https://doi.org/10.17116/sudmed201760518-22

# Специфика путрификации трупа под действием ферментных систем некробиома

К.б.н., доц. Н.А. СИДОРОВА[1], д.м.н., проф. В.Л. ПОПОВ[2], к.м.н., доц. О.С. ЛАВРУКОВА[3], эксп. А.Н. ПРИХОДЬКО[4], к.б.н., доц. С.Н. ЛЯБЗИНА[5], Е.И. ТИХОМИРОВА[6]

[1]Кафедра неврологии, психиатрии и микробиологии (зав. — д.м.н., проф. Н.С. Субботина) Петрозаводского государственного университета, Петрозаводск, Россия, 185910; [2]кафедра судебной медицины и правоведения Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова (зав. — д.м.н., проф. О.Д. Ягмуров), Санкт-Петербург, Россия, 197022; [3]кафедра анатомии, топографической анатомии и оперативной хирургии, патологической анатомии, судебной медицины (зав. — д.м.н., доц. И.Г. Пашкова) Петрозаводского государственного университета, Петрозаводск, Россия, 185910; [4]Бюро судебно-медицинской экспертизы Республики Карелия (нач. — А.Н. Приходько), Петрозаводск, Россия, 185003; [5]кафедра зоологии и экологии (зав. — д.б.н., проф. Э.В. Ивантер) Петрозаводского государственного университета, Петрозаводск, Россия, 185910; [6]Медицинский институт (дир. – д.м.н., проф. А.Т. Балашов) Петрозаводского государственного университета, Петрозаводск, Россия, 185910

**Цель исследования — установить особенности гнилостного разложения трупа под действием ферментных систем некробиома применительно к продолжительности постмортального периода. Представлены результаты исследований ферментативной активности доминантных видов микроорганизмов в составе посмертного микробиома. В качестве моделей путрификации использовали трупы свиньи домашней массой 50—70 кг. Выявлена специфика разложения белков под действием протеолитических ферментов псевдомонад, бацилл и клостридий, которая выражается в изменении количества некробионтов, продуцирующих протеазы в составе целого трупа и его фрагментов при гниении на воздухе на протяжении 30 и 136 сут посмертного периода. С помощью серии экспериментов по оценке эффективности гидролиза белков некробионтами установлена зависимость путрификации от температуры окружающей среды, срока путрификации и вида микроорганизмов.**

*Ключевые слова: путрификация, некробиом, аммонификация, гниение, протеолитические ферменты.*

# The specific features of corpse putrification under the influence of necrobiome enzymatic systems

N.A. SIDOROVA[1], V.L. POPOV[2], O.S. LAVRUKOVA[3], A.N. PRIKHOD'KO[4], S.N. LYABZINA[5], E.I. TIKHOMIROVA[6]

[1]Department of Neurology, Psychiatrics and Microbiology, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia, 185910; [2]Department of Forensic Medicine and Legal Studies, I.P. Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia, 197022; [3]Department of Anatomy, Topographic Anatomy and Emergency Surgery, Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia, 185910; [4]Bureau of Forensic Medical Expertise of Republic Karelia, Petrozavodsk, Russia, 185003; [5]Department of Zoology and Ecology, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia, 185910; [6]Medical Institute, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia, 185910

**The objective of the present study was to characterize the specific features of corpse putrification under the influence of necrobiome enzymatic systems depending on the duration of the post-mortem period. We present the results of investigations into the enzymatic activity of the dominant species of microorganisms making up the post-mortem microbiome. The domestic pork carcasses weighing 50—70 kg were used as an experimental putrification model. The study revealed the characteristic features of protein decomposition under the influence of proteolytic enzymes of pseudomonads, bacilli, and clostridia, such as alteration in the amount of necrobionts producing proteases in the entire carcass and its fragments during biodegradation in the air over 30 and 136 days of the post-mortem period. A series of experiments designed to evaluate the effectiveness of protein hydrolysis by necrobionts have demonstrated the dependence of the rate of biodegradation on the environmental temperature, duration of the putrification pocess, and the species composition of the necrobiome.**

*Keywords: putrifucation, necrobiome, ammonification, biodegradation, proteolytic enzymes.*

В основе естественного разложения трупа лежат процессы деструкции органических веществ, возникающие под действием различных представителей некрофильных сообществ: микроорганизмов, насекомых, простейших и пр. Немаловажную роль в гниении белков играют ферментные системы некробиома или посмертного микробиома — сложной биологической системы, которая формируется поэтапно и является специфичной для каждой стадии путрификации (гнилостное разложение) [1].

