

微生物检验技术在死亡时间推断中的应用

柳佳彤¹, 俞皓麒¹, 李卓言¹, 陈博旭¹, 秦歌¹, 陈婉君^{1,2}, 贾振军^{*1}

1 中国人民公安大学, 北京 100038

2 哈尔滨铁路公安局刑事技术处, 黑龙江 哈尔滨 150000

柳佳彤, 俞皓麒, 李卓言, 陈博旭, 秦歌, 陈婉君, 贾振军. 微生物检验技术在死亡时间推断中的应用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1471-1481.

LIU Jiatong, YU Haoqi, LI Zhuoyan, CHEN Boxu, QIN Ge, CHEN Wanjun, JIA Zhenjun. Application of microbiological examination in the estimation of postmortem interval[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1471-1481.

摘要: 死亡时间的推断一直是法医学鉴定中的重要内容之一。近年来, 随着高通量测序技术的不断成熟、生物信息学和机器学习方法的迅猛发展, 基于尸体微生物群落结构的变化研究为推断死亡时间提供了一种新的可能性。微生物群落随腐败时间推进的演替规律可以用于死亡时间的推断。本文从尸体腐败现象的本质入手, 总结了利用尸体微生物推断死亡时间研究的技术方法和实际应用, 并对尚存在的问题和应用前景进行了展望。

关键词: 死亡时间; 尸体微生物群落; 群落结构; 特征菌群

Application of microbiological examination in the estimation of postmortem interval

LIU Jiatong¹, YU Haoqi¹, LI Zhuoyan¹, CHEN Boxu¹, QIN Ge¹, CHEN Wanjun^{1,2}, JIA Zhenjun^{*1}

1 People's Public Security University of China, Beijing 100038, China

2 Department of Criminal Technique, Harbin Railway Public Security Bureau, Harbin 150000, Heilongjiang, China

Abstract: Postmortem interval (PMI) estimation is one of the important contents in forensic identification. In recent years, with the development of high-throughput sequencing, bioinformatics, and machine learning, the changes of microbial community structure provide a new possibility for PMI estimation. The evolution pattern of the microbial community in the process of decomposition can be used to predict PMI. From the nature of cadaver

资助项目: 中国人民公安大学刑事科学技术双一流专项(2023SYL06)

This work was supported by the Double First-Class Discipline Program of Criminal Science and Technology of People's Public Security University of China (2023SYL06).

*Corresponding author. E-mail: zhenjunjia@163.com

Received: 2023-05-04; Accepted: 2023-11-20; Published online: 2024-01-22

decomposition, we summarize the examination methods and applications of cadaver microbial changes, and discuss the problems and prospects of using the microbial community changes to predict PMI.

Keywords: postmortem interval; cadaver microbial community; microbial community structure; characteristic taxa

死亡时间在法医学上是指机体死后经历的时间(time since death, TSD), 也称死后间隔时间(postmortem interval, PMI), 即检验尸体时距死亡发生时的时间间隔^[1]。死亡时间的推断是法医学鉴定中需要解决的重要问题之一, 尤其是在命案的调查中, 因为死亡时间往往与案件发生时间关系密切, 准确推断死亡时间在法医学和刑事案件的侦查中具有重要意义。目前法医学实践中主要依靠尸体现象如尸僵、尸斑和尸冷等推断死亡时间^[2], 可以将新鲜尸体的死亡时间推断精确到小时以内^[3]。然而, 随着腐败的进行, 尸体的外在

形象越来越难以辨认, 可供推断死亡时间的特征逐渐变得不明显, 导致推断死亡时间的准确性下降。针对这一问题, 有法医学者提出了许多其他推断医学死亡时间的方法, 例如利用生物化学方法^[4-5]、利用核酸物质的降解规律^[6]及法医昆虫学的方法^[7-9]等, 利用 CiteSpace 将 1993 年至今国内外对死亡时间研究的文献的关键词进行分析, 研究频率最高的关键词分别如表 1 和表 2 所示。然而这些方法受到环境和各种物理化学因素的影响, 因此亟需一种受外界影响较小、能够反映尸体变化内在规律的方法来准确推断死亡时间。

表 1 前 10 位基于 CNKI 数据库统计的 1993 年至今推断死亡时间领域频率最高关键词

Table 1 Top 10 keywords with the highest frequency in the field of PMI prediction from CNKI database since 1993

序号 Order	频次 Frequency	首次出现的年份 Year of the first occurrence	关键词 Keyword
1	389	1993	死亡时间 Postmortem interval
2	49	1994	法医学 Forensic science
3	35	2002	大鼠 Rat
4	20	2004	玻璃体液 Vitreous humor
5	15	2000	尸体 Corpse
6	14	1995	图像分析 Image analysis
7	12	1994	尸体腐败 Putrefaction
8	11	2000	丝光绿蝇 <i>Lucilia sericata</i>
9	10	2002	大头金蝇 <i>Chrysomya megacephala</i>
10	9	2001	尸体现象 Postmortem phenomena

表 2 前 10 位基于 WOS 数据库统计的 1993 年至今推断死亡时间领域频率最高关键词

Table 2 Top 10 keywords with the highest frequency in the field of PMI prediction from WOS database since 1993

序号 Order	频次 Frequency	首次出现的年份 Year of the first occurrence	关键词 Keyword
1	354	1993	死亡时间 Postmortem interval
2	186	1997	法医昆虫学 Forensic Entomology
3	152	1994	时间 Time
4	107	1994	死亡 Death
5	90	1993	法庭科学 Forensic science
6	79	2007	温度 Temperature
7	74	2008	分解 Decomposition
8	56	2000	丽蝇科 Calliphoridae
9	53	1994	苍蝇 Fly
10	50	2000	双翅目 Diptera

