

# 文昌航天发射场室内外可培养微生物的分离与鉴定

刘倩倩<sup>1</sup>, 姚琼<sup>2</sup>, 王宁<sup>2</sup>, 赵永<sup>2</sup>, 白苗苗<sup>1</sup>, 冯亚丽<sup>1</sup>, 陈娜娜<sup>1</sup>, 肖葵<sup>1\*</sup>

1. 北京科技大学新材料技术研究院腐蚀与防护中心, 北京 100083

2. 西昌卫星发射中心, 西昌 615000

**摘要** 空间站中的微生物可能会威胁到宇航员的健康和设备的可靠性, 影响空间站的长期在轨运行。航天器的AIT厂房(总装、集成、测试)、运输和发射环境是中国空间站主要的地面微生物污染源, 采用自然沉降法收集了文昌发射场AIT厂房、加注厂房、员工宿舍、发射塔半封闭厂坪、发射塔通风井、环境试验站6个区域的空气微生物样本, 并运用传统的培养法和Sanger测序法对菌株进行了分离鉴定。通过对生物样品的分离纯化, 共获得了35株细菌和57株真菌。菌株的基因序列分析表明优势细菌属有芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*), 优势真菌属有弯孢属(*Curvularia*)、曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)。部分优势菌对空间站内部的系统和设备有潜在的微生物腐蚀危害。

**关键词** 航天器组装环境; AIT厂房; 空间站; 空气微生物; 16S rRNA; ITS rDNA

空间站在运行中具有密闭、控温控湿、宇宙辐射较高和微重力等特点, 使其成为较为独特的室内生长环境<sup>[1]</sup>。对国内外空间站的调查表明, 空间站的封闭环境为许多微生物的生长提供了有利条件。据统计, 1998—2004年, Novikova等<sup>[2]</sup>从国际空间站(ISS)的空气和内部结构表面收集的500多个样本

中分离鉴定了大量细菌和真菌, 其中空气和结构表面中最多的细菌属是葡萄球菌属(*Staphylococcus*), 最多的真菌属是曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)和枝孢属(*Cladosporium*)。俄罗斯和平号空间站(Mir)也发现了类似的结果。Mir在服役的15年间共鉴定了108种细菌和126种真菌, 并且在

收稿日期: 2022-06-20; 修回日期: 2022-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(51971032, 52071019)

作者简介: 刘倩倩, 博士研究生, 研究方向为微生物腐蚀, 电子信箱: 18811343972@126.com; 肖葵(通信作者), 研究员, 研究方向为金属材料腐蚀与防护, 电子信箱: xiaokui@ustb.edu.cn

引用格式: 刘倩倩, 姚琼, 王宁, 等. 文昌航天发射场室内外可培养微生物的分离与鉴定[J]. 科技导报, 2023, 41(7): 114-126; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2023.07.012

细菌中发现了机会性病原体,在真菌中发现了可能引起真菌病和真菌中毒的致病性腐生菌<sup>[3]</sup>。中国航天员也从“天宫一号”空间站中采集了冷凝水和表面样品,利用神州八号和神州九号载人飞船返回舱将样品带回地面,研究人员分离鉴定了10个属的细菌,包括鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、葡萄球菌属等<sup>[4]</sup>。长期的飞行任务也暴露出空间微生物安全问题。比如,Mir的管道、水循环系统、电气连接器、散热器、空调、导航窗和热控制系统等都遭受了微生物污染<sup>[5]</sup>,而ISS的水处理组件出现了生物膜堵塞问题<sup>[6]</sup>。宇航员也被报道了各种可能由微生物引起的健康问题,包括胃肠不适、呼吸系统疾病、皮肤刺激和感染等<sup>[7-8]</sup>。因此,微生物群落不仅会影响空间站内的环境卫生条件,造成宇航员致病性感染,还可能影响空间设备的可靠性以及造成材料的结构生物损伤<sup>[5,9-10]</sup>。虽然中国之前的短期飞行任务尚未有微生物安全问题报道,但同样存在空间站内微生物大量生长的隐患。中国空间站预计在轨运行10年以上,如果任由微生物过量繁殖,类似于Mir和ISS的微生物安全问题将会重演。因此,必须及早发现微生物污染物的源头并采取措施防止其生长。

空间站中的微生物污染物有不同的来源,包括在制造和组装过程中对航天材料和装备的初始污染、乘员自体携带的微生物群、空间站来访的航天器及其货物所携带的微生物等<sup>[11-13]</sup>。其中,空间站的组装环境是引入微生物的最主要的来源之一。为了最大限度地减少污染,航天器一般在洁净室中进行组装。洁净室环境具有严格的清洁和维护程序(控制空气循环、温度、湿度)以及苛刻的洁净室条件(低营养水平、干燥),甚至被认为是不利于微生物生长繁殖的“极端环境”<sup>[14]</sup>。然而,越来越多的研究工作表明,即使在这种“极端环境”中,依然有多种微生物群存在,并且表现出对干燥、消毒剂和紫外线照射等一系列的抗性<sup>[15-16]</sup>。目前,各种微生物分析的方法已经被用来评估中国航天器组装、集成与测试厂房(AIT厂房)内的微生物污染。张兰涛等<sup>[17]</sup>对北京、天津、酒泉3个地区的AIT厂房进行

空气采样,经培养鉴定发现空气中的霉菌主要有青霉、曲霉和枝孢,细菌主要有芽孢杆菌属、葡萄球菌属和微球菌属(*Micrococcus*)。并且,受到不同气候条件、厂房特征和人员管理等因素的影响,各AIT中心的空气微生物分布具有明显的地区差异。Rcheulishvili等<sup>[18]</sup>从中国空间站组装洁净室中分离出的细菌主要有芽孢杆菌属、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和短波单胞菌属(*Brevundimonas*),真菌主要有青霉属、曲霉属和枝孢菌属。他们还从设备表面分离出了耐酸和耐铝微生物,这些耐极端环境的微生物可能会引起铝发生微生物腐蚀(MIC)。尽管微生物分析的结果强烈依赖于时间、地点、方法和其他因素(洁净室维护、任务状态等),但这些研究都揭示了洁净室中微生物的多样性。航天器组装环境中微生物的多样性和持久性也表明,需要经常对微生物群落进行调查,并制定全面的清洁和维护规程。

