



DECIPHERING THE MICROBIAL SIGNATURE OF DEATH: ADVANCES IN POST-MORTEM MICROBIAL ANALYSIS

Chitra JANGID, Jyoti DALAL, Kiran KUMARI

Department of Forensic Science, Lovely Professional University, Punjab, India

Abstract

Cadaver decomposition is a natural phenomenon intimately affected by numerous organisms such as insects, fungi, animals, and bacteria where they use the decaying body as their nutrition source. These organisms can be utilized in forensic science to estimate the post-mortem interval (PMI). The post-mortem interval refers to the time that has passed since the death of a person until the body was found. Forensic entomology is one of the popular approaches where successive colonization of insects on cadaver is studied to estimate PMI. However, sometime this method does not provide consistent results due to lack of insect activities during cold environment conditions or when crime scene is indoor. Therefore, a new approach is needed to aid forensic scientists to estimate PMI. Recently, researchers have noted that microbial communities have shown a predictable and clockwise successional pattern on decomposing cadavers and suggested this could be utilized to estimate PMI when this approach is etched with other established methods. The purpose of this review is to summarize some of the studies that have been conducted on the utility of microbial communities in estimating PMI and discuss the role of microbial communities in cadaver decomposition.

Keywords

Microbial communities; Cadaver; Decomposition.

Received 21 June 2023; accepted 2 October 2023

1. Introduction

The post-mortem interval (PMI) or time since death (TSD) is the period between death and recovery of body. Estimating the post-mortem interval is a fundamental task in forensic investigations. Determining the time since death is a critical component in any investigation involving human remains, as it can provide valuable information to help identify the victim, reconstruct the events leading up to death, and ultimately aid in the identification of the perpetrator(s). The traditional methods of estimating PMI involve several techniques. Firstly, gross changes that include immediate changes such as *algor mortis*, *livor mortis*, and *rigor mortis* (Clarke, Gomez, Singh, Nelson, Brinkac, 2017). After these immediate changes, the body undergoes decomposition as a result of autolysis

and bacterial putrefaction (Hau Teo, Osman, Ayunni Ghani, Hazfalinda Hamzah, 2013). Secondly, temperature changes are recorded by measuring multiple temperature readings of the rectum, eyes, or ear (Baccino et al., 1996, 2007; Rodrigo, 2016). Finally, forensic entomology, which is the study of insects associated with the dead body, is used to determine PMI (Chandra, Sabharwal, 1968). Forensic entomology is a popular approach that examines the successive colonization of insects on the cadaver to estimate PMI (Chandra, Sabharwal, 1968). However, the accuracy of these traditional methods is limited as they are affected by various factors such as temperature, humidity, and the condition of the body (Houtz et al., 2022). In recent years, modern techniques such as molecular and biochemical analyses have been introduced to overcome the limitations of traditional methods and provide

estimation of PMI. Molecular techniques such as RNA sequencing and gene expression profiling are used to detect changes in gene expression patterns after death, which can provide information on the time since death (Belk et al., 2018; Brooks, 2016). Biochemical analyses such as the measurement of specific metabolites and proteins in body fluids are also used to estimate PMI (Buyer, Sasser, 2012; Hill et al., 2000; Ritchie, Schutter, Dick, Myrold, 2000). The combined use of traditional and modern techniques can provide better and more accurate estimates of PMI. These methods have the potential to make progress in the field of forensic science and improve the accuracy of PMI estimation, which is crucial in criminal investigations.

The activity of microbial communities and cadaver decomposition are strongly connected processes (Cobaugh, Schaeffer, DeBruyn, 2015). The changes in decomposition and by-products are deciding factors for the growth of the microbiome. Several animal models such as pigs (Chin, Marwi, Jeffery, Omar, 2008; Connor, Baigent, Hansen, 2018; Zhang, Widmer, Tzipori, 2013), mice (Heimesaat et al., 2012; Metcalf et al., 2013), and even human cadavers (Bucheli, Lynne, 2016; Huttenhower et al., 2012) have been used to study the microbial activity during cadaver decomposition. Together, these studies have allowed us to assess the functional and taxonomic microbial communities during different decomposition stages and their role in corpse decomposition (Hyde, Haarmann, Petrosino, Lynne, Bucheli, 2014; Metcalf et al., 2013, 2016; Pechal et al., 2014). As the decomposition progresses, a distinctive shift from aerobic bacteria (e.g., *Bacteroides spp.*) to anaerobic bacteria (e.g., *Clostridium spp.*) has been noted (Hyde, Haarmann, Lynne, Bucheli, Petrosino, 2013; Pechal et al., 2013). Several recent studies have clarified that during the process of cadaveric decomposition, these microbes have the potential to construct a “post-mortem microbial clock” to assess the PMI of the cadaver (Damann, Williams, Layton, 2015a; Metcalf et al., 2013; Pechal et al., 2013). *Proteus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Aggregatibacter spp.*, *Ignatzschineria spp.*, *Acinetobacter spp.*, and *Prevotella spp.* are among bacteria that could be used for microbial clock (Carter, Tibbett, 2006; Guo et al., 2015; Melvin, Cronholm, Simson, Isaacs, 1984; Vass, 2001).

2. Next generation sequencing (NGS) technologies for identification of post-mortem microbial communities

The field of forensic science has made significant advancements in recent years, with the development of innovative technologies for the identification of microbes and their successional analysis after death. Next generation sequencing technologies have helped the field of microbial ecology, enabling scientists to identify and characterize microbial communities with unparalleled speed and precision. NGS technologies can be used to identify microbial communities in a variety of environments, including decomposing cadavers. By analysing the DNA of microorganisms present in a sample, researchers can identify specific taxa and quantify their abundance. This information can then be used to construct a picture of microbial succession over time, which can be used to estimate the PMI of a cadaver. Recent studies have demonstrated the potential of NGS technologies for forensic analysis. One of the key advancements in NGS for post-mortem microbiology has been the development of high-throughput sequencing technologies that can process large numbers of samples simultaneously (Laudadio et al., 2018). These techniques have enabled researchers to study microbial communities across different post-mortem intervals and across different body sites. By comparing the sequences obtained from environmental samples to established databases, researchers can precisely identify the microbial composition, shedding light on the diversity and dynamics of microbial communities in diverse ecosystems. Metagenomic sequencing, shotgun sequencing, whole genome sequencing, and amplicon sequencing are molecular biology techniques employed for diverse genetic analyses. Metagenomic sequencing is a technique used to analyze genetic material in mixed samples containing genetic material from multiple organisms, allowing for the analysis of complex microbial communities or environmental samples. It allows the analysis of all the genetic material in a sample, including both microbial and human DNA (Petrosino, Highlander, Luna, Gibbs, Versalovic, 2009). This approach has been used to identify the microbial taxa present in post-mortem samples, as well as to infer the metabolic potential of these communities. For example, metagenomic sequencing has been used to identify microbial taxa associated with decomposition and putrefaction, as well as to identify potential microbial markers of time since death (Cao et al., 2021; Kim et al., 2020; Pechal et al., 2014). Within whole genome sequencing, shotgun sequencing is a specific technique used to randomly fragment

and sequence the genome, followed by computational assembly. Amplicon sequencing is a targeted DNA sequencing technique that can be used to analyze specific regions of the genome, including 16S rRNA genes for bacteria and archaea. It involves amplifying the target regions using PCR before sequencing, enabling the study of genetic diversity within specific taxonomic groups. 16S rRNA sequencing is primarily used for bacteria and archaea, 18S rRNA for eukaryotic microorganisms like protists, and ITS (internal transcribed spacer) for fungi. These regions of genetic material are relatively conserved within species but vary between them, making them invaluable for distinguishing and classifying microorganisms. NGS technologies such as 16S rRNA gene sequencing and metagenomic sequencing were used extensively in the Human Microbiome Project (HMP) to identify and analyze microbial communities in various parts of the human body, including the gut, skin, oral cavity, and vagina (Huttenhower et al., 2012). These technologies enabled the identification of previously unknown microbial species and the discovery of new microbial functions. Finally, the development of computational tools and algorithms has greatly improved our ability to analyze and interpret NGS data in the context of post-mortem microbiology. Collectively, these sequencing methodologies contribute to a deeper understanding of microbial communities in diverse environments, ranging from the human gut to soil ecosystems. The choice of a specific method depends on the research objectives and questions being investigated.

3. Succession of microbial communities in decomposition

The Human Microbiome Project has shown that microbiomes associated with different cadaveric decomposition stages can be drastically different from those of healthy humans. Different microbial communities can be found at different stages of decomposition and in different locations as well (Huttenhower et al., 2012; Metcalf et al., 2013) such as microbes present in mouth are different from rectum (Guo et al., 2015). The rectal microbial community is often associated with Gamma-proteobacteria and is regularly exposed to soil and feces, resulting in a bacterial profile comparable to that of these sources (Hayashi, Sakamoto, Kitahara, Benno, 2003; Wagner, 2008), while microbial communities in the oral cavity differ from those of the gastrointestinal tract (GIT) during the bloating stage of decomposition (Huttenhower et al., 2012). In a study, Hyde et al. (2014) observed *Ignatzschineria spp.* and *Wohlfahrtimonas spp.*

at the bloat and purge stage and *Acinetobacter spp.* at the skeletonized stage in human cadavers. This shift suggests that the bacterial community structure changes as the decomposition process advances, and the body's environment undergoes transformations. These types of bacteria are commonly found in association with insect activity during decomposition. Bacterial samples were collected from multiple sites on two outdoor placed decomposing cadavers. The analysis involved 454 pyrosequencing and examination of variable regions V3–V5 of the bacterial 16S rRNA gene. Entire community of microorganisms that are involved in the decomposition of a dead organism, including those found both on the surface and inside the body are called necrobiome, including both epinecrotic and thanatomicrobiome (Javan, Finley, 2018). This community includes bacteria, fungi, viruses, and other microorganisms that work together to break down the organic matter of the dead organism. Both of these communities play essential roles in the decomposition process, and their interactions with each other are critical for the efficient cycling of nutrients and energy in ecosystems.

4. Epinecrotic microbiome

The term “epinecrotic microbiome” refers to the microbial communities that colonize the surface of a decaying organism during decomposition. These communities are dominated by aerobic and facultative anaerobic bacteria that use oxygen to break down complex organic compounds, such as carbohydrates and amino acids, into simpler compounds. Several studies have investigated the use of epinecrotic communities to estimate post-mortem interval. For instance, a study by Metcalf et al. (2013) found that the bacterial communities on carcasses changed predictably over time and that the changes could be used to accurately estimate PMI. The study used high-throughput sequencing to analyze the bacterial communities present on decomposing mouse carcasses at regular intervals up to 48 hours post-mortem. The authors developed a microbial clock model based on the relative abundance of specific bacterial taxa that changed in abundance over time to estimate PMI. The authors suggest that this approach could have important applications in forensic investigations, particularly in cases where traditional methods for estimating PMI are not feasible.

5. Thanatomicrobiome

The thanatomicrobiome refers to the microbial communities that colonize the internal organs (such as the brain, heart, liver, and spleen) and blood of

a corpse during the post-mortem period (Javan, Finley, 2018). These communities are characterized by anaerobic bacteria, which thrive in the absence of oxygen and are responsible for breaking down the more complex organic compounds. The thanatomicrobiome undergoes a successional process where the microbes within the host body colonize, grow, and eventually perish, leading to a shift in the overall community composition as the host continues to decompose over time (Javan et al., 2016b). As the thanatomicrobiome is already present inside the corpse, it is generally less influenced by external environmental factors that affect the necrobiome (Roy, 2020). Studies have shown that the thanatomicrobiome undergoes a predictable and sequential succession of microbial communities during decomposition, and that the composition and abundance of these communities can be used to estimate PMI (Can et al., 2014; Javan, Finley, Smith, Miller, Wilkinson, 2017; Javan et al., 2016b).

6. Microbial succession at different body site after death

The succession of microbial communities after death is a complex process that involves the growth and decay of different microbial species. Figure 1

shows the distribution of bacterial taxa at different organ sites. It shows the abundance of various bacterial taxa in at different site of body including skin, mouth, gut, liver, oral cavity, heart, spleen and bone.

