

网络出版时间:2014-03-26 17:09

DOI: 10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.04.004

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.04.004.html>

饲料中添加碳酸氢钠对蛋鸡肠道内容物 pH、 消化蛋白酶活性及菌群的影响

刘 炎¹, 董晓芳², 佟建明², 高玉鹏¹, 鲍延娥¹, 崔耀明²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

【摘要】【目的】研究蛋鸡饲料中添加不同水平的碳酸氢钠对肠道内容物 pH、消化蛋白酶活性和肠道菌群的影响,以探讨饲料中添加碳酸氢钠对蛋鸡消化机能的影响。【方法】选取 21 周龄海兰褐壳蛋鸡 450 只,随机分为 5 组,每组 6 个重复,每重复 15 只鸡;对照组饲喂基础饲料,试验组分别饲喂添加 0.1%、0.5%、2.5%、5% NaHCO₃ 的试验饲料,试验期 133 d。试验期末采集各组肌胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠食糜及粪便,测定各段食糜和粪便的 pH、肌胃食糜的胃蛋白酶活性、十二指肠食糜的胰蛋白酶和糜蛋白酶活性以及回肠和盲肠食糜中菌群的变性梯度凝胶电泳(DGGE)指纹图谱,并计算回肠、盲肠食糜的多样性指数和相似性指数。【结果】1) 饲料中添加 0.1% 和 0.5% 的碳酸氢钠对蛋鸡肠道各段 pH 无显著影响,而饲料中添加 2.5% 和 5% 的碳酸氢钠可显著提高蛋鸡肌胃、十二指肠和空肠内容物以及粪便的 pH($P < 0.05$)。2) 饲料中添加 2.5% 和 5% 的碳酸氢钠可显著降低肌胃中胃蛋白酶、十二指肠中胰蛋白酶和糜蛋白酶活性($P < 0.05$)。3) 饲料中添加碳酸氢钠可改变蛋鸡回肠和盲肠的微生物多样性指数。【结论】饲料中添加高剂量的碳酸氢钠(2.5% 和 5%)显著影响蛋鸡消化道内环境,降低蛋鸡的蛋白消化机能。

【关键词】 碳酸氢钠; 蛋鸡; 肠道 pH; 蛋白酶活性; 肠道菌群

【中图分类号】 S831.5

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)04-033-08

Effects of dietary sodium bicarbonate on digesta pH, digestive enzyme activities and intestinal microflora of laying hens

LIU Yan¹, DONG Xiao-fang², TONG Jian-ming²,
GAO Yu-peng¹, BAO Yan-e¹, CUI Yao-ming²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Objective】The study investigated the effects of dietary sodium bicarbonate on intestinal pH, digestive proteases activities and intestinal microflora of laying hens to discuss the effects of dietary sodium bicarbonate on digestive function of laying hens. 【Method】450 21-week-old Hi-line brown layers were randomly allocated into 5 groups. Each group had 6 replicates and each replicate had 15 hens. Laying hens in control group were fed with basal diet. The trial groups were fed with the basal diets supplemented with 0.1%, 0.5%, 2.5% and 5% sodium bicarbonate, respectively. The experiment last 133 days. The digesta in gizzard, duodenum, jejunum ileum, and cecum, and manure were collected at the end of experiment.

【收稿日期】 2013-04-17

【基金项目】 国家蛋鸡产业技术体系建设专项(CARS-41-K16)

【作者简介】 刘 炎(1987-),男,陕西西安人,硕士,主要从事家禽营养与免疫研究。E-mail: liuyan710@163.com

【通信作者】 高玉鹏(1956-),男,陕西白水人,教授,硕士生导师,主要从事家禽产业技术与动物营养研究。

E-mail: gaoyupeng112@sina.com

董晓芳(1975-),女,山西柳林人,副研究员,硕士生导师,主要从事家禽营养与免疫研究。

E-mail: xiaofangd1124@sina.com

pH values of manure and digesta in each gastrointestinal tract section and the activities of pepsin in gizzard, trypsin and chymotrypsin in duodenum were measured respectively. Ileal and cecal microflora were analyzed with DGGE fingerprint method and the Shannon-Weiner index and similarity index were calculated.

【Result】 1) pH in each section of gastrointestinal tract were not affected significantly by the supplement of 0.1% or 0.5% sodium bicarbonate whereas 2.5% or 5% sodium bicarbonate supplementary increased pH of digesta in gizzard, duodenal, and jejunal and pH of manure significantly ($P < 0.05$). 2) Activities of pepsin in gizzard and trypsin and chymotrypsin in duodenum were decreased significantly by the supplement of 2.5% or 5% sodium bicarbonate ($P < 0.05$). 3) Ileal and cecal microflora Shannon-Wiener index were altered by the supplement of 2.5% or 5% sodium bicarbonate. **【Conclusion】** Higher levels of sodium bicarbonate (2.5% and 5%) in diet decreased protein digestive function and changed normal intestinal ecological conditions of laying hens.

