

分类号

密级：否



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

不同浓度氨气对生长猪鼻腔微生物区系和
呼吸道粘膜屏障的影响

EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATION AMMONIA ON
NASAL MICROFLORA AND RESPIRATORY MUCOSAL
BARRIER IN GROWING PIGS

研究生：李季

CANDIDATE: LI JI

导师：黄飞若 教授

SUPERVISOR: PROFESSOR HUANG FEIRUO

学位类型：农业推广硕士

MAJOR: MASTER OF AGRICULTURE
EXTENSION

领域：养殖

FIELD: ANIMAL PRODUCTION

中国 武汉
WUHAN, CHINA

二〇一八年六月
JUNE, 2018

华中农业大学硕士学位论文

不同浓度氨气对生长猪鼻腔微生物区系和 呼吸道粘膜屏障的影响

**Effects of Different Concentration Ammonia on Nasal Microflora
and Respiratory Mucosal Barrier in Growing Pigs**

研 究 生: 李 季
学 号: 2016302120016
指导教师: 黄飞若 教授
学位类型: 农业推广硕士
领 域 : 养 殖

华中农业大学动物科技学院-动物医学院
中国.武汉

**College of Animal Sciences and Technology Huazhong Agricultural University
Wuhan China**

本研究由以下三个项目提供经费资助

1国家重点研发计划（十三五）

2016YFD0500506

2湖北省自然科学基金

2018CFA071

3国家自然科学基金面上项目

31572409

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密	否	如需保密, 解密时间	年 月 日
--------------	---	------------	-------

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。

研究生签名: 李季 时间: 2018 年 6 月 15 日

学位论文使用授权书

本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本; 学校有权保留提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 为存在馆际合作关系的兄弟高校用户提供文献传递和交换服务, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。

注: 保密学位论文(即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文)在解密后适用于本授权书。

学位论文作者签名: 李季 导师签名: 董 峰

签名日期: 2018 年 6 月 15 日 签名日期: 2018 年 6 月 15 日

目 录

摘 要	i
Abstract.....	iii
缩略语表	v
第一章 文献综述	1
1 前言	1
2 猪舍氨气产生机理和排放影响因素	1
2.1 猪的生长阶段和体重.....	2
2.2 建筑结构.....	2
2.3 季节和地区差异.....	3
2.4 日粮中的营养成分和添加剂.....	5
2.5 清粪方式和频率.....	5
3 氨气对动物机体的损伤	6
3.1 氨气对呼吸道危害.....	6
3.1.1 猪呼吸道结构和功能	6
3.1.2 氨气对动物呼吸道损伤	7
3.2 氨气对生化指标的影响.....	10
3.3 氨对其他组织器官的影响.....	10
4 规模化猪舍氨气浓度限值	11
5 本研究的目的和意义	12
第二章 不同浓度氨气对生长猪生长性能和呼吸道粘膜的影响	13
1 前言	13
2 材料和方法	13
2.1 猪养殖环境控制箱的建立和环境参数控制.....	13
2.2 试验设计和试验日粮.....	15
2.3 样品采集和指标测定	15
2.3.1 生长性能测定	15
2.3.2 血液生化指标测定	16
2.3.3 气管和肺组织形态观察	16

2.3.4 气管相关基因表达量测定	16
2.3.5 气管粘膜免疫性能测定	18
2.4 数据处理	18
3 结果与分析	18
3.1 不同浓度氨气对生长猪生长性能的影响	18
3.2 不同浓度氨气对生长猪血液生化指标的影响	19
3.3 不同浓度氨气对生长猪气管和肺组织形态的影响	19
3.4 不同浓度氨气对生长猪气管相关基因表达量的影响	21
3.5 不同浓度氨气对生长猪气管粘膜免疫性能的影响	21
4 讨论	21
4.1 不同浓度氨气对生长猪生长性能的影响	22
4.2 不同浓度氨气对生长猪血液生化指标的影响	23
4.3 不同浓度氨气对生长猪呼吸道形态影响	24
4.4 不同浓度氨气对生长猪气管粘膜屏障的影响	24
4.5 不同浓度氨气对生长猪气管粘膜免疫的影响	25
5 小结	26
第三章 不同浓度氨气对生长猪鼻腔微生物多样性的影响	27
1 前言	27
2 材料方法	28
2.1 试验动物及饲养管理	28
2.2 试验日粮组成和营养水平	28
2.3 样品的采集与制备	28
2.4 鼻腔微生物多样性分析	28
2.4.1 微生物组总 DNA 提取和 PCR 扩增	28
2.4.2 PCR 产物回收纯化	28
2.4.3 扩增产物荧光定量	28
2.4.4 测序文库制备和上机测序	29
2.4.5 分析流程	29
2.5 数据处理	29
3 结果与分析	29

3.1 基于 OTU 的物种丰度分析.....	29
3.2 基于 OTU 的物种差异性分析.....	31
3.2.1 OTU venn 图分析	31
3.2.2 OTU PCA 分析	31
3.2.3 OTU Rank 曲线.....	32
3.2.4 各分类水平 OTU 数	33
3.3 物种相似性分析.....	34
4 讨论	35
5 小结	37
本研究小结、创新点和不足	37
1 小结	38
2 创新点	38
3 待解决问题	38
参考文献	39
附录 研究生在读期间发表的主要论文	48
致 谢	49

摘 要

猪舍氨气浓度增加不仅会污染大气环境，同时会严重影响猪群健康，诱发各种呼吸道疾病，导致生产性能下降。为研究不同浓度梯度氨气对生长猪生长性能、血液生化指标、呼吸道粘膜屏障和鼻腔微生物区系的影响，探究氨气浓度对各指标的最低影响阈值浓度。利用环境控制箱调节氨气浓度，选择 25 头体重接近 ($25.25 \pm 1.06 \text{ kg}$) 的生长猪，随机分成 5 个组。每组 5 头生长猪，饲养在 5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg 五种氨气浓度的养殖环境控制箱中，试验期为 28 天。试验结束分析氨气浓度影响各项指标的最小阈值浓度，为猪舍氨气浓度控制提供理论依据，主要研究结果如下：

1. 生长性能和血液生化指标结果表明：氨气浓度与生长猪 ADG 有极显著线性相关 (Linear effect $P < 0.01$)，与 ADFI 和 FCR 没有显著相关性，且 25mg/kg 组生长猪 ADG 显著降低 ($P < 0.05$)。血氨和 BUN 与氨气浓度呈极显著正相关 (Linear effect $P < 0.01$)，其中影响血氨、BUN 的氨气浓度分别为 25mg/kg、15mg/kg；AST 和 LDH 与氨气浓度呈极显著正相关 (Linear effect $P < 0.01$)，影响 AST 和 LDH 的氨气浓度分别为 10mg/kg、20mg/kg；SOD 和 T-AOC 与氨气浓度呈极显著负相关 (Linear effect $P < 0.01$)，影响 SOD 和 T-AOC 的氨气浓度分别为 10mg/kg、15mg/kg。结果表明：高于 10mg/kg 浓度氨气会影响猪血液生化指标；氨气浓度对生长猪生长性能的影响阈值浓度为 25mg/kg。

2. 呼吸道形态学和粘膜屏障结果分析显示：随着氨气浓度增加气管粘膜纤毛脱落程度加重，25mg/kg 组气管纤毛严重脱落，粘膜变形；25mg/kg 组肺泡严重充血，炎症加重。氨气浓度对气管相关基因表达量的影响结果显示，氨气浓度变化与黏蛋白 (muc5b) 和紧密连接蛋白 (Claudin-1) 基因表达量呈显著正相关 (Linear effect $P < 0.05$)，与半胱氨酸蛋白酶 (caspase-3) 基因表达量呈极显著负相关 (Linear effect $P < 0.01$)，影响三种基因表达量的氨气阈值为 15mg/kg。气管粘膜免疫球蛋白与氨气浓度呈显著负相关 (Linear effect $P < 0.05$)，氨气对 IgG、IgA、IgM 的影响阈值为 20mg/kg。结果表明：高于 15mg/kg 氨气浓度会影响气管相关基因表达量，高于 20mg/kg 会降低气管粘膜免疫性能。

3. 利用高通量测序的方法分析生长猪鼻腔微生物组成，不同氨气浓度对生长猪鼻腔微生物区系的影响结果：氨气浓度高于 20mg/kg 时鼻腔微生物 OTU 显著降低 (P

<0.05), 25mg/kg 处理组微生物组成丰度值最低。鼻腔微生物主要菌群有假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、普氏菌属 (*Prevotella*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、莫拉菌属 (*Moraxella*) 和链球菌属 (*Streptococcus*)。25mg/kg 组莫拉菌属 (*Moraxella*) 和链球菌属 (*Streptococcus*) 丰度值显著高于 5-20mg/kg 组 ($P<0.05$), 这两种菌属会导致肺炎和肺部病变。25mg/kg 乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 和普氏菌属 (*Prevotella*) 组丰度值显著低于 5-20mg/kg 组 ($P<0.05$); 20-25mg/kg 组假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和拟杆菌属 (*Bacteroides*) 组丰度值显著低于 5mg/kg 组 ($P<0.05$)。结果表明: 氨气浓度会影响鼻腔微生物多样性, 高于 20mg/kg 氨气浓度会导致鼻腔微生物丰富度降低, 25mg/kg 浓度氨气会导致鼻腔有害菌群定植数量显著增加。

综上所述: 氨气浓度高于 10mg/kg 时会导致血液生化指标改变; 高于 15mg/kg 时气管相关基因表达量和粘膜免疫性能受到影响; 高于 20mg/kg 时鼻腔微生物丰富度降低, 25mg/kg 处理组鼻腔莫拉菌属和链球菌属丰度显著增加 ($P<0.05$) 综合以上结果, 建议猪舍氨气浓度控制低于 20mg/kg。

关键词: 氨气浓度; 生长猪; 生长性能; 呼吸道; 粘膜; 鼻腔微生物

Abstract

Increased ammonia in piggery not only pollute atmosphere, but also seriously affects herd health, induces various respiratory diseases, and results in decreased production performance. In order to study the effects of different concentration of ammonia on the growth performance, blood biochemical parameters, respiratory mucosal barrier and nasal microflora of growing pigs, we investigated the minimum effect threshold concentration of ammonia on each index. Using chambers to adjust the ammonia concentration, 25 growing pigs weighing close to $(25.25 \pm 1.06 \text{ kg})$ were selected and randomly divided into 5 groups. Each group of five growing pigs was reared in 5mg/kg of the culture control box containing 10mg/kg, 15mg/kg, 20mg/kg, and 25mg/kg of five ammonia concentrations. The test period was 28 days. We analysis the minimum threshold of ammonia concentration influences each indicator, which provides a theoretical basis for the control of atmosphere ammonia in the pig house. The main findings are as follows:

The results of growth performance and blood biochemical indicators showed that ammonia concentration was significantly linearly related to the ADG of growing pigs (Linear effect $P < 0.01$), and there was no significant correlation between ADFI and FCR, and the ADG of the growing pigs in the 25 mg/kg group was significantly lower ($P < 0.05$). Ammonia concentration and blood biochemical indicators have a highly significant linear correlation (Linear effect $P < 0.01$), blood ammonia and BUN increased with increasing ammonia concentration, BUN and blood ammonia effected by ammonia concentration 15mg/kg and 25mg/kg; AST The LDH content increased with increasing ammonia concentration, 10 mg/kg and 20 mg/kg ammonia concentration respectively affecting AST and LDH ; with increasing ammonia concentration, SOD and T-AOC decreased, 10mg/kg and 15mg/kg ammonia concentration affecting SOD and T-AOC. The results suggests that: threshold ammonia concentration effects blood biochemical indicators was 10mg/kg; the effects of ammonia concentration on the growth performance of growing pigs was higher with a threshold concentration of 25mg/kg.

The results of airway morphology and mucosal barrier analysis showed that tracheal mucociliary exfoliation was aggravated with the increasing ammonia concentration. In the 25mg/kg group, tracheal cilia severely detached and the mucous membranes deformed severely; in the 25mg/kg group, the alveoli were severely congested and the inflammation was aggravated. The effect of ammonia concentration on the expression of trachea-related genes show a significant linear correlation between ammonia concentration and the

expression of mucin (muc5b) and claudin-1 (Linear effect $P<0.05$). The expression of caspase-3 gene was highly significant negative linear correlation (Linear effect $P<0.01$), ammonia concentration threshold of affecting the expression of three genes was 15 mg/kg. Tracheal mucosal immunoglobulin was significantly negatively correlated with ammonia concentration (Linear effect $P<0.05$). The effect threshold concentration was 20 mg/kg. The results showed that 15-20mg/kg ammonia concentration affected the mucosal immune and tracheal-related gene expression.

High-throughput sequencing was used to analyze the composition of the nasal microflora in growing pigs. The effect of different ammonia concentration on the nasal microflora in growing pigs suggests that with ammonia concentration increased, the microbiological richness of the nasal decreased, and the abundance of the microbial composition of 25 mg/kg treatment group was lowest. The main microflora of nasal flora are *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Moraxella* and *Streptococcus*. The abundance of *Moraxella* in the 25mg/kg group was significantly higher than that in the 5-20mg/kg group ($P<0.05$). Among them, *Moraxella* is a conditional pathogen that causes obstructive pneumonia when the body's immunity is reduced. The abundance of the 25 mg/kg *Lactobacillus* and *Prevotella* groups were significantly lower than those of the 5-20 mg/kg group ($P<0.05$); The abundance values of *Pseudomonas* and *Bacteroides* in the 20-25mg/kg group were significantly lower than those in the 5mg/kg group ($P<0.05$). The abundance of *Pseudomonas* and *Bacteroides* in the 20-25mg/kg group were significantly lower than those in the 5mg/kg group ($P<0.05$). The results suggests that atmosphere ammonia will effect the microbial diversity of nasal, 25mg/kg concentration ammonia will cause a significant increase of harmful bacteria abundance in the nasal flora, 20-25mg/kg concentration of nasal microbial diversity significantly decreased ($P <0.05$).

In conclusion: ammonia concentration higher than 10mg/kg result in blood biochemical parameters change; higher than 15mg/kg affected tracheal-related gene expression and mucosal immune performance; the nasal microflora richness decreased when ammonia concentration increased to 20-25mg/kg. 25mg/kg treatment group nasal *Moraxella* was significantly increased ($P<0.05$), and the abundance of *Lactobacillus* was significantly reduced ($P<0.05$). Based on the above results, we recommended atmosphere ammonia in the pig house should be controlled below 20 mg/kg.

Key words: Ammonia concentration; Growing pigs; Growth performance; Respiratory; Mucosa; Nasal microbe

缩略语表
(Abbreviation)

序号 No.	缩写 Abbr.	英文名称 English name	中文名称 Chinese name
1	NH ₃	Ammonia	氨气
2	DE	Dry matter	干物质
3	CP	Crude protein	粗蛋白
4	Ca	Calcium	钙
5	P	Phosphorus	磷
6	Lys	Lysine	赖氨酸
7	Met	Methionine	蛋氨酸
8	Cys	Cysteine	半胱氨酸
9	ADG	Average daily gain	平均日增重
10	ADFI	Average daily feed intake	平均日采食量
11	FCR	Feed conversation ratio	饲料转化效率
12	BUN	Blood urea nitrogen	血尿素氮
13	SOD	Superoxide Dismutase	超氧化物歧化酶
14	T-AOC	Total antioxidant capacity	总抗氧化能力
15	LDH	Lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
16	AST	Aspartate aminotransferase	谷草转氨酶
17	SEM	Standard error of mean	平均数标准误
18	OTU	Operational Taxonomic Units	可操作分类单元

第一章 文献综述

1 前言

长期以来养猪业的发展产生大量的污水和有害气体，不仅破坏周围环境，而且猪舍中的有害气体过量也容易引发猪群疾病，导致生产性能降低。《全国生猪生产发展规划（2016~2020年）》报告指出“十三五”期间生猪集约化养殖将提高8个百分点；集约化养殖规模扩大的同时会增加饲养密度，容易导致猪舍氨气浓度过量，猪免疫降低，继发感染其他疾病（Xue et al 2017；Murphy et al 2012）。

针对猪舍氨气浓度过量导致的危害，相关法律法规和文件提出了猪舍氨气浓度推荐值或最大限值。我国GBT 17824.3-2008规模化猪场环境参数规定，生长猪舍氨气浓度不应高于 $25\text{mg}/\text{m}^3$ （约 $32.4\text{mg}/\text{kg}$ ）。然而，澳大利亚国家职业健康和安全委员会将氨气的阈值限值设置为 $25\text{mg}/\text{kg}$ ，但目前还没有关于畜禽养殖暴露浓度的规定（Accioly et al 2004）。BC pork producer上指出人处于 $25\text{mg}/\text{kg}$ 氨气环境中会增加呼吸道疾病发生率。事实上通过查阅大量文献和南北方规模化猪舍氨气浓度监测发现，猪舍氨气浓度一般低于 $25\text{mg}/\text{kg}$ （李泽政 2016；杨润泉 2016）。值得注意的是，已经有研究发现 $10\text{mg}/\text{kg}$ 氨气浓度时哺乳仔猪出现萎缩性鼻炎， $15\text{mg}/\text{kg}$ 时易导致猪感染呼吸道疾病（Hamilton et al 1996）。因此氨气对人和畜禽的影响阈值不能一概而论，其原因是暴露的时间有较大差异，工作人员在氨气环境中的暴露为短期间歇性的暴露，而畜禽长期持续的生存在氨气浓度高的环境中。

