

不同类型饲料对扬子鳄肠道微生物群落多样性以及繁殖性能的影响

吴杰^{①②} 王冲^{①②} 陆屹^③ 张禹乾^{①②} 周永康^④

王应超^④ 吴孝兵^{①②} 聂海涛^{①②*}

① 安徽师范大学生命科学学院 芜湖 241000; ② 皖江流域生物多样性保护与生态安全安徽省重点实验室 芜湖 241000;

③ 安徽爱温纳生物科技有限公司 阜阳 236000; ④ 安徽省扬子鳄国家级自然保护区管理局 宣城 242000

摘要: 扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 为国家一级重点保护野生动物, 其人工繁育和饲养管理的质量提升一直受到保护工作者的关注。为了探究扬子鳄饲喂模式的优化, 本实验设置 4 种不同类型的饲料饲喂组: 饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料)、饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌)。通过对各饲喂组扬子鳄粪便进行 16S rDNA 扩增子测序, 分析其肠道菌群变化, 并结合繁殖季节内不同饲喂组的平均窝卵数、受精率及受精卵孵化率调查数据进行对比分析, 综合评价不同类型饲料对扬子鳄肠道微生物群落多样性以及繁殖性能的影响。结果显示, 在肠道微生物群落丰富度和多样性方面, 饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 肠道菌群丰富度最高, 但饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 肠道菌群多样性最高; 不同饲喂组扬子鳄的肠道微生物在门水平的优势菌群 (厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门) 差异均不显著; 在属水平上, 饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 中短芽孢杆菌属、鲸杆菌属、类芽孢杆菌属以及饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 中鲸杆菌属、库尔特氏杆菌属、鞘氨醇杆菌属和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中短芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、谷氨酸杆菌属的微生物丰度均显著高于饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)。PICRUSt2 功能富集分析结果表明, 饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中扬子鳄肠道菌群在细胞运动性、信号转导、转录和氨基酸代谢等 14 项功能相对丰度最高。对比 4 个饲喂组扬子鳄年产卵窝数发现, 饲喂组 2 (混合颗粒饲料, 5 窝)、饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠, 1 窝)、饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌, 1 窝) 均高于饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料, 0 窝)。饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 窝卵数及受精率为 31 枚和 91.2%, 饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 为 29 枚和 89.5%, 饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 平均窝卵数为 (28.6 ± 4.5) 枚, 受精率为 $85.6\% \pm 2.3\%$ 。排除非受精卵后, 饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 孵化率为 95.9%、饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 为 92.5%、饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 平均孵化率为 $95.3\% \pm 2.8\%$ 。综上所述, 混合颗粒饲料对扬子鳄肠道菌群结构具有积极的影响, 能够优化肠道微生物组成, 提高扬子鳄的繁殖性能, 有助于提升扬子鳄的饲养效果和生存质量。

关键词: 扬子鳄; 混合颗粒饲料; 肠道微生物; 16S rDNA

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32370542, 32170525);

* 通讯作者, E-mail: niehaitao@ahnu.edu.cn;

第一作者简介 吴杰, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: wujie980623@163.com。

收稿日期: 2024-04-24, 修回日期: 2024-11-27 DOI: 10.13859/j.cjz.202524097 CSTR: 32109.14.cjz.24097

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2025) 03-321-12

Effects of Different Feed Types on the Diversity of Intestinal Microbial Community and Reproductive Performance of *Alligator sinensis*

WU Jie^{①②} WANG Chong^{①②} LU Yi^③ ZHANG Yu-Qian^{①②} ZHOU Yong-Kang^④
WANG Ying-Chao^④ WU Xiao-Bing^{①②} NIE Hai-Tao^{①②*}

① School of Life Science, Anhui Normal University, Wuhu 241000; ② Anhui Provincial Key Laboratory of Biodiversity Conservation and Ecological Security in the Wanjiang River Basin, Wuhu 241000; ③ Anhui Aiwenna Biotechnology Co., Ltd., Fuyang 236000; ④ Administration Bureau of Anhui *Alligator sinensis* National Nature Reserve, Xuancheng 242000, China

Abstract: [Objectives] The *Alligator sinensis*, classified as a national first-class key protected wild animal, has consistently been a concern for conservationists regarding the improvement of artificial breeding and management standards. This study aims to explore the optimization of feeding patterns for *A. sinensis*. **[Methods]** The experiment utilized four different types of feeding: Feeding Group 1 (traditional frozen animal-derived feed), Feeding Group 2 (mixed pellet feed), Feeding Group 3 (mixed pellet feed with chelated sodium butyrate) and Feeding Group 4 (mixed pellet feed with complex *Bacillus* spores). By collecting feces from each feeding group and analyzing the changes in gut microbiota using 16S rDNA amplicon sequencing, combined with comparative analysis of data such as average clutch size, fertilization rate, and hatching rate of fertilized eggs during the breeding season, the study comprehensively evaluated the impact of different types of feeding on the diversity of gut microbial communities and reproductive performance in *A. sinensis*. Statistical analysis and data processing were performed using Excel 2010 and SPSS version 26.0. **[Results]** In terms of intestinal microbial richness and diversity, the intestinal flora of Feeding Group 1 exhibited the highest richness, while Feeding Group 4 had the highest diversity (Table 1). No significant differences were observed in the dominant flora at the phylum level (Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidota, Actinobacteriota) among the different feeding groups of experimental crocodiles. At the genus level, the microbial abundance of *Brevibacillus*, *Cetobacterium*, and *Paenibacillus* in Feeding Group 2, *Cetobacterium*, *Kurthia*, and *Sphingobacterium* in Feeding Group 3, and *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, and *Glutamicibacter* in Feeding Group 4 were significantly higher than those in Feeding Group 1 (Fig. 3). The PICRUSt2 functional enrichment analysis revealed that the intestinal flora of Feeding Groups 2 and 4 exhibited the highest relative abundance across fourteen functions, including cell motility, signal transduction, transcription, and amino acid metabolism (Fig. 5). A comparison of the annual egg-laying performance of the four feeding groups of *A. sinensis* revealed that the numbers of egg-laying nests in Feeding Group 2 (5 nests), Feeding Group 3 (1 nest), and Feeding Group 4 (1 nest) were higher than that in Feeding Group 1 (0 nest). The number of eggs per nest and fertilization rate for Feeding Group 3 were 31 eggs and 91.2%, for Feeding Group 4 were 29 eggs and 89.5%, and the mean number of eggs per nest for Feeding Group 2 were 28.6 ± 4.5 eggs and $85.6\% \pm 2.3\%$.

