
















## USE OF MICROORGANISMS, INSECTS, PLANTS AND SOIL IN CRIMINOLOGICAL RESEARCH

Irena B. PADZIŃSKA-PRUSZYŃSKA<sup>1</sup> , Jacek J. PRUSZYŃSKI<sup>2</sup> ,  
Małgorzata GÓRCZAK<sup>1</sup> , Anna SMOLARSKA<sup>1</sup> , Małgorzata KUBIAK<sup>1</sup> , Paulina  
KUCCHARZEWSKA<sup>1</sup> , Jacek SZELIGA<sup>1</sup> , Bartłomiej TACIAK<sup>1</sup> , Lidia FLORCZAK<sup>1</sup> , Paulina  
SIEDLECKA<sup>1</sup> , Maria LEWKOWICZ<sup>1</sup> , Karolina DYLEWSKA<sup>1</sup> , Natalia PAWŁASEK<sup>1</sup> ,  
Andrzej KIELISZAK<sup>1</sup> , Magdalena KRÓL<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> *Warsaw University of Life Sciences, Center of Cellular Immunotherapies, Warszawa, Poland*

<sup>2</sup> *School of Public Health, Centre of Postgraduate Medical Education, Warszawa, Poland*

### Abstract

The expectation of effective detection of perpetrators of crimes is fundamental for every person, given their deep-seated need to feel safe. In the context of modern realities, it is difficult to imagine effective activities of the police, prosecutor's office or judiciary without the use of advanced, reliable forensic techniques. The aim of this publication was to collect and present highlights of the evolution in forensic research based on a variety of scientific specializations, including forensic microbiology, forensic entomology, forensic botany, and soil science.

### Keywords

Post-mortem interval; Forensic microbiology; Forensic entomology; Forensic botany; Soil; Necrobiota.

*Received 20 September 2023; accepted 27 November 2023*

*Safety is not everything,  
but without safety everything is nothing.*

Klaus Nauman

### Introduction

Safety is one of basic human needs and has a major role in life as a source of the feeling of the certainty of existence. In Abraham Maslow's pyramid of needs, safety is ranked immediately after the biological needs required to sustain life (Maslow, 1943). Without the feeling of safety resulting from a lack of threats, individuals not only experience a degradation in their mental and physical health, but are also prone to behaviour that harms society as a whole.

The escalation of violence currently observed in some parts of the world, resulting from an increased frequency of the most severe crimes against life, has

exacerbated the feelings of threat in society (Global study on homicide, 2019; Quality of life indicators – economic security and physical safety – Statistics explained, 2023; Zabójstwo – Statystyka – Portal polskiej Policji, 2021). Counteracting this phenomenon requires creating a sense of certainty that the perpetrators of crimes, especially the most serious ones, will be found and punished according to their actions, both among the general population and among the perpetrators themselves. A major part of this process is the use of forensic science, based on reliable rules, as an increasingly important means of contemporary investigative processes.

One of the key tasks of investigators and officers of an investigative department is determining the time and place of death. The main objective of the medical examination of a body is to confirm death, and to establish the preliminary characteristics, time, cause and the mechanism of death. In turn, an extended examination is conducted to potentially support further investigation. A significant challenge is estimating the post-mortem interval (PMI), i.e. the time that has passed from death to the discovery of the body, which requires combining the knowledge of experts from many different fields, including entomologists, anthropologists, botanists, geologists and microbiologists (Franceschetti et al., 2021). Finding the original place of death is particularly important if the body was moved in order to hide or destroy it. Decisive clues can be obtained by observing specific microorganisms in and on the body, checking for the presence of insect larvae and analysing the soil composition on the victim's fingernails or clothes, and the type of pollen that has settled on the body. Likewise, a genetic analysis of the material collected from insects found at a potential place of death may provide information about the victim, even when the body has not yet been found. Investigators can also use forensic botany to analyse

plant evidence, which may indirectly help to connect the perpetrator to the crime scene, identify the murder weapon or determine the route taken by the victim or the suspects (Robinson, Pasternak, Mason, Elhaik, 2021).

The aim of the US-based NGO Innocence Project is to acquit wrongly convicted individuals. According to data from 2020, 375 people were acquitted in the US, of which 21 avoided a death sentence, primarily thanks to the application of molecular biology (Robinson et al., 2021).

Forensic geology also plays an important role in criminal science, by helping investigators to connect suspects with specific crimes by means of a soil and sediment analysis, in accordance with the rule of transfer (Bachliński, 2021). The observed increase of interest in criminal studies and criminological courses indicates a growing respect for experts in criminology (Wells, Stevens, 2008).

The primary aim of this article is to present methods for the assessment of the time, cause and place of death, and the identification of both the victim and the suspect based on microbiological, entomological, botanical and geological techniques (Fig.1).

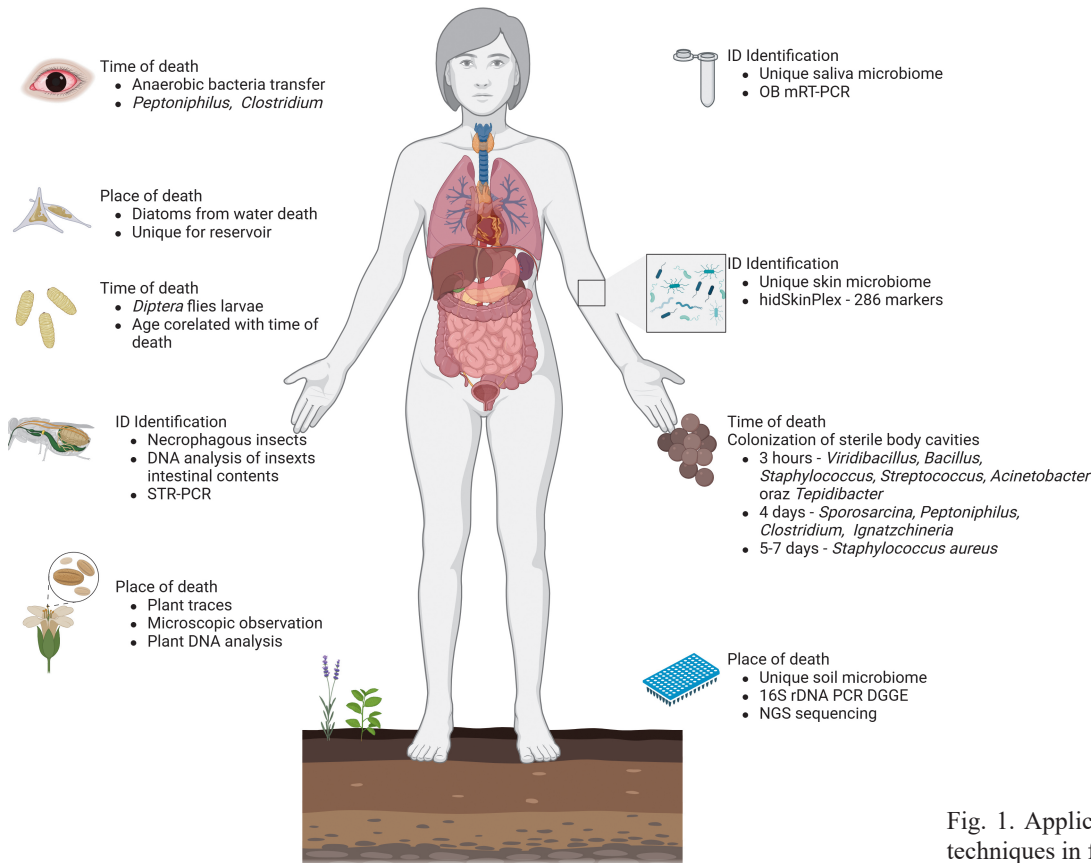


Fig. 1. Applications of biological techniques in forensic sciences.

## Microbiota, microbiome, thanatomicrobiota and necrobiota

Microorganisms are able to colonise most places on earth (Oliveira, Amorim, 2018) and, together with their abiotic surroundings, shape ecosystems. What is more, research has shown that every human and animal has its own, unique microbiota, which is a term that refers to all the microorganisms (bacteria, fungi, eukaryotes, archeons and viruses) inhabiting a given organism, most of which can be found in the large intestine.

The human microbiota is made up of  $10\text{--}100 \times 10^{12}$  symbiotic cells (Ursell, Metcalf, Parfrey, Knight, 2012). The microbiota forms an individual set of microorganisms that inhabit the body, both on the surface and inside (D'Argenio, Salvatore, 2015; Panasiuk, Kowalińska, 2019). According to the Human Microbiome Project Consortium, every human being harbours an individual community of microorganisms that can be used for personal identification, in a similar way to fingerprints (Huttenhower et al., 2012). This means that, for example, a set of microorganisms found in a bite wound can be used to identify the perpetrator (Tuccia, Zurgani, Bortolini, Vanin, 2019).

The composition of the microbiota of living organisms depends on many factors, including the life stage of a given individual, their sex, eating habits, as well as the use of various substances, including preservatives. It is worth emphasising that a person's microbiota may change due to past diseases and use of medications (Wójcik, Tomsia, Drzewiecki, Skowronek, 2021). Examples of connections between diseases and the composition of a personal microbiota is an increased count of bacteria from the genus *Rothia* in persons with cardiovascular disorders, compared to persons without cardiovascular diseases, who showed twice the amount of bacteria from the genera *Haemophilus* and *Fusobacterium* (Robinson et al., 2021). In turn, the term 'microbiome' refers to the genes belonging to a microbiota (Gill et al., 2006).

A necrobiota is a community of various organisms related to a decomposing corpse. In a broader sense of the word, the necrobiota is made up of microorganisms living on, inside, under or around the corpse, as well as the microorganisms transported by insects (Harrison et al., 2020; Pechal et al., 2014, 2013; Tuccia et al., 2019).

Other terms have appeared recently in the criminological literature, such as thanatomicrobiota, i.e. the post-mortem community of microorganisms inside the body; and epinecrotic communities, i.e. the entirety of

the microorganisms inhabiting the surface of a corpse (Dell'Annunziata et al., 2022).

## Birth of forensic microbiology and its contemporary applications

In the 1990s, the intensification of bioterrorism created a need for a new scientific discipline, called forensic microbiology (Bidwell, Murch, 2016). The 2001 terrorist attacks in the US with the use of the bacteria *Bacillus anthracis* constituted a milestone in forensic microbiology (Schmedes, Sajantila, Budowle, 2016). In 2001 in the US, a series of terrorist attacks took place, in which the perpetrators mailed letters containing a powder with spores of the bacterium *Bacillus anthracis*, also known as *anthrax*. These attacks led to the infection and death of five persons and the exposure of many others to anthrax, and caused significant fear among the US society, this way accentuating the threat of bioterrorism (Bush, Perez, 2012).

Forensic microbiology proved to be an important tool in the investigation. Scientists and experts in the microbiology and criminology contributed to the analysis of the anthrax samples, which included an identification of the source of the spores, genetic analysis of the strands and a determination of the modes of transmission. This research played a key role in identifying the perpetrators and understanding how the biological material has been prepared and distributed. Another successful application of forensic microbiology was the sequencing of the genomes of bacteria isolated from heroin users, who were infected with *Bacillus anthracis* in 2009. The examination helped to determine the potential source of contamination in the heroin, which was likely the animal leather used to smuggle the drug to Europe (Price et al., 2012). The potential of microorganisms to be used as evidence in criminal and civil cases began to be recognised (Gunn, Pitt, 2012; Schmedes et al., 2016). Consequently, as the field continues to develop, the specific microorganisms of human cadavers may provide key information for forensic research, allowing for the determination of the PMI, crime scene location and cause of death, and the identification of the victim or perpetrator (Robinson et al., 2021; Schmedes et al., 2016).

## Changes taking place in corpses and their surroundings

The natural decay of corpses leads to numerous biochemical changes. Furthermore, the death-induced

collapse of the circulatory and immune systems causes microorganisms to rapidly multiply and colonise all spaces of the body, where they contribute to various biological and chemical processes, such as the active decomposition of organic compounds (Burcham et al., 2016; Johnson et al., 2016; Pechal et al., 2013; Sidorova et al., 2017; Tuccia et al., 2019). The particular smell created through these processes attracts necrophages, which are organisms that feed on dead or decomposing tissue (Cieśla et al., 2023). Therefore, the products of decomposition quickly enter the underground communities of flora and fauna, forming a cadaver decomposition island (CDI), or a site of intense microbial growth and activity. Such sites then become attractive habitats for insects and plants (Carter, Yellowlees, Tibbett, 2007).

