0254-6124/2017/37(2)-185–07 *Chin. J. Space Sci.* 空间科学学报

YUAN Junxia, YIN Hong, ZHAO Biao, ZHANG Lantao, QU Xi, XU Kanyan. Microbial Diversity analysis in spaceflight AIT center (in Chinese). *Chin. J. Space Sci.*, 2017, **37**(2): 185-191. DOI:10.11728/cjss2017.02.185

航天器 AIT 中心微生物多样性分析 *

袁俊霞[1] 印 红[1] 赵 彪[1]
张兰涛[2] 曲 溪[2] 徐侃彦[1]

1(航天神舟生物科技集团有限公司空间微生物研究室 北京 100190)

2(中国空间技术研究院载人航天总体部 北京 100094)

摘 要 航天器 AIT(总装、集成和测试) 中心的洁净度控制是防止造成航天器正向污染的重要保障. 利用高通量测序技术与传统培养法比较分析了中国某航天器 AIT 中心的空气微生物组成与多样性. 基于高通量的测序分析结果显示: 该 AIT 中心空气中优势细菌以芽孢杆菌属为主, 相对丰度 78.47%±1.59%; 优势真菌为银耳目, 相对丰度 8.97%±0.93%; 基于培养法获得的优势细菌为葡萄球菌属, 且未获得真菌培养物. 空气微生物的 chao1 指数、Simpson 多样性指数以及 Shannon 多样性指数分析显示, 该 AIT 中心空气中细菌的多样性水平均高于真菌.

关键词 AIT 中心, 高通量测序技术, 培养法, 微生物多样性

中图分类号 V 524.1

Microbial Diversity Analysis in Spaceflight AIT Center

YUAN Junxia[1] YIN Hong[1] ZHAO Biao[1]

ZHANG Lantao[2] QU Xi[2] XU Kanyan[1]

1(*Research Office of Space Microbiology, Shenzhou Space Biology Science and Technology Coorporation, Ltd, Beijing* 100190)

2(*Institute of Manned Space System Engineering, China Academy of Space Technology, Beijing* 100094)

Abstract The assembly of spacecraft in clean room environment is essential for the prevention of forward contamination. In this study, both high-throughput sequencing and culture-based method are used to study the microbial community structure and diversity in the AIT (Assembly, Integration and Test) center of the spaceflight. The result of high-throughput sequencing analysis show that in the AIT center the dominant genus of airborne bacteria is *Bacillus* (78.47%±1.59%), and the dominant fungi is Tremellales (8.97%±0.93%). However, culture-based analysis indicates that the *Staphylococcus* is the dominant bacteria, and no fungal colony is observed in the AIT center. The microbial diversity is evaluated by chao1 index, Simpson index and Shannon index, and the results show that the bacterial diversity level is higher than that of fungal in the AIT center.

Key words AIT center, High-throughput sequencing, Culture-based method, Microbial diversity

---

* 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31300162) 和中国航天科技集团公司科技创新研发项目共同资助
2015-12-11 收到原稿, 2016-06-08 收到修定稿
E-mail: xukanyan@cast.cn

0 引言

在人类载人航天活动中, 为防止地球微生物对地外天体的污染, 同时也为了保证载人航天器的长期安全运行, 需要在航天器设计、建造、组装、总装、发射和运行等多个环节进行严格的微生物控制 [1]. 现有的检测结果显示, 航天器总装厂房是航天器携带微生物的重要环境来源 [2,3], 研究采用高效空气过滤器 (HEPA)、恒温恒湿控制以及定期清洁等手段来实现对总装厂房的洁净度控制. 然而 NASA 仍从航天器洁净厂房中检测到大量微生物 [4].

微生物组成和多样性的可靠性检测是开展航天器微生物控制的基础. 传统的微生物检测主要基于培养法, 该方法操作简便, 结果直观, 但是由于培养手段的局限性, 通过培养法获得的微生物信息十分有限 [5]. 随着高通量测序技术的发展, 可以通过对微生物基因组中 *16SrRNA*/*ITS* 等片段的扩增和测序, 实现对环境微生物样品的检测和分析. 高通量测序技术具有快速、灵敏、通量大的优点, 已被 NASA 用于航天器组装厂房以及航天器内环境的微生物多样性分析 [6,7]. 本文通过对中国某航天器总装 AIT (总装、集成和测试) 中心进行空气微生物采样, 分别利用培养法和高通量测序技术, 研究空气样品中微生物的组成和多样性水平, 探讨高通量测序技术在中国载人航天工程微生物防控体系中的应用前景.