After excluding unfertilized eggs, the hatching rate for Feeding Group 4 was 95.9%, for Feeding Group 3 was 92.5%, and the average hatching rate for Feeding Group 2 was $95.3\% \pm 2.8\%$ (Table 2). [Conclusion] In summary, the mixed particle feed has a positive impact on the intestinal flora structure of *A. sinensis*, optimizing the composition of intestinal microbes and enhancing the reproductive performance of *A. sinensis*. This provides a novel approach to the artificial breeding management of *A. sinensis*, which has the potential to enhance breeding outcomes and the quality of life of *A. sinensis*.

Key words: *Alligator sinensis*; Mixed pellet feed; Intestinal microbiota; 16S rDNA

扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 属于半水生爬行动物, 拥有独特的进化位置和食性, 野生条件下主要以鱼类、甲壳类动物、鸟类和其他小型动物为食。其野外栖息地因人类活动破坏而锐减, 因此急需在人工圈养环境下对其开展物种保护 (朱久康等 1995)。人工圈养扬子鳄的传统饲喂模式通常以小型鱼虾等动物源性饲料来满足其生长和繁殖的基本营养需求 (苏力等 2005)。然而, 这种饲喂方式可能存在营养成分单一、冷藏储存成本高以及原料安全风险等问题, 需要通过丰富营养供给和科学化配比来改善扬子鳄的饲养管理, 多种饲料的混合搭配对扬子鳄健康生长与保护有重要价值 (顾长明等 1987, 王朝林等 1990)。

目前在国外开展的鳄类饲料研究多聚焦于营养需求和食性等方面。例如, 尼罗鳄 (*Crocodylus niloticus*) 食性研究表明, 鱼类、鸟类和哺乳动物均可作为其食物来源, 但幼鳄随生长将逐渐减少对鱼类活体饲料的依赖 (Morpurgo et al. 1991, Woodborne et al. 2021)。另一研究发现, 密西西比鳄 (*A. mississippiensis*) 的吻部宽度随着其生长而不断变化, 使得它们能够捕捉并消化体型各异的猎物 (Kerfoot et al. 2014)。此外, 湾鳄 (*C. porosus*) 也被证实其饮食习性在成长过程中会经历从海洋生物到陆地生物的逐步转变 (Campbell et al. 2022)。相关结果表明, 在确定鳄类饲料配方时, 必须充分考虑鳄的年龄、体重等生理因素对食性的影响。除此之外, 面对动物性蛋白质资源日益紧张现状, 将植物性蛋白质作为可持续的替代

品用于鳄类饲料的研究也逐渐成为人类关注的重点 (Di Geronimo et al. 2017)。已有研究表明, 大豆基饲料不会对鳄造成不良影响, 且作为一种环境友好的蛋白质来源, 能够有效缓解饲料资源紧张的问题 (Flint et al. 2023)。此外, 不同饲料成分对鳄的饲喂效果也产生不同的影响。例如, 鸡肝油因其丰富的营养成分, 被证实能够促进鳄的生长; 而脂肪酸则直接关系到鳄的生长速度和饲料转化率 (Staton et al. 1990, Joanen et al. 2023)。因此, 在制定饲料配方时, 必须密切关注饲料的可消化能力和营养吸收效率, 以确保每一份饲料都能发挥出最大的效益。为了提高饲料的稳定性和可消化性, 降低饲养成本, 科研人员还尝试在饲料中添加碱性多糖等添加剂, 这些添加剂不仅能够改善饲料的物理性质, 还能够促进鳄肠道的健康, 从而提高饲料的整体利用率 (Francis et al. 2017)。

综上所述, 鳄类饲料研究正朝着更加科学化、精细化的方向发展, 以便为鳄提供最优质、最经济的饲养方案。本研究以成年扬子鳄为实验对象, 开展传统动物源性饲料及混合颗粒饲料的饲喂对比实验, 通过 16S rDNA 扩增子测序的方法围绕群落组成、结构分析以及群落功能系统研究了不同饲喂组扬子鳄肠道微生物群落变化特征, 结合产卵窝数、产卵率、平均窝卵数、受精率及孵化率指标进一步探讨功能性饲料对扬子鳄繁殖性能的影响, 综合评价扬子鳄混合颗粒饲料的饲喂效果, 以期为成年雌性扬子鳄繁殖以及饲养管理过程中的营养管控提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验分组

选择安徽扬子鳄保护管理局郎溪县扬子鳄野化训练区 4 个塘口内的扬子鳄作为研究对象, 每个塘口内鳄数均为 20 条 (10~15 岁), 雄性与雌性的比例均为 1:3。在扬子鳄的非冬眠期 (2022 年 5 月 12 日至 2022 年 9 月 17 日和 2023 年 5 月 16 日至 2023 年 10 月 3 日) 2 个年度对 4 个塘口的扬子鳄个体分别给予传统动物源性饲料 (饲喂组 1)、混合颗粒饲料 (饲喂组 2)、混合颗粒饲料加螯合丁酸钠 (饲喂组 3) 和混合颗粒饲料加复合芽孢杆菌 (饲喂组 4) 饲喂处理。每个实验周期前 2 周为预饲期, 预饲期间每间隔 3 d 按照正常投喂量的 20% 递增饲喂, 直至达到正常饲喂水平。饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 为 8.0 kg/次, 饲喂组 2 (混合颗粒饲料)、饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 均为 2.5 kg/次, 每 3 d 投喂一次。

