



## 专论与综述

## 土壤微生物在法庭科学领域中的应用研究进展

许敏敏<sup>1,2</sup> 时玉<sup>3</sup> 刘洋<sup>1,5</sup> 涂政<sup>2</sup> 王林<sup>4</sup> 贾振军<sup>\*1</sup> 苑美青<sup>\*2</sup>

1 中国人民公安大学 北京 100038

2 公安部物证鉴定中心 法医遗传学公安部重点实验室 北京 100038

3 河南大学生命科学学院 作物逆境适应与改良国家重点实验室 河南 开封 475004

4 包头市公安局刑侦支队 内蒙古 包头 014030

5 黑龙江省垦区公安局北安分局 黑龙江 黑河 164000

**摘要:** 土壤物证在法庭科学领域的应用由来已久,主要是基于其外观、颜色、元素组成、矿物学等理化特性及土壤夹杂物等的比对检验。近年来,随着高通量测序技术的发展,法医土壤微生物检验不再完全依赖于传统培养技术,而是直接挖掘分析土壤中的全部微生物 DNA 信息,并将这些信息应用于法庭科学领域内的样本比对、土壤物证区域环境推断和溯源研究等,从而凸显出土壤微生物物证在案件侦查和法庭诉讼方面的巨大价值和应用潜力。本文通过综述国内外有关法医土壤微生物研究的最新进展,指出了土壤微生物多样性检验在法庭科学领域的应用潜力,分析了法医土壤微生物群落多样性的影响因素,最后探讨了法医土壤微生物研究中存在的问题和未来的发展方向。

**关键词:** 法庭科学, 土壤物证, 土壤微生物, 高通量测序

## Research progress of soil microbes application in forensic science

XU Minmin<sup>1,2</sup> SHI Yu<sup>3</sup> LIU Yang<sup>1,5</sup> TU Zheng<sup>2</sup> WANG Lin<sup>4</sup> JIA Zhenjun<sup>\*1</sup>  
YUAN Meiqing<sup>\*2</sup>

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

2 Key Laboratory of Forensic Genetics, Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China

3 State Key Laboratory of Crop Stress Adaptation and Improvement, School of Life Sciences, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China

4 Baotou Public Security Bureau, Baotou, Inner Mongolia 014030, China

5 Bei'an Branch of Public Security Bureau in Reclamation Area, Heihe, Heilongjiang 164000, China

**Abstract:** Soil-related evidence has been used for decades in forensic science. Forensic soil comparison test is mainly based on its physical and chemical properties, such as soil appearance, color, elemental

**Foundation item:** Operating Expenses for Basic Scientific Research of People's Public Security University of China (2021JKF104)

**\*Corresponding authors:** JIA Zhenjun: E-mail: zhenjunjia@163.com

YUAN Meiqing: Tel: 86-10-66269473; E-mail: sequence17@163.com

**Received:** 31-12-2020; **Accepted:** 17-05-2021; **Published online:** 22-06-2021

**基金项目:** 中国人民公安大学基本科研业务费(2021JKF104)

**\*通信作者:** 贾振军: E-mail: zhenjunjia@163.com

苑美青: Tel: 010-66269473; E-mail: sequence17@163.com

**收稿日期:** 2020-12-31; **接受日期:** 2021-05-17; **网络首发日期:** 2021-06-22

composition, mineralogical properties and soil inclusions. Recently, with the development of high-throughput sequencing technology, independent of the traditional culture techniques, microbial communities could be directly tested and analyzed through all its DNA information in the soil. Then we use this information for sample comparison or source speculation in mock or real case. This highlights the great value and potential application of soil microbial evidence in case investigation and justice. This review summarizes the recent domestic and foreign research progress in forensic soil microbes, points out the potential applications for soil microbial diversity test in the field of forensic science, analyzes the influencing factors of soil microbial community diversity, and finally discusses the existing problems and future development direction of forensic soil microbiology.

**Keywords:** forensic science, soil evidence, soil microbes, high-throughput sequencing

土壤广泛存在于自然界中,与我们的生活息息相关,也不可避免地成为各类刑事案件现场常见的物证之一。目前,法庭科学领域对于土壤物证的检验主要基于其外观、颜色、元素组成、矿物学等理化特性等。近年来,随着生物技术的快速发展,特别是高通量测序技术的成熟以及成本的下降,法医土壤微生物的研究已经从传统的分离培养及鉴定特征微生物和序列多态性,发展到通过高通量测序直接测定土壤微生物的基因序列,并尝试将其应用到实际案件中,逐渐显示出法医土壤微生物的物证价值。

## 1 土壤微生物多样性检验在法庭科学中的应用潜力

案件现场、嫌疑人活动区域及其衣物工具上难免携带来源地土壤,而土壤微生物多样性与其地理分布、土壤类型、人类活动等密切相关。因此,法庭科学工作者可以利用土壤微生物群落组成特征进行案件现场来源地推断、人或物与特定现场关联、未知土壤物证相似性比对等(图 1)。总体来说,土壤微生物在法庭科学领域的应用潜力主要体现在 3 个方面。

### 1.1 在大尺度空间下可以进行地理来源推断

从理论上来说,土壤微生物的种群结构具有明显的地理分布特征。早在 2006 年, Martiny 等<sup>[1]</sup>提出可以通过绘制微生物分布图来显示各地土壤微生物的分布和群落组成。Habtom 等<sup>[2]</sup>分析了以色列 5 个不同降水区(从南部沙漠到北部地中海气

候地区跨越 260 km,其年降水量从 100 mm 增至 1 300 mm)的不同土壤,发现在同一地理位置不同土壤类型的细菌种群结构差异显著,说明了地理位置对土壤微生物群落的影响大于土壤类型。Yang 等<sup>[3]</sup>研究了在大空间尺度下,中国 10 个城市(跨越 3 000 km) 61 个城区 529 份土样中微生物群落组成的变异情况,结果表明,城市土壤细菌群落相似性随地理距离的增加而显著下降;尽管在同一城市范围内(26–100 km),土壤细菌的种群结构相似性较好,但用 Source Tracker<sup>[4]</sup>和 FEAST<sup>[5]</sup>方法对随机土壤样本进行地理溯源时,在城市水平上其识别准确率为 90.0%,在城市内部的区水平上为 66.7%。以上说明在几百千米的大尺度空间范围,利用土壤微生物进行地理来源推断具有一定的可靠性和准确性。

随着法医土壤微生物研究的进一步深入和数据积累,结合构建法医土壤微生物数据库,未来可以在大空间尺度地理空间上,通过微量的土壤样品预测其地理来源,为锁定案件现场地理位置和缩小调查范围发挥重要作用。

