

引用格式:

王承东, 李根, 姜尧章, 杨超, 李德生, 何鸣, 凌珊珊, 古玉, 马晓平. 亚成体与老年体圈养大熊猫的口腔菌群多样性及潜在致病菌分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(3): 359–365.

WANG C D, LI G, JIANG Y Z, YANG C, LI D S, HE M, LING S S, GU Y, MA X P. Analysis of the oral microflora diversity and potential pathogenic bacteria of sub-adult and elderly captive giant pandas[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(3): 359–365.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 亚成体与老年体圈养大熊猫的口腔菌群多样性 及潜在致病菌分析

王承东<sup>1</sup>, 李根<sup>2,3</sup>, 姜尧章<sup>2,4</sup>, 杨超<sup>2,4</sup>, 李德生<sup>1</sup>, 何鸣<sup>1,2</sup>, 凌珊珊<sup>1</sup>, 古玉<sup>5</sup>, 马晓平<sup>2\*</sup>

(1.中国大熊猫保护研究中心, 四川 都江堰 611800; 2.四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130; 3.湖北三峡职业技术学院农学院, 湖北 宜昌 443000; 4.四川水利职业技术学院生物工程学院, 四川 成都 611231; 5.四川农业大学生命科学院, 四川 成都 611130)

**摘 要:** 采用高通量测序技术对 6 只亚成体和老年体的圈养大熊猫口腔唾液样本进行测序, 分析圈养大熊猫口腔细菌的菌群多样性、结构和潜在致病菌及其在 2 组不同年龄群体间的差异。结果显示: 大熊猫口腔中的细菌以变形菌门(*Proteobacteria*)和蓝细菌门(*Cyanobacteria*)等为主, 相对丰度分别为 70.4%、13.4%, 在属水平上主要有放线杆菌属(*Actinobacillus*)、劳特罗普氏菌属(*Lautropia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和莫拉氏菌属(*Moraxella*)等, 相对丰度分别为 10.5%、5.4%、3.9%、3.8%; 亚成体大熊猫口腔菌群的多样性和丰富度高于老年体的, 但差异无统计学意义;  $\beta$  多样性分析结果显示, 2 组大熊猫口腔菌群结构间的差异无统计学意义; LEfSe 分析发现 2 组之间的差异细菌在亚成体组中有 *Niveispirillum*、固氮螺菌属(*Azospirillum*)与根瘤菌属(*Rhizobium*), 在老年体组中则有气单胞菌属(*Arenimonas*)和二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*), 但它们的相对丰度均不高; 圈养大熊猫口腔中有链球菌属(*Streptococcus*)、放线菌属(*Actinomyces*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等致病菌, 其中与龋齿相关的菌群相对丰度较高, 这可能与圈养大熊猫摄入了较多的碳水化合物有关。

**关 键 词:** 大熊猫; 圈养; 口腔菌群; 潜在致病菌; 高通量测序

中图分类号: Q959.838; S852.6

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)03-0359-07

## Analysis of the oral microflora diversity and potential pathogenic bacteria of sub-adult and elderly captive giant pandas

WANG Chengdong<sup>1</sup>, LI Gen<sup>2,3</sup>, JIANG Yaozhang<sup>2,4</sup>, YANG Chao<sup>2,4</sup>, LI Desheng<sup>1</sup>,

HE Ming<sup>1,2</sup>, LING Shanshan<sup>1</sup>, GU Yu<sup>5</sup>, MA Xiaoping<sup>2\*</sup>

(1.China Conservation and Research Center for the Giant Panda, Dujiangyan, Sichuan 611800, China; 2.College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China; 3.College of Agriculture, Hubei Three Gorges Polytechnic, Yichang, Hubei 443000, China; 4.Bioengineering Institute, Sichuan Water Conservancy College, Chengdu, Sichuan 611231, China; 5.College of Life Sciences, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

**Abstract:** In this study, the oral saliva samples of 6 captive giant pandas were sequenced by high-throughput sequencing technology with an aim to analyze the oral microflora diversity, structure, potential pathogenic bacteria and the differences

收稿日期: 2021-12-08

修回日期: 2023-06-06

基金项目: 国家林业和草原局大熊猫国际资金项目(GH201708)