Стадийность разложения с учетом комплекса микробиологических, биохимических и других факторов рассматривается многими авторами [2—7]. Так, группа ученых под руководством N. Lents [8] исследовала ассоциации бактерий, выделенных из слухового прохода и носовых каналов 21 трупа в разные периоды разложения. Для идентификации микроорганизмов авторы использовали метод метагеномного секвенирования ДНК. В результате анализа полученных данных была построена статистиче-

© Коллектив авторов, 2017

[1]e-mail: valnis@petrsu.ru; [2]e-mail: expertfm@mail.ru;
[3]e-mail: olgalavrukova@yandex.ru; [4]e-mail: andrey_prihodko@list.ru;
[5]e-mail: slyabzina@petrsu.ru; [6]e-mail: lizati97@inbox.ru

ская модель, позволяющая определить посмертный интервал неизвестных образцов трупного материала с точностью до 2 дней.

В других исследованиях [9, 10] указано, что последовательную смену этапов гниения можно объяснить многообразием химических компонентов, формирующихся после посмертного окоченения. Белки, жиры, углеводные и минеральные вещества подвергаются активной биотрансформации именно со стороны микроорганизмов и преобразуются в более чем 1300 различных соединений, химический состав которых зависит от срока разложения, вида микроорганизмов, температуры, влажности, концентрации кислорода, состава органов и тканей, подвергающихся разложению, и ряда других факторов внешней и внутренней среды.

При температуре около 0 °С развивается аммонификация, вызванная жизнедеятельностью психрофильных бактерий, относящихся к родам *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella* и *Aeromonas*. Доминирующим является род *Pseudomonas,* который относится к гамма-подклассу *Proteobacteria* и включает *P. fluorescence*, *P. fragi*, типовые виды *P. aeruginosa* и др. Некоторые из видов рода представляют α-подкласс *Proteobacteria* (*Brevundimonas*, *Devosia*, *Spingomonas*), тогда как *Acidovorax*, *Comamonas* и *Telluria* относятся к β-подклассу.

При повышении температуры до 20—27 °С гниение белков контролируется мезофильными некробионтами: *Proteus vulgaris, Serratia marcescens, Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, Bacillus mycoides, Clostridium sporogenes, Clostridium putrificum, Clostridium perfringens* и другими представителями некрофильной микрофлоры.

Независимо от вида микроорганизмов, факторов окружающей среды и стадии путрификации процесс микробного разложения органических субстратов сводится к некоторым общим принципам [10]:

— активность распада органических соединений зависит от синтеза микроорганизмами внеклеточных экзоферментов, которые в большинстве случаев относятся к группе гидролаз;

— процесс разложения находится под контролем различных видов микроорганизмов, синтезирующих необходимые экзоферменты;

— начальная деструкция субстрата под действием экзоферментов — это стадия, лимитирующая скорость использования субстрата и соответственно рост микроорганизмов.

К наиболее изученным экзоферментам микроорганизмов относятся протеазы, которые контролируют процессы аммонификации и часто синтезируются в виде проферментов и активируются только в результате посттрансляционной модификации в процессе транспорта или аутокаталитической активации [11—13]. Под действием протеолитических ферментов микроорганизмов образуются комплексы высокомолекулярных промежуточных продуктов распада белков, состоящие из пептонов, альбумозы и полипептидов, расщепляющихся на разных этапах протеолиза до отдельных аминокислот.