### 1.2 在小尺度空间下可以实现精细区分

基于大部分案件案发特点以及侦查和破案的实际困难,有些情况下公安机关需要在相对小空间尺度来推断土壤来源或者进行样本比对。

Martiny 等<sup>[6]</sup>分析 3 个大洲 12 个盐沼地 106 个沉积样品的氨氧化细菌种群结构时发现,β 多样性主要由空间因素所决定,群落相似性在局部和区域尺度空间下呈距离衰减关系。采用限制性片段长度多态性技术,陈尚坤等<sup>[7]</sup>利用末端限制性长度

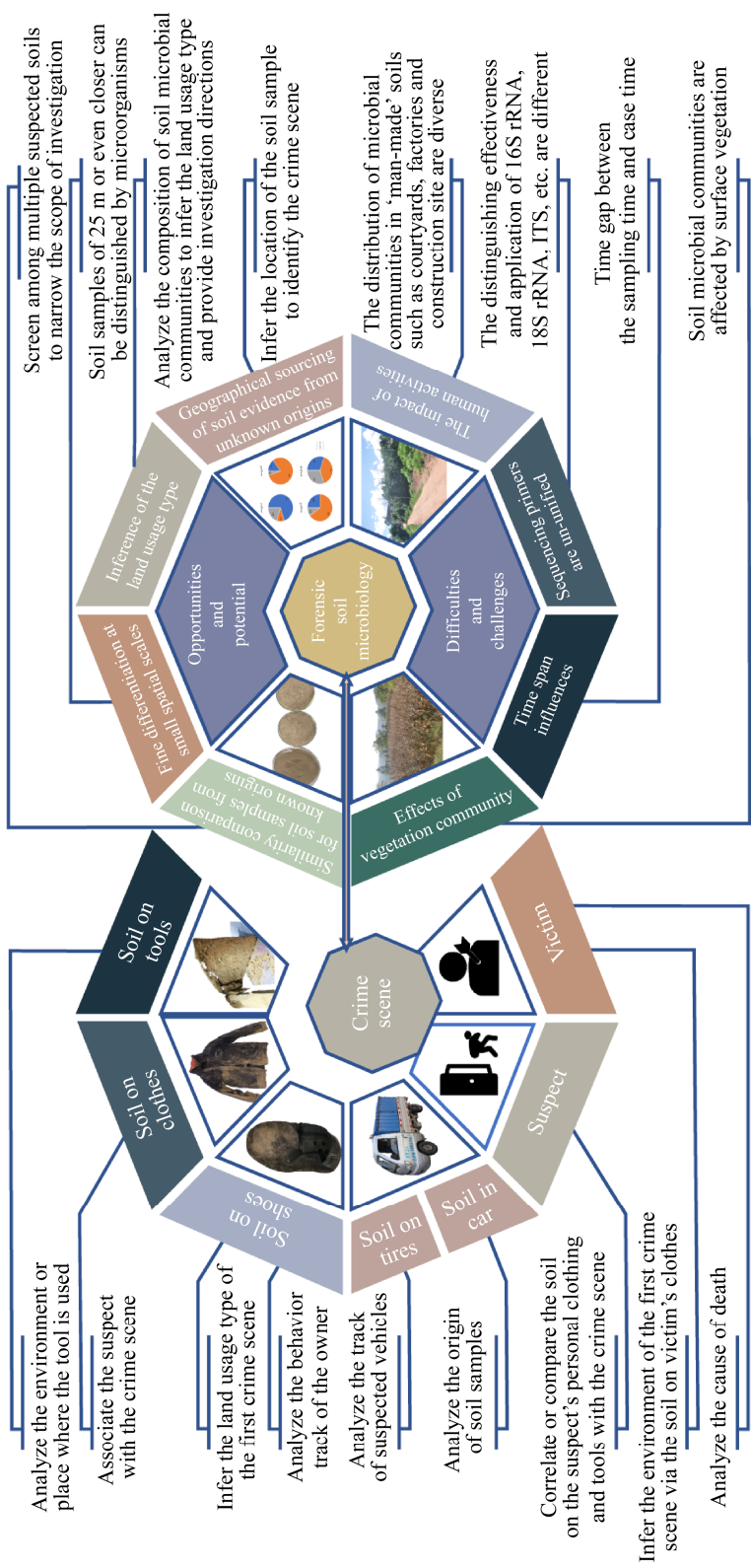


图 1 法医土壤微生物研究内容及应用潜力与挑战示意图  
Figure 1 Schematic diagram of research contents, potential applications and challenges of forensic soil microbes

多态性技术(Terminal-Rstriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)研究我国重庆市和吉林省的土样微生物,结果表明不同地理位置的土样谱图具有差异性,而且距离越近图谱越相似;其中,虽然重庆土样中距离为 2 m 的样品 4 号和 9 号与 10 号仅相距 50 m,但 4 号和 9 号样品的图谱相比 10 号样本更为相似。Mummey 等<sup>[8]</sup>分析了美国怀俄明州均质草地和灌木草地的 2 种土样,发现在均质草地样品中,100 m 内细菌种群结构没有显著差异,而在灌木草地样品中,当采样距离大于 3.6 m 时细菌群落相似性开始下降。Meyers 等<sup>[9]</sup>研究美国密歇根州 5 种生境(农田,沼泽边缘,院落,林地,沙地)距中心约 3 m 的四周土样,发现同一生境内中心点与四周点的细菌群落相似性系数在 0.58–0.70 之间。这些研究意味着案发现场只要环境、植被等不同,并且存在一定的地理距离,就可以利用土壤微生物分析嫌疑土壤样本的相似性及差异度。

采用高通量测序技术, Jesmok 等<sup>[10]</sup>分析了相似土壤(林地)的 9 个不同地点,以及 3 种生境(落叶林,化学处理的庭院,未经处理的庭院)内不同水平距离(约 1.5、3.0、15.2、30.5 m)的土样微生物,虽然发现其细菌群落结构在纲水平上有 80% 的相似度,但 K 近邻分类实验显示,在相似土壤条件下识别准确率为 87.5%–100.0%,在不同水平距离土壤条件下为 94.4%–97.2%。Habtom 等<sup>[2]</sup>利用多响应置换程序(Multi Response Permutation Procedure, MRPP)研究了 3 种土壤类型(黑色石灰土,沙土,红土)分别在 2、25、50、75、100 m 处的微生物种群结构,结果显示除 2 m 处,在 3 种土壤类型内均观察到距离衰减关系。Wang 等<sup>[11]</sup>在我国河南省荥阳市采集了 20 m (路边,距路边 3、7、10、20 m)范围内的小麦田土样和 8 km (1、4、6 和 8 km)范围内的土样,在山西省和陕西省采集了 500 km (300、400 和 500 km)范围内的土样,研究不同水平距离尺度的细菌群落结构,发现在 20 m 范围内,