作者简介: 王承东(1978—), 男, 四川安岳人, 博士, 教授级高级工程师, 主要从事大熊猫保护研究, 285934012@qq.com; \*通信作者, 马晓平, 博士, 副教授, 主要从事兽医学研究, mxp886@sicau.edu.cn

between the two groups of captive giant pandas in different ages. The results showed that the bacteria in the mouth of giant pandas were mainly Proteobacteria (70.4%) and Cyanobacteria(13.4%) at the phylum classification level. At the level of genus classification, *Actinobacillus* (10.5%), *Lautropia*(5.4%), *Pseudomonas*(3.9%) and *Moraxella*(3.8%) were the main species. The diversity and richness of oral flora of sub-adult giant pandas were higher than those of elderly giant pandas with no significant difference. The  $\beta$  diversity analysis showed that there was no significant difference in oral flora structure between the two groups. The LEfSe analysis revealed that the different bacteria of the two groups were *Niveispirillum*, *Azospirillum* and *Rhizobium* in the sub-adult group, while *Arenimonas* and *Capnocytophaga* were found in the senile group, but their abundance were not high. At the same time, we found *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Porphyromonas*, *Staphylococcus* and other pathogenic bacteria in the mouth of captive giant pandas, among which the abundance of caries-related bacteria were higher, which might be related to the more carbohydrate intake of captive pandas.

**Keywords:** *Ailuropoda melanoleuca*; captive; oral flora; potential pathogen; high-throughput sequencing

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是食肉目熊科大熊猫亚科大熊猫属中唯一的哺乳动物,是中国特有的珍稀物种<sup>[1]</sup>。大熊猫的口腔潮湿、温暖,含有唾液蛋白、糖蛋白和龈沟液等,这使其成为了许多微生物生长的合适场所<sup>[2-3]</sup>。口腔微生物群可局部和系统地改变健康和疾病之间的平衡,它们和宿主之间有很强的相互作用,各种口腔微生物的相互作用有助于机体抵御外界不良刺激的侵袭<sup>[4]</sup>。然而,微生物群落失衡会导致口腔疾病,虽然大多数生活在口腔中的微生物是无害的,甚至是有益的,但一些常驻微生物在一定条件下具有潜在的致病性<sup>[5]</sup>。

相关研究<sup>[6-7]</sup>发现,变形链球菌(*Streptococcus mutans*)和乳杆菌(*Lactobacillus*)使口腔环境过度酸化并且与龋齿的发生直接相关,导致口腔疼痛和牙齿脱落;卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)和放线菌属(*Actinomyces*)等细菌的丰度上升与龋齿的发生密切相关,可作为龋齿发生的潜在生物标志物。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、齿密螺旋体(*Treponema denticola*)和福赛坦氏菌(*Tannerella forsythia*)等被称为“红色复合体”的细菌被发现与牙周病的发生相关<sup>[8]</sup>。除此之外,研究<sup>[9]</sup>表明,口腔微生物失调不仅能够引起口腔部位的疾病,还可能与一些全身性疾病的发生相关,包括胃肠道疾病(如炎症性肠病、肝硬化、胰腺癌),神经系统疾病(如阿尔茨海默氏病),内分泌系统疾病(如糖尿病、不良妊娠结局、肥胖和多囊卵巢综合征),免疫系统疾病(如类风湿性关节炎)以及心血管系统疾病(如动脉粥样硬化)。大熊猫口腔微生物同样可能会导致相关疾病的发生,已有研究<sup>[10]</sup>表明,大熊猫牙齿菌斑菌群变化与龋齿的发生具有一定相关性。可见,了解大熊猫口腔微生物群落对大熊猫疾病防治具有重要意义。

关于大熊猫微生物多样性的研究主要集中在肠道和皮肤<sup>[11-12]</sup>,而对口腔和牙齿的研究较少。关于大熊猫口腔微生物群落的研究主要集中在传统的分离培养方法上,如冯帆<sup>[13]</sup>对圈养大熊猫口腔源细菌进行分离培养,发现圈养大熊猫口腔细菌以葡萄球菌属、链球菌属为优势菌群;喻述容等<sup>[14]</sup>在大熊猫幼崽口腔感染的分泌物中分离出了微球菌和聚团杆菌。这种分离培养的研究方法选择了在人工条件下迅速生长的微生物,而低估了口腔微生物群落的整体多样性,存在一定的局限性。为了更全面了解大熊猫口腔微生物的多样性,可采用高通量测序技术和生物信息学结合的研究方法<sup>[15-16]</sup>。笔者采集亚成体与老年体圈养大熊猫的唾液样本,通过16S 扩增子测序分析大熊猫口腔中的细菌多样性,以了解这2个年龄段圈养大熊猫口腔细菌群落的结构和差异,探究大熊猫口腔中存在的潜在致病菌及其可能造成的影响,以期为更好地防治大熊猫口腔与牙齿疾病提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试大熊猫

