

分类号

密级



华中农业大学  
HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# 学士学位论文

## BACHELOR'S THESIS

百里香酚-甲酸复合乳剂对蛋鸡生产性能和肠道功能的影响

Effects of Thymol - Formic Acid Compound Emulsion on  
Performance and Intestinal Function of Laying Hens

姓 名: 于欣弘  
NAME: YUXINHONG

学 号: 2017304220224  
STUDENT NO.:

专 业: 生物技术（国家生命科学与技术人才培养基地）  
MAJOR: BIOTECHNOLOGY (NATIONAL TRAINING BASE  
FOR LIFE SCIENCE AND TECHNOLOGY TALENTS)

导 师: 黄飞若 教授  
SUPERVISOR: PROFESSOR HUANG FEIRUO

中国 武汉  
WUHAN, CHINA

二〇二一年六 月  
JUNE, 2021

分类号

密级

# 华中农业大学学士学位论文

## 百里香酚-甲酸复合乳剂对蛋鸡生产性能和肠道功能的影响

### Effects of Thymol - Formic Acid Compound Emulsion on Performance and Intestinal Function of Laying Hens

姓 名：于欣弘

学 号：2017304220224

专 业 班 级：生物技术 1701

学 位 类 型：理学学士学位

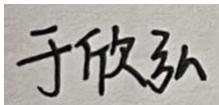
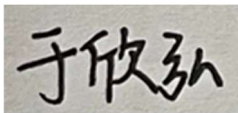
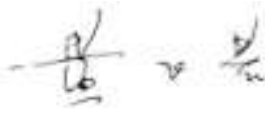
指 导 教 师：黄飞若 教授

华中农业大学生命科学技术学院

中国·武汉



# 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
<div style="text-align: center;"><b>独创性声明</b></div> <p>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。</p> <p>签 名：  时间： 2021 年 5 月 25 日</p>			
<div style="text-align: center;"><b>学位论文使用授权书</b></div> <p>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；学校有权保存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。</p> <p>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。</p> <p>学位论文作者签名：  导师签名： </p> <p>签名日期： 2021 年 5 月 25 日 签名日期： 2021 年 5 月 25 日</p>			

注：请将本表直接装订在学位论文的扉页和目录之间

## 目录

摘 要 .....	i
Abstract.....	ii
缩略语表 .....	iii
1 前言 .....	1
2 植物精油的应用研究 .....	2
2.1 植物精油的抗菌机理 .....	3
2.2 植物精油在蛋鸡中的应用 .....	3
2.3 百里香酚及其生理作用 .....	3
3 有机酸的应用研究 .....	4
3.1 有机酸的作用机理 .....	4
3.2 有机酸在畜禽方面的应用 .....	4
3.3 常用有机酸——甲酸 .....	5
4 植物精油和有机酸的协同使用 .....	5
5 复合乳剂及其在畜禽上的应用 .....	6
6 研究的目的意义 .....	6
2 材料与方法 .....	7
2.1 实验材料 .....	7
2.2 实验仪器与试剂耗材 .....	7
2.3 试验动物与试验设计 .....	7
2.4 试验日粮与饲养管理 .....	8
2.5 样品采集与指标测定 .....	9
2.5.1 生产性能 .....	9
2.5.2 鸡蛋品质 .....	9
2.5.3 血清生化指标 .....	9
2.5.4 肠道紧密连接蛋白及肠道形态结构 .....	9
2.5.5 16S rRNA 测序检测肠道微生物区系 .....	10
2.5.6 数据处理与统计分析 .....	10
3 结果与分析 .....	10

3.1 饮水添加复合乳剂对蛋鸡生产性能的影响 .....	10
3.2 饮水添加复合乳剂对鸡蛋品质的影响 .....	11
3.3 饮水添加复合乳剂对蛋鸡血液生化指标的影响 .....	11
3.4 饮水添加复合乳剂对蛋鸡肠道形态和紧密连接蛋白的影响 .....	12
3.5 饮水添加复合乳剂对蛋鸡肠道微生物区系的影响 .....	14
4 讨论 .....	16
4.1 饮水添加复合乳剂对蛋鸡生产性能的影响 .....	16
4.2 饮水添加复合乳剂对蛋鸡蛋品质的影响 .....	16
4.3 饮水添加复合乳剂对蛋鸡血液生化指标的影响 .....	17
4.4 饮水添加复合乳剂对蛋鸡肠道形态和肠道屏障的影响 .....	17
4.5 饮水添加复合乳剂对蛋鸡肠道微生物区系的影响 .....	18
5 小结 .....	19
参考文献 .....	20
附录 .....	26
致谢 .....	26

## 摘 要

蛋鸡的肠道健康问题会导致蛋品质和产蛋率下降,是蛋鸡行业关注的热点问题。在饲料中添加植物精油和有机酸被报道有助于改善蛋鸡肠道健康,并提高蛋品质和产蛋率,但在蛋鸡饮水中添加植物精油和有机酸的作用未见报道。在这项研究中,通过使用聚乙二醇 40 (PEG 40) 和黄原胶将百里香酚和甲酸制成复合乳剂,随后将其作为饮用水添加剂,通过动物试验研究其对蛋鸡蛋品质和肠道健康等影响。试验将选用健康、体况相近的 33 周龄海兰褐蛋鸡,随机分为 4 组,每个组 10 个重复,每个重复 50 羽。其中,对照组 (CON) 不添加,其它试验组分别在饮水中添加 0.2 mL / L (LOW), 0.4 mL / L (MID) 和 0.6 mL / L (HIGH) 饮用水中的复合乳液。经过 60 天的试验后,每组随机收集鸡蛋、肠组织和盲肠内容物等样本进行分析。结果表明:复合乳剂能够显著提高蛋鸡的生产性能和蛋品质 ( $P < 0.05$ );减轻蛋鸡的炎症反应 ( $P < 0.05$ );增强肠道屏障功能并改善肠道形态 ( $P < 0.05$ );抑制大肠杆菌在内的有害菌生长,促进乳酸杆菌在内的有益菌的生长。综上,本实验使用的百里香酚-甲酸复合乳剂能作为一种有效的蛋鸡饮水添加剂使用,并且在本实验中的饮水最适添加量为 0.4 mL/L。

**关键词:** 复合乳剂; 蛋鸡; 蛋品质; 肠道健康; 肠道菌群

## Abstract

The intestinal health problems of laying hens will lead to the decline of egg quality and laying rate, which is a hot issue in industry of laying hens. The addition of plant essential oils and organic acids in feed has been reported to help improve the intestinal health of laying hens, and enhance egg quality and laying rate. However, the effect of the supplementation of plant essential oils and organic acids in the drinking water of laying hens has not been reported. In this study, thymol and formic acid were made into a composite emulsion by using polyethylene glycol 40 (PEG 40) and xanthan gum, which was then used as a drinking water additive, and research the effects of the egg quality and intestinal health of laying hens, etc, through animal experiments. In this experiment, healthy 33-week-old Hy-Line brown laying hens with similar body condition were randomly divided into 4 groups with 10 replicates per group and 50 hens per replicate. Among them, the control group (CON) was not added, and the other experimental groups were respectively added 0.2 mL/L (LOW), 0.4 mL/L (MID) and 0.6 mL/L (HIGH) composite emulsion in drinking water. After 60 days of testing, samples of eggs, intestinal tissue, and cecal contents were randomly collected from each group for analysis. The results suggested that: composite emulsion could significantly improve the performance and egg quality of laying hens ( $P < 0.05$ ); alleviate the inflammatory response of laying hens ( $P < 0.05$ ); strengthen intestinal barrier function and improve intestinal morphology ( $P < 0.05$ ); inhibit the growth of harmful bacteria including *Escherichia coli*, and promote the growth of harmful bacteria including *Lactobacillus*. In conclusion, the compound emulsion of thymol and formic acid used in this study can be used as an effective drinking water additive for laying hens, and the optimal amount of drinking water added in this study is 0.4 mL/L.

**Key words:** Compound emulsion; Layer hens; Egg quality; Intestinal health; Intestinal flora



缩略语表

(Abbreviation)

缩写 Abbr.	英文名称 English name	中文名称 Chinese name
ADFI	Average daily feed intake	平均日采食量
ADEW	Average daily egg weight	平均日蛋重
AH	Albumen height	蛋白高度
CD	Crypt depth	隐窝深度
ESS	Egg shell strength	蛋壳强度
EST	Egg shell thickness	蛋壳厚度
F/E	Feed to egg ratio	料蛋比
H&E	Hematoxylin and eosin	HE 染色
HU	Haugh unit	哈氏单位
Ig	Immunoglobulin	免疫球蛋白
IL	Interleukin	白介素
PEO	Plant essential oil	植物精油
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$	肿瘤坏死因子- $\alpha$
V/C	The villus height to crypt depth ratio	绒毛高度/隐窝深度
VH	Villus height	绒毛高度
YC	Yolk color	蛋黄颜色
ZO-1	Zonula occludens protein-1	紧密连接蛋白



# 1 前言

自上世纪 80 年代起我国已成为世界上第一的蛋鸡产业大国,蛋鸡养殖业及相关产业快速发展起来,而随着我国人民物质生活水平的进一步提高,对蛋品质和蛋鸡产蛋率也提出了更高的要求(赵一夫等 2010)。尽管先进科学技术的广泛普及和应用,推动着我国蛋鸡产业不断朝着规模化、专业化和生产自动化的方向前进和发展。然而,我国的蛋鸡行业目前还面临一些问题,例如蛋鸡肠道疾病普遍存在且难以防控,导致对蛋鸡产品质量造成影响,降低经济效益等。因此,蛋鸡产业的发展还面临着一系列挑战(王桢和周献民 2012)。

