

研究报告

模拟失重大肠杆菌 K12 基因表达及表型的影响

容丹¹ 王佳平¹ 王海立² 高建义¹ 韩延平² 杨瑞馥² 李勇枝^{1*}

(1. 中国航天员科研训练中心 北京 100094)

(2. 军事医学科学院微生物所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

摘要:【目的】通过低剪切力模拟失重(Low-shear modeled microgravity, LSMMG)连续传代培养大肠杆菌,检测大肠杆菌在模拟失重条件下的表型变化及基因改变。【方法】利用旋转细胞培养系统模拟失重环境对大肠杆菌 K12 进行连续传代培养,对菌株进行增殖速率、耐酸性和生物膜形成的测定,以此评估 LSMMG 对大肠杆菌 K12 表型的影响。利用转录组测序检测模拟失重条件下差异表达的基因,与表型作比对。【结果】模拟失重导致大肠杆菌增殖速率降低,耐酸性下降,生物膜形成能力增强;模拟失重条件下,营养代谢相关差异表达基因有 25 个,其中 20 个表达下降,2 个与耐酸相关基因表达均下降。【结论】模拟失重会引起大肠杆菌表型及相应的基因变化,其中生物膜形成能力的增强可能对航天飞行造成潜在威胁。

关键词: 模拟失重, 大肠杆菌, 转录组测序

Effect of microgravity on *Escherichia coli* K12 phenotype and gene expression

RONG Dan¹ WANG Jia-Ping¹ WANG Hai-Li² GAO Jian-Yi¹ HAN Yan-Ping²
YANG Rui-Fu² LI Yong-Zhi^{1*}

(1. Astronaut Center of China, Beijing 100094, China)

(2. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

Abstract: [Objective] To reveal the phenotypic and gene expression change of *Escherichia coli* after exposure to microgravity. [Methods] Rotary cell culture system (RCCS) was used to simulate microgravity environment. The effect of microgravity on *E. coli* K12 was estimated by measuring the growth kinetics, acid resistance and biofilm formation. RNA-Seq was applied to detect the change of gene expression under low shear modeled microgravity (LSMMG). [Results] LSMMG weakened the growth and acid resistance of *E. coli* K12 and strengthened the biofilm formation ability. Twenty of 25 genes related to nutrition metabolism and the only two acid resistance related genes were down

Foundation item: National Science and Technology Major Projects for “Major New Drugs Innovation and Development” (No. 2015ZX09J15102-002); National Natural Science Foundation of China (No. 31401183)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-66362388; E-mail: lyz0316@sina.com

Received: January 28, 2016; **Accepted:** May 06, 2016; **Published online** (www.cnki.net): February 24, 2017

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项项目(No. 2015ZX09J15102-002); 国家自然科学基金项目(No. 31401183)

***通讯作者:** Tel: 86-10-66362388; E-mail: lyz0316@sina.com

收稿日期: 2016-01-28; **接受日期:** 2016-05-06; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-02-24

regulated under LSMMG condition. **[Conclusion]** Simulated microgravity would lead to a certain change of phenotype and corresponding genes. The enhanced biofilm formation and cytotoxicity would be the potential threats of space flight.

Keywords: Simulated microgravity, *Escherichia coli*, RNA-Seq

随着航天活动的越加频繁,人类在太空停留的时间越来越长。伴随着人类活动,大量的细菌也被带入太空^[1-2]。太空中主要存在失重、辐射、真空以及极端温度等环境。细菌具有感知并适应周围新环境的能力,这种能力对于细菌在极端环境下的生存至关重要,失重环境对于细菌来说是新的环境。在太空失重条件下,细菌承受微重力以及低剪切力^[3],这种环境的改变可能会引起细菌的表型变化,如生长速率、抗生素耐药性、抗氧化、生物膜形成等^[4-10]。加上失重会导致人体骨质丢失、肌肉萎缩、免疫力下降等^[11-15],这让航天员在太空中感染的风险增大。

转录组测序是在 RNA 水平对基因表达进行研究,可以全面地了解特定时间基因的表达,对于细胞生化反应过程、代谢途径、分子功能、细胞组分构成等都能详细揭示,因此在生物学研究中已经得到了广泛的应用^[16]。本实验应用 RNA-Seq 技术对模拟失重培养的大肠杆菌进行检测,全面了解其基因表达程度,发生的表型变化在基因水平上得到了很好的解释。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 大肠埃希菌(*Escherichia coli* 1.2389)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 培养基: LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 5.0, 用于大肠杆菌的培养; LB 固体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 5.0, 琼脂粉 15.0, 用于大肠杆菌生存率实验计数。

1.1.3 主要试剂和仪器: 逆转录试剂盒、Gibco 胰蛋白酶, 美国赛默飞公司; RNA 提取试剂盒, 德国 QIAGEN 公司; 其他常规试剂均为进口分析纯级产品。高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; 旋转细胞培养系统, 美国 Synthecon 公司; 紫外分光光度计, 上