Key words: sodium bicarbonate; laying hens; intestinal pH; protease activities; intestinal microflora

碳酸氢钠 (NaHCO_3) 俗称小苏打, 是一种强碱弱酸盐, 是调节动物机体体液酸碱平衡的缓冲物质之一^[1]。在畜禽养殖业中, 碳酸氢钠作为一种电解质添加剂和酸碱调节剂添加于饲料中, 有提高畜禽生产性能、促进机体免疫力及抗应激能力、增强畜禽对饲料的消化力和增进食欲的作用^[2-3]。营养物质在畜禽消化道内通过物理消化、化学消化和微生物消化后被机体吸收利用, 而肠道中酶的活性和微生物区系又与肠道内的 pH 密切相关^[4-5]。因此, 作为酸碱调节剂, 碳酸氢钠添加于饲料中可影响畜禽肠道 pH、消化酶活性和肠道微生物活动。碳酸氢钠的作用在蛋鸡生产中报道较多并且已经有较为广泛的应用。Yoruk 等^[6]研究表明, 在蛋鸡饲料中添加碳酸氢钠可显著提高蛋鸡产蛋率和蛋质量。Howes^[7]报道, 在蛋鸡饲料中添加碳酸氢钠可增加蛋壳强度。Balnave 等^[8]研究表明, 碳酸氢钠可有效减小热应激对蛋鸡生产性能的负面作用。Anthony^[9]报道, 在饲料中添加碳酸氢钠可提高肉鸡肌胃 pH, 有效降低肉鸡肌胃糜烂的发生率。众所周知, 饲料中的营养物质都是通过肠道而作用于动物体的, 因此, 饲料对肠道的影响对于蛋鸡的生理健康以及生产性能都有重大意义。但关于碳酸氢钠对蛋鸡肠道环境影响的报道目前较为少见。为此, 本试验用添加 0%, 0.1%, 0.5%, 2.5% 和 5% 碳酸氢钠的 5 种饲料饲喂蛋鸡, 研究碳酸氢钠对产蛋鸡肠道 pH、蛋白酶活性和肠道微生物菌群的影响, 旨在为碳酸氢钠在蛋鸡生产中的安全应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用碳酸氢钠, 购于四川省自贡市鸿鹤化工

股份有限公司, 纯度为 99%。

1.2 试验设计

选取 21 周龄海兰褐壳蛋鸡 450 只, 随机分为 5 组, 每组 6 个重复, 每重复 15 只, 预饲期 2 周, 试验期 19 周。基础饲料为参照美国 NRC(1994) 中规定的蛋鸡营养需要标准配制的玉米-豆粕型饲料 (I 组), 试验组饲料分别在基础饲料中添加 0.1% (II 组), 0.5% (III 组), 2.5% (IV 组) 和 5% (V 组) 的碳酸氢钠, 并调整饲料中玉米、豆粕和油的比例, 使各组饲料与基础饲料除碳酸氢钠外的其他营养水平基本保持一致, 饲料组成及其营养水平见表 1。试验期间每只鸡每天饲喂 110 g 干粉饲料, 自由饮水, 每日保证 16 h 光照。

1.3 样品采集和指标的测定

1.3.1 试验样品的采集 于试验第 19 周末, 每重复收集同一笼 3 只鸡的粪便, 测定其 pH。同时每重复随机选 2 只蛋鸡进行屠宰, 无菌操作收集肌胃、十二指肠、空肠、回肠和盲肠的内容物于试管中。其中肌胃内容物分装 2 管, 分别用于测定 pH 和胃蛋白酶活性; 十二指肠内容物分装 2 管, 分别用于测定 pH、胰蛋白酶及糜蛋白酶活性; 回肠和盲肠的内容物各分装 2 管, 分别用于测定 pH 和肠道微生物。

1.3.2 pH 值测定 用 HANNA pH211 型 pH 计测量各段肠道内容物和粪便的 pH。

1.3.3 蛋白酶活性的测定 将肌胃内容物用生理盐水稀释 5 倍, 4 ℃ 条件下 2 000 g 离心 30 min, 取上清液, 用于测定胃蛋白酶活性。将十二指肠内容物在 4 ℃ 条件下 15 000 g 离心 20 min, 取上清液, 用于测定胰蛋白酶和糜蛋白酶活性。

胃蛋白酶活性的测定: 根据 Bergmeyer^[10] 的 Wirnt 方法, 用 N-乙酰基-L-苯丙氨酰基-3, 5-二碘-

酪氨酸(Sigma856746)作为底物测定。胃蛋白酶活性单位定义为,在 37 ℃、pH=2.0 条件下每 min 释放 1 μmol L-3,5-二碘-酪氨酸所具有的活性(U)。

胰蛋白酶活性的测定:根据 Bergmeyer^[10] 的 Wirnt 方法,用 TAME(SigmaT4626)作为底物测定。胰蛋白酶活性单位定义为,在 25 ℃、pH=8.1 条件下每 min 释放 1 μmol 对-苯磺酸-L-精氨酸所

具有的活性(U)。

糜蛋白酶活性的测定:根据 Bergmeyer^[10] 的 Wirnt 方法,用 BTEE(SigmaB6125)作为底物测定。糜蛋白酶活性单位定义为,在 25 ℃、pH=7.8 条件下每 min 释放 1 μmol 苯甲酰-L-酪氨酸所具有的活性(U)。

