. Для таких данных в качестве количественной метрики выступает частота встречаемости таксона в серии проанализированных образцов (Deagle et al., 2019; Fraga Dornellas et al., 2025). Этот подход основан на предположении, что обильные таксоны будут выделять в окружающую среду больше ДНК, которая, следовательно, с большей вероятностью будет обнаружена. Более высокая плотность беспозвоночных на единицу объема почвы приводит к большему количеству прижизненных выделений (например, экскрементов, слизи и экзувиев). Эксперименты показали, что эффективность обнаружения ногохвостки *Allonychiurus kimi* зависит от количества особей, содержащихся в мезокосмах (Lee et al., 2022). Другим фактором, определяющим вероятность обнаружения видов, является скорость продукции ДНК, которая определяется образом жизни, морфологией и активностью животных в почве. Дождевые черви и энхитреиды активно перемещаются в почве и выделяют значительное количество слизи. Следовательно, их ДНК обнаруживается в результатах метабаркодинга средовой ДНК почвы в большом количестве, в отличие от ДНК микроартропод (Kirse et al., 2021). Показатель встречаемости, как правило, используют при анализе содержимого кишечника (Deagle et al., 2019; Zuev et al., 2020). Насколько нам известно, для количественной характеристики обилия комплекса почвенной фауны сходный подход использовался пока только в двух работах (Basset et al., 2022; Fraga Dornellas et al., 2025), которые анализировали ДНК, выделенную из смесей беспозвоночных. Нам не известны работы, в которых метрика частоты встречаемости выступала в качестве показателя обилия животных в исследованиях средовой ДНК почвы. Это, вероятно, связано с необходимостью анализа большого числа образцов с исследуемых участков, что технически или финансово затруднительно для многих исследовательских проектов.

Глава 2. Материалы и методы

В данной главе приведено описание модельных биотопов, охарактеризованы методы сбора и обработки материала, использованные для оценки обилия, таксономического разнообразия и функциональной активности почвенных беспозвоночных. Отдельный блок главы посвящён экспериментам по оценке эффективности метабаркодинга для характеристики разнообразия почвенных беспозвоночных, а также разработке и оптимизации методов выделения ДНК из почвенных образцов и выделенных из почвы беспозвоночных.

2.1 Места проведения экспериментов

Исследование провели в пяти типах экосистем, охватывающих широкий климатический градиент и четыре биома: низинные и горные тропические леса южного Вьетнама, лес умеренной зоны, среднюю тайгу и горную тундру в России. В каждой экосистеме было выбрано два биотопа, различающихся по обилию и составу почвенных беспозвоночных (рисунок 2.1А). В каждом биотопе заложено по пять экспериментальных участков площадью 5×5 метров (всего 50 участков).

Выбор экосистем определялся необходимостью создания градиента обилия, разнообразия и присутствия ключевых групп почвенных беспозвоночных. Часть выбранных экосистем была расположена в горах (горная тундра Хибин и горные леса Вьетнама). В связи с этим условия в них заметно отличались от типичных для природной зоны, в которой они располагались (рисунок 2.1Б).

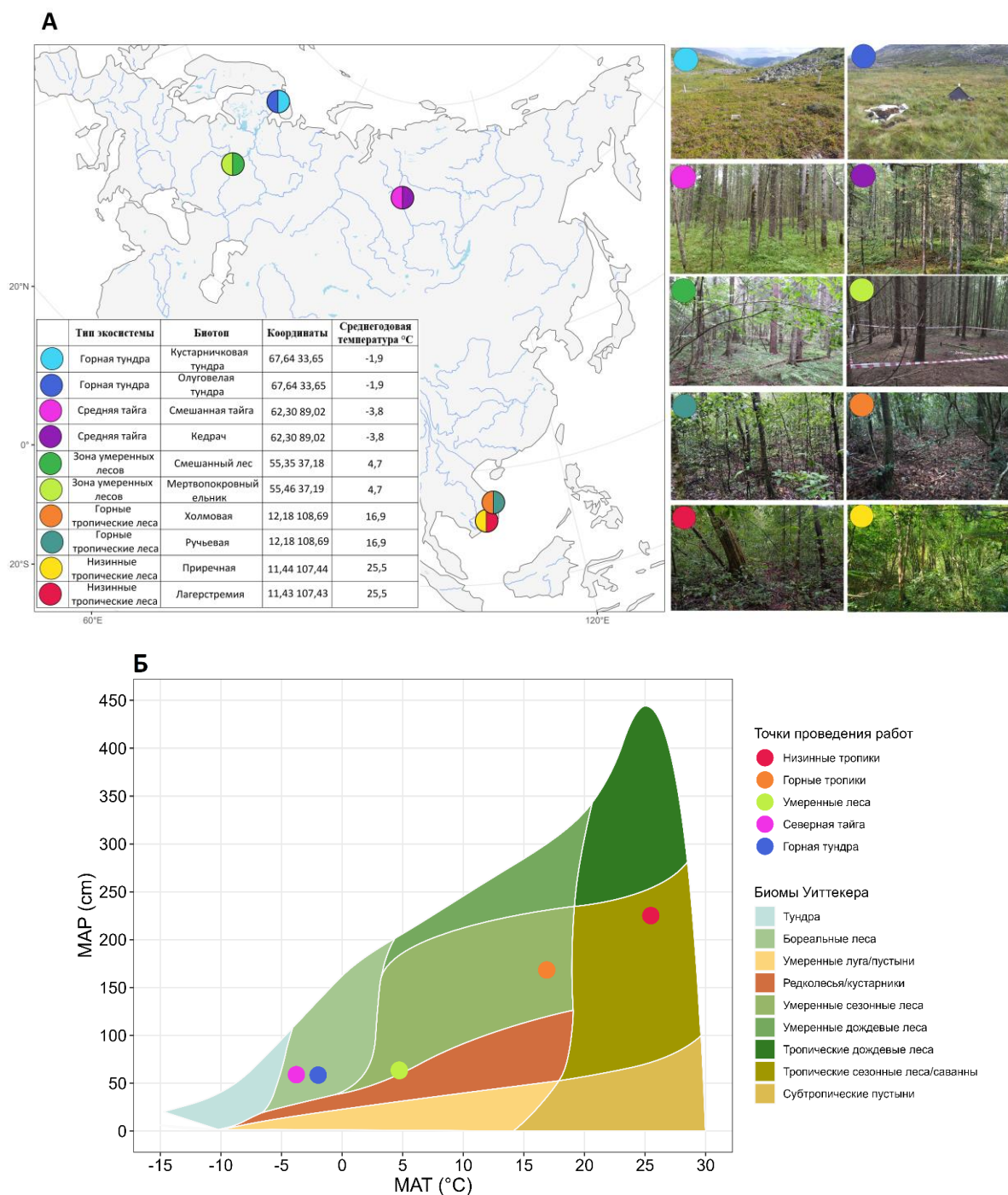


Рисунок 2.1. Расположение экосистем, в которых проводили исследования (А) и их климатические условия в контексте классической схемы биомов Уиттекера (Ştefan and Levin, 2018; Whittaker, 1975) (Б). Данные по среднегодовой температуре и среднегодовом количестве осадков получены по базе данных WorldClim (Fick and Hijmans, 2017)

В низинных тропических муссонных лесах исследования проводили в национальном парке Донгнай (Катъен) в двух биотопах, где в течение многих лет ведутся почвенно-зоологические исследования (Тиунов, 2011). Среднегодовая температура воздуха составляет 25,5 °C, среднегодовое количество осадков — 2251 мм, высота над уровнем моря — 145 м. Первый

биотоп («Лагерстремия») располагался на тёмной гумусо-ферралитной бурой почве под пологом леса с доминированием *Lagerstroemia caliculata* и *Tetrameles nudiflora* (11,4293° с.ш., 107,4275° в.д.). Второй биотоп («Приречная») расположен на прирусловом валу реки Донгнай на песчаной аллювиальной малогумусной супесчаной почве; в древесном ярусе преобладают *Dipterocarpus alatus*, *Irvingia malayana*, *Hopea odorata*, *Shorea* sp. (11,4434° с.ш., 107,4356° в.д.). Почвенное население данных экосистем ранее было описано в работе Аничкина (Аничкин и др., 2007).

Биотопы горного тропического леса находились в национальном парке Бидуп-Нуйба (среднегодовая температура 16,9 °С, осадки 1683 мм, высота 1527 м н.у.м.). Один биотоп («Холмовая») был представлен смешанным хвойно-лиственным лесом с доминированием представителей семейств Magnoliaceae, Theaceae, Sapindaceae, Betulaceae, Fagaceae и Pinaceae на легкосуглинистом желтозёме (12,1848° с.ш., 108,6866° в.д.); другой («Ручьевая») — лиственным лесом на аллювиальной среднесуглинистой почве вдоль русла ручья с доминированием Magnoliaceae, Theaceae, Sapindaceae, Betulaceae, Fagaceae (12,1795° с.ш., 108,6859° в.д.). Почвенное население данных экосистем ранее было описано в работах Аничкина и Тиунова (Аничкин и др., 2007; Тиунов, 2011).

Биотопы в лесу умеренной зоны были заложены в окрестностях биогеоценологической станции ИПЭЭ РАН «Малинки» (среднегодовая температура 4,7 °С, осадки 637 мм, высота 189 м, дерново-подзолистые среднесуглинистые почвы). Один биотоп («Малинки смешанный лес») (55,4571° с.ш., 37,1809° в.д.) находился в смешанном насаждении с преобладанием ели (*Picea abies*) и берёзы (*Betula pendula*), второй (55,4612° с.ш., 37,1862° в.д.) — в мертвopoкpoвном ельнике («Малинки ельник»). Почвенное население данных экосистем ранее было описано в работах Гилярова и Розановой с соавт. (Гиляров, 1983; Rozanova et al., 2022).

В средней тайге экспериментальные биотопы располагались в окрестностях Енисейской экологической станции ИПЭЭ РАН «Мирное» (Красноярский край, среднегодовая температура –3,8 °С, осадки 589 мм, высота 41 м). Биотопы представлены высокоствольным кедром (*Pinus sibirica*) на дерновой оподзоленной среднегумусной почве («Тайга кедровая») (62,3052° с.ш., 89,0175° в.д.) и кедром смешанным с доминированием *Carex* sp. в травянистом ярусе на дерново-слабоподзолистой среднегумусной почве («Смешанная тайга») (62,2937° с.ш., 89,0230° в.д.). Почвенное население данных экосистем ранее было описано в работе Рыбалова и Воробьёвой (Рыбалов и Воробьёва, 2002).

В горной тундре исследования проводили на территории Полярно-Альпийского ботанического сада им. А.Н. Аврорина КНЦ РАН (Мурманская обл., гора Вудъяврчорр; среднегодовая температура –1,9 °С, осадки 585 мм, высота 402 м). Доминирующий тип почв —

подбуры. На участках кустарничковой тундры ($67,6428^{\circ}$ с.ш., $33,6531^{\circ}$ в.д.) преобладают водяника (*Empetrum hermaphroditum*) и карликовая берёза (*Betula nana*) с участием черники (*Vaccinium myrtillus*) и голубики (*Vaccinium uliginosum*) («Кустарничковая тундра»). В олуговелой тундре ($67,6425^{\circ}$ с.ш., $33,6540^{\circ}$ в.д.) доминируют злаки (*Avenella flexuosa*, *Juncus trifidus*, *Festuca ovina*, *Nardus stricta*, *Carex bigelowii*) («Олуговелая тундра»). Почвенное население данных экосистем ранее было описано в работах Зенковой и Леонова (Зенкова и др., 2011; Леонов и др., 2015).

Физико-химические свойства почв на экспериментальных участках определяли в слое 0–10 см с использованием оборудования ЦКП "Инструментальные методы в экологии" при ИПЭЭ РАН (таблица 2.1). Валовое содержание элементов определяли с помощью элементного анализатора Flash 1112 (Thermo, Waltham, MA, USA). Кислотность определяли по водной вытяжке с соотношением почва : вода 1 : 2,5 по стандартной методике (FAO, 2021) с помощью лабораторного рН-метра М500Т (MT Measurement, China). Гранулометрический состав определяли методом лазерной дифракции на анализаторе Mastersizer 3000E (Malvern, UK) с ультразвуковой пробоподготовкой с уровнем энергии 450 Дж/мл и временем обработки 5 мин 20 секунд.

На всех экспериментальных участках для оценки вклада беспозвоночных в деструкцию растительных остатков и общей трофической активности использовали мешки с опадом (раздел 2.3.1) и приманочные пластины (bait lamina test, BLT) (раздел 2.3.2). Биотурбацию оценивали двумя методами: первый основан на подсчёте количества частиц, мигрировавших вглубь почвы (раздел 2.4.1.); второй — на анализе изменения состава стабильных изотопов углерода и азота на фоне снижения общего содержания этих элементов по почвенному профилю (раздел 2.4.2.).

Таблица 2.1. Основные физико-химические параметры верхних горизонтов почвы (0–10 см) исследованных биотопов. *Определение гранулометрического состава не проводили для биотопов горной тундры из-за высокого содержания органического вещества.

Тип экосистемы	Биотоп	C, % n = 5	N, % n = 5	pH n = 5	Содержание песка, %* n = 3	Содержание глины, %* n = 3	Содержание ила, %* n = 3
Низинный тропический лес	Лагерстремия	3,4 ± 0,2	0,31 ± 0,02	5,9 ± 0,1	15,4 ± 1,5	18,4 ± 0,9	66,2 ± 1,2
Низинный тропический лес	Приречная	1,2 ± 0,06	0,11 ± 0,00	5,1 ± 0,1	52,3 ± 2,7	6,7 ± 0,2	41,1 ± 2,5
Горный тропический лес	Холмовая	12,4 ± 1,3	0,73 ± 0,08	4,5 ± 0,2	39,48 ± 1,3	4,94 ± 0,1	55,6 ± 1,4

Горный тропический лес	Ручьевая	9,9 ± 1,0	0,56 ± 0,06	4,4 ± 0,1	28,0 ± 0,4	7,6 ± 0,2	64,4 ± 0,4
Лес умеренной зоны	Смешанный лес	2,7 ± 0,2	0,20 ± 0,00	4,8 ± 0,1	24,8 ± 1,0	6,7 ± 0,2	68,5 ± 0,9
Лес умеренной зоны	Ельник	4,9 ± 0,6	0,39 ± 0,03	5,9 ± 0,1	25,6 ± 1,7	8,5 ± 0,4	66,0 ± 1,4
Лес средней тайги	Смешанная тайга	6,3 ± 1,2	0,24 ± 0,04	4,3 ± 0,1	35,2 ± 1,0	6,1 ± 0,1	58,7 ± 0,9
Лес средней тайги	Кедрач	3,2 ± 0,5	0,10 ± 0,01	4,1 ± 0,0	46,1 ± 1,6	5,0 ± 0,4	48,9 ± 1,2
Горная тундра	Кустарничковая тундра	25,5 ± 1,8	1,02 ± 0,01	4,5 ± 0,1	-*	-	-
Горная тундра	Олуговелая тундра	21,5 ± 1,0	1,12 ± 0,01	4,8 ± 0,0	-*	-	-

2.2 Учёт обилия и метаболизма почвенных беспозвоночных

На каждом экспериментальном участке был проведён однократный учёт почвенной макро- и мезофауны по стандартным протоколам (Potapov et al., 2022). Макрофауну (животных крупнее 2 мм) учитывали методом ручного разбора подстилки и почвы с площади 25×25 см до глубины 10 см. Для учёта мезофауны отбирали монолиты почвы (включая подстилку) буром диаметром 5 см до глубины 10 см от уровня подстилки. Глубина взятия образцов была ограничена 10 см, поскольку обилие животных в нижележащих горизонтах резко снижается (Potapov et al., 2017). Монолиты транспортировали в лабораторию, где беспозвоночных выделяли с помощью воронок Берлезе–Тульгрена. Отбор проб проводили в периоды высокой активности почвенных сапрофагов: в начале влажного сезона (июнь) в тропических экосистемах, в июле в горной тундре и в умеренной зоне, в августе в северной тайге. Извлечённых из почвы животных фиксировали в 75% этаноле и определяли до уровня отряда или семейства. Данные по обилию термитов в низинных тропических экосистемах были взяты из работы Беляевой и Тиунова (2010). В горном тропическом лесу термиты практически отсутствовали (Аничкин и др., 2007), поэтому они не были включены в анализ. Поскольку в задачи настоящего исследования не входила оценка трофических взаимодействий между различными группами почвенных беспозвоночных, для последующего анализа мы ограничились представителями сапрофагов двух размерных классов. Основное внимание было уделено доминирующим на модельных площадках таксонам, общая биомасса которых во всех случаях превосходила 90% от общей биомассы учитываемых нами почвенных беспозвоночных. К этим таксонам в составе макрофауны были отнесены термиты (Isoptera), жуки (Coleoptera - имаго Erotylidae, Lathridiidae; личинки Elateridae, Dascillidae, Catopidae), диплоподы (Diplopoda), мокрицы (Isopoda) и дождевые черви (Crassiclitellata). В составе мезосапрофагов рассматривались Collembola и Sarcoptiformes. Общее обилие макро- и мезосапрофагов рассчитывали по сумме обилия выбранных групп.

Модельные биотопы располагались в широком климатическом градиенте с разной сезонностью и среднегодовой температурой. Очевидно, что активность беспозвоночных в значительной степени определяется температурой окружающей среды. Для учёта температурной зависимости активности сапрофагов в исследованном градиенте экосистем мы рассчитали суммарный метаболизм их сообществ. Для этого был рассчитан метаболизм выбранных для анализа групп с помощью уравнения зависимости интенсивности метаболизма от массы тела и температуры:

$$\ln(I) = \ln(i_0) + a \cdot \ln(M) - E/(kT),$$

где $\ln(I)$ – натуральный логарифм метаболизма, $\ln(i_0)$, a и E – коэффициенты, специфичные для различных филогенетических групп, M – биомасса организма (вес живого организма, мг), k – константа Больцмана $8,62 \cdot 10^{-5} \text{ eV K}^{-1}$ (Ehnes et al., 2011). Поскольку для Isopoda поправочные коэффициенты отсутствовали, для них использовали коэффициенты для насекомых. Данные по средней индивидуальной биомассе членистоногих взяты из работы (Potapov et al., 2023). Дождевых червей, фиксированных в этаноле, взвешивали с точностью до 1 мг. Для коррекции потери массы при фиксации применяли поправочный коэффициент 0,586 (Rožen et al., 2015).

Поскольку время экспозиции мешков с опадом (год или полгода) и приманочных пластин (не более 10 дней) существенно различалось, мы рассчитали два показателя метаболической активности, используя два значения температуры почвы (слой 0–5 см) из базы данных SoilTemp (Lembrechts et al., 2022). Для оценки связи метаболизма животных с их вкладом в деструкцию опада (см. раздел 2.3.1), использовали среднегодовую температуру почвы (mean annual temperature, MAT). Хотя в низинных тропических лесах мешки экспонировались только полгода, мы всё же использовали MAT, поскольку в этих экосистемах температура мало варьирует в течение года (Deshcherevskaya et al., 2013). Использование в расчетах среднегодовой температуры является, очевидно, очень большим упрощением. Для сообществ умеренной и бореальной зоны более удобной мерой могла бы быть сумма положительных температур. К сожалению, этот подход не применим в нашем исследовании, поскольку в тропических экосистемах максимальные температуры ассоциированы с сухим сезоном, в течение которого активность почвенных сапрофагов существенно сокращается (Тиунов, 2011). Поэтому мы остановились на простейшем и легко интерпретируемом варианте.

Для оценки связи метаболизма с трофической активностью, измеренной с помощью метода приманочных пластин (см. раздел 2.3.2), использовали среднемесячную температуру почвы в период экспозиции (июнь для тропических экосистем, июль для горной тундры и умеренной зоны, август для северной тайги).

Для расчёта метаболической активности всего сообщества или отдельных таксономических или размерных групп в Дж ч⁻¹ м⁻² полученные скорости метаболизма для каждого таксона умножали на его обилие.

Проведенный нами однократный учёт обилия и разнообразия почвенных беспозвоночных, выполненный по стандартной методике (Potapov et al., 2022), в условиях широкого градиента экосистем дает возможность провести сравнительную оценку вклада беспозвоночных в экосистемные процессы. Однако полученные данные не позволяют дать детальную характеристику почвенного населения. В связи с этим в работе не приводятся и не анализируются полученные в ходе исследования подробные сведения об обилии и таксономическом составе почвенных беспозвоночных в модельных биотопах.

2.3. Измерения скорости деструкции опада и трофической активности

2.3.1. Вклад макросaproфагов в деструкцию опада (мешки с опадом, litter bags)

В качестве модельного вида растительного опада для биотопов умеренной, таёжной и тундровой зон использовали листья берёзы (*Betula pendula*), а для тропических экосистем — листья лагерстремии (*Lagerstroemia calyculata*). Свежесобранный опад высушивали при 60 °C в течение двух суток, после чего по 5 г сухого опада помещали в мешки размером 15 × 15 см. Для защиты от повреждения термитами мешки изготавливали из металлической сетки. Для изоляции опада от почвенной фауны использовали два размера ячеей: 5,0 мм (для доступа всей почвенной фауны) и 1,2 мм (для исключения макрофауны). На каждом участке размещали по 3–4 мешка каждого типа (по 16 мешков на один биотоп, всего 320 мешков). Закладку мешков проводили одновременно с отбором проб для оценки обилия и разнообразия почвенных беспозвоночных. Продолжительность экспозиции составила один год для всех биотопов, кроме низинных тропиков, где из-за высокой скорости разложения срок сократили до шести месяцев (середина июня — середина декабря). После извлечения мешков опад очищали от почвенных частиц, высушивали при 60 °C и взвешивали.

Скорость деструкции опада рассчитывали с использованием константы разложения k по уравнению $M_t = M_0 \times e^{-kt}$, где M_0 и M_t — исходная и конечная масса опада, t — время экспозиции в днях (Olson, 1963). В мешках с малым размером ячеей разложение проходит при участии микроорганизмов и мезофауны; в мешках с большим размером ячеей — дополнительно вовлекается макрофауна. Вклад макрофауны рассчитывали как натуральный логарифм отношения констант разложения: $LRR = \ln(k_5/k_{1,2})$, где k_5 и $k_{1,2}$ — константы разложения для мешков с ячейей 5 мм и 1,2 мм соответственно (Hedges et al., 1999; Zeng et al., 2024). Поскольку

вклад макросапрофагов в механическую деструкцию опада значительно превышает вклад мезосапрофагов (Handa et al., 2014; Li et al., 2024; Sagi and Hawlena, 2024), мы не использовали мешки, полностью исключающие доступ беспозвоночных, и не оценивали вклад мезофауны в деструкцию.

2.3.2. Трофическая активность (bait lamina test, BLT)

Для оценки трофической активности сапрофагов применяли пластиковые пластины длиной 16 см и шириной 0,5 см, содержащие 16 отверстий диаметром 2 мм с интервалом 0,5 см. Пластины были напечатаны на 3D-принтере с помощью PLA-пластика по модели, предоставленной Е.Л. Воробейчиком (ИЭРиЖ УрО РАН). В качестве приманки использовали смесь порошкообразной крапивы (*Urtica dioica*) и микрокристаллической целлюлозы в соотношении 3:7. Смесь увлажняли до пастообразной консистенции и двукратно заполняли отверстия для предотвращения образования пустот и трещин (Helling et al., 1998; von Törne, 1990). На каждом участке по регулярной сетке 4×4 с шагом 10 см размещали 16 пластин (всего 800 пластин). Пластины вставляли вертикально в предварительно сделанные ножом разрезы так, чтобы верхнее отверстие находилось на 0,5 см ниже поверхности почвы. Трофическую активность измеряли в период отбора проб для учёта почвенных беспозвоночных. Время экспозиции составляло 10 дней, за исключением низинных тропиков, где в предварительных опытах более 80 % отверстий оказались пустыми уже через 7 дней (А. Кудрин, ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, личное сообщение). Время экспозиции в этом биотопе сократили до 7 дней. Извлечённые из почвы пластины замораживали для остановки биологической активности, затем высушивали.

Использованная нами 3D-модель помимо отверстий диаметром 2 мм содержала также узкие отверстия шириной 0,2 мм. Приманку в этих мелких отверстиях не могут потреблять представители макрофауны, что позволяет разделять вклад макро- и мезофауны в трофическую активность (Vorobeichik and Bergman, 2023). Однако в данной работе мы использовали только крупные отверстия, поскольку учёт потребления приманки в мелких отверстиях в некоторых случаях был технически затруднительным. Потребление приманки оценивали по трёхбалльной шкале: 0 — приманка не тронута, 0,5 — значительная часть съедена, 1 — приманка отсутствует. Такой подход обеспечивает более высокую точность измерений (Vorobeichik and Bergman, 2021). Трофическую активность выражали как относительное количество потреблённой приманки (доля пустых отверстий, %), нормированное на число дней экспозиции.

2.4. Методы измерения биотурбационной активности

2.4.1. Оценка интенсивности биотурбации с помощью трассирующих частиц

На каждом экспериментальном участке закладывали по две микроплощадки размером 10 × 10 см, слегка углублённые (~0,5 см) относительно поверхности почвы. Опад и почву из углублений сохраняли на полиэтиленовой плёнке. На каждую микроплощадку вносили 40 мл (~4500 частиц) стеклянного бисера красного цвета диаметром 2 мм и плотностью 2,5 г/см³. После внесения бисер присыпали извлечённой почвой и опадом до уровня исходной поверхности (рисунок 2.2).

А



Б



Рисунок 2.2. Общий вид микроплощадки с бисером для учёта интенсивности биотурбации. А – Микроплощадка с внесённым на поверхность бисером, Б – Микроплощадка с бисером, засыпанная почвой. Национальный парк Каттён, биотоп «Приречная».

Через год проводили послойный отбор проб почвы. Корни вокруг монолита почвы под микроплощадкой прорезали с трёх сторон острым длинным ножом, затем аккуратно окапывали монолит и послойно снимали горизонтальные слои почвы до глубины 10 см с помощью широкого тонкого ножа. Крупные корни отпиливали, чтобы избежать нарушения слоёв. Толщина отдельных горизонтальных слоёв варьировала от 1 до 2 см в зависимости от густоты мелких и наличия крупных корней. Отобранные образцы просеивали через сито с ячейёй 1,5 мм и подсчитывали число частиц бисера в каждом слое. Данные с двух микроплощадок на каждом участке усредняли.

Для характеристики распределения частиц бисера по почвенному профилю использовали коэффициент S экспоненциальной модели вида $N = b * e^{-S*d}$, где N — число частиц, d — глубина

в см. Экспоненциальная модель выбрана в связи с её широким применением для описания распределения органического вещества в почвенном профиле (Hobley and Wilson, 2016; Minasny et al., 2013; Russell and Moore, 1968). Коэффициент S в уравнении отражает равномерность распределения частиц: низкие значения указывают на неравномерное распределение с преимущественной концентрацией в поверхностном слое, тогда как высокие значения соответствуют более гомогенному распределению, т.е. более глубокому проникновению бисера в почвенные горизонты. Коэффициенты рассчитывали для каждой микроплощадки и урседняли в пределах экспериментальных участков. Рассчитанные коэффициенты использовали только в случае наличия статистически значимой зависимости числа частиц бисера от глубины.

В данном эксперименте мы использовали достаточно крупные частицы бисера, перемещение которых, по-видимому, могли способствовать только относительно крупные почвенные беспозвоночные. В исследованных биотопах из всех групп беспозвоночных лишь дождевые черви обладали достаточными размерами и обилием, чтобы обеспечить перемещение частиц. Термиты, которые также могли бы участвовать в этом процессе, встречались только в двух биотопах низинных тропиков, а использованные нами методы учёта не позволяли провести точные оценки их обилия. В связи с этим, мы связываем интенсивность перемещения частиц бисера главным образом с активностью дождевых червей.

Разные функциональные группы дождевых червей могут по-разному влиять на интенсивность миграции бисера. Так, почвенные формы, вероятно, могут перемещать частицы в верхних горизонтах почвенного профиля, норные формы будут способствовать проникновению частиц на большую глубину, а подстилочные формы не должны оказывать видимого влияния. Однако из-за слабой разработанности системы морфо-экологических групп (Bouché, 1977) у тропических видов, в этом эксперименте мы не разделяли дождевых червей на разные функциональные группы.

Мы предполагаем, что перемещение частиц бисера по почвенному профилю связано в первую очередь с количеством «актов рытья», которое определяется в большей степени численностью, чем биомассой, дождевых червей. Экспериментально показано, что мелкие черви при бурении почвы способны развивать намного большую силу относительно своего веса, чем крупные особи (Quillin, 2000). В связи с этим в дополнение к метаболизму (раздел 2.2), мы рассчитали метрику активности, основанную на численности животных и среднегодовой температуре биотопа. Зависимость активности дождевых червей от температуры близко соответствует известной закономерности $Q_{10} = 2$ (Uvarov and Scheu, 2004). На основе этой зависимости был рассчитан поправочный коэффициент. Коэффициент был принят равным единице для биома с минимальной среднегодовой температурой (северная тайга) и удваивался

при каждом повышении температуры на 10 °С. Значение коэффициента для каждого биотопа умножали на численность дождевых червей, которое оценили с помощью ручного разбора почвенных проб (раздел 2.2). Полученные значения интерпретировались как «активность» дождевых червей в исследованных биотопах. Сходный подход ранее применялся для учёта температурной зависимости при расчёте количества потребляемой дождевыми червями почвы (Taylor et al., 2019).

2.4.2. Анализ изотопного профиля почвы

Процессы деструкции органического вещества сопровождаются изменением изотопного состава углерода и азота (Feng, 2002). Более тяжёлые изотопы (^{13}C и ^{15}N) обладают меньшей реакционной способностью и преимущественно задерживаются в системе, тогда как более лёгкие (^{12}C и ^{14}N) имеют более высокую вероятность покинуть её в составе газообразных или растворимых соединений (Тиунов, 2007; Fry, 2006). Вследствие этого для большинства почв характерно увеличение величины $\delta^{13}\text{C}$ на фоне снижения общего содержания углерода с глубиной (Acton et al., 2013). Сходная динамика показана и для азота ($\delta^{15}\text{N}$) (Nel et al., 2018). Изменение изотопного состава элементов при одновременном снижении их концентрации отражает интенсивность разложения органического вещества (рисунок 3). В качестве меры скорости оборота органического вещества используется угол наклона (β -коэффициент) регрессионной прямой, построенной в координатах «логарифм валового содержания элемента — его изотопный состав» (Acton et al., 2013; Soldatova et al., 2024).

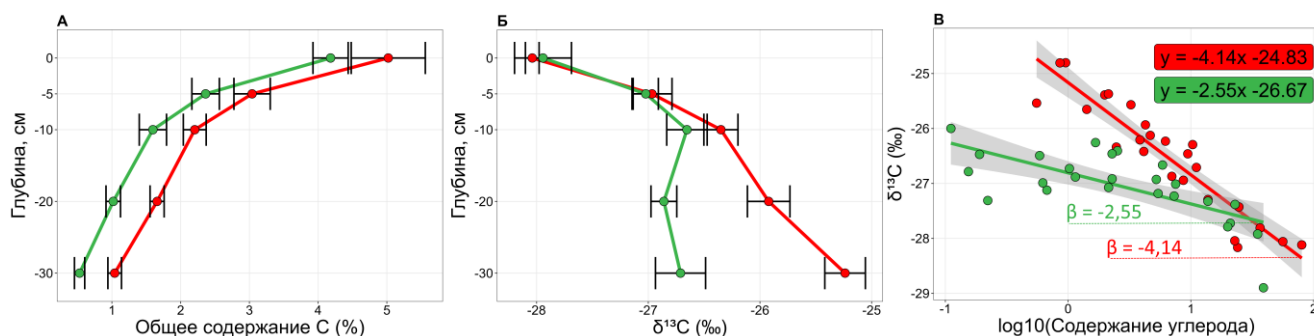


Рисунок 2.3. Принцип расчёта коэффициентов β на примере биотопов «Малинки Смешанный лес» (зеленые символы) и «Катъен Лагерстремия» (красные символы). А – Снижение валового содержания углерода с глубиной; Б – Зависимость $\delta^{13}\text{C}$ от глубины; В – Зависимость $\delta^{13}\text{C}$ от логарифма содержания органического вещества.

β -коэффициент всегда отрицателен. Увеличение его модуля свидетельствует о более интенсивном обогащении органического вещества тяжёлыми изотопами, что указывает на высокую скорость биохимических трансформаций. В связи с этим величину β -коэффициентов, как правило, трактуют как скорость оборота отдельных элементов в экосистемах. Во многих

работах вместо сырых коэффициентов β используют их логарифмированные абсолютные значения. Это позволяет стандартизировать получаемые значения для разных экосистем и облегчает интерпретацию данных. Так, было показано, что показатель $\ln(-\beta)$ хорошо коррелирует со среднегодовой температурой и количеством осадков, отражая скорость трансформации органического вещества и активность почвенных микроорганизмов (Soldatova et al., 2024; Wang et al., 2018). Биотурбационная активность беспозвоночных связана с переносом слабо разложившегося органического вещества, облегчённого тяжёлыми изотопами углерода и азота, вглубь почвенного профиля (Shuster et al., 2001). В связи с этим, следует ожидать, что увеличение обилия и активности животных будет приводить к уменьшению величины $\ln(-\beta)$.

Для проверки возможности использования β -коэффициентов в качестве меры биотурбации на каждом экспериментальном участке были отобраны образцы почвы с глубин 0, 5, 10, 20 и 30 см. Валовое содержание и изотопный состав углерода и азота (соотношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ и $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) в высушенных образцах определяли на комплексе оборудования, включающим элементный анализатор Flash 1112 и изотопный масс-спектрометр Thermo Delta V Plus (Центр коллективного пользования «Инструментальные методы в экологии» ИПЭЭ РАН). Изотопный состав выражали в тысячных долях отклонения от международных стандартов (VPDB для углерода и атмосферного азота для азота), δ (‰). На основе полученных данных для каждой площадки рассчитывали β -коэффициенты для углерода и азота. Для нормализации распределения статистически значимые коэффициенты β_{C} и β_{N} логарифмировали ($\ln(-\beta_{\text{C}})$; $\ln(-\beta_{\text{N}})$).

2.5 Метабаркодинг сообществ почвенных беспозвоночных

Нами была проведена серия экспериментов, направленных на совершенствование и оценку эффективности существующих протоколов метабаркодинга почвенных беспозвоночных.

Первый эксперимент был посвящён оценке влияния процедур биоинформатической фильтрации на результаты идентификации последовательностей, а также общей эффективности метабаркодинга для выявления видов почвенной фауны. Для этого было сконструировано искусственное сообщество, включающее точно известный набор видов из основных групп почвенной фауны. Использование модельной смеси с известным составом позволило оценить эффективность выявления видового состава и точно регистрировать частоту ложноположительных и ложноотрицательных результатов. В рамках данного эксперимента

также проводилось сравнение различных методов выделения ДНК из смесей почвенных беспозвоночных.

Второй эксперимент был направлен на оценку способности метабаркодинга отражать относительно небольшие изменения в структуре сообществ почвенных беспозвоночных. Для того, чтобы вызвать изменения в структуре сообществ мы разместили на поверхности почвы листы полиэтиленовой плёнки, имитирующие загрязнение пластиковыми пакетами, и через год сравнили изменения в структуре сообществ под плёнкой и на контрольных, не покрытых плёнкой участках. ДНК была получена из смеси извлеченных из почвы животных. Полученные молекулярные данные были верифицированы с помощью экстракции беспозвоночных с помощью воронок Тульгрена и последующей идентификацией по морфологическим признакам (далее «морфологического метода»).

Третий эксперимент был посвящён модификации существующих протоколов выделения ДНК из почвы с целью увеличения объёма навески. Разработанная методика была сопоставлена как с традиционными подходами, так и с имеющимися коммерческими наборами для экстракции почвенной ДНК.

Полученные в ходе экспериментов методические наработки были использованы при выделении и анализе ДНК из образцов почвы, отобранных на экспериментальных площадках для оценки таксономического разнообразия почвенных беспозвоночных.

2.5.1 Эксперимент с искусственными сообществами почвенных беспозвоночных.

Чтобы оценить эффективность метабаркодинга для анализа сообществ почвенных беспозвоночных мы провели эксперимент с искусственной смесью животных, состоящей из 24 видов (относящихся к 23 родам, 16 семействам и 8 отрядам) распространённых представителей почвенной фауны (Таблица 2.2). Виды беспозвоночных выбирались по следующим критериям: 1) Животные были экстрагированы из почвы или подстилки. 2) Смесь содержала организмы, находящиеся на различном филогенетическом расстоянии. Например, организмы разных видов одного рода; разных родов одного семейства и разных семейств одного отряда. 3) Нуклеотидные последовательности гена COI выбранных видов беспозвоночных были представлены в международных базах данных NCBI (Geer et al., 2010) и BOLD (Ratnasingham and Hebert, 2007).

Беспозвоночные, которые использовались для составления искусственной смеси, были выделены из образцов почвы, отобранных в окрестностях биогеоэкологической станции ИПЭЭ РАН «Малинки», или предоставлены специалистами лаборатории почвенной зоологии и общей энтомологии ИПЭЭ РАН из личных коллекций. Образцы хранились в 96% этаноле.

Таблица 2.2. Беспозвоночные, использованные для составления искусственных смесей.

№	Отряд	Семейство	Род	Вид
1	Araneae	Gnaphosidae	<i>Haplodrassus</i>	<i>Haplodrassus soerenseni</i>
2	Coleoptera	Elateridae	<i>Dalopius</i>	<i>Dalopius marginatus</i>
3	Lithobiomorpha	Lithobiidae	<i>Lithobius</i>	<i>Lithobius curtipes</i>
4	Crassiclitellata	Lumbricidae	<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus rubellus</i>
5	Crassiclitellata	Lumbricidae	<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus terrestris</i>
6	Crassiclitellata	Lumbricidae	<i>Apporectodea</i>	<i>Apporectodea rosea</i>
7	Enchytraeida	Enchytraeidae	<i>Henlea</i>	<i>Henlea ventriculosa</i>
8	Enchytraeida	Enchytraeidae	<i>Cognettia</i>	<i>Cognettia sphanetorum</i>
9	Enchytraeida	Enchytraeidae	<i>Fridericia</i>	<i>Fridericia ratzeli</i>
10	Hymenoptera	Formicidae	<i>Myrmica</i>	<i>Myrmica ruginodis</i>
11	Sarcoptiformes	Crotoniidae	<i>Platynothrus</i>	<i>Platynothrus peltifer</i>
12	Sarcoptiformes	Camisiidae	<i>Heminothrus</i>	<i>Heminothrus longisetosus</i>
13	Sarcoptiformes	Hypochthoniidae	<i>Hypochthonius</i>	<i>Hypochthonius rufulus</i>
14	Sarcoptiformes	Tectocephidae	<i>Tectocephus</i>	<i>Tectocephus velatus</i>
15	Sarcoptiformes	Oppiidae	<i>Oppiella</i>	<i>Oppiella nova</i>
16	Sarcoptiformes	Euzetidae	<i>Euzetes</i>	<i>Euzetes globolus</i>
17	Sarcoptiformes	Oribatulidae	<i>Oribatula</i>	<i>Oribatula tibialis</i>
18	Collembola	Isotomidae	<i>Parisotoma</i>	<i>Parisotoma notabilis</i>
19	Collembola	Isotomidae	<i>Folsomia</i>	<i>Folsomia quadrioculata</i>
20	Collembola	Isotomidae	<i>Isotomiella</i>	<i>Isotomiella minor</i>
21	Collembola	Isotomidae	<i>Anurophorus</i>	<i>Anurophorus laricis</i>
22	Collembola	Entomobryidae	<i>Lepidocyrtus</i>	<i>Lepidocyrtus lignorum</i>
23	Collembola	Entomobryidae	<i>Pseudosinella</i>	<i>Pseudosinella alba</i>
24	Collembola	Onychiuridae	<i>Protaphorura</i>	<i>Protaphorura armata</i>

Сильные различия в биомассе разных особей могут влиять на выявление мелких организмов (Elbrecht et al., 2017). Поэтому от крупных членистоногих (Araneae, Lithobiomorpha, Hymenoptera) использовали одну или несколько ходильных конечностей. Представители

семейства Elateridae были представлены личинками, которые имеют слаборазвитые конечности, поэтому их разрезали на две части и переднюю половину использовали для составления смеси. У представителей Oligochaeta отрезали небольшой фрагмент стенки тела (в случае с Lumbricidae) или фрагмент туловища (в случае с Enchytraeidae). Особей мезофауны (Collembola, Sarcotiformes) помещали в искусственную смесь целиком. Всего было составлено 15 идентичных искусственных смесей. Мы не проводили измерение массы использованных для составления смесей животных или их фрагментов, поскольку не ставили задачи количественной оценки вклада отдельных видов.

Почвенные беспозвоночные могут содержать на поверхности тела или внутри кишечника частицы почвы. Наборы для выделения ДНК из тканей не содержат реагентов, очищающих от гуминовых кислот, содержащихся в органическом веществе почвы, что может приводить к последующему ингибированию реакций ПЦР при подготовке библиотек для секвенирования. В связи с этим, мы протестировали эффективность выделения ДНК четырьмя коммерческими наборами. Два набора были предназначены для выделения ДНК из тканей – М-сорб и ГМО-Б (Синтол, Россия), два набора для выделения ДНК из почвы - DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Германия) и FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, США). Также мы протестировали эффективность выделения ДНК с помощью физического измельчения и щелочного лизиса без очистки от фрагментов клеток и прочих органических соединений, которые могут ингибировать дальнейшие этапы обработки.

После подготовки смесей, перед выделением ДНК большую часть спирта удаляли. Остатки спирта выпаривали в сушильном шкафу при 60 °C и сухие образцы гомогенизировали с помощью пестика. Выделение ДНК набором М-Сорб производилось по модифицированной методике (Ustinova et al., 2021). При проведении щелочного лизиса в каждую смесь насыпали 100 мг песка с размером частиц 250-300 мкм и добавляли 500 мкл Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) с добавлением 5% Triton X-100. Далее смесь кипятили 15 минут при температуре 100 °C. После лизиса пробы гомогенизировали с помощью гомогенизатора Minilys (Bertin Instruments, Франция) при 5000 об./мин на протяжении 30 с. Полученный лизат центрифугировали при 13400 об./мин на протяжении 3 минут и супернатант использовали для подготовки библиотеки (Belov et al., 2018). Стоит заметить, что в данном методе не применялась никакая очистка, кроме осаждения крупных частиц центрифугированием. Эта и подобные методики (Belov et al., 2018; Krivosheina et al., 2023; Sotnikov et al., 2024) имеют очень низкую стоимость и показывали успешное выделение ДНК из биологических образцов. Выделение ДНК остальными наборами проводили согласно инструкции производителя. Для каждого метода экстракции проводили однократные контрольные выделения без добавления в пробирки

беспозвоночных. Амплификацию фрагмента гена COI длиной ~313 п.н. проводили с праймерами mlCOIntAD и JgHCOAD с высокоточной HS-Fuss полимеразой (Диалат Лтд, Россия). Для оценки влияния температуры отжига праймеров на качество получаемых данных амплификацию проводили при двух температурах отжига — 45 и 48 °C. Программа амплификации включала начальную денатурацию при 98 °C в течение 2 мин, затем 40 циклов: денатурация при 98 °C — 7 с, отжиг праймеров при 45 или 48 °C — 60 с и элонгация при 72 °C — 30 с. Более детальное описание методики подготовки библиотеки приведено в публикации (Sotnikov et al., 2025). Секвенирование проводили на факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова на платформе Illumina MiSeq 2×250 с набором MiSeq Reagent Kit v250 cycle (Illumina, USA). Полученные последовательности депонированы в GenBank (PRJNA1157715).