近年来,随着高通量测序(high throughput sequencing, HTS)技术的出现,微生物检验技术和方法不断发展,越来越多的学者将目光转移到腐败现象的本质——微生物的活动上。人体中的大量微生物参与许多正常生命活动的进行,而当机体死亡后,人体内部微生物与外界微生物共同作用使尸体的腐败得以进行,微生物的活动是导致尸体发生一系列变化的内因。已经证明在腐败过程中微生物的相互作用以及微生物与环境的作用随时间变化具有潜在规律性^[10],因此使得利用微生物的数量和群落结构变化作为推断死亡时间的“生物时钟”成为一种新的可能。本文就微生物在死亡时间推断方面的技术方法和应用潜力进行综述,并对目前存在的问题和研究趋势进行展望。

1 尸体微生物概述

微生物是自然界中一类体型微小但数量众多的生物,其与人类的生命活动息息相关,人体内的微生物群与宿主有共进化、共发育、共代谢和互调控的关系^[11]。微生物在人体黏膜器官存在数量最多,如口腔和肠道等,成人肠道中的微生

物可达 10^{12} – 10^{14} 个^[12],其数量超过了人体细胞的总数,有人认为可以将正常微生物群看作与呼吸系统、循环系统等类似的另一个特殊的人体系统^[13],在机体死亡后,血液循环和呼吸作用停止,肠道中的厌氧微生物开始大量繁殖,微生物活动产生的气体使尸体腹部膨胀,昆虫繁殖和尸体内部气压的变化使尸体表面皮肤破裂,尸体内部的微生物与空气接触,因此尸体微生物的群落演替总是从厌氧菌到需氧菌变化^[14]。同时在分解的过程中,外界微生物通过人体自然腔道及伤口等部位侵入人体后与内源微生物相互作用。有人认为尸体上细菌演替的过程实质就是正常菌群与腐败菌群的相互作用的过程^[15]。

1.1 尸体内生微生物组

尸体内生微生物组(thanatobiome)是指在死亡事件发生前就在人体内部器官定殖生存的微生物^[10]。正常情况下,人体的某些特定部位存在一定数量的微生物,如胃肠道、皮肤、口腔和女性阴道等,而一些重要内脏器官被认为是无菌的^[10]。另外,在一项对菌血症的研究中发现血液巾存在着大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌等细菌菌种,尤其是在生前有感染病史

的病例中^[16]。这些现象揭示了人体内并非是无菌的环境。此外, Zhou 等^[15]研究发现内脏中的细菌与分解过程相关, 这说明生前存在的细菌菌种很可能成为死后细菌群落演替的最初参与者, 一直参与并作用于尸体的腐败过程。

1.2 尸体外部微生物组

尸体外部微生物(epinecrotic microbiome)是指在浅表上皮组织、口腔黏膜和消化道远端开口以及皮肤表面与腐败过程相关的微生物种类^[17]。人体皮肤上定殖的微生物群落具有宿主特异性、部位特异性和时间稳定性^[18], 有证据表明可以将其作为个体识别的依据之一^[19]。与人体内部的微生物群落相比, 外部微生物组在腐败过程中与外界环境直接接触, 受到环境中生物因素或非生物因素的影响, 包括土壤、空气、水体以及昆虫、食腐性的动物和其他共生微生物等。一些研究针对口腔内部^[20]与皮肤表面^[21]的微生物群落进行了一段时间内的采集, 发现了群落整体多样性的变化趋势和一些特定菌种如厚壁菌门和变形菌门等随死亡时间延长的变化规律, 证明随着死亡时间的增加, 尸体外部的微生物群落也在发生着群落的演替, 可以用于推测死亡时间。

2 尸体微生物样本的采集

人们对微生物的认识一定程度上取决于研究手段, 微生物研究的困难之处在于微生物群落微小、复杂、稠密、不均的特征^[22]。过去鉴定微生物群落的方法主要依赖培养法, 然而近 99% 的微生物不可在实验室条件下进行培养^[23], 使得培养法的应用受到限制。近年来发展了利用高通量测序技术对微生物整体群落进行分析的方法, 为了满足高通量测序研究的需要, 必须对微生物群落样本进行有效的采集。有研究表明, 尸

体上的微生物群落定殖部位与健康人体内微生物群落有相似之处^[24], 可以采用与人体样本采集类似的方法进行尸体微生物样本的收集。针对尸体微生物的收集方法, Pechal 等^[25]曾在前人研究的基础上, 总结了尸体微生物群落分析的标准化流程。采集的过程中要注意保持全程无菌操作, 避免环境中和采集者的微生物群落对样品造成污染。

2.1 采集部位

身体的不同部位是人体微生物群落结构差异的首要影响因素^[26], 在尸体微生物研究中不同采样部位对于采集的微生物群落结构组成至关重要。Hyde 等^[24]研究表明, 人体粪便中微生物的种类最为丰富, 口腔内微生物种类较少, 总体上微生物丰富度呈现从上胃肠道(口腔、胃、小肠)到下胃肠道(结肠、直肠、粪便)逐渐增加的趋势; Metcalf 等^[27]在一项对小鼠尸体微生物变化的研究中同时对三个尸体外部部位和一处侵入性部位(腹腔)进行采样, 结果表明皮肤和土壤比腹腔能提供更准确的 PMI 信息; Belk 等^[28]在对不同类型的样本进行预测 PMI 的研究中得出墓穴土和皮肤样本的预测数据最准确, 是一种可行的法医学工具的结论; Guo 等^[29]的研究验证了墓穴土、腹腔和皮肤表面的微生物群可以估计 PMI。因此多数研究选择皮肤表面、腹腔和墓穴土进行微生物组学的研究。

