

ВЛИЯНИЕ МАКРОПЛАСТИКА НА СООБЩЕСТВА ПОЧВЕННЫХ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ: ИССЛЕДОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ ТРАДИЦИОННОГО И МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕТОДОВ

И. В. Сотников¹, А. А. Белов², В. Д. Леонов³, О. Л. Макарова⁴,
К. А. Машков⁵, А. Ю. Короткевич⁶, М. Г. Кривошеина⁷, О. Л. Розанова⁸,
Л. Б. Рыбалов⁹, А. В. Танасевич¹⁰, В. С. Чепцов¹¹, А. В. Тиунов¹²

^{1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12} Институт проблем экологии и эволюции имени А. Н. Северцова РАН, Москва, Россия

^{2, 11} Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

¹ vania.sotnikov@ya.ru

Аннотация. Загрязнение почвы пластиком – глобальная проблема наших дней. В большинстве экспериментальных исследований внимание фокусируется на микропластике, однако крупные фрагменты, такие как разнообразная упаковка и полиэтиленовые пакеты, составляют существенный компонент пластикового загрязнения. Влияние крупных фрагментов бытового пластикового мусора на сообщества почвенных беспозвоночных практически не изучено. Использование метабаркодинга может значительно упростить оценку таксономического состава почвенных беспозвоночных животных, а также их симбионтов и паразитов. Однако метод пока недостаточно разработан и требует верификации классическими подходами. Мы использовали метабаркодинг и традиционный подход, основанный на морфологическом определении беспозвоночных, при оценке влияния макропластика на сообщества почвенных животных. Фрагменты прозрачной или черной полиэтиленовой пленки размером 40 × 40 см были закреплены на поверхности почвы в четырех лесных экосистемах. Через 9 месяцев общая численность мезофауны в целом и отдельных групп беспозвоночных (*Collembola*, *Mesostigmata*) была достоверно снижена в почве под пленкой по сравнению с контрольными участками. Наличие пленки не повлияло на обилие макрофауны, однако в отдельных биотопах под пленкой увеличилось обилие *Isopoda*, *Hemiptera* и *Chilopoda* и снизилась численность личинок *Coleoptera* и *Diptera*. Примененная модификация метабаркодинга позволила выявить существенно меньшее разнообразие беспозвоночных (66 семейств, 105 родов) по сравнению с морфологическим методом определения (95 семейств, 127 родов). Были отмечены *Wolbachia* и *Rickettsia*, типичные эндосимбионты беспозвоночных, но не другие распространенные паразиты. В отличие от морфологического метода определения, метабаркодинг не выявил значимых различий в таксономическом составе беспозвоночных в почве под пленкой и в контрольной почве. Однако значимая корреляция между результатами морфологического определения и метабаркодинга подтверждает способность последнего выявлять даже небольшие изменения таксономического состава сообществ почвенных беспозвоночных.

Ключевые слова: почвенная фауна, метабаркодинг, OTU, ASV, пластиковое загрязнение, лесные экосистемы, макрофауна, мезофауна, структура сообществ

Благодарности: выражаем глубокую благодарность кандидату биологических наук М. Д. Логачевой (Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М. В. Ломоносова) за возможность секвенирования образцов на платформе Illumina. Полевой эксперимент был проведен в рамках проекта № 18-29-05076 Российского фонда фундаментальных исследований. Молекулярно-генетические анализы выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00363).

Для цитирования: 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. Vol. 8 (3). <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2023-3-3>

EFFECT OF MACROPLASTIC ON SOIL INVERTEBRATES: A CASE STUDY USING MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR APPROACHES

I.V. Sotnikov¹, A.A. Belov², V.D. Leonov³, O.L. Makarova⁴,
K.A. Mashkov⁵, A.Y. Korotkevich⁶, M.G. Krivosheina⁷, O.L. Rozanova⁸,
L.B. Rybalov⁹, A.V. Tanasevich¹⁰, V.S. Cheptsov¹¹, A.V. Tiunov¹²

^{1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12} Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^{2, 11} Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Tyumen State University, Tyumen, Russia

¹ vania.sotnikov@ya.ru

Abstract. Soil contamination by plastic is a global problem. Most experimental studies focus on microplastics, but large fragments, such as a variety of packaging and plastic bags, make up a significant component of plastic pollution. The effects of large fragments of household plastic debris on soil invertebrate communities are largely unexplored. The use of metabarcoding can greatly simplify the assessment of the taxonomic composition of soil invertebrates as well as their symbionts and parasites. However, the method is still underdeveloped and requires verification by classical approaches. We used metabarcoding and the traditional approach based on the morphological identification of invertebrates in assessing the effect of macroplastics on soil animal communities. Fragments of transparent or black polyethylene film measuring 40 × 40 cm were fixed on the soil surface in four forest ecosystems. After 9 months, the total abundance of mesofauna in general and individual groups of invertebrates (Collembola, Mesostigmata) was significantly reduced in the soil under the film compared to the control plots. The presence of the film did not affect the abundance of macrofauna, but in some biotopes the abundance of Isopoda, Hemiptera and Chilopoda increased and the number of Coleoptera and Diptera larvae decreased under the plastic film. The applied modification of metabarcoding revealed a significantly lower diversity of invertebrates (66 families, 105 genera) compared to the morphological method of identification (95 families, 127 genera). *Wolbachia* and *Rickettsia*, typical endosymbionts of invertebrates, but not other common parasites, were noted. In contrast to the morphological method of determination, metabarcoding revealed no significant differences in the taxonomic composition of invertebrates in the soil under the film and in the control soil. However, the significant correlation between the results of morphological identification and metabarcoding confirms the ability of metabarcoding to detect even small changes in the taxonomic composition of soil invertebrate communities.

Keywords: soil fauna, metabarcoding, OTU, ASV, plastic pollution, forest ecosystems, macrofauna, mesofauna, community structure

Acknowledgments: we express our deep gratitude to Ph.D. M.D. Logacheva (Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University named after M.V. Lomonosov) for the possibility of sequencing samples on the Illumina platform. The field experiment was carried out within the framework of project No. 18-29-05076 of the Russian Foundation for Basic Research. Molecular genetic analyzes were performed with the support of the Russian Science Foundation (project No. 22-14-00363).

For citation: Sotnikov I.V., Belov A.A., Leonov V.D., Makarova O.L., Mashkov K.A., Korotkevich A.Y., Krivosheina M.G., Rozanova O.L., Rybalov L.B., Tanasevich A.V., Cheptsov V.S., Tiunov A.V. Effect of macroplastic on soil invertebrates: a case study using morphological and molecular approaches. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*. 2023;8(3). (In Russ.). Available from: <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2023-3-3>

Введение

Искусственные полимеры относятся к наиболее распространенным загрязнителям окружающей среды [1]. Влияние пластика на окружающую среду и почвенную биоту во многом определяется размером фрагментов [2]. Воздействие на экосистемы микропластика (частицы размером менее 5 мм) относительно подробно исследовано [3]. Число работ, посвященных исследованию крупных фрагментов (макропластика) в наземных экосистемах, значительно

меньше. Среди разных форм макропластика наиболее заметен и распространен бытовой мусор, состоящий преимущественно из разного рода упаковок и пластиковых пакетов (рис. 1) [4, 5]. По разным оценкам, во всем мире в год используется от 500 миллиардов до одного триллиона пластиковых пакетов [4]. Их низкая стоимость позволяет одноразовое использование, что значительно усиливает степень загрязнения окружающей среды. Работы о взаимодействии почвенных животных с макропластиком в основном посвящены его фрагментации или транспорту

по почвенному профилю. Некоторые беспозвоночные, прежде всего термиты, способны фрагментировать крупные куски пластика [6, 7]. Норные дождевые черви *Lumbricus terrestris* могут переносить куски макропластика размером

2×2 см на глубину до 20 см [8]. Комплексных исследований влияния крупных фрагментов пластика на почвенных беспозвоночных в естественных условиях, по-видимому, не проводилось.

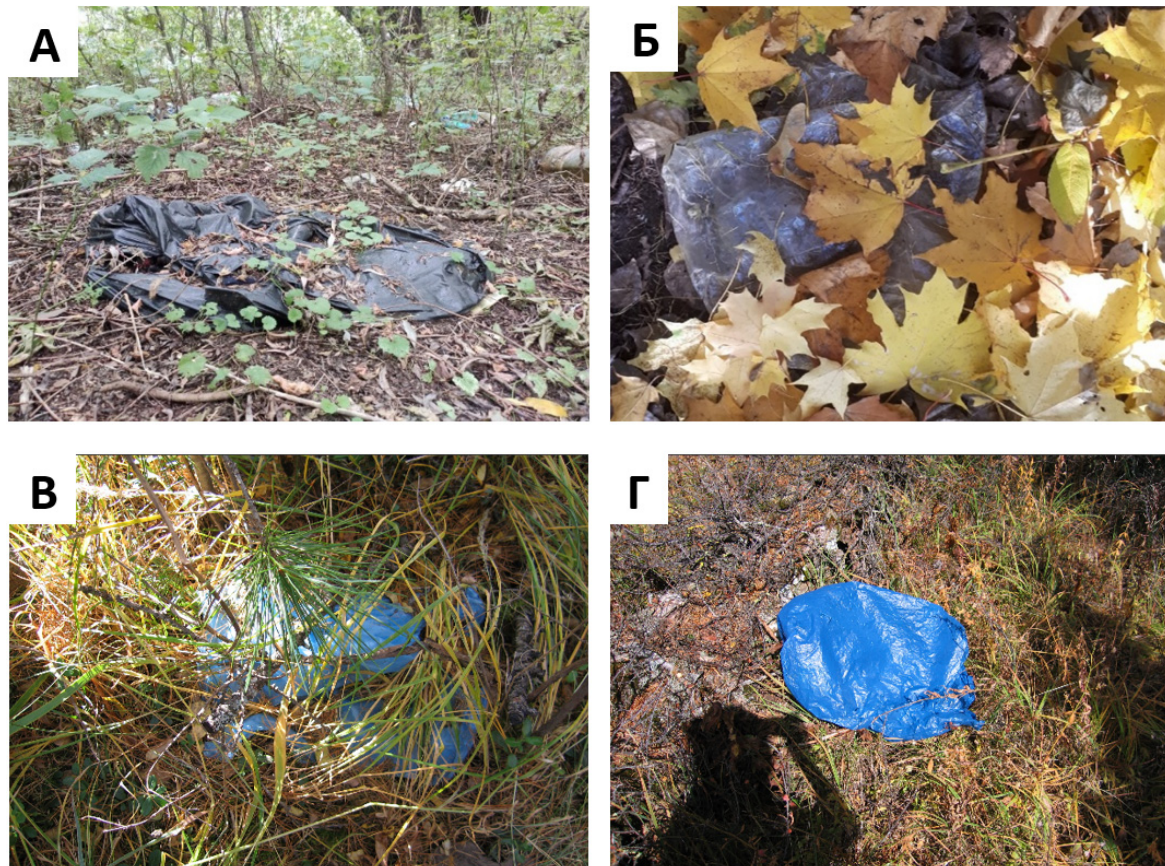


Рис. 1. Бытовой мусор на поверхности почвы:
А – лиственный лес в окрестностях г. Ступино (Московская обл.) (фото А. А. Карабановой);
Б – большой газон МГУ имени М. В. Ломоносова (фото Д. Д. Виноградова);
В, Г – Республика Алтай (фото В. Д. Мигуновой)

Fig. 1. Household waste on the soil surface:
А – deciduous forest in the vicinity of Stupino (Moscow region) (photo by A. A. Karabanova);
Б – large lawn of Lomonosov Moscow State University (photo by D.D. Vinogradov);
В, Г – Altai Republic (photo by V. D. Migunova)

Ближайший аналог непреднамеренного загрязнения почвы макропластиком – пластиковая мульчирующая пленка, используемая в сельском хозяйстве [9, 10]. Влияние пластиковой мульчи на почвенное население было показано в целом ряде работ. В частности, под пластиковой мульчей отмечено снижение разнообразия почвенных беспозвоночных, а также численности муравьев, жуков, сенокосцев, мокриц, слизней и эдафических коллембол [11]. В эксперименте с разными сочетаниями органической и пластиковой мульчи было показано снижение численности пауков и растительноядных нематод, а также общего таксономического разнообразия нематод в вариантах с пластиковой пленкой [12]. Размещение черной пластиковой

пленки на поверхности почвы привело к уменьшению численности дождевых червей в верхнем слое почвы [13]. Черная полиэтиленовая пленка снижала обилие [14] и изменяла видовой состав жужелиц [15]. Таким образом, пластиковая пленка, покрывающая поверхность почвы, изменяет таксономический состав и структуру населения почвенных беспозвоночных в агроэкосистемах. Можно ожидать схожее влияние на состав и численность беспозвоночных животных при экранировании поверхности почвы крупным бытовым мусором, например, пластиковыми пакетами.