6.1. Oral cavity microbiome

The oral cavity harbours a large number of microbial communities that have been explored by several authors in relation to PMI. Recently, Zhao, Zhong, Hua (2022) successfully estimated the post-mortem interval from the over a period of 59 days, selecting 12 time points within the PMI for bacterial community structure analysis. The sequencing of the V3-V4 region of the bacterial 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene on the Ion S5 XL platform revealed significant changes in oral microorganisms during decomposition. At each of the 12-time intervals over the course of the 59-day period, they discovered three genera of bacteria (*Atopostipes spp.*, *Facklamia spp.*, and *Bacillus cereus*) that displayed a linear association. *Planococcaceae* was identified as best feature throughout the last six time points. They used the oral microbiome to establish a mathematical model. Similarly, Adserias-Garriga et al. (2017) used a metagenomic approach to identify the microbial communities of the oral cavity. Study subjects included three people – one male and two female

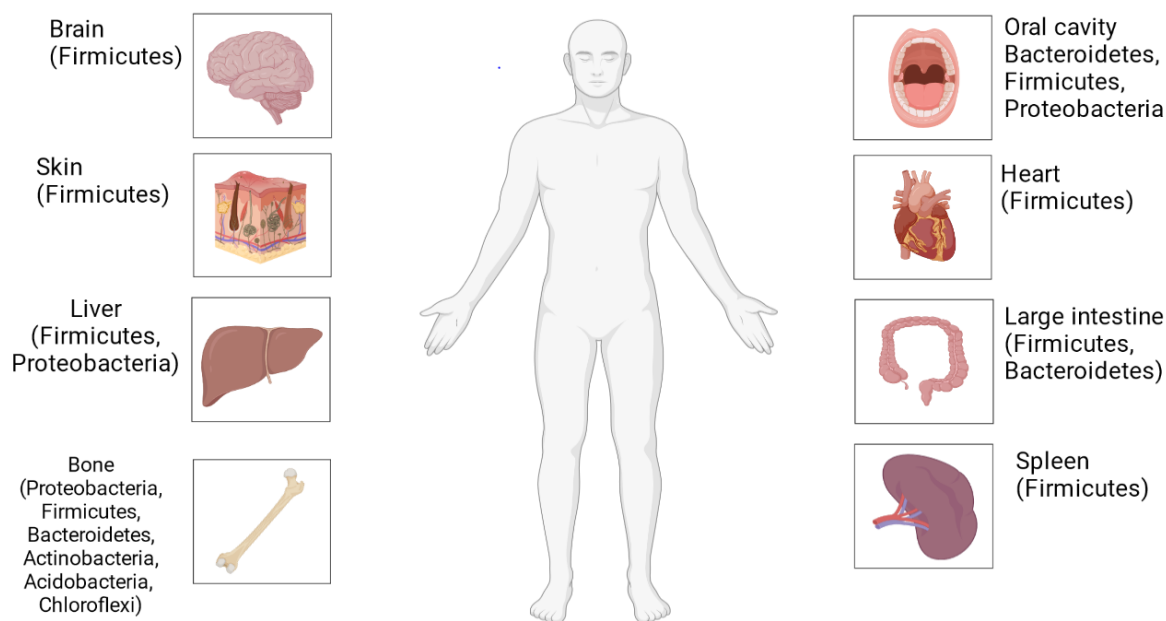


Fig.1. Presence of post-mortem microbial communities at brain (Can et al., 2014; Javan et al., 2017; Javan et al., 2016b), skin (Javan et al., 2016b), liver (Can et al., 2014; Javan et al., 2017; Javan et al., 2016b), bone (Damann et al., 2015a), oral cavity (Javan et al., 2016b), heart (Can et al., 2014; Javan et al., 2017; Javan et al., 2016a), large intestine (DeBruyn, Hauther, 2017) and spleen (Can et al., 2014; Javan et al., 2017; Javan et al., 2016b).

– who donated their bodies to the University of Tennessee Forensic Anthropology Center’s W. M. Bass Donated Skeletal Collection. Daily oral swab samples were collected throughout the various cadaveric putrefaction stages. With the aid of next-generation sequencing methods, DNA was extracted and examined. The overall successional changes in all three cadavers during the decomposition process were comparable. In the fresh stage, Firmicutes and Actinobacteria are the predominate phylum. Tenericutes are indicative of the bloat stage. Although the phylum Firmicutes predominates in advanced decay, this Firmicutes community is distinct from that of the fresh stage. In another study, 24 oral cavity samples from mouse models were investigated to determine the correlation of oral microbes with post-mortem interval (Dong et al., 2019). The results revealed distinct changes in the composition of oral bacteria as the decomposition progressed. Notably, specific bacterial species were found to be significantly correlated with the post-mortem interval at different taxonomic levels. To enhance the accuracy of PMI estimation, the researchers constructed linear regression models between the relative abundance of these bacterial species and the post-mortem interval. Among the identified species, Gammaproteobacteria and *Proteus spp.* emerged as the most promising candidates for inferring the post-mortem interval, particularly for late stages of decomposition.

6.2. Gut and internal organs

Several authors have explored the microbiome of the gut and internal organs during the decomposition process. For instance, Liu et al. (2021) conducted a study using 16S rDNA sequencing to determine the similarities and differences in the succession of the microbial community during mouse decomposition, focusing on the intestine. They observed that Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacteria were dominant phyla in all samples. DeBruyn and Hauther (2017) also investigated the changes in the microbial community of the gut region during the decomposition of a human cadaver through the utilization of 16S rRNA gene amplicon sequencing. The researchers examined four individuals, ranging from 62 to 67 years, and exhibited a weight range of 56 to 77 kg. Importantly, all four individuals passed away from natural causes. To access the gut microbiota, a small incision was surgically made in the abdominal area, and sterile swabs were carefully employed to collect gut material from the caecum. Following each sampling, the incision was securely sealed with tape. This process was repeated on a daily basis until the tissues

within the cadavers had undergone such advanced decay that they could no longer be identified or analyzed. Their research revealed that the richness of microbial communities increased while diversity decreased over time. Additionally, *Bacteroidales* decreased, whereas *Clostridiales* and Gammaproteobacteria increased as the decomposition progressed. These studies shed light on the dynamics of the gut and internal organ microbiomes during decomposition, providing valuable insights into the changes in bacterial composition over time. Recently, Hu et al. (2021) identified the human cadaver intestinal microbial community from the vermiform and colon and observed a significant difference in the microbial communities of both samples within PMI 5–192 h. Firmicutes, Proteobacteria, and Bacteroidetes were found prominent in samples and demonstrated a predictable change after death. In addition, a predictable successional pattern in Firmicutes, Bacteroidetes, and their respective subclasses from these samples were observed. This site exhibits predictable successional changes which could be utilized for PMI estimation and for gaining a better understanding of the intrinsic microbial ecology of decomposition. Moreover, study suggested that vermiform is a better sampling site to study microbial succession than colon.

Internal organs generally have lower microbial populations compared to areas like the skin and gut during an individual’s lifetime, although they are not entirely sterile. After an individual’s death, the breakdown of barriers can lead to changes in microbial distribution and activity. Microorganisms utilize the nutrient fluid released due to cell autolysis and tissue breakdown. The microbiome exponentially predominates after metabolizing this fluid during putrefaction. By estimating the specificity and abundance of microbial communities in association with different organs, a microbial clock could be established (Metcalf, 2019).

Burcham et al. (2019) conducted a study using a controlled mouse model to investigate changes within the microbial population’s structure and function across various body organs, including the heart, spleen, bone marrow, lungs, and intestine. This study contributes to the emerging field of metagenomics by offering insights into expressed microbial genes, microbial species transmigration, and structural changes. The researchers employed a combination of bacterial taxonomy and meta-transcriptomic analysis to gain insights into the decomposition process. Additionally, the study examined the influence of environmental factors on the microbial community during decomposition and ultimately deduced that both environmental conditions and the individual characteristics

of the host have a significant impact on the decomposition process, leading to alterations in the rate of decomposition.

It was noticed in a study that under restricted environmental conditions, decomposition in internal organs progresses at a normal rate, but when it decomposes slowly compared to other areas where microbial communities from gravesoil and aquatic ecosystems invade (Preiswerk, Walser, Ebert, 2018). Among all the organs, reproductive organs are the last to decay, and they have higher alpha diversity than non-reproductive organs. In addition, they have significantly different microbiomes during decomposition. Examining organ tissues from 40 Italian cadavers, ranging in time since death from 24 to 432 hours, the study conducted by Lutz et al. (2020) focused on brain, heart, liver, spleen, prostate, and uterus tissues collected during autopsy. Interestingly, the uterus and prostate displayed significantly higher alpha diversity compared to other anatomical sites. These reproductive organs also exhibited distinct microbial community compositions divergent from non-reproductive organs, which were found to be dominated by bacterial orders like *MLE1-12*, *Saprosirales*, and *Burkholderiales*. In contrast, reproductive organs showcased a dominance of *Clostridiales* and *Lactobacillales*, accompanied by a notable reduction in the relative abundance of *MLE1-12*.

6.3. Skin and gravesoil

Metcalf et al. (2013) conducted a study involving mice carcass skin and grave soil, revealing the presence of Gammaproteobacteria in both scenarios. Moreover, the dominance of the family Pseudomonadaceae was observed over the mouse skin. Conversely, Pechal et al. (2014) observed substantial quantities of *Moraxellaceae* bacteria on the skin of a swine carcass during the initial 24 hours of decomposition, with decreasing numbers as decomposition advanced. These findings underscore the potential significance of the *Moraxellaceae* family as decomposers across various hosts. Clostridia, a diverse class of Bacillota, are widespread in animals, soil, and decaying vegetation (Wells, Wilkins, 1996). While a variety of species have been identified in human clinical samples, few are consistently linked to human disease. *Clostridium* and *Clostridiaceae* were found on both carcass of investigation done (Metcalf et al., 2013) and (Pechal et al., 2014), which is likely due to their ubiquitous nature. Metcalf et al. (2013) also found *Clostridium* in association with the mice carcass as well as the grave soil samples but did not report the presence of

Clostridiaceae. Similarly, Pechal et al. (2014) reported the presence of *Clostridiaceae* on pig carcass but could not find *Clostridium*. Notably, the *Clostridiaceae* family, alongside *Xanthomonadaceae* and *Moraxellaceae*, plays a pivotal role in the cadaver decaying process. Nevertheless, a comprehensive statistical analysis is required to ascertain whether these bacterial species can be characterized as generic decomposers.

To learn more about microbial community succession patterns, researchers have studied decomposition at the skeletonized stage. Damann et al. (2015a) conducted a study at the University of Tennessee Anthropology Research Facility (ARF) to investigate the microbial communities associated with human decomposition. Specifically, researchers collected single lower rib samples from 12 bodies in different stages of decomposition and three soil samples to unravel the impacts of decomposition and the passage of time on bacterial communities using high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene. Proteobacteria was the dominant phylum across all stages of decomposition, with Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria being the primary subgroups. As decomposition progressed, the relative abundance of Alphaproteobacteria increased, while Gammaproteobacteria decreased. Firmicutes and Bacteroidetes, common phyla in the human gut, were also prominent in the samples. Actinobacteria and Acidobacteria, more commonly found in soils, became more prevalent in later decomposition stages and dry remains.

Similarly, in another study, Thomas et al. (2017) posed two hypotheses. First, they hypothesized that, in contrast to early phases of decomposition, the microbial diversity in soil would change during the later stage of decomposition, known as skeletonization. Second, they suggested that gravesoil strata would have comparable microbial taxa, similar to control soil. They used 16S rRNA gene sequencing to compare the microbial communities in burial soil layers from skeletonized bodies with control soil samples in order to verify these ideas. According to the findings, Acidobacteria predominates in both treated and untreated soil strata. Proteobacteria were interestingly less commonly found in skeletonized gravesoil.

For buried human remains, post-mortem microbial succession in grave soil has yet to be fully explored. The restricted oxygen and moisture levels and constant temperature in the soil surrounding buried bodies support an amazingly diverse collection of microbial species found in the more variable soil surface environment (Thomas et al., 2017). Olakanye and Ralebitso-Senior (2022) identified and tracked the shift of these microbiomes and stated that such microbiomes

could be tracked to identify grave emptying. This preliminary study focused on monitoring changes in subsurface soil microbial communities as indicators of the time elapsed since exhumation, using juvenile pig (*Sus scrofa domesticus*) cadavers as proxies for human remains. The study identified specific bacterial taxa that were indicative of different post-burial intervals and events. For example: *Xanthomonadales* and *Xanthomonadaceae* were indicators of the spring-summer season. *Verrucomicrobiaceae* (family) were also indicative of post-burial intervals ≥ 150 days. *Hydrogenophilales* and *Hydrogenophilaceae*, *Clostridiales* and *Clostridiaceae 1*, and *Bacteroidales* were identified as markers of different time points since exhumation, possibly indicating specific stages of microbial community succession in response to the decomposition process.