Вирулентные штаммы микроорганизмов с выраженной протеолитической активностью способны расщеплять белок и пептон до конечных продуктов аммонификации - $C_8H_7N$, $H_2S$, $(NH_2)_2CO$ и $NH_3$ [14]. Протеазы подразделяются на эндо- и экзопептидазы в зависимости от положения расщепляемой пептидной связи в молекуле белка. Эндопептидазы действуют на пептидные связи внутри полипептида, а экзопептидазы отщепляют аминокислотные остатки от С- или N-конца полипептидной цепи. В зависимости от природы активного центра среди протеаз выделяют сериновые, цистеиновые, аспарагиновые и металлсодержащие, которые в свою очередь относятся по специфичности к аминокислотным остаткам в участке расщепления [15]. Перечисленные ферменты различаются по чувствительности к ингибиторам. Сериновые протеазы активного мезофильного некробионта *Bacillus subtilis* чувствительны к диизопропилфторфосфату и его фосфорорганическим производным, которые способны к ковалентной связи с гидроксильной группой серинового остатка в активном центре молекулы белка. Цистеиновые протеазы многих некробионтов чувствительны к ионам металлов, алкилирующим агентам и окислителям. Под их влиянием также находится β-карбоксильная группа аспарагиновой кислоты пепсиноподобных ферментов многих видов дрожжей и микроскопических грибов, входящих в состав ассоциации некробионтов. Микроорганизмы способны синтезировать широкий спектр протеолитических ферментов, активность которых варьирует в широком диапазоне температур (от 4 до 110 °С) и значений pH (от 0,1 М HCl до 0,1 М NaOH) [15], а гидролитические ферменты класса протеаз являются модельными соединениями для изучения взаимосвязей между структурой белка и функцией фермента. В связи с этим востребованность их как объектов исследования для целей микробной биотехнологии, молекулярной биологии и генной инженерии остается весьма значительной [16—20].

Цель исследования — установить особенности гнилостного разложения трупа под действием ферментных систем некробиома применительно к диагностике давности постмортального периода.

## Материал и методы

Исследование выполняли в соответствии с международными этическими нормами, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Рекомендации для врачей по проведению биомедицинских исследований на людях» и Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986) [21], а также требованиями приказа Минздрава СССР №755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» от 12.08.77 [22] и другими нормативными документами (заключение Комитета по медицинской этике при Министерстве здравоохранения и социального развития РК и Петрозаводском государственном университете №35 от 06.11.15).

В качестве модели использовали 4 трупа свиньи домашней (*Sus scrofa domesticus L.*) массой 50—70 кг. Через 2 ч после умерщвления традиционным способом на скотобойне трупы животных поместили в исследуемые биотопы. Исследования проводили в южной части Республики Карелия (р-н Лососинное) в период 2015—2016 гг. По две трупные приманки заложили в лесных (ельник черничный) и открытых (лесной луг) биотопах с использованием разработанного метода изучения некрофильного сообщества на трупах крупных животных [23].

Для анализа некробионтов пробы отбирали в асептических условиях с различных участков тела (кожа, копыта, шерсть) и ложа трупа и заключали в 30% раствор глицери-

***Таблица 1.*** **Основные показатели условий среды на момент отбора проб (30 и 136 сут)**

| Фактор среды | Давность наступления смерти | |
|---|---|---|
| | 30-е сутки | 136-е сутки |
| Температура воздуха, °С | 14,7 | 4,5 |
| Температура почвы, °С | 11,6 | 3,0 |
| pH (почвы) | 5,7 | 5,9 |

на. Произвольно выбрали пробы, полученные от трупов с давностью смерти на 30-е и 136-е сутки. Исследовали протеолитические свойства *Pseudomonas* spp., *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium putrificum* и *Clostridium sporogenes* (методы идентификации чистых культур в составе ассоциации некробиома описаны ранее [24]). Культивирование микроорганизмов проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на шейкере с частотой колебания платформы 200 об/мин при температуре 27 °С. Посевным материалом служила 18-часовая ночная культура, контролировали рост культуры по изменению оптической плотности (ОП) микроорганизмов. Рост биомассы оценивали нефелометрически на фотоэлектроколориметре ФЭК-56ПМ со светофильтром 9 при длине волны 590 нм. За единицу биомассы принимали поглощение в сантиметровой кювете.