### Post-mortem reorganisation of microorganisms over time

Burcham et al. (2016) conducted a study on mice, in which they demonstrated the resettlement of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens* bacteria into previously sterile body cavities, which may potentially help in estimating the PMI. Research indicates that the population of *Staphylococcus aureus* reaches its peak between 5 and 7 days after the termination of vital functions. In a study described by Harrison et al. (2020) the ten most abundant taxa appearing primarily in the first three hours after death were characterised; namely, *Viridibacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Acinetobacter* and *Tepidibacter*. Four days after death, they were *Sporosarcina*, *Peptoniphilus*, *Clostridium* and *Ignatzschineria*. In the study it was found that after several days, the integument of the body was predominantly inhabited by the soil-related bacteria *Sporosarcina*, whereas anaerobic organisms that are primarily characteristic of the digestive system, such as *Peptoniphilus* and *Clostridium*, were especially abundant in the eye sockets. It is also worth mentioning the gram-negative bacteria from the genus *Ignatzschineria spp.*, which are related to the microflora of cadaver-colonising insects and appear as part of the 'model of succession' of the necrobiota. They displace the microorganisms present in the body before death. This process allows the PMI to be estimated based on a 'microbiological clock' (Metcalf et al., 2013). Cobaugh et al. made the important observation that the soil directly around a corpse sustains the necrobiota for a long time. Such discoveries can allow investigators to use microorganisms as biological markers due to their wide potential application; for

example, in cases where the body was moved away from the crime scene (Cobaugh, Schaeffer, DeBruyn, 2015; Johnson et al., 2016). The examples provided above show that the microbiological assessment of changes in the composition and distribution of microorganisms, both in the victim's body and around it, provide relevant information about the PMI and location of the body.

### Microbiological identification of the perpetrator and victim

The primary aim of forensic techniques is to identify the deceased person and the suspect. One of the most difficult problems related to identifying persons based on their microbiota are the dynamic changes in its composition (Robinson et al., 2021). However, the first methods have already been proposed that could allow for the identification of persons based specifically on an analysis of the microorganisms in their bodies. One of these methods is hidSkinPlex, which involves the genetic profiling of the skin microbiome. Even though a large part of the skin bacteria is identical in most individuals, the structure of these microbial communities may differ significantly in terms of the abundance of particular taxa and the presence of distinctive bacterial strands that together form a qualitatively unique microbial pattern. Furthermore, the profile of skin microorganisms remains constant for three years, which may help identify the perpetrator long after the crime was committed (Oh, Byrd, Park, Kong, Segre, 2016). The hidSkinPlex method uses 286 markers to identify selected microorganisms. In order to verify its effectiveness, a study was conducted involving the skin microflora present on three regions of the body: the hands, the feet and the manubrium. The obtained results allowed for the identification of the owner of the microbiota, with an accuracy of up to 94% (Schmedes et al., 2018).

Crime scenes very frequently contain various bodily fluids, such as saliva, semen, blood or vaginal discharge. Because each bodily fluid is characterised by a specific microbial composition, this composition can be used to identify the fluid (Schmedes et al., 2016). Jung et al. (2018) aimed to develop a modern microorganism-based test to identify a biological material; specifically, saliva. They developed a kit based on multiplex real-time PCR for the detection of oral bacteria (oral bacteria multiplex real time PCR, OB mRT-PCR), to enable the forensic identification of secretions found at crime scenes as saliva using three species of oral bacteria: *Streptococcus salivarius*,



*Streptococcus sanguinis* and *Neisseria subflava*. These three species were selected based on studies confirming that *S. salivarius* is an important member of the oral cavity microbiota, while *S. sanguinis* is the most numerous species present in the biofilms of the oral cavity, and *N. subflava* constitutes part of the normal flora of the human oral cavity and respiratory tract (Burton, Wescombe, Moore, Chilcott, Tagg, 2006; Kaplan Fine, 2002; Okahashi et al., 2011). Although there are many factors that distinguish the oral cavity microbiota between individuals, a concurrent analysis of the three bacterial species proposed by Jung's team using the OB mRT-PCR kit can accurately identify a substance as saliva. Jung used the multiplex RT-PCR to amplify several matrices in a single PCR which, when combined with the concurrent use of various starter kits, provides significant time savings and reduces the costs of such analyses, while maintaining the quality of the obtained results. In the case of the aforementioned OB mRT-PCR test, at least two of the three bacterial species must be present in the analysed sample to identify it as saliva.

If a sufficient amount of bodily fluids and DNA cannot be found at a crime scene, investigators may choose to analyse the microorganisms left on the objects in that crime scene. This technique is used to determine a potential similarity in the structure of microorganisms between the analysed sample and a suspect's skin microbiota. With respect to the samples collected from objects stored at room temperature, the method is effective even up to two weeks after the event (Dell'Annunziata et al., 2022).

### **Microbiological determination of the location of a crime**

The composition of microorganisms detected in soil samples can be used to determine the location of a crime (Robinson et al., 2021). Sanachai, Katekeaw, Lomthaisong (2016) were able to identify the source of soil, based on material collected from the sole of a shoe, using 16S rDNA PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis). The PCR based on the amplification of 16S ribosomal DNA (rDNA) sequences in bacteria is a popular, quick and sensitive method that can detect the full spectrum of bacteria in samples (Sontakke, Cadenas, Maggi, Diniz, Breitschwerdt, 2009). Combined with denaturing agent gradient electrophoresis (DGGE), which separates DNA fragments according to their melting point (i.e. according to the number of GC bases in the strand), the 16S rDNA PCR DGGE technique

can be used to quickly and efficiently identify soil samples collected from a crime scene by analysing the profiles of the bacteria that they contain (Lerner, Shor, Vinokurov, Okon, Jurkevitch, 2006).

Another technique aimed at determining the location of a crime scene is massive parallel sequencing (MPS), which is performed using next-generation sequencing (NGS). The aim of MPS is to determine the entire genomic sequence of a person or organism, by means of the concurrent sequencing of multiple DNA strands in order to yield thousands of overlapping nucleotide sections, which are then subjected to a bioinformatics-based analysis and combined into a single output sequence. This approach provides a much higher throughput than traditional sequencing methods and minimises the need to clone fragments for use in Sanger sequencing (Mostafa, Sabri, Aly, 2015). The modernisations implemented in MPS in recent years have allowed for a comprehensive analysis of the sets of microorganisms present in the soil. However, MPS is a fairly time-consuming and expensive technique, and for it to reach its full potential, researchers would need to develop maps showing the distribution of each set of microorganisms (Schmedes et al., 2016).

One of the crucial tasks in an investigation is to determine whether the body was moved away from the actual crime scene to somewhere else. This analysis is typically performed using forensic botany. However, research has shown that forensic microbiology may also be a viable approach (Schmedes et al., 2016). Unfortunately, the use soil of microbiota as evidence is still considerably limited, due to the fact that the assessment of the composition of microbial communities may yield different results depending on the season of the year in which a sample was collected or the distance between the collection points (Pasternak et al., 2013).

### **Diatoms and cause of death**

Investigators can also assess microorganisms in order to determine the cause death; for example, by looking for diatoms in corpses found in water. In a study published by a team of researchers (Sitthiwong, Ruangyuttikarn, Vongvivach, Peerapornpisal, 2014) on the identification of diatoms in the bodies of drowning victims, the presence of diatoms was observed in organs such as the lungs, kidneys, liver and brain, as well as in the blood and in the contents of the stomach and the duodenum. However, the researchers did not observe them in the bodies of individuals who died from diseases or car accidents, or whose corpses

were not in contact with water. The samples of diatoms collected from water are identical to those collected from the tissues of a dead body. This means that identifying the diatoms in a body found outside of water may help to determine whether the victim drowned in fresh or salt water (Schmedes et al., 2016; Sitthiwong et al., 2014). In turn, a study by Lucci, Campobasso, Cirnelli, Lorenzini (2008) conducted on the bodies of drowning victims demonstrated the presence of faecal streptococci and *E. coli* bacteria in blood samples taken from the central and peripheral circulatory system. These bacteria were not found in the blood samples collected from bodies that were put in water only after death (Lucci et al., 2008; Robinson et al., 2021).

### Insects in forensic investigations and their application

Entomological assessments performed to determine the time of death are the most viable in cases where the PMI exceeds 48–72 hours, while biochemical and physical methods are more accurate before that time (Frątczak-Łagiewska, 2016; Mona, Jawad, Noreen, Ali, Rakha, 2019; Wang et al., 2019). The age of the entomological trace, i.e. the development time of insects (from egg-laying to their collection from a corpse) is estimated based on an analysis of many specimens (the development method) or a set of insects (the succession method). The time of death is determined using insects at different developmental stages. Viable determinants include the developmental stage of the eggs and the age of the larvae, pupae and imago. These methods rely primarily on molecular assessments or the observations of the morphological features under a microscope (Frątczak-Łagiewska, 2016).

The insects used to determine the PMI usually have constant and predictable life cycles. However, some factors, such as the temperature and humidity around a corpse, may affect their maturation time. There are many other relevant factors, including the place where the corpse was found, season of the year, weather and access to food by preying insects (Mona et al., 2019). The substances previously ingested by the victim may also significantly affect the maturation time of scavenging insects. Such substances include cocaine, which accelerates the colonisation of cadavers by these insects, and arsenic, which delays and disrupts their development in the corpse. Furthermore, some substances initially stimulate the colonisation of a corpse by necrophages, then inhibit it. This allows these insects to be used to detect the presence of

various toxic substances. Some metals (e.g. cadmium, mercury, zinc, antimony, lead, iron or copper) accumulate in the tissues of scavenging insects and can be detected at all stages of the insects' development (Czepiel-Mil, Los, Marczevska, 2015).

In temperate climates – for example, in Poland – the first arthropods to colonise a corpse are flies (*Diptera*) from the blowfly family (*Calliphoridae*). Some of the common representatives of this family are the *Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria* (blue bottle fly), *Lucilia caesar* (common greenbottle) and *Lucilia sericata*. The age of the larvae of these flies can be used to estimate the PMI. An assessment of the age of the larvae of other insects, such as the *Sarcophagidae* (flesh flies) and *Piophilidae*, may also be informative, but its potential is not as high as assessing the age of the larvae of the aforementioned *Calliphoridae*. Another important group of scavenging arthropods are *Coleoptera* (beetles) from the families *Silphidae* (large carrion beetles), *Histeridae* (hister beetles) and others. Corpses can also be settled by *Staphylinidae* (rove beetles) which, although they are not scavengers themselves, prey on the larvae of scavenging insects, which makes them viable for estimating the PMI (Weithmann et al., 2021). Omnivorous and incidental species are also known to feed on corpses (Czepiel-Mil et al., 2015).

A study by Singh, Ashikin, Abdullah, Carbaugh, Heo (2020) assessed the effect of *Formicidae* (ants) – in particular, *Carebara diversa* – on PMI estimations. Ants hamper the development of scavenging flies, because they interfere with egg-laying and reduce the survivability of the fly larvae. The competition between *Formicidae* and *Diptera* may therefore lead to an incorrect estimation of the PMI. However, the ants themselves can be used to assess the PMI by determining the time at which a new colony begins to create reproductive castes (Singh et al., 2020). Table 1 presents the species of insects that may help to determine the PMI of corpses found in Polish forests.

The environment of a corpse does not usually limit the activity of scavenging insects. Some fly species are able to find a corpse and begin laying eggs on it within a few minutes (Mona et al., 2019). However, a tightly sealed corpse could potentially cause a false estimation of the PMI. A famous example of such an error is the expert opinion issued by Doctor William Bass in 1977, in which he overestimated the PMI by as many as 113 years. This error motivated the scientist to establish the Anthropological Forensic Anthropology Centre at the University of Tennessee, known as a body farm. The aim of the centre is to provide researchers with an opportunity to observe the progressing decomposition

of corpses exposed to various environmental factors over the course of many years (Bass, 2012). In 2017, scientists from Amsterdam's Academic Medical Centre obtained permission to open the first such centre in Europe (Enserink, 2017). However, the establishment of a body farm in Poland seems unlikely due to the legal, cultural, economic and bioethical restrictions (Skowronek, Chowanec, 2010).

Applying entomological methods is also important for determining the cause of death. For example, stab wounds that may have caused death attract insects as a place that supports egg laying. As a result, stab wounds will contain more eggs than other areas of the corpse (Wang et al., 2019).