Биоинформатическую сборку последовательностей проводили с помощью пакета DADA2 (Callahan et al., 2016) в программной среде R v.4.1.2 (R Core Team, 2025). Идентификацию собранных последовательностей проводили по базе данных NCBI GenBank. Удаляли все последовательности, аннотированные не беспозвоночными животными (грибы, *Homo sapiens* и т.д.). Полученный набор данных проводили через серию стандартных этапов постбиоинформатической обработки данных. Некоторые ASV совпадали с последовательностями базы данных, которые были аннотированы до уровня рода или семейства. На первом этапе идентификацию таких ASV уточняли по базе данных BOLD (Ratnasingham and Hebert, 2007). На втором этапе удаляли все виды, которые совпадали менее чем на 97% с последовательностью базы данных NCBI. На третьем этапе удаляли последовательности, которые имели низкое число ридов в каждом образце. Порог удаления редких ридов рассчитывали, как среднее их количество в образцах контрольных экстракций ДНК среди всех используемых способов выделения. Данный порог использовался для всех образцов и составил 7 ридов. После каждого шага фильтрации вычисляли базовые количественные параметры для характеристики результатов идентификации искусственного сообщества на уровне семейства, рода и вида. Базовые параметры включали общее число идентифицированных таксонов, число идентифицированных таксонов искусственного сообщества (число истинно-положительных таксонов), долю таксонов искусственного сообщества (доля истинно-положительных таксонов) в результатах метабаркодинга. На основе этих данных рассчитывали число и долю ложноположительных таксонов, которые не входили в состав искусственных смесей, однако были идентифицированы в результатах метабаркодинга.

2.5.2 Эксперимент с естественными сообществами почвенных беспозвоночных

Эксперимент провели на четырёх площадках, расположенных в двух хвойных и двух лиственных лесах на трёх биостанциях ИПЭЭ РАН в Московской области. Лиственные леса были

представлены участком с доминированием лещины (*Corylus avellana*) на территории гидробиологической станции «Глубокое озеро» (55.752° N, 36.511° E) и участком с доминированием клёна остролистного (*Acer platanoides*) на биогеоценологической станции «Малинки» (55.459° N, 37.178° E). Участки хвойных лесов располагались на территории научно-экспериментальной базы «Черноголовка» и были представлены ельником (*Picea abies*, 56.025° N, 38.430° E) и сосняком (*Pinus sylvestris*, 56.024° N, 38.429° E). На каждой площадке на поверхность почвы поместили листы прозрачной и чёрной двухслойной полиэтиленовой плёнки (40×40 см, ПЭВД, толщина слоя 100 мкм), закреплённые металлическими гвоздями. Листы разного типа размещали рядом для нивелирования влияния микрорельефа. Плёнка имитировала фрагменты бытового мусора (Сотников и др., 2023). После 9 месяцев экспонирования из-под каждого листа отбирали по одной пробе размером 10×10×10 см (включая подстилку). Всего было отобрано 72 пробы (по 6 повторностей на каждый тип воздействия: прозрачный пластик, чёрный пластик и контроль в каждом биотопе). Для извлечения животных каждую пробу делили на две равные части. Животных экстрагировали с помощью воронок Тульгрена в течение 10 дней и фиксировали в 95% этаноле. Беспозвоночные из одной половины пробы были использованы для морфологической идентификации и оценки обилия, из другой — для определения таксономического состава методом метабаркодинга. Описание метода выделения ДНК с помощью набора М-Сорб (Синтол, Россия), подготовки библиотек, а также биоинформатический анализ описаны в разделе 2.5.1.

Анализ данных проводили в соответствии с работой (Tiunov and Scheu, 2000). Было использовано три набора данных. Первый набор включал результаты традиционного морфологического определения беспозвоночных до уровня семейства, второй набор состоял из точных вариантов последовательностей ампликонов (ВПА), третий набор включал нуклеотидные последовательности, идентифицированные до уровня семейства по базам NCBI или BOLD. Присутствие животных в пробе во всех наборах данных преобразовывали в качественный формат (наличие-отсутствие). Анализ наборов данных включал непараметрическое многомерное шкалирование (NMDS) с индексом Жаккара в качестве меры сходства; число осей NMDS для каждого набора данных было задано равным пяти для достижения значения стресса менее 0,2. Координаты проб в пространстве NMDS использовались в линейном дискриминантном анализе (функции *lda* из пакета MASS и *candisc* из одноимённого пакета), где тип воздействия (прозрачный пластик, чёрный пластик, контроль) выступал в качестве группирующей переменной. Результаты ординации визуализированы в пространстве двух дискриминантных функций. Для сопоставления результатов трёх методов рассчитывали

корреляцию Спирмана между дискриминантными функциями каждого подхода, внёсшими наибольший вклад в разделение групп.

2.5.3. Разработка методики выделения средовой ДНК почвы

Отбор проб почвы проводили в смешанном елово-берёзовом лесу с лещиной (Московская область, биогеоценологическая станция «Малинки» ИПЭЭ РАН, Россия; 55,457° с.ш., 37,180° в.д.). Шестнадцать образцов почвы (без подстилки) для анализа средовой ДНК были отобраны с помощью металлических ложек с глубины 0–5 см (примерно 50 г влажной почвы на образец). После каждого отбора ложки стерилизовали с помощью хлорки и обжигали в пламени горящего спирта. Образцы отбирали по регулярной сетке (4×4) с шагом 5 м между пробами. Почвенные образцы в тот же день доставляли в лабораторию и хранили при –20 °С до начала выделения ДНК. Для верификации результатов с помощью морфологического метода были отобраны пробы почвы из пяти точек на той же площади, где проводился сбор проб для средовой ДНК (см. раздел 2.2).

Для экстракции ДНК образцы размораживали при +4 °С в течение 12 часов. Каждый из 16 отобранных образцов перемешивали, и тотальную ДНК выделяли согласно двум стандартным протоколам и новому протоколу, разработанному на основе работы Лопеса с соавторами (Lopes et al., 2021). Два коммерческих набора Magen HiPure Soil DNA Kit (Magen, Китай) и DNeasy PowerMax Soil Kit (Qiagen, Дания) с использованием навесок 0,5 г и 10 г (влажный вес) почвы, соответственно, были использованы согласно инструкциям производителя. Для выделения ДНК с помощью нового протокола использовали 10 г (влажный вес) почвы. Навески почвы смешивали с десорбционным буфером в соотношении 1:1,5 (масса/объём). Буфер состоял из смеси 1М PBS (Guerra et al., 2020; Taberlet et al., 2012b) и буфера Лонгмайра (Longmire et al., 1997). Для дополнительного лизиса клеток добавляли 0,5% SDS. Итоговый состав буфера: 1М PBS, 0,1 М NaCl, 0,1 М Na-EDTA, 0,1 М Tris-HCl×2H₂O и 0,5% SDS (pH = 8). Смесь почвы с буфером перемешивали на вортексе на максимальной скорости в течение 10 секунд и инкубировали при 65 °С в течение 10 минут, перемешивая каждую минуту в течение 10 секунд, с последующим центрифугированием при 7000 × g в течение 10 мин (Guerra et al., 2020). Несмотря на центрифугирование, надосадочная жидкость содержала высокую концентрацию мелкой органической фракции. Супернатант фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры диаметром 47 мм с размером пор 0,2 мкм (Lopes et al., 2021) с помощью установки для вакуумной фильтрации (Владисарт ЛТД, Россия). Объём отфильтрованной надосадочной жидкости колебался от 5 до 15 мл. Фильтр с осадком разрезали на мелкие фрагменты с помощью стерильных ножниц и помещали в микропробирку для экстракции ДНК с использованием набора

Magen HiPure Soil DNA Kit. Выделение ДНК проводили в соответствии с инструкциями производителя, исключая этап добавления SDS.

Согласно оригинальному протоколу (Lopes et al., 2021), экстракция тотальной ДНК включала смешивание образцов подстилки с дистиллированной водой с последующей фильтрацией через нитрат-целлюлозные фильтры. Этап лизиса инициировали в ходе последующей обработки фильтра лизирующими агентами. Наша ключевая модификация заключается в обработке буфером непосредственно образца почвы. Буфер приводит к десорбции внеклеточной ДНК с поверхности почвенных частиц (1M PBS), лизирует клетки (SDS с нагреванием) для высвобождения внутриклеточной ДНК и хелатирует ионы металлов (Tris), облегчая последующие этапы очистки. Кроме того, Lopes с соавторами использовали отдельный этап смывания ДНК с фильтров и дальнейшее её спиртовое переосаждение. Мы предлагаем использовать сам фильтр в качестве исходного материала для экстракции ДНК, как это реализуется в исследованиях средовой ДНК воды. Данный шаг значительно ускоряет и упрощает оригинальный протокол экстракции ДНК. Для отслеживания возможных контаминаций для каждого метода выделения ДНК было подготовлено по одному образцу без добавления почвы (отрицательный контроль выделения ДНК). В тексте и на рисунках используемые методы обозначены как «Magen», «PowerMax» и «Filtration». Концентрацию ДНК измеряли с помощью Qubit 2.0 с набором QuDye HS (Lumiprobe, Россия).

Амплификацию ДНК проводили парами праймеров, нацеленных на фрагмент COI: mlCOIintF (5'-GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC-3') (Leray et al., 2013) и Fol-degen-rev (5'-TANACYTCNGGRTGNCCRAARAAYCA-3') (Yang et al., 2021) с помощью программы: 95 °C в течение 5 мин; 16 циклов: 95 °C – 10 с, 62–46 °C (–1 °C за цикл) – 30 с, 72 °C – 1 мин; 20 циклов: 95 °C – 10 с, 46 °C – 30 с, 72 °C – 60 с; и финальная элонгация при 72 °C в течение 10 мин. Приготовление библиотек и секвенирование NGS были выполнены компанией BMKGENE (Ухань, Китай). Для контроля контаминации на этапе подготовки библиотеки был отсекуен контрольный образец ПЦР.

Биоинформатический анализ описан в разделе 2.5.1. Демультимплексированные fastq-файлы были обработаны с использованием пакета DADA2 (Callahan et al., 2016) в среде R (R Core Team, 2025). Обработка включала удаление низкокачественных ридов, подавление шумов, объединение парных ридов и удаление химер. Для обеспечения сопоставимости между образцами с разной глубиной секвенирования была проведена rareфикация до глубины 267 931 рида с помощью команды rarefy из пакета vegan (Oksanen et al., 2012). Полученные варианты последовательностей ампликонов (БПА или ASV - Amplicon Sequence Variants) были идентифицированы с использованием базы данных MetaCOX (Balech et al., 2022). После

удаления неклассифицированных последовательностей, последовательностей не принадлежащих Metazoa и последовательностей, представленных одним ридом, более детальное таксономическое назначение проводили на основе базы данных GenBank nt (Sayers et al., 2022; доступ 06.07.2025) с использованием blastn 2.16.0+ (Camacho et al., 2009). На основе анализа отрицательного контроля потенциально чужеродные последовательности были удалены с использованием пакета MicroDecon (McKnight et al., 2019). Пороги сходства для гена COI были установлены на уровне 97% для видового уровня, 95% для уровня рода и 90% для уровня семейства и отряда. Для каждого таксономического уровня из набора данных удаляли все последовательности, сходство которых с референсными последовательностями было ниже установленного порога. Оставшиеся риды суммировали для каждого уникального таксона в пределах каждого образца. Использование разных порогов сходства для разных таксономических уровней может приводить к тому, что число таксонов, идентифицированных на уровне семейств или отрядов, будет превышать число таксонов, идентифицированных на уровне родов и видов, поскольку более низкий порог сходства позволяет включать в анализ последовательности, не прошедшие фильтрацию на более строгих порогах. Полученные ASV также кластеризовали в операционные таксономические единицы (OTU - Operational taxonomic unit) с 97% сходством с использованием vsearch v2.30.0 (Rognes et al., 2016). Даже после описанных выше процедур фильтрации данных в результатах метабаркодинга оставался ряд таксонов, не характерных для населения почвы (Cephalopoda, Actinopterygii и Cnidaria). Эти нецелевые таксоны были вручную удалены из окончательных результатов. Исходные fastq-файлы доступны в базе данных NCBI (BioProject accession PRJNA1404656).

После биоинформатической обработки было создано шесть наборов данных для разных таксономических уровней беспозвоночных (отряды, семейства, рода, виды, OTU и ASV). Кластеризация последовательностей в OTU фактически представляет не идентифицированные «прокси» видов и позволяет проводить ориентировочную оценку видового разнообразия, не ограниченную наличием или отсутствием референсных баз данных. Точные варианты последовательностей ампликонов (ASV) фактически представляют уровень гаплотипов и также используются в современных работах. Для сравнения различных методов экстракции ДНК были построены кривые накопления на уровне рода для COI с использованием функции spsaccum из пакета vegan.

Различия в количестве таксонов, обнаруженных разными методами экстракции ДНК, сравнивали с использованием дисперсионного анализа (ANOVA), с последующим апостериорным критерием Тьюки с поправкой Тьюки – Крамера (команда TukeyHSD). Допущения ANOVA проверяли с помощью теста на нормальность распределения данных с

использованием критерия Шапиро – Уилка (shapiro.test) и теста на гомогенность дисперсий с использованием критерия Левена (leveneTest).

Для обеспечения сопоставимости результатов метабаркодинга, полученных с использованием разработанного протокола экстракции ДНК, с данными морфологического анализа, из дальнейшей обработки были исключены последовательности, аннотированные как Nematoda, Enchytraeidae и Tardigrada, поскольку эти группы не учитывались примененным нами методом сухой экстракции почвенных проб.

В качестве количественных метрик для результатов метабаркодинга мы использовали относительное число ридов (relative read abundance, RRA), рассчитанное как процент ридов, отнесённых к данному таксону, относительно общего числа ридов в образцах, и частоту встречаемости (frequency of occurrence, FOO), рассчитанную как процент образцов, в которых был обнаружен таксон (Deagle et al., 2019). В анализ включали только таксоны, идентифицированные с помощью морфологического метода. Связь между показателями обилия, полученными с помощью метабаркодирования (RRA и FOO), и обилием, оценённым с использованием морфологического метода, оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена. Анализ проводили на уровне семейств.

2.5.4. Оценка разнообразия почвенных беспозвоночных на модельных площадках с помощью метабаркодинга средовой ДНК.

На каждом экспериментальном участке, где проходила оценка функциональной активности почвенных беспозвоночных (см. раздел 2.1.), отбирали также пробы для анализа разнообразия беспозвоночных с использованием метабаркодинга средовой ДНК. На расстоянии не более 1 метра от места взятия монолита для учета макрофауны отбирали образец того же размера (25 × 25 × 10 см) в плотный полиэтиленовый пакет. Почву вместе с подстилкой тщательно перемешивали руками, не вынимая из пластикового пакета, после чего отбирали среднюю пробу массой 50 г. Образцы замораживали и хранили при –20 °С до выделения ДНК. Выделение ДНК проводили по разработанной методике (см. раздел 2.5.3) партиями по 5 образцов. Между парами партий проводили контрольные выделения ДНК без добавления почвенного образца. Для амплификации использовали стандартный участок гена COI. Для увеличения таксономического охвата, каждый образец амплифицировали также с помощью универсальных праймеров на консервативный V4 фрагмент гена 18S рДНК - TAREuk454FWD1 (5'-CCAGCASCYGCGGTAAT-3') и TAREukREV3 (5'-ACTTTCGTTCTTGATYR-3') (Stoeck et al., 2010) по программе, включающей начальную денатурацию при 95 °С в течение 5 мин; 10 циклов:

94 °C — 30 с, 50 °C — 45 с, 72 °C — 1 мин; затем 25 циклов: 94 °C — 30 с, 50 °C — 45 с, 72 °C — 1 мин; и финальную элонгацию при 72 °C в течение 10 мин. Приготовление библиотек и секвенирование были выполнены компанией BMKGENE (Ухань, Китай). Для контроля контаминации на этапе подготовки библиотеки был секвенирован один контрольный образец ПЦР (без добавления ДНК).

Биоинформатическую обработку данных проводили для каждого секвенированного региона по алгоритму DADA2 в программной среде R. Алгоритмы анализа были аналогичны описанным выше (разделы 2.5.1 и 2.5.3). Контрольные образцы выделения ДНК либо не содержали идентифицированные последовательности, либо содержали ДНК *Homo sapiens* и организмов, не связанных с почвенной средой (*Hemibagrus guttatus*), что указывает на отсутствие значимой кросс-контаминации между образцами. Идентификацию полученных последовательностей проводили на уровне рода, удаляя все последовательности, имеющие таксономическую аннотацию с уровнем сходства ниже 95 % для гена COI и ниже 97 % для гена 18S. После фильтрации по порогам сходства наборы данных для двух генов объединяли путём суммирования числа ридов для каждого рода в пределах каждого биотопа и повторности. В результате мы получили два набора данных, один из которых содержал число выявленных родов для отдельных проб ($n = 50$), а другой для каждого биотопа ($n = 10$). Аналогичные наборы данных были сформированы и для родового богатства, оценённого традиционным морфологическим методом.

2.6. Анализ зависимости между обилием, разнообразием и функциональной активностью почвенных сапрофагов.

Статистическую обработку данных выполняли в среде R (R Core Team, 2025). Для оценки различий исследуемых показателей между экспериментальными группами использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна (пакет FSA; (Ogle et al., 2022)). Для коррекции уровня статистической значимости при множественных сравнениях применяли поправку Бенджамини–Хохберга.

Для анализа изменений показателей в градиенте модельных биотопов и оценки связей между исследуемыми переменными использовали линейный регрессионный анализ (lm, пакет stats; R Core Team, 2025). Метод применяли для оценки зависимостей параметров функциональной активности от обилия, метаболической активности или разнообразия почвенных сапрофагов. Анализ проводили на исходных или логарифмически преобразованных данных; наилучшую регрессионную модель выбирали по максимальному значению

коэффициента детерминации (R^2). Нормальность распределения остатков проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка (shapiro.test). Различия и связи считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Глава 3. Зависимость функциональной активности сапрофагов от их обилия и метаболизма

В данной главе представлены закономерности, выявленные в масштабном эксперименте по оценке зависимости параметров функциональной активности почвенных сапрофагов от их обилия и метаболизма. Влияние макросапрофагов на деструкцию опада оценили с использованием метрики LRR, рассчитанной как отношение скоростей деструкции в мешках с разным размером ячеек (5 мм и 1,2 мм). Данная метрика позволяет оценить вклад макросапрофагов (преимущественно механическое разрушение) в совокупный процесс деструкции, осуществляемой всем комплексом почвенной фауны. Прямую оценку трофической активности сапрофагов проводили с помощью метода приманочных пластин (BLT). Оценку биотурбационной активности проводили на основе подсчёта количества трассирующих частиц диаметром 2 мм, мигрировавших вглубь почвы. Кроме того, для оценки биотурбации исследовали характер распределения изотопного состава углерода и азота в верхних 30 см почвы. Силу связи между параметрами функциональной активности, обилием и метаболизмом беспозвоночных оценивали с помощью регрессионного анализа.

3.1. Вклад в деструкцию опада и трофическая активность

3.1.1. Результаты

Обилие и метаболизм сапрофагов на экспериментальных площадках. Обилие сапрофагов сильно варьировало в разных пробах, поэтому статистически значимых различий между биотопами было не так много. Однако наибольшее среднее обилие как макро, так и мезосапрофагов было выявлено в биотопах средней тайги и зоне умеренных лесов (рисунок 3.1 А). Однако, в силу более высокой среднегодовой температуры, максимальные значения метаболической активности сообществ зафиксированы в низинном тропическом муссонном лесу (рисунок 3.1 Б). Основной вклад в метаболизм сообществ вносили дождевые черви, коллемболы и орибатида.

Обилие мезосапрофагов имело статистически значимую отрицательную связь со среднегодовой температурой ($R^2 = 0,20$), тогда как для макрофауны подобной зависимости не выявлено (рисунок 3.2).

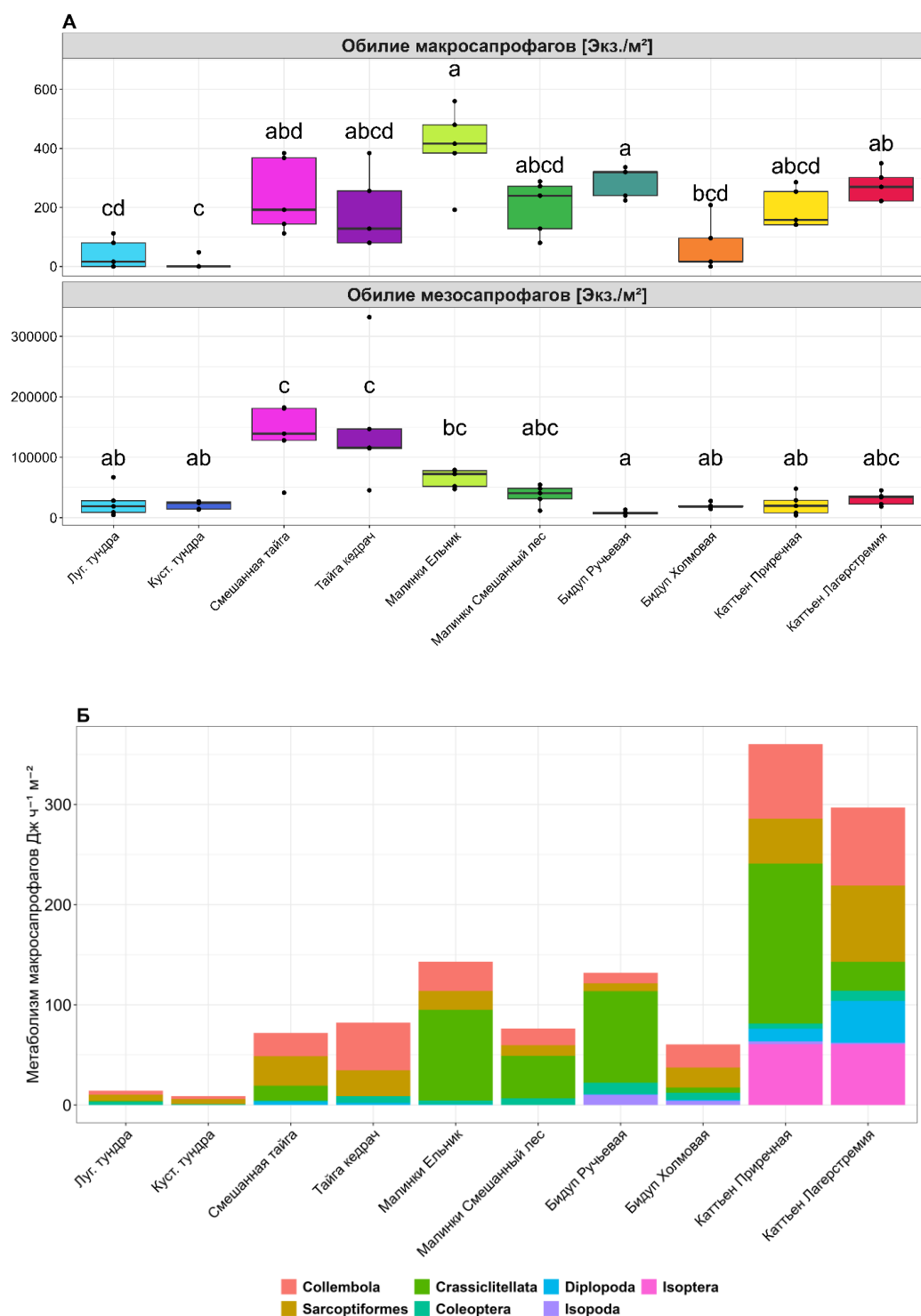


Рисунок 3.1. А - Общее обилие (экз. м⁻²) макро- и мезосапрофагов в исследованных экосистемах. Разные буквы обозначают статистически значимые различия между группами по критерию Данна ($p < 0,05$). Боксплоты показывают медиану и границы межквартильного размаха, усы $1,5 \times$ межквартильного размаха (IQR). Б - Интегральный метаболизм (Дж ч⁻¹ м⁻²) основных групп почвенных сапрофагов, рассчитанный с использованием среднегодовой температуры почвы (МАТ). Оценки метаболизма термитов приведены на основании литературных данных об их обилии на экспериментальных участках (Беляева и Тиунов, 2010).

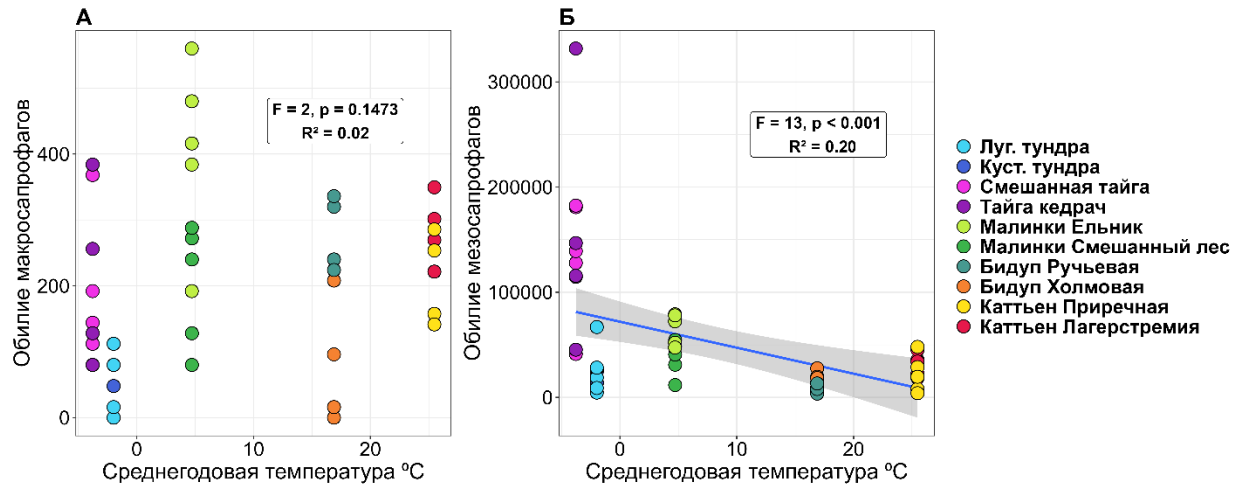


Рисунок. 3.2. Связь между численностью макросaproфагов (А) и мезосaproфагов (Б) и среднегодовой температурой. Приведены параметры линейной регрессии. Сплошная линия отражает статистически значимую связь ($p < 0,05$). Серая область показывает 95% доверительный интервал линии регрессии.

Зависимость функциональных параметров от температуры. Минимальная и максимальная скорости разложения опада зафиксированы в горной тундре и низинных тропических лесах соответственно. Скорость деструкции в мешках как с крупной, так и с мелкой ячейкой демонстрировала сильную положительную связь со среднегодовой температурой (МАТ, рисунок 3.3. А, Б). Потребление приманки bait lamina test также имело сильную положительную связь ($R^2 = 0,39$) с температурой месяца, в который проводились измерения (рисунок 3.3 В). Вклада макросaproфагов в деструкцию опада фактически не зависел от среднегодовой температуры (рисунок 6 Г, $R^2 = 0,09$).

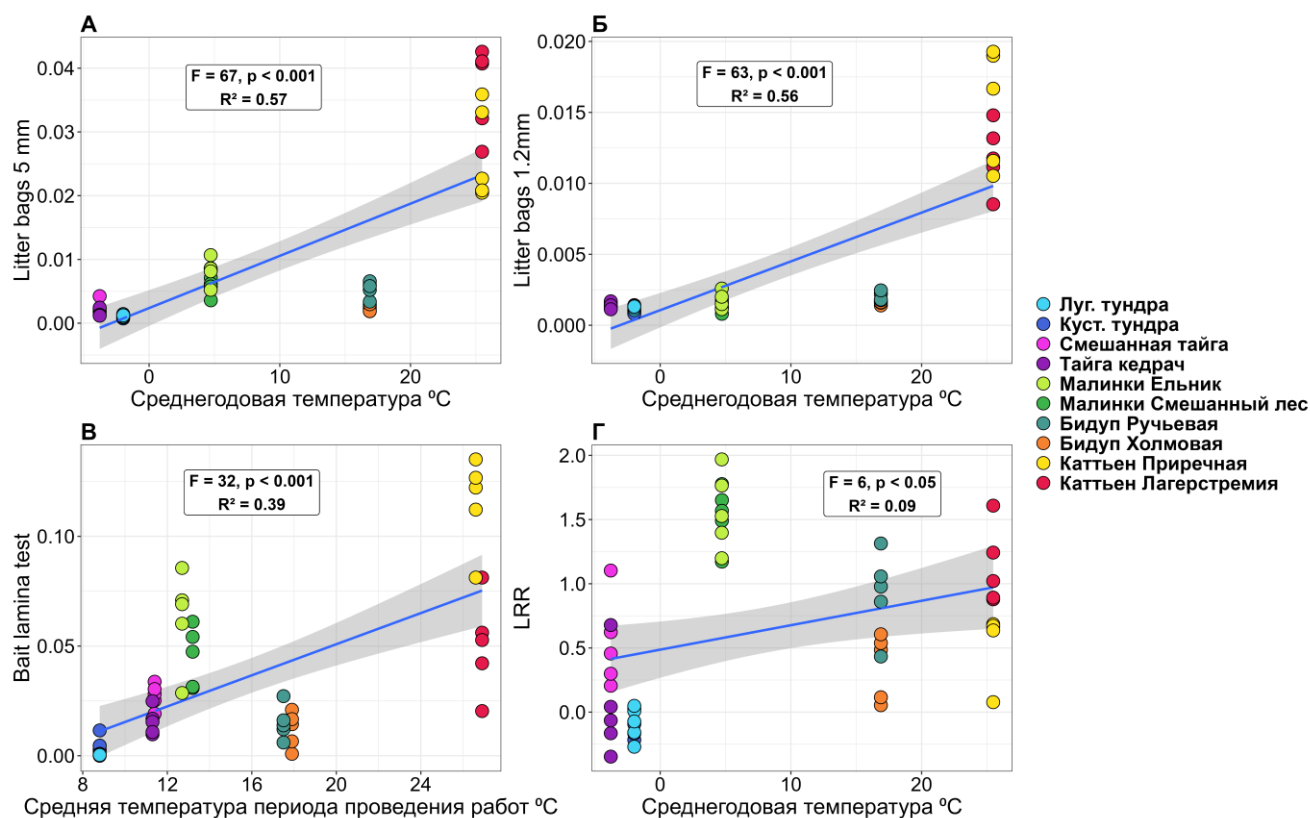


Рисунок 3.3. А, Б – связь между среднегодовой температурой и константой разложения опада k в мешках с ячейей 5 мм (А) и 1,2 мм (Б). В – связь между среднемесячной температурой в период проведения экспериментов и интенсивностью потребления приманки bait lamina test. Г – связь между вкладом макрофауны в деструкцию опада и среднегодовой температурой. Приведены параметры линейной регрессии. Сплошная линия отражает статистически-значимые связи ($p < 0,05$). Серая область вокруг линий регрессии показывает 95% доверительный интервал.

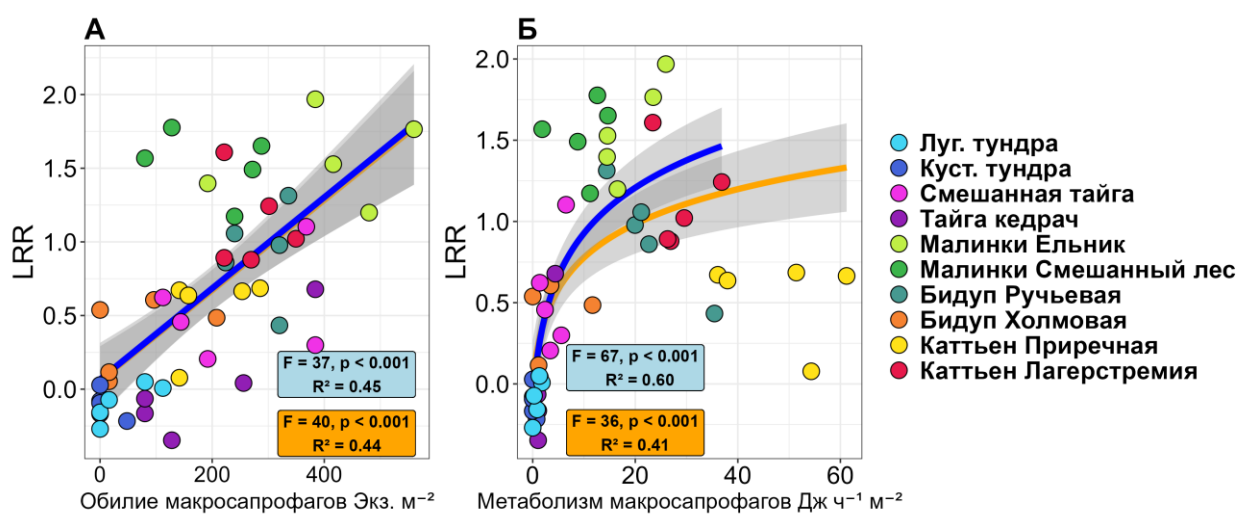


Рисунок. 3.4. Связь между вкладом макросaproфагов в деструкцию опада (LRR) и их численностью (экз. м⁻²) (А) и суммарным метаболизмом (Дж ч⁻¹ м⁻²) (Б). Цвет символов обозначает тип биотопа, в котором проводили измерения. Приведены параметры линейной или

логарифмической регрессии. Жёлтые и синие линии регрессии соответствуют зависимостям с включением и без включения приречного биотопа низинных тропиков, соответственно (см. текст). На левой панели линии регрессии совпадают.

Связь обилия и метаболизма макросапрофагов с их вкладом в деструкцию опада.

Вклад макросапрофагов в деструкцию опада (LRR) был значимо связан как с их обилием ($R^2 = 0,45$), так и с суммарным метаболизмом ($R^2 = 0,41$) (рисунок 3.4). Для корректной интерпретации полученных результатов необходимо учитывать специфику сообщества почвенных беспозвоночных в биотопе «Приречная» (низинные тропики). Ранее для этого участка была отмечена очень высокая численность инвазивного дождевого червя *Pontoscolex corethrus* (Тиунов, 2011), что подтверждается и нашими данными (рисунок 3.1 Б). Этот вид не питается растительными остатками: его рацион основан на углероде корневых выделений или тонкодисперсном органическом веществе, рассеянном в минеральной почве (Шиленкова и Тиунов, 2014). В связи с этим его вклад в разложение растительного опада в мешках, размещённых на поверхности почвы, был минимален. Это подтверждается заметным увеличением доли объяснённой дисперсии при исключении данного биотопа из анализа ($R^2 = 0,60$). Аналогичный паттерн наблюдался и при анализе связи между LRR и метаболизмом отдельных групп почвенной макрофауны (рисунок 3.5). Среди доминирующих таксонов только дождевые черви демонстрировали значимую связь с LRR ($R^2 = 0,39$), причём эта связь усиливалась при исключении биотопа «Приречная» ($R^2 = 0,58$).

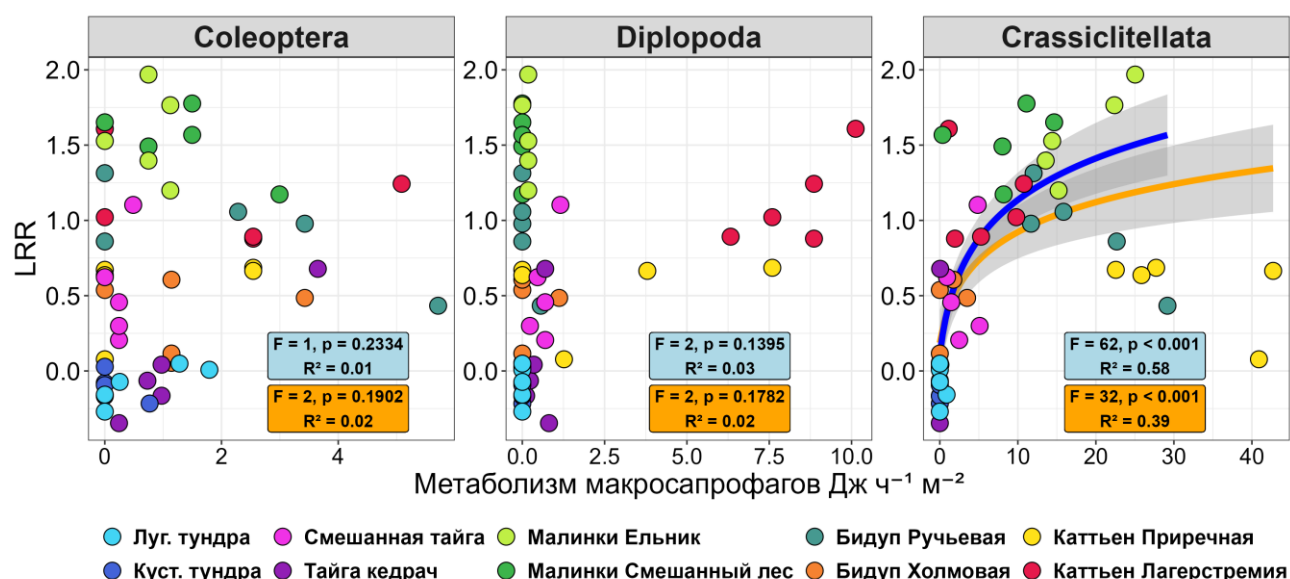


Рисунок 3.5. Связь между вкладом макрофауны в деструкцию опада и интегральным метаболизмом (Дж ч⁻¹ м⁻²) наиболее обильных групп сапрофагов. Жёлтые и синие линии регрессии соответствуют зависимостям с включением и без включения приречного биотопа

низинных тропиков, соответственно. Приведены параметры линейной (для жуков и диплопод) или логарифмической (для дождевых червей) регрессии. Серая область вокруг линий регрессии показывает 95% доверительный интервал.

Трофическая активность (BLT). Интенсивность потребления приманки в bait lamina test имела положительную связь с температурой ($R^2 = 0,39$ рисунок 3.3). Потребление приманки было значимо связано как с обилием, так и с метаболизмом макросапрофагов, однако метаболизм объяснял существенно бóльшую долю дисперсии ($R^2 = 0,73$), чем обилие ($R^2 = 0,19$) (рисунок 3.6). Среди доминирующих групп сапрофагов потребление приманки было связано с метаболизмом диплопод ($R^2 = 0,08$) и дождевых червей ($R^2 = 0,58$; рисунок 3.7).

Ни общее обилие, ни суммарный метаболизм наиболее обильных групп мезосапрофагов не коррелировали с интенсивностью потребления приманки (рисунки 3.6, 3.7).

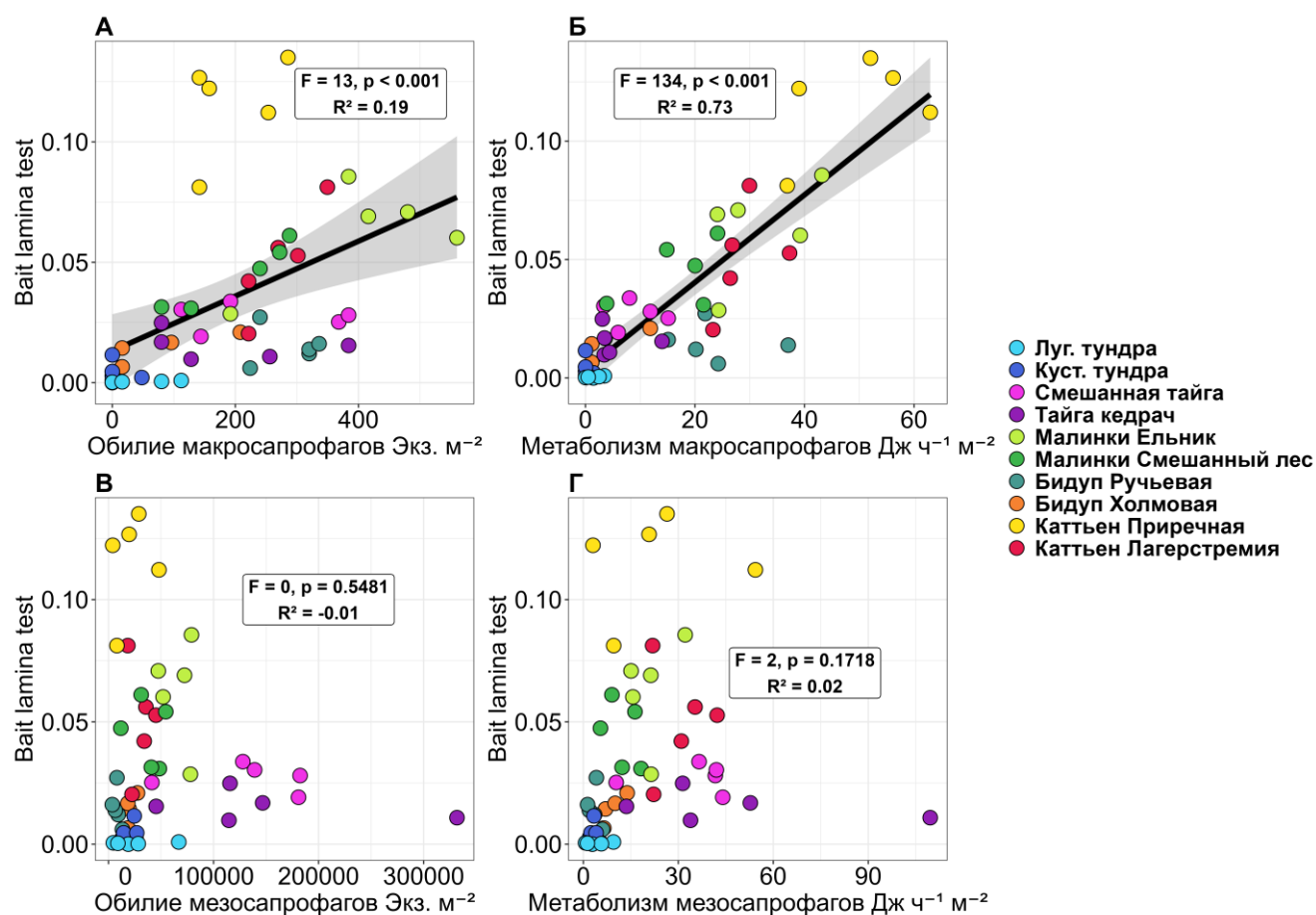


Рисунок. 3.6. Связь между потреблением приманки в тесте с приманочными пластинами (bait lamina test) и численностью (экз. m^{-2}) и интегральным метаболизмом (Дж $ч^{-1} m^{-2}$) макросапрофагов (А, Б) и мезосапрофагов (В, Г). Показаны параметры линейной регрессии. Серая область вокруг линий регрессии показывает 95% доверительный интервал.

