

УДК 631.467.25 DOI 10.21685/2500-0578-2022-2-5

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СООБЩЕСТВ ПОЧВЕННЫХ НЕМАТОД

А. А. Кудрин¹, А. А. Сущук²¹ Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Россия, 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 28² Институт биологии Карельского научного центра Российской академии наук, Россия, 185910, Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11¹ kudrin@ib.komisc.ru, ² anna_sushchuk@mail.ru

Аннотация. Обзор посвящен описанию общепринятых и наиболее часто используемых в современных экологических работах методов исследования почвенных нематод. Рассматриваются методы отбора проб, экстракции, фиксации, изготовления микропрепаратов для морфологической идентификации, методы фиксации нематод для нужд изотопного анализа и молекулярно-биологических работ. Кратко представлена проблема проведения метабаркодинга сообществ нематод. Наряду с методиками пробоподготовки рассматриваются основы экологической классификации нематод и подходы к анализу данных о составе и численности их сообществ. Приводятся описание и принципы расчета эколого-популяционных индексов сообществ нематод, позволяющих получить представление о степени нарушенности местообитаний, состоянии почвенной пищевой сети и преобладающих путях разложения органики. Разобраны некоторые проблемы и ограничения использования таких индексов.

Ключевые слова: метод Бермана, флотация, стабильные изотопы, метабаркодинг, с-р шкала, индекс зрелости (MI), индекс обогащения (EI), индекс структурирования (SI), индекс преобладающих путей разложения органики (CI)

Благодарности: авторы выражают благодарность А. В. Тиуну за ценные советы и замечания при подготовке рукописи.

Финансирование: работа выполнена в рамках госбюджетной темы НИР Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН № 12204060025-2 и Института биологии ФИЦ КарНЦ РАН № 122032100130-3, при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00606.

Для цитирования: Кудрин А. А., Сущук А. А. Методы исследования сообществ почвенных нематод // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2022. Vol. 7 (2). <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2022-2-5>

METHODS FOR STUDYING SOIL NEMATODE COMMUNITIES

A. A. Kudrin¹, A. A. Sushchuk²¹ Institute of Biology of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 28 Kommunisticheskaya street, Syktyvkar, 167982, Russia² Institute of Biology of the Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, 11 Pushkinskaya street, Petrozavodsk, 185910, Russia¹ kudrin@ib.komisc.ru, ² anna_sushchuk@mail.ru

Abstract. The review contains the generally accepted and most frequently used methods for studying soil nematodes communities in recent ecological studies. The methods of sampling, extraction, fixation, microslide mounting for morphological identification, methods of fixation of nematodes for the needs of isotopic analysis and molecular biological work are considered. The problems of metabarcoding of nematode communities are briefly discussed. Along with sample preparation methods, the ecological classification of nematodes and approaches to the analysis of data on the composition and abundance of their communities are considered. A description and principles for calculating the ecological indices of nematode communities are given, which allow us to get information about the degree of habitat disturbance, the state of the soil food web, and the predominant pathways of organic matter decomposition. Some problems and limitations of using such indices are considered.

Keywords: Baermann funnel method, flotation, stable isotopes, metabarcoding, c-p scale, Maturity index (MI), Enrichment index (EI), Structure index (SI), Channel index (CI)

Acknowledgments: the authors are grateful to A. V. Tiunov for valuable advice and comments during the preparation of the manuscript.

Financing: the work was carried out within the framework of the state budget research project of the Institute of Biology of the Federal Research Center of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences No. 122040600025-2 and the Institute of Biology of the Federal Research Center of the Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences No. 122032100130-3, with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of the scientific project No. 20-04-00606.

For citation: Kudrin A.A., Sushchuk A.A. Methods for studying soil nematode communities. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*. 2022;7(2). (In Russ.). Available from: <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2022-2-5>

Введение

Нематоды являются важнейшим компонентом почвенного сообщества и самыми многочисленными животными на Земле [1, 2]. Они играют ключевую роль в переработке органического вещества и контроле над популяциями почвенных микроорганизмов [3–5], регуляции динамики углерода и питательных веществ [6], процессах формирования почвенного плодородия [7, 8].

Велико значение нематод как фитогельминтов. Идентифицировано более 4000 видов нематод, паразитирующих на растениях. В совокупности они ежегодно уничтожают около 14 % мирового урожая растениеводства [9, 10]. Фитогельминты переносят вирусы, усугубляют грибные и бактериальные болезни, нарушают процессы поглощения корнями воды и питательных веществ, приводя к снижению продуктивности, массовой гибели растений в засуху и гниению продовольственных запасов [11, 12].

Нематоды обладают огромным потенциалом как объекты биоиндикации. Благодаря большому разнообразию, высокой численности, трофической и экологической гетерогенности, широкому распространению, легкости отбора почвенных проб, они являются прекрасным индикатором воздействия человека и естественных процессов на экосистемы [13, 14]. Разработан ряд специальных индексов, позволяющих эффективно оценивать степень нарушения среды обитания и давать представление о состоянии почвенной экосистемы на основе анализа сообществ нематод [15, 16].

Для получения информации о составе, структуре и численности нематод в почве разработано большое количество методов выделения нематод из почвы, их фиксации, изготовления временных и постоянных препаратов [17]. Существуют и специализированные подходы к анализу данных о структуре сообществ нематод. Настоящий обзор не претендует на охват

всех существующих методов и в основном обобщает базовые подходы к исследованию сообществ свободноживущих почвенных нематод, а также рассматривает анализ полученных данных.

Отбор проб

Инструменты

Для отбора почвенных проб в нематологических исследованиях используют пробоотборники различных конструкций. Они могут быть разного сечения (круглый/квадратный), диаметра (1,5–10 см) и длины. Простейший отборник представляет собой обрезок металлической трубы нужного диаметра, заточенный с одной стороны. Однако коммерчески выпускаемые пробоотборники, выполненные из качественных и безопасных материалов, существенно удобнее в работе. В связи с тем, что представители семейств *Trichodoridae* и *Longidoridae* длиннее (3–10 мм), чем большинство нематод, для их учета рекомендуют использовать пробоотборники диаметром не менее 3 см [18]. Во избежание перекрестной контаминации необходимо следить за чистотой пробоотборника. Для снижения степени нарушения почвенной пробы и упрощения процесса отбора необходимо регулярно обновлять его заточку.

Глубина отбора проб

Отбор проб в естественных биотопах обычно проводят на глубину 10–15 см [2]. Однако глубина отбора может значительно варьировать в зависимости от задач и района исследования. Поэтому перед проведением работ следует проанализировать литературу со схожими задачами и типом местообитания. В бореальных лесах в верхнем органогенном горизонте (~ 3–5 см) сосредоточено 90–98 % всего обилия нематод [19, 20], в таких экосистемах обосновано про-

водить отбор на глубину органогенного горизонта [21]. На лугах и в агросистемах в верхнем 10-см слое сосредоточено только 30 % обилия, а в верхних 30 см уже около 80 % [22, 23]. Поэтому в таких экосистемах отбор проб обычно проводится на глубину 30 см [24, 25]. При изучении вертикального распределения нематод глубина отбора может достигать 150 см [23, 26]. При необходимости отбор проб проводят послойно, либо с учетом строения почвенного профиля [19], либо на фиксированных глубинах [23, 26].

Период отбора проб

Периоды пиковой численности нематод могут довольно сильно варьировать [27]. Так, при исследовании лесов в Финляндии и Канаде наибольшая численность была отмечена в зимние месяцы [28, 29]. В лесах Польши пики численности были обнаружены весной и осенью [30]. На плантациях канадской пихты Дугласа наибольшая численность нематод была обнаружена весной и в начале лета [31]. Основными факторами, регулирующими сезонную динамику, считают температуру и количество осадков [27, 29]. Таким образом, численность нематод может различаться в зависимости от погодных условий соответствующего года и региона исследования.

В связи с этим можно дать только общие рекомендации по выбору периода отбора проб. Отбор следует проводить при положительных температурах почвы и воздуха. В условиях умеренного климата лучше всего придерживаться вегетационного периода. Не отбирать пробы после продолжительных засух или ливневых дождей. При проведении исследований в значительном широтном градиенте для синхронизации отбора в разных районах можно использовать «растительный маркер» – время цветения растения, встречающегося во всех районах исследования.

Схема отбора проб

Нематоды в почве распределены неравномерно и образуют пятна высокой и низкой плотности [32]. Факторы, ответственные за такую неоднородность, весьма разнообразны: тип почвы, растительность, содержание органического вещества и т.д. [33]. Существенная неоднородность распределения нематод определяет необходимость обдуманного выбора схемы отбора проб [34]. Широко распространен упорядоченный отбор по линии, зигзагом, звездой и т.д. [17]. В фаунистических исследованиях

для выявления максимального разнообразия мы рекомендуем отбирать пробы в широком спектре микроместообитаний исследуемого участка, учитывая рельеф, растительность, ручьи и водотоки, скальные выходы, крупные древесные остатки и т.д. В экологических исследованиях, в идеале, следует проводить рекогносцировочные сборы для выяснения размеров автокорреляции и расчета минимально необходимого расстояния между пробами [35]. Возможно проводить отбор проб случайным или стратифицированным произвольным образом (случайный отбор из условных квадратов, на которые разбивается исследуемый участок) [36].

Количество проб

Количество проб сильно зависит от задач и дизайна исследования. В большинстве случаев отбирается от 5 до 30 почвенных проб для определения численности и разнообразия комплекса нематод исследуемого биотопа (участка). Стоит отметить, что количество отобранных и анализируемых проб может отличаться. Так называемый подход смешанной пробы заключается в отборе нескольких почвенных образцов, которые затем объединяются (перемешиваются) и анализируются уже как одна проба [37]. Данный подход может быть использован для фаунистических исследований или для поиска в почве определенных целевых таксонов (например, фитопаразитических нематод). Возможно его использование и в случае проведения полевых экспериментов, когда каждая площадка (экспериментальная единица) соответствует определенной манипуляции и отбор нескольких проб с площадки и последующее объединение позволяют оценить усредненную реакцию, исключив эффект неоднородности [21]. Однако в большинстве экологических исследований данный подход не может быть рекомендован, так как теряется информация о неоднородности распределения нематод и вызывающих ее факторах. При проведении многофакторных экспериментов со сложным дизайном количество проб на экспериментальную единицу может быть небольшим ($n = 3-5$). Для детальной фаунистической характеристики биотопа потребуется уже более значительное количество проб. При построении дизайна экологического исследования и расчета необходимого количества проб следует избегать взятия большого числа близкорасположенных проб на одном участке. Для получения более репрезентативной картины следует,

по мере возможности, подбирать несколько участков одного типа, расположенных на расстоянии друг от друга. Иными словами, более правильным будет отобрать по 10 проб на трех участках, чем 30 на одном.

Следует отметить, что правильное планирование экологического исследования является важнейшим этапом его реализации. В этом контексте рекомендации по схеме отбора и количеству проб для оценки сообщества нематод не будут отличаться от общих правил. Существует ряд статей и пособий, где рассматриваются принципы и правила планирования экологических исследований, которые помогут получить убедительные результаты и повысят шанс публикации работы в престижном журнале [38, 39].

Масса, площадь или объем пробы

Измерение почвенной пробы для дальнейшего пересчета численности нематод – необходимый этап отбора проб. Исторически было принято измерять площадь почвенного образца и пересчитывать численность нематод в экз./м² [40], однако в различных исследованиях глубина отбора может быть неодинакова и дальнейшее сравнение таких данных затруднено. В настоящее время в отношении нематод пересчет на единицу площади практически не используется. В исследованиях, связанных с фитогельминтами, обычно применяется пересчет на объем пробы [41], в других случаях стандартным можно признать пересчет численности нематод на массу сухой почвы [2].

Транспортировка и хранение

Для упаковки и хранения проб удобно использовать полиэтиленовые пакеты с замком (грипперы, ziplock bag), что позволяет предотвратить их высыхание. При транспортировке необходимо исключить сдавливание почвы, а также ее перегрев. В связи с этим хорошим вариантом для транспортировки проб можно считать термоконтейнеры (термосумки). В лабораторных условиях до начала экстракции почвенные пробы следует хранить в холодильнике при температуре 3–4 °С. После отбора проб нематоды должны быть выделены в максимально сжатые сроки, иначе численность и структура комплекса нематод могут сильно измениться [42]. Во время массового отбора проб зачастую не удается в короткие сроки осуществить экстракцию нематод из почвы. В таких случаях период хранения проб в холодильнике, по нашему мнению, может быть увеличен максимум до двух недель.

Экстракция нематод

Идеальный метод экстракции позволил бы извлечь всех нематод на всех стадиях развития при низких затратах (время, оборудование, вода) [43]. К сожалению, ни один из существующих методов не соответствует этому идеалу. Большинство методов экстракции базируются на трех основных принципах [17, 44]:

а) масса и скорость осаждения. В воде нематоды отделяются от частиц субстрата, которые оседают быстрее и могут быть удалены. Этот принцип лежит в основе ряда применений, таких как использование восходящего потока воды, удерживающего нематод на плаву, в то время как другие частицы оседают (элютриатор Остенбринка), и применение жидкости с более высоким удельным весом, чем нематоды, что также удерживает их на плаву, в то время как другие частицы с более высокой удельной массой под действием центрифугирования опускаются на дно емкости (флотация);

б) размер и форма. Учитывая размер и удлиненную форму, нематоды могут быть отделены от почвенных частиц с помощью набора сит с различным размером ячеек (декантация и просеивание);

в) мобильность. Активнодвигающиеся нематоды способны проникать в мельчайшие поры. Это свойство позволяет им проходить через пористый фильтр, удерживающий почвенные частицы [45]. При сильном увлажнении субстрата нематоды отделяются от частиц почвы, оседают на фильтр, через который проникают благодаря активному движению, и могут быть собраны в виде прозрачной суспензии (модифицированный метод Бермана).

На эффективность экстракции может влиять тип почвы. Из глинистых и богатых органикой почв эффективность выделения ниже, по сравнению с песчаными почвами. Глина и органические частицы подобно нематодам всплывают в жидкости и значительным образом загрязняют пробу при использовании декантации и флотации [17].

Несмотря на существование разных методов экстракции, в современных исследованиях используется их ограниченный перечень. Анализ глобального распределения почвенных нематод [46], включивший огромный объем данных (6825 пробы), собранных различными исследователями по всему миру, продемонстрировал, что метод Бермана является наиболее используемым подходом, элютриатор Остенбринка и флотация применяются реже. Другие подходы практически не используются в современных исследованиях (рис. 1).