除路边土样外,细菌群落聚集较为紧密,而且路边土样的特异 OTU 数量是其他土样的 2 倍;线性判别分析效应大小显示,距离路边土样越近差异越显著;此外,相似度分析显示 3 种距离尺度之间差异显著。以上研究者的研究结果均显示,即使在距离相近(大于 2 m)的小尺度空间范围内,土壤微生物的种群结构也有所不同,从而为法庭科学工作者在小范围内进行土壤识别、比较土壤样品的相似性提供了坚实的研究基础。

除了土壤微生物的水平分布特征对实际案件有较大应用价值外,对于一些土埋案件,从水平和垂直尺度上分析土壤微生物的变化情况,均对案件侦查有重要意义。Fierer 等<sup>[12]</sup>在加利福尼亚梯田和山谷生境内,分析采样深度达 2 m 的土壤,结果显示 2 种生境内微生物种群结构与采样深度都存在显著关系,随着采样深度的增加,微生物群落密度比地表少 1–2 个数量级,在 2 m 处的微生物量比 25 cm 处少了约 33%–35%。Eilers 等<sup>[13]</sup>分析了科罗拉多州 9 处土壤,采样深度达 180 cm,发现总体上细菌种群结构与深度成类似“U”形曲线,而群落多样性在前 10 cm 处最高,随着深度增加减少了 20%–40%;此外,在 20–60 cm 时的群落相似性受地理位置的影响较小。Jesmok 等<sup>[10]</sup>研究了细菌种群结构在采样深度为 0–152.4 cm 之间的差异情况,虽然在纲水平上差异不显著,但仍随深度而发生变化,利用深度为 2、10、60 cm 作为训练集进行机器学习,其分配正确率为 100%。Finley 等<sup>[14]</sup>对 18 具地表和土埋尸体的分解过程进行了 3–303 d 的观察,发现地表尸体中酸杆菌门(*Acidobacteria*)相对丰度减少、厚壁菌门(*Firmicutes*)相对丰度增加,而土埋尸体的种群结构则相对保持一致。Thomas 等<sup>[15]</sup>分析了白骨化尸体和对照组(无尸体)在上(0–10 cm)、中(10–20 cm)、下(20–30 cm) 3 个土层中的微生物种群结构,发现白骨化尸体的种群结构不仅在 3 个土层中相似,并且与对照组也相似。

以上结果提示我们是否需要采集垂直水平的土壤样本需要视案情实际情况而定,如果分析案件发生地和涉案人员只可能接触到表层土壤,则不需要采集不同深度的对照样本;反之,如果案情与不同深度土壤相关联,则最好采集不同深度土壤作为对照样本。

### 1.3 利用土壤微生物可以区分土壤生境类型

不同土壤生境类型具有不同的理化性质和生物因素,对微生物种群结构也会产生不同影响。Delgado-Baquerizo 等<sup>[16]</sup>分析了跨越 6 大洲和 18 个国家的 237 个土样,发现虽然仅有 2% 的细菌种系型(Phylotype)(约 500 种系型,共约 25 224 种系型)是主要类型,但却占全球土壤细菌的近一半,由此说明尽管生境类型不同,但在一定分类水平上具有相当多的同种微生物,而从另一方面也说明绝大多数微生物是稀有罕见、丰度相对较低且分布相对狭窄,因此为区分不同土样提供了客观条件和理论基础。Fløjgaard 等<sup>[17]</sup>采集了丹麦 5 个地区 24 种环境类型的 130 个土样微生物 eDNA (包括真核生物、真菌、植物和昆虫),通过线性回归分析环境条件、二次判别分析生境类型和地理来源预测,并用 2 个模拟案例进行验证,结果表明土壤 eDNA 具有较好的预测潜力。葛芸英等<sup>[18]</sup>研究我国北京市不同地理位置的土样微生物,发现不同土壤类型样品之间的相似系数较低(小于 0.5)。在我国上海市,宋国庆等<sup>[19]</sup>利用高通量测序技术分析了 7 个市区(各采样点之间距离 1–2 km) 5 种生境(天然草地,人工草地,工业区草地,树林土壤,沙滩土壤)的土样微生物,发现不同土壤类型的细菌群落结构在门和科水平上差异显著,在主成分图上聚集较为紧密,2 个主成分反映了全部信息的 82.7%,具有较高代表性。Jesmok 等<sup>[10]</sup>对 10 种生境(湿地,田地,针叶林,沙滩,玉米地,未耕地,路边,落叶林,庭院,土路)的土样微生物群落进行了非度量多维尺度分析和聚类实验,结果表明虽然不同生境的细菌群落组成在纲水平上高达约 75% 的相似度,但

总体上区分效果好,而且聚类识别准确率达 88% 以上,由此说明虽然不同生境之间的群落具有一定相似性,但仍存在足以区分的差异。

在法庭科学工作中,从不同生境类型的特殊微生物种群入手预测未知土壤样本来源地的生境类型,有利于小范围内筛查到最可能与案件有直接关系的发生地。比如从嫌疑人鞋底提取的土壤中分析其微生物特有种群,判断其来源于周围的玉米地、菜地或林地等,从而缩小侦查范围。

## 2 土壤微生物群落多样性的影响因素及其对证据价值的影响

### 2.1 时间跨度的影响

案件从发生距发现再到现场勘查人员提取物证往往会存在时间差,这个时间差短则数小时、数天,长则达数月甚至数年。由于土壤微生物物证区别于指纹、DNA 等物证的自身特点,其生物学属性导致其自变性,因此,法医土壤微生物研究特别需要明晰案发后经过多长时间微生物仍可保持其相对稳定性或者其随时间的变化规律,从而把握时间因素对土壤比对正确性的影响,这也是众多法庭科学工作者关心的重要问题之一。

Chernov 等<sup>[20]</sup>对土壤微生物群落在不同时间范围内的动态变化进行了详细论述,划分了 4 个时间段,包括短期变化(数小时或数天至数周)、季节性变化、长期变化(数年)和最长时间变化(数百年),并概括了影响微生物群落各段时间动态变化的相关因素,包括土壤条件的突然转变(如冻结与融化,干燥与湿润)<sup>[21]</sup>、有机物质<sup>[22]</sup>、植物群落<sup>[23]</sup>、温度<sup>[24]</sup>、湿度<sup>[25]</sup>和土壤理化性质<sup>[26]</sup>等,但不同时间范围内微生物群落多样性的变化模式并不趋于一致。

一些研究表明,虽然微生物群落结构随时间发生变化,但这种变化在一定范围内不会造成显著影响。在大空间尺度下,Zhang 等<sup>[27]</sup>分析了我国北部平原冬小麦种植区细菌和真菌群落种群结构随空间(跨越 878 km, 48 个地点)和时间(夏季、冬季)