### Insects as a source of human DNA: practical applications in criminology and forensic medicine

The necrophagous insects scavenging on human corpses can be used as a source of biological material to provide data for genetic assessments and identification. Because the frontal part of the intestine of the larvae stores the deceased individual's tissues (Skowronek, 2012), investigators usually collect the contents of the insect ingluvies which, due to the low activity of digestive enzymes, contain the best biological material

(Campobasso, Linville, Wells, Introna, 2005). A genetic analysis of the contents of the digestive tracts of fly larvae (*Diptera*) may yield human DNA and help to identify the victim, in cases when the body was moved away from the crime scene. Some of the methods used for this purpose are the short tandem repeat-polymerase chain reaction (STR-PCR) and a hypervariable region (HVR) analysis (Paneto et al., 2010; Zehner, Amendt, Krettek, 2004). The former method involves analysing microsatellite sequences, or short tandem repeats (STRs). The forensic assessment takes advantage of the interpersonal variation of the STRr resulting from the different number of repeating tandem patterns (Tuccia et al., 2019).

Equally important are hematophagous insects which, if present at a suspected crime scene, may provide viable evidence. Examples of such insects are common bedbugs, mosquitoes, lice and fleas. The human blood they extract from the corpse may provide investigators with potential biological material containing DNA (Skowronek, Tomsia, Drożdżiok, Kabiesz, 2014). Multiplex PCR performed after DNA isolation and a subsequent capillary electrophoresis can identify, with a high level of probability, the person (victim or criminal) on whom the hematophagous insect was feeding (Spitaleri, Romano, Luise, Ginestra, Saravo, 2006).

Table 1

*Insects determining the time of death for corpses exposed on the ground in Polish forests. Table based on the publication by Matuszewski and Szpila (2010)*

Flies useful for determining the time of death in Polish forests		Beetles useful for determining the time of death in Polish forests	
Family	Species	Family	Species
Calliphoridae	Calliphora vicina Calliphora vomitoria Chrysomya albiceps Cynomya mortuorum Lucilia caesar Phormia regina	Staphylinidae	Creophilus maxillosus Omalius rivulare Aleochara curtula Philonthus politus Philonthus succicola
Dryomyzidae	Dryomyza flaveola	Dermestidae	Dermestes murinus
Fanniidae	Fannia coracina Fannia manicata	Histeridae	Margarinotus brunneus Saprinus planiusculus Saprinus semistriatus
Muscidae	Hydrotaea aenescens Hydrotaea armipes Hydrotaea dentipes Hydrotaea ignava	Silphidae	Necrodes littoralis Nicrophorus vespilloides Oiceoptoma thoracicum Thanatophilus rugosus Thanatophilus sinuatus
Piophilidae	Stearibia nigriceps	Nitidulidae	Omosita depressa
		Cleridae	Necrabia violacea

## Forensic botany

Forensic botany is a field of forensic sciences that involves researching plant traces in terms of their applicability in criminal investigations, based on the anatomy and ecology of plants and their molecular biology. There are various subdisciplines of forensic botany that focus on a specific type of plant material. These include palynology (focusing on the pollen of seed plants and the spores of bryophytes, ferns and fungi), lichenology (lichens), bryology (bryophytes) and diatomology (diatoms) (Bajerlein, Wojterska, Grewling, Kokociński, 2015; Caccianiga et al., 2021).

One of the most popular tests in forensic botany is the analysis of pollen and the spores of plants and fungi, or palynomorphs. Pollen and spores are characterised by a very small size, high durability and a resilience to many external factors. They can also travel very rapidly over long distances, due to their ability to easily adhere to various surfaces (Bajerlein et al., 2015; Lisiecka, 2019). These features have made palynomorphs extremely popular as evidence in criminal investigations. The assessment of palynomorphs may help to locate the crime scene, to determine the route travelled by the participants in the crime and where the victim's body was moved to, and to connect a suspect with the crime scene (Alotaibi et al., 2020; Bajerlein et al., 2015; Lisiecka, 2019).

Not only the spores, but also whole plants from the bryophyte group are used as important pieces of evidence. Fragments of bryophytes easily attach to clothing and shoes, and their analysis and matching to the original plant can provide evidence for the presence of a person in a particular environment (Bajerlein et al., 2015; Virtanen, Korpelainen, Kostamo, 2007).

In addition to the use of basic tools, such as a microscope, advanced techniques are also employed to determine the morphological traits of seeds. A DNA analysis facilitates the identification of damaged seeds (e.g. damaged by digestive juices, such as those obtained from the victim's digestive tract) or those that are very difficult to identify (Lee, Huang, Hsu, Lee, 2019).

Forensic botany also plays a major role in searching for the place of internment of the body. Burying a body causes local changes in the structure of the vegetation cover, which can persist for a long period of time (Caccianiga, Bottacin, Cattaneo, 2012). A frequently observed disturbance at an internment site is a change in the species composition of the plant cover, associated with the disappearance of previously present species or the appearance of species unusual for the site. As a result, such species serve as grave indicators,

also called 'post-burial indicators'. In a study conducted in an open area covered with herbaceous plants in northern Italy, it was found that the number of ruderal species, i.e. species that are typical of areas heavily transformed by humans, increased at the internment site. Conversely, the number of species such as vernal sedge (*Carex caryophyllea* Latourr), wall germander (*Teucrium chamaedrys* Latourr) and prairie junegrass (*Koeleria pyramidata*) decreased. These changes were observed in both full and empty graves, suggesting that the primary disruptor of the plant community in these cases was the mechanical factor itself, i.e. the process of digging the grave (Bajerlein et al., 2015; Caccianiga et al., 2012).

The internment site fairly often develops noticeably taller and greener vegetation than its close surroundings, due an increased amount of mineral compounds in the soil originating from the decomposing body. Dense vegetation may also grow as a result of improved aeration and loosening of the soil structure caused by digging, which in turn promotes the development of root systems. On the other hand, digging may have a harmful effect on the vegetation by destroying its root systems. In such cases, the internment site is recognisable by less developed vegetation compared to its surroundings, or even a complete lack of vegetation. The primary factor affecting these changes is the depth of the grave (Watson, Forbes, 2008).

The contemporary progress in molecular biology has made it possible to assess plant material with a very good level of precision, even if it has been severely damaged and cannot be identified using basic methods. It is particularly helpful to use plastid DNA, as it is characterised by a high conservativeness. Another effective approach is to analyse the DNA markers (the 'bar code' of DNA), or the DNA sequences in a given standard region of the genome that allow for the identification of a species (Aquila et al., 2014; Bajerlein et al., 2015). Information gained from tests that detect DNA marker polymorphisms, such as restriction fragment length polymorphism (RFLP), single nucleotide polymorphism (SNP) or simple sequence repeats (SSR) polymorphism, can be used to identify the parent specimen that produced the assessed plant material (Bajerlein et al., 2015).

## Environmental factors affecting the decomposition rate of a corpse

Ambient temperature is a significant external factor that determines the decomposition rate of a corpse. It affects the intensity of the biochemical and biological



processes involved in decomposition. For every 10°C increase in temperature, the chemical processes taking place in the corpse accelerate by several times (Wescott, 2018). Another important factor is the microorganisms and arthropods involved in the degradation of the corpse's tissues. Similarly, an increase in temperature stimulates their activity, albeit exclusively within a specific range of the optimal temperature (Carter, Yellowlees, Tibbett, 2008). A suboptimal temperature (either higher or lower) disturbs the colonisation and development of arthropods in corpses, and can cause some microorganisms to die, in turn reducing the decomposition rate. A combined analysis of the rate of decay and the ambient temperature may also help to determine the PMI (Franceschetti, Amadasi, Bugelli, Bolsi, Tsokos, 2023).

Likewise, the analysis of soil at a frequent internment site provides valuable information about the effect of the environment on the buried body. Initially, both the soil pH (an increase from 4.5–6.0 to about 8.0 over 25 days) and the moisture content (an increase from 10–15% to about 25% over 25 days) increase in the vicinity of a buried body (Szelecz, Koenig, Seppey, Le Bayon, Mitchell, 2018), which affects the development of the soil microorganisms and entomofauna, i.e. the spectrum of insect species inhabiting a given area. An increase in pH hampers the development of soil microorganisms and entomofauna. Conversely, increased humidity supports the individual development of different species and their metamorphosis between the developmental stadia (Hauteo et al., 2013). Furthermore, the presence of a corpse increases the content of various components in the soil, such as the total nitrogen and phosphorus (Benninger, Carter, Forbes, 2008). The increased vegetation due to the presence of nitrogen compounds produced by the decomposition of a corpse can be detected using spectrometric methods with hyperspectral and/or multispectral sensors (Silván-Cárdenas et al., 2021).

Another factor affecting the decomposition rate of a corpse is liming (Robinson et al., 2021). Using quicklime or slaked lime on a corpse can delay its decomposition, as lime increases the pH of the soil, preventing the development of soil microorganisms and causing the corpse to dry out, which discourages insects from scavenging.

### **Forensic environmental markers available in the soil**

During decomposition, a corpse releases bodily fluids and the products of tissue degradation into the soil.

This makes it possible to isolate the potential markers of a decomposing corpse from soil samples (von der Lühe, Dawson, Mayes, Forbes, Fiedler, 2013). Among such environmental biomarkers are sterols, including cholesterol and coprostanol (von der Lühe et al., 2013), as well as nitric oxide and carbon dioxide, which show increased concentrations at the internment site (Dalva, Moore, Kalacska, Leblanc, Costopoulos, 2015). In turn, volatile organic compounds, including the sulphides, aldehydes and carboxylic acids produced by the decomposition of a corpse, play an important role in the detection of an internment site by tracking dogs (Alexander, Hodges, Bytheway, Aitkenhead-Peterson, 2015; Alexander, Hodges, Wescott, Aitkenhead-Peterson, 2016). Research has also demonstrated that these compounds are released with higher intensity in summer than in winter (Forbes, Perrault, Stefanuto, Nizio, Focant, 2014).

### **Conclusions**

Investigative methods based on knowledge of human anatomy and medical examinations may contribute significantly to forensic investigations and help resolve important issues, such as proving a suspect's guilt, identifying the crime scene or the place where the body was hidden, and determining the victim's PMI and cause of death. Therefore, it is important to promote modern forensic techniques, including those based on advances in biology and microbiology. The successful use of microorganisms, insects, plants and soil in forensic investigations to date justifies the development and further growth of the branches of criminology and veterinary forensics described in this paper.

### **References**

1. Alexander, M. B., Hodges, T. K., Bytheway, J., Aitkenhead-Peterson, J. A. (2015). Application of soil in forensic science: residual odor and HRD dogs. *Forensic Science International*, 249, 304–313. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2015.01.025>
2. Alexander, M. B., Hodges, T. K., Wescott, D. J., Aitkenhead-Peterson, J. A. (2016). The effects of soil texture on the ability of human remains detection dogs to detect buried human remains. *Journal of Forensic Sciences*, 61(3), 649–655. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13084>