Оценка влияния пластика на почвенных беспозвоночных осложняется их высоким разнообразием и большой численностью. Идентификация

до низких таксономических рангов (род, вид) требует привлечения специалистов по соответствующим группам животных и занимает много времени. Многих беспозвоночных возможно определить только по половозрелым особям или по особям одного из полов [16, 17]. Использование метабаркодинга позволяет в короткие сроки установить таксономический состав живых организмов в большом числе проб. Метабаркодинг активно используется для биомониторинга, контроля инвазивных видов, установления пищевых предпочтений различных животных [18–20]. Однако результаты метабаркодинга не всегда полностью согласуются с результатами морфологической идентификации [21, 22]. Вероятные причины расхождений в результатах двух подходов весьма разнообразны и могут включать особенности выделения ДНК, подготовки библиотек для секвенирования и идентификации полученных последовательностей. В частности, эффективность выделения ДНК зависит от степени склеротизации покровов животных [23, 24]. Огромную роль играет выбор праймеров, используемых при ПЦР. Для беспозвоночных животных традиционно используется фрагмент митохондриального гена первой субъединицы мультимерного белка дыхательной цепи цитохром оксидазы (COI/cox) [25]. Этот фрагмент содержит как области с высокой степенью консерватизма для идентификации крупных таксонов, так и с высокой вариабельностью для различия низких таксономических рангов [26, 27]. Для этого гена в базах данных представлено наибольшее число аннотированных последовательностей [28]. Однако для некоторых представителей почвенной фауны вариабельность гена COI бывает слишком сильной, из-за чего один и тот же вид может быть идентифицирован как несколько разных. Так, внутривидовые различия гена COI у разных популяций *Steganacarus magnus* (Oribatida) колебались от 5 до 32 % [29]. Однако подобные различия встречаются нечасто; для идентификации «сложных» таксонов используют несколько разных генов [30].

При работе с данными метабаркодинга есть возможность проводить анализ сообщества без отождествления каждого фрагмента гена с определенным таксоном. В таком случае анализируются последовательности, сгруппированные на разном уровне сходства (Operational Taxonomic Unit) – OTU [31] или точные варианты последовательностей ампликонов (Amplicon Sequence Variants) – ВПА, или ASV [32]. Оба подхода широко используются, в том

числе для анализа сообществ беспозвоночных животных.

Цель данной работы – сравнение методов метабаркодинга и традиционной морфологической идентификации беспозвоночных при оценке влияния на почвенные сообщества крупных фрагментов пластиковой пленки, размещенной на поверхности почвы. Мы предполагали, что изоляция поверхности почвы пластиковой пленкой вызовет изменения в численности и таксономическом составе почвенных беспозвоночных.

Материалы и методы

Район исследований

Эксперимент проведен на четырех экспериментальных площадках, расположенных в двух хвойных и двух широколиственных лесах на трех биостанциях Института проблем экологии и эволюции имени А. Н. Северцова РАН в Московской области (рис. 2).

В лиственном лесу на торфяно-подзолистой оглеенной почве на гидробиологической станции «Глубокое озеро» (55.7525° N, 36.5113° E) площадка располагалась на участке с доминированием лещины *Corylus avellana*. На биогеоэкологической станции «Малинки» (55.4593° N, 37.1787° E) площадка была заложена в насаждении клена остролистного *Acer platanoides* на дерново-подзолистой почве. На научно-экспериментальной базе «Черноголовка» по одной площадке было заложено в сосняке (*Pinus sylvestris*, 56.0244° N, 38.4292° E) и ельнике (*Picea abies*, 56.0252° N, 38.4307° E) на дерново-подзолистых почвах.

В сентябре 2019 г. на каждой экспериментальной площадке на поверхности почвы разместили листы прозрачной и листы черной двуслойной полиэтиленовой пленки размером 40 × 40 см (полиэтилен высокого давления, ПЭВД, толщина каждого слоя 100 мкм). Листы пленки крепились за углы металлическими гвоздями длиной 15 см. Два листа разного типа пластика (черный и прозрачный) располагали рядом для снижения влияния микрорельефа и прочих случайных факторов (рис. 2). Листы пленки имитировали фрагменты бытового мусора (рис. 1). При завершении эксперимента (снятие пленки) вблизи каждой пары листов были выбраны контрольные участки с ненарушенным почвенным покровом.

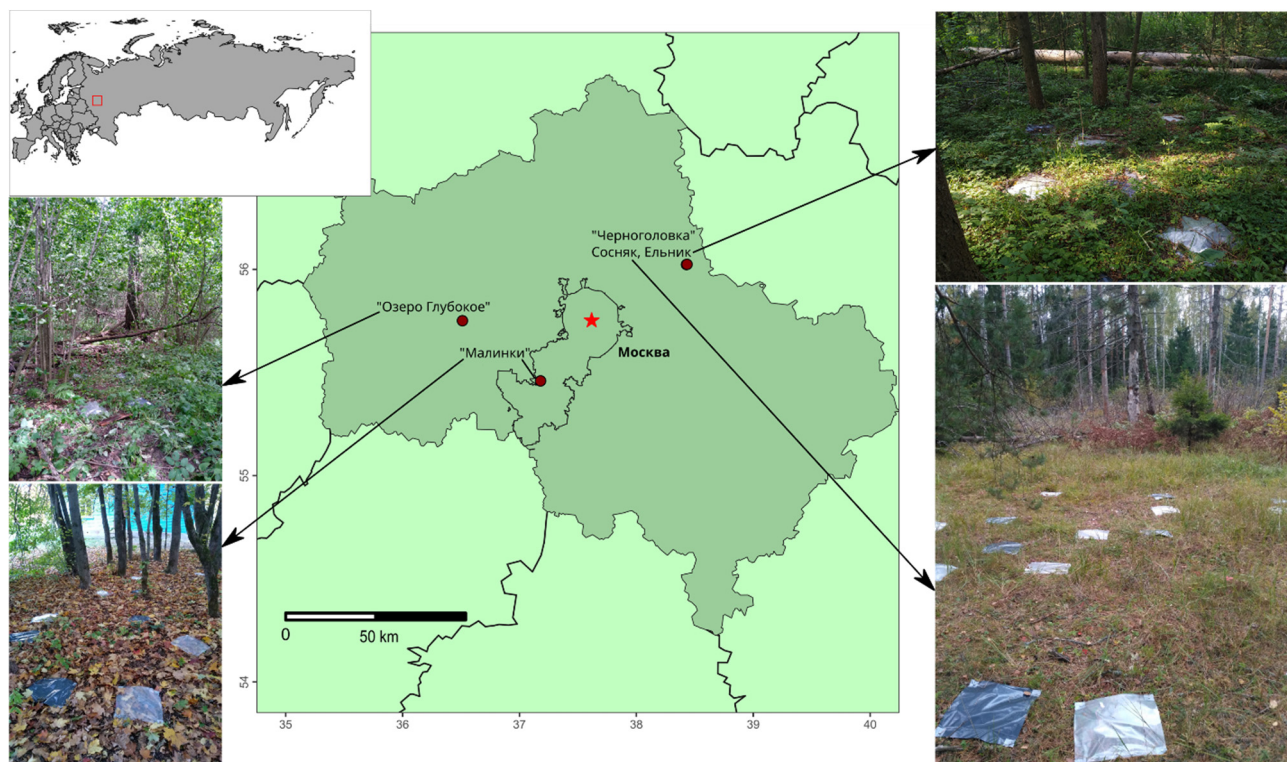


Рис. 2. Экспериментальные площадки на трех биостанциях
Института проблем экологии и эволюции имени А. Н. Северцова РАН

Fig. 2. Experimental sites at three biological stations of Severtsov Institute
of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences

Отбор и обработка проб

Почвенные пробы отбирали в июне 2020 г., т.е. время экспонирования пластиковой пленки составило 9 месяцев. В каждом биотопе отбрали 18 почвенных проб площадью 10×10 и глубиной 10 см (включая подстилку, при наличии), по 6 повторностей для каждого типа экспериментального воздействия – прозрачный пластик, черный пластик, контроль. Для извлечения животных каждую пробу делили пополам. Животных из каждой половины экстрагировали с помощью воронок Тульгрена в течение 10 дней и фиксировали 95 % спиртом. Особи беспозвоночных, выделенные из одной половины пробы, были использованы для морфологической идентификации и оценки обилия. Животные, экстрагированные из другой половины пробы, были использованы для определения таксономического состава с помощью метабаркодинга. Сильные различия биомассы разных таксонов могут повлиять на результаты метабаркодинга [33]. Поэтому от крупных беспозвоночных (длина более 3 мм) отделяли и использовали в анализе только небольшой фрагмент (голова или несколько конечностей). При оценке общей численности животных энхитреид не учитывали, поскольку использованный метод (сухая экстракция) не подходит для оценки их обилия. Однако мы

использовали данные о наличии в пробах энхитреид при сравнении результатов метабаркодинга и морфологического определения. Кроме того, из-за мелких размеров не была проведена оценка обилия клещей отряда Trombidiformes.

Влажность почвы (в % от влажного веса) определяли по разнице массы почвенного образца до и после экстракции животных.

Выделение ДНК и приготовление библиотеки для секвенирования на платформе Illumina

Экстракцию ДНК смеси всех особей почвенных беспозвоночных, извлеченных из каждой пробы, проводили коммерческим набором для выделения ДНК из клинических образцов «М-сорб» (Синтол, Россия) по описанной ранее методике [34]. Из микропробирки с животными дозатором удаляли излишки спирта, остатки выпаривали при $70\text{--}75\text{ }^\circ\text{C}$ до сухого состояния. Затем образцы гомогенизировали пестиком и заливали лизирующим буфером. Время лизиса было увеличено до 15–20 ч при $75\text{ }^\circ\text{C}$. Приготовление библиотеки для секвенирования проводили по методике метабаркодинга сообществ почвенных беспозвоночных, описанной в той же работе, на которой основывалось выделение ДНК [34]. Для амплификации целевого фрагмента

длиной ~313 п.н. использовали праймеры mICOIntF (5'-GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC-3') и JgHCO2198 (5'-TAIACYTCIGGRTGICCRARAAYCA-3'). К последовательностям праймеров были добавлены вставки и адаптеры для дальнейшего индексирования и секвенирования. Секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq на факультете Биотехнологии и Биоинформатики Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Биоинформатический анализ

В последовательностях демультиплексированных файлов формата FastQ с помощью программы cutadapt обрезали последовательности адаптеров и праймеров [35]. Дальнейший анализ проводили в программной среде R v.4.1.2 [36]. С помощью пакета DADA2 [37] проводили фильтрацию последовательностей по качеству и очистку от шумов, объединяли парные чтения. Отфильтровывали последовательности по длине (300–320 п.н.), удаляли химеры. В результате получали таблицу с ВПА. Идентификацию проводили по базе данных BOLD [38].

Анализ данных

Статистическую обработку проводили в программной среде R v.4.1.2 [36]. Все графики строили с помощью пакета ggplot2 [39].

Для сравнения таксономического состава сообществ почвенных беспозвоночных при разных типах воздействия была применена методика, описанная в [40], с использованием трех наборов данных. Первый набор включал идентифицированные морфологическим методом семейства почвенных беспозвоночных. Второй набор состоял из точных ВПА. Третий был представлен семействами беспозвоночных, которые были идентифицированы на основе метабаркодинга по базе данных BOLD. Для 2 из 3 подходов (морфологическое определение и идентифицированные последовательности) проводили фильтрацию редких таксонов, встретившихся менее чем в 4 пробах, и «пустых» проб, в которых встретилось менее чем 2 таксона. Количество полученных после секвенирования ридов только приблизительно отражает численность таксонов [41]. Поэтому численность животных после морфологического определения и число ридов каждого таксона в результатах метабаркодинга были преобразованы в качественный фор-

мат (наличие-отсутствие). На основе полученных наборов данных было проведено непараметрическое многомерное шкалирование (NMDS – команда metaMDS из пакета vegan [42]) с индексом Жаккара в качестве меры сходства (количество осей NMDS для каждого набора данных было равно 5, для достижения значения стресса меньше 0,2). Координаты проб в осях NMDS были использованы в линейном дискриминантном анализе (функции lda из пакета MASS [43] и candisc из одноименного пакета [44]) с типом воздействия (прозрачный пластик, черный пластик, контроль) как группирующей переменной. Результаты ординации были представлены в пространстве двух дискриминантных функций. Для сравнения результатов трех методов использовали корреляцию Спирмена дискриминантных функций каждого подхода, внесшего наибольший вклад в разделение групп.

Численность макро- и мезофауны (но не отдельных таксонов) соответствовала нормальному распределению по тесту Шапиро – Уилка и имела гомогенную дисперсию по тесту Левина (функция leveneTest из пакета car [45]). Поэтому для оценки изменения общего обилия макро- и мезофауны при разных экспериментальных воздействиях использовали двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с факторами «биотоп, d.f. = 3» и «тип воздействия, d.f. = 2» после Lg-трансформации исходных данных. Поскольку обилие отдельных таксонов беспозвоночных не имело нормального распределения, для оценки изменения их численности при разных типах воздействия использовали тест Краскела – Уоллиса с последующим пост-хок тестом Данна с уровнем значимости $p < 0,05$ и поправкой на множественные сравнения Беньямини – Хохберга (функция dunnTest из пакета FSA [46]).

Результаты

Влияние пластиковой пленки на состояние почвы

Внешний вид почвенного покрова под пленкой и без нее сильно различался (рис. 3, А, Б). Под черной пленкой практически полностью отсутствовали живые зеленые растения; пленка препятствовала поступлению на поверхность почвы опада. Во время отбора проб на нижней поверхности пленки часто был замечен конденсат (рис. 3).



Рис. 3. Фрагменты полиэтиленовой пленки, размещенные на экспериментальных площадках: А, Б – изменение внешнего вида почвенного покрова под пластиковой пленкой по сравнению с незатронутыми участками; В, Г, Д – перехват опада пластиковыми листами; Е – конденсат под поверхностью прозрачной пленки

Fig. 3. Fragments of polyethylene film placed at the experimental sites: А, Б – change in the appearance of the soil cover under the plastic film compared to unaffected areas; В, Г, Д – interception of litter with plastic sheets; Е – condensation under the surface of the transparent film

На двух площадках на биостанции Черноголовка было отмечено достоверное снижение влажности почвы под пленкой по сравнению

с контролем. На биостанциях Глубокое и Малинки значимых различий влажности почвы обнаружено не было (рис. 4).