海元析仪器有限公司; 恒温培养箱, 苏州培英实验设备有限公司; 生物安全柜, 美国赛默飞公司; 荧光定量 PCR 仪 Light cycle[®] 480 II, 瑞士 Roche 公司。

1.2 模拟失重培养条件

利用旋转细胞培养系统(Rotary cell culture system, RCCS)模拟失重条件(图 1), RCCS 由控制器和旋转生物反应器(High aspect rotating vessel, HARV)构成, 控制器调节旋转的速度和方向, 生物反应器对细菌进行培养。HARV 垂直旋转时受低剪切力且重力矢量随机, 此环境被命名为低剪切力模拟失重环境(Low-shear modeled microgravity, LSMMG), 水平旋转时仅受低剪切力, 为正常重力组, 生物反应器由半透膜进行气体交换^[17]。

模拟失重培养实验利用 1%接种量接种大肠杆菌至 5 mL LB 培养基, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 取活化后菌液以 1:250 体积比接种到生物反应器中(含 50 mL LB 培养基), 分别在水平和垂直方向以 37 °C、25 r/min 进行培养, 每 24 h 以 1:250 体积比进行传代并保种, 连续培养两周。

1.3 生长曲线的测定

将连续培养两周的失重组及对照组菌株甘油种按 1%接种量接种至 5 mL LB 培养基, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 将活化好的菌液以 1:250 体积比接入含 50 mL LB 培养液的 HARV, 在 37 °C、

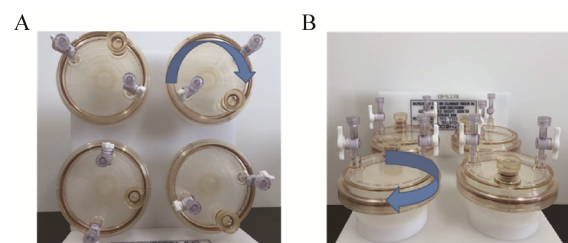


图 1 旋转细胞培养系统

Figure 1 Rotary cell culture system

注: A: 模拟失重组; B: 正常重力组。

Note: A: Low-shear modeled microgravity; B: Normal gravity.

25 r/min 的条件下进行模拟失重培养。从 0 h 开始, 每 2 h 取菌液 300 μ L, 用 30 μ L 甲醛固定, 连续取 36 h, 最后将所取样品用分光光度计在 600 nm 处测定 OD, 并作生长曲线图。分别测定两组菌株在普通 LB 液体培养基和 pH 5.5 液体培养基中的生长曲线。

1.4 耐酸性的测定

每天传代时, 取前一天培养的菌液以 1% 接种量接入 pH 3.5 的 LB 液体培养基以及普通 LB 空白对照组中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 孵育 1 h。孵育结束后, 将培养液用磷酸盐缓冲液(PBS)倍比稀释, 取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个梯度, 在 LB 固体培养基上涂布计数, 每个浓度涂 3 块。计算经过酸性孵育后菌株生存率 $= (a_1+a_2+a_3)/(b_1+b_2+b_3)$, a_1 、 a_2 、 a_3 为 pH 3.5 LB 培养液中孵育 1 h 后的涂布计数结果, b_1 、 b_2 、 b_3 为普通 LB 培养液中孵育 1 h 后的涂布计数结果。

1.5 菌落表面褶皱实验

根据细菌富产胞外多糖(生物膜基质的主要成分), 菌落表面会呈现褶皱的原理, 可以通过观察菌落表面褶皱的方法来判断生物膜形成量的多少。由于培养时间较长, 固体培养基厚度应为培养皿深度的 1/2, 使用前在 37 $^{\circ}$ C 摇床中平衡 2 h, 取 5 μ L 的甘油菌种, 点加于 LB 平板表面, 37 $^{\circ}$ C 培养 3–5 d, 拍正面照。

1.6 生物膜生成的测定(结晶紫染色实验)

将两组菌的甘油种以 1% 接种量接入 2 mL LB 培养液, 用 15 mL 玻璃试管在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养至平台期, 菌液转移至离心管, 用于测定 OD_{600} 值, 用去离子水温和地洗涤试管两次, 洗净菌液。将试管在 60 $^{\circ}$ C 放置 15 min 固定, 每孔加入 5 mL 的 0.1% 结晶紫染色 15 min。用去离子水洗涤 2–3 次, 充分洗去游离的结晶紫。每管加入 5 mL 的二甲基亚砷(需完全没过生物膜), 放置 30–60 min, 期间间隔吹打混合, 直至菌体发白。测定 OD_{570} 值。计算生物膜的相对形成量 $= 1000 \times OD_{570} / (OD_{600} \times V_1 \times V_2)$, V_1 = 初始菌液体积(2 mL), V_2 = DMSO (5 mL)。