在已有的氨气对猪的危害的研究中设置的氨气浓度较高，远远超出了猪舍实际测量的氨气浓度，不能真实反映猪舍氨气对猪的危害（曹进等 2003）。为此，本研究利用养殖环境控制箱精准调控氨气浓度，设计了 $5\text{mg}/\text{kg}$ - $25\text{mg}/\text{kg}$ 五个等浓度梯度的氨气刺激生长猪，分析影响猪呼吸道健康的最低阈值浓度，为规模化猪舍氨气浓度控制提供有力支撑。

2 猪舍氨气产生机理和排放影响因素

猪舍内氨气产生的途径主要有 2 个：①猪体内蛋白质代谢产生氨气：蛋白质在猪体内降解为氨基酸，氨基酸在肝脏中进行氧化脱氨基作用和联合脱氨基作用释放出氨气。大部分氨在尿素循环中与二氧化碳一起转变为尿素。其中，20% ~ 25%的

尿素会进入肠道，在肠道微生物脲酶的作用下分解产生氨气。肠道内未被消化的蛋白质和未被吸收的氨基酸，经肠道细菌作用也可产生氨气排出体外（邹思湘 2012）。

②猪舍内堆积的粪尿、饲料残渣和垫料等含氮有机物分解产生氨气。猪舍内产生的氨气主要来自于排泄物中尿素的分解。粪尿中的很多微生物具有脲酶活性，在脲酶的催化作用下，尿素被分解为氨气。猪体内形成的尿素 75%~80% 随尿液排出体外，而尿液中 97% 的氮以尿素形式存在（史清河 2001）。

2.1 猪的生长阶段和体重

随着猪生长周期的延长，体重、采食量和日粮营养成分的改变，猪舍氨气排放会有显著差异。Hayes（2006）监测了从哺乳仔猪到育肥猪各生长阶段的氨气排放和猪舍氨气浓度，空怀母猪和育肥猪舍的氨气浓度为10.2mg/kg~15.2mg/kg，而刚断奶的仔猪舍氨气浓度为4.7mg/kg~5.8mg/kg。猪舍氨气浓度差异不仅是因为猪的生长阶段导致体重、采食量、日粮营养导致的氨气浓度不同，还有不同阶段的猪舍建筑结构导致的氨气排放也会有差异。Philippe等（2007）研究发现，猪育肥期结束时的氨气排放量是育肥初期的5倍。在整个育肥期间，猪日氨气排放量平均每天增加85mg（Aarnink et al 1995）。因为猪的体重增加需要的采食量和产生的粪尿也会增加。在生猪养殖过程中，育肥猪氨气排放的主要贡献者，约占氨气总排放的70%（Dourmad et al 1999）。

2.2 建筑结构

空间结构：研究发现超大型密闭鸡舍内氨气浓度约为普通密闭鸡舍和开放型鸡舍氨气浓度2倍，其原因可能是鸡舍长轴增加，从而减小了长轴方向通风速率，导致有害气体不能有效排出（张英 2013）。规模化猪舍存在相同弊病，猪舍的长轴过长会导致通风较差，有可能导致氨气浓度超标。

地面材料：育肥猪舍使用锯末、稻壳和各种微生物菌类组成的发酵床与普通实心水泥地面相比，氨气浓度由13.45mg/m³减少为7.96mg/m³（王国华 2016）。这与垫料中的发酵菌群有关，其中的微生物可以利用粪尿中的一部分氮元素，因此以氨态氮挥发的形式就相对减少。

通风系统：通风系统是规模化养殖必不可少的设备，畜禽舍的通风状况会直接影响舍内氨气浓度。研究表明，钟楼式牛舍氨气浓度显著低于双坡式牛舍，因为钟

楼式牛舍具有更好的通风性 (Liu et al 2018)。然而, 空气气流增加会加快尿素分解, 加快氨气生成 (Ye et al 2009)。据报道, 鸡舍机械通风和自然通风相比氨气排放量更大, 这是由于机械通风增加了气体交换导致氨气排放增加 (Mendes et al 2014)。但是总的来说, 猪舍保持良好通风会大大降低舍内氨气等有害气体含量。

2.3 季节和地区差异

不同季节的气候对猪舍内温度及通风量有很大影响, 从而影响猪舍内氨气排放量。夏季气温升高, 氨气排放量显著升高, 冬季则显著下降 (Palkovičová et al 2012)。然而, 猪舍氨气浓度受排放量和多种其他因素影响, 由于夏季炎热, 猪舍的通风频率增加, 舍内的氨气浓度会显著降低 (Blanesvidal et al 2008)。地区不同导致的猪舍氨气浓度差异主要是因为地区环境差异, 我国北方冬季气温低, 冬季时间长, 为了猪舍保温基本采用密闭式, 通风时间短, 猪舍氨气浓度较高; 而南方地区在冬季还可以保持一定的通风频率, 猪舍氨气浓度相对低于北方 (表1-1)。总的来说, 对于同一猪舍, 冬季温度低较少通风, 氨气浓度普遍高于夏季。因此在寒冷的冬季, 可以在中午温度稍高时适当的开窗通风, 能有效减少猪舍氨气浓度。

表1-1 气候条件对猪舍有害气体浓度影响

Table1 Impact of climatic condition on the concentration of harmful gases in pig house

猪生长阶段	监测地区	NH ₃ (mg/kg)	CO ₂ (mg/kg)	H ₂ S (mg/m ³)	粉尘 (mg/m ³)	参考文献
哺乳仔猪	杭州	1.63±0.29 (春) 2.55±0.27 (秋)	-	-	-	李泽政 2016
保育猪	山东	4.60±1.46 (夏)	654 (夏)	-	-	尹昭智 2017
保育猪	山东	7.33 (冬)	-	-	3.85	盛清凯 2009
保育猪	金华	5.21±2.17 (春) 3.29±0.87 (夏)	- -	7.37±1.43 (春) 5.68±1.74 (夏)	-	章红兵 2012
保育猪	广东	16.21±1.21 (春)	-	2.94±0.16 (春)	3.76±0.62	李学莉 2014
保育猪	吉林	38.43±2.38 (冬)	1500 (冬)	-	-	尹航 2008
保育猪	浙江	6.24±0.51	-	-	-	赵许可 2014
生长育肥猪	河北	73.66±3.43 (秋)	-	-	-	李蕴玉 2012
生长育肥猪	江苏	2.21~6.89 (夏) 7.8~17.03 (冬)	-	-	-	周忠凯 2014
育肥猪	宁夏	0.25 (冬) 16.8 (夏)	1400 (冬) 400 (夏)	0.54 (冬) 2.82 (夏)	-	任俊 2012
妊娠母猪	湖南	6.94±3.42 (冬) 6.59±3.25 (春) 5.64±3.00 (夏) 9.75±9.27 (秋)	1054 (冬) 689 (春) 615 (夏) 796 (秋)	-	-	杨润泉 2016
哺乳母猪	山东	14.50±0.23	-	-	-	郭丽华 2013
哺乳母猪	甘肃	28.38 (夏)	1400 (夏)	7.2 (夏)	-	宗丰 2008
妊娠母猪	黑龙江	7.54±2.21 (冬)	5178 (冬)	-	-	高孟起 2015
哺乳母猪	四川	28.28 (夏)	1174 (夏)	29.34 (夏)	-	张艳 2016

注: -表示未测定

Note: -- means not determined

2.4 日粮中的营养成分和添加剂

适当降低猪日粮粗蛋白水平、平衡必须氨基酸可以有效减少氨气排放。猪日粮粗蛋白（CP）下降1%可以减少氨气排放10%~12.5%，粗蛋白含量从20%下降到12%时，猪氨气排放量减少63%（Hansen et al 2007；Otto et al 2003）。日粮粗蛋白减少会降低血液尿素氮含量，动物排泄物中的尿素含量随之降低，进而减少氨气排放（Liu et al 2017）。

日粮中粗纤维水平会影响畜禽氨气排放，粗纤维中的非淀粉多糖有利于肠道微生物区系健康。盲道微生物分解纤维素产生丙酸、丁酸等短链脂肪酸会降低家畜盲肠和粪便的pH，从而抑制脲酶活性减少NH₃排放（Clark et al 2005）。用小麦代替大麦饲喂育肥猪，NH₃排放量可以减少约40%（Garry et al 2007）。

日粮添加剂减少猪舍氨气排放主要是通过抑制脲酶活性、物理吸附和增加畜禽蛋白利用率等措施减排。研究报道，断奶仔猪日粮中添加125 mg/kg丝兰提取物能显著降低猪舍内氨气浓度并降低猪排泄物中的脲酶活性（Liang et al 2009）。肉鸡日粮中添加2%复合吸附剂可以减少约24%氨气排放（张建军 2017）。添加肠道益生菌可以改善畜禽肠道微生物区系，提高有益菌数量、增加菌体蛋白利用率，减少粪氮排出，从而减少粪尿氨气排放。蛋鸡日粮中添加0.01%的屎肠球菌能显著降低氨气排放并增加蛋鸡产蛋率（Park et al 2016）。

2.5 清粪方式和频率

粪尿是畜禽舍氨气排放的主要来源，畜禽粪尿的清理方式会影响舍内氨气浓度。研究表明猪舍水泡粪比人工干清粪的氨气浓度高9.97%（杨亮 2013）；提高清粪频率对舍内氨气浓度控制尤为重要，随着粪尿堆放时间延长不仅会滋生大量有害微生物，而且会明显增加氨气浓度。粪尿堆积过程中内部温度升高，会导致脲酶活性增加，氨气排放增加（臧冰 2016）。据报道，每周清粪一次和清粪两次比深坑自然积粪减少氨气排放52%和63%（Lim et al 2004）。

3 氨气对动物机体的损伤

3.1 氨气对呼吸道危害

3.1.1 猪呼吸道结构和功能

呼吸道是介导氧气从空气中转移到血液并将二氧化碳等代谢废物排出、辅助调节体温的器官。呼吸道在解剖学上被分为上呼吸道和下呼吸道，被咽部隔开。上呼吸道包括鼻腔和鼻咽。下呼吸道从喉开始，然后是气管，支气管，细支气管和肺（彭克美 2009）。鼻粘膜由纤毛柱状细胞、基底细胞和杯状细胞组成，以纤毛柱状细胞为主（Joki et al 1998），粘膜上丰富的鼻毛可以过滤空气中的颗粒物。由于猪鼻腔由狭窄的管腔、空洞和间隙等构成，结构复杂。猪舍中的菌群复杂导致鼻粘膜上有大量的微生物寄居。这其中包括有益菌、有害菌和条件性致病菌等。鼻粘膜定植的微生物种类和数量与猪的疾病密切相关（郑志喜 2013；陈江 2016）。

气管粘膜由纤毛柱状上皮细胞、纤毛、杯状细胞与基细胞以及上层黏液组成（图 1-1）。纤毛上附有黏液层，黏液层富含 SIgA、溶菌酶、免疫蛋白等，具杀菌作用。其覆盖在纤毛上皮，具有润滑、保护上皮且能吸附外来吸入的颗粒、病原菌、微生物等作用，黏液的多少能影响纤毛的摆动。SIgA 由 B 淋巴细胞分泌并经过一系列加工到达气管粘膜，它同时参与了气管和肺部的特异性免疫和非特异性免疫，是粘膜免疫中重要的组成部分（Krejci et al 2013）。呼吸道粘膜具有强有力的物理、化学及免疫的清除外源微生物的机制，在机体免疫中发挥重要的作用。

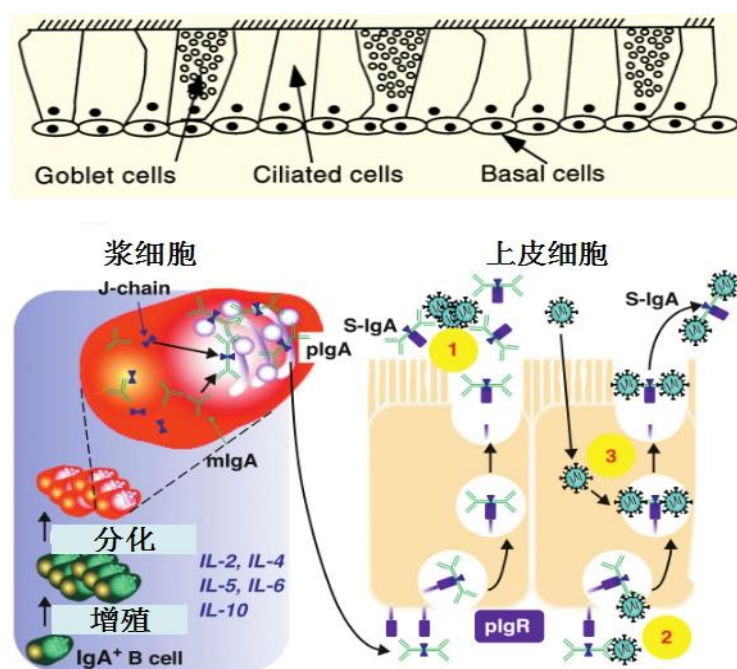


图 1-1 气管粘膜非特异性免疫（修改自Sato and Kiyono 2012）

Fig 1-1 Non-specific immune of Tracheal mucosal (modified from Sato and Kiyono 2012)

肺组织中有参与非特异性免疫的一系列活性蛋白和细胞，肺泡巨噬细胞存在于肺泡腔中，主要参与非特异性免疫中细胞免疫和体液免疫（Crujisen et al 1992; Pabst et al 1996）。肺泡中的防御素在受到外界环境刺激或微生物攻击时会召集大量的免疫因子增加自身的防御力。呼吸道中复杂有效的非特异性免疫机制系统，可杀灭超过90%的从空气中吸入的微生物。这种非特异性免疫系统在预防感染中起关键作用，而不会过度激活特异性免疫应答（Krejci et al 2013）。

呼吸道粘膜中的机械屏障、化学屏障和免疫屏障通过不同的分子调控机制、信号传导以及生物学功能相互结合共同保护机体呼吸道粘膜屏障，抵御病原菌等有害物质的攻击。当猪舍环境致病因子相互作用时，会破坏呼吸道粘膜屏障完整性，导致呼吸道上皮细胞氧化应激及炎症加重，引发呼吸道疾病，降低免疫功能，严重危害猪群健康。呼吸道作为机体的第一道防御屏障在体积非特异免疫中起到至关重要的作用（孙永波 2017）。猪的呼吸道与外界环境相通，直接受猪舍内温湿度、细菌、病毒和各种有害气体的影响。

3.1.2 氨气对动物呼吸道损伤

氨气具有极强的水溶性和腐蚀性，因此畜禽呼吸道对氨气的敏感性较强，氨气通过损伤呼吸道粘膜降低其免疫抵抗力，细菌病毒通过呼吸道上皮细胞间隙进入动

物体内，引发呼吸道疾病（孙永波 2017）。氨气对呼吸系统的损坏程度与浓度高低和暴露时间长短有关，当肉鸡舍中氨气浓度达到 $20\text{mg}/\text{m}^3$ ，持续6周会引起肉鸡肺水肿，采食量减少，生长性能降低，并增加各种疾病易感性；氨气浓度达到 $70\text{mg}/\text{kg}$ 时，肉仔鸡气管和肺部粘膜纤毛脱落、肺部炎性细胞显著增加（魏凤仙 2012）。研究发现 $75\text{mg}/\text{kg}$ 的高氨环境导致肉鸡气管纤毛变短或缺失，检测发现黏蛋白的表达量上调，而过度分泌黏蛋白会导致气管阻塞，这就解释了为什么舍内高浓度氨气环境下的畜禽会出现咳嗽、喘气等症状（Yan et al 2016）（表1-2）。此外，肉鸡气管中肌球蛋白、肌钙蛋白表达量均上调，这些蛋白在肌肉收缩中发挥重要作用，通过促进细丝滑动和增强肌肉收缩功能来收缩气管，从而减少氨气吸入（Amer et al 2004）。氨气不仅直接危害呼吸道，还会导致畜禽舍内空气中微生物气溶胶浓度升高、各种病原体数量增多。Michiels等（2015）研究氨气浓度对生长猪舍内空气中PM2.5含量和生长猪肺组织病变的影响，结果表明随着氨气浓度增加，生长猪死亡率和支原体肺炎的患病率都有显著增加。当猪舍氨气为 $15\text{mg}/\text{kg}$ 时，易导致猪感染呼吸道疾病；达到 $35\text{mg}/\text{kg}$ 时，开始出现萎缩性鼻炎（曹进 2003）。

表1-2 不同氨气浓度对动物呼吸道健康的影响

Table 1-2 The effect of different concentration ammonia on growth performance and health of pigs

动物种类	体重或日龄	氨气浓度	氨气控制	测定指标与结论	参考文献
哺乳仔猪	1周	5、10、15、25、35、50mg/kg	环境控制室	10mg/kg氨气猪萎缩性鼻炎最严重，呼吸道粘膜损伤	Hamilton et al 1996
哺乳仔猪	1周	0、20mg/kg	环境控制室	20mg/kg时猪鼻腔巴氏杆菌定植数量↑	Hamilton et al 1998
断奶仔猪	10kg	15~100mg/kg	猪舍+氨水挥发	氨气浓度60mg/kg时，萎缩性鼻炎发病率↑	曹进 2003
育肥猪	16周	0、10、25、50mg/kg	环境控制室	c (NH ₃) ↑，呼吸道α-溶血性球菌含量↑、机体免疫↓	Murphy et al 2012
生长猪	25kg	18.6±2.8~33.9±4.7mg/kg	猪舍	c (NH ₃) ↑，死亡率、肺炎发病率↑	Michiels et al 2015
肉鸡	21日龄	0、75mg/kg	环境控制箱	75mg/kg氨气肉鸡气管炎性因子和黏蛋白分泌↑	Yan et al 2016
肉鸡	21日龄	30、70mg/kg	环境控制箱	70mg/kg氨气浓度时，气管SIgA含量↓	魏凤仙 2012
肉鸡	21日龄	0、25、50mg/kg	环境控制箱	25mg/kg到50mg/kg支气管炎加重，生长性能↓	Caveny et al 1981
肉鸡	21日龄	0、30、60mg/kg	环境控制箱	60mg/kg时肉鸡气管和肺组织病变明显	Beker et al 2004

注：↑表示上升，↓表示下降。

Note: ↑means increase, ↓means decrease.