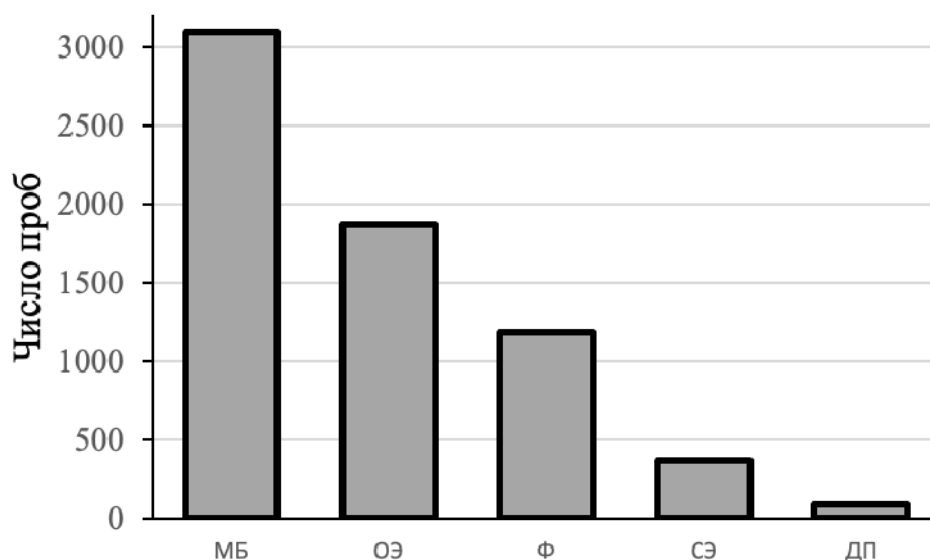


Рис. 1. Число проб, обработанных различными методами экстракции в глобальном обзоре распределения почвенных нематод [46]: МБ – модифицированный метод Бермана; ОЭ – элютриатор Остенбринка; Ф – флотация; СЭ – элютриатор Сайнхорста; ДП – декантация и просеивание

Fig. 1. Number of samples processed by different extraction methods in a global review of soil nematode distribution [46]: МБ – Baermann funnel method; ОЭ – Oostenbrink elutriator; Ф – flotation; СЭ – Seinhorst elutriator; ДП – decanting and sieving

Модифицированный метод Бермана (Baermann funnel method)

Данный метод является наиболее простым, дешевым и универсальным решением для экстракции нематод, позволяющим выделять из почвы и других субстратов их активные формы. Преимуществом метода по сравнению с другими является чистота получаемой суспензии, а также возможность экстракции нематод из широкого спектра субстратов: почва, корни, растительный опад, мертвая и живая древесина и т.д. Из недостатков следует отметить меньшую эффективность экстракции по сравнению с рядом других методов (элютриатор Остенбринка и метод флотации), плохую экстракцию малоподвижных нематод (например, представителей *Criconeematidae*, подвижность которых снижена вследствие массивного тела и дополнительного слоя рыхлой кутикулы). Качество экстракции в этом методе зависит от толщины слоя почвы (чем тоньше слой почвы, тем лучше нематоды выходят из субстрата). Обычно нематод экстрагируют из навески свежей почвы массой 25–100 г, однако при использовании навесок по 25 г эффективность выделения нематод выше, чем при других массах пробы [47]. В международном стандарте РМ 7/119 (1) Nematode extraction [44] нет четкого критерия выбора фильтра для экстракции.

Рекомендуют использовать ватный фильтр для молока или любой эквивалент (марля, фильтровальная бумага, бумажные салфетки). По нашему опыту, наиболее простой, доступный и эффективный вариант – это один слой трехслойного одноразового носового платочка, который позволяет получить чистую суспензию при эффективной экстракции нематод.

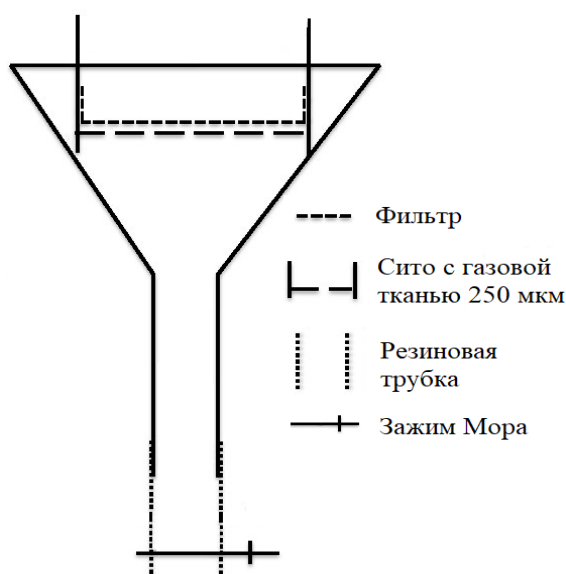
Оборудование:

- стеклянные или пластиковые воронки;
- сита с газовой тканью (размер ячеек 250 мкм для свободного прохождения нематод) диаметром, позволяющим вставить сито в воронку;
- соединительные резиновые или силиконовые трубки;
- зажимы Мора;
- пробирки;
- фильтр;
- стойка для размещения воронок.

Перед экстракцией почвенную пробу аккуратно перемешивают (гомогенизируют), при этом из нее удаляют крупные корни, камни и т.д. Некоторые авторы рекомендуют предварительно просеивать почву через сито с ячейкой 2 мм [47]. Подготавливают сито, где на газовую ткань дополнительно укладывают фильтр и помещают навеску почвы. Следует тщательно проверять фильтр на наличие повреждений, так как это может привести к загрязнению суспензии.

зии нематод почвенными частицами, что значительно усложнит дальнейшую обработку пробы. Толщина слоя почвы на сите не должна превышать 1 см [47]. Воронку соединяют с пробиркой резиновой трубкой и заполняют водой. Возможно применение зажима Мора, который устанавливается на резиновую трубку и снимает необходимость использовать пробирку (рис. 2). В воронку помещают сито с навеской почвы. На этом этапе необходима значительная аккуратность для предотвращения повреждения фильтра и загрязнения суспензии. Вода должна смачивать, но не покрывать почву целиком. Период инкубации составляет 48 часов. По прошествии суток

в воду желательно добавить несколько капель перекиси водорода для насыщения воды кислородом. В процессе экстракции также необходимо компенсировать испарение воды. Через двое суток сито аккуратно извлекают из воронки, пробирку отсоединяют от трубки. Оставшаяся на фильтре почвенная навеска может быть высушена при температуре 105 °С для определения исходной влажности почвы, которая затем будет использована для пересчета численности нематод (см. ниже). В Гентском университете (UGent), Бельгия, подготовили видеоинструкцию по выделению нематод при помощи модифицированного метода Бермана (<https://youtu.be/Fx5bvCy46cc>).



а)



б)

Рис. 2. Схема устройства воронки Бермана для извлечения нематод из почвы (а); деревянный стеллаж для воронок (б)

Fig. 2. Scheme of the Baermann funnel device for extracting nematodes from the soil (a); wooden rack for funnels (b)

Элютриатор Остенбринка (Oostenbrink elutriator)

Этот метод позволяет извлекать нематод из образцов почвы 100–1000 мл. Считается одним из наиболее эффективных методов экстракции нематод [17]. В специальном аппарате нематод сначала отделяют от более тяжелых частиц почвы в восходящем токе воды. Затем их собирают на батарее сит разного размера. Однако полученная таким образом суспензия содержит большое количество почвенных частиц, поэтому далее ее очищают модифицированным методом Бермана или флотацией. Метод характеризуется высокой эффективностью выделения нематод, высокой повторяемостью и

позволяет экстрагировать большие пробы. Используемое оборудование относительно дорого и серийно производится несколькими компаниями (www.mirma.nl, www.meku-pollachne.de). Насколько нам известно, данный метод экстракции нематод не применяется в России. Университет Вагенингена (Wageningen University and Research Centre), Нидерланды, подготовил видеоинструкцию по использованию элютриатора Остенбринка для экстракции нематод (<https://youtu.be/t9WUkfoEvs>).

Элютриатор Сайнхорста (Seinhorst elutriator)

Данный метод был разработан и в основном используется для экстракции цист нематод

из почвы, однако в некоторых случаях его применяют и для экстракции нематод [2]. Метод по принципу выделения схож с элютриатором Остенбринка, однако сам аппарат имеет несколько видоизмененную конструкцию, адаптированную для выделения цист [17].

Метод флотации (Centrifugal flotation)

Метод позволяет извлекать как подвижных, так и неподвижных нематод. Характеризуется высокой эффективностью выделения нематод из почвы [17]. При извлечении нематод используют жидкость определенной плотности (растворы сахарозы, $MgSO_4$ или $ZnSO_4$), которая не позволяет нематодам оседать при центрифугировании, в отличие от почвенных частиц. Данный метод также используют для очистки суспензий нематод, полученных другим путем. Размер пробы ограничивается объемом используемой центрифужной пробирки. Из недостатков следует отметить некоторую избирательность метода, так как часть нематод будет оседать вместе с почвенными частицами. При увеличении плотности раствора число экстрагируемых нематод будет выше, однако при этом увеличится количество почвенных частиц в суспензии и вырастет степень осмотического повреждения нематод [48]. В связи с этим плотность используемого раствора подбирают индивидуально в пределах 1,15–1,22 (табл. 1) [17].

Оборудование:

- центрифуга + центрифужные пробирки;
- каолин;
- раствор сахарозы, $MgSO_4$ или $ZnSO_4$ заданной плотности (1,15–1,22);
- сито с размерами отверстий 40–50 мкм;
- стеклянный стакан 100 мл.

Перед экстракцией почвенную пробу аккуратно перемешивают, удаляют крупные корни,

камни, остатки древесины. Для данного этапа возможно использование крупного сита с отверстиями 3–7 мм. Далее в центрифужные пробирки объемом 1000 мл загружают почвенную пробу объемом 250 мл и добавляют 400 мл воды с одной столовой ложкой каолина (каолин формирует видимый слой между осадком с нематодами и надосадочной жидкостью). В некоторых руководствах каолин не используется [17]. При меньшем размере центрифужных пробирок объем почвы и воды уменьшают пропорционально. Тщательно перемешивают пробу для формирования однородной суспензии (возможно использование вортекса). Далее центрифугируют полученную суспензию примерно 4 минуты при $RCF = 1800 g$. Рекомендованное время и скорость центрифугирования отличаются в разных руководствах, однако на начальных этапах освоения методики желательно придерживаться данных значений. Аккуратно сливают надосадочную жидкость. Повторно разводят осадок, но уже в 400 мл раствора заданной плотности (см. выше). Снова центрифугируют суспензию при 1800 g в течение 4 минут. Надосадочную жидкость сливают на сито с размерами отверстий 40–50 мкм. Ополаскивают сито с находящимися на нем нематодами водой от использованного раствора и смывают нематод в чашку Петри либо в пробирку. Раствор $MgSO_4$ или $ZnSO_4$ возможно использовать повторно. В случае наличия только настольных центрифуг с небольшим объемом пробирок возможно предварительное извлечение нематод из почвы методом декантации и просеивания либо при помощи элютриатора. Существует несколько видеоруководств от различных университетов, которые демонстрируют основные этапы экстракции данным методом (https://youtu.be/x_X08MdV5qk, <https://youtu.be/KfuW27ufEL4>).

Таблица 1

Table 1

Количество вещества из расчета грамм на литр воды, необходимого для приготовления раствора заданной плотности [49]

The amount of substance at the rate of grams per liter of water required for preparing a solution of a given density [49]

Плотность (20 °C)	1,15	1,18	1,22
Сахароза	401	484	588
$MgSO_4$ (безводный)	166	200	245
$MgSO_4 \times 7H_2O$	339	409	503
$ZnSO_4$ (безводный)	156	187	229
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	279	335	410

Метод декантации и просеивания (Decanting and sieving: Cobb's method)

Метод позволяет извлекать как подвижных, так и неподвижных нематод из почвы. Суть метода заключается в промывке почвы и последующей ее декантации, в процессе которой нематод собирают на ситах с разными размерами отверстий [50]. Метод основан на различиях в размере, форме и скорости осаждения между нематодами и частицами почвы. Метод достаточно прост, не требует специального оборудования и обладает хорошей эффективностью экстракции нематод. Не подходит для глинистой и богатой органикой почвы из-за высокого загрязнения конечной суспензии [17]. Однако для очищения суспензии может быть использован метод Бермана.

Оборудование:

- стеклянный стакан объемом 2 л;
- пластиковые чаши объемом 4 л;
- набор почвенных сит с размерами отверстий 500–1000 мкм, 350–375 мкм, 175 мкм, 100 мкм, 45 мкм (возможно использование других наборов сит с сопоставимыми размерами отверстий);
- стеклянный стакан 100 мл.

Почву массой 100–200 г помещают в стакан емкостью 2 л. Добавляют 1 л воды. Все тщательно перемешивают до получения однородной суспензии. Через 15–30 секунд, когда крупные частицы почвы осядут, сливают надосадочную жидкость в пластиковую чашу объемом 4 л. Трижды повторяют данную процедуру. Полученную суспензию (около 3 л) пропускают через сито 500–1000 мкм, постоянно потряхивая его. Частицы почвы, оставшиеся на сите, могут быть выброшены. Далее суспензию пропускают через батарею сит 350–375 мкм, 175 мкм, 100 мкм, 45 мкм, смывая остаток с каждого сита в специальную емкость (стакан 100 мл). Через сито 45 мкм суспензию следует пропустить трехкратно. Оставшуюся воду утилизируют. Смывы переливают во флакон для хранения и фиксации.

Фиксация нематод

Фиксация нематод для морфологической идентификации

Извлеченных из почвы нематод следует умертвить и зафиксировать. Хорошие результаты получаются в случае быстрого умерщвления (нагреванием до 65–90 °C) и немедленной фиксации. В результате теплового шока нематоды принимают характерную форму в зависимости от вида (изогнутая, спираль, прямая). Этапы

умерщвления и фиксации обычно проводят в один шаг. Формалин (4–5 %) наиболее часто используется в качестве фиксатора. Однако с течением времени он может вызывать изменения во внутренних структурах нематод, поэтому его зачастую используют в комбинации с уксусной или пропионовой кислотой для нейтрализации данного эффекта. В российской нематологии с той же целью используют добавление триэтаноламина (см. ниже).

После того как пробирка с суспензией отстоялась несколько часов и все нематоды осели на дно (для этого также можно воспользоваться центрифугой, 3–4 мин при 1800 g), убирают пипеткой надосадочную жидкость, оставляя минимально возможное количество воды. Далее на водяной бане нагревают до появления мелких пузырьков небольшое количество фиксатора (ОСТОРОЖНО: работать под вытяжкой) и добавляют его к нематодам. Следующим шагом необходимо быстро охладить нематод либо добавлением новой порции уже холодного фиксатора, либо охлаждением пробирки в воде.

Наиболее часто используемые фиксаторы:

1. Формалин (4 %):

- формалин (формальдегид 37 %) – 10,8 мл;
- дистиллированная вода – 89,2 мл.

2. Ф.П. (4:1):

- формалин (формальдегид 37 %) – 10,8 мл;
- пропионовая кислота – 1 мл;
- дистиллированная вода – 88,2 мл.

3. Ф.Г. (4:1):

- формалин (формальдегид 37 %) – 8,5 мл;
- глицерин – 2 мл;
- дистиллированная вода – 89,5 мл.

4. Т.А.Ф.:

- формалин (формальдегид 37 %) – 7,6 мл;
- триэтаноламин – 2 мл;
- дистиллированная вода – 90,4 мл.

Фиксация нематод для изотопного анализа

Анализ содержания стабильных изотопов широко используется для исследования структуры почвенных пищевых сетей [51, 52]. Также данный подход применяется для определения трофической позиции почвенных нематод [53, 54]. Широкое использование данного метода в отношении нематод пока сдерживается высокой трудоемкостью отбора животных в необходимых для надежного измерения количествах [53]. Химическая фиксация материала может отражаться на химическом составе тканей животных и таким образом влиять на получаемые результаты [55]. Так, под действием спирта и формалина изотопная подпись нематод по углероду ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) может немного изменяться,

хотя в некоторых работах успешно использовали нематод, зафиксированных 80 % спиртом [56] или даже формалином [57]. Лучшим решением является сортировка нефиксированных особей сразу после их экстракции с последующей сушкой образцов для анализа. Однако высокая трудоемкость работы и обычно большое количество проб приводят к ситуациям, когда необходимо сохранить нематод до сортировки. В таких случаях мы используем заморозку суспензии нематод в воде при температуре -24°C . После разморозки нематоды сохраняют свою целостность и могут быть идентифицированы для нужд изотопного анализа.