空气采样是评估洁净室空气过滤效果和人类活动对环境微生物多样性影响的重要手段。本研究通过自然沉降法采集了文昌发射场的厂房、员工宿舍以及室外运输环境的空气样本,涵盖了空间站总装、集成、测试、运输和发射等环境区域。利用传统培养法和Sanger双脱氧测序技术对空气中可培养微生物进行了系统的检测和分类。

## 1 实验设计

### 1.1 采样方法和地点

参照标准GB/T 18204.3—2013,采用自然沉降法对发射场室内外的空气微生物进行采集。按照均匀布点的原则布置,室内3个采样点设置在室内对角线4等分的3个等分点上,半封闭室外环境的采样点按照同样的方法布置。为了减少空气流动的影响,采样点避开了通风口、通风道,同时避开人群的呼气流。采样区域分别是发射场内的环境试验站(No.1)、AIT厂房(No.2)、加注厂房(No.3)、卫星发射塔通风井(No.4)、卫星发射塔半封闭敞坪(No.5)、宿舍(No.6)。采样区域的气象测量见表1。可以看出,不同采样区域之间温度差异性不大,但是湿度存在显著性差异。采样时,打开培养皿盖,

表1 采样区域的温度和湿度

采样区域 编号	采样区域 名称	温度/°C	湿度/%
1	环境试验站(室外)	33.1	70
2	AIT厂房(室内)	27.2	50
3	加注厂房(室内)	30.1	70
4	发射塔通风井(室外)	30.7	80
5	发射塔半封闭敞坪(室外)	29.9	84
6	员工宿舍(室内)	29.8	83

将其暴露在离地面 1.5 m 高度的空气中 5 min, 本次共采集了 36 个样本。

### 1.2 微生物分离、纯化和鉴定

使用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和Luria-Bertani(LB)培养基分别收集空气中的真菌和细菌。采集到微生物后,将培养基低温保存(4°C),并于4 h内转移到实验室。PDA平板在25°C下培养3~7 d, LB平板在37°C下有氧培养24~48 h。分别挑取LB和PDA上的所有菌落,直到分离出纯菌株为止。

对纯化的菌株进行种属鉴定。使用真菌基因组DNA提取试剂盒(EE141-PlantZol, TRAN, 中国)对真菌基因组DNA进行提取。采用通用引物序列ITS-1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3')和ITS-4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')<sup>[9]</sup>, 扩增核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacers and 5.8S rDNA, ITS)。DNA的ITS基因序列PCR扩增反应体系(30 μL): Mix为15 μL, 引物ITS1、ITS4各为1.5 μL, 基因组模板1~2 μL, 其余的用水补齐至30 μL。PCR扩增条件: 95°C预变性5 min, 95°C变性30 s, 50°C退火30 s, 72°C延伸30 s, 30个循环, 72°C延伸7 min。用细菌基因组DNA提取试剂盒(EE141-PlantZol, TRAN, 中国)对分离到的细菌进行基因组DNA提取。采用引物序列为27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')扩增细菌16S rRNA片段。16S rRNA基因PCR扩增反应体系(30 μL): Mix为15 μL, 引物27F、1492R各为1.5 μL, 基因组模板1~2 μL, 其余的用水补齐至30 μL。PCR扩增条件: 95°C预变性5 min, 95°C变性

30 s, 57°C退火30 s, 72°C延伸1 min 30 s, 30个循环, 72°C延伸7 min。PCR扩增产物由北京睿博兴科生物技术有限公司进行测序。

### 1.3 系统发育树分析

使用DNASTAR Lasergene软件包SeqMan将所得到的2条互补序列进行拼接,然后在NCBI数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行BLAST基本序列比对。在BLAST结果中下载与已知序列相似度高的参考序列(覆盖度>90%, 相似度>97%), 使用MAFFT(<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>)将已知序列与参考序列进行多重序列比对<sup>[20]</sup>。用Gblocks 0.91b<sup>[21]</sup>选择序列保守区, 使用软件IQTREE<sup>[22]</sup>以最大似然法(maximum likelihood, ML)建立系统发育树。根据贝叶斯信息准则(Bayesian information criterion, BIC)选择最佳碱基替代模型, 运算次数为1000次。使用生命树交互网站(<https://itol.embl.de/>)对构建的进化树进行编辑标示。测序质量较高的16S rRNA和ITS rDNA基因序列已全部上传至NCBI的GenBank核酸序列数据库。

### 1.4 统计学分析

本研究采用分离频率(isolation frequency, IF)比较和判断优势菌群, 定义为某一指定类真菌或细菌的菌株数量占分离培养的菌株数量的百分率<sup>[23]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 发射场室内外空气中可培养细菌的群落组成

本研究中共获得35株测序质量较高的细菌16S rRNA序列, 测序得到的16S rRNA基因的序列长度约为1400 bp, 将序列上传至NCBI, 获得细菌的GenBank登录号为MW052566~MW052600。表2是发射场不同区域内空气细菌群落分布。

将测得的序列与已知的参考菌株序列进行联配, 并基于16S rRNA进行分子系统发育多样性分析, 得到的最大似然树如图1所示。ML树表明, 35株细菌与相应目的代表性菌株形成7个主分支, 分别归属于微球菌目(Micrococcales)、芽孢杆菌目(Bacillales)、鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)、海洋螺菌目(Oceanospirillales)、弧菌目(Vibrionales)

