

АЛГОРИТМ ИЗУЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕНДЕНЦИЙ РАЗЛОЖЕНИЯ ТРУПА

Толмачев И.А.¹, Сидорова Н.А.², Лаврукова О.С.², Приходько А.Н.³

¹ФГБВО ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, vmeda-na@mil.ru

²ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, rectorat@petsu.ru;

³ГБУЗ МО «Бюро СМЭ», Москва, office@sudmedmo.ru

Цель работы – описание алгоритма изучения основных микробиологических тенденций разложения трупа. Микробиом трупа и его ложа изучен стандартными методами микробиологических исследований и с привлечением ПЦР-анализа на трупах представителей класса Млекопитающие. В качестве показателей интенсивности разложения трупа использованы качественные и количественные характеристики его микрофлоры или некробиома. Проанализированы таксономическое и эколого-физиологическое разнообразие микроорганизмов, населяющих труп и ложе трупа экспериментальных животных, динамика численности и структура доминантных видов микроорганизмов в разные периоды разложения трупа, ферментативная активность доминантных групп микроорганизмов в составе микрофлоры трупа и особенности физиологических групп микроорганизмов – участников диагенеза костных фрагментов. Использование предложенного алгоритма изучения процессов разложения трупа, опосредованного деятельностью микроорганизмов, позволяет подробно проанализировать основные закономерности разложения трупов различных по размеру и массе экспериментальных животных на протяжении длительных отрезков времени, изучить микробиом трупов и эпинекротическое микробное сообщество, применить традиционные (бактериологические и бактериоскопические) и современные (молекулярно-генетические) методы исследования. Результаты подобных исследований могут быть применимы для обоснования и широкого использования микробиологических методов в судебно-медицинской практике.

Ключевые слова: труп, разложение, микроорганизмы, судебно-медицинская экспертиза, постмортальный интервал.

ALGORITHM FOR STUDYING MAIN MICROBIOLOGICAL TRENDS OF CORPSE DECOMPOSITION

Tolmachev I.A.¹, Sidorova N.A.², Lavrukova O.S.², Prikhodko A.N.³

¹Military Medical Academy, St. Petersburg, vmeda-na@mil.ru;

²Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, rectorat@petsu.ru;

³Bureau of Forensic Medical Expertise of Moscow region, Moscow, office@sudmedmo.ru

The aim of the work is to describe the algorithm for studying the main microbiological trends of corpse decomposition. The microbiome of the corpse and its bed has been studied by standard methods of microbiological research and using PCR analysis on corpses of members of the class Mammals. Qualitative and quantitative characteristics of its microflora or necrobioma are used as indicators of corpse decomposition intensity. Taxonomic and ecological-physiological diversity of microorganisms inhabiting the corpse and body bed of experimental animals, dynamics of number and structure of dominant species of microorganisms in different periods of corpse decomposition, enzymatic activity of dominant groups of microorganisms in the body microflora and peculiarities of physiological groups of microorganisms - participants of bone fragment diagnostics were analyzed. Using the proposed algorithm for studying the processes of body decomposition mediated by the activities of microorganisms, it is possible to analyze in detail the main patterns of body decomposition of experimental animals of different size and weight over long periods of time, to study the microbiome of bodies and the epinecrotic microbial community, to apply traditional (bacteriological and bacterioscopic) and modern (molecular genetic) methods of research. The results of such studies may be useful for the justification and wide application of microbiological methods in forensic practice.

Keywords: corpse, decomposition, microorganisms, forensic examination, post-mortal interval.

Традиционно целесообразность посмертного микробиологического исследования в практике патоморфологов определяется возможностью подтверждения диагноза и

установления этиологии не диагностированной при жизни инфекции, при которой смерть наступает еще до проведения соответствующей микробиологической диагностики, оценкой эффективности прижизненной антибактериальной терапии, выяснением эпидемиологической ситуации и своевременным проведением соответствующих противоэпидемических мероприятий [1, 2]. Однако специфика задач, решаемых судебно-медицинскими экспертами, подразумевает научно обоснованное понимание процессов разложения. Значимой компонентой в процессе разложения является его микробиологическая составляющая.