1 材料与方法

1.1 材料

本研究中的空气样品采自中国某航天器 AIT 中心.

高通量测序环境样品采集利用赛多利斯 MD8 空气采样器, 对航天器 AIT 中心的空气进行采样, 采样流量为 50 L·min^{-1}, 采样时间为 20 min. 培养法中环境样品采集利用 JWL-IIC 型空气微生物检测仪, 对航天器 AIT 中心的空气进行采样, 采样流量为 20 L·min^{-1}, 采样时间为 10 min. 空气样品均设置三个重复.

1.2 高通量测序实验方法

采集的空气凝胶膜在实验室条件下提取微生物总 DNA. 采用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop1000 进行 DNA 质控, 确认 DNA 样品合格后用于高通量测序. 对提取的微生物样品 DNA 的 *16SrRNA* V3 区基因和 *ITS2* 进行扩增, 选用引物序列为: 16S-F: TACGGRAGGCAGCAG/16S-R: ATTACCGCGGCTGCTGGC; ITS2-F: GCATCGATGAAGAACGCAGC/ITS2-R: TCCTCCGCTTATTGATATGC. 扩增体系为 25 μL, 扩增条件为: 94°C 2 min, 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环, 72°C 5 min. PCR 产物经测序前处理后利用 Illumina Miseq 测序仪进行高通量测序.

1.3 培养法实验方法

采集到的空气样品在实验室条件下培养, 获得微生物的纯培养菌落后, 利用单克隆进行菌落 PCR, PCR 目的片段为 *16SrRNA* 基因, 选用引物序列为: 16S-F': AGAGTTTGATCCTGGCTCA/16S-R': GGTTACCTTGTTACGACTT. PCR 扩增体系为 50 μL, 扩增条件为: 94°C 5 min, 94°C 20 s, 55°C 20 s, 68°C 100 s, 30 个循环, 68°C min. PCR 产物利用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并利用 PCR 产物回收试剂盒回收 PCR 产物, 将回收产物用 ABI3730-DNA 测序仪完成测序.

1.4 数据分析

(1) 数据处理

使用 FastQC 软件对高通量测序获得的序列进行质量控制; 使用 FLASHv1.2.7 软件根据序列读长的重叠序列 (overlap) 进行合并, 最终得到完整的目标序列; 使用 QIIME1.8 软件 [8] 进行分样、查找嵌合体序列并过滤, 过滤后的序列进行 OTU (Operational Taxonomic Unit, 操作分类单元) 统计、鉴定以及多样性分析.

培养法获得的序列利用 BLAST 方法进行同源性搜索与菌种鉴定, 序列相似性大于 97% 即将其定义为一个 OTU, 每个 OTU 对应于一类不同的微生物.

(2) 多样性计算

本研究中航天器 AIT 空气样品的微生物多样性水平评估指标如下 [8−9].

①丰度指数 chao1 计算方式为

$$S_{\mathrm{chao1}} = S_{\mathrm{obs}} + n_1^2/(2n_2).$$

式中 S_{obs} 为 OTU 的观测值, n_1, n_2 分别表示仅包含 1 条序列的 OTU 与包含 2 条同源序列的 OTU.

② Simpson 多样性指数 $D = 1 - \{[\Sigma N_i(N_i -$

1)]/[$N(N-1)$]}.

③ Shannon 指数 $H = -\Sigma P_i \ln P_i$. 式中 $P_i = N_i/N$, 这里 N_i 为第 i 种 OTU 的数目, N 为 OTU 总数目.

(3) 系统进化树构建

为了表征航天器 AIT 中心获得的空气微生物 OTU 间的系统进化关系, 利用 MEGA6.0[10] 软件对微生物 OTU 进行 NJ 进化树分析. 选取高通量测序获得的细菌 OTU 序列中分布频次前 100 位、真菌中分布频次前 50 位的序列进行分析. 采用奇古菌的 *16SrRNA* 基因序列作为细菌外类群 (GenBank 序列号: KT036446)、小球藻的ITS基因 (GenBank 序列号: AY591495.1) 作为真菌外类群构建进化树, 并利用自举法 (bootstrap) 重复 1000 次, 分析系统进化树拓扑结构的可靠性.