供试大熊猫来自中国大熊猫保护研究中心都江堰基地。大熊猫被圈养在都江堰基地独立圈舍中,每个圈舍包括1个开放的室外区域和1个封闭的室内区域,饲养1~2只大熊猫。圈舍的室外环境与野外环境相似,有茂密的阔叶林、竹林和草丛。大熊猫可以在自己的圈舍里自由地活动。被采样大熊猫身体健康,无明显异常,无遗传学亲缘关系,近3个月未使用过抗菌药物,都食用同样的食物(窝窝头、竹子)和水。

## 1.2 样本采集

于 2019 年 8 月 5 日采集大熊猫口腔唾液样本。采集样品前大熊猫禁食 1 h, 以无菌 0.9% NaCl 溶液润湿的无菌棉拭子取样, 每只大熊猫重复采样 3 次, 将口腔拭子的 2/3 伸入口腔旋转蘸取口腔舌下唾液, 然后放入采样管封口, 2 h 内转运至 $-80^{\circ}\text{C}$ 冻存。共采集 6 只大熊猫口腔唾液样本。按照胡锦涛的标准对大熊猫进行年龄界定, 分为亚成体组(J1、J2、J3)与老年体组(G1、G2、G3), 其年龄分别为 2.9、3.0、2.9、24.9、24.8、28.9。其中 J2 和 G2 为雄性, 其余 4 只为雌性。

## 1.3 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增与测序

采用 CTAB 法提取口腔拭子样本的基因组 DNA, 并利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度。取适量的样本 DNA 于离心管中, 使用无菌水稀释样本至  $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ , 以稀释后的基因组 DNA 为模板, 选用引物 341F( $5'-\text{CCTACGGGNGGCWGCAG}-3'$ )和 805R( $5'-\text{GACTACHVGGGTATCTAATC}-3'$ )对 16S rRNA V3+V4 区进行 PCR 扩增, 采用 2% 的琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行检测, 使用购自 Qiagen 公司的胶回收试剂盒回收目的条带。采用 Tru Seq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 文库试剂盒进行文库构建, 质检合格后运用 NovaSeq6000 上机测序。

## 1.4 数据处理与分析

从得到的下机数据中去除 Barcode 和引物序列, 运用 FLASH(V1.2.7)<sup>[17]</sup>进行拼接以及过滤处理后得到高质量的 Tags 数据; 应用 Qiime(V1.9.1)<sup>[18]</sup>的 Tags 质量控制流程, 得到分析所需的有效数据<sup>[19]</sup>; 运用 Uparse v7.0.1001<sup>[20]</sup>将得到的全部有效数据聚

类成为操作分类单元(OTUs); 再运用 Qiime(V1.9.1)进行界、门、纲、目、科、属等分类水平上的物种注释分析, 并计算 ACE、Shannon 指数, 选用 wilcoxon 检验方法进行  $\alpha$  多样性指数和  $\beta$  多样性指数组间差异分析。运用 R 软件的 WGCNA, stats 和 ggplot2 软件包, 基于 unweighted 距离对所有样本进行 PCoA 分析。LEfSe 分析默认设置 LDA Score 的筛选值为 3,  $P<0.05$ 。分析结束后, 将所有的原始序列数据上传至 National Center for Biotechnology Information Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 登录号为 PRJNA784731。

## 2 结果与分析

### 2.1 大熊猫口腔唾液样本的测序质量与物种注释

6 份口腔唾液样本构建的文库测序后共得到 347 766 条有效序列。按照 97% 的相似度聚类后共得到 1316 个 OTUs。经物种注释后共得到 24 个门、47 个纲、131 个目、211 个科和 423 个属。对聚类得到 OTUs 结果进行分析, 亚成体组的 OTUs 为 1169 个, 老年体组的 OTUs 为 934 个, 2 组共有的 OTUs 为 787 个, 占全部 OTUs 数的 59.8%; 亚成体组的特有 OTUs 数量(382 个)高于老年体组的特有 OTUs 数量(147 个)。