Фиксация нематод для молекулярно-генетического анализа

Стандартные схемы фиксации с использованием формалина неприменимы для молекулярно-генетических исследований, в связи с его разрушительным действием на структуру ДНК. Стоит отметить, что шанс выделить ДНК и провести амплификацию из фиксированного формалином материала существует [58], однако это оправдано только в случае работ с коллекционными материалами. Использование заморозки в водной суспензии также не может быть рекомендовано, так как, несмотря на общую целостность тела нематод, их клетки могут повреждаться кристаллами льда и при последующей разморозке молекулы ДНК могут быстро разрушаться ферментами. Идеальным решением, как и в случае с изотопным анализом, является использование для молекулярных работ живых нефиксированных особей. Для сохранения ДНК необходимо инактивировать нуклеазы. В коммерческих наборах для этого используются специальные буферные растворы. Одним из способов сохранения нематод для последующей экстракции ДНК является их заморозка в таком буфере (например, *ATL buffer* в наборе *DNeasy Blood & Tissue Kit*). Предполагается, что после помещения в такой буфер и последующей заморозки при -80°C нематоды могут храниться «вечно». Традиционным методом фиксации образцов для молекулярных исследований является применение этанола (70 %). В случае с нематодами данный метод также применим [59], однако, по мнению некоторых авторов, результат может быть не всегда стабильным [60]. К тому же фиксация этанолом не позволяет проводить морфологическую идентификацию нематод, вследствие вызванных фиксатором изменений внутренних структур и формы. Для сохранения возможности выделить ДНК и провести морфологическую идентификацию из одного и того же образца

применяется фиксатор DESS [61]. Фиксатор представляет собой смесь ЭДТА (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) и ДМСО (диметилсульфоксид), насыщенную хлоридом натрия. Данное решение позволяет сохранить морфологию нематод на сопоставимом с формалином уровне, при этом являясь менее токсичным для человека [60]. По сравнению с этанолом DESS не горюч и может быть использован для перевозки образцов любым способом. DESS не предназначен для длительного хранения образцов, и для получения наилучших результатов амплификации рекомендуется хранить образцы не более двух месяцев [60]. О способе приготовления фиксатора снят обучающий ролик университета Гента (https://youtu.be/ye_1FRIR8bY).

Состав DESS:

- 250 мл 0,5 М ЭДТА $\text{pH} = 8,0$;
- 100 мл ДМСО;
- 150 мл дист. H_2O ;
- 105 г NaCl .

Изготовление микропрепаратов

Перевод в чистый глицерин

Для идентификации нематод необходимо четко различать их внутренние структуры, поэтому перед изготовлением препаратов их переводят в чистый глицерин. Наиболее популярным и дающим хорошие результаты является метод, предложенный Сайнхорстом [62]. Предварительно готовят два раствора:

- раствор 1: 20 мл этанола 96 %, 1 мл глицерина, 79 мл дистиллированной воды;
- раствор 2: 93 мл этанола 96 %, 7 мл глицерина.

Перед проведением нематод в чистый глицерин они должны находиться в фиксаторе не менее двух недель. Нематод отбирают из пробирки с фиксатором и помещают в часовое стекло. По возможности следует максимально удалить фиксатор при помощи шприца или пипетки. Далее добавляют раствор 1 и помещают часовое стекло в эксикатор (или другую стеклянную или пластиковую герметично закрывающуюся емкость), куда на дно добавляют небольшое количество 96 % спирта. Эксикатор помещают в термостат с температурой 40°C . Инкубируют 16–24 часа. Затем приоткрывают эксикатор для испарения воды и спирта и в течение дня, каждые два-три часа, добавляют в часовое стекло раствор 2. Оставшихся в глицерине нематод для полного обезвоживания помещают на несколько часов в другой эксикатор с CaCl_2 или силикагелем. После можно переходить к монтированию нематод в препа-

раты. Технические особенности проведения данной процедуры могут отличаться в зависимости от количества одновременно обрабатываемых проб, наличия необходимого оборудования и расходных материалов. О реализации данной методики в университете Гента можно узнать из видеоинструкции (https://youtu.be/pszNMUZYC_kg).

Монтирование постоянных препаратов

Для массового изготовления препаратов наиболее удобен метод монтирования нематод в глицерин с использованием парафиновых колец. Для этого берут медную трубку диаметром 1,5 см (диаметр трубки должен соответствовать размеру покровного стекла). Трубку нагревают на спиртовке, отпечатывают на блоке парафина и быстро накладывают на чистое стекло, оставляя на нем отпечаток парафина. После охлаждения на стекле образуется кольцо из парафина, внутрь которого помещают каплю глицерина, а в нее выбирают нематод (уже переведенных в чистый глицерин), и все накрывают покровным стеклом. Препарат подогревают на термостойке или спиртовке; после таяния парафина и выхода пузырьков воздуха – охлаждают. Затвердевший парафин образует широкую и крепкую подставку вокруг нематод, не допуская их расплющивания [63, 17]. Однако при длительном хранении (более 3 лет) может наблюдаться отслаивание покровного стекла и медленное испарение глицерина. Видеоинструкция применения метода снята университетом Гента (<https://youtu.be/OeyY6tbTI9I>).

Пересчет численности на единицу массы, площади, объема

В связи с возможной огромной численностью нематод в одной пробе, в экологических исследованиях сообществ нематод для упрощения подсчета и дальнейшей обработки материала используют не весь объем суспензии, а его определенную часть – аликвоту. Она должна быть такого объема, чтобы в ней содержалось не менее 100 особей нематод. Если количество нематод невелико, обрабатывают всю пробу целиком. Полученную суспензию нематод интенсивно перемешивают посредством продувания воздуха пипеткой. Непосредственно после перемешивания (пока нематоды не осели на дно пробирки) отбирают аликвоту (для этого удобно использовать автоматические пипетки с объемом от 25 до 100 мкл) и помещают в часовое стекло с последующим циклом всех манипуляций (перевод нематод в чистый глицерин, изготовление препаратов, идентификация

нематод). В дальнейшем численность нематод пересчитывают на всю пробу.

Метабаркодинг сообществ почвенных нематод

В связи со значительным развитием молекулярно-биологических методов и повышением доступности высокопроизводительного секвенирования растет число исследований сообществ почвенных нематод с применением метабаркодинга [64–67]. Метабаркодинг представляет собой использование определенного маркерного гена для анализа состава природных сообществ в образце субстрата (вода, почва, экскременты и т.д.). После экстракции геномной ДНК используемый участок маркерного гена амплифицируют с помощью пары специфичных праймеров. Полученные таким образом фрагменты ДНК (ампликоны) помечают уникальными для каждого образца метками и секвенируют с использованием высокопроизводительных генетических анализаторов [68]. После получения данных секвенирования проводят биоинформационный анализ, включающий фильтрацию последовательностей ДНК по качеству прочтения, удаление вероятных ошибок и химерных последовательностей с последующей кластеризацией последовательностей на основе их сходства, а также аннотацией полученных кластеров с использованием специализированных баз данных [69]. Мы не будем подробно останавливаться на всех этапах проведения метабаркодинга, а рассмотрим только некоторые, где придется столкнуться с выбором стратегии проведения анализа. Более подробно с этапами проведения метабаркодинга природных сообществ можно познакомиться, например, в работах [70, 73].

Выделение ДНК для метабаркодинга сообществ нематод можно осуществлять из обогащенных или необогащенных проб. Использование необогащенных проб подразумевает экстракцию ДНК непосредственно из почвенного образца [71]. Для обогащения нематод предварительно извлекают из почвы способами, указанными выше, тем самым концентрируя нематод в небольшом объеме суспензии [65]. В обоих случаях после экстракции ДНК проводится амплифицирование маркерных участков. Каждый подход имеет свои преимущества и недостатки. Предварительная экстракция позволяет получать материал в том числе и для морфологического определения нематод, обрабатывать большие объемы почвы, отсеивать нецелевые организмы, упрощая подбор праймеров, извлекать данные о численности нематод, которые будут использованы для интерпретации результатов метабаркодинга.

Главным недостатком такого подхода является неполный учет разнообразия вследствие невозможности полной экстракции нематод существующими способами. Выделение общей ДНК из почвы (такая ДНК, полученная из окружающей среды, в англоязычной литературе обозначается термином *environmental DNA*, *eDNA*) является более продвинутым подходом, однако имеет ряд методических сложностей, которые пока сдерживают его активное применение. Проблемы экстракции и очистки почвенной ДНК, ингибирование амплификации присутствующими в почве гуминовыми веществами осложняет получение пригодной для метабаркодинга матрицы [72, 73]. Сложности вызывает и получение репрезентативного образца для выделения ДНК [74]. Традиционно нематод учитывают в пробах массой от 25 г и больше (см. «Экстракция нематод»), однако наиболее доступные наборы для выделения ДНК из почвы предназначены для образцов массой всего 0,5–1 г. Для решения этой проблемы можно использовать усреднение образца массой 100–200 г [71]. Для этого его подвергают лиофильной сушке, после чего гомогенизируют и отбирают из него аликвоту, необходимую для выделения ДНК. При таком подходе важно тщательно следить за стерильностью гомогенизатора (мельницы), во избежание перекрестной контаминации образцов. Между тем одно из важных преимуществ использования общей почвенной ДНК – ее пригодность для метабаркодинга не только нематод, но и любых других организмов, что может быть удобным при проведении комплексных исследований.

Для экстракции ДНК из обогащенных проб (суспензий нематод) обычно используют наборы для животных тканей, или другие универсальные наборы (например, *Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit* или *MP Biomedicals FastDNA Spin Kit*), или специализированные наборы (*ClearDetections Nematode DNA extraction & purification kit*). Высокий выход ДНК из обогащенных проб с приемлемым качеством позволяет получить набор *DNeasy Blood & Tissue Kit* [75].

Для экстракции ДНК из почвы применяются специализированные наборы (например, *MO BIO PowerSoil DNA Isolation Kit*, *Norgen Biotek Soil DNA Isolation Kit*, *Macherey-Nagel NucleoSpin Soil* и др.). Однако не все они позволяют успешно экстрагировать ДНК нематод из почвы [72]. В успешных работах по метабаркодингу нематод из почвенной ДНК применялся набор *PowerLyzer soil DNA extraction kit* от *Qiagen* [71, 76].

Наиболее важное условие для успешного метабаркодинга – наличие подходящих праймеров, которые должны надежно амплифицировать необходимый маркерный участок таксона-мишени, но не должны связываться с нецелевой ДНК в образце. Поскольку к настоящему времени решены далеко не все проблемы подбора подходящих праймеров, необходимо следить за работами по поиску новых, более эффективных маркеров для метабаркодинга нематод [76–78]. На сегодняшний день наиболее широко используемые праймеры для метабаркодинга – праймеры, комплементарные участкам гена малой субъединицы рибосомальной РНК (18S рРНК) [71, 79–82]. Вариателные области V2, V4 и V9 этого гена были предложены как наиболее подходящие для оценки биоразнообразия [83]. Однако маркерам на основе 18S рРНК может не хватать разрешения для идентификации нематод до уровня вида. Кроме того, специфичность многих праймеров не очень высока [77] и может приводить к амплификации последовательностей ДНК других таксонов (например, тихоходок или кольчатых червей). Также ведется поиск праймеров, нацеленных на гены первой субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы – COI [76, 77] – и большой субъединицы рРНК – 28S [77, 78]. Однако пока ген 18S рРНК остается наиболее широко используемым молекулярным маркером для идентификации нематод в работах с использованием высокопроизводительного секвенирования. Наиболее часто используемые праймеры для метабаркодинга нематод приведены в табл. 2.

Таблица 2

Table 2

Пары праймеров, наиболее часто используемые
для метабаркодинга сообществ почвенных нематод

Primer pairs most commonly used for metabarcoding soil nematode communities

Прямой	Обратный	Ссылка
NF1	18Sr2b	[79]
NemF	18Sr2b	[71]
3NDF	1132mod	[65]

Обогащение проб облегчает подбор праймеров: поскольку подавляющее количество ДНК в пробе принадлежит нематодам, то возможно использовать как специфичные для нематод, так и универсальные праймеры эукариот для гена 18S рРНК [65]. Для ДНК небогатых проб наиболее перспективен набор праймеров NemF – 18Sr2b, амплифицирующих переменные области V6–V8 гена 18S рРНК длиной около 520 п.о. [71, 72]. Протестированный как на искусственных сообществах, так и на почвенных образцах, этот набор показал высокую специфичность (около 70 %) для нематод в почвенной ДНК [76]. Для таксономической аннотации полученных последовательностей в настоящее время наиболее часто используются специализированные, курируемые специалистами базы данных SILVA [84] или PR2 [85]. Также для этой цели может быть использована база данных GenBank [86], однако из-за большого количества неопределенных или неправильно определенных таксонов к полученным результатам стоит относиться с большей осторожностью.

Анализ данных о сообществах нематод; эколого-популяционные индексы

Начиная с 70-х годов прошлого века нематоды стали использоваться в качестве индикаторов состояния окружающей среды в водных экосистемах. Уже в 80-х годах были разработаны подходы к использованию сообществ нематод в качестве индикаторов для экологического мониторинга наземных сообществ [15, 87]. Благодаря ряду особенностей нематоды – весьма удобный объект биоиндикации. Нематоды распространены повсеместно, встречаются во всех естественных и антропогенно измененных биотопах, последними из *Metazoa* покидают места максимального загрязнения. Короткое время генераций и большое разнообразие позволяют населению нематод быстрее, в сравнении с мезо- и макрофауной, реагировать на изменения среды обитания. Наличие разнообразных типов питания, которые относительно легко могут быть идентифицированы на основе строения стомы, позволяет судить о трофической структуре сообществ нематод и относительном обилии их трофических ресурсов. Образцы субстрата могут быть отобраны в почве любого региона, независимо от времени года. Исследование нематод не требует больших по объему образцов почвы и не приводит к значительному нарушению исследуемого биотопа.

Традиционный подход к биоиндикации заключается в поиске видов, которые наиболее чувствительны к определенному нарушению [88]. Однако в случае с нематодами удалось реализовать так называемый *trait* подход, когда для индикации используются группы, объединенные схожими свойствами (экологическими характеристиками). Благодаря такому подходу использование нематод для биоиндикации не зависит от наличия в биотопе индикаторных видов, а полученные в разных регионах и природных зонах результаты сравнимы между собой. Исследования в этом направлении дали возможность разработать ряд специализированных индексов, которые позволяют судить не только о степени нарушенности (или сукцессионной зрелости) биотопа, но и о функциональном состоянии почвы. По сути, разработанные индексы основаны на двух характеристиках (*traits*) нематод – это тип жизненной стратегии и трофическая специализация. Данные индексы весьма активно используются в современных исследованиях и уже стали так же обычны, как, например, расчет индексов биоразнообразия. Две основополагающие работы в этом направлении: *The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition* Тома Бонгерса [15] и *A framework for soil food web diagnostics: Extension of the nematode faunal analysis concept* Говарда Ферриса с соавторами [16] – к 2022 году уже насчитывают более 2 тыс. цитирований, по данным базы Scopus. Несмотря на некоторые ограничения и проблемы использования, разработанные индексы являются мощным инструментом для оценки состояния почвенной экосистемы.

С-р шкала и индекс зрелости

Почвенные нематоды – весьма гетерогенная в экологическом плане группа, для нее характерно наличие как г-, так и К-стратегов. В 1990 году Т. Бонгерсом была предложена с-р шкала (colonizers-persisters scale) и основанный на ней индекс зрелости сообщества нематод, или maturity index (MI). На одном конце такой шкалы расположены типичные г-стратеги, или колонисты, т.е. нематоды, быстро увеличивающие свою численность при благоприятных условиях. Для нематод-колонистов также характерны короткие жизненные циклы, большая способность к колонизации, терпимость к нарушениям среды, эвтрофикации и дефициту кислорода, способность быстро использовать избыток легкодоступных пищевых ресурсов.