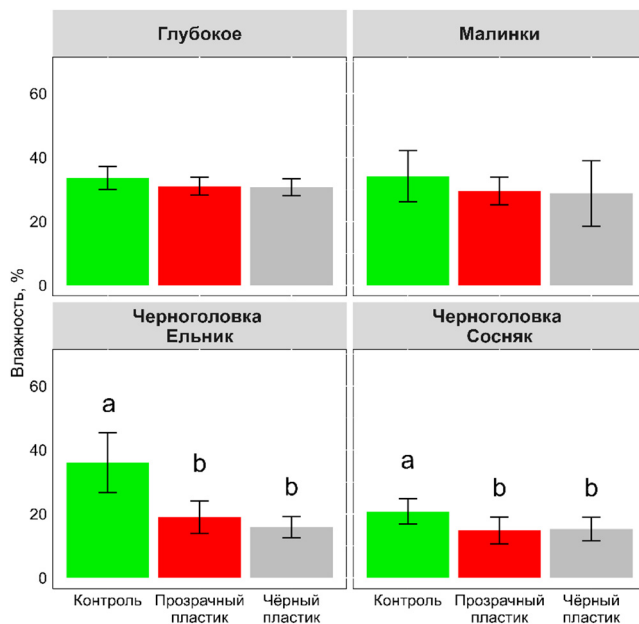


Рис. 4. Влажность почвы (% влажного веса) под пластиковой пленкой и в контроле. На рисунке представлены средние значения и ошибки среднего (SE). Разные буквы указывают на статистически значимые различия в пределах биотопа (тест Краскела – Уолеса и парное сравнение Данна)

Fig. 4. Soil moisture (% wet weight) under plastic film and control. The figure shows the means and errors of the mean (SE). Different letters indicate statistically significant differences within the biotope (Kruskal-Wallis test and Dunn's pairwise comparison)

Идентификация беспозвоночных разными методами

По морфологическим признакам во всех исследованных пробах (72 пробы) было идентифицировано 11 классов, 26 отрядов, 95 семейств, 127 родов и 168 видов почвенных животных. Наиболее часто встречающимися и обильными отрядами были клещи Sarcoptiformes и Mesostigmata и коллемболы Entomobryomorpha и Poduromorpha.

При подготовке библиотеки для секвенирования не удалось получить ампликоны для одного из образцов в связи с низкой концентрацией ДНК. После обрезки последовательностей адаптеров, праймеров и баркодов было получено 1 498 230 сырых прочтений. После фильтрации последовательностей по качеству с помощью пакета DADA2 осталось 790 310 ридов, которые объединились в 287 121 последовательность. После фильтрации по длине было получено

283 115 последовательностей, которые состояли из 1 147 ВПА. После идентификации последовательностей по базе данных BOLD (97 % уровень сходства, minimum overlap – 300) было идентифицировано 8 классов, 22 отряда, 66 семейств, 105 родов и 119 видов беспозвоночных животных. Эффективность метабаркодинга оказалось низкой: 32 из 66 идентифицированных семейств встречались менее чем в двух пробах. Жуки семейства Curculionidae имели наибольшую встречаемость (38 проб). Высокую встречаемость имели панцирные клещи Damaeidae (37 проб), жуки Cantharidae и Staphylinidae (по 35 проб) и мезостигматические клещи Parasitidae (34 пробы).

Общее число семейств, идентифицированных метабаркодингом в контрольной почве

(50 семейств), было выше по сравнению с почвой под прозрачным и черным пластиком (44 и 41 семейство соответственно). При морфологическом определении было выявлено 78, 77 и 65 семейств в контроле, под прозрачным и черным пластиком соответственно (рис. 5). Целый ряд таксонов беспозвоночных плохо идентифицировался методом метабаркодинга, в том числе клещи Mesostigmata (4 семейства при метабаркодинге и 16 семейств при морфологической идентификации) и Sarcoptiformes (9 семейств при метабаркодинге и 30 семейств при морфологической идентификации). Дождевые черви (Lumbricidae) не были обнаружены метабаркодингом ни в одной из проб (рис. 5).

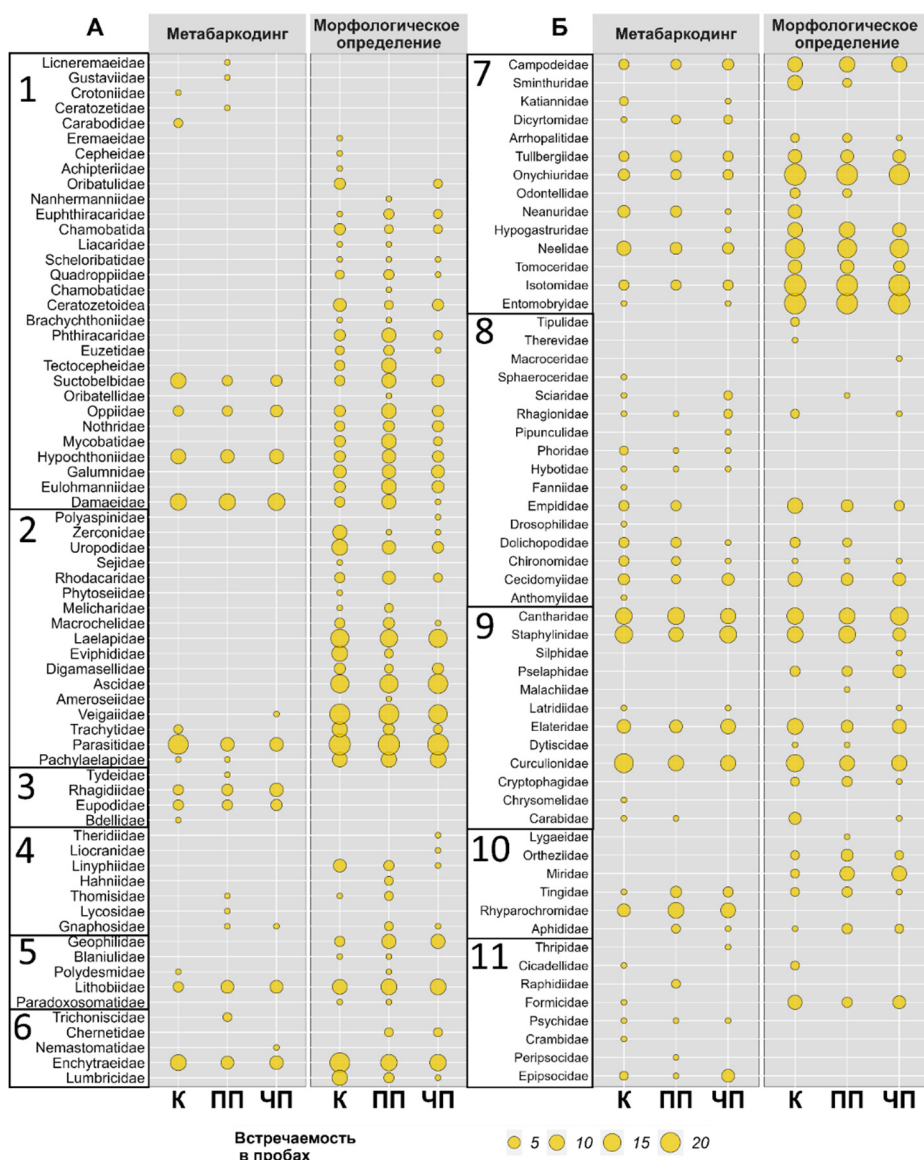


Рис. 5. Встречаемость семейств беспозвоночных в пробах (от ≤ 5 до > 20) в разных вариантах эксперимента (К – контроль, ПП – прозрачный пластик, ЧП – черный пластик). А: 1 – Sarcoptiformes; 2 – Mesostigmata; 3 – Trombidiformes; 4 – Araneae; 5 – Myriapoda; 6 – Pseudoscorpiones, Opiliones, Oniscidea, Annelidae. Б: 7 – Entognata (Collembola, Diplura); 8 – Diptera; 9 – Coleoptera; 10 – Hemiptera; 11 – Psocodea, Thysanoptera, Lepidoptera, Hymenoptera. Trombidiformes (A3) не были идентифицированы до уровня семейств при морфологическом определении, поэтому представлены только в результатах метабаркодинга

Fig. 5. Occurrence of invertebrate families in samples (from ≤ 5 to > 20) in different versions of the experiment (K – control, ПП – transparent plastic, ЧП – black plastic).

A: 1 – Sarcoptiformes; 2 – Mesostigmata; 3 – Trombidiformes; 4 – Araneae; 5 – Myriapoda; 6 – Pseudoscorpiones, Opiliones, Oniscidea, Annelidae. Б: 7 – Entognata (Collembola, Diplura); 8 – Diptera; 9 – Coleoptera; 10 – Hemiptera; 11 – Psocodea, Thysanoptera, Lepidoptera, Hymenoptera. Trombidiformes (A3) were not identified to the family level during morphological determination, therefore, presented only in metabarcoding results

Тем не менее результаты метабаркодинга показали некоторые различия встречаемости беспозвоночных в разных экспериментальных вариантах. Представители Parasitidae, одного из наиболее обычных семейств гамазовых клещей (Mesostigmata), чаще встречались в контрольных пробах (20 проб) по сравнению с пробами из-под прозрачного (7 семейств) и черного (7 семейств) пластика. По данным морфологического метода определения Mesostigmata встречались во всех пробах, кроме одной (рис. 5), но имели значительно меньшую численность в почве под пленкой (рис. 6). По результатам

морфологического определения, представители клопов семейства Miridae (Hemiptera) имели более высокое обилие и встречаемость в почве под пластиком по сравнению с контролем. В данных метабаркодинга это семейство отсутствовало. Однако другое семейство полужесткокрылых, Rhyarochromidae показало увеличение встречаемости в почве под прозрачным (11 проб) и черным (9 проб) пластиком по сравнению с контролем (6 проб). Представители двух других семейств (Tingidae и Aphididae) по результатам метабаркодинга также чаще встречались в почве под пластиком (рис. 5).

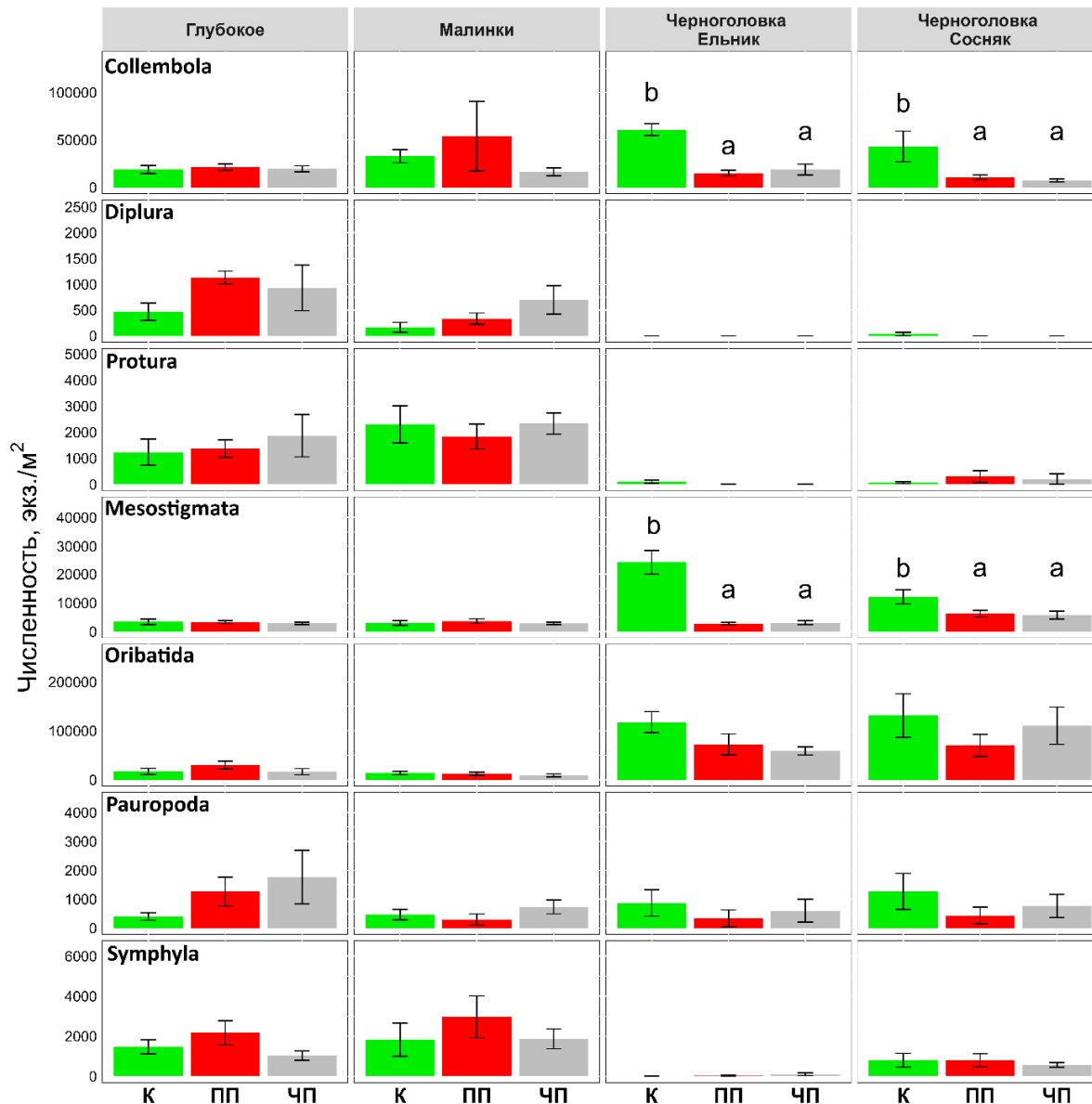


Рис. 6. Численность основных таксономических групп почвенной мезофауны (среднее \pm SE) в разных вариантах эксперимента (К – контроль, ПП – прозрачный пластик, ЧП – черный пластик). Разные буквы указывают на статистически значимые различия в пределах биотопа (тест Краскела – Уоллиса и парное сравнение Данна с поправкой на множественные сравнения Беньямини – Хохберга)