3.2 氨气对生化指标的影响

猪长时间处在高浓度的氨气环境中，呼吸道所吸入的氨气通过肺泡上皮直接进入血液，其中一部分能被肝脏转化为尿素，但仍有部分氨存留于血液中导致血氨升高。此外，动物对氨气的刺激具有本能的逃避性，通过10天仔猪氨气暴露试验发现2/3的仔猪都会逃避100mg/kg氨气浓度，选择正常环境（5-10mg/kg氨气浓度）（Smith et al 1996）。50mg/kg氨气时保育猪血液中巨噬细胞、淋巴细胞和皮质酮含量显著增加，这是机体应激的一种免疫应答（Borell et al 2007）。70mg/kg氨气浓度时肉鸡血清球蛋白和溶菌酶浓度降低，溶菌酶主要由巨噬细胞分泌，是动物机体的一种非特异性免疫（Wei et al 2015）。因此，氨气会导致动物机体免疫性能下降，各种病原微生物随之入侵机体，诱发各种呼吸道疾病、导致生产性能下降。

3.3 氨对其他组织器官的影响

氨气作为一种应激源会造成肠道粘膜损伤，同时影响肠道消化酶活性及粘膜上皮养分转运载体，进一步影响畜禽的养分消化率。研究发现，大鼠血氨浓度升高会抑制肠道短链脂肪酸氧化（Jr et al 2003）。据报道，75mg/kg氨气环境中肉鸡小肠细胞骨架蛋白表达下调，小肠粘膜上皮细胞的形态改变，表现为肠道绒毛的长度变短或缺失、纤毛之间的隐窝加深，肉鸡的生长性能下降（Zhang et al 2015）。肠道产氨会改变肠道内pH值，对肠道有益菌群有较大影响（魏凤仙 2012）。

氨可以作为动物机体氨基酸合成的来源之一，同时也可以经氨基酸脱氨产生，氨作为氨基酸和蛋白代谢的产物主要在肝脏代谢合成尿素。研究表明，随着门静脉血氨浓度升高，进入猪肝NH₄⁺增加，门静脉血中NH₄⁺进入肝脏后会加速猪肝氨基酸分解代谢，导致尿氮排放增加（包正喜 2017）。此外，氨和二氧化碳、H₂O结合生成尿素，这个过程消耗的能量约占肝脏消耗总能的45%，猪吸入的氨气过多，会影响整个机体的能量代谢（Lobley et al 1995）。

血氨毒性对脑组织中神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞也具有很强的破坏作用，氨易导致星形胶质细胞的肿胀（Vijay et al 2016）。高血氨引起的大脑缺氧或细胞有氧呼吸抑制会导致脑组织乳酸含量增加（Rose et al 2007）。肉牛饲喂过量尿素氨中毒会出现肌肉震颤、瘤胃停滞、心率加快、轻度或严重脱水和抽搐等病理反应（Antonelli et al 2004）。Charles（1966）认为，高浓度氨气会改变血液中pH值，血

液pH值的改变导致大脑神经中枢的改变，从而抑制呼吸，机体能量需求量降低，采食量下降，进而影响其生长性能。

4 规模化猪舍氨气浓度限值

根据我国GBT 17824.3-2008规模化猪场环境参数规定，生长猪舍氨气浓度不应高于 $25\text{mg}/\text{m}^3$ （约 $32.4\text{mg}/\text{kg}$ ），而美国爱荷华州立大学推荐的氨气浓度限值为 $10\text{mg}/\text{kg}$ 。BC pork producers safe guide指出 $25\text{mg}/\text{kg}$ 氨气每天8小时的暴露时间对猪场工作人员的鼻粘膜，上呼吸道结构和肺组织都会产生很不利的影响，长时间会引起呼吸道疾病（表1-3）。猪场工作人员和猪群的最大区别在于猪场工作人员是间歇性、暂时性暴露于氨气环境中，而猪群是连续暴露于氨气环境中，其暴露时间长于人的暴露时间，因此氨气浓度对猪和人的危害阈值有差异。Donham（1991）研究发现， $11\text{mg}/\text{kg}$ 氨气浓度就会对猪呼吸道产生不利影响。据调查猪舍氨气浓度大多低于 $25\text{mg}/\text{kg}$ ，而有研究报道了低于 $25\text{mg}/\text{kg}$ 的氨气浓度会对猪呼吸系统造成损伤，因此猪舍氨气浓度限值目前还存在较大争议。

表1-3 不同氨气浓度对人和猪危害

Table1-3 Impact of different concentrations ammonia on human and pigs

氨气浓度	暴露时间	对猪的影响	对工作人员影响	参考文献
$32.4\text{mg}/\text{kg}$	持续暴露	整个呼吸道损伤, 生长性能下降	-	GBT17824.3-2008
$6-20\text{mg}/\text{kg}$	持续暴露	-	眼结膜受损, 呼吸道患病率增加	Pork Industry Handbook 2010
$50\text{mg}/\text{kg}$	持续暴露	生长性能下降、呼吸道患病率显著增加	-	
$25\text{mg}/\text{kg}$	8h/d	-	刺激眼睛和上呼吸道粘膜, 长期暴露可能导致呼吸道疾病	BC Pork Producers Safety Guide 1993
$11\text{mg}/\text{kg}$	持续暴露	呼吸道患病率显著增加	-	Donham 1991
$10\text{mg}/\text{kg}$	持续暴露	呼吸道患病率增加	-	爱荷华州立大学

注：-表示未测定。

Note: - means not determined.

5 本研究的目的是和意义

随着我国集约化养猪的快速发展，猪舍养殖密度增加，有害气体的控制也成为制约养猪业可持续发展的难题。氨气作为猪舍中危害最严重的有害气体，对猪群的健康有很不利的影响。众所周知，春冬季节是猪舍传染病的高发期，这与猪舍氨气浓度过高有直接的关系，氨气浓度高会导致猪群的免疫力降低，病原微生物趁机而入。目前我国农业行业标准规定生长育肥猪舍氨气浓度应低于 $25\text{mg}/\text{m}^3$ （约 $32.4\text{mg}/\text{kg}$ ）。然而很多研究报道了低于 $25\text{mg}/\text{kg}$ 的氨气浓度也会导致猪的免疫降低，出现呼吸道疾病等。近年来随着动物福利的呼声越来越高，猪舍氨气的阈值浓度有待进一步降低。目前氨气对畜禽的危害研究主要集中在肉鸡和蛋鸡领域，国内对猪的危害研究鲜见报道。本研究旨在比较5种浓度氨气（5、10、15、20、 $25\text{mg}/\text{kg}$ ）对猪的生长性能、血液生化、呼吸道粘膜屏障和粘膜免疫、鼻腔微生物区系的影响。综合筛选出现显著差异的最低阈值浓度，进而推荐猪舍氨气应该控制的氨气浓度范围，为生产实践提供理论和依据。

第二章 不同浓度氨气对生长猪生长性能和呼吸道粘膜的影响

1 前言

呼吸道粘膜是机体非特异免疫的重要组成部分，也是机体的第一道免疫屏障，对抵抗复杂环境致病菌有重要作用（Krejci et al 2013）。呼吸道粘膜的物理屏障、化学屏障和免疫屏障共同构成一道防御系统（孙永波 2017）。然而由于呼吸道运输气体的过程与环境空气直接接触，对空气中的有害气体，微生物等较为敏感。对猪舍而言，有害气体浓度升高会刺激呼吸道，易导致呼吸道免疫屏障被破坏。进而导致微生物的趁虚而入，引发猪群疾病，影响其生长性能。

氨气是猪舍中常见有害气体之一，其极强的水溶性使其容易对猪呼吸道粘膜部分造成损伤，在氨气进入血液循环形成血氨之后还会对机体的各个器官造成危害（Zheng et al 2005）。研究发现，高浓度氨气会增加猪萎缩性鼻炎和肺炎等呼吸道疾病的患病率，甚至会导致猪生长性能下降（Michiels et al 2015；曹进 2003）。Drummond等（1980）试验表明：暴露于50mg/kg、100mg/kg和150mg/kg浓度氨气仔猪分别对照组（0mg/kg浓度氨气）日增重降低12%、30%和29%。氨气长时间暴露会对猪造成慢应激，血液生化指标有所改变，血液免疫性能下降（Borell et al 2007）。虽然氨气对猪血液指标影响的研究较少报道，但大量的家禽试验表明，高浓度氨气环境会导致家禽血液应激激素水平增加，血液免疫性能降低（王忠等 2008）。

呼吸道是接受氨气刺激的最敏感器官，氨气对猪呼吸道粘膜和生长性能影响的阈值浓度可能存在差异。为研究氨气刺激对呼吸道粘膜屏障和粘膜免疫与生长性能的影响阈值。本试验利用猪养殖环境培养箱控制设施，系统开展了不同梯度氨气浓度对生长猪的刺激试验。通过5-25mg/kg五种浓度梯度氨气刺激生长猪，研究其对生长猪生长性能、血液生化指标、呼吸道粘膜屏障和免疫的影响，为猪舍氨气浓度控制参数提供参考。

2 材料和方法

2.1 猪养殖环境控制箱的建立和环境参数控制

相对于传统猪舍而言，环境控制箱可以保持环境参数舒适且能够精确调控各环境参数，传统猪舍中影响猪呼吸道健康的因素众多，不能保证环境因子单一，对试

验结果有较大影响。本试验为研究不同氨气浓度梯度对生长猪的影响，采用一种智能化养殖环境培养箱（由华中农业大学工学院高云老师团队设计），环境控制箱的空间为 $2.5\text{m}\times 2.5\text{m}\times 2.5\text{m}$ （图2-1）。控制箱内的温度、湿度、二氧化碳、氨气浓度等环境参数。通过控制空调、风机、氨气减压阀、电磁阀等设备运转，精准控制箱内氨气浓度并使其他环境参数满足生长猪生长的舒适环境。根据中国《规模猪场环境参数及环境管理》（GB/T 17824.3—2008）对猪舍内空气温度、相对湿度和风速的规定，环境控制箱温度设置为 $22\sim 25^{\circ}\text{C}$ ，湿度为 $60\sim 75\%$ ，风速 $<0.3\text{m/s}$ 。



图2-1养殖环境控制箱部分和整体图

Figure 2-1 Part and overall view of the aquaculture chamber

氨气是猪舍中危害最大的有害气体之一，猪群对环境中的氨气变化比较敏感。因此本试验选择测量精度较高的光谱吸收测量仪，测量精度为 0.1mg/kg 。安装测量装置的高度根据生长猪站立的生长高度，其测量值可以准确反应猪实际吸入的氨气浓度，并及时反馈到计算机程序，及时调整通风阀，保证氨气浓度稳定，氨气浓度设置为 5ppm 、 10mg/kg 、 15mg/kg 、 20mg/kg 、 25mg/kg 。且 $c(\text{CO}_2) < 800\text{mg/kg}$ ， $c(\text{H}_2\text{S}) < 5\text{mg/kg}$ 。

2.2 试验设计和试验日粮

选择25只体重接近(25.25 ± 1.06 kg)、健康状况良好的生长猪(全部为阉割公猪),随机分配在5个环境控制箱,每个环境控制箱5头猪,五个环境控制箱的氨气浓度分别控制在5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg。饲喂方式为自由采食,每天上午8:00清理料槽记录前一天的采食量,预试验7天,正式试验28天。试验地点为华中农业大学国家家畜工程研究中心种猪场。试验日粮参考生长猪NRC(2012)营养标准购买于武汉大北农饲料,饲料组成及营养成分见表2-1。每天早晚各投料一次,记录加料重量,并在第二天清理料槽记录前一天日采食量。

表2-1 饲料组成及营养成分
Table 2-1 Feed composition and nutritional level (%)

饲料原料	含量/%	营养水平	含量/%
玉米	64.5	DE (MJ/kg)	13.80
麸皮	11.0	CP	17.00
豆粕	22.0	Ca	0.61
石粉	0.40	P	0.60
骨粉	1.00	Lys	0.85
食盐	0.40	Met+Cys	0.38
预混料	0.50		
赖氨酸	0.20		

注: 1 预混料为每千克日粮提供: 锰, 35mg; 铁, 152.5mg; 锌, 137.5mg; 铜, 125mg; 碘, 0.75mg; 硒, 0.30mg; VA, 11750IU; VD₃, 50IU; VE, 50IU; VK, 1.75mg; 氯化胆碱, 750mg; 烟酸, 38mg; 泛酸钙, 35.75mg; VB₂, 10mg; VB₁, 1mg; VB₆, 1mg; VB₁₂, 27.5mg; 生物素, 100μg; 叶酸, 0.5mg。

Note:¹ The premix provided per kilogram diet: Mn, 35mg; Fe, 152.5mg; Zn, 137.5mg; Cu, 125mg; I, 0.75mg; Se, 0.30mg; VA, 11750IU; VD₃, 1500IU; VE, 50IU; VK, 1.75mg; Choline chloride, 750mg; Niacin, 38mg; calcium pantothenate, 35.75mg; VB₂, 10mg; VB₁, 1mg; VB₁₂, 1mg; VB₁₂, 27.5mg; Biotin, 100mg; Folic acid, 0.5mg.