### 2.2 亚成体与老年体大熊猫口腔细菌的群落结构

变形菌门(Proteobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidota)等 5 个细菌门是大熊猫口腔细菌群落的优势门, 平均相对丰度分别为 70.4%、13.4%、5.6%、4.2%、2.8%。从图 1

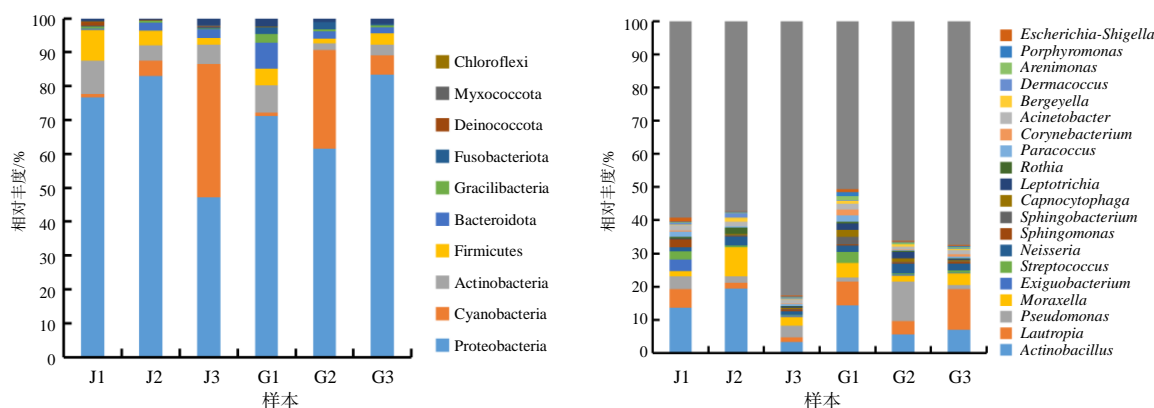


图 1 圈养大熊猫个体口腔细菌的群落结构

Fig.1 Structure of oral bacterial flora of captive giant panda

可知,大熊猫口腔菌群有着明显的个体性差异,如 J3 和 G2 的口腔中蓝细菌门的相对丰度明显高于同组其他大熊猫的;G2 口腔中的假单胞菌属的相对丰度明显高于同组其他大熊猫的;即使是同组且性别相同的大熊猫也在菌群结构方面有所不同,如 J1 和 J3,G1 和 G3 等在门水平的细菌群落结构上均表现出了一定差异。相对丰度大于 1% 的主要细菌属包括放线杆菌属(*Actinobacillus*)、劳特罗普氏菌属(*Lautropia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、莫拉氏菌属(*Moraxella*)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、链球菌属(*Streptococcus*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)等 7 个,平均相对丰度分别为 10.5%、5.4%、3.9%、3.8%、2.0%、1.3%、1.3%。供试大熊猫口腔细菌菌群中相对丰度前 20 的细菌属如图 1 所示。

2.3 亚成体与老年体大熊猫口腔细菌群落的差异

2.3.1  $\alpha$  多样性分析

从表 1 可知,亚成体组大熊猫口腔细菌的平均丰富度(ACE 指数)和多样性(Shannon 指数)均略高

表 1 圈养大熊猫口腔细菌的  $\alpha$  多样性指数

Table 4 The $\alpha$ diversity index of oral bacterial flora of captive giant pandas		
样本	ACE 指数	Shannon 指数
J1	724.83	5.881 7
J2	567.69	4.490 4
J3	872.38	4.666 1
G1	630.04	5.573 5
G2	530.90	4.509 2
G3	585.83	4.520 2

于老年体组的,但 2 组间的差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.3.2  $\beta$  多样性分析

从图 2 可知,2 组样本的分布均没有表现出明显的聚集现象,且老年体组的样本间的距离较亚成体组的更远。Anoism 分析结果显示不同个体大熊猫之间可能存在一定差异,但 2 组之间的差异无统计学意义( $R<0, P>0.05$ )。