目前,我国蛋鸡养殖规模不断扩大,但是行业的生产效率并未跟紧发展规模的步伐,其很大原因是受到蛋鸡疾病问题频发的影响(赵宝华 2009)。由于肠道健康直接影响蛋鸡的健康以及蛋品质,因此,近年来人们更多聚焦于如何通过科学手段解决蛋鸡肠道健康问题(Chen et al 2020)。肠道健康很大程度依赖于肠道菌群的平衡,这有利于构建稳定的肠道微生态环境,从而对于蛋鸡抵御外界刺激与提高产品质量产生积极意义(Khan et al 2020)。在目前所提倡的集约化养殖条件下,水塔-水箱-饮水乳头的供水模式被大量应用于蛋鸡养殖场,但养殖户对饮水质量的重视程度较低,导致鸡场的输水管线卫生问题严重:水管内壁长时间被有机污染物附着,不仅堵塞管道,使蛋鸡饮水不足,更为大肠杆菌、沙门氏菌等病原微生物提供了繁殖的温床,对饮用水造成二次污染(曹云芳 2018)。这是影响蛋鸡肠道健康的重大难题之一,以往通过在蛋鸡饲料中预防性使用抗生素能够有效解决这一难题,并且达到促进生长、降低料蛋比和减少肠道疾病发生的效果。然而,抗生素的滥用导致大量耐药细菌产生,而耐药细菌会通过食物链传播和扩散。早在 2006 年,欧盟率先提出严禁在畜禽饲料中使用抗生素。而 2020 年,我国农业农村部也规定,畜禽饲料中不得添加抗生素,这一规定无疑为给蛋鸡养殖业带来了新的挑战。所以,从学术研究和商业开发的角度来看,开发出能改善动物健康和提高生产效益的饲料添加剂,来作为抗生素的有效替代品,是如今迫切需要解决的头号问题(陈琳和 Marie-LaurenceLeRay 2015)。

目前,为了寻找有效的抗生素替代品,一大批新型饲料添加剂进入了学者们的研究视野,包括复合酶制剂、益生菌制剂、草药、植物香料在内,其中大部分已投入到实际生产中(李鹏和齐广海 2007)。作为开创中医文化的华夏大国,草药、植物

香料的有益作用自古以来就已经被人们认识，它们的特性也在食品和实验动物中得到了报道。而在长期的研究过程中，其主要的有效活性成分——植物精油（PEO）和有机酸也被研究者们发现，更因为其安全无害、无残留、抗菌效果好等特点成为后抗生素时代的研究热点。

Kohlert 等(2000)研究发现 PEO 中各种生物活性物质经口、肺或皮肤给药后很快被吸收，其中大多数物质经过新陈代谢后，或以葡萄糖醛酸酯的形式由肾脏排出，或以二氧化碳的形式呼出，证明了 PEO 能在机体内被快速清除和半衰期短的特性，因此 PEO 相比于抗生素不会在体内积聚产生残留。有机酸的抗菌抑菌特性能帮助改善肠道健康，减少消化系统疾病，提高生产性能。而体外抑菌试验表明，PEO 和柠檬酸混合后，能够发挥更佳的抑菌作用(张浩然 et al 2018)。Lalles 等(2009)研究发现在植物精油中添加丁酸可以增强精油的抗菌作用。Aksit 等(2006)报道，在鸡饲料中添加 PEO 和有机酸比单独添加能更好地改善生产性能和产品质量。这些研究表明，PEO 和有机酸在实际应用中存在良好的协同作用，将两者联用效果更佳。但在实际生产过程中，为了保证 PEO 和有机酸在饲料中能够混合均匀，需要对其进行复杂的处理，例如微胶囊化等(Xiao et al 2014)。这不仅会导致饲料生产成本上升，而且长期添加 PEO 和有机酸容易导致饲料板结，这是困扰蛋鸡养殖业的一个难题。值得注意的是，目前为止未见直接向饮水中添加 PEO 和有机酸的研究报道。因此，研究 PEO 和有机酸的饮水添加具有实际意义。由于两者难溶于水，因此如何将它们均匀地添加到饮水中一直是一个复杂的问题，而复合乳液的出现可以很好地解决这个问题。复合乳液是指通过乳化剂的作用使用水不溶性原料在水中形成非常小的水溶性液滴(Ozturk and McClements 2016)。尽管 PEO 和有机酸在水中不相容，但乳化剂和增稠剂可用于将这两种组分制成稳定的复合乳液，从而确保两者能在饮水中均匀分布并稳定存在。因此，在本试验中，将制好的百里香酚精油-甲酸复合乳剂添加到蛋鸡饮水中，旨在研究其对蛋鸡的生产性能指标、肠道形态以及微生物区系的影响，并通过动物实验进行效果验证，以期为蛋鸡生产实践中的应用提供科学参考。

## 2 植物精油的应用研究

PEO 是一类芳香族挥发性油状液体，是由植物叶和茎中的特殊细胞或细胞群分泌形成，通常通过蒸馏、萃取等方法提取。在过去的 30 年里，除了它们的传统用途外，实验研究还证明 PEO 具有生物活性，包括对脂质代谢的有益影响、促进消化的

能力、抗菌、抗炎和抗氧化性能以及氨氮控制作用等，因此其被广泛应用于多种领域。

## 2.1 植物精油的抗菌机理

PEO 及其成分的一个重要特征是疏水性，这一特性决定其能够对细菌细胞膜上的脂质进行溶解，损伤细菌细胞结构，使其更具渗透性；另外，PEO 中的活性成分能够改变细菌质膜的通透性，影响其正常的生命活动，从而起到抗菌效果(Xu et al 2008)。研究发现，PEO 中的活性成分还能够渗透到细菌胞内，引起载体蛋白  $H^+$  和  $K^+$  离子的运输发生变化，导致细菌生命活动受损(Bölükbaşı and Erhan 2007)。大多数 PEO 对 G-菌的杀伤效果更强，这与其细胞壁的厚度有关。

## 2.2 植物精油在蛋鸡中的应用

近些年来，PEO 作为潜在的动物生长性能调节剂受到了越来越多的关注。与常用的抗生素相比，PEO 具有无残留的优势，而且它们在食品工业中被普遍认为是来源安全和常用的添加剂，因此也逐渐被广泛应用于养殖业。而在蛋鸡养殖中，PEO 因为其具有独特的风味和抗菌特性，可以通过增加采食量、改善蛋鸡肠道健康来提高蛋鸡的生产效益。PEO 还具有良好的抗氧化效果，其原因在于百里香酚的 OH 基团在脂质氧化过程中具有过氧化氢自由基的供体的作用，从而阻碍了过氧化氢的形成。Çabuk 等(2006)研究表明，饲料添加 PEO 能调控蛋鸡生产，混合精油显著提高夏季母鸡的产蛋率，而对其采食量没有负面影响。Bozkurt 等(2012)报道，饲料添加 24mg/kg 混合精油提高了罗曼褐壳蛋鸡的产蛋量和鸡蛋重量。Ma 等(2013)研究表明，添加含百里香油、牛至油、大蒜油、茴香油的混合精油能显著改善蛋品质。

## 2.3 百里香酚及其生理作用

许多研究表明，抗菌效果最好的 PEO 大多数为酚类化合物，如香芹酚和百里香酚等(Didry et al 1993)。百里香酚是一种通过 FDA 认证的天然单萜酚类化合物，有效性主要归因于其化学结构中的酚羟基。由于其良好的抗氧化性，抗菌功能和抗炎特性，已在动物生产中使用了多年，广泛的应用及研究已证实了其作为添加剂的安全性和可靠性。百里香酚在进入动物机体后，一方面能够清除 ROS 和自由基，以维持正常的细胞功能和信号通路；另一方面能降低炎症因子的表达，减轻肠道炎症反应。此外，许多研究都已经报道过其抗菌特性，尤其是对常见有害菌的抑制效果明显(Zarrini et al 2010)。有证据表明，在蛋鸡饲料中添加百里香酚后生成了丙二醛，

能够降低冷藏蛋黄中的脂质氧化，从而延长储存时间，减少或消除额外的氧化稳定成本(Abdel-Wareth 2016)。此外，在蛋鸡日粮中添加百里香酚后，蛋鸡的生产性能和抗氧化指标得到了显著改善(宫榕，2015)。

### 3 有机酸的应用研究

有机酸是一种具有酸的属性的含碳有机化合物总称，在自然界中通常作为植物或动物组织的正常组分存在，主要包括脂肪酸、羧酸和弱酸等。有机酸分布广泛，大多数的有机酸是由大肠中的微生物发酵产生，部分以结合钠、钾或钙的形式存在。作为公认的抗菌剂，许多不同种类的有机酸已被用作饲料添加剂使用。有机酸的效果不仅体现在能够限制饲料基质中病原体的生长繁殖，还能参与代谢反应、调节动物肠道微生物平衡等。

#### 3.1 有机酸的作用机理

目前，畜牧行业常用的有机酸主要有甲酸、乙酸和乳酸等。有机酸的特殊香味不仅能提高畜禽进食欲，刺激畜禽唾液腺的分泌；还能降低饲料的缓冲值，提高营养物质的消化吸收。此外，相较于无机酸，有机酸的一大优势在于，有机酸本身就能直接或者间接的参与三羧酸循环，从而起到为机体供能的效果(Abd El-Hakim et al 2009)。