表2 发射场室内外空气中可培养细菌的菌株数和分离频率

属和种	菌株数 <i>n</i>	分离频率/%	采样区域	GenBank 登录号
<b><i>Bacillus</i></b>	21	60.0	3,5,4	
<i>B. aerius</i>	2	5.7	5	MW052592/593
<i>B. cereus</i>	8	22.9	4,5	MW052579/583/584/585/586/587/596/597
<i>B. firmus</i>	1	2.9	4	MW052581
<i>B. gibsonii</i>	1	2.9	4	MW052582
<i>B. marisflavi</i>	1	2.9	5	MW052590
<i>B. megaterium</i>	4	11.4	5	MW052589/595/599/600
<i>B. subtilis</i>	1	2.9	4	MW052588
<i>B. velezensis</i>	3	8.6	3,5	MW052570/571/598
<b><i>Curtobacterium</i></b>	3	8.6	2,4,5	
<i>C. luteum</i>	3	8.6	2,4,5	MW052573/578/594
<b><i>Halomonas</i></b>	1	2.9	4	
<i>H. johnsoniae</i>	1	2.9	4	MW052580
<b><i>Pseudomonas</i></b>	5	14.3	3,4	
<i>P. guguanensis</i>	3	8.6	4	MW052575/576/577
<i>P. psychrotolerans</i>	2	5.7	3	MW052566/567
<b><i>Sphingobium</i></b>	1	2.9	2	
<i>S. rhizovicinum</i>	1	2.9	2	MW052572
<b><i>Staphylococcus</i></b>	3	8.6	3	
<i>S. capitis</i>	2	5.7	3	MW052568/569
<i>S. haemolyticus</i>	1	2.9	3	MW052574
<b><i>Vibrio</i></b>	1	2.9	5	
<i>V. owensii</i>	1	2.9	5	MW052591
总计	35			

注:采样区域为1—环境试验站;2—AIT厂房;3—加注厂房;4—发射塔通风井;5—发射塔半封闭敞坪;6—员工宿舍。

和假单胞菌目(Pseudomonadales)。其中,芽孢杆菌目的分离频率最高,其次是假单胞菌目。从表2可知,35个细菌分离株归属于7属16个种:芽孢杆菌属、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、假单胞菌属、鞘脂菌属(*Sphingobium*)、葡萄球菌属和弧形菌属(*Vibrio*)。从表2可知,芽孢杆菌属和假单胞菌属是发射场室内外空气中最常见的细菌属。其中,芽孢杆菌属的分离频率为60%,涵盖8个不同的物种,分别是:气芽孢杆菌(*B. aerius*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、坚强芽孢杆菌(*B. firmus*)、吉氏芽孢杆菌(*B. gibsonii*)、黄海芽孢杆菌(*B. marisflavi*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*),最常见的是蜡状芽孢杆菌。假单胞菌属的分离频率为14.3%,包括谷关假单胞菌(*P.*

*guguanensis*)和耐冷假单胞菌(*P. psychrotolerans*)2个物种。AIT厂房(NO.2)中仅分离出短小杆菌属和鞘脂菌属。

## 2.2 发射场室内外空气中可培养真菌的群落组成

本研究中共获得62株测序质量较高的真菌ITS rDNA序列。测序得到的ITS rDNA序列长度约为500~600 bp。将序列上传至NCBI,获得真菌的GenBank登录号为MW077043~MW077104。表3是发射场不同区域内空气真菌群落分布表,其中有从采样点获得的菌株数、菌株的分离频率以及它们的GenBank登录号。

将测得的序列与已知的参考菌株序列进行联配,并基于ITS rDNA进行分子系统发育多样性分析,得到的最大似然树如图2所示。ML树表明,62株真菌与相应目的代表性菌株形成7个主分支,分