2.2 采集方法

目前的研究中常见的方法有棉签擦拭法和刮擦法等, 其中棉签擦拭法能够提供更高的微生物多样性。对于体表样品的采集, 多数情况下可以使用无菌棉签在尸体皮肤表面或其他部位进行擦拭(一般 30 s 或 1 min)即可采集到尸体微生物群落, 一般一个部位采集 2-3 次以供重复试验^[30]。为了保证不被采样过程影响, 一般不对同一个区域进行采样, 即棉签擦拭过的部位不再

进行重复采样,以保障采样过程的标准化和采样流程的可重复性。对于腹腔样本, Metcalf 等^[27]针对腹腔是否能够容纳液体提出了两种采样方案,当腹腔完整的情况下,使用 0.5 mL 的无菌注射器从腹腔冲洗和提取微生物;当不能容纳液体时从腹腔制作切口并用无菌拭子对腹腔内部进行采样。对于体外样本的收集,主要涉及墓穴土的采样,通常采用无菌土壤取样器、无菌药匙或其他无菌器具。采集到的微生物样本最好在 2 h 内进行后续处理,当现场情况不满足后续处理的条件时,可以在低温条件下保存两周,因为相较于环境因素和分子技术误差来说,短期内存储条件不会显著影响微生物群落的结构^[31]。常见微生物样本的采集方法如图 1 所示。

3 高通量测序技术在尸体微生物群落研究中的应用

高通量测序技术(high-throughput sequencing, HTS)又称下一代测序技术(next generation sequencing, NGS),或大规模平行测序(massively parallel sequencing, MPS),是一种能够同时对大量核酸分子进行测序的技术。利用高通量技术对微生物群落的测序可以分为扩增子测序和宏基因组测序。

扩增子测序是指直接扩增微生物基因序列的某些特定区域,如细菌和古菌的 16S rRNA 基因、真菌的 18S rRNA 基因和 ITS 序列片段,在微生物领域应用较多的是 16S rRNA 基因序列。16S rRNA 基因是编码原核生物核糖体小亚基的

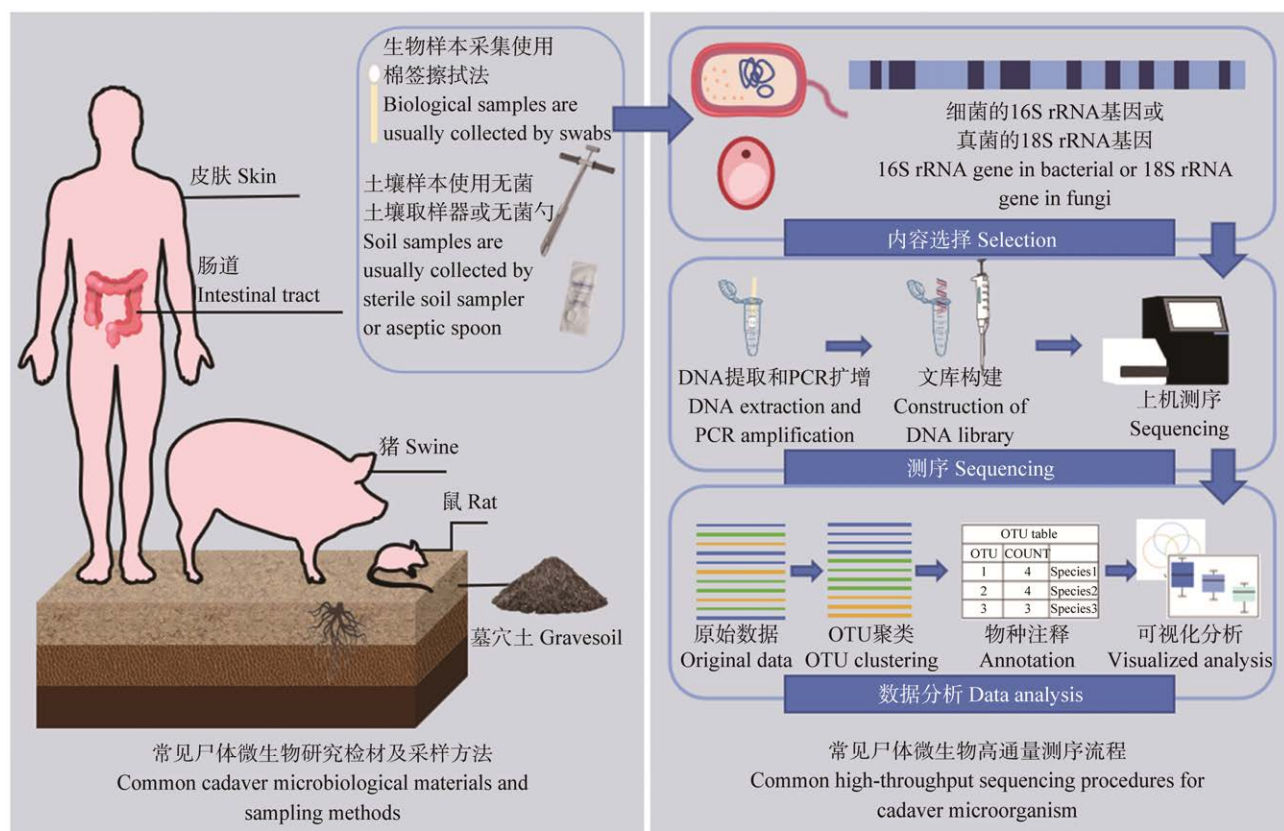


图 1 常见尸体微生物群落分析流程

Figure 1 Common cadaver microbial community analysis procedures.

