

ЗООЛОГИЯ

Научная статья

УДК 595.142.34:57.06:543.424

doi: 10.17072/1994-9952-2023-2-147-157

**Исследование различий ИК-спектров дождевых червей как
возможный способ их таксономической идентификации**

**С. Ю. Князев¹, К. А. Бабий¹, Е. В. Голованова¹, Д. В. Соломатин¹,
Е. А. Сарф¹, Л. В. Бельская¹**

¹ Омский государственный педагогический университет, Омск, Россия

Автор, ответственный за переписку: Станислав Юрьевич Князев, labinvert@omgpu.ru

Аннотация. Цель данного исследования – оценка принципиальной возможности таксономической идентификации дождевых червей на основании изучения функционально-группового состава их тел методом ИК-Фурье спектроскопии. Объектами исследования послужили дождевые черви 7 видов из 5 родов: *Aporrectodea caliginosa*, *Eisenia fetida*, *E. nordenskioldi*, *E. ventripapillata*, *Lumbricus rubellus*, *Rhiphaeodrilus diplotetrathecus*, *Octolasion lacteum*. ИК-спектры поглощения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре «ФТ-801» в диапазоне 500–4 000 см⁻¹. На всех спектрах определены положение, интенсивность и площадь полос поглощения, установлены максимальные различия между отдельными видами по интенсивности и положению полос поглощения белков и нуклеиновых кислот. Метод главных компонент показал, что в основе классификации лежат характеристики полос поглощения валентных и деформационных колебаний метильных и метиленовых групп, а также амидных групп в структуре червей. При этом разделение дождевых червей на подгруппы с близкими спектральными характеристиками может быть объяснено несколькими причинами: их происхождением, родством и влиянием среды. Полученные в ходе исследования данные подтверждают возможность использования ИК-спектроскопии для идентификации дождевых червей.

Ключевые слова: дождевые черви, таксономическая идентификация, ИК-Фурье спектроскопия

Для цитирования: Исследование различий ИК-спектров дождевых червей как возможный способ их таксономической идентификации / С. Ю. Князев, К. А. Бабий, Е. В. Голованова, Д. В. Соломатин, Е. А. Сарф, Л. В. Бельская // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2023. Вып. 2. С. 147–157. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-2-147-157>.

Благодарности: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-20034) и Минпрома Омской области (грант № 32-С от 22.06.2022).

ZOOLOGY

Original article

**Investigation of differences in the IR spectra of earthworms
as a possible way of their taxonomic identification**

**S. Yu. Kniazev¹, K. A. Babiy¹, E. V. Golovanova¹, D. V. Solomatin¹, E. A. Sarf¹,
L. V. Bel'skaya¹**

¹ Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia

Corresponding author: Stanislav Yu. Kniazev, labinvert@omgpu.ru

Abstract. IR spectrometry is successfully used for the taxonomic identification of various groups of invertebrates: butterflies, flies, grasshoppers, mosquitoes, weevils, and termites. Therefore, the purpose of this study was to assess the fundamental possibility of taxonomic identification of earthworms based on the study of the functional-group composition of their bodies by the method of IR-Fourier spectroscopy. Seven species of earthworms from five genera were the objects of the study: *Aporrectodea caliginosa*, *Eisenia fetida*, *Eisenia nordenskioldi*, *Lumbricus rubellus*, *Rhiphaeodrilus diplotetrathecus*, *Octolasion lacteum*, *Eisenia ventripapillata*. IR absorption spectra were registered on an FT-801 IR-Fourier spectrometer in the range of 500–4000 cm⁻¹. The position, intensity, and area of the absorption bands were determined on all spectra. The maximum differences between individual species in intensity and position of protein and nucleic acid absorption bands were established. Using the principal component method, it was shown that the classification was based on the characteris-

tics of the absorption bands of stretching and bending vibrations of methyl and methylene groups, as well as amide groups in the structure of worms. At the same time, the division of earthworms into subgroups with similar spectral characteristics could be explained by several reasons: their origin, kinship, and the influence of the environment. The data obtained during the study confirm the possibility of using IR spectrometry for the identification of earthworms.

Keywords: earthworms, taxonomic identification, FT-IR spectroscopy

For citation: Kniazev S. Yu., Babiy K. A., Golovanova E. V., Solomatin D. V., Sarf E. A., Bel'skaya L. V. [Investigation of differences in the IR spectra of earthworms as a possible way of their taxonomic identification]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 2 (2023): pp. 147-157. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2023-2-147-157>.

Acknowledgments this research was funded by the Russian Science Foundation (grant No. 22-14-20034) and the Ministry of Industry and Scientific and Technical Development of the Omsk Region (grant No. 32-C dated 22.06.2022).

Введение

Дождевые черви являются ключевыми “инженерами”, управляющими рядом экосистемных функций почвы, такими как круговорот питательных веществ [Lavelle et al., 2016], разложение опада [Blouin et al., 2013] и эмиссия парниковых газов [Lubbers et al., 2013]. Чтобы оценить влияние дождевых червей на обеспечение этих функций, необходима их таксономическая идентификация, которая традиционно основана на морфологических особенностях, однако она трудоемка и требует определенной квалификации. А определение неполовозрелых и поврежденных особей часто невозможно, из-за чего они не используются в исследованиях [Richard et al., 2010]. Поэтому молекулярные подходы, такие, как анализ ДНК, стали использоваться как альтернативный инструмент для идентификации дождевых червей [Shekhovtsov et al., 2017] или разделения морфологически схожих видов [Shekhovtsov et al., 2016]. Несмотря на технологическое развитие и снижение стоимости оборудования и реактивов для проведения секвенирования [Gautier et al., 2018; Srivathsan et al., 2019], анализ ДНК редко применяется в исследованиях из-за высокой стоимости, поэтому существует необходимость использовать недорогие и доступные методы идентификации таксонов (видов) дождевых червей с помощью более дешевых альтернативных молекулярных подходов [Vaupel, Hommel, Beule, 2022] или метабомики, которая основана на методах аналитической химии, анализирующей глобальный метаболический профиль объекта [Rodríguez-Fernández et al., 2010]. Одним из самых дешевых, надежных и почти мгновенных методов является инфракрасная (ИК) спектроскопия [Raupach et al., 2016].

Возможности использования ИК-спектроскопии для таксономической идентификации установлены в различных областях [Rodríguez-Fernández et al., 2010; Vance et al., 2016], в том числе для бабочек [Tao et al., 2018], мух-дрозофил [Aw, Dowell, Ballard, 2012], прямокрылых [Da Silva, Gutjahr, De Moraes, 2018], комаров [Sikulu, 2014], долгоносиков [Johnson, 2022] и термитов [Jouquet et al., 2018]. Поэтому целью данного исследования являлось изучение химического состава тел дождевых червей разных родов и видов методом инфракрасной спектроскопии для установления возможности его использования в таксономической идентификации дождевых червей.

