

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200205001

http://www.yykxjz.cn/

郑姚, 吴开年, 王利, 魏勇. 枯草芽孢杆菌对氨氮应答的转录组及 sRNA 分析. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 147–154
Zheng Y, Wu KN, Wang L, Wei Y. Transcriptome and sRNA analyses of the response of *Bacillus subtilis* to ammonia nitrogen. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 147–154

枯草芽孢杆菌对氨氮应答的转录组及 sRNA 分析*

郑 姚¹ 吴开年¹ 王 利^{1①} 魏 勇²

(1. 西南民族大学 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部和四川省重点实验室 成都 610041;

2. 四川省畜牧科学研究院 成都 610041)

摘要 为探索枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)脱氮的分子机制,筛选枯草芽孢杆菌对氨氮的分子生态学应答相关候选基因及 small RNA(sRNA),本研究对处于富含氨氮环境和对照组的枯草芽孢杆菌 R47 进行原核链特异性转录组及 sRNA 分析,并采用 Real-time PCR 方法检测差异表达基因的相对表达量。结果显示,平均每个测序样本得到约 1.40×10^7 条 reads。对照组与处理组 DESeq2 分析得到 3918 个差异表达基因,并富集在 KEGG 数据库中的 176 个信号通路,其中,包括 8 个与适应富含氨氮环境相关的信号通路(细菌双组分系统通路、精氨酸生物合成、嘌呤代谢等),同时发现, *epsA*、*tasA*、*sinR*、*glnR*、*glnA*、*tnrA* 和 *ureABC* 基因可能参与枯草芽孢杆菌对氨氮的应答过程。经 sRNA 分析获得已注释的枯草芽孢杆菌 sRNA 62 条。对 sRNA 靶基因的分析结果显示,共有 3960 个对应的潜在靶基因,主要参与碳水化合物运输和新陈代谢、氨基酸转运和代谢、转录过程,其中, sRNA2073 和 sRNA2182 对应的靶基因分别为 *sinR* 和 *tnrA*。Real-time PCR 结果显示, *argH*、*codY*、*argG*、*glnA* 和 *glnR* 基因的相对表达量变化与转录组测序结果一致。本研究为进一步探究枯草芽孢杆菌污水脱氮的分子机理提供参考数据。

关键词 枯草芽孢杆菌; 氨氮应答; 转录组; 差异表达基因; sRNA 分析

中图分类号 Q933 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0147-08

生活污水排放量的剧增、部分工厂未正确处理工业废水等原因使水体中含氮有害物质积累,导致水体氨氮污染,这对水生生物的生存造成威胁(Liu *et al.*, 2004)。因此,水体净化已是养殖业的关注焦点,当前主要提倡微生物脱氮,以微生物作为生态调节剂来维持水生态平衡,不仅效率高、成本低,而且不易造成二次污染(康传磊等, 2018)。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为革兰氏阳性菌,其抗逆性强、环境兼容性好,优异的蛋白质分泌功能使其成为生产抗生素、药用蛋白和工业酶的重要宿

主(Kewcharoen *et al.*, 2019; 王成强等, 2019)。枯草芽孢杆菌因具有多种优良特性而在水产养殖中得到广泛应用。枯草芽孢杆菌 HAINUP40 可降低模拟废水及养殖废水水体中氨氮含量,是净化水质的一种良好生物制剂(刘树彬等, 2018)。枯草芽孢杆菌对氨的利用途径为谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶(Glutamine synthetase/glutamate synthase, GS/GOGAT)途径(Magasanik, 1982)。本研究以枯草芽孢杆菌 R47 为研究对象,以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为水体氨氮污染来源,模拟富含氨氮污水,采用高通量测序技术建立富含氨氮条

* 四川省农业科技成果转化资金项目(2018NZZJ008)、四川省科技支撑项目(2016NZ0044)和四川肉羊创新团队防疫岗位共同资助 [This work was supported by Sichuan Agricultural Science and Technology Achievement Transformation Fund Project (2018NZZJ008), Sichuan Province Science and Technology Support Project (2016NZ0044), and Sichuan Meat Sheep Innovation Team Epidemic Prevention Post]. 郑 姚, E-mail: 1793946322@qq.com

① 通讯作者: 王 利, 教授, E-mail: qinxin916@aliyun.com

收稿日期: 2020-02-05, 收修改稿日期: 2020-03-11

件下枯草芽孢杆菌转录组数据库,初步筛选参与枯草芽孢杆菌响应富含氨氮环境的相关基因及通路,为进一步探究其对氨氮应答的分子机制提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