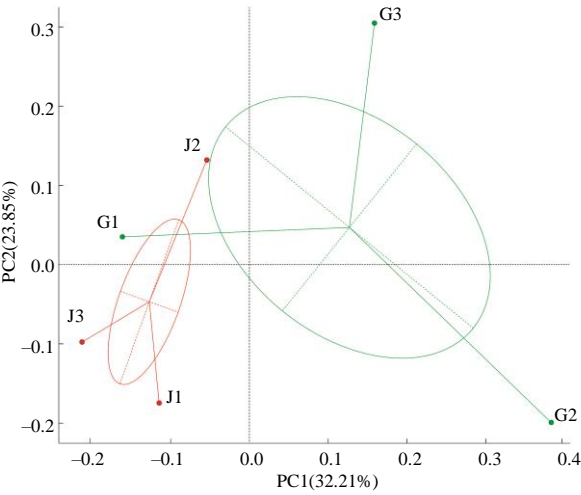


图 2 基于非加权距离分析的圈养大熊猫口腔细菌的 PCoA 结果

Fig.2 PCoA plot of oral bacterial flora of captive giant pandas based on unweighted unifrac analysis

2.3.3 大熊猫口腔中的差异性细菌

从图 3 可知,2 个年龄段中最具代表性的差异

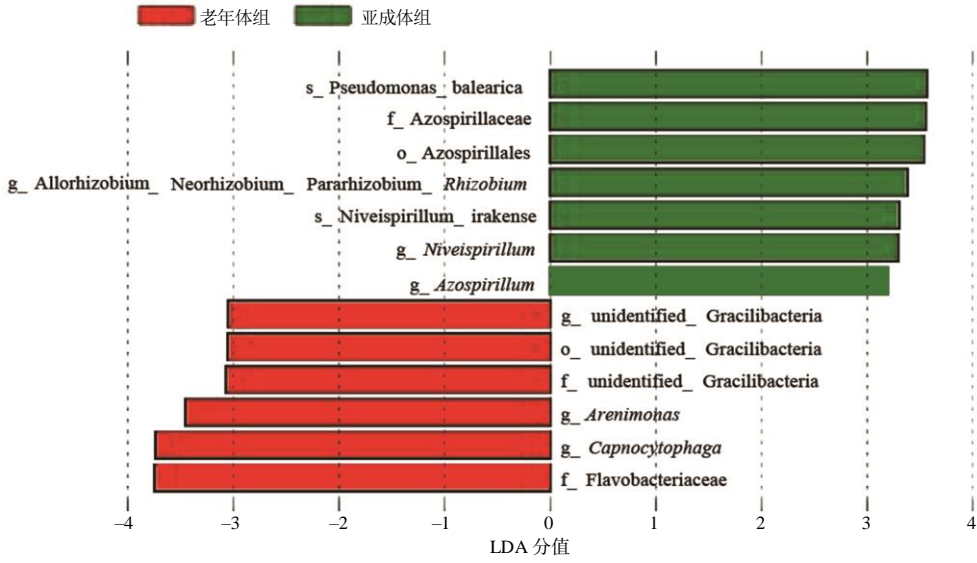


图 3 亚成体组与老年体组大熊猫口腔细菌群落的 LefSe 分析结果

Fig.3 LefSe analysis of oral bacterial community in sub-adult and elderly giant pandas



性菌属在亚成体组中有 *Niveispirillum*、固氮螺菌属(*Azospirillum*)与根瘤菌属(*Rhizobium*)，在老年体组中则有气单胞菌属(*Arenimonas*)和二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*)，但它们的相对丰度均不高，分别为 0.39%、0.30%、0.65%、0.22%、0.22%。

## 2.4 亚成体与老年体大熊猫口腔中的潜在致病细菌

在大熊猫口腔唾液样本的测序数据中，发现包括链球菌属、放线菌属(*Actinomyces*)、卟啉单胞菌属(*Porphyromonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、密螺旋体属(*Treponema*)、*Saccharibacteria*、摩根氏菌属(*Morganella*)和韦荣球菌属(*Veillonella*)等致病或与疾病密切相关的细菌存在于大熊猫口腔中，这些潜在致病细菌的分布热图如图 4 所示。在 6 个样本中，G1 口腔中的链球菌属、卟啉单胞菌属和放线菌属的相对丰度最高；J1 和 G3 的口腔中也存在较多的链球菌属；J2 和 G3 口腔中则存在较高丰度的葡萄球菌属。总体来说，链球菌属、放线菌属、卟啉单胞菌属和葡萄球菌属在大熊猫口腔中的相对丰度较高。