基因,存在于细菌和古生菌中,包括9个高变区(V1-V9)和10个保守区,目前常用V3、V4区域进行微生物群落的研究,其中V4高变区在门的分类水平上最能准确描述死亡微生物发生的变化^[32];但单独应用16S rRNA基因序列并不能得到解释力最高的效果,结合16S rRNA基因和18S rRNA基因数据集才能够得到最佳PMI估计^[27];元基因组全基因组测序(metagenomic whole genome sequencing, mWGS)是以全部细菌、真菌和古菌基因组的遗传物质为研究对象,相较于扩增子测序,宏基因组测序能够将测序深度扩展到种水平,并且能够实现功能注释,突破了扩增子测序对群落功能研究的限制,能够从功能基因的角度描绘微生物群落的全貌。此外, MWGS 还能准确跟踪微生物群落菌株水平的传播与进化,对菌株的追踪可以用来寻找接触的潜在证据^[15]。微生物高通量测序的一般流程如图1所示。然而,宏基因组测序成本较高,因此一般的研究步骤是先进行大量样本的扩增子测序,再选择目标样本进行宏基因组测序。

4 尸体微生物群落的死后变化规律

4.1 尸体分解过程中微生物群落整体结构变化趋势

正常人体内生存着大量的微生物,它们稳定参与并调节着人体的正常生命活动,尤其肠道中的微生物对人体健康有着重要影响,一旦这些微环境遭到破坏,甚至可能导致疾病的发生^[33]。当死亡事件发生后,由于失去免疫屏障的保护,肠道尤其是回盲部微生物开始加剧繁殖,这也是尸体的腐败总是自下腹部开始的原因。而死亡后埋葬尸体的行为,则会导致尸体与土壤环境之间发生物质与能量的交换,在尸体膨胀破裂之后,

大量碳源和氮源流入土壤中,形成尸体分解岛(cadaver decomposition island, CDI)^[34],随着腐败过程的进行,尸体微生物与环境微生物会逐渐趋于同质化^[35],尤其是在腐败晚期,这为利用土壤微生物的变化来推断 PMI 提供了新的思路。Olakanye 等^[36]将家猪尸体和草料两种不同的碳源埋入砂质黏壤土中,监测关键环境因子和土壤微生物16S rRNA基因和18S rRNA基因的多样性变化,发现不同处理的土壤不仅pH变化显著($P<0.05$),而且微生物的丰富度和均匀度均有差异,显示尸体分解岛的引入可能影响土壤中的生物化学结构;Thomas 等^[37]检测了埋入尸体和未埋入尸体两种不同处理后的土壤群落结构的变化,在历经420 d的埋葬后,土壤微生物与尸体微生物形成了互惠或中性的相互作用,并逐渐恢复到未埋葬前的状态。由此可见,在尸体腐败的过程中尸体与环境土壤存在相互作用,因此有大量研究不仅研究了尸体微生物本身的变化,还将研究对象扩展到了埋葬尸体的土壤中的微生物群落变化上。

Finley 等^[38]在一项对陆地生境尸体不同腐败阶段微生物群落的研究中,将18具尸体分为地表组和埋葬组,结果显示两个实验分组的微生物群落发生了不同的变化,其中地表组微生物群落在分解过程中类群丰富度、多样性和均匀度呈现下降趋势,而埋葬组则呈现出类群丰富度增加、多样性保持不变和均匀度降低的趋势;Li 等^[39]通过观察大鼠死后30 d内肠道微生物结构和多样性的变化,发现细菌群落多样性和丰富度在死后1-5 d和10-25 d下降,在5-10 d内上升,而考虑整个分解过程,细菌群落的多样性、丰富度和均匀度均呈现下降趋势;Pechal 等^[25]研究了尸体死亡后0、1、3和5 d的口腔和体表微生物变化,发现在门和科的分类水平上,微生物物种

的丰富度均随时间呈负相关变化; Procopio 等^[40]对猪尸体在埋葬条件下的土壤微生物群落结构进行了观察, 得出了与其他研究类似的结论, 即微生物多样性随 PMI 的延长而逐渐降低。

尸体分解岛的引入使一些寡养性微生物的生命活动受到抑制, 而一些富养性微生物大量繁殖, 通过对微生物种群丰度随时间的变化可以推测尸体分解处于死亡后的何种阶段, 有研究表明甚至可以通过寡养性微生物和富养性微生物的丰度相对变化鉴定墓穴土壤, 来推断样品是否来源于可疑的秘密墓穴^[27]。由此可见, 死后微生物群落的整体结构变化可以提供许多关于死亡本身及案事件的相关信息。

4.2 尸体分解过程中的特征菌群的变化

人体微生物群受到个体生活环境、饮食以及抗生素使用的影响, 可能呈现出不同的变化^[41], 但是在较高分类水平上, 人体各部位存在着优势菌群并在一定条件下保持稳定, 例如人体肠道内的菌群占主导地位的是放线菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门; 而人体皮肤表面厚壁菌门和放线菌的丰度更高^[42]。在机体死亡后, 这些优势菌群就成为尸体上的首批繁殖者^[15], 并在后续的分解过程中持续发挥作用。