In the same year, Emmons et al. (2022) conducted research to determine the composition and function of microbiomes from bone and grave soil samples. Furthermore, the results were compared with the sequences of the American Gut Project, where samples were from exposed decomposing cadavers. Untargeted metabolomics was also applied to some subset of samples to determine the relation of microbiomes with the cadavers. Similarities between microbiomes were found between surface deposition bones and shallow bones with grave soil, while gut samples showed similarities with deeper soil samples where anaerobic taxa were prominent. Akin to other previous studies, Procopio et al. (2019) noted the abundance of Proteobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes at specific PMI. A decrease in the richness of the microbial community was observed after two months from the death, and *Bacteroid spp.* were found to be present in the soil even after six-month PMI. In addition, Iancu, Necula-Petrescu, Purcarea (2018) characterized microbial communities from shallow graves and provided the first quantitative data on *Enterococcus faecalis* and *Clostridium paraputrificum*. This study investigated the succession of necrophagous insect species and bacterial communities on swine carcasses to estimate PMI during a 7-month period that covers the winter and spring periods in Bucharest, Romania. They found Actinobacteria in greater abundance and lesser abundance of Bacteroidetes in their study. Moreover, at high temperatures, Firmicutes were the most dominant, and at low temperatures, Proteobacteria were the most dominant.

7. Universal presence of *Clostridium*

Clostridium is a genus of bacteria commonly found in soil and in the gut of humans and animals. *Clostridium spp.* can produce spores in dead or decaying tissues, leading to their widespread presence in dead bodies. However, the abundance and diversity of *Clostridium* species in dead bodies can vary depending on a range of factors, such as the time since death, the presence of other microorganisms, and environmental conditions. Some species of *Clostridium* are also capable of producing toxic compounds, such as clostridial toxins, which can contribute to the degradation of tissues and influence the progression of decomposition. In forensic science, the presence of *Clostridium spp.* can be used as an indicator of the PMI and can help to establish a timeline for the events leading up to death. The abundance and diversity of *Clostridium spp.* in dead bodies can also provide information about the environmental conditions and microbial interactions that occurred during decomposition. In a study, *Clostridium spp.* was found to be ubiquitous during human decomposition and was named the “post-mortem *Clostridium* effect” (Javan et al., 2017). This study also demonstrated that *Clostridium spp.* is abundant at both short and long PMI. Phylogenetic analysis was performed using the V4 vs. V3-V4 hypervariable region from liver and spleen samples of 27 male and 17 female deceased individuals. This research explained three factors responsible for this phenomenon of the ubiquitous presence of *Clostridium spp.*: first, the ability to double in a short span of time; second, the transmigration ability of *Clostridium spp.* by digesting the collagen fibre, which may hinder microorganisms from spreading to other regions of the body due to the presence of collagenolytic protease in them, which is present in only a few microorganisms; third, the development of anaerobic conditions after death that facilitate the microbe to grow more efficiently. In cardiac tissues, recently, another study confirmed the post-mortem *Clostridium* effect in human cadavers. A survey on post-mortem microbiomes in cardiac tissues from 10 deceased individuals across a range of time since death (6–58 hours) was conducted (Bell et al., 2018). This survey employed amplicon-based sequencing targeting the V1-2 and V4 hypervariable regions of the 16S rRNA gene. The outcomes revealed statistically significant ($p < 0.05$) sex-dependent variations in the amplicons. Notably, *Clostridium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Pantoea spp.*, and *Streptococcus spp.* exhibited the highest enrichment levels across both V1-2 and V4 regions. Similarly, a few other authors have also noted

this post-mortem *Clostridium* effect (Burcham et al., 2019; Pechal et al., 2018).

8. Microbial clock

A microbial clock refers to a computational model that uses changes in the microbial community over time to estimate the PMI. The concept behind the microbial clock is that various microorganisms exhibit different growth and decay patterns, and by monitoring changes in the abundance of specific microbial taxa, it is possible to determine how long a body has been deceased. The progression of microbial communities follows a predictable and sequential pattern, which can be utilized to create a “post-mortem microbial clock” to estimate the PMI (Belk et al., 2018; Johnson et al., 2016; Metcalf et al., 2013, 2016). Mathematical models have been developed for microbial data sets to better predict the successional patterns of microbes from decomposing cadavers with more accuracy using complex microbiome data. Regression models may be developed to include microbial quantification as a predictive feature, with a correlation between the composition of microbial communities and the decay time point determined. Studies in this field have employed model-based statistical approaches, including exponential decay models based on the reduction in microbial communities with an increase in PMI abundance of microbial taxa (Hauther et al., 2015) and indicator species model-based analysis (Pechal et al., 2014). Microbial datasets are complex and can be classified using machine learning methods. Many researchers have used algorithms such as K-nearest neighbors, Random Forest, and K-nearest to predict PMI (Deel et al., 2019). Belk et al. (2018) addressed knowledge gaps to create robust random forest regression models for calculating PMI. Sequencing datasets of universal genes (16S rRNA, 18S rRNA, ITS gene region) obtained from multiple studies of decomposing cadavers can be useful in constructing predictive models for estimating PMI from successional microbial research. To predict PMI using these mathematical algorithms, data samples should be gathered at regular intervals from various locations during decomposition (Deel et al., 2019). However, there are some limitations and knowledge gaps when utilizing these microbial clocks, such as uncertainty about the most dependable time duration of the microbial clock, the environmental factors that can increase microbial clock accuracy, and which sample site is more suitable for successional study using machine learning techniques. These limitations could be addressed by increasing

research in this area and further refining, validating, and standardizing NGS techniques for the better application of microbial profiling in legal investigations and PMI estimation. Table 1 lists the predominant microbial taxa and their abundance during each stage of decomposition, along with the animal model used in the study. It is evident that there is a distinct shift in the microbial communities during the various stages of decomposition, as observed in all animal models. The table highlights the role of specific microbial taxa in corpse decomposition and provides valuable information that could be used to develop a microbial clock for estimating PMI.

9. Challenges and ethical acceptance

One major challenge in using microbial communities for PMI estimation is the lack of standardization in sample collection, preservation, and sequencing methods. Variations in these factors can significantly affect the composition of the microbial community, leading to inaccurate PMI estimations. Additionally, environmental factors such as temperature, humidity, and the type of soil in which the body is buried can also influence the microbial community's composition (Carter, Yellowlees, Tibbett, 2007). Another challenge is the complexity of analysing microbial community data. Microbial community data analysis involves dealing with high-dimensional data, taxonomic classification, and functional inference, which require sophisticated computational tools and expertise. Moreover, the dynamics and temporal changes of microbial communities over the decomposition process add another layer of complexity to the analysis (Pechal et al., 2018). Site-specific models for PMI estimation are also required as the microbial community composition can vary significantly among different body sites (Metcalf et al., 2013). Although most of the studies in this area are from the United States, microbial community colonization can vary from one location to another and even between regions of the same country (Adserias-Garriga et al., 2017; Hauther et al., 2015; Hyde et al., 2013). Therefore, knowledge of the microbial communities present in the surrounding environment and the host's microbiome composition can be helpful. Studies on the identification and succession of microbial communities in aquatic environments have been conducted and found to be useful for determining PMI. However, further research is needed to validate these findings. Additionally, the microbial community in water may enter the body and interfere with the proliferation of other microbes that

Table 1
Association of prominent microbial taxa with different decomposition stages of different animal models

References	Specimen	Microbial findings	Estimated PMI
(Can et al., 2014)	Blood, brain, heart, liver and spleen	<i>Clostridium spp.</i> in heart, liver, spleen and <i>Lactobacillus spp.</i> in blood were prominent bacterial species observed	20–240 h PMI
(Hyde et al., 2013)	Intestine, oral cavity and skin	Aerobic to anaerobic bacterial shift was noted. Firmicutes, Actinobacteria and Bacteroidetes were prominent	0–30 days decomposition
(Tuomisto et al., 2014)	Pericardial fluid, blood, liver, portal vein and mesenteric lymph node	<i>Escherichia spp.</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> and <i>Clostridium spp.</i> were prominent	1–7 days
(Damann et al., 2015b)	Lower rib	Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroides, Actinobacteria, Acidobacteria and Chloroflexi were prominent phyla	571–18,918 accumulated day degree decomposition (ADD). ADD is calculated by summing the daily mean temperatures (usually in degrees Celsius or degrees Fahrenheit) over a period of time and comparing it to a base temperature
(Hauther et al., 2015)	Proximal large intestine	<i>Bacteroides spp.</i> and <i>Lactobacillus spp.</i> declining abundance was noted to estimate PMI	9–20 days decomposition
(Javan et al., 2016b)	Brain, heart, liver, and spleen, buccal cavity, blood	Higher abundance of <i>Pseudomonas spp.</i> and <i>Clostridiales</i> were found in female cadavers while male cadavers have higher abundance of <i>Clostridium spp.</i> and <i>Streptococcus spp.</i> as decomposition progress	3.5–240 h PMI
(Adserias-Garriga et al., 2017)	Oral cavity	Firmicutes and Actinobacteria were found prominent during decomposition	0–12 days decomposition
(DeBruyn, Hauther, 2017)	Proximal large intestine (caecum)	Significant decline in Bacteroidetes while increase in <i>Clostridiales</i> and Gammaproteobacteria	0–800 accumulated day degrees decomposition
(Javan et al., 2017)	Liver and spleen tissues	Post-mortem <i>Clostridium</i> effect was observed	4–8 h PMI
(Pechal et al., 2018)	External auditory canal, eyes, nares, mouth, umbilicus and rectum	Decline in Actinobacteria and Bacteroidetes with increase in abundance of Proteobacteria was observed as decomposition progresses	1–73 + h PMI
(Hu et al., 2021)	Gut microflora samples were collected from the vermiform appendix and the transverse colon	Firmicutes, Bacteroidetes, and their respective subclasses	5–192 h PMI
(Wallace et al., 2021)	Skin	Most abundant families were <i>Moraxellaceae</i> , <i>Burkholderiaceae</i> (Proteobacteria), and <i>Clostridiaceae</i> (Firmicutes)	0–7415 + accumulated degree hours (ADH)
(Houtz et al., 2022)	Small intestine, large intestine, ceca, and a cloacal swab	<i>Lactococcus spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> , and <i>Clostridium spp.</i>	0–72 h PMI
(Zhao et al., 2022)	Oral cavities	<i>Atopostipes</i> , <i>Fack lamia</i> and <i>Bacillus cereus</i> were linearly correlated at all 12 time points in the 59-day period	0–59 days decomposition

invade the cadaver. Lastly, ethical and legal issues arise when using microbial communities for PMI estimation, such as concerns over privacy, consent, and potential misuse of the data. The use of microbial data has the potential to reveal sensitive information about individuals, including their genetics, health status, and

susceptibility to diseases. Changes in the microbiome may be associated with various health conditions, such as gastrointestinal disorders and autoimmune diseases. By analysing microbial data, researchers may infer information about an individual's overall health or specific health conditions. For example, in some cases,

microbial data may be combined with other information (e.g. medical records, demographics) that could potentially lead to the identification of individuals. Even without direct identification, the data might still be sensitive. Depending on the source of the microbial samples, obtaining informed consent from donors or their legal representatives may be necessary to ensure that individuals are aware of how their data will be used. Therefore, ethical guidelines and regulatory frameworks are necessary to ensure that the use of microbial communities for PMI estimation is conducted responsibly and transparently. Clear and informed consent procedures should be established for sample collection and data use, especially if the samples are obtained from human subjects. Overcoming these challenges requires interdisciplinary efforts involving forensic scientists, microbiologists, bioinformaticians, and ethicists.