枯草芽孢杆菌 R47 分离于鲫鱼(*Carassius auratus*)粪便,保存于西南民族大学青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部和四川省重点实验室。

1.2 枯草芽孢杆菌 R47 对氨氮的应答实验

将枯草芽孢杆菌 R47 接种于 LB 液体培养基, 37℃ 培养,待菌液浓度达 1.4×10^8 CFU/ml 时,取 10 ml 菌液加入 100 ml 水样中,分别于 6、18 和 24 h 取样,根据水质检测试剂盒(杭州陆恒生物科技有限公司)操作指南测定氨氮含量(mg/L)。

1.3 转录组测序分析

1.3.1 测序样品制备及测序 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氨氮污染来源,模拟富含氨氮污水。将枯草芽孢杆菌 R47 接种于 LB 液体培养基, 37℃ 培养,待菌液浓度达 1.4×10^8 CFU/ml 时,向 LB 液体培养基中添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,对照组(C)和处理组(T)的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度分别为 0 和 40 mmol/L, 37℃ 180 r/min 培养 24 h 后, 4℃ 12000 r/min 离心 2 min,收集菌体沉淀, -80℃ 中保存。每个样品 3 个生物学重复。参照细菌总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取 2 组细菌总 RNA,经 NanoDrop ND-1000 核酸检测仪(LabTech, 美国)检测 RNA 的浓度与纯度。基于 Illumina 二代高通量测序平台(HiSeq 4000)测序,由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.3.2 转录组数据处理与分析 将质控后的原始数据,即 Clean data,与参考基因组使用软件 Bowtie 进行比对,获得用于后续分析的 Mapped data,同时,对本次转录组测序的比对结果进行质量评估, Reads

在参考基因组不同区域分布以及 Reads 在不同染色体分布分析,以此获得各样品 Reads 的比对效率和 Reads 在基因组上的位置信息。比对参考基因组进行基础功能注释,基于蛋白序列与 NR 库(Non-Redundant Protein Database)、Swiss-prot 库(Swissprotein sequence database)、Pfam 数据库、COG 数据库(Cluster of Orthologous Groups of proteins)和 KEGG 数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 6 大数据库进行比对,得到相应的功能注释信息,综合 NR、Swiss-Prot、KEGG、COG 和 Pfam 数据库的注释结果,选择最佳的 Unigene 进行分析。利用软件 RSEM(RNA-Seq expression estimation by Expectation-Maximization)以 TPM 为定量指标对基因的表达水平进行定量分析。基于负二项分布的 DESeq2 软件对 Raw counts 进行组间表达差异的基因统计分析,标准为对比组样品间表达倍数(Fold Change) ≥ 2 和错误发现率(False Discover Rate, FDR) < 0.05 且 $|\log_2^{\text{FC}}| > 1$ 。采用软件 Goatools 对差异表达基因进行 GO 和 KEGG Pathway 富集分析,预测其可能参与的生物学过程和功能。

1.3.3 small RNA(sRNA)分析 采用软件 Rockhopper 获得 sRNA 预测结果后,使用 Blast 及公共数据 sRNAMap、sRNATarBase、SIPHT 及 Rfam 资源对鉴定到的 sRNA 进行注释。采用 RNAPlex 和 IntaRNA 分别对 sRNA 靶基因预测,然后对潜在靶基因的功能进行分析。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

使用 PrimeScript™ 1st strand cDNA Sythesis Kit 试剂盒(TaKaRa 公司)制备 cDNA。选择了 5 个差异表达基因,以高水平、恒定表达的 16S rDNA 基因为内参基因,设计特异性引物(表 1)。以合成的 cDNA 为模板,使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒(TaKaRa 公司)进行实时荧光定量分析,检测其 mRNA 水平的相对表达量,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析结果。Real-Time PCR 结果与转录组测序数据结果均以 $|\text{Log}_2^{\text{FC}}|$ 表示。

表 1 Real-Time PCR 引物
Tab.1 Primers of Real-Time PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'~3')	反向引物 Reverse primer (5'~3')
<i>argH</i>	GCAGAGGAGGGAGCATTG	AGTCGCCACCTGGTCATT
<i>argG</i>	AATCTTGACAGCCCGTAT	AAGCGAGTAGGAAACACC
<i>glnA</i>	GAGCCAACGCTTGAACATAA	TCGTGTTGACCAGGTGCTAC
<i>glnR</i>	GCCGCTCAATGCCTTTAT	CCTTGTTCTATCAGGTGCT
<i>codY</i>	AACAGTTGTGCGGAATGGA	TAACAGAACGGGTAATGC'
16S rDNA	GTAGTCCACGCCGTAAACGA	CGAATTAACCACATGCTCCA