1.2 实验日粮营养成分

依据安徽扬子鳄保护区管理局提供的活体饲料营养成分测定数据和日均投喂量, 课题组与安徽爱温纳生物科技有限公司合作, 共同研制开发混合颗粒饲料用于本次实验。混合颗粒饲料营养成分为: 粗蛋白 52.42%, 可消化粗蛋白/消化能 116 mg/kcal, 粗脂肪 12.31%, 灰分 17.42%, 粗纤维 0.45%, 淀粉 7.69%, 消化能 3 450 kcal/kg, 赖氨酸 (lysine) 3.66%, 苏氨酸 (threonine) 1.92%, 蛋氨酸 (methionine) 1.27%, 精氨酸 (arginine) 3.07%, 必需氨基酸总量 22.97%, 钙 2.51%, 总磷 1.8%, 有效磷 0.98%。饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 及饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 在混合颗粒饲料配方基础上分别添加功能性饲料添加剂螯合丁酸钠 (添加质量比为 0.2%) 及复合芽孢杆菌 (添加质量比为 0.5%), 且增加添加剂后颗粒饲料的营养成分未发生变化。

1.3 粪便样本采集及繁殖性能测定

于第一年度 (2022 年 5 月 12 日至 2022 年 9 月 17 日) 饲喂实验的最后一周, 在每个饲喂组所在繁殖区塘口沿岸收集新鲜粪便 (根据粪便干湿度及颜色判定其是否为新鲜粪便), 最终收集符合 16S rDNA 扩增子测序要求的粪便样本共计 18 份, 其中, 饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 5 份、饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 5 份、饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 3 份、饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 5 份, 并将所有采集到的粪样经液氮速冻后, 迅速转存于 -80 °C 并寄送至广州基迪奥生物科技有限公司进行 16S rDNA 扩增子测序。考虑到第一年度开食时间与当年繁殖季节 (每年 6 月初为产卵高峰期) 间隔较短, 为了更加客观地评价不同饲喂模式对扬子鳄繁殖性能的影响, 第二年度 (2023 年 5 月 16 日至 2023 年 10 月 3 日) 继续开展与 2022 年度同样的饲喂处理, 并在当年收集并统计各饲喂组繁殖性能数据, 包括产卵窝数、平均窝卵数、受精率和孵化率, 进一步分析不同类型饲料对扬子鳄繁殖性能的影响。

1.4 数据分析

16S rDNA 扩增子测序数据的生物信息分析利用广州基迪奥生物科技有限公司生信云平台完成, 使用 Usearch (V8.1.1831) 基于 97% 的序列相似性阈值进行操作分类单元 (OTU) 聚类, 使用 LefSe 软件对各分组的 Biomarker 物种进行筛选, 使用 PICRUSt 进行样本细菌或古菌的 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 代谢通路分析。利用 QIME 软件计算样本序列的 α 多样性, 利用基于 Bray 距离的 Beta 多样性分析统计不同实验组样本之间的细菌群落差异, 采用主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 区分样本间的菌群组成差异, 使用 Anosim 进行分组信息检验。统计与数据处理使用 Excel 2010 和 SPSS 26.0, 绘图用 GraphPad Prism 10 软件。

2 结果

2.1 扬子鳄肠道细菌群落的 α 和 β 多样性分析

样本低丰度 OTU 的覆盖情况显示, 4 组实验样本的覆盖度 (goods coverage) 值均超过 0.99, 表明测序的深度足够。Ace 指数和 Chao1 指数, 饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 最高, 表明其肠道菌群的丰富度最高, 饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 最低, 饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 居中, 但 Simpson 指数在饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中最高, 表示其肠道菌群多样性最高 (表 1)。

PCoA 分析展示了不同饲喂组扬子鳄肠道菌群的 β 多样性 (图 1), 饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料)、饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中的样本在图中表现出了一定程度的重叠, 表明这些组别之间可能存在一定的菌群相似性。

2.2 扬子鳄肠道菌群群落物种组成分析

为了探究不同饲喂组扬子鳄肠道微生物的组成差异, 对 18 个样本的 16S rDNA 基因 V3 ~ V4 区域进行高通量测序分析。本研究共获得 1 469 个 OTU, 归属于 28 门 43 纲 98 目 154 科 271 属及 135 种。4 个饲喂组有 224 个共有的 OTU, 饲喂组 2 (混合颗粒饲料)、饲喂组 3 (混

合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) OTU 共有率为 26.1% (270 个)。饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 与饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 共有 OTU 最多 (349 个), 而饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 与饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 共有 OTU 最少 (302 个) (图 2)。

不同类型饲料对肠道微生物产生不同的效应。在门水平上, 厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidota)、放线菌门 (Actinobacteriota) 为扬子鳄肠道微生物的四大优势菌门, 占据扬子鳄肠道微生物总量的 90%。在门水平上排列前十的厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门、梭杆菌门 (Fusobacteriota)、蓝藻菌门 (Cyanobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobiota)、鬣骨菌门 (Patescibacteria) 及浮霉菌门 (Planctomycetota) 占序列的 98.6% ~ 99.2% (图 3a)。其中, 厚壁菌门占比均最高, 在饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料)、饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中分别为 36.4%、41.3%、32.0% 和 40.8%。厚壁菌门 (41.3%) 和变形菌门 (31.5%) 在饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 中的比

表 1 4 个饲喂组扬子鳄肠道菌群多样性分析

Table 1 Analysis of bacterial diversity of intestinal microbiota in *Alligator sinensis* from four feeding groups

分组 Group	覆盖度 Goods coverage	Ace 指数 Ace index	Chao1 指数 Chao1 index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index
饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) Feeding Group 1 (Traditional frozen animal-derived feed)	0.999	831.16 ± 332.38	789.11 ± 357.89	5.44 ± 2.03	0.91 ± 0.09
饲喂组 2 (混合颗粒饲料) Feeding Group 2 (Mixed pellet feed)	0.998	708.96 ± 91.79	652.08 ± 80.18	4.71 ± 1.31	0.87 ± 0.15
饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) Feeding Group 3 (Mixed pellet feed with sodium butyrate chelate)	0.998	755.54 ± 64.35	688.11 ± 56.94	4.72 ± 0.53	0.91 ± 0.02
饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) Feeding Group 4 (Mixed pellet feed with <i>Bacillus</i> complex)	0.998	748.83 ± 67.47	692.97 ± 59.00	5.22 ± 0.95	0.93 ± 0.05