10. Conclusion

In conclusion, the estimation of the PMI is a crucial aspect of forensic investigations involving human remains, and traditional methods have been limited in accuracy due to various factors. Recent studies have introduced modern techniques, such as molecular and biochemical analyses, to overcome these limitations and provide more accurate estimates of PMI. However, microbial communities associated with cadaver decomposition have also been found to play a crucial role in PMI estimation, and recent research has revealed that these communities have the potential to construct a post-mortem microbial clock to assess the PMI of the cadaver. Several studies have demonstrated that the succession of microbial taxa is associated with different decomposition stages of animal models, and that specific taxa can be used as markers for PMI estimation. These findings can provide more accurate estimates of PMI. However, further research is needed to validate the use of microbial communities for PMI estimation in humans.

References

- Adserias-Garriga, J., Quijada, N. M., Hernandez, M., Rodríguez Lázaro, D., Steadman, D., Garcia-Gil, L. J. (2017). Dynamics of the oral microbiota as a tool to estimate time since death. *Molecular Oral Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/omi.12191>
- Baccino, E., Cattaneo, C., Jouineau, C., Poudoulec, J., Martrille, L. (2007). Cooling rates of the ear and brain in pig heads submerged in water: implications for post-mortem interval estimation of cadavers found in still water. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 28(1), 80–85. <https://doi.org/10.1097/01.PAF.0000233529.50779.08>
- Baccino, E., De Saint Martin, L., Schuliar, Y., Guillo-teau, P., Le Rhun, M., Morin, J. F., Leglise, D., Amice, J. (1996). Outer ear temperature and time of death. *Forensic Science International*, 83(2), 133–146. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(96\)02027-0](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(96)02027-0)
- Belk, A., Xu, Z. Z., Carter, D. O., Lynne, A., Bucheli, S., Knight, R., Metcalf, J. L. (2018). Microbiome data accurately predicts the postmortem interval using random forest regression models. *Genes*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/GENES9020104>
- Bell, C. R., Wilkinson, J. E., Robertson, B. K., Javan, G. T. (2018). Sex-related differences in the thanatomicrobiome in postmortem heart samples using bacterial gene regions V1-2 and V4. *Letters in Applied Microbiology*, 67(2), 144–153. <https://doi.org/10.1111/LAM.13005>
- Brooks, J. W. (2016). Postmortem changes in animal carcasses and estimation of the postmortem interval. *Veterinary Pathology*, 53(5), 929–940. <https://doi.org/10.1177/0300985816629720>
- Bucheli, S. R., Lynne, A. M. (2016). The microbiome of human decomposition. *Microbe Magazine*, 11(4), 165–171. <https://doi.org/10.1128/microbe.11.165.1>
- Burcham, Z. M., Pechal, J. L., Schmidt, C. J., Bose, J. L., Rosch, J. W., Benbow, M. E., Jordan, H. R. (2019). Bacterial community succession, transmigration, and differential gene transcription in a controlled vertebrate decomposition model. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 745. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00745/BIB-TEX>
- Buyer, J. S., Sasser, M. (2012). High throughput phospholipid fatty acid analysis of soils. *Applied Soil Ecology*, 61, 127–130. <https://doi.org/10.1016/J.AP-SOIL.2012.06.005>
- Can, I., Javan, G. T., Pozhitkov, A. E., Noble, P. A. (2014). Distinctive thanatomicrobiome signatures found in the blood and internal organs of humans. *Journal of Microbiological Methods*, 106, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2014.07.026>
- Cao, J., Li, W. J., Wang, Y. F., An, G. S., Lu, X. J., Du, Q. X., Li, J., Sun, J. H. (2021). Estimating post-mortem interval using intestinal microbiota diversity based on 16S rRNA high-throughput sequencing technology. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 37(5), 621–626. <https://doi.org/10.12116/J.ISSN.1004-5619.2020.400708>
- Carter, D. O., Tibbett, M. (2006). Microbial decomposition of skeletal muscle tissue (*Ovis aries*) in a sandy loam soil at different temperatures. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(5), 1139–1145. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.09.014>

13. Carter, D. O., Yellowlees, D., Tibbett, M. (2007). Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Naturwissenschaften*, 94(1), 12–24. <https://doi.org/10.1007/s00114-006-0159-1>
14. Chandra, J., Sabharwal, K. (1968). Determination of time since death from a study of various postmortem changes – PubMed. *Journal of the Indian Medical Association*, 51(7), 336–341. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5705879/>
15. Chin, H. C., Marwi, M. A., Jeffery, J., Omar, B. (2008). Insect succession on a decomposing piglet carcass placed in a man-made freshwater pond in Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 25(1), 23–29.
16. Clarke, T. H., Gomez, A., Singh, H., Nelson, K. E., Brinkac, L. M. (2017). Integrating the microbiome as a resource in the forensics toolkit. *Forensic Science International. Genetics*, 30, 141–147. <https://doi.org/10.1016/J.FSigen.2017.06.008>
17. Cobaugh, K. L., Schaeffer, S. M., DeBruyn, J. M. (2015). Functional and structural succession of soil microbial communities below decomposing human cadavers. *PLoS ONE*, 10(6), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130201>
18. Connor, M., Baigent, C., Hansen, E. S. (2018). Testing the use of pigs as human proxies in decomposition studies. *Journal of Forensic Sciences*, 63(5), 1350–1355. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13727>
19. Damann, F. E., Williams, D. E., Layton, A. C. (2015a). Potential use of bacterial community succession in decaying human bone for estimating postmortem interval. *Journal of Forensic Sciences*, 60(4), 844–850. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12744>
20. Damann, F. E., Williams, D. E., Layton, A. C. (2015b). Potential use of bacterial community succession in decaying human bone for estimating postmortem interval. *Journal of Forensic Sciences*, 60(4), 844–850. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12744>
21. DeBruyn, J. M., Hauther, K. A. (2017). Postmortem succession of gut microbial communities in deceased human subjects. *PeerJ*, 5(6). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.3437>
22. Deel, H., Bucheli, S., Belk, A., Ogden, S., Lynne, A., Carter, D. O., Knight, R., Metcalf, J. L. (2019). Using microbiome tools for estimating the postmortem interval. (In) B. Budowle, S. Schutzer, S. Morse, *Microbial forensics* (pp. 171–191). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815379-6.00012-X>
23. Dong, K., Xin, Y., Cao, F., Huang, Z., Sun, J., Peng, M., Liu, W., Shi, P. (2019). Succession of oral microbiota community as a tool to estimate postmortem interval. *Scientific Reports*, 9(1), 13063. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49338-z>
24. Emmons, A. L., Mundorff, A. Z., Hoeland, K. M., Davoren, J., Keenan, S. W., Carter, D. O., Campagna, S. R., DeBruyn, J. M. (2022). Postmortem skeletal microbial community composition and function in buried human remains. *MSystems*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.00041-22>
25. Guo, J. J., Liao, H. D., Fu, X. L., Zha, L., Liu, J. S., Cai, J. F. (2015). Bacterial community succession analysis by next generation sequencing in Changsha city, China. *Forensic Science International. Genetics Supplement Series*, 5, e107–e108. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.043>
26. Hau Teo, C., Osman, K., Ayunni Ghani, A., Hazfalinda Hamzah, N. (2013). Post mortem changes in relation to different types of clothing. *The Malaysian Journal of Pathology*, 35(1), 77–85. <https://www.researchgate.net/publication/244481156>
27. Hauther, K. A., Cobaugh, K. L., Jantz, L. M., Sparer, T. E., DeBruyn, J. M. (2015). Estimating time since death from postmortem human gut microbial communities. *Journal of Forensic Sciences*, 60(5), 1234–1240. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12828>
28. Hayashi, H., Sakamoto, M., Kitahara, M., Benno, Y. (2003). Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiology and Immunology*, 47(8), 557–570. <https://doi.org/10.1111/J.1348-0421.2003.TB03418.X>
29. Heimesaat, M. M., Boelke, S., Fischer, A., Haag, L. M., Loddenkemper, C., Köhl, A. A., Göbel, U. B., Bereswill, S. (2012). Comprehensive postmortem analyses of intestinal microbiota changes and bacterial translocation in human flora associated mice. *PLOS ONE*, 7(7), e40758. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0040758>
30. Hill, G. T., Mitkowski, N. A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L. R., Jurkonie, D. D., Ficke, A., Maldonado-Ramirez, S., Lynch, S. T., Nelson, E. B. (2000). Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15(1), 25–36. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00069-X)
31. Houtz, J. L., Receveur, J. P., Pechal, J. L., Benbow, M. E., Horton, B. M., Wallace, J. R. (2022). Characterization of the avian postmortem gut microbiome across space and time using 16S rRNA sequencing. *Forensic Science International: Animals and Environments*, 2, 100053. <https://doi.org/10.1016/J.FSIAE.2022.100053>
32. Hu, L., Xing, Y., Jiang, P., Gan, L., Zhao, F., Peng, W., Li, W., Tong, Y., Deng, S. (2021). Predicting the postmortem interval using human intestinal microbiome data and random forest algorithm. *Science and Justice*, 61(5), 516–527. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2021.06.006>

33. Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Halls-worth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Soder-gren, E. J., White, O. (The Human Microbiome Project HMP Consortium) (2012). Structure function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/NATURE11234>
34. Hyde, E. R., Haarmann, D. P., Lynne, A. M., Bucheli, S. R., Petrosino, J. F. (2013). The living dead: bacterial community structure of a cadaver at the onset and end of the bloat stage of decomposition. *PloS One*, 8(10), e77733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077733>
35. Hyde, E. R., Haarmann, D. P., Petrosino, J. F., Lynne, A. M., Bucheli, S. R. (2014). Initial insights into bacterial succession during human decomposition. *International Journal of Legal Medicine*, 129(3), 661–671. <https://doi.org/10.1007/s00414-014-1128-4>
36. Iancu, L., Junkins, E. N., Necula-Petrareanu, G., Pur-carea, C. (2018). Characterizing forensically important insect and microbial community colonization patterns in buried remains. *Scientific Reports 2018 8:1*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33794-0>
37. Javan, G. T., Finley, S. J. (2018). What is the “thanatomicrobiome” and what is its relevance to forensic investigations? (In) T. K. Ralebitso-Senior (Ed.), *Forensic ecogenomics: the application of microbial ecology analyses in forensic contexts* (pp. 133–143). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809360-3.00006-0>
38. Javan, G. T., Finley, S. J., Abidin, Z., Mulle, J. G. (2016a). The thanatomicrobiome: a missing piece of the microbial puzzle of death. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 225. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00225/BIBTEX>
39. Javan, G. T., Finley, S. J., Can, I., Wilkinson, J. E., Hanson, J. D., Tarone, A. M. (2016b). Human thanatomicrobiome succession and time since death. *Scientific Reports*, 6. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/srep29598>
40. Javan, G. T., Finley, S. J., Smith, T., Miller, J., Wilkinson, J. E. (2017). Cadaver thanatomicrobiome signatures: The ubiquitous nature of Clostridium species in human decomposition. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02096>
41. Johnson, H. R., Trinidad, D. D., Guzman, S., Khan, Z., Parziale, J. V., DeBruyn, J. M., Lents, N. H. (2016). A machine learning approach for using the postmortem skin microbiome to estimate the postmortem interval. *PLoS ONE*, 11(12), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167370>
42. Kim, H., Cho, Y., Lee, J., Kim, H. S., Jung, J. Y., Kim, E. S. (2020). Metagenomic analysis of postmortem-bone using next-generation sequencing and forensic microbiological application. *The Microbiological Society of Korea*, 56(1), 10–18. <https://doi.org/10.7845/KJM.2020.9158>
43. Laudadio, I., Fulci, V., Palone, F., Stronati, L., Cucchiara, S., Carissimi, C. (2018). Quantitative assessment of shotgun metagenomics and 16S rDNA amplicon sequencing in the study of human gut microbiome. *Omic: A Journal of Integrative Biology*, 22(4), 248–254. <https://doi.org/10.1089/OMI.2018.0013>
44. Liu, R., Wang, Q., Zhang, K., Wu, H., Wang, G., Cai, W., Yu, K., Sun, Q., Fan, S., Wang, Z. (2021). Analysis of postmortem intestinal microbiota successional patterns with application in postmortem interval estimation. *Microbial Ecology* 84(4), 1087–1102. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01923-4>
45. Lutz, H., Vangelatos, A., Gottel, N., Osculati, A., Visona, S., Finley, S. J., Gilbert, J. A., Javan, G. T. (2020). Effects of extended postmortem interval on microbial communities in organs of the human cadaver. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.569630>
46. Melvin, J. R., Cronholm, L. S., Simson, L. R., Isaacs, A. M. (1984). Bacterial transmigration as an indicator of time of death. *Journal of Forensic Sciences*, 29(2), 11687J. <https://doi.org/10.1520/JFS11687J>
47. Metcalf, J. L. (2019). Estimating the postmortem interval using microbes: knowledge gaps and a path to technology adoption. *Forensic Science International. Genetics*, 38, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.11.004>
48. 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. (2013). A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *ELife*, 2, 1–19. <https://doi.org/10.7554/elife.01104>
49. Metcalf, J. L., Xu, Z. Z., Weiss, S., Lax, S., Van Treuren, W., Hyde, E. R., Song, S. J., Amir, A., Larsen, P., Sangwan, N., Haarmann, D., Humphrey, G. C., Ackermann, G., Thompson, L. R., Lauber, C., Bibat, A., Nicholas, C., Gebert, M. J., Petrosino, J. F., Reed, S. C., Gilbert, J. A., Lynne, A. M., Bucheli, S. R., Carter, D. O., Knight, R. (2016). Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition. *Science*, 351(6269), 158–162. <https://doi.org/10.1126/science.aad2646>
50. Olakanye, A. O., Ralebitso-Senior, T. K. (2022). Profiling of successional microbial community structure and composition to identify exhumed gravesoils – preliminary study. *Forensic Sciences*, 2(1), 130–143. <https://doi.org/10.3390/forensicsci2010010>
51. Pechal, J. L., Crippen, T. L., Benbow, M. E., Tarone, A. M., Dowd, S., Tomberlin, J. K. (2014). The potential use of bacterial community succession in forensics as described by high throughput metagenomic sequencing. *International Journal of Legal Medicine*, 128(1), 193–205. <https://doi.org/10.1007/s00414-013-0872-1>