Казеинолитическую активность (КА) или общую протеолитическую активность (ОПА) чистых культур микроорганизмов определяли методом Ансона в модификации И.С. Петровой [20]. При интерпретации полученных данных учитывали основные показатели окружающей среды на момент отбора проб **(табл. 1)**.

Изменчивость состава микробиома трупа и его ложа на двух исследуемых сроках изучали методом главных компонент. Задачи анализа – выявить структуру отношений многомерных данных, вычленяя группы (плеяды) зависимых признаков и группы (кластеры) сходных объектов обозначить общие причины по которым признаки изменяются согласованно, а объекты оказываются сходными. Исходные значения нормировали, компоненты с дисперсией менее единицы относили к несущественным и не рассматривали. Факторные нагрузки представляли произведением собственных векторов и стандартных отклонений соответствующих главных компонент. Такой метод позволил сравнивать коэффициенты одного признака в разных главных компонентах [25]. Признаки группировали в плеяды исходя из наибольших величин их факторных нагрузок в рядах главных компонент.

## Результаты и обсуждение

Проведен качественный и количественный анализ доминантных видов некробионтов, способных к синтезу протеолитических ферментов, контролирующих путрификацию трупа на воздухе на 30-е и 136-е сутки посмертного периода:

1. Представители *Pseudomonas* spp. (25 штаммов) — прямые или изогнутые палочки, подвижные, грамотрицательные; хемоорганотрофные с дыхательным типом метаболизма; способные к росту в широком диапазоне температур от 4 и ниже до 43 °С.

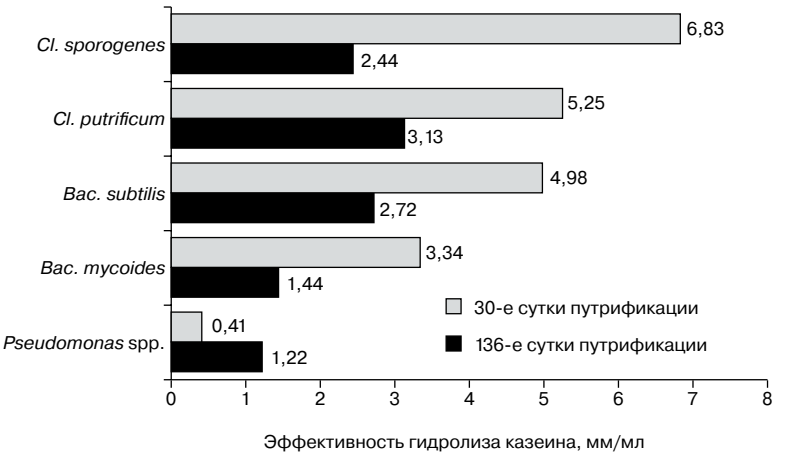
2. *Bacillus mycoides* (20 штаммов) — стрептобациллы с центральным расположением спор, грамположительные; хемоорганотрофные; аэробы или факультативные анаэробы; способны к росту при температуре от 10 до 45 °С.

3. *Bacillus subtilis* (20 штаммов) — стрептобациллы с центральным расположением спор, грамположительные; хемоорганотрофные; аэробы или факультативные анаэробы; способны к росту при температуре от 10 до 45 °С.

4. *Clostridium putrificum* (20 штаммов) — полиморфные палочки с терминальным расположением спор, грамположительные; хемоорганотрофные; облигатные анаэробы.

5. *Clostridium sporogenes* (20 штаммов) — полиморфные палочки с центральным расположением спор, грамположительные; хемоорганотрофные; облигатные анаэробы.