1.7 RNA 提取

将第 14 天的菌液继续传代模拟失重培养, 当菌液生长至 OD_{600} 约为 1.0 时, 12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 RNA 提取试剂盒抽提细菌 RNA, 所有步骤严格按照试剂盒说明书进行。RNA 提取后, 经 NanoDrop 检测, $OD_{260/280}$ 在 1.8–2.0 之间为合格, 将抽提好的 RNA 立即放入 -80° C 保存, 第二天送转录组测序, 并将同一批 RNA 备份, 以备后续验证。

1.8 转录组测序及基因表达水平分析

实验由上海晶能生物技术有限公司完成, 采用 Illumina HiSeq 测序平台的双端测序模式对多个样本进行高通量测序。在 RNA-Seq 分析中, 可以通过定位到基因组区域测序序列(Reads)的计数来估计基因的表达水平, 为了使不同基因、不同实验间估计的基因表达水平具有可比性, 引入了 RPKM (Reads per kilo bases per million reads)的概念, RPKM 同时考虑了测序深度和基因长度对 Reads 计数的影响, 是目前最常用的基因表达水平估算方法^[18]。

$$RPKM = \frac{\text{Total exon reads}}{\text{Mapped reads (millions)} \times \text{Exon length (kb)}}^{\circ}$$

1.9 差异基因 GO 和 KEGG 富集分析

GO 功能分析是针对全基因/转录本和差异基因/转录本进行功能注释和归类, KEGG pathway 功能分析是针对全基因/转录本和差异基因/转录本进行 KEGG 数据库中 Pathway 的功能注释和归类, KEGG pathway 功能富集分析方法与 GO 功能富集分析类似。

1.10 实时定量 PCR

将提取的总 RNA 用去 DNA 污染试剂盒进行消化, 去除 DNA 污染, 步骤严格按照说明书进行。将消化后的 RNA 取 3.5 μ g, 用试剂盒进行逆转录, 严格按照说明书进行。

采用 20 μ L 的体系进行 PCR 扩增: 上下游引物 (10 μ mol/L) (表 1) 各 0.8 μ L, Lumix 10 μ L, 模板 (10 mg/L) 2 μ L, 水 6.4 μ L。以 16S rRNA 基因为内参, 扩增条件: 50 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 45 个循环。每个实验进行 3 次。

表 1 qRT-PCR 引物
Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR analysis

Primer	Sequence (5'→3')	Size (bp)
flhC-F	CCCGTGCCTGGACATTGGT	141
flhC-R	GGGATGGCGGTTGACATAAGC	
xdhA-F	ACGGAACATTGAAAGGTTATAGTCTGG	135
xdhA-R	AACTGTAAGCGTAGGCACAACGAG	
tnaA-F	GCAACTTTGACCTTGAGGGATTAG	219
tnaA-R	CACGCTGCTTGATGAAATAGGC	
plsC-F	CGTAACCACCAGAACAATATGA	122
plsC-R	TTAACCAGTACAACCTGCCCGAAG	
prpC-F	CGTGCGTACCGTGCTGGAAG	198
prpC-R	TCGCCGTTGTGGCTGTAGTGA	
prpD-F	CCCAGACGGCAGTTGAAGCAG	189
prpD-R	GCGGGATCGCCACCATGTAC	

2 结果与分析

2.1 模拟失重条件下大肠杆菌生长速率低于正常重力

生长速率检测结果显示, 在普通 LB 液体培养基中, 与正常重力组相比, 模拟失重组增殖速率降低, 平台期菌液浓度显著低于正常重力组; 在 pH 5.5 的 LB 液体培养基中也出现类似结果(图 2)。

2.2 模拟失重组大肠杆菌耐酸性降低

在每天传代的时候测定两组菌的耐酸性, 连续测量两周, 将正常重力组酸性条件下孵育 1 h 后的生存率除以模拟失重组酸性条件下孵育 1 h 后的生存率得到连续的耐酸性比较曲线(图 3)。