有机酸发挥杀菌效果的方式为(Cherrington et al 1991)：质子化形式的有机酸能够穿透细菌的细胞壁，而另一部分有机酸能够在细菌细胞内游离为非质子化形式，降低胞内 pH 值引起了胞内环境应激，导致细胞功能障碍，影响细菌的正常生长，对 pH 敏感的细菌种类效果尤佳。解离细菌内容物，抑制糖酵解等必要的代谢反应，从而抑制细菌生长，尤其是对于大肠杆菌、沙门氏菌、产气荚膜梭菌等抑制效果甚佳。另一方面，有机酸中不能以其解离形式扩散出细菌的阴离子部分，将在细菌内积累并破坏许多代谢功能，并导致渗透压升高，最终导致细菌死亡。

#### 3.2 有机酸在畜禽方面的应用

有机酸作为一种发展成熟的饲料添加剂，有较好的促生长作用，能提高养殖经济效益，因此在蛋鸡养殖中使用广泛。Yesilbag 等(2006)研究表明，在蛋鸡饲料中添加有机酸，能够提高蛋鸡生产性能、改善蛋品质。Kaya 等(2015)发现饲料添加有机酸能够改善蛋鸡的肠道形态结构。此外，有机酸的特殊香味还会刺激蛋鸡的采食欲。Soltan(2008)研究表明，饲料添加有机酸提高了蛋鸡采食量，并显著提高蛋鸡生产性

能。Grashorn 等(2013)报道, 在蛋鸡日粮中添加有机酸, 提高了矿物质等营养物质的消化吸收率。

在目前集约化养殖的条件下, 水塔-水箱-饮水乳头的供水模式是相当普遍的, 养殖户往往把重心放在饲料, 却忽视了饮水问题。沈美艳等(2018)研究表明种鸡场源头水在经过输水管线的运输后受到严重的污染, 终端水的菌落数明显升高。而葛中东(2016)的肉鸡饮水试验表明, 饮用水酸化后中细菌数量较对照组少, 且在饮用水酸化期间水中未检测出大肠杆菌超标。故酸化饮水可以明显改善由输水管线二次污染引起的饮用水菌群超标这一现象, 证明了饮水添加酸化剂的可行性。

### 3.3 常用有机酸——甲酸

甲酸( $\text{HCOOH}$ )作为被广泛研究和应用的几种有机酸之一, 是脂肪族一元酸中相对分子质量最小的一种, 其具有良好的水溶性和刺激性酸香味。在家禽饲料中添加甲酸的目的, 往往是为了抑制饲料中的沙门氏菌和其他食源性病原体生长, 以及食用后可能出现在胃肠道中的其它致病物质(Thompson and Hinton 1997)。甲酸对肠道中食源性病原体具有抑制作用的机理是: 其解离出的  $\text{H}^+$  大量进入病原体细胞内, 破坏病原体原先的酸碱平衡, 并影响正常的代谢活动最终使细胞裂解。另外, 甲酸的脂溶性性质还能使细菌的胞质膜受到溶解破坏, 从而使细菌正常生长繁殖受阻以及死亡。Humphrey 等(1988)通过在蛋鸡饲料中添加甲酸, 来解决蛋鸡沙门氏菌感染的问题; Abbas 等(2013)等则在饮水中添加甲酸, 发现蛋鸡生产性能及蛋品质都有了明显的改善。以上研究结果充分体现了甲酸在蛋鸡生产应用中的重要性和有效性。

## 4 植物精油和有机酸的协同使用

随着对饲料添加剂对宿主和食源性病原体的功效和影响的研究越来越深入, 目前已经开发了多种具有促生长及调节肠道菌群的饲料添加剂, 如益生菌、酸化剂、PEO、酶制剂等。以往大量的研究表明, 合理联合使用植物精油和酸化剂能够表现出协同作用, 对动物具有明显的促生长效果。Aksit 等(2006)研究表明, 牛至精油和有机酸均能减少肉鸡肠道中致病菌的数量, 而二者联用则更能对肉鸡的生长产生有益的影响。Lalles 等(2009)研究表明, 在植物精油中添加丁酸能够提高了 PEO 的抗菌效果。Yang 等(2019)将 PEO 和有机酸微胶囊化, 减少了蛋鸡致病菌数量, 消化酶活性有所提高。然而, 将两者经过处理后联合添加到饲料中, 也会带来饲料成本升

高、保质期缩短等弊端。

## 5 复合乳剂及其在畜禽上的应用

复合乳剂定义为两种及以上不相混溶的液体的混合，其中一相(分散相或内相)液滴被封装在另一相的薄膜中(连续相或外部相)。复合乳剂有两种基本形式：第一种是水包油型，油滴分散并封装在水柱内。第二种是油包水型，水滴被分散并包裹在油中。复合乳剂具有水溶性、增加水解物质稳定性和提高物质吸收率等诸多优点，因此具有广阔的发展和应用前景。过去，复合乳剂只在农药加工方面应用广泛，而随着时间的推移，目前在畜禽养殖行业也逐渐得到广泛应用。鉴于复合乳剂具有低刺激和稳定等独特优势，以复合乳剂为载体使溶解性不佳或需延时释放的药物得以应用。例如禽流感油乳剂疫苗等诸多复合乳剂疫苗，已经成为畜禽养殖行业必不可少的常用药物。然而在饲用添加剂方面，尤其是作为饮水添加剂使用，目前还鲜有相关报道。

## 6 研究的目的意义

近年来，我国蛋鸡养殖不断趋向于集约化和规模化，蛋鸡的肠道健康问题越来越受到研究者的关注。而过去用于预防性治疗蛋鸡肠道疾病的抗生素，在全球范围内已被大规模禁用。因此，寻找抗生素的潜在替代品势在必行。众多研究展现了植物精油和有机酸强大的协同抗菌和抑菌特性，在提高畜牧行业生产效益方面具有潜在价值。但两者在饲料中添加面临着一系列问题，如缩短饲料保质期、提高饲料生产成本等，而将两者制成复合乳剂应用于饮水中，能消除其在饲料中添加的弊端。因此，本研究通过将二者复配制成的复合乳剂添加至蛋鸡饮水中，探究其对蛋鸡肠道形态功能、生产性能、产品品质以及肠道菌群的影响，以期能为复合乳剂在蛋鸡养殖中的实际应用提供科学参考。



## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

本实验使用的百里香酚-甲酸复合乳剂为实验室前期开发完成的成品，其主要成分及具体配比详见表 1。百里香酚精油（食品级）购自吉安市荣盛植物有限公司，有效含量为 99%以上；PEG-40（食品级）购自广东省高良科技有限公司；甘油购自广州市畅宏化工有限公司，有效含量为 99.7%；黄原胶（食品级）购自广州市畅宏化工有限公司，有效含量为 99%以上。

表 1 百里香酚-甲酸复合乳剂组成成分表

主要成分	含量，%
dd H <sub>2</sub> O	64.73
PEG 40	15.00
百里香酚	10.00
甲酸	4.26
甘油	1.00
黄原胶	0.01
合计	100.00

### 2.2 实验仪器与试剂耗材

主要仪器：蛋品质测定仪(EMT-7300, Robotmation)，电泳仪(PP-1105, CAVOY)，扫描仪（L4158, EPSON），生物显微镜（Axio Scope A1, Zeiss），Miseq 测序仪（Illumina, USA）等常用仪器设备。

主要试剂耗材：RIPA lysis buffer（Upstate; Temecula, CA），磷酸酶抑制剂（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO），蛋白印迹膜再生液（Pierce, Rockford, IL）及常用检测试剂盒等。

### 2.3 试验动物与试验设计

选取 2000 只生长状况相近的 33 周龄海兰褐蛋鸡，随机分为 4 组，每组 10 个重复，每个重复 50 只。预试验 7d 后，开始正式试验，试验期 60d。对照组饮水不做处理，试验组从试验第一天起饮水添加复合水乳剂，直至试验结束。试验处理如表 1。为了避免不同时间、地点及水源差异对水乳剂制作产生影响，在试验开始时，由

本实验室师兄将整个饲养试验饮水添加所需水乳剂一次性制备完毕，随后带至养殖场。

表 1 试验处理

Table1. Arrangements of experimental treatments

处理	饮水添加量
A 组	基础饮水
B 组	基础饮水+0.2 mL/L 复合乳剂
C 组	基础饮水+0.4 mL/L 复合乳剂
D 组	基础饮水+0.6 mL/L 复合乳剂

## 2.4 试验日粮与饲养管理

所有蛋鸡饲养于湖北省荆门市沙洋县伟伟养殖场，四个组分别饲养于四栋鸡舍，鸡舍条件均一致并正常通风。此外，每栋鸡舍都配备了 1000 升的手动储水箱，按表 1-1 所示对饮用水进行处理，为蛋鸡提供饮用水。为了确保将复合乳液均匀混合在饮用水中并且达到所需浓度，储水箱配备了搅拌器进行搅拌，并在搅拌完成后，使用 WYT-15 乳液浓度计进行浓度检测。每当饮用水即将耗尽的时候，储水箱将被手动填充与之前完全相同的饮用水。每组生产管理措施一致，蛋鸡均饲喂相同的饲料，自由采食和饮水，每天光照 16h（上午 6:00 开灯，晚上 22:00 关灯），舍内温度控制在 18-25℃，每天 08:00 捡蛋。试验期间饲喂的基础饲料配方详见表 1-2。

表 2 基础饲料组成及营养水平

Table 2 Composition and nutrient levels of the basal diet

原料	含量，%	营养水平 Nutrient levels	
玉米 Corn	64.66	代谢能 ME (MJ/kg)	11.42
豆粕 Soybean meal	20.80	粗蛋白 CP,%	16.79
花生粕 Peanut meal	3.00	钙 Ca,%	3.08
玉米蛋白粉 Corn gluten powder	2.00	可利用磷 AP,%	0.35
大豆油 Soybean oil	0.17	赖氨酸 Lys,%	0.86
石粉 Limestone	8.00	蛋氨酸 Met,%	0.34
磷酸氢钙 CaHPO <sub>4</sub>	0.80	蛋氨酸+胱氨酸 Met + Cys,%	0.66
食盐 NaCl	0.20	苏氨酸 Thr,%	0.79