表 1 各组蛋鸡饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient level of each diet (air-dry basis)

项目 Item	I 组 Group I	II 组 Group II	III 组 Group III	IV 组 Group IV	V 组 Group V
玉米/(g·kg ⁻¹) Corn	595.0	593.0	584.5	544.0	493.0
豆粕/(g·kg ⁻¹) Soybean meal	257.0	257.5	259.0	266.0	275.0
豆油/(g·kg ⁻¹) Soybean oil	10.0	10.5	13.5	27.0	44.0
石粉/(g·kg ⁻¹) Limestone	85.0	85.0	85.0	85.0	85.0
食盐/(g·kg ⁻¹) Salt	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
预混料/(g·kg ⁻¹) Premix	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
碳酸氢钠/(g·kg ⁻¹) Sodium bicarbonate	0	1.0	5.0	25.0	50.0
合计 Total	1 000.0	1 000.0	1 000.0	1 000.0	1 000.0
代谢能/(MJ·kg ⁻¹) ME	11.39	11.38	11.39	11.38	11.38
粗蛋白/(g·kg ⁻¹) CP	163.6	163.7	163.7	163.6	163.6
钙/(g·kg ⁻¹) Ca	36.6	36.7	36.7	36.7	36.7
非植酸磷/(g·kg ⁻¹) AP	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
赖氨酸/(g·kg ⁻¹) Lys	8.3	8.3	8.4	8.4	8.6
蛋氨酸+胱氨酸/(g·kg ⁻¹) Met+Cys	6.1	6.1	6.1	6.0	6.0
钠/(g·kg ⁻¹) Na	1.9	2.3	3.5	6.6	12.8

注:预混料为每千克饲料提供磷酸氢钙 16 000 mg,锰 63.6 mg,锌 69 mg,铁 30 mg,铜 6.26 mg,碘 0.4 mg,硒 0.2 mg,维生素 A 8 000 IU,维生素 D₃ 3 000 IU,维生素 E 15 IU,维生素 K 2 mg,维生素 B₁ 2 mg,维生素 B₂ 4 mg,维生素 B₆ 4 mg,维生素 B₁₂ 0.01 mg,泛酸钙 12 mg,烟酸 40 mg,叶酸 1 mg,生物素 0.1 mg,氯化胆碱 500 mg,蛋氨酸 990 mg。营养水平中的钠含量为实测值,其余指标为计算值。

Note: Each kg of premix provides the following: Dicalcium phosphate 16 000 mg, Mn (as manganese sulfate) 63.6 mg, Zn (as zinc sulfate) 69 mg, Fe (as ferrous sulfate) 30 mg, Cu (as copper sulfate) 6.26 mg, I (as potassium iodide) 0.4 mg, Se (as sodium selenite) 0.2 mg, V_A 8 000 IU, V_{D₃} 3 000 IU, V_E 15 IU, V_K 2 mg, V_{B₁} 2 mg, V_{B₂} 4 mg, V_{B₆} 4 mg, V_{B₁₂} 0.01 mg, pantothenic acid 12 mg, nicotinic acid 40 mg, folic acid 1 mg, biotin 0.1 mg, choline chloride 500 mg, methionine 990 mg. Na contents are measured values while the others are calculated values.

1.3.4 肠道微生物变性梯度凝胶电泳(Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)指纹图谱分析

(1)肠道总微生物 DNA 的提取^[11]。每组随机取 4 只鸡的回肠和盲肠内容物用于 DGGE 指纹图谱分析。每只鸡取回肠和盲肠内容物 1 g 左右,加入 2 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS)充分混匀,1 600 r/min 离心 10 min,取上清液,重复 3 次,收集所有上清液于离心管中,在 10 000 r/min 下离心 5 min,收集沉淀。在沉淀中加入 0.5 mL 1×TAE 和 0.6 mL 50 g/L 溶菌酶,37 ℃水浴 3 h。在混合溶液中加入 170 μL 100 g/L 的十二烷基磺酸钠(SDS)和 17 μL 20 g/L 蛋白酶 K,37 ℃水浴 1 h。在混合液中加入 0.6 mL 5 mol/L NaCl 和 0.5 mL 100 g/L 的十六烷基三甲基溴化铵氯化钠(CTAB/NaCl)溶液,65 ℃水浴 20 min。将混合液用 0.7 mL 氯仿/异戊醇(V(氯仿):V(异戊醇)=24:1)抽提 1 次,

10 000 r/min 离心 10 min,吸取上层液体于另一试管中,用 0.7 mL 苯酚/氯仿/异戊醇(V(苯酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1)抽提 1 次,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上层液体于另一试管中,再用氯仿/异戊醇抽提 1 次。在吸取的上层液体中加入 0.6 倍体积的异丙醇,静置沉淀 1 h,12 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀。用体积分数 70%的乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀。用 40 μL TE 溶解 DNA,-20 ℃保存备用。用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段。

(2)微生物总 DNA 的 PCR 扩增^[12]。利用细菌通用引物对供试鸡细菌 16S rDNA 的 V₃ 区进行 PCR 扩增。引物为 F341-GC:5'-CGCCCGGGCG-CGCCCCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGCC-TACGGGAGGCAGCAG-3' 与 R534:5'-ATTAC-CGCGGCTGCTGG-3',由上海生工合成。PCR 反