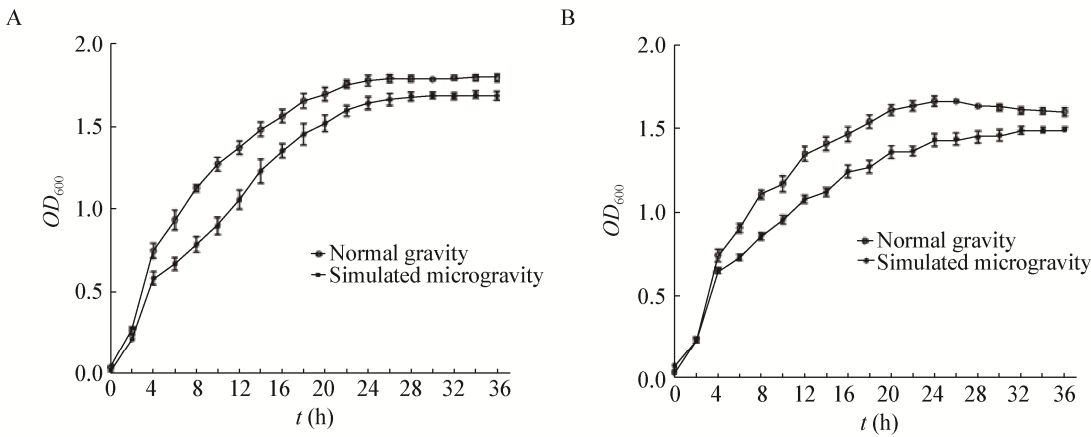


图 2 大肠杆菌生长曲线
Figure 2 Growth kinetics of *E. coli*

注: A: 模拟失重组与正常重力组在 pH 5.5 的 LB 液体培养基中的生长曲线; B: 模拟失重组与正常重力组在普通 LB 液体培养基中的生长曲线。

Note: A: Growth kinetics of *E. coli* under LSMMG and normal gravity condition in pH 5.5 LB medium; B: Growth kinetics of *E. coli* under LSMMG and normal gravity condition in pH 7.0 LB medium.

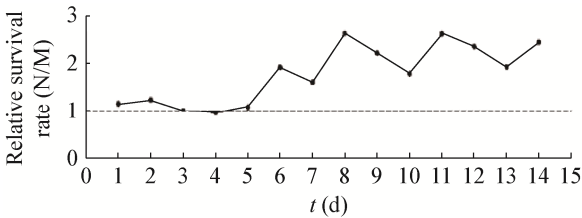


图 3 酸性条件刺激后相对生存率曲线
Figure 3 Relative (normal gravity/microgravity) survival rate after exposure to pH 3.5 LB medium

2.3 模拟失重增强细菌生物膜的形成能力

生物膜的形成能显著增强细菌对外界环境的抵抗力, 增强细菌在极端环境中的生存能力^[19-20]。在实验中发现, 经过两周的连续传代培养后, 与正常重力组相比, 模拟失重组大肠杆菌的细胞褶皱形成与生物膜形成能力明显增强(图 4)。

2.4 大肠杆菌基因差异性表达结果

经过连续两周模拟失重培养后将大肠杆菌进

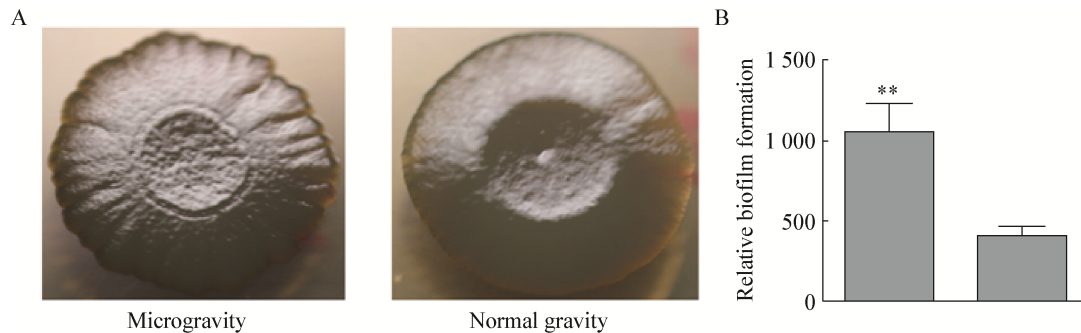


图4 生物膜形成比较

Figure 4 Comparison of biofilm formation

注：A：模拟失重组与正常重力组细胞褶皱形成比较；B：模拟失重组与正常重力组结晶紫染色实验比较。

Note: A: Comparison of bacterial colony morphology between LSMMG and normal gravity; B: Comparison of crystalviolet staining between LSMMG and normal gravity.

行转录组测序，共有 142 个基因表达差异达两倍以上 ($P < 0.05$)，其中 58 个上调，84 个下调(图 5)。其中上调基因主要包括一些耐药基因(*emrA*, *mraY*, *ppiA*)、核苷酸代谢(*dut*, *xdhA*)和一些功能未知的蛋白(*yjaH*, *ygfS*, *yqiC*, *yejK*, *yrbG*, *yigM*, *yrbG*,

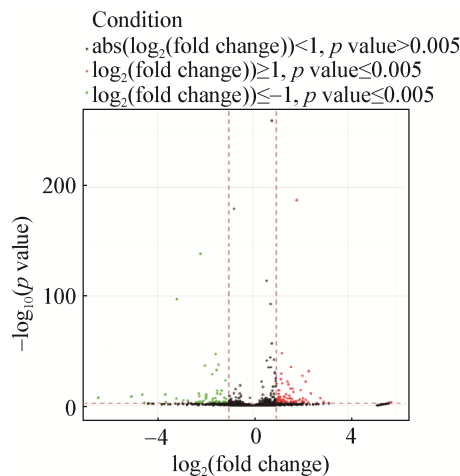


图5 模拟失重诱导大肠杆菌基因差异表达结果

Figure 5 Relative gene expression of *E. coli* between microgravity and normal gravity