氯化胆碱 Choline chloride	0.10
植酸酶 Phytase	0.05
矿物质预混料 Mineral premix	0.20
维生素预混料 Vitamin premix	0.02
合计 Total	100.00

## 2.5 样品采集与指标测定

### 2.5.1 生产性能

试验正式开始后，每天同一时间记录每栋鸡舍的产蛋总数和总重量；每周于固定时间，统计一次耗料量和耗水量。

计算系列生产性能指标，具体计算公式如下：

日产蛋重 Daily Egg Weight(g/d)=平均每日总蛋重 / 鸡数；

平均蛋重 Average Egg Weight(g / egg)=平均每日总蛋重 / 总蛋数；

平均日采食量 Average Daily Feed Intake(g / hen / d)=每日消耗饲料总量 / 鸡数；

产蛋率 Laying Rate(%)=(平均每日总蛋数 / 鸡数) $\times$ 100%；

料蛋比 The Ratio of Feed to Egg=采食量 / 产蛋重。

### 2.5.2 鸡蛋品质

在试验期结束后，每组随机收集一百个鸡蛋，带回实验室使用相关仪器进行蛋品质检测，并将测试的有效结果记录到实验记录本上。

### 2.5.3 血清生化指标

试验期结束后，每组随机抽取 50 只蛋鸡进行腋下穿刺静脉采血。采血后，待其自然凝固或离心析出血清，用移液枪吸取纯净的血清重新分装。随后通过 ELISA 试剂盒对蛋鸡血液生化指标进行测定，实验方法参照试剂盒说明书进行。

### 2.5.4 肠道紧密连接蛋白及肠道形态结构

采血完毕后，以颈动脉放血的方式致死，屠宰后分离整个小肠，于小肠各段采取所需肠段及肠道内容物，待后续实验检测。首先进行石蜡切片制备，其过程参考赵颖 (2013)，随后在显微镜下观察，并应用 Image-Pro Plus 软件进行拍照计数，计算肠道形态结构相关指标的数值。最后，通过 WB 实验检测表三种蛋白的表达量，具体实验方法参照于玮(2013)。

### 2.5.5 16S rRNA 测序检测肠道微生物区系

通过常规方法进行微生物测序，具体实验方法参照屈倩(2017)。

### 2.5.6 数据处理与统计分析

使用 Excel 软件统计实验数据，随后通过 SPSS 软件中的 One-way ANOVA 进行单因素方差分析。当  $P<0.05$  时在统计学上视为具有显著的差异。

## 3 结果与分析

### 3.1 饮水添加复合乳剂对蛋鸡生产性能的影响

如表 3 所示，在研究的开始和结束时，各组的蛋鸡重量没有显著差异( $P>0.05$ )。同时，四组的死亡率和平均每日饮水量之间也没有显著差异( $P>0.05$ )。与对照组相比，添加复合乳剂对平均每日采食量也无显著影响( $P>0.05$ )。但是，0.4 mL/L 复合乳剂组的显示出比其他组更高的平均每日蛋重和产蛋率( $P<0.05$ )，料蛋比明显低于其他乳剂组( $P<0.05$ )。此外，对照组、0.2 mL/L 组和 0.6 mL/L 复合乳剂组的产蛋率无显著差异( $P>0.05$ )。

表 3 复合乳剂对蛋鸡生产性能的影响

Table 3 Effects of compound emulsion on production performance of laying hens

项目 Items	对照组	复合乳剂添加量			SEM	P-value
		The level of compound emulsion, mL/L				
		0.2	0.4	0.6		
初重 Intial weight, kg	1.86	1.88	1.85	1.83	0.013	0.314
末重 Final weight, kg	2.08	2.13	2.16	2.12	0.031	0.142
平均每日饮水量 Average daily water drink, mL	212	221	228	205	2.124	0.118
平均每日采食量 ADFI, g	116.25	118.35	121.24	117.97	0.885	0.279
平均每日蛋重 ADEW, g	55.86 <sup>b</sup>	58.61 <sup>a</sup>	60.12 <sup>a</sup>	58.53 <sup>a</sup>	0.334	<0.01
料蛋比 F/E	2.32 <sup>a</sup>	2.08 <sup>b</sup>	2.01 <sup>c</sup>	2.09 <sup>b</sup>	0.045	0.021
产蛋率 Laying rate,%	93.56 <sup>b</sup>	94.73 <sup>ab</sup>	95.68 <sup>a</sup>	94.32 <sup>ab</sup>	0.428	0.037
死亡率 Mortality,%	2.10	1.90	1.80	1.80	0.124	0.213

注：同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )，相同或无字母表示差异不显著 ( $P>0.05$ )。下表同。

Note: In the same row, values with different letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), and with

the same or no letter superscripts mean no significant difference ( $P>0.05$ ). The same as below.

### 3.2 饮水添加复合乳剂对鸡蛋品质的影响

由表 4 可知, 饮水添加复合乳剂在蛋壳强度和蛋壳厚度两方面均无明显的改善效果( $P>0.05$ )。但是, 能明显观察到复合乳剂组的蛋黄颜色、蛋白高度、哈氏单位三个指标显著提高( $P<0.05$ )。相比于其他三组, 0.4 mL/L 复合乳剂组能显著提高 AH 和 HU ( $P<0.05$ )。而 0.2 和 0.6 mL/L 复合乳剂组这两组相比, 它们的 AH 和 HU 均没有发生显著改变( $P>0.05$ )。同样, 在三个实验组中, 复合乳剂添加量的不同对蛋黄颜色中未产生显著改变( $P>0.05$ )。

表 4 复合乳剂对鸡蛋品质的影响

Table 4 Effects of compound emulsion on egg quality of laying hens

项目 Items	对照组	复合乳剂添加量			SEM	P-value
		The level of compound emulsion, mL/L				
		0.2	0.4	0.6		
蛋壳强度 ESS, kg/cm <sup>2</sup>	5.21	5.52	5.86	5.67	0.14	0.360
蛋壳厚度 EST, mm	0.36	0.38	0.39	0.38	0.01	0.147
蛋白高度 AH, mm	5.04 <sup>c</sup>	5.52 <sup>b</sup>	5.88 <sup>a</sup>	5.44 <sup>b</sup>	0.15	0.025
蛋黄颜色 YC	5.68 <sup>b</sup>	6.64 <sup>a</sup>	6.92 <sup>a</sup>	6.38 <sup>a</sup>	0.23	<0.01
哈氏单位 HU	62.66 <sup>c</sup>	65.88 <sup>b</sup>	69.21 <sup>a</sup>	64.62 <sup>b</sup>	0.82	<0.01

### 3.3 饮水添加复合乳剂对蛋鸡血液生化指标的影响

表 5 展示了饮水添加复合乳剂对蛋鸡血液生化指标的影响。如表所示, 在所有组之间均未观察到复合乳剂对三种血清免疫球蛋白 (IgA、IgM、IgY) 水平的显著影响 ( $P>0.05$ )。与对照组相比, 复合乳剂显著降低了蛋鸡血液细胞因子 IL-2、IL-6、TNF- $\alpha$  的含量 ( $P<0.05$ )。此外, 0.2 和 0.4 mL/L 的复合乳剂相比于 0.6 mL/L 的复合乳剂, 能更显著的降低血清中细胞因子 IL-2 和 IL-6 的含量 ( $P<0.05$ ), 但在降低 TNF- $\alpha$  含量方面则无明显差异 ( $P>0.05$ )。

表 5 复合乳剂对蛋鸡血液生化指标的影响

Table 5 Effects of compound emulsion on blood biochemical indices of laying hens

项目 Items	对照组	复合乳剂添加量			SEM	P-value
		The level of compound emulsion, mL/L				
		0.2	0.4	0.6		
IgA, $\mu\text{g/mL}$	231.12	245.62	255.24	248.57	19.24	0.252
IgM, $\mu\text{g/mL}$	828.31	1034.52	1142.57	967.42	26.25	0.141
IgY, $\mu\text{g/mL}$	2241.25	2481.28	2635.48	2462.14	53.21	0.167
IL-2, $\text{pg/mL}$	240.7 <sup>a</sup>	150.4 <sup>c</sup>	140.5 <sup>c</sup>	198.7 <sup>b</sup>	9.14	<0.01
IL-6, $\text{pg/mL}$	170.18 <sup>a</sup>	108.15 <sup>c</sup>	92.15 <sup>c</sup>	134.32 <sup>b</sup>	8.86	<0.01
TNF- $\alpha$ , $\text{pg/mL}$	83.62 <sup>a</sup>	42.79 <sup>b</sup>	28.54 <sup>b</sup>	48.81 <sup>b</sup>	6.28	<0.001

### 3.4 饮水添加复合乳剂对蛋鸡肠道形态和紧密连接蛋白的影响

表 6 和图 1 展示了复合乳剂对蛋鸡肠道功能的影响。结果显示, 0.2 mL/L 和 0.4 mL/L 复合乳剂组中空肠和回肠的 VH, 明显比对照组和 0.6 mL/L 复合乳剂组的 VH 更高 ( $P<0.05$ )。然而, 复合乳剂对蛋鸡肠道的 CD 没有明显影响 ( $P>0.05$ )。有趣的是, 与对照组做比较, 不同浓度的复合乳剂均可显著提高蛋鸡肠道的 V/C ( $P<0.05$ )。而对于肠壁厚度方面, 在 0.2 和 0.4 mL/L 的复合乳剂组中, 明显比对照组和 0.6 mL/L 的复合乳剂组厚 ( $P<0.05$ )。此外, 对照组和 0.6 mL/L 复合乳剂组之间的绒毛高度, 绒隐比值和肠壁厚度无显著差异 ( $P>0.05$ )。