应体系(25 μL): $2 \times \text{PCR Taq Mix}$ 12.5 μL (包括 0.2 U/ μL Taq DNA 聚合酶、400 mmol/L dNTP、20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L KCl 和 3 mmol/L Mg^{2+}), 模板 DNA 0.5 μL , 上、下游引物各 1 μL , ddH₂O 10 μL , 总体积为 25 μL 。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 93 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用 20 g/L 的琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

(3) DGGE^[13]。采用 Bio-Rad Dcode 进行 DGGE 凝胶电泳, 将 16S rDNA V₃ 区的 PCR 扩增产物于 8% 的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离。凝胶变性梯度为 350~550 g/L, 变性方向与电泳方向一致, 使用 $1 \times \text{TAE}$ 缓冲溶液, 180 V 60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温电泳 3 h, 电泳结束后用硝酸银染色, 显色定影后, 用 Alphimager 成像系统拍照。

1.4 数据分析

蛋鸡肠道各段内容物和粪便的 pH、蛋白酶活性用 SAS 8.1 软件进行单因子方差分析和 Duncan 氏法多重比较, 试验结果以“平均值 \pm 标准差”表示。

表 2 饲料中碳酸氢钠添加水平对蛋鸡肠道内容物和粪便 pH 的影响

Table 2 Effects of dietary NaHCO_3 level on pH of gastrointestinal tract contents and manure of laying hens

碳酸氢钠添加水平/ NaHCO_3 level	肌胃 Gizzard	十二指肠 Duodenum	空肠 Jejunum	回肠 Ileum	盲肠 Cecum	粪便 Manure
0(CK)	4.22 \pm 0.07 c	6.08 \pm 0.09 b	6.17 \pm 0.08 bc	6.51 \pm 0.10 a	6.93 \pm 0.11 a	7.18 \pm 0.26 c
0.1	4.25 \pm 0.05 c	6.11 \pm 0.09 ab	6.19 \pm 0.09 bc	6.56 \pm 0.11 a	6.90 \pm 0.13 a	7.51 \pm 0.15 c
0.5	4.25 \pm 0.06 c	6.08 \pm 0.05 b	6.14 \pm 0.11 c	6.53 \pm 0.10 a	6.87 \pm 0.12 a	7.50 \pm 0.45 c
2.5	4.68 \pm 0.09 b	6.17 \pm 0.08 a	6.22 \pm 0.10 ab	6.54 \pm 0.11 a	6.94 \pm 0.14 a	8.45 \pm 0.34 b
5	4.88 \pm 0.10 a	6.16 \pm 0.08 a	6.28 \pm 0.09 a	6.57 \pm 0.14 a	6.93 \pm 0.11 a	9.13 \pm 0.31 a

注: 同列数据后所标字母相异表示差异显著 ($P < 0.05$), 所标字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

Note: Different letters in each column mean that the difference is significant ($P < 0.05$), while same letters in each row indicate that the difference is not significant ($P > 0.05$). The same below.

2.2 碳酸氢钠添加水平对蛋鸡肠道内蛋白酶活性的影响

由表 3 可知, 2.5% 和 5% 碳酸氢钠添加水平组的肌胃中胃蛋白酶活性以及十二指肠中胰蛋白酶活

表 3 饲料中碳酸氢钠添加水平对蛋鸡肠道胃蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶活性的影响

Table 3 Effects of dietary NaHCO_3 level on activities of pepsin, trypsin and chymotrypsin in gastrointestinal tract contents of laying hens

碳酸氢钠添加水平/ NaHCO_3 level	胃蛋白酶 Pepsin	胰蛋白酶 Trypsin	糜蛋白酶 Chymotrypsin
0(CK)	526.71 \pm 88.29 a	15.45 \pm 1.16 a	477.70 \pm 73.31 a
0.1	558.84 \pm 90.44 a	13.93 \pm 1.07 ab	523.54 \pm 90.64 a
0.5	513.52 \pm 71.61 a	14.97 \pm 1.31 a	453.83 \pm 63.58 a
2.5	359.76 \pm 64.51 b	13.33 \pm 1.46 b	338.38 \pm 66.63 b
5	261.70 \pm 54.05 c	13.06 \pm 1.07 b	260.69 \pm 64.99 b

2.3 碳酸氢钠添加水平对蛋鸡肠道微生物区系多样性的影响及其相似性分析

饲料中不同碳酸氢钠添加水平组蛋鸡回肠、盲

肠道微生物菌群的 DGGE 图像用 Quantity One 软件进行分析, 用 UPGMA (Unweighted pair group mean average) 进行聚类分析, 用 Dice 法计算各碳酸氢钠添加组与对照组肠道微生物的相似性指数 (Similarity indice), 并根据每个条带的灰度值 (P_i), 分别计算每组的香农指数 H' (Shannon-Weiner index), 公式为 $H' = -\sum P_i \ln P_i$ ^[14]。