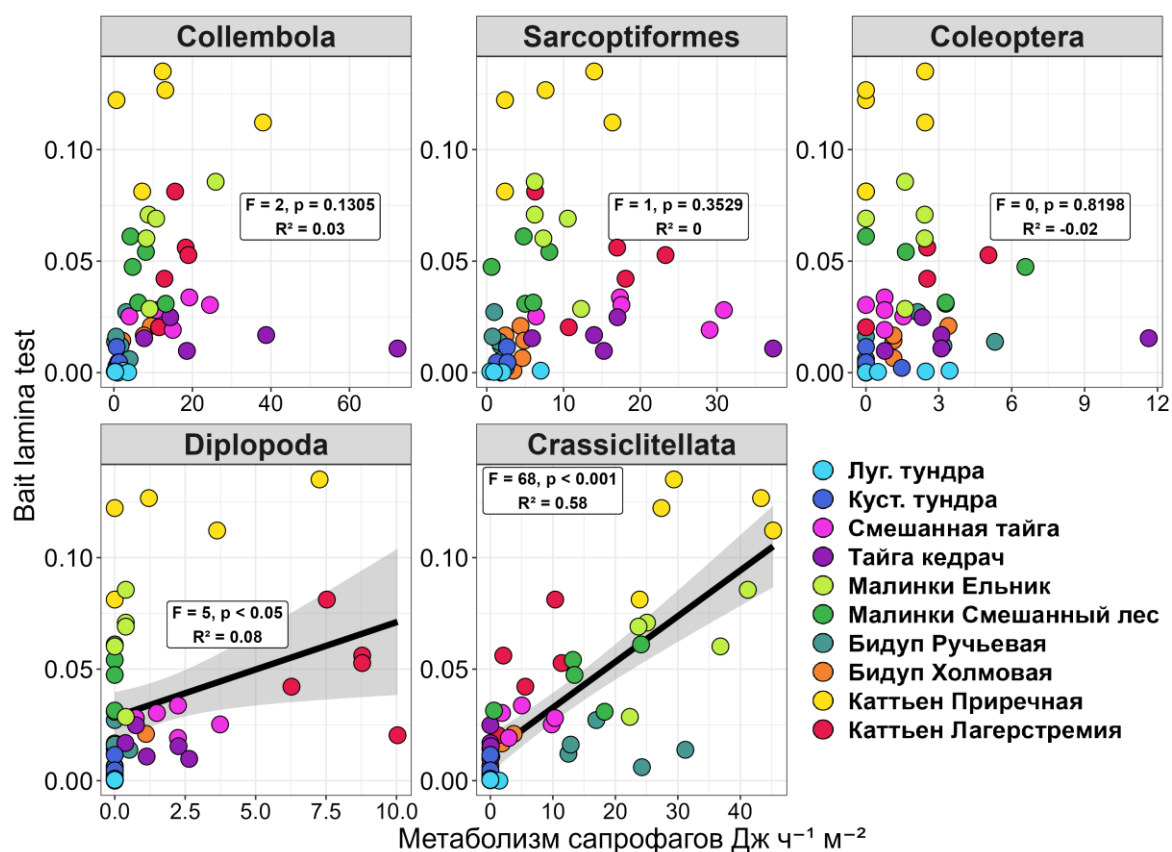


Рисунок 3.7. Связь между потреблением приманки в тесте с приманочными пластинами (bait lamina test) и интегральным метаболизмом доминирующих таксономических групп сапрофагов. Показаны параметры линейной регрессии.

Трофическая активность, измеренная с помощью bait lamina test, демонстрировала статистически значимую связь со вкладом макрофауны в деструкцию опада. При исключении биотопа «Приречная» низинных тропиков коэффициент детерминации R^2 составлял 0,52 (рисунок 3.8). При включении всех биотопов доля объяснённой дисперсии была значительно ниже, но оставалась статистически значимой ($R^2 = 0,15$).

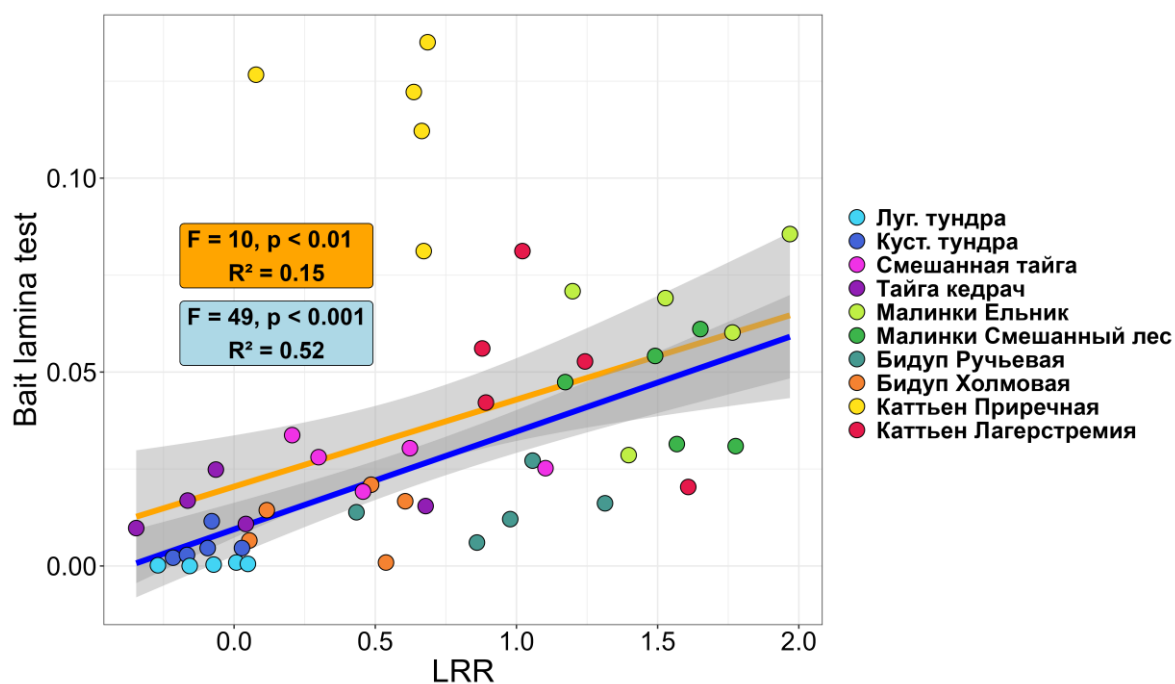


Рисунок 3.8. Связь между вкладом макрофауны в деструкцию опада (LRR) и трофической активностью почвенных сапрофагов, оцененной с помощью bait lamina test (BLT) с учетом и без учета биотопа «Приречная» (жёлтые и синие линии, соответственно).

3.1.2. Обсуждение

Скорость деструкции растительного опада закономерно возрастает от высоких широт к тропикам (Aerts, 1997; Berg and McClaugherty, 2008), что согласуется с полученными нами максимальными значениями констант разложения k в низинных тропических биотопах (рисунок 3.3). Однако роль почвенных сапрофагов в этом процессе не столь однозначна. Согласно одним метаанализам, вклад беспозвоночных в разложение растительных остатков увеличивается в широтном градиенте с ростом температуры и количества осадков (García-Palacios et al., 2013; Zeng et al., 2024), тогда как другие показывают, что макрофауна может играть особенно важную роль в засушливых или умеренных экосистемах (Li et al., 2024; Sagi and Hawlena, 2024). В работе (Heděnec et al., 2022) было рассчитано, что почвенные беспозвоночные в лесах умеренной зоны потребляют бóльшую долю поступающего на поверхность почвы опада (79,2 %) по сравнению с сообществами тропических экосистем (48,3 %). В глобальном эксперименте Дайаны Уолл не было обнаружено чётких различий влияния беспозвоночных на деструкцию растительных остатков между экосистемами тропических и умеренных широт (Wall et al., 2008), тогда как метаанализ Huang et al., (2020) не выявил климатических различий во влиянии дождевых червей на разложение опада. В нашем исследовании максимальный вклад макрофауны в деструкцию (величина LRR) был зафиксирован в лесах умеренной зоны, а не в низинных тропических биотопах, в которых общая скорость потери веса растительного материала была максимальна

(рисунок 3.3), что частично подтверждается описанными выше работами. Данный результат может быть связан с высокой микробной активностью во влажных тропических лесах (Gao et al., 2024), которая по своему эффекту могла быть даже выше вклада термитов, несмотря на их высокую активность в модельных биотопах (Беляева и Тиунов, 2010). Тем не менее, эти результаты противоречат метаанализу Zeng et al., (2024), который показал, что вклад беспозвоночных в деструкцию опада в 1,4 раза выше в тропических и субтропических лесах, чем в остальных типах лесных экосистем. Существенные различия в глобальных оценках вклада беспозвоночных в деструкцию опада могут быть связаны не только с обилием, но и с присутствием и соотношением отдельных таксономических и функциональных групп почвенных беспозвоночных. Данный вопрос более подробно разбирается в соответствующих частях диссертации (раздел 1.2; глава 5).

Мы обнаружили сильную и значимую связь между обилием и метаболизмом почвенных сапрофагов и их вкладом в деструкцию опада. Эта связь ожидаема, но продемонстрирована лишь в ограниченном числе исследований. Например, Хуанг с соавторами (Huang et al., 2020) по результатам метаанализа 40 работ показали сильную корреляцию между обилием дождевых червей и скоростью деструкции опада. Напротив, в метаанализе 46 исследований Peng et al., (2023) не было выявлено связи между обилием беспозвоночных и деструкцией. Отсутствие такой зависимости также показано в более узких экспериментальных работах, например, в недавнем исследовании в горном тропическом лесу (Castillo-Figueroa and Castillo-Avila, 2025). Для bait lamina test связь с обилием почвенных животных, как правило, не выявляется (Gongalsky et al., 2004; Römbke et al., 2006; Rozen et al., 2015). Тем не менее, (Birkhofer et al., 2011) обнаружили положительную связь между численностью коллембол и скоростью потребления приманки. Pelosi et al., (2020) показали связь между обилием энхитреид и трофической активностью, что частично противоречит данным (Birkhofer et al., 2011), которые не обнаружили влияния обилия энхитреид на потребление приманки в BLT. Наша работа впервые продемонстрировала сильную связь между измерениями трофической активности почвенных беспозвоночных и их общим обилием в широком климатическом градиенте.

Вклад размерных и таксономических групп. Среди двух размерных классов почвенной фауны потребление приманки в bait lamina test было связано с метаболизмом макрофауны, тогда как для мезофауны статистически значимой связи не обнаружено. Эти результаты согласуются с современными представлениями о метаболических потребностях почвенных беспозвоночных. Интегральный метаболизм педобионтов, как правило, не согласуется с законом энергетической эквивалентности, согласно которому метаболизм организмов разного размера в сообществе

остаётся постоянным за счёт большей численности организмов меньшего размера (Ehnes et al., 2014). Крупные почвенные животные вносят больший вклад в общий метаболизм почвенного сообщества, чем представители мезофауны, несмотря на существенно более высокую численность последних (Brown et al., 2004; Petersen and Luxton, 1982; Potapov et al., 2026). В связи с этим вклад макрофауны в разложение растительного опада превышает вклад мезофауны (Handa et al., 2014; Li et al., 2024; Peng et al., 2023; Sagi and Hawlena, 2024). Ранее высказывалось предположение, что аналогичная закономерность справедлива и для трофической активности, измеряемой с помощью bait lamina test (Vorobeichik and Bergman, 2023).

Среди отдельных групп почвенной фауны трофическая активность и вклад в деструкцию были сильно связаны только с метаболизмом дождевых червей. Эти результаты согласуются с метаанализом (Huang et al., 2020), показавшим, что общее обилие дождевых червей вносит значительный вклад в разложение опада в глобальном масштабе. Сильный вклад в деструкцию опада согласуется также и с энергетическим и массовым доминированием дождевых червей в сообществах почвенных беспозвоночных (Petersen and Luxton, 1982; Potapov et al., 2026). Термиты также являются важной группой почвенных сапрофагов (Zeng et al., 2024). Однако в нашем эксперименте было только две экосистемы с высокой численностью термитов, что не позволило установить прямые связи с их численностью и метаболизмом. В некоторых сообществах вклад других сапрофагов, таких как коллемболы, личинки двукрылых или энхитреиды (Birkhofer et al., 2011; Frouz et al., 2015a; Pelosi et al., 2020), может быть существенным. Однако в нашем наборе данных, помимо дождевых червей, только диплоподы демонстрировали значимое, хотя и слабое, влияние на потребление приманки BLT.

Сравнение двух методов. Используемые в наших экспериментах подходы к оценке трофической активности почвенных сапрофагов различаются по пространственному охвату. Мешки с опадом размещаются на поверхности почвы, обеспечивая доступ к субстрату для широкого спектра почвенных и подстилочных сапрофагов. Напротив, пластины BLT располагаются в толще верхнего горизонта почвы, и приманка может потребляться более узким набором организмов. Методы также различаются по временному масштабу. BLT отражает трофическую активность животных за короткий период (7–10 дней), тогда как скорость разложения опада представляет собой интегральную оценку трофической активности за 6–12 месяцев. Тем не менее, вклад почвенных макросапрофагов в разложение опада и оценки трофической активности, полученные с помощью BLT, демонстрировали сходную вариацию в исследованных экосистемах. Это согласуется с немногочисленными экспериментальными работами, в которых одновременно применялись оба подхода (Andriamparany et al., 2025; Mbodj

et al., 2010). Таким образом, наши результаты позволяют предположить, что быстрая оценка трофической активности почвенных сообществ с помощью bait lamina test может служить индикатором вклада почвенной фауны в разложение растительного опада в крупномасштабных исследованиях.

Наш эксперимент позволил выявить ожидаемую, но ранее экспериментально не подтвержденную, зависимость функциональной роли почвенных макросапрофагов от их обилия и метаболической активности на широком географическом градиенте. Однако он имеет ряд очевидных методологических ограничений, касающихся как характеристики почвенного населения, так и оценки функциональных параметров. Учёт почвенной фауны проводился однократно, т.е. сезонная динамика сообществ не принималась во внимание. Кроме того, точность учета почвенных животных традиционными методами невелика (André et al., 2002), а метод мешков с опадом часто искажает реальную динамику разложения растительных остатков (Bokhorst and Wardle, 2013; Bradford et al., 2002; Prescott, 2005). Для расчёта метаболической активности мы использовали литературные данные по массе тела животных, что потенциально вносит дополнительную ошибку в наши оценки. Кроме того, для расчета метаболизма мы использовали среднегодовую температуру, что, несомненно, является большим упрощением. Мы также не учитывали снижение активности животных в сухой сезон в тропиках. Тем не менее, мы получили сильные и значимые связи между вкладом фауны в деструкцию опада, трофической активностью почвенных животных и их обилием и метаболизмом, а отклонения от этих зависимостей имеют чёткие биологические объяснения. Это указывает на то, что обширные данные по обилию и составу почвенных сапрофагов в различных биотах могут быть эффективно интегрированы в биогеохимические модели (Filser et al., 2016). Такая интеграция позволит повысить точность прогнозов изменений углеродного баланса экосистем и сопутствующих биогеохимических процессов, которые могут возникнуть в результате сдвигов в сообществах почвенных животных под влиянием глобального потепления или антропогенных нарушений (Eisenhauer et al., 2023; Goncharov et al., 2023).

3.2. Связь активности дождевых червей с биотурбацией

3.2.1 Результаты

Интенсивность и глубина миграции частиц бисера варьировали между биотопами. Наибольшая интенсивность погружения частиц наблюдалась в тропических биотопах, на что указывают более высокие коэффициенты S . Однако частицы оставались в пределах верхних 3-5 см почвенного профиля. В северной тайге и в лесах умеренной зоны миграция была в среднем менее интенсивной, но частицы обнаруживались на значительно большей глубине (рисунок 3.9) и часто образовывали линейные скопления в норах дождевых червей (рисунок 3.10). Максимальная глубина обнаружения бисера (13 см) зафиксирована в мертвопокровном ельнике умеренной зоны (данные не показаны).

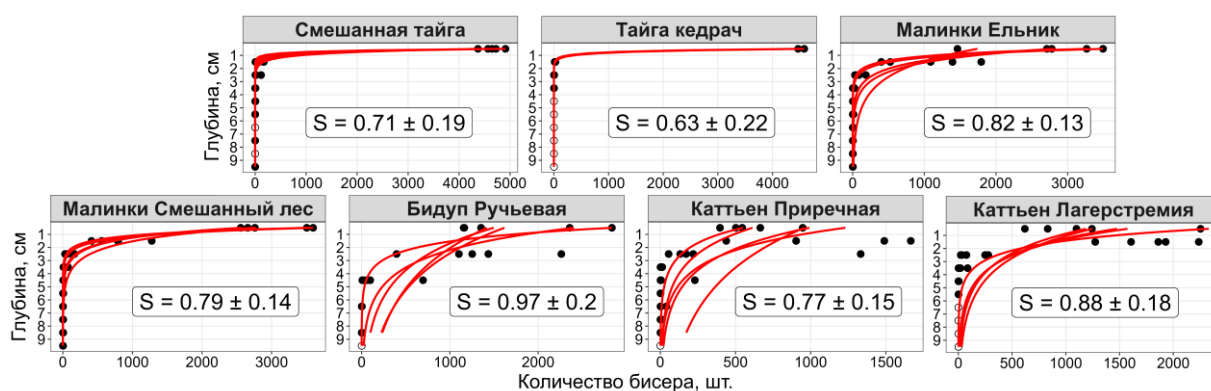


Рисунок 3.9. Зависимость количества частиц бисера от глубины почвенного профиля после года экспозиции. Пустые кружки соответствуют пробам, в которых частицы бисера не обнаружены. Красные линии отражают регрессию экспоненциальной модели $N = b \cdot e^{-S \cdot d}$ для каждой повторности, где N – количество частиц бисера, d – глубина (см). Для каждого биотопа приведены усреднённые ($n = 5$) значения коэффициента S и его стандартные ошибки.

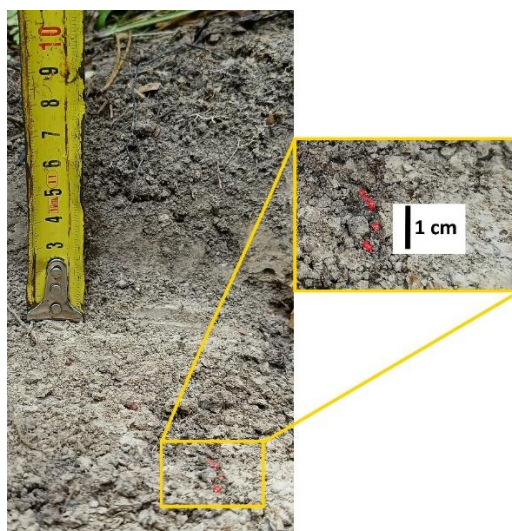


Рисунок 3.10. Цепочки бисера в норе дождевого червя на глубине 9 см. Мертвопокровный ельник в окрестностях биогеоценологической станции «Малинки».

Интенсивность миграции бисера возрастала с увеличением интенсивности метаболизма дождевых червей ($R^2 = 0,20$; рисунок 3.11). Использование активности (т.е. скорректированного на температуру обилия) дождевых червей вместо метаболизма приводило к увеличению данной связи ($R^2 = 0,44$; рисунок 3.12 А). Остатки модели не были связаны ни с гранулометрическим составом почвы, ни со среднегодовым количеством осадков (рисунок 3.12, Б, В), что подтверждает преобладание биотурбации над пассивным переносом частиц.

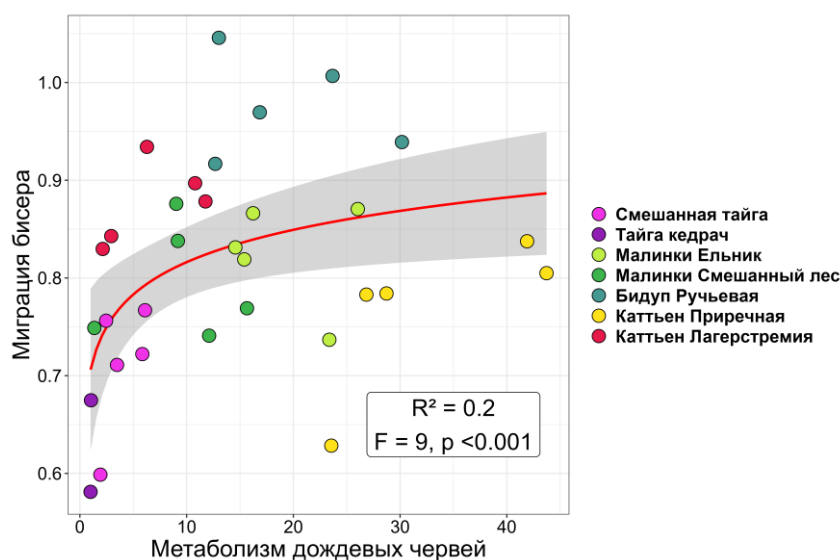


Рисунок 3.11. Связь между суммарным метаболизмом дождевых червей и интенсивностью погружения частиц бисера. Метаболизм дождевых червей рассчитывали исходя из эмпирических закономерностей зависимости метаболической активности от биомассы беспозвоночных и температуры (Раздел 2.2; Ehnes et al., 2011). Использовали среднегодовую температуру почвы на глубине 0-5 см, полученную из базы SoilTemp (Lembrechts et al., 2022).

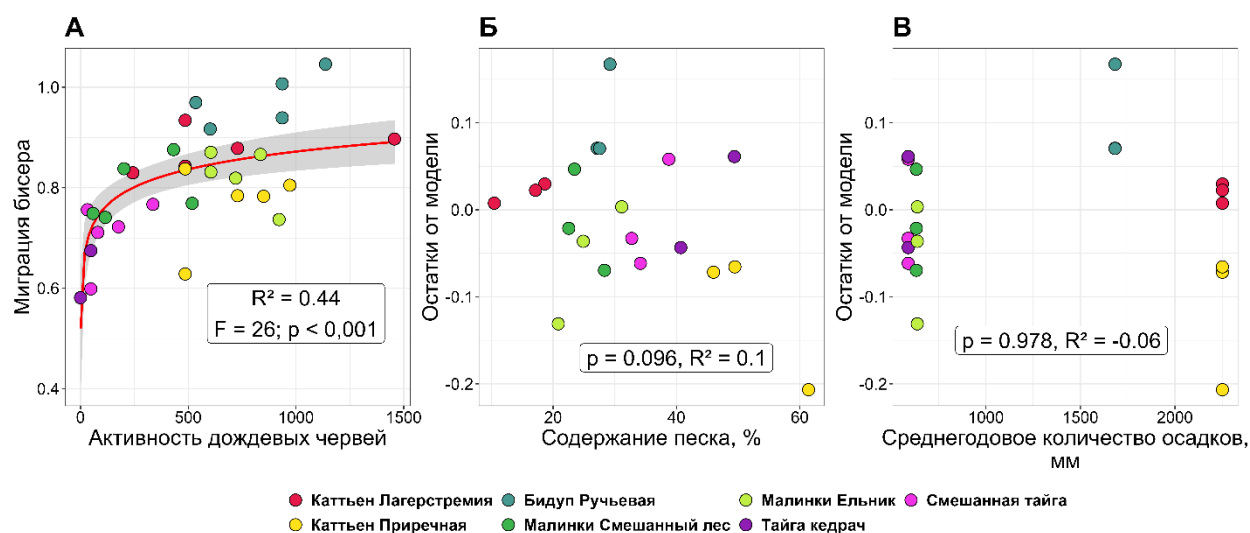


Рисунок 3.12. Связь между интенсивностью миграции частиц бисера и активностью дождевых червей (А), а также зависимость остатков регрессии от содержания песка (Б) и среднегодового количества осадков (В). Цвет символов обозначает тип биотопа, в котором проводили измерения. Активность дождевых червей оценивали на основании их общего обилия и температурного коэффициента $Q_{10} = 2$.

3.2.2. Обсуждение

Большая часть частиц бисера оставалась в верхних 3–5 см почвы (рисунок 3.9), что согласуется с приуроченностью большинства видов дождевых червей, и их активности, к верхним горизонтам почвы. Предыдущие исследования с трассирующими частицами также показали, что перемещение почвенных видов в основном ограничено верхними горизонтами, несмотря на наличие более глубоких ходов (Sapowicz et al., 2021). Норные дождевые черви способны переносить частицы на бóльшую глубину (Rillig et al., 2017; Zhang et al., 2025), но обычно имеют относительно невысокую численность. Соответственно, частицы, обнаруженные ниже 5 см, были редки и встречались либо в виде единичных частиц, либо в виде коротких цепочек (рисунок 3.10), вероятно, связанных с ходами норных видов. Разные экологические группы дождевых червей будут оказывать различное влияние на интенсивность миграции бисера. Однако мы не разделяли дождевых червей на функциональные группы, главным образом из-за слабой разработанности морфо-функциональных классификаций (например, по Bouché, 1977) применительно к фауне Юго-Восточной Азии. Разделение вклада этих групп представляет собой важную задачу для будущих исследований.

Для коррекции температурной зависимости активности беспозвоночных обычно используют два основных подхода. Первый основан на расчётах с использованием эмпирических зависимостей между биомассой и метаболизмом в сочетании с температурной зависимостью скоростей биохимических реакций, описываемой уравнением Аррениуса (Clarke, 2004; Ehnes et

al., 2011). Этот подход был использован нами для температурной коррекции активности беспозвоночных при анализе их связи с трофической активностью и вкладом в деструкцию опада. Второй подход заключается в прямом умножении биомассы на коэффициент, полученный из лабораторных оценок скоростей развития или потребления пищи при разных температурах. Этот подход применяли, например, Taylor et al., (2019) для оценки биотурбационной активности дождевых червей и муравьёв; Frouz et al., (2015a) — для оценки количества потребляемого опада личинками двукрылых. В данном эксперименте мы использовали второй подход, опираясь на температурный коэффициент Q_{10} , который неоднократно измерялся для разных видов дождевых червей (Bolton and Phillipson, 1976; Šustr and Pižl, 2010; Uvarov and Scheu, 2004). Оба подхода позволяют учитывать температурную зависимость активности почвенных животных, однако в их основе лежат оценки биомассы. Между тем, как отмечалось выше, число частиц бисера, перенесённых в глубокие слои почвы, связано скорее с количеством «актов рытья» и численностью животных, а не с суммарной живой биомассой. Это предположение подтверждается тем, что связь между коэффициентом S и расчётным метаболизмом сообщества дождевых червей слабее ($R^2 = 0,195$; рисунок 3.11), чем между S и активностью, вычисленной на основе общей численности ($R^2 = 0,44$; рисунок 3.12).

Активность дождевых червей объясняла менее половины наблюдаемой вариации интенсивности миграции бисера. Помимо ряда ограничений данного эксперимента, описанных выше, это может быть связан с тем, что мы не учитывали других почвенных инженеров — прежде всего общественных насекомых, таких как термиты и муравьи, которые играют заметную роль в формировании почвенного профиля, особенно в тропических экосистемах. Их влияние на биотурбацию часто носит локальный характер и, по-видимому, требует иных подходов, например, визуальной оценки зоогенных структур (Wu et al., 2025).

Таким образом, в широком климатическом градиенте нами обнаружена значимая связь между активностью дождевых червей и интенсивностью биотурбации. Глубина проникновения инертных частиц может служить простым количественным показателем биотурбации в различных экосистемах, что позволит улучшить глобальные оценки интенсивности и последствий инженерной активности почвенной фауны.

3.3. Связь обилия и метаболизма макросaproфагов с распределением стабильных изотопов углерода и азота в почвенном профиле

3.3.1. Результаты

Общее содержание углерода и азота снижалось с увеличением глубины почвенного профиля. При этом значения $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ увеличивались (рисунок 3.13).

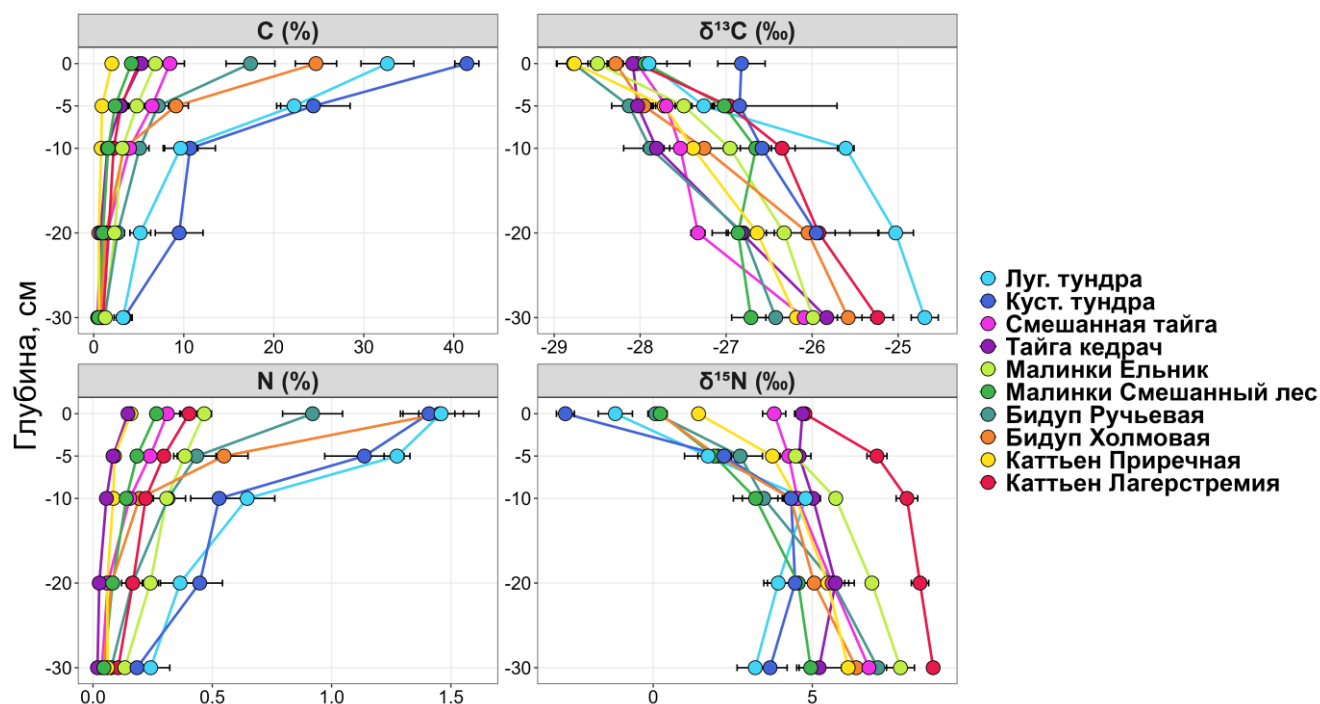


Рисунок 3.13. Распределение общего содержания углерода и азота и их изотопного состава по почвенному профилю исследованных биотопов. Показаны средние значения и ошибка среднего для каждой глубины ($n = 5$).

Значения $\text{Ln}(-\beta)$, рассчитанные по изотопным профилям, были выше для азота, чем для углерода. Для обоих элементов $\text{Ln}(-\beta)$ не имели статистически значимой связи со среднегодовой температурой (рисунок 3.14; $p < 0,1$). Статистически значимой связи между $\text{Ln}(-\beta)$ для азота и углерода и обилием макросaproфагов также не выявлено, однако отмечена положительная связь с их общим метаболизмом (рисунок 3.15).

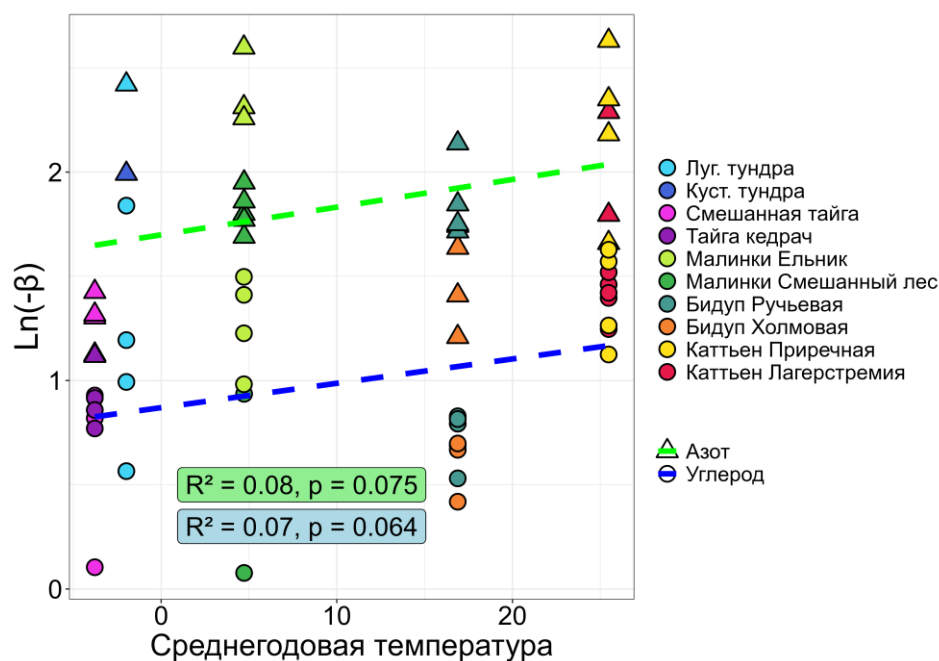


Рисунок 3.14 Зависимость $\text{Ln}(-\beta)$ для азота и углерода от среднегодовой температуры. Треугольники и круги показывают статистически-значимые коэффициенты β_N и β_C для отдельных повторностей. Зелёным цветом показаны β_N , синим β_C . Заливка символов отражает тип биотопа, в котором проводили измерения.

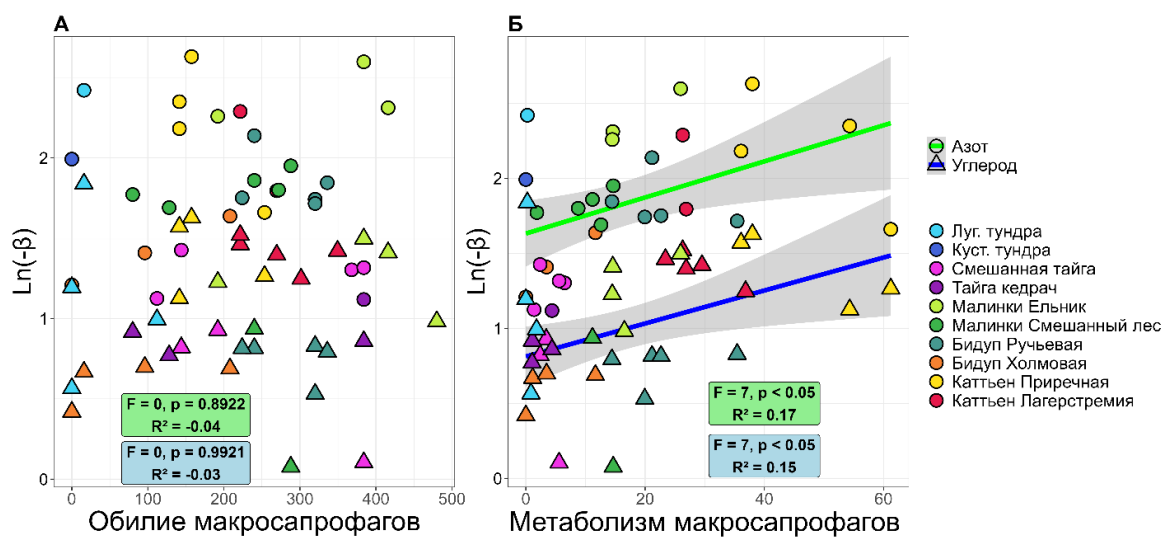


Рисунок 3.15. Зависимость $\text{Ln}(-\beta)$ для азота и углерода от обилия и метаболизма макросaproфагов. Треугольники и круги показывают статистически значимые коэффициенты $\text{Ln}(-\beta_N)$ и $\text{Ln}(-\beta_C)$ для отдельных повторностей. Показаны параметры регрессии между коэффициентами бета и суммарным обилием и метаболизмом доминирующих групп почвенных saproфагов. Зелёным цветом показаны $\text{Ln}(-\beta_N)$, синим $\text{Ln}(-\beta_C)$. Сплошная линия отражает статистически значимые регрессии ($p < 0,05$). Серая область вокруг линий регрессии показывает 95% доверительный интервал для среднего значения предсказанных β -коэффициентов.

Среди доминирующих групп макросaproфагов была выявлена слабая положительная связь между $\text{Ln}(-\beta_C)$ и метаболизмом *Diplopoda* ($R^2 = 0,14$); $\text{Ln}(\beta_N)$ и метаболизмом дождевых червей ($R^2 = 0,18$) (рисунок 3.16).

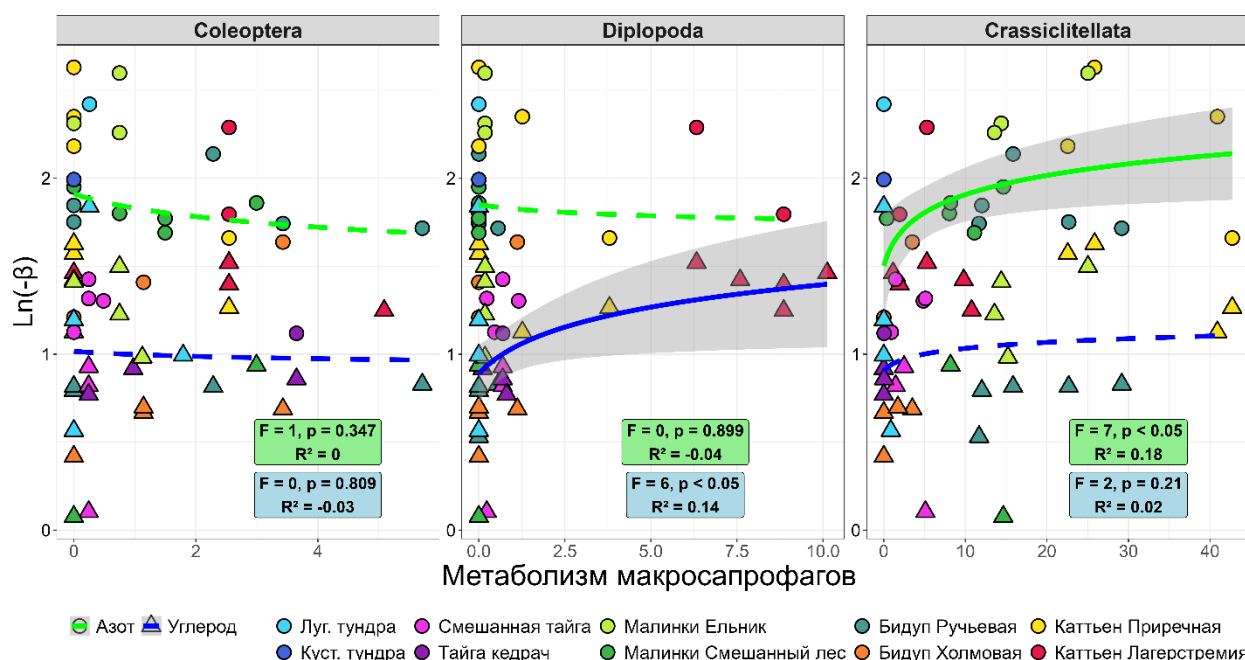


Рисунок 3.16. Зависимость $\text{Ln}(-\beta_C)$ для азота и углерода от суммарного метаболизма отдельных доминирующих таксономических групп макросaproфагов. Треугольники и круги показывают статистически-значимые коэффициенты $\text{Ln}(-\beta_N)$ и $\text{Ln}(-\beta_C)$ для отдельных повторностей. Показаны параметры линейной или логарифмической регрессии. Зелёным цветом показаны β_N , синим β_C . Сплошная линия отражает статистически-значимые связи ($p < 0,05$). Пунктирная линия показывает статистически не значимые зависимости.

3.3.2. Обсуждение

Механизмы, посредством которых почвенные беспозвоночные влияют на вертикальное распределение стабильных изотопов углерода и азота в почвенном профиле, определяются особенностями биогеохимических циклов этих элементов и свойствами конечных продуктов их минерализации. Большая часть углерода, поступающего в почву, в процессе минерализации превращается в углекислый газ и покидает систему (Berthelin et al., 2022). В связи с этим основным механизмом прямого влияния почвенных беспозвоночных на изотопный профиль углерода является физический перенос в нижние горизонты почвы слабо разложившегося органического вещества, обеднённого тяжёлым изотопом углерода. Подобные процессы переноса описаны для различных групп почвенных беспозвоночных (Angst et al., 2024; Chamberlain et al., 2006; Frouz et al., 2015b). Основные минеральные формы азота (аммоний, нитрат, мочевины) хорошо растворимы в воде и способны мигрировать по почвенному профилю с водными потоками. Роющая деятельность почвенных беспозвоночных, в частности дождевых

червей, может способствовать увеличению водопроницаемости почвы и, как следствие, усилению вертикального переноса соединений азота (Domínguez et al., 2004; Manzoni and Porporato, 2009; Schimel and Bennett, 2004; Wang et al., 2005). Прямое влияние почвенных беспозвоночных на перераспределение органического вещества и растворимых соединений в почвенном профиле должно приводить к уменьшению модуля коэффициентов β , отражающих скорость изменения изотопного состава с глубиной. Как следствие, можно ожидать отрицательную связь модуля коэффициента β с обилием и активностью беспозвоночных.

Другой возможный механизм связан с косвенным воздействием беспозвоночных на микробные сообщества. Присутствие почвенной макрофауны стимулирует активность микроорганизмов за счёт измельчения органических остатков, изменения структуры почвы и других процессов (Angst et al., 2024; Frouz et al., 2006). Усиление микробной активности сопровождается увеличением интенсивности биохимических превращений органического вещества и, соответственно, более выраженным изотопным фракционированием (Fernandez and Cadisch, 2003; Šantrůčková et al., 2000). В результате данный механизм должен приводить к увеличению модуля β при увеличении активности беспозвоночных.

Вопреки первоначальным предположениям, мы не обнаружили связь между обилием макрофауны и характером вертикального распределения изотопной подписи углерода и азота в почвенных профилях. Однако суммарный метаболизм сапрофагов показал слабую, но статистически значимую положительную связь с $\ln(-\beta)$ ($R^2 = 0,17$ для $\ln(-\beta_N)$ и $R^2 = 0,15$ для $\ln(-\beta_C)$). Это указывает на то, что с ростом метаболизма животных модуль β возрастает, т.е. интенсифицируются процессы микробной деструкции органического вещества. Полученные результаты позволяют предположить, что влияние почвенных беспозвоночных на формирование изотопных профилей в исследованном широтном градиенте реализуется преимущественно косвенно — через регулирование активности микробных сообществ, а не путём непосредственного переноса органического вещества или минеральных соединений по почвенному профилю. Такое объяснение согласуется с тем, что микроорганизмы рассматриваются как основные агенты биохимической трансформации органического вещества почвы (Kallenbach et al., 2016), тогда как животные-педобионты оказывают преимущественно регулирующее воздействие на микробные сообщества посредством избирательного выедания, биотурбации и изменения физических свойств среды (Aira and Domínguez, 2011; Angst et al., 2024). Отсутствие выраженной связи между обилием макрофауны и коэффициентами β можно объяснить также относительно небольшой биомассой почвенных беспозвоночных по сравнению с биомассой корневых систем растений и микроорганизмов (Bar-On et al., 2018; Fierer et al., 2009).

Вследствие этого непосредственный вклад беспозвоночных в перераспределение органического вещества в почвенном профиле, вероятно, существенно уступает влиянию процессов, определяемых поступлением корневого углерода и количеством микробной биомассы и некромассы.

Низкие значения коэффициентов детерминации (R^2) указывают, что влияние метаболической активности сапрофагов объясняет лишь небольшую долю вариации $\ln(-\beta)$. Следовательно, интегральный показатель изотопного профиля (β), по-видимому, не может рассматриваться как надёжный индикатор интенсивности биотурбации в исследованных экосистемах.

3.4. Заключение

Нами был проведён комплекс экспериментов по оценке разных компонентов функциональной активности почвенных беспозвоночных в широком климатическом градиенте. Мы показали, что обилие, и в особенности метаболизм или активность, сапрофагов имеют сильную связь с вкладом макрофауны в деструкцию опада, показателем трофической активности и интенсивностью миграции частиц по почвенному профилю. Не все размерные и функциональные группы почвенного населения оказывали значимый вклад в измеренные экосистемные процессы. Наиболее важной группой во всех исследованных процессах были дождевые черви, что согласуется с их энергетическим доминированием в почвенных экосистемах.

