

СПЕЦИФИКА МИКРОБНОГО РАЗЛОЖЕНИЯ МЕРТВЫХ ТЕЛ

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

¹ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, e-mail: rectorat@petsu.ru;

²ГБУЗ МО «Бюро СМЭ», Москва, office@sudmedmo.ru;

³ФГБВО ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, e-mail: vmeda-na@mil.ru

Цель работы - изучение специфики микробного разложения мертвых тел, для постижения которой изучены таксономическое разнообразие и эколого-физиологические группы микроорганизмов трупа и его ложа, изменения численности и структура доминантных видов в разные периоды пу트리фикации, ферментативная активность доминирующих видов и особенные качества физиологических групп бактерий, участвующих в разложении костных фрагментов. Микробиом трупа (некробиом) изучен стандартными методиками микробиологических исследований и с использованием ПЦР-анализа на трупах экспериментальных животных класса Млекопитающие. Определено, что некробиом – это гетерогенная, специфичная в разных местообитаниях система, установлены количественные показатели его представителей, изучено влияние ряда абиотических факторов на процессы разложения мертвого вещества, описана бактериальная сукцессия в процессе деструкции трупа. Для объективной оценки давности наступления смерти большое значение имеет такой фактор, как совокупность и разнообразие микроорганизмов, участвующих в сложных процессах разложения органического вещества. Перспективными являются дальнейшие исследования микрофлоры костных фрагментов, что позволит выйти за рамки экспериментального подхода и получить объективно измеряемые параметры, применимые в практике судебно-медицинской экспертизы.

Ключевые слова: давность наступления смерти, судебно-медицинская экспертиза, постмортальный интервал, разложение, микроорганизмы.

FEATURES OF MICROBIAL DECOMPOSITION OF DEAD BODIES

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

¹Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, e-mail: rectorat@petsu.ru;

²Bureau of Forensic Medical Expertise of Moscow region, Moscow, office@sudmedmo.ru;

³Military Medical Academy, St. Petersburg, e-mail: vmeda-na@mil.ru

The aim of the work is to study the specifics of the microbial decomposition of dead bodies, to achieve which the taxonomic diversity and ecological and physiological groups of microorganisms of the corpse and its bed, changes in the number and structure of dominant species at different periods of putrefaction, the enzymatic activity of the dominant species and the special qualities of the physiological groups of bacteria involved are studied in the decomposition of bone fragments. Material and methods. Corpse microbiome (necrobioma) was studied by standard methods of microbiological research and using PCR analysis on the corpses of experimental animals of the Mammals class. Results. It was determined that necrobioma is a heterogeneous system specific to different habitats, quantitative indicators of its representatives have been established, the influence of a number of abiotic factors on the decomposition of dead matter has been studied, bacterial succession in the process of destruction of a corpse has been described. Conclusion For an objective assessment of the limitation of the onset of death, such a factor as the totality and variety of microorganisms involved in complex processes of decomposition of organic matter is of great importance. Further research on the microflora of bone fragments is promising, which will go beyond the experimental approach and obtain objectively measurable parameters applicable in the practice of forensic medical examination.

Keywords: age of death, forensic examination, postmortal interval, decomposition, microorganisms.

Показателями интенсивности разложения трупа являются качественные и количественные характеристики его микрофлоры или некробиома. Труп является доступным источником азотсодержащей органики для микроорганизмов [1; 2], которые используют его в качестве источника питания и могут оказывать большое влияние на направленность

разложения [3; 4]. Кроме того, доминантные эколого-трофические группы микрофлоры трупа представляют особый интерес для судебной экспертизы, поскольку способны выживать и расти благодаря активной конкуренции с некрофильными насекомыми, представляющими экологический комплекс деструкторов останков и экскрементов животного происхождения [5].

Целью работы являлось изучение специфики микробного разложения мертвых тел.

Материал и методы исследования. Для проведения исследования пробы отбирали из трупов домашних свиней (массой 50-100 кг), кур (массой 1,5-2 кг) и домовых мышей (массой 80 г). Всего изучено более 80 объектов, более 1000 изолятов микроорганизмов. Все эксперименты проводились с соблюдением соответствующих этических норм и правовых документов.