Целью работы является описание способа изучения основных микробиологических тенденций разложения трупа. Данные сведения необходимы как для обоснования и широкого применения микробиологических методов в судебно-медицинской практике [3], так и для формирования объективной научной базы в целях установления причинно-следственных закономерностей микробной трансформации органического вещества в природе.

Традиционные методы исследований. R. Melvin с соавт. [4] одними из первых отметили, что определение давности наступления смерти для судебного эксперта с использованием существующих методов является сложной, а иногда и объективно неразрешимой задачей. Они предложили животную модель для оценки продолжительности посмертного периода путем оценки трансмиграции нормальной микробиоты через стенку тонкой кишки.

Результаты исследований посмертных изменений микрофлоры с использованием модельных экспериментов на трупах животных являются серьезной доказательной базой. J.L. Metcalf с соавторами [5] использовали трупы мышей, у которых в течение 48 суток отбирали микрофлору из брюшной полости и с поверхности кожных покровов. Кроме того, осуществлялся забор образцов из связанного с трупами могильного грунта (ложе трупа) для оценки микробного разнообразия и степени рН.

J. L. Rechal с соавт. [6] использовали для экспериментов трупы свиней (в качестве модели трупа человека), разложенные на поверхности почвы в лесу и укрытые сетками с целью защиты от птиц. Регулярно регистрировались изменения температуры трупов и почвы. Отбор проб производился из ротовой полости и с поверхности кожи трупов. Определение разнообразия организмов, связанных с разложением тел, производилось методом пиросеквенирования.

E. R. Hyde с соавт. [7] проводили исследования на трупах людей. Для этого эксперимента два трупа были размещены для разложения в естественных условиях. Наблюдения производились в течение нескольких дней в сентябре и в ноябре 2011 г.

Зафиксированы среднесуточные условия температуры и влажности за исследуемый период. Образцы материала изымались изо рта и прямой кишки трупов в начале и в конце каждого временного отрезка исследования. Использовался метод пиросеквенирования.

H.R. Johnson [8] также использовали образцы, взятые из 21 трупа людей. Все трупы были размещены на поверхности почвы и разлагались естественным путем. Образцы забирали из слухового прохода и/или носовых ходов, состав микробного сообщества устанавливался на основе генотипирования.

Оригинальные методы исследований. Практически любое микробное сообщество представлено эукариотическими и прокариотическими организмами. В данном исследовании изучены представители мира Prokarya, а именно эубактерии, что связано с их доминирующим положением в сообществе, контролирующем разложение мертвого органического вещества.

В качестве показателей интенсивности разложения трупа использованы качественные и количественные характеристики его микрофлоры или некробиома. Труп является доступным источником органических форм азота и углерода для гетеротрофных бактерий, которые используют белки и углеводы в процессах катаболизма и могут оказывать большое влияние на направленность трупного разложения.

Некробиомы трупа и его ложа в разных экосистемах переменны, взаимодействия на уровне сообщества довольно специфичны, отдельные микроорганизмы находятся в облигатном симбиозе с другими, зависят от качественного и количественного состава их метаболитов, что чрезвычайно затрудняет использование видов для оценки продолжительности посмертного интервала. Поэтому изменчивость микробиомов целесообразно исследовать вдоль катены, обусловленной климатом, местностью, последовательной сменой насекомых или растительности.

С целью изучения особенностей микробного разложения трупа проанализированы: таксономическое разнообразие микроорганизмов, населяющих труп и ложе трупа экспериментальных животных; эколого-физиологическое разнообразие микроорганизмов в составе микрофлоры трупа; динамика численности и структура доминантных видов микроорганизмов в разные периоды разложения трупа; ферментативная активность доминантных групп микроорганизмов в составе микрофлоры трупа; особенности физиологических групп микроорганизмов – участников диагенеза костных фрагментов. Кроме того, создан каталог аммонификаторов с характеристикой подходов к систематизации и методам хранения коллекционных культур.