3. Alotaibi, S. S., Sayed, S. M., Alosaimi, M., Alharthi, R., Banjar, A., Abdulqader, N., Alhamed, R. (2020). Pollen molecular biology: applications in the forensic palynology and future prospects: a review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(5), 1185–1190. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.02.019>
4. Aquila, I., Ausania, F., Di Nunzio, C., Serra, A., Boca, S., Capelli, A., Magni, P., Ricci, P. (2014). The role of forensic botany in crime scene investigation: case report and review of literature. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 820–824. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12401>
5. Bachliński, R. (2021). Badania gleb, wyrobów kamiennych i skał – wybrane przypadki opinii wykonywanych w Centralnym Laboratorium Kryminalistycznym Policji w Warszawie. *Problemy Kryminalistyki*, 311(1), 21–34.
6. Bajerlein, D., Wojterska, M., Grewling, Ł., Kokociński, M. (2015). Botanika sądowa – stan wiedzy i możliwości zastosowania w praktyce śledczej. *Problemy Kryminalistyki*, 289, 20–32.
7. Bass, B. (2012). *Trupia Farma. Sekrety legendarnego laboratorium sądowego, gdzie zmarli opowiadają swoje historie*. Kraków: Wydawnictwo Znak.
8. Benninger, L. A., Carter, D. O., Forbes, S. L. (2008). The biochemical alteration of soil beneath a decomposing carcass. *Forensic Science International*, 180(2–3), 70–75. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2008.07.001>
9. Bidwell, C. A., Murch, R. (2016). *Use of microbial forensics in the Middle East/North Africa Region*. Federation of American Scientists.
10. Burcham, Z. M., Hood, J. A., Pechal, J. L., Krausz, K. L., Bose, J. L., Schmidt, C. J., Benbow M. E., Jordan, H. R. (2016). Fluorescently labeled bacteria provide insight on post-mortem microbial transmigration. *Forensic Science International*, 264, 63–69. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2016.03.019>
11. Burton, J. P., Wescombe, P. A., Moore, C. J., Chilcott, C. N., Tagg, J. R. (2006). Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 3050–3053. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.3050-3053.2006>
12. Bush, L. M., Perez, M. T. (2012). The anthrax attacks 10 years later. *Annals of Internal Medicine*, 156(1 Pt 1), 41–44. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-155-12-201112200-00373>
13. Caccianiga, M., Bottacin, S., Cattaneo, C. (2012). Vegetation dynamics as a tool for detecting clandestine graves. *Journal of Forensic Sciences*, 57(4), 983–988. <https://doi.org/10.1111/J.1556-4029.2012.02071.X>
14. Caccianiga, M., Caccia, G., Mazzarelli, D., Salsarola, D., Poppa, P., Gaudio, D., Cappella, A., Franceschetti, L., Tambuzzi, S., Maggioni, L., Cattaneo, C. (2021). Common and much less common scenarios in which botany is crucial for forensic pathologist and anthropologists: a series of eight case studies. *International Journal of Legal Medicine*, 135(3), 1067–1077. <https://doi.org/10.1007/S00414-020-02456-0>
15. Campobasso, C. P., Linville, J. G., Wells, J. D., Introina, F. (2005). Forensic genetic analysis of insect gut contents. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 26(2), 161–165. <https://doi.org/10.1097/01.PAF.0000163832.05939.59>
16. Carter, D. O., Yellowlees, D., Tibbett, M. (2007). Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Die Naturwissenschaften*, 94(1), 12–24. <https://doi.org/10.1007/S00114-006-0159-1>
17. Carter, D. O., Yellowlees, D., Tibbett, M. (2008). Temperature affects microbial decomposition of cadavers (*Rattus rattus*) in contrasting soils. *Applied Soil Ecology*, 40(1), 129–137. <https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2008.03.010>
18. Cieśla, J., Skrobisz, J., Niciński, B., Kloc, M., Mazur, K., Pałasz, A., Javan, G. T., Tomsia, M. (2023). The smell of death. State-of-the-art and future research directions. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1260869>
19. 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). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0130201>
20. Czepiel-Mil, K., Los, A., Marczevska, P. (2015). Entomotoksykologia jako narzędzie w rozwiązywaniu zagadek kryminalnych. *Medycyna Weterynaryjna*, 71(8), 522–527.
21. D’Argenio, V., Salvatore, F. (2015). The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 451(Pt A), 97–102. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2015.01.003>
22. Dalva, M., Moore, T. R., Kalacska, M., Leblanc, G., Costopoulos, A. (2015). Nitrous oxide, methane and carbon dioxide dynamics from experimental pig graves. *Forensic Science International*, 247, 41–47. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2014.12.002>
23. Dell’Annunziata, F., Martora, F., Pepa, M. E. Della, Folliero, V., Luongo, L., Bocelli, S., Guida, F., Mascolo, P., Campobasso, C. P., Maione, S., Franci, G., Galdiero, M. (2022). Postmortem interval assessment by MALDI-TOF mass spectrometry analysis in murine cadavers. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 707–714. <https://doi.org/10.1111/JAM.15210>
24. Enserink, M. (2017). Amsterdam to host Europe’s first “forensic cemetery.” *Science*. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAL0637>













25. Forbes, S. L., Perrault, K. A., Stefanuto, P. H., Nizio, K. D., Focant, J. F. (2014). Comparison of the decomposition VOC profile during winter and summer in a moist, mid-latitude (Cfb) climate. *PloS One*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0113681>
26. Franceschetti, L., Amadasi, A., Bugelli, V., Bolsi, G., Tsokos, M. (2023). Estimation of late postmortem interval: where do we stand? A literature review. *Biology*, 12(6), 783. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY12060783>
27. Franceschetti, L., Pradelli, J., Tuccia, F., Giordani, G., Cattaneo, C., Vanin, S. (2021). Comparison of accumulated degree-days and entomological approaches in post mortem interval estimation. *Insects*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/INSECTS12030264>
28. Frątczak-Łagiewska, K. (2016). Metody oceny wieku śladów entomologicznych. *Problemy Kryminalistyki*, 293(3), 22–27.
29. Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778), 1355. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1124234>
30. Global study on homicide. (2019). Division for policy analysis and public affairs. United nations office on drugs and crime. Vienna. Austria.
31. Gunn, A., Pitt, S. J. (2012). Microbes as forensic indicators. *Tropical Biomedicine*, 29(3), 311–330.
32. Harrison, L., Kooienga, E., Speights, C., Tomberlin, J., Lashley, M., Barton, B., Jordan, H. (2020). Microbial succession from a subsequent secondary death event following mass mortality. *BMC Microbiology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-020-01969-3>
33. Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/NATURE11234>
34. 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). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0167370>
35. Jung, J. Y., Yoon, H. K., An, S., Lee, J. W., Ahn, E. R., Kim, Y. J., Park, H. C., Lee K., Hwang J. H., Lim, S. K. (2018). Rapid oral bacteria detection based on real-time PCR for the forensic identification of saliva. *Scientific Reports*, 8(1), 10852. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-29264-2>
36. Kaplan, J. B., Fine, D. H. (2002). Biofilm dispersal of *Neisseria subflava* and other phylogenetically diverse oral bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4943. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4943-4950.2002>
37. Lee, C. L., Huang, Y. H., Hsu, I. C., Lee, H. C. (2019). Evaluation of plant seed DNA and botanical evidence for potential forensic applications. *Forensic Sciences Research*, 5(1), 55–63. <https://doi.org/10.1080/20961790.2019.1594599>
38. Lerner, A., Shor, Y., Vinokurov, A., Okon, Y., Jurkevitch, E. (2006). Can denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of amplified 16s rDNA of soil bacterial populations be used in forensic investigations? *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6), 1188–1192.
39. Lisiecka, M. (2019). Pyłki i zarodniki – niedoceniane narzędzia kryminalistyczne? Możliwości palinologii kryminalistycznej. *Zeszyty Prawnicze*, 19(4), 125–151. <https://doi.org/10.21697/ZP.2019.19.4.06>
40. Lucci, A., Campobasso, C. P., Cirnelli, A., Lorenzini, G. (2008). A promising microbiological test for the diagnosis of drowning. *Forensic Science International*, 182(1–3), 20–26. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCI-INT.2008.09.004>
41. Maslow, A. H. (1943). A theory of human motivation. *Psychological Review*, 50, 370–396.
42. Matuszewski, S., Szpila, K. (2010). Katalog owadów przydatnych do ustalenia czasu śmierci w lasach Polski. *Problemy Kryminalistyki*, 268, 5–17, 26–38.
43. Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., 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*, 2013(2). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.01104.001>
44. Mona, S., Jawad, M., Noreen, S., Ali, S., Rakha, A. (2019). Forensic entomology: a comprehensive review. *Advancements in Life Sciences*, 6(2), 48–59.
45. Mostafa, M., Sabri, D. M., Aly, S. M. (2015). Overviews of “next-generation sequencing”. *Forensic Medical Science*, 5–6. <https://doi.org/10.2147/RRFMS.S57998>
46. Oh, J., Byrd, A. L., Park, M., Kong, H. H., Segre, J. A. (2016). Temporal stability of the human skin microbiome. *Cell*, 165(4), 854–866. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.04.008>
47. Okahashi, N., Nakata, M., Terao, Y., Isoda, R., Sakurai, A., Sumitomo, T., Yamaguchi, M., Kimura, R. K., Oiki, E., Kawabata, S., Ooshima, T. (2011). Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, 50(3–4), 148–154. <https://doi.org/10.1016/J.MIC-PATH.2011.01.005>
48. Oliveira, M., Amorim, A. (2018). Microbial forensics: new breakthroughs and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(24), 10377–10391. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-9414-6>
49. Panasiuk, A., Kowalińska, J. (2019). *Mikrobiota przewodu pokarmowego*. Warszawa: PZWL Wydawnictwo Lekarskie.

50. Paneto, G. G., Longo, L. V. G., Martins, J. A., De Camargo, M. A., Costa, J. C., De Mello, A. C. O., Chen, B., Oliviera, R. N., Hirata, M. H., Cicarelli, R. M. B. (2010). Heteroplasmy in hair: study of mitochondrial DNA third hypervariable region in hair and blood samples. *Journal of Forensic Sciences*, 55(3), 715–718. <https://doi.org/10.1111/J.1556-4029.2010.01339.X>
51. Pasternak, Z., Al-Ashhab, A., Gatica, J., Gafny, R., Avraham, S., Minz, D., Gillor, O., Jurkevitch, E. (2013). Spatial and temporal biogeography of soil microbial communities in Arid and Semiarid regions. *PLoS ONE*, 8(7), 69705. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0069705>
52. 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>
53. 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). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0079035>
54. Price, E. P., Seymour, M. L., Sarovich, D. S., Latham, J., Wolken, S. R., Mason, J., Vincent, G., Drees, K. P., Beckstrom-Sternberg, S. M., Phillippy, A. M., Koren, S., Okinaka, R., T., Chung, W. K., Schupp, J. M., Wagner, D. M., Vipond, R., Foster, J. T., Bergman, N. H., Burans, J., Pearson, T., Brooks, T., Keim, A. P. (2012). Molecular epidemiologic investigation of an anthrax outbreak among heroin users, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 18(8), 1307–1313. <https://doi.org/10.3201/EID1808.111343>
55. Quality of life indicators – economic security and physical safety – Statistics Explained. (2023). [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Quality\\_of\\_life\\_indicators\\_-\\_economic\\_security\\_and\\_physical\\_safety](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Quality_of_life_indicators_-_economic_security_and_physical_safety)
56. Robinson, J. M., Pasternak, Z., Mason, C. E., Elhaik, E. (2021). Forensic applications of microbiomics: a review. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.608101>
57. Sanachai, A., Katekeaw, S., Lomthaisong, K. (2016). Forensic soil investigation from the 16S rDNA profiles of soil bacteria obtained by denaturing gradient gel electrophoresis. *Chiang Mai Journal of Science*, 54(8), 1964–1974.
58. Schmedes, S. E., Sajantila, A., Budowle, B. (2016). Expansion of microbial forensics. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), 1964–1974. <https://doi.org/10.1128/JCM.00046-16>
59. Schmedes, S. E., Woerner, A. E., Novroski, N. M. M., Wendt, F. R., King, J. L., Stephens, K. M., Budowle, B. (2018). Targeted sequencing of clade-specific markers from skin microbiomes for forensic human identification. *Forensic Science International. Genetics*, 32, 50–61. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGEN.2017.10.004>
60. Sidorova, N. A., Popov, V. L., Lavrukova, O. S., Prikhod'Ko, A. N., Lyabzina, S. N., Tikhomirova, E. I. (2017). [The specific features of corpse putrefaction under the influence of necrobiome enzymatic systems]. *Sudebno-Meditsinskaia Ekspertiza*, 60(5), 18–22. <https://doi.org/10.17116/SUDMED201760518-22>
61. Silván-Cárdenas, J. L., Caccavari-Garza, A., Quinto-Sánchez, M. E., Madrigal-Gómez, J. M., Coronado-Juárez, E., Quiroz-Suarez, D. (2021). Assessing optical remote sensing for grave detection. *Forensic Science International*, 329. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2021.111064>
62. Singh, S., Ashikin, N., Abdullah, B., Carbaugh, J., Heo, C. C. (2020). Ants associated with a rat carcass: its implications in forensic entomology with special emphasis on *Carebara diversa* (Hymenoptera: Formicidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 40(3). <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00110-1>
63. Sitthiwong, N., Ruangyuttikarn, W., Vongvivach, S., Peerapornpisal, Y. (2014). Detection and identification of diatoms in tissue samples of drowning victims. *Chiang Mai Journal of Science*, 41(5.1), 1020–1031.
64. Skowronek, R., Tomsia, M., Drożdżiak, K., Kabiesz, J. (2014). Insects feeding on cadavers as an alternative source of human genetic material. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*, 64(4), 254–267. <https://doi.org/10.5114/AMSIK.2014.50530>
65. Skowronek, R. (2012). Wykorzystanie entomologii w kryminalistyce i medycynie sądowej. *Problemy Środowiska i Jego Ochrony*, 20, 115–137.
66. Skowronek, R., Chowaniec, C. (2010). Polska entomologia sądowa – rys historyczny, stan obecny i perspektywy na przyszłość. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*, 60, 55–58.
67. Sontakke, S., Cadenas, M. B., Maggi, R. G., Diniz, P. P. V. P., Breitschwerdt, E. B. (2009). Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 76(3), 217–225. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2008.11.002>
68. Spitaleri, S., Romano, C., Luise, E. Di, Ginestra, E., Saravo, L. (2006). Genotyping of human DNA recovered from mosquitoes found on a crime scene. *International Congress Series*, 1288(6), 574–576. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2005.11.055>
69. Szelecz, I., Koenig, I., Seppey, C. V. W., Le Bayon, R. C., Mitchell, E. A. D. (2018). Soil chemistry changes beneath decomposing cadavers over a one-year period. *Forensic Science International*, 286, 155–165. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2018.02.031>