(4) 统计分析

本研究中实验数据以 $\bar{x} \pm sd$ 表示, 不同实验方法间的结果比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著.

2 结果

2.1 AIT 中心微生物组成

(1) 细菌群落组成

利用高通量测序技术对中国某航天器 AIT 中心空气中细菌进行检测, 共获得细菌 OTU 总数为 1569±41, 涵盖了来自细菌中 61 目 146 属的类群. 在目水平上统计获得的 OTU 及其在空气细菌组成中所占的比例见表 1. 该 AIT 中心空气中的优势细菌来自芽孢杆菌目、梭菌目及栖热菌目, 其约占空气中细菌组成的 90%; 在属水平上进行的统计结果显示, 该 AIT 中心空气中的优势细菌主要来自芽孢杆菌属 (78.47%±1.59%) 以及 *Thermosinus* 属 (7.26%±0.71%).

利用培养法对空气中细菌菌落数 CFU (Colony Forming Units) 的检测结果显示: 该 AIT 中心空气中细菌平均菌落数为 43.3±10.4 CFU/m^3. 利用 *16SrRNA* 对分离出的菌落进行鉴定, 结果包含 12 株葡萄球菌属、6 株芽孢杆菌属、5 株微球菌属、1 株红

表 1 AIT 中心空气细菌群落组成分析

Table 1 Bacterial community structure in AIT center

类群	基于高通量测序法		基于培养法	
	组成百分比/(%)	OTU 种类	组成百分比/(%)	OTU 种类
芽孢杆菌目 (Bacillales)	80.64±1.59	201±14	72	2
梭菌目 (Clostridiales)	8.92±0.85	309±14	–	–
栖热菌目 (Thermales)	1.93±0.16	11±2	–	–
黄单胞菌目 (Xanthomonadales)	1.46±0.12	16±2	–	–
红环菌目 (Rhodocyclales)	1.24±0.13	17±3	–	–
弧菌目 (Vibrionales)	0.86±0.19	51±6	–	–
乳杆菌目 (Lactobacillales)	0.51±0.08	74±9	–	–
假单胞菌目 (Pseudomonadales)	0.45±0.04	105±9	–	–
放线菌目 (Actinomycetales)	0.41±0.04	95±8	28	3
热袍菌目 (Thermotogales)	0.27±0.04	10±1	–	–
肠杆菌目 (Enterobacteriales)	0.26±0.06	70±6	–	–
拟杆菌目 (Bacteroidales)	0.23±0.02	143±11	–	–
伯克氏菌目 (Burkholderiales)	0.19±0.04	52±9	–	–
黄杆菌目 (Flavobacteriales)	0.15±0.03	53±3	–	–
其他	2.49±0.27	362±18	–	–

球菌属及1株棒状杆菌属. 以序列间相似性大于97%即判定为一个 OTU 作为标准, 共获得 OTU 总数为 5 个, 包含来自芽孢杆菌目葡萄球菌属、芽孢杆菌属 OTU 共 2 个, 来自放线菌目红球菌属、棒状杆菌属、微球菌属 OTU 各 1 个 (见表 1). 与高通量测序结果相比, 两种分析方法获得的细菌 OTU 数目差异显著 ($P < 0.05$).

(2) 真菌群落组成

基于高通量测序技术对 AIT 中心空气中真菌组成进行检测, 获得的真菌 OTU 总数为 486±55, 涵盖了来自真菌中 30 目 74 属的类群. 在目水平上统计获得的 OTU 种类及其在空气真菌组成所占的比例见表 2. 该 AIT 中心空气中的优势真菌来自银耳目、马拉色菌目、煤炱目以及散囊菌目, 其约占空气中真菌组成的 25%; 利用培养法没有检测到该 AIT 中心空气中有真菌存在.

(3) 微生物多样性水平

利用高通量测序获得的 OTU 序列, 分别计算该 AIT 中心空气中细菌及真菌的 chao1 指数、Simpson 多样性指数 D 和 Shannon 多样性指数 H, 结果列于表 3, 该 AIT 中心空气中细菌的多样性指数均高于真菌.