Несмотря на то что в природе постоянно происходит гибель организмов, обнаружить их непосредственно сразу после наступления смерти и провести полноценное исследование

не представляется возможным. Поэтому для исследований используют заранее умерщвленных животных. Необходимо отметить, что труп может находиться в любых условиях (в помещении, на поверхности почвы, захороненным в почве). В зависимости от этого, а также от возможности доступа к трупу некрофильных насекомых, позвоночных животных процесс деструкции трупа протекает различно. В данной работе в качестве объекта исследования использована гетеротрофная группа бактерий в составе микробного сообщества трупа, находящегося на поверхности почвы, и ложа трупа (непосредственно самой почвы). Предметом исследования являлись трупы некоторых представителей семейства Млекопитающие, массой от 80 г до 100 кг.

Использованы традиционные методы выделения чистой культуры микроорганизмов с последующим изучением их фенотипических признаков согласно алгоритму «Определителя бактерий Берги» [9]. Учитывая особенности фенотипического полиморфизма прокариот, не позволяющего объективно оценивать таксономические признаки, в работе также применены современные молекулярно-генетические подходы к идентификации видов бактерий, что облегчает определение некультивируемых форм и видов, не поддающихся точной идентификации.

Разработана оригинальная схема закладки трупных приманок, забора микробиологических образцов, выделения и идентификации видов бактерий, отнесенных к пяти эколого-физиологическим группам в составе некробиома. Исследования выполнялись на свежесделанных культурах, репрезентативность выборок соответствовала общестатистическим закономерностям.

Методика закладки трупов крупных и средних животных подробно изложена в работах О.С. Лавруковой с соавт. [10, 11]. Опыты по разложению 45 трупов мышей закладывались весной 2016 г. на песчаных и торфяных почвах, на суглинке.

Микрофлору ложа и фрагментов органов и тканей трупа отбирали из областей, в наибольшей степени подвергающихся микробной контаминации, помещали в асептических условиях в пробирки со стерильной транспортной средой (5 мл) для дальнейшего исследования. Посмертную микрофлору с костных останков и копыт трупов свиней отбирали методом смывов. Параллельно измеряли температуру и кислотность трупа и окружающей среды.

Для выделения и идентификации фирмикутных и грациликутных бактерий в составе некробиома использовали наборы «Микро-Циль-Нильсен-Ницф», «Микро-Гинс-Ницф», «Микро-Цитохромоксидаза-Ницф», «Микро-Каталаза-Ницф», «Микро-Желатиназа-Ницф», короткий ряд Гисса, сульфатредуцирующий агар, среды Блаурокка и Китт–Тароцци.

Таксономическую идентификацию, как было указано выше, производили с использованием алгоритма определения вида с помощью «Определителя бактерий Берги» [9].

Изучение сукцессии микроорганизмов базировалось на определении возможностей функционирования сообщества микробов в разных экосистемах и степени их изменения в зависимости от территории расположения и срока разложения трупа, доступности питательного субстрата и температуры окружающей среды. Причинно-следственный анализ последовательной смены микробных сообществ трупов животных и ложа трупа проводился на специально оборудованных площадках в лесной зоне (северное Прионежье Республики Карелия) и в зоне населенного пункта (частный сектор г. Петрозаводска).

При анализе распределения эколого-физиологических профилей микробных сообществ в составе некробиома трупа и ложа трупа учитывались район исследования, территориальное размещение, характер растительности и особенности почвенного покрова. В каждом биоценозе и в каждой функциональной зоне для проведения микробиологического анализа пробы отбирались случайным образом с пяти пространственно удаленных станций, где рандомно выполнялся стратифицированный отбор фрагментов наружных покровов (кожи, шерсти), мягких тканей, костей трупа и ложа трупа. Изменения температуры в почве и трупе регистрировались в трехкратной повторности с помощью прибора «4В1 РН метра», температура воздуха измерялась беспроводным термометром «RST 01077».

Микробиологический анализ выполнялся с использованием принципа накопительных культур. В эксперименте применялись стандартные методы бактериологических исследований на основных, элективных и дифференциально-диагностических средах; учитывались только физиологически активные группы микроорганизмов, дающие выраженный культуральный рост на указанных средах.