2 结果

2.1 枯草芽孢杆菌 R47 对氨氮的应答

枯草芽孢杆菌菌株 R47 对氨氮的应答实验结果显示,在 6 h 后水样中氨氮含量从 0.8 降至 0.01 mg/L, 18 和 24 h 后,水样中氨氮含量也均维持在 0.01 mg/L, 这表明枯草芽孢杆菌 R47 可明显降低氨氮含量,可能存在同化吸收作用。

2.2 转录组测序数据拼接与组装

平均每个测序样本得到约 1.40×10^7 条 reads。质控后碱基错误率(Clean Error Rate)为 0.01%, 碱基质量值大于 20 的占 99.24%, 大于 30 的占 97.55%, GC 含量为 43.51%。以上结果显示, 转录组测序结果质量较高。将各样本比对到参考基因组上的 Reads (Mapped Reads)占 Clean Reads 的百分比均大于 80%, 表明所选参考基因组组装可以满足信息分析的需求。

2.3 Unigene 的功能注释

分别基于 NR、Swiss-prot、Pfam、COG、GO 和 KEGG 数据库进行总 Unigene 注释, 注释到 NR 库的基因占比最高, 高达 96.95%, 注释到 KEGG 库的基因占总基因数最少, 为 42.51%。6 个数据库总计能注释的 Unigene 数目为 4420。

2.4 转录组测序差异表达基因分析

转录组测序数据相关性检查结果显示, 每组样品间基因表达水平皮尔逊相关系数的平方(R^2)均大于 0.65, 即各组样品之间表达模式的相似度较高, 增加了实验的可靠性。将 2 个组基因表达水平分析中得到的数据采用 DESeq2 进行分析, 结果显示, 与对照组相比, 处理组共筛选出 3918 条差异表达基因 (Differentially expressed genes, DEGs), 其中, 包括 1887 个 DEGs 上调表达, 2031 个 DEGs 下调表达。利用 KEGG 数据库, 可将 DEGs 按照参与的 Pathway 通路或行使的功能进行分类, 结果发现, 表达下调基因主要参与氨基酸代谢、碳水化合物代谢、膜运输过程, 上调基因则主要参与碳水化合物代谢、氨基酸代谢与辅助因子和维生素的代谢等过程。

2.5 差异表达基因功能富集分析

采用软件 Goatools 对差异表达基因进行 GO 富集分析, 获得差异表达基因主要具有的 GO 功能(图 1)。上调基因中对与氨氮代谢功能有关的 GO 条目及候选基因进行筛选, 共得到 1 个 GO 条目, 包含 37 个

DEGs。下调基因中 GO 条目及候选基因筛选共得到 13 个 GO 条目, 包含 574 个 DEGs。将 DEGs 标注到 KEGG 数据库中, 对基因进行 KEGG Pathway 富集分析, 结果显示, 共富集到 176 个信号通路, 上调基因与下调基因共同信号通路有 130 个。在差异基因 KEGG 富集结果中, 挑选了富集最显著的 20 条通路在图形中展示(图 2)。在所有 KEGG 通路中, 对参与枯草芽孢杆菌氨氮代谢通路及候选基因筛选, 共得到 8 个信号通路, 包含 260 个 DEGs(表 2)。根据对差异表达基因 GO 与 KEGG 富集分析中筛选出 9 个与枯草芽孢杆菌 R47 对水中氨氮应答的相关基因(表 3)。

2.6 sRNA 的预测和分析

去除接头并滤去低质量数据后, 获得 3348 条长度为 50~500 nt 的 sRNA 序列, 其中, 以 50~100 nt 的序列居多。用 Blast 及公共数据库 sRNA Map、sRNA TarBase、SIPHT 及 Rfam 资源对鉴定到的 sRNA 进行注释, 被注释到的 sRNA 总数为 62。

2.7 sRNA 的潜在靶位点及功能分类

对 sRNA 靶基因的分析结果显示, 其有 3960 个对应的潜在靶基因。KEGG 数据库将潜在的靶基因分为代谢、环境信息处理等 6 大类(表 4)。这些潜在靶基因涉及较广的生物学过程及功能, 其中主要参与碳水化合物运输和新陈代谢、氨基酸转运和代谢、转录过程等, 但由于数据有限, 有 1285 个靶基因功能不明确。根据富集分析所得 9 个相关基因中, 其中, *sinR* 和 *tnrA* 分别是 sRNA2073 和 sRNA2182 的靶基因。