2.3 样品采集和指标测定

2.3.1 生长性能测定

试验开始和结束当天上午8:00以重复单位对猪只进行称重,并记录,并对余料进行称重,计算平均日增重(ADG)、平均日采食量(ADFI)以及料重比(FCR)。

2.3.2 血液生化指标测定

正式试验开始后清理料槽称重并对生长猪进行称重，记录试验结束时体重。试验结束后，每个处理组选取 3 头生长猪，前腔静脉采血，分装在 5ml 肝素钠采血管中，3000r/min 转速离心 10 分钟取血清，用生化试剂盒分别测定血浆中血氨、尿素氮、T-AOC、SOD、AST、LDH 含量。

血液生化指标根据生化试剂盒说明书按步骤测定，所需仪器和试剂耗材如下：

仪器：纯水仪（FBZ2001-UP-P 型，青岛富勒姆），台式离心机（Neofuge 15R 型，Heal Force），微型旋涡混合器（MX-F 型，Servicebio），水浴锅（TL-420D 型，江苏姜堰），移液枪（DS74948，大龙），酶标检测仪（Epoch，BioTeK），全自动生化分析仪（Chemray 240，深圳雷杜生命科技）。

试剂耗材：T-AOC试剂盒（A015，南京建成），SOD试剂盒（A001-1，南京建成），LDH试剂盒（A020-2，南京建成），BUN试剂盒（C013-1，南京建成），AST试剂盒（C010-1，南京建成），血氨试剂盒（A086，南京建成）。

2.3.3 气管和肺组织形态观察

分别于试验结束后屠宰生长猪取气管（1cm）、肺组织一小块（1g）固定于4%多聚甲醛中，常规石蜡包埋组织切片，HE 染色，中性树脂封片，倒置显微镜观察照相记录试验结果。

2.3.4 气管相关基因表达量测定

保定生长猪耳缘静脉注射戊巴比妥钠，几分钟后待生长猪完全麻醉后放血致死，迅速取出每头猪会厌软骨下方气管长约1cm气管-80℃保存用于检测气管组织中相关基因的表达量测定。

所用仪器和试剂耗材如下：

仪器：匀浆仪（KZ-II，康涛科技），台式高速冷冻型微量离心机（D3024R，DragonLab），荧光定量PCR仪（Stepone plus，ABI），超微量分光光度计（NanoDrop2000，Thermo），纯水仪（FBZ2001-UP-P型，青岛富勒姆）。

试剂耗材：RNA提取液（G3013，武汉谷歌生物），三氯甲烷（10006818，国药），异丙醇（80109218，国药），无水乙醇（10009218，国药），HyPure TMMolecular Biology Grade Water（SH30538.02，HyClone），RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

(K1622, Thermo), FastStart Universal SYBR Green Master(Rox) (04913914 001, Roche), 引物(表2-2)

表 2-2 气管相关基因引物序列
Table 2-2 Sequences of trachea-related gene primers

引物名称	引物序列	片段长度 (bp)	退火温度 (°C)
猪-gapdh-S	GTGAAGGTCGGAGTGAACGGA	252	60
猪-gapdh-A	CCATTGTGATGTTGGCGGGAT		60
猪-CLAUDIN-1-S	CCCGTGCCTTGATGGTAATTG	309	60
猪-CLAUDIN-1-A	AAAGTAGGGCACCTCCCAGAAG		60
猪-CASP3-S	GGAAGCAAATCAATGGACTCTG	271	60
猪-CASP3-A	TGCTCCTTTTGCTATGGTCTTCT		60
猪-MUC5B-S	ACAACGCCCTCAACGACTTCA	218	60
猪-MUC5B-A	GGTGGAGTCAACCTGAGAACG		60

具体操作如下:

(1) 总RNA抽提:

取匀浆管, 加入1ml的Trizol Reagent, 置冰上预冷, 取100mg组织, 加入到匀浆管中, 匀浆仪充分研磨直至无可见组织块, 12000rpm离心10min取上清, 加入250 μ l 三氯甲烷, 颠倒离心管15s, 充分混匀, 静置3min, 4°C下12000rpm离心10min。将上清转移到一新的离心管中, 加入0.8倍体积的异丙醇, 颠倒混匀, -20°C放置15min, 4°C下12000rpm离心10min, 管底的白色沉淀即为RNA。吸除液体, 加入75%乙醇1.5ml洗涤沉淀, 4°C下12000rpm离心5min, 将液体吸除干净, 将离心管置于超净台上吹3min, 加入15 μ l无RNA酶的水溶解RNA, 55°C孵育5min。使用Nanodrop 2000检测RNA浓度及纯度: 仪器空白调零后取2.5 μ l 待测RNA溶液于检测基座上, 放下样品臂, 使用电脑上的软件开始吸光值检测, 将浓度过高的RNA进行适当比例的稀释, 使其终浓度为200ng/ μ l。

(2) 反转录:

取一PCR管, 加入含2 μ g RNA的溶液, 加入1 μ l oligo (dT) 18, 用无核糖核酸酶的去离子水补足至12 μ l, 于PCR仪上65°C保温5min, 迅速置冰上冷却, 依次加入4 μ l 5 \times Reaction Buffer, 2 μ l 10mM dNTP Mix, 1 μ l RiboLock RNAase抑制剂 (20U/ μ l) 和1 μ l RevertAi M-MuLV 逆转录酶 (200 u/ μ l), 用枪抽吸混匀, 于PCR仪上42°C保温60min, 结束后70°C保温5min灭活反转录酶。

(3) 定量PCR:

取0.2ml PCR管，配制如下反应体系，每个反转录产物配制3管。

2×qPCR Mix	12.5μl
7.5μM基因引物	2.0μl
反转录产物	2.5μl
ddH ₂ O	8.0μl

PCR扩增：95℃，10min预变性；95℃，15s60℃，60s循环（40次）。每个待测样品设置3个重复，对得到的三个CT值取算术平均值。

2.3.5 气管粘膜免疫性能测定

取生长猪气管组织1g保存于-80℃中，用于测定气管组织IgA、IgG、IgM水平。按试剂盒说明书进行操作，不同指标操作不一样，具体以订购的试剂盒说明书为准。

2.4 数据处理

试验数据采用Excel进行初步整理，并用SPSS 17.0统计软件ANOVA模块进行方差分析，以一次（L）或二次（Q）相关的显著性呈现数据结果，最后分析单项指标的组间差异，差异显著水平为 $P<0.05$ ，不显著水平为 $P>0.05$ 。

3 结果与分析

3.1 不同浓度氨气对生长猪生长性能的影响

氨气浓度对生长猪生长性能的影响见表2-3。由表可知，5-25mg/kg氨气浓度与生长猪ADFI和FCR没有显著相关性，各组间差异不显著（ $P>0.05$ ）。氨气浓度与生长猪ADG呈极显著线性相关（Linear Effect $P<0.01$ ），随着氨气浓度增加25mg/kg时ADG显著降低（ $P<0.05$ ），5-20mg/kg组间ADG差异不显著（ $P>0.05$ ）。

表2-3 不同浓度氨气对生长猪生长性能的影响

Table 2-3 Effects of different concentration ammonia on growth performance in growing pigs

项目 Item	氨气浓度Ammonia concentration, mg/kg					SEM	相关性, Contrast ¹	
	5mg/kg	10mg/k g	15mg/k g	20mg/k g	25mg/k g		L	Q
ADFI (kg)	1.715	1.732	1.647	1.681	1.624	0.019	0.110	0.865
ADG (kg)	0.877 ^a	0.847 ^{ab}	0.822 ^{ab}	0.810 ^{ab}	0.774 ^b	0.013	<0.01	0.985
FCR	1.96	2.05	2.00	2.08	2.10	0.035	0.258	0.941

注：1 相关性：L 指线性相关，Q 指二次相关。同行数值肩标无相同字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

Note: 1 Contrast: L means linear effect, Q means quadratic effect. Values with no common superscripts means significant difference ($P<0.05$).

3.2 不同浓度氨气对生长猪血液生化指标的影响

氨气浓度对生长猪血液生化指标的影响如表2-4所示。血氨与氨气浓度增加呈极显著正相关 (Linear Effect $P<0.01$)，25mg/kg组血氨含量显著升高 ($P<0.05$)。BUN与氨气浓度呈极显著正相关 (Linear Effect $P<0.01$)，高于10mg/kg时BUN水平显著增加 ($P<0.05$)。SOD和T-AOC与氨气浓度增加呈极显著负相关 (Linear Effect $P<0.01$)，高于10mg/kg浓度氨气时SOD含量显著降低 ($P<0.05$)，高于15mg/kg浓度氨气T-AOC显著降低 ($P<0.05$)。LDH和AST随氨气浓度增加呈极显著正相关 (Linear Effect $P<0.01$)，高于10mg/kg浓度氨气AST水平显著增加 ($P<0.05$)，高于20mg/kg时LDH含量显著增加 ($P<0.05$)。10mg/kg浓度氨气开始影响猪血液生化指标。

表2-4 不同浓度氨气对生长猪血液生化指标的影响
Table 2-4 Effects of different concentration ammonia on blood biochemical of growing pigs

生化指标 Biochemical indicators	氨气浓度 Ammonia concentration					SEM	相关性, Contrast ¹	
	5mg/kg	10mg/kg	15mg/kg	20mg/kg	25mg/kg		L	Q
血氨 (μmol/L)	146.51 ^b	155.36 ^b	159.07 ^b	173.63 ^{ab}	195.19 ^a	5.54	<0.01	0.272
BUN (mmol/L)	2.89 ^d	3.34 ^{cd}	3.62 ^{bc}	4.09 ^{ab}	4.18 ^a	0.14	<0.01	0.374
SOD (U/L)	162.32 ^a	142.21 ^b	139.20 ^b	125.74 ^c	119.72 ^c	4.12	<0.01	0.153
T-AOC (μmol/L)	1.56 ^a	1.44 ^{ab}	1.25 ^{bc}	1.07 ^c	1.00 ^c	0.07	<0.01	0.750
LDH (U/L)	483.14 ^c	471.11 ^c	531.83 ^{bc}	560.12 ^b	664.99 ^a	19.87	<0.01	0.017
AST (U/L)	4.56 ^d	6.52 ^c	10.55 ^b	9.89 ^b	12.77 ^a	0.79	<0.01	0.019

注：1 相关性：L 指线性相关，Q 指二次相关。同行数值肩标无相同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: 1 Contrast: L means linear effect, Q means quadratic effect. Values with no common superscripts means significant difference ($P<0.05$).

3.3 不同浓度氨气对生长猪气管和肺组织形态的影响

不同浓度氨气对生长猪气管粘膜形态影响如图2-2所示，5-10mg/kg的氨气处理，猪气管粘膜结构相对完整，在15-20mg/kg氨气环境下，猪气管粘膜有轻度纤毛缺失，而25mg/kg时，气管粘膜层结构变形严重，假复层柱状纤毛大面积缺失。

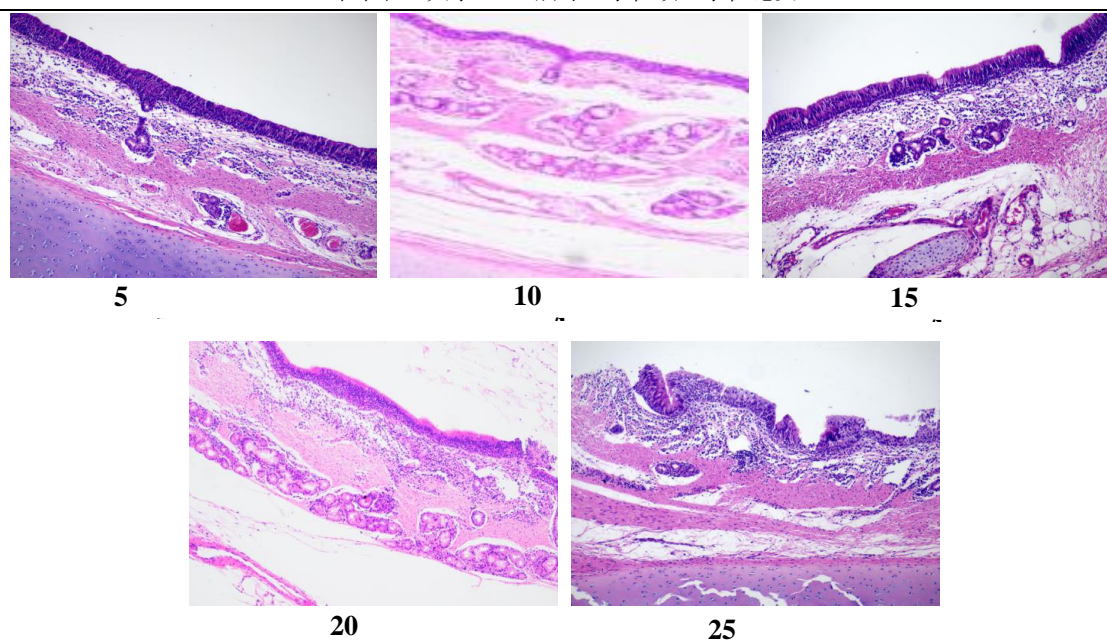


图2-2不同氨气浓度对气管粘膜结构影响 (HE染色100×)

Fig 2-2 Effect of different concentration ammonia on tracheal mucosal structure (HE staining 100×)

不同浓度氨气对生长猪肺组织形态影响如图2-3所示，5mg/kg~25mg/kg氨气浓度对猪气管粘膜的损伤程度不断加重，5-10mg/kg的氨气刺激尚可见较明显的肺泡腔，25mg/kg时肺泡中有大量炎性细胞浸润，肺泡腔空隙减小。

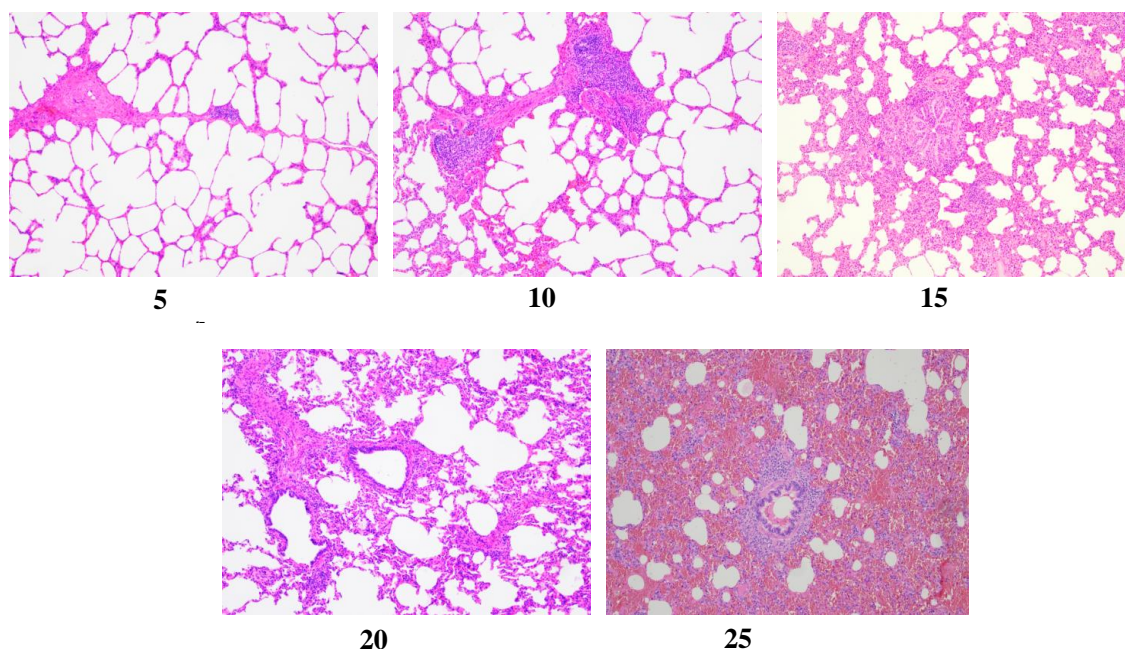


图2-3 不同氨气浓度对肺组织结构影响 (HE染色100×)

Fig 2-3 Impact of different concentration ammonia on lung tissue structure (HE staining 100×)

3.4 不同浓度氨气对生长猪气管相关基因表达量的影响

不同氨气浓度对生长猪气管相关基因表达量的影响见表2-5。黏蛋白（muc5b）基因表达量和半胱氨酸蛋白酶（caspase-3）基因表达量与氨气浓度呈显著正相关（Linear Effect $P<0.05$ ），15mg/kg时两种蛋白基因表达量显著高于5mg/kg（ $P<0.05$ ）。紧密连接蛋白（Claudin-1）基因表达与氨气浓度呈显著负相关（Linear Effect $P<0.05$ ），5mg/kg时表达量最大，15mg/kg组表达量显降低（ $P<0.05$ ）。

表2-5 不同浓度氨气对生长猪气管相关基因表达量的影响

Table 2-5 Effects of different concentration ammonia on trachea-related gene expression in growing pigs

测定基因 Measured gene	氨气浓度Ammonia concentration, mg/kg					SEM	相关性, Contrast ¹	
	5mg/kg	10mg/kg	15mg/kg	20mg/kg	25mg/kg		L	Q
muc5b	0.77 ^c	1.25 ^{bc}	1.40 ^b	2.42 ^a	2.37 ^a	0.25	0.016	0.926
Claudin-1	1.57 ^a	1.52 ^{ab}	1.33 ^b	1.11 ^c	0.85 ^d	0.10	0.014	0.568
caspase-3	0.52 ^c	0.68 ^c	1.04 ^b	1.19 ^{ab}	1.38 ^a	0.11	<0.01	0.817

注：1 相关性：L 指线性相关，Q 指二次相关。同行数值肩标无相同字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

Note: 1 Contrast: L means linear effect, Q means quadratic effect. Values with no common superscripts means significant difference ($P<0.05$).

3.5 不同浓度氨气对生长猪气管粘膜免疫性能的影响

不同浓度氨气对生长猪气管免疫球蛋白的影响见表2-6。IgG、IgA和IgM含量随氨气浓度增加都呈极显著负相关（Linear Effect $P<0.01$ ），5mg/kg组IgG含量最大，20-25mg/kg时IgG含量显著低于5mg/kg组（ $P<0.05$ ）。5mg/kg组IgA含量最大，20-25mg/kg时IgA含量显著低于5mg/kg（ $P<0.05$ ）；10mg/kg组IgM含量最大，20-25mg/kg时IgM含量显著低于5mg/kg（ $P<0.05$ ）。影响这三种免疫球蛋白的氨气阈值浓度为20mg/kg。

表2-6 不同浓度氨气对生长猪气管免疫性能影响

Table 2-6 Effects of different concentration ammonia on tracheal immunity of growing pigs

免疫球蛋白 Immunoglobulin	氨气浓度Ammonia concentration, mg/kg					SEM	相关性, Contrast ¹	
	5mg/kg	10mg/kg	15mg/kg	20mg/kg	25mg/kg		L	Q
IgG (μg/mL)	19.53 ^a	18.26 ^a	17.85 ^{ab}	15.66 ^{bc}	15.35 ^c	0.51	<0.01	0.958
IgA (μg/mL)	71.82 ^a	70.49 ^a	67.23 ^{ab}	60.09 ^{bc}	58.28 ^c	1.70	<0.01	0.590
IgM (μg/mL)	124.54 ^a	129.98 ^a	120.31 ^{ab}	111.63 ^{bc}	108.56 ^c	2.45	<0.01	0.215

注：1 相关性：L 指线性相关，Q 指二次相关。同行数值肩标无相同字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

Note: 1 Contrast: L means linear effect, Q means quadratic effect. Values with no common superscripts means significant difference ($P<0.05$).