На другом полюсе расположены нематоды-персистеры, или типичные К-стратеги, отличающиеся невысокой скоростью размножения, длинными жизненными циклами, низкой способностью к колонизации и высокой чувствительностью к нарушению среды. По пятибалльной с-р шкале типичные колонисты и персистеры получают соответственно 1 и 5 баллов. Другие таксоны, обладающие свойствами обеих групп, в зависимости от преобладания тех или иных характеристик, занимают промежуточные позиции (табл. 3). Изначально распределение нематод по с-р шкале было проведено на уровне семейств, а в дальнейшем – и на уровне родов. Наиболее актуальное распределение таксонов нематод по с-р шкале представлено в информационной системе *Nemaplex* [89].

MI представляет собой полуколичественную оценку состояния экосистемы на основании состава и соотношения таксонов нематод с разным типом жизненной стратегии. При высоком относительном обилии нематод-колонистов в сообществе значения индекса смещаются в сторону единицы и указывают на начальные этапы сукцессии в данном биотопе, а следовательно, высокий уровень нарушения среды. При доминировании персистеров, наоборот, значения индекса отклоняются к пяти, предполагая поздние этапы сукцессии и малую нарушенность биотопа. Мета-анализ [90] показал, что MI реагирует на внесение удобрений и применение пестицидов, чувствителен к типам обработки почвы и землепользования. В различных исследованиях была также показана чувствительность MI к возрасту луговых сообществ [91], загрязнению тяжелыми металлами [92, 93] и химическими соединениями [94].

Например, в зоне действия Алмалыкского горно-металлургического комбината (Узбекистан) индекс зрелости (MI) увеличивался от 2,0 в непосредственной близости от производства до 3,2 на удалении 15 км, предполагая снижение интенсивности нарушающего воздействия, вызванного накоплением тяжелых металлов [95]. На лугах в результате применения удобрений происходило снижение индекса зрелости с 2,5 в контроле до 1,6 при внесении органических и до 2,1 при внесении неорганических удобрений, указывая на увеличение уровня нарушения [96].

Рассчитывается индекс по формуле: $MI = \sum V_i \times f_i$, где V_i – значение по с-р шкале i -го таксона; f_i – доля i -го таксона в сообществе.

В настоящее время разработан ряд модификаций индекса зрелости, пример расчета некоторых из них приведен в табл. 3:

1. MI – рассчитывается с учетом только свободноживущих нематод (имеющих значения от 1 до 5 по с-р шкале), характеризует нарушение среды в целом, служит для мониторинга процессов колонизации и дальнейшей сукцессии после нарушения среды. Низкие значения являются показателем начальных стадий сукцессии, высокие – более поздних стадий или малых нарушений среды [15].

2. $\sum MI$ – учитываются все группы нематод (свободноживущие и паразитические) со значениями от 1 до 5 по с-р шкале, используется для тех же целей и реагирует сходно [97]. В агроценозах с высокой численностью паразитов растений индекс может быть не эффективен, поэтому рекомендован для естественных и мало измененных условий среды [98].

3. RPI – вычисляется с учетом паразитических нематод (со значениями от 2 до 5 по с-р шкале) [97]. В почвах естественных экосистем, бедных питательными элементами, индекс RPI ниже, чем в агроценозах, где для обогащения почв применяются удобрения.

4. RPI/MI – снижение индекса MI и увеличение RPI отмечено с возрастанием доступности питательных ресурсов в почве (например, при внесении минеральных удобрений). Соотношение может быть чувствительным показателем для оценки статуса и мониторинга агроэкосистем [99, 100].

5. MINO (MI_{2-5}) – индекс зрелости для свободноживущих нематод, исключая группу с-р-1 и учитывая только таксоны с с-р значениями от 2 до 5 [13, 98, 101]. Индекс не отражает кратковременные изменения, связанные с увеличением нематод-колонизаторов вследствие внесения удобрений или повышения доступности органических веществ, и предоставляет информацию о долговременных нарушениях среды.

Для правильного расчета различных модификаций индекса долю отдельных таксонов следует рассчитывать относительно нематод, используемых в расчете именно данной модификации, а не всех нематод, обнаруженных в пробе (см. пример расчета в табл. 3).

Таблица 3

Table 3

Пример расчета индексов MI, ΣMI , PPI, MI₂₋₅
для двух сообществ почвенных нематод (проба А и проба Б)

An example of calculating the indices MI, ΣMI , PPI,
MI₂₋₅ for two soil nematode communities (sample A and sample B)

Таксон	Проба А, кол-во особей	Проба Б, кол-во особей	С-р	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
				MI	MI	ΣMI	ΣMI	PPI	PPI	MI ₂₋₅	MI ₂₋₅
				<i>Vf</i>	<i>Vf</i>	<i>Vf</i>	<i>Vf</i>	<i>Vf</i>	<i>Vf</i>	<i>Vf</i>	<i>Vf</i>
<i>Hoplolaimidae</i>	5	15	3			0,1	0,4	1,5	1,5		
<i>Pratylenchidae</i>	5	15	3			0,1	0,4	1,5	1,5		
<i>Aphelenchidae</i>	15	5	2	0,3	0,1	0,3	0,1			0,3	0,3
<i>Cephalobidae</i>	15	2	2	0,3	0,1	0,3	0,0			0,3	0,1
<i>Plectidae</i>	2	15	2	0,0	0,4	0,0	0,3			0,0	1,0
<i>Rhabditidae</i>	2	50	1	0,0	0,6	0,0	0,5				
<i>Dorylaimidae</i>	50	5	4	2,0	0,3	1,8	0,2			2,1	0,7
<i>Discolaimidae</i>	15	2	5	0,8	0,1	0,7	0,1			0,8	0,3
Сумма особей, принятых для расчета индекса	109	109		99	79	109	107			97	29
Значение индекса				3,4	1,6	3,3	2,0	3,0	3,0	3,5	2,4

П р и м е ч а н и е. На первом этапе рассчитывается сумма нематод, удовлетворяющих критерию индекса (для ΣMI – все группы нематод, для MI – все за исключением паразитов растений, для PPI – только паразитические нематоды, для MI₂₋₅ – нематоды со значением от 2 до 5 по с-р шкале). На втором этапе рассчитывается взвешенная по с-р шкале доля таксона (*Vf*). На третьем этапе величины *Vf* суммируются с получением значения индекса.

Трофические группы

Одна из уникальных особенностей нематод заключается в наличии хорошо выраженной трофической специализации отдельных таксонов и возможности довольно точно ее идентифицировать на основе морфологического строения ротового аппарата. В основе используемой сейчас трофической классификации нематод лежит работа Йейтса с соавторами [103], в которой было выделено восемь трофических групп нематод. Однако в настоящее время в большинстве экологических работ классификация сводится к пяти основным группам (табл. 4), в ряде работ – к шести. Наиболее актуальная версия разделения нематод на трофические группы представлена в информационной системе *Nemaplex* [89]:

1. Бактериотрофы, Б (*bacteriovores*, *bacterial feeders*, *Ba*). Эта группа включает нематод, питающихся прокариотическими организмами. Ротовая часть – в виде стомы цилиндрической формы. Специальные образования в стоме (копье, стилет, онхи), характерные для представителей других трофических групп, отсутствуют. Бактериотрофы обычно доминируют в сообществе нематод.

2. Микотрофы, М (*fungivores*, *fungal feeders*, *Fu*). Микотрофы питаются содержимым гиф

грибов, прокалывая их при помощи специального перфорирующего органа (копья или стилета), размер которого обычно меньше, чем у фитотрофов.

3. Всеядные, В, или политрофы, П (*omnivores*, *Om*). В эту группу выделяют хищников-генералистов с широким спектром трофических связей, включающих растения, водоросли, микроартропод и т.д., однако доминирующим является хищный тип питания [53]. Питание осуществляется преимущественно при помощи копы.

4. Хищники, Х (*predators*, *Pr* или *carnivores*, *Ca*). Хищные нематоды питаются простейшими и различными беспозвоночными, такими как энхитреиды, нематоды и др. В качестве приспособления к типу питания имеется онх (онхи) (зубы) или копы. В некоторых работах в связи с одинаковым трофическим уровнем группы всеядных и хищников объединяют с обозначением *Om+Pr*.

5. Фитотрофы или паразиты растений, Пр (*plant feeders*, *herbivores*, *H*). Данную группу также именуют фитопаразитами или фитогельминтами. Фитотрофы питаются живыми тканями высших растений. Как результат адаптации к такому типу питания у данной группы всегда присутствует стилет или копы, с помощью которых происходит прокалывание клеток/тканей и высасывание их содержимого.

Таблица 4

Table 4

Матрица функциональных гильдий нематод [102]

Matrix of functional nematode guilds [102]

Трофическая группа	С-р шкала				
	1	2	3	4	5
Фитотрофы (<i>H</i>)	–	<i>H</i> ₂ <i>Tylenchidae</i>	<i>H</i> ₃ <i>Pratylenchidae</i>	<i>H</i> ₄ <i>Trichodoridae</i>	<i>H</i> ₅ <i>Longidoridae</i>
Микотрофы (<i>Fu</i>)	–	<i>Fu</i> ₂ <i>Aphelenchidae</i>	<i>Fu</i> ₃ <i>Diphtherophoridae</i>	<i>Fu</i> ₄ <i>Tylencholaimidae</i>	–
Бактериотрофы (<i>Ba</i>)	<i>Ba</i> ₁ <i>Panagrolaimidae</i>	<i>Ba</i> ₂ <i>Cephalobidae</i>	<i>Ba</i> ₃ <i>Teratocephalidae</i>	<i>Ba</i> ₄ <i>Alaimidae</i>	–
Хищники (<i>Pr</i>)	<i>Pr</i> ₁ <i>Neodiplogastridae</i>	<i>Pr</i> ₂ <i>Seinuridae</i>	<i>Pr</i> ₃ Некоторые <i>Tripylidae</i>	<i>Pr</i> ₄ <i>Mononchidae</i>	<i>Pr</i> ₅ <i>Discolaimidae</i>
Всеядные (<i>Om</i>)	–	–	–	<i>Om</i> ₄ <i>Oudsiatidae</i>	<i>Om</i> ₅ <i>Aporcelaimidae</i>
Ключевые особенности	Оппортунисты «обогащения»	Базовая фауна	Рудиментарная пищевая сеть	Высоко структурированная пищевая сеть	Максимально структурированная пищевая сеть
Другие экологические характеристики	Высокая плодовитость. Маленькие яйца. Короткий жизненный цикл. Стадия личинки Дауэра	Мелкие нематоды. Ангидробиоз. Снижение метаболической активности. Трофические приспособления	Чувствительность к химическим стрессорам. Появление трофических взаимосвязей (хищных нематод)	Повышенная чувствительность к нарушениям. Большой размер тела. Меньшее количество яиц. Более длительный жизненный цикл	Крупные нематоды. Длительный жизненный цикл. Узкая экологическая амплитуда

П р и м е ч а н и е. Прочерк обозначает отсутствие нематод в гильдии.

Одна из модификаций трофической классификации связана с неоднозначным трофическим статусом многочисленного и разнообразного сем. *Tylenchidae*, связанного с растениями и имеющего практическое значение. Одни авторы относят его представителей к фитотрофам [99], другие – к микотрофам [96], а третьи – и к тем и другим [104]. В 2003 году Окада с соавторами [105] показали, что нематоды рода *Filenchus* (сем. *Tylenchidae*) в своем питании тесно связаны с грибным мицелием, после чего многие авторы стали относить данный таксон к группе микотрофов. В связи с этим встречается несколько вариантов трофического группирования семейства: 1) всех представителей сем. *Tylenchidae* помещают в группу фитотрофов; 2) всех представители сем. *Tylenchidae* помещают в группу фитотрофов, за исключением нематод рода *Filenchus*, которых помещают в группу микотрофов; 3) нематод сем. *Tylenchidae* выделяют в отдельную трофическую группу «нематод, ассоциированных с растением», *Asp* (*root-fungal feeders*, *Rff* или *plant-associated nematodes*), предполагая их питание на корнях растений с возможностью использования и других ресурсов, таких как гифы грибов.

В детритных пищевых сетях поток вещества и энергии опосредован грибами и бактериями. Обилие нематод соответствующих трофических групп, в свою очередь, весьма чувствительно к изменению обилия почвенной микробиоты и отражает доступность того или иного микробного компонента в системе. Предложенный Г. Йейтсом индекс соотношения энергетических каналов (*Nematode Channel Ratio*) показывает преобладающие пути разложения органики на основе соотношения бактериотрофов и микотрофов в почвенной пищевой сети [106]. При нулевых значениях индекса предполагается полное доминирование грибного, при единице – бактериального пути разложения. Индекс рассчитывается по следующей формуле: $NCR = Ba/(Ba + Fu)$, где *Ba* и *Fu* – численность нематод бактериотрофов и микотрофов соответственно.

Функциональные гильдии нематод

Развитием концепции индексов зрелости стало появление классификации функциональных гильдий нематод. Жизненная стратегия нематод (с-р шкала) в сочетании с их трофиче-

ской позицией позволяет выделить гильдии нематод, на основе анализа которых возможно дать характеристику условиям почвенной пищевой сети и почвенной экосистемы в целом [16]. При этом значительное таксономическое разнообразие нематод внутри каждой гильдии создает высокую вероятность того, что ее наличие или отсутствие является отражением состояния почвенной пищевой сети, а не внутрипопуляционных процессов. Функциональные гильдии выделяются на основе трофической группы и положения на с-р шкале (например, Ba_2 – бактериотрофы со значением 2 на с-р шкале, см. табл. 4).

«Обогащение» пищевой сети происходит, когда ресурсы становятся доступными из-за внешнего воздействия, нарушений, гибели организмов или изменений в окружающей среде [107, 108]. Гильдии Ba_1 и Fu_2 являются индикаторами обогащения почвы. Эти гильдии чувствительны к обилию бактериальной и грибной массы и быстро реагируют на ее изменение, вызванное поступлением в почву доступного органического вещества. Другие гильдии нематод являются индикаторами сложности (структурированности) почвенной пищевой сети. В ненарушенных пищевых сетях численность организмов более высокого трофического уровня и количество трофических связей между ними больше, чем после нарушения [109]. Следовательно, присутствие хищных и всеядных нематод в сообществе указывает на низкую степень нарушенности и отражает сложность и устойчивость пищевой сети.