52. Pechal, J. L., Crippen, T. L., Tarone, A. M., Lewis, A. J., Tomberlin, J. K., Benbow, M. E. (2013). Microbial community functional change during vertebrate carrion decomposition. *PLoS ONE*, 8(11), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079035>
53. Pechal, J. L., Schmidt, C. J., Jordan, H. R., Benbow, M. E. (2018). A large-scale survey of the postmortem human microbiome, and its potential to provide insight into the living health condition. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23989-w>
54. Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A., Versalovic, J. (2009). Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry*, 55(5), 856–866. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2008.107565>
55. Preiswerk, D., Walsler, J. C., Ebert, D. (2018). Temporal dynamics of microbiota before and after host death. *The ISME Journal*, 12(8), 2076–2085. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0157-2>
56. Procopio, N., Ghignone, S., Williams, A., Chamberlain, A., Mello, A., Buckley, M. (2019). Metabarcoding to investigate changes in soil microbial communities within forensic burial contexts. *Forensic Science International. Genetics*, 39, 73–85. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGEN.2018.12.002>
57. Ritchie, N. J., Schutter, M. E., Dick, R. P., Myrold, D. D. (2000). Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1668–1675. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1668-1675.2000/ASSET/AA562BC0-8969-4B70-B75A-AA5DB35A4924/ASSETS/GRAPHIC/AM0401491004.JPEG>
58. Rodrigo, M. R. (2016). A nonlinear least squares approach to time of death estimation via body cooling. *Journal of Forensic Sciences*, 61(1), 230–233. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12875>
59. Roy, R. (2020). Potential use of microbiota as a forensics tool to determine a post-mortem interval. *Duluth Journal of Advanced Writing*, 1, 13–22.
60. Thomas, T. B., Finley, S. J., Wilkinson, J. E., Wescott, D. J., Gorski, A., Javan, G. T. (2017). Postmortem microbial communities in burial soil layers of skeletonized humans. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 49, 43–49. <https://doi.org/10.1016/J.JFLM.2017.05.009>
61. Tuomisto, S., Pessi, T., Collin, P., Vuento, R., Aittoniemi, J., Karhunen, P. J. (2014). Changes in gut bacterial populations and their translocation into liver and ascites in alcoholic liver cirrhotics. *BMC Gastroenterology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-230X-14-40>
62. Vass, A. (2001). Beyond the grave – understanding human decomposition. *Microbiology Today*, 28(28), 190–192.
63. Wagner, D. (2008). Microbial communities and processes in arctic permafrost environments. *Microbiology of Extreme Soils*, 13, 133–154. https://doi.org/10.1007/978-3-540-74231-9_7
64. Wallace, J. R., Receveur, J. P., Hutchinson, P. H., Kaszubinski, S. F., Wallace, H. E., Benbow, M. E. (2021). Microbial community succession on submerged vertebrate carcasses in a tidal river habitat: implications for aquatic forensic investigations. *Journal of Forensic Sciences*, 66(6), 2307–2318. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14869>
65. Zhang, Q., Widmer, G., Tzipori, S. (2013). A pig model of the human gastrointestinal tract. *Gut Microbes*, 4(3), 193–200. https://doi.org/10.4161/GMIC.23867/SUPPL_FILE/KGMI_A_10923867_SM0001.ZIP
66. Zhao, X., Zhong, Z., Hua, Z. (2022). Estimation of the post-mortem interval by modelling the changes in oral bacterial diversity during decomposition. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/jam.15771>

Corresponding author

Assistant Prof. Jyoti Dalal
Department of Forensic Science
Lovely Professional University
Punjab, India
e-mail: jyotidalal417@gmail.com

JAK ROZSZYFROWAĆ MIKROBIOLOGICZNĄ SYGNATURĘ ŚMIERCI – POSTĘPY W POŚMIERTNEJ ANALIZIE DROBNOUSTROJÓW

1. Wprowadzenie

Ustalenie czasu, jaki upłynął od zgonu do odnalezienia zwłok, jest jednym z podstawowych zadań w badaniach kryminalistycznych. Czas ten oznacza się skrótem PMI (*post-mortem interval*) lub TSD (*time since death*). Oszacowanie czasu od zgonu to kluczowe działanie w każdym dochodzeniu, w którym mamy do czynienia z ludzkimi zwłokami, gdyż dostarcza ono cennych informacji pozwalających na zidentyfikowanie ofiary i zrekonstruowanie zdarzeń poprzedzających zgon, prowadząc ostatecznie do ustalenia sprawcy lub sprawców. Do szacowania PMI stosuje się tradycyjnie kilka technik. Po pierwsze – ocenia się zmiany ogólne, w tym zmiany natychmiastowe, takie jak *algor mortis*, *livor mortis* czy *rigor mortis* (Clarke, Gomez, Singh, Nelson, Brinkac, 2017). Po zmianach natychmiastowych następuje rozkład zwłok w wyniku autolizy i gnicia powodowanego przez bakterie (Hau Teo, Osman, Ayunni Ghani, Hafzalinda Hamzah, 2013). Po drugie – ocenia się zmiany temperatury na podstawie jej wielokrotnych pomiarów w odbycie, na oczach lub na uszach (Baccino i in., 1996, 2007; Rodrigo, 2016). I po trzecie – popularną metodą, pomocną w ustalaniu PMI, jest też entomologia sądowa, czyli nauka analizująca postępujące zasiedlanie zwłok przez owady (Chandra, Sabharwal, 1968). Wyżej wymienione tradycyjne techniki mają jednak ograniczenia wynikające z wpływu różnych czynników, takich jak temperatura, wilgotność czy stan zwłok (Houtz i in., 2022). W ostatnich latach wprowadzono nowoczesne techniki, m.in. analizy molekularne i biochemiczne, które eliminują ograniczenia tradycyjnych metod i umożliwiają ustalenie PMI. Techniki molekularne, takie jak sekwencjonowanie RNA i profil ekspresji genów, służą do wykrywania zmian we wzorcach ekspresji genów po zgonie (Belk i in., 2018; Brooks, 2016). Inne metody oceny PMI polegają na oznaczaniu określonych metabolitów i białek w płynach ustrojowych (Buyer, Sasser, 2012; Hill i in., 2000; Ritchie, Schutter, Dick, Myrold, 2000). Stosując tradycyjne techniki w połączeniu z nowoczesnymi, można oszacować PMI z większą dokładnością. Nowoczesne techniki mają potencjał, by rozwinąć nauki kryminalistyczne i poprawić kluczową w śledztwie dokładność pomiarów PMI.

Aktywność społeczności drobnoustrojów jest ściśle związana z rozkładem zwłok (Cobaugh, Schaeffer, DeBruyn, 2015). O wroście mikrobiomu decydują zmiany w przebiegu rozkładu i jego produktach ubocznych. Do

analizy tego procesu stosuje się kilka modeli zwierzęcych, jak na przykład model świni (Chin, Marwi, Jeffery, Omar, 2008; Connor, Baigent, Hansen, 2018; Zhang, Widmer, Tzipori, 2013) i myszy (Heimesaat i in., 2012; Metcalf i in., 2013), a nawet model ludzkich zwłok (Bucheli, Lynne, 2016; Huttenhower i in., 2012). Badania w powyższym zakresie umożliwiły analizę funkcjonalną i taksonomiczną społeczności drobnoustrojów na kolejnych etapach rozkładu oraz analizę roli drobnoustrojów w procesie rozkładu (Hyde, Haarmann, Petrosino, Lynne, Bucheli, 2014; Metcalf i in., 2013, 2016; Pechal i in., 2014). Zaobserwowano, że w miarę postępu rozkładu bakterie aerobowe (np. *Bacteroides spp.*) wyraźnie ustępują miejsca anaerobowym (np. *Clostridium spp.*) (Hyde, Haarmann, Lynne, Bucheli, Petrosino, 2013; Pechal i in., 2013). Kilka niedawno opublikowanych prac wyjaśnia, że w trakcie rozkładu zwłok drobnoustroje mogą utworzyć „pośmiertny zegar mikrobiologiczny” pozwalający ustalić PMI (Damann, Williams, Layton, 2015a; Metcalf i in., 2013; Pechal i in., 2013). Bakterie potrafiące utworzyć taki zegar to m.in. *Proteus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Aggregatibacter spp.*, *Ignatzschineria spp.*, *Acinetobacter spp.* i *Prevotella spp.* (Carter, Tibbett, 2006; Guo i in., 2015; Melvin, Cronholm, Simson, Isaacs, 1984; Vass, 2001).

2. Identyfikacja pośmiertnych społeczności drobnoustrojów technologią sekwencjonowania nowej generacji

W ostatnich latach dzięki rozwojowi innowacyjnych technologii identyfikacji drobnoustrojów i ich analizy po zgonie dokonał się znaczny postęp w kryminalistyce. Sekwencjonowanie nowej generacji (*next generation sequencing*, NGS) jako technologia wspierająca dziedzinę ekologii drobnoustrojów pozwoliło badaczom na identyfikację i scharakteryzowanie społeczności drobnoustrojów z niezrównaną szybkością i precyzją. Technologią tą można identyfikować społeczności drobnoustrojów w wielu różnych środowiskach, w tym w zwłokach w stanie rozkładu. Analiza DNA mikroorganizmów obecnych w próbce pozwala badaczom rozpoznać określone taksony i ocenić ich liczebność; informacje te można następnie wykorzystać, by ustalić sukcesję drobnoustrojów w czasie, a na jej podstawie oszacować PMI. Niedawno opublikowane prace wskazują na duży potencjał NGS w zakresie badań kryminalistycznych. Istotny wkład NGS dla