Материал и методы исследования

Сбор дождевых червей

Объектами исследования послужили дождевые черви 7 видов из 5 родов: *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826), *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), *Eisenia nordenskioldi* (Eisen, 1879), *Eisenia ventripapillata* Perel, 1985, *Lumbricus rubellus* Hoffmeister, 1843, *Rhiphaeodrilus diplotetrathecus* (Perel, 1967), *Octolasion lacteum* (Orley, 1885). Дождевые черви были собраны на 4 участках: в окрестностях с. Черноручье (Омский р-н, Омская обл., N 55°16'33.6", E 73°02'35.3"); на исследовательском поле полевого стационаре Омского государственного педагогического университета (г. Омск, N 55°02'38.9", E 73°22'52.4"); на территории Парка культуры и отдыха им. 30-летия Победы (г. Омск, N 54°57', E 73°21'); в окрестностях д. Хомутовки (городской округ Первоуральск, Свердловская обл., N 56°51'37.7", E 59°46'02.8").

Инкубационный эксперимент. Подготовка образцов

Для изучения состава тела дождевых червей мы поместили их в 14 двухлитровых пластиковых контейнеров с перфорированными крышками, по два микрокосма на каждый вид. Микрокосмы были заполнены 1.5 л почвы, очищенной от макрофауны с помощью сит с диаметром ячейки 4 мм. Во всех микрокосмах в качестве подстилки использовалась сухая листва *Populus tremula* L. по 9.00 ± 0.05 г. Таким образом мы нивелировали влияние типа почвы и опада на состав тела червей. Почву в микрокосмах поли-

вали одинаковым количеством дистиллированной воды, чтобы поддерживать влажность на уровне 50%. В каждый микрокосм добавляли по 8 особей дождевых червей. В микрокосмах дождевые черви содержались в течение 90 сут., и каждые 30 дней производилась замена почвы. Затем их промывали дистиллированной водой. Для очистки кишечника содержали пять суток в отдельных контейнерах по 2 особи на фильтровальной бумаге, которую меняли по мере загрязнения. После этого их замораживали на 24 ч., заранее удалив последние сегменты тела, так как они часто содержали остатки почвы. Далее червей высушивали при температуре 60°C в течение 48 ч. и потом измельчали в порошок. Всего было подготовлено по 6 образцов каждого вида по 2–3 особи на один образец.

Метод получения и предварительной обработки ИК-спектров

Порошки исследовали в таблетках, спрессованных в смеси с бромистым калием (соотношение 1:100, диаметр 3.5 мм). В качестве опорного использован спектр чистого бромистого калия, предварительного высушенного при температуре ~600°C в течение 6 ч. ИК-спектры поглощения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре «ФТ-801» (СИМЕКС) в диапазоне 500–4000 см^{-1} (число сканов 32, разрешение 4 см^{-1}). Коррекция базовой линии и нормализация спектров произведены с использованием программного обеспечения ZaIR 3.5 (СИМЭКС). На всех спектрах определяли положение, интенсивность и площадь полос поглощения (ПП).

Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft) непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах – U-критерия Манна-Уитни. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Для определения видовой близости состава тела дождевых червей использовали метод Уорда для построения кластерной древовидной диаграммы с евклидовой мерой сходства. Анализ методом главных компонент (PCA) был выполнен в программном пакете R (package “FactoMinerR”) [Le, Josse, Husson, 2008].

Результаты и их обсуждение

Типичный ИК-спектр червя приведен на рис. 1. Показано, что в его структуре присутствуют функциональные группы белков (1 315–1 638 см^{-1}), липидов (2 873–2 960 см^{-1}) и нуклеиновых кислот (617–1 233 см^{-1}). Детальная расшифровка ИК-спектров приведена в табл. 1. В целом по функционально-групповому составу исследуемые виды близки, основные отличия наблюдаются для ПП 617 см^{-1} , 1 053–1 080 см^{-1} и 1 619–1 638 см^{-1} (рис. 2). ПП 1 053 см^{-1} , которая появляется дополнительно на ИК спектрах червей вида *R. diplotetrathecus* и *E. ventripapillata*, соответствует колебаниям $\nu\text{C-O}$ и $\delta\text{C-O}$ углеводов. Некоторая сходность исследуемых видов по функционально-групповому составу может быть объяснена сходством среды обитания, так как червей перед анализом содержали 90 дней в лабораторных условиях в одинаковой почве и на одинаковой подстилке для нивелирования разницы в контрастности условий обитания, так как ранее для термитов [Jouquet et al., 2018] и дождевых червей [Pham et al., 2021] была установлена зависимость функционально-группового состава ИК-спектров от среды обитания и типа почвы. В то же время копролиты дождевого червя *Andiodrilus pachoensis* (Michaelsen, 1900) существенно различались по характеристикам ИК-спектров в зависимости от расположения участка и состава растительного покрова [Velasquez et al., 2007].

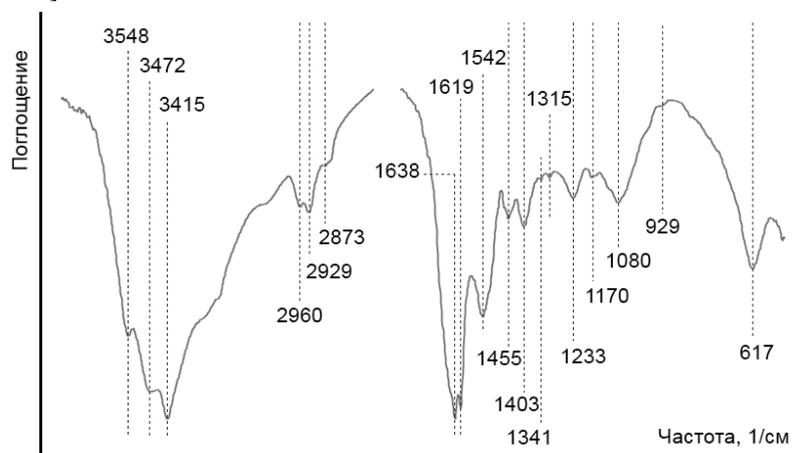


Рис. 1. Типичный ИК-спектр дождевого червя

[Typical IR-spectrum of an earthworm]

Основные ПП на ИК-спектрах дождевых червей
 [Main absorption bands in the IR spectra of earthworms]