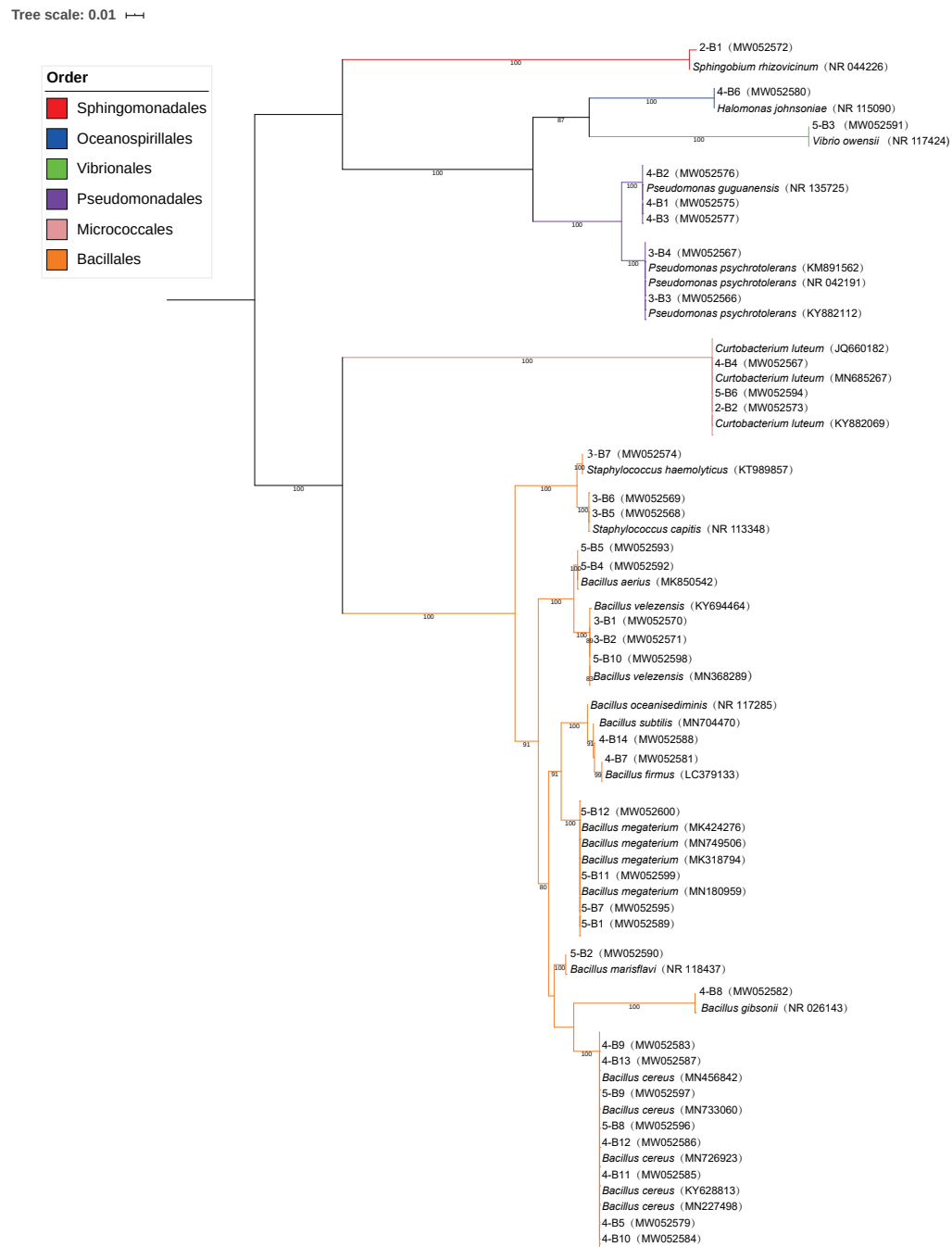


图1 基于16S rRNA序列构建的细菌的最大似然树

别归属于伞菌目(Agaricales)、多孔菌目(Polyporales)、假毛球壳目(Trichosphaeriales)、肉座菌目(Hypocreales)、煤炱目(Capnodiales)、散囊菌目(Eurotiales)和格孢腔菌目(Pleosporales)。其中,散囊菌目和格孢腔菌目所占的比例最高。在分离的62个真菌菌株中,鉴定出18个属,22个不同的物种,其中仅1个菌株鉴定到属水平(表3)。弯孢属、

曲霉属和青霉属是空气中最常见的真菌属:弯孢属有22个分离菌株,占真菌总分离株数的35%以上,种类包括美洲弯孢霉(*C. americana*)、画眉草弯孢(*C. eragrostidis*)、膝曲弯孢霉菌(*C. geniculata*)和新月弯孢菌(*C. lunata*);其次,曲霉菌和青霉菌各占16%以上。曲霉属包括棘孢曲霉(*A. aculeatus*)和杂色曲霉(*A. versicolor*),以及青霉属包括灰黄青霉