mikrobiologii pośmiertnej polega na rozwoju wysoko-przepustowej technologii sekwencjonowania, pozwalającej na sekwencjonowanie wielu próbek jednocześnie (Laudadio i in., 2018). Technologia ta umożliwiła kryminalistom badanie społeczności drobnoustrojów w różnych przedziałach czasu po zgonie i w różnych rejonach ciała. Porównując sekwencje uzyskane z próbek środowiskowych z bazami danych, uzyskuje się precyzyjne informacje o składzie drobnoustrojów, a tym samym o różnorodności i dynamice społeczności drobnoustrojów zasiedlających różne ekosystemy. Sekwencjonowanie metagenomiczne, sekwencjonowanie metodą *shotgun*, sekwencjonowanie całego genomu oraz amplikonów to techniki biologii molekularnej stosowane do różnych analiz genetycznych. Sekwencjonowanie metagenomiczne służy do badania próbek mieszanych zawierających materiał genetyczny pochodzący z wielu organizmów w celu analizy złożonych społeczności drobnoustrojów lub próbek środowiskowych. Technika ta pozwala zbadać całość materiału genetycznego zawartego w próbce, w tym DNA zarówno drobnoustrojowe, jak i ludzkie (Petrosino, Highlander, Luna, Gibbs, Versalovic, 2009). Wykorzystano ją do identyfikacji taksonów drobnoustrojów obecnych w próbkach pośmiertnych i oceny potencjału metabolicznego takich społeczności. Przykładowo użyto sekwencjonowania genetycznego do zidentyfikowania taksonów związanych z rozkładem i gniciem oraz do ustalenia wskaźników mikrobiologicznych czasu zgonu (Cao i in., 2021; Kim i in., 2020; Pechal i in., 2014). Odmianą sekwencjonowania całego genomu jest podejście typu *shotgun*, polegające na dzieleniu genomu na przypadkowe fragmenty, sekwencjonowaniu go, a następnie składaniu fragmentów w całość komputerowo. Z kolei sekwencjonowaniem amplikonowym analizuje się konkretne regiony genomu, w tym genów 16S rRNA u bakterii i archeonów. Technika ta polega na amplifikacji wybranych regionów metodą PCR przed sekwencjonowaniem, co pozwala na badanie różnorodności genetycznej konkretnych grup taksonomicznych. Sekwencjonowanie 16S rRNA stosuje się głównie w odniesieniu do bakterii i archeonów, sekwencjonowanie 18S rRNA – do mikroorganizmów eukariotycznych, np. protistów, a sekwencjonowanie wewnętrznych regionów niekodujących (*internal transcribed spacer*, ITS) – do grzybów. Wymienione wyżej regiony materiału genetycznego zachowują względnie tę samą postać wewnątrzgatunkowo, ale różnią się międzygatunkowo, co czyni je nieocenionymi w rozróżnianiu i klasyfikowaniu drobnoustrojów. W ramach Projektu Badań nad Ludzkim Mikrobiomem (*Human Microbiome Project*, HMP) wykorzystano wyłącznie technologie NGS, takie jak sekwencjonowanie genów 16S rRNA czy sekwencjonowanie metagenomiczne, którymi zidentyfikowano i zanalizowano różne partie ludzkiego ciała, w tym jelita, skórę, jamę ustną i pochwę (Huttenhower i in., 2012). Technologie te

pozwołyły odkryć nieznanne wcześniej gatunki i funkcje drobnoustrojów. Rozwój narzędzi i algorytmów obliczeniowych znacznie polepszył zdolność do analizowania i interpretacji danych NGS w kontekście mikrobiologii pośmiertnej. Wspomniane metodologie sekwencjonowania przyczyniają się wspólnie do głębszego zrozumienia społeczności drobnoustrojów w różnorodnych środowiskach, od jelita ludzkiego do ekosystemów glebowych. Wybór danej metody zależy od założonych celów i pytań badawczych.

3. Sukcesja społeczności drobnoustrojów podczas rozkładu

Projekt Badań nad Ludzkim Mikrobiomem wykazał, że mikrobiomy związane z poszczególnymi etapami rozkładu zwłok mogą znacznie różnić się od mikrobiomów występujących u zdrowych ludzi. Społeczności drobnoustrojów zmieniają się w zależności od etapu rozkładu. Zmienia się też ich miejsce występowania (Huttenhower i in., 2012; Metcalf i in., 2013). Na przykład drobnoustroje występujące w jamie ustnej są inne niż te w odbycie (Guo i in., 2015). Społeczność drobnoustrojów obecna w odbycie wiąże się często z klasą *Gammaproteobacteria*. Z powodu kontaktu z glebą i odchodami ma też profil bakteryjny porównywalny z innymi źródłami (Hayashi, Sakamoto, Kitahara, Benno, 2003; Wagner, 2008). Z kolei społeczności drobnoustrojów w jamie ustnej różnią się od tych obserwowanych w przewodzie pokarmowym w trakcie wzdęciowego etapu rozkładu (Huttenhower i in., 2012). W jednym z badań (Hyde i in., 2014) stwierdzono obecność *Ignatzschineria spp.* i *Wohlfahrtiimonas spp.* w stadium rozděcia i gnicia oraz *Acinetobacter spp.* w stadium szkieletowania ludzkich zwłok. Obserwacje te sugerują, że wraz z postępowaniem rozkładu zmienia się struktura społeczności bakteryjnych, a także środowisko ciała. Wspomniane typy bakterii są związane z aktywnością owadów w trakcie rozkładu. Próbkę bakterii pobrano z wielu miejsc na zwłokach dwóch osób w stanie rozkładu, pozostawionych na świeżym powietrzu. Analiza obejmowała pirosekwencjonowanie techniką 454 i badanie regionów zmiennych V3-V5 genu bakteryjnego 16S rRNA. Ogół społeczności mikroorganizmów biorących udział w rozkładzie zwłok, w tym te znajdujące się zarówno na powierzchni, jak i wewnątrz ciała, jest nazywany nekrobiomem. Obejmuje on mikrobiom epinekrotyczny i tanatomikrobiom (Javan, Finley, 2018). W ich skład wchodzi bakterie, grzyby, wirusy i inne mikroorganizmy wspólnie rozkładające materię organiczną martwego organizmu. Obie społeczności odgrywają kluczową rolę w procesie rozkładu, a interakcje między nimi są niezbędne do skutecznego obiegu składników odżywczych i energii w ekosystemach.

4. Mikrobiom epinekrotyczny

Mianem mikrobiomu epinekrotycznego określa się społeczności drobnoustrojów zasiedlające powierzchnię gnijącego organizmu w trakcie rozkładu. W mikrobiomie epinekrotycznym przeważają bakterie tlenowe i fakultatywne beztlenowe, które za pomocą tlenu rozkładają złożone związki organiczne, takie jak węglowodany i aminokwasy, na prostsze związki. W kilku pracach zbadano przydatność społeczności epinekrotycznych do szacowania PMI. Przykładowo badanie przeprowadzone przez Metcalf i współpracowników (2013) wykazało, że społeczności bakteryjne na zwłokach zmieniały się w sposób przewidywalny w czasie, a zmiany te pozwalały na dokładne oszacowanie PMI. W badaniu za pomocą sekwencjonowania o wysokiej przepustowości analizowano społeczności bakterii obecne na zwłokach myszy w stanie rozkładu w regularnych odstępach czasu do 48 godzin po śmierci. Autorzy opracowali model zegara mikrobiologicznego oparty na zmieniającej się w czasie liczebności względnej określonych taksonów bakterii służący do szacowania PMI. Autorzy sugerują, że model ten mógłby okazać się istotny w dochodzeniach sądowych, szczególnie w sytuacjach, gdy tradycyjne metody szacowania PMI byłyby nieskuteczne.

5. Tanatomikrobiom

Tanatomikrobiom oznacza społeczności drobnoustrojów zasiedlające organy wewnętrzne (mózg, serce, wątrobę, śledzionę i in.) oraz krew zwłok (Javan, Finley, 2018). Charakterystyczne dla tanatomikrobiomu są bakterie anaerobowe, które rozwijają się dynamicznie bez tlenu i odpowiadają za rozkład złożonych związków organicznych. Tanatomikrobiom przechodzi kolejne fazy, podczas których drobnoustroje zasiedlają ciało gospodarza, mnożą się w nim, a na końcu umierają. Prowadzi to do zmian w ogólnym składzie społeczności w miarę postępu rozkładu gospodarza (Javan i in., 2016b). Ponieważ tanatomikrobiom jest już obecny w zwłokach, zazwyczaj mniej wpływają na niego zewnętrzne czynniki środowiskowe niż nekrobiom (Roy, 2020). Badania dowodzą, że tanatomikrobiom przechodzi w trakcie rozkładu przewidywalną, sekwencyjną sukcesję społeczności drobnoustrojów, na podstawie składu i liczebności których można oszacować PMI (Can i in., 2014; Javan, Finley, Smith, Miller, Wilkinson, 2017; Javan i in., 2016b).

6. Sukcesja drobnoustrojów w różnych partiach ciała po śmierci

Sukcesja społeczności drobnoustrojów po śmierci to skomplikowany proces, podczas którego różne

ich gatunki mnożą się i umierają. Rycina 1 przedstawia występowanie i liczebność różnych taksonów bakterii w poszczególnych partiach ciała, tj. skórze, jelicie grubym, wątrobie, jamie ustnej, sercu, śledzionie i kościach.

6.1. Mikrobiom jamy ustnej

Jamę ustną zamieszkują liczne społeczności drobnoustrojów, które zostały zbadane przez kilku autorów w kontekście PMI. W swej niedawnej publikacji Zhao, Zhong i Hua (2022) szacowali PMI przez okres 59 dni, ustalając 12 przedziałów czasowych w obrębie PMI, wybranych do analizy struktury społeczności bakterii. Sekwencjonowanie regionu V3-V4 genu bakteryjnego 16S rRNA na platformie Ion S5 XL ujawniło istotne zmiany w składzie mikroorganizmów jamy ustnej podczas rozkładu. W każdym z 12 czasów pomiaru w ciągu 59 dni autorzy odkryli trzy rodzaje bakterii (*Atopostipes spp.*, *Facklamia spp.* i *Bacillus cereus*) wykazujące zależność liniową. Rodzina *Planococcaceae* okazała się najlepszym wskaźnikiem w ostatnich sześciu przedziałach czasowych. Autorzy na podstawie mikrobiomu jamy ustnej opracowali model matematyczny. Podobnymi badaniami zajmowali się Adserias-Garriga i in. (2017), którzy zastosowali podejście metagenomiczne w celu zidentyfikowania społeczności drobnoustrojów obecnych w jamie ustnej. Badaniu poddano zwłoki trzech osób (jednego mężczyzny i dwóch kobiet), które przekazały swoje ciała Kolekcji Podarowanych Szkieletów im. W. M. Bassa przy Centrum Antropologii Sądowej na Uniwersytecie w Tennessee. Codziennie pobierano próbki wymazów z jamy ustnej w różnych stadiach gnicia zwłok. Wyekstrahowano i zanalizowano DNA, używając metod NGS. Ogólne zmiany sukcesyjne zachodzące w zwłokach wszystkich trzech osób podczas rozkładu były porównywalne. W stadium świeżości dominują rodzaje *Firmicutes* i *Actinobacteria*. *Tenericutes* są wskaźnikami stadium wzdęcia. Choć *Firmicutes* są dominującym rodzajem w zaawansowanych stadiach rozkładu, społeczność *Firmicutes* różni się od jej odpowiednika w stadium świeżości. W innej pracy badano 24 próbki pobrane z jamy ustnej modeli myszy, aby ustalić korelację pomiędzy drobnoustrojami jamy ustnej a PMI (Dong i in., 2019). Autorzy zaobserwowali wyraźne zmiany w składzie bakterii jamy ustnej w miarę postępu rozkładu. Co interesujące, pewne gatunki bakterii wykazywały istotną korelację z PMI na różnych poziomach taksonomicznych. Aby zwiększyć dokładność oceny PMI, badacze skonstruowali modele regresji liniowej pomiędzy liczebnościami względnymi wyżej wymienionych gatunków bakterii a PMI. Spośród zidentyfikowanych gatunków *Gammaproteobacteria* i *Proteus spp.* okazały się najbardziej obiecującymi kandydatami do szacowania PMI, w szczególności w zaawansowanych stadiach rozkładu.