70. Teo, C. H., Pawita, A. H., Khairul, O., Atiah Ayunni, A. G., Noor Hazfalinda, H. (2013). Post mortem changes in relation to different types of clothing. *The Malaysian Journal of Pathology*, 35(1), 77–85.
71. Tuccia, F., Zurgani, E., Bortolini, S., Vanin, S. (2019). Experimental evaluation on the applicability of necrobiome analysis in forensic veterinary science. *MicrobiologyOpen*, 8(9). <https://doi.org/10.1002/MBO3.828>
72. Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70(Suppl 1), S38. <https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.2012.00493.X>
73. Virtanen, V., Korpelainen, H., Kostamo, K. (2007). Forensic botany: usability of bryophyte material in forensic studies. *Forensic Science International*, 172(2–3), 161–163. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2006.11.012>
74. von der Lühne, B., Dawson, L. A., Mayes, R. W., Forbes, S. L., Fiedler, S. (2013). Investigation of sterols as potential biomarkers for the detection of pig (*S. s. domesticus*) decomposition fluid in soils. *Forensic Science International*, 230(1–3), 68–73. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2013.03.030>
75. Wang, M., Chu, J., Wang, Y., Li, F., Liao, M., Shi, H., Zhang, Y., Hu, G., Wang, J. (2019). Forensic entomology application in China: four case reports. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 63, 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.JFLM.2019.03.001>
76. Watson, C. J., Forbes, S. L. (2008). Investigation of the vegetation associated with grave sites in southern Ontario. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 41(4), 199–207.
77. Weithmann, S., von Hoermann, C., Degasperi, G., Brandt, K., Steiger, S., Ayasse, M. (2021). Temporal variability of the rove beetle (Coleoptera: Staphylinidae) community on small vertebrate carrion and its potential use for forensic entomology. *Forensic Science International*, 323. <https://doi.org/10.1016/J.FORSCIINT.2021.110792>
78. Wells, J. D., Stevens, J. R. (2008). Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annual Review of Entomology*, 53, 103–120. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ENTO.52.110405.091423>
79. Wescott, D. J. (2018). Recent advances in forensic anthropology: decomposition research. *Forensic Sciences Research*, 3(4), 327. <https://doi.org/10.1080/20961790.2018.1488571>
80. Wójcik, J., Tomsia, M., Drzewiecki, A., Skowronek, R. (2021). Thanatobiome – state of the art and future directions. *Advancements of Microbiology*, 60(1), 21–29. <https://doi.org/10.21307/PM-2021.60.1.03>
81. Zabójstwo – Statystyka – Portal polskiej Policji (2021). <https://statystyka.policja.pl/st/przestepstwa-ogolem/przestepstwa-kryminalne/zabojstwo/64003,Zabojstwo.html>
82. Zehner, R., Amendt, J., Krettek, R. (2004). STR typing of human DNA from fly larvae fed on decomposing bodies. *Journal of Forensic Sciences*, 49(2), 1–4. <https://doi.org/10.1520/JFS2003248>

#### ORCID

Irena B. Padzińska-Pruszyńska  0000-0003-0784-8066  
Jacek J. Pruszyński  0000-0003-2123-6488  
Magdalena Król  0000-0003-0421-5167  
Małgorzata Górczak  0000-0001-5383-6096  
Małgorzata Kubiak  0000-0001-5002-8245  
Paulina Kucharzewska  0000-0002-4698-2551  
Jacek Szeliga  0000-0002-5924-1488  
Bartłomiej Taciak  0000-0003-2623-4860  
Anna Smolarska  0000-0001-6995-6316  
Lidia Florczak  0009-0002-2121-5169  
Paulina Siedlecka  0009-0009-6914-5973  
Maria Lewkowicz  0009-0007-1702-3371  
Karolina Dylewska  0009-0006-9971-5744  
Natalia Pawłasek  0009-0005-7684-6218  
Andrzej Kieliszak  0009-0001-7084-1679

#### Corresponding author

Prof. Magdalena Król  
Centrum Immunoterapii Komórkowych SGGW  
ul. Ciszewskiego 8, budynek 23  
PL 02-786 Warszawa  
e-mail: magdalena\_krol@sggw.edu.pl

## WYKORZYSTANIE MIKROORGANIZMÓW, OWADÓW, ROŚLIN ORAZ GLEBY W BADANIACH KRYMINALISTYCZNYCH

*Bezpieczeństwo nie jest wszystkim,  
ale bez bezpieczeństwa wszystko jest niczym.*

Klaus Nauman

### Wstęp

Poczucie bezpieczeństwa jest jedną z podstawowych potrzeb człowieka i odgrywa w jego życiu ogromną rolę, ponieważ jest stanem dającym poczucie pewności istnienia. Abraham Maslow w stworzonej przez siebie piramidzie potrzeb umieścił je zaraz za wymogami biologicznymi niezbędnymi do podtrzymania egzystencji (Maslow, 1943). Bez poczucia bezpieczeństwa związanego z brakiem zagrożeń dochodzi nie tylko do pogorszenia stanu zdrowia psychicznego i fizycznego jednostek, ale także do zachowań mających negatywne konsekwencje dla całego społeczeństwa.

Obserwowana w części współczesnego świata eskalacja przemocy, wiążąca się ze zwiększeniem częstotliwości najgroźniejszych przestępstw przeciwko życiu, spowodowała wzrost poczucia zagrożenia w społeczeństwie (Global study on homicide, 2019; Quality of life indicators – economic security and physical safety – Statistics Explained, 2023; Zabójstwo – Statystyka – Portal polskiej Policji, 2021). Aby przywrócić poczucie bezpieczeństwa, konieczne jest wytworzenie przeświadczenia zarówno wśród ogółu społeczeństwa, jak i samych przestępców, że sprawcy przestępstw, zwłaszcza tych najcięższych, zostaną wykryci i ukarani stosownie do popełnionych czynów. Niebagatelne znaczenie w tych dążeniach mają oparte na wiarygodnych zasadach nauki kryminalistyczne, które stanowią coraz istotniejszy element współcześnie prowadzonego śledztwa.

Jedno z kluczowych zagadnień, jakie stawiają przed sobą śledczy oraz funkcjonariusze wydziału kryminalnego, dotyczy określenia momentu oraz miejsca zgonu. W trakcie oględzin medycznych ciała, głównym celem jest potwierdzenie faktu zgonu oraz wstępne zdefiniowanie charakterystyki, czasu, przyczyny i mechanizmu śmierci. Natomiast dodatkowe badania mają potencjalnie w znaczącym stopniu wspomóc dalsze postępowanie. Jednym z kluczowych wyzwań jest oszacowanie tzw. interwału pośmiertnego (*post-mortem interval*, PMI) – czasu, jaki upłynął od momentu śmierci do odnalezienia zwłok. W tym celu angażuje się wiedzę specjalistów z wielu dziedzin, w tym entomologów, antropologów, botaników, geologów czy mikrobiologów (Franceschetti i in., 2021). Znalezienie pierwotnego miejsca zgonu staje się szczególnie ważne, kiedy zwłoki zostały przemieszczone w celu ich ukrycia czy zniszczenia. Kluczowych

wskazówek mogą dostarczyć obserwacje specyficznych mikroorganizmów w i na ciele, obecność larw owadów, analiza składu gleby pod paznokciami czy na ubraniu ofiary, a także badania nad rodzajem pyłków roślinnych osiadających na zwłokach. Analiza genetyczna materiału pozyskanego od owadów zebranych z potencjalnego miejsca zgonu może dostarczyć informacji na temat ofiary, szczególnie gdy ciało nie zostało odnalezione. Badania z dziedziny botaniki sądowej umożliwiają analizę dowodów pochodzenia roślinnego, które mogą pośrednio pomóc w skojarzeniu sprawcy z miejscem przestępstwa, identyfikacji narzędzia zbrodni czy określeniu trasy, którą podążała ofiara bądź podejrzani (Robinson, Pasternak, Mason, Elhaik, 2021).

W Stanach Zjednoczonych funkcjonuje organizacja „Innocence Project”, która w ramach działalności non-profit dąży do niewinnienia niesłusznie skazanych osób. Dane z 2020 roku wskazują, że uniewinniono tam 375 osób, z czego 21 uniknęło kary śmierci, głównie dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej (Robinson i in., 2021).

Również geologia sądowa odgrywa kluczową rolę w kryminalistyce, pomagając w połączeniu podejrzanych z konkretnym przestępstwem poprzez analizę gleby i osadów zgodnie z zasadą transferu (Bachliński, 2021). Obserwowany wzrost zainteresowania badaniami kryminalistycznymi oraz związane z nimi studia i szkolenia świadczą o rosnącym uznaniu dla specjalistów w tej dziedzinie (Wells, Stevens, 2008).

Głównym celem niniejszego artykułu jest przedstawienie metod oceny czasu i przyczyny śmierci, miejsca zgonu oraz identyfikacji zarówno ofiary, jak i podejrzanego, w oparciu o techniki mikrobiologiczne, entomologiczne, botaniczne i geologiczne (Ryc. 1).

### Mikrobiota, mikrobiom, tanatomikrobiota i nekrobiota

Drobnoustroje są w stanie kolonizować większość miejsc na ziemi (Oliveira, Amorim, 2018) i wraz z otoczeniem abiotycznym kształtują ekosystemy. Co więcej, badania dowodzą, że każdy człowiek czy zwierzę posiada własną, unikalną mikrobiotę. Terminem „mikrobiota” określa się wszystkie drobnoustroje (bakterie, grzyby, eukariota, archeony i wirusy) zasiedlające dany organizm,

z czego większość z nich bytuje w jelicie grubym. Ludzka mikrobiota składa się z  $10\text{--}100 \times 10^{12}$  komórek symbiotycznych (Ursell, Metcalf, Parfrey, Knight, 2012). Mikrobiota tworzy indywidualny „zestaw” mikroorganizmów żyjących zarówno na powierzchni, jak i w głębi ciała (D'Argenio, Salvatore, 2015; Panasiuk, Kowalińska, 2019). Human Microbiome Project Consortium podaje, że każdy przedstawiciel gatunku ludzkiego posiada indywidualną zbiorowość mikroorganizmów, która może posłużyć do zidentyfikowania osobnika podobnie jak odcisk palca (Huttenhower i in., 2012). Oznacza to, że na przykład zestaw mikroorganizmów znaleziony w ranie powstałej w wyniku ugryzienia może posłużyć do identyfikacji sprawcy (Tuccia, Zurgani, Bortolini, Vanin, 2019).

Skład mikrobioty w organizmach żywych zależy od wielu czynników, takich jak: etap życia danego osobnika, jego płeć, nawyki żywieniowe oraz wpływ różnorodnych substancji, w tym środków konserwujących. Warto podkreślić, iż może on ulec zmianie w wyniku przebytych chorób i przyjmowanych leków (Wójcik, Tomsia, Drzewiecki, Skowronek, 2021). Przykładem powiązań pomiędzy chorobami a składem indywidualnej mikrobioty jest większa ilość bakterii rodzaju *Rothia* w przypadku osób cierpiących z powodu chorób serca, natomiast w ciałach osób niewykazujących oznak chorobowych odnotowano dwukrotnie większą ilość bakterii z rodzajów *Haemophilus* i *Fusobacterium* (Robinson i in., 2021). Termin „mikrobiom” oznacza natomiast geny należące do mikrobioty (Gill i in., 2006).