Fig. 6. Number of main taxonomic groups of soil mesofauna (average \pm SE) in different experimental variants (K – control, ПП – transparent plastic, ЧП – black plastic). Different letters indicate statistically significant differences within a biotope (Kruskal–Wallis test and Dunn's pairwise comparison corrected for Benjamin–Hochberg multiple comparisons)

Встречаемость большинства таксонов была существенно занижена при использовании мета-баркодинга. Например, семейство коллембол *Onychiuridae* под прозрачным пластиком, черным пластиком и в контрольных пробах было встречено соответственно в 23, 21 и 24 пробах при морфологическом определении и в 3, 3 и 4 пробах при метабаркодинге. Различия встречаемости подобного порядка были получены и для других распространенных семейств коллембол (*Entomobryidae* и *Isotomidae*). Наименьшие различия встречаемости между двумя методами показали жуки *Circulionidae* (морфология: 10 под прозрачным, 10 под черным пластиком и 18 проб в контроле; метабаркодинг: 9, 10 и 14 проб соответственно), *Cantharidae*, *Staphylinidae*, *Elateridae* (рис. 5). Небольшие различия между методами, хотя и при меньшем среднем уровне встречаемости, характерны и для двукрылых, особенно *Cecidomyiidae* и *Chironomidae*.

Число таксонов, идентифицированных обоими методами, уменьшалось со снижением таксономического уровня (рис. 7). Морфологическим методом определения было идентифицировано 27 отрядов беспозвоночных животных, при этом 5 из них не было идентифицировано с помощью метабаркодинга. На уровне семейств результаты менее сопоставимы. Обоими методами было идентифицировано 37 семейств, 58 уникальных семейств – при морфологическом определении и 25 уникальных семейств было выявлено метабаркодингом. Наибольшее число семейств, определенных как обоими методами (6), так и только метабаркодингом (7), принадлежало двукрылым. На более низких уровнях таксономического разрешения число таксонов, выявленных обоими методами, резко снижается, примерно до 12 % от общего разнообразия родов и 5 % общего разнообразия видов, выявленных в сумме двумя методами (рис. 7).

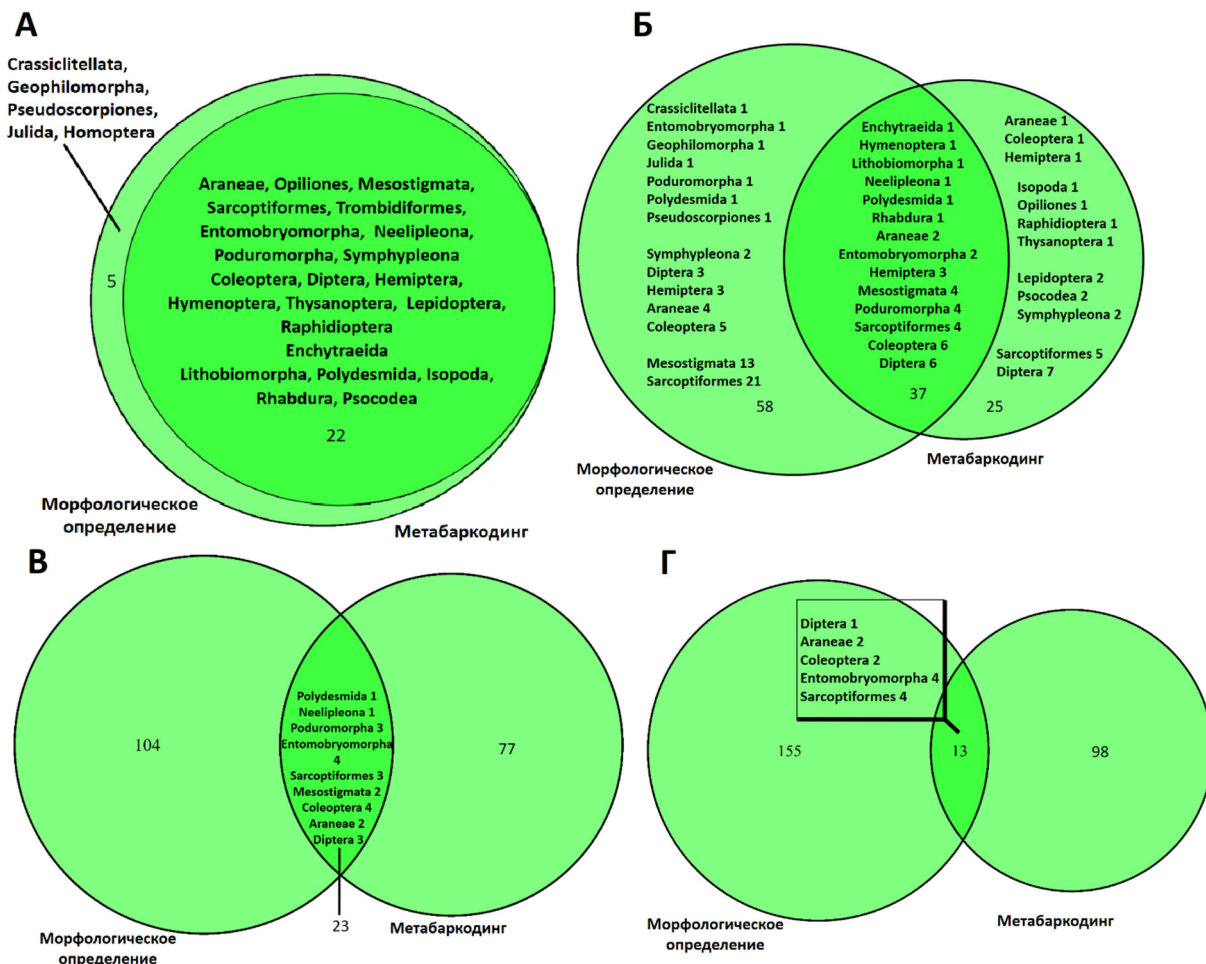


Рис. 7. Число таксонов, идентифицированных с помощью морфологического метода определения и метабаркодинга для разных таксономических уровней (диаграммы Венна):

А – отряды; Б – семейства; В – роды; Г – виды. Цифрами показано число семейств, родов и видов, идентифицированных в составе отрядов

Fig. 7. Number of taxa identified using the morphological method of identifying and metabarcoding for different taxonomic levels (Venn diagrams):

A – orders; Б – families; В – genera; Г – species. Numbers show number of families, genera and species identified within orders

Влияние пластика на таксономическую структуру почвенных беспозвоночных, выявленную разными методами

По результатам многомерного шкалирования (NMDS), ни один из используемых нами подходов (морфологическое определение, идентифицированные последовательности по базе данных BOLD и набор ВПА) не выявил заметных изменений таксономического состава сообществ почвенных беспозвоночных в разных вариантах эксперимента (рис. 8). Можно отметить меньшую изменчивость таксономического состава

в контрольной почве, что особенно хорошо выражено при использовании ВПА. С другой стороны, наблюдались существенные различия в структуре населения между биотопами. Наилучшее разделение биотопов показал вариант с использованием ВПА, в котором пробы из биостанций Глубокое озеро, Малинки и Черноголовка располагались в разных четвертях графика NMDS и не перекрывались. Пробы из сосняка и ельника биостанции Черноголовка были размещены в одной четверти графика и сильно перекрывались друг с другом. Два других подхода эффективно разделяли только хвойные и лиственные леса.

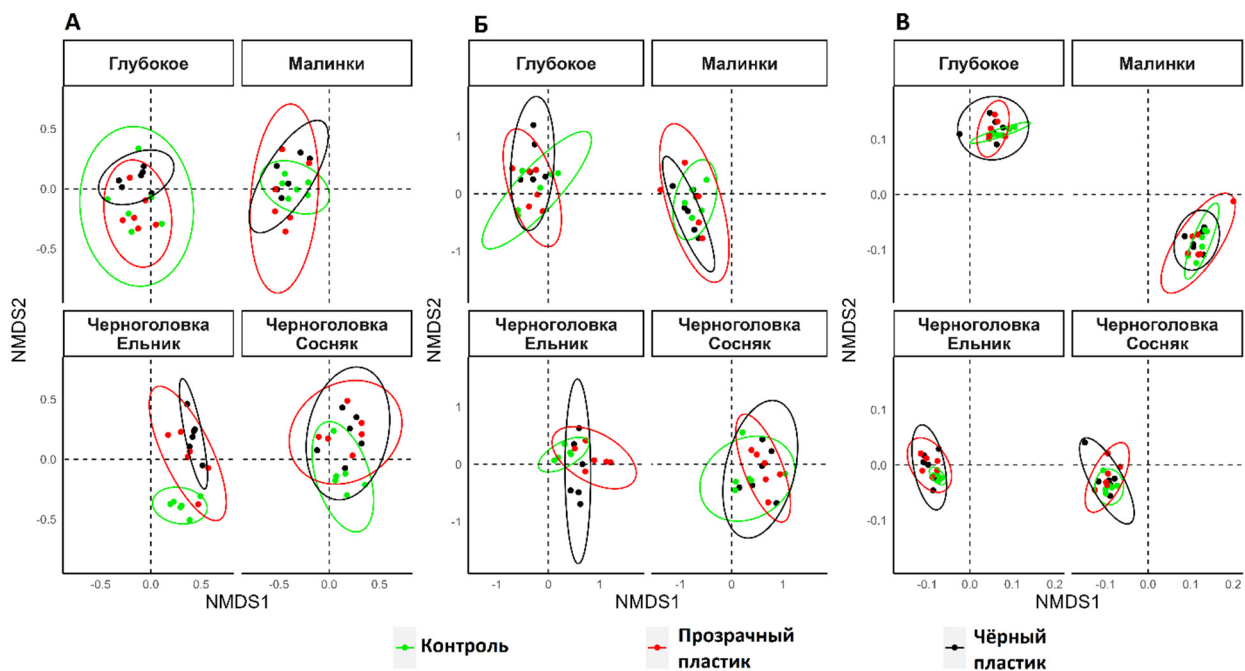


Рис. 8. Непараметрическое многомерное шкалирование (NMDS), проведенное по индексу сходства Жаккара при разных наборах данных:

А – результаты морфологического определения; Б – результаты идентификации по базе данных BOLD; В – точные варианты последовательностей ампликонов (ВПА). Эллипсы отображают 95 % вероятность нахождения точек в их пределах. Для наглядности каждый график поделен на 4 панели, соответствующие разным биотопам

Fig. 8. Nonparametric multidimensional scaling (NMDS), carried out using the Jaccard similarity index for different data sets:

А – results of morphological determination; Б – identification results according to the BOLD database; В – exact variants of amplicon sequences (VAS). Ellipses represent the 95 % probability of finding points within their boundaries. For clarity, each graph is divided into 4 panels corresponding to different biotopes

Дальнейший дискриминантный анализ полученных осей NMDS для всех биотопов в совокупности выявил статистически значимую ($p < 0,01$) первую дискриминантную функцию (88,6 % объясненной дисперсии), разделяющую разные варианты эксперимента при использовании морфологического метода идентификации. При использовании ВПА первая дискриминантная функция имела значимость на уровне гипотезы ($p < 0,1$, 99,1 % дисперсии). Для идентифицированных последовательностей в системе

BOLD первая дискриминантная функция была незначима ($p = 0,22$, 94,2 % дисперсии). Для всех трех подходов вторые дискриминантные функции были статистически незначимы (рис. 9).

Несмотря на различающиеся результаты дискриминантного анализа, дискриминантные функции, объясняющие наибольшую долю дисперсии, коррелировали друг с другом с высоким уровнем значимости (рис. 10).