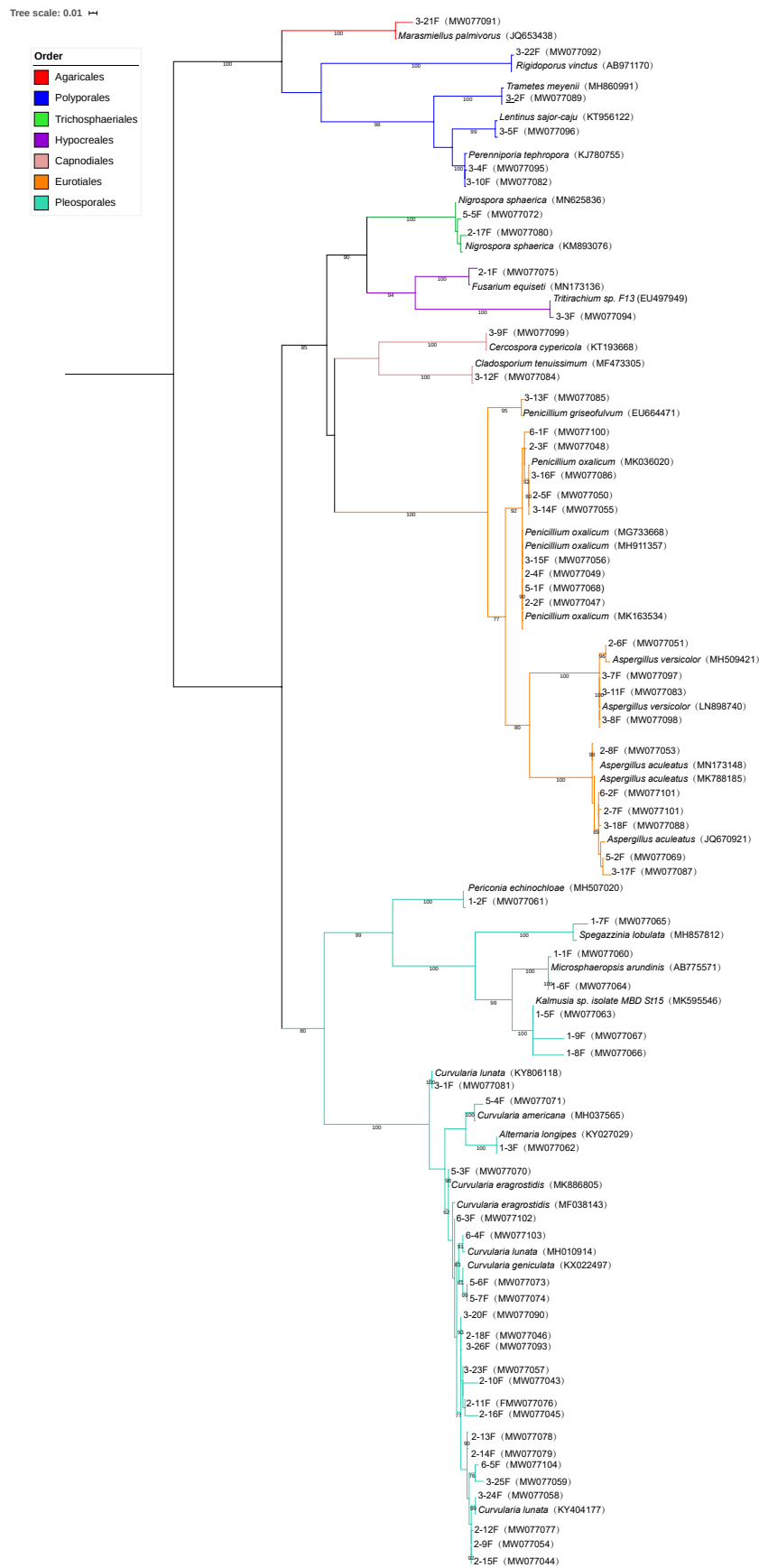


图2 基于ITS rDNA序列构建的真菌的最大似然树

表3 发射场室内外空气中可培养真菌的菌株数和分离频率

属和种	菌株数 <i>n</i>	分离频率/%	采样区域	GenBank 登录号
<b><i>Alternaria</i></b>	1	1.6	1	
<i>A. longipes</i>	1	1.6	1	MW077062
<b><i>Aspergillus</i></b>	10	16.1	2, 3, 5, 6	
<i>A. aculeatus</i>	6	9.7	2, 3, 5, 6	MW077052/053/069/087/088/101
<i>A. versicolor</i>	4	6.5	2, 3	MW077051/083/097/098
<b><i>Cercospora</i></b>	1	1.6	3	
<i>C. cypericola</i>	1	1.6	3	MW077099
<b><i>Cladosporium</i></b>	1	1.6	3	
<i>C. tenuissimum</i>	1	1.6	3	MW077084
<b><i>Curvularia</i></b>	22	35.5	2, 3, 5, 6	
<i>C. americana</i>	1	1.6	5	MW077071
<i>C. eragrostidis</i>	2	3.2	5, 6	MW077070/102
<i>C. geniculata</i>	2	3.2	5	MW077073/074
<i>C. lunata</i>	17	27.4	2, 3, 6	MW077043/044/045/046/054/057/058/059/076/077/078/ 079/081/090/093/103/104
<b><i>Fusarium</i></b>	1	1.6	2	
<i>F. equiseti</i>	1	1.6	2	MW077075
<b><i>Kalmusia</i></b>	3	4.8	1	
<i>K. italica</i>	3	4.8	1	MW077063/066/067
<b><i>Lentinus</i></b>	1	1.6	3	
<i>L. sajor-caju</i>	1	1.6	3	MW077096
<b><i>Marasmiellus</i></b>	1	1.6	3	
<i>M. palmivorus</i>	1	1.6	3	MW077091
<b><i>Microsphaeropsis</i></b>	2	3.2	1	
<i>M. arundinis</i>	2	3.2	1	MW077060/064
<b><i>Nigrospora</i></b>	2	3.2	2, 5	
<i>N. sphaerica</i>	2	3.2	2, 5	MW077072/080
<b><i>Penicillium</i></b>	10	16.1	2, 3, 5, 6	
<i>P. griseofulvum</i>	1	1.6	3	MW077085
<i>P. oxalicum</i>	9	14.5	2, 3, 5, 6	MW077047/048/049/050/055/056/068/086/100
<b><i>Perenniporia</i></b>	2	3.2	3	
<i>P. tephropora</i>	2	3.2	3	MW077082/095
<b><i>Periconia</i></b>	1	1.6	1	
<i>P. echinochloae</i>	1	1.6	1	MW077061
<b><i>Rigidoporus</i></b>	1	1.6	3	
<i>R. vinctus</i>	1	1.6	3	MW077092
<b><i>Spegazzinia</i></b>	1	1.6	1	
<i>S. lobulata</i>	1	1.6	1	MW077065
<b><i>Trametes</i></b>	1	1.6	3	
<i>T. meyenii</i>	1	1.6	3	MW077089
<b><i>Tritirachium</i></b>	1	1.6	3	
<i>Unclassified</i>	1	1.6	3	MW077094
总计	62			

注:采样区域为1—环境试验站;2—AIT厂房;3—加注厂房;4—发射塔通风井;5—发射塔半封闭敞坪;6—员工宿舍。

(*P. griseofulvum*)和草酸青霉(*P. oxalicum*)。

### 2.3 发射场室内外空气微生物群落组成比较

表4为细菌和真菌在室内外的分布情况。

由表4可知,细菌室外分离频率是室内分离频率的近3倍。室内和室外细菌的种类有较大差异:室外分离出12个细菌物种,而室内只分离出5个。与细菌的分布情况相反,室内真菌的分离频率是室外真菌分离频率的3倍多,而且种类也更丰富。这可能是因为室内空气不流通以及人员活动,真菌孢

子极易在空气中累积。图3可以看出室内外优势真菌和细菌的分布情况。图3显示室内最常见的细菌是葡萄球菌属(34%)、芽孢杆菌属(22%)和铜绿假单胞菌属(22%);室外优势的细菌是芽孢杆菌属(73%)和铜绿假单胞菌属(11%)。室内最常见的真菌是弯孢属(36%),青霉和曲霉为室内第二大常见物种(19%)。室外最常见的真菌是弯孢属(35%),占第二位的菌是 *Kalmusia* (15%),其次是青霉属、曲霉属和小球壳孢属(10%)。青霉属和曲

表4 细菌和真菌的室内外分布情况

菌种类型	采样环境	总菌株数 <i>n</i>	分离频率/%	采样区域	分离的物种				
细菌	室内	9	25.7	2	<i>Sphingobium rhizovicinum</i> <i>Curtobacterium luteum</i>				
				3	<i>Bacillus velezensis</i> <i>Pseudomonas psychrotolerans</i> <i>Staphylococcus capitis</i>				
					4	<i>Bacillus cereus/ firmus/ gibsonii/ subtilis</i> <i>Pseudomonas guguanensis</i> <i>Curtobacterium luteum</i>			
						<i>Halomonas johnsoniae</i>			
				5	<i>Bacillus aerius/megaterium/velezensis/marisflavi/cereus</i> <i>Curtobacterium luteum</i> <i>Vibrio owensii</i>				
	室外	26	74.3	2	<i>Aspergillus aculeatus/versicolor</i> <i>Curvularia lunata</i>				
					<i>Fusarium equiseti</i> <i>Nigrospora sphaerica</i> <i>Penicillium oxalicum</i>				
				3	<i>Aspergillus aculeatus/versicolor</i> <i>Cercospora cypericola</i> <i>Cladosporium tenuissimum</i> <i>Curvularia lunata</i> <i>Lentinus sajor-caju</i>				
					6	<i>Marasmiellus palmivorus</i> <i>Penicillium griseofulvum/oxalicum</i> <i>Perenniporia tephropora</i> <i>Rigidoporus vinctus</i> <i>Trametes meyenii</i> <i>Tritirachium sp. F13</i>			
						<i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Curvularia eragrostidis/lunata</i> <i>Penicillium oxalicum</i>			
				真菌	室内	47	75.8	3	<i>Aspergillus aculeatus/versicolor</i> <i>Cercospora cypericola</i> <i>Cladosporium tenuissimum</i> <i>Curvularia lunata</i> <i>Lentinus sajor-caju</i> <i>Marasmiellus palmivorus</i> <i>Penicillium griseofulvum/oxalicum</i> <i>Perenniporia tephropora</i> <i>Rigidoporus vinctus</i> <i>Trametes meyenii</i> <i>Tritirachium sp. F13</i>
									6