2 结果与分析

2.1 碳酸氢钠添加水平对蛋鸡肠道内容物和粪便 pH 的影响

由表 2 可知, 2.5% 和 5% 碳酸氢钠添加水平组的肌胃、十二指肠内容物及粪便的 pH 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 0.1% 和 0.5% 碳酸氢钠添加水平组则与对照组无显著差异。5% 碳酸氢钠添加水平组的空肠内容物 pH 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其余 3 组与对照无显著差异。回肠和盲肠内容物 pH 在 5 个处理组之间均无显著差异。

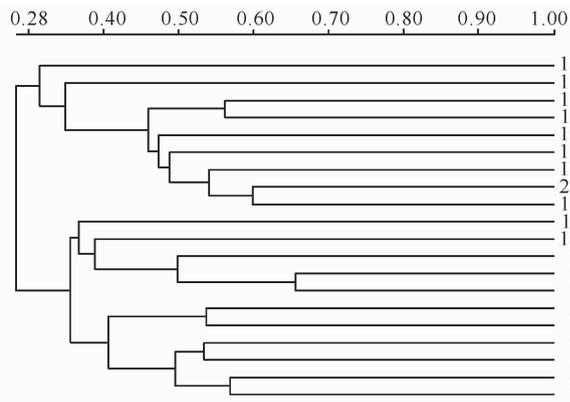
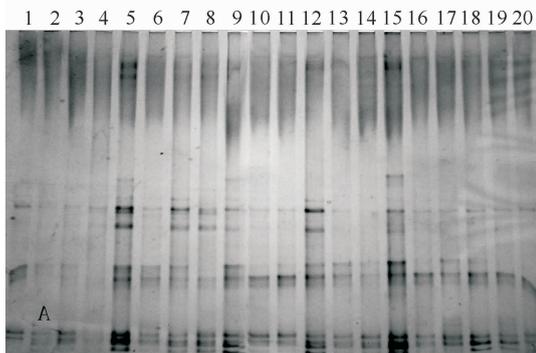
性和糜蛋白酶活性均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 0.1% 和 0.5% 碳酸氢钠添加水平组则与对照组无显著差异。

肠菌群 16S rDNA V₃ 区 PCR-DGGE 指纹图谱和聚类分析结果见图 1。由图 1(左)可知, 不同组蛋鸡回肠和盲肠微生物区系均存在共有条带和特异条带,

且在每组的 4 只鸡之间也存在大量特异条带。由聚类分析结果(图 1 右)可以看出,添加 2.5% 和 5% 碳酸氢钠组的回肠微生物与其他组聚为不同簇,添加

5% 碳酸氢钠组的盲肠微生物与其他组聚为不同簇。其他各碳酸氢钠添加水平组之间无明显的分类。

回肠内容物 Ileal content



盲肠内容物 Cecal content

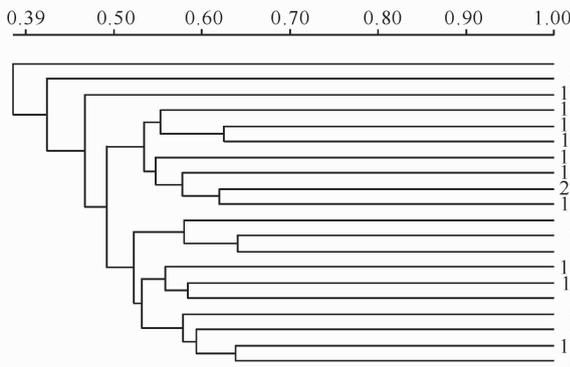


图 1 不同碳酸氢钠添加水平组蛋鸡回肠、盲肠微生物 16S rDNA V₃ 区的 PCR-DGGE 指纹图谱(左)和聚类分析(右)
1~4. 对照组;5~8,9~12,13~16,17~20. 分别为饲料中添加 0.1%,0.5%,2.5% 和 5% 碳酸氢钠组

Fig. 1 PCR-DGGE DNA profiles (Left) and dendrogram (Right) of the V₃ region of 16S rDNA of bacteria in ileal and cecal digesta of laying hens fed with diets containing different levels of sodium bicarbonate
1-4. Control group;5-8,9-12,13-16, and 17-20. Groups fed with diets supplemented with 0.1%,0.5%, 2.5% and 5% sodium bicarbonate, respectively

不同碳酸氢钠添加水平组蛋鸡回肠、盲肠菌群的

香农指数见图 2,不同组之间的相似性指数见图 3。

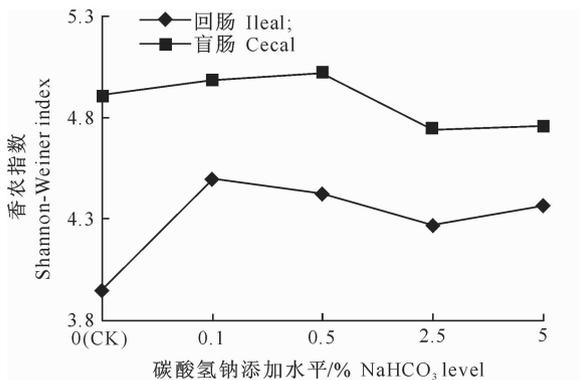


图 2 不同碳酸氢钠添加水平组蛋鸡肠道微生物的香农指数

Fig. 2 Shannon-Weiner index of intestinal microflora of laying hens fed with diets containing different levels of NaHCO₃