На основе анализа функциональных характеристик различных гильдий нематод Феррис с соавторами [16] выделили три индикационных компонента внутри сообщества нематод. Базальный компонент (*basal component*, b) включает гильдии нематод, адаптированные к стрессовым условиям и имеющие широкую экологическую амплитуду. Многие из нематод этих гильдий способны к криптобиозу и более устойчивы к загрязнению, чем другие таксоны. Данный компонент можно рассматривать как основу сообщества нематод, всегда присутствующую в биотопе. Высокая доля базального компонента указывает на стрессовые условия пищевой сети. Величина базального компонента рассчитывается как

$$b = (Ba_2 + Fu_2) \times W_2,$$

где $W_2 = 0,8$, а Ba_2 и Fu_2 – численность нематод бактериотрофов и микотрофов со значением 2 на с-р шкале. Компонент обогащения (*enrichment component*, e) включает гильдии нематод, быстро реагирующие на изменение микробной биомассы и являющиеся индикаторами обога-

щения почвенной пищевой сети (эвтрофикации). Он рассчитывается как

$$e = (Ba_1 \times W_1) + (Fu_2 \times W_2),$$

где $W_1 = 3,2$ и $W_2 = 0,8$, а Ba_1 и Fu_2 – численность нематод бактериотрофов и микотрофов со значениями соответственно 1 и 2 на с-р шкале. Структурный компонент (*structure component*, s) включает гильдии с высоким значением по с-р шкале (3–5), которые отражают сложность трофических взаимодействий и стабильность почвенной пищевой сети. Он рассчитывается как

$$s = Ba_{(n)} \times W_{(n)} + Pr_{(n)} \times W_{(n)} + Fu_{(n)} \times W_{(n)} + Om_{(n)} \times W_{(n)},$$

где n – это значение на с-р шкале от 3 до 5, $W_3 = 1,8$, $W_4 = 3,2$, $W_5 = 5,0$, а Ba_n , Pr_n , Fu_n , Om_n – численность трофических групп с соответствующим значением по с-р шкале.

Авторы концепции вводят в расчеты специальные коэффициенты значимости гильдий (W_i), чтобы отразить важность их присутствия для индикационных целей. Например, присутствие гильдий с-р 2 относительно неважно, поскольку они присутствуют во всех биотопах. Однако присутствие гильдий Pr_5 и Om_5 является очень важным индикатором, поскольку эти нематоды обычно не обнаруживаются в условиях нарушения. Более подробная информация о принципах расчета коэффициентов (W_i) представлена в статье [16]. На основе соотношения компонентов рассчитываются индексы, характеризующие состояние почвенной пищевой сети: индекс обогащения, индекс структурирования, индекс преобладающего пути разложения органики (табл. 5). Пример расчета значений индексов приведен в табл. 6.

Индикационные компоненты (структурный и компонент обогащения) могут быть представлены графически с построением фаунистического профиля, который позволяет получить более «объемную» характеристику почвенной пищевой сети. Фаунистический профиль представляет собой отложенные по осям абсцисс и ординат значения индексов SI и EI и состоит из четырех квадратов (рис. 3), каждый из которых дает определенную характеристику состояния почвенной пищевой сети (нарушенная – квадрат А, зрелая – В, структурированная – С и деградированная – D) (табл. 7). Авторы концепции, однако, оговаривают, что приведенные характеристики несколько субъективны и построены на основе их личного опыта, интерпретации общепринятых представлений и опубликованной информации и будут со временем улучшены [16].

Таблица 5

Table 5

Эколого-популяционные индексы, характеризующие состояние почвенной пищевой сети [16]

Ecological indices characterizing state of the soil food web [16]

Индекс	Диапазон	Значение	Характеристика
Индекс обогащения Enrichment index (EI) $EI = e/(e+b) \times 100$, где e и b – компоненты обогащения и базальный	0–100	0–30	Низкое поступление лабильного органического вещества или удобрений. Незначительное участие бактерий в минерализации питательных веществ. Низкое плодородие
		30–60	Средний уровень поступления органических веществ или удобрений. Скорость разложения от средней до быстрой. Плодородие от среднего до высокого
		60–100	Быстрое разложение, высокое плодородие. Небольшое количество сложных органических веществ
Индекс структурирования Structure index (SI) $SI = s/(s+b) \times 100$, где s и b – структурный и базальный компонент	0–100	0–30	Почвенная пищевая сеть сильно нарушена. Ограничено развитие высших трофических звеньев
		30–60	Почвенная пищевая сеть средне или сильно развита. Хорошее состояние высших трофических звеньев
		60–100	Почвенная пищевая сеть хорошо структурирована
Индекс преобладающего пути разложения Channel index (CI) $CI = Fu_2 \times W_2 / (Ba_1 \times W_1 + Fu_2 \times W_2)$, где $W_1 = 3,2$; $W_2 = 0,8$; Fu_2 и Ba_1 – численность микотрофов и бактериотрофов с соответствующим значением по с-р шкале	0–100	0–30	Небольшое поступление сложных органических соединений. Низкое участие грибов и высокое бактерий в минерализации органического вещества
		30–60	Уровень содержания сложного органического вещества от среднего до высокого. Участие грибов в разложении органического вещества от среднего до высокого
		60–100	Высокое участие грибов и низкое участие бактерий в минерализации органического вещества. Низкая скорость разложения

Таблица 6

Table 6

Пример расчета индексов EI и SI для двух сообществ почвенных нематод (проба А и Б)

An example of calculating the EI and SI indices for two soil nematode communities (sample A and B)

Таксон	Проба А, кол-во особей	Проба Б, кол-во особей	С-р	Трофическая группа	$W(b)$	$W(e)$	$W(s)$	Проба А			Проба Б		
								b	e	s	b	e	s
<i>Hoplolaimidae</i>	5	15	3	<i>H</i>				0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pratylenchidae</i>	5	15	3	<i>H</i>				0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Aphelenchidae</i>	15	5	2	<i>Fu</i>	0,8	0,8		12,0	12,0	0,0	4,0	4,0	0,0
<i>Cephalobidae</i>	15	2	2	<i>Ba</i>	0,8			12,0	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0
<i>Plectidae</i>	2	15	2	<i>Ba</i>	0,8			1,6	0,0	0,0	12,0	0,0	0,0
<i>Rhabditidae</i>	2	50	1	<i>Ba</i>		3,2		0,0	6,4	0,0	0,0	160,0	0,0
<i>Dorylaimidae</i>	50	5	4	<i>Om</i>			3,2	0,0	0,0	160,0	0,0	0,0	16,0
<i>Discolaimidae</i>	15	2	5	<i>Pr</i>			5,0	0,0	0,0	75,0	0,0	0,0	10,0
Общая численность	109	109											
Сумма компонента								25,6	18,4	235,0	17,6	164,0	26,0
EI	41,8	90,3											
SI	90,2	59,6											

Примечание. На первом этапе рассчитывается значение компонента для таксонов необходимых гильдий (гильдии, использующиеся для расчета каждого компонента, приведены в тексте). На втором этапе полученные значения суммируются для получения значения компонента в пробе. На третьем этапе происходит расчет индексов по формулам, приведенным в табл. 5.

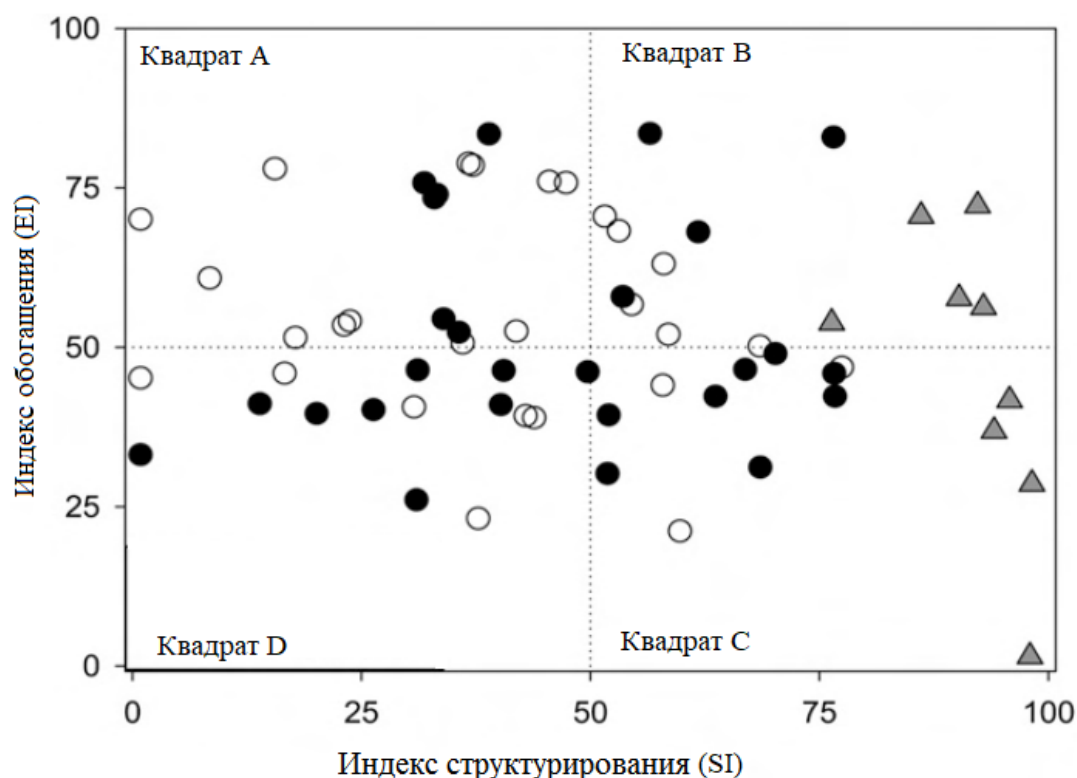


Рис. 3. Фаунистический профиль, характеризующий почвенную трофическую сеть на участках с различным типом земледелия в условиях прерий [110]: открытые окружности – традиционное земледелие; заполненные окружности – органическое земледелие; треугольники – восстановленные прерии

Fig. 3. Faunal profile characterizing the soil food web in areas with different types of farming under prairie conditions [110]: open circles, traditional farming; filled circles – organic farming; triangles – restored prairies

Таблица 7

Table 7

Предполагаемые условия почвенной пищевой сети, полученные
на основе анализа сообщества нематод [16]

Assumed soil food web conditions based on the analysis of the nematode community [16]

Характеристики	Квадрат А	Квадрат В	Квадрат С	Квадрат D
Нарушенность	Высокая	Низкая – средняя	Не нарушена	Условия стресса
Обогащение	Высокое	Высокое	Умеренное	Истошающееся
Пути разложения	Бактериальный	Сбалансированный	Грибной	Грибной
Соотношение C/N	Низкое	Низкое	Среднее – высокое	Высокое
Условия трофической сети	Нарушенная	Зрелая	Структурированная	Деградирующая

Например, в работе [110] изучали реакцию почвенных нематод на четырехлетний севооборот с применением традиционного и органического земледелия в условиях североамериканских прерий. В качестве контроля рассматривались участки восстановленных прерий. На основе расчета индексов (табл. 8) авторы делают выводы о том, что превращение прерий в агроэкосистемы приводит к нарушению и упрощению почвенной пищевой сети (снижение MI и SI). Значения EI указывают на среднюю степень обогащения органикой почвенной пищевой се-

ти в восстановленных прериях и увеличение степени обогащения при их трансформации (особенно в случае традиционного земледелия). Индекс SI предполагает снижение участия грибов и увеличение бактерий в деструкционных процессах при переходе к возделыванию сельскохозяйственных культур. В совокупности восстановленная прерия характеризуется как ненарушенная почвенная экосистема со структурированной почвенной пищевой сетью и со средней, по сравнению с агроэкосистемами, степенью обогащения (см. рис. 3).

Таблица 8

Table 8

Значения эколого-популяционных индексов в работе
по изучению трансформации прерий в агросистемы [110]
Values of ecological indices in the study of the transformation
of prairies into agricultural systems [110]

Тип земледелия	MI	EI	SI	CI
Традиционное	2,1	55	39	34
Органическое	2,2	50	47	39
Восстановленные прерии	3,4	46	92	50

Дополнением к эколого-популяционным индексам стала возможность на основе данных о численности и биомассе рассчитывать уровни метаболической активности или метаболический след нематод (nematode metabolic footprint), выполняющих различные функциональные роли в почвенной пищевой сети. Данное дополнение позволяет измерить экосистемные услуги, выполняемые каждой функциональной гильдией нематод. Однако в идеале такие вычисления должны строиться на данных об измерениях нематод и расчетах их реальной биомассы в почве, что увеличивает трудоемкость выполняемой работы. Более подробно о расчете метаболического следа нематод можно узнать в работе Г. Ферриса [111]. Расчеты и графическое представление метаболического следа, а также расчеты описанных выше эколого-популяционных индексов сообществ нематод могут быть выполнены с использованием программы NINJA: Nematode INdicator Joint Analysis (<https://sieriebriennikov.shinyapps.io/ninja/>) [112]. Для этого данные, включающие список таксонов (на уровне семейств, родов или видов) и численность нематод каждого таксона (количество нематод на единицу площади/объема/массы), должны быть организованы специальным образом в таблицы Excel и загружены отдельным файлом на онлайн-ресурс NINJA, где в автоматическом режиме проводится их обработка.

Ограничения и проблемы использования

Несмотря на значительные индикационные возможности, «нематодные индексы» имеют некоторые ограничения. В частности, расположение тех или иных таксонов на с-р шкале при разработке метода определялось в большинстве случаев на основе морфологического строения, а не на основе экспериментальных данных [14]. Следовательно, с-р значения для отдельных таксонов могут измениться вследствие детализации информации об их жизненной стратегии

[113]. Как отмечено выше, изначально распределение нематод по с-р шкале было проведено на уровне семейства, т.е. индекс не учитывал различия в жизненной стратегии видов и родов внутри таксона. Эта проблема была частично решена распределением родов нематод по с-р шкале, однако в этом случае индекс не учитывает различия видов внутри одного рода. В отдельных случаях распределение нематод по трофическим группам также имеет неопределенность. Яркий тому пример – нематоды сем. *Tylenchidae* (см. выше), трофическое положение которых до сих пор остается дискуссионным вопросом. Таким образом, уточнение типа жизненной стратегии или трофического положения отдельных таксонов нематод может потребовать пересчета полученных ранее данных.

Индексы могут не корректно отражать степень нарушения и состояние почвенной пищевой сети вследствие чувствительности к влиянию «нецелевых» факторов. Так, широта местности [114], количество осадков [90], тип почвы [14], глубина [90] и сезон [115] отбора проб могут оказывать влияние на значения индексов, приводя к несоответствию формируемой ими картины и наблюдаемых процессов. Например, в экстремальных условиях тундровых биотопов при ужесточении температурного режима, росте переувлажнения почвы и снижении степени развития растительности индексы $\sum MI$ и SI , в отличие от ожидаемого снижения, наоборот, возрастали [116]. На острове архипелага Кузовá (Белое море) в ряде скальных биотопов наблюдалось доминирование хищных нематод [117], которые имеют высокий ранг по с-р шкале (4–5) и определяют высокие значения индексов $\sum MI$ и SI . На арктических и антарктических островах с крайне суровыми климатическими условиями индекс SI в ряде случаев достигал максимально возможных показателей [118]. В регулярно затопляемых местообитаниях он также отличался высокими значениями, что было обусловлено развитием нематод,

имеющих высокие значения по с-р шкале и способных использовать для питания водоросли [119, 120]. Видимо, в экстремальных экосистемах на фоне крайне неблагоприятных условий и угнетения сообщества нематод в целом ряд таксонов за счет специфической реакции на определенные факторы среды и/или наличие подходящего источника питания могут увеличивать свою численность, что приводит к получению непредвиденных значений индексов.

Обилие нематод может оказывать влияние на значения индексов [91, 90]. При низких плотностях индикационное значение отдельных с-р групп или гильдий нематод может значительным образом гипертрофироваться, приводя к искажению получаемой от индексов информации.

Индексы могут быть менее эффективны в небольшом градиенте воздействия и плохо реагировать на начальные этапы нарушений. Так, на сельскохозяйственных участках значе-

ния индексов не отличались существенным образом в градиенте интенсивности землепользования [121]. Индексы весьма чувствительны к внесению удобрений [90], однако могут слабо реагировать на изменение их дозировки [122].