表 6 复合乳剂对蛋鸡肠道形态的影响

Table 6 Effects of compound emulsion on small intestine structure of laying hen

项目 Items	对照组	复合水乳剂添加量			SEM	P-value
		The level of compound emulsion, mL/L				
		0.2	0.4	0.6		
绒毛高度 VH, μm						
空肠 Jejunum	1069.32 <sup>c</sup>	1213.28 <sup>b</sup>	1315.72 <sup>a</sup>	1135.43 <sup>c</sup>	98.42	0.001
回肠 Ileum	977.59 <sup>c</sup>	1109.87 <sup>b</sup>	1201.84 <sup>a</sup>	1024.27 <sup>c</sup>	94.27	<0.001
隐窝深度 CD, μm						
空肠 Jejunum	234.32	198.14	182.84	223.41	35.74	0.095
回肠 Ileum	209.37	172.90	163.24	198.91	32.02	0.062
绒隐比值 V/C						
空肠 Jejunum	5.04 <sup>b</sup>	6.72 <sup>a</sup>	7.69 <sup>a</sup>	6.28 <sup>a</sup>	0.62	<0.001

百里香酚-甲酸复合乳剂对蛋鸡生产性能和肠道功能的影响

回肠 Ileum	4.77 <sup>b</sup>	6.56 <sup>a</sup>	7.38 <sup>a</sup>	6.05 <sup>a</sup>	0.84	<0.01
肠壁厚度 WT, $\mu\text{m}$						
空肠 Jejunum	1632.17 <sup>b</sup>	1972.48 <sup>a</sup>	2041.25 <sup>a</sup>	1703.45 <sup>b</sup>	164.28	<0.01
回肠 Ileum	1745.52 <sup>b</sup>	2063.80 <sup>a</sup>	2107.33 <sup>a</sup>	1814.94 <sup>b</sup>	174.11	<0.01

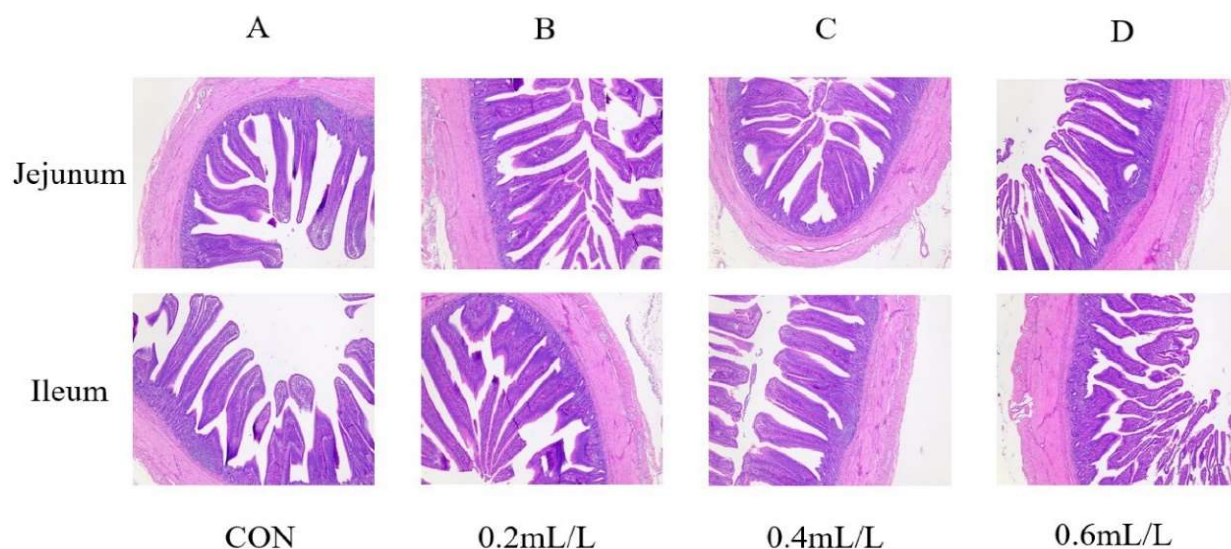


图 1 复合乳剂对空肠和回肠肠道形态的影响 (HE 染色, 40 $\times$ )

Figure 1 Effects of compound emulsion on intestine structure changes of jejunum and ileum with H&E staining (original magnification of 40 $\times$ )

图 2 展示了复合乳剂对蛋鸡肠道紧密连接相关蛋白表达的影响。结果表明, 复合乳剂对于增加空肠和回肠黏膜中 ZO-1, claudin-1 和 occludin 蛋白表达量起着重要作用。在对照组和 0.6 mL/L 复合乳剂组中, 空肠和回肠黏膜中 ZO-1, claudin-1 和 occludin 的表达降低, 明显低于 0.2 和 0.4 mL / L 复合乳剂组 ( $P < 0.05$ )。但是, 对照组和 0.6 mL/L 复合乳剂组之间没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。此外, 0.2 mL/L 复合乳剂组空肠和回肠黏膜中 ZO-1 和 claudin-1 蛋白的表达明显低于 0.4 mL/L 组 ( $P < 0.05$ )。

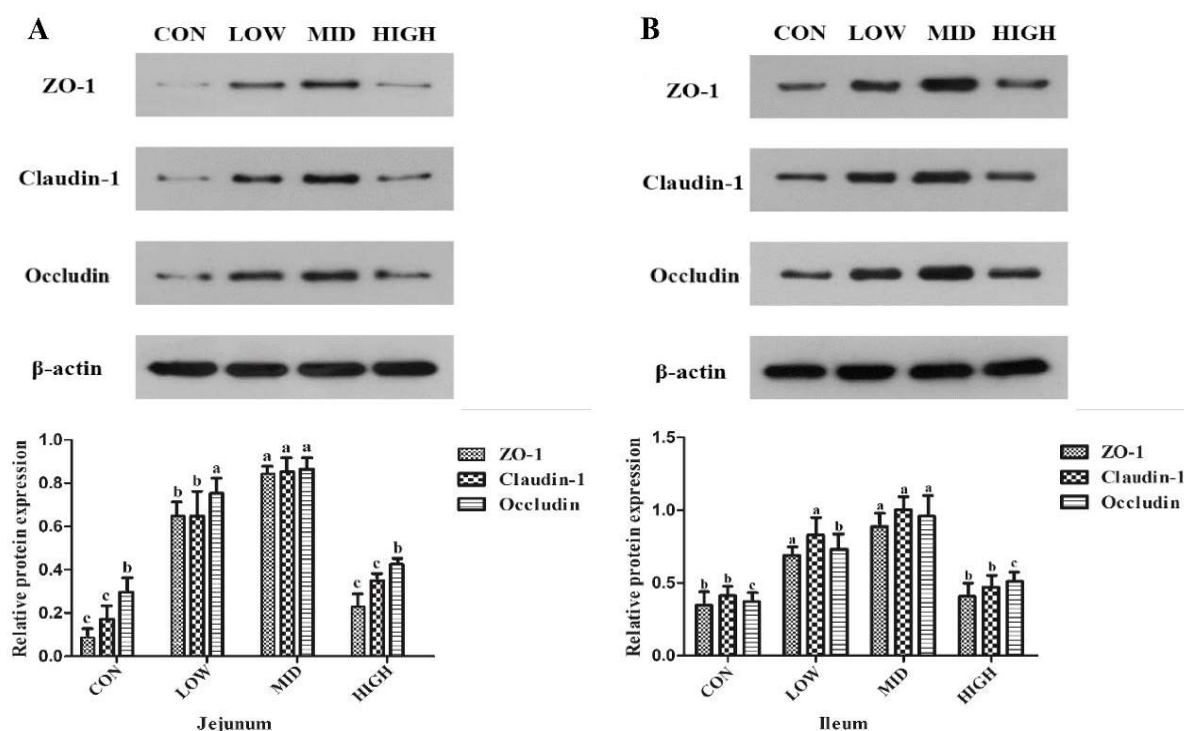


图 2 复合乳剂对肠黏膜紧密连接的影响

Figure 2 Effect of compound emulsion on tight junctions in the intestinal mucosa

a 空肠中三种紧密连接蛋白的相对表达;b 回肠中三种紧密连接蛋白蛋白的相对表达。

a Relative expression of three tight junction proteins in jejunum , bRelative expression of three tight junction proteins in ileum.