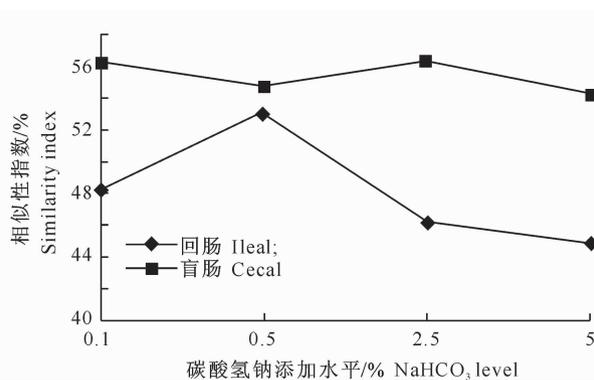


图 3 不同碳酸氢钠添加水平组蛋鸡肠道微生物与对照组的相似性指数比较

Fig. 3 Comparison of similarity index in intestinal microflora of laying hens fed with diets containing different levels of NaHCO₃ and the control

由图 2 可见,回肠的香农指数曲线波动大于盲肠,说明饲料中的碳酸氢钠对回肠菌群的影响大于盲肠;0.1%,0.5%,2.5%和 5%碳酸氢钠添加组回肠的香农指数均明显大于对照组。图 3 显示,各组与对照组的盲肠、回肠菌群相似性均不高,分布在 44%~56%,其中各组盲肠微生物与对照组的相似性指数均高于回肠,这说明饲料中碳酸氢钠对回肠微生物的作用大于对盲肠微生物的作用。各组间盲肠的对比中,以 5%碳酸氢钠添加组与对照组的相似性指数最低,为 54.17%;各组间回肠的对比中,2.5%,5%碳酸氢钠添加组与对照组的相似性指数较低,分别为 46.11%和 44.94%。

3 讨论

3.1 饲料中添加碳酸氢钠对蛋鸡肠道内容物及粪便 pH 的影响

动物肠道内容物的 pH 由很多相关因素共同决定^[15-18],其对动物的消化酶活性及肠道微生物的定殖都有重要作用^[5,19]。当饲料中加入碳酸氢钠时,由于碳酸氢钠呈弱碱性,有很强的缓冲能力,故其可在胃中中和胃酸,使胃中的 pH 上升。少量的碳酸氢钠在中和一定量的胃酸后,会刺激机体内的负反馈机制,促进胃酸分泌,使胃内 pH 基本保持不变。但大量的碳酸氢钠进入消化道后会中和大量胃酸,超过了负反馈机制的调节能力,故可使胃内 pH 升高,并且影响肠道 pH。

在本试验中,0.1%和 0.5%碳酸氢钠添加水平组的肌胃 pH 与对照组无显著差异,而 2.5%和 5%碳酸氢钠添加水平组的肌胃 pH 显著高于对照组。胃中流向十二指肠的盐酸会刺激促胰液素和胆囊收缩素,促使胰液和胆汁的分泌及排出,用以中和胃酸。相反,当大量盐酸被中和时,胰液和胆汁的分泌量也会减小^[17-18]。在本试验中,2.5%和 5%水平组的十二指肠 pH 虽仍显著高于对照组,但与对照组之间的差距已大幅度减小。碳酸氢钠进入肠道内是以离子形式被吸收的,故吸收较其他大分子快,吸收部位在肠道前段。本试验结果显示,5%碳酸氢钠添加水平组空肠 pH 显著高于对照组,其余 4 组与对照组无显著差异,而回肠和盲肠的 pH 各组间均无显著差异,说明饲料中过量的碳酸氢钠对肠道后段 pH 的影响较小。碳酸氢钠在小肠中被吸收后,迅速转移至血液中,参与体内的酸碱调节。当体内碱过剩时,机体可通过减小 HCO_3^- 在肾脏的重吸收来调节体内的酸碱平衡。因此,当过量的碳酸氢钠进

入体内后,会在肾脏聚集,通过尿液排出。对于家禽而言,粪尿是通过泄殖腔一起排出体外的,这可以解释本试验中“回肠和盲肠内容物的 pH 差异不显著,而粪便的 pH 却随着碳酸氢钠添加量加大而显著升高”的结果。