ПП, см ⁻¹	Расшифровка	ПП, см ⁻¹	Расшифровка
617	Кольцевая деформация фенила	1 542	δ N-H, ν C-N (Амид II)
929	Левосторонняя спираль ДНК (Z-форма)	1 619	ν C=O (Амид I) β -pleated sheets
1 080	ν PO ₂ (коллаген и фосфолипидные группы нуклеиновых кислот)	1 638	ν C=O (Амид I) α -helical protein
1 170 (1 156)	ν C-O of proteins and carbohydrates	2 873	ν_s CH ₃ (липиды)
1 233	δ N-H, ν C-N (Амид III) ν_{as} PO ₂ (нуклеиновые кислоты)	2 929	ν_{as} CH ₂ (липиды)
1 315	Амид III (белки, коллаген)	2 960	ν_{as} CH ₃ (липиды, ДНК, белки)
1 341	CH ₂ wagging (коллаген)	3 415	Stretching O-H asymmetric
1 403	ν C-N, δ N-H, δ C-H	3 472	Stretching O-H asymmetric
1 455	δ_{as} CH ₃ , δ CH ₂	3 548	Stretching O-H

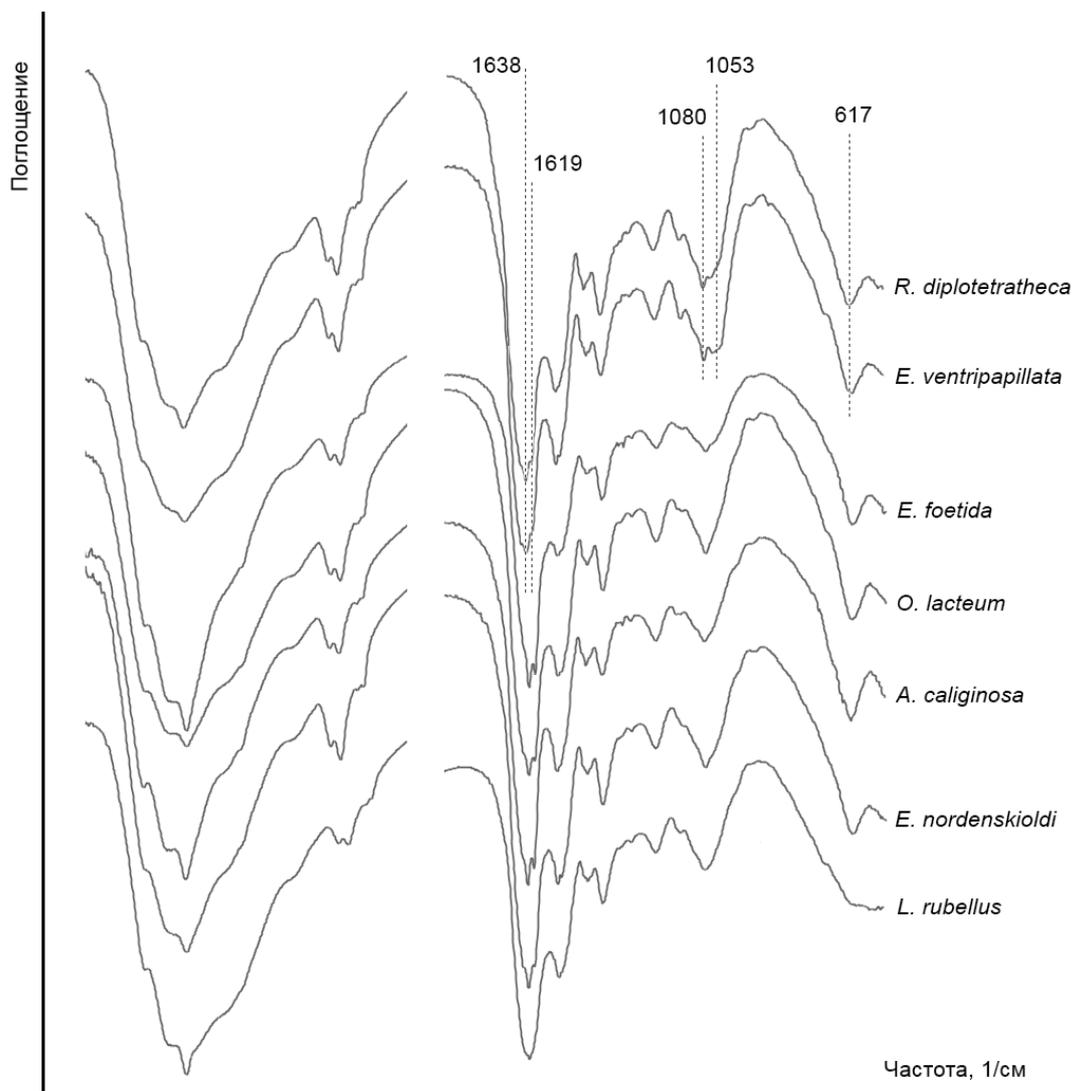


Рис. 2. Примеры ИК-спектров разных видов дождевых червей
 [Examples of IR spectra of different species of earthworms]

Выявлено, что частота встречаемости ПП на ИК-спектрах червей различных видов неодинакова (табл. 2). Так, ПП 930 и 1338 см^{-1} не обнаружены для вида *L. rubellus*, ПП 1355 см^{-1} для вида *E. ventripapillata*. ПП 1053 см^{-1} характерна для видов *R. diplotetrathecus* и *E. ventripapillata* и т.д. (табл. 2). В исследовании Фама с соавторами [Pham et al., 2021] виды червей *Lumbricus terrestris* Linnaeus, 1758, *Allolobophora chlorotica* (Savigny, 1826), *A. caliginosa* и *Aporrectodea icterica* (Savigny, 1826) также различались между собой по полосам поглощения в основном в областях 3 500–3 000 и <1 800 см^{-1} .

Таблица 2

Частота встречаемости ПП на ИК-спектрах дождевых червей различных видов
[Frequency of occurrence of absorption bands in the IR spectra of earthworms of different species]

ПП, см^{-1}	<i>A. caliginosa</i>	<i>E. fetida</i>	<i>E. nordenskioldi</i>	<i>L. rubellus</i>	<i>R. diplotetrathecus</i>	<i>O. lacteum</i>	<i>E. ventripapillata</i>
614	100	50	33	67	100	100	50
930	33	100	100	0	100	100	100
1053	0	0	0	0	100	0	100
1080	100	100	100	100	100	100	100
1156	100	100	100	100	100	100	100
1236	100	100	100	100	100	100	100
1315	100	100	50	100	100	100	100
1338	100	100	33	0	67	33	83
1355	33	100	83	50	50	67	0
1407	100	100	100	100	100	100	100
1455	100	100	100	100	100	100	100
1547	100	100	100	100	100	100	100
1620	33	50	0	0	33	33	0
1640	100	100	100	100	100	100	100
2874	67	0	0	0	50	67	50
2929	100	100	100	100	100	100	100
2960	100	100	100	100	100	100	100
3418	100	50	33	100	100	100	100
3469	33	33	0	0	17	0	0
3546	83	17	0	0	17	0	0

Характеристики ПП, которые идентифицированы на ИК-спектрах всех изученных видов дождевых червей, приведены в открытом доступе на Figshare по адресу <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.21855450.v1>

С целью выявления сходств и различий между ИК спектрами разных видов червей проведен кластерный анализ (рис. 3).