注：火山图展示了基因的表达差异结果，位于右侧红色的点表示基因表达显著上调，位于左侧绿色的点表示基因表达显著下调。在所有 4 498 个分析的基因中，有 58 个上调，84 个下调，只有表达差异 2 倍以上且 $P < 0.05$ 的基因才被认为是表达有显著差异。Note: The volcano plot depicts gene expression in *E. coli* cultured in LB medium under LSMMG environment compared to normal gravity environment. Genes that are represented on the right side of the axis ($x \geq 1$) are up regulated and those on the left side of the axis ($x \leq -1$) are down regulated. Out of the 4 498 analysed genes, 58 genes were up regulated and 84 genes were down regulated. Only those show more than 2 fold change and have a $P < 0.05$ were identified as significantly changed.

yigM)等；下调基因主要包括代谢相关的 ABC 转运蛋白(*argT*, *fepB*, *ftsX*, *hisM*, *rbsD*, *tauA*)、氨基酸代谢(*aspC*, *gabD*, *astB*, *astC*, *ilvA*, *serB*)、碳水化合物代谢(*prpB*, *prpC*, *prpD*, *gabD*, *aceA*, *ilvA*, *serB*)、辅助因子及维他命代谢(*nadD*, *ribA*, *thiC*, *pabB*)等营养代谢相关基因。

在显著差异表达的基因中查找与耐酸性相关的基因，发现了两个基因(sRNA)与大肠杆菌耐酸性相关(表 2)，并且表达均下降，与大肠杆菌耐酸性下降的结果一致。

2.5 KEGG 差异表达基因通路富集分析

将表达差异基因进行 KEGG 分析，结果显示 43 个基因分布在 49 条通路中，分为 17 类(图 6)。

将 KEGG 通路富集分析结果中与营养物质代谢相关通路中的基因进行整理，发现一共有 25 个基因与营养代谢相关，其中 20 个基因在模拟失重条件下表达下降，5 个基因表达上升(图 7)，这与前期表型实验得出的结论一致：模拟失重会抑制大肠杆菌增殖。

表 2 耐酸相关基因		
Table 2 Genes related to acid resistance		
Gene	$\log_2(\text{fold change})$	Description
<i>arrS</i>	-2.218 217 36	Antisense sRNA regulator of <i>gadE</i> and acid resistance
<i>dsrA</i>	-1.460 388 778	Regulatory sRNA enhances translation of <i>rpoS</i> ; component of acid resistance regulatory circuit

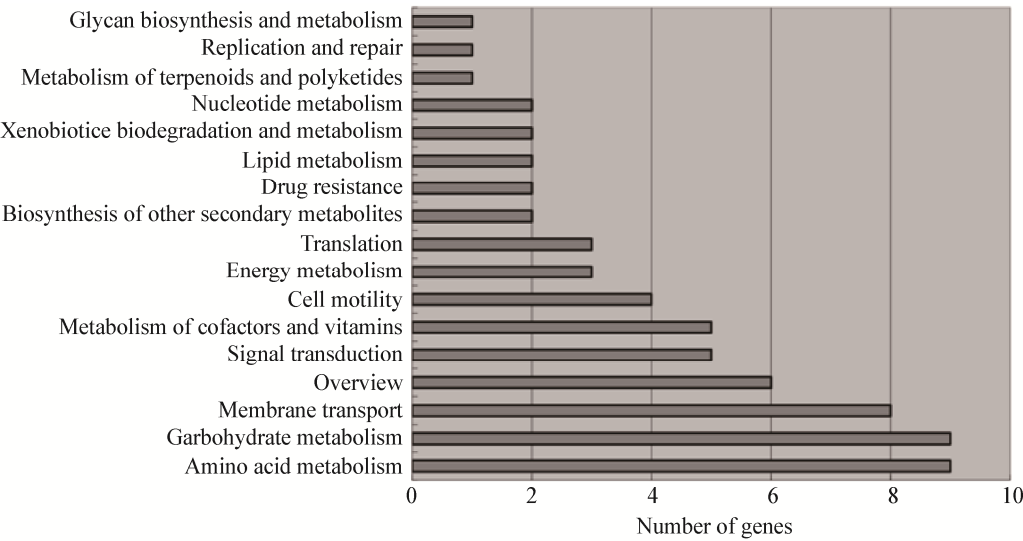


图 6 KEGG 基因富集分析结果
Figure 6 Number of significantly changed genes categorized by KEGG