В ходе экспериментов нами был предложен метод, позволяющий количественно оценивать интенсивность перемещения твёрдых частиц в почвенном профиле, что можно интерпретировать как прямой индикатор интенсивности биотурбации. Действительно, интенсивность перемещения стеклянного бисера достоверно ($R^2 = 0,44$) коррелировала со скорректированным на температуру обилием дождевых червей. С другой стороны, значения $\ln(-\beta)$, отражающие распределение изотопного состава углерода и азота в почвенном профиле, не выявили закономерностей, указывающих на активный перенос свежего органического углерода в глубокие слои почвы при биотурбации, но указывают на стимуляцию беспозвоночными, в особенности дождевыми червями, микробной активности почвы.

Многие оцениваемые нами параметры (деструкция опада, миграция бисера) были получены на основе длительных измерений на протяжении года, в то время как оценка обилия беспозвоночных проводилась однократно в период закладки экспериментов. В нашей работе этот

очевидный методический пробел мог отчасти нивелироваться широким климатическим градиентом и отбором проб в период высокой активности беспозвоночных. Кроме того, в большинстве случаев эксперименты были заложены в хорошо исследованных экосистемах, и полученные нами оценки обилия беспозвоночных соответствовали результатам ранее проведенных исследований в низинных и горных лесах южного Вьетнама в национальных парках Катъен и Бидуп-Нуйба (Аничкин и др., 2007; Тиунов, 2011), в зоне умеренных лесов в окрестностях биогеоценологической станции Малинки (Гиляров, 1983; Rozanova et al., 2022); в северной тайге в окрестностях Енисейской экологической станции «Мирное» (Рыбалов и Воробьева, 2002); в тундрах горы Вудъяврчорр на территории Полярно-Альпийского ботанического сада им. А.Н. Аврорина (Зенкова и др., 2011; Леонов и др., 2015). Однако при проведении более детальных исследований учёт сезонной динамики обилия и метаболизма беспозвоночных может существенно повысить точность оценки их суммарной активности в течение года.

Тем не менее, установленные нами статистически значимые связи показывают, что существующие данные по обилию и структуре сообществ почвенных беспозвоночных могут служить основой для оценки их роли в глобальных процессах. Это, в свою очередь, позволит повысить надёжность моделей, описывающих динамику почвенного углерода и другие значимые экосистемные параметры.

Глава 4. Метабаркодинг сообществ почвенных беспозвоночных

4.1. Влияние методов выделения ДНК и процедур фильтрации на результаты метабаркодинга искусственной смеси почвенных беспозвоночных

В данном разделе представлены результаты эксперимента, нацеленного на оценку эффективности метабаркодинга в определении таксономического состава почвенных беспозвоночных. Для этого мы приготовили 15 идентичных искусственных смесей из 24 видов почвенных беспозвоночных разных филогенетических групп, относящихся к 23 родам, 16 семействам и 8 отрядам. Для выделения ДНК использовали пять различных методов. Подготовку библиотек провели с двумя температурами отжига праймеров (45 и 48 °C). При пост-биоинформатической обработке результатов метабаркодинга фиксировали количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов после ключевых этапов: использование двух баз данных, фильтрация по уровню сходства и фильтрация по числу редких ридов.

4.1.1. Результаты

В результате секвенирования получено 810 736 необработанных ридов. После биоинформатической обработки осталось 266 331 рид, которые были сгруппированы в 184 точных варианта последовательностей ампликонов (ASV). Эти ASV были идентифицированы как 49 видов, относящихся к 41 роду и 29 семействам беспозвоночных. Ещё 17 таксонов были определены на надвидовом уровне (род или семейство) (рисунок 4.1). В общей сложности из 24 видов, входивших в состав модельного сообщества, 16 были выявлены с использованием всех вариантов выделения ДНК до пост-биоинформатической обработки; 8 видов не были обнаружены ни одним из методов, однако, из них 2 вида (*Fridericia ratzei*, *Protaphorura armata*) было идентифицировано на уровне рода (рисунок 4.1).

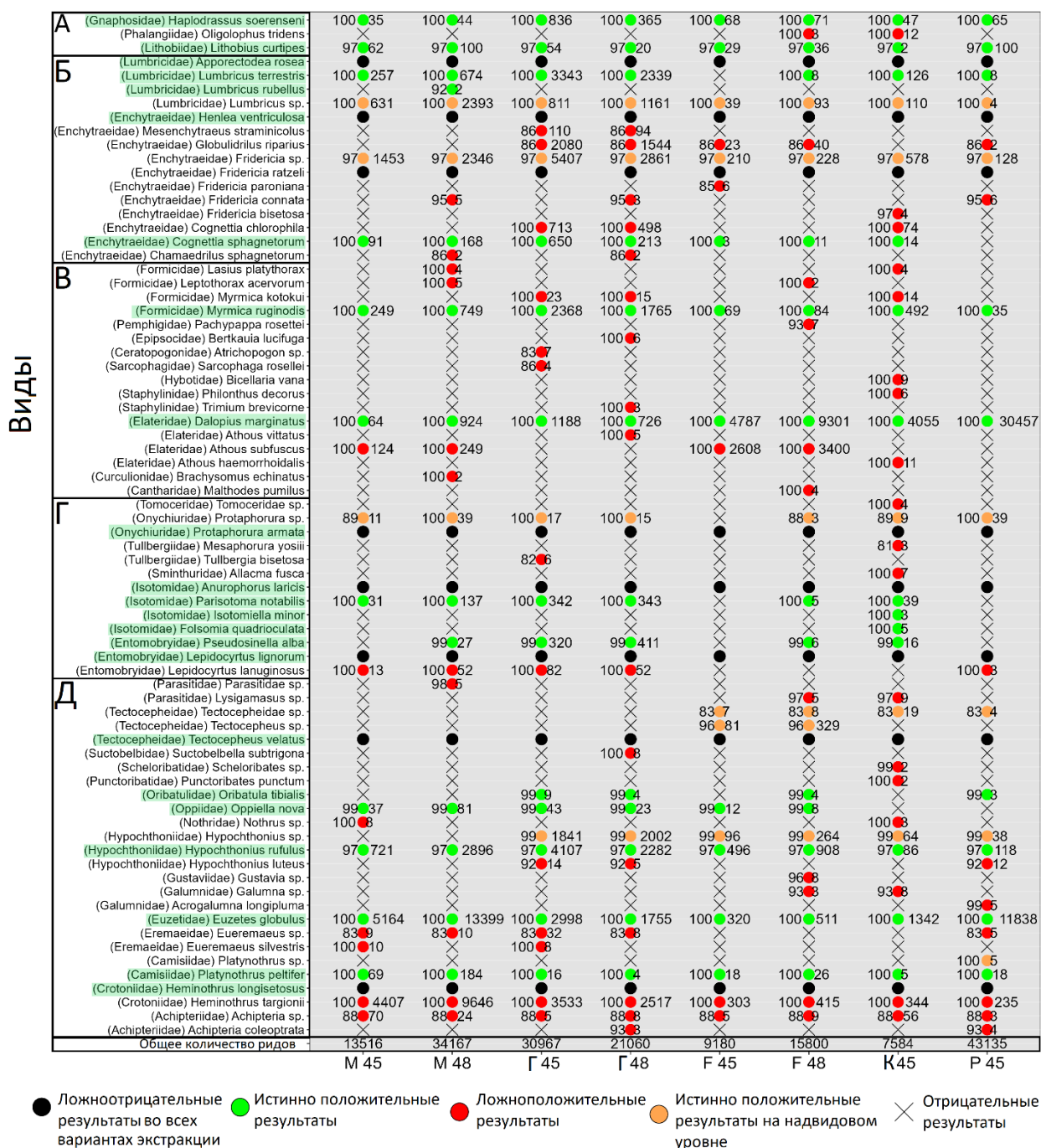


Рисунок. 4.1. Виды, идентифицированные с помощью метабаркодинга (по базе данных NCBI GenBank) с использованием различных вариантов экстракции ДНК и температур отжига праймеров до этапов обработки данных. Виды, присутствовавшие в искусственном сообществе, выделены зелёной заливкой. Для каждой комбинации метода экстракции и температуры отжига праймеров было суммировано число видов для каждого вида. Зелёные точки соответствуют видам, присутствовавшим в модельном сообществе и идентифицированным метабаркодингом (истинно положительные результаты). Оранжевые точки – таксоны, присутствовавшие в искусственном сообществе, но идентифицированные только на надвидовом уровне (род или семейство). Красные точки – виды, отсутствовавшие

в модельном сообществе, но выявленные метабаркодингом (ложноположительные результаты). Чёрные точки – виды, присутствовавшие в искусственном сообществе, но не идентифицированные ни одним из методов (ложноотрицательные результаты для всех вариантов). Чёрные крестики – таксоны, не выявленные данным вариантом экстракции. Числа слева от символов обозначают максимальное сходство (%) с базой GenBank, числа справа – суммарное число ридов по трём повторам. Варианты экстракции ДНК (см. раздел 2.5.1): М – M-Copb, G – ГМО-Б, F – FastDNA SPIN Kit for Soil, В – щелочной лизис кипячением, Р – DNeasy PowerSoil Pro Kit. 45 и 48 – температуры отжига праймеров (45 и 48 °С соответственно). А – пауки (Araneae) и ногоножки (Myriapoda); В – малощетинковые черви (Oligochaeta); С – насекомые (Insecta); D – ногохвостки (Collembola); E – Клещи (Acari).

Влияние фильтрации данных на результаты метабаркодинга при использовании разных методов выделения ДНК и температур отжига праймеров. До проведения фильтрации влияние метода экстракции ДНК на результаты метабаркодинга проявлялось только на уровне общего числа идентифицированных видов (рисунок 4.2А). Однако апостериорные тесты не выявили статистически значимых различий между вариантами экстракции.

После фильтрации обнаружены значимые различия между наборами ГМО-В и FastDNA как по общему числу видов, так и по количеству истинно положительных результатов (рисунок 4.2В). Повышение температуры отжига праймеров сопровождалось увеличением общего выявляемого разнообразия на уровне видов, родов и семейств (рисунок 4.1). Однако, статистически значимого влияния температуры отжига праймеров на результаты метабаркодинга обнаружено не было ($P > 0,05$) (рисунок 2А).

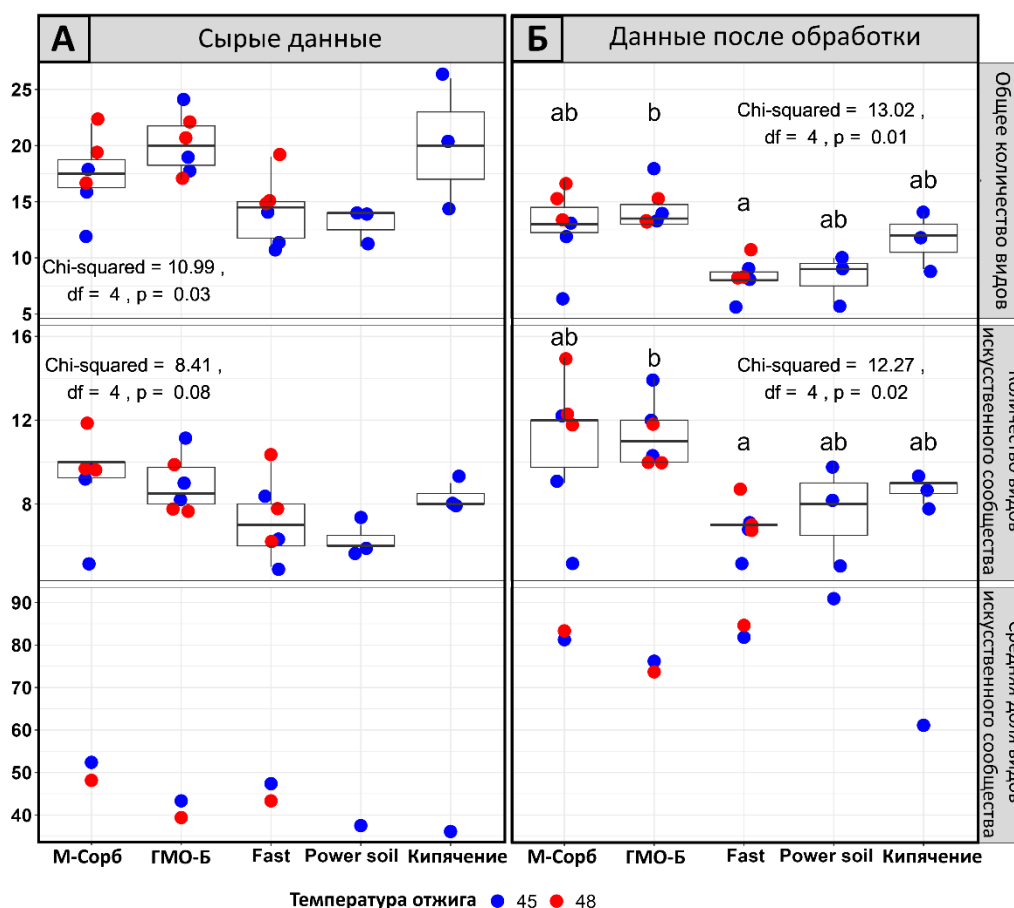


Рисунок 4.2. Эффективность методов экстракции ДНК из искусственных смесей почвенных беспозвоночных. Общее число видов, количество истинно положительных результатов и средний процент истинно положительных результатов, выявленных методом метабаркодинга с использованием различных методов экстракции ДНК до (А) и после (В) этапов обработки. Синие и красные точки обозначают температуру отжига праймеров 45 и 48 °С соответственно. Горизонтальные линии, прямоугольники и усы обозначают медиану, квантили и межквартильный размах, умноженный на 1,5 ($1,5 \times \text{IQR}$ для Q1 и Q3), соответственно. Приведены результаты теста Краскела – Уоллиса. Различные буквы обозначают значимые различия между группами согласно парному критерию Данна с поправкой Бенджамини – Хохберга ($p < 0,05$). Средний процент истинно положительных результатов — доля истинно положительных результатов в данных метабаркодинга, рассчитанная после суммирования идентифицированных видов по всем повторностям.

Влияние отдельных этапов фильтрации данных на результаты метабаркодинга. Процедуры фильтрации оказали существенное влияние на результаты метабаркодинга. Дополнительная идентификация таксонов, которые были аннотированы по GenBank надвидовым уровнем, по базе данных BOLD не привела к значимому увеличению общего количества таксонов (рисунок 4.3А). Однако данный этап привёл к

статистически значимому увеличению доли истинно положительных видов (рисунок 4.3Б). На более высоких таксономических уровнях статистически значимых изменений общего числа таксонов и доли истинно положительных результатов обнаружено не было (рисунок 4.3Б).

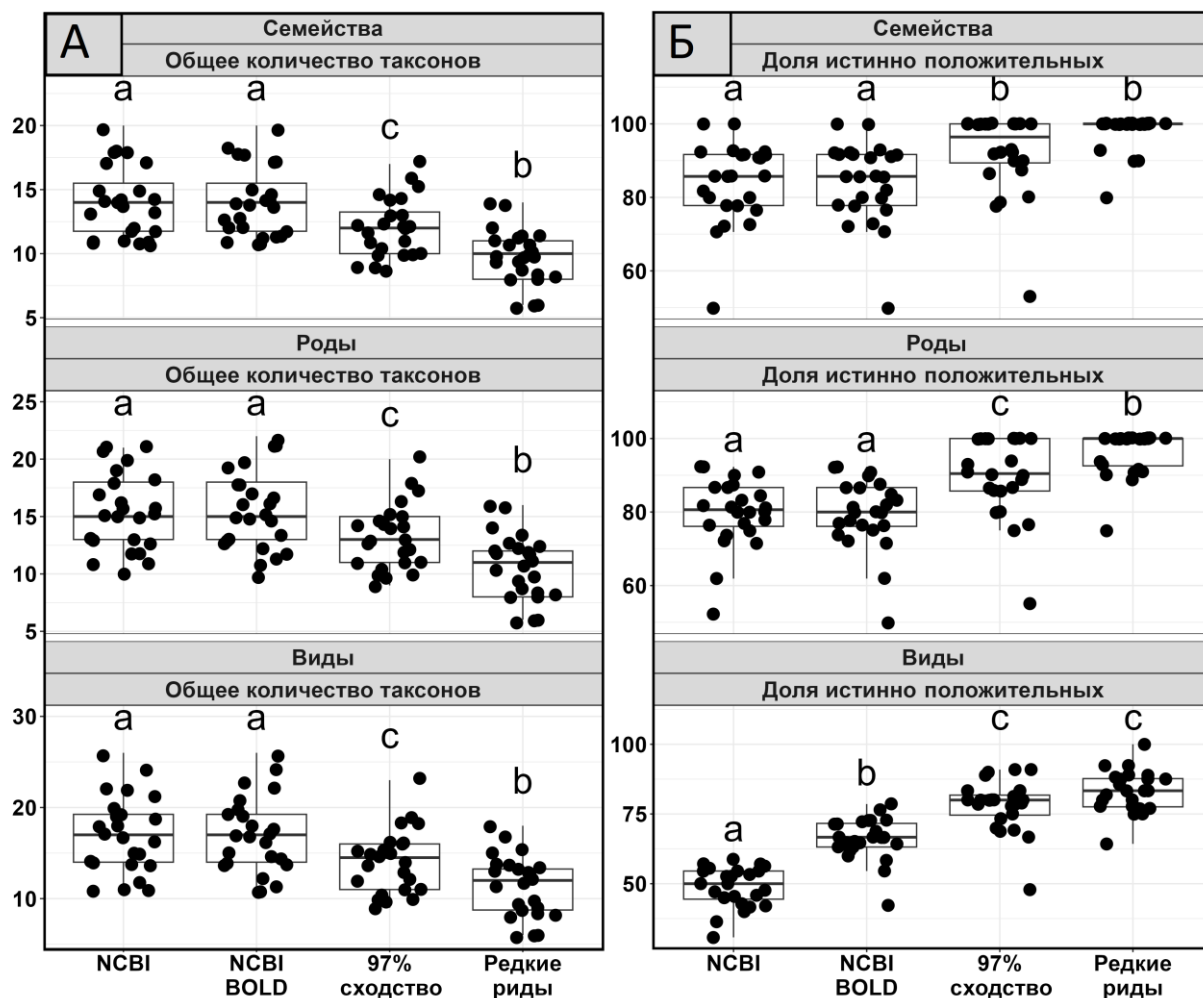


Рисунок 4.3. Общее число таксонов (А) и доля истинно положительных результатов (Б) в данных метабаркодинга искусственных смесей на уровнях семейства, рода и вида в процессе обработки. Каждая точка соответствует отдельному образцу. Этапы пост-биоинформатической обработки: NCBI — сырые данные после идентификации по базе NCBI без применения какой-либо обработки; NCBI BOLD — уточнение таксонов по базе данных BOLD; 97% сходство — фильтрация таксонов по уровню сходства; Редкие риды — фильтрация по числу редких ридов. Разные буквы обозначают значимые различия между группами согласно парному критерию Данна с поправкой Бенджамини – Хохберга ($p < 0,05$).

Фильтрация по порогу сходства 97% и удаление видов с низким числом ридов привели к значительному уменьшению общего числа таксонов и увеличению доли истинно положительных результатов на всех таксономических уровнях (рисунок 4.3). После обработки средняя доля истинно положительных результатов в результатах метабаркодинга составила 79%, 91% и 95% для видов, родов и семейств соответственно. Несмотря на высокую долю истинно положительных результатов после этапов фильтрации на всех таксономических уровнях, доля идентифицированных таксонов искусственного сообщества оставалась довольно низкой. Для различных методов экстракции ДНК этот показатель варьировал от 38% до 67% для видов, от 43% до 74% для родов и от 63% до 94% для семейств.

Выявление видового состава искусственного сообщества после всех этапов фильтрации данных. Идентификация таксонов, имевших надвидовые аннотации по базе данных NCBI GenBank, с использованием базы BOLD показала, что пять из них являлись видами искусственного сообщества: *Lumbricus* sp., идентифицированный по базе GenBank, был определен с помощью BOLD как *Lumbricus rubellus*; *Platynothrus* sp. — как *Platynothrus peltifer*; *Hypochthonius* sp. — как *Hypochthonius rufulus*; *Fredericia* sp. — как *Fredericia ratzeli*; *Protaphorura* sp. — как *Protaphorura armata*; Некоторые ASV видов *Platynothrus peltifer* и *Hypochthonius rufulus* также были идентифицированы с использованием GenBank (рисунок 4.4). Остальные надвидовые таксоны либо не были идентифицированы по базе данных BOLD, либо были представлены видами, не использовавшимися в модельном сообществе, с очень низким числом ридов.

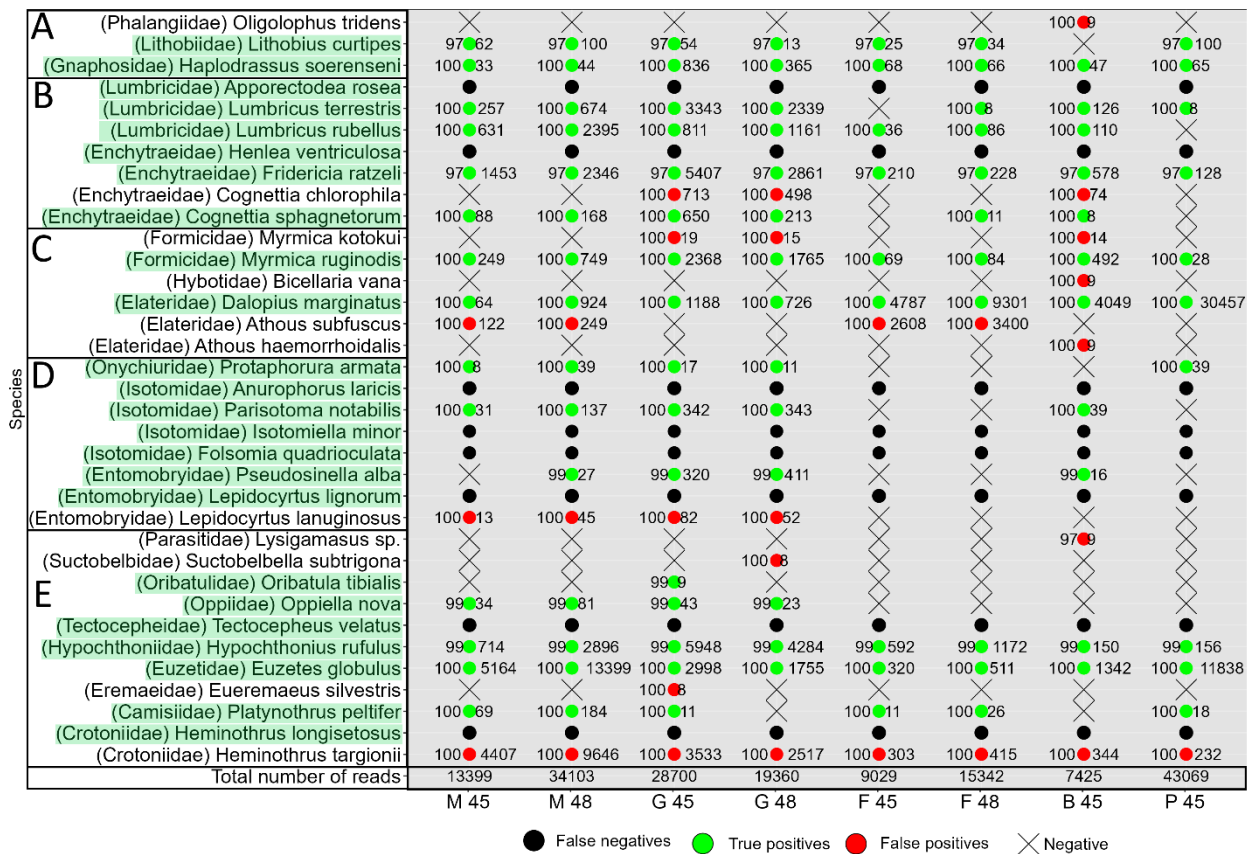


Рисунок 4.4. Виды, идентифицированные метабаркодингом с использованием различных вариантов экстракции ДНК и температур отжига праймеров после этапов обработки. Для каждой комбинации метода экстракции и температуры отжига праймеров было суммировано число ридов для каждого вида. Виды, присутствовавшие в искусственном сообществе, выделены зелёной заливкой. Зелёные точки – виды, присутствовавшие в искусственном сообществе и идентифицированные метабаркодингом (истинно положительные результаты). Красные точки – виды, отсутствовавшие в искусственном сообществе, но выявленные метабаркодингом (ложноположительные результаты). Чёрные точки – виды, присутствовавшие в искусственном сообществе, но не идентифицированные ни одним из методов (ложноотрицательные результаты для всех вариантов). Чёрные крестики – таксоны, не выявленные данным вариантом экстракции. Числа слева от символов указывают на максимальное сходство (%) с базой данных GenBank. Числа справа обозначают сумму ридов по повторам (репликам). Варианты экстракции ДНК: М – М-Сорб, G – ГМО-Б, F – FastDNA SPIN Kit для почвы, B – щелочной лизис кипячением, P – DNeasy PowerSoil Pro Kit. 45 – температура отжига 45 °C, 48 – температура отжига 48 °C. А – пауки (Araneae) и многоножки (Myriapoda); B – олигохеты (Oligochaeta); C – насекомые (Insecta); D – ногохвостки (Collembola); E – Клещи (Acari). Два вида искусственного сообщества (*Folsomia quadrioculata*, *Isotomiella minor*) были отфильтрованы из-за низкого числа ридов.

Таким образом, из восьми неидентифицированных видов, два (*Folsomia quadrioculata*, *Isotomiella minor*) были отфильтрованы из-за низкого числа ридов, а другие

два вида были идентифицированы в ходе уточнения идентификации надвидовых таксонов (*Fredericia ratzeli* и *Protaphorura armata*). Всего после завершения всех этапов обработки 16 из 24 видов, входивших в состав искусственных сообществ, были идентифицированы хотя бы одним вариантом экстракции ДНК (рисунок 4.4). Набор ГМО-Б при температуре отжига праймеров 45 °С позволил выявлять наибольшее количество видов искусственного сообщества (16 видов), однако, привёл к идентификации 5 видов, не входящих в состав искусственных смесей. Набор М-Сорб при температуре отжига праймеров 48 °С позволил выявить наибольшее количество идентифицированных видов (15 видов) при наименьшем количестве ложноположительных идентификаций (3 вида).

Не было обнаружено какой-либо четкой закономерности, указывающей на более эффективную идентификацию определенных таксонов при использовании разных вариантов экстракции ДНК и температур отжига праймеров. После всех этапов фильтрации осталось 11 ложноположительных видов (рисунок 4.4).

4.1.2. Обсуждение

Методы выделения ДНК из смеси беспозвоночных животных. На основе числа и доли истинно положительных результатов наиболее эффективными оказались коммерческие наборы М-Сорб и ГМО-Б. Протоколы этих наборов предусматривает длительный лизис животных при высокой температуре: 12 часов в наборе М-Сорб (Ustinova et al., 2021) и 1 час в наборе ГМО-Б. Длительный лизис при повышенной температуре способствует более полному высвобождению ДНК из тканей беспозвоночных (Carew et al., 2018; Porco et al., 2010). Наборы для экстракции ДНК из почвы не требуют лизиса с нагреванием, вероятно, потому что инкубация при высоких температурах может высвобождать из почвы гуминовые кислоты, которые ухудшают выделение ДНК (Taberlet et al., 2012b). Метод «кипячение» (щелочной лизис при высокой температуре; Belov et al., 2018) показал наихудшие результаты метабаркодинга. Это, вероятно, связано с отсутствием этапа очистки лизатов: остатки клеток могут связывать ДНК и ингибировать ПЦР (Demeke and Jenkins, 2010; Suárez- Martínez et al., 2006; Wilson, 1997). Однако в ряде опубликованных работ методы, сходные с «кипячением», продемонстрировали результаты, сопоставимые с коммерческими наборами (Contos et al., 2023; Majaneva et al., 2018).

Температура отжига праймеров. Повышение температуры отжига праймеров на 3 °С не оказало статистически значимого влияния на результаты метабаркодинга, однако привело к увеличению числа ложноположительных результатов для отдельных вариантов экстракции. Это неожиданный результат, поскольку более высокие температуры отжига

обычно обеспечивают бóльшую специфичность вследствие образования большего количества комплементарных пар между последовательностью праймера и целевым фрагментом ДНК. Тем не менее, в некоторых исследованиях сообщалось о повышенной частоте неспецифических продуктов амплификации при более высоких температурах отжига (Rychlik et al., 1990; Yang et al., 2021). Одним из возможных объяснений может быть присутствие инозина в обратном праймере, использованном в эксперименте. Было показано, что пары оснований с участием инозина менее стабильны, чем природные пары (A:T, G:C) (Bergstrom et al., 1997), и могут зависеть от окружающих оснований (Watkins and SantaLucia, 2005). Для праймеров с инозином не было продемонстрировано согласованных результатов при разных температурах отжига (Ben-Dov et al., 2006; Sergeant et al., 2012). Тем не менее, большинство ложноположительных результатов были отфильтрованы при обработке результатов. Это согласуется с рядом исследований, в которых не было показано сильного влияния повышения температуры отжига на результаты метабаркодинга (Aylagas et al., 2016; Elbrecht et al., 2019).

Фильтрация по уровню сходства и числу ридов. В различных исследованиях для видовой идентификации почвенных беспозвоночных применяли уровни сходства 97% или 98% (Hein et al., 2024; McGee and Eaton, 2015; Young and Hebert, 2022), либо использовали методы идентификации с разными метриками фильтрации (Ustinova et al., 2021; Watts et al., 2019). Фильтрация данных искусственного сообщества по порогу сходства привела к ожидаемому снижению общего числа выявляемого разнообразия на всех таксономических уровнях, тогда как доля истинно положительных результатов возросла. Это было связано с тем, что ASV, аннотированные в базе NCBI как *Protaphorura* sp., *Tectocephidae* sp. и *Tectocephus* sp., характеризовались низкими уровнями сходства как с последовательностями из NCBI, так и из BOLD. Высокая генетическая изменчивость гена COI известна для многих таксонов беспозвоночных (Bonin et al., 2023; Porco et al., 2012; Zhang and Wu, 2022), включая панцирных клещей (Oribatida) (Kreipe et al., 2015; Le Cadre et al., 2024). Средняя изменчивость между разнымикладами *Platynothrus peltifer* (который присутствовал в искусственной смеси и был успешно идентифицирован в нескольких вариантах) по гену COI составляет 56% (Heethoff et al., 2007). Успешная идентификация высокоизменчивого вида *P. peltifer* и отфильтровывание *Tectocephus* sp. может объясняться тем, что особи *P. peltifer* (но не *Tectocephus*), использованные в модельном сообществе, принадлежали ккладам, последовательности которых загружены в базы данных (Meyer and Paulay, 2005). Отсутствие однозначных результатов для особей, морфологически идентифицированных как *Tectocephus velatus*, хорошо отражает

трудности в определении числа видов этого рода (Haarlov, 1957; Hammer, 1967; Knulle, 1954). Это указывает на возможную значительную генотипическую пластичность особей рода *Tectocephus*, которая отражается и в морфологических признаках. Хотя филогенетические связи между разными видами рода *Tectocephus* были описаны (Laumann et al., 2007), нам не удалось найти данные об изменчивости этого рода по гену COI, которая может превышать установленный порог сходства в 97%.

Удаление последовательностей, представленных низким числом чтений, необходимо для снижения количества артефактов амплификации и секвенирования, а также контроля контаминаций. В нашей работе мы использовали порог в 7 ридов, исходя из среднего числа чтений в отрицательных контрольных экстракциях ДНК, и предположили, что степень контаминации примерно одинакова во всех вариантах. Данный этап фильтрации привёл к значимому снижению общего числа выявленных семейств, родов и видов. Однако доля истинно положительных результатов почти не менялась, что указывает на преимущественное удаление таксонов, отсутствующих в искусственной смеси.

Результаты после фильтрации данных. После двух этапов фильтрации и уточнения идентификации по базе данных BOLD в результатах метабаркодинга сохранились как неверно идентифицированные метабаркодингом виды, так и таксоны с надвидовой аннотацией. Ложноположительные результаты могут быть обусловлены различными причинами. Для некоторых животных наряду с идентифицированным целевым таксоном обнаруживался дополнительный таксон из того же рода или семейства. Например, *Cognettia chlorophila* является криптическим видом по отношению к *Cognettia sphagnetorum* (Martinsson et al., 2015).

Появление видов *Athous subfuscus*, *Athous haemorrhoidalis*, *Oligolophus tridens*, *Bicellaria vana*, *Lysigamasus* sp., *Suctobelbella subtrigona* и *Eueremaeus silvestris*, не использовавшихся в модельном сообществе, может быть связано с тем, что особи этих членистоногих присутствовали в пробах почвы, из которых были получены модельные животные, и были экстрагированы в тот же фиксирующий раствор. Известно, что молекулы ДНК, остающиеся в фиксирующей жидкости, в которой хранились образцы членистоногих, могут быть использованы для метабаркодинга (Hein et al., 2024; Marquina et al., 2019; Zizka et al., 2018).

В некоторых случаях неверная идентификация приводила к замене целевого таксона близкородственным видом, как произошло в нашем исследовании с родами *Myrmica*,

Lepidocyrtus и *Heminothrus*. Вероятные объяснения могут быть связаны с ошибочно аннотированными последовательностями в базах данных, ошибками, возникающими при ПЦР или секвенировании, недостаточной разработанностью таксономии многих групп почвенной фауны, а также отсутствием в базах данных последовательностей географически отдаленных филогенетических линий животных, как обсуждалось выше. Подобные ошибки обычны и неизбежны. Вероятно, по этой причине во многих исследованиях, в которых изучалось всё сообщество почвенных беспозвоночных, анализ проводился на уровне семейства или даже отряда (McGee et al., 2020; McGee and Eaton, 2015; Oliverio et al., 2018).

Таким образом, используя модельное сообщество почвенных беспозвоночных, включающее представителей мезо- и макроартропод, а также кольчатых червей (энхитреид и люмбрицид), мы показали, что эффективность метабаркодинга в значительной степени определяется выбором набора для экстракции ДНК и стратегией обработки данных. Повышение температуры отжига праймеров не привело к значимым изменениям конечных результатов. Хотя ни один из применённых подходов не позволил идентифицировать все виды, присутствовавшие в модельном сообществе, количество ложноположительных результатов оказалось относительно невысоким. Наибольшая доля идентифицированных таксонов искусственного сообщества составила 67% видов и 94% семейств. Полученные результаты – важный этап накопления количественных сведений о степени точности и надежности современных методов метабаркодинга при исследовании сообществ почвенных беспозвоночных.

4.2. Эксперимент с естественными сообществами почвенных беспозвоночных.

В данном разделе представлены результаты сравнения морфологического метода и метабаркодинга при выявлении изменений в структуре сообществ почвенных беспозвоночных под влиянием макропластика. Мы провели эксперимент, в котором почвенные пробы отбирались из-под полиэтиленовых листов размером 40×40 см, закреплённых на поверхности почвы на протяжении 9 месяцев в четырёх экосистемах Московской области. Каждую пробу делили на две части и почвенных беспозвоночных извлекали из каждой половины с использованием воронок Тульгрена. Таксономический состав беспозвоночных определяли с помощью метабаркодинга гена COI и морфологического метода.

4.2.1. Результаты

В результате секвенирования получено 1 498 230 необработанных ридов. После биоинформатической обработки осталось 283 115 ридов, которые были сгруппированы в 1147 точных вариантов последовательностей ампликонов. Идентификация полученных ASV позволила отнести их к 8 классам, 22 отрядам, 62 семействам, 100 родам и 111 видам беспозвоночных животных. В ходе морфологического анализа 72 проб было определено 168 видов, принадлежащих к 11 классам 27 отрядам 95 семействам и 127 родам, почвенных животных.

С понижением таксономического уровня число групп, выявленных одновременно двумя методами, последовательно сокращалось (рисунок 4.5). С помощью морфологической идентификации было определено 27 отрядов, из которых пять не были обнаружены при метабаркодинге. На уровне семейств согласованность результатов оказалась ниже: пересечение двух методов составило 37 семейств, тогда как только морфологически было выявлено 58 семейств, а исключительно метабаркодингом — 25. Наибольшее число семейств, определённых как обоими подходами (6), так и только молекулярным методом (7), относилось к отряду двукрылых. При переходе к более низким таксономическим рангам доля таксонов, идентифицированных одновременно двумя методами, резко падала: на уровне родов составила 11%, а на уровне видов 5% от общего числа таксонов, выявленных в сумме двумя методами (рисунок 4.5).

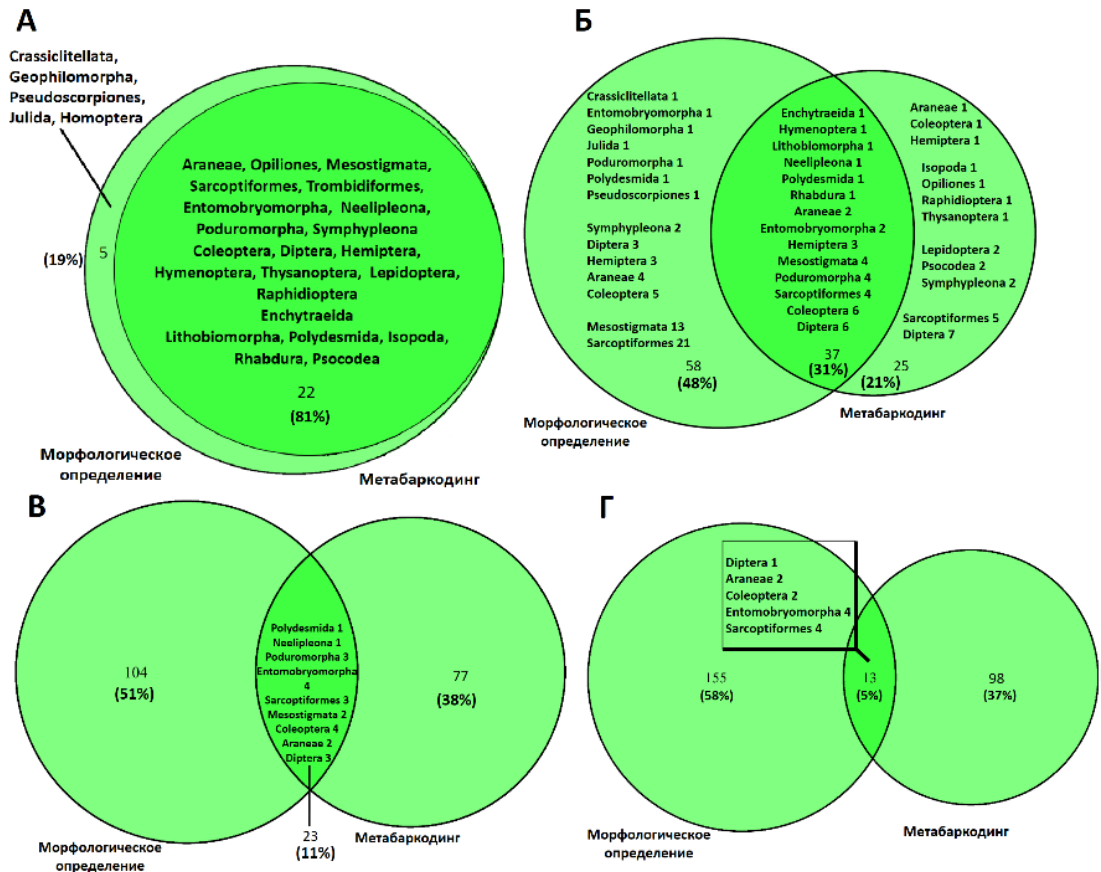


Рисунок 4.5 Диаграммы Венна для числа таксонов, идентифицированных с помощью морфологического метода и метабаркодинга на разных таксономических уровнях: А – отряды, Б – семейства, В – роды, Г – виды. Приведены число и доля таксонов, определённых каждым из подходов и одновременно двумя методами; для семейств, родов и видов указано их распределение по отрядам.

Для оценки влияния прозрачного и черного пластика на сообщества почвенных животных было применено непараметрическое многомерное шкалирование с последующим дискриминантным анализом (см. раздел 2.5.2. в методах). Во всех случаях первые дискриминантные функции объясняли основную долю дисперсии (от 88,55 до 99,10%). Однако первая функция была статистически значима только для морфологических данных ($p < 0,01$), для анализа на основе ASV — значимой лишь на уровне тенденции ($p < 0,1$), а для идентифицированных последовательностей — незначимой ($p = 0,22$). Вторые дискриминантные функции во всех случаях были статистически незначимы (рисунок 4.6).

Несмотря на отсутствие статистической значимости первых дискриминантных функций метабаркодинга (объясняющих наибольшую долю дисперсии), они имели сильную корреляцию с первой дискриминантной функцией морфологического метода (рисунок 4.7).

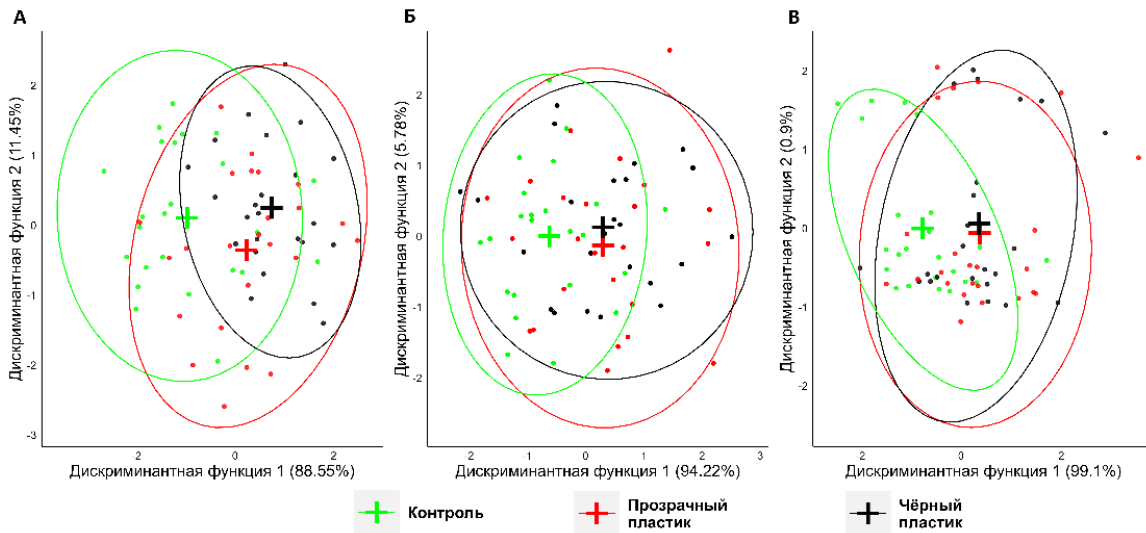


Рисунок 4.6 Результаты дискриминантного анализа осей NMDS, построенного по данным традиционного морфологического определения и метабаркодинга: А – морфологическая идентификация; Б – идентификация последовательностей по базе BOLD; В – точные варианты последовательностей ампликонов (ASV). Различные варианты эксперимента обозначены цветом, их центроиды показаны соответствующими символами. Эллипсы соответствуют 95% доверительному интервалу.