В анаэробных условиях гниение белка сопровождается образованием $NH_3$, который вступает в реакцию с неорганическими кислотами и образует соли: $NH_4NO_3$, $(NH)_2SO_4$, $(NH_4)_2CO_3$. Общая протеолитическая активность доминантных видов некробионтов на 30-е и 136-е сутки путрификации трупа отражена на **рисунке.**




**Сравнение общей протеолитической активности некробионтов в различные сроки посмертного периода трупов свиньи домашней (*Sus scrofa domesticus L.*).**

***Таблица 2.*** **Количество штаммов некробионтов — продуцентов протеаз (в %) на трупах свиньи домашней (*Sus scrofa domesticus L.*) в разные сроки посмертного периода**

| Образец | *Pseudomonas* spp. | *Bacillus mycoides* | *Bacillus subtilis* | *Clostridium putrificum* | *Clostridium sporogenes* |
|---|---|---|---|---|---|
| Ложе трупа | 9,15*<br>47,20** | 50,14<br>24,10 | 61,06<br>18,10 | 25,50<br>39,30 | 36,15<br>23,20 |
| Шерсть | 20,10<br>38,10 | 42,10<br>15,80 | 50,61<br>14,10 | 13,12<br>25,10 | 24,10<br>36,9 |
| Копыта | 25,20<br>61,20 | 23,10<br>21,10 | 63,50<br>48,50 | 10,10<br>15,0 | 18,10<br>24,20 |
| Кости | 11,40<br>39,80 | 22,20<br>16,40 | 41,10<br>21,10 | 15,10<br>15,3 | 20,20<br>27,40 |

*Примечание.**— количество некробионтов-продуцентов протеаз на 30-е сутки; ** — количество некробионтов-продуцентов протеаз на 136-е сутки.

Гидролиз казеина на низком фоновом уровне, в среднем 0,12±0,01 мм/мл, отметили у всех исследованных штаммов. Максимальной оказалась эффективность гидролиза белка для мезофильных некробионтов рода *Clostridium* (6,83 и 5,25 мм/мл), выделенных на 30-е сутки. Соотношение клостридиальных продуцентов протеаз в составе некробиома ложа трупа, шерсти, копыт и костей изменилось с 13,12% (количество *Cl. putrificum* в составе некробиома шерсти на 30-е сутки) до 39,3% (количество *Cl. putrificum* в составе некробиома ложа трупа на 136-е сутки) **(табл. 2)**. Наименьшую протеолитическую активность в отношении казеина установили у психрофилов группы псевдомонад — 0,41 и 1,22 мм/мл, на 30-е и 136-е сутки соответственно. Несмотря на увеличение численности *Pseudomonas* spp. на 136-е сутки **(см. табл. 2)** и повышение их ферментативной активности почти в 3 раза **(см. рисунок)**, во всех исследованных образцах основной контроль процессов аммонификации белков принадлежал спорогенным культурам рода *Bacillus — B. mycoides, B. subtilis* и *Clostridium — Cl. putrificum, Cl. sporogenes.*

Таким образом, интенсивность гнилостного разложения трупа зависит как от срока посмертного периода и температуры окружающей среды, так и от количества эффективных протеолитиков, к которым можно отнести мезофильные микроорганизмы рода *Bacillus* и *Clostridium*.

На 30-е сутки при температуре почвы и воздуха 11,6 и 14,7 °С в исследованных образцах доминировали представители рода *Bacillus*. Среди бацилл процент активных продуцентов протеаз изменялся от 22,2 (фрагменты костей) до 63,5% (фрагменты копыт). К 136-м суткам температура окружающей среды снизилась до 3,0—4,5 °С и в образцах стали доминировать психрофильные псевдомонады, среди которых относительное количество штаммов, продуцирующих протеиназы, изменялось от 38,1 (фрагменты шерсти) до 61,2% (фрагменты копыт).

При благоприятных условиях окружающей среды для мезофиллов на 30-е сутки, а для психрофилов на 136-е сутки отметили увеличение активности гидролиза субстрата во внешней среде, что вызвало транспорт низкомолекулярных продуктов ферментации в клетки и повышение синтеза экзоферментов для *Bac. mycoides* в 2,3 раза, *Bac. cereus* в 1,8 раза, *Cl. putrificum* в 1,7 раза, *Cl. sporogenes* в 2,8 раза и для *Pseudomonas sp*. в 2,9 раза ($p<0,01$).