4讨论

4.1 养殖环境控制箱氨气浓度控制

利用环境控制箱控制温热及气体环境对动物影响的试验已有报道，相比于传统畜禽舍，环境控制箱能控制单一环境变量和多种环境因子变量（Murphy et al 2012）。本试验氨气浓度控制原理为：经过前期调试确定一次通入氨气量，根据氨气量调节电磁阀需要开启的时间，为0.1-1s范围内。氨气与抽入的新鲜空气混合再测被氨气传感器测定，反馈到控制程序，浓度过高则通入空气稀释，浓度过低再次打开电磁阀通入氨气。试验过程中会产生粪尿，为控制粪尿产生有害气体的影响，通过漏缝地板下的抽粪装置，每间隔1小时抽出粪尿一次。风机不断换气中保证箱体中氨气浓度达到设定值并基本排除其他有害气体对试验的影响。本试验设计的环境控制箱可用于多种气体全自动、精确控制。结合氨气光学传感器24小时记录箱中的环境参数，同时安装报警系统，在环境参数出现异常时会发出报警，对程序控制做出及时调整。养殖环境控制箱为各种动物应激模型的建立提供了便利，由于传统猪舍空间过大，环境参数不便于控制（Schenkel et al 2009）。同时还可以用于测定动物代谢气体排放量和粪尿中的氨氮排放。利用养殖环境控制箱构建动物应激模型在未来的动物试验中仍是一种重要的研究手段。

4.2 不同浓度氨气对生长猪生长性能的影响

大量研究表明畜禽舍高浓度氨气聚集会降低畜禽的生产性能，但影响程度和影响生长性能的氨气阈值浓度差异较大。曹进等（2003）利用不同体积的浓氨水挥发控制猪舍氨气浓度，结果显示，氨气浓度达60mg/kg时，断奶仔猪生长性能开始显著下降。也有研究发现，在环境控制箱中用5mg/kg和20mg/kg的氨气刺激生长猪，对其生长性能没有显著影响（Cheng et al 2014）。Michiels等（2015）研究发现，生长猪舍中氨气浓度由18.6mg/kg升高至33.9mg/kg过程中，生长猪肺炎发生率和死亡率都出现显著升高，生长性能显著下降。更早的研究发现，断奶仔猪从氨气浓度由50mg/kg上升到100mg/kg时，生长性能显著下降（Drummond et al 1980）。有研究认为，一方面氨气浓度升高破坏了猪敏锐的嗅觉和味觉，导致采食量降低，同时氨气浓度增加会导致血氨浓度增加，抑制下丘脑采食中枢的兴奋性，也会导致采食量减少（魏凤仙 2012）。另一方面，血氨浓度升高导致肝脏尿素循环中需要将更多的游离氨转

化为尿素，这个过程会消耗一部分ATP，而且增加肝脏氨基酸分解代谢，增加能量消耗，导致猪饲料转化率降低（包正喜 2017）。

本试验设置的氨气浓度较低，比较接近规模化猪舍真实的氨气浓度。研究表明随着氨气浓度增加，平均日采食量（ADFI）和料重比（FCR）都没有显著影响，平均日采食量（ADFI）和料重比（FCR）与氨气浓度变化既没有线性相关也没有二次相关。而生长猪平均日增重（ADG）随氨气浓度增加呈极显著负线性相关，且25mg/kg组ADG显著低于5mg/kg组。值得注意的是，猪舍中含有大量的复杂病原菌，一旦氨气浓度升高导致了猪的免疫性能降低，就有可能感染疾病，导致其生产性能下降。

4.3 不同浓度氨气对生长猪血液生化指标的影响

血液对保证机体新陈代谢、生理功能调节及内外环境平衡起重要作用，一旦机体出现问题，首先在血液指标上有所反应。王忠等（2008）发现肉鸡体内血氨浓度随着环境中氨气浓度的增加而逐渐升高。正常情况下，畜禽生长在低氨环境中（<20 mg/kg），体内的血氨主要是蛋白质代谢脱氨作用产生的少量氨，为生理性血氨。但在环境氨气浓度过高时、肠吸收、肾脏脱氨及机体消除游离氨功能低，氨的生成量增多，血氨的浓度会升高。猪吸入氨气后，通过肺泡上皮直接进入血液，有一部分在肝脏尿素循环中被转化为尿素，但大部分游离氨仍存在于血液中，因而血浆氨浓度升高（刘雪兰 2015）。血清尿素氮浓度是反映动物机体氮代谢的重要指标。血清尿素氮的降低表明蛋白氮的体内沉积增加，饲料中蛋白质利用率提高（Kohn et al 2005）。此外，血清尿素氮降低还可以缓解肝脏将血氨转化为尿素的负担，并减少这一过程损失的能量。Beker等（2004）报道了肉仔鸡在0、30、60 mg/kg氨气环境条件下血液尿素氮的变化，发现氨气浓度越高，尿素氮水平越高。包正喜等（2017）研究发现，生长猪门静脉注射氯化铵两小时后血浆尿素浓度显著增加（ $P<0.05$ ）。在高氨应激状态下肌肉、血浆组织中不稳定蛋白分解加强，血清尿素氮水平增加（刘铀 1999）。

SOD和T-AOC是显示机体抗氧化性能的重要指标，SOD能有效清除氧自由基，抑制氢氧化离子的产生，对机体细胞有保护作用，在应激状态下，SOD和T-AOC通常会下降。魏凤仙等（2012）报道，肉仔鸡用30mg/kg和70mg/kg的氨气分别刺激，高浓度氨气下肉鸡血清中SOD和T-AOC显著降低。谷草转氨酶（AST）是机体重要的转氨酶，在氨基酸代谢和蛋白质代谢中发挥重要作用。一般AST存在于心肌细胞

和肝细胞线粒体中。机体处于应激条件时，细胞线粒体受损，AST 进入血液，血清 AST 活性升高。乳酸脱氢酶（LDH）是糖酵解过程的关键酶，血清中LDH的活性升高与细胞无氧呼吸加强密切相关。本试验中随着氨气浓度增加SOD、T-AOC等都呈下降趋势，高于10mg/kg浓度氨气SOD活性显著下降，说明高于10mg/kg氨气导致猪机体抗氧化性能的降低。10-25mg/kg氨气处理组AST活性极显著高于5mg/kg，其原因可能是长期的氨气暴露导致进入肝脏的血氨升高，肝细胞出现应激，肝脏负荷加重，AST含量升高。随着氨气浓度增加，进入猪肺泡中的氨气增加，通过肺泡结合更多的血红蛋白，导致血红蛋白的携氧能力减弱，机体渐渐处于无氧状态（Tilak et al 2007）。20-25mg/kg时LDH显著增加，说明机体无氧呼吸增强，LDH催化丙酮酸产生更多的乳酸，同时ATP的生成减少，这也会对猪的生长性能产生影响。

4.4 不同浓度氨气对生长猪呼吸道形态影响

氨气吸入呼吸道以后，其损伤贯穿整个气道粘膜，且受损部位集中在表皮细胞。Yan等（2016）用3mg/kg和75mg/kg氨气分别处理肉鸡发现，75mg/kg处理组气管粘膜上皮柱状纤毛脱落严重。三周龄肉鸡在13mg/kg氨气环境中就会出现气管粘膜纤毛轻度脱落和变短，26mg/kg时气管柱状纤毛大量脱落，气管粘膜变薄（姚中磊 2008）。氨气对肺部刺激会引发肺炎、肺纤维化等多种疾病。高浓度氨气（80mg/kg-90mg/kg）刺激小鼠发现，小鼠肺泡膨胀，肺间隔消失，一些相邻的肺泡融合形成大小不一的空泡，空腔中有大量炎症细胞和吞噬细胞（王仁辉等 2002）。

本试验发现5-10mg/kg浓度处理下气管粘膜结构完整，15-20mg/kg时气管粘膜有轻度柱状纤毛脱落，25mg/kg时气管粘膜变形严重，柱状纤毛大片脱落。肺形态结构显示，5-15mg/kg组有明显的肺泡间隔和清晰的肺泡腔，25mg/kg氨气浓度处理导致猪肺泡腔充血。粘膜结构的完整性是粘膜物理屏障的保证，柱状纤毛有节律的摆动可以及时扫除附着的尘埃和异物，防止其进入肺组织。纤毛脱落后，下层的基细胞和杯状细胞将受到氨气直接刺激，更容易导致粘膜被氨气腐蚀（Sato et al 2012）。

4.5 不同浓度氨气对生长猪气管粘膜屏障的影响

氨气作为一种水溶性极强的碱性气体，进入呼吸道之后对气管粘膜上皮细胞有较强腐蚀性。氨气溶解于气管粘液中会改变黏液层 pH，造成气管内上层纤毛柱状细胞氧化应激，加速细胞凋亡。主要包括对呼吸道的影响，降低气管表面黏液流动性

和纤毛细胞摆动作用（Mashhadani et al 1985）。氨气细胞的刺激导致氧化应激，产生活性氧，细胞或细胞器膜完整性被破坏，酶活性丧失，细胞代谢功能出现障碍，细胞凋亡加快（Nandi et al 2016）。Igarashi 等（2001）也证实了血氨会引发炎症因子增加，诱导胃上皮细胞凋亡。氨可以刺激免疫反应，促进炎症细胞因子的产生和炎症细胞浸润（Bobermin et al 2012）。

紧密连接蛋白claudin对紧密连接的形态及功能起着重要作用，当粘膜部位发生炎症以及环境条件骤变等原因引起claudin和与其结合的蛋白结构发生改变时，紧密连接就会受损，导致粘膜机械屏障破坏。黏蛋白是粘膜上皮组织所产生的高分子糖蛋白，黏蛋白能聚集而形成凝胶状、形成化学屏障。本试验结果表明，黏蛋白基因和紧密连接蛋白基因表达量与氨气浓度增加呈显著线性相关，随着氨气浓度增加黏蛋白表达量升高而紧密连接蛋白表达量降低。黏蛋白在粘膜部位的表达量升高可以作为粘液分泌量的重要指标，通常情况下，粘液分泌量增加伴随着黏蛋白含量升高。黏蛋白的高水平被认为是炎症性呼吸系统疾病的特征其过量分泌容易导致气管阻塞（Rogers 2004; Thornton et al 2008）。紧密连接蛋白的表达降低说明氨气破坏了细胞之间的致密结构，细胞间更容易出现松散和脱落粘膜部位对异物的通透性增加。另一方面，黏液的过度分泌聚集在气管中，粘附的异物增多会增加气管粘膜炎性反应，降低粘膜免疫。

半胱天冬酶（caspases）通过传递凋亡信号而导致细胞凋亡，是细胞凋亡的主要执行者。caspase-3是caspases家族中细胞凋亡中的关键蛋白酶，在caspase传导的细胞凋亡路径中，其表达量与细胞凋亡密切相关。本试验结果表明，caspase-3表达量与氨气浓度变化呈极显著正线性相关，说明氨气浓度增加导致了气管粘膜上皮细胞凋亡。氨气长期暴露是典型的慢应激，类似于其他应激条件，其导致气管粘膜发生细胞凋亡的机制可能是氨气造成的应激导致机体抗氧化性能下降，抗氧化性能下降的细胞更易诱导凋亡；而且氨气应激使caspase-3的表达量显著增加，加速了气管上皮细胞凋亡。

4.6 不同浓度氨气对生长猪气管粘膜免疫的影响

免疫球蛋白是机体非特异性免疫的重要组成，大部分存在于血清中，也有一部分存在于组织器官中。研究表明，应激刺激诱导多种免疫改变,包括淋巴细胞增殖能力降低、NK细胞活性下降、抗体生成水平降低、以及多种细胞因子产生减少等（Pruett

et al 2003; Padgett et al 2003)。高浓度氨气刺激肉鸡会导致其免疫器官重量减轻或退化,血清中免疫球蛋白含量有下降趋势(魏凤仙 2012)。本试验研究表明,气管粘膜免疫球蛋白含量与氨气浓度变化呈极显著负相关,随着氨气浓度增加IgA、IgM、IgG含量降低,且20mg/kg开始出现显著降低。IgA是SIgA的组成部分,在气管粘膜非特异性免疫中发挥重要作用(Krejci et al 2013)。本试验中氨气刺激呼吸道形态观察发现,20-25mg/kg处理组气管粘膜形态变形严重,此浓度环境下猪气管粘膜免疫性能已经受到氨气刺激影响,出现显著下降。

5 小结

氨气浓度增加与ADG呈显著负相关,25mg/kgADG显著下降。氨气浓度增加会导致血液中抗氧化性能的降低,高于10mg/kg显著影响血液生化指标。15-20mg/kg时气管相关基因表达量和气管粘膜免疫性能下降。

第三章 不同浓度氨气对生长猪鼻腔微生物多样性的影响

1前言

微生物在粘膜部位的定植数量和种类可以影响粘膜的完整性和免疫性能。鼻腔弯曲的结构、厌氧环境决定了其中含有丰富的微生物群落（Yan et al 2013）。氨气作为一种碱性刺激性气体在通过呼吸道时会影响微生物生存环境，而且氨气对呼吸道粘膜的破坏也会影响菌群定植。研究发现，氨气浓度增加会导致鼻腔巴氏杆菌数量增加。在猪萎缩性鼻炎的患病猪鼻腔中能检测到大量多杀性产毒巴氏杆菌（Hamilton et al 1996）。这说明鼻腔作为呼吸道的起点，其微生物区系的改变会影响整个呼吸道健康。

粘膜微生物区系是影响粘膜健康的重要因素，目前大多数研究关注于肠道粘膜的微生物区系，而对鼻腔粘膜微生物区系的研究较少。在众多氨气对猪影响的国内外研究中我们发现，很多试验设计的氨气浓度相对较高（50-100mg/kg），猪舍中很少能达到这样的氨气浓度。随着高通量测序在微生物分析的广泛应用，对微生物区系组成的更深入的了解已经实现（Slifierz et al 2015；Niederwerder et al 2016）。本课题组在调查了南北方的部分规模化猪舍后发现冬季猪舍的氨气浓度达到10-25mg/kg之间，而夏季猪舍氨气浓度更低（一般低于10mg/kg）。因此本试验选择5-25mg/kg的氨气浓度更能贴近实际生产，反应出猪舍中影响猪的氨气浓度，本试验旨在研究不同梯度氨气浓度对猪鼻腔微生物多样性的影响，为规模化猪舍环境参数的控制提供参考。

2材料方法

2.1试验动物及饲养管理

试验动物、试验处理、养殖环境控制条件及饲养管理同第二章。

2.2试验日粮组成和营养水平

试验日粮组成和营养水平同第二章。

2.3样品的采集与制备

试验结束随机选择3头生长猪保定，用医用酒精对生长猪鼻盘进行消毒，打开鼻拭子棉签插入猪鼻腔2~3cm，取出后编号迅速放入液氮保存，用于鼻腔微生物多样性分析。

2.4 鼻腔微生物多样性分析

2.4.1 微生物组总DNA提取和PCR扩增

对于各种不同来源的微生物组样本，根据过往项目经验，选用最合适的微生物组总DNA提取方法，并通过0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA提取质量，同时采用紫外分光光度计对DNA进行定量。通常以微生物核糖体RNA等能够反映菌群组成和多样性的目标序列为靶点，根据序列中的保守区域设计相应引物，并添加样本特异性Barcode序列，进而对rRNA基因可变区（单个或连续的多个）或特定基因片段进行PCR扩增。PCR扩增采用NEB公司的Q5高保真DNA聚合酶，并严格控制扩增循环数，使循环数尽可能低的同时，也保证同一批样本的扩增条件一致。

2.4.2 PCR产物回收纯化

PCR扩增产物通过2%琼脂糖凝胶电泳进行检测，并对目标片段进行切胶回收，回收采用AXYGEN公司的凝胶回收试剂盒。

2.4.3 扩增产物荧光定量

参照电泳初步定量结果，将PCR扩增回收产物进行荧光定量，荧光试剂为Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit，定量仪器为Microplate reader（BioTek，

FLx800)。根据荧光定量结果，按照每个样本的测序量需求，对各样本按相应比例进行混合。

2.4.4 测序文库制备和上机测序

以Illumina MiSeq测序为例，采用Illumina公司的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit制备测序文库，测序文库后上机进行高通量测序。采用Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit在Promega QuantiFluor荧光定量系统上对文库进行定量，合格的文库浓度应在2nM以上。将合格的各上机测序文库（Index序列不可重复）梯度稀释后，根据所需测序量按相应比例混合，并经NaOH变性为单链进行上机测序；使用MiSeq测序仪进行2×300bp的双端测序，相应试剂为MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycles)。