Несмотря на обозначенные проблемы, эколого-популяционные индексы представляют собой уникальный инструмент оценки состояния почвенных экосистем, возможности которого во многом не исчерпаны. Однако мы призываем с аккуратностью интерпретировать и экстраполировать результаты и выводы, полученные при помощи этого подхода. В настоящее время назрела потребность в калибровке индексов по количественным уровням нарушений, типам почв и экосистем, что позволило бы на новом методическом уровне использовать нематод для индикации. Постепенное появление обобщающих статей [90, 114, 123] дает основание полагать, что такая работа в скором времени может быть реализована.

Список литературы

1. Neher D. A. Ecology of plant and free-living nematodes in natural and agricultural soil // *Annual Review of Phytopathology*. 2010. Vol. 48. P. 371–394.
2. Hoogen J. van den, Geisen S., Routh D. [et al.]. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale // *Nature*. 2019. Vol. 572. P. 194–198.
3. Ingham R. E., Trofymow J. A., Ingham E. R., Coleman D. C. Interactions of Bacteria, Fungi, and their Nematode Grazers: Effects on Nutrient Cycling and Plant Growth // *Ecological Monographs*. 1985. Vol. 55. P. 119–140.
4. Fu S. L., Ferris H., Brown D., Plant R. Does the positive feedback effect of nematodes on the biomass and activity of their bacteria prey vary with nematode species and population size? // *Soil of Biology and Biochemistry*. 2005. Vol. 37. P. 1979–1987.
5. Ferris H. Contribution of nematodes to the structure and function of the soil food web // *Russian Journal of Nematology*. 2010. Vol. 42. P. 63–67.
6. Griffiths B. S. Microbial-feeding nematodes and protozoa in soil: their effects on microbial activity and nitrogen mineralization in decomposition hotspots and the rhizosphere // *Plant Soil*. 1994. Vol. 164. P. 25–33.
7. Ferris H., Venette R. C., Lau S. S. Dynamics of nematode communities in tomatoes grown in conventional and organic farming systems, and their impact on soil fertility // *Applied Soil Ecology*. 1996. Vol. 3. P. 161–175.
8. Gebremikael M. T., Steel H., Buchan D. [et al.]. Nematodes enhance plant growth and nutrient uptake under C and N-rich conditions // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. P. e32862.
9. Mesa-Valle C. M., Garrido-Cardenas J. A., Cebrian-Carmona J. [et al.]. Global research on plant nematodes // *Agronomy*. 2020. Vol. 10. P. e1148.
10. Sasser J. N., Freckman D. W. A World perspective on nematology: the role of the society // *Nematology*. 1987. Vol. 18. P. 596.
11. Jones J. T., Haegeman A., Danchin E. G. J. [et al.]. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology // *Molecular Plant Pathology*. 2013. Vol. 14. P. 946–961.
12. Зиновьева С. В., Чижов В. Н., Приданников М. В. [и др.]. Фитопаразитические нематоды России : монография. М. : КМК, 2012. 385 с.
13. Bongers T., Ferris H. Nematode community structure as a biomonitor in environmental monitoring // *Trends in Ecology and Evolution*. 1999. Vol. 14. P. 224–228.
14. Neher D. A. Role of nematodes in soil health and their use as indicators // *Russian Journal of Nematology*. 2001. Vol. 33. P. 161–168.
15. Bongers T. The maturity index, an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition // *Oecologia*. 1990. Vol. 83. P. 14–19.
16. Ferris H., Bongers T., Goede R. G. M. de. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept // *Applied Soil Ecology*. 2001. Vol. 18. P. 13–29.
17. Bezooijen J. van. Methods and techniques for nematology. 2006. URL: <https://www.wur.nl/en/show/manual-methods-and-techniques-for-nematology-1.htm>.

18. Soil test for virus-vector nematodes in the framework of EPPO Standard PM 4 Schemes for the production of healthy plants for planting of fruit crops, grapevine, *Populus* and *Salix* // EPPO Bulletin. 2009. Vol. 39. P. 284–288.
19. Sohlenius B. A. Carbon budget for nematodes, rotifers and tardigrades in Swedish coniferous forest soil // Hol-arct. Ecol. 1979. Vol. 2. P. 30–40.
20. Long J. R., Dorrepaal E., Kardol P. [et al.]. Contrasting responses of soil microbial and nematode communities to warming and plant functional group removal across a post-fire boreal forest successional gradient // Ecosys-tems. 2015. Vol. 19. P. 339–355.
21. Kudrin A. A., Zuev A. G., Taskaeva A. A. [et al.]. Spruce girdling decreases abundance of fungivorous soil nematodes in a boreal forest // Soil Biology and Biochemistry. 2021. Vol. 155. P. 108184.
22. Sohlenius B., Sandor A. Vertical distribution of nematodes in arable soil under grass (*Festuca pratensis*) and barley (*Hordeum disticum*) // Biology and Fertility of Soils. 1987. Vol. 3. P. 19–25.
23. Liang W., Li Q., Jiang Y., Neher D. A. Nematode faunal analysis in an aquic brown soil fertilised with slow-release urea, Northeast China // Applied Soil Ecology. 2005. Vol. 29. P. 185–192.
24. Djiga D., Chabrie C., Duyck P. F. [et al.]. Cover crops alter the soil nematode food web in banana agroecosys-tems // Soil Biology and Biochemistry. 2012. Vol. 48. P. 142–150.
25. Poeydebat C., Tixier P., Chabrier C. [et al.]. Does plant richness alter multitrophic soil food web and promote plant parasitic nematode regulation in banana agroecosystems? // Applied Soil Ecology. 2017. Vol. 117. P. 137–146.
26. Ou W., Liang W., Jiang Y. [et al.]. Vertical distribution of soil nematodes under different land use types in an aquic brown soil // Pedobiologia. 2005. Vol. 49. P. 139–148.
27. Sohlenius B., Boström S. Annual and long-term fluctuations of the nematode fauna in a Swedish Scots pine for-est soil // Pedobiologia. 2001. Vol. 45. P. 408–429.
28. Huhta V., Karppinen E., Nurminen M., Valpas A. Effect of silvicultural practices upon arthropod, annelid and nematode populations in coniferous forest soil // Annales Zoologici Fennici. 1967. Vol. 4. P. 87–143.
29. Panesar T. S., Marshall V. G., Barclay H. J. The impact of clear-cutting and partial harvesting systems on popu-lation dynamics of soil nematodes in coastal Douglas-fir forests // Pedobiologia. 2000. Vol. 44. P. 641–665.
30. Wasilewska L. Nematodes of the dunes in the Kampinos forest. II. Community structure based on numbers of individuals, state of biomass and respiratory metabolism // Ekologia Polska. 1971. Vol. 19. P. 651–688.
31. Marshall V. G. Seasonal and vertical distribution of soil fauna in a thinned and urea-fertilized Douglas fir forest // Canadian Journal of Soil Science. 1974. Vol. 54. P. 491–500.
32. Robertson G. P., Freckman D. W. The spatial-distribution of nematode trophic groups across a cultivated ecosystem // Ecology. 1995. Vol. 76. P. 1425–1432.
33. Quist C. W., Gort G., Mooijman P. [et al.]. Spatial distribution of soil nematodes relates to soil organic matter and life strategy // Soil Biology and Biochemistry. 2019. Vol. 136. P. 107542.
34. Goodell P. B., Ferris H. Sample optimization for five plant-parasitic nematodes in an alfalfa field // Journal of Nematology. 1981. Vol. 13. P. 304–313.
35. Покаржевский А. Д., Гонгальский К. Б., Зайцев А. С., Савин Ф. А. Пространственная экология почвен-ных животных. М. : КМК, 2007. 174 с.
36. Carter M. R., Gregorich E. G. Soil Sampling and Methods of Analysis. Boca Raton : CRC Press, 2007. 1262 p.
37. Renco M., Cerevkova A., Homolova Z., Gömöryova E. Long-term effects on soil nematode community structure in spruce forests of removing or not removing fallen on soil nematode communities after a windstorm // Forest Ecology and Management. 2015. Vol. 356. P. 243–252.
38. Scheiner S. M., Gurevitch J. Design and Analysis of Ecological Experiments. New York : Chapman & Hall, 2001.
39. Козлов М. В. Планирование экологических исследований: теория и практические рекомендации. М. : КМК, 2014. 171 с.
40. Yeates G. W. Soil nematodes in terrestrial ecosystems // Russian Journal of Nematology. 1979. Vol. 11. P. 213–229.
41. Dahlin P., Edera R., Consolia E. [et al.]. Integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomatoes using fluopyram and *Purpureocillium lilacinum* strain 251 // Crop Protection. 2019. Vol. 14. P. 119–124.
42. Sohlenius B. Influence of climatic conditions on nematode coexistence: a laboratory experiment with a conifer-ous forest soil // Oikos. 1985. Vol. 44. P. 430–438.
43. McSorley R. Extraction of nematodes and sampling methods // Principles and Practice of Nematode Control in Crops / R. H. Brown, B. R. Kerry. Sydney : Academic Press, 1987. P. 13–41.
44. Hallman J., Viaene N. PM 7/119(1) Nematode extraction // EPPO Bulletin. 2013. Vol. 43. P. 471–495.
45. Ryss A. Y. A simple express technique to process nematodes for collection slide mounts // Journal of Nematology. 2017. Vol. 49. P. 27–32.
46. Hoogen J. van den., Geisen S., Wall D. H. [et al.]. A global database of soil nematode abundance and functional group composition // Scientific Data. 2020. Vol. 7. P. e103.
47. Cesarz S., Schulz A. E., Beugnion R., Eisenhauer N. Testing soil nematode extraction efficiency using different variations of the Baermann-funnel method // Soil organisms. 2019. Vol. 91. P. 61–72.
48. Viglierchio D. R., Yamashita T. T. On the methodology of nematode extraction from field samples: Density flotation techniques // Journal of Nematology. 1983. Vol. 15. P. 444–449.
49. Southey J. F. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. London : H.M. Stationery Off., 1970. 148 p.

50. Cobb N. A. Estimating the nema populations of soil // USDA Technical Circular. 1918. Vol. 1. P. 48.
51. Scheu S., Falca M. The soil food web of two beech forests (*Fagus sylvatica*) of contrasting humus type: stable isotope analysis of a macro- and mesofauna dominated community // Oecologia. 2000. Vol. 123. P. 285–296.
52. Tiunov A. V. Stable isotopes of carbon and nitrogen in soil ecological studies // Biology Bulletin. 2007. Vol. 34. P. 395–407.
53. Kudrin A. A., Tsurikov S. M., Tiunov A. V. Trophic position of microbivorous and predatory soil nematodes in boreal forest as indicated by stable isotope analysis // Soil Biology and Biochemistry. 2015. Vol. 86. P. 193–200.
54. Melody C., Griffiths B., Dyckmans J., Schmidt O. Stable isotope analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of soil nematodes from four feeding groups // PeerJ. 2016. Vol. 4. P. 1–19.
55. Potapov A. M., Tiunov A. V., Scheu S. Uncovering trophic positions and food resources of soil animals using bulk natural stable isotope composition // Biological Reviews. 2019. Vol. 94. P. 37–59.
56. Potapov A. M., Rozanova O. L., Semenina E. E. [et al.]. Size compartmentalization of energy channeling in terrestrial belowground food webs // Ecology. 2021. Vol. 102. P. e03421.
57. Sticht C., Schrader S., Giesemann A., Weigela H. Sensitivity of nematode feeding types in arable soil to free air CO_2 enrichment (FACE) is crop specific // Pedobiologia. 2009. Vol. 52. P. 337–349.
58. Rubtsova T. V., Moens M., Subbotin S. A. PCR amplification of a rRNA gene fragment from formalin fixed and glycerine-embedded nematodes from permanent slides // Russian Journal of Nematology. 2005. Vol. 13. P. 137–140.
59. Dawson M. N., Raskoff K. A., Jacobs D. K. Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses // Molecular marine biology and biotechnology. 1998. Vol. 7. P. 145–152.
60. Yoder M., De Ley I. T., King I., Mundo-Ocampo M. DESS: A versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes // Nematology. 2006. Vol. 8. P. 367–376.
61. Seutin G., White B. N., Boag P. T. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses // Canadian Journal of Zoology. 1991. Vol. 69. P. 82–90.
62. Seinhorst J. W. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin // Nematologica. 1959. Vol. 4. P. 67–69.
63. Кирьянов Е. С., Кралль Э. Л. Паразитические нематоды растений и меры борьбы с ними. Л. : Наука, 1969. Т. 1. 522 с.
64. Kerfahi D., Tripathi B. M., Porazinska D. L. [et al.]. Do tropical rain forest soils have greater nematode diversity than high Arctic tundra? A metagenetic comparison of Malaysia and Svalbard // Global Ecology Biogeography. 2016. Vol. 25. P. 716–728.
65. Geisen S., Snoek L. B., Hooven F. C. ten. [et al.]. Integrating quantitative morphological and qualitative molecular methods to analyse soil nematode community responses to plant range expansion // Methods in Ecology and Evolution. 2018. Vol. 9. P. 1366–1378.
66. Treonis A. M., Unangst S. K., Kepler R. M. [et al.]. Characterization of soil nematode communities in three cropping systems through morphological and DNA metabarcoding approaches // Scientific Reports. 2018. Vol. 8. P. e2004.
67. Kitagami Y., Obase K., Matsuda Y. High-throughput sequencing and conventional morphotyping show different soil nematode assemblages but similar community responses to altitudinal gradients on Mt. Ibuki, Japan // Pedobiologia. 2021. Vol. 90. P. e150788.
68. Taberlet P., Coissac E., Pompanon F. [et al.]. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding // Modern Ecology. 2012. Vol. 21. P. 2045–2050.
69. Straub D., Blackwell N., Langarica-Fuentes A. [et al.]. Interpretations of environmental microbial community studies are biased by the selected 16S rRNA (Gene) amplicon sequencing pipeline // Frontiers in Microbiology. 2020. Vol. 11. P. e2652.
70. Tedersoo L., Bahram M., Zinger L. [et al.]. Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results // Molecular Ecology. 2022. Vol. 31. P. 2769–2795.
71. Sapkota R., Nicolaisen M. High-throughput sequencing of nematode communities from total soil DNA-extractions // BMC Ecol. 2015. Vol. 15. P. e3.
72. Peham T., Steiner F. M., Schlick-Steiner B. C., Arthofer W. Are we ready to detect nematode diversity by next generation sequencing? // Ecology and Evolution. 2017. Vol. 7. P. 4147–4151.
73. Семенов М. Е. Метабаркодинг и метагеномика в почвенно-экологических исследованиях: успехи, проблемы и возможности // Журнал общей биологии. 2019. Т. 80. С. 403–417.
74. Griffiths B. S., Groot G. A. de, Laros I. [et al.]. The need for standardisation: Exemplified by a description of the diversity, community structure and ecological indices of soil nematodes // Ecological Indicator. 2018. Vol. 87. P. 43–46.
75. Waeyenberge L., De Sutter N., Viaene N., Haegeman A. New insights into nematode DNA-metabarcoding as revealed by the characterization of artificial and spiked nematode communities // Diversity. 2019. Vol. 11. P. e52.
76. Sikder M., Vestergaard M., Sapkota R. [et al.]. Evaluation of metabarcoding primers for analysis of soil nematode communities // Diversity. 2020. Vol. 12. P. e388.
77. Ahmed M., Back M. A., Prior T. [et al.]. Metabarcoding of soil nematodes: The importance of taxonomic coverage and availability of reference sequences in choosing suitable marker(s) // Metabarcoding Metagenomics. 2019. Vol. 3. P. e36408.