的变化情况,发现 2 种微生物丰富度在夏季均较高,而且群落组成相似度也较高,利用随机森林方法确定了季节性差异是由快速变化的环境变量引起的,如土壤湿度、溶解有机氮、降水等。然而空间因素更能解释微生物的时空分布情况,由此在一定程度上排除了大尺度空间下进行地理溯源时一定时间范围对微生物种群结构的影响。

在小空间尺度下,Lauber 等<sup>[28]</sup>也发现与 Zhang 等<sup>[27]</sup>类似的结果,即时间因素对  $\alpha$  多样性影响显著,而对  $\beta$  多样性影响较小,但不同土地利用方式的时间变化模式也不一致,可能是土壤环境和植物群落多样性相互作用的结果。Carini 等<sup>[29]</sup>在科罗拉多州山坡上进行了 6 个月的密集采样,研究了时间、空间以及残留 DNA 对土壤原核生物和真菌群落的影响,结果发现微生物群落的空间变化比时间变化更显著,而且不受残留 DNA 的影响;但在控制空间异质性情况下,微生物群落随时间发生明显变化,在去除土壤中残留 DNA 后种间差异更显著。因此,在研究有关土壤微生物群落的时间变化时需要考虑残留 DNA 的影响。Badgley 等<sup>[30]</sup>在 4–9 月模拟保存在不同条件(室温, 24 °C, 4 °C)、不同客体(铲子, T 恤, 牛仔裤, 鞋)、不同案发现场(农田, 针叶林, 土路, 院子)的土样微生物变化情况,发现所有客体样品在最初几个月内细菌群落结构变化最明显,之后趋于平稳,与物证承载客体、生境类型、保存条件无关,但在较低温度下该变化通常会比较缓慢;通过非度量多维尺度分析(Non-Metric Multidimensional Scaling, NMDS)散点图观察到不同客体土样都与原采样地聚集紧密,随机森林分类准确率为 88.2%–100.0%;对 T 恤土样进一步分析发现,一周内其与原采样地紧密聚集,在 3–6 月虽然分布分散,但都沿着同一移动方向。虽然微生物群落相似性随时间发生了一定变化,但主要体现在  $\alpha$  多样性上,而对  $\beta$  多样性影响较小,所以在一定时间范围内这种差异对其识别准确率不会造成显著影响。因此,法医土壤微生物在一定程度上仍然是稳定和可比较的,但是由于受到其他各种因

素的影响,时间因素对微生物群落的具体影响仍需进一步研究。

## 2.2 人类活动的影响

案件中涉及土壤的现场环境具有广泛性、复杂性、变量多的特点,有些处于人迹罕至的荒山平原,有些处于人类活动较多的公园、道路等,导致微生物种群结构受到人类活动的影响。一般情况下,具体案件的土壤环境是特定的,所以微生物的地理分布规律不明显,也没有引起广泛的关注。然而一些研究发现人类活动可能造成土壤多样化,形成所谓的“人为土壤”,包括受化学物质作用或在采矿、灌溉和施工等过程中形成的混合土壤,这些土壤表现出高度的空间异质性,从而导致微生物种群结构发生显著变化<sup>[31–32]</sup>。

Meyers 等<sup>[9]</sup>的研究分析发现,相比其他生境的土样,农田和院子的细菌群落多样性随时间变化并不显著,前者可能受种植作物、翻耕土地施肥等影响,后者可能是修剪除草、人类走路活动等影响,由此说明人类活动可能会导致生境群落的均质化。Damaso 等<sup>[33]</sup>研究结果表明,地理距离近的土样其微生物种群结构相似,但一部分土样没有显著相关性,其环境属性包括建筑用地、废弃的养老院、农田、垃圾填埋场和 6 个月前经过焚烧的土地,因此认为人类活动对种群结构有一定程度的影响。此外,人类活动也可能导致微生物多样性的显著增加。Ramirez 等<sup>[34]</sup>分析了纽约中央公园约 600 个土样,与全球土壤微生物数据集进行比对,结果显示二者土样理化性质相似,其原核和真核生物比全球微生物数据库分别仅少 6.5%和 26%,说明了微生物多样性受到了城镇化过程和人类管理活动的影响。因此,在法医土壤微生物分析中需要考虑人类活动对微生物种群结构的影响,同时一些特定人为干扰的土壤微生物的变异可能更有利于案件侦破。

## 2.3 植物的影响

由于案发地点的多样性,如农田、树林、草地、荒漠等覆盖着不同的植物群落,因此,法医土壤微生物研究需要考虑植物对土壤微生物群落多样性

和组成结构的影响。毕江涛等<sup>[35]</sup>从植物类型、植物多样性、植物不同的生长发育阶段、同一植物不同基因型、植物根系分泌物以及外来入侵植物方面论述了植物对土壤微生物多样性的影响。褚海燕等<sup>[36]</sup>综述了我国关于森林、草地、农田生态系统的土壤微生物地理分布研究,也说明了不同生态系统中植物物种对土壤微生物种群结构的影响。Delgado-Baquerizo 等<sup>[37]</sup>研究了澳大利亚和英格兰 2 个独立地区的植物属性对土壤微生物多样性的影响,发现在大尺度空间下植物属性能够解释细菌和真菌群落组成的某些特异变化。然而,在英国草地生态系统中,Leff 等<sup>[38]</sup>分析了植物群落分类、系统发育和功能性状预测土壤微生物种群结构的可能性,发现虽然植物群落组成信息可以提高对微生物群落组成的预测可能性,但也仅对某些微生物(如真菌)发挥作用,而且植物群落系统发育和功能性状的预测效果均不佳,此外,微生物群落组成差异与从土壤中提取的植物 DNA 有关,与根 DNA 无显著关系。在巴拿马热带雨林生态系统中,Barberán 等<sup>[39]</sup>也发现了类似结果。

以上研究结果都提示我们,在实际案件中如果遇到植被类型复杂或特殊的环境,除了对土壤物证进行提取之外,也要对地上植被信息进行记录分析,并且法庭科学工作者事实上已经考虑搜集分析土壤中相应的植物 DNA 信息,综合应用多种技术手段联合破案。

## 2.4 微生物标记物种类的影响

目前,通常使用细菌、真菌、古菌作为标记物进行土壤微生物分析,而土壤中的微生物数量众多,至今仍有很多未被人类识别,因此需要评估何种标记物具有较强的区分能力。由于古菌在常见土壤中所占比例较少,所以本文只对细菌和真菌进行概述。

### 2.4.1 细菌

细菌是土壤中数量最多、种类最多的微生物<sup>[40]</sup>,1 g 土壤中有  $4 \times 10^7$ – $2 \times 10^9$  个细菌<sup>[10,41]</sup>,远多于真菌,大大提高了土壤的区分能力。Woese