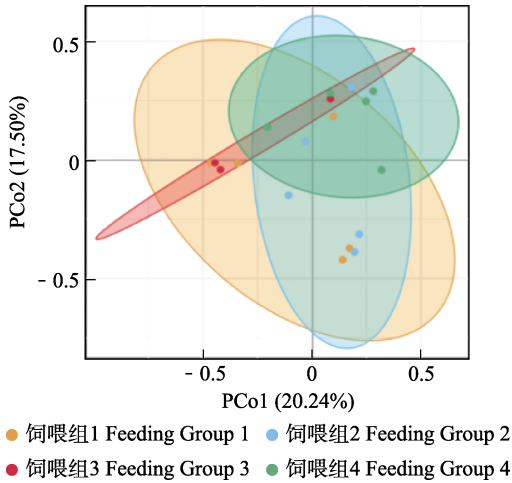


图 1 主坐标分析

Fig. 1 Principal co-ordinates analysis (PCoA)

饲喂组 1. 传统冷冻动物源性饲料; 饲喂组 2. 混合颗粒饲料; 饲喂组 3. 混合颗粒饲料与螯合丁酸钠; 饲喂组 4. 混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌。

Feeding Group 1. Traditional frozen animal-derived feed; Feeding Group 2. Mixed pellet feed; Feeding Group 3. Mixed pellet feed with sodium butyrate chelate; Feeding Group 4. Mixed pellet feed with *Bacillus* complex.

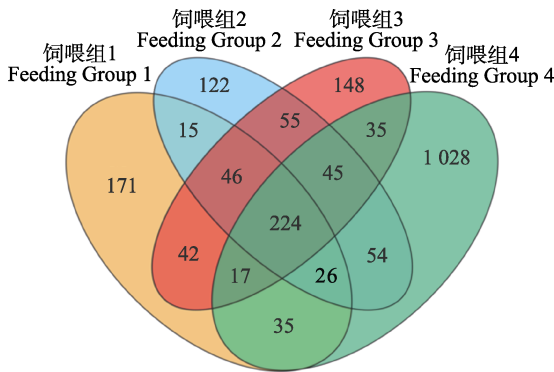


图 2 不同饲喂组别扬子鳄肠道菌群 OTUs 的韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of intestinal microbiota OTUs of *Alligator sinensis* in different feeding groups

饲喂组 1. 传统冷冻动物源性饲料; 饲喂组 2. 混合颗粒饲料; 饲喂组 3. 混合颗粒饲料与螯合丁酸钠; 饲喂组 4. 混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌。

Feeding Group 1. Traditional frozen animal-derived feed; Feeding Group 2. Mixed pellet feed; Feeding Group 3. Mixed pellet feed with sodium butyrate chelate; Feeding Group 4. Mixed pellet feed with *Bacillus* complex.

例高于另外三组。拟杆菌门在饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 中的比例 (27.5%) 高于其他三组, 其在饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 分别占比为 16.6%、10.5% 和 11.8%。放线菌门在饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中比例 (15.7%) 高于饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) (4.9%)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料) (7.6%) 和饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) (3.6%)。排除未分类的组, 厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和放线菌门是所有样本的优势菌门。

在属水平上, 排列前十的鲸杆菌属 (*Cetobacterium*)、短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、库特菌属 (*Kurthia*)、鞘氨醇杆菌属 (*Sphingobacterium*)、梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、埃希氏菌属 (*Escherichia-Shigella*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) 和谷氨酸杆菌属 (*Glutamicibacter*) 为观察到的相对丰度占比较高的优势菌属, 占序列的 33.7% ~ 45.6%。鲸杆菌属在饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 中最高 (11.6%), 在饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中占比分别为 7.5%、7.5% 和 0.3%; 短芽孢杆菌属在饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中占比为 11.1%, 在饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 和饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 占比分别为 0.04%、7.7% 和 0.2%; 不动杆菌属在饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料)、饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 分别占比为 9.4%、1.7%、4.4% 和 5.2%; 库特菌属在饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 中占比最高 (9.4%), 在饲喂

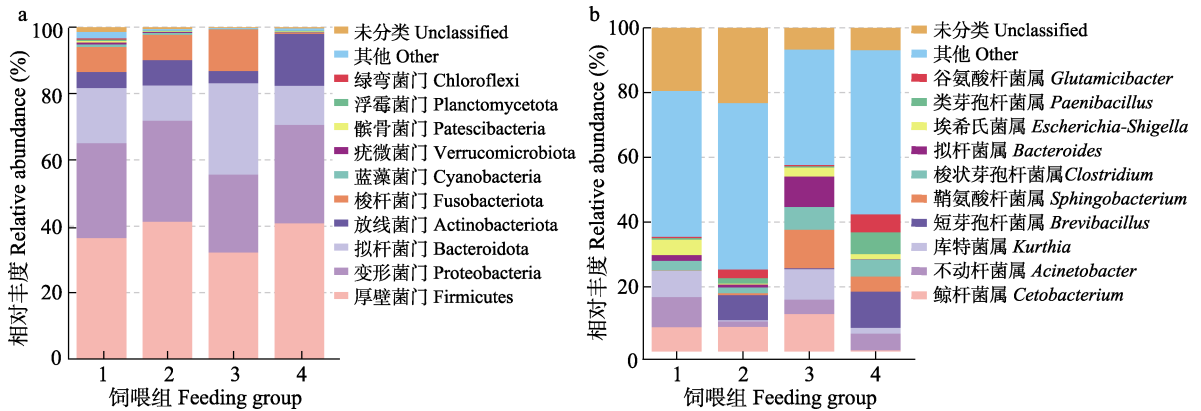


图 3 不同饲喂条件下扬子鳄粪便门 (a) 和属 (b) 水平微生物相对丰度排名前十的细菌类堆叠图

Fig. 3 Stacked bar chart showing the top ten bacterial genera with the highest relative abundance at the phylum (a) and genus (b) levels in the feces of *Alligator sinensis* under different feeding conditions

饲喂组: 1. 传统冷冻动物源性饲料; 2. 混合颗粒饲料; 3. 混合颗粒饲料与螯合丁酸钠; 4. 混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌。

Feeding group: 1. Traditional frozen animal-derived feed; 2. Mixed pellet feed; 3. Mixed pellet feed with sodium butyrate chelate; 4. Mixed pellet feed with *Bacillus* complex.