2.8 实时荧光定量 PCR 验证

为评估转录组测序结果的可靠性, 随机挑选 *argH*、*codY*、*argG*、*glnA* 和 *glnR* 共 5 个基因进行 Real-time PCR 分析。相关性分析结果显示, 皮尔逊相关系数为 0.947, $P < 0.05$, Real-time PCR 与转录组测序结果具有一致性, 表明基于转录组分析差异表达基因的表达结果较为可靠(图 3)。

3 讨论与结论

微生物可参与水环境中的物质代谢, 将有机和无机污染物转化为无毒化合物, 从而达到改善水质的作用(Hu *et al*, 2012)。比较来自海水分离的枯草芽孢杆菌、粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)和绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 枯草芽孢杆菌所分泌的酶具有最高的活性, 去除污渍能力最强(Marathe *et al*, 2018)。分离于水产养殖水体及底泥中枯草芽孢杆菌

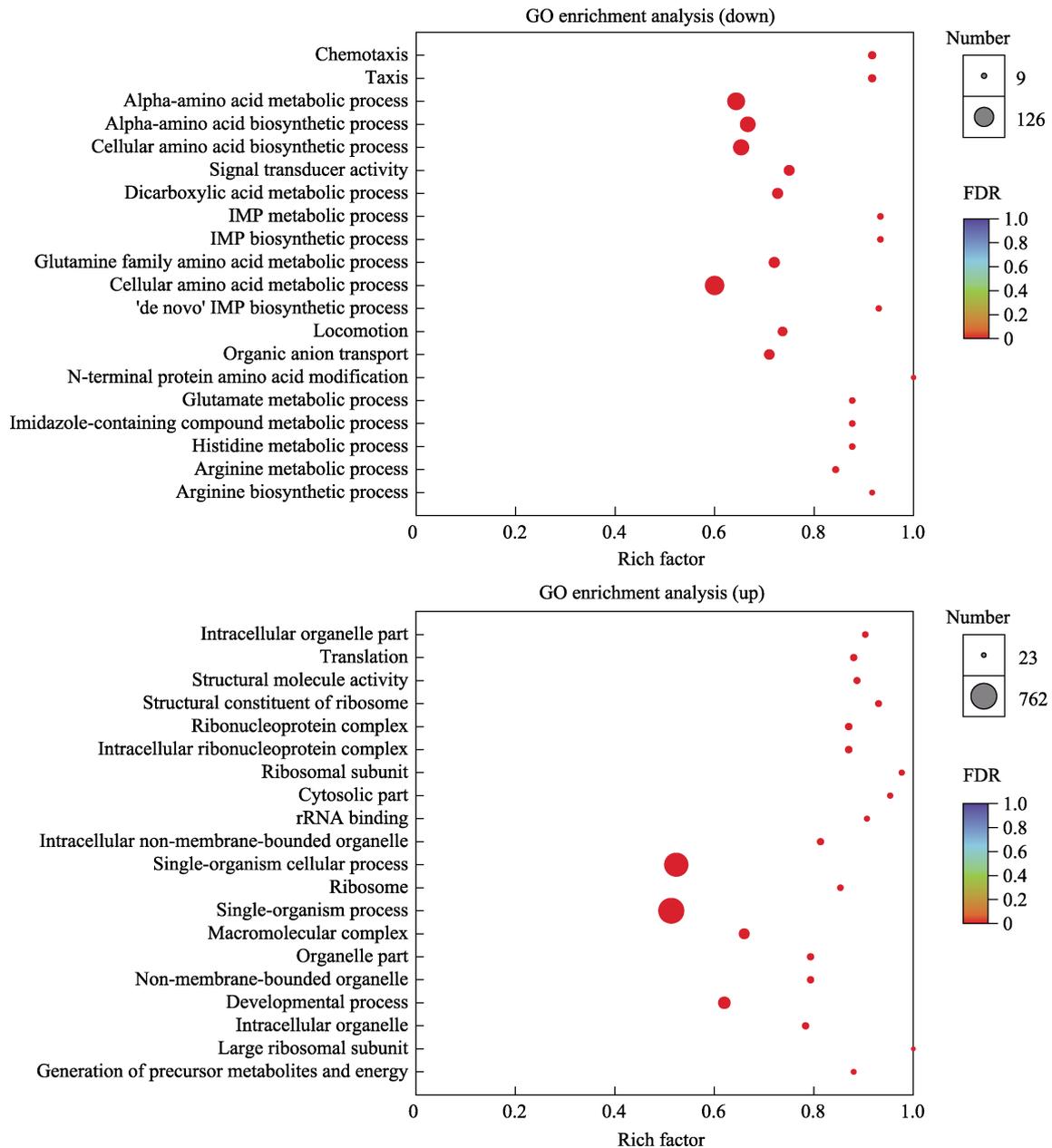


图 1 差异表达基因 GO 富集散点图

Fig.1 Scattered plot of GO enrichment of DEGs

B7 具有良好的水质调控作用,对水体中氨氮的去除率大于 80%(陈静, 2008)。鲫鱼粪便中分离的枯草芽孢杆菌 R47 对氨氮具有相似响应,在一定时间内可降低氨氮含量,从而改善水质。