2.2 系统进化树分析

利用 NJ 法对 AIT 中心空气中细菌进行系统进化树分析, 结果如图 1 所示. AIT 中心空气细菌 OTU 主要分为 8 类, 其中, 芽孢杆菌纲以芽孢杆菌属细菌 OTU 为代表的 OTU 种类在空气中占据优势. 在变形菌门中, 主要包含 β-, γ- 变形菌纲细菌. 基于培养法得到的 5 个 OTU 分别属于芽孢杆菌纲与放线菌纲. 对 AIT 中心空气中真菌进行系统进化树分析, 结果如图 2 所示. AIT 中心空气真菌 OTU 主要分为 5 类, 包括散囊菌目、煤炱目、格孢腔菌目、酵母目以及银耳目真菌, 其中前 4 目真菌均隶属于子囊菌门.

3 讨论

对航天器 AIT 中心进行微生物组成及多样性分析是载人航天工程中微生物防控的重要环节. DNA 的扩增和测序技术用于微生物多样性检测具有快速、准确及灵敏度高的优点. Schwendner 等 [11] 对 ESA

表 2 AIT 中心空气真菌群落组成分析

Table 2 Fungal community structure in AIT center

类群	组成百分比/(%)	OTU 种类
银耳目 (Tremellales)	8.97±0.93	21±2
马拉色菌目 (Malasseziales)	7.83±1.35	6±1
煤炱目 (Capnodiales)	5.40±0.62	34±4
散囊菌目 (Eurotiales)	5.00±0.53	59±7
粪壳菌目 (Sordariales)	3.42±1.54	6±3
酵母菌目 (Saccharomycetales)	2.66±0.34	31±5
格孢腔目 (Pleosporales)	1.89±0.61	19±8
伞菌目 (Agaricales)	0.92±0.43	9±3
肉座菌目 (Hypocreales)	0.85±0.19	20±8
线黑粉菌目 (Filobasidiales)	0.84±0.70	10±3
刺盾炱目 (Chaetothyriales)	0.68±0.75	5±2
多孔菌目 (Polyporales)	0.27±0.08	12±2
锁掷酵母目 (Sporidiobolales)	0.24±0.03	12±2
其他真菌	26.17±9.00	201±23
未判定种类	34.88±8.86	66±17

表 3 基于高通量测序技术的 AIT 中心微生物多样性水平

Table 3 Airmicrobial diversity of AIT center based on high-throughput sequencing

	细菌	真菌
OTU 数目	1569±41	486±55
chao1 指数	3171.54±234.38	876.21±63.31
Simpson 多样性指数 D	0.49±0.02	0.27±0.03
Shannon 多样性指数 H	2.56±0.09	1.84±0.05

圭亚那航天中心的总装厂房洁净室进行采样和微生物分析, 利用培养法分离获得 49 株细菌, 同时利用 *16SrRNA* 基因建立的克隆文库共发现来自 12 门 34 科的细菌. La Duc 等 [6] 利用 454 高通量测序技术评估 NASA 某组装洁净室环境中细菌、古细菌及真菌的微生物多样性水平, 结果显示, 基于高通量技术获得的微生物多样性水平是基于传统培养法的 100~1000 倍. 本研究通过对中国某航天器 AIT 中心空气微生物组成分析发现, 基于高通量测序方法所获得的空气微生物 OTU 是培养法的数百倍 (见表 3), 该结果进一步支持了以上结论.