Микрофлору ложа и фрагментов органов и тканей трупа отбирали из наиболее подвергающихся микробной контаминации областей и в условиях асептики помещали в пробирки со стерильной транспортной средой. С костных останков трупов свиней посмертную микрофлору отбирали методом смывов. Методика сбора и микробиологического анализа смывов позволяет получить более точные результаты и определить присутствие характерных микроорганизмов в составе микрофлоры трупа. Смывы (протирая необходимые участки не менее 5 раз) собирали стерильными салфетками или ватными тампонами, которые предварительно смачивали стерильным изотоническим раствором. Параллельно измерялась температура трупа и окружающей его среды. Параллельно с отбором проб измеряли температуру и кислотность тканей трупа и окружающей среды.

Для выделения и идентификации Firmicutes и Gracilicutes использовали диагностические наборы «Микро-Желатиназа-Ницф», «Микро-Гинс-Ницф», «Микро-Циль-Нильсен-Ницф», «Микро-Каталаза-Ницф», «Микро-Цитохромоксидаза-Ницф», среды Блаурокка и Китт-Тароцци, короткий ряд Гисса, сульфатредуцирующий агар. Таксономическая идентификация производилась с использованием алгоритма определения вида по «Определителю бактерий Берги» (1997) [6].

Последовательную смену микроорганизмов некробиома изучали в естественных условиях и на антропогенно измененных территориях, оценивали по динамике эколого-физиологических профилей: протеолитиков, целлюлозолитиков, азотфиксаторов, прототрофов и сульфатредукторов. Дополнительно для них определяли и биохимические показатели.

Для изучения консорциума аммонификаторов посмертного микробиома использованы стандартные среды, реактивы и красители. Основными признаками их развития считали

помутнение среды, образование пленки, осадка и положительные реакции на аммиак (NH_3) с реактивом Несслера и на сероводород (H_2S) с ацетатом свинца. Наблюдения проводили на первые, третьи, пятые и седьмые дни с момента посева. Реакцию на NH_3 ставили на пятый-седьмой день. Морфологию и ультраструктуру клеток аммонификаторов учитывали на препаратах, выполненных по Граму, а разнообразие их определяли по культуральным макро- и микроскопическим признакам. Доминантные колонии с наиболее специфическими признаками исследовались бактериоскопически с помощью окраски по Граму.

Протеолитическую активность и свойства представителей доминантных видов посмертного микробиома, выделенных в чистую культуру, рассматривали на разных стадиях разложения трупов. При интерпретации полученных данных учитывали основные абиотические показатели на момент отбора проб.

С целью изучения многообразия физиологических групп микроорганизмов, ответственных за трансформацию костных останков, использован труп экспериментального животного, который помещали в природные условия для развития явлений гниения. Для наблюдения за интенсивностью разложения трупа и изменениями костной ткани проводился макроскопический анализ, в процессе которого фиксировались интенсивность гнилостной трансформации трупа, а затем и костных останков – наличие или отсутствие на костях мягких тканей, их цвет и структура, состояние костной пластинки, тяжесть, плотность и маслянистость костей. С помощью прибора «4В1 РН метра» оценивали изменение абиотических факторов в почве и трупе: морфологические и физико-химические свойства (кислотность, влажность, температура).

Затем кости в условиях лаборатории помещали в огородную почву с целью создания эффекта «почвенной ловушки» для участвующих в разложении костной ткани микроорганизмов. Опыты проводили при температурах $+37$, $+21$ и $+5$ °С. Микрофлору отбирали методом смывов стерильными тампонами, случайно от 3 до 5 образцов. Микробиологический анализ осуществляли сразу после отбора проб путем суспензирования в физиологическом растворе, затем, в объеме 0,1 мл, инокулирования в среды, предназначенные для развития узких групп микроорганизмов, выполняющих определенную функцию в процессе диагенеза костных останков.