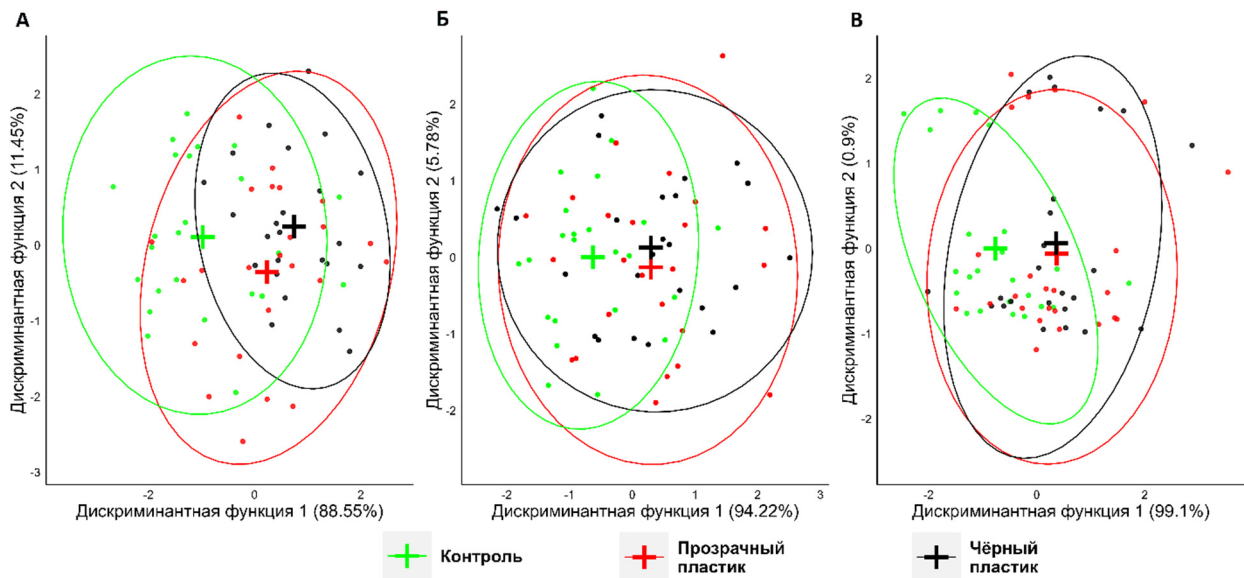


Рис. 9. Результаты дискриминантного анализа, все площадки объединены:

А – результаты морфологического определения; Б – идентифицированные последовательности по базе данных BOLD; В – точные варианты последовательностей ампликонов. Цветом отмечены разные варианты эксперимента, а символами отображены положения их центроидов. Эллипсы отображают 95 % вероятность нахождения точек. Вторая дискриминантная функция была статистически не значима и представлена только в целях визуализации. Первая дискриминантная функция была статистически значима ($p < 0,05$) только при использовании морфологического определения (А)

Fig. 9. Results of discriminant analysis, all sites combined:

А – results of morphological determination; Б – sequences identified according to the BOLD database; В – exact variants of amplicon sequences. Different experimental options are marked in color, and the positions of their centroids are shown in symbols. Ellipses represent the 95 % probability of finding points. The second discriminant function was not statistically significant and is presented for visualization purposes only. The first discriminant function was statistically significant ($p < 0,05$) only when using the morphological definition (А)

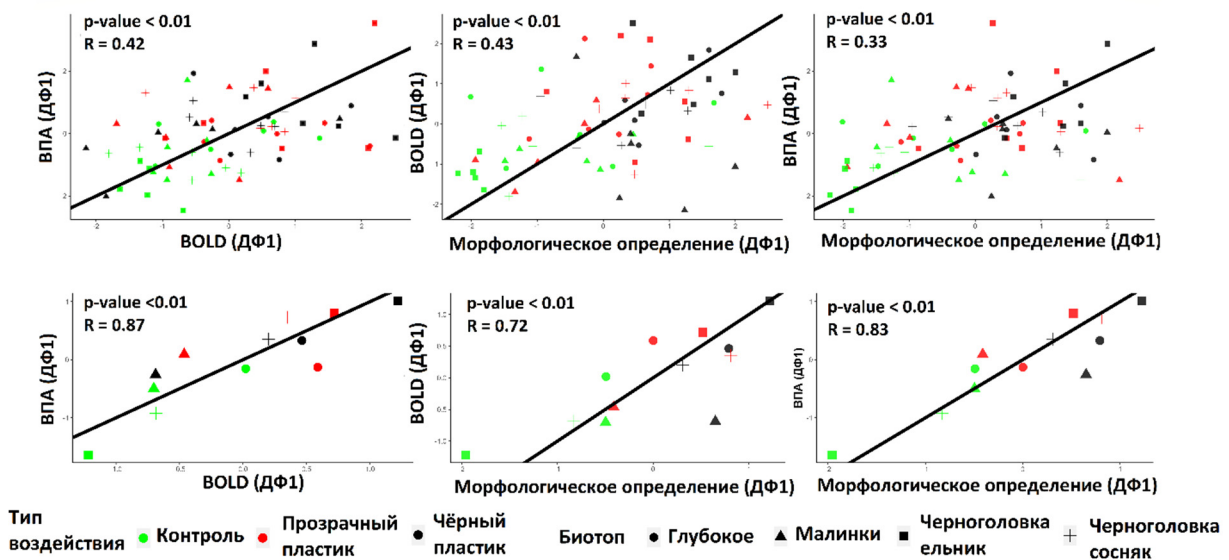


Рис. 10. Корреляция Спирмена между дискриминантными функциями, объясняющими наибольшую долю дисперсии при использовании каждого из трех подходов (см. текст). Верхний ряд – корреляции рассчитаны для всей выборки данных. Нижний ряд – корреляции построены на средних значениях для каждого экспериментального варианта в каждом исследуемом биотопе. Форма символов обозначает тип биотопа, цвет – тип воздействия

Fig. 10. Spearman correlation between discriminant functions, explaining the largest share of variance using each of the three approaches (see text). Top row – correlations were calculated for the entire data sample. Bottom row – correlations based on average values for each experimental variant in each biotope under study. The shape of the symbols indicates the type of biotope, the color indicates the type of impact

Влияние пластика на численность почвенных беспозвоночных животных

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа подтвердили статистически значимое влияние фактора биотоп (d.f. = 3) на общую численность мезофауны ($p < 0,01$) и макрофауны ($p = 0,05$). Численность мезофауны была в среднем ниже в почве под фрагментами пластика, чем в контроле ($p = 0,03$), хотя эта закономерность была по-разному выражена в разных биотопах (взаимодействие пластик \times биотоп: $p = 0,07$). Среди отдельных таксонов мезофауны наблюдалось статистически значимое снижение под пластиком численности хищных клещей Mesostigmata в сосняке ($\chi^2 = 7,96$; $p < 0,05$) и ельнике

($\chi^2 = 11,40$; $p < 0,01$), а также коллембол в тех же биотопах ($\chi^2 = 11,67$, $p < 0,01$ и $\chi^2 = 10,75$; $p < 0,01$ в сосняке и ельнике соответственно) (рис. 6).

Влияние пластика на представителей макрофауны было гораздо менее выражено. Общая численность почвенной макрофауны не различалась в разных вариантах эксперимента ($p = 0,75$). Однако обилие некоторых таксонов значительно изменилось при экранировании поверхности почвы пластиковой пленкой (рис. 11). На биостанции Малинки численность мокриц (Oniscidea) была максимальна под прозрачным пластиком ($\chi^2 = 6,53$, $p < 0,05$); мокрицы встречались только под прозрачной пленкой в сосняке на биостанции Черноголовка (рис. 11).

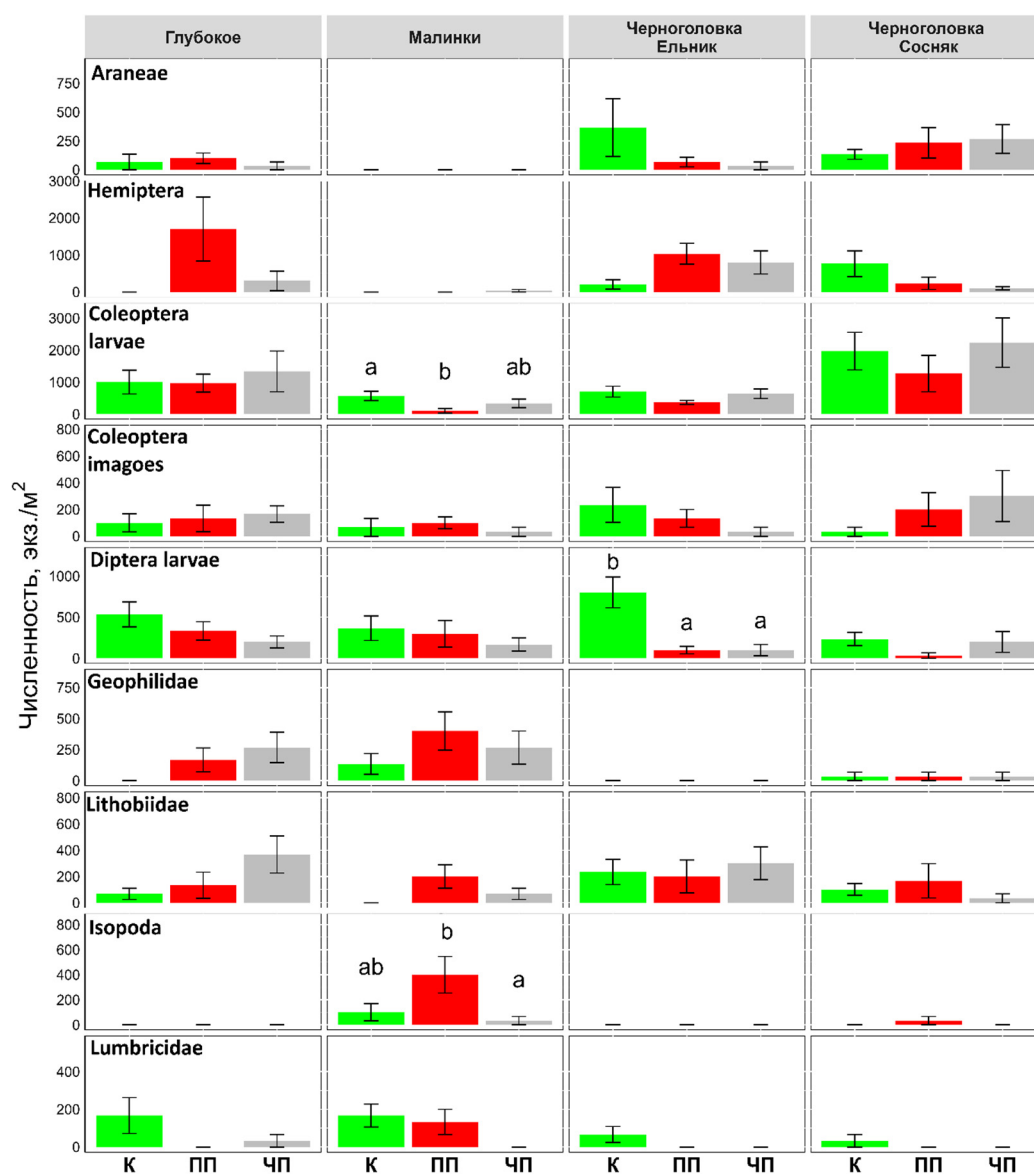


Рис. 11. Численность основных таксономических групп почвенной макрофауны (среднее \pm SE) в разных вариантах эксперимента (К – контроль, ПП – прозрачный пластик, ЧП – черный пластик). Разные буквы указывают на статистически значимые различия в пределах биотопа (тест Краскела – Уоллиса и парное сравнение Данна с поправкой на множественные сравнения Бенъямини – Хохберга)

Fig. 11. Number of main taxonomic groups of soil macrofauna (average \pm SE) in different versions of the experiment (К – control, ПП – transparent plastic, ЧП – black plastic). Different letters indicate statistically significant differences within the biotope (Kruskal test – Wallis and Dunn pairwise comparisons corrected for Benjamin–Hochberg multiple comparisons)

Геофилы на биостанции Глубокое озеро и косянки на биостанции Малинки не были встречены в контрольной почве. Полужесткокрылые, представленные ювенильными особями, в ельнике (Черноголовка) имели существенно более высокую численность под прозрачным пластиком (1033 ± 281 экз./м²), чем в контрольной почве (200 ± 127 экз./м²) ($\chi^2 = 5,97$; $p = 0,05$) и не встречались в контрольных пробах на Глубоком озере. Только две группы беспозвоночных в некоторых биотопах снижали свою численность под пластиковой пленкой. Обилие личинок двукрылых насекомых было выше в контроле (800 ± 186 экз./м²) по сравнению с прозрачным (100 ± 45 экз./м²) и черным (100 ± 68 экз./м²) пластиком в ельнике на биостанции Черноголовка ($\chi^2 = 10,10$; $p < 0,01$), схожая тенденция наблюдалась в других биотопах. Личинки жуков снижали численность под листьями пластиковой пленки с 567 ± 141 экз./м² в контроле до 100 ± 68 экз./м² под прозрачным пластиком в Малинках; схожая тенденция наблюдалась в Черноголовке.

Обсуждение результатов

Сравнение результатов метабаркодинга и морфологической идентификации

Результаты оценки таксономического состава беспозвоночных, полученные разными методами, значительно различались. Доля общих таксонов, идентифицированных обоими методами, уменьшалась со снижением таксономического уровня. Это может быть связано с ошибками ПЦР и секвенирования [47, 48], неполнотой существующих баз данных [22, 49] и с разной генетической изменчивостью животных на низком таксономическом уровне [50]. Например, в работе [51] в искусственно созданной смеси животных из-за низкой межвидовой изменчивости было идентифицировано только два из трех видов рода *Daphnia* и один из двух видов рода *Artemia*.

Снижение доли идентифицированных двумя методами таксонов со снижением таксономического ранга описывалось ранее [52, 53]. Это явление наблюдается даже при использовании разных методик таксономической идентификации полученных последовательностей [54]. В большинстве исследований, в которых устанавливался таксономический состав всей почвенной фауны методом метабаркодинга, анализ результатов проводился на уровне семейств или более крупных таксономических единиц [22, 34, 53, 55].

Наибольшее число семейств, идентифицированных как метабаркодингом (7 семейств), так и обоими методами (6 семейств) было обнаружено

у двукрылых (рис. 7). Помимо наличия самих личиночных стадий представителей этого отряда, высокое число семейств, идентифицированных метабаркодингом, может быть связано с наличием в почве щетинок или иных фрагментов, которые попали в почву с поверхности от имаго насекомых [22, 56]. С этим также может быть связано наличие двух семейств *Lepidoptera* в результатах метабаркодинга.