2.4.5 分析流程

下机数据去除质量低的reads，剩余高质量的clean data方可用于后期分析；通过reads之间的overlap关系将reads拼接成tags；在给定的相似度下将tags聚集成OTU，然后通过OTU与数据库对比，对OTU进行物种注释；基于OTU和物种注释结果进行样品物种复杂度分析以及物种间物种差异分析。信息分析的内容主要包括：物种分类和丰度分析、样品多样性分析、物种差异性分析以及CCA分析。

2.5 数据处理

试验数据采用Excel进行初步整理，并用SPSS 17.0统计软件ANOVA模块进行方差分析，差异显著水平为 $P < 0.05$ ，不显著水平为 $P > 0.05$ 。

3 结果与分析

3.1 基于OTU的物种丰度分析

通过与数据库进行对比，对OTU进行物种分类并分别在门和属两个分类等级对各个样品做物种组内相对含量柱状图。从图中可以看出不同物种在样品中所占比例，在门的分类水平上，主要的几种菌门分别为变形菌门（*Proteobacteria*）、厚壁菌门（*Firmicutes*）、拟杆菌门（*Bacteroidetes*）和放线菌门（*Actinobacteria*）。变形菌门（*Proteobacteria*）在25mg/kg组比例显著高于其他组（ $P < 0.01$ ）。

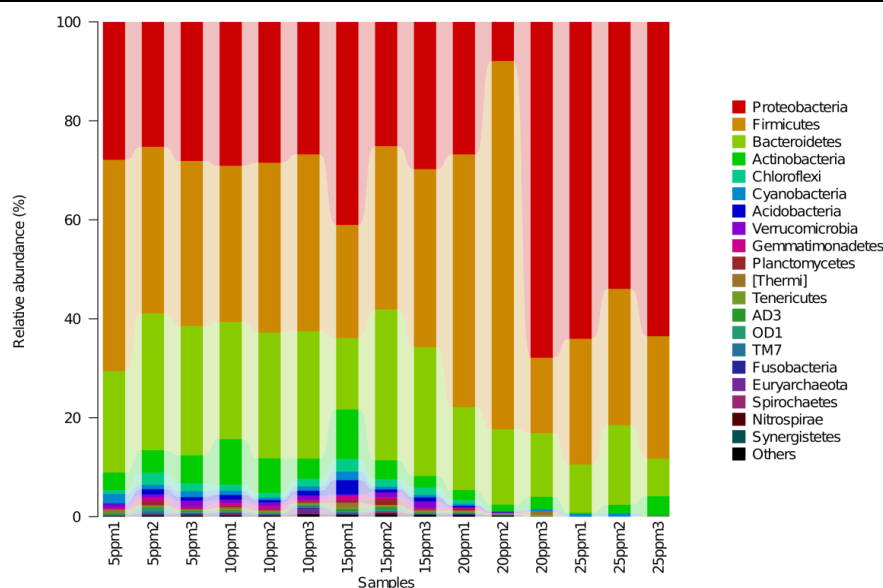


图3-1不同浓度氨气刺激猪鼻腔微生物物种profiling柱状图（门水平）

Figure 3-1 Different concentration ammonia stimulate pig nasal microorganisms profiling histogram (Phylum)

在属的分类水平上，更能清楚反映微生物组成的差异。在属的分类水平可以看出25mg/kg组和5-20mg/kg组有较大差异。5-20mg/kg组的主要几种菌属分别为假单胞菌属（*Pseudomonas*）、乳酸杆菌属（*Lactobacillus*）、普氏菌属（*Prevotella*）、拟杆菌属（*Bacteroides*），5-15mg/kg组莫拉菌属（*Moraxella*）含量极少。而25mg/kg组OTU分析显示莫拉菌属（*Moraxella*）和链球菌属（*Streptococcus*）丰度显著增加（ $P < 0.05$ ），从OTU门和属的分类水平可以看出，氨气浓度差异对猪鼻腔微生物组成有显著影响。

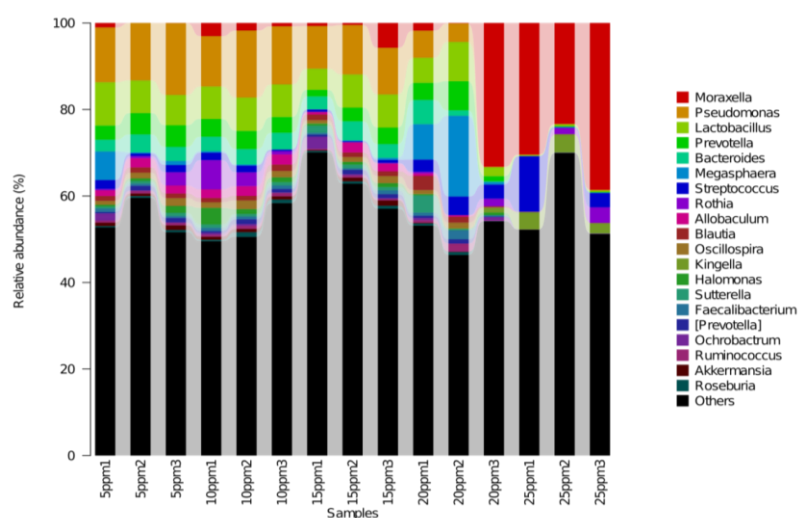


图3-2不同浓度氨气刺激猪鼻腔微生物物种profiling柱状图（属水平）

Fig. 3-2 Different concentration ammonia stimulate pig nasal microbial species profiling histogram (Genus)

3.2 基于OTU的物种差异性分析

3.2.1 OTU venn 图分析

Venn图可以显示多个样品共有OTU数目，直观展示样品间OTU的重叠情况，如图所示。五组中共有OTU数为111个，5mg/kg组特有OTU为932，10mg/kg组特有OTU为1201，15mg/kg组特有OTU为1434，20mg/kg组特有OTU为488，25mg/kg组特有OTU为619，这说明氨气浓度变化会影响鼻腔菌群组成。

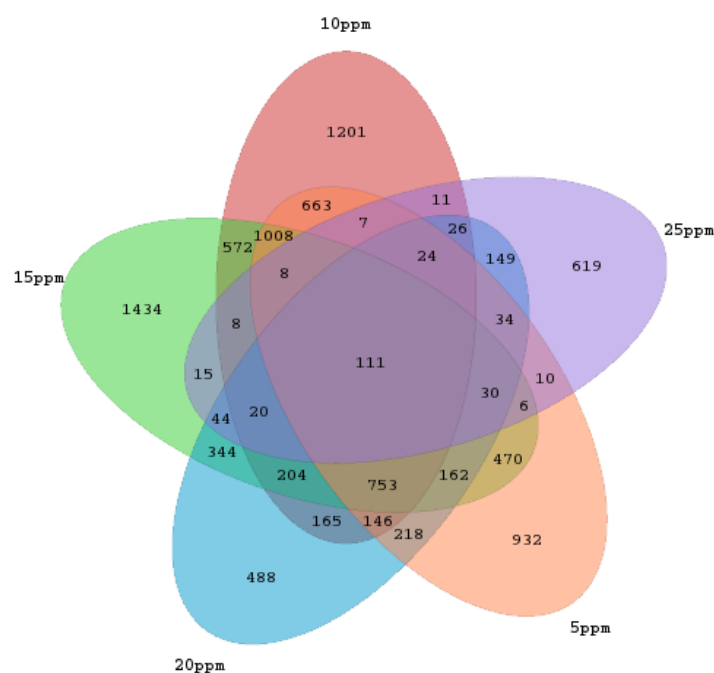


图 3-3 OTU Venn 图
Fig. 3-3 OTU Venn chart

3.2.2 OTU PCA分析

PCA分析即主成分分析（principal component analysis），可以反映不同样品之间物种组成的相似性和差异性。在二维坐标中，样品距离越近，说明物种组成越相似，样品距离越远，说明物种组成差异性越大。如图20mg/kg组和25mg/kg组与其他组距离较远，说明这两组在物种组成的差异性较大，而5mg/kg-15mg/kg组距离较近，说明5-15mg/kg组鼻腔微生物组成差异性较小。

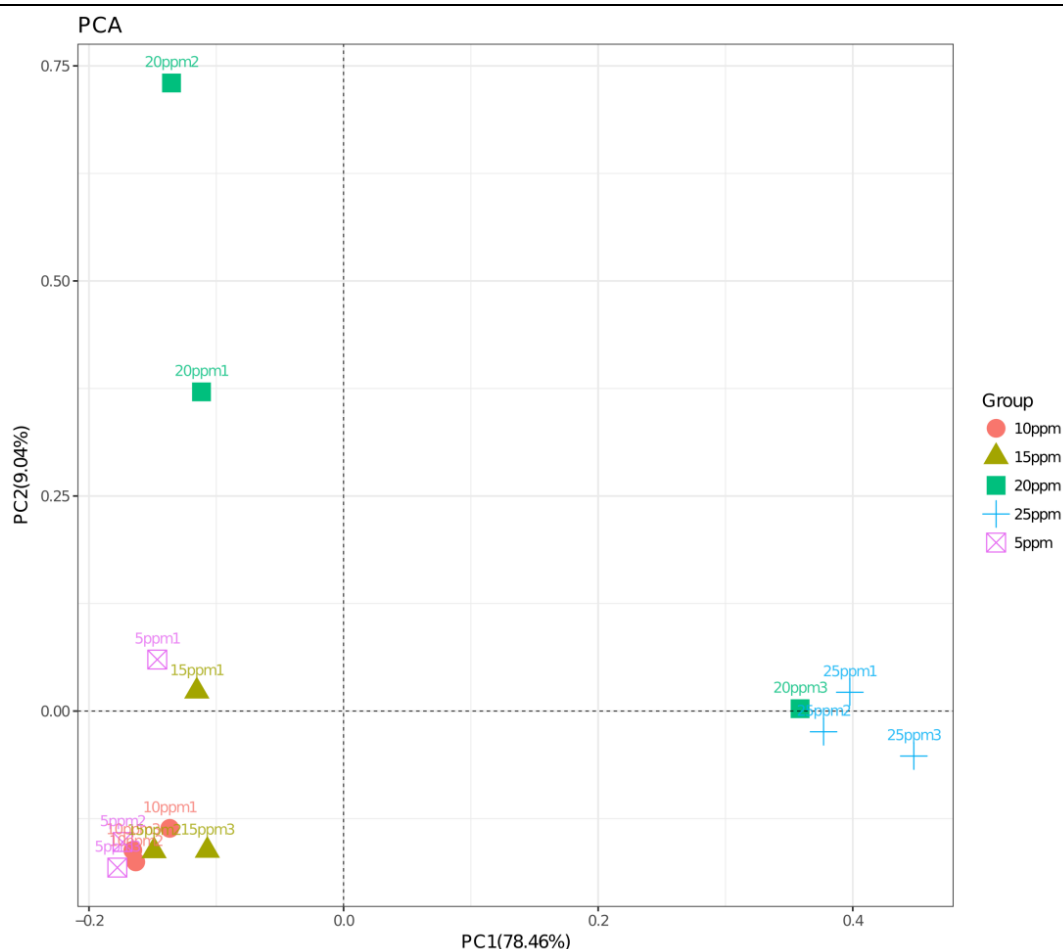


图 3-4 基于 OTU 丰度的 PCA 分析
Fig. 3-4 PCA analysis based on OTU abundance

3.2.3 OTU Rank 曲线

OTU Rank 曲线可以展示样品中物种的丰度程度和均匀程度。丰富度由曲线横坐标表示，曲线越宽，丰富度越高；均匀度则由曲线的纵坐标表示，曲线越平坦，均匀度越高。各组样品的rank曲线如图所示5-15mg/kg组的曲线宽度大于20mg/kg和25mg/kg组，说明5-15mg/kg组物种组成丰度大于20mg/kg组和25mg/kg组，同时5-15mg/kg组曲线比20mg/kg和25mg/kg组平坦，说明样本中物种组成均匀度高于20mg/kg和25mg/kg组。

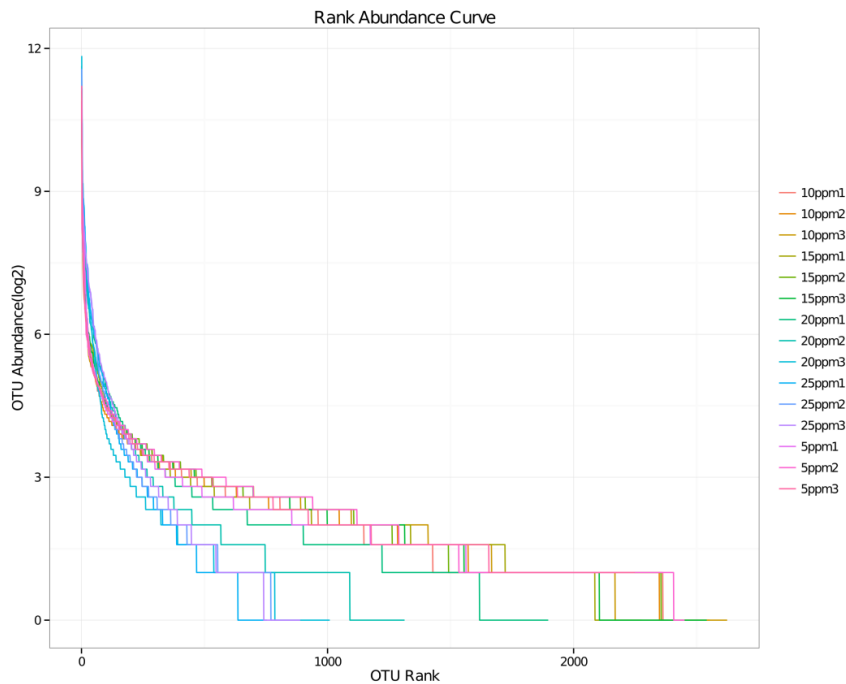


图 3-5 OTU Rank 曲线图
Fig. 3-5 OTU Rank curve

3.2.4各分类水平OTU数

对各组样品中各分类水平的 OTU 数目进行统计，结果如表 3-1 所示：10mg/kg 组各分类水平的 OTU 数均最高，25mg/kg 组各分类水平的 OTU 数最低。氨气浓度从 5mg/kg 增加到 25mg/kg 过程中，5-15mg/kg 各分类水平的 OTU 数差异不显著，20mg/kg 开始各分类水平 OTU 数显著降低（ $P<0.05$ ）。结果表明：氨气浓度增加会导致猪鼻腔微生物丰富度降低。

表3-1 不同浓度氨气对微生物各分类水平OTU数的影响
Table 3-1 Effects of different concentration ammonia on microorganisms' levels of OTU

分类水平 Classification level	氨气浓度 Ammonia concentration				
	5mg/kg	10mg/kg	15mg/kg	20mg/kg	25mg/kg
Phylum（门）	2289±145 ^a	2520±123 ^a	2399±134 ^a	1406±451 ^b	842±78 ^c
Class（纲）	2287±146 ^a	2517±123 ^a	2397±135 ^a	1404±451 ^b	842±78 ^c
Order（目）	2260±131 ^a	2487±118 ^a	2354±168 ^a	1387±433 ^b	842±77 ^c
Family（科）	1996±79 ^a	2210±110 ^a	2034±203 ^a	1198±368 ^b	707±56 ^c
Genus（属）	994±26 ^a	1114±57 ^a	997±59 ^a	660±165 ^b	426±47 ^c
Species（种）	153±30 ^{ab}	174±6 ^a	154±28 ^{ab}	116±33 ^b	52±21 ^c

注：表中同行数值肩标相同字母表示差异不显著（ $P>0.05$ ），字母不相同者表示差异显著（ $P<0.05$ ）
Note: values with a row with common superscripts means no significant difference（ $P>0.05$ ）,no common superscripts means significant difference（ $P<0.05$ ）

3.3 物种相似性分析

对各组物种组成进行聚类分析，可以判断各组间物种组成相似性。样品越靠近，枝长越短，说明两个样品间的物种组成越相似。由图可知25mg/kg组与其余各组的物种组成相似度较低，5-15mg/kg三组相聚较近，说明物种组成相似度较高。