生物体对某一刺激作出反应时,阐明其生物功能涉及的信号通路是至关重要的。本研究在 GO 富集分析的基础上,进一步开展了 KEGG 信号通路分析,发现 DEGs 富集最多的候选信号通路为细菌双组分系统(Two component system, TCS)。TCS 在细菌、古细菌中均有发现,是其对环境刺激作出反应的多种信号转导过程。枯草芽孢杆菌通过 TCS 来应对高浓度氨

氮环境,得以在逆境中生存(Galperin *et al*, 2018; Krell *et al*, 2010)。*epsA*、*tasA* 和 *sinR* 参与枯草芽孢杆菌对高浓度氨氮的应激反应。TCS 可影响细菌的生物膜形成(Plate *et al*, 2012)。枯草芽孢杆菌生物被膜的胞外基质主要由胞外多糖和胞外蛋白质 TasA 2 个主要组分组成,分别由 *epsA-O* 操纵子和 *tapA-sipW-tasA* 操纵子诱导合成(Kolodkin *et al*, 2010; Nagorska *et al*, 2010)。SinR 是枯草芽孢杆菌生物被膜形成过程中重要的调控蛋白,通过抑制胞外多糖和胞外蛋白质 TasA 的合成,进而抑制生物被膜的形成(Kearns *et al*, 2005)。差异表达分析结果显示, *epsA* 和 *tasA* 均表现出