基于高通量测序技术分析该 AIT 中心空气中优势细菌组成, 结果显示优势细菌主要来自芽孢杆菌目芽孢杆菌属. NASA 通过对多个航天器总装洁净室

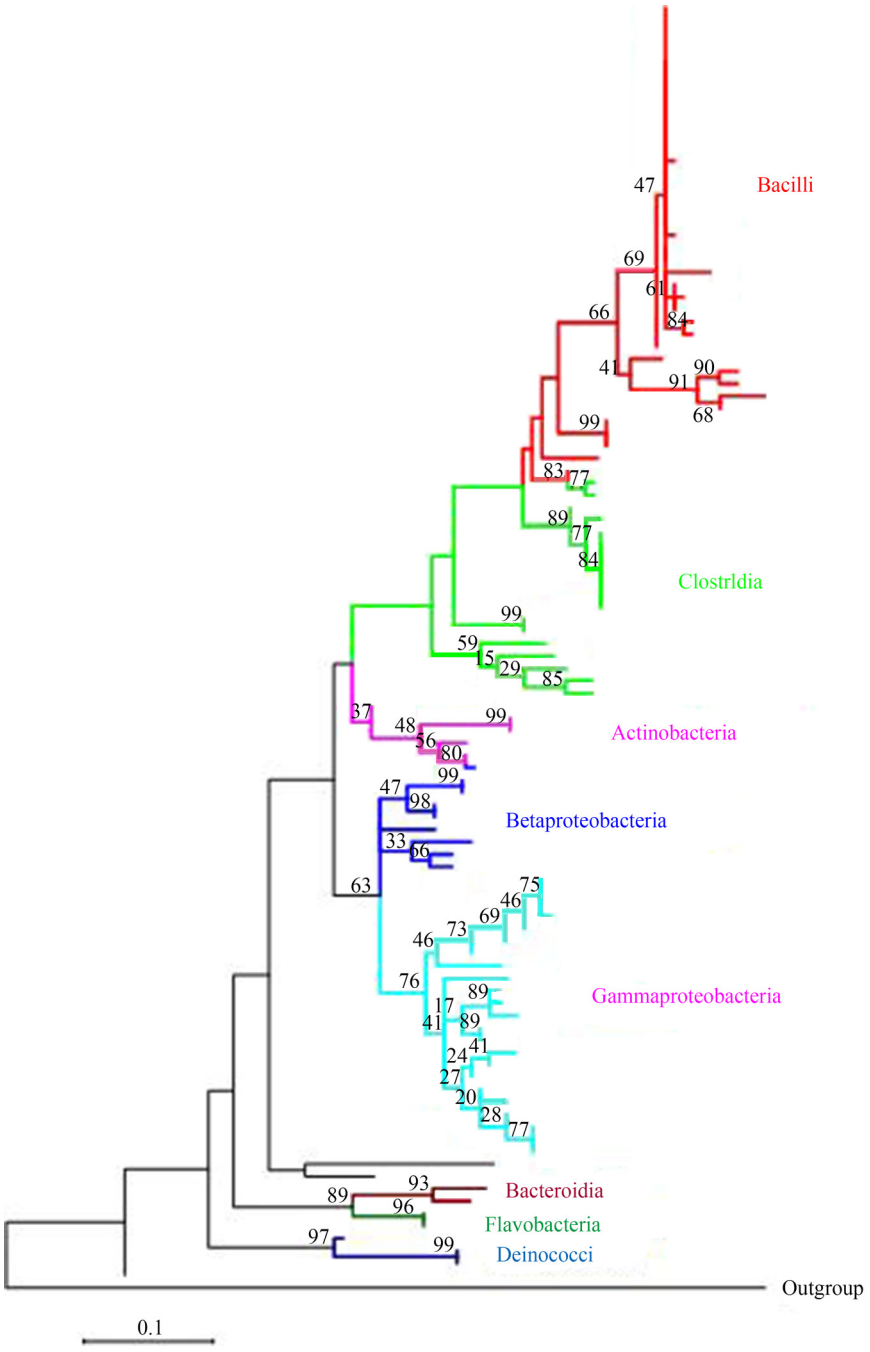


图 1 基于*16SrRNA*基因的 AIT 空气样品系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the *16SrRNA* sequences of 100 bacterial OTUs in AIT center

的微生物监测, 认为芽孢杆菌类细菌是在航天器总装洁净室与航天器表面被分离出的最多类群, 这可能与这类细菌的孢子对辐射、干燥、消毒剂等具有极强抵抗力有关 [4,12]. 此外, 在地面总装厂房内还发现一定数量的亚栖热菌属细菌 (*Meiothermus*), 约占空气细菌总量的 1%, 该类细菌隶属于栖热菌目, 是一类嗜高温的微生物, 易在极端环境存活, 对此类抗逆性强的微生物的有效检测将为行星保护过程中避免造成正向污染提供数据支持 [4].

对 AIT 中心空气中真菌组成的分析发现, 隶属于子囊菌门的散囊菌目、煤炱目及酵母目等真菌的 OTU 相对丰度在空气中比例较高 (见图 2), 特别是青霉属 (*Penicillium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、枝孢霉属 (*Cladosporium*) 真菌, 其能够造成环境中材料的腐蚀, 在 AIT 中心的运行和维护中需要加以严格控制 [13]. 此外, 马拉色菌目真菌在空气中相对丰度约 8%, 此类真菌多存在于人的皮脂腺, 考虑到空气环境样品采集时该 AIT 中心正处于工作状态, 人员的活动可能是此类真菌的主要来源. 值得注意的是, 尽管高通量测序技术已经能够提供大量的真菌组成信息, 但由于真菌 *ITS* 基因数据库的限制, 许多序列仍未被鉴定, 随着 *ITS* 数据的积累, 对环境样品中真菌的组成和生态特征认识将得到完善.