### 3.5 饮水添加复合乳剂对蛋鸡肠道微生物区系的影响

在目、属、种这三个分类等级上,以组内相对丰度柱状图的形式,展现 16S rRNA 测序结果(图 3)。结果表明,在对照组和 0.6 mL/L 复合乳剂组中,这三个分类等级上的微生物相对丰度没有明显差异( $P > 0.05$ ),而在 0.2 和 0.4 mL/L 的复合乳剂这两组中也是如此( $P > 0.05$ )。在目分类水平上,与对照组和 0.6 mL/L 复合乳剂组相比,0.2 mL/L 和 0.4 mL/L 复合乳剂组减少了肠杆菌目(Enterobacteriales)和疣微菌目(Verrucomicrobiales)的相对丰度,而乳杆菌目(Lactobacillales),梭菌目(Clostridiales),假单胞菌目(Pseudomonadales)和芽孢杆菌目(Bacillales)的相对丰度增加了(图 3 a)。以上六个目的变化尤其明显,因此单独再以直方图的形式显示它们的相对丰度以进行分析(图 3 d)。如图 3 d 所示,在 0.2 和 0.4 mL/L 的复合乳剂组中,肠杆菌目(Enterobacteriales)和乳杆菌目(Lactobacillales)的相对丰度发生了显著变化。而在对照组和 0.6 mL/L 复合乳剂组中,乳杆菌目



(Lactobacillales), 假单胞菌目 (Pseudomonadales), 肠杆菌目 (Enterobacteriales) 和芽孢杆菌目 (Bacillales) 的相对丰度没有明显差异 ( $P > 0.05$ ), 但与对照组相比, 0.6 mL/L 复合乳剂显著增加了梭菌目 (Clostridiales) 的相对丰度并减少了疣微菌目 (Verrucomicrobiales) 的相对丰度 ( $P < 0.05$ )。此外, 0.4 mL/L 复合乳剂组的相对丰度变化与其他相比显著 ( $P < 0.05$ )。在属水平上, 0.2 和 0.4 mL/L 的复合乳剂组降低了拟杆菌属和 *Rikenellaceae* 的相对丰富度, 但增加了链球菌, 乳酸杆菌, *Ruminococcus*, *Phasecolarctobacterium* 和 *Faecalibacterium* 的相对丰富度 (图 3b)。在物种水平上, 在 0.2 和 0.4 mL/L 的复合乳剂组中, 拟杆菌 (*Bacteroides*) 和乳杆菌 (*Lactobacillus*) 发生了显著变化 (图 3c)。

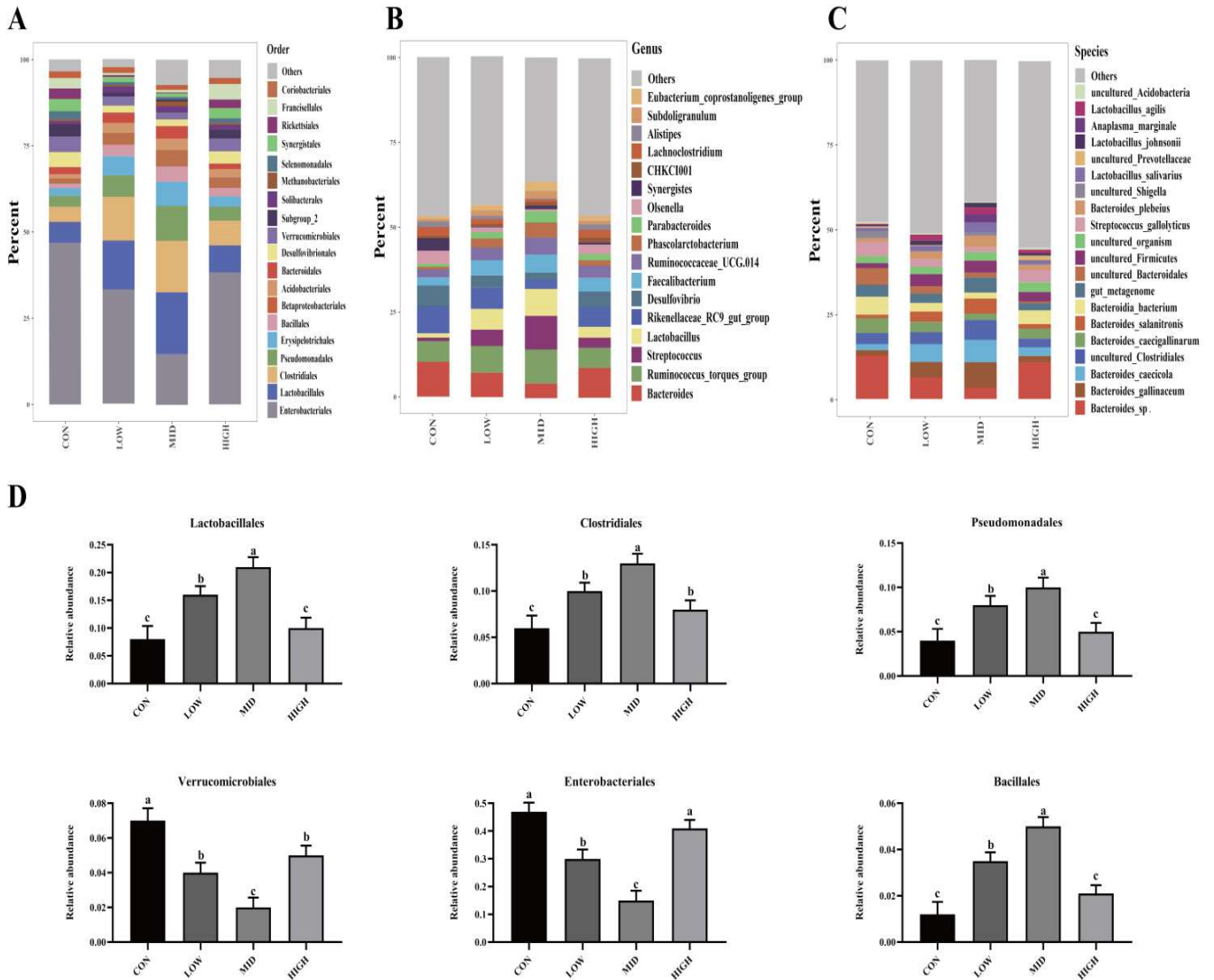


图 3 复合乳剂对蛋鸡盲肠微生物菌群的影响。a 图：目分类级别的相对丰度柱状图。b 图：属分类级别的相对丰度柱状图。c 图：种分类级别的相对丰度柱状图。d 图：乳杆菌，梭菌，假单胞菌，疣微菌，肠杆菌和芽孢杆菌的相对丰度变化。

**Figure 3 Effect of compound emulsion on the composition of colonic microbiota in laying hens. a Graph represents the OTUs at different taxonomical levels: order. b Graph represents the OTUs at different taxonomical levels: genus. c Graph represents the OTUs at different taxonomical levels: species. d The change in the relative abundance of order Lactobacillales, Clostridiales, Pseudomonadales, Verrucomicrobiales, Enterobacteriales and Bacillales.**

## 4 讨论

### 4.1 饮水添加复合乳剂对蛋鸡生产性能的影响

在生产中，蛋鸡的生产性能不仅受到蛋鸡采食量的影响，还受到其肠道健康和消化吸收能力的影响(Wang et al 2020; Gong et al 2021)。在研究开始和结束时，如实记录了蛋鸡的平均重量，并确认四组之间没有差异。另外，在整个试验过程中，四组之间的死亡率和平均每日耗水量没有显著变化，表明复合乳剂在这些方面没有显著影响。在饮用水中添加复合乳液可以提高蛋鸡的生产性能，这可以通过在本实验中试验组 ADEW 和产蛋率的提高以及 F / E 的降低来证明。但是，王等(2019)发现，在饮食中添加 PEO 或 EOA 均不能显著改善蛋鸡的生产性能。因此，本实验结果证明，将复合乳液添加到饮用水中的方法可能比直接在饮食中添加 PEO 和有机酸更好。这一结果产生的原因可能是：相较于直接添加于饲料，复合乳剂一方面降低了植物精油、有机酸的挥发性，提高了蛋鸡对植物精油、有机酸的实际肠道吸收率；另一方面，致病微生物并非是肠道健康问题的根源，真正的问题在于后肠的营养过剩，导致微生物在后肠的繁殖(Oviedo-Rondón 2019)。而乳剂本身的包裹作用将植物精油和有机酸锁住，延缓有效成分的释放，从而保证到达后肠的植物精油和有机酸浓度能够抑制后肠致病微生物的生长，发挥更好的效果。

### 4.2 饮水添加复合乳剂对蛋鸡蛋品质的影响

提高蛋品质对于增加蛋鸡生产效益的重要性不言而喻，并且已经有许多关于植物精油和有机酸对蛋品质的影响的研究(Özek et al 2011; Ding et al 2017)。在该实验中，添加复合乳剂显著提高了蛋鸡的蛋品质，尤其是对蛋黄颜色的改善。改善蛋黄颜色对提高鸡蛋的商业价值具有重要意义。蛋黄中沉积的色素主要来自摄入的食物(Iqbal et al 2018)，这表明添加复合乳剂有利于蛋黄中色素的沉积。而 Torki 等(2015)

发现日粮中的 PEO 不能提高蛋鸡的蛋品质,这表明添加复合乳化剂作为饮用水比在饮食中添加单一 PEO 更好。而与 0.6 mL / L 复合乳剂组相比, 0.4 mL / L 复合乳剂组的 AH 和 HU 显着升高。这些结果表明, 过量的复合乳剂不能获得令人满意的结果。原因可能是高浓度的复合乳剂对产蛋鸡造成刺激, 这也符合前人的研究结论 (Olgun 2016)。此外, 刘艳利等(2015)研究表明, 添加酸化剂有助于产蛋鸡的蛋壳强度显著提升 ( $P<0.05$ ), 对蛋壳厚度没有明显作用效果 ( $P>0.05$ )。而在本次实验中, 复合乳剂对蛋壳厚度、蛋壳强度均无影响, 可能的原因是植物精油和酸化剂的种类不同, 导致其协同效应也发生改变。综上所述, 复合乳剂对实验组的鸡蛋品质进行了显著改善, 这也侧面体现出实验组具有更好的免疫状态和健康水平。