Nekrobiota to społeczność różnorodnych organizmów związanych z rozkładającymi się zwłokami. W szerszym tego słowa znaczeniu nekrobiota jest tworzona przez mikroorganizmy, które żyją w oraz na powierzchni zwłok, pod nimi czy wokół nich, a także takie, które są rozprowadzone przez owady (Harrison i in., 2020; Pechal i in., 2014, 2013; Tuccia i in., 2019).

W kryminalistyce pojawiły się w ostatnim czasie również nowsze określenia, takie jak „pośmiertna społeczność mikroorganizmów wewnątrz ciała”, czyli tanatomikrobiota, oraz społeczności epinekrotyczne rozumiane jako ogół mikroorganizmów bytujących na powierzchni zwłok (Dell'Annunziata i in., 2022).

### Narodziny mikrobiologii kryminalistycznej oraz współczesne możliwości jej zastosowania

W ostatnim dziesięcioleciu XX wieku wraz z nasileniem się aktów bioterroryzmu nastąpiła potrzeba powstania nowej dyscypliny naukowej – mikrobiologii kryminalistycznej (*forensic microbiology*) (Bidwell, Murch, 2016). Atak z wykorzystaniem bakterii *Bacillus anthracis*, mający miejsce w Stanach Zjednoczonych w 2001 roku, stanowi kamień milowy omawianej dziedziny

(Schmedes, Sajantila, Budowle, 2016). W październiku 2001 roku w Stanach Zjednoczonych doszło do serii ataków terrorystycznych, podczas których drogą pocztową wysyłano listy z proszkiem zawierającym zarodniki bakterii *Bacillus anthracis*, znanej również jako laseczka wąglika (po angielsku i łacinie: *Anthrax*; w wersji polskiej „antraks”). Ataki te doprowadziły do zakażenia i śmierci pięciu osób oraz narażenia wielu innych na ekspozycję na antraks oraz wywołały ogromne obawy w społeczeństwie i podkreśliły zagrożenie bioterroryzmem (Bush, Perez, 2012).

Mikrobiologia kryminalistyczna stała się istotnym narzędziem w dochodzeniu w tej sprawie. Naukowcy oraz eksperci z dziedziny mikrobiologii i kryminalistyki przyczynili się do analizy próbek antraksu, identyfikacji źródła zarodników bakterii, analizy genetycznej szczepów oraz ustalania ścieżek transmisji. Badania te odegrały kluczową rolę w identyfikacji sprawców i zrozumieniu sposobu, w jaki został przygotowany i rozpowszechniony materiał biologiczny. Kolejnym dowodem przydatności tego narzędzia było sekwencjonowanie genomów bakterii wyizolowanych od heroinistów zarażonych laseczką wąglika w 2009 roku. Badanie to pozwoliło na ustalenie potencjalnego źródła zanieczyszczenia narkotyku, którym prawdopodobnie były skóry zwierzęce używane do przemykania heroiny do Europy (Price i in., 2012). Stopniowo zaczęto dostrzegać potencjał w wykorzystaniu mikroorganizmów jako dowodów w sprawach karnych oraz cywilnych (Gunn, Pitt, 2012; Schmedes i in., 2016). Oznacza to, że w miarę rozwoju tej dziedziny specyficzne mikroorganizmy ludzkich zwłok mogą dostarczać kluczowych informacji w badaniach z zakresu medycyny sądowej, pozwalając między innymi na ustalenie PMI, lokalizacji miejsca przestępstwa, przyczyny zgonu, a także na identyfikację ofiary lub sprawcy (Robinson i in., 2021; Schmedes i in., 2016).

### Zmiany zachodzące w zwłokach i ich otoczeniu

W następstwie naturalnego rozkładu zwłok dochodzi do licznych przemian biochemicznych. Co więcej, w wyniku spowodowanej zgonem zapaści układu krwionośnego i odpornościowego mikroorganizmy gwałtownie rozmnażają się i kolonizują wszystkie przestrzenie ciała, przyczyniając się do różnych procesów biologiczno-chemicznych, takich jak np. aktywny rozkład związków organicznych (Burcham i in., 2016; Johnson i in., 2016; Pechal i in., 2013; Sidorova i in., 2017; Tuccia i in., 2019). Wytwarzająca się w wyniku tych procesów specyficzna woń wabi nekrofagi, czyli organizmy odżywiające się martwymi albo rozkładającymi się tkankami (Cieśla i in., 2023). Produkty rozkładu zwłok szybko przedostają się do podziemnych zbiorowisk flory i fauny, co skutkuje powstaniem wyspy rozkładu zwłok – CDI (*cadaver*

*decomposition island*), która jest miejscem intensyfikacji wzrostu i aktywności mikrobiologicznej. Miejsca te wtórnie stają się atrakcyjnym habitatem dla owadów i roślinności (Carter, Yellowlees, Tibbett, 2007).

### Pośmiertna reorganizacja mikroorganizmów w czasie

Burcham i współpracownicy (2016) udowodnili w swoich badaniach na myszach przesiedlanie się bakterii *Staphylococcus aureus* i *Clostridium perfringens* do niegdyś sterylnych jam ciała, co potencjalnie może pomóc w oszacowaniu czasu zgonu. Wyniki badań wskazują, że największa liczebność bakterii z gatunku *Staphylococcus aureus* wykrywana jest pomiędzy 5 a 7 dniem od momentu ustania funkcji życiowych organizmu. W badaniach opisanych przez Harrisona i współpracowników (2020) scharakteryzowano dziesięć najliczniej występujących taksonów pojawiających się przede wszystkim w pierwszych trzech godzinach po zgonie, tj. *Viridibacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Acinetobacter* oraz *Tepidibacter*, a także po 4 dobach od zgonu (*Sporosarcina*, *Peptoniphilus*, *Clostridium* i *Ignatzschineria*). Odkryto, że po kilku dniach na powłokach ciała najliczniej występowała związana z glebą *Sporosarcina*, zaś organizmy beztlenowe, charakterystyczne przede wszystkim dla układu pokarmowego, takie jak *Peptoniphilus* oraz *Clostridium*, gromadziły się w szczególności w oczodołach. Ponadto warto tu również zwrócić uwagę na pojawiające się gram-ujemne bakterie z rodzaju *Ignatzschineria spp.*, które będąc powiązane z mikroflorą insektów kolonizujących zwłoki, są częścią „modelu sukcesji” nekrobioty, która wypiera mikroorganizmy występujące w organizmie przed jego śmiercią. Zatem istnieje możliwość oszacowania PMI za pomocą „zegara mikrobiologicznego” (Metcalf i in., 2013). Kolejnym ważnym odkryciem opisanym przez Cobaugh wraz z zespołem była obserwacja, że w glebie znajdującej się bezpośrednio w okolicach zwłok nekrobiota utrzymuje się przez długi okres. Tego typu odkrycia pozwalają na wykorzystanie mikroorganizmów jako markerów biologicznych ze względu na ich potencjalne zastosowanie np. w przypadku uprzedniego usunięcia zwłok z miejsca zdarzenia (Cobaugh, Schaeffer, DeBruyn, 2015; Johnson i in., 2016). Na podstawie przytoczonych przykładów można stwierdzić, że badania mikrobiologiczne oceniające zmiany w składzie oraz rozmieszczeniu mikroorganizmów zarówno w ciele ofiary, jak i jego otoczeniu dostarczają istotnych informacji dotyczących zarówno PMI, jak i lokalizacji zwłok.

### Mikrobiologiczna identyfikacja tożsamości sprawcy oraz ofiary

Kluczowym zadaniem technik kryminalistycznych jest identyfikacja denata, a także osoby podejrzanej o przestępstwo. Jeden z największych problemów związanych z próbami identyfikacji osób za pomocą badania ich mikrobioty stanowią dynamiczne zmiany w jej składzie (Robinson i in., 2021). Niemniej jednak pojawiają się już pierwsze metody związane z identyfikacją ludzi właśnie dzięki analizie obecności mikroorganizmów w ich ciałach. Jedną z nich jest hidSkinPlex, w której wykorzystuje się genetyczne profilowanie mikrobiomu skóry. Mimo że duża część flory bakteryjnej skóry jest wspólna dla większości ludzi, to struktura społeczności tych drobnoustrojów może się znacznie różnić pod względem liczebności określonych taksonów i obecności unikatowych szczepów bakteryjnych, co razem daje unikalny jakościowo ślad mikrobiologiczny. Co więcej, profil drobnoustrojów występujących na skórze danego człowieka jest niezmienny przez 3 lata, co umożliwia mikrobiologiczną identyfikację sprawcy długo po popełnieniu zbrodni (Oh, Byrd, Park, Kong, Segre, 2016). Metoda hidSkinPlex bazuje na 286 markerach, które pozwalają na identyfikację wybranych mikroorganizmów. W celu zweryfikowania skuteczności tej metody przeprowadzono badania z wykorzystaniem mikrobioty skóry z trzech rejonów ciała: dłoni, stopy oraz rękocyfeli mostka. Wyniki badań pozwoliły na identyfikację posiadacza danej mikrobioty z dokładnością do 94% (Schmedes i in., 2018).

Na miejscach przestępstwa bardzo często znajdują się różnego rodzaju płyny ustrojowe, takie jak ślina, nasienie, krew, wydzielina z pochwy i inne. Każdy płyn ustrojowy charakteryzuje się specyficznym składem drobnoustrojów, co pozwala na wykorzystanie ich w celu identyfikacji wydzieliny (Schmedes i in., 2016). Badania Jung i współpracowników (2018) miały na celu opracowanie nowoczesnego testu wykorzystującego mikroorganizmy do rozpoznawania materiału biologicznego, jakim jest ślina. Efektem tych prac był zestaw bazujący na multiplexowej reakcji *real time PCR* do detekcji bakterii jamy ustnej (*oral bacteria multiplex real time PCR*, OB mRT-PCR) umożliwiający kryminalistyczną identyfikację znalezionej na miejscu zbrodni wydzieliny jako śliny przy użyciu trzech gatunków bakterii jamy ustnej: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis* i *Neisseria subflava*. Zostały one wybrane na podstawie doniesień literaturowych, z których wynika, że *S. salivarius* jest ważnym członkiem mikrobioty jamy ustnej, *S. sanguinis* jest najliczniejszym gatunkiem występującym w biofilmach jamy ustnej, a *N. subflava* stanowi część normalnej flory jamy ustnej i dróg oddechowych u ludzi (Burton, Wescombe, Moore, Chilcott, Tagg, 2006; Kaplan Fine, 2002; Okahashi i in., 2011). Ze względu na wiele czynników mikrobiota jamy ustnej różni się



u poszczególnych osób, jednak dzięki jednoczesnej analizie trzech gatunków bakterii zaproponowany przez zespół Jung zestaw OB mRT-PCR zapewnia dokładność identyfikacji badanej wydzieliny jako śliny. Wykorzystana przez zespół Jung metoda multipleksowej reakcji RT-PCR służy do amplifikacji kilku matryc podczas jednej reakcji PCR, co dzięki jednoczesnemu wykorzystaniu różnych zestawów starterów pozwala na dużą oszczędność czasu i obniżenie kosztów takich badań przy jednoczesnym zachowaniu jakości uzyskiwanych wyników. W przypadku opisywanego testu OB mRT-PCR w celu scharakteryzowania badanej próbki jako śliny potrzebne jest wykazanie obecności co najmniej dwóch z wyżej wymienionych gatunków bakterii.

W przypadku niewystępowania płynów ustrojowych oraz wystarczającej ilości DNA na miejscu zdarzenia pomocne może być wykonanie analizy mikroorganizmów pozostawionych na znajdujących się tam przedmiotach. Technika ta pozwala na stwierdzenie ewentualnego podobieństwa struktury mikroorganizmów między badaną próbką a mikrobiotą skóry podejrzanego. W przypadku pobrania próbek z przedmiotów przebywających w temperaturze pokojowej metoda ta jest skuteczna nawet w okresie do 2 tygodni od chwili zdarzenia (Dell'Annunziata i in., 2022).