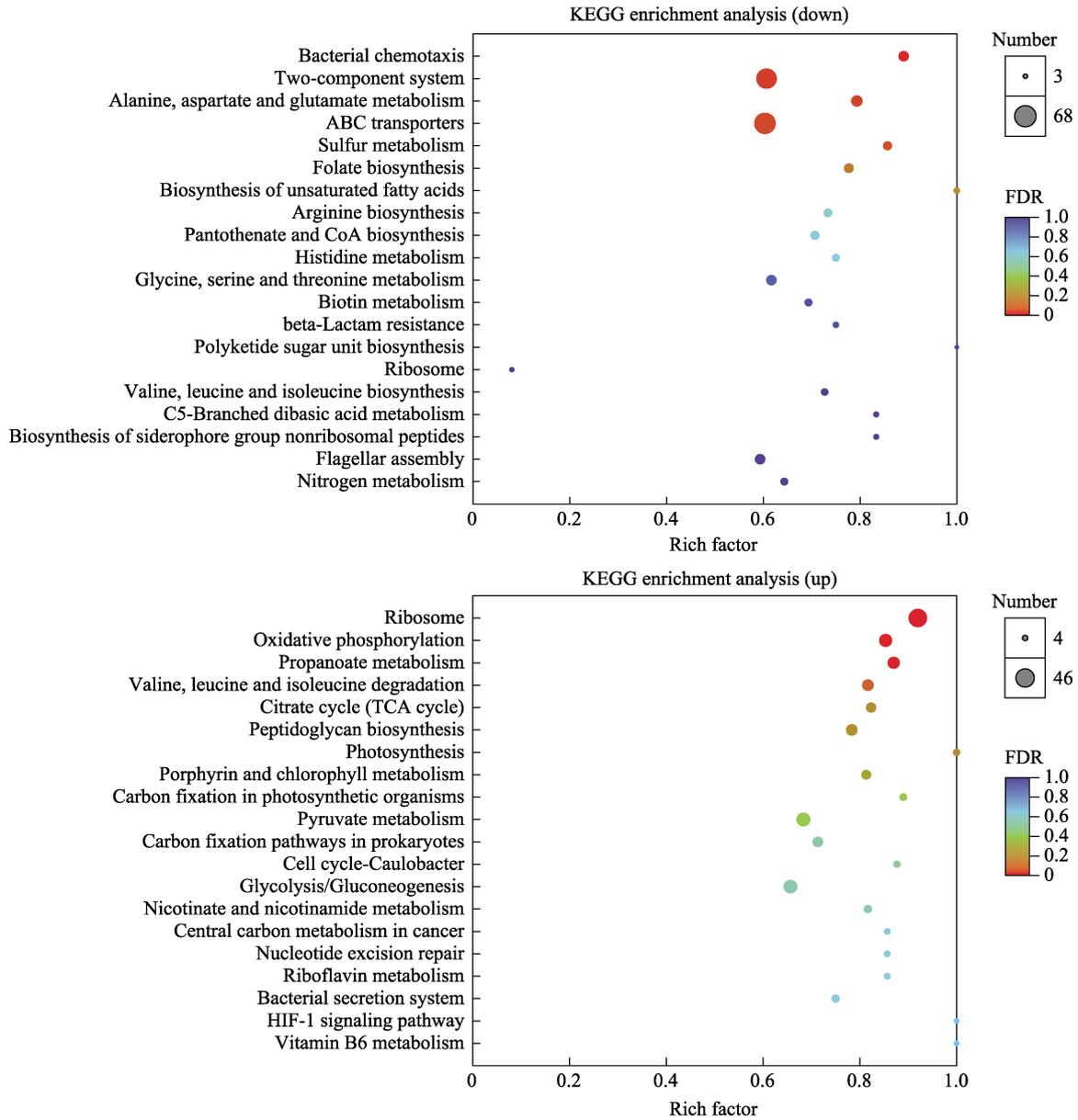


图 2 差异表达基因 KEGG 富集散点图

Fig.2 Scattered plot of KEGG enrichment of DEGs

表 2 氨氮代谢相关差异表达基因 KEGG 富集通路

Tab.2 The enrichment pathway of ammonia nitrogen metabolism related DEGs

通路 Pathway	Pathway ID	DEGs		
		up	down	
细菌双组分系统	Two component system	map02020	40	62
精氨酸生物合成	Arginine biosynthesis	map00220	4	11
嘌呤代谢	Metabolism	map00230	23	31
赖氨酸生物合成	Lysine biosynthesis	map00300	5	8
氮代谢	Nitrogen metabolism	map00910	5	9
硫胺素代谢	Thiamine metabolism	map00730	9	8
精氨酸和脯氨酸代谢	Arginine and proline metabolism	map00330	11	11
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	Alanine, aspartic acid and glutamate metabolism	map00250	4	19

表3 氨氮代谢相关差异表达基因
Tab.3 DEGs related ammonia nitrogen metabolism

基因 Gene	描述 Description
<i>epsA</i>	hypothetical protein
<i>glnR</i>	MerR family transcriptional regulator
<i>glnA</i>	glutamine synthetase
<i>sinR</i>	XRE family transcriptional regulator
<i>tasA</i>	spore coat protein N
<i>tnrA</i>	MerR family transcriptional regulator
<i>ureA</i>	urease subunit gamma
<i>ureB</i>	urease subunit beta
<i>ureC</i>	urease subunit alpha

表4 sRNA 潜在靶基因的 KEGG 代谢通路分类统计
Tab.4 Classification of KEGG metabolic pathways of sRNA potential target genes

KEGG 代谢通路 KEGG metabolic pathway	基因数目 Number of gene
代谢 Metabolism	834
遗传信息处理 Genetic information processing	143
环境信息处理 Environmental information processing	234
细胞过程 Cellular processes	113
生物体系统 Organismal systems	27
人类疾病 Human diseases	71

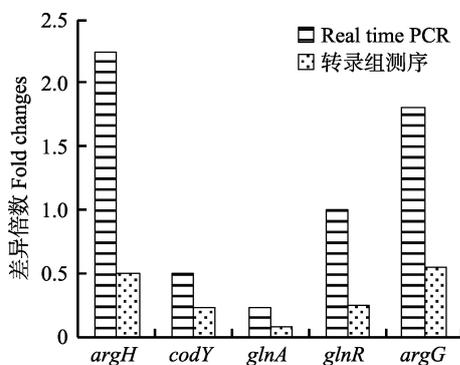


图3 转录组测序结果的实时定量 PCR 验证

Fig.3 Verification of RNA-sequence by Real-time PCR

下调趋势, 而 *sinR* 表现出上调趋势。这可能是由于枯草芽孢杆菌 R47 正处于高浓度氨氮水体的初级适应阶段。

枯草芽孢杆菌没有谷氨酸脱氢酶活性, 通过 GS/GOGAT 途径同化氨, *glnR*、*glnA*、*ureABC* 和 *tnrA* 参与此过程。*glnR* 基因编码的蛋白是氮代谢全局调控因子(Global nitrogen regulator, GlnR), 一种转录调控因子。枯草芽孢杆菌氮代谢途径的谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 受 GlnR 的调节(杨帆等, 2019), 这一观点在本研究也得以证实。*glnR* 位于 *glnA* 上游, 参与双顺