比较 NASA 和 ESA 等机构的研究结果发现, 航天器组装洁净室内的空气微生物组成呈现地域性分布. Moissl 等 [14] 利用 *16SrRNA* 基因分别对喷气推

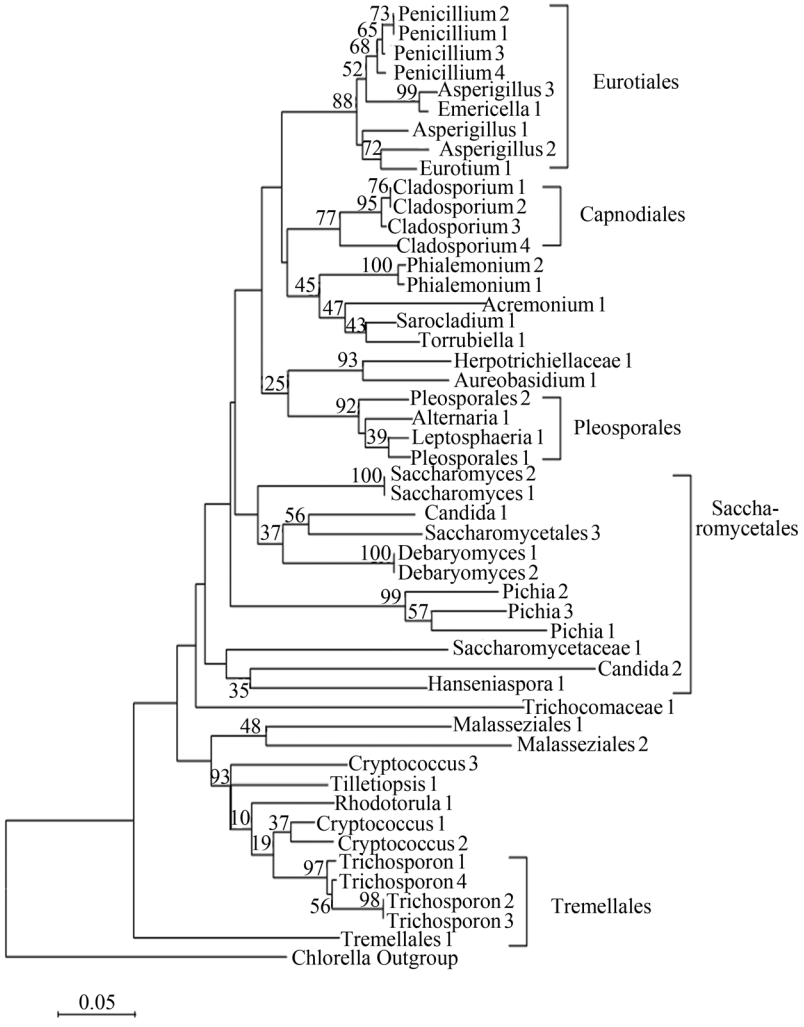


图 2 基于*ITS2*基因的 AIT 空气样品系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the *ITS2* sequences of 50 fungal OTUs in AIT center

进实验室 (JPL)、肯尼迪航天中心 (KSC) 及约翰逊航天中心 (JSC) 的 3 个总装洁净室空气细菌进行分析, 结果显示 JSC 洁净室中优势细菌以 α-, γ- 变形菌纲与放线菌为主; KSC 洁净室中含有大量变形菌门细菌; JPL 中则以厚壁菌门细菌为主. Zhang 等 [3] 基于培养法对北京、天津、酒泉三个 AIT 中心空气微生物进行分析, 结果也显示空气微生物分布呈现地区差异. 本研究所采集的航天器 AIT 中心空气中细菌以芽孢杆菌纲为主, 真菌以子囊菌门为主, 微生物组成与张兰涛等 [3] 在北京某 AIT 中心采集的空气微生物组成相似, 但该结果并不足以表征中国其他地区航天器 AIT 中心环境样品的微生物生态特征. 因此, 建议对中国各航天器 AIT 中心以及航天器的组装、总装及发射等阶段建立相应的环境微生物检测方法和数据库. 高通量测序技术以其通量大、时间短、精确度高及信息量丰富等优点, 可以在短时间内实现对环境样品中微生物组成和多样性的评估, 在中国载人航天工程中极具应用潜力.