78. Kawanobe M., Toyota K., Ritz K. Development and application of a DNA metabarcoding method for comprehensive analysis of soil nematode communities // *Applied Soil Ecology*. 2021. Vol. 166. P. e103974.
79. Porazinska D. L., Giblin-Davis R. M., Faller L. L. [et al.]. Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity // *Molecular Ecology Resources*. 2009. Vol. 9. P. 1439–1450.
80. Creer S., Fonseca V. G., Porazinska D. L. [et al.]. Ultrasequencing of the meiofaunal biosphere: Practice, pitfalls and promises // *Molecular Ecology*. 2010. Vol. 19. P. 4–20.
81. Fonseca V. G., Carvalho G. R., Nichols B. [et al.]. Metagenetic analysis of patterns of distribution and diversity of marine meiobenthic eukaryotes // *Global Ecology and Biogeography*. 2014. Vol. 23. P. 1293–1302.
82. Bik H. M., Sung W. A. Y., De Ley P. [et al.]. Metagenetic community analysis of microbial eukaryotes illuminates biogeographic patterns in deep-sea and shallow water sediments // *Molecular Ecology*. 2012. Vol. 21. P. 1048–1059.
83. Hadziavdic K., Lekang K., Lanzen A. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers // *PLOS One*. 2014. Vol. 9. P. e87624.
84. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. [et al.]. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Research*. 2013. Vol. 41. P. 590–596.
85. Guillou L., Bachar D., Audic S. [et al.]. The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy // *Nucleic Acids Research*. 2013. Vol. 41. P. 597–604.
86. Database resources of the National Center for Biotechnology Information NCBI Resource Coordinators // *Nucleic Acids Research*. 2016. Vol. 44. P. 7–19.
87. Freckman D. W. Bacterivorous nematodes and organic matter decomposition // *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 1988. Vol. 24. P. 195–217.
88. Burger J. Bioindicators: a review of their use in the environmental literature 1970–2005 // *Environ Bioindic.* 2006. Vol. 1. P. 136–144.
89. Ferris H. Nemaplex, the “Nematode-Plant Expert Information System”: A Virtual Encyclopedia on Soil and Plant Nematodes. Davis : University of California, 2019. URL: <http://nemaplex.ucdavis.edu/>
90. Puissant J., Villenave C., Chauvin C. [et al.]. Quantification of the global impact of agricultural practices on soil nematodes: a meta-analysis // *Soil Biology and Biochemistry*. 2021. Vol. 161. P. e108383.
91. Wasilewska L. The effect of age of meadows on succession and diversity in soil nematode communities // *Pedobiologia*. 1994. Vol. 38. P. 1–11.
92. Korthals G. W., Popovici I., Iliev I., Lexmond T. M. Influence of perennial ryegrass on a copper and zinc affected terrestrial nematode community // *Applied Soil Ecology*. 1998. Vol. 10. P. 73–85.
93. Сущук А. А. Почвенные нематоды трансформированных экосистем Карелии : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.16. Сыктывкар, 2009. 22 с.
94. Blakely J. K., Neher D. A., Spongberg A. L. Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination // *Applied Soil Ecology*. 2002. Vol. 21. P. 71–88.
95. Pen-Mouratov S., Shukurov N., Steinberger Y. Influence of industrial heavy metal pollution on soil free-living nematode population // *Environment Pollution*. 2008. Vol. 152. P. 172–183.
96. Forge T. A. Simard S. W. Structure of nematode communities in forest soils of southern British Columbia: relationships to nitrogen mineralization and effects of clear-cut harvesting and fertilization // *Biology and Fertility of Soils*. 2001. Vol. 34. P. 170–178.
97. Yeates G. W. Modification and qualification of the nematode Maturity Index // *Pedobiologia*. 1994. Vol. 38. P. 97–101.
98. Wasilewska L. The relationship between the diversity of soil nematode communities and the plant species richness of meadows // *Ekologia Polska*. 1997. Vol. 45. P. 719–732.
99. Freckman D. W., Ettema C. H. Assessing nematode communities in agroecosystems of varying human intervention // *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 1993. Vol. 45. P. 239–261.
100. Bongers T., Korthals G. The behavior of MI and PPI under enriched conditions // *Nematologica*. 1995. Vol. 41. P. 286.
101. Neher D. A., Campbell C. L. Nematode communities and microbial biomass in soils with annual and perennial crops // *Applied Soil Ecology*. 1994. Vol. 1. P. 17–28.
102. Ferris H., Bongers T. Nematode indicators of organic enrichment // *Journal of Nematology*. 2006. Vol. 38. P. 3–12.
103. Yeates G. W., Bongers T., De Goede R. G. M. [et al.]. Feeding habits in soil nematode families and genera. An outline for soil ecologists // *Journal of Nematology*. 1993. Vol. 25. P. 315–331.
104. Ruess L. Studies on the nematode fauna of an acid forest soil: spatial distribution and extraction // *Nematologica*. 1995. Vol. 41. P. 229–239.
105. Okada H., Kadota I. Host status of 10 fungal isolates for two nematode species, *Filenchus misellus* and *Aphelenchus avenae* // *Soil Biology and Biochemistry*. 2003. Vol. 35. P. 1601–1607.
106. Yeates G. W. Nematodes as soil indicators: functional and biodiversity aspects // *Biology and Fertility of Soils*. 2003. Vol. 37. P. 199–210.
107. Odum E. P. Trends expected in stressed ecosystems // *BioScience*. 1985. Vol. 35. P. 419–422.
108. Van Veen J. A., Kuikman P. Soil structural aspects of decomposition of organic matter by micro-organisms // *Biogeochemistry*. 1990. Vol. 11. P. 213–233.

109. Wardle D. A., Yeates G. W. The dual importance of competition and predation as regulatory forces in terrestrial ecosystems, evidence from decomposer food-webs // *Oecologia*. 1993. Vol. 93. P. 303–306.
110. Briar S. S., Barker C., Tenuta M., Entz M. H. Soil nematode responses to crop management and conversion to native grasses // *Journal of Nematology*. 2012. Vol. 44. P. 245–254.
111. Ferris H. Form and function: metabolic footprints of nematodes in the soil food web // *European Journal of Soil Biology*. 2010. Vol. 46. P. 97–104.
112. Sieriebriennikov B., Ferris H., Goede R. G. M. de. NINJA: An automated calculation system for nematode-based biological monitoring // *European Journal of Soil Biology*. 2014. Vol. 61. P. 90–93.
113. Bongers T., Goede R. G. M. de, Korthals G. W., Yeates G. W. Proposed changes of c-p classification for nematodes // *Russian Journal of Nematology*. 1995. Vol. 3. P. 61–62.
114. Song D., Pan K., Tariq A. [et al.]. Large-scale patterns of distribution and diversity of terrestrial nematodes // *Applied Soil Ecology*. 2017. Vol. 114. P. 161–169.
115. Ruess L. Nematode soil faunal analysis of decomposition pathways in different ecosystems // *Nematology*. 2003. Vol. 5. P. 179–181.
116. Кудрин А. А., Конакова Т. Н., Таскаева А. А. Сообщества почвенных нематод различных тундровых фитоценозов, отличающихся степенью развития кустарникового яруса // *Экология*. 2019. № 6. С. 419–428.
117. Груздева Л. И., Коваленко Т. Е., Матвеева Е. М. Особенности фауны нематод островов архипелага Кузова в Белом море // *Проблемы изучения, рационального использования и охраны ресурсов Белого моря : материалы IX Междунар. конф., Петрозаводск, 11–14 октября 2004 г. Петрозаводск : КарНЦ РАН, 2005. С. 81–86.*
118. Peneva V., Lazarova S., Elshishka M. [et al.]. Nematode assemblages of hair-grass (*Deschampsia spp.*) microhabitats from polar and alpine deserts in the Arctic and Antarctic // *Species and Communities in extreme environment*. Sofia : Pensoft Publishers ; M. : KMK Scientific Press, 2009. P. 419–438.
119. Okada H., Niwa S., Takemoto S. [et al.]. How different or similar are nematode communities between a paddy and an upland rice field across a flooding-drainage cycle? // *Soil Biology and Biochemistry*. 2011. Vol. 43. P. 2142–2151.
120. Кудрин А. А., Лаптева Е. М., Долгин М. М. Комплекс почвенных нематод в пойменных лесах долины р. Печора // *Теоретическая и прикладная экология*. 2011. № 2. С. 75–83.
121. Vonk J. A., Breure A. M., Mulder C. Environmentally-driven dissimilarity of trait-based indices of nematodes under different agricultural management and soil types // *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2013. Vol. 179. P. 133–138.
122. Wei C., Zheng H., Li Q. [et al.]. Nitrogen addition regulates soil nematode community composition through ammonium suppression // *PLOS One*. 2012. Vol. 7. P. e43384.
123. Матвеева Е. М., Сушук А. А. Особенности сообществ почвенных нематод в различных типах естественных биоценозов: информативность параметров // *Известия РАН. Сер. биологическая*. 2016. № 5. С. 551–560.

References

1. Neher D.A. Ecology of plant and free-living nematodes in natural and agricultural soil. *Annual Review of Phytopathology*. 2010;48:371–394.
2. Hoogen J. van den, Geisen S., Routh D. [et al.]. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature*. 2019;572:194–198.
3. Ingham R.E., Trofymow J.A., Ingham E.R., Coleman D.C. Interactions of Bacteria, Fungi, and their Nematode Grazers: Effects on Nutrient Cycling and Plant Growth. *Ecological Monographs*. 1985;55:119–140.
4. Fu S.L., Ferris H., Brown D., Plant R. Does the positive feedback effect of nematodes on the biomass and activity of their bacteria prey vary with nematode species and population size? *Soil of Biology and Biochemistry*. 2005;37:1979–1987.
5. Ferris H. Contribution of nematodes to the structure and function of the soil food web. *Russian Journal of Nematology*. 2010;42:63–67.
6. Griffiths B.S. Microbial-feeding nematodes and protozoa in soil: their effects on microbial activity and nitrogen mineralization in decomposition hotspots and the rhizosphere. *Plant Soil*. 1994;164:25–33.
7. Ferris H., Venette R.C., Lau S.S. Dynamics of nematode communities in tomatoes grown in conventional and organic farming systems, and their impact on soil fertility. *Applied Soil Ecology*. 1996;3:161–175.
8. Gebremikael M.T., Steel H., Buchan D. [et al.]. Nematodes enhance plant growth and nutrient uptake under C and N-rich conditions. *Scientific Reports*. 2016;6:e32862.
9. Mesa-Valle C.M., Garrido-Cardenas J.A., Cebrian-Carmona J. [et al.]. Global research on plant nematodes. *Agronomy*. 2020;10:e1148.
10. Sasser J.N., Freckman D.W. A World perspective on nematology: the role of the society. *Nematology*. 1987;18:596.
11. Jones J.T., Haegeman A., Danchin E.G.J. [et al.]. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2013;14:946–961.
12. Zinov'eva S.V., Chizhov V.N., Pridannikov M.V. [et al.]. *Fitoparaziticheskie nematody Rossii: monografiya* = Phytoparasitic nematodes of Russia: monograph. Moscow: KMK, 2012:385. (In Russ.)

13. Bongers T., Ferris H. Nematode community structure as a biomonitor in environmental monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*. 1999;14:224–228.
14. Neher D.A. Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *Russian Journal of Nematology*. 2001;33:161–168.
15. Bongers T. The maturity index, an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia*. 1990;83:14–19.
16. Ferris H., Bongers T., Goede R.G.M. de. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology*. 2001;18:13–29.
17. Bezooijen J. van. *Methods and techniques for nematology*. 2006. Available at: <https://www.wur.nl/en/show/manual-methods-and-techniques-for-nematology-1.htm>
18. Soil test for virus-vector nematodes in the framework of EPPO Standard PM 4 Schemes for the production of healthy plants for planting of fruit crops, grapevine, Populus and Salix. *EPPO Bulletin*. 2009;39:284–288.
19. Sohlenius B.A. Carbon budget for nematodes, rotifers and tardigrades in Swedish coniferous forest soil. *Holarct. Ecol.* 1979;2:30–40.
20. Long J.R., Dorrepaal E., Kardol P. [et al.]. Contrasting responses of soil microbial and nematode communities to warming and plant functional group removal across a post-fire boreal forest successional gradient. *Ecosystems*. 2015;19:339–355.
21. Kudrin A.A., Zuev A.G., Taskaeva A.A. [et al.]. Spruce girdling decreases abundance of fungivorous soil nematodes in a boreal forest. *Soil Biology and Biochemistry*. 2021;155:108184.
22. Sohlenius B., Sandor A. Vertical distribution of nematodes in arable soil under grass (*Festuca pratensis*) and barley (*Hordeum disticum*). *Biology and Fertility of Soils*. 1987;3:19–25.
23. Liang W., Li Q., Jiang Y., Neher D.A. Nematode faunal analysis in an aquic brown soil fertilised with slow-release urea, Northeast China. *Applied Soil Ecology*. 2005;29:185–192.
24. Djiga D., Chabrie C., Duyck P.F. [et al.]. Cover crops alter the soil nematode food web in banana agroecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*. 2012;48:142–150.
25. Poeydebat C., Tixier P., Chabrier C. [et al.]. Does plant richness alter multitrophic soil food web and promote plant parasitic nematode regulation in banana agroecosystems? *Applied Soil Ecology*. 2017;117:137–146.
26. Ou W., Liang W., Jiang Y. [et al.]. Vertical distribution of soil nematodes under different land use types in an aquic brown soil. *Pedobiologia*. 2005;49:139–148.
27. Sohlenius B., Bostrom S. Annual and long-term fluctuations of the nematode fauna in a Swedish Scots pine forest soil. *Pedobiologia*. 2001;45:408–429.
28. Huhta V., Karppinen E., Nurminen M., Valpas A. Effect of silvicultural practices upon arthropod, annelid and nematode populations in coniferous forest soil. *Annales Zoologici Fennici*. 1967;4:87–143.
29. Panesar T.S., Marshall V.G., Barclay H.J. The impact of clear-cutting and partial harvesting systems on population dynamics of soil nematodes in coastal Douglas-fir forests. *Pedobiologia*. 2000;44:641–665.
30. Wasilewska L. Nematodes of the dunes in the Kampinos forest. II. Community structure based on numbers of individuals, state of biomass and respiratory metabolism. *Ekologia Polska*. 1971;19:651–688.
31. Marshall V.G. Seasonal and vertical distribution of soil fauna in a thinned and urea-fertilized Douglas fir forest. *Canadian Journal of Soil Science*. 1974;54:491–500.
32. Robertson G.P., Freckman D.W. The spatial-distribution of nematode trophic groups across a cultivated ecosystem. *Ecology*. 1995;76:1425–1432.
33. Quist C.W., Gort G., Mooijman P. [et al.]. Spatial distribution of soil nematodes relates to soil organic matter and life strategy. *Soil Biology and Biochemistry*. 2019;136:107542.
34. Goodell P.B., Ferris H. Sample optimization for five plant-parasitic nematodes in an alfalfa field. *Journal of Nematology*. 1981;13:304–313.
35. Pokarzhevskiy A.D., Gongal'skiy K.B., Zaytsev A.S., Savin F.A. *Prostranstvennaya ekologiya pochvennykh zhivotnykh* = Spatial ecology of soil animals. Moscow: KMK, 2007:174. (In Russ.)
36. Carter M.R., Gregorich E.G. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Boca Raton: CRC Press, 2007:1262.
37. Renco M., Cerevkova A., Homolova Z., Gömöryova E. Long-term effects on soil nematode community structure in spruce forests of removing or not removing fallen on soil nematode communities after a windstorm. *Forest Ecology and Management*. 2015;356:243–252.
38. Scheiner S.M., Gurevitch J. *Design and Analysis of Ecological Experiments*. New York: Chapman & Hall, 2001.
39. Kozlov M.V. *Planirovanie ekologicheskikh issledovaniy: teoriya i prakticheskie rekomendatsii* = Environmental Research Planning: Theory and Practical Recommendations. Moscow: KMK, 2014:171. (In Russ.)
40. Yeates G.W. Soil nematodes in terrestrial ecosystems. *Russian Journal of Nematology*. 1979;11:213–229.
41. Dahlin P., Edera R., Consolia E. [et al.]. Integrated control of *Meloidogyne incognita* in tomatoes using fluopyram and *Purpureocillium lilacinum* strain 251. *Crop Protection*. 2019;14:119–124.
42. Sohlenius B. Influence of climatic conditions on nematode coexistence: a laboratory experiment with a coniferous forest soil. *Oikos*. 1985;44:430–438.
43. McSorley R. Extraction of nematodes and sampling methods. *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. Sydney: Academic Press, 1987:13–41.
44. Hallman J., Viaene N. PM 7/119(1) Nematode extraction. *EPPO Bulletin*. 2013;43:471–495.