表4 细菌和真菌的室内外分布情况(续)

菌种类型	采样环境	总菌株数/n	分离频率/%	采样区域	分离的物种
真菌	室外	15	24.2		<i>Alternaria longipes</i>
					<i>Kalmusia italica</i>
					1 <i>Microsphaeropsis arundinis</i>
					<i>Periconia echinochloae</i>
					<i>Spegazzinia lobulata</i>
					<i>Aspergillus aculeatus</i>
					5 <i>Curvularia americana/eragrostidis/geniculata/</i>
					<i>Nigrospora sphaerica</i>
					<i>Penicillium oxalicum</i>

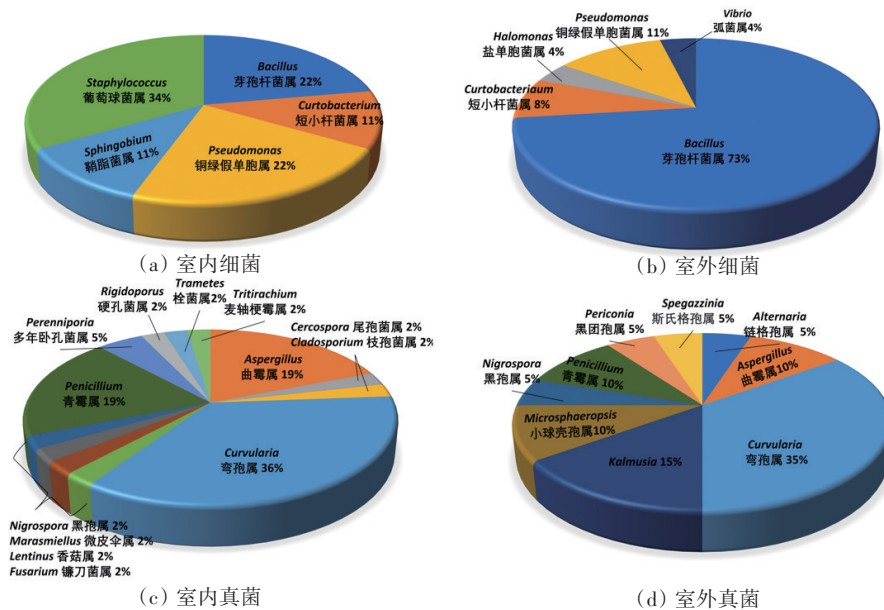


图3 室内外优势细菌和真菌的分布

霉菌广泛存在于发射场室内和室外环境中,对环境表现出了最大的适应性。

### 3 讨论

#### 3.1 AIT厂房中微生物的生理生化特性

本研究中,AIT厂房中检测到的微生物可以分为3类:(1)潜在致病菌;(2)对材料或设备有潜在危害的微生物;(3)不影响设备或机组人员健康的微生物。芽孢杆菌是细菌中最具代表性的菌属。芽孢杆菌可以产生椭圆形的内生孢子,使细菌能够处于休眠状态很长一段时间,并且内生孢子可以在

没有营养的情况下存活。研究发现,枯草芽孢杆菌内孢子对环境压力(如灭菌剂、有毒化学品、干燥剂、压力、极端温度、较高剂量的紫外线和电离辐射)的灭活具有很强的抵抗力,这将给灭菌工作带来很大的困难<sup>[24]</sup>。芽孢杆菌在世界各地的许多组装环境中都占主导地位,并且ISS和Mir也报告了类似的结果<sup>[3,13,25]</sup>。青霉和曲霉作为地面环境中最常见的真菌,同样在空间站也占据优势地位<sup>[26]</sup>。Salyut 6号、7号中发现了大量青霉、曲霉生长在非金属和非阳极化处理的铝合金表面<sup>[5]</sup>,并且这2种菌在地面的腐蚀研究中表现出较强的破坏性<sup>[27-29]</sup>。本研究中分离的杂色曲霉也被实验证实对PCB(印

刷电路板)有一定的腐蚀作用<sup>[30]</sup>。因此,青霉和曲霉对空间站内部的系统和设备有潜在的微生物腐蚀危害。

### 3.2 航天器微生物污染防治建议

从美国和俄罗斯太空计划中吸取的经验教训,应重视航天器微生物的控制和防护。做到以下2个方面至关重要:一方面经常对航天器表面以及AIT厂房的微生物群落进行监测;另一方面开发新的清洁/杀菌方法。

#### (1) 航天器微生物检查。

航天器在组装、测试和发射操作期间都暴露于严重的生物污染风险之中。因此,需要对航天器及其周围环境的微生物清洁度进行维护。定期对航天器硬件表面进行生物检测,必要时进行生物清洗。为了评估微生物污染的严重程度,欧洲航天局(ESA)和美国航天局(NASA)使用棉签或湿巾从航天器表面采集样品,经过萃取程序后,样本会受到短暂的热震(15 min, 80°C),然后将样本涂在TSA培养基上,最后计算微生物含量<sup>[31]</sup>。如果航天器硬件的表面污染超过了可接受限度,需使用酒精或异丙醇、消毒剂 and 紫外线等方法来减少微生物污染。另外,生物防护罩可以用来包围硬件,避免污染<sup>[32]</sup>。

#### (2) AIT厂房微生物控制和监测。

空间站的所有组装程序都在洁净室中进行,便于组装预先清洁和预先消毒的航天器硬件。因此,洁净室的微生物水平控制是非常重要的环节。洁净室通常保持在国际标准化组织(ISO)8级水平,空气中的颗粒物清洁度限制为3520000粒子 $>0.5\ \mu\text{m}/\text{m}^3$ (ISO标准:ISO 14644)<sup>[33]</sup>。通过严格的空气过滤和清洁,可以减少颗粒物的流入和停留时间。理论上,高效颗粒空气过滤器(HEPA)可以去除空气中99.97%大于0.3  $\mu\text{m}$ 的颗粒物。通过调节温度、湿度和压力梯度,再加上严格的维护和清洁制度,可以最大限度地减少微生物的持久性<sup>[34]</sup>。此外,工作人员需要配备特殊的洁净室服装,通常包括整体服装、裤子、帽子、眼镜、手套、鞋套和靴子等<sup>[13]</sup>。有研究表明,当工作人员穿洁净室服装时,携带微生物颗粒的分散速率大大降低,证明了这种措施的有效性<sup>[35]</sup>。洁净室中的人员还必须遵循特