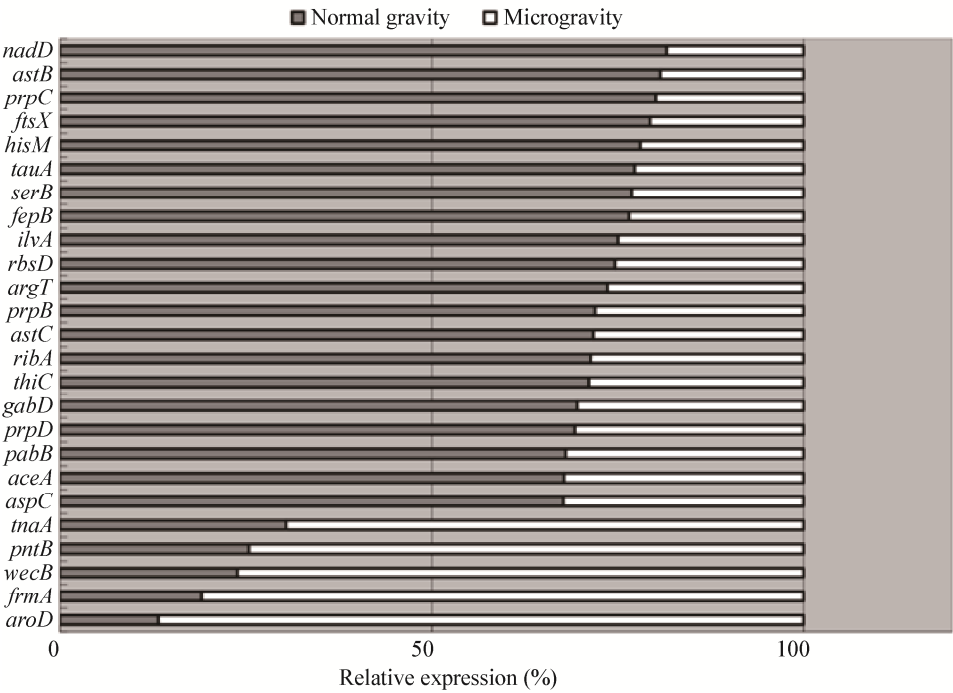


图 7 营养代谢相关基因相对表达量
Figure 7 Relative expression of genes involved in nutrition metabolism

2.6 GO 基因富集分析结果

差异表达基因经过 GO 功能分类，在 142 个差异表达基因中，有 59 个基因在 3 个类别的功能体系中富集，分别是：生物过程(Biological process)类 36 个基因分别对应到 32 条通路中；分子功能(Molecular function)类 35 个基因对应到 36 条通路

中；细胞组分(Cellular component)类 13 个基因对应到 8 个细胞组分中(图 8)。

2.7 转录组结果验证

实验采用 qRT-PCR 对 RNA-Seq 结果进行验证，选择 6 个表达量高的基因进行验证，其中 2 个表达量上调，4 个表达量下调。结果显示(图 9)，实时定量