6.2. Jelito grube i inne organy wewnętrzne

Kilku autorów badało mikrobiom jelita grubego i innych organów wewnętrznych w trakcie rozkładu. Na przykład Liu i in. (2021), używając sekwencjonowania 16S rDNA, prowadzili badania w celu ustalenia podobieństw i różnic w sukcesji społeczności drobnoustrojów w trakcie rozkładu zwłok myszy. Autorzy skupili się na jelicie grubym. Dominującymi typami we wszystkich próbkach okazały się *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i *Actinobacteria*. DeBruyn i Hauther (2017) również badały zmiany w społeczności drobnoustrojów rejonu jelita grubego w trakcie rozkładu zwłok ludzkich za pomocą sekwencjonowania amplikonów genu 16S rRNA. Autorki zbadały zwłoki czterech osób w wieku od 62 do 67 lat o masie ciała od 56 do 77 kg. Należy zaznaczyć, że wszystkie cztery osoby zmarły śmiercią naturalną. Dostęp do mikroflory żołądka autorki uzyskały chirurgicznie, wykonując małe cięcia w rejonie brzucha, a następnie sterylnymi wacikami starannie pobrały próbki materiału żołądka z kątnicy. Po każdym poborze próbek cięcie zamykano dokładnie taśmą. Procedurę powtarzano codziennie, aż rozkład tkanek w zwłokach osiągnął stan na tyle zaawansowany, że uniemożliwiał ich identyfikację i analizę. Wyniki pokazały, że bogactwo społeczności drobnoustrojów wzrastało z czasem, a ich różnorodność – malała. Dodatkowo licznosc *Bacteroidales* malała, a *Clostridiales* i *Gammaproteobacteria* rosła w miarę rozkładu. Badania te poszerzają wiedzę na temat dynamiki drobnoustrojów jelita grubego i innych organów wewnętrznych w trakcie rozkładu i dostarczają cennego wglądu w zmiany składu bakterieryjnego w czasie. Niedawne badania przeprowadzone przez Hu i in. (2021) zidentyfikowały społeczności drobnoustrojów jelitowych ludzkich zwłok występujące w wyrostku robaczkowym i okrężnicy; zaobserwowano też istotną różnicę w społecznościach drobnoustrojów obu próbek w zakresie PMI 5–192 godz. *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Bacteroidetes* dominowały w próbkach oraz przechodziły przewidywalne zmiany po śmierci. Ponadto *Firmicutes*, *Bacteroidetes* i ich podklasy w pobranych próbkach przejawiały przewidywalne wzorce sukcesji. W tym rejonie ciała obserwuje się przewidywalne zmiany sukcesyjne, które mogą posłużyć do szacowania PMI i osiągnięcia lepszego zrozumienia ekologii drobnoustrojowej w trakcie rozkładu. Co więcej, praca sugeruje, że wyrostek robaczkowy jest lepszym źródłem próbek do badań sukcesji drobnoustrojowej niż okrężnica.

W porównaniu do np. skóry czy jelita grubego inne organy wewnętrzne mają zazwyczaj mniej liczne populacje drobnoustrojów, choć nie są całkowicie jałowe. Załamanie barier następujące po śmierci człowieka może prowadzić do zmian w składzie i aktywności drobnoustrojów. Mikroorganizmy żywią się płynem uwalnianym w następstwie autolizy komórek i niszczenia tkanek. Po

zmetabolizowaniu tego płynu w trakcie gnicia mikrobiom wzrasta wykładniczo. Pomiar specyficzności i liczebności społeczności drobnoustrojów w poszczególnych organach może dać podstawę do opracowania zegara mikrobiologicznego (Metcalf, 2019).

Burcham i in. (2019) przeprowadzili badania, w których za pomocą kontrolowanego modelu myszy oceniali zmiany w strukturze populacji drobnoustrojów i ich funkcje w różnych organach, w tym sercu, śledzionie, szpiku kostnym, płucach i jelitach. Badania te przyczyniły się do rozwoju metagenomiki, dostarczając wglądu w ekspresję genów drobnoustrojów, transmigrację ich gatunków oraz ich zmiany strukturalne. Autorzy wykorzystali kombinację taksonomii bakterii i analizy metatranskryptomu do zbadania rozkładu, zbadali ponadto wpływ czynników środowiskowych na społeczność drobnoustrojów podczas rozkładu, dochodząc do wniosku, że zarówno warunki środowiskowe, jak i indywidualne cechy gospodarza, mają znaczący wpływ na przebieg rozkładu, prowadząc do zmian w jego tempie.

W innej pracy zauważono, że w odizolowanych warunkach środowiskowych rozkład w narządach wewnętrznych postępuje w normalnym tempie, ale tempo to maleje w porównaniu z innymi partiami ciała, jeśli dojdzie do inwazji społeczności drobnoustrojów z gleby przygrubowej i ekosystemów wodnych (Preiswerk, Walser, Ebert, 2018). Organy reprodukcyjne przechodzą rozkład jako ostatnie ze wszystkich organów; mają też większą różnorodność alfa od innych organów oraz znacząco inny mikrobiom w trakcie rozkładu. Lutz i współpracownicy (2020) zanalizowali tkanki organów pobrane w trakcie sekcji zwłok 40 osób z Włoch (czas od zgonu od 24 do 432 godzin), skupiając się na mózgu, sercu, wątrobie, śledzionie, prostaty i macicy. Co ciekawe, macica i prostata wykazywały znacznie większą różnorodność alfa w porównaniu z innymi narządami. W tym wypadku skład społeczności drobnoustrojów w narządach rozrodczych również był inny niż w pozostałych narządach, w których dominowały takie rzędy bakterii jak *MLE1-12*, *Saprospirales* i *Burkholderiales*. Natomiast w organach reprodukcyjnych dominowały *Clostridiales* i *Lactobacillales*, podczas gdy względna licznosc *MLE1-12* zmalała.

6.3. Skóra i gleba przygrubowa

Metcalf i in. (2013) przeprowadzili badania na skórze pobranej ze zwłok myszy i z gleby przygrubowej. W obu wypadkach stwierdzili obecność *Gammaproteobacteria*, jak również dominację rodziny *Pseudomonadaceae* w skórze myszy. Natomiast Pechal i in. (2014) zaobserwowali dużą ilość bakterii *Moraxellaceae* na skórze pobranej ze zwłok świni w pierwszych 24 godzinach rozkładu, przy czym ilość ta zmniejszała się w miarę postępu rozkładu. Wyniki te podkreślają rolę rodziny

Moraxellaceae jako dekompozytorów u wielu różnych gospodarzy. Clostridia, zróżnicowana klasa Bacillota, występuje powszechnie w ciele zwierząt, glebie i rozkładającej się roślinności (Wells, Wilkins, 1996). Choć zidentyfikowano już wiele gatunków bakterii w ludzkich próbkach klinicznych, to jednak tylko kilka z nich wykazuje stały związek z chorobami człowieka. *Clostridium* i *Clostridiaceae* stwierdzono zarówno w tuszach objętych badaniami Metcalf i współpracowników (2013), jak i Pechal i współpracowników (2014), co prawdopodobnie wynika z ich wszechobecności. Metcalf i in. (2013) również odkryli *Clostridium* w powiązaniu z tuszami myszy, a także próbkami gleby z grobów, ale nie zgłosili obecności *Clostridiaceae*. Podobnie Pechal i in. (2014) odnotowali obecność *Clostridiaceae* na tuszy wieprzowej, ale nie znaleźli *Clostridium*. Rodzina *Clostridiaceae*, obok *Xanthomonadaceae* i *Moraxellaceae*, w szczególności odgrywa kluczową rolę w rozkładzie zwłok. Wciąż jednak jest potrzebna dokładna analiza statystyczna sprawdzająca, czy wyżej wymienione gatunki bakterii można uznać za zwykłych dekompozytorów.

Prowadzone są badania rozkładu w stadium szkielegowania w celu poszerzenia wiedzy o wzorcach sukcesji społeczności drobnoustrojów. Damann i in. (2015a) przeprowadzili w Centrum Badań Antropologicznych na Uniwersytecie w Tennessee analizę społeczności drobnoustrojów związanych z rozkładem zwłok ludzkich. Pobrali pojedyncze próbki dolnych żeber z 12 ciał w różnych stadiach rozkładu oraz trzy próbki gleby w celu wyjaśnienia wpływu rozkładu i upływu czasu na społeczność bakterii, używając wysokoprzepustowego sekwencjonowania genu 16S rRNA. Dominującym rodzajem we wszystkich stadiach rozkładu okazały się *Proteobacteria*, a głównymi podgrupami były *Alphaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria*. W miarę postępu rozkładu względna liczebność *Alphaproteobacteria* wzrastała, a *Gammaproteobacteria* – malała. *Firmicutes* i *Bacteroidetes*, czyli rodzaje powszechnie spotykane w jelicie grubym człowieka, były również bardzo liczne w próbkach. *Actinobacteria* i *Acidobacteria*, przeważnie występujące w glebie, zwiększyły swoją liczebność w późniejszych stadiach rozkładu i w suchych szczątkach.

Podobnie w innym badaniu (Thomas i in., 2017) postawiono dwie hipotezy. Pierwszą hipotezą było, że w późnych stadiach rozkładu, w odróżnieniu od wczesnych, różnorodność drobnoustrojów w glebie zmienia się, tj. następuje szkielegowanie. Drugą, że w poszczególnych warstwach gleby przygrobowej występują porównywalne taksony drobnoustrojów, zbliżone do tych w glebie kontrolnej. Autorzy wykorzystali sekwencjonowanie genu 16S rRNA do porównania społeczności drobnoustrojów w warstwach gleby przygrobowej położonej wokół zeszkielegowanych zwłok z próbkami gleby kontrolnej i sprawdzenia obu hipotez. Wyniki pokazały,

że dominującym rodzajem zarówno w glebie przygrobowej, jak i kontrolnej, były *Acidobacteria*. Co ciekawe, *Proteobacteria* były mniej liczne w glebie przygrobowej.

Wiedza na temat pośmiertnej sukcesji drobnoustrojów w glebie występującej przy pochowanych szczątkach ludzkich jest wciąż niepełna. Ograniczone poziomy tlen i wilgotności w połączeniu ze stałą temperaturą w glebie przygrobowej umożliwiają rozwój znacznie bardziej zróżnicowanych gatunków drobnoustrojów niż na powierzchni gleby, gdzie panują bardziej zmienne warunki (Thomas i in., 2017). Olakanye i Ralebitso-Senior (2022) przeprowadzili wstępne badanie, w ramach którego ustalili, a następnie śledzili zmiany w tego typu mikrobiomach, stwierdzając, że mikrobiomy te mogą dostarczyć informacji na temat ekshumacji. Autorzy skupili się na monitorowaniu zmian w podpowierzchniowych społecznościach drobnoustrojów glebowych jako wskaźnikach czasu, jaki upłynął od ekshumacji, używając do badań zwłok młodych świń (*Sus scrofa domestica*) jako zamienników ludzkich szczątków. Zidentyfikowali konkretne taksony bakterii wskazujące na różne przedziały czasowe oraz zdarzenia zachodzące po pochówku. Na przykład *Xanthomonadales* i *Xanthomonadaceae* wskazywały na okres wiosenno-letni; rodzina *Verrucomicrobiaceae* była związana z upływem co najmniej 50 dni od pochówku; zaś *Hydrogenophilales* i *Hydrogenophilaceae*, *Clostridiales* i *Clostridiaceae* 1 oraz *Bacteroidales* były wskaźnikami różnych przedziałów czasu po ekshumacji, których obecność potencjalnie wiązała się z określonymi etapami sukcesji drobnoustrojów w trakcie rozkładu.

W tym samym roku Emmons i in. (2022) przeprowadzili badanie w celu wyznaczenia składu i funkcji mikrobiomu na podstawie próbek kości i gleby przygrobowej. Uzyskane wyniki porównali z sekwencjami z próbek pobranych ze zwłok w stanie rozkładu w ramach *American Gut Project* (Amerykańskiego Projektu Badań nad Jelitem Grubym). Autorzy zastosowali również nieukierunkowane badania metabolomiczne w odniesieniu do niektórych podzbiorów próbek, żeby określić związek mikrobiomów ze zwłokami. Stwierdzili podobieństwa pomiędzy mikrobiomami zasiedlającymi kości na powierzchni oraz płytko zakopane kości a glebą przygrobową. Z kolei próbki jelita grubego wykazywały podobieństwa do próbek z głębszych warstw gleby, gdzie dominowały taksony anaerobowe. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach Procopio i in. (2019) odnotowali ogromną liczebność *Proteobacteria*, *Firmicutes* i *Bacteroidetes* w określonym PMI. Po dwóch miesiącach od zgonu zaobserwowano spadek bogactwa społeczności drobnoustrojów, podczas gdy *Bacteroid spp.* były obecne w glebie nawet po sześciu miesiącach od zgonu. Ponadto Iancu i in. (2018) scharakteryzowali społeczności drobnoustrojów z płytkich grobów, w wyniku czego uzyskali pierwsze dane ilościowe na temat *Enterococcus faecalis*

i *Clostridium paraputrificum*. W badaniu tym analizowano sukcesję nekrofagicznych gatunków owadów i społeczności bakterii obecnych na zwłokach świń w celu oszacowania PMI w okresie 7 miesięcy, obejmującym zimę i wiosnę w Bukareszcie (Rumunia). Stwierdzono obecność dużej liczby *Actinobacteria* i mniejszej liczby *Bacteroidetes*. Ponadto w wysokich temperaturach najliczniejsze były *Firmicutes*, a w niskich – *Proteobacteria*.