### 4.3 饮水添加复合乳剂对蛋鸡血液生化指标的影响

随后, 对各组蛋鸡血清中的生化指标进行了分析, 这可以反映蛋鸡的健康状况。一方面, 本试验结果中各组的血清免疫球蛋白 (IgA、IgM、IgY) 无明显差异 ( $P>0.05$ ), 但均存在上升的趋势。这与 Michalina 和 Danuta(2019)的研究结果一致, 他们发现薰衣草精油作为饮用水补充剂无法显著改善血液生化指标。造成这一结果的原因可能是复合乳剂对体液免疫功能影响较小, 但具体的分子机制仍有待研究。另一方面, 在本实验中复合乳剂可降低蛋鸡的细胞因子 IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的含量。适当水平的细胞因子可能在生理炎症中起作用, 这是机体对病原体入侵作出的正常反应(Kogut et al 2018)。但是 Iannaccone 等人(2019)则认为细胞因子的减少可能表明炎症得到缓解。因此, 这项研究中细胞因子的减少表明复合乳剂可能会减轻蛋鸡的炎症反应。简而言之, 我们的结果表明, 在饮用水中添加复合乳液要优于单一的 PEO。此外, 随着复合乳剂浓度的从 0.4mL/L 增加到 0.6mL/L, 蛋鸡细胞因子的水平不降反增, 表明复合水乳剂浓度过大可能对蛋鸡产生应激。因此, 在饮用水中添加适量浓度的复合乳剂, 可能对蛋鸡的免疫性能改善效果更好。

### 4.4 饮水添加复合乳剂对蛋鸡肠道形态和肠道屏障的影响

此外, Lei 等(2013)早已报道过提高蛋鸡的肠道健康是提高蛋鸡生产效益的重要因素之一。因此, 本实验进一步评估了复合乳剂对蛋鸡肠道形态和屏障功能的影响。实验结果表明, 添加复合乳剂可显着提高蛋鸡空肠和回肠的 V / C。添加 0.2 和 0.4 mL / L 复合乳剂可显着提高蛋鸡空肠和回肠的 VH 和 WT。在这种情况下, 百里香酚对肠道结构和通透性的改善可以发挥抗氧化、抗炎和抗菌作用(Ezzat Abd El-Hack et al

2016), 而甲酸则可以为肠绒毛的生长提供能量(Pathak et al 2017)。此外, 在本研究中, 复合乳剂提高了蛋鸡肠道三种紧密连接蛋白 ZO-1, occludin 和 claudin-1 的含量, 这表明复合乳剂组蛋鸡肠道通透性降低。这些结果表明, 复合乳剂可以在屏障功能以及形态结构中起作用, 以维持蛋鸡健康的肠道功能。原因可能是复合乳剂改善了蛋鸡的肠道形态结构, 这为营养物质吸收提供了更好的结构基础, 推测这也是实验组蛋鸡生产性能得以提高的主要原因之一。有趣的是, Andi(2015)和 Khosravinia(2013)分别发现使用不同的 PEO 作为饮用水添加剂会对肉鸡产生一系列不利影响。未经处理的 PEO 由于其在水中的不溶性而难以被动物吸收, 因此无法发挥其作用。这项研究进一步证明了在饮用水中添加复合乳液的优越性, 将这二者作为复合乳剂联用, 更有利于肠道结构完整性的维持; 而饮水添加饲养效果优于饲料添加, 可能的原因是有机酸、植物精油本身作为抗菌物质, 降低了输水管线对饮用水的微生物污染。

#### 4.5 饮水添加复合乳剂对蛋鸡肠道微生物区系的影响

判断肠道健康的另一个重要指标为肠道菌群是否平衡, 因此本实验最后通过高通量测序对蛋鸡结肠菌群中的 16S rRNA 基因进行了分析。前人的研究表明, 在饲料中添加 PEO 可以减少肠道大肠杆菌的数量(Jang et al 2007)。在本研究中, 复合乳剂在不同分类水平上提高了乳酸菌、梭菌、假单胞菌和杆菌的相对丰度, 降低了肠道大肠杆菌的相对丰度。显然, 其原因是乳液中的有效成分可以抑制蛋鸡消化道中有害细菌的生长并促进有益细菌的生长。许多研究已经充分证明了百里香酚和甲酸的抗菌作用(Marchese et al 2016; Ricke et al 2020), 因此得到这些实验结果也是符合预期的。但是, Açıkgöz 等(2010)研究了在饮用水中添加甲酸对肠道菌群没有有益的作用。因此, 将甲酸和 PEO 配置成复合乳剂再添加到饮水中是很有必要的。百里香酚可以通过改变细菌的结构来增加细菌的通透性, 从而增强细菌对酸性环境的敏感性(Wang et al 2019)。而甲酸能使肠道中的 pH 值降低, 从而增加百里香酚的疏水性, 两者一齐发挥出卓越的抗菌作用(Wang et al 2019)。因此, 复合乳剂的添加可能通过调整肠道微生物菌群结构, 特别是增加乳酸杆菌数目, 促进蛋鸡的产蛋率增加。此外, 先前的研究表明, 作为一种常见的益生菌, 乳酸杆菌与免疫系统的调节, 动物健康的改善和生产性能的提高相关(Dowarah et al 2017)。因此, 有可能的是, 通过增加乳杆菌的相对丰度和降低大肠杆菌的相对丰度, 添加复合乳剂可以提高蛋鸡的

生产性能。

## 5 小结

根据上述结果，在饮水中添加百里香酚和甲酸复合乳剂是提高蛋鸡的生产性能和改善肠道功能的有效措施。在本实验中，饮水添加量为 0.4 mL/L 时展现出较好的效果，而增大水乳剂用量至 0.6 mL/L 时，改善效果则不明显。在蛋鸡饮水中添加复合乳剂有助于维持蛋鸡良好的肠道形态和屏障功能，改善其免疫功能，从而提高生产性能和蛋品质。这些结果有助于更好地理解百里香酚和甲酸复合乳剂的生物学作用及其作为蛋鸡功能性添加剂的潜力。此外，它们还为进一步开发可提高蛋鸡生产效率的产品提供了理论基础和实验依据。

## 参考文献

1. 曹云芳. 产蛋鸡饮水管理存在的问题及改进措施. 上海畜牧兽医通讯, 2018, 000:58
2. 陈琳,Marie-LaurenceLeRay. 为后抗生素时代做好准备. 国外畜牧学:猪与禽, 2015, 111
3. 葛中东. 饮水型酸化剂敖众优健在肉鸡生产中的应用. 养禽与禽病防治, 2016, :14-18
4. 宫榕.蒙脱石和百里香酚对蛋鸡生产性能,抗氧化和肠道健康的影响 浙江大学, 2016
5. 李鹏,齐广海. 饲料添加剂中常用的抗生素替代品. 饲料博览, 2007, 000:24-27
6. 刘艳利, 辛洪亮, 黄铁军, 刘磊, 阳成波,杨小军. 酸化剂对蛋鸡生产性能, 蛋品质及肠道相关指标的影响. 动物营养学报, 2015, 27:526-534
7. 屈倩.热应激对蛋鸡肠道菌群的影响及中药对其调节作用的研究 华南农业大学, 2017
8. 沈美艳, 袁东芳, 杜燕, 李舫,李伊倩. 山东省部分地区种禽场禽饮用水卫生状况调查. 中国家禽, 2018, 40:75-78
9. 王桢,周献民. 我国蛋鸡业生产现状的思考. 河南畜牧兽医:综合版, 2012, 000:8-9
10. 于玮.蛋氨酸类似物调节鸡肠道紧密连接蛋白表达与机理研究 江南大学, 2013
11. 张皓然, 刘金松, 张玲玲,杨彩梅. 植物精油与有机酸的抑菌效果及协同作用研究. 饲料工业, 2018, :48-52
12. 赵宝华.In, 中国蛋鸡行业发展大会, 2009
13. 赵一夫, 薛莉,秦富. 我国蛋鸡产业生产状况及发展形势分析. 中国家禽, 2010, 032:1-7
14. 赵颖. 超微粉碎低聚木糖对肉鸡生产性能, 抗氧化及免疫机能的影响 [D] 南京: 南京农业大学, 2013
15. Abbas G, Khan S H,Rehman H-u. Effects of formic acid administration in the drinking water on production performance, egg quality and immune system in layers during hot season. *Avian Biology Research*, 2013, 6:227-232
16. Abd El-Hakim A, Cherian G,Ali M. Use of organic acid, herbs and their combination

- to improve the utilization of commercial low protein broiler diets. *Int. J. Poult. Sci*, 2009, 8:14-20
17. Abdel-Wareth A. Effect of dietary supplementation of thymol, synbiotic and their combination on performance, egg quality and serum metabolic profile of Hy-Line Brown hens. *British poultry science*, 2016, 57:114-122
18. Açıkgöz Z, Bayraktar H, Altan Ö. Effects of formic acid administration in the drinking water on performance, intestinal microflora and carcass contamination in male broilers under high ambient temperature. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2010, 24:96-102
19. Adaszyńska-Skwirzyńska M, Szczerbińska D. The effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil as a drinking water supplement on the production performance, blood biochemical parameters, and ileal microflora in broiler chickens. *Poultry science*, 2019, 98:358-365
20. Aksit M, Goksoy E, Kok F, Ozdemir D, Ozdogan M. The impacts of organic acid and essential oil supplementations to diets on the microbiological quality of chicken carcasses. *Archiv fur Geflugelkunde*, 2006, 70:168-173
21. Andi M A. Influence of *Saturejahortensis* L. essential oil in drinking water on broiler production and some blood biochemical parameters. *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res*, 2015, 3:391-396
22. Bölükbaşı Ş C, Erhan M K. Effect of Dietary Thyme (*Thymus vulgaris*) on Laying Hens Performance and *Escherichia coli* (*E. coli*) Concentration in Feces. *International Journal of Natural & Engineering Sciences*, 2007, 1
23. Bozkurt M, Tokuşoğlu Ö, Küçükyılmaz K, Akşit H, Çabuk M, Uğur Çatlı A, Seyrek K, Çinar M. Effects of dietary mannan oligosaccharide and herbal essential oil blend supplementation on performance and oxidative stability of eggs and liver in laying hens. *Italian Journal of Animal Science*, 2012, 11:e41
24. Çabuk M, Bozkurt M, Alcicek A, Çatlı A, Baser K. Effect of a dietary essential oil mixture on performance of laying hens in the summer season. *South African Journal of Animal Science*, 2006, 36:215-221
25. Chen J, Xu M, Kang K, Tang S, He C, Qu X, Guo S. The effects and combinational