组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 分别占比为 8.1%、0.4% 和 1.9%; 梭状芽孢杆菌属在饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 中占比最高 (7.0%), 在饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 占比分别为 3.0%、1.86% 和 5.2%; 鞘氨醇杆菌属在饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 中占比最高 (11.9%), 在饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中占比分别为 0.1%、0.6% 和 4.7%; 类芽孢杆菌属在饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中占比最高 (6.8%), 在饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 和饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 中占比分别为 0.47%、1.7% 和 0.3%; 谷氨酸杆菌属在饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中占比最高 (5.5%), 在饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料)、饲喂组 2

(混合颗粒饲料) 和饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 中占比分别为 0.4%、2.6% 和 0.5% (图 3b)。

2.3 扬子鳄肠道菌群差异性分析

应用 LEFSe 软件对 4 种类型饲料组的扬子鳄肠道菌群样本进行线性判别分析 (linear discriminant analysis, LDA), 来确定样本中细菌丰度的变化。对 LDA 判别值大于 3 的细菌类群进行分析 (图 4), 饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 特异菌群为理研菌科 (*Rikenellaceae*), 饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 特异性菌群为香港副爱格氏菌 (*Paraeggerthella hongkongensis*)、动力菌属 (*Motilimonas*)、副爱格氏菌属 (*Paraeggerthella*)、精氨酸单胞菌属 (*Argininibacter*)、双链菌属 (*Bilania*)、冷单胞菌属 (*Psychromonas*) 和爱格氏菌科 (*Eggerthellaceae*)。饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 特异菌群为肠球菌科 (*Enterococcaceae*), 在属水平上的丰富度最高为鞘氨醇杆菌属、肠球菌属 (*Enterococcus*) 和食酸菌属 (*Acidovorax*)。饲喂组 4 (混合

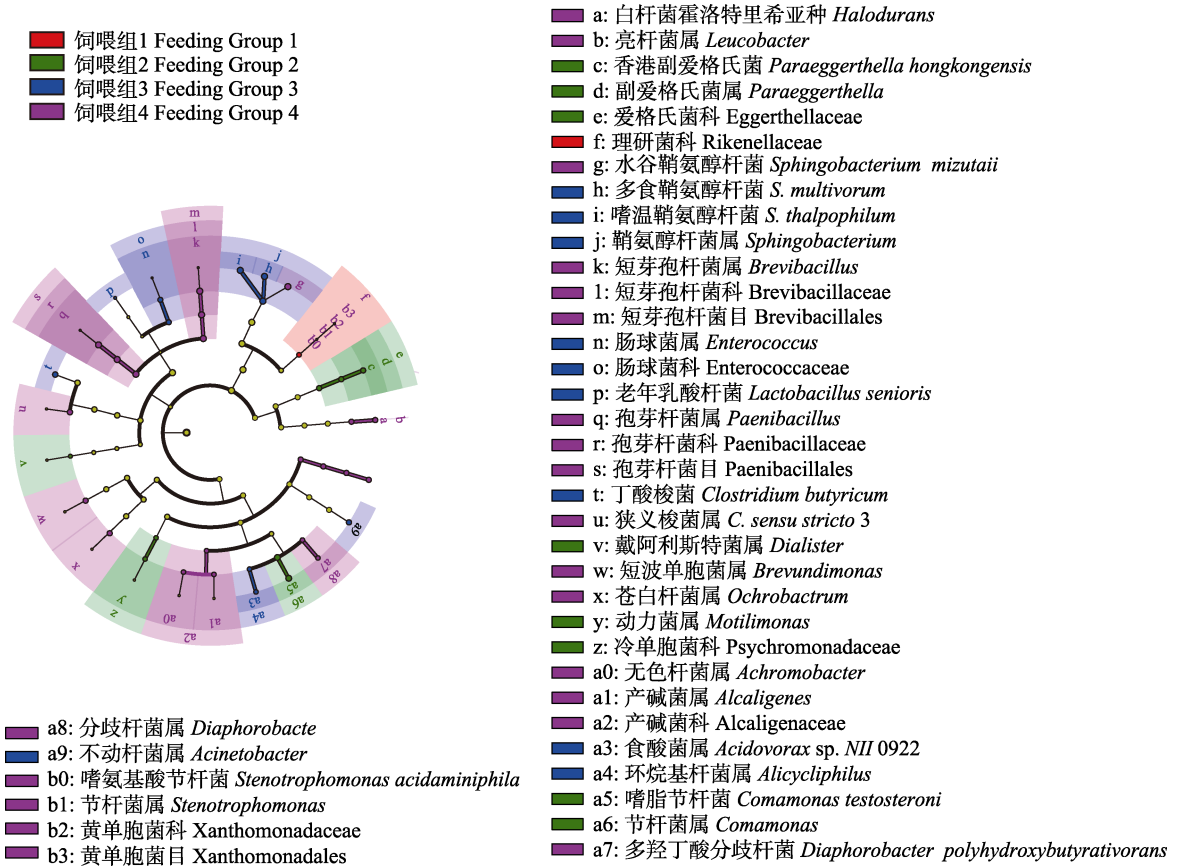


图 4 不同饲喂组别扬子鳄肠道菌群进化分支图

Fig. 4 Evolutionary bifurcation graph of intestinal microbiota of *Alligator sinensis* in different feeding groups

饲喂组 1. 传统冷冻动物源性饲料；饲喂组 2. 混合颗粒饲料；饲喂组 3. 混合颗粒饲料与整合丁酸钠；饲喂组 4. 混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌。

Feeding Group 1. Traditional frozen animal-derived feed; Feeding Group 2. Mixed pellet feed; Feeding Group 3. Mixed pellet feed with sodium butyrate chelate; Feeding Group 4. Mixed pellet feed with *Bacillus* complex.

颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 在属水平上的标志物为短芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、梭菌属 (*Clostridium*)、产碱菌属 (*Alcaligenes*) 等。

2.4 扬子鳄肠道微生物群落的 PICRUSt2 功能预测

扬子鳄肠道菌群主要涉及的功能表型为糖合成与代谢 (glycan biosynthesis and metabolism)、细胞运动性 (cell motility)、信号转导 (signal transduction)、脂质代谢 (lipid metabolism)、碳水化合物代谢 (carbohydrate

metabolism)、膜转运 (membrane transport)、转录 (transcription)、氨基酸代谢 (amino acid metabolism)、转运与分解代谢 (transport and catabolism)、萜类和多酮类代谢 (metabolism of terpenoids and polyketides) 以及复制与修复 (replication and repair) (图 5)。混合颗粒饲料组 (饲喂组 2) 糖合成与代谢的丰度最低, 混合颗粒饲料加功能性饲料添加剂 1-整合丁酸钠组 (饲喂组 3) 中糖合成与代谢的丰度最高, 传统动物源性饲料组 (饲喂组 1) 在所有功能表型中的丰度较低, 混合颗粒饲料加功能性

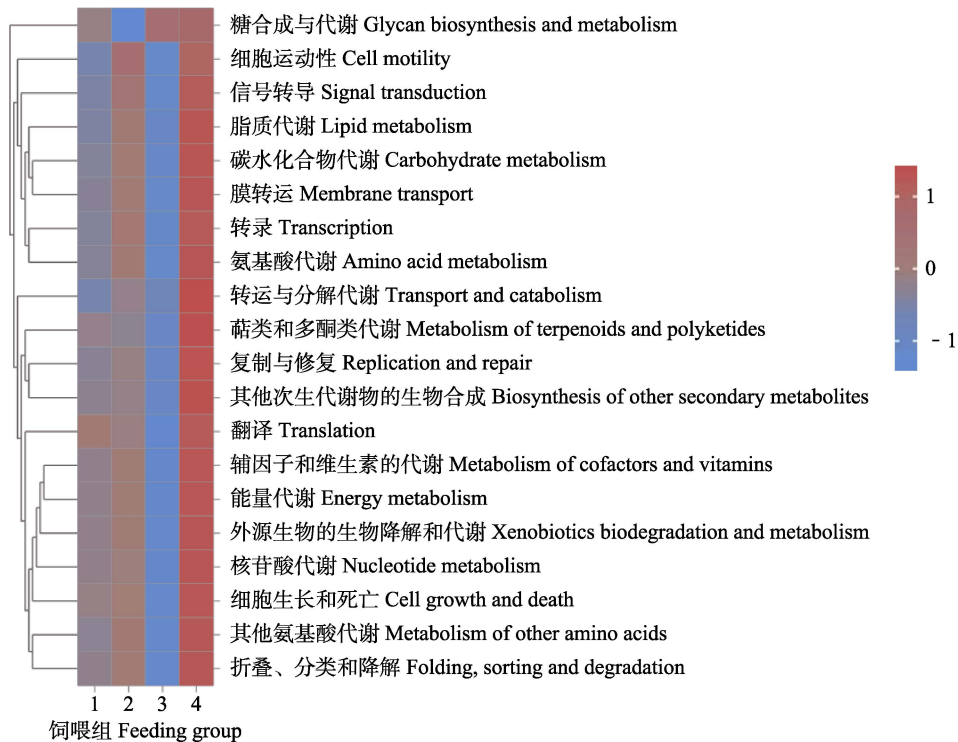


图 5 不同饲喂条件下扬子鳄肠道菌群 PICRUSt2 功能分析

Fig. 5 PICRUSt2 functional analysis of the intestinal microbiota of *Alligator sinensis* under different feeding conditions

饲喂组 1. 传统冷冻动物源性饲料; 饲喂组 2. 混合颗粒饲料; 饲喂组 3. 混合颗粒饲料与螯合丁酸钠; 饲喂组 4. 混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌。

Feeding Group 1. Traditional frozen animal-derived feed; Feeding Group 2. Mixed pellet feed; Feeding Group 3. Mixed pellet feed with sodium butyrate chelate; Feeding Group 4. Mixed pellet feed with *Bacillus* complex.

饲料添加剂 2-复合芽孢杆菌组 (饲喂组 4) 在所有功能表型中的丰度最高。混合颗粒饲料组 (饲喂组 2) 和混合颗粒饲料加功能性饲料添加剂 2-复合芽孢杆菌组 (饲喂组 4) 在功能表型中的丰度中呈现出正相关, 其中细胞运动性、信号转导、脂质代谢、碳水化合物代谢、膜转运、转录 (transcription) 以及氨基酸代谢通路均与扬子鳄的繁殖过程息息相关, 并在饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中丰度最高。

2.5 不同类型饲料对扬子鳄繁殖性能的影响

2023 年分别统计饲喂组 1 (传统动物源性

饲料)、饲喂组 2 (混合颗粒饲料)、饲喂组 3 (混合颗粒饲料加功能性饲料添加剂螯合丁酸钠) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料加功能性饲料添加剂复合芽孢杆菌) 成年雌性扬子鳄的产卵窝数、产卵率、平均窝卵数、受精率和孵化率情况 (表 2)。

3 讨论

肠道内微生物群落复杂, 包括细菌、真菌等, 可分为有益菌与有害菌。有益菌调节肠道菌群平衡, 维持健康状态 (钟国防等 2013, 管晓轩等 2022), 健康稳定的肠道微生物群落是宿主健康的基石, 而失衡的肠道微生物群落会

表 2 不同饲喂条件对扬子鳄繁殖性能的影响

Table 2 Effects of different feeding conditions on the reproductive performance of *Alligator sinensis*

饲料种类 Type of feed	产卵窝数 Number of nests with eggs	平均窝卵数 Average clutch size	受精率 Fertilization rate (%)	孵化率 Hatching rate (%)
饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) Feeding Group 1 (Traditional frozen animal-derived feed)	0	—	—	—
饲喂组 2 (混合颗粒饲料) Feeding Group 2 (Mixed pellet feed)	5	28.6 ± 4.5	85.6 ± 2.3	95.3 ± 2.8
饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) Feeding Group 3 (Mixed pellet feed with sodium butyrate chelate)	1	31	91.2	92.5
饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) Feeding Group 4 (Mixed pellet feed with <i>Bacillus</i> complex)	1	29	89.5	95.9

孵化率是指在排除未受精卵之后所计算出的比例，—表示无数据。

The hatching rate is the proportion calculated after the exclusion of unfertilized eggs, — indicates no data.