При анализе полученных результатов необходимо учитывать, что на активность синтеза экзоферментов у исследованных культур некробионтов может влиять как общая регуляция метаболизма микроорганизмов, так и частные процессы в клетке: спорообразование, подвижность клеток или их компетентность к ДНК-трансформации. У типичных представителей посмертного микробиома, бактерий рода *Bacillus,* синтез протеаз и амилаз может подавляться в фазе экспоненциального роста, но в стационарной фазе происходит его дерепрессия [26]. В конце экспоненциальной фазы роста, когда истощается запас легкометаболируемых низкомолекулярных субстратов, у бацилл возникает потребность в экзоферментах, обеспечивающих поступление питательных веществ в результате активного разложения белков.

Применение многомерного анализа позволило выявить две значимые главные компоненты (ГК) — срок разложения (ГК 1) и протеолитическую активность выделенных видов микроорганизмов (ГК 2). Срок разложения меняет некробиом трупа, и важными индикаторами на исследуемых субстратах являются виды *Bac. mycoides* и *Bac. Subtilis*, *Pseudomonas* spp.*, Cl. putrificum* и *Cl. sporogenes,* однако между ними существует временное разграничение. На 30-е сутки посмертного периода были активны только представители рода *Bacillus*, а в поздний период — оставшиеся виды микроорганизмов. Эта зависимость прослеживалась на всех субстратах исследования (копыта, кости, шерсть, ложе).

Вторая главная компонента разделяет микроорганизмы, обнаруженные на копытах трупа и в его ложе на 136-е сутки. В данном случае установлена существенная разница в протеолитической активности видов, выделенных в пробах с различных участков копыт, костей, шерсти и ложа трупа на одном сроке посмертного периода. Наибольшую нагрузку здесь несут виды, составляющие комплекс микроорганизмов на копытах на 136-е сутки постмортального периода: превалирует *Pseudomonas* spp., составляя более 60% **(см. табл. 2)**. Виды, обнаруженные в ложе трупа в тот же срок, имели наименьшую протеолитическую активность.

## Выводы

1. Выявлена специфика путрификации трупа под действием протеолитических ферментов псевдомонад, бацилл и клостридий, которая выражалась в изменении количества штаммов некробионтов, продуцирующих протеазы в составе целого трупа и его фрагментов при гниении на воздухе к 30-м и 136-м суткам посмертного периода.

2. Оценена протеолитическая активность некробионтов в различные сроки путрификации с изменением температуры окружающей среды. Для мезофильных некробионтов — представителей родов *Bacillus* и *Clostridium* увеличение срока путрификации на 106 сут и снижение температуры среды на 10 °С вызвало снижение протеолити-

ческой активности, а для *Pseudomonas* — увеличение эффективности гидролиза белка.

3. Показаны особенности видового состава микроорганизмов в зависимости от срока разложения трупа с изменением температурного фактора: смена видов микроорганизмов, способных к аммонификации белков трупа, проявилась в разнонаправленном доминировании мезофильных представителей родов *Bacillus* и *Clostridium* и психрофильных *Pseudomonas*. Максимальная активность для *Bacillus* и *Clostridium* зафиксирована при температуре окружающей среды 11,6—14,7 °С, а для *Pseudomonas* при 3—4,5 °С.

4. С помощью полученных данных возможны создание дополнительной методики установления сроков посмертного периода, базирующейся на изменениях активности микроорганизмов, и более объективная диагностика повреждений трупа и его фрагментов в процессе путрификации.