В нашей работе морфологический метод определения выявил существенно большее разнообразие беспозвоночных животных по сравнению с метабаркодингом. Этот результат противоречит многим исследованиям, в которых сравнивались молекулярные и традиционные подходы в оценке разнообразия животных [57–59]. Однако в некоторых работах отмечалась меньшая эффективность метабаркодинга по сравнению с традиционными методами [21, 52].

Использованная нами процедура метабаркодинга показала низкую способность выявлять разнообразие оribатид и гамазовых клещей. Это не согласуется с ранее проведенной работой [34], в которой примененная нами методика показала удовлетворительные результаты. Следует также отметить полное отсутствие дождевых червей (*Lumbricidae*) в результатах метабаркодинга. При отработке методики используемая нами праймерная система была опробована на ряде индивидуальных животных, среди которых был и один вид *Lumbricidae*. При амплификации ДНК, выделенной из одной особи, были получены ампликоны, которые после секвенирования были успешно идентифицированы до уровня вида (BOLD: *Aporrectodea caliginosa*, 98,15 %). Кроме того, использованная нами праймерная система в других работах успешно идентифицировала дождевых червей при метабаркодинге [21, 60]. Поэтому мы можем исключить отсутствие отжига праймеров на участке гена COI *Lumbricidae*. При подготовке библиотеки мы использовали реактивы, аналогичные тем, которые использовались в оригинальной методике [34]. Тем не менее из-за отсутствия видимого продукта на электрофорезе нам пришлось увеличивать температуру отжига праймеров и количество циклов как первичной, так и индексной ПЦР. Повышение температуры отжига могло повлиять на селективность отжига праймеров к тем или иным таксонам [61]. Получение отличающихся результатов при обработке образцов из одного местообитания одинаковыми реактивами, но в разных лабораториях, отмечалось и ранее [62].

Идентификация таксонов при морфологическом методе определения во многом зависит от наличия специалистов по соответствующим

группам животных. Например, определение энхитреид проводится в живом состоянии [63], поэтому их не удалось определить по морфологическим признакам до рода или вида. Метабаркодинг выявил 10 видов из 4 родов энхитреид при всех типах воздействия (рис. 7). Многоножки *Paurogoda* и *Symphyla* не были определены ниже уровня класса, *Protura*, *Thysanoptera*, *Psocodea*, *Trombidiformes* не были идентифицированы ниже уровня отряда. Некоторые из этих групп были идентифицированы метабаркодингом до более низких таксономических уровней. Это также внесло вклад в различия результатов определения двумя методами.

Для идентификации нуклеотидных последовательностей нами была выбрана база данных BOLD [38], поскольку она является специализированной базой данных метабаркодинга. Однако она содержит меньшее количество аннотированных последовательностей по сравнению, например, с базой данных NCBI GenBank [64]. При идентификации нашего набора данных по GenBank был обнаружен ряд невыявленных ранее таксонов. В частности, увеличилось количество семейств коллембол и клещей, хотя число идентифицированных таксонов насекомых мало отличалось от результатов идентификации по базе BOLD.

В двух пробах нами были идентифицированы представители бактерий из родов *Wolbachia* и *Rickettsia*. Эти организмы являются типичными эндосимбионтами беспозвоночных [65, 66] и могут влиять на генетическую структуру их популяций [67]. Ранее сообщалось об идентификации этих бактерий в данных метабаркодинга [68, 69]. Нами не были идентифицированы другие распространенные паразиты беспозвоночных (*Aricomplexa*, *Nematoda*). Тем не менее метабаркодинг обладает потенциалом для выявления паразитарной нагрузки на сообщества почвенных беспозвоночных [70, 71]. Модификация методик и пополнение баз данных позволит оценить не только таксономический состав животных, но и разнообразие их паразитов, что может быть важной характеристикой состояния сообществ почвенных животных.

Изменение численности почвенных беспозвоночных

Нами было отмечено изменение численности мезофауны в почве под пластиковой пленкой по сравнению с контролем, но общая численность макрофауны не изменялась при экспериментальном воздействии. Сравнимых работ, трактующих влияние пластикового загрязнения на сообщества педобионтов в лесных почвах,

обнаружить не удалось. Исследования влияния пластиковой мульчи на беспозвоночных животных в агроценозах фокусировались преимущественно на сельскохозяйственных вредителях, например клещах, трипсах [72, 73] или нематодах [74, 75]. Только в одной публикации было отмечено снижение численности большинства групп почвенных беспозвоночных под пластиковой мульчей по сравнению с органической при выращивании клубники [11]. Изменения в сообществе беспозвоночных авторы связывают с меньшим количеством пищевых ресурсов и изменением влажности почвы под пластиковой пленкой. Несколько работ показали снижение численности некоторых герпетобионтных жу-желец [14, 15], учитываемых с помощью ловушек Барбера, в почве под пластиковой пленкой по сравнению с почвой, мульчированной органическими материалами. Отмечалось уменьшение обилия дождевых червей под черной пластиковой пленкой [13].

Пластиковая пленка, подобно доскам [76] или камням [77], может создавать укрытия, привлекающие некоторых представителей почвенной фауны. Стабилизация влажности почвы и меньшая интенсивность света могли создавать благоприятные условия для беспозвоночных. Мы обнаружили увеличение под пленкой обилия мокриц, ювенильных особей полужесткокрылых и хищных многоножек. Последнее согласуется с данными о повышении численности хищников под камнями [77–79].

В двух биотопах на биостанции Черноголовка отмечено снижение под пленкой численности отдельных таксонов мезофауны, имеющих высокую численность и тонкие хитиновые покровы (*Collembola* и *Mesostigmata*). Снижение численности коллембол под пластиковой пленкой наблюдалось и в агроценозе [11]. Это явление можно связать с несколькими факторами. Из-за перехвата опада пластиковой пленкой под ней может создаваться дефицит пищевых субстратов; кроме того, отсутствие опада упрощает пространственную структуру верхнего слоя почвы, уменьшая объем, в котором могут обитать почвенные беспозвоночные [80, 81]. Отмеченное нами снижение влажности верхнего слоя почвы также могло приводить к снижению численности животных [79].

Таким образом, после девяти месяцев под листами пластиковой пленки произошли изменения численности ряда распространенных таксонов почвенных беспозвоночных. Мы не знаем точных причин этих изменений, однако они, вероятно, определялись локальными изменениями среды обитания, вызванными разрывом непосредственной связи между наземным и почвенным

ярусам: прекращением поступления растительного опада и осадков в почву, замедлением роста травяного покрова и испарения почвенной влаги.

Выявление влияния пластика на таксономическую структуру почвенных беспозвоночных разными методами

Из трех подходов, использованных для анализа влияния пластика на таксономическую структуру почвенных беспозвоночных, только морфологический метод показал значимые различия между почвой, покрытой пластиком, и контрольной почвой. Данные метабаркодинга показали влияние пластика только при использовании ВПА. Анализ с использованием морфологического метода определения и идентифицированных последовательностей по базе данных BOLD проводился на уровне семейств, тогда как использование информации о составе точных ВПА подразумевает как межвидовые, так и внутривидовые различия организмов [82, 83]. Таким образом, высокое таксономическое разрешение ВПА компенсировало низкую эффективность метабаркодинга и показало наличие различий между группировками животных в почве под пластиковой пленкой и на контрольных площадках, хотя и с очень низким уровнем значимости. Ранее было показано, что метабаркодинг не всегда бывает достаточно чувствителен, чтобы отразить небольшие изменения в таксономическом составе почвенных животных [60].

Поскольку данные метабаркодинга и морфологического определения получены при извлечении животных из двух разных половин одной пробы, мы не можем точно соотносить встречаемость таксонов, оцененную двумя методами. Тем не менее можно утверждать, что, например, Parasitidae (одно из наиболее часто встречающихся семейств Mesostigmata) имели намного большую встречаемость в пробах, чем показала молекулярно-генетическая идентификация. По данным морфологического метода, численность, и, как следствие, биомасса Mesostigmata (а следовательно, и количество их ДНК)

в пробах под пластиком была значительно ниже по сравнению со многими другими таксонами, что могло обуславливать меньшую концентрацию ДНК в итоговой библиотеке. Известно, что эффективность молекулярно-генетической идентификации таксонов определяется соотношением количества вносимой ткани в смеси животных [33, 51, 84]. Способность метабаркодинга выявлять таксоны в пробах в зависимости от их численности может быть потенциальным индикатором обилия беспозвоночных в разных экологических условиях [58]. Отсутствие подобных закономерностей в случае ногохвосток может быть связано с тем, что метабаркодинг в целом показал слабую способность к идентификации коллембол, несмотря на их высокую численность. Встречаемость Curculionidae и Staphylinidae в разных вариантах эксперимента была сходным образом оценена двумя методами и эти группы в целом хорошо идентифицировались метабаркодингом. Это могло быть связано с большей селективностью праймеров к данным таксонам, хотя ранее это не было отмечено [21, 34].

По результатам дискриминантного анализа можно заключить, что наилучшим подходом для разделения типов воздействия оказался морфологический метод определения. Однако, учитывая сильное перекрытие эллипсов в пространстве дискриминантных функций, даже с его помощью нами не было показано существенного изменения состава сообществ почвенных беспозвоночных после девяти месяцев экспонирования пластиковой пленки. Возможно, время экспозиции пластика было недостаточным, чтобы привести к сильным изменениям таксономического состава сообществ почвенных беспозвоночных. Тем не менее наличие корреляции дискриминантных функций обоих подходов метабаркодинга со статистически значимой дискриминантной функцией морфологического метода говорит о потенциальной возможности метабаркодинга выявлять изменения таксономического состава сообществ почвенных беспозвоночных.

Список литературы

1. Li P., Wang X., Su M. [et al.]. Characteristics of Plastic Pollution in the Environment: A Review: 4 // Bull Environ Contam Toxicol. 2021. Vol. 107, № 4. P. 577–584.
2. Леонов В. Д., Тиунов А. В. Взаимодействие беспозвоночных и синтетических полимеров в почве (обзор) // Экология. 2020. № 6. С. 403–416.
3. Bucci K., Tulio M., Rochman C. M. What is known and unknown about the effects of plastic pollution: A meta-analysis and systematic review // Ecological Applications. 2020. Vol. 30, № 2. P. e02044.
4. Alam O., Billah M., Yajie D. Characteristics of plastic bags and their potential environmental hazards // Resources, Conservation and Recycling. 2018. Vol. 132. P. 121–129.

5. Tudor V., Marin A., Vasca-Zamfir D. [et al.]. The Influence of the Plastic Bags on the Environment // *Materiale Plastice*. 2018. Vol. 55. P. 595–599.
6. Lenz M., Creffield J., Evans T. A. [et al.]. Resistance of polyamide and polyethylene cable sheathings to termites in Australia, Thailand, USA, Malaysia and Japan: A comparison of four field assessment methods // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2012. Vol. 66. P. 53–62.
7. Lenz M. M., Kard B., Creffield J. [et al.]. Ability of Field Populations of *Coptotermes* spp., *Reticulitermes flavipes*, and *Mastotermes darwiniensis* (Isoptera: Rhinotermitidae; Mastotermitidae) to Damage Plastic Cable Sheathings // *Journal of economic entomology*. 2013. Vol. 106. P. 1395–1403.
8. Zhang L., Sintim H., Bary A. [et al.]. Interaction of *Lumbricus terrestris* with macroscopic polyethylene and biodegradable plastic mulch // *Science of The Total Environment*. 2018. Vol. 635. P. 1600–1608.
9. Jabran K. *Role of Mulching in Pest Management and Agricultural Sustainability*. NY : Springer, 2019. 62 p.
10. Zhang H., Miles C., Gerdeman B. [et al.]. Plastic mulch use in perennial fruit cropping systems – A review // *Scientia Horticulturae*. 2021. Vol. 281. P. 109975.
11. Schirmel J., Albert J., Kurtz M.P., Muñoz K. Plasticulture changes soil invertebrate assemblages of strawberry fields and decreases diversity and soil microbial activity // *Applied Soil Ecology*. 2018. Vol. 124. P. 379–393.
12. Quintanilla M., Wang K. H., Tavares J., Hooks C. Effects of mulching on above and below ground pests and beneficials in a green onion agroecosystem // *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2016. Vol. 224. P. 75–85.
13. Schonbeck M., Evanylo G. Effects of Mulches on Soil Properties and Tomato Production II. Plant-Available Nitrogen, Organic Matter Input, and Tilt-Related Properties // *Journal of Sustainable Agriculture – J SUSTAINABLE AGR*. 1998. Vol. 13. P. 83–100.
14. Miñarro M., Dapena E. Effects of groundcover management on ground beetles (Coleoptera: Carabidae) in an apple orchard // *Applied Soil Ecology*. 2003. Vol. 23. P. 111–117.
15. Tuovinen T., Kikas A., Tolonen T., Kivijärvi P. Organic mulches vs. black plastic in organic strawberry: does it make a difference for ground beetles (Col., Carabidae)? // *Journal of Applied Entomology*. 2006. Vol. 130, № 9–10. P. 495–503.
16. Pfungstl T., Krisper G. No difference in the juveniles of two *Tectocephus* species (Acari: Oribatida, Tectocephidae) // *Acarologia*. 2011. Vol. 51. P. 199–218.
17. Orgiazzi A., Dunbar M., Panagos P. [et al.]. Soil biodiversity and DNA barcodes: Opportunities and challenges // *Soil Biology and Biochemistry*. 2014. Vol. 80. P. 244–250.
18. Barsoum N., Bruce K., Forster J. [et al.]. The devil is in the detail: Metabarcoding of arthropods provides a sensitive measure of biodiversity response to forest stand composition compared with surrogate measures of biodiversity // *Ecological Indicators*. 2019. Vol. 101. P. 313–323.
19. Comtet T., Sandionigi A., Viard F., Casiraghi M. DNA (meta)barcoding of biological invasions: a powerful tool to elucidate invasion processes and help managing aliens // *Biol Invasions*. 2015. Vol. 17, № 3. P. 905–922.
20. de Sousa L. L., Silva S. M., Xavier R. DNA metabarcoding in diet studies: Unveiling ecological aspects in aquatic and terrestrial ecosystems // *Environmental DNA*. 2019. Vol. 1, № 3. P. 199–214.
21. 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. P. 675–686.
22. Oliverio A., Gan H., Wickings K., Fierer N. A DNA metabarcoding approach to characterize soil arthropod communities // *Soil Biology and Biochemistry*. 2018. Vol. 125. P. 37–43.
23. Young M., Behan-Pelletier V., Hebert P. Revealing the Hyperdiverse Mite Fauna of Subarctic Canada through DNA Barcoding // *PloS one*. 2012. Vol. 7. P. e48755.
24. 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. Vol. 19. P. 1516–1530.
25. Folmer O., Black M., Wr H. [et al.]. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular marine biology and biotechnology*. 1994. Vol. 3. P. 294–299.
26. Andújar C., Arribas P., Yu D. [et al.]. Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the Metazoa // *Molecular ecology*. 2018. Vol. 27. P. 3968–3975.
27. 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 БГУ*. 2012. Т. 7. Ч. 1–2. С. 22–42.
28. Porter T. M., Hajibabaei M. Over 2.5 million COI sequences in GenBank and growing // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, № 9. P. e0200177.
29. Rosenberger M., Maraun M., Scheu S., Schaefer I. Pre- and post-glacial diversifications shape genetic complexity of soil-living microarthropod species: 2 // *Pedobiologia*. 2013. Vol. 56, № 2. P. 79–87.
30. Schäffer S., Kerschbaumer M., Koblmüller S. Multiple new species: Cryptic diversity in the widespread mite species *Cymbaeremaeus cymba* (Oribatida, Cymbaeremaeidae) // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2019. Vol. 135. P. 185–192.
31. Clare E. L., Chain F. J. J., Littlefair J. E., Cristescu M. E. The effects of parameter choice on defining molecular operational taxonomic units and resulting ecological analyses of metabarcoding data: 11 // *Genome*. 2016. Vol. 59, № 11. P. 981–990.