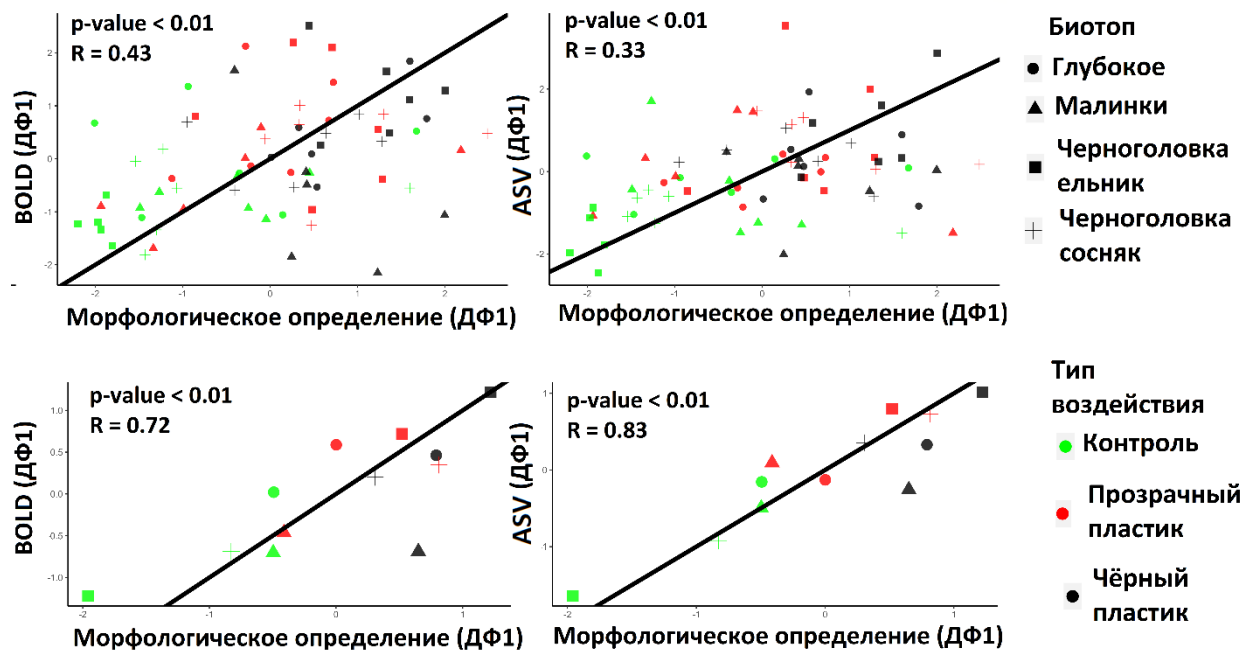


Рисунок 4.7 Корреляция Спирмена между дискриминантными функциями, объясняющими наибольшую долю дисперсии, при использовании морфологического подхода и двух наборов результатов метабаркодинга (не идентифицированные точные варианты последовательностей ампликонов (ASV) и идентифицированные последовательности по базе данных BOLD на уровне семейств).

4.2.2. Обсуждение

Метабаркодинг естественных сообществ почвенных беспозвоночных. Число таксонов, идентифицированных и морфологическим и молекулярным методом, закономерно снижалось по мере уменьшения таксономического ранга, при этом морфологическая идентификация в целом обеспечивала более высокий уровень выявляемого разнообразия на видовом и родовом уровнях. Однако степень расхождения между двумя подходами в естественном сообществе оказалась выше, чем в эксперименте с искусственными смесями. В отличие от модельного эксперимента, где набор видов был заранее задан, естественное сообщество характеризуется значительно большим таксономическим богатством и гетерогенностью генетического материала. В таких условиях возрастает вероятность присутствия видов или отдельных генетических линий, последовательности которых отсутствуют в глобальных базах данных, что особенно актуально для почвенных микроартропод, многие группы которых остаются недостаточно представленными в нуклеотидных коллекциях. Даже с учётом высокой степени изученности беспозвоночных региона проведения эксперимента, новые находки членистоногих продолжают регистрироваться (Krivosheina et al., 2023; Sotnikov et al., 2024). Кроме того, принципиальное значение имеет эффект стохастической выборки на ранних циклах ПЦР. При составлении искусственных смесей мы стремились избегать больших различий во вносимой биомассе разных видов. Для естественных сообществ характерно доминирование небольшого числа видов и высокое разнообразие более редких, минорных видов (Giller, 1996; Jianing Wang et al., 2025). В результате этого на ранних циклах амплификации происходит лавинообразное накопление ампликонов доминантных таксонов. В дальнейшем растущая концентрация ампликонов доминантов начинает подавлять отжиг праймеров на редкие матрицы за счёт конкуренции за ограниченный ресурс — молекулы полимеразы и свободные нуклеотиды; чем больше накапливается продукта реакции, тем ниже эффективность амплификации минорных компонентов (Ingr et al., 2015). Даже в эксперименте с искусственными смесями, в котором мы стремились минимизировать разницу во вносимой биомассе, присутствие некоторых видов не привело к их идентификации. В выборке из природных сообществ значительная часть редких генетических линий может остаться неидентифицированной, что вносит дополнительный вклад в наблюдаемое расхождение между молекулярными и морфологическими данными.

Сравнение эффективности выявления влияния макропластика на структуру сообществ почвенной фауны метабаркодингом и морфологическим методом. Изучение воздействия пластика на почвенные сообщества крайне актуально в условиях

современного глобального загрязнения (Singh et al., 2026). Большая часть исследований посвящена загрязнению мелкими частицами микро и нано-пластика, в то время как влияние крупных фрагментов, макропластика, на естественные экосистемы практически не изучено (Леонов и Тиунов, 2020). Наш эксперимент имитировал загрязнение почвы пластиковыми пакетами или мульчирующими плёнками, которые составляют немалую долю в общем пуле пластиковых загрязнителей (Qi et al., 2020). Влияние пластиковой плёнки на почвенное население может быть вызвано изолированием поверхности почвы от поступления опада, осадков, солнечных лучей, что может приводить к осушению, гибели растений и снижению количества пищи для беспозвоночных. С другой стороны, листы полиэтилена могут выступать как укрытия для крупных и подвижных представителей почвенной фауны. Однако исследование влияния пластиковой плёнки выявило лишь небольшие изменения в обилии некоторых групп почвенных беспозвоночных (Сотников и др., 2023). Об этом свидетельствует и сильное перекрытие эллипсов в пространстве дискриминантных функций при использовании любого метода (рисунок 4.6). Однако дискриминантные функции, полученные на основе морфологического метода, коррелировали с дискриминантными функциями метабаркодинга как на уровне идентифицированных семейств, так и на уровне не идентифицированных ASV. Это подтверждает, что несмотря на различия в выявляемом разнообразии, метабаркодинг и морфологический подход сходно отражают даже относительно небольшие изменения структуры почвенных сообществ, вызванные экспериментальными манипуляциями.

4.3. Методика выделения средовой ДНК из почвы для анализа разнообразия и обилия почвенных беспозвоночных

В данном разделе представлены результаты сравнения новой методики выделения средовой ДНК из крупных навесок почвы с классическими методами выведения ДНК, а также с морфологическим методом. Для этого на территории смешанного леса биогеоценологической станции «Малинки» по регулярной сетке с шагом 5 м было отобрано 16 почвенных образцов. Из каждого образца ДНК выделяли тремя способами: с помощью двух коммерческих наборов из навесок 0,5 и 10 г (Magen и PowerMax, соответственно), а также с использованием вновь разработанной методики из 10 г почвы (далее по тексту фильтрация или Filtration). Предлагаемый подход основан на переводе внутриклеточной и сорбированной на частицах почвы ДНК в раствор с последующим осаждением на нитрат-целлюлозный фильтр, который затем использовали для выделения ДНК коммерческими

наборами. Таксономическое разнообразие почвенных беспозвоночных, выявленное метабаркодингом после каждого варианта экстракции, сравнивали с результатами традиционных учетов почвенного населения (см. раздел 2.1).

4.3.1. Результаты

После секвенирования 48 образцов (16 образцов для каждого из трёх методов: Magen, PowerMax и Filtration) было получено 26702726 необработанных последовательности гена COI. После биоинформатической обработки было получено 57439 точных вариантов последовательностей ампликонов гена COI. После идентификации и процедур фильтрации сформировали наборы данных, включающие 122 вида, 161 род, 150 семейств и 36 отрядов беспозвоночных. Кластеризация 1757 ASV гена COI, отнесённых к беспозвоночным, по уровню 97% сходства привела к выявлению 982 операционных таксономических единиц (OTU). С помощью традиционных методов (ручной разбор почвенных проб и экстракция беспозвоночных с помощью воронок Берлезе-Тульгрена) было идентифицировано 54 рода, 69 семейств и 17 отрядов беспозвоночных.

Кривые накопления родов для трёх методов экстракции ДНК и морфологической идентификации не достигли плато (рисунок 4.8). Морфологический метод демонстрировал заметно более крутой рост числа обнаруженных родов с добавлением дополнительных образцов по сравнению с метабаркодингом. Кривые, построенные на основе данных метабаркодинга, показали более плавное увеличение выявленного разнообразия для всех методов. Наибольший рост был показан у метода фильтрации.

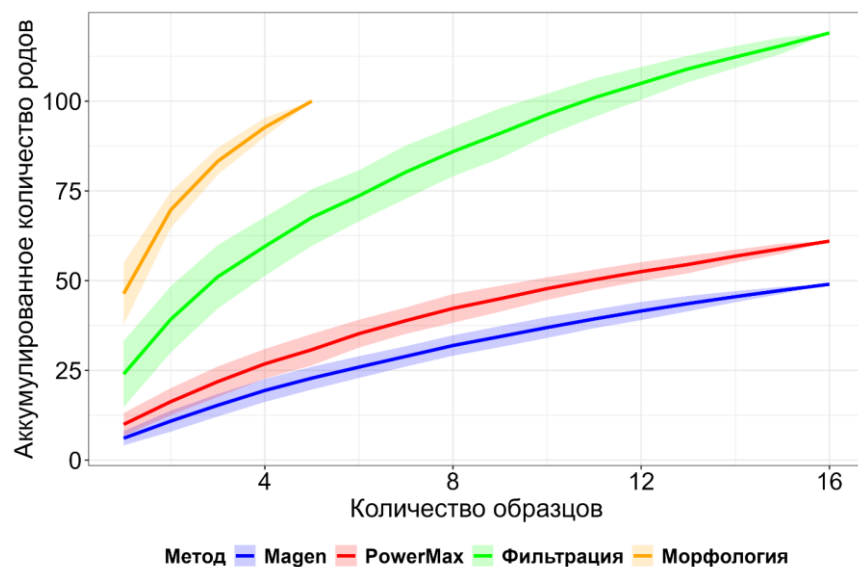


Рисунок 4.8. Кривые накопления числа идентифицированных родов беспозвоночных с помощью метабаркодинга (ген COI) при различных методах экстракции ДНК и морфологической идентификации.

Сравнение эффективности разработанной методики со стандартными протоколами выделения ДНК. Таксономическое богатство беспозвоночных, обнаруженных в отдельных образцах, различалось между тремя методами экстракции ДНК на всех таксономических уровнях. Количество отрядов и семейств было выше для метода фильтрации и не различалось между наборами Magen и PowerMax (рисунок 4.9). Богатство родов и видов возрастало в ряду Magen, PowerMax, Filtration. Количество OTU и ASV для COI было наибольшим для метода Filtration, при этом набор PowerMax дал наименьшее количество (рисунок 4.9).

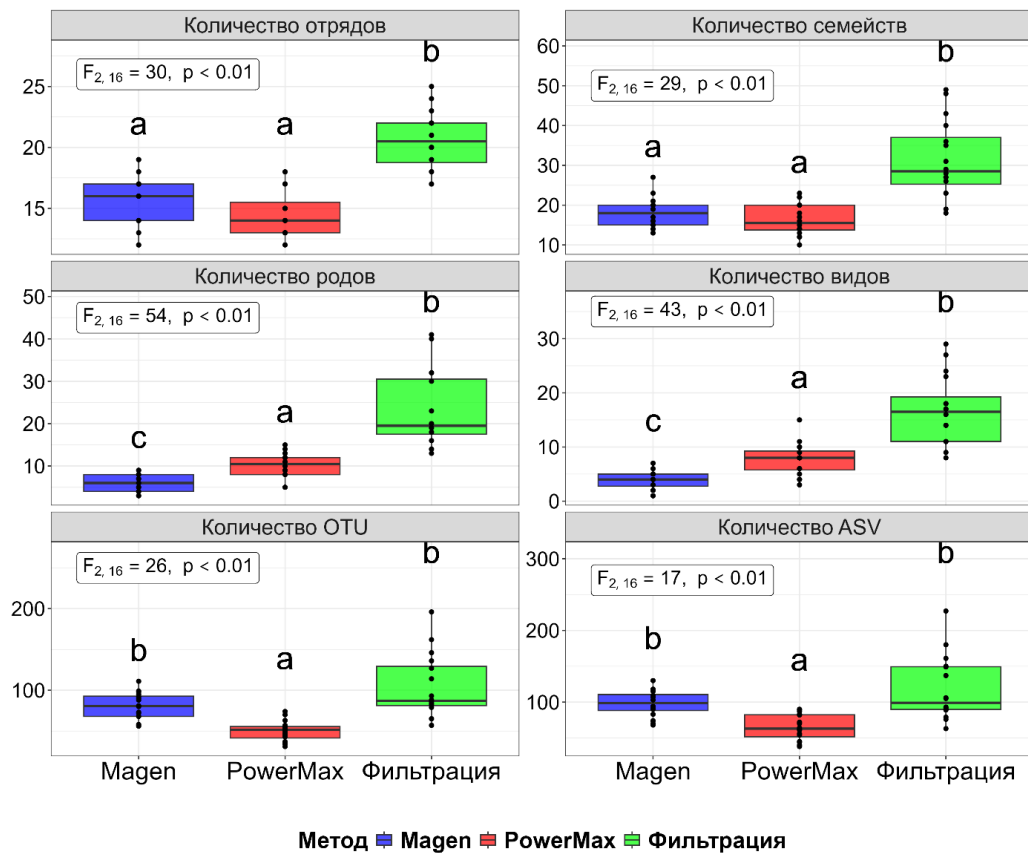


Рисунок. 4.9. Среднее разнообразие беспозвоночных в отдельных пробах (n = 16) на разных таксономических уровнях (OTU, операционные таксономические единицы и ASV, точные варианты последовательностей ампликонов), выявленное метабаркодингом с использованием различных методов экстракции ДНК. Горизонтальные линии, прямоугольники и «усы» обозначают медиану, квартили и межквартильный размах, умноженный на 1,5 ($1,5 \times \text{IQR}$ для Q1 и Q3), соответственно. Разные буквы указывают на значимые различия согласно апостериорному критерию Тьюки с поправкой Тьюки – Крамера ($p < 0,05$). Синий, красный и зелёный цвета обозначают таксономическое богатство для методов Magen (0,5 г почвы), PowerMax (10 г почвы) и Filtration (10 г почвы), соответственно.

Общее число идентифицированных родов было в 2–2,5 раза больше при использовании метода фильтрации (119 родов), чем при использовании наборов PowerMax (61 род) и Magen (49 родов) (рисунок 4.10А). Среди доминирующих по разнообразию классов беспозвоночных метод фильтрации выявил 36 родов насекомых (против 14 у PowerMax и 11 у Magen), 28 родов паукообразных (против 14 и 10) и 19 родов коллембол (против 14 у PowerMax и 11 у Magen). Напротив, для малощетинковых червей (Clitellata) все три метода показали сходные результаты — 12 родов. Использование 10 г почвы (Filtration и PowerMax) позволило обнаружить два дополнительных класса беспозвоночных – брюхоногих моллюсков (Gastropoda) и высших раков (Malacostraca, изоподы), которые не были выявлены в навесках 0,5 г (Magen) (рисунок 4.10А). Наибольшее количество родов, выявленное всеми методами было аннотировано таксонами из класса Clitellata (рисунок 4.10Б).

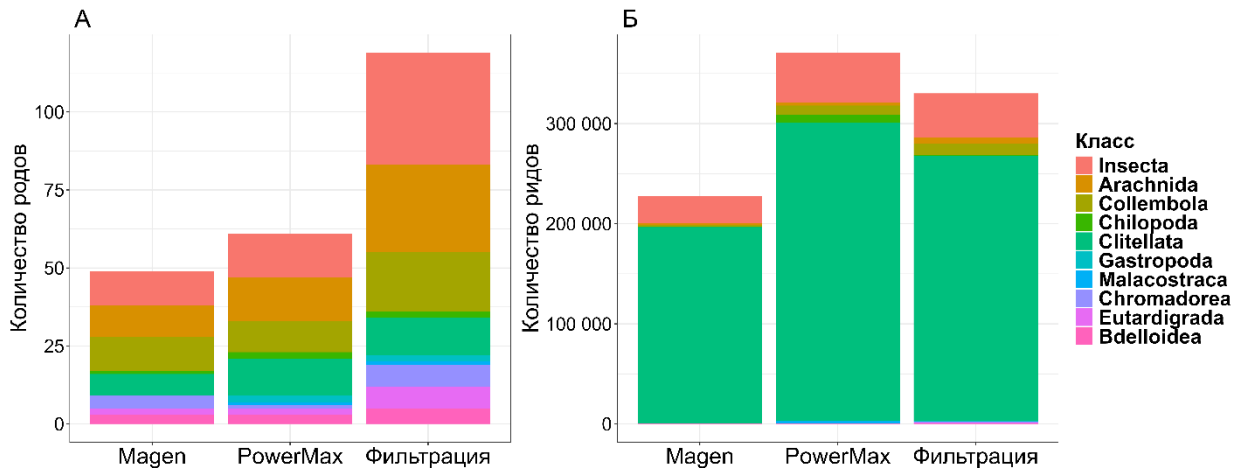


Рисунок 4.10. Число родов (А) и видов (Б) разных классов беспозвоночных, идентифицированных методом метабаркодинга с использованием различных методов экстракции средовой ДНК.

На уровне отрядов, семейств, родов и видов доля таксонов, общих для всех трёх методов, составила 68%, 41%, 21% и 18% соответственно (рисунок 4.11). Наибольшее число уникальных таксонов на уровне семейств (25%), родов (39%) и видов (42%) было обнаружено с использованием метода фильтрации.

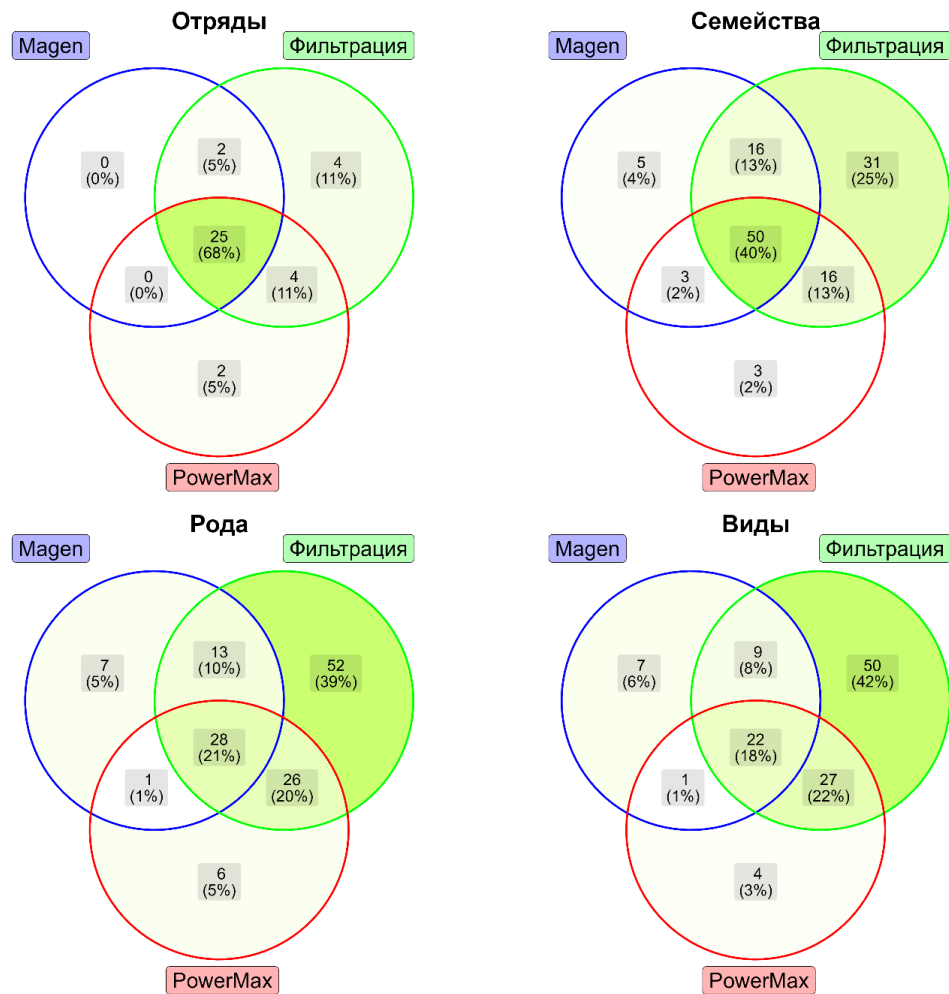


Рисунок 4.11. Число таксонов, идентифицированных на уровнях отряда, семейства, рода и вида с использованием различных методов экстракции ДНК: Magen (0,5 г почвы), PowerMax (10 г почвы) и метода фильтрации (10 г почвы).

Сравнение метода фильтрации с морфологическим методом. Метод фильтрации обеспечил обнаружение более высокого разнообразия почвенных беспозвоночных по сравнению с другими методами экстракции ДНК. Поэтому только этот метод был использован для сравнения с традиционным морфологическим подходом. Метабаркодинг средовой ДНК, выделенной с помощью метода фильтрации, позволил выявить большее разнообразие насекомых, чем классический морфологический подход (28 и 17 семейств соответственно; рисунок 4.12). Однако морфологический метод привел к идентификации большего числа семейств в отрядах Sarcophagales, Mesostigmata и Symphypleona (рисунок 4.12).

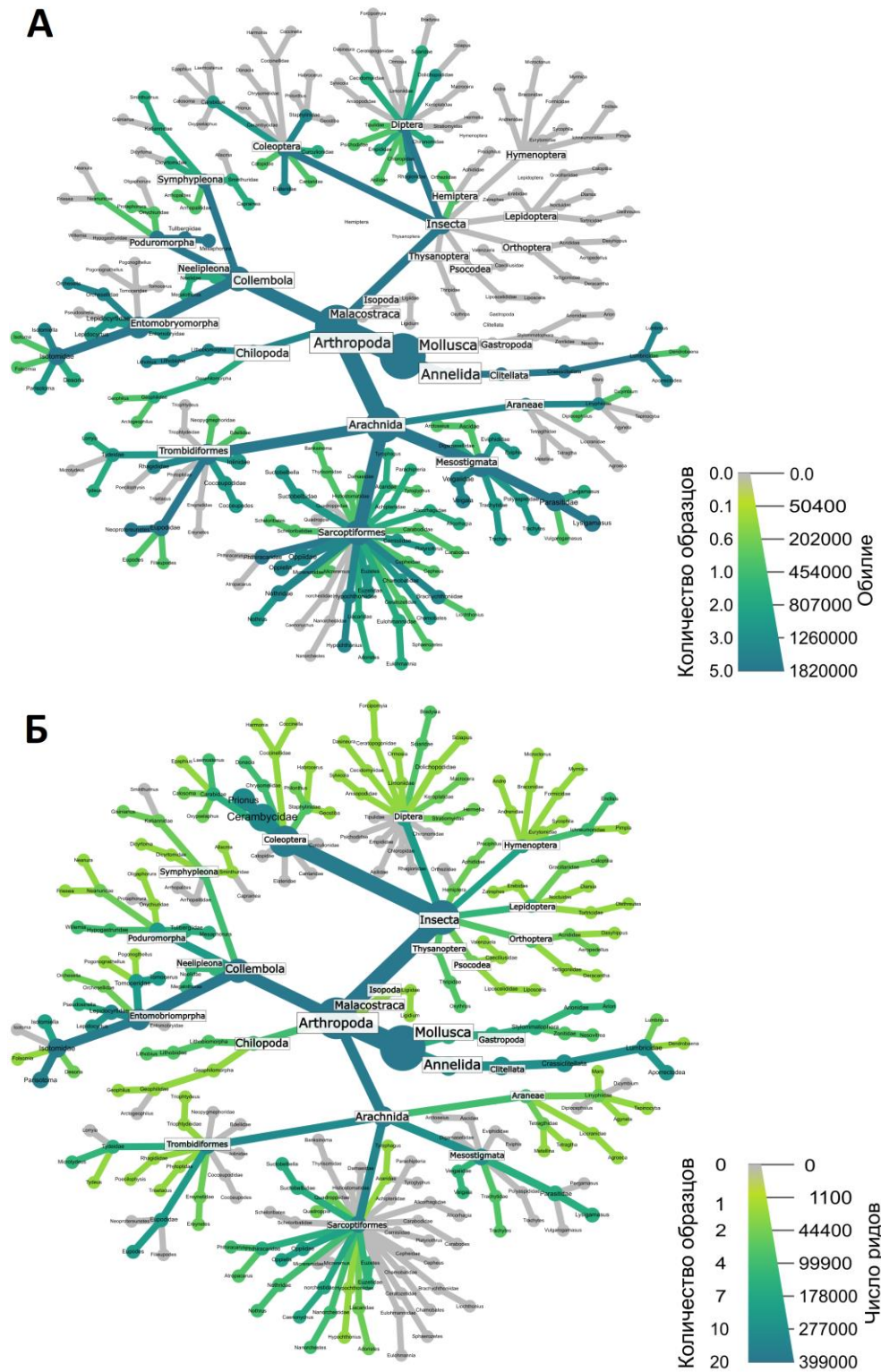


Рисунок 4.12 Дендрограмма выявленных семейств беспозвоночных с помощью А – морфологического метода и Б – метабаркодинга средовой ДНК почвы, выделенной методом фильтрации. Размер кругов обозначает обилие (экз./м²) в случае морфологии и число родов в случае метабаркодинга. Заливка отражает число образцов, в которых таксон был выявлен (максимальное число образцов для морфологии = 5, для метабаркодинга = 16). График создан с использованием пакета MetaCoder (Foster et al., 2017).

Доля общих таксонов между методом фильтрации и морфологическим методом составила 64% для отрядов, 31% для семейств и 21% для родов (рисунок 4.13)

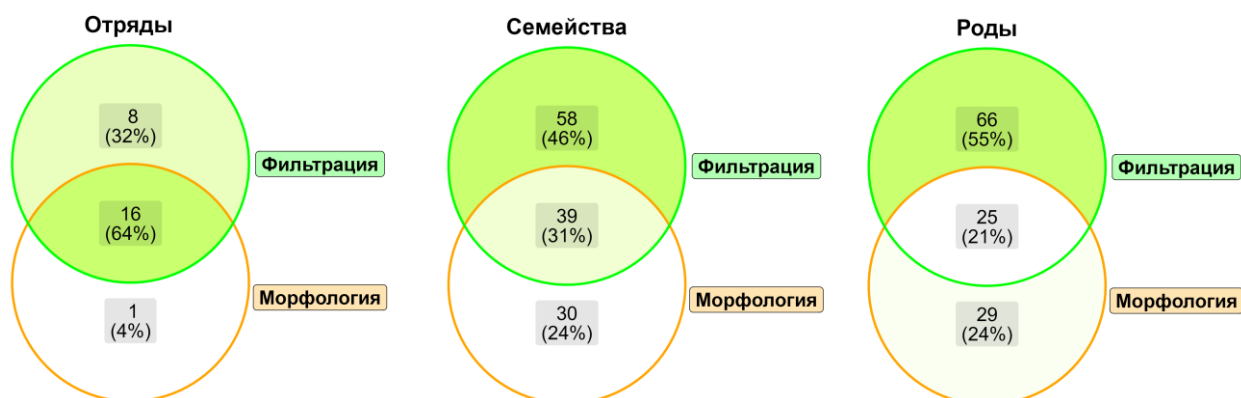


Рисунок 4.13. Число таксонов, идентифицированных с использованием среды ДНК, выделенной с помощью метода фильтрации и морфологического метода, для отрядов, семейств и родов.

Использование метабаркодинга для оценки обилия почвенных беспозвоночных. Связь между обилием беспозвоночных (традиционные методы учета), частотой встречаемости (FOO) и относительным обилием родов (RRA) на уровне семейств значительно варьировала в зависимости от таксона и метода экстракции ДНК (рисунок 4.14). При экстракции ДНК из 0,5 г почвы единственная статистически значимая корреляция наблюдалась между обилием насекомых, определённым традиционным методом, и частотой встречаемости родов (FOO, рисунок 4.14). Увеличение массы обработанной почвы до 10 г (PowerMax и Filtration) привело к появлению значимых и погранично значимых корреляций между обилием ногохвосток, клещей и насекомых и количественными метриками метабаркодинга (RRA и/или FOO). Обилие тромбидиформных клещей (Trombidiformes) не коррелировало ни с одной количественной метрикой метабаркодинга (рисунок 4.14).

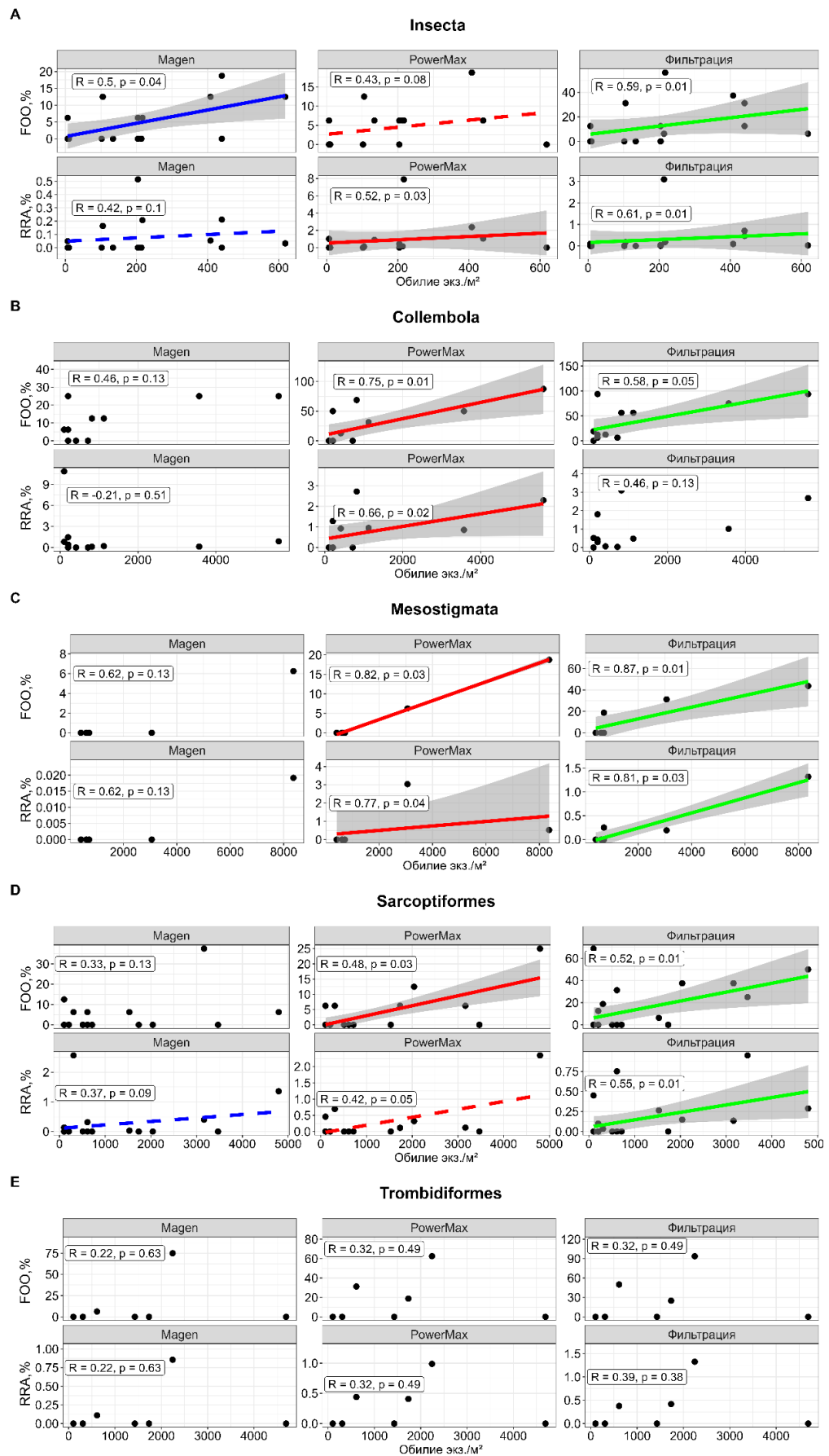


Рисунок 4.14. Корреляция между обилием почвенных беспозвоночных, определённым традиционным почвенно-зоологическим методом, и частотой встречаемости

(FOO) и относительным обилием родов (RRA) в мтабаркодинге. Срезовая ДНК была выделена с помощью трёх методов экстракции. (A) Insecta, (B) Collembola, (C) Mesostigmata, (D) Sarcotiformes и (E) Trombidiformes. Каждая точка соответствует одному семейству. Для анализа использовали только таксоны, учтенные традиционным методом. Приведены коэффициенты корреляции Спирмена. Сплошные и пунктирные линии обозначают статистически значимые ($p < 0,05$) и погранично значимые ($p < 0,1$) корреляции.

4.3.2. Обсуждение

Сравнение разных методов экстракции ДНК. Масса почвенного образца оказывает сильное влияние на экстракцию ДНК беспозвоночных. Использование небольших объёмов почвы, характерных для стандартных коммерческих наборов, приводит к заниженным оценкам разнообразия всей почвенной фауны (Sapkota et al., 2025), нематод (Kageyama and Toju, 2022), почвенных членистоногих (Dopheide et al., 2019) и дождевых червей (Lilja et al., 2023). Kageyama и Toju (2022) рекомендуют использовать не менее 20 граммов почвы для характеристики сообществ почвенных нематод (при использовании для выделения ДНК 500 мкл надосадочной жидкости после обработки почвы буферным раствором). Выделение ДНК из 10 г почвы с помощью набора PowerMax привело к обнаружению большего общего числа родов и видов беспозвоночных по сравнению с использованием навески в 0,5 г, что подтверждается и другими работами (Lilja et al., 2023; Sapkota et al., 2025). Фильтрация супернатанта значительно повысила эффективность экстракции ДНК многоклеточных организмов даже по сравнению с набором PowerMax, который сам по себе превосходил распространённый подход с прямым использованием супернатанта для выделения ДНК (Taberlet et al., 2012b). На сегодняшний день метод фильтрации применялся только к образцам подстилки (Lopes et al., 2021), а его эффективность напрямую не сравнивалась другими методами выделения. Прохождение буфера, содержащего десорбированную ДНК, через нитрат-целлюлозный фильтр, вероятно, приводит к концентрированию ДНК как на его поверхности, так и внутри его толщи. Такое концентрирование критически важно для многоклеточных организмов, ДНК которых распределена в почве менее равномерно по сравнению с микробной. Как следствие, этот подход увеличил оценки богатства не только на низких таксономических уровнях (род или вид), но и на более высоких (отряд и семейство). Анализ последовательностей гена 18S, проведённый на этих же образцах, не показал значимых различий между методами в выявляемом разнообразии одноклеточных эукариот (грибов и бактерий) (Sotnikov et al., в печати). Это подтверждает разный пространственный масштаб, характерный для разнообразия одноклеточных и многоклеточных организмов (Dopheide et

al., 2019; Kageyama and Toju, 2022). Дополнительным методическим шагом, который мог способствовать более эффективному выявлению разнообразия разработанной методикой является состав буфера. В отличие от классического PBS, используемого в большинстве работ (Rota et al., 2020; Taberlet et al., 2012b; Zinger et al., 2016), наш буфер содержит дополнительный лизирующий (SDS) и хелатирующий (EDTA) компоненты. Такой состав позволяет включить внутриклеточную ДНК в анализ и предотвращает сорбцию ДНК на почвенных частицах с помощью поливалентных ионов металлов (Levy-Booth et al., 2007).

Сравнение разработанной методики с морфологическим подходом. В главе 4.1 мы показали, что оценка разнообразия почвенных беспозвоночных на уровне вида с помощью метабаркодинга приводит к значительной доле ложноотрицательных результатов. При использовании традиционного подхода для значительной части групп (напр. личинки Diptera и Coleoptera) видовая идентификация была невозможна. В связи с этим при сравнении двух подходов мы использовали надвидовые уровни (роды и семейства).

Сравнение результатов метабаркодинга с данными морфологического определения показало, что относительная эффективность выявления разнообразия различных таксономических групп во многом определялась наличием специалистов, способных проводить точную идентификацию по морфологическим признакам. В нашей работе идентификацию проводили эксперты по орибатидам (В.Д. Леонов), гамазовым и тромбидиформным клещам (О.Л. Макарова), паукам (А.В. Танасевич), основным таксонам макрофауны (Lumbricidae, Myriapoda — Л.Б. Рыбалов) и двукрылым (М.Г. Кривошеина). Для этих групп при морфологическом анализе было выявлено значительно большее родовое разнообразие по сравнению с метабаркодингом (рисунок 4.12). Однако для большинства отрядов насекомых, по которым в нашей группе отсутствовали специалисты, способные выполнить детальную таксономическую идентификацию, большая часть разнообразия была выявлена молекулярным методом. Весьма вероятно, что аналогичные причины лежат в основе различий между методами, наблюдаемыми в эксперименте с макропластиком (раздел 4.2).

Указанный человеческий фактор, или «артефакт специалиста», не отменяет объективных технических ограничений метабаркодинга средовой ДНК, включая высокий уровень внутри- и межвидовой изменчивости и связанную с этим неполноту референсных баз данных, а также различную эффективность амплификации у разных таксонов. Более половины семейств и родов, выявленных метабаркодингом, не были подтверждены морфологически. Это может быть обусловлено не только отсутствием диагностических

признаков или экспертов по отдельным группам, но и тем, что метабаркодинг средовой ДНК способен улавливать сигнал остаточной ДНК от животных, которые не были активны в период отбора проб или вовсе не связаны напрямую с почвой (Madden et al., 2016; Oliverio et al., 2018).

Оценка обилия почвенных беспозвоночных. Выбор количественной метрики для оценки обилия почвенных беспозвоночных в пробах средовой ДНК почвы является ключевой, и пока далеко не решенной, методической задачей в экологических исследованиях (Fraga Dornellas et al., 2025). Обе метрики, использованные в нашей работе (относительное обилие и встречаемость ридов), в какой-то степени зависят от активности и обилия почвенных беспозвоночных. Однако показатель FOO позволяет снизить искажения количественных оценок из-за различий в эффективности амплификации разных таксонов. Тем не менее, связь с обилием зависела не столько от метрики, сколько от объема анализируемой метабаркодингом пробы. Использование 10 граммов почвы приводило к значимым корреляциям с обилием для большинства групп. Отсутствие выраженных различий между двумя количественными метриками, а также зависимость коэффициентов корреляции от эффективности обнаружения семейств, предполагают, что увеличение массы навески почвы обеспечивает более полное выявление разнообразия беспозвоночных и позволяет получать полуколичественные оценки обилия по крайней мере некоторых таксонов.

Таким образом, мы сравнили новую методику выделения ДНК из почвенных образцов с коммерческими наборами для выделения ДНК и классическим морфологическим методом. Разработанный протокол значительно увеличил разнообразие обнаруживаемых беспозвоночных по сравнению к коммерческим наборами. Предложенная методика приводит к выявлению большего разнообразия насекомых, в то время как морфологический метод выявляет большее разнообразие клещей и коллембол, что во многом обусловлено наличием специалистов в исследовательской группе. Около половины семейств и родов, выявленных метабаркодингом, не было подтверждено морфологическим методом, что отчасти может быть связано с наличием реликтовой ДНК. Применение нового метода экстракции ДНК в большинстве случаев улучшило корреляцию между обилием семейств беспозвоночных и частотой их встречаемости или числом ридов в образцах. Потенциал масштабирования обрабатываемого размера почвенного образца открывает путь к повышению точности оценок разнообразия и обилия почвенных беспозвоночных.

4.4. Оценка разнообразия почвенных беспозвоночных на экспериментальных площадках с помощью метабаркодинга средовой ДНК

В данной главе представлены результаты сравнения таксономического состава почвенных беспозвоночных, определённого традиционными методами и метабаркодингом средовой ДНК почвы на экспериментальных участках, где проводили измерения функциональной активности (глава 3). Традиционные почвенно-зоологические методы включали экстракцию беспозвоночных на воронках Берлезе-Тульгрена (для учета микроартропод) и ручной разбор почвенных монолитов для учёта макрофауны. Детальную идентификацию этих животных проводили по морфологическим признакам. Этот традиционный подход мы далее будем обозначать как «Морфология» или «Морфологический метод».

4.4.1. Результаты

По результатам работ на всех 50 экспериментальных участках морфологический метод обеспечил наиболее полное выявление разнообразия паукообразных (120 семейств) по сравнению с метабаркодингом по гену COI (46 семейств), однако результаты по гену 18S оказались сопоставимыми с морфологическими методом (86 семейств). Объединение данных по двум генам привело к увеличению выявляемого разнообразия до 104 семейств. Наибольшее разнообразие насекомых было выявлено с использованием гена COI, тогда как по гену 18S было идентифицировано только два семейства (рисунок 4.15). Метабаркодинг также позволил выявить большее разнообразие Clitellata, Diplopoda и Chilopoda по сравнению с морфологическим методом, причём для Diplopoda и Chilopoda более высокие показатели были получены с использованием гена 18S. Уровень выявляемого разнообразия коллембол был сопоставим между всеми методами (рисунок 4.15).

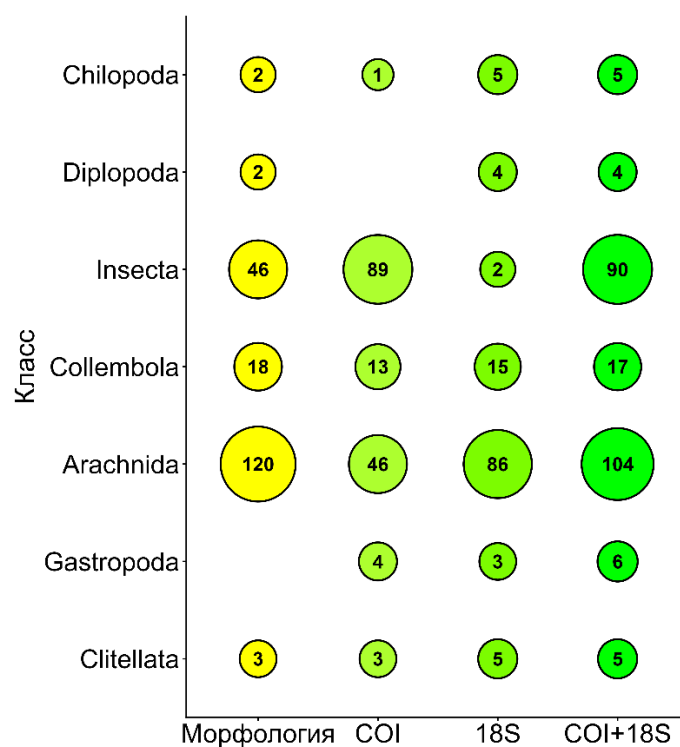


Рисунок 4.15 Число семейств беспозвоночных разных классов, выявленное морфологическим методом и метабаркодингом по генам COI и 18S среды ДНК почвы всех исследованных биотопов. Показаны только группы, учитываемые методами сухой экстракции и ручной разборки почвенных проб.