4 结论

利用高通量测序技术分析中国某航天器 AIT 中心空气微生物组成与多样性, 结果显示中国某航天器 AIT 中心的空气微生物存在丰富的多样性, 该结果将为中国航天器地面总装厂房中相应的清洁和灭菌手段制定提供数据支持. 同时, 高通量测序技术在洁净室环境微生物多样性分析中具有快速、准确及通量高的优势, 可以应用于中国未来航天工程微生物防控体系中.

致谢 裴智勇博士和高洁博士在数据处理工作中给予了帮助.

参考文献

[1] ZHANG L T, WEI C F, HOU Y Q, *et al*. Difficulties and countermeasures of microbe control in long-term manned spacecraft [J]. *Life Sci. Instr.*, 2014(3): 17-19 (张兰涛, 魏传峰, 侯永青, 等. 长期载人航天器微生物控制难点及对策 [J] . 生命科学仪器, 2014(3): 17-19)

[2] YAMAGUCHI N, ROBERTS M, CASTRO S, *et al*. Microbial monitoring of crewed habitats in space-current status and future perspectives [J]. *Microbes Environ.*, 2014, **38**(3). DOI:10.1264/jsme1262.ME14031

[3] ZHANG L T, WEI C F, BAI F L, *et al*. The microbial distribution of spaceflight AIT center [J]. *Spacecraft Environ. Eng.*, 2014, **4**(4): 415-419 (张兰涛, 魏传峰, 白梵露, 等. 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, **4**(4): 415-419)

[4] VAISGAMPAYAN P A, RABBOW E, HORNECK G, *et al*. Survival of *Bacillus pumilus spores* for a prolonged period of time in real space conditions [J]. *Astrobiology*, 2012, **12**(5). DOI: 10.1089/ast.2011.0738

[5] GUO B, WU X L, QIAN Y. Approaches for increasing the culturability of microorganisms [J]. *Acta Microbiol. Sin.*, 2006, **46**(3): 504-507 (郭斌, 吴晓磊, 钱易. 提高微生物可培养性的方法和措施 [J]. 微生物学报, 2006, **46**(3): 504-507)

[6] LA DUC MT, VAISHAMPAYAN P, NILSSON HR, *et al*. Pyrosequencing-derived bacterial, archaeal, and fungal diversity of spacecraft hardware destined for Mars [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, **78**(16): 5912. DOI: 5910.1128/AEM.01435-01412

[7] VAISHAMPAYAN P, PROBST A J, DUC M T L, *et al*. New perspectives on viable microbial communities in low-biomass clean room environments [J]. *ISME J.*, 2013, **7**(2): 312-324

[8] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, *et al*. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods*, 2010, **7**(5): 335-336

[9] HUGHES J B, HELLMANN J J, RICKETTS T H, *et al*. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**(10): 4399-4406

[10] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, *et al*. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biol. Evolution*, 2013, **30**: 2725-2729

[11] SCHWENDNER P, MOISSL-EICHINGER C, BARCZYK S, *et al*. Insights into the microbial diversity and bioburden in a south American spacecraft assembly clean room [J]. *Astrobiology*, 2013, **13**(12): 1140-1154.

[12] MOELLER R, GUNTHER R, NICHILSON W L, *et al*. Mutagenesis in bacterial spores exposed to space and simulated Martian conditions: data from the EXPOSE-E spaceflight experiment PROTECT [J]. *Astrobiology*, 2012, **12**(5). DOI:10.1089/ast.2011.0739

[13] LI F, YUAN H, ZHAO H. Review of microbiological control technologies in space and development proposals [J]. *Manned Spaceflight*, 2014, **5**(5): 465-473 (李飞, 袁辉, 赵辉. 空间微生物控制技术综述 [J]. 载人航天, 2014, **5**(5): 465-473)

[14] MOISSL C, OSMAN S, DUC M T L, *et al*. Molecular bacterial community analysis of clean rooms where spacecraft are assembled [J]. *FEMS Microbiol. Ecology*, 2007, **61**(3): 509-521