反子 *glnRA* 操纵子的组成。具有一个 α -螺旋-转角-螺旋结构域的 GlnR 形成二聚体后, 结合到 *glnRA* 操纵子上, 在氮源丰富时抑制 *glnA* 转录, 降低谷氨酰胺合成酶的活性(Brown *et al.*, 1996; Wray *et al.*, 2008), 同时, GlnR 也能抑制脲酶 *ureABC* 操纵子的转录, 作为阻遏物阻碍 *tnrA* 基因表达(Brandenburg *et al.*, 2002; Randazzo *et al.*, 2017)。差异表达基因分析结果显示, *glnA*、*ureABC* 和 *tnrA* 呈下调趋势, 与其保持一致。枯草芽孢杆菌对氨氮的应答是一个复杂反应, 多个信号通路相互协调完成。本研究仅对枯草芽孢杆菌 R47 的双组分系统与部分基因进行了探讨, 还需深入开展研究。

sRNA 介导的转录后基因调控是生物体的一种新型基因调控机制, 它在有机体适应环境、调节生命活动等生物过程中有极为重要的作用。氮胁迫诱导 RNA1 和 RNA4 可调节念珠藻(*Nostocales*)和蓝细菌(*Cyanobacteria*)对氮的可利用性(Álvarez-Escribano *et al.*, 2018; Klähn *et al.*, 2018)。Gaimster 等(2019)发现, 副球菌(*Paracoccus denitrificans*) sRNA29 的过表达下调亚硝酸盐还原酶并限制细胞产生 NO 和 N₂O。本研究对样本 sRNA 的靶基因进行预测分析, sRNA2073 和 sRNA2182 所介导的调控通路可能是枯草芽孢杆菌 R47 进行氮代谢的重要辅助。

本研究利用 Illumina 二代高通量测序技术对在富含氨氮环境中枯草芽孢杆菌 R47 进行测序, 并初步分析发现细菌双组分系统和 *epsA*、*tasA*、*sinR*、*glnR*、*glnA*、*tnrA*、*ureABC* 等基因可能参与枯草芽孢杆菌 R47 对氨氮应答过程, 同时进行了 sRNA 分析, 为后续深入探讨枯草芽孢杆菌的脱氮分子机理提供数据支撑。

参 考 文 献

- Álvarez-Escribano I, Vioque A, Muro-Pastor AM. NsrR1, a nitrogen stress-repressed sRNA, contributes to the regulation of nblA in *Nostoc* sp. PCC 7120. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9(1): 2267
- Brandenburg JL, Wray LV, Beier L, *et al.* Roles of PucR, GlnR, and TnrA in regulating expression of the *Bacillus subtilis* ure P3 promoter. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(21): 6060–6064
- Brown SW, Sonenshein AL. Autogenous regulation of the *Bacillus subtilis* *glnRA* operon. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(8): 2450–2454
- Chen J, Xu HY, Gu W. *Bacillus subtilis* B7: Isolation and function in water purification. *Hebei Fisheries*, 2008(11): 10–11, 29 [陈静, 徐海燕, 谷巍. 枯草芽孢杆菌 B7 的分离和净化水质的初步研究. *河北渔业*, 2008(11): 10–11, 29]
- Commichau FM, Gunka K, Landmann JJ, *et al.* Glutamate