定的程序,包括使用消毒工具、观察可能的生物风险,甚至需要进行频繁的健康检查。

装配洁净室中微生物的检测对于验证空气净化过程和确定可能的污染源非常的直观重要。微生物监测通常依据标准,基于培养的方法使用营养琼脂板对装配洁净室的空气和表面进行采样。随着空气和表面样品中颗粒物的减少,单位面积的菌落数(CFU)也相应减少。然而,除了基于培养的方法之外,还可以使用分子分析方法研究装配洁净室中微生物的多样性和丰度<sup>[36-37]</sup>。与培养法相比,分子方法具有更广泛的多样性,有助于全面地认识装配洁净室中的微生物群。

微生物清洁和防护方法从发射场室内外环境分离出的优势真菌(枝孢属、青霉属、曲霉属)和优势细菌(芽孢杆菌属、假单胞菌属)是普遍存在的且具有代表性,应重点针对这几种微生物对AIT厂房进行清洁和消毒。对于普通的微生物,常用的清洁试剂有异丙醇(70% v/v, IPA)、过氧化氢(例如klercide-CR)、碱性清洗剂(例如Kleenol 30),并辅以紫外、 $\gamma$ 辐射或气相 $\text{H}_2\text{O}_2$ 处理。定期吸尘、拖地也可以使微生物丰度大大降低<sup>[3]</sup>。对于枝孢属、曲霉属和青霉属等文昌发射场室内广泛存在的真菌,有研究发现4250Z(季铵盐消毒剂)适合作为消毒剂,它对枝孢属、曲霉属和青霉属有非常广的抗菌性<sup>[38]</sup>。大部分微生物在消毒剂的作用下会被杀灭,然而,对洁净室的维护为微生物创造了一个人工的、极端的生态环境,导致很多微生物对于环境压力的适应性变强,普通的消毒剂可能很难把它们杀灭,例如芽孢杆菌<sup>[39]</sup>。通常,芽孢杆菌对干燥、氧化和电离剂等各种灭菌处理具有抗性。因此,需要特别为这类细菌孢子开发清洁技术。如果使用溶剂类清洁剂,还要考虑到溶剂和材料的兼容性。

## 4 结论

针对文昌发射场内航天器的AIT厂房、运输、发射区域以及工作人员的宿舍进行空气微生物采集、培养和鉴定。对于细菌来说,芽孢杆菌在地面及空间站分布均占较大优势。同时,芽孢杆菌对灭

菌剂、极端温度、紫外线辐射和电离辐射的灭活具有很强的抵抗力,这给清洁灭菌工作带来很大挑战。对于真菌来说,曲霉属和青霉属在地面和空间站中均被大量检测到,说明它们对环境的适应能力以及繁殖能力较强,从而可能在空间站长期的飞行任务中威胁到内部的系统和设备的安全运行。因此,芽孢杆菌、青霉属和曲霉属应作为后续清洁、灭菌及微生物腐蚀研究重点关注的对象。此外,本文仅限于研究可培养微生物,传统的基于培养的方法低估了环境中微生物的多样性和丰富性。考虑到大部分菌株对于不同生长条件的巨大差异性,对多样性的全面评估必须结合分子方法,希望后续开展更为全面的微生物分析工作。

#### 参考文献(References)

- [1] Thirsk R, Kuipers A, Mukai C, et al. The space-flight environment: The International Space Station and beyond[J]. *Canadian Medical Association Journal*, 2009, 180(12): 1216-1220.
- [2] Novikova N, Boever P, Poddubko S, et al. Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station[J]. *Research in Microbiology*, 2006, 157(1): 5-12.
- [3] Novikova N D. Review of the knowledge of microbial contamination of the Russian manned spacecraft[J]. *Microbial Ecology*, 2004, 47(2): 127-132.
- [4] 刘长庭, 常德. 空间微生物学基础与应用研究[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2016.
- [5] Klintworth R, Reher H J, Viktorov A N, et al. Biological induced corrosion of materials II: New test methods and experiences from Mir station[J]. *Acta Astronautica*, 1999, 44(7): 569-578.
- [6] Weir N, Wilson M, Yoets A, et al. Microbiological characterization of the international space station water processor assembly external filter assembly S/N 01[C]//42nd International Conference on Environmental Systems. San Diego: AIAA, 2012: 3595.
- [7] Crucian B, Babiak A, Johnston S, et al. Incidence of clinical symptoms during long-duration orbital spaceflight[J]. *International Journal of General Medicine*, 2016, 9: 383-391.
- [8] Dunn C, Boyd M, Orengo I. Dermatologic manifestations in spaceflight: A review[J]. *Dermatology Online Journal*, 2018, 24(11): 1-8.
- [9] Novikova N D, Polikarpov N A, Poddubko S, et al. The results of microbiological research of environmental microflora of orbital station Mir[R]. Washington DC: SAE Technical Papers, 2001.
- [10] Alekhova T A, Aleksandrova A A, Novozhilova T I, et al. Monitoring of microbial degraders in manned space stations[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2005, 41(4): 435-443.
- [11] Checinska A, Probst A J, Vaishampayan P, et al. Microbiomes of the dust particles collected from the international space station and spacecraft assembly facilities[J]. *Microbiome*, 2015, 3(1): 1-18.
- [12] Nicholson W L, Schuerger A C, Race M S. Migrating microbes and planetary protection[J]. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(9): 389-392.
- [13] Mora M, Mahnert A, Koskinen K, et al. Microorganisms in confined habitats: Microbial monitoring and control of intensive care units, operating rooms, cleanrooms and the international space station[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1573.
- [14] Moissl C, Osman S, La Duc M T. Molecular bacterial community analysis of clean rooms where spacecraft are assembled[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2007, 61(3): 509-521.
- [15] 陆月盈, 杨建楼, 付玉明, 等. 航天器组装环境中极端微生物的筛选与特性[J]. *应用与环境生物学报*, 2021(1): 1-13.
- [16] 张文德, 王艳发, 马珺, 等. 航天器AIT厂房环境中嗜极微生物的筛选与鉴定[J]. *应用与环境生物学报*, 2020, 26(4): 766-774.
- [17] 张兰涛, 魏传锋, 白梵露. 载人航天器AIT中心微生物分布特征分析[J]. *航天器环境工程*, 2014, 31(4): 415-419.
- [18] Reheulishvili N, Papukashvili D, Shakir Y, et al. Acid and aluminium-tolerant microbes isolated from China space station assembly cleanroom surfaces and identified by 16S rRNA/ITS sequencing and MALDI-TOF MS[J]. *International Journal of Astrobiology*, 2021, 20(2): 133-141.
- [19] Lovinger D, White G, Weight F. NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat[J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 1990, 10(4): 1372-1379.