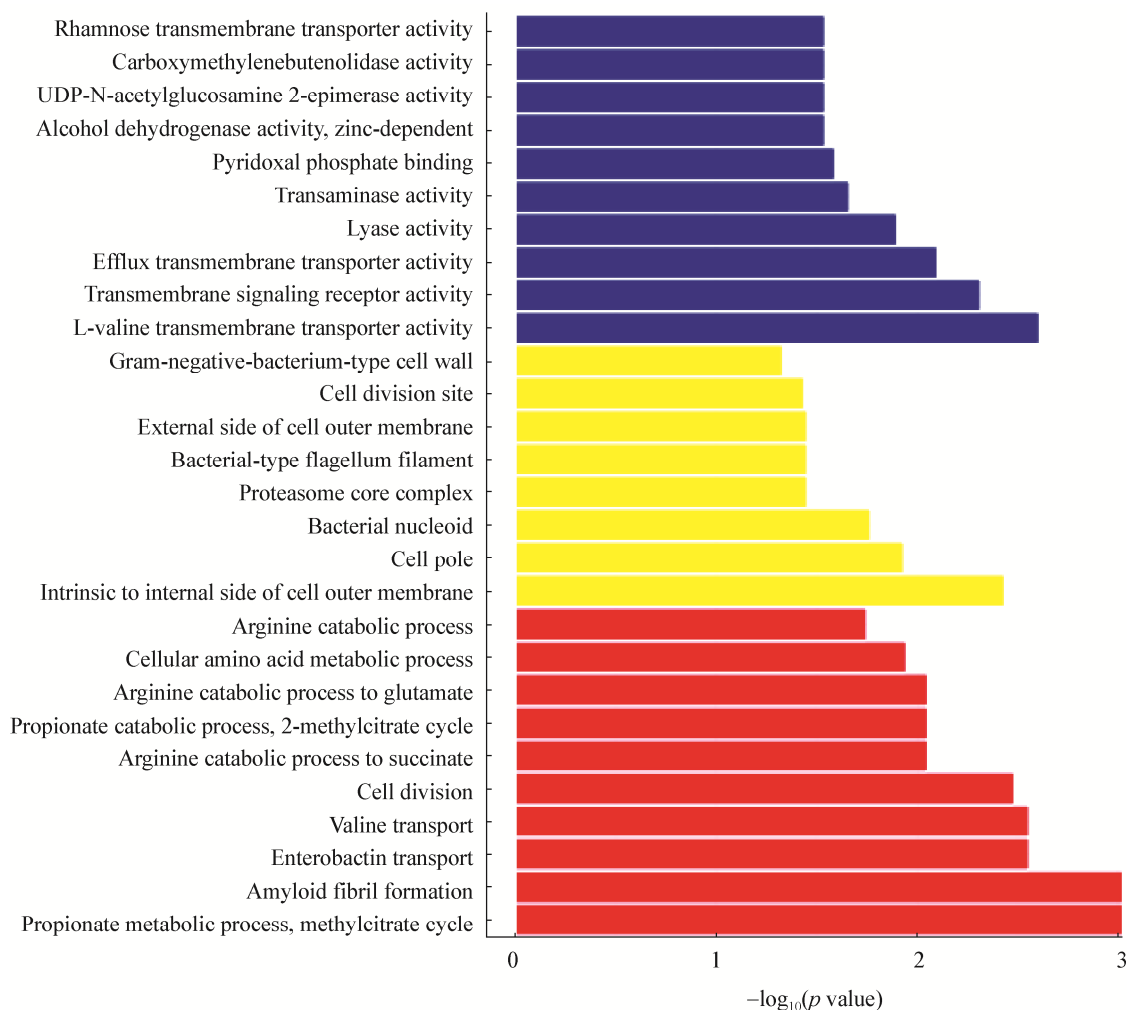


图8 显著富集 GO 柱状图

Figure 8 Enrichment of GO analysis

注：每种分类最多显示 10 条通路。蓝色：分子功能；黄色：细胞组分；红色：生化过程。

Note: A maximum of 10 pathways were showed under each category. Blue bar: Molecular function; Yellow bar: Cellular component; Red bar: Biological process.

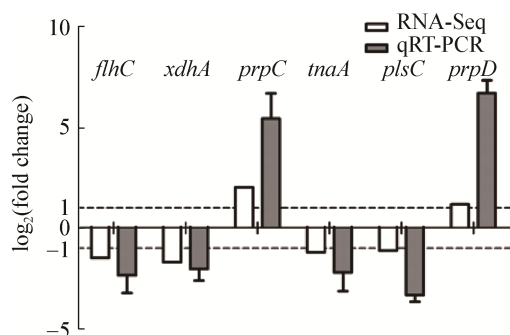


图9 RNA-Seq 结果验证

Figure 9 Validation of RNA-Seq

PCR 结果与转录组测序结果一致，说明转录组测序结果可信。

3 结论与讨论

航天飞行中细菌的潜在危害巨大，尽管目前还未在太空发现微生物，但随着人类一起进入太空的细菌也不容忽视，地球上的条件致病菌在航天环境中可能对航天员造成危害，一些细菌还能腐蚀飞行器的电路板等材料，在金属上形成致密的生物膜，影响航天飞行安全^[1,21]，研究细菌在太空环境下的

变化有着重要的意义。

本实验将大肠杆菌在模拟失重条件下进行连续传代两周培养,测定培养两周后的生长曲线发现,与正常重力组相比,模拟失重组大肠杆菌在 LB 液体培养基中对数生长期增殖显著减缓,并且平台期菌液终浓度也降低。在试验过程中观察到,在正常重力组的 HARV 中,菌液在 2 h 的取样间隔时间内会有一定程度的沉淀,这样 HARV 上部的培养液细菌相对底部少,细菌处于低浓度快速生长的状态,沉淀在底部的细菌为上部的细菌让出了生长的空间,上部的细菌不断沉淀到底部,导致 HARV 上部始终处于细菌低浓度快速增长的状态。而模拟失重组由于垂直旋转,细菌无法沉淀, HARV 内细菌分布均匀,生长状态也较均一。取样测菌液浓度时,会把正常重力组菌液混匀,这样导致测得的平均浓度高于模拟失重组。RNA-Seq 的结果中可以看到,在 KEGG 通路富集结果中,与营养物质代谢相关的基因共有 26 个,其中 20 个在模拟失重组表达下调,这与模拟失重组大肠杆菌生长速率下降的结果一致。在早期的研究中, Kim 等^[8]对大肠杆菌 O157:H7 进行研究发现模拟失重条件下细菌增殖速度加快,我们认为本实验得出不同结果的原因除菌株不同的因素外,取样时间及是否混匀菌液可能是造成差异的原因。在 Kim 等的实验中,取样时间分别是 0、3、6、12、24、48 h,长时间的间隔会使正常重力组细菌沉淀在底部,导致培养皿上部浓度大大降低。本研究 2 h 取一次样,并且每次取样之前充分混匀,测出的菌液浓度为整个培养皿的平均浓度。