等<sup>[42]</sup>首先使用 16S rRNA 基因作为细菌分类标记进行系统发育分析,随后微生物学家开始广泛使用 16S rRNA 基因作为细菌分类鉴定标记。16S rRNA 基因包含 10 个反映菌种之间进化关系的保守区,以及 9 个反映菌种之间差异性的序列高度变化的可变区<sup>[43]</sup>。因此可根据保守区设计引物,再利用可变区的特异性在特定分类水平下鉴定细菌种类<sup>[44]</sup>。虽然细菌群落结构的稳定性易受各种因素的影响,但 Young 等<sup>[45]</sup>研究表明即使在土壤数量较少的情况下,细菌在小范围内仍具有较好的区分能力。此外,许多关于土壤特性和环境因素的微生物学分析实验都是基于细菌群落结构进行的,为法医土壤微生物分析提供了大量的细菌群落信息<sup>[46]</sup>。

### 2.4.2 真菌

Hawksworth 等<sup>[47]</sup>首次阐述了真菌在法庭科学领域内的价值和相关应用。Macdonald 等<sup>[48]</sup>研究保存在干燥空气下的土壤真菌、细菌、古菌对土壤来源的分类作用,由于古菌数量较少,不能有效区分土壤类型,而细菌可能受到土壤含水量的影响变化较大,相比之下真菌受环境影响较小。Young 等<sup>[45]</sup>研究 4 种土壤微生物标记基因(细菌 16S rRNA 基因、真核 18S rRNA 基因、叶绿体 trnI 内含子基因及核糖体基因间隔区)区别不同地理位置土壤的能力,结果显示真菌具有最高的区分能力,而且在扩增 DNA 片段时也比较可靠。随后在模拟案例中,Young 等<sup>[49]</sup>对放在嫌疑人汽车后车厢里 6 个星期、带有泥土的鞋和铲子与犯罪现场土样进行比较检验,验证了真菌推断土壤来源的可靠性,并指出真菌对某些环境变量并不特别敏感,如降水、温度、保存条件等。

由于细菌和真菌都具有各自优势以及一定的局限性,有学者综合使用多种微生物作为共同标记物来推断土壤来源,发现其确实能提高土壤地理溯源的准确性。Macdonald 等<sup>[48]</sup>发现单一细菌和真菌标记物均不能准确区分所有土壤,但二者作为共同标记物能弥补不足,区分效果更佳。



## 2.5 土壤重量的影响

有些案件收集到的土壤是微量的,虽然 1 g 土壤含有大量微生物,但是微量土壤中的微生物能否代表该土壤特征仍需进一步验证。Young 等<sup>[50]</sup>发现不同土壤重量(50、150、250 mg)对真菌群落结构没有显著影响,即使由于受重量影响导致 DNA 产量减少也没有降低真菌的区分能力。Foran 等<sup>[51]</sup>分析了 4 种生境内重量为 1–250 mg 的土样微生物,发现尽管测序序列数量与土壤重量有关,但细菌种群结构与其无关,NMDS 分析发现不同重量的土样仍按其来源地聚集,但土壤重量较大的样本总体上聚集紧密,而较小的样本(10、5、1 mg)则分布相对分散。由此说明土壤重量基本上不会影响微生物种群结构,但实际案件中仍需尽可能多地采集样本,防止遗漏信息及进行再次检验。

## 2.6 包装、保存方式的影响

由于微生物的敏感性导致土壤微生物物证易受污染,因此在样本包装以及保存过程中,包装方式、保存条件和时间等均会对样本造成不同程度的影响。Pasternak 等<sup>[52]</sup>比较了不同保存条件下(风干,冷冻干燥,−80 °C)经过 14 年的土样,结果表明 −80 °C 冷冻保存的土壤中微生物的变化较小。Foran 等<sup>[51]</sup>分析了 4 种生境内包装方式(密封塑料袋与露天存放)、保存时间(8 周)和保存温度(室温,4 °C,−20 °C,−80 °C)对土样微生物的影响,结果发现密封塑料袋内保存的群落结构不受时间和温度的影响,室温下露天存放的群落结构发生显著变化;作者在 Badgley 等<sup>[30]</sup>的研究基础上进一步研究,发现无论在短期(1 周)或长期(3–6 个月, T 恤土样 1 年)时间内,相比于在密封塑料袋−80 °C 存放的原采样地土样,不同客体土样与室温露天存放的原采样地土样聚集紧密,而且随机森林分类准确率在 97.4%–100.0%,他们认为低温密封虽有利于土壤物证保存,但实际案件中检材和样本的收集并不同时,因此,模拟未知检材经历的时间和存放条件可以减少二者非本质差异导致的“不匹配”。

## 3 土壤微生物应用于法庭科学应该注意的问题

要使土壤微生物物证作为法庭证据不仅要达到 Sensabaugh<sup>[53]</sup>提出的 3 个条件,即数据可重复性、区分能力的有效性与分析方法的客观性,还需满足 Daubert 标准<sup>[54]</sup>,即经过技术验证、科学界普遍接受及同行审查。我们认为,为了增强土壤微生物的证据价值,结合司法审判对证据的要求,同时使不同研究团队的研究成果更好地应用于实际破案,还需要在一些方面努力。

### 3.1 微生物 DNA 提取的标准化

虽然市面上已有各种成套的 DNA 提取设备,但仍需确定标准统一的提取过程,以确保各实验机构的实验分析过程相同,便于进行同行审查相互印证。在 2006 年法国标准协会(Agence Française pour la Normalisation, AFNOR)向国际标准组织提出了 DNA 提取标准方法<sup>[55]</sup>,澳大利亚法庭土壤科学中心(Centre for Australian Forensic Soil Science, CAFSS)制定了 Guidelines for Conducting Criminal and Environmental Soil Forensic Investigations,其描述了从样品采集、土壤表征到证据评估方面的最佳方案<sup>[56]</sup>,但由于土壤对微生物 DNA 的提取具有很大影响,因此还需考虑不同土壤特性的微生物 DNA 提取标准化方案<sup>[33]</sup>。

### 3.2 测序技术和数据分析的标准化

不同测序平台<sup>[57–58]</sup>的准确性、敏感性和可靠性,以及采用不同实验设计<sup>[59]</sup>和基因标记物均会对微生物群落结构产生影响,从而导致不同结果,所以需要确定不同测序平台的错误率、不同基因标记物的分辨能力,以获得可靠的数据质量。此外,不同数据分析方法也会导致同一实验具有不同的结果,加之需要参考微生物数据库进行注释,所以数据库的实时性也至关重要<sup>[60]</sup>。因此,一套完整、标准的测序设计及数据分析策略,对于数据质量的可靠性、分析结果的准确性及二者的相对稳定性至关重要。