7. Powszechne występowanie *Clostridium*

Clostridium to rodzaj bakterii powszechnie występujących w glebie oraz w jelitach ludzi i zwierząt. *Clostridium spp.* wytwarzają zarodniki w martwych lub rozkładających się tkankach, co przekłada się na ich znaczną liczebność w zwłokach. Zarówno liczebność, jak i różnorodność gatunków *Clostridium* w zwłokach może jednak się różnić w zależności od szeregu czynników, takich jak PMI, obecność innych mikroorganizmów czy warunki środowiskowe. Niektóre gatunki *Clostridium* wytwarzają też związki toksyczne, takie jak toksyny klostridialne, które mogą powodować degradację tkanek i przyczyniać się do postępu rozkładu. W dociekaniach kryminalistycznych obecność *Clostridium spp.* może posłużyć za wskaźnik PMI i pomóc w ustaleniu następstwa zdarzeń przed śmiercią. Liczność i różnorodność *Clostridium spp.* w zwłokach może też dostarczyć informacji na temat warunków środowiskowych i interakcji pomiędzy drobnoustrojami właściwych rozkładowi. W jednej z prac wykazano, że bakterie *Clostridium spp.* występują powszechnie w trakcie rozkładu zwłok ludzkich. Autorzy nazwali to zjawisko „pośmiertnym efektem *Clostridium*” (Javan i in., 2017). Ponadto w tej samej pracy stwierdzono, że *Clostridium spp.* osiąga znaczną liczebność zarówno przy krótkim, jak i długim PMI. Przeprowadzono analizę filogenetyczną porównującą hiperzmienny region V4 z regionami V3-V4 w próbkach wątroby i śledziony pobranych ze zwłok 27 mężczyzn i 17 kobiet. Analiza wyjaśniła trzy czynniki odpowiadające za powszechną obecność *Clostridium spp.*: po pierwsze zdolność tych bakterii do podwojenia liczebności w krótkim czasie; po drugie – zdolność do transmigracji przez trawienie włókien kolagenowych, co może utrudniać drobnoustrojom rozprzestrzenianie się w innych partiach ciała ze względu na zawartą we włóknach proteazę kolagenolityczną, która występuje tylko u kilku drobnoustrojów; i po trzecie: powstawanie warunków beztlenowych po zgonie, które ułatwiają drobnoustrojom wzrost. Niedawno opublikowana praca potwierdziła występowanie efektu *Clostridium* w tkance sercowej zwłok ludzkich. W pracy tej badano drobnoustroje rozwijające się po śmierci w próbkach tkanki sercowej pobranych od 10 zmarłych osób pomiędzy 6 a 58 godzinami po zgonie (Bell i in., 2018). Użyto w niej sekwencjonowania amplikonów

nakierowanego na hiperzmienny region V1-2 i V4 genu 16S rRNA. Wyniki ujawniły istotne statystycznie zróżnicowanie ($p < 0,05$) amplikonów pomiędzy płciami. W szczególności *Clostridium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Pantoea spp.* i *Streptococcus spp.* odznaczały się największym wzrostem liczebności w wypadku regionów V1-2 i V4. Pośmiertny efekt *Clostridium* zaobserwowało również kilku innych autorów (Burcham i in., 2019; Pechal i in., 2018).

8. Zegar mikrobiologiczny

Zegarem mikrobiologicznym nazywa się model obliczeniowy wykorzystujący zmiany społeczności drobnoustrojów zachodzące w czasie w celu oszacowania PMI. Podstawą działania zegara jest to, że różne drobnoustroje wykazują różne wzorce wzrostu i rozkładu, a monitorowanie zmian w liczebności określonych taksonów pozwala ustalić czas, jaki upłynął od zgonu. Ponieważ sukcesja społeczności drobnoustrojów następuje w sposób przewidywalny i sekwencyjny, na jej podstawie można stworzyć „pośmiertny zegar mikrobiologiczny” pozwalający oszacować PMI (Belk i in., 2018; Johnson i in., 2016; Metcalf i in., 2013, 2016). Opracowano modele matematyczne wykorzystujące dane o drobnoustrojach, aby z lepszą dokładnością przewidywać wzorce sukcesji w zwłokach w stanie rozkładu na podstawie złożonych danych o mikrobiomach. Można potencjalnie stworzyć predyktywne modele opierające się na kwantyfikacji drobnoustrojów uwzględniające korelację pomiędzy składem społeczności drobnoustrojów a wyznaczonym przedziałem czasu w procesie rozkładu. Badania w tym zakresie stosowały modelowe podejścia statystyczne, w tym wykładnicze modele rozkładu wykorzystujące spadek liczebności społeczności drobnoustrojów wraz ze wzrostem PMI (Hauther i in., 2015), a także modelową analizę opartą na gatunkach wskaźnikowych (Pechal i in., 2014). Zbiory danych dotyczących drobnoustrojów są złożone, ale można je klasyfikować za pomocą uczenia maszynowego. Wielu badaczy stosowało m.in. algorytmy najbliższych sąsiadów (*K-nearest neighbours*) czy lasów losowych (*random forest*) do przewidywania PMI (Deel i in., 2019). Belk i współpracownicy (2018) podjęli próbę uzupełnienia braków w wiedzy, aby stworzyć odporne modele regresji lasu losowego do obliczania PMI. Dane dotyczące sekwencjonowania uniwersalnych genów (16S rRNA, 18S rRNA, region genu ITS) uzyskane z wielu badań na rozkładających się zwłokach mogą okazać się przydatne do konstruowania modeli predykcyjnych mających na celu szacowanie PMI na podstawie danych o sukcesji drobnoustrojów. Aby przewidzieć PMI za pomocą wyżej wymienionych algorytmów, należy w regularnych odstępach czasu pobierać próbki danych z różnych miejsc w trakcie rozkładu (Deel i in., 2019).

Zastosowanie zegarów mikrobiologicznych i wiedza na ich temat są jednak do pewnego stopnia ograniczone. Nie jest na przykład pewne, jaki czas trwania takiego cyklu wyznaczonego przez zegar daje najbardziej wiarygodne wyniki, jakie czynniki środowiskowe zwiększają jego dokładność ani jakiej wielkości próbki najlepiej nadają się do badań nad sukcesją za pomocą technik uczenia maszynowego. Ograniczeniom tym można zaradzić, prowadząc więcej badań w tym zakresie oraz udoskonalając, walidując i standaryzując techniki NGS w celu usprawnienia profilowania drobnoustrojów do badań sądowych i szacowania PMI. W tabeli 1 przedstawiono dominujące taksony drobnoustrojów i ich liczebność w poszczególnych stadiach rozkładu oraz model zwierzęcy zastosowany w badaniu. Widać wyraźnie, że w różnych stadiach rozkładu następują swoiste zmiany w społecznościach drobnoustrojów, co potwierdzają wszystkie modele zwierzęce. Tabela podkreśla rolę poszczególnych taksonów drobnoustrojów w rozkładzie zwłok oraz dostarcza cennych informacji, które mogą posłużyć do opracowania zegara mikrobowego do szacowania PMI.

9. Wyzwania i dopuszczalność etyczna

Dużym wyzwaniem w szacowaniu PMI na podstawie społeczności drobnoustrojów jest brak standaryzacji co do poboru i przechowywania próbek oraz metod sekwencjonowania. Odchylenia w tych czynnikach mogą znacząco wpłynąć na skład społeczności drobnoustrojów, co prowadzi do nieprawidłowej oceny PMI. Na skład społeczności mogą też wpływać czynniki środowiskowe, takie jak temperatura, wilgotność czy typ gleby, w której pochowano ciało (Carter, Yellowlees, Tibbett, 2007). Innym wyzwaniem jest skomplikowana procedura analizy społeczności drobnoustrojów, ponieważ opiera się ona na wysokowymiarowych danych, klasyfikacji taksonomicznej i wnioskowaniu funkcjonalnym, co wymaga potężnych narzędzi obliczeniowych i odpowiedniej wiedzy. Co więcej, analizę komplikują zmiany w czasie społeczności drobnoustrojów i ich dynamika w trakcie rozkładu (Pechal i in., 2018). Szacowanie PMI wymaga również modeli dostosowanych do poszczególnych rejonów ciała, ponieważ skład społeczności drobnoustrojów może się znacznie różnić pomiędzy nimi (Metcalf i in., 2013). Choć większość badań na ten temat prowadzi się w Stanach Zjednoczonych, kolonizacja przez społeczności drobnoustrojów może przebiegać inaczej w zależności od lokalizacji, a nawet w zależności od regionu w danym kraju (Adserias-Garriga i in., 2017; Hauther i in., 2015; Hyde i in., 2013). Pomocna w tym zakresie jest wiedza o okolicznych społecznościach drobnoustrojów i składzie mikrobiomu gospodarza. Informacje uzyskane z badań nad identyfikacją i sukcesją społeczności drobnoustrojów w środowiskach wodnych

okazały się pomocne do oceny PMI. Potrzebne są jednak dalsze prace w celu walidacji tych odkryć. Ponadto społeczności drobnoustrojów zamieszkujące wodę mogą dostać się do zwłok i przeszkodzić we wzroście innym obecnym w nich mikroorganizmom. W związku z wykorzystywaniem społeczności drobnoustrojów do szacowania PMI pojawiają się również kwestie etyczne i prawne, dotyczące m.in. prywatności, zgody i potencjalnego nadużywania danych. W wyniku przetwarzania danych o drobnoustrojach może dojść do ujawnienia wrażliwych informacji o osobach, w tym o ich genach, zdrowiu i podatności na choroby. Zmiany w mikrobiomie mogą być związane z różnymi chorobami, takimi jak zaburzenia żołądkowo-jelitowe i choroby autoimmunologiczne. Informacje o drobnoustrojach wskazują na ogólny stan zdrowia czy konkretne choroby danej osoby. Przykładowo informacje o drobnoustrojach w połączeniu z innymi danymi (takimi jak kartoteka medyczna czy dane demograficzne) w niektórych wypadkach mogą wystarczyć do zidentyfikowania osoby. Nawet jeśli nie dojdzie do bezpośredniej identyfikacji, dane mogą okazać się wrażliwe. W zależności od źródła próbek drobnoustrojów może być konieczne uzyskanie świadomej zgody od dawców bądź ich opiekunów prawnych, aby osoby te wiedziały, do jakich celów są używane ich dane. Tym samym zasady etyczne i ramy prawne są niezbędne do zapewnienia, że społeczności drobnoustrojów będą wykorzystywane do szacowania PMI w sposób odpowiedzialny i przejrzysty. Należy opracować procedury pozyskiwania wyraźnej i świadomej zgody na pobranie próbek i przetwarzanie danych, zwłaszcza w odniesieniu do próbek ludzkich. Do sprostania tym wyzwaniom będą potrzebne działania interdyscyplinarne, skupiające kryminalistów, mikrobiologów, bioinformatyków i etyków.

10. Wnioski

Podsumowując: szacowanie PMI jest kluczowym aspektem dochodzeń kryminalistycznych, w których specjaliści mają do czynienia z ludzkimi zwłokami, ale dokładność tradycyjnie stosowanych metod ograniczają różne czynniki. Niedawne badania aby wyeliminować te ograniczenia i zwiększyć dokładność szacowania PMI, wprowadziły nowoczesne techniki, takie jak analizy molekularne i biochemiczne. Okazało się jednak, że społeczności drobnoustrojów towarzyszące rozkładowi zwłok również odgrywają kluczową rolę w szacowaniu PMI, a najnowsze publikacje dowodzą, że społeczności te można potencjalnie wykorzystać do skonstruowania pośmiertnego zegara mikrobiologicznego służącego do szacowania PMI. W kilku pracach wykazano, że sukcesja taksonów drobnoustrojów jest związana z różnymi stadiami rozkładu modeli zwierzęcych, a określone taksony

mogą posłużyć jako wskaźniki do szacowania PMI. Obserwacje te mogą pozwolić na dokładniejsze szacunki PMI. Konieczne są jednak dalsze badania w celu walidacji wykorzystania społeczności drobnoustrojów do szacowania PMI u ludzi.