Для преимущественного выделения из образцов спорообразующих аммонифицирующих бактерий предварительно проводили их пастеризацию с целью гибели вегетативных клеток и сохранения только спорогенных организмов. Накопительные культуры получали при температурном диапазоне от 24 ± 3 до 37 ± 1 °С. Учет количества представителей определенной физиологической группы проводили методом предельных разведений с использованием таблицы Мак-Креди.

Для изучения процессов биогенной деструкции коллагена костной ткани проведена серия экспериментов по выделению в чистую культуру коллагеназ-продуцирующих бактерий родов *Bacillus* и *Clostridium* с использованием модифицированного метода агаровых блоков Н.С. Егорова [7]. Одновременно оценивали протеолиз желатина (60% гидролизата коллагена). Бактерии, обладающие ферментом желатиназой, подвергают гидролизу аминокислоты, входящие в состав желатина, в результате чего этот белок теряет свои желирующие свойства, приобретая жидкую консистенцию. Приготовление питательной среды для определения желатиназной активности выполняли с помощью набора реагентов «Микро-Желатиназа-Ницф» (021231): ГМФ бульон – 3,0; желатин – 12,0; Na₂CO₃ – 2,0. Чистые 18-часовые тест-культуры засеивали уколом в пробирки с питательным желатином и помещали в термостат при +37±0,5 °С на 3–5 суток, перед учетом результатов посева выдерживали в холодильнике 30 минут при температуре +3,0±2 °С вместе с неинокулированной контрольной пробой. В случае с положительной желатиназной активностью отмечали расплавление желатина, а при отрицательной реакции – отсутствие расплавления.

Результаты и их обсуждение. Практически любое микробное сообщество представлено эукариотическими (грибы, микромицеты, дрожжеподобные грибы, простейшие) и прокариотическими (истинные бактерии, археобактерии, эубактерии, риккетсии и хламидии) организмами. В нашей работе исследованы представители мира прокариот, а именно эубактерии, так как именно они занимают доминирующее положение в контролирующем путрификацию сообществе.

В результате исследований по таксономическому разнообразию некробиомов получены данные о зависимости количества и качества идентифицированных таксонов *Firmicutes* и *Gracilicutes* от вида экспериментального животного, размеров трупа, биотопа его расположения, а также интенсивности и сроков разложения. Наибольшее разнообразие прокариотических микроорганизмов характерно для трупов свиней, некробиом которых содержал 24 рода фирмикутных и 14 родов грациликутных бактерий. Активные аммонификаторы среди них были представлены 5 родами. Наименьшее разнообразие вышеуказанных бактерий установлено для трупов куриц – 19 родов, из которых к активным аммонификаторам отнесены 4: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*. Полученные данные свидетельствуют об относительной стабильности ведущей микрофлоры, ответственной за процессы аммонификации (разложения) белков в составе трупного материала.

В результате исследования эколого-трофического разнообразия микроорганизмов в составе микрофлоры трупа выделены пять эколого-трофических групп, принимающих

активное участие в разложении мертвого вещества: протеолитики, целлюлозолитики, азотфиксаторы, прототрофы, сульфатредукторы. В составе исследуемых микробных сообществ не выявлено олигонитрофилов и олигокарбофилов, что означает незавершенность процессов микробной минерализации органического вещества к 58 суткам разложения трупного материала. Каждую эколого-трофическую группу представляли таксоны микроорганизмов, которые имеют определенный набор ферментов, активирующийся на ранней или на поздней стадии разложения трупа.

Для описания динамики численности и структуры доминантных видов микроорганизмов в разные периоды разложения трупа выполнено распределение видов по шести жизненным формам: анаэробные хемоорганотрофы; аэробные хемоорганотрофы; аэробные хемоорганотрофы, активные аммонификаторы; факультативные анаэробы; хемоорганотрофы, денитрификаторы; аэробные фиксаторы молекулярного азота; аэробные аутотрофы, окисляющие аммиак до азотистой кислоты. Выявлена закономерность: чем специфичнее условия среды, тем беднее биоразнообразие бактерий в составе некробиома и выше численность отдельных физиологических групп.