### 3.3 样品污染、转移

由于案发时间与现场勘查时间存在时间差,在此期间土壤检材极易受到污染,加之土壤承载介质对微生物 DNA 存在影响。Quaak 等<sup>[61]</sup>在模拟识别 13 个案例土样时,其中一个鞋子的样品是混合物,因此在 DNA 提取时无法分离,导致 T-RFLP 分析错误匹配。Demanèche 等<sup>[62]</sup>利用核糖体基因间隔区和 16S rRNA 基因高通量测序分析 2 个模拟未知土样,其中一个为犯罪现场混合样品,结果发现相较于混合样品,2 种技术均可以较好地识别单一来源样品,因此提出技术综合有利于混合样品的区分,由此可为如何对混合样品进行正确归类提供了参考。Igolkina 等<sup>[63]</sup>提出一种基于 16S rRNA 基因特异文库序列集(Library-Specific Sets of Sequences, LSPECs)的机器学习算法,对单一来源土样、混合土样和污染土样进行来源识别,区分效果较好。该算法利用了全部序列信息,突破了传统 OTU 聚类的局限性,为应用于法庭土壤分析提供了参考价值。

Young 等<sup>[64]</sup>提到土壤极易存在二次转移现象,但尚不清楚 DNA 混合程度以及二次转移对不同来源土壤微生物的影响。Procter 等<sup>[65]</sup>首次研究了英国 5 种常见土壤(公园土,林地,沼地泥炭土,河边冲积土,冰碛物土)如何转移到 5 种服装材料(棉布,牛仔布,羊毛,尼龙,皮革)上,结果发现所有短暂接触过土壤表面的衣物都检测出微量土壤,土壤湿度对土壤转移量的影响最大,而服装材料类型对土壤转移和土壤类型的影响随土壤湿度发生变化。虽然未利用土壤微生物进行分析,但在一定程度上为研究土壤转移对微生物的影响机理提供了参考价值。

此外,后期在实验分析过程中,微生物 DNA 提取无菌实验环境、实验仪器和工具及空白对照都是需要考虑的因素,避免对土壤检材造成再次污染。

### 3.4 证据结果定量化

由于土壤微生物检验分析过程复杂,即使使用可视化工具将结果输出为图表格式,对于非生物领域人员仍较难理解,尤其是与法庭诉讼相关人员如

法官、律师和检察官等,所以需要一个较明确、简便、易懂的鉴定意见表述,并通过定量模式增强证据的证明力。

传统的鉴定意见是基于定性评估的,其模式表现为肯定同一、否定同一、不确定等,而当前研究领域开始转向更精确的定量评估,如基于贝叶斯似然比方法的 DNA 证据鉴定意见表述模式。Habtom 等<sup>[2]</sup>采用基于 Bray-Curtis 距离的贝叶斯似然比方法定量评估土壤微生物物证,并通过 Bosaris 工具<sup>[66]</sup>计算对数似然比代价函数(Log-Likelihood-Ratio Cost,  $C_{llr}$ )来衡量该模型的可靠性,为定量评估土壤微生物物证提供参考价值。

### 3.5 数据库的建立

大数据的迅速发展使得法庭科学领域中各种证据都开始建立数据库,如 DNA 数据库、指纹自动识别数据库、鞋印数据库等。然而土壤物证在实际案件中不仅用于检材与样本之间的比较,而且在仅有单一样品时更需进行匹配以获取相关犯罪信息。Jurkevitch 等<sup>[67]</sup>提出土壤微生物数据库虽然不需要太大,但是在小范围内需要考虑土壤类型、土地利用方式、气候、季节等因素,并通过举例进行了说明。

### 3.6 土壤微生物保护、提取意识

由于土壤微生物的敏感性,需要及时保护现场并迅速提取物证,但由于并未被法庭科学领域广泛应用,目前多数侦查人员不具备这种意识,导致土壤微生物物证极易丧失、减损或受到污染。因此,提高相关人员——侦查人员、现场保护人员、现场勘查人员等对土壤微生物作为证据的意识,才能对土壤物证进行更加严密的保护,从而有利于其为侦查和审判活动提供线索和证据<sup>[62]</sup>。

## 4 展望

随着科学技术的发展以及我们身处的信息爆炸时代,罪犯的反侦查意识和能力不断提高,犯罪现场遗留下的传统物证逐渐减少,破坏证据、伪造现场以及不留证据等现象日益突出。传统优势的

DNA、视频、指纹、痕迹等专业在实际工作中正面临新的挑战。由于土壤物证具有广泛性、分散性、隐蔽性强以及准确性高等特点,因此能提供受害人和犯罪嫌疑人的诸多信息,在一些疑难案件中越来越显示出其良好的物证属性和证据价值。

土壤微生物在法庭科学领域具有广阔的应用潜力和巨大的应用价值,而且在国内已经有成功的案例和一定的积累。同时,现有的科学技术和研究成果使我们有望将土壤微生物检验充分应用到实际案件的侦查中。此外,我们还应该认识到土壤微生物物证本身的特点,重视土壤微生物物证的转移、粘附、保留、衰减机制研究,为其作为法庭证据的真实性、关联性和合法性提供客观条件,有利于法官、律师和侦查人员等案件参与者理解、接受并采纳其作为证据使用。