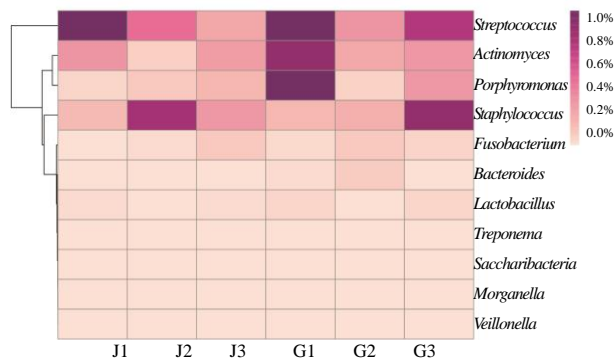


图 4 圈养大熊猫口腔潜在致病细菌的分布热图

Fig.4 Heat map of the distribution of potential oral pathogens of captive giant pandas

## 3 结论与讨论

本研究中，圈养大熊猫口腔中的细菌以变形菌门为主，平均占比超过 50%，依次还有蓝细菌门、放线菌门、厚壁菌门和拟杆菌门等；主要属为放线杆菌属、劳特罗普氏菌属、假单胞菌属、莫拉氏菌属、奈瑟氏菌属、链球菌属和不动杆菌属等。在以往关于大熊猫口腔细菌的分离培养研究中，葡萄球菌属、链球菌属已被发现是大熊猫口腔中的优势菌属<sup>[13]</sup>。在人口腔中，门水平以厚壁菌门和拟杆菌门

为主，属水平以链球菌属、韦荣球菌属(*Veillonella*)和普雷沃菌属(*Prevotella*)为主<sup>[21]</sup>。可见，大熊猫口腔的细菌群落结构与人的有着较明显的差异。

口腔菌群的变化与多种因素相关，遗传、时间、年龄、饮食以及环境等都会在一定程度上影响口腔菌群<sup>[15,22-24]</sup>。本研究中，大熊猫亚成体组和老年体组之间相同的 OTUs 数占全部 OTUs 数的 59.8%。这说明大熊猫口腔中存在相当数量的稳定细菌群落，这些细菌群落不随年龄的改变而发生明显变化，较长时间持续存在于大熊猫口腔之中。

$\alpha$  多样性分析结果显示，亚成体组的 ACE、Shannon 指数略高于老年体组的，这说明随着年龄的增加，大熊猫口腔中细菌的多样性和丰富度略有降低，但 2 组间的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。这可能是由于采样大熊猫所处的环境都是相似的圈养环境，且采样的亚成体大熊猫年龄均接近 3 岁，已经基本度过了食性转换期，完成了由高蛋白饮食(如母乳或牛奶等)向竹类等高纤维素食物为主食的转化过程，饮食结构与老年体大熊猫的相似，这种相似的环境与饮食条件可能会导致口腔菌群的相似<sup>[25-26]</sup>。

$\beta$  多样性分析的结果显示，亚成体组和老年体组的样本分布并没有表现出明显的聚集现象，不同个体大熊猫之间的差异甚至要更加明显( $R<0$ ， $P>0.05$ )，这说明大熊猫口腔菌群可能有着明显的个体差异。

LEfSe 分析结果显示，2 组大熊猫口腔中差异最明显的细菌属有亚成体组中的 *Niveispirillum*、固氮螺菌属与根瘤菌属，老年组中的气单胞菌属和二氧化碳噬纤维菌属，但这些具有明显差异的细菌相对丰度( $<1\%$ )均不高，并不是口腔中的优势细菌。

本研究中，大熊猫口腔唾液样本中相对丰度较高的潜在致病细菌有链球菌属、放线菌属、卟啉单胞菌属和葡萄球菌属等。其中，链球菌尤其是变形链球菌(*Streptococcus mutans*)会对口腔环境进行过度酸化，被认为是造成龋齿的特异性病原菌<sup>[7]</sup>。放线菌属和卟啉单胞菌属也被认为与龋齿的发生有着密切关联，可作为潜在的生物标志物用于辅助诊断<sup>[27]</sup>。龋齿是产酸菌和可发酵碳水化合物之间相互作用的结果，经常摄入高水平的碳水化合物会导致产酸量增加，唾液缓冲能力下降，以及低 pH 环境。

口腔环境酸化是引起龋齿发展过程中微生物发生变化的主要原因之一<sup>[28-29]</sup>。圈养大熊猫在人工饲养条件下会比野生大熊猫摄入更多的碳水化合物。虽然这种措施能够丰富大熊猫的营养摄入,但也可能会导致更高的龋齿发生风险。在本次研究的6只大熊猫中,G1口腔中的链球菌属、放线菌属和卟啉单胞菌属的相对丰度高于其他大熊猫的,J1和G3的口腔中也含有较多的链球菌属,这可能预示着这3只大熊猫发生龋齿的风险会更高,需要密切观察它们的牙齿健康情况并调整饮食。J2和G3口腔中较高丰度的葡萄球菌属则有可能导致发生口腔黏膜感染以及下呼吸道感染的风险上升<sup>[30]</sup>。