5. Дальнейшие исследования должны быть направлены на выявление степени влияния отдельных факторов окружающей среды на посмертную активность микробной флоры.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

*Статья подготовлена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания №656-17.*

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Туманов Э.В., Кильдюшов Е.М., Соколова З.Ю. *Судебно-медицинская танатология*. М.: НП ИЦ ЮрИнфоЗдрав. 2012. [Tumanov EV, Kil'dyushov EM, Sokolova ZYu. *Sudebno-meditsinskaya tanatologiya*. M.: NP ITs YurInfoZdrav. 2012. (In Russ.)].
2. Jiron LF, Cortin VM. Insect succession in the decomposition of a mammal in Costa Rica. *NY Ent Soc.* 1981;89(3):158-165.
3. Марченко М.И. *Судебно-медицинское значение энтомофауны трупа для определения давности наступления смерти*: Дис. ... канд. биол. наук. Л. 1987. [Marchenko MI. *Sudebno-meditsinskoe znachenie entomofauny trupa dlya opredeleniya davnosti nastupleniya smerti*: Dis. ... kand. biol. nauk. L. 1987. (In Russ.)].
4. Марченко М.И. Влияние климатических факторов на продолжительность биологического разложения трупа насекомыми-некробионтами в условиях Северо-Запада Европейской части России. *Энтомологическое обозрение.* 1992;71(3):557-568. [Marchenko MI. Effect of climatic factors on duration of the biological decomposition of cadaver by necrobiont insect in Northwestern European part of Russia. *Entomol oboz.* 1992;71(3):557-568. (In Russ.)].
5. Galal Lamia AA, Abd-El-hameed Saly Y, Attia Rasha AH, Uonis Doaa A. An initial study on arthropod succession on exposed human tissues in assuit, Egypt. Mansoura. *J Forensic Med Clin Toxicol.* 2009;7(1):55-74.
6. Шевченко И.Н., Голубович Л.Л., Куртев А.В. Динамика разложения трупа. *Судово-медична експертиза.* 2012;5:26-29. [Shevchenko IN, Golubovich LL, Kurtev AV. The dynamic of putrefaction of death body. *Sudovo-medichna ekspertiza*. 2012;5:26-29. (In Ukr.)].
7. Богомолов Д.В., Таргашин А.В., Павлова А.З., Денисова О.П., Аммурадов А.Х., Пирязева Е.А., Бобров А.П. *Применение микологических и энтомологических исследований при проведении судебно-медицинской экспертизы трупа для установления давности наступления смерти и возможности посмертного перемещения тела: методические рекомендации*. М. 2014. [Bogomolov DV, Targashin AV, Pavlova AZ, Denisova OP, Amanmuradov AKh, Piryazeva EA, Bobrov AP. *Primenenie mikologicheskikh i entomologicheskikh issledovanii pri provedenii sudebno-meditsinskoi ekspertizy trupa dlya ustanovleniya davnosti nastupleniya smerti i vozmozhnosti posmertnogo peremeshcheniya tela: metodicheskie rekomendatsii*. M. 2014. (In Russ.)].
8. Johnson HR, Trinidad DD, Guzman S, Khan Z, Parziale JV, DeBruyn JM, Lents NH. A machine learning approach for using the postmortem skin microbiome to estimate the postmortem interval. *PLOS ONE.* 2016;11(12):e0167370. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167370
9. Lawrie RA. *Meat Science*. New York: Pergamon Press. 1966.
10. Ratledge C. *Biochemistry of microbial degradation*. Dordrecht: Kluwer. 1993.
11. Priest FG. Extracellular enzyme synthesis in the genus Bacillus. *Bacteriol Rev*. 1977;41(3):711-753.
12. Msadek T. When the going gets tough: survival strategies and environmental ignaling networks in Bacillus subtilis. *Trends Microbiol*. 1999;7(5):201-207. https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01479-1
13. Veening J-W, Igoshin OA, Eijlander RT, Nijland R, Hamoen LW, Kuipers OP. Transient heterogeneity in extracellular protease production by Bacillus subtilis. *Mol Syst Biol*. 2008;4(184):1-15. https://doi.org/10.1038/msb.2008.18