## REFERENCES

- [1] Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH, Colwell RK, Fuhrman JA, Green JL, Horner-Devine MC, Kane M, Krumins JA, Kuske CR, et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(2): 102-112
- [2] Habtom H, Pasternak Z, Matan O, Azulay C, Gafny R, Jurkevitch E. Applying microbial biogeography in soil forensics[J]. *Forensic Science International: Genetics*, 2019, 38: 195-203
- [3] Yang T, Shi Y, Zhu J, Zhao C, Wang JM, Liu ZY, Fu X, Liu X, Yan JW, Yuan MQ, et al. The spatial variation of soil bacterial community assembly processes affects the accuracy of source tracking in ten major Chinese cities[J]. *Science China Life Sciences*, 2021: 1-14
- [4] Knights D, Kuczynski J, Charlson ES, Zaneveld J, Mozer MC, Collman RG, Bushman FD, Knight R, Kelley ST. Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking[J]. *Nature Methods*, 2011, 8(9): 761-763
- [5] Shenhav L, Thompson M, Joseph TA, Briscoe L, Furman O, Bogumil D, Mizrahi I, Pe'er I, Halperin E. FEAST: fast expectation-maximization for microbial source tracking[J]. *Nature Methods*, 2019, 16(7): 627-632
- [6] Martiny JBH, Eisen JA, Penn K, Allison SD, Horner-Devine MC. Drivers of bacterial-diversity depend on spatial scale[J]. *PNAS*, 2011, 108(19): 7850-7854
- [7] Chen SK, Wang XD, Zhang XJ, Wang JQ, Zhang GQ. The forensic application analysis of soil microbial 16S rDNA-based T-RFLP[J]. *Journal of Criminal Investigation Police University of China*, 2016(3): 70-73 (in Chinese)  
陈尚坤, 王旭东, 张晓嘉, 王佳琦, 张更谦. 土壤微生物 16S rDNA 的 T-RFLP 法医学应用分析[J]. *中国刑警学院学报*, 2016(3): 70-73
- [8] Mummey DL, Stahl PD. Spatial and temporal variability of bacterial 16S rDNA-based T-RFLP patterns derived from soil of two Wyoming grassland ecosystems[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 46(1): 113-120
- [9] Meyers MS, Foran DR. Spatial and temporal influences on bacterial profiling of forensic soil samples[J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2008, 53(3): 652-660
- [10] Jesmok EM, Hopkins JM, Foran DR. Next-generation sequencing of the bacterial 16S rRNA gene for forensic soil comparison: a feasibility study[J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2016, 61(3): 607-617
- [11] Wang JM, Zhang QR, Yuan MQ, Chu HY, Shi Y. Developing a method for exploiting soil bacterial communities as evidence in environmental forensic investigations[J]. *Environmental Forensics*, 2021, 22(3/4): 385-392
- [12] Fierer N, Schimel JP, Holden PA. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(1): 167-176
- [13] Eilers KG, Debenport S, Anderson S, Fierer N. Digging deeper to find unique microbial communities: the strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 50: 58-65
- [14] 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
- [15] 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
- [16] Delgado-Baquerizo M, Oliverio AM, Brewer TE, Benavent-González A, Eldridge DJ, Bardgett RD, Maestre FT, Singh BK, Fierer N. A global atlas of the dominant bacteria found in soil[J]. *Science*, 2018, 359(6373): 320-325
- [17] Fløjgaard C, Frøslev TG, Brunbjerg AK, Bruun HH, Moeslund J, Hansen AJ, Ejrnæs R. Predicting provenance of forensic soil samples: linking soil to ecological habitats by metabarcoding and supervised classification[J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0202844
- [18] Ge YY, Chen S, Sun H, Hu L, Tu Z. The application exploring of bacterial community diversity profiling in forensic comparison of soil[J]. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 2008, 23(2): 104-107 (in Chinese)  
葛芸英, 陈松, 孙辉, 胡兰, 涂政. 土壤细菌群落多样性的 T-RFLP 分析应用探讨[J]. *中国法医学杂志*, 2008, 23(2): 104-107
- [19] Song GQ, Li H, Ma K, Zhao XY, Shen YW, Xie JH, Zhou HG. Difference analysis based on 16S rRNA sequencing of different soil bacterial communities[J]. *Journal of Forensic Medicine*, 2019, 35(2): 187-193 (in Chinese)

- 宋国庆, 李辉, 马克, 赵雪莹, 沈忆文, 谢建辉, 周怀谷. 基于 16S rRNA 基因序列对不同土壤细菌群落的差异性分析[J]. 法医学杂志, 2019, 35(2): 187-193
- [20] Chernov TI, Zhelezova AD. The dynamics of soil microbial communities on different timescales: a review[J]. *Eurasian Soil Science*, 2020, 53(5): 643-652
- [21] Kim DG, Vargas R, Bond-Lamberty B, Turetsky MR. Effects of soil rewetting and thawing on soil gas fluxes: a review of current literature and suggestions for future research[J]. *Biogeosciences*, 2012, 9(7): 2459-2483
- [22] Medeiros PM, Fernandes MF, Dick RP, Simoneit BRT. Seasonal variations in sugar contents and microbial community in a ryegrass soil[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(5): 832-839
- [23] Wu H, Xiong DH, Xiao L, Zhang S, Yuan Y, Su ZG, Zhang BJ, Yang D. Effects of vegetation coverage and seasonal change on soil microbial biomass and community structure in the dry-hot valley region[J]. *Journal of Mountain Science*, 2018, 15(7): 1546-1558
- [24] Campisano A, Albanese D, Yousaf S, Panher M, Donati C, Pertot I. Temperature drives the assembly of endophytic communities' seasonal succession[J]. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(8): 3353-3364
- [25] Lacerda-Júnior GV, Noronha MF, Cabral L, Delforno TP, De Sousa STP, Fernandes-Júnior PI, Melo IS, Oliveira VM. Land use and seasonal effects on the soil microbiome of a Brazilian dry forest[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 648
- [26] Rasche F, Knapp D, Kaiser C, Koranda M, Kitzler B, Zechmeister-Boltenstern S, Richter A, Sessitsch A. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(3): 389-402
- [27] Zhang KP, Delgado-Baquerizo M, Zhu YG, Chu HY. Space is more important than season when shaping soil microbial communities at a large spatial scale[J]. *mSystems*, 2020. DOI: 10.1128/msystems.00783-19
- [28] Lauber CL, Ramirez KS, Aanderud Z, Lennon J, Fierer N. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(8): 1641-1650
- [29] Carini P, Delgado-Baquerizo M, Hinckley ELS, Holland-Moritz H, Brewer TE, Rue G, Vanderburgh C, McKnight D, Fierer N. Effects of spatial variability and relic DNA removal on the detection of temporal dynamics in soil microbial communities[J]. *mBio*, 2020. DOI: 10.1128/mbio.02776-19
- [30] Badgley AJ, Jesmok EM, Foran DR. Time radically alters ex situ evidentiary soil 16S bacterial profiles produced via next-generation sequencing[J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2018, 63(5): 1356-1365
- [31] IUSS Working Group WRB. World Reference Base for Soil Resources: 2006: A Framework for International Classification, Correlation and Communication[M]. Rome: World Soil Resources Reports No. 103. FAO, 2006
- [32] Foran DR, Jesmok EM, Hopkins JM. Soil bacteria as trace evidence[A]//Carter DO, Tomberlin JK, Benbow ME, Metcalf JL. *Forensic Microbiology*[M]. New Jersey: John Wiley & Sons, 2017: 339-357
- [33] Damaso N, Mendel J, Mendoza M, Von Wettberg EJ, Narasimhan G, Mills D. Bioinformatics approach to assess the biogeographical patterns of soil communities: the utility for soil provenance[J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2018, 63(4): 1033-1042
- [34] Ramirez KS, Leff JW, Barberán A, Bates ST, Betley J, Crowther TW, Kelly EF, Oldfield EE, Shaw EA, Steenbock C, et al. Biogeographic patterns in below-ground diversity in New York City's Central Park are similar to those observed globally[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014, 281(1795): 20141988
- [35] Bi JT, He DH. Research advances in effects of plant on soil microbial diversity[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(9): 244-250 (in Chinese)  
毕江涛, 贺达汉. 植物对土壤微生物多样性的影响研究进展[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(9): 244-250
- [36] Chu HY, Feng MM, Liu X, Shi Y, Yang T, Gao GF. Soil microbial biogeography: recent advances in China and research frontiers in the world[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, 57(3): 515-529 (in Chinese)  
褚海燕, 冯毛毛, 柳旭, 时玉, 杨腾, 高贵锋. 土壤微生物地理学: 国内进展与国际前沿[J]. *土壤学报*, 2020, 57(3): 515-529
- [37] Delgado-Baquerizo M, Fry EL, Eldridge DJ, De Vries FT, Manning P, Hamonts K, Kattge J, Boenisch G, Singh BK, Bardgett RD. Plant attributes explain the distribution of soil microbial communities in two contrasting regions of the globe[J]. *The New Phytologist*, 2018, 219(2): 574-587
- [38] Leff JW, Bardgett RD, Wilkinson A, Jackson BG, Pritchard WJ, De Long JR, Oakley S, Mason KE, Ostle NJ, Johnson D, et al. Predicting the structure of soil communities from plant community taxonomy, phylogeny, and traits[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(7): 1794-1805
- [39] Barberán A, McGuire KL, Wolf JA, Jones FA, Wright SJ, Turner BL, Essene A, Hubbell SP, Faircloth BC, Fierer N. Relating belowground microbial composition to the taxonomic, phylogenetic, and functional trait distributions of trees in a tropical forest[J]. *Ecology Letters*, 2015, 18(12): 1397-1405
- [40] Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P, Zuberer D. *Principles and Applications of Soil Microbiology*[M]. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall, 2005
- [41] Daniel R. The metagenomics of soil[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(6): 470-478
- [42] Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977, 74(11): 5088-5090
- [43] Gray MW, Sankoff D, Cedergren RJ. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny

- based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12(14): 5837-5852
- [44] Guo MW, Liu FM, Zou W. Research progress of 16S rRNA sequencing technology in detection of intestinal flora[J]. *Laboratory Science*, 2019, 22(2): 1-4,8 (in Chinese)  
郭美薇, 刘凡铭, 邹伟. 16S rRNA 测序技术在肠道菌群检测中的研究进展[J]. *实验室科学*, 2019, 22(2): 1-4,8
- [45] Young JM, Weyrich LS, Cooper A. Forensic soil DNA analysis using high-throughput sequencing: a comparison of four molecular markers[J]. *Forensic Science International: Genetics*, 2014, 13: 176-184
- [46] Van Elsas JD, Boersma FGH. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(2): 77-87
- [47] Hawksworth DL, Wiltshire PEJ. Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations[J]. *Forensic Science International*, 2011, 206(1/2/3): 1-11
- [48] Macdonald LM, Singh BK, Thomas N, Brewer MJ, Campbell CD, Dawson LA. Microbial DNA profiling by multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for forensic comparison of soil and the influence of sample condition[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(3): 813-821
- [49] Young JM, Weyrich LS, Breen J, Macdonald LM, Cooper A. Predicting the origin of soil evidence: high throughput eukaryote sequencing and MIR spectroscopy applied to a crime scene scenario[J]. *Forensic Science International*, 2015, 251: 22-31
- [50] Young JM, Weyrich LS, Cooper A. High-throughput sequencing of trace quantities of soil provides reproducible and discriminative fungal DNA profiles[J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2016, 61(2): 478-484
- [51] Foran DR, Badgley AJ. Bacterial profiling of soil for forensic investigations: consideration of ex situ changes in questioned and known soil samples[J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2020, 65(2): 471-480
- [52] Pasternak Z, Luchibia AO, Matan O, Dawson L, Gafny R, Shpitzen M, Avraham S, Jurkevitch E. Mitigating temporal mismatches in forensic soil microbial profiles[J]. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 2019, 51(6): 685-694
- [53] Sensabaugh GF. Microbial community profiling for the characterisation of soil evidence: forensic considerations[A]// Ritz K, Dawson L, Miller D. *Criminal and Environmental Soil Forensics*[M]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009: 49-60.
- [54] Abboud A, Daubert V. Merrell Dow Pharmaceuticals, Inc. (1993)[DB/OL]. Arizona State University, School of Life Sciences, Center for Biology and Society, Embryo Project Encyclopedia [2017-05-29]. <http://embryo.asu.edu/handle/10776/11528>
- [55] Petric I, Philippot L, Abbate C, Bispo A, Chesnot T, Hallin S, Laval K, Lebeau T, Lemanceau P, Leyval C, et al. Inter-laboratory evaluation of the ISO standard 11063 "Soil quality-Method to directly extract DNA from soil samples"[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84(3): 454-460
- [56] Fitzpatrick R, Raven M. Guidelines for Conducting Criminal and Environmental Soil Forensic Investigations (Version 10.1)[M]. The University of Adelaide: Acid Sulfate Soils Centre, 2017: 1-46.
- [57] Habtom H, Demanèche S, Dawson L, Azulay C, Matan O, Robe P, Gafny R, Simonet P, Jurkevitch E, Pasternak Z. Soil characterisation by bacterial community analysis for forensic applications: a quantitative comparison of environmental technologies[J]. *Forensic Science International: Genetics*, 2017, 26: 21-29
- [58] Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, Pallen MJ. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 434-439
- [59] Meisel JS, Hannigan GD, Tyldsley AS, SanMiguel AJ, Hodgkinson BP, Zheng Q, Grice EA. Skin microbiome surveys are strongly influenced by experimental design[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2016, 136(5): 947-956
- [60] Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Kõljalg U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective[J]. *PLoS One*, 2006, 1(1): e59
- [61] Quak FCA, Kuiper I. Statistical data analysis of bacterial t-RFLP profiles in forensic soil comparisons[J]. *Forensic Science International*, 2011, 210(1/2/3): 96-101
- [62] Demanèche S, Schauser L, Dawson L, Franqueville L, Simonet P. Microbial soil community analyses for forensic science: application to a blind test[J]. *Forensic Science International*, 2017, 270: 153-158
- [63] Igolkina AA, Grekhov GA, Pershina EV, Samosorov GG, Leunova VM, Semenov AN, Baturina OA, Kabilov MR, Andronov EE. Identifying components of mixed and contaminated soil samples by detecting specific signatures of control 16S rRNA libraries[J]. *Ecological Indicators*, 2018, 94: 446-453
- [64] Young JM, Austin JJ, Weyrich LS. Soil DNA metabarcoding and high-throughput sequencing as a forensic tool: considerations, potential limitations and recommendations[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93(2): fiw207
- [65] Procter FA, Swindles GT, Barlow NLM. Examining the transfer of soils to clothing materials: implications for forensic investigations[J]. *Forensic Science International*, 2019, 305: 110030
- [66] Brümmer N, Du Preez J. Application-independent evaluation of speaker detection[J]. *Computer Speech & Language*, 2006, 20(2/3): 230-275
- [67] Jurkevitch E, Pasternak Z. A walk on the dirt: soil microbial forensics from ecological theory to the crime lab[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2021, 45(2): fuaa053