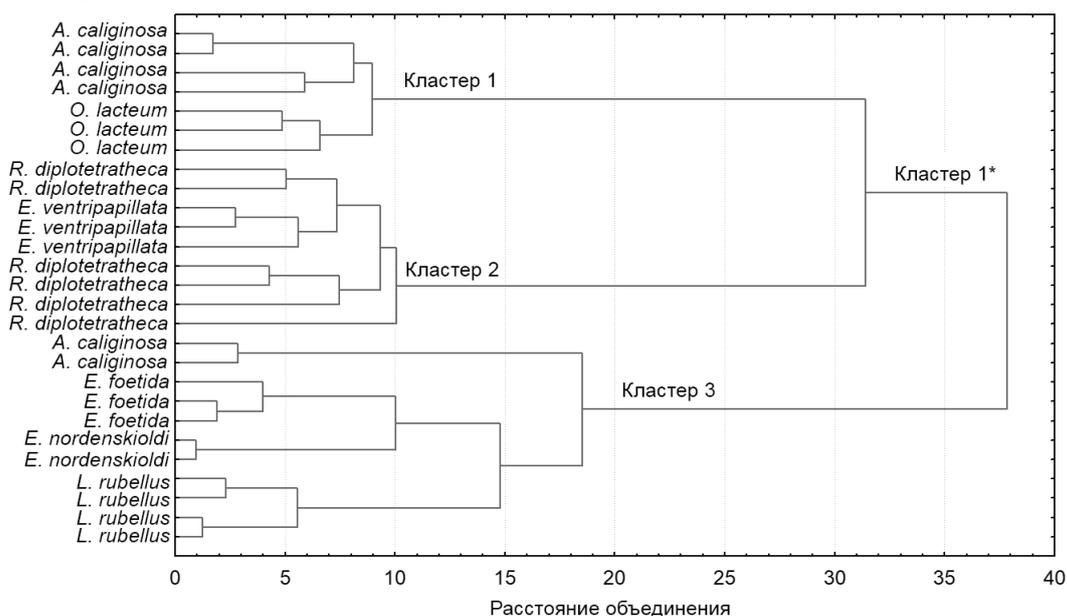


Рис. 3. Результаты кластерного анализа
 [Results of cluster analysis]

Только для вида *A. caliginosa* отмечено попадание в разные кластеры, остальные виды показали четкое разделение: *A. caliginosa* + *O. lacteum* (кластер 1), *R. diplotetrathecus* + *E. ventripapillata* (кластер 2), *E. fetida* + *E. nordenskioldi* + *L. rubellus* (кластер 3) (рис.3). При укрупненном рассмотрении все виды кластеров 1 и 2 формируют единый кластер (кластер 1*).

Разделение дождевых червей на кластеры (рис. 3 и рис. 4) может быть объяснено несколькими причинами: их происхождением, родством и влиянием среды. *A. caliginosa* и *O. lacteum* являются европейскими по происхождению дождевыми червями, которые обитают и питаются непосредственно в почве [Tiunov et al., 2006]. *E. fetida* и *E. nordenskioldi* – филогенетически близкие друг к другу виды [Latif, Malek, Csuzdi, 2017], а некоторая их обособленность может быть вызвана разницей в происхождении. Согласно данным С. Csuzdi, J. Koo, Y. Hong [2022] род *Eisenia* формирует два субклада: один европейский, куда входит *E. fetida*, другой состоит из азиатских таксонов, включая *E. nordenskioldi*. Поэтому объединение этих четырех видов в два кластера видится закономерным. Попадание *L. rubellus* в кластер к *E. fetida* + *E. nordenskioldi* можно объяснить активным потреблением опада осины всеми тремя видами.

Объединение двух горных эндемиков *R. diplotetrathecus* [Перель, 1979; Vorobeichik et al., 2021] и *E. ventripapillata* [Перель, 1985] в один кластер можно объяснить сходными условиями обитания в горной местности при формировании видовых особенностей.

Попадание *A. caliginosa* (рис. 3) в два разных кластера может быть обусловлено тем, что некоторые особи могли потреблять больше подстилки, чем другие, так как отмечена его способность переходить к активному потреблению подстилки в лабораторных условиях, подобно подстилочным видам [van Groenigen et al., 2019].

Близкие результаты получены при многомерной оценке полученных данных методом главных компонент (PCA) (рис. 4).

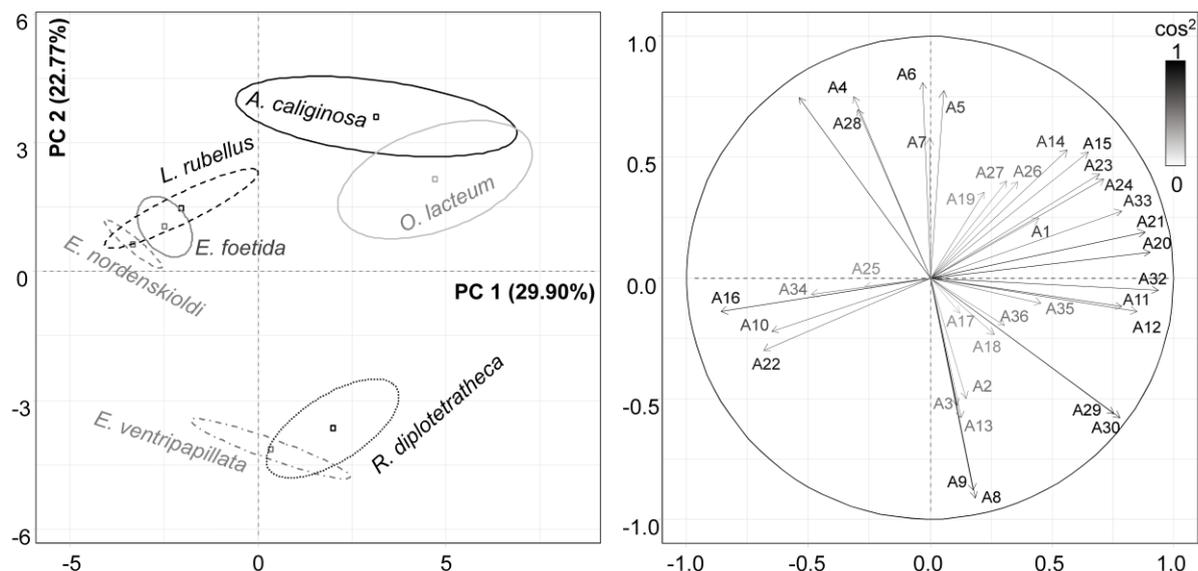


Рис. 4. Факторные карты образцов (А) и переменных (Б).