Как морфологический метод, так и метабаркодинг позволяли выявлять характерные для почвы группы беспозвоночных. Для паукообразных наиболее богатыми по числу семейств отрядами были Sarcoptiformes, Trombidiformes, Mesostigmata, Araneae (рисунок 4.16). Метабаркодинг по гену 18S также позволил выявить тропических представителей Schizomida, Palpigradi и Amblypygi, которые не были обнаружены традиционными почвенно-зоологическими методами. Выявленное разнообразие отрядов коллембол было сходным между морфологическим методом и метабаркодингом по каждому из двух генов (рисунок 4.16). Наиболее богатыми по количеству выявленных семейств отрядами насекомых были Coleoptera и Diptera. В результатах метабаркодинга по гену COI значительную долю составляли также семейства отрядов Lepidoptera и Hymenoptera. Как метабаркодинг, так и морфологический метод выявляли распространённые семейства дождевых червей (Lumbricidae, Megascolecidae, Glossoscolecidae – класс Clitellata) и отрядов многоножек (Polydesmida, Geophilomorpha, Lithobiomorpha). Секвенирование гена 18S позволило выявить представителей Ocnerodrilidae, Moniligastridae из класса Clitellata, Polyxenida из Diplopoda и Scolopendromorpha из класса Chilopoda (рисунок 4.16).

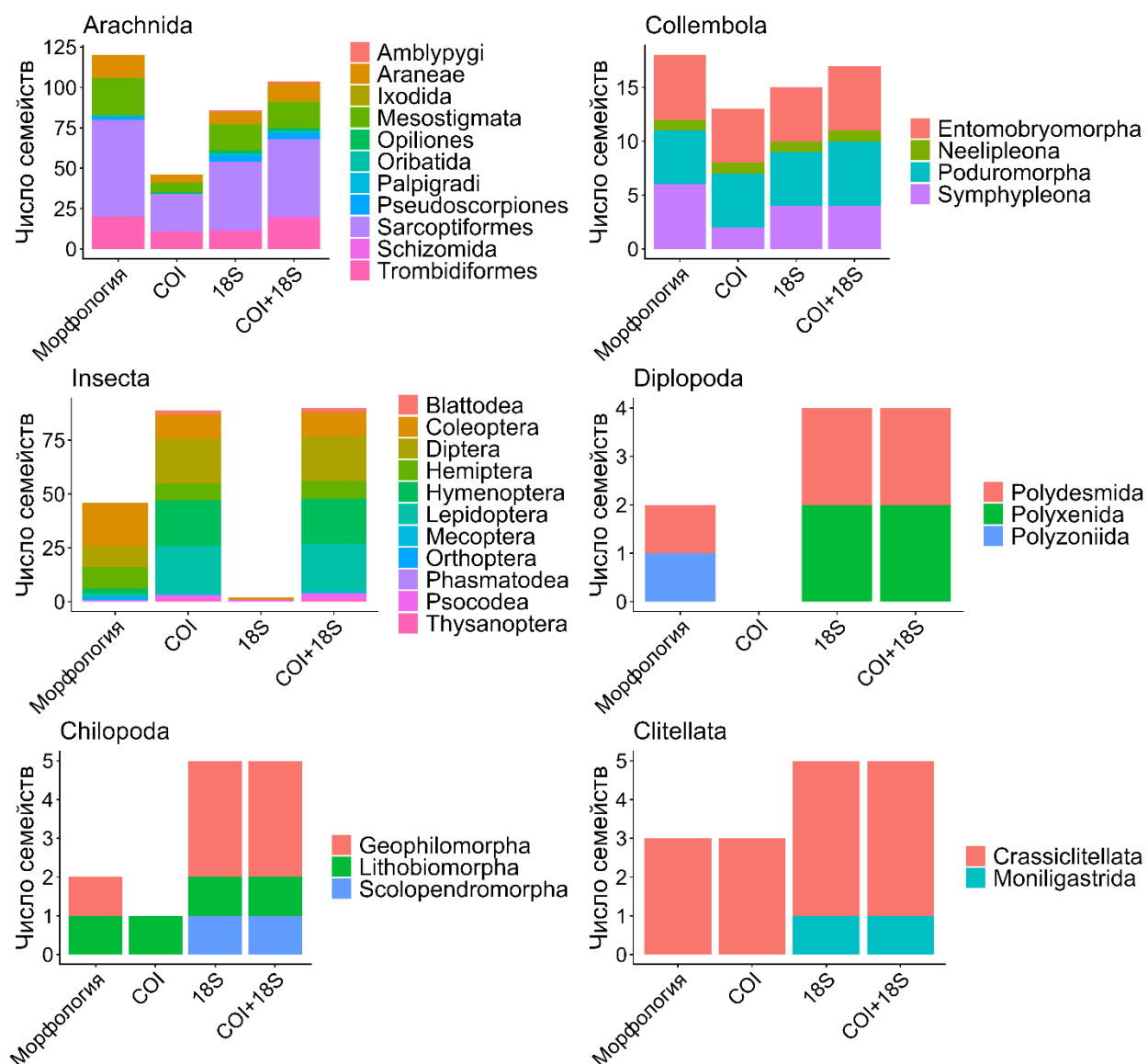


Рисунок 4.16. Число семейств разных отрядов основных классов почвенных беспозвоночных, выявленное морфологическим методом и метабаркодингом по генам COI и 18S среды ДНК почвы исследованных биотопов. Показаны только группы, учитываемые методами сухой экстракции и ручной разборки почвенных проб.

Число семейств, выявленное одновременно метабаркодингом и традиционным морфологическим методом, составляло 33% от общего разнообразия, выявленного двумя методами, и различалось в зависимости от класса. Для паукообразных доля семейств, общих для двух методов (37 %), была схожей с долей семейств, уникальных для морфологического метода (36 %). Большая часть семейств, уникальных для метабаркодинга (20 %), была выявлена при секвенировании гена 18S (рисунок 4.17). Более половины семейств коллембол (85%) было выявлено обоими методами. Уникальные для метабаркодинга семейства (1%) были выявлены только при секвенировании гена 18S.

Наибольшая доля разнообразия Diplopoda и Chilopoda была выявлена метабаркодингом гена 18S (рисунок 4.17).

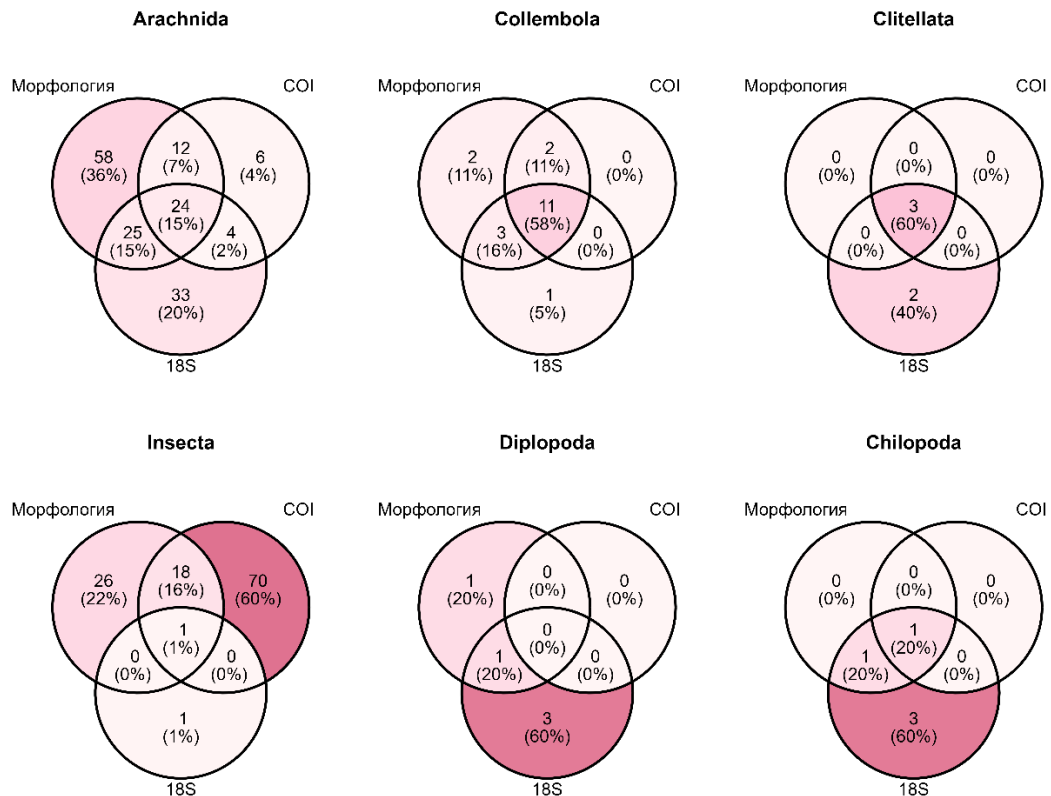


Рисунок 4.17. Число семейств основных классов почвенных беспозвоночных, выявленное морфологическим методом и метабаркодингом среды ДНК по генам COI и 18S.

Для оценки согласованности наших данных с современными представлениями о глобальном распределении почвенных сапрофагов мы построили зависимости таксономического богатства от среднегодовой температуры. Количество идентифицированных родов, выявленное метабаркодингом (по сумме двух генов) в отдельных пробах ($R^2 = 0,56$), а также и общее разнообразие для биотопов ($R^2 = 0,44$), было отрицательно связано с температурой (рисунок 4.18). При этом общее число родов, определяемое традиционными методами, не показало значимой связи с температурой ни при расчёте по отдельным пробам, ни при анализе на уровне биотопов. Поскольку выявленные паттерны были сходны на локальном уровне и на уровне биотопов, дальнейший анализ связи с температурой для отдельных таксонов проводили на уровне биотопов.

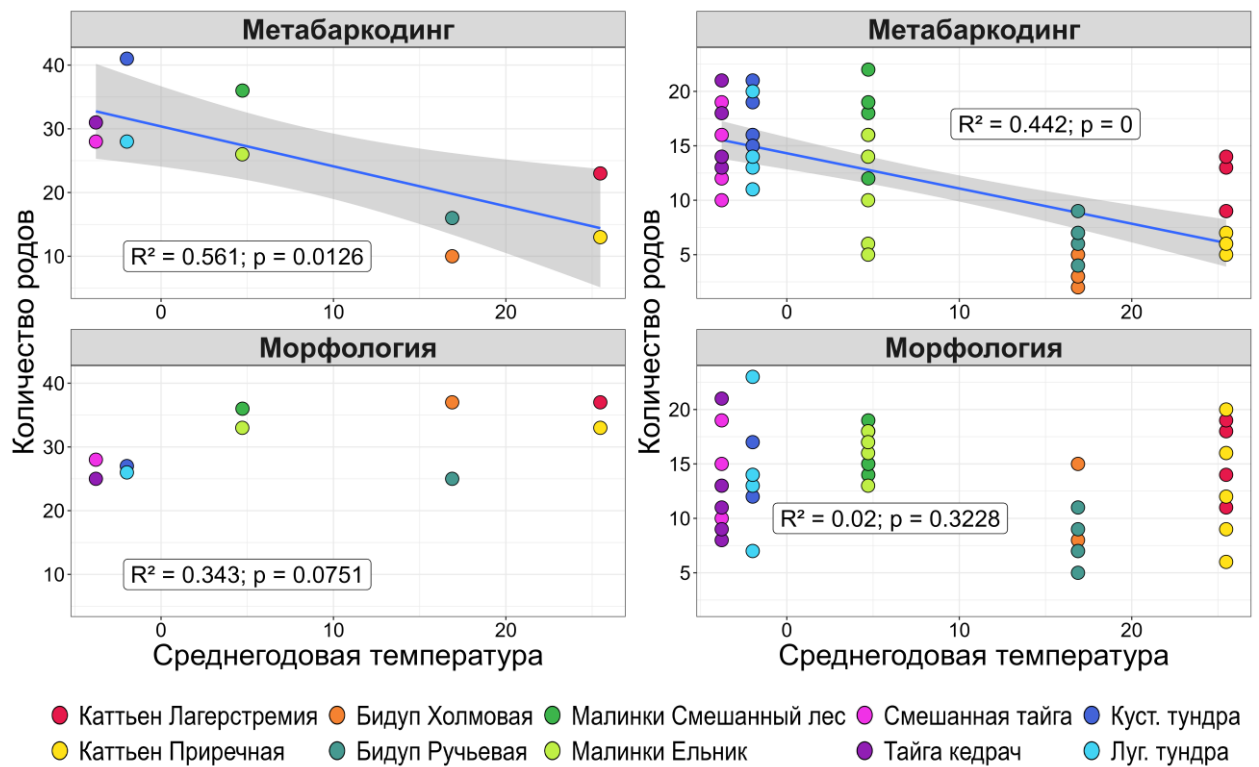


Рисунок 4.18 Общее для отдельных биотопов и локальное (в отдельных пробах) разнообразие почвенных беспозвоночных, выявленное метабаркодингом и традиционными методами в биотопах с разными климатическими условиями. Разнообразие для метабаркодинга рассчитано как суммарное разнообразие по двум генам (COI и 18S). Приведены параметры линейной регрессии. Область серого цвета соответствует 95% доверительному интервалу регрессии.

Разнообразие клещей ($R^2 = 0,63$) и коллембол ($R^2 = 0,50$), выявленное метабаркодингом, было отрицательно связано с температурой (рисунок 4.19). По данным морфологического метода коллемболы не показали связи с температурой, тогда как клещи продемонстрировали значимую положительную связь ($R^2 = 0,43$). Разнообразие дождевых червей не коррелировало с температурой при использовании любого метода. Морфологическим методом показана положительная связь между количеством выявляемых в биотопах семейств жуков-сапрофагов ($R^2 = 0,47$).

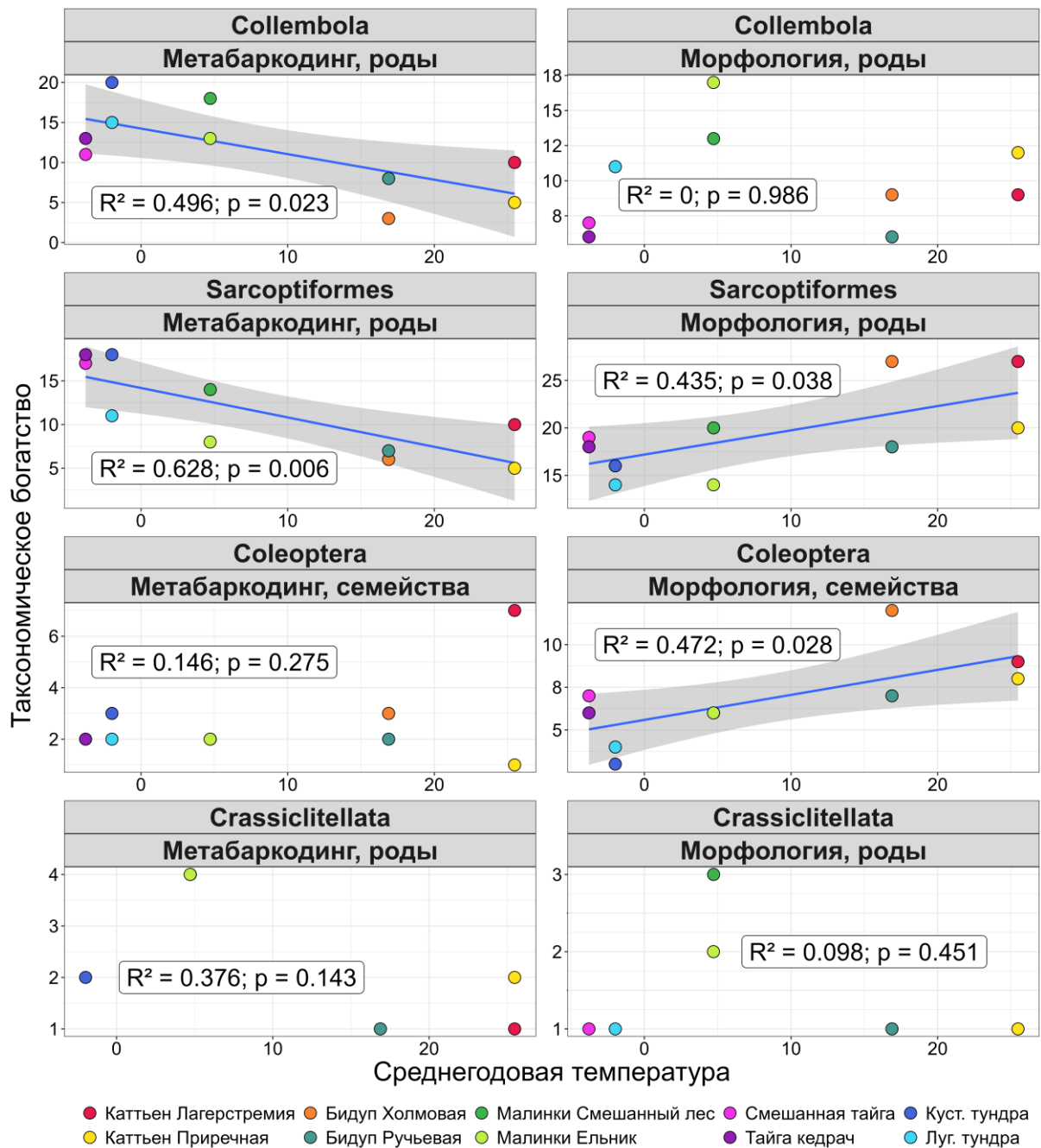


Рисунок 4.19. Связь таксономического богатства основных групп почвенных беспозвоночных от среднегодовой температуры. Точки показывают общее число родов и (для Coleoptera) семейств, выявленное в отдельных биотопах разными методами. Область серого цвета соответствует 95% доверительному интервалу регрессии.

Механизмы, определяющие роль разнообразия почвенных беспозвоночных в экосистемных процессах, часто связаны с присутствием в экосистемах отдельных ключевых групп животных (Briones, 2014, раздел 1.2). В данной работе в качестве таких групп мы выделили дождевых червей, диплопод, мокриц и термитов. Чтобы проверить, как параметры функциональной активности связаны с присутствием этих групп (см. главу 5), мы оценили эффективность их выявления метабаркодингом и традиционными методами.

Дождевые черви были выявлены во всех исследованных биотопах, причем для большинства из них присутствие подтверждалось как традиционным методом ручного разбора проб, так и метабаркодингом средовой ДНК (рисунок 4.20). Двупароногие многоножки обнаруживались с сопоставимой эффективностью обоими методами, за исключением биотопов северной тайги и одной площадки горного тропического леса, где они были отмечены только с использованием традиционного подхода. Мокрицы были обнаружены только при ручном разборе почвенных проб во всех тропических экосистемах, но не в зоне умеренных лесов, хотя и являются типичными представителями местной фауны. Однако присутствие мокриц было отмечено в одной из шестнадцати проб, отобранных в смешанном лесу умеренной зоны для разработки методики выделения ДНК из почвы (раздел 4.3 - рисунок 4.12). Присутствие термитов было зарегистрировано в трех из четырех исследованных тропических биотопов. При этом метабаркодинг позволил выявить термитов даже в биотопе «Ручьевая» горного тропического леса, где их численность была очень невысокой (рисунок 4.20).

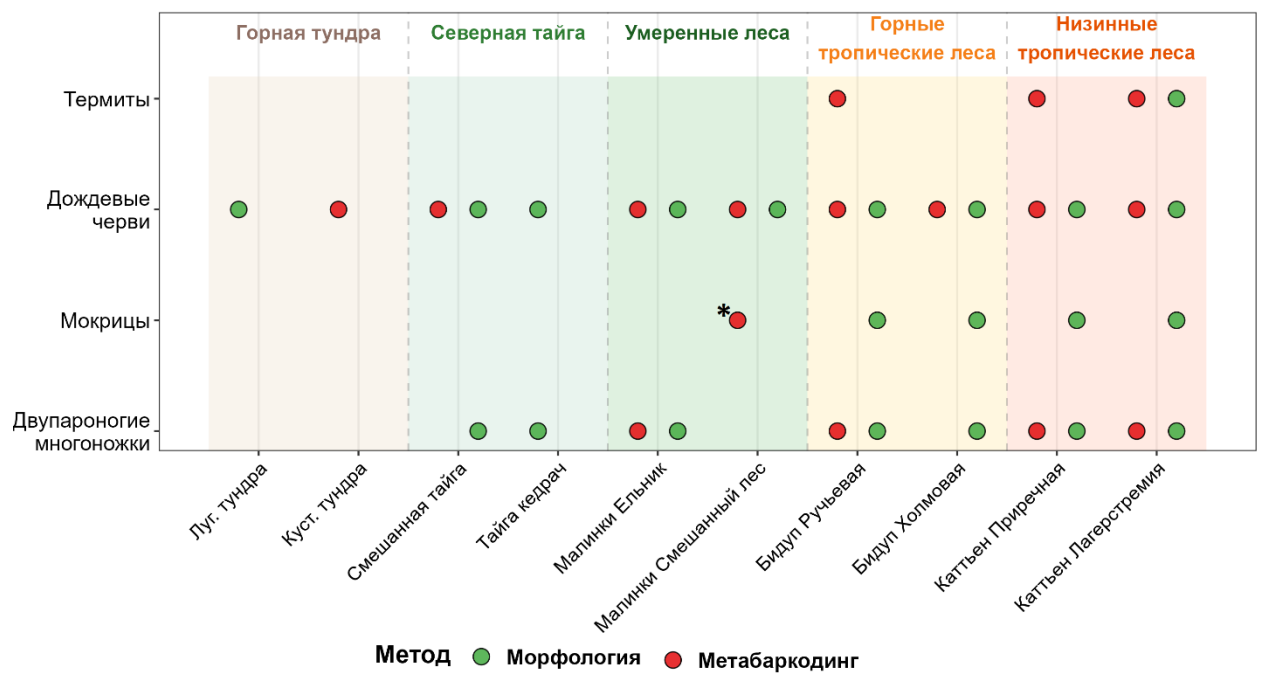


Рисунок 4.20. Присутствие ключевых групп почвенной макрофауны в исследованных экосистемах, выявленное по результатам метабаркодинга средовой ДНК по двум маркерным генам (красные точки) и традиционным морфологическим методом (зелёные точки). * - Присутствие мокриц в смешанном лесу умеренной зоны было отмечено метабаркодингом при разработке методики выделения ДНК из почвы (раздел 4.3), отбор проб для которой проводился в этом биотопе.

4.4.2. Обсуждение

Использование разных генетических маркеров для оценки разнообразия почвенной фауны. Использование нескольких маркерных генов и праймеров, специфичных к разным группам организмов, позволяет значительно расширить таксономический охват выявляемого разнообразия. Даже в рамках характеристики только почвенных беспозвоночных могут применяться отдельные маркеры для коллембол, насекомых и дождевых червей (Bloor et al., 2021; Guerrieri et al., 2023). Использование гена 18S позволяет выявлять большее разнообразие на уровне крупных таксономических групп, особенно для Annelida и Nematoda (Brunetti et al., 2024; Horton et al., 2017; Kirse et al., 2021), однако обладает значительно меньшим таксономическим разрешением по сравнению с COI.

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными. Ген 18S позволил выявить большее разнообразие Annelida и Diplopoda, а также существенно дополнил разнообразие клещей Sarcotiformes. В то же время этот маркер практически не идентифицировал насекомых, что также соответствует опубликованным данным (Kirse et al., 2021). В связи с этим, мы объединили идентифицированные последовательности по обоим маркерам на уровне семейств, что позволило значительно дополнить морфологический метод.

Сравнение оценки связи разнообразия почвенных беспозвоночных с температурой в широтном градиенте: морфологический подход и метабаркодинг. Разнообразие большинства наземных организмов уменьшается от экватора к полюсам, но почвенные животные не всегда следуют этой зависимости (Cameron et al., 2019). Так, в обзорной работе (Maraun et al., 2007) было показано, что разнообразие орибатид увеличивается от бореальных экосистем к тёплым умеренным, но не продолжает увеличение к тропикам. Однако ввиду непрерывного описания новых видов и развития молекулярных методов результаты подобных оценок могут меняться. Недавнее исследование предполагает, что видовое разнообразие орибатид выше в тропиках, а разнообразие на уровне семейств не отличается между разными биогеографическими регионами (Lu et al., 2024). Напротив, глобальная оценка разнообразия с использованием секвенирования маркерного гена 18S показала, что разнообразие паукообразных может быть выше в северных регионах (Bastida et al., 2019).

Результаты наших оценок показали разнонаправленный характер зависимостей выявляемого родового богатства орибатид от среднегодовой температуры. Традиционный подход позволил выявлять большее число родов орибатид в тропических биотопах с более

высокой среднегодовой температурой, что согласуется с результатами оценок разнообразия оribатид в климатическом градиенте (Lu et al., 2024). В тоже время оценки разнообразия клещей Sarcoptiformes с помощью метабаркодинга были выше в таёжных и тундровых экосистемах, что согласуется результатами работы (Bastida et al., 2019)

Глобальное распределение разнообразия коллембол в широтном градиенте, по-видимому, не имеет единого паттерна. Уровень разнообразия не зависит от среднегодовой температуры, а определяется скорее типом экосистем с определёнными условиями обитания (Potapov et al., 2023). Данные морфологического определения в целом подтвердили этот паттерн, однако метабаркодинг показал ярко выраженную отрицательную связь выявляемого числа родов с температурой.

Интерпретация полученных с помощью метабаркодинга результатов требует учёта специфики этого метода. Эффективность детекции отдельных таксонов в значительной степени зависит от обилия групп (рисунок 4.14). Обилие коллембол, как правило, значительно выше в северных регионах, чем в тропических (Potapov et al., 2023); низкое обилие снижает вероятность обнаружения таксонов и приводит к заниженным оценкам разнообразия. Схожие причины могут объяснять и отрицательную связь разнообразия Sarcoptiformes со среднегодовой температурой. Указанная специфика данных, получаемых с использованием метабаркодинга, могла являться причиной расхождений между результатами сравнений молекулярных и классических методов оценок разнообразия почвенных беспозвоночных в масштабном исследовании (Köninger et al., 2025).

В отличие от других членистоногих, насекомые продемонстрировали ярко выраженную положительную связь локального разнообразия семейств, выявленных по гену COI, с температурой, что согласуется с глобальными паттернами разнообразия (French et al., 2023) Морфологический метод не показал значимой зависимости, что вероятно связано с невозможностью или низким качеством идентификации личинок и ювенильных особей (Fraga Dornellas et al., 2025), особенно в тропических экосистемах.

Выявляемое в отдельных биотопах число родов дождевых червей не имело значимых связей с температурой. Наибольшее их родовое богатство было отмечено в лесах умеренных широт, что совпадает с результатами глобального исследования Phillips et al., (2019).

Представленная выше интерпретация зависимости разнообразия разных таксономических групп от среднегодовой температуры требует учёта специфики исследованных биотопов. Ряд экосистем в нашем исследовании представлен горными

биотопами, для которых характерна специфическая структура сообществ, не всегда сопоставимая с равнинными регионами (Qin et al., 2024; Зенкова и др., 2011). Тем не менее, выявленные нами глобальные закономерности во многом согласуются с известными в литературе паттернами. А выявленные обратные зависимости находят обоснованные объяснения.

Встречаемость ключевых групп почвенных макросaproфагов. Совместное использование метабаркодинга и морфологического метода позволило выявить присутствие всех ключевых групп почвенных макросaproфагов, характерных для исследованных биотопов. В горной тундре из числа рассматриваемых таксонов присутствовали только дождевые черви; в северной тайге к ним добавлялись двупарноногие многоножки. В лесах умеренной зоны дополнительно отмечены мокрицы, а в тропических экосистемах были зафиксированы термиты.

Вместе с тем эффективность детекции отдельных групп зависела от использованного подхода. Двупарноногие многоножки имели высокую численность в биотопах северной тайги, однако не были выявлены при использовании метабаркодинга. Мокрицы в тропических экосистемах выявлялись исключительно методом ручного разбора почвенных проб, тогда как в лесах умеренной зоны, где эта группа является обычным компонентом фауны (Гиляров, 1983), их присутствие в пробах не было подтверждено ни морфологическим, ни молекулярным методом. Однако в ходе отработки протокола выделения ДНК (раздел 2.2.3) на территории смешанного леса был выполнен дополнительный пробоотбор. Из 16 проанализированных образцов присутствие мокриц было зафиксировано только в одном. Данный результат служит косвенным свидетельством того, что в период проведения исследований обилие мокриц, по-видимому, было низким, а их детекция стала возможной лишь при существенном увеличении объема выборки.

Метод ручного разбора почвенных проб предназначен для учёта разнообразия большинства групп макрофауны, однако слабо подходит для термитов, которые имеют сильно агрегированное пространственное распределение. В результате этого традиционный метод показал присутствие термитов только в одном из исследованных биотопов низинных тропиков, хотя их численность там очень велика (Беляева и Тиунов, 2010). Метабаркодинг же позволил детектировать их присутствие не только в биотопах низинного тропического леса, но и в горных тропиках, где их активность значительно ниже. Низкая эффективность детекции малочисленных, агрегированных или высокоподвижных групп беспозвоночных может компенсироваться увеличением анализируемой выборки проб. Использование метабаркодинга средовой ДНК обладает значительным потенциалом для анализа больших

выборок, что позволяет расширить возможность детекции ключевых групп почвенных беспозвоночных.

Необходимо отметить, что представленные в этом разделе данные о разнообразии почвенных беспозвоночных, или присутствии ключевых таксономических групп, в отдельных биотопах были получены в рамках комплексного эксперимента, направленного главным образом на исследование функциональной активности педобионтов (глава 3). Это по необходимости ограничивало как объем выборки (всего пять проб на один тип экосистемы), так и затраты труда и времени на обработку полученных материалов. Нет сомнений, что в таких условиях значительная часть общего разнообразия была упущена, но мы и не ставили целью его полное выявление. Однако во всех биотопах работы были выполнены одним и тем же исследователем, с применением одинаковых методов и с затратой приблизительно одинаковых усилий, что обеспечивает получение сравнимых в пределах этой работы результатов.

4.5. Заключение

Нами был проведён комплекс экспериментов по оценке эффективности и разработке новых методик метабаркодинга для использования в полевых экологических исследованиях.

Для начала мы с использованием модельного сообщества с известным видовым составом проверили эффективность метабаркодинга в выявлении разнообразия почвенных беспозвоночных на разных таксономических уровнях (раздел 4.1). Затем мы проверили, насколько метабаркодинг может использоваться для отслеживания изменений состава и структуры естественных сообществ педобионтов. На этом этапе мы использовали беспозвоночных, выделенных из образцов почвы, чтобы апробировать подход на более сложном, по сравнению с модельным сообществом, материале (раздел 4.2). После этого мы разработали и протестировали новую методику выделения ДНК из почвы для более эффективной детекции почвенных беспозвоночных (раздел 4.3) и применили её на широком географическом градиенте (раздел 4.4). При полевых экспериментах параллельно с пробами для анализа с помощью метабаркодинга мы отбирали пробы для учёта разнообразия почвенной фауны классическими почвенно-зоологическими методами (ручной разбор почвенных монолитов и экстракция на воронках Берлезе-Тульгрена).

Эксперимент с искусственными сообществами почвенных беспозвоночных показал, что метабаркодинг способен выявлять относительно высокую долю таксономического состава этих сообществ (в лучшем варианте экстракции ДНК он составил 94% для семейств, 74% для родов и 67% для видов). При работе со значительно более разнообразными естественными сообществами, доля общих с морфологическим методом идентифицированных таксонов значительно снижалась – 31 % для семейств, 11 % для родов и всего 5 % для видов. Это ясно указывает на необходимость совершенствования методов метабаркодинга извлеченных из почвы животных, но также требует и проверки традиционных методов, эффективность и точность которых далека от 100%.

Это в полной мере относится и к совершенствованию методов извлечения из почвы и анализа средовой ДНК. Разработанная методика выделения ДНК из больших навесок почвы позволила выявить в 2,5 раза большее разнообразие почвенных беспозвоночных по сравнению со стандартным подходом, использующим 0,5 г почвы. Доля общих таксонов с традиционными почвенно-зоологическими методами составляла 31 % семейств и 21 % родов. Апробация разработанной методики в широком климатическом градиенте подтвердила, что при сравнимых оценках общего разнообразия, получаемых двумя методами, доля общих для метабаркодинга и традиционных методов семейств составляет около одной трети общего разнообразия, с большой вариацией между таксономическими группами (от 17% для семейств насекомых до 85% для коллембол). Основными причинами расхождений между методами являются неполнота референсных баз данных в случае метабаркодинга и сложность идентификации значительной доли организмов при традиционном морфологическом подходе.

Мы также предприняли попытку использования данных о встречаемости таксонов в серии проанализированных с помощью метабаркодинга средовой ДНК проб в качестве меры обилия почвенных беспозвоночных. Для ряда групп почвенной фауны были получены статистически значимые связи между обилием, оценённым с помощью традиционных почвенно-зоологических методов, и встречаемостью в пробах метабаркодинга. Этот результат свидетельствует о перспективе использования метабаркодинга для получения количественных данных, что значительно расширяет возможные области его применения в экологических исследованиях.

Глава 5. Связь разнообразия и функциональной активности почвенных сапрофагов

В данной главе мы рассматриваем описанные в главе 3 результаты в контексте функциональной значимости разнообразия почвенных животных и соотносим экосистемные процессы с присутствием ключевых групп почвенной макрофауны. Основываясь на результатах главы 4, в качестве метрики разнообразия мы использовали число семейств сапрофагов, выявленное в модельных биотопах при объединении данных, полученных в ходе метабаркодинга средовой ДНК (раздел 2.5.4) и традиционными почвенно-зоологическими методами (раздел 2.2). Мы сопоставили измеренные параметры функциональной активности (LRR, BLT, миграция бисера – S) с богатством семейств тех групп почвенной фауны, активность которых влияет на соответствующие процессы. Для LRR это было богатство семейств макросапрофагов; интенсивность потребления приманки (BLT) сопоставляли с общим числом семейств всех сапрофагов (макро- и мезофауны). Интенсивность миграции частиц бисера связывали с разнообразием дождевых червей на уровне рода.

5.1. Результаты

Ни один из измеренных в нашей работе функциональных параметров (вклад сапрофагов в деструкцию опада, трофическая активность, интенсивность биотурбации) не был статистически значимо связан с разнообразием беспозвоночных, влияющих на эти параметры.

В разделе 3.1 мы отмечали, что максимальный вклад макросапрофагов в деструкцию в ряду изученных биотопов не совпадает с максимальными скоростями деструкции опада (рисунок 3.3). Наименьшая скорость деструкции опада в мешках с доступом всей почвенной фауны, а также минимальный вклад макрофауны в этот процесс наблюдались в биотопах горной тундры и северной тайги (рисунок 5.1). Среди ключевых групп почвенной макрофауны в этих биотопах были отмечены подстилочные дождевые черви и диплоподы (рисунок 5.2). В лесах умеренной зоны, где помимо подстилочных дождевых червей и диплопод встречались также мокрицы, норные и почвенные дождевые черви, скорость деструкции значимо возрастала, а LRR достигал максимальных значений (рисунок 5.1; 5.2).

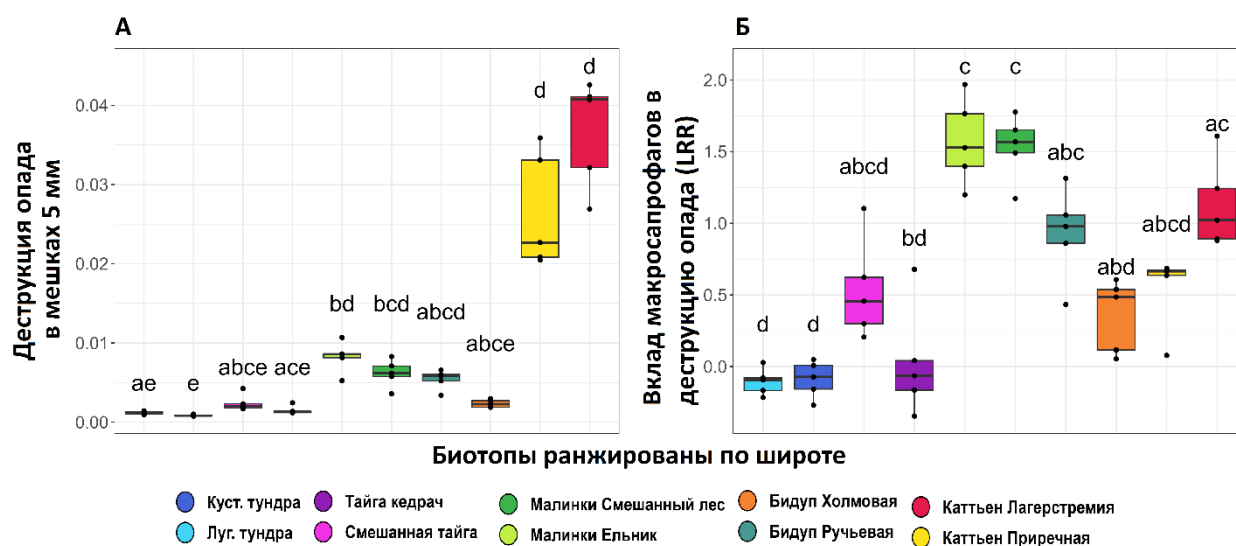


Рисунок 5.1 Показатели, связанные с деструкцией опада в широтном градиенте биотопов. А - Деструкция опада в мешках с доступом всех размерных групп почвенной фауны (значения коэффициентов деструкции в мешках с размером ячеей 5 мм, нормированные на количество дней). Б – Вклад макроспрофагов в деструкцию опада, рассчитанный по отношению коэффициентов деструкции в мешках с доступом всех почвенных беспозвоночных (размер ячеей 5 мм) и ограничивающих доступ макрофауны (размер ячеей 1,2 мм). Разные буквы обозначают статистически значимые различия между группами по критерию Данна ($p < 0,05$).

В горных тропических экосистемах скорость деструкции опада не отличалась от таковой в умеренных и таёжных биотопах, несмотря на присутствие термитов. Максимальная скорость деструкции была зафиксирована в биотопах низинного тропического леса, тогда как медианные значения LRR в них снижались по сравнению со смешанным лесом умеренного климата (рисунок 5.1). В этих биотопах термиты имели наибольшую представленность, в то время как среди дождевых червей были отмечены преимущественно почвенные формы. Для тропических экосистем нами были также было отмечено большее таксономическое разнообразие насекомых-детритофагов (сверчков, тараканов, палочников) (рисунок 5.2)

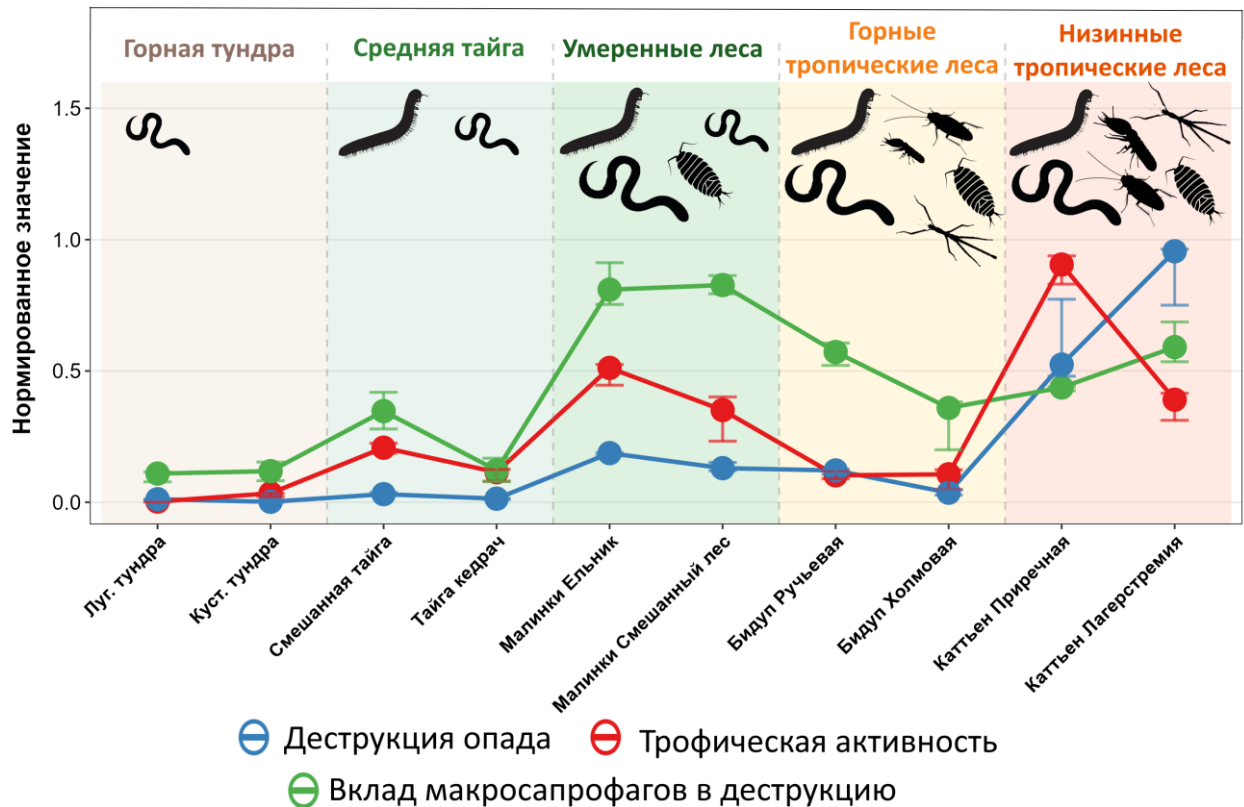


Рисунок 5.2. Нормализованные значения скорости деструкции опада в мешках с доступом всех почвенных беспозвоночных (размер ячеек 5 мм), трофической активности, оценённой с помощью bait lamina test, и вклада макросaproфагов в деструкцию опада в широтном градиенте. Точки показывают медианные значения представленных показателей, усы – межквартильный размах. Тёмные силуэты отражают присутствие в экосистемах ключевых групп почвенных макросaproфагов (см. главу 4.4.).

5.2. Обсуждение

В отличие от показателей обилия и биомассы, которые напрямую связаны с количеством перерабатываемого растительного материала или с длиной прокладываемых ходов, связь экологических функций с разнообразием определяется более сложными зависимостями. Механизмы, лежащие в основе таких зависимостей, связаны с нишевой комплиментарностью, приводящей к более полному освоению ресурсов, присутствием ключевых видов, деятельность которых определяет течение важнейших экосистемных процессов, а также дублированием функций отдельных видов, что приводит к повышению устойчивости экосистем.

Мы не выявили зависимостей между трофической активностью и интенсивностью миграции частиц бисера с таксономическим разнообразием сапрофагов, оказывающих прямое влияние на рассматриваемые показатели. Данные результаты согласуются с известными закономерностями, предполагающими, что функциональная избыточность сообществ почвенных беспозвоночных по-видимому, нивелирует связь между таксономическим разнообразием и отдельными экосистемными функциями (Cole et al., 2006; Setälä et al., 2005).