32. Callahan B., Mcmurdie P., Holmes S. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis // *The ISME Journal*. 2017. Vol. 11. P. 2639–2643.
33. Elbrecht V., Peinert B., Leese F. Sorting things out: Assessing effects of unequal specimen biomass on DNA metabarcoding // *Ecology and Evolution*. 2017. Vol. 7. P. 6918–6926.
34. 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. Vol. 159. P. 108288.
35. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads // *EMBnet j.* 2011. Vol. 17, № 1. P. 10.
36. Team R. C. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012. 2021.
37. Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J. [et al.]. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nat Methods*. 2016. Vol. 13, № 7. P. 581–583.
38. Ratnasingham S., Hebert P. D. N. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System // *PLoS ONE* / ed. Fontaneto D. 2013. Vol. 8, № 7. P. e66213.
39. Wickham H., Chang W., Henry L. [et al.]. ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. 2023.
40. Tiunov A., Scheu S. Microfungal communities in soil, litter and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae): A laboratory experiment // *Applied Soil Ecology*. 2000. Vol. 14. P. 17–26.
41. Lamb P., Hunter E., Pinnegar J. [et al.]. How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach // *Molecular Ecology*. 2018. Vol. 28. P. 420–430.
42. Oksanen J., Blanchet F. G., Kindt R. [et al.]. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-2. 2012.
43. Ripley B., Venables B., Bates D. M. MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS. 2022.
44. Friendly M., Fox J. candisc: Visualizing Generalized Canonical Discriminant and Canonical Correlation Analysis. 2021.
45. Fox J., Weisberg S., Price B. [et al.]. R-Core. car: Companion to Applied Regression. 2022.
46. Ogle D., Doll J., Wheeler P. FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods. 2022.
47. Alberdi A., Aizpurua O., Gilbert M. T. P., Bohmann K. Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples // *Methods in Ecology and Evolution*. 2018. Vol. 9, № 1. P. 134–147.
48. Krehenwinkel H., Wolf M., Lim J. Y. [et al.]. Estimating and mitigating amplification bias in qualitative and quantitative arthropod metabarcoding: 1 // *Sci Rep. Nature Publishing Group*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 17668.
49. Kjørandsen J. Current State of DNA Barcoding of Sciaroidea (Diptera)-Highlighting the Need to Build the Reference Library: 2 // *Insects*. 2022. Vol. 13, № 2. P. 147.
50. Collins G. E., Hogg I. D., Convey P. [et al.]. Genetic diversity of soil invertebrates corroborates timing estimates for past collapses of the West Antarctic Ice Sheet // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. Vol. 117, № 36. P. 22293–22302.
51. Brown E. A., Chain F. J. J., Crease T. J. [et al.]. Divergence thresholds and divergent biodiversity estimates: can metabarcoding reliably describe zooplankton communities? // *Ecology and Evolution*. 2015. Vol. 5, № 11. P. 2234–2251.
52. Tang C. Q., Leasi F., Obertegger U. [et al.]. The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. Vol. 109, № 40. P. 16208–16212.
53. Young M. R., Hebert P. D. N. Unearthing soil arthropod diversity through DNA metabarcoding // *PeerJ*. 2022. Vol. 10. P. e12845.
54. Hleap J. S., Littlefair J. E., Steinke D. [et al.]. Assessment of current taxonomic assignment strategies for metabarcoding eukaryotes // *Molecular Ecology Resources*. 2021. Vol. 21, № 7. P. 2190–2203.
55. Dopheide A., Tooman L. K., Grosser S. [et al.]. Estimating the biodiversity of terrestrial invertebrates on a forested island using DNA barcodes and metabarcoding data: 4 // *Ecological Applications*. 2019. Vol. 29, № 4. P. e01877.
56. 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. Vol. 25, № 24. P. 6214–6224.
57. Serrana J. M., Miyake Y., Gamboa M., Watanabe K. Comparison of DNA metabarcoding and morphological identification for stream macroinvertebrate biodiversity assessment and monitoring // *Ecological Indicators*. 2019. Vol. 101. P. 963–972.
58. 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): 1 // *Sci Rep*. 2022. Vol. 12, № 1. P. 10762.
59. Elbrecht V., Vamos E. E., Meissner K. [et al.]. Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring // *Methods in Ecology and Evolution*. 2017. Vol. 8, № 10. P. 1265–1275.
60. Hermans S. M., Lear G., Buckley T. R., Buckley H. L. Environmental DNA sampling detects between-habitat variation in soil arthropod communities, but is a poor indicator of fine-scale spatial and seasonal variation // *Ecological Indicators*. 2022. Vol. 140. P. 109040.

61. Ishii K., Fukui M. Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR: 8 // *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. Vol. 67, № 8. P. 3753–3755.
62. Zaiko A., Greenfiel, P., Abbott C. [et al.]. Towards reproducible metabarcoding data: Lessons from an international cross-laboratory experiment: 2 // *Molecular Ecology Resources*. 2022. Vol. 22, № 2. P. 519–538.
63. Schmelz R. M., Collado R. A guide to European terrestrial and freshwater species of Enchytraeidae (Oligochaeta): 1 // *SOIL ORGANISMS*. 2010. Vol. 82, № 1. P. 1–176.
64. Sayers E. W., Bolton E. E., Brister J. R. [et al.]. Database resources of the national center for biotechnology information // *Nucleic Acids Res*. 2022. Vol. 50, № D1. P. D20–D26.
65. Landmann F. The Wolbachia Endosymbionts // *Microbiology Spectrum*. 2019. Vol. 7, № 2. P. 7.2.25.
66. Perlman S. J., Hunter M. S., Zchori-Fein E. The emerging diversity of Rickettsia // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006. Vol. 273, № 1598. P. 2097–2106.
67. Arif S., Gerth M., Hone-Millard W. G. [et al.]. Evidence for multiple colonisations and Wolbachia infections shaping the genetic structure of the widespread butterfly *Polyommatus icarus* in the British Isles // *Molecular Ecology*. 2021. Vol. 30, № 20. P. 5196–5213.
68. Blanckenhorn W. U., Rohner P. T., Bernasconi M. V. [et al.]. Is qualitative and quantitative metabarcoding of dung fauna biodiversity feasible? // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2016. Vol. 35, № 8. P. 1970–1977.
69. Krueger T., Cross A. T., Hübner J. [et al.]. A novel approach for reliable qualitative and quantitative prey spectra identification of carnivorous plants combining DNA metabarcoding and macro photography: 1 // *Sci Rep*. 2022. Vol. 12, № 1. P. 4778.
70. Schulz G., Schneider D., Brinkmann N. [et al.]. Changes in Trophic Groups of Protists With Conversion of Rain-forest Into Rubber and Oil Palm Plantations // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10.
71. Singer D., Duckert C., Heděnc P. [et al.]. High-throughput sequencing of litter and moss eDNA reveals a positive correlation between the diversity of Apicomplexa and their invertebrate hosts across alpine habitats // *Soil Biology and Biochemistry*. 2020. Vol. 147. P. 107837.
72. Kivijärvi P., Parikka P., Tuovinen T. The effect of different mulches on yield, fruit quality and strawberry mite in organically grown strawberry // *Organic production of fruit and berries*. 2002. P. 6.
73. Razzak M. Effect of plastic mulch on the abundance of Thrips palmi Karny (Thysanoptera: Thripidae) and yield of Jalapeno pepper in south Florida. 2018. Vol. 130. P. 124–128.
74. Ogwulumba S. I., Ugwuoke K. I. The effect of coloured plastic mulches on the control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica* Treub) infections on some tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivars // *International Journal of Plant Pathology*. 2011. Vol. 2, № 1. P. 26–34.
75. Oka Y., Shapira N., Fine P. Control of root-knot nematodes in organic farming systems by organic amendments and soil solarization: 10 // *Crop Protection*. 2007. Vol. 26, № 10. P. 1556–1565.
76. Billaud O., Vermeersch R.-L., Porcher E. Citizen science involving farmers as a means to document temporal trends in farmland biodiversity and relate them to agricultural practices // *Journal of Applied Ecology*. 2021. Vol. 58, № 2. P. 261–273.
77. Goldsbrough C. L., Hochuli D. F., Shine R. Invertebrate biodiversity under hot rocks: habitat use by the fauna of sandstone outcrops in the Sydney region: 1 // *Biological Conservation*. 2003. Vol. 109, № 1. P. 85–93.
78. Ferreira R., Soares S. Biodiversity under rocks in disturbed habitats: the role of microhabitats in landscape heterogeneity and community maintenance // *Zoociências*. 2009. Vol. 11. P. 129–136.
79. Ferreira R., Souza-Silva M. Biodiversity under rocks: The role of microhabitats in structuring invertebrate communities in Brazilian outcrops // *Biodiversity and Conservation*. 2001. Vol. 10. P. 1171–1183.
80. Fujii S., Berg M. P., Cornelissen J. H. C. Living Litter: Dynamic Trait Spectra Predict Fauna Composition // *Trends in Ecology & Evolution*. 2020. Vol. 35, № 10. P. 886–896.
81. Sayer E. Using experimental manipulation to assess the roles of leaf litter in the functioning of forest ecosystems // *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2006. Vol. 81. P. 1–31.
82. Martin G. K., Beisner B. E., Chain F. J. J. [et al.]. Freshwater zooplankton metapopulations and metacommunities respond differently to environmental and spatial variation // *Ecology*. 2021. Vol. 102, № 1. P. e03224.
83. Noguerales V., Meramveliotakis E., Castro-Insua A. [et al.]. Community metabarcoding reveals the relative role of environmental filtering and spatial processes in metacommunity dynamics of soil microarthropods across a mosaic of montane forests // *Molecular Ecology*. 2021. P. 1–17.
84. Braukmann T., Ivanov, N., Prosser S. [et al.]. Metabarcoding a Diverse Arthropod Mock Community // *Molecular Ecology Resources*. 2019. Vol. 19. P. 711–727.

References

1. Li P., Wang X., Su M. et al. Characteristics of Plastic Pollution in the Environment: A Review: 4. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2021;107(4):577–584.
2. Leonov V.D., Tiunov A.V. Interactions between invertebrates and synthetic polymers in soil (review). *Ekologiya = Ecology*. 2020;(6):403–416. (In Russ.)
3. Bucci K., Tulio M., Rochman C.M. What is known and unknown about the effects of plastic pollution: A meta-analysis and systematic review. *Ecological Applications*. 2020;30(2):e02044.