В результате изучения ферментативной активности выделенных групп микроорганизмов установлено, что наибольшая доля приходится на виды с фосфатазной активностью (до 59,4% в зависимости от срока разложения), протеолитиков (до 52,8% в зависимости от срока разложения) и виды с декарбоксилазной активностью (до 27,2% в зависимости от срока разложения). Доля сульфатредукторов в исследуемых микробных сообществах оказалась самой незначительной (до 13,3% в зависимости от срока разложения).

Примечательно, что доля биохимически активных групп микроорганизмов исследуемых биотопов в процессе разложения трупов стабильно увеличивалась независимо от срока разложения и колебаний температуры окружающей среды. За период исследования доля протеолитически активных микроорганизмов увеличилась в 1,5 раза, доля гликолитически активных – в 1,7 раза; обладающих фосфатазной активностью – в 2,8 раза, нитрогеназной – в 1,6 раза, декарбоксилазной – в 2,3 раза, сульфатредуцирующей – в 1,8 раза.

Судебно-медицинское значение полученных экспериментальных данных по закономерностям изменения состава эколого-трофических профилей некробиома заключается в том, что из всех изученных параметров ферментативная активность микроорганизмов является наиболее чувствительным критерием, позволяющим разработать альтернативные подходы к объективной оценке срока давности наступления смерти [8].

Установлено, что в путрификации ведущую роль играют микроорганизмы, ответственные за гниlostный распад белков или аммонификацию [9]. Установлена

относительная стабильность их ведущей микрофлоры в составе изученных образцов трупа и его ложа. Аммонификаторов в составе некробиома домашней свиньи обнаружено десять протеолитически активных штаммов, у курицы и домово́й мыши – по восемь. При исследовании активности протеолитических ферментов у бактерий определено, что наибольшая способность вызывать разложения азотсодержащих органических соединений трупного материала характерна представителям родов *Bacillus*, *Clostridium* и *Pseudomonas*. Среди них установлены доминирующие, а также и малочисленные и редкие виды бактерий. Подтверждено, что в процессе гниения органики трупного материала происходит снижение общего числа видов, численность отдельных таксонов резко увеличивается, и получают возможность свободно размножаться наиболее конкурентоспособные.

При изучении особенностей физиологических групп микроорганизмов, участников диагенеза костных фрагментов, выделены 8 из 14 физиологических групп микроорганизмов - участников диагенеза: аммонификаторы, нитрифицирующие бактерии, бактерии, разлагающие клетчатку, возбудители молочнокислого и уксуснокислого брожения, азотфиксаторы и денитрифицирующие бактерии.

Большинство выделенных физиологических групп находятся в постоянной динамике, что, вероятно, связано с неравномерным распределением в почве органических веществ, образующихся в разное время в процессе микробной трансформации костных фрагментов. Исключение составила группа споровых аммонификаторов, которая на протяжении 7 месяцев модельного эксперимента, независимо от давности наступления смерти и температуры окружающей среды, развивалась стабильно, и её доля от общей численности микроорганизмов всегда была значительной (от 20,5 до 39,1%).

Анализ качественных и количественных характеристик данных групп микроорганизмов дает возможность не только оценить интенсивность происходящих процессов во времени, но и в зависимости от таких факторов среды, как кислотность почвы и температура окружающей среды. Полученные данные могут быть использованы в качестве инструмента исследования для оценки времени наступления смерти (посмертного интервала), расследования причин смерти, а также определения местонахождения захороненных трупов.

После смерти трупы являются доступным источником азотсодержащей органики, они не только колонизируются микроорганизмами, которые представляют нормальную микрофлору человека, но также и видами, которые обычно не способны колонизировать живые ткани или колонизируют их при определенных условиях [10; 11]. К таким видам относятся *Bac. mycoides*, *Bac. subtilis*, *Cl. putrificum* и *Cl. sporogenes*, которые в основном обитают в почве, контролируя процессы биогеохимической трансформации азота. С

помощью серии выполненных исследований по изучению коллагеназной активности бациллярно-кlostридиального комплекса микроорганизмов доказано, что ферменты бактерий, обнаруженных в составе некробиома, являются чувствительными молекулярными маркерами интенсивности разложения костных фрагментов. Установлено, что виды рода *Bacillus* и *Clostridium* способны гидролизовать коллаген в широких физиологических диапазонах pH и температуры.