Среди наиболее интересных феноменов, обнаруженных в нашем исследовании, нельзя не отметить расхождения в паттернах изменения скорости деструкции опада и вклада макрофауны в этот процесс в широтном градиенте. Скорость деструкции опада была максимальна биотопах низинных тропиков, что согласуется с общеизвестными трендами (Aerts, 1997; Berg and McClaugherty, 2008). Термиты являются одной из наиболее значимых групп сапрофагов, а их присутствие в тропических экосистемах предполагает более высокий вклад беспозвоночных в деструкцию опада по сравнению с другими регионами. Помимо термитов, в исследованных нами тропических экосистемах было отмечено значительно большее таксономическое разнообразие насекомых-детритофагов (сверчков, тараканов, палочников) по сравнению с другими экосистемами. Однако максимальный вклад макросапрофагов в деструкцию опада был отмечен в зоне умеренных и широколиственных лесов. Это частично согласуется с результатами ряда работ (Heděpec et al., 2022; Li et al., 2024; Wall et al., 2008; Zeng et al., 2024), которые отмечали, что роль сапрофагов в процессах деструкции опада не достигает пика в тропических лесах. В нашей работе данный результат может быть связан с высокой численностью и разнообразием функциональных групп дождевых червей в биотопах умеренного климата. Ключевая роль дождевых червей в функционировании почвенных сообществ показана во многих частных работах (da Silva et al., 2020; Ernst et al., 2009; Potapov et al., 2026) и метаанализах (Eisenhauer, 2010; Huang et al., 2020; Y. Wang et al., 2025). В лесах умеренной зоны (биостанция «Малинки») дождевые черви в наших пробах были представлены четырьмя родами: *Aporrectodea*, *Octolasion*, *Dendrobaena* и *Lumbricus*. Среди них идентифицированы почвенные формы — *Aporrectodea* (*A. caliginosa* и *A. rosea*) и *Octolasion lacteum*, а также подстилочный вид *Dendrobaena octaedra*. В составе рода *Lumbricus* отмечены норный вид *Lumbricus terrestris* и два подстилочных вида — *Lumbricus rubellus* и *Lumbricus castaneus*. В тропических экосистемах разнообразие дождевых червей было ниже и представлено инвазивным почвенным видом *Pontoscolex corethrurus*, а также видами, относящимися к родам *Amyntas* и *Nematogenia*. Видовая идентификация представителей этих двух родов

оказалась невозможной ни по морфологическим, ни по молекулярным данным. Большинство представителей рода *Amyntas* относятся к почвенно-подстилочным видам, обитающим в верхней части почвенного профиля (Bethke and Midgley, 2020), тогда как *Nematogena* обычно представлен почвенными формами (Kamau et al., 2020; Norgrove et al., 2011). Присутствие всех трёх функциональных групп дождевых червей в зоне умеренных лесов, вероятно, обеспечивало высокий вклад макросапрофагов в деструкцию опада. Данные закономерности подтверждаются представлениями о том, что вклад беспозвоночных в экосистемные процессы достигает максимума при ограниченном числе функциональных групп (Setälä et al., 2005).

Полученные нами зависимости в значительной степени ограничены числом биотопов, в которых проводился эксперимент. Расположение десяти исследованных экосистем в четырех биотах позволило построить широтный градиент, в котором при движении к экватору добавлялись новые функциональные группы макросапрофагов (рисунок 5.4). Однако число исследованных биотопов не позволило получить достаточно данных для проведения формальных статистических тестов значимости влияния присутствия ключевых групп макросапрофагов на экосистемные процессы. Тем не менее, наша работа в целом подтверждает, что вклад беспозвоночных в экосистемные процессы, такие как деструкция опада, в значительной степени определяется присутствием ключевых групп почвенной макрофауны, среди которых морфо-экологические группы дождевых червей являются наиболее значимыми. Экспериментальное подтверждение функционального значения разнообразия педобионтов за пределами присутствия немногих ключевых функциональных групп требует включения в анализ значительно более широкого спектра экосистем. Выполнение этой задачи существенно облегчится по мере расширения набора методов оценки функциональной активности почвенных животных и совершенствования молекулярных (или иных) методов учета разнообразия и обилия педобионтов.

Заключение

Почвенные беспозвоночные являются одним из ключевых компонентов наземных экосистем, обеспечивая выполнение важнейших экосистемных процессов. Несмотря на это, их вклад в функционирование экосистем до настоящего времени остаётся количественно охарактеризованным лишь в ограниченной степени, а связь между интенсивностью экосистемных процессов и обилием беспозвоночных в большинстве случаев рассматривается преимущественно в рамках теоретических работ и метаанализов. Между тем, экспериментальное выявление и количественное описание таких закономерностей имеет принципиальное значение для совершенствования биогеохимических моделей, используемых для прогнозирования изменений экосистем в условиях глобального изменения климата и возрастающего антропогенного воздействия.

В настоящей работе показано, что основные компоненты функциональной активности почвенных беспозвоночных — трофическая и биотурбационная активность, посредством которых они реализуют своё влияние на экосистемные функции, тесно связаны с обилием макросапрофагов. В ходе исследования был разработан и апробирован новый полевой метод оценки биотурбационной активности, а также впервые предпринята попытка использовать распределение стабильных изотопов в почвенном профиле для количественной оценки вклада почвенной фауны в процессы перемешивания почвы. Полученные результаты также подтвердили, что при проведении крупномасштабных макроэкологических исследований критически необходимо учитывать температурную зависимость активности почвенных беспозвоночных. Хотя количественные значения выявленных зависимостей требуют дальнейшей проверки в более масштабных исследованиях, полученные результаты доказывают принципиальную возможность использования данных об обилии почвенных беспозвоночных для прогнозирования их вклада в экосистемные процессы.

Важным направлением настоящего исследования стало развитие методов ДНК-метабаркодинга для применения в экологических задачах почвенной зоологии. Комплекс экспериментов с естественными и искусственными сообществами почвенных беспозвоночных показал, что технические особенности метабаркодинга и классических почвенно-зоологических методов приводят к значительным различиям в выявляемом разнообразии, даже при сходном числе детектируемых таксонов. Однако при увеличении таксономического уровня данные различия снижаются. Поскольку для многих

представителей почвенной фауны функциональные группы выделяются на уровне родов или даже семейств, это указывает на возможность использования менее трудозатратного метабаркодинга в экологических работах. Разработанный протокол выделения ДНК позволил существенно повысить эффективность выявления основных групп почвенных беспозвоночных, а также получать полуколичественные оценки их обилия. Использование разработанной методики позволило в рамках крупномасштабного полевого исследования проанализировать связь функциональной активности почвенной фауны с её таксономическим разнообразием. Было показано, что интенсивность исследованных экосистемных процессов определяется не уровнем родового богатства почвенных беспозвоночных, а присутствием в экосистеме ключевых функциональных групп макрофауны. Несмотря на ожидаемость такого результата с теоретической точки зрения, до настоящего исследования он не был подтверждён прямыми крупномасштабными полевыми экспериментами. Это свидетельствует о возможности использования даже бинарных данных о присутствии ключевых групп почвенной фауны для оценки интенсивности экосистемных процессов. В свою очередь, применение метабаркодинга открывает возможность анализа существенно большего количества проб по сравнению с традиционными методами, что значительно расширяет возможности выявления ключевых функциональных групп и изучения закономерностей их распределения.

Таким образом, выполненная работа не только показывает связь между экосистемными функциями и обилием педобионтов, но и предлагает новые методические подходы к количественному исследованию их сообществ. Совокупность полученных результатов создаёт основу для интеграции данных о почвенной фауне в современные модели функционирования экосистем и их отклика на глобальные изменения окружающей среды.

Выводы

1. В широком климатическом градиенте экспериментально измеренные трофическая активность почвенных животных и вклад макросапрофагов в деструкцию опада статистически значимо связаны с их общим обилием ($R^2 = 0,19$ и $0,45$, соответственно). Учёт температурной зависимости метаболизма макросапрофагов приводит к значительному увеличению силы связи для трофической активности ($R^2 = 0,73$) и вклада в деструкцию опада ($R^2 = 0,60$).
2. С помощью вновь разработанного метода выявлена статистически значимая связь ($R^2 = 0,44$) между интенсивностью биотурбации почвы (скоростью погружения яркоокрашенных трассирующих частиц) и скорректированным на температуру обилием дождевых червей.
3. Зависимость изотопного состава азота и углерода от содержания этих элементов в почвенном профиле имеет слабую положительную связь с метаболизмом почвенных макросапрофагов. Это предполагает, что влияние беспозвоночных на изотопный профиль почвы определяется преимущественно стимуляцией микробной активности, а не перемещением органического вещества.
4. Эксперимент с искусственными смесями видов показал возможность с помощью метабаркодинга корректно идентифицировать до 95% семейств беспозвоночных. Однако результаты метабаркодинга «естественной» смеси экстрагированных из почвы животных существенно расходятся с результатами традиционных морфологических методов идентификации (около 30% общих семейств). Тем не менее, традиционный морфологический метод и метабаркодинг показали схожие паттерны изменения сообществ почвенных беспозвоночных в ответ на экспериментальные нарушения почвенного покрова.
5. Разработанная методика выделения средней ДНК из больших (10 г) навесок почвы позволила выявить в 2,5 раза большее разнообразие почвенных беспозвоночных по сравнению со стандартным подходом, использующим 0,5 г почвы. При использовании для выделения ДНК 10 г почвы выявлены значимые корреляции между полуколичественными метриками (относительным числом ридов и встречаемостью таксонов), полученными при метабаркодинге, и обилием ключевых групп почвенных членистоногих.
6. Таксономическое богатство почвенных сапрофагов, оцененное комбинацией традиционного метода и метабаркодинга средней ДНК, не показало значимых связей с трофической активностью и интенсивностью биотурбации. По-видимому, функциональная избыточность сообществ нивелирует связь между таксономическим разнообразием и отдельными экосистемными функциями почвенных сапрофагов.

Список литературы

1. Аничкин А. Е., Беляева Н. В., Довгоброд И. Г., Швейнкова Ю. Б., Тиунов А. В. Почвенное население муссонных тропических лесов заповедников Кат Тьен и Би Дуп-Нуй Ба (Южный Вьетнам) // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2007. Т. 5. С. 598–607.
2. Беляева Н. В., Тиунов А. В. Термиты (Isoptera) в лесных экосистемах национального парка Кат Тьен (Южный Вьетнам) // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2010. Т. 4. С. 442–450.
3. Букварева Е. Н., Алещенко Г. М. Принцип оптимального разнообразия биосистем // Успехи современной биологии. 2005. Т. 125. № 4. С. 337–348.
4. Вернадский В. И. Проблемы биогеохимии. II. О коренном материально-энергетическом отличии живых и косных естественных тел биосферы. Москва; Ленинград: Издательство Академии наук СССР, 1939. (Труды Академии наук СССР).
5. Воронова Н. В., Буга С. В., Курченко В. П. Последовательность гена субъединицы I цитохромоксидазы С в молекулярной таксономии животных: принципы, результаты и проблемы использования // Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярно-биологические науки. 2012. Т. 7, ч. 1. С. 217–233.
6. Гиляров М. С. Соотношение размеров и численности почвенных животных // Доклады АН СССР. 1944. Т. 43. С. 283–285.
7. Гиляров М. С. Почвенная фауна и жизнь почвы // Почвоведение. 1939. С. 3–15.
8. Гиляров М. С. Фауна и экология почвенных беспозвоночных Московской области / под ред. М. С. Гилярова. — Москва : Наука, 1983. — 215 с.
9. Докучаев В. В. Русский чернозём : отчет Императорскому Вольному экономическому обществу. — Санкт-Петербург : Типография Деклерона и Евдокимова, 1883. — 376 с.
10. Зенкова И. В., Пожарская В. В., Похилько А. А. Высотное распределение почвенной фауны Хибин // Почвоведение. 2011. № 9. С. 1083–1093.
11. Леонов В. Д., Рахлеева А. А., Сидорчук Е. А. Распределение панцирных клещей (Acari: Oribatida) на высотном профиле горы Вудъяврчорр (Хибинские горы) // Почвоведение. 2015. № 11. С. 1383–1393.

12. Леонов В. Д., Тиунов А. В. Взаимодействие беспозвоночных и синтетических полимеров в почве (обзор) // Экология. 2020. № 6. С. 403–416
13. Рыбалов Л. Б., Воробьёва И. Г. Население почвенных беспозвоночных в таёжных экосистемах среднего течения реки Енисей // Изучение биологического разнообразия на Енисейском экологическом трансекте. Животный мир. 2002. С. 8–43.
14. Сотников И. В., Белов А. А., Леонов В. Д., Макарова О. Л., Машков К. А., Короткевич А. Ю., Кривошеина М. Г., Розанова О. Л., Рыбалов Л. Б., Танасевич А. В., Чепцов В. С., Тиунов А. В. Влияние макропластика на сообщества почвенных беспозвоночных: исследование с помощью традиционного и молекулярного методов // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2023. Т. 8. С. 34–55.
15. Стриганова Б. Р. Локомоторная и трофическая активность беспозвоночных как фактор формирования почвенной структуры // Почвоведение. 2000. № 10. С. 1247–1254.
16. Стриганова Б. Р. Питание почвенных сапрофагов. Москва: Наука, 1980.
17. Стриганова Б. Р., Кудряшева И. В., Тиунов А. В. Пищевая активность дождевых червей *Eisenia nordenskioldi* (Eisen) (Oligochaeta, Lumbricidae) в лесостепных дубравах и их участие в деструкционных процессах // Почвоведение. 1987. № 1. С. 72–77.
18. Стриганова Б. Р., Тиунов А. В. Пищевая стратегия дождевых червей в горных почвах на многолетней мерзлоте // Известия РАН. Серия биологическая. 1994. № 3. С. 435–445.
19. Тиунов А. В. Стабильные изотопы, ДНК и жирные кислоты: новые методы в трофической экологии // Чтения памяти академика В. Н. Сукачева. XXIII. Потоки вещества и энергии в трофических сетях: современные методы изучения. Москва: Т-во научных изданий КМК, 2014. С. 10–20.
20. Тиунов А. В. Структура и функции почвенного населения тропического муссонного леса (Национальный парк Кат Тьен, Южный Вьетнам). — Москва : Товарищество научных изданий КМК, 2011. — 277 с.
21. Тиунов А. В. Метабиоз в почвенной системе: влияние дождевых червей на структуру и функционирование почвенной биоты: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.16. Москва: Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, 2007.
22. Тиунов А. В. Стабильные изотопы углерода и азота в почвенно-экологических исследованиях // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. 2007. Т. 4. С. 475–489.

23. Шеховцов С., Шеховцова И., Пельтек С. ДНК-штрихкодирование: методы и подходы // Успехи современной биологии. 2019. Т. 139. С. 211–220.
24. Шиленкова О. Л., Тиунов А. В. Освоение подвижного углерода почвы тропическими дождевыми червями *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta) // Зоологический журнал. 2014. Т. 93. № 12. С. 1397–1403.
25. Acton P., Fox J., Campbell E., Rowe H., Wilkinson M. Carbon isotopes for estimating soil decomposition and physical mixing in well-drained forest soils // Journal of Geophysical Research: Biogeosciences. 2013. V. 118. № 4. P. 1532–1545.
26. Aerts R. Climate, Leaf Litter Chemistry and Leaf Litter Decomposition in Terrestrial Ecosystems: A Triangular Relationship // Oikos. 1997. V. 79. № 3. P. 439–449.
27. Ahmed M., Back M. A., Prior T., Karssen G., Lawson R., Adams I., Sapp M. Metabarcoding of soil nematodes: the importance of taxonomic coverage and availability of reference sequences in choosing suitable marker(s) // Metabarcoding and Metagenomics. 2019. V. 3. P. 77–99.
28. Aira M., Domínguez J. Earthworm Effects without Earthworms: Inoculation of Raw Organic Matter with Worm-Worked Substrates Alters Microbial Community Functioning // PLoS ONE. 2011. V. 6. № 1. Article e16354.
29. Andersen K., Bird K. L., Rasmussen M. [et al.] Meta-barcoding of “dirt” DNA from soil reflects vertebrate biodiversity // Molecular Ecology. 2012. V. 21. № 8. P. 1966–1979.
30. André A., Antunes S. C., Gonçalves F., Pereira R. Bait-lamina assay as a tool to assess the effects of metal contamination in the feeding activity of soil invertebrates within a uranium mine area // Environmental Pollution. 2009. V. 157. № 8–9. P. 2368–2377.
31. André H. M., Ducarme X., Lebrun P. Soil biodiversity: myth, reality or conning? // Oikos. 2002. V. 96. № 1. P. 3–24.
32. Andriamparany R., Rasoloariniaina J. R., Cesarz S., Andrianarimisa A. Effects of land use in Southwestern Madagascar on soil faunal feeding activity and litter decomposition // Soil Organisms. 2025. V. 97. № 3. P. 341–356.
33. Angst G., Frouz J., van Groenigen J. W. [et al.] Earthworms as catalysts in the formation and stabilization of soil microbial necromass // Global Change Biology. 2022. V. 28. № 15. P. 4775–4782.
34. Angst G., Potapov A., Joly F.-X. [et al.] Conceptualizing soil fauna effects on labile and stabilized soil organic matter // Nature Communications. 2024. V. 15. Article 5005.

35. Anthony M. A., Bender S. F., van der Heijden M. G. A. Enumerating soil biodiversity // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2023. V. 120. № 33. Article e2304663120.
36. Antunes A. C., Gauzens B., Brose U. [et al.] Environmental drivers of local abundance–mass scaling in soil animal communities // *Oikos*. 2023. Article e09735.
37. Ardestani M. M., Šustr V., Frouz J. Consumption Performance of Five Detritivore Species Feeding on *Alnus glutinosa* L. Leaf Litter in a Microcosm Experiment // *Forests*. 2019. V. 10. № 12. Article 1080.
38. Arribas P., Andújar C., Salces-Castellano A. [et al.] The limited spatial scale of dispersal in soil arthropods revealed with whole-community haplotype-level metabarcoding // *Molecular Ecology*. 2021. V. 30. № 1. P. 48–61.
39. Aylagas E., Borja Á., Irigoien X., Rodríguez-Ezpeleta N. Benchmarking DNA Metabarcoding for Biodiversity-Based Monitoring and Assessment // *Frontiers in Marine Science*. 2016. V. 3. Article 96.
40. Baker R. F. Binding of DNA to cellulose nitrate filters under denaturing conditions // *Analytical Biochemistry*. 1977. V. 78. № 2. P. 569–571.
41. Balech B., Sandionigi A., Marzano M. [et al.] MetaCOXI: an integrated collection of metazoan mitochondrial cytochrome oxidase subunit-I DNA sequences // *Database*. 2022. V. 2022. Article baab084.
42. Barnes A. D., Brose U., Eisenhauer N. [et al.] Food web complexity underlies biodiversity effects on ecosystem functioning // *Nature*. 2026. P. 1–7.
43. Barnett S. E., Shade A. Disturbance increases soil microbiome functional redundancy but decreases capacity for insurance via winnowed environmental responsiveness. 2025. Preprint.
44. Bar-On Y. M., Phillips R., Milo R. The biomass distribution on Earth // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. V. 115. № 26. P. 6506–6511.
45. Bartoš O., Chmel M., Swierczková I. The overlooked evolutionary dynamics of 16S rRNA revises its role as the “gold standard” for bacterial species identification // *Scientific Reports*. 2024. V. 14. Article 9067.
46. Basset Y., Hajibabaei M., Wright M. T. G. [et al.] Comparison of traditional and DNA metabarcoding samples for monitoring tropical soil arthropods (Formicidae, Collembola and Isoptera) // *Scientific Reports*. 2022. V. 12. Article 10762.

47. Bastida F., Eldridge D., Abades S. [et al.] Climatic vulnerabilities and ecological preferences of soil invertebrates across biomes // *Molecular Ecology*. 2020. V. 29. № 4. P. 752–761.
48. Belov A. A., Cheptsov V. S., Vorobyova E. A. Soil bacterial communities of Sahara and Gibson deserts: Physiological and taxonomical characteristics // *AIMS Microbiology*. 2018. V. 4. № 4. P. 685–710.
49. Ben-Dov E., Shapiro O. H., Siboni N., Kushmaro A. Advantage of Using Inosine at the 3' Termini of 16S rRNA Gene Universal Primers for the Study of Microbial Diversity // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. V. 72. № 11. P. 6902–6904.
50. Beng K. C., Tomlinson K. W., Shen X. H. [et al.] The utility of DNA metabarcoding for studying the response of arthropod diversity and composition to land-use change in the tropics // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. Article 24965.
51. Bengtsson J. Which species? What kind of diversity? Which ecosystem function? Some problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function // *Applied Soil Ecology*. 1998. V. 10. № 3. P. 191–199.
52. Beretta G. M., Deere J. A., Messelink G. J. [et al.] Review: predatory soil mites as biocontrol agents of above- and below-ground plant pests // *Experimental and Applied Acarology*. 2022. V. 87. № 2. P. 143–162.
53. Berg B., McClaugherty C. *Plant Litter: Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration*. — 2nd ed. — Berlin, Heidelberg : Springer, 2008. — xiii, 338 p.
54. Bergstrom D. E., Zhang P., Johnson W. T. Comparison of the base pairing properties of a series of nitroazole nucleobase analogs in the oligodeoxyribonucleotide sequence 5'-d(CGCXAATTYGCG)-3' // *Nucleic Acids Research*. 1997. V. 25. № 10. P. 1935–1942.
55. Berthelin J., Laba M., Lemaire G. [et al.] Soil carbon sequestration for climate change mitigation: Mineralization kinetics of organic inputs as an overlooked limitation // *European Journal of Soil Science*. 2022. V. 73. № 4. Article e13221.
56. Bethke P. G., Midgley M. G. *Amyntas* spp. impacts on seedlings and forest soils are tree species-dependent // *Biological Invasions*. 2020. V. 22. № 10. P. 3145–3162.
57. Bienert F., De Danieli S., Miquel C. [et al.] Tracking earthworm communities from soil DNA // *Molecular Ecology*. 2012. V. 21. № 8. P. 2017–2030.

58. Birkhofer K., Diekötter T., Boch S. [et al.] Soil fauna feeding activity in temperate grassland soils increases with legume and grass species richness // *Soil Biology and Biochemistry*. 2011. V. 43. № 11. P. 2200–2207.
59. Bloor J. M. G., Si-Moussi S., Taberlet P. [et al.] Analysis of complex trophic networks reveals the signature of land-use intensification on soil communities in agroecosystems // *Scientific Reports*. 2021. V. 11. Article 18260.
60. Bokhorst S., Wardle D. A. Microclimate within litter bags of different mesh size: Implications for the ‘arthropod effect’ on litter decomposition // *Soil Biology and Biochemistry*. 2013. V. 58. P. 147–152.
61. Bolton P. J., Phillipson J. Burrowing, Feeding, Egestion and Energy Budgets of *Allolobophora rosea* (Savigny) (Lumbricidae) // *Oecologia*. 1976. V. 23. № 3. P. 225–245.
62. Bond W. J. Keystone Species // *Biodiversity and Ecosystem Function* / eds. E.-D. Schulze, H. A. Mooney. Berlin, Heidelberg: Springer, 1994. P. 237–253.
63. Bonin A., Guerrieri A., Ficetola G. F. Optimal sequence similarity thresholds for clustering of molecular operational taxonomic units in DNA metabarcoding studies // *Molecular Ecology Resources*. 2023. V. 23. № 2. P. 368–381.
64. Bouché M. B. Strategies lombriciennes // *Ecological Bulletins*. 1977. V. 25. P. 122–132.
65. Bradford M. A., Tordoff G. M., Eggers T. [et al.] Microbiota, Fauna, and Mesh Size Interactions in Litter Decomposition // *Oikos*. 2002. V. 99. № 2. P. 317–323.
66. Bredon M., Dittmer J., Noël C. [et al.] Lignocellulose degradation at the holobiont level: teamwork in a keystone soil invertebrate // *Microbiome*. 2018. V. 6. Article 162.
67. Briones M. J. I. Soil fauna and soil functions: a jigsaw puzzle // *Frontiers in Environmental Science*. 2014. V. 2. Article 7.
68. Brown J. H., Gillooly J. F., Allen A. P. [et al.] Toward a Metabolic Theory of Ecology // *Ecology*. 2004. V. 85. № 7. P. 1771–1789.
69. Brunetti M., Magoga G., Cussigh A. [et al.] Soil invertebrate biodiversity and functionality within the intensively farmed areas of the Po Valley // *Applied Soil Ecology*. 2024. V. 197. Article 105326.

70. Cai P., Huang Q., Zhang X., Chen H. Adsorption of DNA on clay minerals and various colloidal particles from an Alfisol // *Soil Biology and Biochemistry*. 2006. V. 38. № 3. P. 471–476.
71. Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J. [et al.] DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nature Methods*. 2016. V. 13. P. 581–583.
72. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V. [et al.] BLAST+: architecture and applications // *BMC Bioinformatics*. 2009. V. 10. Article 421.
73. Cameron E. K., Martins I. S., Lavelle P. [et al.] Global mismatches in aboveground and belowground biodiversity // *Conservation Biology*. 2019. V. 33. № 5. P. 1187–1192.
74. Capowiez Y., Bonzom J.-M., Bottinelli N., Gilbert F. The burrowing and casting dynamics of earthworms are influenced by litter presence as evidenced by repeated scans and a new marker of bioturbation // *Applied Soil Ecology*. 2024. V. 202. Article 105569.
75. Capowiez Y., Gilbert F., Vallat A. [et al.] Depth distribution of soil organic matter and burrowing activity of earthworms—mesocosm study using X-ray tomography and luminophores // *Biology and Fertility of Soils*. 2021. V. 57. № 3. P. 337–346.
76. Capowiez Y., Sammartino S., Michel E. Burrow systems of endogeic earthworms: Effects of earthworm abundance and consequences for soil water infiltration // *Pedobiologia*. 2014. V. 57. № 4–6. P. 303–309.
77. Capra E., Giannico R., Montagna M. [et al.] A new primer set for DNA metabarcoding of soil Metazoa // *European Journal of Soil Biology*. 2016. V. 77. P. 53–59.
78. Carew M. E., Coleman R. A., Hoffmann A. A. Can non-destructive DNA extraction of bulk invertebrate samples be used for metabarcoding? // *PeerJ*. 2018. V. 6. Article e4980.
79. Carini P., Marsden P. J., Leff J. W. [et al.] Relic DNA is abundant in soil and obscures estimates of soil microbial diversity // *Nature Microbiology*. 2016. V. 2. Article 16242.
80. Castillo-Figueroa D., Castillo-Avila C. Little influence of soil fauna on decomposition in successional upper Andean tropical forests // *Soil Ecology Letters*. 2025. V. 7. № 1. Article 240277.
81. Chamberlain P. M., McNamara N. P., Chaplow J. [et al.] Translocation of surface litter carbon into soil by Collembola // *Soil Biology and Biochemistry*. 2006. V. 38. № 9. P. 2655–2664.

82. Cheesman A. W., Cernusak L. A., Zanne A. E. Relative roles of termites and saprotrophic microbes as drivers of wood decay: A wood block test // *Austral Ecology*. 2018. V. 43. № 3. P. 257–267.
83. Cheik S., Bottinelli N., Minh T. T. [et al.] Quantification of Three Dimensional Characteristics of Macrofauna Macropores and Their Effects on Soil Hydraulic Conductivity in Northern Vietnam // *Frontiers in Environmental Science*. 2019. V. 7. Article 31.
84. Chen M., Dulya O., Mikryukov V. [et al.] Sampling Design and Sample Processing Affect Soil Biodiversity Assessments // *Molecular Ecology Resources*. 2026. V. 26. № 3. Article e70113.
85. Clare E. L., Economou C. K., Bennett F. J. [et al.] Measuring biodiversity from DNA in the air // *Current Biology*. 2022. V. 32. № 3. P. 693–700.e5.
86. Clarke A. Is There a Universal Temperature Dependence of Metabolism? // *Functional Ecology*. 2004. V. 18. № 2. P. 252–256.
87. Cole L., Bradford M. A., Shaw P. J. A., Bardgett R. D. The abundance, richness and functional role of soil meso- and macrofauna in temperate grassland—A case study // *Applied Soil Ecology*. 2006. V. 33. № 2. P. 186–198.
88. Contos P., Heloise G., Jellinek S., Murphy N. P. DNA metabarcoding uncovers dispersal-constrained arthropods in a highly fragmented restoration setting // *Restoration Ecology*. 2023. V. 32. № 1. Article e14068.
89. Cordier T., Angeles I. B., Henry N. [et al.] Patterns of eukaryotic diversity from the surface to the deep-ocean sediment // *Science Advances*. 2022. V. 8. № 7. Article eabj9309.
90. Crowther T. W., Stanton D. W. G., Thomas S. M. [et al.] Top-down control of soil fungal community composition by a globally distributed keystone consumer // *Ecology*. 2013. V. 94. № 11. P. 2518–2528.
91. Curry J. P., Schmidt O. The feeding ecology of earthworms—a review // *Pedobiologia*. 2007. V. 50. № 6. P. 463–477.
92. da Silva P. M., Nascimento E., Reis F. [et al.] More frequent droughts slow down litter decomposition across European agroecosystems and increase the importance of earthworm functional diversity // *Applied Soil Ecology*. 2020. V. 153. Article 103628.
93. Darwin C. *The Formation of Vegetable Mould, Through the Action of Worms, with Observations on Their Habits*. — London : John Murray, 1881. — vii, 326 p.

94. David J.-F., Gillon D. Annual feeding rate of the millipede *Glomeris marginata* on holm oak (*Quercus ilex*) leaf litter under Mediterranean conditions // *Pedobiologia*. 2002. V. 46. № 1. P. 42–52.
95. David J.-F., Handa I. T. The ecology of saprophagous macroarthropods (millipedes, woodlice) in the context of global change // *Biological Reviews*. 2010. V. 85. № 4. P. 881–895.
96. Deagle B. E., Thomas A. C., McInnes J. C. [et al.] Counting with DNA in metabarcoding studies: How should we convert sequence reads to dietary data? // *Molecular Ecology*. 2019. V. 28. № 2. P. 391–406.
97. Deiner K., Bik H. M., Mächler E. [et al.] Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities // *Molecular Ecology*. 2017. V. 26. № 21. P. 5872–5895.
98. Delgado-Baquerizo M., Reich P. B., Trivedi C. [et al.] Multiple elements of soil biodiversity drive ecosystem functions across biomes // *Nature Ecology & Evolution*. 2020. V. 4. № 2. P. 210–220.
99. Demeke T., Jenkins G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010. V. 396. № 6. P. 1977–1990.
100. Deng H., He C., Worden A. Z., Gong J. Employing a triple metabarcoding approach to differentiate active, dormant and dead microeukaryotes in sediments // *Environmental Microbiology*. 2024. V. 26. Article e16615.
101. Deshcherevskaya O. A., Avilov V. K., Dinh B. D. [et al.] Modern climate of the Cát Tiên National Park (Southern Vietnam): Climatological data for ecological studies // *Izvestiya, Atmospheric and Oceanic Physics*. 2013. V. 49. № 8. P. 819–838.
102. Domínguez J., Bohlen P. J., Parmelee R. W. Earthworms Increase Nitrogen Leaching to Greater Soil Depths in Row Crop Agroecosystems // *Ecosystems*. 2004. V. 7. № 7. P. 672–685.
103. Dopheide A., Xie D., Buckley T. R. [et al.] Impacts of DNA extraction and PCR on DNA metabarcoding estimates of soil biodiversity // *Methods in Ecology and Evolution*. 2019. V. 10. № 1. P. 120–133.
104. Drake L. E., Cuff J. P., Young R. E. [et al.] An assessment of minimum sequence copy thresholds for identifying and reducing the prevalence of artefacts in dietary metabarcoding data // *Methods in Ecology and Evolution*. 2022. V. 13. № 3. P. 694–710.

105. Edgar R. C. Updating the 97% identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs // *Bioinformatics*. 2018. V. 34. № 14. P. 2371–2375.
106. Ehnes R. B., Pollierer M. M., Erdmann G. [et al.] Lack of energetic equivalence in forest soil invertebrates // *Ecology*. 2014. V. 95. № 2. P. 527–537.
107. Ehnes R. B., Rall B. C., Brose U. Phylogenetic grouping, curvature and metabolic scaling in terrestrial invertebrates // *Ecology Letters*. 2011. V. 14. № 10. P. 993–1000.
108. Eisenbeis G., Lenz R., Heiber T. Organic residue decomposition: The minicontainer-system a multifunctional tool in decomposition studies // *Environmental Science and Pollution Research*. 1999. V. 6. № 4. P. 220–224.
109. Eisenhauer N. The action of an animal ecosystem engineer: Identification of the main mechanisms of earthworm impacts on soil microarthropods // *Pedobiologia*. 2010. V. 53. № 6. P. 343–352.
110. Eisenhauer N., Ochoa-Hueso R., Huang Y. [et al.] Ecosystem consequences of invertebrate decline // *Current Biology*. 2023. V. 33. № 21. P. 4538–4547.
111. Eisenhauer N., Schielzeth H., Barnes A. D. [et al.] Chapter One — A multitrophic perspective on biodiversity–ecosystem functioning research // *Advances in Ecological Research* / eds. N. Eisenhauer, D. A. Bohan, A. J. Dumbrell. Academic Press, 2019. V. 60. P. 1–54.
112. Ekschmitt K., Griffiths B. S. Soil biodiversity and its implications for ecosystem functioning in a heterogeneous and variable environment // *Applied Soil Ecology*. 1998. V. 10. № 3. P. 201–215.
113. Elbrecht V., Braukmann T. W. A., Ivanova N. V. [et al.] Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods // *PeerJ*. 2019. V. 7. Article e7745.
114. Elbrecht V., Leese F. Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance? Testing Primer Bias and Biomass—Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol // *PLOS ONE*. 2015. V. 10. № 7. Article e0130324.
115. Elbrecht V., Peinert B., Leese F. Sorting things out: Assessing effects of unequal specimen biomass on DNA metabarcoding // *Ecology and Evolution*. 2017. V. 7. № 17. P. 6918–6926.
116. Erktan A., Or D., Scheu S. The physical structure of soil: Determinant and consequence of trophic interactions // *Soil Biology and Biochemistry*. 2020. V. 148. Article 107876.

117. Ernst G., Felten D., Vohland M., Emmerling C. Impact of ecologically different earthworm species on soil water characteristics // *European Journal of Soil Biology*. 2009. V. 45. № 2. P. 207–213.
118. Escudero H. J., Domínguez A., Bedano J. C. Large-scale ecologically-based farming systems foster earthworm communities and their contribution to ecosystem processes // *Applied Soil Ecology*. 2023. V. 185. Article 104800.
119. Fan K., Chu H., Eldridge D. J. [et al.] Soil biodiversity supports the delivery of multiple ecosystem functions in urban greenspaces // *Nature Ecology & Evolution*. 2023. V. 7. № 1. P. 113–126.
120. FAO. Standard operating procedure for soil pH determination. 1st ed. Rome: FAO, 2021.
121. Fateeva A. A., Kudrin A. A. Changes in the feeding activity of soil fauna after forest harvesting: A case study from spruce-dominated stands in Russian taiga // *Applied Soil Ecology*. 2026. V. 217. Article 106634.
122. Feng X. A theoretical analysis of carbon isotope evolution of decomposing plant litters and soil organic matter // *Global Biogeochemical Cycles*. 2002. V. 16. № 4. P. 66-1–66-11.
123. Fernandez I., Cadisch G. Discrimination against ^{13}C during degradation of simple and complex substrates by two white rot fungi // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2003. V. 17. № 23. P. 2614–2620.
124. Ferrín M., Peñuelas J., Gargallo-Garriga A. [et al.] Responses of soil hexapod communities to increasing nitrogen in a subarctic grassland // *Soil Biology and Biochemistry*. 2024. V. 188. Article 109228.
125. Fick S. E., Hijmans R. J. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas // *International Journal of Climatology*. 2017. V. 37. № 12. P. 4302–4315.
126. Fierer N., Strickland M. S., Liptzin D. [et al.] Global patterns in belowground communities // *Ecology Letters*. 2009. V. 12. № 11. P. 1238–1249.
127. Filser J., Faber J. H., Tiunov A. V. [et al.] Soil fauna: key to new carbon models // *SOIL*. 2016. V. 2. № 4. P. 565–582.
128. Folke C., Holling C. S., Perrings C. Biological Diversity, Ecosystems, and the Human Scale // *Ecological Applications*. 1996. V. 6. № 4. P. 1018–1024.

129. Folmer O., Black M., Hoeh W. [et al.] DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994. V. 3. № 4. P. 294–299.
130. Foster Z. S. L., Sharpton T. J., Grünwald N. J. Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data // *PLOS Computational Biology*. 2017. V. 13. № 2. Article e1005404.
131. Fraga Dornellas L., Mata V. A., Mendes S. [et al.] Establishing DNA-Based Strategies for Soil Biodiversity Assessment: Insights From Carabid Beetles // *Ecology and Evolution*. 2025. V. 15. Article e72461.
132. French C. M., Bertola L. D., Carnaval A. C. [et al.] Global determinants of insect mitochondrial genetic diversity // *Nature Communications*. 2023. V. 14. Article 5276.
133. Frøslev T. G., Ejrnæs R., Hansen A. J. [et al.] Treated like dirt: Robust forensic and ecological inferences from soil eDNA after challenging sample storage // *Environmental DNA*. 2023. V. 5. № 1. P. 158–174.
134. Frouz J. Effects of soil macro- and mesofauna on litter decomposition and soil organic matter stabilization // *Geoderma*. 2018. V. 332. P. 161–172.
135. Frouz J., Elhottová D., Kuráž V., Šourková M. Effects of soil macrofauna on other soil biota and soil formation in reclaimed and unreclaimed post mining sites: Results of a field microcosm experiment // *Applied Soil Ecology*. 2006. V. 33. № 3. P. 308–320.
136. Frouz J., Jedlička P., Šimáčková H., Lhotáková Z. The life cycle, population dynamics, and contribution to litter decomposition of *Penthetria holosericea* (Diptera: Bibionidae) in an alder forest // *European Journal of Soil Biology*. 2015a. V. 71. P. 21–27.
137. Frouz J., Kristůfek V., Li X. [et al.] Changes in amount of bacteria during gut passage of leaf litter and during coprophagy in three species of Bibionidae (Diptera) larvae // *Folia Microbiologica*. 2003. V. 48. № 4. P. 535–542.
138. Frouz J., Kukla J., Umari R. [et al.] Soil fauna bioturbation along a successional gradient following swidden agriculture in the lowland tropical rainforests of New Guinea // *CATENA*. 2023. V. 229. Article 107203.
139. Frouz J., Roubíčková A., Heděnc P., Tajovský K. Do soil fauna really hasten litter decomposition? A meta-analysis of enclosure studies // *European Journal of Soil Biology*. 2015b. V. 68. P. 18–24.

140. Fry B. Stable Isotope Ecology. — New York : Springer, 2006. — xii, 308 p.
141. Fueyo Á., Sánchez O., Coya R. [et al.] The influence of databases enrichment using local macroinvertebrate genetic references for metabarcoding based biodiversity studies in river monitoring // *Ecological Indicators*. 2024. V. 158. Article 111454.
142. Gao D., Bai E., Wasner D., Hagedorn F. Global prediction of soil microbial growth rates and carbon use efficiency based on the metabolic theory of ecology // *Soil Biology and Biochemistry*. 2024. V. 190. Article 109315.
143. García-Palacios P., Maestre F. T., Kattge J., Wall D. H. Climate and litter quality differently modulate the effects of soil fauna on litter decomposition across biomes // *Ecology Letters*. 2013. V. 16. № 8. P. 1045–1053.
144. Geer L. Y., Marchler-Bauer A., Geer R. C. [et al.] The NCBI BioSystems database // *Nucleic Acids Research*. 2010. V. 38. Database issue. P. D492–D496.
145. Ghilarov M. S. Why so many species and so many individuals can coexist in the soil? // *Ecological Bulletins*. 1977. V. 25. P. 593–597.
146. Giller P. S. The diversity of soil communities, the ‘poor man’s tropical rainforest’ // *Biodiversity and Conservation*. 1996. V. 5. № 2. P. 135–168.
147. Goncharov A. A., Leonov V. D., Rozanova O. L. [et al.] A meta-analysis suggests climate change shifts structure of regional communities of soil invertebrates // *Soil Biology and Biochemistry*. 2023. V. 181. Article 109014.
148. Gongalsky K. B., Pokarzhevskii A. D., Filimonova Z. V., Savin F. A. Stratification and dynamics of bait-lamina perforation in three forest soils along a north–south gradient in Russia // *Applied Soil Ecology*. 2004. V. 25. № 2. P. 111–122.
149. Griffiths H. M., Ashton L. A., Evans T. A. [et al.] Termites can decompose more than half of deadwood in tropical rainforest // *Current Biology*. 2019. V. 29. № 3. P. R118–R119.
150. Guerra V., Beule L., Lehtsaar E. [et al.] Improved Protocol for DNA Extraction from Subsoils Using Phosphate Lysis Buffer // *Microorganisms*. 2020. V. 8. № 4. Article 532.
151. Guerrieri A., Carteron A., Bonin A. [et al.] Metabarcoding data reveal vertical multitaxa variation in topsoil communities during the colonization of deglaciated forelands // *Molecular Ecology*. 2023. V. 32. № 23. P. 6304–6319.

152. Guthrie A. M., Cooper C. E., Bateman P. W. [et al.] A quantitative analysis of vertebrate environmental DNA degradation in soil in response to time, UV light, and temperature // *Environmental DNA*. 2024. V. 6. № 3. Article e581.
153. Haarlov N. Mircroarthropods from danish soils // *Spolia Zoologica*. 1957. V. 17. P. 7–60.
154. Hagemann U., Moroni M. T. Moss and lichen decomposition in old-growth and harvested high-boreal forests estimated using the litterbag and minicontainer methods // *Soil Biology and Biochemistry*. 2015. V. 87. P. 10–24.
155. Hammer M. Some oribatids from Kodiak Island near Alaska // *Acta Arctica*. 1967. V. 14. P. 1–25.
156. Handa I. T., Aerts R., Berendse F. [et al.] Consequences of biodiversity loss for litter decomposition across biomes // *Nature*. 2014. V. 509. P. 218–221.
157. Hättenschwiler S., Tiunov A. V., Scheu S. Biodiversity and Litter Decomposition in Terrestrial Ecosystems // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2005. V. 36. P. 191–218.
158. Hebert P., Cywinska A., Ball S. L., Dewaard J. Biological identification through DNA barcodes // *Proceedings of the Royal Society B*. 2003. V. 270. № 1512. P. 313–321.
159. Hebert P. D. N., Bock D. G., Prosser S. W. J. Interrogating 1000 insect genomes for NUMTs: A risk assessment for estimates of species richness // *PLOS ONE*. 2023. V. 18. № 6. Article e0286620.
160. Hebert P. D. N., Penton E. H., Burns J. M. [et al.] Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. V. 101. № 41. P. 14812–14817.
161. Heděnc P., Jiménez J. J., Moradi J. [et al.] Global distribution of soil fauna functional groups and their estimated litter consumption across biomes // *Scientific Reports*. 2022. V. 12. Article 17362.
162. Heděnc P., Zheng H., Siqueira D. P. [et al.] Litter chemistry of common European tree species drives the feeding preference and consumption rate of soil invertebrates, and shapes the diversity and structure of gut and faecal microbiomes // *Soil Biology and Biochemistry*. 2023. V. 177. Article 108918.
163. Hedges L. V., Gurevitch J., Curtis P. S. The Meta-Analysis of Response Ratios in Experimental Ecology // *Ecology*. 1999. V. 80. № 4. P. 1150–1156.