- effects of *Bacillus subtilis* and montmorillonite on the intestinal health status in laying hens. *Poultry science*, 2020, 99:1311-1319
26. Cherrington C, Hinton M, Mead G, Chopra I. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Advances in microbial physiology*, 1991, 32:87-108
  27. Didry N p, Dubreuil L, Pinkas M. Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. *Die Pharmazie*, 1993, 48:301-304
  28. Ding X, Yu Y, Su Z, Zhang K. Effects of essential oils on performance, egg quality, nutrient digestibility and yolk fatty acid profile in laying hens. *Animal Nutrition*, 2017, 3:127-131
  29. Dowarah R, Verma A, Agarwal N. The use of *Lactobacillus* as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. *Animal Nutrition*, 2017, 3:1-6
  30. Ezzat Abd El-Hack M, Alagawany M, Ragab Farag M, Tiwari R, Karthik K, Dhama K, Zorriehzahra J, Adel M. Beneficial impacts of thymol essential oil on health and production of animals, fish and poultry: a review. *Journal of Essential Oil Research*, 2016, 28:365-382
  31. Gong H, Yang Z, Celi P, Yan L, Ding X, Bai S, Zeng Q, Xu S, Su Z, Zhuo Y. Effect of benzoic acid on production performance, egg quality, intestinal morphology, and cecal microbial community of laying hens. *Poultry Science*, 2021, 100:196-205
  32. Grashorn M, Gruzauskas R, Dauksiene A, Raceviciute-Stupeliene A, Zdunczyk Z, Juśkiewicz J, Bliznikas S, Svirmickas G, Slausgalvis V. Influence of organic acids supplement to the diet on functioning of the digestive system in laying hens. *Archiv Für Geflügelkunde*, 2013, 77:155-159
  33. Humphrey T, Lanning D. The vertical transmission of salmonellas and formic acid treatment of chicken feed: a possible strategy for control. *Epidemiology & Infection*, 1988, 100:43-49
  34. Iannaccone M, Ianni A, Ramazzotti S, Grotta L, Marone E, Cichelli A, Martino G. Whole blood transcriptome analysis reveals positive effects of dried olive pomace-supplemented diet on inflammation and cholesterol in laying hens. *Animals*, 2019, 9:427



35. Iqbal Z, Roberts J, Perez-Maldonado R, Goodarzi Boroojeni F, Swick R A, Ruhnke I. Pasture, multi-enzymes, benzoic acid and essential oils positively influence performance, intestinal organ weight and egg quality in free-range laying hens. *British poultry science*, 2018, 59:180-189
36. Jang I, Ko Y, Kang S, Lee C. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 134:304-315
37. Kaya A, Kaya H, Gül M, Yildirim A, Timurkaan B, Timurkaan S. Effect of different levels of organic acids in the diets of hens on laying performance, egg quality criteria, blood parameters, and intestinal histomorphology. *Indian Journal of Animal Research*, 2015, 49
38. Khan S, Moore R J, Stanley D, Chousalkar K K. The gut microbiota of laying hens and its manipulation with prebiotics and probiotics to enhance gut health and food safety. *Applied and environmental microbiology*, 2020, 86
39. Khosravinia H. Productive performance, litter characteristics and carcass defects of the broiler chickens given drinking water supplemented with *Satureja khuzistanica* essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2013, 7:1754-1760
40. Kogut M H, Genovese K J, Swaggerty C L, He H, Broom L. Inflammatory phenotypes in the intestine of poultry: not all inflammation is created equal. *Poultry science*, 2018, 97:2339-2346
41. Kohlert C, Van Rensen I, März R, Schindler G, Graefe E, Veit M. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. *Planta medica*, 2000, 66:495-505
42. Lalles J P, Bosi P, Janczyk P, Koopmans S, Torrallardona D. Impact of bioactive substances on the gastrointestinal tract and performance of weaned piglets: a review. *Animal*, 2009, 3:1625-1643
43. Lei K, Li Y, Yu D, Rajput I, Li W. Influence of dietary inclusion of *Bacillus licheniformis* on laying performance, egg quality, antioxidant enzyme activities, and intestinal barrier function of laying hens. *Poultry science*, 2013, 92:2389-2395
44. MA Y. Effects of dietary inclusion of plant extract mixture and copper into layer diets

- on egg yield and quality, yolk cholesterol and fatty acid composition. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2013, 19
45. Marchese A, Orhan I E, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi S F, Gortzi O, Izadi M, Nabavi S M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food chemistry*, 2016, 210:402-414
  46. Olgun O. The effect of dietary essential oil mixture supplementation on performance, egg quality and bone characteristics in laying hens. *Annals of Animal Science*, 2016, 16:1115
  47. Oviedo-Rondón E O. Holistic view of intestinal health in poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 2019, 250:1-8
  48. Özek K, Wellmann K, Ertekin B, Tarım B. Effects of dietary herbal essential oil mixture and organic acid preparation on laying traits, gastrointestinal tract characteristics, blood parameters and immune response of laying hens in a hot summer season. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2011, 20:575-586
  49. Ozturk B, McClements D J. Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science*, 2016, 7:1-6
  50. Pathak M, Mandal G, Patra A, Samanta I, Pradhan S, Haldar S. Effects of dietary supplementation of cinnamaldehyde and formic acid on growth performance, intestinal microbiota and immune response in broiler chickens. *Animal Production Science*, 2017, 57:821-827
  51. Ricke S C, Dittoe D K, Richardson K E. Formic Acid as an Antimicrobial for Poultry Production: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7
  52. Soltan M. Effect of dietary organic acid supplementation on egg production, egg quality and some blood serum parameters in laying hens. *Int. J. Poult. Sci*, 2008, 7:613-621
  53. Thompson J L, Hinton M. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on *Salmonellas* in the crop. *British poultry science*, 1997, 38:59-65
  54. Torki M, Akbari M, Kaviani K. Single and combined effects of zinc and cinnamon essential oil in diet on productive performance, egg quality traits, and blood parameters of laying hens reared under cold stress condition. *International Journal of*

- Biometeorology*, 2015, 59:1169-1177
55. Wang H, Liang S, Li X, Yang X, Long F, Yang X. Effects of encapsulated essential oils and organic acids on laying performance, egg quality, intestinal morphology, barrier function, and microflora count of hens during the early laying period. *Poultry science*, 2019, 98:6751-6760
56. Wang W-w, Wang J, Zhang H-j, Wu S-g, Qi G-h. Effects of *Clostridium butyricum* on production performance and intestinal absorption function of laying hens in the late phase of production. *Animal Feed Science and Technology*, 2020, 264:114476
57. Xiao Z, Liu W, Zhu G, Zhou R, Niu Y. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94:1482-1494
58. Xu F, Uebaba K, Ogawa H, Tatsuse T, Wang B-H, Hisajima T, Venkatraman S. Pharmacophyso-psychologic effect of Ayurvedic oil-dripping treatment using an essential oil from *Lavendula angustifolia*. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2008, 14:947-956
59. Yang C, Zhang L, Cao G, Feng J, Yue M, Xu Y, Dai B, Han Q, Guo X. Effects of dietary supplementation with essential oils and organic acids on the growth performance, immune system, fecal volatile fatty acids, and microflora community in weaned piglets. *Journal of animal science*, 2019, 97:133-143
60. Yesilbag D, Colpan I. Effects of organic acid supplemented diets on growth performance, egg production and quality and on serum parameters in laying hens. *Revue de médecine vétérinaire*, 2006, 157:280-284
61. Zarrini G, Delgosha Z B, Moghaddam K M, Shahverdi A R. Post-antibacterial effect of thymol. *Pharmaceutical biology*, 2010, 48:633-636

## 附录

发表论文情况：

Dietary garcinol attenuates hepatic pyruvate and triglyceride accumulation by inhibiting P300/CBP-associated factor in mid-to-late pregnant rats. *The Journal of nutrition*. 第五作者

## 致谢

毕业论文的写作进入最后关头，也预示着本科阶段学习生活的结束。在导师黄飞若教授的悉心指导下，我完成了本次实验以及毕业论文的撰写。在此过程中，无时无刻体现了导师对于本科生的悉心培养；师从黄老师这样严谨治学、恪尽职守的一位教授，我不仅在试验方面有所进步，更是对今后工作中的为人处世有所感悟、体会。此外，感谢课题组张黎博士在我试验采样、检测及分析过程中提供的帮助和支持。他不仅为我提供实验材料还在给我的课题指明方向，同时还教会了我实验中要用到的实验技术和论文的撰写修改，给我的学习和生活都提供了很大的帮助。当然，我还得衷心感谢我的父母，是他们的支持鼓励才有了今天的我。

最后，由衷的感谢在本科生涯的遇到的所有老师、同学，一路走来你们给予的帮助，让我收获颇多！祝你们未来一切都好，生活幸福美满！