Как указано выше, для описания микробных сообществ трупа и ложа трупа использованы пять эколого-физиологических групп: протеолитики, целлюлозолитики, азотфиксаторы, прототрофы, сульфатредукторы. Для их описания применялись ультраструктурные, морфологические, культуральные и биохимические признаки.

Учитывая, что при разложении трупа ведущая роль принадлежит микроорганизмам, контролирующим гнилостный распад белковых веществ или аммонификацию, основное внимание в исследовании микрофлоры трупа уделено изучению протеолитически активных групп бактерий, выделенных в чистую культуру. Методы идентификации чистых культур в составе ассоциации некробиома описаны в работах О.С. Лавруковой с соавт. [12] и Н.А. Сидорова с соавт. [13]. Казеинолитическую (или общую протеолитическую) активность оценивали по методу Ансона в модификации И.С. Петровой (1966). При интерпретации

полученных данных учитывали основные абиотические факторы, зафиксированные на момент отбора проб.

С целью изучения разнообразия физиологических групп микроорганизмов, контролирующих трансформацию костных останков в природе, труп экспериментального животного сначала помещали в природные условия на специально оборудованную площадку для развития гнилостных явлений. Затем кости изымали из естественной среды и в лабораторных условиях помещали в нестерильную, увлажненную огородную почву для создания эффекта «почвенной ловушки» для микроорганизмов, участвующих в разложении костной ткани. Модельные опыты проведены при разных температурных условиях: +37°C, +21°C и +5°C. Общая продолжительность эксперимента составила 14 месяцев.

Микрофлору с фрагментов костей отбирали методом смывов с помощью стерильных тампонов. Для получения статистически достоверных результатов смывы с пробной поверхности отбирали случайно от трех до пяти образцов. Микробиологический анализ проводили сразу после отбора образцов. Для этого пробы суспензировали в физиологическом растворе и в объеме 0,1 мл инокулировали в элективные питательные среды, предназначенные для развития узкой группы микроорганизмов, выполняющих определенную функцию в процессе диагенеза.

Для преимущественного выделения из смывов с поверхности костей спорообразующих аммонифицирующих бактерий предварительно проводили пастеризацию отобранных смывов, при этом вегетативные клетки погибали, сохранялись только спорогенные бактерии. С учетом принадлежности выделяемых микробов к мезофилам накопительные культуры получали при комнатной температуре в диапазоне от 24±3°C до 37±1°C. Учет количества представителей определенной физиологической группы проводили методом предельных разведений с использованием таблицы Мак-Креди.

На базе ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» лаборатории молекулярной диагностики ЦКП «Биоинженерия» (Москва) выполнено генотипирование шести культур микроорганизмов с неясным таксономическим положением. Для этого выделены препараты ДНК, получены ПЦР-фрагменты генов, кодирующих 16S рРНК, проведено секвенирование этих фрагментов, осуществлена оценка степени чистоты культур. Проведен BLAST-поиск по международной базе данных GenBank, с помощью онлайн-сервиса RDP-Classifier определена таксономическая принадлежность исследованных бактерий.

Для изучения направленности процессов биогенной деструкции костного коллагена проведена серия модельных экспериментов по выделению в чистую культуру коллагеназ-продуцирующих микроорганизмов рода *Bacillus* и рода *Clostridium*. Культивирование продуцентов коллагеназ выполняли с увеличением диапазона температур от +20°C до +50°C

в суховоздушном охлаждающем термостате ТСО-1/80 СПУ. Идентификацию выделенных бактерий до вида выполняли согласно критериям «Определителя бактерий Берги» [9]. Для анализа коллагеназной активности бацилл и клостридий использовали модифицированный метод агаровых блоков Н.С. Егорова [14]. Питательную среду для визуализации ферментативной активности микроорганизмов готовили по Q. Wu с соавт. [15] в авторской модификации.