164. Heemsbergen D. A., Berg M. P., Loreau M. [et al.] Biodiversity effects on soil processes explained by interspecific functional dissimilarity // *Science*. 2004. V. 306. № 5698. P. 1019–1020.
165. Heethoff M., Domes K., Laumann M. [et al.] High genetic divergences indicate ancient separation of parthenogenetic lineages of the oribatid mite *Platynothrus peltifer* (Acari, Oribatida) // *Journal of Evolutionary Biology*. 2007. V. 20. № 1. P. 392–402.
166. Hein N., Astrin J. J., Beckers N. [et al.] Arthropod diversity in the alpine tundra using metabarcoding: Spatial and temporal differences in alpha- and beta-diversity // *Ecology and Evolution*. 2024. V. 14. Article e10969.
167. Helling B., Pfeiff G., Larink O. A comparison of feeding activity of collembolan and enchytraeid in laboratory studies using the bait-lamina test // *Applied Soil Ecology*. 1998. V. 7. № 3. P. 207–212.
168. Helliwell J. R., Sturrock C. J., Grayling K. M. [et al.] Applications of X-ray computed tomography for examining biophysical interactions and structural development in soil systems: a review // *European Journal of Soil Science*. 2013. V. 64. № 3. P. 279–297.
169. Hermans S. M., Buckley H. L., Lear G. Optimal extraction methods for the simultaneous analysis of DNA from diverse organisms and sample types // *Molecular Ecology Resources*. 2018. V. 18. № 3. P. 557–569.
170. Hoang D., Pausch J., Razavi B. [et al.] Hotspots of microbial activity induced by earthworm burrows, old root channels, and their combination in subsoil // *Biology and Fertility of Soils*. 2016. V. 52. № 8. P. 1137–1148.
171. Hobbie E. A., Ouimette A. P. Controls of Nitrogen Isotope Patterns in Soil Profiles // *Biogeochemistry*. 2009. V. 95. № 3. P. 355–371.
172. Hobbie E. U., Wilson B. The depth distribution of organic carbon in the soils of eastern Australia // *Ecosphere*. 2016. V. 7. № 3. Article e01214.
173. Hodkinson I. D., Wookey P. A. Functional ecology of soil organisms in tundra ecosystems: towards the future // *Applied Soil Ecology*. 1999. V. 11. № 2–3. P. 111–126.
174. Holtmeier F.-K. Keystone Species // *Animals' Influence on the Landscape and Ecological Importance* / ed. F.-K. Holtmeier. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. P. 295–331.

175. Horton D. J., Kershner M. W., Blackwood C. B. Suitability of PCR primers for characterizing invertebrate communities from soil and leaf litter targeting metazoan 18S ribosomal or cytochrome oxidase I (COI) genes // *European Journal of Soil Biology*. 2017. V. 80. P. 43–48.
176. Huang W., González G., Zou X. Earthworm abundance and functional group diversity regulate plant litter decay and soil organic carbon level: A global meta-analysis // *Applied Soil Ecology*. 2020. V. 150. Article 103473.
177. Hudson J. B. The fixation and retention of viral and mammalian deoxyribonucleic acids on nitrocellulose filters // *Canadian Journal of Biochemistry*. 1971. V. 49. № 6. P. 631–636.
178. Ingr M., Dostál J., Majerová T. Enzymological description of multitemplate PCR — Shrinking amplification bias by optimizing the polymerase–template ratio // *Journal of Theoretical Biology*. 2015. V. 382. P. 1–9.
179. Ishii K., Fukui M. Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR // *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. V. 67. № 8. P. 3753–3755.
180. Jänsch S., Alves D., Cunha L. [et al.] Comparison of Morphological and DNA-Based Identification Methods to Assess Earthworm (Clitellata: Lumbricidae) Diversity at 25 Permanent Soil Monitoring Sites in Germany // *Ecology and Evolution*. 2025. V. 15. Article e71155.
181. Jayaramaiah R. H., Ghaderi R., Nguyen T. B. A. [et al.] Uncovering the functional roles of soil fauna in nitrogen cycling and agricultural sustainability // *Geoderma*. 2026. V. 468. Article 117777.
182. Jimenez J. J., Filser J., Barot S. [et al.] Soil Fauna: Key to Soil Organic Matter Dynamics and Modelling: Handbook of Methods, COST Action ES1406. — Version 1. — Brussels : COST, 2020. — 62 p.
183. Johnson S. N., Rasmann S. Root-Feeding Insects and Their Interactions with Organisms in the Rhizosphere // *Annual Review of Entomology*. 2015. V. 60. P. 517–535.
184. Jones C. G., Lawton J. H., Shachak M. Organisms as Ecosystem Engineers // *Ecosystem Management: Selected Readings* / eds. F. B. Samson, F. L. Knopf. New York: Springer, 1996. P. 130–147.
185. Jonsson H., Blume-Werry G., Wackett A. A. [et al.] Non-Native Earthworms Alter Carbon Sequestration in Arctic Tundra Ecosystems // *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*. 2025. V. 130. № 6. Article e2024JG008598.

186. Juan C., ChengCheng L., YaE Z. [et al.] Population identification and divergence threshold in Psoroptidae based on ribosomal ITS2 and mitochondrial COI genes // *Parasitology Research*. 2015. V. 114. № 9. P. 3497–3507.
187. Jurburg S. D., Keil P., Singh B. K., Chase J. M. All together now: Limitations and recommendations for the simultaneous analysis of all eukaryotic soil sequences // *Molecular Ecology Resources*. 2021. V. 21. № 6. P. 1759–1771.
188. Kageyama T., Toju H. Effects of source sample amount on biodiversity surveys of bacteria, fungi, and nematodes in soil ecosystems // *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2022. V. 10. Article 959945.
189. Kallenbach C. M., Frey S. D., Grandy A. S. Direct evidence for microbial-derived soil organic matter formation and its ecophysiological controls // *Nature Communications*. 2016. V. 7. Article 13630.
190. Kamau S., Barrios E., Karanja N. K. [et al.] Dominant tree species and earthworms affect soil aggregation and carbon content along a soil degradation gradient in an agricultural landscape // *Geoderma*. 2020. V. 359. Article 113983.
191. Kamdem M. M., Ngakou A., Yanou Njintang N., Voua Otomo P. Habitat components and population density drive plant litter consumption by *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta) under tropical conditions // *Integrative Zoology*. 2021. V. 16. № 3. P. 255–269.
192. Kampichler C., Bruckner A. The role of microarthropods in terrestrial decomposition: a meta-analysis of 40 years of litterbag studies // *Biological Reviews*. 2009. V. 84. № 3. P. 375–389.
193. Kirse A., Bourlat S. J., Langen K., Fonseca V. G. Unearthing the Potential of Soil eDNA Metabarcoding—Towards Best Practice Advice for Invertebrate Biodiversity Assessment // *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2021. V. 9. Article 630560.
194. Kjørandsen J. Current State of DNA Barcoding of Sciarioidea (Diptera) — Highlighting the Need to Build the Reference Library // *Insects*. 2022. V. 13. № 2. Article 147.
195. Knulle W. Die Arten der Gattung *Tectocepheus* Berlese (Acarina: Oribatei) // *Zoologischer Anzeiger*. 1954. V. 152. P. 280–305.
196. Köninger J., Beule L., Tsiafouli M. [et al.] Molecular and morphological identification methods show contrasting trends in soil fauna diversity along land-use intensity gradients // *Applied Soil Ecology*. 2025. V. 216. Article 106499.

197. Kooch Y., Heydari M., Parsapour M. K., Valkó O. Earthworm: a keystone species of soil quality, health and functions // *Acta Oecologica*. 2025. V. 128. Article 104106.
198. Kraevsky S. V., Barinov N. A., Morozova O. V. [et al.] Features of DNA-Montmorillonite Binding Visualized by Atomic Force Microscopy // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. V. 24. № 12. Article 9827.
199. Krehenwinkel H., Wolf M., Lim J. Y. [et al.] Estimating and mitigating amplification bias in qualitative and quantitative arthropod metabarcoding // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. Article 17668.
200. Kreipe V., Corral-Hernández E., Scheu S. [et al.] Phylogeny and species delineation in European species of the genus *Steganacarus* (Acari, Oribatida) using mitochondrial and nuclear markers // *Experimental and Applied Acarology*. 2015. V. 66. № 2. P. 173–186.
201. Kretzschmar A. Quantification, écologique des galeries de lombriciens Techniques et premières estimations // *Pedobiologia*. 1978. V. 18. P. 31–38.
202. Krivosheina M. G., Vinogradov D. D., Tsurikov S. M. [et al.] New registrations of some rare species of the genus *Gymnometriocnemus* Edwards, 1932 (Diptera: Chironomidae) // *Euroasian Entomological Journal*. 2023. V. 32. № 2. P. 239–242.
203. Krüger N., Finn D. R., Don A. Soil depth gradients of organic carbon-13 — A review on drivers and processes // *Plant and Soil*. 2024. V. 495. № 1–2. P. 113–136.
204. Kvist S. Barcoding in the dark?: A critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2013. V. 69. № 1. P. 39–45.
205. Lamb P. D., Hunter E., Pinnegar J. K. [et al.] How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach // *Molecular Ecology*. 2019. V. 28. № 2. P. 420–430.
206. Laumann M., Norton R. A., Weigmann G. [et al.] Speciation in the parthenogenetic oribatid mite genus *Tectocepheus* (Acari, Oribatida) as indicated by molecular phylogeny // *Pedobiologia*. 2007. V. 51. № 2. P. 111–122.
207. Lavelle P., Decaëns T., Aubert M. [et al.] Soil invertebrates and ecosystem services // *European Journal of Soil Biology*. 2006. V. 42, Supplement 1. P. S3–S15.
208. Lavelle P., Spain A. V. Earthworms as Soil Ecosystem Engineers // *Earthworms and Ecological Processes* / eds. Y. Kooch, Y. Kuzyakov. Cham: Springer Nature Switzerland, 2024. P. 455–483.

209. Lazić C. N., Stefanović M. M., Milić S. B. [et al.] Selection of Primers in eDNA Metabarcoding Affects Soil Invertebrate Diversity Assessment—Evidence from a Comparative Survey // *Eurasian Soil Science*. 2025. V. 58. № 2. P. 193–205.
210. Le Cadre J., Klemp F. L., Bálint M. [et al.] Applicability and perspectives for DNA barcoding of soil invertebrates // *PeerJ*. 2024. V. 12. Article e17709.
211. Lee Y.-S., Jung M., Wee J. [et al.] Species-specific environmental DNA analysis of the index species in soil ecosystem, *Allonychiurus kimi* (Collembola: Onychiuridae) // *Ecology and Evolution*. 2022. V. 12. Article e9598.
212. Lembrechts J. J., van den Hoogen J., Aalto J. [et al.] Global maps of soil temperature // *Global Change Biology*. 2022. V. 28. № 9. P. 3110–3144.
213. Leray M., Yang J. Y., Meyer C. P. [et al.] A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents // *Frontiers in Zoology*. 2013. V. 10. Article 34.
214. Levy-Booth D. J., Campbell R. G., Gulden R. H. [et al.] Cycling of extracellular DNA in the soil environment // *Soil Biology and Biochemistry*. 2007. V. 39. № 12. P. 2977–2991.
215. Li K., Song L., Ran Q. [et al.] Global meta-analysis reveals differential effects of climate and litter quality on soil fauna-mediated litter decomposition across size classes // *Geoderma*. 2024. V. 450. Article 117042.
216. Li Y., Liao J., Reich P. B. [et al.] Earthworms Enhance Global Soil Carbon Storage Through Microbial–Mineral Stabilization // *Global Change Biology*. 2026. V. 32. Article e70815.
217. Liiri M., Setälä H., Haimi J. [et al.] Relationship between soil microarthropod species diversity and plant growth does not change when the system is disturbed // *Oikos*. 2002. V. 96. № 1. P. 137–149.
218. Lilja M. A., Buivydaite Ž., Zervas A. [et al.] Comparing earthworm biodiversity estimated by DNA metabarcoding and morphology-based approaches // *Applied Soil Ecology*. 2023. V. 185. Article 104798.
219. Liu G., Guo L., Wang C. [et al.] Revealing the infiltration process and retention mechanisms of surface applied free DNA tracer through soil under flood irrigation // *Science of the Total Environment*. 2023. V. 905. Article 167378.

220. Liu S., Behm J. E., Chen J. [et al.] Functional redundancy dampens the trophic cascade effect of a web-building spider in a tropical forest floor // *Soil Biology and Biochemistry*. 2016. V. 98. P. 22–29.
221. Longmire J. L., Maltbie M., Baker R. J. Use of “Lysis Buffer” in DNA isolation and its implication for museum collections. Lubbock: Museum of Texas Tech University, 1997.
222. Lopes C. M., Baêta D., Sasso T. [et al.] Power and limitations of environmental DNA metabarcoding for surveying leaf litter eukaryotic communities // *Environmental DNA*. 2021. V. 3. № 2. P. 528–540.
223. Lu J.-Z., Pan X., Scheu S., Maraun M. Biogeography of oribatid mites (Acari) reflects their ancient origin and points to Southeast Asia as centre of radiation // *Journal of Biogeography*. 2024. V. 51. № 11. P. 2211–2220.
224. Lubbers I. M., Berg M. P., Deyn G. B. D. [et al.] Soil fauna diversity increases CO₂ but suppresses N₂O emissions from soil // *Global Change Biology*. 2020. V. 26. № 4. P. 1886–1898.
225. Macheriotou L., Guilini K., Bezerra T. N. [et al.] Metabarcoding free-living marine nematodes using curated 18S and CO1 reference sequence databases for species-level taxonomic assignments // *Ecology and Evolution*. 2019. V. 9. № 3. P. 1211–1226.
226. Madden A. A., Barberán A., Bertone M. A. [et al.] The diversity of arthropods in homes across the United States as determined by environmental DNA analyses // *Molecular Ecology*. 2016. V. 25. № 24. P. 6214–6224.
227. Majaneva M., Diserud O., Eagle S. [et al.] Choice of DNA extraction method affects DNA metabarcoding of unsorted invertebrate bulk samples // *Metabarcoding and Metagenomics*. 2018. V. 2. Article e26664.
228. Manzoni S., Porporato A. Soil carbon and nitrogen mineralization: Theory and models across scales // *Soil Biology and Biochemistry*. 2009. V. 41. № 7. P. 1355–1379.
229. Maraun M., Schatz H., Scheu S. Awesome or ordinary? Global diversity patterns of oribatid mites // *Ecography*. 2007. V. 30. № 2. P. 209–216.
230. Marquina D., Esparza-Salas R., Roslin T., Ronquist F. Establishing arthropod community composition using metabarcoding: Surprising inconsistencies between soil samples and preservative ethanol and homogenate from Malaise trap catches // *Molecular Ecology Resources*. 2019. V. 19. № 6. P. 1516–1530.

231. Martinsson S., Rota E., Erséus C. Revision of *Cognettia* (Clitellata, Enchytraeidae): re-establishment of *Chamaedrillus* and description of cryptic species in the sphagnetorum complex // *Systematics and Biodiversity*. 2015. V. 13. № 3. P. 257–277.
232. Mbodj I., Sarr M., Diarra K. Using bait lamina and litterbags, two functional methods to monitor biological activity in soil contaminated by dieldrin. Preliminary results from Dakar (Senegal) sahelian region // *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2010. V. 4. № 1. P. 1–10.
233. McGee K. M., Eaton W. D. A comparison of the wet and dry season DNA-based soil invertebrate community characteristics in large patches of the bromeliad *Bromelia pinguin* in a primary forest in Costa Rica // *Applied Soil Ecology*. 2015. V. 87. P. 99–107.
234. McGee K. M., Porter T. M., Wright M., Hajibabaei M. Drivers of tropical soil invertebrate community composition and richness across tropical secondary forests using DNA metasytematics // *Scientific Reports*. 2020. V. 10. Article 18429.
235. McKnight D. T., Huerlimann R., Bower D. S. [et al.] microDecon: A highly accurate read-subtraction tool for the post-sequencing removal of contamination in metabarcoding studies // *Environmental DNA*. 2019. V. 1. № 1. P. 14–25.
236. Meier R., Shiyang K., Vaidya G., Ng P. K. L. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success // *Systematic Biology*. 2006. V. 55. № 5. P. 715–728.
237. Meiklejohn K. A., Damaso N., Robertson J. M. Assessment of BOLD and GenBank — Their accuracy and reliability for the identification of biological materials // *PLOS ONE*. 2019. V. 14. № 6. Article e0217084.
238. Meyer C. P., Paulay G. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling // *PLOS Biology*. 2005. V. 3. № 12. Article e422.
239. Minasny B., McBratney A. B., Malone B. P., Wheeler I. Chapter One — Digital Mapping of Soil Carbon // *Advances in Agronomy* / ed. D. L. Sparks. Academic Press, 2013. V. 121. P. 1–47.
240. Mioduchowska M., Czyż M. J., Gołdyn B. [et al.] Instances of erroneous DNA barcoding of metazoan invertebrates: Are universal *cox1* gene primers too “universal”? // *PLOS ONE*. 2018. V. 13. № 6. Article e0199609.

241. Morrissey E. M., McHugh T. A., Preteska L. [et al.] Dynamics of extracellular DNA decomposition and bacterial community composition in soil // *Soil Biology and Biochemistry*. 2015. V. 86. P. 42–49.
242. Mugnai F., Costantini F., Chenuil A. [et al.] Be positive: customized reference databases and new, local barcodes balance false taxonomic assignments in metabarcoding studies // *PeerJ*. 2023. V. 11. Article e14616.
243. Myer A., Myer M. H., Trettin C. C., Forschler B. T. The fate of carbon utilized by the subterranean termite *Reticulitermes flavipes* // *Ecosphere*. 2021. V. 12. № 12. Article e03872.
244. Nahmani J., Capowiez Y., Lavelle P. Effects of metal pollution on soil macroinvertebrate burrow systems // *Biology and Fertility of Soils*. 2005. V. 42. № 1. P. 31–39.
245. Nel J. A., Craine J. M., Cramer M. D. Correspondence between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in soils suggests coordinated fractionation processes for soil C and N // *Plant and Soil*. 2018. V. 423. № 1–2. P. 257–271.
246. Nielsen U. N., Ayres E., Wall D. H., Bardgett R. D. Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity–function relationships // *European Journal of Soil Science*. 2011. V. 62. № 1. P. 105–116.
247. Norgrove L., Csuzdi C., Hauser S. Effects of cropping and tree density on earthworm community composition and densities in central Cameroon // *Applied Soil Ecology*. 2011. V. 49. P. 268–271.
248. Nyffeler M., Birkhofer K. An estimated 400–800 million tons of prey are annually killed by the global spider community // *The Science of Nature*. 2017. V. 104. Article 30.
249. Ogle D., Doll J., Wheeler P. [et al.] FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods. 2022. R package.
250. Oksanen J., Blanchet F. G., Kindt R. [et al.] vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-2. 2012.
251. Oliverio A., Gan H., Wickings K., Fierer N. A DNA metabarcoding approach to characterize soil arthropod communities // *Soil Biology and Biochemistry*. 2018. V. 125. P. 37–43.
252. Olson J. S. Energy Storage and the Balance of Producers and Decomposers in Ecological Systems // *Ecology*. 1963. V. 44. № 2. P. 322–331.

253. Orgiazzi A., Panagos P., Fernández-Ugalde O. [et al.] LUCAS Soil Biodiversity and LUCAS Soil Pesticides, new tools for research and policy development // *European Journal of Soil Science*. 2022. V. 73. Article e13299.
254. Ortiz D. C., de Souza T. A. F., Pech T. M. [et al.] Soil ecosystem changes by vegetation on old-field sites over five decades in the Brazilian Atlantic forest // *Journal of Forest Research*. 2022. V. 33. № 2. P. 667–677.
255. Paine R. T. The *Pisaster-Tegula* interaction: Prey patches, predator food preference, and intertidal community structure // *Ecology*. 1969. V. 50. № 6. P. 950–961.
256. Pappalardo P., Hemmi J. M., Machida R. J. [et al.] Taxon-specific BLAST percent identity thresholds for identification of unknown sequences using metabarcoding // *Methods in Ecology and Evolution*. 2025. V. 16. № 11. P. 2380–2394.
257. Paula D. P. Next-Generation Sequencing and Its Impacts on Entomological Research in Ecology and Evolution // *Neotropical Entomology*. 2021. V. 50. № 5. P. 679–696.
258. Pelosi C., Boros G., van Oort F., Schmidt O. Soil Oligochaeta communities after 9 decades of continuous fertilization in a bare fallow experiment // *Soil Organisms*. 2020. V. 92. № 2. P. 129–141.
259. Peng Y., Vesterdal L., Peñuelas J. [et al.] Soil fauna effects on litter decomposition are better predicted by fauna communities within litterbags than by ambient soil fauna communities // *Plant and Soil*. 2023. V. 487. № 1–2. P. 49–59.
260. Petersen H., Luxton M. A Comparative Analysis of Soil Fauna Populations and Their Role in Decomposition Processes // *Oikos*. 1982. V. 39. № 3. P. 288–388.
261. Pfingstl T., Krisper G. No difference in the juveniles of two *Tectocepheus* species (Acari: Oribatida, Tectocepheidae) // *Acarologia*. 2011. V. 51. № 2. P. 199–218.
262. Phillips H. R. P., Guerra C. A., Bartz M. L. C. [et al.] Global distribution of earthworm diversity // *Science*. 2019. V. 366. № 6464. P. 480–485.
263. Phillips J. D., Gillis D. J., Hanner R. H. Lack of Statistical Rigor in DNA Barcoding Likely Invalidates the Presence of a True Species' Barcode Gap // *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2022. V. 10. Article 859099.
264. Pietramellara G., Ascher J., Ceccherini M. T. [et al.] Adsorption of pure and dirty bacterial DNA on clay minerals and their transformation frequency // *Biology and Fertility of Soils*. 2007. V. 43. № 6. P. 731–739.

265. Piron D., Boizard H., Heddadj D. [et al.] Indicators of earthworm bioturbation to improve visual assessment of soil structure // *Soil and Tillage Research*. 2017. V. 173. P. 53–63.
266. Piron D., Pérès G., Hallaire V., Cluzeau D. Morphological description of soil structure patterns produced by earthworm bioturbation at the profile scale // *European Journal of Soil Biology*. 2012. V. 50. P. 83–90.
267. Polz M. F., Cavanaugh C. M. Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR // *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. V. 64. № 10. P. 3724–3730.
268. Porco D., Bedos A., Greenslade P. [et al.] Challenging species delimitation in Collembola: cryptic diversity among common springtails unveiled by DNA barcoding // *Invertebrate Systematics*. 2012. V. 26. № 4. P. 470–477.
269. Porco D., Rougerie R., Deharveng L., Hebert P. Coupling non-destructive DNA extraction and voucher retrieval for small soft-bodied Arthropods in a high-throughput context: the example of Collembola // *Molecular Ecology Resources*. 2010. V. 10. № 5. P. 942–945.
270. Portillo M. C., Leff J. W., Lauber C. L., Fierer N. Cell Size Distributions of Soil Bacterial and Archaeal Taxa // *Applied and Environmental Microbiology*. 2013. V. 79. № 20. P. 6250–6258.
271. Potapov A., Sun X., Briones M. [et al.] Global monitoring of soil animal communities using a common methodology. 2022. Preprint.
272. Potapov A. M., Goncharov A. A., Semenina E. E. [et al.] Arthropods in the subsoil: Abundance and vertical distribution as related to soil organic matter, microbial biomass and plant roots // *European Journal of Soil Biology*. 2017. V. 82. P. 88–97.
273. Potapov A. M., Guerra C. A., van den Hoogen J. [et al.] Globally invariant metabolism but density-diversity mismatch in springtails // *Nature Communications*. 2023. V. 14. Article 674.
274. Potapov A. M., Scheu S., Tiunov A. V. Trophic consistency of supraspecific taxa in below-ground invertebrate communities: Comparison across lineages and taxonomic ranks // *Functional Ecology*. 2019. V. 33. № 6. P. 1172–1183.
275. Potapov A. M., Semenyuk I., Bluhm S. L. [et al.] Energy and biomass distribution in soil food webs of temperate and tropical forests // *Nature Communications*. 2026. V. 17. Article 417.
276. Power H., Takahashi M., Jarman S., Berry O. What is environmental DNA? // *Environmental DNA*. 2023. V. 5. № 6. P. 1743–1758.

277. Prescott C. E. Do rates of litter decomposition tell us anything we really need to know? // *Forest Ecology and Management*. 2005. V. 220. № 1–3. P. 66–74.
278. Puche N., Rumpel C., Le Mer G. [et al.] Mechanisms and kinetics of de-protection of soil organic carbon in earthworm casts in a tropical environment // *Soil Biology and Biochemistry*. 2022. V. 170. Article 108686.
279. Qi R., Jones D. L., Li Z. [et al.] Behavior of microplastics and plastic film residues in the soil environment: A critical review // *Science of the Total Environment*. 2020. V. 703. Article 134722.
280. Qin H., Shang J., Qi Q. [et al.] Soil Moisture and Litter Coverage Drive the Altitude Gradient Pattern of Soil Arthropods in a Low-Elevation Mountain // *Diversity*. 2024. V. 16. № 5. Article 263.
281. Quillin K. J. Ontogenetic scaling of burrowing forces in the earthworm *Lumbricus terrestris* // *Journal of Experimental Biology*. 2000. V. 203. P. 2757–2770.
282. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2025.
283. Ratnasingham S., Hebert P. D. N. BOLD: The Barcode of Life Data System // *Molecular Ecology Notes*. 2007. V. 7. № 3. P. 355–364.
284. Riaz T., Shehzad W., Viari A. [et al.] ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis // *Nucleic Acids Research*. 2011. V. 39. № 21. Article e145.
285. Rillig M. C., Ziersch L., Hempel S. Microplastic transport in soil by earthworms // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. Article 1362.
286. Rognes T., Flouri T., Nichols B. [et al.] VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ*. 2016. V. 4. Article e2584.
287. Römbke J., Höfer H., Garcia M. V. B., Martius C. Feeding activities of soil organisms at four different forest sites in Central Amazonia using the bait lamina method // *Journal of Tropical Ecology*. 2006. V. 22. № 3. P. 313–320.
288. Rosero P., Crespo-Pérez V., Espinosa R. [et al.] Multi-taxa colonisation along the foreland of a vanishing equatorial glacier // *Ecography*. 2021. V. 44. № 7. P. 1010–1021.
289. Rossi J.-P., Mathieu J., Cooper M., Grimaldi M. Soil macrofaunal biodiversity in Amazonian pastures: Matching sampling with patterns // *Soil Biology and Biochemistry*. 2006. V. 38. № 8. P. 2178–2187.

290. Rota N., Canedoli C., Ferrè C. [et al.] Evaluation of Soil Biodiversity in Alpine Habitats through eDNA Metabarcoding and Relationships with Environmental Features // *Forests*. 2020. V. 11. № 7. Article 738.
291. Rota T., Lecerf A., Chauvet É., Pey B. The importance of intraspecific variation in litter consumption rate of aquatic and terrestrial macro-detritivores // *Basic and Applied Ecology*. 2022. V. 63. P. 175–185.
292. Rozanova O. L., Tsurikov S. M., Krivosheina M. G. [et al.] The isotopic signature of the arthropod rain in a temperate forest // *Scientific Reports*. 2022. V. 12. Article 321.
293. Rozen A., Sobczyk Ł., Weiner J. The effect of pre-analytical treatment on the results of stoichiometric measurements in invertebrates // *Applied Entomology and Zoology*. 2015. V. 50. № 3. P. 393–403.
294. Ruess L., Chamberlain P. M. The fat that matters: Soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature // *Soil Biology and Biochemistry*. 2010. V. 42. № 11. P. 1898–1910.
295. Russell J. S., Moore A. W. Comparison of different depth weightings in the numerical analysis of anisotropic soil profile data // *Proceedings of the 9th International Congress of Soil Science*. 1968. P. 205–213.
296. Rutgers M., Orgiazzi A., Gardi C. [et al.] Mapping earthworm communities in Europe // *Applied Soil Ecology*. 2016. V. 97. P. 98–111.
297. Rychlik W., Spencer W. J., Rhoads R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro // *Nucleic Acids Research*. 1990. V. 18. № 21. P. 6409–6412.
298. Sagi N., Hawlena D. Climate dependence of the macrofaunal effect on litter decomposition: A global meta-regression analysis // *Ecology Letters*. 2024. V. 27. Article e14333.
299. Saitoh S., Aoyama H., Fujii S. [et al.] A quantitative protocol for DNA metabarcoding of springtails (Collembola) // *Genome*. 2016. V. 59. № 8. P. 705–723.
300. Sánchez-Galindo L. M., Sandmann D., Marian F. [et al.] Leaf litter identity rather than diversity shapes microbial functions and microarthropod abundance in tropical montane rainforests // *Ecology and Evolution*. 2021. V. 11. № 4. P. 2360–2374.
301. Šantrůčková H., Bird M. I., Lloyd J. Microbial processes and carbon-isotope fractionation in tropical and temperate grassland soils // *Functional Ecology*. 2000. V. 14. № 1. P. 108–114.

302. Sapkota R., Buivydaite Ž., Lilja M. A. [et al.] Evaluating DNA extraction methods for eDNA metabarcoding of soil invertebrate diversity // *European Journal of Soil Biology*. 2025. V. 126. Article 103751.
303. Sapkota R., Pan Y., Nagli V. [et al.] Environmental RNA and DNA metabarcoding of soil fauna reveal complementary insights into biodiversity and limited effect of nitrification inhibitors // *Applied Soil Ecology*. 2026. V. 222. Article 106996.
304. Sayers E. W., Bolton E. E., Brister J. R. [et al.] Database resources of the National Center for Biotechnology Information // *Nucleic Acids Research*. 2022. V. 50. № D1. P. D20–D26.
305. Schenk J., Geisen S., Kleinbölting N., Traunspurger W. Metabarcoding data allow for reliable biomass estimates in the most abundant animals on earth // *Metabarcoding and Metagenomics*. 2019. V. 3. Article e46704.
306. Schimel J. P., Bennett J. Nitrogen Mineralization: Challenges of a Changing Paradigm // *Ecology*. 2004. V. 85. № 3. P. 591–602.
307. Schrader S., Rogasik H., Onasch I., Jégou D. Assessment of soil structural differentiation around earthworm burrows by means of X-ray computed tomography and scanning electron microscopy // *Geoderma*. 2007. V. 137. № 3–4. P. 378–387.
308. Seifert K. A. Progress towards DNA barcoding of fungi // *Molecular Ecology Resources*. 2009. V. 9, Supplement 1. P. 83–89.
309. Sergeant M. J., Constantinidou C., Cogan T. [et al.] High-Throughput Sequencing of 16S rRNA Gene Amplicons: Effects of Extraction Procedure, Primer Length and Annealing Temperature // *PLOS ONE*. 2012. V. 7. № 5. Article e38094.
310. Setälä H., Berg M. P., Jones T. H. Trophic structure and functional redundancy in soil communities // *Biological Diversity and Function in Soils* / eds. D. Hopkins, M. Usher, R. Bardgett. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. P. 236–249.
311. Shaffer M. R., Andruszkiewicz Allan E., Van Cise A. M. [et al.] Observation Bias in Metabarcoding // *Molecular Ecology Resources*. 2025. V. 25. Article e14119.
312. Sheng X., Qin C., Yang B. [et al.] Metal cation saturation on montmorillonites facilitates the adsorption of DNA via cation bridging // *Chemosphere*. 2019. V. 235. P. 670–678.
313. Shokralla S., Spall J. L., Gibson J. F., Hajibabaei M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research // *Molecular Ecology*. 2012. V. 21. № 8. P. 1794–1805.

314. Shuster W. D., Subler S., McCoy E. L. Deep-burrowing earthworm additions changed the distribution of soil organic carbon in a chisel-tilled soil // *Soil Biology and Biochemistry*. 2001. V. 33. № 7–8. P. 983–996.
315. Sickel W., Zizka V., Scherges A. [et al.] Abundance estimation with DNA metabarcoding: recent advancements for terrestrial arthropods // *Metabarcoding and Metagenomics*. 2023. V. 7. Article e104050.
316. Singh D. J., Dikshit A. K., Kumar S. Impact of macroplastic and microplastic litter pollution on terrestrial soil–plant ecosystems: Pathways, fate, and transport // *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 2026. V. 49. Article 100694.
317. Sirois S. H., Buckley D. H. Factors governing extracellular DNA degradation dynamics in soil // *Environmental Microbiology Reports*. 2019. V. 11. № 2. P. 173–184.
318. Soldatova E., Krasilnikov S., Kuzyakov Y. Soil organic matter turnover: Global implications from ¹³C and ¹⁵N signatures // *Science of the Total Environment*. 2024. V. 912. Article 169423.
319. Sotnikov I. V., Vecherskii M. V., Cheptsov V. S., Tiunov A. V. Metabarcoding of a mock community of soil invertebrates: DNA extraction, false positives, and data filtration // *Pedobiologia*. 2025. V. 109. Article 151022.
320. Sotnikov I. V., Vinogradov D. D., Mazakina V. V. [et al.] New report of a rare species of the gall midge from the genus *Camptomyia* Kieffer, 1894 (Diptera: Cecidomyiidae) // *Euroasian Entomological Journal*. 2024. V. 33. № 3. P. 397–400.
321. Stat M., Huggett M. J., Bernasconi R. [et al.] Ecosystem biomonitoring with eDNA metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. Article 12240.
322. Štefan V., Levin S. plotbiomes: R package for plotting Whittaker biomes with ggplot2. 2018.
323. Stoeck T., Bass D., Nebel M. [et al.] Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water // *Molecular Ecology*. 2010. V. 19, Supplement 1. P. 213–225.
324. Suárez-Martínez E. B., González-Santos M., Federico M. Evaluation of extraction methods for the isolation of dust mites, bacterial, and fungal PCR-quality DNA from indoor environmental dust samples: A new scope for indoors research // *Journal of Environmental Health Research*. 2006. V. 5. P. 105–114.

325. Šustr V., Pižl V. Temperature dependence and ontogenetic changes of metabolic rate of an endemic earthworm *Dendrobaena mrazeki* // *Biologia*. 2010. V. 65. № 2. P. 289–293.
326. Suthar S. Earthworm density, casting activities and its impact on canopy soil nutrient profile under different aboveground vegetations // *Environmentalist*. 2011. V. 31. № 3. P. 227–236.
327. Swift M. J., Heal O. W., Anderson J. M. *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. — Berkeley : University of California Press, 1979. — xii, 372 p.
328. Taberlet P., Coissac E., Pompanon F. [et al.] Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding // *Molecular Ecology*. 2012a. V. 21. № 8. P. 2045–2050.
329. Taberlet P., Prud'homme S. M., Campione E. [et al.] Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies // *Molecular Ecology*. 2012b. V. 21. № 8. P. 1816–1820.
330. Tardy V., Mathieu O., Lévêque J. [et al.] Stability of soil microbial structure and activity depends on microbial diversity // *Environmental Microbiology Reports*. 2014. V. 6. № 2. P. 173–183.
331. Taylor A. R., Lenoir L., Vegerfors B., Persson T. Ant and Earthworm Bioturbation in Cold-Temperate Ecosystems // *Ecosystems*. 2019. V. 22. № 5. P. 981–994.
332. Taylor A. R., Taylor A. F. S. Assessing daily egestion rates in earthworms using fungal spores as a natural soil marker to estimate gut transit time // *Biology and Fertility of Soils*. 2014. V. 50. № 1. P. 179–183.
333. Tilman D., Isbell F., Cowles J. M. Biodiversity and ecosystem functioning // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2014. V. 45. № 1. P. 471–493.
334. Tiunov A., Scheu S. Microfungal communities in soil, litter and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae): A laboratory experiment // *Applied Soil Ecology*. 2000. V. 14. № 1. P. 17–26.
335. Torsekar V. R., Sagi N., Daniel J. A. [et al.] Contrasting responses to aridity by different-sized decomposers cause similar decomposition rates across a precipitation gradient // *eLife*. 2024. V. 13. Article RP93656.
336. Tournayre O., Littlefair J. E., Garrett N. R. [et al.] First national survey of terrestrial biodiversity using airborne eDNA // *Scientific Reports*. 2025. V. 15. Article 19247.

337. Trimbos K. B., Cieraad E., Schrama M. [et al.] Stirring up the relationship between quantified environmental DNA concentrations and exoskeleton-shedding invertebrate densities // *Environmental DNA*. 2021. V. 3. № 3. P. 605–618.
338. Tu C., Zhang A., Zhang Y. [et al.] Soil fauna niche complementarity explains long-term soil multifunctionality differences between planted and natural subalpine forests // *Geoderma*. 2026. V. 465. Article 117653.
339. Ustinova E. N., Schepetov D. M., Lysenkov S. N., Tiunov A. V. Soil arthropod communities are not affected by invasive *Solidago gigantea* Aiton (Asteraceae), based on morphology and metabarcoding analyses // *Soil Biology and Biochemistry*. 2021. V. 159. Article 108288.
340. Uvarov A. V., Scheu S. Effects of temperature regime on the respiratory activity of developmental stages of *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae) // *Pedobiologia*. 2004. V. 48. № 4. P. 365–371.
341. van den Hoogen J., Geisen S., Wall D. H. [et al.] A global database of soil nematode abundance and functional group composition // *Scientific Data*. 2020. V. 7. Article 103.
342. van der Meij W. M., Riedesel S., Reimann T. Mixed Signals: interpreting mixing patterns of different soil bioturbation processes through luminescence and numerical modelling // *SOIL*. 2025. V. 11. № 1. P. 51–66.
343. Velzen R. van, Weitschek E., Felici G., Bakker F. T. DNA Barcoding of Recently Diverged Species: Relative Performance of Matching Methods // *PLOS ONE*. 2012. V. 7. № 2. Article e30490.
344. von Törne E. Assessing feeding activities of soil-living animals. I. Bait-lamina-tests // *Pedobiologia*. 1990. V. 34. № 2. P. 89–101.
345. Vorobeichik E. L., Bergman I. E. Modification of the bait-lamina test to estimate soil macrofauna and mesofauna feeding activity // *Soil Biology and Biochemistry*. 2023. V. 183. Article 109047.
346. Vorobeichik E. L., Bergman I. E. Bait-lamina test for assessment of polluted soils: Rough vs. Precise scales // *Ecological Indicators*. 2021. V. 122. Article 107277.
347. Vorobeichik E. L., Bergman I. E. Bait-Lamina Test in the Assessment of Polluted Soils: Choice of Exposure Duration // *Russian Journal of Ecology*. 2020. V. 51. № 5. P. 430–439.

348. Wall D. H., Bradford M. A., St. John M. G. [et al.] Global decomposition experiment shows soil animal impacts on decomposition are climate-dependent // *Global Change Biology*. 2008. V. 14. № 11. P. 2661–2677.
349. Wang C., Houlton B. Z., Liu D. [et al.] Stable isotopic constraints on global soil organic carbon turnover // *Biogeosciences*. 2018. V. 15. № 4. P. 987–995.
350. Wang Jiachen, Yang Y., Zhang G. [et al.] Niche Differentiation of Three Terrestrial Isopod Species Based on DNA Metabarcoding // *Ecology and Evolution*. 2025. V. 15. Article e71682.
351. Wang Jianing, Yu J., Pan Z. [et al.] Rare taxa modulate the emergence of dominants in microbial communities // *mBio*. 2025. V. 17. № 3. Article e02598-25.
352. Wang X., Hu F., Li H.-X. Contribution of earthworm activity to the infiltration of nitrogen in a wheat agroecosystem // *Biology and Fertility of Soils*. 2005. V. 41. № 4. P. 284–287.
353. Wang Y., Zheng Y., Peñuelas J. [et al.] Earthworm activity increases soil greenhouse gas emission and microbial biomass: a global meta-analysis // *Plant and Soil*. 2025. V. 515. № 1. P. 685–700.
354. Watkins N. E. Jr, SantaLucia J. Jr. Nearest-neighbor thermodynamics of deoxyinosine pairs in DNA duplexes // *Nucleic Acids Research*. 2005. V. 33. № 19. P. 6258–6267.
355. Watts C., Dopheide A., Holdaway R. [et al.] DNA metabarcoding as a tool for invertebrate community monitoring: a case study comparison with conventional techniques // *Austral Entomology*. 2019. V. 58. № 3. P. 675–686.
356. White E. P., Ernest S. K. M., Kerkhoff A. J., Enquist B. J. Relationships between body size and abundance in ecology // *Trends in Ecology & Evolution*. 2007. V. 22. № 6. P. 323–330.
357. Whittaker R. H. *Communities and Ecosystems*. — 2nd ed. — New York : Macmillan, 1975. — xviii, 385 p.
358. Wiemers M., Fiedler K. Does the DNA barcoding gap exist? a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae) // *Frontiers in Zoology*. 2007. V. 4. Article 8.
359. Wilson I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification // *Applied and Environmental Microbiology*. 1997. V. 63. № 10. P. 3741–3751.
360. Wright A. J., Wardle D. A., Callaway R., Gaxiola A. The Overlooked Role of Facilitation in Biodiversity Experiments // *Trends in Ecology & Evolution*. 2017. V. 32. № 5. P. 383–390.

361. Wu D., Du E., Eisenhauer N. [et al.] Global engineering effects of soil invertebrates on ecosystem functions // *Nature*. 2025. V. 640. № 8060. P. 120–129.
362. Wynn J. G. Carbon isotope fractionation during decomposition of organic matter in soils and paleosols: Implications for paleoecological interpretations of paleosols // *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 2007. V. 251. № 3–4. P. 437–448.
363. Xiao W., Chen C., Chen X. [et al.] Functional and phylogenetic diversity promote litter decomposition across terrestrial ecosystems // *Global Ecology and Biogeography*. 2020. V. 29. № 12. P. 2261–2272.
364. Yang C., Bohmann K., Wang X. [et al.] Biodiversity Soup II: A bulk-sample metabarcoding pipeline emphasizing error reduction // *Methods in Ecology and Evolution*. 2021. V. 12. № 7. P. 1252–1264.
365. Young M. R., Hebert P. D. N. Unearthing soil arthropod diversity through DNA metabarcoding // *PeerJ*. 2022. V. 10. Article e12845.
366. Yu W. H., Li N., Tong D. S. [et al.] Adsorption of proteins and nucleic acids on clay minerals and their interactions: A review // *Applied Clay Science*. 2013. V. 80–81. P. 443–452.
367. Zeng X., Gao H., Wang R. [et al.] Global contribution of invertebrates to forest litter decomposition // *Ecology Letters*. 2024. V. 27. Article e14423.
368. Zeng X.-M., Delgado-Baquerizo M., Wen S. [et al.] Soil invertebrate diversity supports ecosystem multifunctionality along elevation gradients // *Plant and Soil*. 2025. V. 512. № 1–2. P. 1243–1260.
369. Zhang H., Bu W. Exploring Large-Scale Patterns of Genetic Variation in the COI Gene among Insecta: Implications for DNA Barcoding and Threshold-Based Species Delimitation Studies // *Insects*. 2022. V. 13. № 5. Article 425.
370. Zhang X., Liu Y., He D. Earthworms multifacetedly drive size- and type-dependent microplastic transport in soils // *Environmental Pollution*. 2025. V. 382, Part 1. Article 126789.
371. Zhang Z., Qu Y., Li S. [et al.] Soil bacterial quantification approaches coupling with relative abundances reflecting the changes of taxa // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. Article 4837.
372. Zimmer M., Kautz G., Topp W. Do woodlice and earthworms interact synergistically in leaf litter decomposition? // *Functional Ecology*. 2005. V. 19. № 1. P. 7–16.

373. Zimmermann H. H., Harðardóttir S., Ribeiro S. Assessing the performance of short 18S rDNA markers for environmental DNA metabarcoding of marine protists // *Environmental DNA*. 2024. V. 6. № 3. Article e580.
374. Zinger L., Chave J., Coissac E. [et al.] Extracellular DNA extraction is a fast, cheap and reliable alternative for multi-taxa surveys based on soil DNA // *Soil Biology and Biochemistry*. 2016. V. 96. P. 16–19.
375. Zizka V. M. A., Leese F., Peinert B., Geiger M. DNA metabarcoding from sample fixative as a quick and voucher-preserving biodiversity assessment method // *Genome*. 2018. V. 62. № 3. P. 122–136.
376. Zuev A., Heidemann K., Leonov V. [et al.] Different groups of ground-dwelling spiders share similar trophic niches in temperate forests // *Ecological Entomology*. 2020. V. 45. № 6. P. 1346–1356.