A1 – X 617, A2 – H 617, A3 – S 617, A4 – X 1080, A5 – H 1080, A6 – S 1080, A7 – X 1156, A8 – H 1156, A9 – S 1156, A10 – X 1236, A11 – H 1236, A12 – S 1236, A13 – X 1315, A14 – H 1315, A15 – S 1315, A16 – X 1407, A17 – H 1407, A18 – S 1407, A19 – X 1455, A20 – H 1455, A21 – S 1455, A22 – X 1547, A23 – H 1547, A24 – S 1547, A25 – X 1640, A26 – H 1640, A27 – S 1640, A28 – X 2929, A29 – H 2929, A30 – S 2929, A31 – X 2960, A32 – H 2960, A33 – S 2960, A34 – X 3418, A35 – H 3418, A36 – S 3418. X – положение ПП, H – высота ПП, S – площадь ПП

[Factor map of samples (A) and factor map of variables (B). X is the position of the absorption band, H is the height of the absorption band, S is the area of the absorption band]

Показано, что вся выборка разделяется на 3 подгруппы: *A. caliginosa* + *O. lacteum*, *R. diplotetrathecus* + *E. ventripapillata*, *E. fetida* + *E. nordenskioldi* + *L. rubellus* (рис. 4а). Первые два компонента выражают 52.66% общей инерции набора данных. Первая главная компонента разделяет группы относительно вертикальной оси, вторая главная компонента – относительно горизонтальной оси. Вклад характеристик ИК-спектров в разделение подгрупп показан в табл. 3. Максимальный вклад в разделение подгрупп *A. caliginosa* + *O. lacteum* и *R. diplotetrathecus* + *E. ventripapillata* от *E. fetida* + *E. nordenskioldi* + *L. rubellus* вносят ПП 2960, 2929, 1547, 1455, 1407, 1355 и 1236 см⁻¹, при этом положительные коэффициенты кор-

реляции отмечены с высотой и площадью соответствующих ПП, тогда как отрицательные – с положением ПП (табл. 3).

Таблица 3

Коэффициенты корреляции характеристик ПП
[Correlation coefficients of characteristics of absorption bands]

PC1		PC2			
Характеристика ПП		Коэффициент корреляции	Характеристика ПП		Коэффициент корреляции
A32	H 2960	0.9384	A6	S 1080	0.8095
A20	H 1455	0.9047	A5	H 1080	0.7742
A21	S 1455	0.8819	A4	X 1080	0.7520
A12	S 1236	0.8517	A31	X 2960	0.7473
A33	S 2960	0.7870	A28	X 2929	0.6979
A11	H 1236	0.7864	A7	X 1156	0.5804
A30	S 2929	0.7801	A14	H 1315	0.5294
A29	H 2929	0.7552	A15	S 1315	0.5205
A24	S 1547	0.7150	A3	S 617	-0.5285
A23	H 1547	0.6954	A29	H 2929	-0.5632
A15	S 1315	0.6498	A30	S 2929	-0.5786
A14	H 1315	0.5625	A13	X 1315	-0.5805
A31	X 2960	-0.5385	A9	S 1156	-0.8805
A10	X 1236	-0.6526	A8	H 1156	-0.9128
A22	X 1547	-0.6858	A16	X 1407	-0.8610

Максимальный вклад в разделение вносят характеристики ПП валентных и деформационных колебаний метильных и метиленовых групп в структуре червей (2 960, 2 929 и 1 455 cm^{-1}) и амидных групп (1 547, 1 407, 1 315 и 1 236 cm^{-1}). Разделение подгрупп *A. caliginosa* + *O. lacteum* *E. fetida* + *E. nordenskioldi* + *L. rubellus* и от *R. diplozetathecus* + *E. ventripapillata* определяется ПП 2 960, 2 929, 1 315, 1 156, 1 080 и 617 cm^{-1} , причем здесь отмечена противоположная тенденция: положительные коэффициенты корреляции выявлены для положения ПП, отрицательные – для высот и площадей ПП. Помимо ПП валентных и деформационных колебаний метильных и метиленовых групп в разделение вносят вклад ПП коллагена и фосфодиэфирных групп нуклеиновых кислот (1 156, 1 080 и 617 cm^{-1}).

Можно было предположить, что дождевые черви могли бы разделиться согласно принадлежности к экологическим группам в соответствии с классификацией экологических категорий Буше [Bouche, 1972], как это произошло в исследовании Фама с соавторами [Pham et al., 2021], когда эпианекический *L. terrestris* был отделен от двух эндогейных видов (*A. caliginosa* и *A. icterica*) и промежуточного вида *A. chlorotica* по первой дискриминантной функции. В нашем исследовании такого разделения закономерно не произошло (см. рис. 4), так как при разработке экологической классификации дождевых червей Буше учитывал морфо-анатомические признаки и экологию [Botinelli et al., 2020] и не учитывал сложный химический состав тела. Таким же образом, экологические категории не отражают влияния дождевых червей на показатели почвы [van Groenigen et al., 2019; Bottinelli, Capowiez, 2021] или же состав производимых ими копролитов [Babiy et al., 2021].

Заключение

В настоящем исследовании показана принципиальная возможность таксономической идентификации дождевых червей на основании изучения функционально-группового состава их тел методом ИК-Фурье спектроскопии. Основные отличия наблюдаются для ПП 617 cm^{-1} , 1 053–1 080 cm^{-1} и 1 619–1 638 cm^{-1} . ПП 1 053 cm^{-1} , которая появляется дополнительно на ИК-спектрах червей видов *R. diplozetathecus* и *E. ventripapillata*, соответствует колебаниям $\nu\text{C-O}$ и $\delta\text{C-O}$ углеводов. При этом для увеличения точности определения видовой принадлежности данным методом необходимо выявить специфические особенности для каждого вида дождевого червя, что планируется сделать на следующем этапе исследования. Для достижения этой цели имеет смысл увеличить размер выборки для получения более точных маркерных характеристик. При этом, возможно, стоит анализировать червей с разных почв и на разных подстилках, чтобы получить надежные маркеры. Другой возможный вариант предполагает выявление специфической части тела дождевого червя, анализ которой даст более четкие видовые признаки и не потребует анализа