Cobaugh 等^[43]在对 4 具人类尸体腐败分解过程中肠道和土壤微生物的变化进行了记录, 在死亡后 7–12 d, 变形杆菌的数量占据主导, 占比由 15% 上升至 26.1%, 而在死亡后的 10–23 d, 厚壁菌门成为主要的微生物门类, 占比上升至 50.9%; Hyde 等^[24]在对 2 具人类尸体的膨胀初期和膨胀晚期分别进行了采样, 综合两具尸体的数据, 在门水平上厚壁菌门占比最多, 其次是变形菌门, 但是由于采样次数较少, 无法准确描述微生物群落随时间的结构变化; Pechal 等^[25]对 3 头公猪腐败过程中体表和口腔采样, 在门的分

类水平上, 优势菌群为变形杆菌(70.4%±1.6%)和厚壁菌门(20.1%±6.6%), 在科的水平上优势菌群为莫拉氏菌科(51.3%±23.2%), 此外还得出门水平的分类在辨别死亡天数方面分辨率最高的结论; Li 等^[39]观察了大鼠死后 30 d 的肠道微生物结构和多样性变化, 在大鼠死后 5–10 d 变形杆菌为优势菌种, 而在 10 d 后厚壁菌门成为了优势菌种, 在分解过程中变形杆菌和厚壁菌门呈现趋势相反的变化; He 等^[44]利用高通量测序技术评估了淡水中老鼠尸体的分解过程微生物群落的组成和演替情况, 比较发现小鼠皮肤、岩石和水体微生物群落均有变化, 在科水平上同时检测梭状芽孢菌科和丛枝菌科有助于死后沉没时间(postmortem submersion interval, PMSI)的估计; Pittner 等^[45]分析了 2 具尸体 32 个样本在 15 周内的微生物群落变化, 认为在门水平的分类上变形杆菌和厚壁菌门占据主导; Liu 等^[46]利用机器学习算法研究微生物群落在死亡后的变化, 认为微生物群落在死亡时间点和晚期腐败阶段表现出明显差异, 其中粪肠球菌、厌氧杆菌和卢氏乳杆菌是预测 PMI 的模型中最具信息量的菌种。基于此前各项研究的结论总结关于死后尸体微生物群落的变化情况如表 3 所示。

尸体腐败过程中的特征菌群不仅受到个体生前饮食生活习惯的影响, 而且与死后所处的环境也息息相关, 外界微生物与尸体微生物共同主导了尸体腐败分解的过程^[17], 菌群受到温度、湿度和昆虫等因素的影响在各项研究中并未表现出一致的规律, 而是随着不同环境条件的影响而改变, 例如酸性细菌在某些研究中会呈现截然相反的变化, 推测其原因可能是不同环境的 pH 变化引起。但综合各项研究, 厚壁菌门和变形杆菌在腐败分解前期和后期的丰度变化使其可能具有作为特征菌群的潜力。

表 3 尸体微生物群落变化研究及主要结论

Table 3 Study on changes of cadaver microbial community and main conclusions

作者	分类水平	主要结论
Author	Classification level	Main conclusions
Hyde et al ^[24]	Phylum	厚壁菌门占主导地位, 其次是变形菌门 <i>Firmicutes</i> are in the domination position, followed by <i>Proteobacteria</i>
Pechal et al ^[25]	Phylum and family	菌群丰富度随时间变化呈现负相关; 门水平上变形菌门和厚壁菌门占主导, 科水平上莫拉氏菌科占主导 Richness was negatively correlated with time; <i>Firmicutes</i> and <i>Proteobacteria</i> are the main phyla under phylum level and <i>Moraxellaceae</i> under family level
Finley et al ^[38]	Phylum	地表组丰富度、多样性、均匀度均呈现下降趋势; 埋葬组丰富度升高, 多样性不变, 均匀度下降; 变形杆菌、放线菌和酸杆菌是主要的门 The richness, diversity and evenness of surface groups decreased while in the burial group the richness increased, the diversity remained unchanged, and the evenness decreased; <i>Proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> and <i>Acidobacteria</i> are the main phyla
Li et al ^[39]	Phylum	菌群多样性、丰富度和均匀度均呈现下降趋势; 5–10 d 内变形菌门占主导, 10 d 后厚壁菌门主导 The diversity, richness and evenness decreased; <i>Proteobacteria</i> is the main phylum within 5–10 d and <i>Firmicutes</i> after 10 d
Procopio et al ^[40]	Phylum	多样性随 PMI 延长而降低; 变形菌门、厚壁菌门和拟杆菌门增加, 酸杆菌减少 The diversity decreased as the PMI prolonged; <i>Proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> and <i>Bacteroidetes</i> increased and <i>Acidobacteria</i> decreased
Cobaugh et al ^[43]	Phylum	总细菌丰度无变化; 7–12 d 内变形菌门和厚壁菌门主导, 10–23 d 内厚壁菌门主导 No change in total abundance; <i>Proteobacteria</i> and <i>Firmicutes</i> are the main phyla within 7–12 d and <i>Firmicutes</i> within 10–23 d
He et al ^[44]	Family	岩石和皮肤样品呈下降趋势, 水体样品保持稳定; 梭状芽孢菌科、丛枝菌科真菌有助于估计 PMI Rock and skin samples showed a downward trend, while water samples remained stable; <i>Clostridiaceae</i> and <i>Arbuscular fungi</i> can help predicting PMI
Pittner et al ^[45]	Phylum	厚壁菌门和变形菌门主导 <i>Proteobacteria</i> and <i>Firmicutes</i> are the main phyla
Liu et al ^[46]	Phylum	厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和放线菌门在门水平上在所有 PMI 组中占优势 <i>Proteobacteria</i> , <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , and <i>Actinobacteria</i> are the main phyla in all PMI groups