3.2 饲料中添加碳酸氢钠对蛋鸡肠道蛋白酶活性的影响

有报道显示,蛋鸡在热应激情况下对蛋白的利用率明显降低^[20],而碳酸氢钠通常作为一种抗热应激添加剂,其对蛋鸡蛋白质利用率的影响可能是其缓解热应激的机理之一。而蛋鸡肠道中的蛋白酶活性极大程度上决定了其对蛋白质的利用率,因此,研究饲料中的碳酸氢钠对蛋白酶活性的影响有重大意义。饲料中少量的碳酸氢钠可使胃液的分泌量增加,而胃液分泌量的增加可能是本试验中 0.1%碳酸氢钠添加水平组胃蛋白酶活性有上升趋势的原因。而当大量的碳酸氢钠进入胃中,食糜的 pH 改变量超出了机体的调节能力,直接降低了食糜中胃蛋白酶的活力。胃蛋白酶的适宜 pH 为 1~4^[21],从本试验肌胃中 pH 的测定结果来看,2.5%和 5%碳酸氢钠水平组的肌胃食糜 pH 已超出该范围,这可能是这 2 组胃蛋白酶活性显著低于对照组的主要原因。胰蛋白酶和糜蛋白酶的适宜 pH 为 6~9^[21],从本试验十二指肠 pH 的测定结果来看,各组均未超过该范围。但是肠道中过量的碳酸氢钠会影响胰液的分泌,可能导致胰脏分泌这 2 种酶的量下降,以致十二指肠食糜中这 2 种酶的浓度下降,故其活力下降。另外,胰蛋白酶和糜蛋白酶都是以酶原的形式分泌出来的,胰蛋白酶是自身和糜蛋白酶的活化剂^[21],当胰蛋白酶的量减少时,这 2 种酶的活化程度降低,这可能是 2.5%和 5%碳酸氢钠添加水平组胰蛋白酶和糜蛋白酶活性显著低于对照组的另一个原因。

3.3 饲料中添加碳酸氢钠对蛋鸡肠道微生物区系的影响

动物胃肠道内定殖的微生物及其发酵产物对动物的消化吸收、黏膜代谢及生理、局部和全身的免疫应答有着不可忽视的作用^[22]。而消化道后段作为肠道微生物的主要活动场所,其中的微生物菌群在整个肠道微生物菌群中发挥着主要作用。一般认为,酸性的肠道环境有利于共生微生物在动物体内定殖并抑制有害微生物在肠道内生长^[19],而消化道前段的酸碱度影响着消化道微生物从外界环境向动物体内的迁移^[23]。这可能是本试验中碳酸氢钠对

回肠菌群的作用效果比对盲肠菌群更明显的原因。此外,李永洙^[22]指出,饲料中的氨基酸含量对盲肠中的微生物菌群有显著影响。本试验中,由于饲料中过量的碳酸氢钠影响了小肠内蛋白酶的活性,故可能对肠道内容物中氨基酸的含量有所影响,这可能是本试验中碳酸氢钠高剂量组(2.5%和5%)的盲肠微生物与其他组产生差异的又一原因。另有研究指出,宿主的个体原因对肠道微生物的组成影响很大,即使是饲养于相同环境、饲喂相同饲料且相互接触的同龄肉鸡之间都会表现出不同的图谱^[23-24]。这可能是本试验各组间的相似性指数比较低的原因。另外,对 DGGE 结果中的特异性条带进行切胶回收并测序,可能会得到更有意义的结果,这有待后续研究。

[参考文献]