всего дождевого червя в целом. Например, если функционально-групповой состав кожно-мускульного мешка будет более видоспецифичным, то это позволит улучшить качество таксономической идентификации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Перель Т.С. Распространение и закономерности распределения дождевых червей фауны СССР. М.: Наука, 1979. 272 с.
2. Перель Т.С. Особенности фауны дождевых червей (Oligochaeta, Lumbricidae) в Алтайских рефугиумах неморальной растительности // Доклады Академии наук СССР. 1985. Т. 283, № 3. С. 752–756.
3. Aw W.C., Dowell F.E., Ballard J.W. Using near-infrared spectroscopy to resolve the species, gender, age, and the presence of Wolbachia infection in laboratory-reared *Drosophila* // G3 (Bethesda). 2012. Vol. 2, № 9. P. 1057–1065. DOI: 10.1534/g3.112.003103.
4. Babiy K.A. et al. What determines ion content of lumbricid casts: soil type, species, or ecological group? // Polish Journal of Ecology. 2021. Vol. 69, № 2. P. 96–110. DOI: 10.3161/15052249PJE2021.69.2.003.
5. Blouin M. et al. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services: earthworm impact on ecosystem services // European Journal of Soil Science. 2013. Vol. 64. P. 161–182. DOI: 10.1111/ejss.12025.
6. Bottinelli N. et al. An explicit definition of earthworm ecological categories - Marcel Bouché's triangle revisited // Geoderma. 2020. Vol. 372. DOI: 10.1016/j.geoderma.2020.114361.
7. Bottinelli N., Capowiez Y. Earthworm ecological categories are not functional groups // Biology and Fertility of Soils. 2021. Vol. 57. P. 329–331. DOI: 10.1007/s00374-020-01517-1.
8. Bouché M. Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. Paris: INRA, 1972. 671 p.
9. Csuzdi C., Koo J., Hong Y. The complete mitochondrial DNA sequences of two sibling species of lumbricid earthworms, *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) (Annelida, Crassicitellata): comparison of mitogenomes and phylogenetic positioning // ZooKeys. 2022. Vol. 1097. P. 167–181. DOI: 10.3897/zookeys.1097.80216.
10. Da Silva R., Gutjahr A., De Morais J. Solving taxonomic Orthoptera problems by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): The case of *Aganacris* Walker, 1871 (Tettigoniidae: Phaneropterinae; Scudderini) // Zootaxa. 2018. Vol. 4461. P. 445–450. DOI: 10.11646/zootaxa.4464.3.10.
11. de Azevedo R.A. et al. Discrimination of termite species using near-infrared spectroscopy (NIRS) // European Journal of Soil Biology. 2019. Vol. 93. 103084. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2019.04.002.
12. Gautier M. et al. The genomic basis of color pattern polymorphism in the harlequin ladybird // Current Biology. 2018. Vol. 28. e3297. DOI: 10.1016/j.cub.2018.08.023.
13. Johnson J.B. Discrimination of Gonipterini weevil genera using near infrared spectroscopy // Journal of Near Infrared Spectroscopy. 2022. Vol. 30, № 5. P. 264–269. DOI: 10.1177/09670335221117300.
14. Jouquet P. et al. Potential of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for identifying termite species // European Journal of Soil Biology. 2014. Vol. 60. P. 49–52. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2013.11.004.
15. Jouquet P. et al. Evidence from mid-infrared spectroscopy (MIRS) that the biochemical fingerprints of *Odontotermes obesus* colonies change according to their geographical location and age // Insectes Sociaux. 2018. Vol. 65. P. 77–84. DOI: 10.1007/s00040-017-0589-0.
16. Latif R., Malek R., Csuzdi C. When morphology and DNA are discordant: Integrated taxonomic studies on the *Eisenia fetida/andrei* complex from different parts of Iran (Annelida, Clitellata: Megadrili) // European Journal of Soil Biology. 2017. Vol. 81. P. 55–63. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2017.06.007.
17. Lavelle P. et al. Ecosystem engineers in a self-organized soil: A review of concepts and future research questions // Soil Science. 2016. Vol. 181, № 3–4. P. 91–109. DOI: 10.1097/SS.0000000000000155.
18. Lê S., Josse J., Husson F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis // Journal of Statistical Software. 2008. Vol. 25, № 1. P. 1–18. DOI: 10.18637/jss.v025.i01.
19. Lubbers I.M. et al. Greenhouse-gas emissions from soils increased by earthworms // Nature Climate Change. 2013. Vol. 3. P. 187–194. DOI: 10.1038/nclimate1692.
20. Movasaghi Z., Rehman S., ur Rehman I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues // Applied Spectroscopy Reviews. 2008. Vol. 43, № 2. P. 134–179. DOI: 10.1080/05704920701829043.
21. Pham T. et al. Mid-infrared spectroscopy of earthworm bodies to investigate their species belonging and their relationship with the soil they inhabit // Applied Soil Ecology. 2021. Vol. 162. 103894. DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.103894
22. Raupach M.J. et al. The application of “-omics” technologies for the classification and identification of animals // Organisms Diversity & Evolution. 2016. Vol. 16. P. 1–12. DOI: 10.1007/s13127-015-0234-6.
23. Richard B. et al. Reintegrating earthworm juveniles into soil biodiversity studies: species identification through DNA barcoding // Molecular Ecology Resources. 2010. Vol. 10. P. 606–614. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02822.x.
24. Rodríguez-Fernández J.I. et al. Barcoding without DNA? Species identification using near infrared spectroscopy // Zootaxa. 2010. Vol. 2933. P. 46–54. DOI: 10.11646/zootaxa.2933.1.3.

25. Shekhovtsov S.V. et al. Cryptic genetic lineages in *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae) // *European Journal of Soil Biology*. 2016. Vol. 75. P. 151–156. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2016.06.004.
26. Shekhovtsov S.V. et al. DNA barcoding: how many earthworm species are there in the south of West Siberia? // *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 57–62. DOI: 10.1134/S2079059717010130.
27. Sikulu M.T. Non-destructive near infrared spectroscopy for simultaneous prediction of age and species of two major African malaria vectors: *An. gambiae* and *An. Arabiensis* // *NIR News*. 2014. Vol. 25, № 5. P. 4–6. DOI: 10.1255/nirn.1455.
28. Srivathsan A. et al. 1D MinION Sequencing for large-scale species discovery: 7000 scuttle flies (Diptera: Phoridae) from one site in Kibale national park (Uganda) revealed to belong to > 650 species // *bioRxiv*. 2019. 622365. DOI: 10.1101/622365.
29. Tao D. et al. Accurate identification of the sex and species of silkworm pupae using near infrared spectroscopy // *Journal of Applied Spectroscopy*. 2018. Vol. 85. P. 949–952. DOI: 10.1007/s10812-018-0744-z.
30. Tiunov A.V. et al. Invasion patterns of Lumbricidae into the previously earthworm-free areas of north-eastern Europe and the western Great Lakes region of North America // *Biological Invasions*. 2006. Vol. 8. P. 1223–1234. DOI: 10.1007/s10530-006-9018-4.
31. van Groenigen J.W. et al. How fertile are earthworm casts? A meta-analysis // *Geoderma*. 2019. Vol. 338. P. 525–535. DOI: 10.1016/j.geoderma.2018.11.001.
32. Vance C.K. et al. Near infrared spectroscopy in wildlife and biodiversity // *Journal of near Infrared Spectroscopy*. 2016. Vol. 24. P. 1–25. DOI: 10.1255/jnirs.1199.
33. Vaupel A., Hommel B., Beule L. High-resolution melting (HRM) curve analysis as a potential tool for the identification of earthworm species and haplotypes // *PeerJ*. 2022. Vol. 10. e13661. DOI: 10.7717/peerj.13661.
34. Velasquez E. et al. This ped is my ped: Visual separation and near infrared spectra allow determination of the origins of soil macroaggregates // *Pedobiologia*. Vol. 51, № 1. 2007. P. 75–87. DOI: 10.1016/j.pedobi.2007.01.002.
35. Vorobeichik E. et al. Long-term dynamics of the abundance of earthworms and enchytraeids (Annelida, Clitellata: Lumbricidae, Enchytraeidae) in forests of the Central Urals, Russia // *Biodiversity Data Journal*. 2021. Vol. 9. e75466. DOI: 10.3897/BDJ.9.e75466.