- metabolism in *Bacillus subtilis*: Gene expression and enzyme activities evolved to avoid futile cycles and to allow rapid responses to perturbations of the system. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(10): 3557–3564
- Gaimster H, Hews CL, Griffiths R, *et al.* A central small RNA regulatory circuit controlling bacterial denitrification and N₂O emissions. *mBio*, 2019, 10(4): e01165–19
- Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, *et al.* Phyletic distribution and lineage-specific domain architectures of archaeal two-component signal transduction systems. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(7): e00681–17
- Hu M, Wang X, Wen X, *et al.* Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454 pyrosequencing analysis. *Bioresource Technology*, 2012, 117: 72–79
- Kang CL, Li QF, Zhang Y, *et al.* Purifying effect of three heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria strains on the farming water of *Verasper variegates*. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(2): 42–48 [康传磊, 李秋芬, 张艳, 等. 三株异养硝化-好氧反硝化细菌对圆斑星鲈养殖水质的净化效果. *渔业科学进展*, 2018, 39(2): 42–48]
- Kearns DB, Chu F, Branda SS, *et al.* A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(3): 739–749
- Kewcharoen W, Srisapoome P. Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 94: 175–189
- Klähn S, Bolay P, Wright PR, *et al.* A glutamine riboswitch is a key element for the regulation of glutamine synthetase in cyanobacteria. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(19): 10082–10094
- Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, *et al.* D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, 2010, 328(5978): 627–629
- Krell T, Lacal J, Busch A, *et al.* Bacterial sensor kinases: Diversity in the recognition of environmental signals. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64(1): 539–5593
- Liu CH, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Virio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 16(3): 321–334
- Liu SB, Wang XR, Lin ZQ, *et al.* Purification of aquaculture effluent by *Bacillus subtilis* HAINUP40. *Journal of Fisheries Science*, 2018, 37(2): 159–166 [刘树彬, 王新锐, 林壮其, 等. 枯草芽孢杆菌 HAINUP40 水质净化作用的研究. *水产科学*, 2018, 37(2): 17–24]
- Magasanik B. Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annual Review of Genetics*, 1982, 16: 135–168
- Marathe SK, Vashistht MA, Prashanth A, *et al.* Isolation, partial purification, biochemical characterization and detergent compatibility of alkaline protease produced by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* obtained from sea water samples. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, 16(1): 39–46
- Nagorska K, Ostrowski A, Hinc K, *et al.* Importance of EPS genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. *Journal of Applied Genetics*, 2010, 51(3): 369–381
- Plate L, Marletta MA. Nitric oxide modulates bacterial biofilm formation through a multicomponent cyclic-di-GMP signaling network. *Molecular Cell*, 2012, 46(4): 449–460
- Randazzo P, Aucouturier A, Delumeau O, *et al.* Revisiting the *in vivo* GlnR-binding sites at the genome scale in *Bacillus subtilis*. *BMC Research Notes*, 2017, 10(1): 422
- Wang CQ, Li BS, Wang JY, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* and yeast culture on growth, serum biochemical indices and antioxidant capacity of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 47–56 [王成强, 李宝山, 王际英, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌和酵母培养物对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼生长、血清生化指标及抗氧化能力的影响. *渔业科学进展*, 2019, 40(4): 47–56]
- Wray LV, Fisher SH. *Bacillus subtilis* GlnR contains an autoinhibitory C-terminal domain required for the interaction with glutamine synthetase. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(2): 277–285
- Yang F, Qin JX, Peng Q, *et al.* Transcriptional regulation and overexpression of *glnA* gene in *Bacillus thuringiensis*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2019, 35(4): 563–569 [杨帆, 秦嘉欣, 彭琦, 等. 苏云金芽孢杆菌谷氨酰胺合成酶基因 *glnA* 的转录调控和过表达. *中国生物防治学报*, 2019, 35(4): 563–569]

(编辑 冯小花)

Transcriptome and sRNA Analyses of the Response of *Bacillus subtilis* to Ammonia Nitrogen

ZHENG Yao¹, WU Kainian¹, WANG Li^{1①}, WEI Yong²

(1. Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Utilization, Ministry of Education and Sichuan Province, Southwest Minzu University, Chengdu 610041;

2. Animal Science Academy of Sichuan Province, Chengdu 610041)

Abstract To explore the molecular mechanism of denitrification by *Bacillus subtilis* and screen out candidate genes and small RNA (sRNA) related to the response of *B. subtilis* to ammonia nitrogen. Transcriptome sequencing and sRNA analysis were performed on *B. subtilis* in both an ammonia-rich environment and a control group. The relative expression changes in differentially expressed genes were analyzed using real-time PCR. The results showed that each sequencing sample yielded approximately 1.40×10^7 reads on average. There were 3918 differentially expressed genes in the control and treatment groups as per DESeq2 analysis, which enriched 176 signaling pathways in the KEGG database, including eight signaling pathways (bacterial two-component system pathway, arginine biosynthesis, purine metabolism, and so on) adapted to the ammonia-rich environment. We found that *epsA*, *tasA*, *SinR*, *glnR*, *glnA*, *tnrA*, and *ureABC* genes may be involved in the response of *B. subtilis* to ammonia nitrogen in water. Sixty-two annotated strains of *B. subtilis* sRNA were obtained. The prediction and analysis results of sRNA target genes revealed that there are 3960 potential target genes involved in carbohydrate transport and metabolism, amino acid transport and metabolism, and transcription processes. Among them, the target genes corresponding to sRNA2073 and sRNA2182 were *sinR* and *tnrA*, respectively. Real-time PCR analysis showed that the relative expression changes of *argH*, *codY*, *argG*, *glnA* and *glnR* were consistent with transcriptome sequencing. These results provide reference data for further exploring the molecular mechanism of nitrogen removal by *B. subtilis* in wastewater.

Key words *Bacillus subtilis*; Response to ammonia nitrogen; Transcriptome; Differentially expressed genes; sRNA analysis

① Corresponding author: WANG Li, E-mail: qinxin916@aliyun.com