- [1] 周顺伍. 动物生物化学 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000:277-294.
Zhou S W. Biochemistry [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000:277-294. (in Chinese)
- [2] 叶远成, 张惠云. 电解质添加剂: 碳酸氢钠 [J]. 饲料工业, 1997, 18(9):19-21.
Ye Y C, Zhang H Y. Electrolyte additive: Sodium bicarbonate [J]. Feed Industry Magazine, 1997, 18(9):19-21. (in Chinese)
- [3] 田允波, 杨保和. 电解质添加剂和酸碱调节剂: 碳酸氢钠 [J]. 黑龙江畜牧科技, 1997(2):34-35.
Tian Y B, Yang B H. Electrolyte additive and acid-base regulator: Sodium bicarbonate [J]. Heilongjiang Journal of Animal Science and Technology, 1997(2):34-35. (in Chinese)
- [4] Koutsos E A, Arias V J. Intestinal ecology: Interactions among the gastrointestinal tract, nutrition, and the microflora [J]. The Journal of Applied Poultry Research, 2006, 15:161-173.
- [5] 梅学文, 陈宝江, 于会民, 等. 产蛋高峰期蛋鸡消化参数变化规律的研究 [J]. 中国家禽, 2009, 31(23):26-29.
Mei X W, Chen B J, Yu H M, et al. Study on the gastrointestinal parameters of laying hens in peak stage [J]. China Poultry, 2009, 31(23):26-29. (in Chinese)
- [6] Yoruk M A, Gul M, Hayirli A, et al. Laying performance and egg quality of hens supplemented with sodium bicarbonate during the late laying period [J]. International Journal of Poultry Science, 2004, 3(4):272-278.
- [7] Howes J R. Eggshell quality as affected by the addition of bicarbonate to the feed and water [J]. Poultry Science, 1966, 45:1092.
- [8] Balnave D, Muheereza S K. Improving eggshell quality at high temperatures with dietary sodium bicarbonate [J]. Poultry Science, 1997, 76:588-593.
- [9] Anthony P. Sodium bicarbonate reduces gizzard erosion in broilers [J]. Feedstuff, 1988, 6:14, 49.
- [10] Bergmeyer H U. Methods of enzymatic analysis [M]. 2nd ed. New York: Academic Press, 1974:1009-1057.
- [11] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62:316-322.
- [12] 王岳坤, 洪 葵. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V₃ 片段 PCR 产物的 DGGE 分析 [J]. 微生物学报, 2005, 42(2):201-204.
Wang Y K, Hong K. Mangrove soil community analysis using DGGE of 16S rDNA V₃ fragment polymerase chain reaction products [J]. Acta Microbiology Sinica, 2005, 42(2):201-204. (in Chinese)
- [13] Gerard M, Kornelia S. Application of denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis(TGGE) in microbial ecology [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73:127-141.
- [14] Keylock C J. Simpson diversity and the Shannon-Weiner index as special cases of a generalized entropy [J]. Oikos, 2005, 109(1):203-207.
- [15] 樊红平, 侯水生, 黄 苇, 等. 鸡、鸭消化道 pH 和消化酶活的比较研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(10):1009-1015.
Fan H P, Hou S S, Huang W, et al. Comparative study of the pH in digestive tract and digestive enzyme between cock and drake [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2006, 37(10):1009-1015. (in Chinese)
- [16] Burhol P G. Regulation of gastric secretion in the chicken [J]. Sand J Gastroenterol, 1982, 17:321-323.
- [17] 周 芬, 丁月云, 张莉莉, 等. 胰腺外分泌的功能及影响因素 [J]. 饲料研究, 2008(8):28-30.
Zhou F, Ding Y Y, Zhang L L, et al. The function and influential factors of pancreatic exocrine secretion [J]. Feed Research, 2008(8):28-30. (in Chinese)
- [18] 李新平, 欧阳克清, 蔡绍哲. 胆汁分泌与排出的调节 [J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(9):1066-1070.
Li X P, Ouyang K Q, Cai S X. Regulation of secretion of bile [J]. World Chin J Digestol, 2001, 9(9):1066-1070. (in Chinese)
- [19] 刘蓓一, 徐 恒, 王志跃. 家禽胃肠道微生物区系与营养的相互关系 [J]. 饲料广角, 2008(1):15-18.
Liu B Y, Xu H, Wang Z Y. The relationship between gastrointestinal microflora and nutrition in poultry [J]. China Feed, 2008(1):15-18. (in Chinese)
- [20] Grossu D, Iliescu M, Lofciu D. Efficiency of dietary energy utilisation in hens under thermal stress [J]. EAAP, 2000, 58:420-424.
- [21] 樊红平. 鸡鸭对饲料养分消化作用的比较研究 [D]. 北京: 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 2003.
Fan H P. Comparative study of the digestion of feed nutrients between cockerel and drake [D]. Beijing: Institute of Animal Science of CAAS, 2003. (in Chinese)
- [22] 李永洙. 氨基酸对蛋鸡生产性能及盲肠微生物菌群结构的影响 [J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(2):108-116.

- Li Y Z. Effect of amino acids supplementation in low protein feed on the performance and cecal microflora structure of laying hens [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2012, 17(2): 108-116. (in Chinese)
- [23] 胡平, 施寿荣, 王志跃, 等. 采用变性梯度凝胶电泳技术研究不同形态玉米日粮对鹅肠道微生物区系的影响 [J]. *动物营养学报*, 2010, 22(1): 169-175.
Hu P, Shi S R, Wang Z Y, et al. Effects of different corn diet forms on intestinal microflora of geese by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(1): 169-175. (in Chinese)
- [24] 倪学勤, Joshua G, Hai Y, 等. 采用 PCR-DGGE 技术分析蛋鸡肠道细菌种群结构及多样性 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(7): 955-961.
Ni X Q, Joshua G, Hai Y, et al. The bacterial community and diversity in the layer gastrointestinal tract: From crop to cecum analyzed by PCR-DGGE [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(7): 955-961. (in Chinese)

(上接第 32 页)

- [15] 赵静梅, 杨旭辉, 王广占, 等. 补肾解毒活血法对骨髓抑制小鼠造血功能的影响 [J]. *环球中医药*, 2012, 5(1): 12-15.
Zhao J M, Yang X H, Wang G Z, et al. Influence of Bushen Jiedu Huoxue Recipe on the blood-producing function in mice of myelosuppression [J]. *Global Traditional Chinese Medicine*, 2012, 5(1): 12-15. (in Chinese)
- [16] 罗晓丽, 杨侃, 孙明. 黄芪扶正汤对免疫抑制小鼠的免疫调节功能 [J]. *中南大学学报: 医学版*, 2009, 34(6): 555-558.
Luo X L, Yang K, Sun M. Immunoregulatory effect of Huanqi Fuzhengtang on immunosuppressive mice [J]. *Journal of Centre South University: Medicine Science*, 2009, 34(6): 555-558. (in Chinese)
- [17] 赵连梅, 纪昕, 潘晓明, 等. 淫羊藿苷(ICA)对化疗免疫抑制小鼠的免疫促进作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2009, 25(12): 1092-1095, 1099.
Zhao L M, Ji X, Pan X M, et al. Immunoenhancement effect of ICA on the mouse model of Cy-induced hypimmunity [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2009, 25(12): 1092-1095, 1099. (in Chinese)
- [18] 崔治中, 崔保安. 兽医免疫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 43.
Cui Z Z, Cui B A. *Veterinary immunology* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004: 43. (in Chinese)