- [20] Katoh K, Standley D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(4): 772–780.
- [21] Dereeper A, Audic S, Claverie J M, et al. BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10(1): 1–6.
- [22] Trifinopoulos J, Nguyen L-T, Von Haeseler A, et al. W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W232–W235.
- [23] Wei J G, Xu T, Guo L D, et al. Endophytic Pestalotiopsis species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China[J]. *Fungal Diversity*, 2007, 24(1): 55–74.
- [24] Zhang Y, Zhang L, Li Z, et al. Microbiomes of China's space station during assembly, integration, and test operations[J]. *Microbial Ecology*, 2019, 78(3): 631–650.
- [25] Checinska Sielaff A, Urbaniak C, Mohan G B M, et al. Characterization of the total and viable bacterial and fungal communities associated with the International Space Station surfaces[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 1–21.
- [26] Pierson D L. Microbial contamination of spacecraft[J]. *Gravitational and Space Research*, 2001, 14(2): 1–6.
- [27] Fan Q, Fu L. Corrosion behavior of 7075-t6 aluminum alloy in the presence of aspergillus niger[J]. *International Journal of Electrochemical Science*, 2021, 16: 9.
- [28] Dai X, Wang H, Ju L K, et al. Corrosion of aluminum alloy 2024 caused by *Aspergillus niger*[J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2016, 115: 1–10.
- [29] Zhang T, Wang J, Zhang G, et al. The corrosion promoting mechanism of *Aspergillus niger* on 5083 aluminum alloy and inhibition performance of miconazole nitrate [J]. *Corrosion Science*, 2020, 176: 108930.
- [30] Wang J, Bai Z, Xiao K, et al. Effect of static magnetic field on mold corrosion of printed circuit boards[J]. *Bioelectrochemistry*, 2020, 131: 107394.
- [31] Probst A, Facius R, Wirth R, et al. Validation of a Nylon-Flocked-Swab protocol for efficient recovery of bacterial spores from smooth and rough surfaces[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(15): 5148–5158.
- [32] Debus A. The European standard on planetary protection requirements[J]. *Research in Microbiology*, 2006, 157(1): 13–18.
- [33] Zhang Y, Xin C, Wang X, et al. Detection of microorganism from China's spacecraft assembly cleanroom[J]. *Acta Astronautica*, 2020, 166: 545–547.
- [34] Newcombe D A, La Duc M T, Vaishampayan P, et al. Impact of assembly, testing and launch operations on the airborne bacterial diversity within a spacecraft assembly facility clean-room[J]. *International Journal of Astrobiology*, 2008, 7(3/4): 223–236.
- [35] Whyte W, Hejab M. Particle and microbial airborne dispersion from people[J]. *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*, 2007, 12(2): 39–46.
- [36] Vaishampayan P, Osman S, Andersen G, et al. High-Density 16S microarray and clone library-based microbial community composition of the phoenix spacecraft assembly clean room[J]. *Astrobiology*, 2010, 10(5): 499–508.
- [37] Stieglmeier M, Rettberg P, Barczyk S, et al. Abundance and diversity of microbial inhabitants in european spacecraft-associated clean rooms[J]. *Astrobiology*, 2012, 12(6): 572–585.
- [38] 张文德, 赵一夔, 印红, 等. 航天器AIT中心空气霉菌特性研究[J]. *中国空间科学技术*, 2019, 39(5): 76–86.
- [39] Mahnert A, Vaishampayan P, Probst A J, et al. Clean-room maintenance significantly reduces abundance but not diversity of indoor microbiomes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): 1–20.

## Isolation and identification of indoor and outdoor culturable microorganisms in Wenchang Spacecraft Launch Site

LIU Qianqian<sup>1</sup>, YAO Qiong<sup>2</sup>, WANG Ning<sup>2</sup>, ZHAO Yong<sup>2</sup>, BAI Miaomiao<sup>1</sup>, FENG Yali<sup>1</sup>, CHEN Nana<sup>1</sup>, XIAO Kui<sup>1\*</sup>

1. Institute of Advanced Materials and Technology, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China

2. Xichang Satellite Launch Center, Xichang 615000, China

**Abstract** Microorganisms in space station may threaten the health of astronauts and reliability of equipment and affect long-term on-orbit operation of the space station. AIT(assembly, integration, testing) center, transportation and launch environment of spacecraft are the main microbial pollution sources of China's space station. Therefore, it is necessary to conduct comprehensive microbial monitoring of the plant and outdoor environment of Wenchang launch site. Samplings were collected by Petri plate gravitational settling from spacecraft assembly and test clean-room and other five surrounding areas. The strains were identified using traditional culture-based and Sanger dideoxy sequencing technology. Analysis of isolated strains showed that *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. were the dominant airborne bacterial genus whereas *Curvularia* sp., *Aspergillus* sp., and *Penicillium* sp. dominated the fungal population. Some of the dominant microbes have potential microbial corrosion hazards to the equipment and structures of the space station. The results can provide bacteria and fungi references for space microbial corrosion research in China and facilitate targeted biological safety prevention.

**Keywords** spacecraft assembly environment; AIT center; space station; airborne microbes; 16S rRNA; ITS rDNA ●



(责任编辑 徐丽娇)