影响消化与免疫，引发健康问题。微生物群落对肠道发育、血管网络及淋巴毛细血管构建产生影响，并且与宿主形成复杂的相互作用机制，共同参与代谢活动。肠道微生物所蕴含的丰富基因资源，犹如一个庞大的基因库，能够敏锐地响应环境变化，精准调控微生物组的构成与丰度，实现与周围环境的和谐共生 (He et al. 2021, Xia et al. 2021, 李正中等 2023)。

3.1 不同类型饲料及功能性添加剂对扬子鳄肠道菌群多样性的影响

α 多样性分析结果表明，不同类型饲料及功能性添加剂对扬子鳄肠道菌群多样性无显著影响。PCoA 分析发现，饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 和饲喂组 2 (混合颗粒饲料) 中各样本距离较远，而饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 和饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中各样本距离较近，且呈现出更好的聚类，因此表明功能性添加剂对扬子鳄肠道微生物影响显著，使得这两组扬子鳄之间肠道菌群的相似性较高。

3.2 不同类型饲料对扬子鳄肠道菌群组成和功能的影响

不同类型饲料改变了扬子鳄肠道微生物的组成。饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 中厚壁菌门和变形菌门丰度高，蓝藻菌门和绿弯菌门丰度也较高；饲喂组 2 (混合颗粒饲料)

中厚壁菌门、变形菌门和放线菌门丰度增加，优势菌属为鲸杆菌属和短芽孢杆菌属；饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 中拟杆菌门丰度增加，拟杆菌门是肠道多糖降解的主力军，与厚壁菌门共生且促进能量吸收或储存 (黄媛媛等 2022)；饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中的优势菌门为厚壁菌门和变形菌门，优势菌属为短芽孢杆菌属。在门水平上，优势菌门为厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和放线菌门，这些细菌通常在资源利用和代谢方面具有很大的通用性，能够容忍环境的变化，较少地受到物种分类过程的影响；在属水平上，鲸杆菌属为优势菌属，这些菌群在混合颗粒饲料投喂组是优势菌群，这可能与混合颗粒饲料含有较高的碳水化合物、脂肪和蛋白质有关，因为这些营养物质需要更多的相关菌群进行代谢 (钟立强等 2022)。在同一年内发现混合颗粒饲料喂养模式下细菌群落未分类类群少于传统喂养模式，由于混合颗粒饲料的成分和配比通常经过科学设计和优化，以满足扬子鳄的营养需求，具有较好的消化吸收率，这就导致了扬子鳄在食用混合颗粒饲料后，排泄物中未消化物质和残留微生物也相应地较少，这也有助于降低扬子鳄因微生物感染而引发的疾病风险，同时也有助于维护其健康和生长。利用 PICRUST2 进行的功能预测，验证了混合颗粒

饲料对扬子鳄肠道微生物群落功能所产生的影响。饲喂组 2 (混合颗粒饲料)、饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中的肠道菌群在多个关键功能类别上显著富集, 这些功能类别包括脂质代谢, 其相对丰度的提升, 很可能与饲料中脂肪的高效消化及有效利用之间存在着密切的关联性; 碳水化合物代谢的高丰度则反映了肠道菌群对饲料中碳水化合物成分的广泛适应与利用能力; 此外, 膜转运功能的增强, 可能促进了营养物质在肠道细胞间的有效传递, 进而优化了养分的吸收效率。同时, 转录功能的相对丰富, 暗示了肠道菌群在基因表达层面的高度活跃性, 这可能有助于它们快速适应饲料变化并优化代谢途径; 氨基酸代谢的高丰度, 则进一步强调了肠道菌群在蛋白质分解与氨基酸循环利用中的重要作用, 这对于扬子鳄的生长与发育至关重要。

3.3 功能性饲料添加剂对扬子鳄肠道菌群组成的影响

添加螯合丁酸钠和复合芽孢杆菌对肠道微生物组成有积极影响, 但机制不同。螯合丁酸钠提供能量、调节菌群; 复合芽孢杆菌抑制有害菌。饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) 中拟杆菌门和梭杆菌门丰度在四组中最高, 鲸杆菌属丰度高于饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 及饲喂组 2 (混合颗粒饲料), 鲸杆菌属作为一种共生菌, 能够产生维生素 B₁₂, 显著增强了肠道微生物群之间的相互作用, 并提高了宿主对病原菌感染的抵抗力 (张红芳等 2024)。饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中放线菌门和芽孢杆菌属丰度高, 饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠)、饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) 中梭状芽孢杆菌属和鞘氨醇杆菌属丰度高于饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 及饲喂组 2 (混合颗粒饲料)。因此, 功能性饲料添加剂在调控扬子鳄肠道菌群方面发挥着重要作用, 具体而言, 这些添加剂有可能优化肠道内的菌群结构, 促进优势菌群的生长和繁殖, 这些优势菌群在改善肠道环

境、提高扬子鳄的消化能力方面具有潜在优势, 进而对其整体健康状况产生积极影响。丁酸钠和复合芽孢杆菌能够改变肠道形态结构, 促进有益菌生长, 保持肠道健康平衡 (罗佳捷等 2011, 张福兴等 2024)。综上所述, 特定添加剂的加入能够增加扬子鳄肠道内的有益菌群数量, 维持肠道的平衡状态, 进而提升其免疫力和繁殖性能。

3.4 不同类型饲料及功能性饲料添加剂对扬子鳄繁殖性能的影响

在扬子鳄的繁殖过程中, 单纯依赖新鲜鱼类作为其食物来源已难以满足其全面的营养需求。相比之下, 混合颗粒饲料具有均衡的营养配比, 展现出了一定的优越性, 饲喂组 2 (混合颗粒饲料) (5 窝) 产卵窝数高于饲喂组 3 (混合颗粒饲料与螯合丁酸钠) (1 窝)、饲喂组 4 (混合颗粒饲料与复合芽孢杆菌) (1 窝) 和饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) (0 窝)。本研究结果表明, 在饲料中添加螯合丁酸钠的饲喂组 3 和添加复合芽孢杆菌的饲喂组 4, 其窝卵数及产卵率均高于仅喂食基础饲料的饲喂组 1 (传统冷冻动物源性饲料) 和初期不适应混合颗粒饲料的饲喂组 2 (混合颗粒饲料), 且饲喂组 4 的平均孵化率最高。芽孢杆菌作为一种益生菌, 其在改善水质、抑制病原菌、促进生长和提高免疫力方面展现出了独特的优势 (付天玺等 2007, 韩丽等 2017, 李佳骏等 2023); 特别是枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 它还能分泌出多种消化酶, 帮助扬子鳄更好地消化和吸收食物中的营养成分 (万培伟等 2023)。而丁酸钠则具有促进肠细胞增殖分化、维护肠道微生态平衡和增强免疫力的功能 (王曼曼等 2011, 侯冬强等 2023), 综上所述, 在进行扬子鳄饲料配方设计时使用功能性饲料添加剂进行肠道健康等靶向调控具有一定的可行性。

参 考 文 献

- Campbell M A, Udyawer V, Jardine T D, et al. 2022. Dietary shifts may underpin the recovery of a large carnivore population.