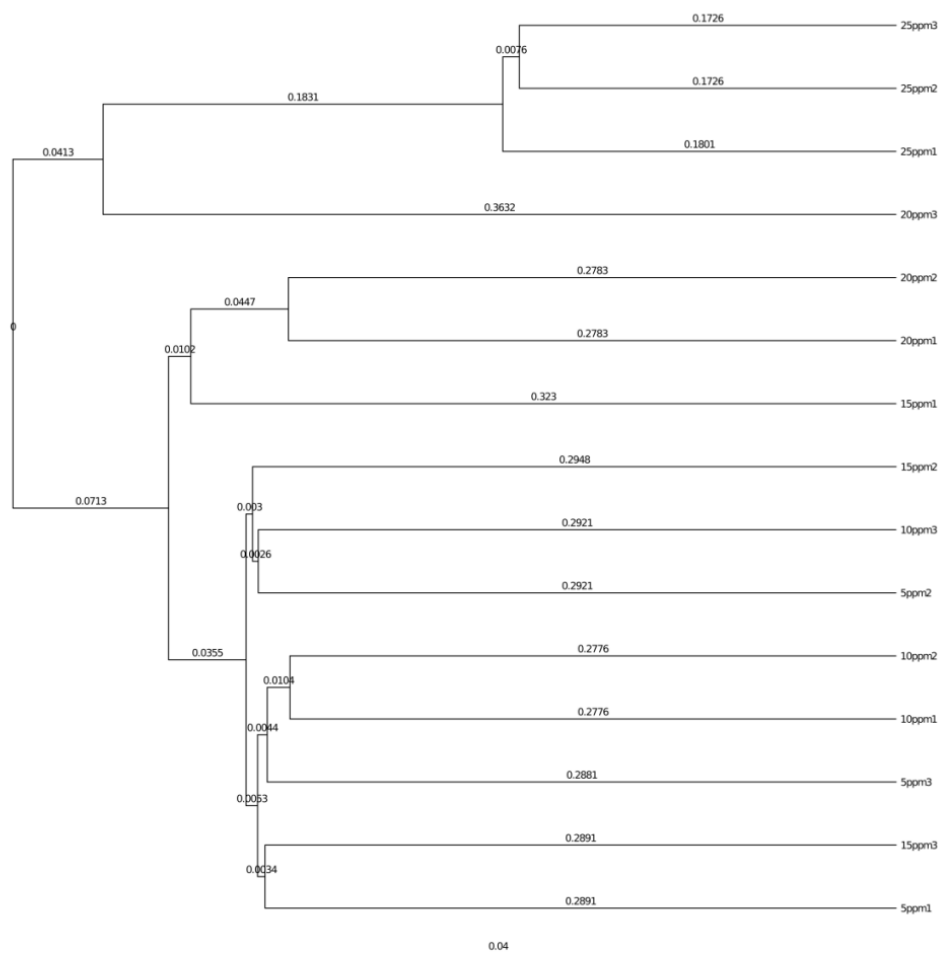


图3-6不同处理组间物种聚类分析

Fig. 3-6 Cluster analysis of different treatment groups

4 讨论

粘膜微生物区系由定植于皮肤和粘膜表面的微生物组成, 广泛的分布于消化道、呼吸道和泌尿生殖道等粘膜部位 (Budden et al 2017)。这些微生物影响机体先天和适应性免疫的发育和成熟 (Günther et al 2016)。微生物群可通过直接抑制病原体的生长, 改变微环境或定殖位点的竞争来防止病原体定殖。相反, 微生物群中的一些微生物能够在特定条件下引起疾病 (Reid et al 2011)。呼吸道感染是全世界人类和动物疾病和死亡的主要原因之一 (Ayrle et al 2016)。猪的呼吸道疾病通常受到多种微生物和不利环境条件的影响。原发感染细菌, 如多杀巴斯德氏菌, 副猪嗜血杆菌和猪链球菌, 导致更严重的呼吸道疾病 (Brockmeier et al 2002)。

研究发现, 人和畜禽上、下呼吸道的微生物分布多样性差异不大。上、下呼吸道微生物多样性具有高度同源性, 上呼吸道和下呼吸道菌群的差异表现在微生物的生物数量上, 上呼吸道菌群数量要比下呼吸道多, 并不是体现在生物多样性上 (Bittinger et al 2014)。鼻腔作为上呼吸道粘膜系统的一部分, 其微生物组成会随着环境的改变而改变。因此从微生物的组成结构可以窥视整个呼吸道的微生物区系, 为猪群的疾病防控提供参考 (陈江 2016)。

畜禽生存环境条件的改变会影响其鼻腔微生物的组成和定植 (Kraemer et al 2018)。Hamilton (1998) 研究发现, 分别以0mg/kg和20mg/kg氨气刺激哺乳仔猪, 并在试验前对哺乳仔猪鼻腔接种巴氏杆菌, 结果20mg/kg组鼻腔巴氏杆菌数量显著增加, 并且哺乳仔猪患萎缩性鼻炎。而0mg/kg氨气处理组由于鼻腔粘膜的非特异性免疫, 巴氏杆菌基本被清除。这表明氨气能影响呼吸道粘膜微生物区系, 同时微生物区系中有害菌成为优势种群后可能引发呼吸道疾病。Park等 (2017) 对儿童咳嗽产生的粘液分析发现, 粘液中流感嗜血杆菌含量和肺炎患病率有显著相关性。

本试验利用高通量测序的方法对不同浓度氨气刺激的生长猪鼻腔微生物进行分析, 在门和属的水平上分析了优势菌群和各分类水平的OTU丰度值。结果发现, 10mg/kg处理组生长猪鼻腔微生物OTU丰富度最高, 随着氨气浓度增加, 20mg/kg时各分类水平的OTU丰度出现显著降低。通过对不同浓度氨气刺激生长猪呼吸道, 物种组成成分发现其鼻腔中的优势菌群包括变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 和放线菌门 (*Actinobacteria*); 属水平包括莫拉菌属 (*Moraxella*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、

普氏菌属 (*Prevotella*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、链球菌属 (*Streptococcus*)。其中25mg/kg组莫拉菌属 (*Moraxella*) 极显著高于其他处理组, 25mg/kg处理组链球菌属 (*Streptococcus*) 显著高于15mg/kg组。近20多年的研究发现, 莫拉菌属是引起人和畜禽下呼吸道感染的重要病原菌, 尤其多见于慢性阻塞性肺炎 (Gutbier et al 2015)。Riise等 (2000) 研究表明, 莫拉菌属和链球菌属是肺炎患者肺组织中常见的致病菌。之前的呼吸道形态观察发现, 25mg/kg处理组肺组织严重充血, 肺泡腔充斥大量炎症细胞, 这与微生物菌群的分析结果相对应。这说明, 鼻腔中定植的大量莫拉菌可能随气流进入肺泡, 使肺部产生炎症, 导致了阻塞性肺炎。链球菌属包含化脓性链球菌、肺炎链球菌等多种有害菌, 此菌属含量在25mg/kg组含量较高可能是导致其肺部病变的原因之一。

乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 对猪的肠道而言是有益菌, 能产生有机酸, 有助于大肠利用纤维素。然而存在于呼吸道中的乳酸杆菌对呼吸道的利弊尚不清楚, 但有报道称, 呼吸道中乳酸杆菌可以抑制大肠杆菌等腐败菌的生长繁殖 (胡骑等 2006)。本试验中, 5-15mg/kg处理组乳酸杆菌属是含量第二位的优势菌属, 显著高于20-25mg/kg处理组, 一方面可能是由于氨气浓度过高使鼻粘液的pH值升高, 抑制了乳酸杆菌的生长繁殖, 另一方面有害菌的种群扩大也会抑制乳酸菌属的增长。

综上, 不同梯度浓度氨气影响了生长猪鼻腔微生物的组成结构, 随着氨气浓度在5-25mg/kg范围内增加, 20mg/kg微生物多样性显著降低, 氨气浓度增加降低了鼻腔微生物多样性。而鼻腔中有害菌群例如莫拉菌属 (*Moraxella*) 和链球菌属 (*Streptococcus*) 等菌群的增加可能是导致高浓度氨气处理组猪发生肺组织病变的主要原因。根据微生物分析的结果建议猪舍氨气控制在20mg/kg范围内。

5 小结

不同氨气浓度处理结果显示, 5-25mg/kg生长猪鼻腔微生物的主要菌属为莫拉菌属 (*Moraxella*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、普氏菌属 (*Prevotella*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、链球菌属 (*Streptococcus*)。氨气浓度达到20mg/kg时, 各分类水平的OTU丰度显著降低 ($P<0.05$), 氨气浓度为25mg/kg时, 猪鼻腔有害微生物莫拉菌属 (*Moraxella*)和链球菌属 (*Streptococcus*)丰度值显著增加($P<0.05$);假单胞菌属(*Pseudomonas*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、普氏菌属 (*Prevotella*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 丰度值显著降低 ($P<0.05$)。氨气浓度高于20mg/kg会减少鼻腔微生物区系多样性同时增加有害菌群定植。

本研究小结、创新点和不足

1 小结

1. 氨气浓度增加与生长猪ADG呈显著负相关，25mg/kgADG显著下降。高于10mg/kg氨气浓度会影响血液生化指标。高于15mg/kg氨气浓度影响气管相关基因表达量，高于20mg/kg氨气浓度时气管粘膜免疫性能下降，气管和肺组织结构损伤严重。

2. 不同氨气浓度处理结果显示，20mg/kg氨气浓度显著降低生长猪鼻腔微生物OTU丰度值，浓度高于20mg/kg时与呼吸道疾病有关的有害菌属丰度显著增加。其中主要菌属为莫拉菌属（*Moraxella*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、乳酸杆菌属（*Lactobacillus*）、普氏菌属（*Prevotella*）、拟杆菌属（*Bacteroides*）、链球菌属（*Streptococcus*）。氨气浓度为25mg/kg时，猪鼻腔有害微生物莫拉菌属（*Moraxella*）和链球菌属（*Streptococcus*）丰度值显著增加，这两种菌属都会引起猪肺部疾病，而假单胞菌属（*Pseudomonas*）和乳酸杆菌属（*Lactobacillus*）的适宜生活环境为弱酸环境，氨气浓度增加抑制了这两种菌群的生长。

2 创新点

结合规模化猪舍的实际氨气浓度范围设计相应的氨气浓度梯度，研究不同浓度梯度氨气对生长猪呼吸道粘膜屏障、鼻腔微生物区系及生长性能的影响，揭示了氨气对不同指标的敏感差异性，综合各指标影响阈值为规模化猪舍氨气浓度控制范围提供参考

3 待解决问题

1. 本试验研究了氨气浓度对鼻腔微生物多样性的影响，而氨气浓度对肺组织微生物多样性的影响还需要进一步测定。

2. 养殖环境控制箱中的环境与猪舍环境有较大差异，因此这两种环境下的鼻腔微生物区系可能会有差异，猪舍环境和养殖环境控制箱养殖条件下的菌群比较有待进一步测定。

参考文献

1. 包正喜, 李鲁鲁, 王同心, 刘霜, 张萍, 黄飞若. 门静脉血氨对猪肝尿素循环和糖异生的影响. 畜牧兽医学报, 2017, (01): 91-98.
2. 曹进, 张峥. 封闭猪场内氨气对猪群生产性能的影响及控制试验. 养猪, 2003(4): 42-44.
3. 陈江. 香猪鼻腔细菌和真菌群落分析[硕士学位论文]. 贵州大学, 2016.
4. 高孟起, 施正香, 白琳, 栾冬梅. 水泡粪妊娠猪舍冬季有害气体含量影响因素分析[J]. 猪业科学, 2015(5): 90-93.
5. 郭丽华, 索成, 刘海涛. 地衣芽孢杆菌对妊娠及哺乳母猪生产性能及猪舍氨气浓度的影响. 安徽农业科学, 2013, 41(5): 1975-1977.
6. 胡骑, 程安春, 汪铭书, 刘艳丽, 陈孝跃. DPV强毒滴鼻对雏鸭呼吸道大肠杆菌、葡萄球菌和乳酸杆菌数量的影响. 中国畜牧兽医学会动物微生态学分会第八次全国学术研讨会暨动物微生态企业发展战略论坛. 2006.
7. 李学莉, 贺丽苹, 刘伏佳, 杨雄, 蔡玉华, 易旻. 微生态制剂结合发酵床养殖模式对猪生产性能及猪舍环境的影响. 广东农业科学, 2014, 41(9): 123-128.
8. 李蕴玉, 刘谢荣, 芮萍, 冯敏山, 马增军, 李政, 赵君武. 秋季发酵床养猪对猪舍环境的影响. 畜牧与兽医, 2012, 44(3): 44-46.
9. 李泽政. 不同季节和类别猪舍内环境指标比较. 猪业科学, 2016, 33(3): 42-44.
10. 刘雪兰, 张燕, 高金波. 不同垫料对肉鸡舍内氨气浓度、肉鸡生产性能及血液生化指标的影响. 家畜生态学报, 2015, 36(11): 42-47.
11. 刘铀, 刘艳芬, 林红英, 罗东君. 维生素E防治肉鸡热应激机理的初步研究. 中国家禽, 1999(6): 6-9.
12. 彭克美. 畜禽解剖学. 高等教育出版社, 2009.
13. 任俊, 朱继红, 庞伟英. 不同季节和类型猪舍有害气体含量的对比与思考. 现代畜牧兽医, 2012(12): 53-55.
14. 盛清凯, 王诚, 武英, 郭建凤, 赵红波, 张桂芝. 冬季发酵床养殖模式对猪舍环境及猪生产性能的影响. 家畜生态学报, 2009, 30(1): 67-67.
15. 史清河. 通过日粮调控减少猪排泄物中氨与硫化氢的产生与散发量. 家畜生态学报, 2001, 22(1): 34-39.

16. 孙永波, 栾素军, 王亚, 萨仁娜, 张宏福. 畜禽呼吸道黏膜屏障的结构和功能及其改善措施. 动物营养学报, 2017, 29(6): 1866-1873.
17. 王国华, 郝荣超, 李广东, 王健诚, 左飞, 孙敬辉, 苗玉涛. 发酵床与实心地面育肥猪舍氨气、硫化氢及二氧化碳浓度对比检测研究. 家畜生态学报, 2016, 37(10): 69-71.
18. 王仁辉, 颜淑琴, 姜媛丽, 徐德铎, 薄文学. 氨气引起金黄地鼠肺炎的观察. 中国比较医学杂志, 2002, 12(5): 281-282.
19. 王忠, 宋弋, 汪以真, 王友明, 吕于明. 氨气对肉鸡生产性能、血液常规指标和腹水症发生率的影响. 中国畜牧杂志, 2008, 44(23): 46-49.
20. 魏凤仙. 湿度和氨暴露诱导的慢性应激对肉仔鸡生长性能、肉品质、生理机能的影响及其调控机制[博士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2012: 47-60.
21. 杨本升, 刘玉斌, 苟仕金. 动物微生物学. 长春: 吉林科学技术出版社, 1995.
22. 杨亮. 两种清粪方式对保育猪生长性能、环境指标以及粪污成分的影响研究[硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2013: 3-4.
23. 杨润泉, 方热军, 杨飞云, 等. 环境温湿度和猪舍空气质量对妊娠母猪生产性能的影响. 家畜生态学报, 2016, 37(12): 40-43.
24. 尹航, 周海柱, 娄玉杰. 生态型发酵床养猪模式对猪舍环境的影响. 养猪, 2008(6): 30-31.
25. 尹昭智, 唐敏, 于光辉, 李少宁, 宋春阳. 新型节能猪舍与传统猪舍环境对断奶仔猪生产性能的比较. 畜牧与兽医, 2017, 49(9): 27-31.
26. 臧冰, 李恕艳, 李国学. 风干预处理对堆肥腐熟度及臭气排放量的影响. 农业工程学报, 2016, 32(S2): 247-253.
27. 张建军. 饲料中添加茶渣和活性炭作为吸附剂对肉鸡舍环境的影响研究. 今日畜牧兽医, 2017(12): 53-54.
28. 张艳, 刘小谭, 邓佳, 王鹏. 猪舍内环境空气参数监测系统的应用研究. 四川畜牧兽医, 2016(6): 24-26.
29. 章红兵, 楼月琴, 徐玉花. 发酵床饲养方式对猪舍环境的影响. 家畜生态学报, 2012, 33(3): 96-99.
30. 赵许可. 规模猪场不同清粪方式对猪生产性能、舍内环境、粪污排放的影响[硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2014.

31. 郑志喜. 功能性鼻内镜手术后鼻粘膜形态结构和功能的变化[硕士学位论文]. 福州: 福建医科大学, 2013.
32. 周忠凯, 余刚, 秦竹, 林家彬, 严建民, 汤赤, 陈俊. 发酵床育肥猪舍的氨气浓度及其排放率. *江苏农业科学*, 2014, 42(7): 210-212.
33. 宗丰. EM菌液对降低猪舍有害气体含量的实验. *石河子科技*, 2008(6): 51-52.
34. 邹思湘. 动物生物化学. 中国农业出版社, 2005.
35. 张英, 王哲鹏, 闵育娜, 陈洪, 高玉鹏. 冬季不同类型蛋鸡舍环境参数变化特点研究. 第十六次全国家禽学术讨论会. 2013.
36. Aarnink, A. J. A, Keen, A, Metz, J. H. M, Speelman, L, & Verstegen, M. W. A. Ammonia Emission Patterns during the Growing Periods of Pigs Housed on Partially Slatted Floors. *J Agr Eng Res*, 1995, 62(2):105-116.
37. Accioly, J. M, Taylor, E. G, Costa, N. D, Pethick, D. W, White, C. L, Pluske, J. R, Clark, P. Effect of atmospheric ammonia on bovine lung. *Sci Access*, 2004, 1(1): 1-4.
38. Amer, A. H, Pingel, H, Hillig, J, Soltan, M, Von Borell, E. Impact of atmospheric ammonia on laying performance and egg shell strength of hens housed in climatic chambers. *Arch Geflugelkund*, 2004, 68(3): 120-125.
39. Antonelli A C. Experimental ammonia poisoning in cattle fed extruded or prilled urea: clinical findings. *Brazilian J Vet Res & Anim Sci*, 2004, 41(1): 67-74.
40. Ayrle, H, Mevissen, M, Kaske, M, Nathues, H, Gruetzner, N, Melzig, M, Walkenhorst, M. Medicinal plants—prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets. *Bmc Vet Res*, 2016, 12(1): 89.
41. Beker, A, Vanhooser, S. L, Swartzlander, J. H, Teeter, R. G. Atmospheric Ammonia Concentration Effects on Broiler Growth and Performance. *J Appl Poul Res*, 2004, 13(1): 5-9.
42. Bittinger, K, Charlson, E. S, Loy, E, Shirley, D. J, Haas, A. R, Laughlin, A, Cantu, E. Improved characterization of medically relevant, fungi in the human respiratory tract using, next-generation sequencing. *Genome Biol*, 2014, 15(10):487.
43. Bjarnsholt, T, Jensen, P. Ø, Fiandaca, M. J, Pedersen, J, Hansen, C. R, Andersen, C. B, Højby, N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatric Pulmonol*, 2009, 44(6), 547–558.