References

1. Perel T.S. *Rasprostranenie i zakonomernosti raspredeleniya dozdevnykh červej fauny SSSR* [Range and distribution of earthworms of the USSR fauna]. Moscow, Nauka Publ., 1979. 272 p. (In Russ.).
2. Perel T.S. [Specific Features of the Earthworm Fauna (Oligochaeta, Lumbricidae) in Altai Refugia of Nemoral Vegetation]. *Doklady Akademii nauk SSSR*. V. 283(3) (1985): pp 752-756. (In Russ.).
3. Aw W.C., Dowell F.E., Ballard J.W. Using near-infrared spectroscopy to resolve the species, gender, age, and the presence of Wolbachia infection in laboratory-reared *Drosophila*. *G3 (Bethesda)*. V. 2(9) (2012): pp. 1057-1065. DOI: 10.1534/g3.112.003103.
4. Babiy K.A., Kniazev S.Yu., Golovanova E.V., Solomatin D.V., Bel'skaya L.V. What determines ion content of lumbricid casts: soil type, species, or ecological group? *Polish Journal of Ecology*. V. 69(2) (2021): pp. 96-110. DOI: 10.3161/15052249PJE2021.69.2.003.
5. Blouin M., Hodson M.E., Delgado E.A., Baker G., Brussaard L., Butt K.R. et al. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services: earthworm impact on ecosystem services. *European Journal of Soil Science*. V. 64 (2013): pp. 161-182. DOI: 10.1111/ejss.12025
6. Bottinelli N., Hedde M., Jouquet P., Capowiez Y. An explicit definition of earthworm ecological categories - Marcel Bouché's triangle revisited. *Geoderma*. V. 372 (2020): 114361. DOI: 10.1016/j.geoderma.2020.114361.
7. Bottinelli N., Capowiez Y. Earthworm ecological categories are not functional groups. *Biology and Fertility of Soils*. V. 57 (2021): pp. 329-331. DOI: 10.1007/s00374-020-01517-1.
8. Bouché, M. *Lombriciens de France. Ecologie et Systematique*. Paris: INRA, 1972. 671 p.
9. Csuzdi C., Koo J., Hong Y. The complete mitochondrial DNA sequences of two sibling species of lumbricid earthworms, *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) (Annelida, Crassielitellata): comparison of mitogenomes and phylogenetic positioning. *ZooKeys*. V. 1097 (2022): pp. 167-181. DOI: 10.3897/zookeys.1097.80216.
10. Da Silva R., Gutjahr A., De Morais J. Solving taxonomic Orthoptera problems by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS): The case of *Aganacris* Walker, 1871 (Tettigoniidae: Phaneropterinae; Scudderini). *Zootaxa*. V. 4461 (2018): pp. 445-450. DOI: 10.11646/zootaxa.4464.3.10.
11. de Azevedo R.A., de Morais J.W., Lang C., de Sales Dambros C. Discrimination of termite species using near-infrared spectroscopy (NIRS). *European Journal of Soil Biology*. V. 93 (2019): 103084. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2019.04.002.

12. Gautier M., Yamaguchi J., Foucaud J., Loiseau A., Ausset A., Facon B. et al. The genomic basis of color pattern polymorphism in the harlequin ladybird. *Current Biology*. V. 28(3296–3302) (2018): e3297. DOI: 10.1016/j.cub.2018.08.023.
13. Johnson J.B. Discrimination of Gonipterini weevil genera using near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. V. 30(5) (2022): pp. 264-269. DOI: 10.1177/09670335221117300.
14. Jouquet P., Capowicz Y., Bottinelli N., Traoré S. Potential of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for identifying termite species. *European Journal of Soil Biology*. V. 60 (2014): pp. 49-52. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2013.11.004.
15. Jouquet P., Pando A., Aroui H., Harit A., Capowicz Y., Bottinelli N. Evidence from mid-infrared spectroscopy (MIRS) that the biochemical fingerprints of *Odontotermes obesus* colonies change according to their geographical location and age e. *Insectes Sociaux*. V. 65 (2018): pp. 77-84. DOI: 10.1007/s00040-017-0589-0.
16. Latif R., Malek M., Csuzdi C. When morphology and DNA are discordant: Integrated taxonomic studies on the *Eisenia fetida/andrei* complex from different parts of Iran (Annelida, Clitellata: Megadrili). *European Journal of Soil Biology*. V. 81 (2017): pp. 55-63. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2017.06.007.
17. Lavelle P., Spain A., Blouin M., Brown G., Decaëns T., Grimaldi M., Jiménez J.J., McKey D., Mathieu J., Velasquez E., Zangerlé A. Ecosystem engineers in a self-organized soil: A review of concepts and future research questions. *Soil Science*. V. 181(3-4) (2016): pp. 91-109. DOI: 10.1097/SS.000000000000155.
18. Lê S., Josse J., Husson F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*. V. 25(1) (2008): pp. 1-18. DOI: 10.18637/jss.v025.i01.
19. Lubbers I.M., van Groenigen K.J., Fonte S.J., Six J., Brussaard L., van Groenigen J.W. Greenhouse-gas emissions from soils increased by earthworms. *Nature Climate Change*. V. 3 (2013): pp. 187-194. DOI: 10.1038/nclimate1692
20. Movasaghi Z., Rehman S., ur Rehman I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. V. 43(2) (2008): pp. 134-179. DOI: 10.1080/05704920701829043.
21. Pham T., Rumpel C., Capowicz Y., Jouquet P., Pelosi C., Pando A., Boukbida H.A., Bottinelli N. Mid-infrared spectroscopy of earthworm bodies to investigate their species belonging and their relationship with the soil they inhabit. *Applied Soil Ecology*. V. 162 (2021): 103894. DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.103894
22. Raupach M.J., Amann R., Wheeler Q.D., Roos C. The application of “-omics” technologies for the classification and identification of animals. *Organisms Diversity & Evolution*. V. 16 (2016): pp. 1-12. DOI: 10.1007/s13127-015-0234-6.
23. Richard B., Decaëns T., Rougerie R., James S.W., Porco D., Hebert P.D.N. Reintegrating earthworm juveniles into soil biodiversity studies: species identification through DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*. V. 10 (2010): pp. 606-614. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02822.x.
24. Rodríguez-Fernández J.I., de Carvalho C.J., Pasquini C., de Lima M.G., Moura M.O., Arízaga G.G.C. Barcoding without DNA? Species identification using near infrared spectroscopy. *Zootaxa*. V. 2933 (2010): pp. 46-54. DOI: 10.11646/zootaxa.2933.1.3.
25. Shekhovtsov S.V., Berman D.I., Bazarova N.E., Bulakhova N.A., Porco D., Peltek S.E. Cryptic genetic lineages in *Eisenia nordenskioldi pallida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *European Journal of Soil Biology*. V. 75 (2016): pp. 151-156. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2016.06.004.
26. Shekhovtsov S.V., Bazarova N.E., Berman D.I., Bulakhova N.A., Golovanova E.V., Konyaev S.V., Krugova T.M., Lyubchanskii I.I., Peltek S.E. DNA barcoding: how many earthworm species are there in the south of West Siberia? *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. V. 7(1) (2017): pp. 57-62. DOI: 10.1134/S2079059717010130.
27. Sikulu M.T. Non-destructive near infrared spectroscopy for simultaneous prediction of age and species of two major African malaria vectors: *An. gambiae* and *An. Arabiensis*. *NIR News*. V. 25(5) (2014): pp. 4-6. DOI: 10.1255/nirn.1455.
28. Srivathsan A., Hartop E., Puniamoorthy J., Lee W.T., Kutty S.N., Kurina O., Meier R. 1D MinION Sequencing for large-scale species discovery: 7000 scuttle flies (Diptera: Phoridae) from one site in Kibale national park (Uganda) revealed to belong to > 650 species. *bioRxiv*. (2019): 622365. DOI: 10.1101/622365.
29. Tao D., Wang Z., Li G., Qiu G. Accurate identification of the sex and species of silkworm pupae using near infrared spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy*. V. 85 (2018): pp. 949-952. DOI: 10.1007/s10812-018-0744-z.
30. Tiunov A.V., Hale C.M., Holdsworth A.R., Vsevolodova-Perel T.S. Invasion patterns of Lumbricidae into the previously earthworm-free areas of northeastern Europe and the western Great Lakes region of North America. *Biological Invasions*. V. 8 (2006): pp. 1223-1234. DOI: 10.1007/s10530-006-9018-4.
31. van Groenigen J.W., van Groenigen K.J., Koopmans G.F., Stokkermans L., Vos H.M.J., Lubbers I.M. How fertile are earthworm casts? A meta-analysis. *Geoderma*. V. 338 (2019): pp. 525-535. DOI: 10.1016/j.geoderma.2018.11.001.
32. Vance C.K., Tolleson D.R., Kinoshita K., Rodriguez J., Foley W.J. Near infrared spectroscopy in wildlife and biodiversity. *Journal of near Infrared Spectroscopy*. V. 24 (2016): pp. 1-25. DOI: 10.1255/jnirs.1199.