- Biology Letters, 18(4): 20210676.
- Di Geronimo P M, Di Girolamo N, Crossland N A, et al. 2017. Effects of plant protein diets on the health of farmed American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 48(1): 131–135.
- Flint M, Flint J. 2023. Use of soybean as an alternative protein source for welfare-orientated production of American alligators (*Alligator mississippiensis*). *PeerJ*, 11: e16321.
- Francis M, Morel P C H, Wilkinson B H P, et al. 2017. Alginate increases water stability whilst maintaining diet digestibility in farmed saltwater crocodiles. *Journal of Animal Science*, 95(2): 820–826.
- He Y Q, Maltecca C, Tiezzi F. 2021. Potential use of gut microbiota composition as a biomarker of heat stress in monogastric species: a review. *Animals*, 11(6): 1833.
- Joanen T, Mikolajczyk A P, Staton M, et al. 2023. Impacts of diet on reproductive performance of captive American alligators (*Alligator mississippiensis*). *Animals*, 13(24): 3797.
- Kerfoot J R, Fern M P, Elsey R M. 2014. Scaling the feeding mechanism of captive *Alligator mississippiensis* from hatchling to juvenile. *Biology*, 3(4): 724–738.
- Morpurgo B, Gvaryahu G, Robinzon B. 1991. Food preference, fish attractability and behavior manifested toward new feed in young Nile crocodiles, *Crocodylus niloticus*. *Physiology & Behavior*, 50(1): 1–4.
- Staton M A, Edwards H M, Brisbin I L, et al. 1990. Essential fatty acid nutrition of the American Alligator (*Alligator mississippiensis*). *The Journal of Nutrition*, 120(7): 674–685.
- Woodborne S, Botha H, Huchzermeyer D, et al. 2021. Ontogenetic dependence of Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*) isotope diet-to-tissue discrimination factors. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 35(18): e9159.
- Xia T, Yao Y, Wang C, et al. 2021. Seasonal dynamics of gut microbiota in a cohort of wild Tibetan macaques (*Macaca thibetana*) in Western China. *Global Ecology and Conservation*, 25: e01409.
- 付天玺, 魏开建, 许国焕. 2007. 芽孢杆菌在水产养殖中的研究和应用概况. *水利渔业*, 28(3): 102–104.
- 顾长明, 王朝林, 潘洪唐. 1987. 扬子鳄不同饲料的对比试验. *野生动物*, 8(1): 24–25, 38.
- 管晓轩, 胡红莲, 高民, 等. 2022. 复合微生态制剂在犊牛抗腹泻中应用的研究进展. *现代畜牧兽医*, (8): 74–78.
- 韩丽, 孔祥峰, 赵越, 等. 2017. 枯草芽孢杆菌对围产期母猪繁殖性能和子代生长的影响. *动物营养学报*, 29(12): 4440–4446.
- 侯冬强, 赵红霞, 彭凯, 等. 2023. 丁酸钠的生物学功能及其在动物生产中的应用. *动物营养学报*, 35(4): 2119–2128.
- 黄媛媛, 陈华国, 谢文, 等. 2022. 多糖与肠道菌群相互作用及其构效关系研究进展. *微生物学通报*, 49(6): 2325–2346.
- 李佳骏, 张秀霞, 冼健安, 等. 2023. 芽孢杆菌在水产养殖中的应用研究进展. *现代畜牧科技*, (4): 63–66.
- 李正中, 刘波, 刘志桦, 等. 2023. 发酵饲料对日本沼虾生长性能、抗氧化能力及肠道微生物的影响. *水生生物学报*, 47(9): 1435–1445.
- 罗佳捷, 张彬, 王洁. 2011. 丁酸钠在动物生产中的研究进展. *湖南饲料*, (4): 10–12.
- 苏力, 梁启凌, 周立文, 等. 2005. 扬子鳄的人工饲养及繁殖. *广东畜牧兽医科技*, 30(1): 29–30.
- 王培伟, 刘文欣, 戴五洲. 2023. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对鹅生长性能的影响. *江西畜牧兽医杂志*, (5): 26–28.
- 王朝林, 梁保东, 顾长明, 等. 1990. 不同饲料配方对初生扬子鳄采食与生长情况比较. *四川动物*, 9(1): 19–21.
- 王曼曼, 陈宝江, 梁陈冲, 等. 2011. 丁酸钠作用机理及其在畜牧生产中应用研究进展. *当代畜禽养殖业*, (7): 30–32.
- 张福兴, 聂福旭, 唐文雅, 等. 2024. 枯草芽孢杆菌的生物学作用及在家禽生产中的应用研究进展. *国外畜牧学(猪与禽)*, 44(1): 69–72.
- 张红芳, 钱涛, 金婷, 等. 2024. 草鱼肠道微生物谱及其发育性变化. *浙江农业学报*, 36(4): 780–789.
- 钟国防, 朱伟星, 焦建刚, 等. 2013. 益生菌在水产健康养殖中的应用. *饲料工业*, 34(8): 56–58.
- 钟立强, 王海骁, 王明华, 等. 2022. 不同饵料对大口黑鲈生长性能和肠道微生物的影响. *水生生物学报*, 46(11): 1609–1617.
- 朱久康, 李显美. 1995. 扬子鳄在模拟自然生态环境下的饲养. *水产养殖*, 16(4): 17.