### Mikrobiologiczne ustalenie lokalizacji przestępstwa

Skład drobnoustrojów wykrytych w próbkach gleby może posłużyć do lokalizacji miejsca przestępstwa (Robinson i in., 2021). Badania prowadzone przez Sanachai i współpracowników (Sanachai, Katekeaw, Lomthaisong, 2016) pozwoliły na identyfikację miejsca pochodzenia gleby na podstawie materiału pobranego z podeszwy buta. Wyjaśnienia pochodzenia gleby dokonano przez analizę 16S rDNA PCR-DGGE (*polymerase chain reaction – denaturing gradient gel electrophoresis*). Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) oparta na amplifikacji sekwencji 16S rybosomalnego DNA (rDNA) w bakteriach to powszechnie stosowana szybka i czuła metoda, która pozwala na wykrycie całego spektrum bakterii w badanych próbkach (Sontakke, Cadenas, Maggi, Diniz, Breitschwerdt, 2009). W połączeniu z elektroforezą prowadzoną w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE), umożliwiającą rozdzielenie fragmentów DNA pod kątem ich temperatury topnienia (zależnej od ilości zasad GC w nici), technika 16S rDNA PCR DGGE może być wykorzystywana do szybkiej i efektywnej identyfikacji próbek gleby z miejsca zbrodni poprzez analizę profili bakterii w nich obecnych (Lerner, Shor, Vinokurov, Okon, Jurkevitch, 2006).

Jedną z innych technik wykorzystywanych do ustalenia lokalizacji miejsca przestępstwa jest masywne

równoległe sekwencjonowanie (*massive parallel sequencing*, MPS), które jest prowadzone z wykorzystaniem nowoczesnych platform sekwencjonowania nowej generacji (*next-generation sequencing*, NGS). Służy ono do określenia całej sekwencji genomowej osoby lub organizmu poprzez równoległe sekwencjonowanie wielu fragmentów nici DNA, dzięki czemu uzyskuje się tysiące nakładających się odcinków nukleotydowych, które następnie w procesie analizy bioinformatycznej można złożyć do jednej wypadkowej sekwencji. Tym samym uzyskuje się dużo większą przepustowość niż w przypadku tradycyjnych metod sekwencjonowania, a także minimalizuje się konieczność stosowania metod klonowania fragmentów będących podstawą sekwencjonowania genomów metodą Sangera (Mostafa, Sabri, Aly, 2015). Dzięki jej unowocześnieniu w ostatnich latach możliwa jest kompleksowa analiza zespołu mikroorganizmów obecnych w glebie. Technika ta jest jednak dość czasochłonna oraz kosztowna, a dla jej pełnej przydatności należałoby skonstruować mapy ukazujące rozmieszczenie poszczególnych zespołów mikroorganizmów (Schmedes i in., 2016).

Do kluczowych kwestii w dochodzeniu należy ustalenie, czy doszło do przeniesienia zwłok z faktycznego miejsca zbrodni w inne miejsce. Wiele odpowiedzi na to pytanie uzyskano dzięki wykorzystaniu technik botaniki sądowej, jednak analizy wskazują, że podobne zastosowanie mogą mieć techniki mikrobiologii kryminalistycznej (Schmedes i in., 2016). Niestety nadal istnieje wiele ograniczeń użycia mikrobioty glebowej jako materiału dowodowego, ponieważ na wyniki badania składu społeczności mikroorganizmów może wpływać pora roku, w jakiej pobrano próbki, czy też odległość między punktami pobrania (Pasternak i in., 2013).

### Okrzemki a przyczyna śmierci

Badanie mikroorganizmów może być pomocne przy ustaleniu przyczyny zgonu, na przykład dzięki poszukiwaniu okrzemek w zwłokach znalezionych w akwenach wodnych. Badanie opublikowane przez grupę naukowców (Sitthiwong, Ruangyuttikarn, Vongvivach, Peerapornpisal, 2014), dotyczące identyfikacji okrzemek w ciele ofiar utonięcia, wykazało ich obecność w organach, takich jak płuca, nerki, wątroba, mózg, a także w treści żołądkowej, treści dwunastnicy oraz krwi, natomiast nie potwierdzono ich obecności w ciałach osób, które zmarły w wyniku chorób lub na skutek wypadków samochodowych i których zwłoki nie miały styczności z wodą. Próbki okrzemek pobranych z akwenów są tożsame ze znalezionymi w tkankach badanych zwłok. Oznacza to, że identyfikacja okrzemek w ciele znalezionym poza akwenem wodnym może określić typ wód (wody słodkie lub słone), w jakich doszło do utonięcia (Schmedes i in.,

2016; Sitthiwong i in., 2014). Natomiast badania Lucciego i współpracowników (Lucci, Campobasso, Cirmelli, Lorenzini, 2008) przeprowadzone na zwłokach ofiar utożsamienia wykazały obecność paciorkowców kałowych oraz bakterii *E. coli* w próbkach krwi pobranej z ośrodkowego i obwodowego układu krążenia. Nie wykazano bytowania takich mikroorganizmów w próbkach krwi pobranej ze zwłok umieszczonych w wodzie już po śmierci (Lucci i in., 2008; Robinson i in., 2021).

## Owady w kryminalistyce i ich zastosowanie

Badania entomologiczne mające na celu określenie czasu zgonu są najbardziej przydatne w przypadkach, w których odstęp pomiędzy czasem zgonu a chwilą znalezienia zwłok wynosi ponad 48–72 godzin, natomiast przed tym czasem dokładniejsze są metody biochemiczne i fizyczne (Frątczak-Łagiewska, 2016; Mona, Jawad, Noreen, Ali, Rakha, 2019; Wang i in., 2019). Szacowanie wieku śladu entomologicznego, czyli czasu rozwoju owadów (od złożenia jaj do jego zabezpieczenia na zwłokach), wykorzystuje analizę wieku osobników (metoda rozwojowa) lub zespołu owadów (metoda sukcesyjna). Do określenia czasu zgonu wykorzystywane są owady w różnym stadium rozwoju. Określać można: stadium rozwoju jaj, wiek larw, wiek poczwerek i wiek postaci dorosłych. Metody te opierają się głównie na obserwacji cech morfologicznych pod mikroskopem bądź badań molekularnych (Frątczak-Łagiewska, 2016).

Cykle życiowe owadów używanych do określenia czasu zgonu są na ogół stałe i przewidywalne. Jednak pewne czynniki, takie jak temperatura i wilgotność otoczenia zwłok, mogą zmienić ich czas dojrzewania. Znaczenie ma również miejsce odnalezienia zwłok, pora roku, pogoda, zasoby pokarmowe owadów żerujących i wiele innych (Mona i in., 2019). Istotnym czynnikiem wpływającym na czas trwania rozwoju owadów padlinożernych jest również wpływ substancji wcześniej przyjętych przez ofiarę, czego przykładem może być kokaina, która przyspiesza kolonizację zwłok przez te owady, lub arsen, który opóźnia oraz zaburza ich rozwój w ciele zmarłego. Istnieją także substancje, które początkowo działają stymulująco, a następnie hamująco na procesy kolonizacji zwłok przez nekrofagi. Pozwala to na wykorzystanie owadów do wykrywania różnorodnych substancji toksycznych. Niektóre z metali (m.in. kadm, rtęć, cynk, antymon, ołów, żelazo, miedź) kumulują się w tkankach owadów żerujących na zwłokach i mogą być wykryte na każdym etapie ich cyklu rozwojowego (Czepiel-Mil, Los, Marczevska, 2015).

W klimacie umiarkowanym, jaki występuje w Polsce, stawonogami, które jako pierwsze kolonizują zwłoki, są muchówki (*Diptera*) z rodziny plujkowatych (*Calliphoridae*). Pospolitymi przedstawicielami tej rodziny są:

plujka pospolita (*Calliphora vicina*), plujka burcząca (*Calliphora vomitoria*), padlinówka cesarska (*Lucilia caesar*) i mucha zielona (*Lucilia sericata*). Wiek larw tych muchówek może posłużyć do wyznaczenia prawdopodobnego czasu zgonu ofiary. Ocena wieku larw innych owadów, np. ścierwicowatych (*Sarcophagidae*) i sernicowatych (*Piophilidae*) także może dostarczyć pewnych danych, ale nie odznacza się aż tak dużym potencjałem badawczym jak pomiary wieku larw owadów wcześniej wymienionej rodziny. Ważną grupą stawonogów żerujących na martwych ciałach są także chrząszcze (*Coleoptera*) z rodzin: omarlicowate (*Silphidae*), gnilikowate (*Histeridae*) i inne. Owadami znajdowanymi na zwłokach są także kusakowate (*Staphylinidae*), które pomimo że nie żywią się tkankami zwłok, to ze względu na to, iż żerują na larwach owadów padlinożernych, mogą służyć do ustalenia PMI (Weithmann i in., 2021). Żerować na zwłokach mogą także gatunki wszystkożerne oraz gatunki przypadkowe (Czepiel-Mil i in., 2015).

W badaniach Singha i współpracowników (Singh, Ashikin, Abdullah, Carbaugh, Heo, 2020) oceniano wpływ mrówkowatych (*Formicidae*), ze szczególnym uwzględnieniem *Carebara diversa*, na szacowaną wartość PMI. Mrówkowate oddziałują niekorzystnie na rozwój muchówek padlinożernych, ponieważ zakłócają proces składania jaj oraz doprowadzają do mniejszej przeżywalności larw muchówek. Konkurencja między *Formicidae* a *Diptera* może doprowadzić do błędnie oszacowanego czasu zgonu. Natomiast same mrówkowate mogą zostać użyte do ocenienia PMI poprzez określenie czasu, w którym nowa kolonia zaczyna wytwarzać kasty reprodukcyjne (Singh i in., 2020). W tabeli 1 przedstawiono gatunki owadów pomocnych przy określaniu czasu zgonu w lasach polskich.

Środowisko, w którym znajdują się zwłoki, nie ogranicza zwykle aktywności owadów żerujących na zwłokach. Niektóre gatunki much potrafią odnaleźć zwłoki i zacząć składać na nich jaja w ciągu kilku minut (Mona i in., 2019). Niemniej jednak szczelne zamknięcie zwłok mogłoby doprowadzić do błędnego oszacowania czasu śmierci. Znany przykład takiej pomyłki jest eksperytyza dra Billa Bassa z 1977 roku, w której naukowiec pomylił się aż o 113 lat. Ten błąd zmotywował go do utworzenia w 1981 roku Antropologicznego Ośrodka Badawczego Uniwersytetu Tennessee znanego pod nazwą *body farm*. Jest to ośrodek, w którym przez wiele lat obserwuje się postępujący rozkład zwłok wystawionych na różne czynniki środowiskowe (Bass, 2012). W 2017 roku Amsterdam's Academic Medical Center uzyskał zgodę na otwarcie pierwszego takiego ośrodka w Europie (Enserink, 2017). Utworzenie *body farm* w Polsce wydaje się mało prawdopodobne ze względów prawnych, kulturowych, ekonomicznych i bioetycznych (Skowronek, Chowanec, 2010).

Zastosowanie metod entomologicznych ma także znaczenie przy ocenianiu przyczyny zgonu. Rany klute, które mogły spowodować śmierć, wabią owady, które chętnie składają w tych miejscach jaja, co powoduje, że jaj w tych miejscach będzie więcej niż na innych obszarach zwłok (Wang i in., 2019).

### Owady jako źródło ludzkiego DNA – praktyczne zastosowanie w kryminalistyce i medycynie sądowej

Owady nekrofagiczne żerujące na ludzkich zwłokach mogą być wykorzystane jako źródło materiału biologicznego dostarczającego informacji do badań genetycznych i celów identyfikacyjnych. W przedniej części jelita larw magazynowane są tkanki pochodzące od denata (Skowronek, 2012), toteż do badań najczęściej pobierana jest treść z wola owadów (łac. *ingluvies*), gdzie ze względu na małą aktywność enzymów trawiennych znajduje się najlepszy materiał biologiczny (Campobasso, Linville, Wells, Introna, 2005). Analiza genetyczna zawartości przewodu pokarmowego larw muchówek (*Diptera*) może być źródłem ludzkiego DNA i posłużyć do identyfikacji ofiary, w przypadku gdy zwłoki zostały usunięte z miejsca przestępstwa. Do tego celu używa się między innymi techniki STR-PCR (*short tandem repeat-polymerase chain reaction*) i analizy HVR (sekwencje regionów hiperzmiennych) (Paneto i in., 2010; Zehner, Amendt, Krettek, 2004). W pierwszej z wymienionych metod wykorzystuje się analizę sekwencji mikrosatelitarnych, czyli tzw. krótkich powtórzeń tandemowych STR (*short tandem repeats*). W kryminalistyce wykorzystuje się ich międzypersonalną zmienność wynikającą z różnej liczby powtarzających się zorganizowanych tandemowo motywów (Tuccia i in., 2019).