45. Ryss A.Y. A simple express technique to process nematodes for collection slide mounts. *Journal of Nematology*. 2017;49:27–32.
46. Hoogen J. van den., Geisen S., Wall D.H. [et al.]. A global database of soil nematode abundance and functional group composition. *Scientific Data*. 2020;7:e103.
47. Cesarz S., Schulz A.E., Beugnon R., Eisenhauer N. Testing soil nematode extraction efficiency using different variations of the Baermann-funnel method. *Soil organisms*. 2019;91:61–72.
48. Viglierchio D.R., Yamashita T.T. On the methodology of nematode extraction from field samples: Density flotation techniques. *Journal of Nematology*. 1983;15:444–449.
49. Southey J.F. *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes*. London: H.M. Stationery Off., 1970:148.
50. Cobb N.A. Estimating the nema populations of soil. *USDA Technical Circular*. 1918;1:48.
51. Scheu S., Falca M. The soil food web of two beech forests (*Fagus sylvatica*) of contrasting humus type: stable isotope analysis of a macro- and mesofauna dominated community. *Oecologia*. 2000;123:285–296.
52. Tiunov A.V. Stable isotopes of carbon and nitrogen in soil ecological studies. *Biology Bulletin*. 2007;34:395–407.
53. Kudrin A.A., Tsurikov S.M., Tiunov A.V. Trophic position of microbivorous and predatory soil nematodes in boreal forest as indicated by stable isotope analysis. *Soil Biology and Biochemistry*. 2015;86:193–200.
54. Melody C., Griffiths B., Dyckmans J., Schmidt O. Stable isotope analysis ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of soil nematodes from four feeding groups. *PeerJ*. 2016;4:1–19
55. Potapov A.M., Tiunov A.V., Scheu S. Uncovering trophic positions and food resources of soil animals using bulk natural stable isotope composition. *Biological Reviews*. 2019;94:37–59.
56. Potapov A.M., Rozanova O.L., Semenina E.E. [et al.]. Size compartmentalization of energy channeling in terrestrial belowground food webs. *Ecology*. 2021;102:e03421.
57. Sticht C., Schrader S., Giesemann A., Weigela H. Sensitivity of nematode feeding types in arable soil to free air CO_2 enrichment (FACE) is crop specific. *Pedobiologia*. 2009;52:337–349.
58. Rubtsova T.V., Moens M., Subbotin S.A. PCR amplification of a rRNA gene fragment from formalin fixed and glycerine-embedded nematodes from permanent slides. *Russian Journal of Nematology*. 2005;13:137–140.
59. Dawson M.N., Raskoff K.A., Jacobs D.K. Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. *Molecular marine biology and biotechnology*. 1998;7:145–152.
60. Yoder M., De Ley I.T., King I., Mundo-Ocampo M. DESS: A versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology*. 2006;8:367–376.
61. Seutin G., White B.N., Boag P.T. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology*. 1991;69:82–90.
62. Seinhorst J.W. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*. 1959;4:67–69.
63. Kir'yanov E.S., Krall' E.L. *Paraziticheskie nematody rasteniy i mery bor'by s nimi* = Plant parasitic nematodes and their control measures. Leningrad: Nauka, 1969;1:522. (In Russ.)
64. Kerfahi D., Tripathi B. M., Porazinska D.L. [et al.]. Do tropical rain forest soils have greater nematode diversity than high Arctic tundra? A metagenetic comparison of Malaysia and Svalbard. *Global Ecology Biogeography*. 2016;25:716–728.
65. Geisen S., Snoek L.B., Hooven F.C. ten. [et al.]. Integrating quantitative morphological and qualitative molecular methods to analyse soil nematode community responses to plant range expansion. *Methods in Ecology and Evolution*. 2018;9:1366–1378.
66. Treonis A.M., Unangst S.K., Kepler R.M. [et al.]. Characterization of soil nematode communities in three cropping systems through morphological and DNA metabarcoding approaches. *Scientific Reports*. 2018;8:e2004.
67. Kitagami Y., Obase K., Matsuda Y. High-throughput sequencing and conventional morphotyping show different soil nematode assemblages but similar community responses to altitudinal gradients on Mt. Ibuki, Japan. *Pedobiologia*. 2021;90:e150788.
68. Taberlet P., Coissac E., Pompanon F. [et al.]. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Modern Ecology*. 2012;21:2045–2050.
69. Straub D., Blackwell N., Langarica-Fuentes A. [et al.]. Interpretations of environmental microbial community studies are biased by the selected 16S rRNA (Gene) amplicon sequencing pipeline. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:e2652.
70. Tedersoo L., Bahram M., Zinger L. [et al.]. Best practices in metabarcoding of fungi: From experimental design to results. *Molecular Ecology*. 2022;31:2769–2795.
71. Sapkota R., Nicolaisen M. High-throughput sequencing of nematode communities from total soil DNA-extractions. *BMC Ecol*. 2015;15:e3.
72. Peham T., Steiner F. M., Schlick-Steiner B.C., Arthofer W. Are we ready to detect nematode diversity by next generation sequencing? *Ecology and Evolution*. 2017;7:4147–4151.
73. Semenov M.E. Metabarcoding and metagenomics in soil-ecological research: progress, problems and opportunities. *Zhurnal obshchey biologii* = Journal on general biology. 2019;80:403–417. (In Russ.)
74. Griffiths B.S., Groot G.A. de, Laros I. [et al.]. The need for standardisation: Exemplified by a description of the diversity, community structure and ecological indices of soil nematodes. *Ecological Indicator*. 2018;87:43–46.

75. Waeyenberge L., De Sutter N., Viaene N., Haegeman A. New insights into nematode DNA-metabarcoding as revealed by the characterization of artificial and spiked nematode communities. *Diversity*. 2019;11:e52.
76. Sikder M., Vestergård M., Sapkota R. [et al.]. Evaluation of metabarcoding primers for analysis of soil nematode communities. *Diversity*. 2020;12:e388.
77. Ahmed M., Back M.A., Prior T. [et al.]. Metabarcoding of soil nematodes: The importance of taxonomic coverage and availability of reference sequences in choosing suitable marker(s). *Metabarcoding Metagenomics*. 2019;3:e36408.
78. Kawanobe M., Toyota K., Ritz K. Development and application of a DNA metabarcoding method for comprehensive analysis of soil nematode communities. *Applied Soil Ecology*. 2021;166:e103974.
79. Porazinska D.L., Giblin-Davis R.M., Faller L.L. [et al.]. Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity. *Molecular Ecology Resources*. 2009;9:1439–1450.
80. Creer S., Fonseca V.G., Porazinska D.L. [et al.]. Ultrasequencing of the meiofaunal biosphere: Practice, pitfalls and promises. *Molecular Ecology*. 2010;19:4–20.
81. Fonseca V.G., Carvalho G.R., Nichols B. [et al.]. Metagenetic analysis of patterns of distribution and diversity of marine meiobenthic eukaryotes. *Global Ecology and Biogeography*. 2014;23:1293–1302.
82. Bik H.M., Sung W.A.Y., De Ley P. [et al.]. Metagenetic community analysis of microbial eukaryotes illuminates biogeographic patterns in deep-sea and shallow water sediments. *Molecular Ecology*. 2012;21:1048–1059.
83. Hadziavdic K., Lekang K., Lanzen A. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLOS One*. 2014;9:e87624.
84. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P. [et al.]. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 2013;41:590–596.
85. Guillou L., Bachar D., Audic S. [et al.]. The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Research*. 2013;41:597–604.
86. Database resources of the National Center for Biotechnology Information NCBI Resource Coordinators. *Nucleic Acids Research*. 2016;44:7–19.
87. Freckman D.W. Bacterivorous nematodes and organic matter decomposition. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 1988;24:195–217.
88. Burger J. Bioindicators: a review of their use in the environmental literature 1970–2005. *Environ Bioindic.* 2006;1:136–144.
89. Ferris H. *Nemaplex, the “Nematode-Plant Expert Information System”: A Virtual Encyclopedia on Soil and Plant Nematodes*. Davis: University of California, 2019. Available at: <http://nemaplex.ucdavis.edu/>
90. Puissant J., Villenave C., Chauvin C. [et al.]. Quantification of the global impact of agricultural practices on soil nematodes: a meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*. 2021;161:e108383.
91. Wasilewska L. The effect of age of meadows on succession and diversity in soil nematode communities. *Pedobiologia*. 1994;38:1–11.
92. Korthals G.W., Popovici I., Iliev I., Lexmond T.M. Influence of perennial ryegrass on a copper and zinc affected terrestrial nematode community. *Applied Soil Ecology*. 1998;10:73–85.
93. Sushchuk A.A. *Pochvennye nematody transformirovannykh ekosistem Karelii* = Soil nematodes of transformed ecosystems of Karelia. PhD abstract. Syktyvkar, 2009:22. (In Russ.)
94. Blakely J.K., Neher D.A., Spongberg A.L. Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Applied Soil Ecology*. 2002;21:71–88.
95. Pen-Mouratov S., Shukurov N., Steinberger Y. Influence of industrial heavy metal pollution on soil free-living nematode population. *Environment Pollution*. 2008;152:172–183.
96. Forge T.A., Simard S.W. Structure of nematode communities in forest soils of southern British Columbia: relationships to nitrogen mineralization and effects of clear-cut harvesting and fertilization. *Biology and Fertility of Soils*. 2001;34:170–178.
97. Yeates G.W. Modification and qualification of the nematode Maturity Index. *Pedobiologia*. 1994;38:97–101.
98. Wasilewska L. The relationship between the diversity of soil nematode communities and the plant species richness of meadows. *Ekologia Polska*. 1997;45:719–732.
99. Freckman D.W., Ettema C.H. Assessing nematode communities in agroecosystems of varying human intervention. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 1993;45:239–261.
100. Bongers T., Korthals G. The behavior of MI and PPI under enriched conditions. *Nematologica*. 1995;41:286.
101. Neher D.A., Campbell C.L. Nematode communities and microbial biomass in soils with annual and perennial crops. *Applied Soil Ecology*. 1994;1:17–28.
102. Ferris H., Bongers T. Nematode indicators of organic enrichment. *Journal of Nematology*. 2006;38:3–12.
103. Yeates G.W., Bongers T., De Goede R.G.M. [et al.]. Feeding habits in soil nematode families and genera. An outline for soil ecologists. *Journal of Nematology*. 1993;25:315–331.
104. Ruess L. Studies on the nematode fauna of an acid forest soil: spatial distribution and extraction. *Nematologica*. 1995;41:229–239.
105. Okada H., Kadota I. Host status of 10 fungal isolates for two nematode species, *Filenchus misellus* and *Aphelenchus avenae*. *Soil Biology and Biochemistry*. 2003;35:1601–1607.

106. Yeates G.W. Nematodes as soil indicators: functional and biodiversity aspects. *Biology and Fertility of Soils*. 2003;37:199–210.
107. Odum E.P. Trends expected in stressed ecosystems. *BioScience*. 1985;35:419–422.
108. Van Veen J.A., Kuikman P. Soil structural aspects of decomposition of organic matter by micro-organisms. *Biogeochemistry*. 1990;11:213–233.
109. Wardle D.A., Yeates G.W. The dual importance of competition and predation as regulatory forces in terrestrial ecosystems, evidence from decomposer food-webs. *Oecologia*. 1993;93:303–306.
110. Briar S.S., Barker C., Tenuta M., Entz M.H. Soil nematode responses to crop management and conversion to native grasses. *Journal of Nematology*. 2012;44:245–254.
111. Ferris H. Form and function: metabolic footprints of nematodes in the soil food web. *European Journal of Soil Biology*. 2010;46:97–104.
112. Sieriebriennikov B., Ferris H., Goede R.G.M. de. NINJA: An automated calculation system for nematode-based biological monitoring. *European Journal of Soil Biology*. 2014;61:90–93.
113. Bongers T., Goede R.G.M. de, Korthals G.W., Yeates G.W. Proposed changes of c-p classification for nematodes. *Russian Journal of Nematology*. 1995;3:61–62.
114. Song D., Pan K., Tariq A. [et al.]. Large-scale patterns of distribution and diversity of terrestrial nematodes. *Applied Soil Ecology*. 2017;114:161–169.
115. Ruess L. Nematode soil faunal analysis of decomposition pathways in different ecosystems. *Nematology*. 2003;5:179–181.
116. Kudrin A.A., Konakova T.N., Taskaeva A.A. Communities of soil nematodes of various tundra phytocenoses differing in the degree of development of the shrub layer. *Ekologiya = Ecology*. 2019;(6):419–428. (In Russ.)
117. Gruzdeva L.I., Kovalenko T.E., Matveeva E.M. Peculiarities of the Nematode Fauna of the Islands of the Kuzov Archipelago in the White Sea. *Problemy izucheniya, ratsional'nogo ispol'zovaniya i okhrany resursov Belogo morya: materialy IX Mezhdunar. konf., Petrozavodsk, 11–14 oktyabrya 2004 g.* = Problems of studying, rational use and protection of the resources of the White Sea: proceedings of the X International. Conference, Petrozavodsk, October 11–14, 2004. Petrozavodsk: KarNTs RAN, 2005:81–86. (In Russ.)
118. Peneva V., Lazarova S., Elshishka M. [et al.]. Nematode assemblages of hair-grass (*Deschampsia spp.*) microhabitats from polar and alpine deserts in the Arctic and Antarctic. *Species and Communities in extreme environment*. Sofia: Pensoft Publishers; Moscow: KMK Scientific Press, 2009:419–438.
119. Okada H., Niwa S., Takemoto S. [et al.]. How different or similar are nematode communities between a paddy and an upland rice field across a flooding-drainage cycle? *Soil Biology and Biochemistry*. 2011;43:2142–2151.
120. Kudrin A.A., Lapteva E.M., Dolgin M.M. The complex of soil nematodes in the floodplain forests of the Pechora river valley. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya = Theoretical and applied ecology*. 2011;(2):75–83. (In Russ.)
121. Vonk J.A., Breure A.M., Mulder C. Environmentally-driven dissimilarity of trait-based indices of nematodes under different agricultural management and soil types. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2013;179:133–138.
122. Wei C., Zheng H., Li Q. [et al.]. Nitrogen addition regulates soil nematode community composition through ammonium suppression. *PLOS One*. 2012;7:e43384.
123. Matveeva E.M., Sushchuk A.A. Peculiarities of Soil Nematode Communities in Different Types of Natural Biocenoses: Informativeness of Parameters. *Izvestiya RAN. Ser. Biologicheskaya = Proceedings of RAS. Biological series*. 2016;(5):551–560. (In Russ.)