5 总结与展望

对尸体微生物的研究受到人类微生物组 (Human Microbiome Project, HMP)^[47] 的启发, 借鉴了 HMP 研究的方法, 对机体死亡、免疫屏障消失后的人体微生物进行了进一步研究, 并探究了其与环境变量之间的关系, 旨在建立起一种基于微生物群落结构变化规律的死亡时间推断方法, 以科学的手段对命案现场尸体死亡时间进行

合理推断。在这一领域已有的研究已经初步描绘出微生物应用于死亡时间推断的广阔前景。目前国内有学者综述了肠道菌群和内脏菌群在死亡时间推断中的应用进展, 认为有必要建立一套检验流程的标准, 以方便研究结果之间的横向对比^[48]; 还有研究者从技术方法、研究应用和影响因素三个角度总结了微生物群落演替在 PMI 推断中的国内外研究情况, 认为需要探讨各影响因素影响下的微生物群落变化规律^[49]; 此外, 也有研究者

从不同生境中的尸体微生物研究入手,认为需要探究不同环境条件下对尸体微生物群落的变化模型的影响,以及探究动物实验的模型如何适用于人体检材等^[50]。综上所述,尸体的分解过程是一种多因素影响下的动态连续过程,环境因素、实验材料和技术方法的选择都会影响研究结果,导致死亡时间推断的模型不够准确。因此在今后的研究中应考虑不同的影响因素来设计实验,尽量使用死亡情况更加相似的人类尸体,同时适当增加采样时间点,更系统全面地探究尸体分解过程中的微生物群落结构改变以及关键环境因子的影响,最终总结归纳一套标准化的微生物采样和检验分析流程应用于法医学实践中。

REFERENCES

- [1] 丛斌. 法医病理学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 66.
CONG B. Forensic Pathology[M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016: 66 (in Chinese).
- [2] 黎增强, 左卫东, 张付, 李冬日, 王慧君. 死亡时间推断研究进展[J]. 法医学杂志, 2012, 28(4): 287-292.
LI ZQ, ZUO WD, ZHANG F, LI DR, WANG HJ. Latest progress in postmortem interval estimation[J]. Journal of Forensic Medicine, 2012, 28(4): 287-292 (in Chinese).
- [3] 孙政, 钟立辉, 孙栋. 256 例命案尸体死亡时间推断的回顾性分析[J]. 法医学杂志, 2013, 29(6): 434-436.
SUN Z, ZHONG LH, SUN D. A retrospective analysis of estimating postmortem interval in 256 murder cases[J]. Journal of Forensic Medicine, 2013, 29(6): 434-436 (in Chinese).
- [4] 夏玮, 袁慧雅, 高利娜, 徐恩宇, 刘俊亭. 生物胺在死亡时间推断中的应用[J]. 中国法医学杂志, 2020, 35(6): 660-663.
XIA W, YUAN HY, GAO LN, XU EY, LIU JT. Application of biogenic amines in the inference of postmortem interval[J]. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2020, 35(6): 660-663 (in Chinese).
- [5] 朱宝利, 曹志鹏. 死后生物化学检验在法医学鉴定中的应用[J]. 法医学杂志, 2021, 37(6): 859-866.
ZHU BL, CAO ZP. Application of postmortem biochemistry analysis in forensic medicine[J]. Journal of Forensic Medicine, 2021, 37(6): 859-866 (in Chinese).
- [6] LV YH, MA JL, PAN H, ZENG Y, TAO L, ZHANG H, LI WC, MA KJ, CHEN L. Estimation of the human postmortem interval using an established rat mathematical model and multi-RNA markers[J]. Forensic Science, Medicine, and Pathology, 2017, 13(1): 20-27.
- [7] 李亮亮, 王禹, 王江峰, 王敏. 我国嗜尸性蝇类的鉴别、发育及演替研究现状与分析[J]. 环境昆虫学报, 2016, 38(1): 159-169.
LI LL, WANG Y, WANG JF, WANG M. The current situation and analysis of identification, development and succession of sarcosaprophagous flies[J]. Journal of Environmental Entomology, 2016, 38(1): 159-169 (in Chinese).
- [8] 吕宙, 万立华. 昆虫学证据在死亡时间推断中的应用[J]. 刑事技术, 2016, 41(5): 352-356.
LÜ Z, WAN LH. Insect evidence and its application in postmortem interval estimation[J]. Forensic Science and Technology, 2016, 41(5): 352-356 (in Chinese).
- [9] 任立品, 尚艳杰, 郭亚东. 昆虫学证据在法庭科学中的应用及进展[J]. 法医学杂志, 2021, 37(3): 295-304.
REN LP, SHANG YJ, GUO YD. Progress and application of entomological evidence in forensic science[J]. Journal of Forensic Medicine, 2021, 37(3): 295-304 (in Chinese).
- [10] DASH HR, DAS S. Thanatomicrobiome and epinecrotic community signatures for estimation of post-mortem time interval in human cadaver[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(22): 9497-9512.
- [11] 郭晓奎. 人体微生物群与微生物组[J]. 微生物与感染, 2017, 12(3): 132-138.
GUO XK. Human microbiota and microbiome[J]. Journal of Microbes and Infections, 2017, 12(3): 132-138 (in Chinese).
- [12] GOODACRE R. Metabolomics of a superorganism[J]. The Journal of Nutrition, 2007, 137(1): 259S-266S.
- [13] 康白. 正常微生物群是一个新的人体生理学系统[J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(2): 63-65.
KANG B. Normal microbiota is a new human physiological system[J]. Chinese Journal of Microecology, 2003, 15(2): 63-65 (in Chinese).
- [14] 江鑫钰, 王江峰, 朱光辉. 尸体腐败微生物的研究进展[J]. 中国法医学杂志, 2016, 31(2): 148-150.
JIANG XY, WANG JF, ZHU GH. The development of microbial community study in forensic microorganism[J]. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2016, 31(2): 148-150 (in Chinese).
- [15] ZHOU W, BIAN YN. Thanatomicrobiome composition