某些血清型的大肠杆菌可以经口感染人,引起严重的肠道炎症^[22-23]。大肠杆菌能经过胃部酸性环境并且存活,耐酸性是大肠杆菌引起人类肠道感染的一个重要生理特性。本实验从第一天培养开始检测两组菌经过 pH 3.5 培养液孵育 1 h 后的生存率,观察大肠杆菌在模拟失重条件下耐酸性变化的趋势,结果显示大肠杆菌经模拟失重培养后耐酸性逐渐下降。我们在 RNA-Seq 差异表达基因中查找出两个基因与耐酸性相关,并且表达都降低,这与模

拟失重大肠杆菌耐酸性下降结果一致。

生物膜有利于细菌抵抗外界极端环境,若细菌在人体内形成生物膜,可引起难治性感染。本实验结果显示大肠杆菌在模拟失重条件下生物膜形成能力增强,这可能导致其在失重条件下生存能力更强,是人类航天飞行潜在的威胁。

对于以上的表型变化,我们认为其改变是可遗传的。在实验过程中从模拟失重组分离出了几株表型异质性菌株,细菌的形态与生理特性完全不同于 K12 原始菌株,认为连续培养两周后的菌液正是由这些不同的表型异质性菌株以不同的比例构成的,所以出现了生理特性及基因表达的改变。对其中一株菌体长度为正常大肠杆菌几十倍的菌株在普通摇床上进行传代培养,一周之后仍然保持了其长丝状的菌体,由此可见,这种改变是可遗传的。

本实验利用模拟失重环境培养大肠杆菌,检测了大肠杆菌在失重条件下的表型变化以及基因表达改变,为下一步研究其变化机制打下了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Horneck G, Klaus DM, Mancinelli RL. Space microbiology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2010, 74(1): 121-156
- [2] Pierson DL, Bassinger VJ, Molina TC, et al. Preflight and postflight microbiological results from 25 Space Shuttle crews[R]. SAE Technical Paper, 1993
- [3] Vukanti R, Mintz E, Leff L. Changes in gene expression of *E. coli* under conditions of modeled reduced gravity[J]. Microgravity-Science and Technology, 2008, 20(1): 41-57
- [4] Vukanti R, Model MA, Leff LG. Effect of modeled reduced gravity conditions on bacterial morphology and physiology[J]. BMC Microbiology, 2012, 12(1): 4
- [5] Kim W, Tengra FK, Young Z, et al. Spaceflight promotes biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62437
- [6] Wilson JW, Ott CM, Ramamurthy R, et al. Low-shear modeled microgravity alters the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium stress response in an RpoS-independent manner[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5408-5416
- [7] Mauclair L, Egli M. Effect of simulated microgravity on growth and production of exopolymers of *Micrococcus luteus* space and earth isolates[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2010, 59(3): 350-356
- [8] Kim HW, Matin A, Rhee MS. Microgravity alters the physiological characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, ATCC 43889, and ATCC 43895 under different nutrient conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(7): 2270-2278
- [9] Lawal A, Kirtley ML, van Lier CJ, et al. The effects of modeled microgravity on growth kinetics, antibiotic susceptibility, cold

- growth, and the virulence potential of a *Yersinia pestis* *ymoA*-deficient mutant and its isogenic parental strain[J]. *Astrobiology*, 2013, 13(9): 821-832
- [10] Rosenzweig JA, Ahmed S, Eunson Jr J, et al. Low-shear force associated with modeled microgravity and spaceflight does not similarly impact the virulence of notable bacterial pathogens[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(21): 8797-8807
- [11] Basso N, Heersche JNM. Effects of hind limb unloading and reloading on nitric oxide synthase expression and apoptosis of osteocytes and chondrocytes[J]. *Bone*, 2006, 39(4): 807-814
- [12] Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Functional and structural adaptations of skeletal muscle to microgravity[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(18): 3201-3208
- [13] Levine DS, Greenleaf JE. Immunosuppression during spaceflight deconditioning[J]. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 1998, 69(2): 172-177
- [14] Guéguinou N, Huin-Schohn C, Bascove M, et al. Could spaceflight-associated immune system weakening preclude the expansion of human presence beyond Earth's orbit?[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2009, 86(5): 1027-1038
- [15] Crucian B, Stowe R, Quiriarte H, et al. Monocyte phenotype and cytokine production profiles are dysregulated by short-duration spaceflight[J]. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 2011, 82(9): 857-862
- [16] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(1): 57-63
- [17] Nauman EA, Ott CM, Sander E, et al. Novel quantitative biosystem for modeling physiological fluid shear stress on cells[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 699-705
- [18] Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621-628
- [19] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322
- [20] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms[J]. *The Lancet*, 2001, 358(9276): 135-138
- [21] Lynch SV, Mukundakrishnan K, Benoit MR, et al. *Escherichia coli* biofilms formed under low-shear modeled microgravity in a ground-based system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(12): 7701-7710
- [22] Crump JA, Sulka AC, Langer AJ, et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm[J]. *New England Journal of Medicine*, 2002, 347(8): 555-560
- [23] King LA, Nogareda F, Weill FX, et al. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France, June 2011[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2012, 54(11): 1588-1594