Równie ważne są owady hematofagiczne, które – znajdując się w domniemanym miejscu przestępstwa – mogą dostarczyć materiałów dowodowych w sprawie. Przykładem takich owadów są powszechnie występujące pluskwy, komary, wszy i pchły. Pobrana przez nie krew ludzka może dostarczyć śledczym potencjalnego materiału biologicznego zawierającego DNA (Skowronek, Tomsia, Drożdżiok, Kabiesz, 2014). Multipleksowa reakcja PCR po wyizolowaniu DNA i następująca po tym elektroforeza kapilarna umożliwia z dużym prawdopodobieństwem identyfikację osoby (ofiary lub sprawcy przestępstwa), na której żerował owad hematofagiczny (Spitaleri, Romano, Luise, Ginestra, Saravo, 2006).

### Botanika sądowa

Botanika sądowa jest dziedziną nauk kryminalistycznych, która bada ślady biologiczne pochodzenia

roślinnego pod kątem ich przydatności w postępowaniu śledczym. W ramach tej dziedziny wykorzystuje się wiedzę z zakresu anatomii i ekologii roślin oraz biologii molekularnej. Specyficznymi działami botaniki sądowej są dyscypliny skupiające się na określonym rodzaju materiału roślinnego – są to m.in. palinologia (badająca głównie pyłek roślin nasiennych, zarodniki mszaków, paprotników i grzybów), lichenologia (badająca porosty), briologia (zajmująca się mszakami) oraz diatomologia, w której obiektem zainteresowania są okrzemki (Bajerlein, Wojterska, Grewling, Kokociński, 2015; Caccianiga i in., 2021).

Jednym z najpopularniejszych badań w botanice sądowej jest analiza ziaren pyłku oraz zarodników roślin i grzybów, czyli palinomorfów. Ziarna pyłku i zarodniki charakteryzują się bardzo niewielkimi rozmiarami, wysoką trwałością i odpornością na działanie różnych czynników zewnętrznych. Mogą bardzo szybko przenosić się na znaczne odległości, ponieważ łatwo przylegają do różnego rodzaju powierzchni (Bajerlein i in., 2015; Lisiecka, 2019). Powyższe cechy stały się powodem, dla którego palinomorfy są tak często używane jako materiał dowodowy w toku śledztwa. Badanie palinomorfów może ułatwić ustalenie miejsca, w którym doszło do zbrodni, jaką trasą przemieszczali się uczestnicy zdarzenia, czy znalezione ciało ofiary zostało przeniesione. Może także pozwolić na powiązanie podejrzanego z miejscem przestępstwa (Alotaibi i in., 2020; Bajerlein i in., 2015; Lisiecka, 2019).

Nie tylko zarodniki, ale także całe rośliny należące do grupy mszaków są wykorzystywane jako ważny materiał dowodowy. Fragmenty mszaków łatwo przyczepiają się do ubioru i obuwia, a ich analiza i dopasowanie do rośliny macierzystej może stać się dowodem obecności danej osoby w określonym środowisku (Bajerlein i in., 2015; Virtanen, Korpelainen, Kostamo, 2007).

Oprócz wykorzystania podstawowych narzędzi, takich jak mikroskop, w celu określenia cech morfologicznych nasion zastosowanie znajdują zaawansowane techniki badawcze. Analiza DNA ułatwia identyfikację nasion uszkodzonych (np. przez soki trawienne, w przypadku tych pobranych z przewodu pokarmowego ofiary) czy takich, których identyfikacja jest bardzo trudna (Lee, Huang, Hsu, Lee, 2019).

Botanika sądowa odgrywa również ważną rolę podczas poszukiwań miejsca pochówku zwłok. Zakopanie zwłok w ziemi powoduje miejscowe zmiany w strukturze pokrywy roślinnej, które mogą utrzymywać się nawet przez dłuższy czas (Caccianiga, Bottacin, Cattaneo, 2012). Często obserwowanym zakłóceniem w miejscu pochowania zwłok jest zmiana w składzie gatunkowym pokrywy roślinnej związana z zanikiem dotychczas występujących gatunków lub pojawieniem się gatunków nietypowych dla tego miejsca, co czyni je wskaźnikami grobów (*grave indicators*, *post-burial indicators*).



W badaniach przeprowadzonych na terenie otwartym pokrytym roślinnością zielną w północnych Włoszech zauważono, że w miejscu w którym wykopano grób, zwiększyła się liczba gatunków ruderalnych, tj. typowych dla terenów silnie przekształconych przez człowieka. Z kolei zmniejszeniu uległa liczba gatunków takich jak turzyca wiosenna (*Carex caryophyllea Latourr*), ożanka właściwa (*Teucrium chamaedrys Latourr*) czy strzęplica piramidalna (*Koeleria pyramidata*). Zmiany te były obserwowane zarówno w przypadku grobów pełnych, jak i pustych, co sugeruje, że zasadniczym czynnikiem zakłócającym zbiorowisko roślinne w tym przypadku był sam czynnik mechaniczny – proces kopania (Bajerlein i in., 2015; Caccianiga i in., 2012).

Dość często w miejscu zakopania zwłok rozwija się wyraźnie wyższa i bardziej zielona roślinność niż w miejscach sąsiadujących z miejscem pochówku. Jest to związane ze zwiększeniem się w glebie ilości związków mineralnych pochodzących z rozkładających się zwłok. Rozwój bujniejszej roślinności może nastąpić także w efekcie lepszego napowietrzenia i rozluźnienia struktury gleby spowodowanych kopaniem, co z kolei wpływa pozytywnie na rozwój systemów korzeniowych. Z drugiej strony czynność kopania może działać destrukcyjnie na roślinność poprzez zniszczenie systemu korzeniowego. W takim przypadku miejsce pochowania zwłok będzie wyróżniało się słabszym wzrostem roślinności w porównaniu z roślinnością jego otoczenia lub nawet całkowitym zniszczeniem pokrywy roślinnej. Zasadniczym czynnikiem mającym wpływ na tego typu zmiany jest głębokość grobu (Watson, Forbes, 2008).

W obecnych czasach dzięki rozwojowi technik biologii molekularnej możliwe jest dużo dokładniejsze zbadanie materiału roślinnego, nawet jeśli uległ on znacznym uszkodzeniom uniemożliwiającym jego identyfikację podstawowymi metodami badawczymi. Podczas takich analiz szczególnie pomocne jest plastydowe DNA, charakteryzujące się dużą konserwatywnością. Korzyści daje również analiza markerów DNA („kodu kreskowego” DNA), czyli sekwencji DNA w wybranym standardowym regionie genomu, pozwalającej na identyfikację gatunku (Aquila i in., 2014; Bajerlein i in., 2015). Aby móc rozpoznać osobnika macierzystego, z którego pochodzi materiał roślinny badany w sprawie, wykorzystuje się wiedzę zdobytą podczas badań wykrywających polimorfizmy markerów DNA, takich jak polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych – RFLP (*restriction fragments length polymorphism*), polimorfizm pojedynczego nukleotydu – SNP (*single nucleotide polymorphism*) czy polimorfizm prostych sekwencji powtarzalnych – SSR (*simple sequence repeats*) (Bajerlein i in., 2015).

## Warunki środowiskowe wpływające na tempo rozkładu zwłok

Temperatura otoczenia stanowi istotny czynnik zewnętrzny determinujący tempo rozkładu zwłok. Wpływa ona na intensywność procesów biochemicznych i biologicznych biorących udział w tym procesie. Z każdym wzrostem temperatury o 10°C następuje kilkukrotne przyspieszenie procesów chemicznych zachodzących w obrębie zwłok (Wescott, 2018). Istotną rolę odgrywają również mikroorganizmy i stawonogi biorące udział w procesie degradacji tkanek zwłok. Również w tych przypadkach wzrost temperatury stymuluje ich aktywność, niemniej jednak odbywa się to tylko w granicach odpowiedniego dla nich optimum temperaturowego (Carter, Yellowlees, Tibbett, 2008). Temperatury suboptymalne (zarówno wyższe, jak i niższe) powodują zaburzenie kolonizacji i rozwoju populacji stawonogów w zwłokach. Mogą także doprowadzić do obumarcia pewnych mikroorganizmów, co może również opóźnić tempo rozkładu zwłok. Analiza szybkości tego procesu w powiązaniu z temperaturą otoczenia stanowi kolejne pomocne narzędzie służące do określenia PMI (Franceschetti, Amadasi, Bugelli, Bolsi, Tsokos, 2023).

Również badania gleby jako często wybieranego miejsca pochówku dostarczają istotnych informacji na temat wpływu środowiska na przebywające w nim zwłoki. W otoczeniu pochowanych w glebie zwłok w początkowym okresie wzrasta zarówno wartość odczynu gleby (wzrost pH z wartości 4,5–6 do ok. 8 w ciągu 25 dni), jak i wilgotność (wzrost z poziomu 10–15%, do około 25% w ciągu 25 dni) (Szelec, Koenig, Seppey, Le Bayon, Mitchell, 2018). Wpływa to na rozwój mikroorganizmów glebowych i entomofauny, czyli ogółu gatunków owadów występujących na określonym obszarze. Wzrost pH wpływa niekorzystnie na rozwój mikroorganizmów glebowych i entomofauny. Natomiast podwyższona wilgotność wspomaga rozwój osobniczy poszczególnych gatunków i ich metamorfozę pomiędzy stadiami rozwojowymi (Hauteo i in., 2013). Obecność zwłok wpływa także na podwyższenie zawartości w glebie takich składników jak azot całkowity i fosfor (Benninger, Carter, Forbes, 2008). Wykrywanie nasilonej dzięki związkom azotu pochodzącym ze zwłok wegetacji roślin jest możliwe metodami spektrometrii z wykorzystaniem sensorów hiperspektralnych i/lub multispektralnych (Silván-Cárdenas i in., 2021).

Innym czynnikiem wpływającym na czas rozkładu zwłok jest ich wapnowanie (Robinson i in., 2021). Użycie wapna palonego lub gaszonego na zwłokach może opóźnić procesy rozkładu ciała, ponieważ wapno podwyższa pH gleby, wpływając niekorzystnie na rozwój mikroorganizmów glebowych, dodatkowo powodując wysuszenie zwłok, co zniechęca owady do żerowania.



### **Markery środowiskowe pomocne w kryminalistyce dostępne w glebie**

Podczas rozkładu zwłok do gleby przedostają się płyny ustrojowe i produkty rozpadu tkanek. Pozwala to na próby izolacji z materiału glebowego potencjalnych markerów rozkładającego się ciała (von der Lühne, Dawson, Mayes, Forbes, Fiedler, 2013). Przykładem takich biomarkerów są sterole, między innymi cholesterol i koprostanol (von der Lühne i in., 2013). Innym przykładem markerów środowiskowych mogą być tlenek azotu i dwutlenek węgla. W miejscu pochówku wykrywa się ich zwiększone stężenie (Dalva, Moore, Kalacska, Leblanc, Costopoulos, 2015). Natomiast lotne związki organiczne, takie jak siarczki, aldehydy i kwasy karboksylowe powstające podczas rozkładu zwłok, odgrywają ważną rolę w wykrywaniu miejsca pochówku przez psy tropiące (Alexander, Hodges, Bytheway, Aitkenhead-Peterson, 2015; Alexander, Hodges, Wescott, Aitkenhead-Peterson, 2016). Badania pokazują, że w okresie letnim intensywność wydzielania się tych związków jest wyższa niż w okresie zimowym (Forbes, Perrault, Stefanuto, Nizio, Focant, 2014).

### **Wnioski**

Metody śledcze wykorzystujące wiedzę opierającą się nie tylko na anatomii człowieka czy badaniach medycznych mogą wnieść wiele do śledztwa i pomóc w istotnych kwestiach, takich jak: udowodnienie winy podejrzanego, identyfikacja miejsca popełnienia przestępstwa czy ukrycia zwłok, określanie czasu i przyczyny zgonu ofiary. Dlatego istotne jest propagowanie współczesnej wiedzy dotyczącej nowoczesnych technik kryminalistycznych, w tym także tych opartych na zdobyczach biologii i mikrobiologii. Dotychczasowe sukcesy śledcze uzyskane dzięki wykorzystaniu mikroorganizmów, owadów, roślin oraz gleby w badaniach kryminalistycznych uzasadniają rozwój i dalszy wzrost znaczenia opisanych w niniejszej pracy działów kryminalistyki sądowej i weterynaryjnej.