4. Alam O., Billah M., Yajie D. Characteristics of plastic bags and their potential environmental hazards. *Resources, Conservation and Recycling*. 2018;132:121–129.
5. Tudor V., Marin A., Vasca-Zamfir D. et al. The Influence of the Plastic Bags on the Environment. *Materiale Plastice*. 2018;55:595–599.
6. Lenz M., Creffield J., Evans T.A. et al. Resistance of polyamide and polyethylene cable sheathings to termites in Australia, Thailand, USA, Malaysia and Japan: A comparison of four field assessment methods. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2012;66:53–62.
7. Lenz M.M., Kard B., Creffield J. et al. Ability of Field Populations of *Coptotermes* spp., *Reticulitermes flavipes*, and *Mastotermes darwiniensis* (Isoptera: Rhinotermitidae; Mastotermitidae) to Damage Plastic Cable Sheathings. *Journal of economic entomology*. 2013;106:1395–1403.
8. Zhang L., Sintim H., Bary A. et al. Interaction of *Lumbricus terrestris* with macroscopic polyethylene and biodegradable plastic mulch. *Science of The Total Environment*. 2018;635:1600–1608.
9. Jabran K. *Role of Mulching in Pest Management and Agricultural Sustainability*. New York: Springer, 2019:62.
10. Zhang H., Miles C., Gerdeman B. et al. Plastic mulch use in perennial fruit cropping systems – A review. *Scientia Horticulturae*. 2021;281:109975.
11. Schirmel J., Albert J., Kurtz M.P., Muñoz K. Plasticulture changes soil invertebrate assemblages of strawberry fields and decreases diversity and soil microbial activity. *Applied Soil Ecology*. 2018;124:379–393.
12. Quintanilla M., Wang K.H., Tavares J., Hooks C. Effects of mulching on above and below ground pests and beneficials in a green onion agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2016;224:75–85.
13. Schonbeck M., Evanylo G. Effects of Mulches on Soil Properties and Tomato Production II. Plant-Available Nitrogen, Organic Matter Input, and Tilth-Related Properties. *Journal of Sustainable Agriculture – J SUSTAINABLE AGR*. 1998;13:83–100.
14. Miñarro M., Dapena E. Effects of groundcover management on ground beetles (Coleoptera: Carabidae) in an apple orchard. *Applied Soil Ecology*. 2003;23:111–117.
15. Tuovinen T., Kikas A., Tolonen T., Kivijärvi P. Organic mulches vs. black plastic in organic strawberry: does it make a difference for ground beetles (Col., Carabidae)? *Journal of Applied Entomology*. 2006;130(9–10):495–503.
16. Pflingstl T., Krisper G. No difference in the juveniles of two *Tectocepheus* species (Acari: Oribatida, Tectocepheidae). *Acarologia*. 2011;51:199–218.
17. Orgiazzi A., Dunbar M., Panagos P. et al. Soil biodiversity and DNA barcodes: Opportunities and challenges. *Soil Biology and Biochemistry*. 2014;80:244–250.
18. Barsoum N., Bruce K., Forster J. et al. The devil is in the detail: Metabarcoding of arthropods provides a sensitive measure of biodiversity response to forest stand composition compared with surrogate measures of biodiversity. *Ecological Indicators*. 2019;101:313–323.
19. Comtet T., Sandionigi A., Viard F., Casiraghi M. DNA (meta)barcoding of biological invasions: a powerful tool to elucidate invasion processes and help managing aliens. *Biol Invasions*. 2015;17(3):905–922.
20. de Sousa L.L., Silva S.M., Xavier R. DNA metabarcoding in diet studies: Unveiling ecological aspects in aquatic and terrestrial ecosystems. *Environmental DNA*. 2019;1(3):199–214.
21. 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*. 2019:675–686.
22. Oliverio A., Gan H., Wickings K., Fierer N. A DNA metabarcoding approach to characterize soil arthropod communities. *Soil Biology and Biochemistry*. 2018;125:37–43.
23. Young M., Behan-Pelletier V., Hebert P. Revealing the Hyperdiverse Mite Fauna of Subarctic Canada through DNA Barcoding. *PloS one*. 2012;7:e48755.
24. 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;19:1516–1530.
25. Folmer O., Black M., Wr H. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*. 1994;3:294–299.
26. Andújar C., Arribas P., Yu D. et al. Why the COI barcode should be the community DNA metabarcode for the Metazoa. *Molecular ecology*. 2018;27:3968–3975.
27. Voronova N.V., Buga S.V., Kurchenko V.P. Sequence of the gene subunit I of cytochrome oxidase C in the molecular taxonomy of animals: principles, results and problems of use. *Trudy BGU = Proceedings of BSU*. 2012;7(part 1–2):22–42. (In Russ.)
28. Porter T.M., Hajibabaei M. Over 2.5 million COI sequences in GenBank and growing. *PLoS One*. 2018;13(9):e0200177.
29. Rosenberger M., Maraun M., Scheu S., Schaefer I. Pre- and post-glacial diversifications shape genetic complexity of soil-living microarthropod species: 2. *Pedobiologia*. 2013;56(2):79–87.
30. Schäffer S., Kerschbaumer M., Koblmüller S. Multiple new species: Cryptic diversity in the widespread mite species *Cymbaeremaeus cymba* (Oribatida, Cymbaeremaeidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2019;135:185–192.
31. Clare E.L., Chain F.J.J., Littlefair J.E., Cristescu M.E. The effects of parameter choice on defining molecular operational taxonomic units and resulting ecological analyses of metabarcoding data: 11. *Genome*. 2016;59(11):981–990.

32. Callahan B., McMurdie P., Holmes S. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*. 2017;11:2639–2643.
33. Elbrecht V., Peinert B., Leese F. Sorting things out: Assessing effects of unequal specimen biomass on DNA metabarcoding. *Ecology and Evolution*. 2017;7:6918–6926.
34. 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;159:108288.
35. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet j.* 2011;17(1):10.
36. Team R.C. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012;2021.
37. Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*. 2016;13(7):581–583.
38. Ratnasingham S., Hebert P.D.N. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e66213.
39. Wickham H., Chang W., Henry L. et al. *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics*. 2023.
40. Tiunov A., Scheu S. Microfungal communities in soil, litter and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae): A laboratory experiment. *Applied Soil Ecology*. 2000;14:17–26.
41. Lamb P., Hunter E., Pinnegar J. et al. How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. *Molecular Ecology*. 2018;28:420–430.
42. Oksanen J., Blanchet F.G., Kindt R. et al. *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-2. 2012.
43. Ripley B., Venables B., Bates D.M. *MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS*. 2022.
44. Friendly M., Fox J. *candisc: Visualizing Generalized Canonical Discriminant and Canonical Correlation Analysis*. 2021.
45. Fox J., Weisberg S., Price B. et al. *R-Core. car: Companion to Applied Regression*. 2022.
46. Ogle D., Doll J., Wheeler P. *FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods*. 2022.
47. Alberdi A., Aizpurua O., Gilbert M.T.P., Bohmann K. Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution*. 2018;9(1):134–147.
48. Krehenwinkel H., Wolf M., Lim J.Y. et al. Estimating and mitigating amplification bias in qualitative and quantitative arthropod metabarcoding: 1. *Sci Rep. Nature Publishing Group*. 2017;7(1):17668.
49. Kjærandsen J. Current State of DNA Barcoding of Sciaroidea (Diptera)-Highlighting the Need to Build the Reference Library: 2. *Insects*. 2022;13(2):147.
50. Collins G.E., Hogg I.D., Convey P. et al. Genetic diversity of soil invertebrates corroborates timing estimates for past collapses of the West Antarctic Ice Sheet. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(36):22293–22302.
51. Brown E.A., Chain F.J.J., Crease T.J. et al. Divergence thresholds and divergent biodiversity estimates: can metabarcoding reliably describe zooplankton communities? *Ecology and Evolution*. 2015;5(11):2234–2251.
52. Tang C.Q., Leasi F., Obertegger U. et al. The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(40):16208–16212.
53. Young M.R., Hebert P.D.N. Unearthing soil arthropod diversity through DNA metabarcoding. *PeerJ*. 2022;10:e12845.
54. Hleap J.S., Littlefair J.E., Steinke D. et al. Assessment of current taxonomic assignment strategies for metabarcoding eukaryotes. *Molecular Ecology Resources*. 2021;21(7):2190–2203.
55. Dopheide A., Tooman L.K., Grosser S. et al. Estimating the biodiversity of terrestrial invertebrates on a forested island using DNA barcodes and metabarcoding data: 4. *Ecological Applications*. 2019;29(4):e01877.
56. 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;25(24):6214–6224.
57. Serrana J.M., Miyake Y., Gamboa M., Watanabe K. Comparison of DNA metabarcoding and morphological identification for stream macroinvertebrate biodiversity assessment and monitoring. *Ecological Indicators*. 2019;101:963–972.
58. 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): 1. *Sci Rep*. 2022;12(1):10762.
59. Elbrecht V., Vamos E.E., Meissner K. et al. Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods in Ecology and Evolution*. 2017;8(10):1265–1275.
60. Hermans S.M., Lear G., Buckley T.R., Buckley H.L. Environmental DNA sampling detects between-habitat variation in soil arthropod communities, but is a poor indicator of fine-scale spatial and seasonal variation. *Ecological Indicators*. 2022;140:109040.
61. Ishii K., Fukui M. Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR: 8. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001;67(8):3753–3755.
62. Zaiko A., Greenfiel P., Abbott C. et al. Towards reproducible metabarcoding data: Lessons from an international cross-laboratory experiment: 2. *Molecular Ecology Resources*. 2022;22(2):519–538.

63. Schmelz R.M., Collado R. A guide to European terrestrial and freshwater species of Enchytraeidae (Oligochaeta): 1. *SOIL ORGANISMS*. 2010;82(1):1–176.
64. Sayers E.W., Bolton E.E., Brister J.R. et al. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D20–D26.
65. Landmann F. The Wolbachia Endosymbionts. *Microbiology Spectrum*. 2019;7(2):7.2.25.
66. Perlman S.J., Hunter M.S., Zchori-Fein E. The emerging diversity of Rickettsia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006;273(1598):2097–2106.
67. Arif S., Gerth M., Hone-Millard W. G. et al. Evidence for multiple colonisations and Wolbachia infections shaping the genetic structure of the widespread butterfly *Polyommatus icarus* in the British Isles. *Molecular Ecology*. 2021;30(20):5196–5213.
68. Blanckenhorn W.U., Rohner P.T., Bernasconi M.V. et al. Is qualitative and quantitative metabarcoding of dung fauna biodiversity feasible? *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2016;35(8):1970–1977.
69. Krueger T., Cross A. T., Hübner J. et al. A novel approach for reliable qualitative and quantitative prey spectra identification of carnivorous plants combining DNA metabarcoding and macro photography: 1. *Sci Rep*. 2022;12(1):4778.
70. Schulz G., Schneider D., Brinkmann N. et al. Changes in Trophic Groups of Protists With Conversion of Rainforest Into Rubber and Oil Palm Plantations. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10.
71. Singer D., Duckert C., Heděnc P. et al. High-throughput sequencing of litter and moss eDNA reveals a positive correlation between the diversity of Apicomplexa and their invertebrate hosts across alpine habitats. *Soil Biology and Biochemistry*. 2020;147:107837.
72. Kivijärvi P., Parikka P., Tuovinen T. The effect of different mulches on yield, fruit quality and strawberry mite in organically grown strawberry. *Organic production of fruit and berries*. 2002:6.
73. Razzak M. *Effect of plastic mulch on the abundance of Thrips palmi Karny (Thysanoptera: Thripidae) and yield of Jalapeno pepper in south Florida*. 2018;130:124–128.
74. Ogwulumba S.I., Ugwuoke K.I. The effect of coloured plastic mulches on the control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica* Treub) infections on some tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivars. *International Journal of Plant Pathology*. 2011;2(1):26–34.
75. Oka Y., Shapira N., Fine P. Control of root-knot nematodes in organic farming systems by organic amendments and soil solarization: 10. *Crop Protection*. 2007;26(10):1556–1565.
76. Billaud O., Vermeersch R.-L., Porcher E. Citizen science involving farmers as a means to document temporal trends in farmland biodiversity and relate them to agricultural practices. *Journal of Applied Ecology*. 2021;58(2):261–273.
77. Goldsbrough C.L., Hochuli D.F., Shine R. Invertebrate biodiversity under hot rocks: habitat use by the fauna of sandstone outcrops in the Sydney region: 1. *Biological Conservation*. 2003;109(1):85–93.
78. Ferreira R., Soares S. Biodiversity under rocks in disturbed habitats: the role of microhabitats in landscape heterogeneity and community maintenance. *Zoociências*. 2009;11:129–136.
79. Ferreira R., Souza-Silva M. Biodiversity under rocks: The role of microhabitats in structuring invertebrate communities in Brazilian outcrops. *Biodiversity and Conservation*. 2001;10:1171–1183.
80. Fujii S., Berg M.P., Cornelissen J.H.C. Living Litter: Dynamic Trait Spectra Predict Fauna Composition. *Trends in Ecology & Evolution*. 2020;35(10):886–896.
81. Sayer E. Using experimental manipulation to assess the roles of leaf litter in the functioning of forest ecosystems. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 2006;81:1–31.
82. Martin G.K., Beisner B.E., Chain F.J.J. et al. Freshwater zooplankton metapopulations and metacommunities respond differently to environmental and spatial variation. *Ecology*. 2021;102(1):e03224.
83. Nogueras V., Meramveliotakis E., Castro-Insua A. et al. Community metabarcoding reveals the relative role of environmental filtering and spatial processes in metacommunity dynamics of soil microarthropods across a mosaic of montane forests. *Molecular Ecology*. 2021:1–17.
84. Braukmann T., Ivanov, N., Prosser S. et al. Metabarcoding a Diverse Arthropod Mock Community. *Molecular Ecology Resources*. 2019;19:711–727.