- profiling as a tool for forensic investigation[J]. Forensic Sciences Research, 2018, 3(2): 105-110.
- [16] FORD WW. On the bacteriology of normal organs[J]. The Journal of Hygiene, 1901, 1(2): 277-284.
- [17] JAVAN GT, FINLEY SJ, ABIDIN Z, MULLE JG. The thanatomicrobiome: a missing piece of the microbial puzzle of death[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 225.
- [18] 夏旭倩, 牛青山. 皮肤微生物群落的研究进展及法医学应用[J]. 刑事技术, 2019, 44(3): 195-200.
- XIA XQ, NIU QS. Forensic potential of skin microbial community[J]. Forensic Science and Technology, 2019, 44(3): 195-200 (in Chinese).
- [19] FIERER N, LAUBER CL, ZHOU N, McDONALD D, COSTELLO EK, KNIGHT R. Forensic identification using skin bacterial communities[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(14): 6477-6481.
- [20] DONG KK, XIN Y, CAO FQ, HUANG ZW, SUN J, PENG M, LIU WB, SHI P. Succession of oral microbiota community as a tool to estimate postmortem interval[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 13063.
- [21] METCALF JL, XU ZZ, WEISS S, LAX S, van TREUREN W, HYDE ER, SONG SJ, AMIR A, LARSEN P, SANGWAN N, HAARMANN D, HUMPHREY GC, ACKERMANN G, THOMPSON LR, LAUBER C, BIBAT A, NICHOLAS C, GEBERT MJ, PETROSINO JF, REED SC, et al. Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition[J]. Science, 2016, 351(6269): 158-162.
- [22] 盛华芳, 周宏伟. 微生物组学大数据分析方法、挑战与机遇[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(7): 931-934.
- SHENG HF, ZHOU HW. Methods, challenges and opportunities for big data analyses of microbiome[J]. Journal of Southern Medical University, 2015, 35(7): 931-934 (in Chinese).
- [23] STREIT WR, SCHMITZ RA. Metagenomics – the key to the uncultured microbes[J]. Current Opinion in Microbiology, 2004, 7(5): 492-498.
- [24] HYDE ER, HAARMANN DP, LYNNE AM, BUCHELI SR, PETROSINO JF. The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77733.
- [25] PECHAL JL, CRIPPEN TL, BENBOW ME, TARONE AM, DOWD S, TOMBERLIN JK. The potential use of bacterial community succession in forensics as described by high throughput metagenomic sequencing[J]. International Journal of Legal Medicine, 2014, 128(1): 193-205.
- [26] COSTELLO EK, LAUBER CL, HAMADY M, FIERER N, GORDON JI, KNIGHT R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time[J]. Science, 2009, 326(5960): 1694-1697.
- [27] METCALF JL, WEGENER PARFREY L, GONZALEZ A, LAUBER CL, KNIGHTS D, ACKERMANN G, HUMPHREY GC, GEBERT MJ, van TREUREN W, BERG-LYONS D, KEEPERS K, GUO Y, BULLARD J, FIERER N, CARTER DO, KNIGHT R. A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system[J]. eLife, 2013, 2: e01104.
- [28] BELK A, XU ZZ, CARTER DO, LYNNE A, BUCHELI S, KNIGHT R, METCALF JL. Microbiome data accurately predicts the postmortem interval using random forest regression models[J]. Genes, 2018, 9(2): 104.
- [29] GUO JJ, FU XL, LIAO HD, HU ZY, LONG LL, YAN WT, DING YJ, ZHA L, GUO YD, YAN J, CHANG YF, CAI JF. Potential use of bacterial community succession for estimating post-mortem interval as revealed by high-throughput sequencing[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24197.
- [30] FINLEY SJ, BENBOW ME, JAVAN GT. Microbial communities associated with human decomposition and their potential use as postmortem clocks[J]. International Journal of Legal Medicine, 2015, 129(3): 623-632.
- [31] LAUBER CL, ZHOU N, GORDON JI, KNIGHT R, FIERER N. Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 307(1): 80-86.
- [32] JAVAN GT, FINLEY SJ, SMITH T, MILLER J, WILKINSON JE. Cadaver thanatomicrobiome signatures: the ubiquitous nature of *Clostridium* species in human decomposition[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2096.
- [33] GONZALEZ A, CLEMENTE JC, SHADE A, METCALF JL, SONG SJ, PRITHIVIRAJ B, PALMER BE, KNIGHT R. Our microbial selves: what ecology can teach us[J]. EMBO Reports, 2011, 12(8): 775-784.
- [34] CARTER DO, YELLOWLEES D, TIBBETT M. Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems[J]. Naturwissenschaften, 2007, 94(1): 12-24.