14. Лабинская А.С. *Микробиология с техникой микробиологических исследований*. М.: Медицина. 1978. [Labinskaya AS. *Mikrobiologiya s tekhnikoi mikrobiologicheskikh issledovanii*. M.: Meditsina. 1978. (In Russ.)].
15. *Современная микробиология: Прокариоты.* В 2 т. Т.2. Пер. с англ. Под ред. Ленгелера Й, Древса Г., Шлегеля Г.М. М.:Мир. 2005. [*Sovremennaya mikrobiologiya: Prokarioty*. V 2 t. T.2. Per. s angl. Pod red. Lengelera I, Drevsa G, Shlegelya G. M.: Mir. 2005. (In Russ.)].
16. Leshchinskaya IB, Shakirov EV, Itskovitch EL, Balaban NP, Mardanova AM, Sharipova MR, Viryasov MB, Rudenskaya GN, Stepanov VM. Glutamylendopeptidase of Bacillus intermedius strain 3-19. *FEBS Lett*. 1997;404:241-244. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)00113-0
17. Pottathil M, Lazazzera BA. The extracellular phr peptide rap phosphatase signaling circuit of Bacillus subtilis. *Front Biosci*. 2003;8:32-45. https://doi.org/10.2741/913
18. Nascimento WCA, Martins MLL. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic Bacillus spp. *Brazil J Microbiol.* 2004;35(1-2):91-96. https://doi.org/10.1590/s1517-83822004000100015
19. Балабан Н.П., Марданова А.М., Маликова Л.А., Ильинская О.Н., Шарипова М.Р. Биосинтез субтилизиноподобной протеиназы Bacillus amyloliquefaciens H2 и биологические свойства фермента. *Ученые записки Казанского ун-та. Серия: Естественные науки*. 2008;2(150):81-90. [Balaban NP, Mardanova AM, Malikova LA, Ilinskaya ON, Sharipova MR. The biosynthesis of the Bacillus amyloliquefaciens H2 subtilisin-like proteinase and its biological activity. *Uchen zap Kazan un-ta. Ser Estestv nauki*. 2008;2(150):81-90. (In Russ.)].
20. Петрова И.С., Винцюнайте М.Н. Определение протеолитической активности энзимных препаратов микробного происхождения. *Прикладная биохимия и микробиология*. 1966;1(2):322-327. [Petrova IS, Vintsyunaite MN. Determination of the proteolytic activity of enzyme preparations of microbial origin. *Prikl biokhimiya i mikrobiol.* 1966;1(2):322-327. (In Russ.)].
21. *Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123)*. Страсбург. 1986 Март 18. [*Evropeiskaya konventsiya o zashchite pozvonochnykh zhivotnykh, ispol'zuemykh dlya eksperimentov ili v inykh nauchnykh tselyakh (ETS N123)*. Strasburg 1986 March 18. (In Russ.)].
22. Приказ Минздрава СССР №755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» от 12.08.77. [Prikaz Minzdrava SSSR №755 «O merakh po dal'neishemu sovershenstvovaniyu organizatsionnykh form raboty s ispol'zovaniem eksperimental'nykh zhivotnykh» ot 12.08.77. (In Russ.)].
23. Лябзина С.Н., Приходько А.Н., Лаврукова О.С. Метод изучения некрофильных насекомых на трупах крупных животных. *Принципы экологии*. 2016;2(5):91-98. [Lyabzina SN, Prichodko AN, Lavrukova OS. Method of studying necrophilic insects on the corpses of large size animals. *Principy èkologii*. 2016;2(5):91-98. (In Russ.)]. https://doi.org/10.15393/j1.art.2016.5022
24. Сидорова Н.А., Лаврукова О.С., Лябзина С.Н., Приходько А.Н. Каталогизация микроорганизмов в составе микробиома трупа. *Journal of Biomedical Technologies.* 2016;1:24-34. [Sidorova NA, Lavrukova OS, Lyabzina SN, Prikhod'ko AN. Catalogization of microorganisms in composition of the corpse microbiome. *Journal of Biomedical Technologies.* 2016;1:24-34. (In Russ.)]. https://doi.org/10.15393/j6.art.2016.3502
25. Ивантер Э.В., Коросов А.В. *Элементарная биометрия*. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ. 2010. [Ivanter EV, Korosov AV. *Elementarnaya biometriya*. Petrozavodsk: Izd-vo PetrGU. 2010. (In Russ.)].
26. Gottschalk G. *Bacterial metabolism*. 2nd ed. New York: Springer. 1986.