Заключение. Использование предложенного алгоритма изучения процессов разложения трупа, опосредованного деятельностью микроорганизмов, позволяет подробно проанализировать основные закономерности разложения трупов различных по размеру и массе экспериментальных животных на протяжении длительных отрезков времени, изучить микробиом трупов и эпинекротическое микробное сообщество, применить традиционные (бактериологические и бактериоскопические) и современные (молекулярно-генетические) методы исследования. Результаты подобных исследований могут быть использованы в судебно-медицинской экспертизе для решения остро стоящих экспертных проблем, в частности для определения давности наступления смерти в поздний постмортальный период и выявления микробиологического патоморфоза посттравматических изменений.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья подготовлена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения государственного задания. Реализовано в рамках Программы развития опорного университета ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» на период 2017–2021 гг. Секвенирование фрагментов генов 16S рРНК исследованных микроорганизмов выполнено с использованием научного оборудования ЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Список литературы

1. Маслова Е.Н., Болдырева О.В. Значение посмертной микробиологической диагностики в судебно-медицинской практике. Материалы VI Всероссийского съезда судебных медиков. М.–Тюмень, 2005. С. 195.
2. Середкина М.А., Кречикова О.И., Сухорукова М.В. Микробиологическое исследование аутопсийного материала и интерпретация его результатов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. №. 2(2). С. 79-85.
3. Приходько А.Н., Лаврукова О.С., Лябзина С.Н., Сидорова Н.А., Попов В.Л. Использование микробно-энтомологических данных для установления давности наступления смерти // Судебно-медицинская экспертиза. 2018. № 6(61). С. 52-57.
4. Melvin J., Cronholm L., Simson L., Isaacs A. Bacterial transmigration as an indicator of time of death. Journal of Forensic Sciences. 1984. V. 29. P. 412–417.

5. Metcalf J.L., Wegener Parfrey L., Gonzalez A., Lauber C.L., Knights D., Ackermann G., Humphrey G.C., Gebert M.J., Van Treuren W., Berg-Lyons D., Keepers K., Guo Y., Bullard J., Fierer N., Carter D.O., Knight R. A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *eLIFE* 2. 2013. P. e01104.
6. Pechal J.L., Crippen T.L., Benbow M.L., Tarone A.M., Dowd S., Tomberlin J.K. The potential use of bacterial community succession in forensics as described by high throughput metagenomic sequencing. *International Journal of Legal Medicine*. 2013. V. 8. P. 240–242.
7. Hyde E.R., Haarmann D.P., Lynne A.M., Bucheli S.R., Petrosino J.F. The Living Dead: Bacterial Community Structure of a Cadaver at the Onset and End of the Bloat Stage of Decomposition. *PLOS ONE*. 2013;8(10): e77733.
8. Johnson H.R., Trinidad D.D., Guzman S., Khan Z., Parziale J.V., DeBruyn J.M., Lents N.H. A machine learning approach for using the postmortem skin microbiome to estimate the postmortem interval. *PLOS ONE*. 2016. V. 11(12). P. e0167370.
9. Определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта. М.: Мир, 1997. 429 с.
10. Лаврукова О.С., Лябзина С.Н., Приходько А.Н. Метод изучения некрофильных насекомых на трупах крупных животных // *Принципы экологии*. 2016. № 2. P. 91–98.
11. Лаврукова О.С., Лябзина С.Н., Сидорова Н.А., Приходько А.Н. Энтомологические и микробиологические особенности разложения трупов, подвергшихся воздействию пламени // *Вестник судебной медицины*. 2018. № 7(4). P. 30–35.
12. Лаврукова О.С., Лябзина С.Н., Приходько А.Н., Сидорова Н.А. Каталогизация микроорганизмов в составе микробиома трупа // *Journal of Biomedical Technologies*. 2016. № 1. С. 24–34.
13. Сидорова Н.А., Попов В.Л., Лаврукова О.С., Лябзина С.Н., Приходько А.Н. Специфика пупрификации трупа под действием ферментных систем некробиома // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2017. Т. 60(5). С. 18–22.
14. Егоров Н.С. Метод диффузии протеолитических ферментов из блоков агара с культурами микроорганизмов. М.: Наука, 1971. 18 с.
15. Wu Q., Li C., Chen H., Shuliang L. Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* CoI-J. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010. V. 160. P. 129–139.