- [35] SPERUDA M, PIECUCH A, BORZĘCKA J, KADEJ M, OGÓREK R. Microbial traces and their role in forensic science[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(4): 2547-2557.
- [36] OLAKANYE AO, THOMPSON T, RALEBITSO-SENIOR TK. Shifts in soil biodiversity: a forensic comparison between *Sus scrofa domesticus* and vegetation decomposition[J]. Science & Justice, 2015, 55(6): 402-407.
- [37] THOMAS TB, FINLEY SJ, WILKINSON JE, WESCOTT DJ, GORSKI A, JAVAN GT. Postmortem microbial communities in burial soil layers of skeletonized humans[J]. Journal of Forensic and Legal Medicine, 2017, 49: 43-49.
- [38] FINLEY SJ, PECHAL JL, BENBOW ME, ROBERTSON BK, JAVAN GT. Microbial signatures of cadaver gravesoil during decomposition[J]. Microbial Ecology, 2016, 71(3): 524-529.
- [39] LI H, YANG E, ZHANG SR, ZHANG J, YUAN L, LIU RN, ULLAH S, WANG Q, MUSHTAQ N, SHI Y, AN CH, WANG ZY, XU JR. Molecular characterization of gut microbial shift in SD rats after death for 30 days[J]. Archives of Microbiology, 2020, 202(7): 1763-1773.
- [40] PROCOPIO N, GHIGNONE S, WILLIAMS A, CHAMBERLAIN A, MELLO A, BUCKLEY M. Metabarcoding to investigate changes in soil microbial communities within forensic burial contexts[J]. Forensic Science International: Genetics, 2019, 39: 73-85.
- [41] LANGDON A, CROOK N, DANTAS G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation[J]. Genome Medicine, 2016, 8(1): 39.
- [42] LAX S, SMITH DP, HAMPTON-MARCELL J, OWENS SM, HANDLEY KM, SCOTT NM, GIBBONS SM, LARSEN P, SHOGAN BD, WEISS S, METCALF JL, URSELL LK, VÁZQUEZ-BAEZA Y, van TREUREN W, HASAN NA, GIBSON MK, COLWELL R, DANTAS G, KNIGHT R, GILBERT JA. Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment[J]. Science, 2014, 345(6200): 1048-1052.
- [43] COBAUGH KL, SCHAEFFER SM, DeBRUYN JM. Functional and structural succession of soil microbial communities below decomposing human cadavers[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130201.
- [44] HE J, GUO JJ, FU XL, CAI JF. Potential use of high-throughput sequencing of bacterial communities for postmortem submersion interval estimation[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2019, 50(4): 999-1010.
- [45] PITTNER S, BUGELLI V, BENBOW ME, EHRENFELLNER B, ZISSLER A, CAMPOBASSO CP, OOSTRA RJ, AALDERS MCG, ZEHNER R, LUTZ L, MONTICELLI FC, STAUFER C, HELM K, PINCHI V, RECEVEUR JP, GEIßENBERGER J, STEINBACHER P, AMENDT J. The applicability of forensic time since death estimation methods for buried bodies in advanced decomposition stages[J]. PLoS One, 2020, 15(12): e0243395.
- [46] LIU RN, GU YX, SHEN MW, LI H, ZHANG K, WANG Q, WEI X, ZHANG HH, WU D, YU K, CAI WM, WANG GJ, ZHANG SR, SUN QR, HUANG P, WANG ZY. Predicting postmortem interval based on microbial community sequences and machine learning algorithms[J]. Environmental Microbiology, 2020, 22(6): 2273-2291.
- [47] TURNBAUGH PJ, LEY RE, HAMADY M, FRASER-LIGGETT CM, KNIGHT R, GORDON JI. The human microbiome project[J]. Nature, 2007, 449: 804-810.
- [48] 王梓齐, 张驰, 康克莱, 龚辰宇, 郭立亮, 季安全, 聂胜洁, 吴坚, 王乐. 微生物群落变化在死亡时间推断中的研究进展[J]. 中国法医学杂志, 2021, 36(5): 528-531.
- WANG ZQ, ZHANG C, KANG KL, GONG CY, GUO LL, JI AQ, NIE SJ, WU J, WANG L. Research progress of microbial community changes in the estimation of postmortem interval[J]. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2021, 36(5): 528-531 (in Chinese).
- [49] 向青青, 陈立方, 苏秦, 杜宇坤, 梁沛妍, 康晓东, 石河, 徐曲毅, 赵建, 刘超, 陈晓晖. 微生物群落演替在死亡时间推断中的研究进展[J]. 法医学杂志, 2023, 39(4): 399-405.
- XIANG QQ, CHEN LF, SU Q, DU YK, LIANG PY, KANG XD, SHI H, XU QY, ZHAO J, LIU C, CHEN XH. Research progress on microbial community succession in the postmortem interval estimation[J]. Journal of Forensic Medicine, 2023, 39(4): 399-405 (in Chinese).
- [50] 赵广众, 梁宇, 董春楠. 应用法医微生物学推断死亡时间研究进展[J]. 刑事技术, 2024, 49(1): 80-84.
- ZHAO GZ, LIANG Y, DONG CN. Research progress of forensic microbiology in postmortem interval estimation in different environments[J]. Forensic Science and Technology, 2024, 49(1): 80-84 (in Chinese).