Несмотря на зависимость метаболизма бацилл и кlostридий от кислотности среды и температурного диапазона, изучение протеолитически активных видов, участвующих в разрушении костного коллагена, является перспективным для целей судебно-медицинской экспертизы, особенно в случае объективного установления позднего постмортального периода. Хотя использование ферментов бактерий в судебно-экспертной практике еще остается сложной задачей, применение их субстратной специфичности может существенно расширить доказательную базу проводимых экспертиз.

Выводы

1. В результате проведенной работы установлено, что микробиом трупа (некробиом) – это гетерогенная, специфичная в разных местообитаниях система, установлены количественные показатели его представителей, изучено влияние ряда абиотических факторов на процессы разложения мертвого вещества, описана бактериальная сукцессия в процессе деструкции трупа.

2. Для объективной оценки давности наступления смерти большое значение имеет такой фактор, как совокупность и разнообразие микроорганизмов, участвующих в сложных процессах разложения органического вещества.

3. Возрастающая проблема разработки новых методов определения давности наступления смерти, особенно в позднем посмертном периоде, заставляет задумываться об использовании в практике судебно-медицинской экспертизы биоиндикаторных тест-систем для установления давности наступления смерти, где индикаторами будут служить ферменты, являющиеся продуктом жизнедеятельности микроорганизмов в разные сроки посмертного периода.

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 годов.

Список литературы

1. Lehman D. C. Forensic Microbiology. *Clinical Microbiology Newsletter*. 2014. V. 36. P.49-54.
2. Felsmann M. Z., Szarek J., Felsmann M., Babinska I. Factors affecting temporary cavity generation during gunshot wound formation in animals – new aspects in the light of flow mechanics: a review. *Veterinarni medicina*. 2012. V. 57. P.569-574.
3. Kasper J., Mumm R., Ruther J. The composition of carcass volatile profiles in relation to storage time and climate conditions. *Forensic Science International*. 2012. V. 223. P.64-71.
4. Can I., Javan G. T., Pozhitkov A. E., Noble P. A. Distinctive thanatomicrobiome signatures found in the blood and internal organs of humans. *Journal of Microbiological Methods*. 2014. V. 106. P.1-7.
5. Rozen D. E., Engeimor D. J. P., Smiseth P. T. Antimicrobial strategies in burying beetles breeding on carrion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. V. 105. P.17890-17895.
6. Определитель бактерий Берги / Под ред. Дж. Хоулта. М.: Мир, 1997. 429 с.
7. Егоров Н.С. Метод диффузии протеолитических ферментов из блоков агара с культурами микроорганизмов. М.: Наука, 1971. 18 с.
8. Лаврукова О.С., Сидорова Н.А., Приходько А.Н., Толмачев И.А., Шигеев С.В. Комплексная микробно-зоологическая характеристика постмортального периода при производстве судебно-медицинской экспертизы // *Кубанский научный медицинский вестник*. 2019. Т.26. №3. С.71-80.
9. Сидорова Н.А., Попов В.Л., Лаврукова О.С., Приходько А.Н., Лябзина С.Н., Тихомирова Е.И. Специфика путрификации трупа под действием ферментных систем некробиома // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2017. Т.60. №5. С.8-22.
10. Dickson G.C., Poulter R.T.M., Maas E.W., Probert P.K., Kieser J.A. Marine bacterial succession as a potential indicator of postmortem submersion interval. *Forensic Science International*. 2011. V. 209. P.1-10.
11. Lauber C.L., Metcalf J.L., Keepers K., Ackermann G., Carter D.O., Knight R. Vertebrate decomposition is accelerated by soil microbes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014. V. 80. P.4920-4929.