33. Vaupel A., Hommel B., Beule L. High-resolution melting (HRM) curve analysis as a potential tool for the identification of earthworm species and haplotypes. *PeerJ*. V. 10 (2022): e13661. DOI: 10.7717/peerj.13661.

34. Velasquez E., Pelosi C., Brunet D., Grimaldi M., Martins M., Carolina Rendeiro A., Barrios E., Lavelle P. This ped is my ped: Visual separation and near infrared spectra allow determination of the origins of soil macroaggregates. *Pedobiologia*. V. 51(1) (2007): pp. 75-87. DOI: 10.1016/j.pedobi.2007.01.002.

35. Vorobeichik E., Nesterkov A., Golovanova E., Nesterkova D., Ermakov A., Grebennikov M. Long-term dynamics of the abundance of earthworms and enchytraeids (Annelida, Clitellata: Lumbricidae, Enchytraeidae) in forests of the Central Urals, Russia. *Biodiversity Data Journal*. V. 9 (2021): e75466. DOI: 10.3897/BDJ.9.e75466.

Статья поступила в редакцию 30.01.2023; одобрена после рецензирования 28.02.2023; принята к публикации 02.06.2023.

The article was submitted 30.01.2023; approved after reviewing 28.02.2023; accepted for publication 02.06.2023.

Информация об авторах

Станислав Юрьевич Князев – labinvert@omgpu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0031-0618>, научный сотрудник, лаборатория систематики и экологии беспозвоночных;

Кирилл Анатольевич Бабий – killbabiy55@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7735-9052>, младший научный сотрудник, лаборатория систематики и экологии беспозвоночных;

Елена Васильевна Голованова – nilseb@omgpu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0871-9274>, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория систематики и экологии беспозвоночных;

Денис Владимирович Соломатин – solomatin_dv@omgpu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9356-9890>, канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры математики и методики обучения математике;

Елена Александровна Сарф – nemcha@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4918-6937>, научный сотрудник, научно-исследовательская лаборатория биохимии;

Людмила Владимировна Бельская – LudaB2005@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6147-4854>, канд. хим. наук, зав. научно-исследовательской лабораторией биохимии.

Information about the authors

Stanislav Yu. Kniazev – labinvert@omgpu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0031-0618>, research associate at Research laboratory of systematics and ecology of invertebrates;

Kirill A. Babiy – killbabiy55@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7735-9052>, junior researcher at Research laboratory of systematics and ecology of invertebrates;

Elena V. Golovanova – nilseb@omgpu.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0871-9274>, candidate of Biological Sciences, senior researcher at Research laboratory of systematics and ecology of invertebrates;

Denis V. Solomatin – solomatin_dv@omgpu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9356-9890>, candidate of Physical and Mathematical Sciences, associate professor of the Department of mathematics and methods of teaching mathematics;

Elena A. Sarf – nemcha@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4918-6937>, research associate of biochemistry research laboratory;

Ludmila V. Bel'skaya – LudaB2005@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6147-4854>, candidate of Chemical Sciences, head of biochemistry research laboratory.

Вклад авторов:

Князев С. Ю. – концепция исследования; написание исходного текста; итоговые выводы, сбор дождевых червей.

Бабий К. А. – сбор дождевых червей; лабораторный анализ материала; доработка текста.

Голованова Е. В. – сбор и определение дождевых червей; доработка текста.

Соломатин Д. В. – статистическая обработка материала.

Сарф Е. А. – лабораторный анализ материала.

Бельская Л. В. – научное консультирование; написание исходного текста; статистическая обработка материала.

Contribution of the authors:

Kniazev S. Yu. – research concept; writing the source text; scientific conclusion; collection of earthworms.

Babiy K. A. – collection of earthworms; laboratory analysis of the material; follow on revision of the text.

Golovanova E. V. – collection and identification of earthworms; follow on revision of the text.

Solomatin D. V. – statistical processing of the material.

Sarf E. A. – laboratory analysis of the material.

Bel'skaya L. V. – scientific consultation; writing the source text; statistical processing of the material.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.