44. Blanesvidal V, Hansen M N, Pedersen S, Rom, H. B. Emissions of ammonia, methane and nitrous oxide from pig houses and slurry: Effects of rooting material, animal activity and ventilation flow. *Agr Ecosyst Environ*, 2008, 124(3):237-244.
45. Bobermin, L. D, Quincozes-Santos, A, Guerra, M. C, Leite, M. C, Souza, D. O, Gonçalves, C. A, Gottfried, C. Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells. *Plos One*, 2012, 7(12): e52164.
46. Borell V, Ozpinar E, Eslinger A, Schnitz, K. M, Zhao, A. L, Mitloehner, Y. Acute and prolonged effects of ammonia on hematological variables, stress responses, performance, and behavior of nursery pigs. *J Swine Health Prod*, 2007, 15(15):137-145.
47. Brockmeier S L, Halbur P G, Thacker E L. Porcine Respiratory Disease Comple. *J Guangxi Agr Bio Sci*, 2002, 166(3): 231-258.
48. Budden, K. F, Gellatly, S. L, Wood, D. L, Cooper, M. A, Morrison, M, Hugenholtz, P, Hansbro, P. M. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 15(1): 55.
49. Charles D R, Payne C G. The influence of graded levels of atmospheric ammonia on chickens. *British Poul Sci*, 1966, 7(3): 189-198.
50. Cheng, Z, O'Connor, E. A, Jia, Q, Demmers, T. G M, Wathes, C. M, Wathes, D. C. Chronic ammonia exposure does not influence hepatic gene expression in growing pigs. *Anim*, 2014, 8(2): 331-7.
51. Clark, O. G, Moehn, S, Edeogu, I, Price, J, Leonard, J. Manipulation of dietary protein and nonstarch polysaccharide to control swine manure emissions. *J Environ Qual*, 2005, 34(5): 1461-1466.
52. Donham K J. Association of environmental air contaminants with disease and productivity in swine. *Am J Vet Res*, 1991, 52(10): 1723.
53. Dourmad, J. Y, Guingand, N, Latimier, P, Seve, B. Nitrogen and phosphorus consumption, utilisation and losses in pig production: France. *Livest Prod Sci*, 1999, 58(3): 199-211.
54. Drummond, J. G, Curtis, S. E, Simon, J, Norton, H. W. Effects of aerial ammonia on growth and health of young pigs. *J Anim Sci*, 1980, 50(6): 1085-1091.
55. Garry, B. P, Fogarty, M, Curran, T. P, O'connell, M. J, O'doherty, J. V. The effect of cereal type and enzyme addition on pig performance, intestinal microflora, and ammonia and odour emissions. *Anim An Int J Anim Biosci*, 2007, 1(5): 751-757.

56. Gunther C, Josenhans C, Wehkamp J. Crosstalk between microbiota, pathogens and the innate immune responses. *Int J Med Microbiol Ijmm*, 2016, 306(5): 257-265.
57. Gutbier, B, Fischer, K, Doehn, J. M, von Lachner, C, Herr, C, Klaile, E, Suttorp, N. *Moraxella catarrhalis* induces an immune response in the murine lung that is independent of human CEACAM5 expression and long-term smoke exposure. *Am J Physiol Lung C & Mol Physiol*, 2015, 309(3): 864-71.
58. Hamilton T D, Roe J M, Webster A J. Synergistic role of gaseous ammonia in etiology of *Pasteurella multocida*-induced atrophic rhinitis in swine. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(9): 2185-2190.
59. Hamilton, T. D. C, Roe, J. M, Hayes, C. M, Webster, A. J. F. Effects of ammonia inhalation and acetic acid pretreatment on colonization kinetics of toxigenic *Pasteurella multocida* within upper respiratory tracts of swine. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(5): 1260.
60. Hansen C F. Reduced diet crude protein level, benzoic acid and inulin reduced ammonia, but failed to influence odour emission from finishing pigs. *Livest Sci*, 2007, 109(1): 228-231.
61. Hayes E T, Curran T P, Dodd V A. Odour and ammonia emissions from intensive poultry units in Ireland. *Bioresource Tech*, 2006, 97(7): 933.
62. Igarashi, M, Kitada, Y, Yoshiyama, H, Takagi, A, Miwa, T, Koga, Y. Ammonia as an accelerator of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Infect & Immun*, 2001, 69(2): 816.
63. Joki, S, Toskala, E, Saano, V, Nuutinen, J. Correlation Between Ciliary Beat Frequency and the Structure of Ciliated Epithelia in Pathologic Human Nasal Mucosa. *Laryngoscope*, 1998, 108(3): 426-430.
64. Jr C J, Fitch M D, Fleming S E. Glucose alleviates ammonia-induced inhibition of short-chain fatty acid metabolism in rat colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastr & L*, 2003, 285(1): G105.
65. Kosenko, E, Venediktova, N, Kaminsky, Y, Montoliu, C, Felipo, V. Sources of oxygen radicals in brain in acute ammonia intoxication in vivo. *Brain Res*, 2003, 981(1): 193-200.
66. Kraemer, J. G, Ramette, A, Aebi, S, Oppliger, A, Hilty, M. Influence of pig farming on the human's nasal microbiota: The key role of the airborne microbial communities. *Appl & Environ Microbio*, 2018, 84(6): AEM. 02470-17.

67. Krejci, J, Nechvatalova, K, Kudlackova, H, Faldyna, M, Kucerovala, Z, Toman, M. Systemic and local antibody responses after experimental infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in piglets with passive or active immunity. *J Vet Med*, 2005, 52(4): 190.
68. Liang, G. Q, Wang, X. P, Wang, X. M, Chuan-Pu, L. I, Chen, A. G. Effects of Camphor Familial Plant Extract and Yucca Extracts on Emission of NH₃ and H₂S in Slurry of Weaned Pigs. *Chinese J Anim Sci*, 2009.
69. Lim, T. T, Heber, A. J, Ni, J. Q, Kendall, D. C, Richert, B. R. Effects of manure removal strategies on odor and gas emissions from swine finishing. *T Asae*, 2004: 2041-2050.
70. Liu, S, Ni, J. Q, Radcliffe, J. S, Vonderohe, C. E. Mitigation of ammonia emissions from pig production using reduced dietary crude protein with amino acid supplementation. *Bioresource Tech*, 2017.
71. Liu, Y, Cao, Z, Chen, Z, Liu, J, Yang, S. Study on the effect of ventilation system of campanile beef barn in southern China during winter. *Heilongjiang Anim Sci Vet Medicine*, 2018.
72. Lobley, G. E, Connell, A, Lomax, M. A, Brown, D. S, Milne, E, Calder, A. G, Farningham, D. A. H. Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. *British J Nutr*, 1995, 73(05): 667-685.
73. Mashhadani E. H, Beck M. M. Effect of Atmospheric Ammonia on the Surface Ultrastructure of the Lung and Trachea of Broiler Chicks. *Poul Sci*, 1985, 64(11): 2056-61.
74. Mendes, L. B, Tinoco, I. F, Ogink, N. W, Rocha, K. S, Osorio, S, Jairo, A, Santos, M. S. Ammonia emissions from a naturally and a mechanically ventilated broiler house in Brazil. *Rev Bras Eng Agr Amb*, 2014, 18(11): 1179-1185.
75. Michiels, A, Piepers, S, Ulens, T, Van Ransbeeck, N, Sacristán, R. D. P, Sierens, A, Maes, D. Impact of particulate matter and ammonia on average daily weight gain, mortality and lung lesions in pigs. *Prev vet med*, 2015, 121(1): 99-107.
76. Murphy, T, Cargill, C, Rutley, D, Stott, P. Pig-shed air polluted by haemolytic cocci and ammonia causes subclinical disease and production losses. *Vet Rec*, 2012, 171(5): 123.
77. Nandi S, Gupta P. S, Mondal S. Ammonia concentrations in different size classes of ovarian follicles of sheep (*Ovis aries*): Possible mechanisms of accumulation and its

- effect on oocyte and granulosa cell growth in vitro. *Theriogenology*, 2016, 85(4):678-687.
78. Niederwerder, M. C, Jaing, C. J, Thissen, J. B, Cino-Ozuna, A. G, McLoughlin, K. S, Rowland, R. R. Microbiome associations in pigs with the best and worst clinical outcomes following co-infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet Microbiol*, 2016, 188: 1-11.
79. Otto, E. R, Yokoyama, M, Hengemuehle, S, Von Bermuth, R. D, Van Kempen, T, Trottier, N. L. Ammonia, volatile fatty acids, phenolics, and odor offensiveness in manure from growing pigs fed diets reduced in protein concentration. *J Anim Sci*, 2003, 81(7): 1754-1763.
80. Padgett D A, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends in Immunology*, 2003, 24(8): 444.
81. Palkovičová, Z, Brouček, J, Hanus, A, Tongel', P, Uhrinčat', M, Strmen'ová, A. Effect of season on ammonia emissions in pig fattening. *Slovak J Anim Sci*, 2012, 45:53-59.
82. Park, D. E, Baggett, H. C, Howie, S. R., Shi, Q, Watson, N. L, Brooks, W. A, Madhi, S. A. Colonization Density of the Upper Respiratory Tract as a Predictor of Pneumonia—Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Staphylococcus aureus, and Pneumocystis jirovecii. *Clin Infect Dis An Official Publication of the Infectious Dis Society of Am*, 2017, 64(suppl_3): S328.
83. Park, J. W, Jeong, J. S, Lee, S. I, Kim, I. H. Effect of dietary supplementation with a probiotic (Enterococcus faecium) on production performance, excreta microflora, ammonia emission, and nutrient utilization in ISA brown laying hens. *Poultry Sci*, 2016, 95(12): pew241.
84. Philippe, F. X, Laitat, M, Canart, B, Vandenheede, M, Nicks, B. Comparison of ammonia and greenhouse gas emissions during the fattening of pigs, kept either on fully slatted floor or on deep litter. *Livest Sci*, 2007, 111(1): 144-152.
85. Pruet S B. Stress and the immune system. *Pathophysiol*, 2003, 9(3): 133-153.
86. Reid, G, Younes, J. A, Van der Mei, H. C, Gloor, G. B, Knight, R, Busscher, H. J. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(1): 27-38.

87. Riise, G. C, Qvarfordt, I, Larsson, S, Eliasson, V, Andersson, B. A. Inhibitory Effect of N-Acetylcysteine on Adherence of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to Human Oropharyngeal Epithelial Cells in vitro. *Respiration*, 2000, 67(5): 552-558.
88. Rogers D F. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology. *Curr Opin in Pharmacol*, 2004, 4(3): 241.
89. Rose, C, Ytrebo, L. M, Davies, N. A, Sen, S, Nedredal, G. I, Belanger, M, Jalan, R. Association of reduced extracellular brain ammonia, lactate, and intracranial pressure in pigs with acute liver failure. *Hepatology*, 2007, 46(6): 1883-1892.
90. Sato S, Kiyono H. The mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr Opin Virol*, 2012, 2(3): 225-232.
91. Schenkel A R, Schroeder W G, Volckens J. System for Small Animal Aerosol Inhalation Chamber: US, US 20090211534 A1. 2009.
92. Slifierz M J, Friendship R M, Weese J S. Longitudinal study of the early-life fecal and nasal microbiotas of the domestic pig. *Bmc Microbiol*, 2015, 15(1): 1-12.
93. Smith J H, Wathes C M, B. A. Baldwin. The preference of pigs for fresh air over ammoniated air. *Appl Anim Behav Sci*, 1996, 49(4): 417-424.
94. Thornton D J, Rousseau K, McGuckin M A. Structure and Function of the Polymeric Mucins in Airways Mucus. *Annu Rev Physiol*, 2008, 70(1): 459.
95. Tilak K S, Veeraiah K, Raju J M. Effects of ammonia, nitrite and nitrate on hemoglobin content and oxygen consumption of freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *J Environ Biol*, 2007, 28(1):45-47.
96. Vijay, G. M, Hu, C, Peng, J, Martinez, I. G, Hoque, R, Zhang, X, Wen, L. Ammonia-Induced Brain Oedema and Immune Dysfunction is Mediated by Toll-Like Receptor 9(TLR9). *J Hepatol*, 2016, 64(2): S314-S314.
97. Wei, F. X, Hu, X. F, Xu, B, Zhang, M. H, Li, S. Y, Sun, Q. Y, Lin, P. Ammonia concentration and relative humidity in poultry houses affect the immune response of broilers. *Genetics & Molecular Res Gmr*, 2015, 14(2): 3160-3169.
98. Xue, L. I, Chen, F, Xiong, X, Xin, W. U, Liu, G, Yin, Y. Effects of stocking density on piggy's health and environment in pig house. *Chinese J Anim Nutr*, 2017.
99. Yan M, Pamp S J, Fukuyama J, Hwang, P. H, Cho, D. Y, Holmes, S, Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage. *Cell Host Microbe*, 2013, 14(6):631-640.

100. Ye, Z, Zhang, G, Seo, I. H, Kai, P, Saha, C. K, Wang, C, Li, B. Airflow characteristics at the surface of manure in a storage pit affected by ventilation rate, floor slat opening, and headspace height. *Biosyst Eng*, 2009, 104(1): 97-105.
101. Zhang, J, Li, C, Tang, X, Lu, Q, Sa, R, Zhang, H. Proteome changes in the small intestinal mucosa of broilers (*Gallus gallus*) induced by high concentrations of atmospheric ammonia. *Proteome Sci*, 2015, 13(1): 9.
102. Zheng T, Chen L, Qiu X. H. The impact on detecting blood ammonia via separate gel tube and the significance of detecting blood ammonia in patients of hepatic diseases. *Qilu J Medicall Aboratory Sci*, 2005.

附录 研究生在读期间发表的主要论文

1. **李季**, 王同心, 姚卫磊, 等. 畜禽舍氨气排放规律及对畜禽健康的危害[J]. 动物营养学报, 2017, 29(10).
2. Wang T, Yao W, **Li J**, et al. Acetyl-CoA from Inflammation-Induced Fatty Acids Oxidation Promotes Hepatic Malate-Aspartate Shuttle Activity and Glycolysis[J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2018.

致 谢

感谢黄飞若教授对我的传道受业解惑之恩。黄老师严谨的科研态度，力求完美的工作作风深深地影响着我，最重要的是老师积极乐观的生活态度，灵活多变的思维方式给了我很大启发。在本论文的选题、试验方案的确定、试验的开展、数据统计与分析到毕业论文的撰写、修改、定稿整个过程中，黄老师给予了大量的指导和建议。在此谨向黄老师致以诚挚的谢意和崇高的敬意。感谢您在这两年的学习和生活中给予的关心和帮助！

本论文的试验离不开华中农业大学工学院高云老师和其团队设计的养殖环境控制箱，在试验过程中陈震撼、刁亚萍、郭继亮等同学也给予了很大帮助，帮助我调试环境控制箱氨气浓度，助我顺利完成试验；感谢华中农业大学家畜工程研究中心种猪场张金龙老师在试验过程中提供的支持和帮助。

衷心感谢动物营养与饲料科学系的彭健教授、齐德生教授、晏向华教授、马立保副教授、齐智利副教授、王艳青副教授、魏宏逵副教授、孙铝辉副教授、周忠新副教授和张妮娅副教授在我研究生期间的教导和帮助！

实验室的师兄师姐是学习路上的引路人，他们的一句提醒和点拨都会让我茅塞顿开。感谢王同心师兄、刘霜师兄、郭亮师兄、秦廷洋师兄、张萍师姐、李蓉师姐在我学习过程中提出的宝贵意见和建议，以及对我生活和学习上的鼓励和帮助！感谢姚卫磊、杨洪明、张轶凤、邵亚飞、贺琼玉、高景、王向明、刘雨辰等同窗和师弟师妹在两年的研究生学习中带来的感动和欢声笑语。

感谢我的家人、朋友在这两年的学习生活中给予的支持、鼓励和信任！你们的支持和鼓励是我最大的动力。

最后，再次感谢所有关心、支持和帮助我的老师、亲人、朋友！感谢华中农业大学对我的培养！愿华中农业大学的明天更加辉煌，动物营养与科学系的明天更加美好！

李 季

2018年6月