大熊猫口腔唾液样本中还有梭杆菌属(能引起口腔黏膜感染<sup>[31]</sup>)、拟杆菌属(与牙周炎相关<sup>[27]</sup>)、乳杆菌属(与龋齿的发生相关<sup>[27]</sup>)、密螺旋体属(与牙周病的发生相关<sup>[27]</sup>)、*Saccharibacteria*(与口腔黏膜感染相关<sup>[32]</sup>)、摩根氏菌属(与口腔黏膜感染相关<sup>[33]</sup>)和韦荣球菌属(与龋齿的发生相关<sup>[27]</sup>)等与口腔疾病或者全身疾病密切相关的细菌存在,不过它们的相对丰度较低(<0.5%)。当大熊猫机体处于健康状态时,这些细菌并不会对大熊猫造成影响,但机体状态改变,免疫力下降或者营养状况不良时,则有可能转变成致病菌,危害大熊猫的健康。

#### 参考文献:

- [1] MA X P, LI C C, HOU J F, et al. Isolation and identification of culturable fungi from the genitals and semen of healthy giant pandas(*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. BMC Veterinary Research, 2017, 13(1): 344.
- [2] KILIAN M, CHAPPLE I L, HANNIG M, et al. The oral microbiome: an update for oral healthcare professionals [J]. British Dental Journal, 2016, 221(10): 657-666.
- [3] SOLBIATI J, FRIAS-LOPEZ J. Metatranscriptome of the oral microbiome in health and disease[J]. Journal of Dental Research, 2018, 97(5): 492-500.
- [4] ZARCO M F, VESS T J, GINSBURG G S. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine[J]. Oral Diseases, 2012, 18(2): 109-120.
- [5] SAMPAIO-MAIA B, CALDAS I M, PEREIRA M L, et al. The oral microbiome in health and its implication in oral and systemic diseases[J]. Advances in Applied Microbiology, 2016, 97: 171-210.
- [6] GROSS E L, LEYS E J, GASPAROVICH S R, et al. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(11): 4121-4128.
- [7] MA C, CHEN F, ZHANG Y F, et al. Comparison of oral microbial profiles between children with severe early childhood caries and caries-free children using the human oral microbe identification microarray[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0122075.
- [8] SOCRANSKY S S, HAFAJEE A D, CUGINI M A, et al. Microbial complexes in subgingival plaque[J]. Journal of Clinical Periodontology, 1998, 25(2): 134-144.
- [9] GAO L, XU T S, HUANG G, et al. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body[J]. Protein & Cell, 2018, 9(5): 488-500.
- [10] MA R, HOU R, GUO J L, et al. The plaque microbiota community of giant panda(*Ailuropoda melanoleuca*) cubs with dental caries[J]. Frontiers In Cellular And Infection Microbiology, 2022, 12: 866410.
- [11] YANG S Z, GAO X, MENG J H, et al. Metagenomic analysis of bacteria, fungi, bacteriophages, and helminths in the gut of giant pandas[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1717.
- [12] MA X P, LI G, YANG C, et al. Skin microbiota of the captive giant panda(*Ailuropoda melanoleuca*) and the distribution of opportunistic skin disease: associated bacteria in different seasons[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 666486.
- [13] 冯帆. 圈养大熊猫口腔源葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- [14] 喻述容, 余建秋, 李光汉, 等. 大熊猫幼仔口腔分泌物中检出聚团肠杆菌和微球菌[J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(3): 286-287.
- [15] ANUKAM K C, AGBAKOBA N R. A comparative study of the oral microbiome compositions of healthy postmenopausal, premenopausal, and prepubertal Nigerian females, using 16s rRNA metagenomics methods[J]. Nigerian Journal of Clinical Practice, 2017, 20(10): 1250.
- [16] BURCZYNSKA A, DZIEWIT L, DECEWICZ P, et al. Application of metagenomic analyses in dentistry as a novel strategy enabling complex insight into microbial diversity of the oral cavity[J]. Polish Journal of Microbiology, 2017, 66(1): 9-15.
- [17] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [18] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [19] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics[J]. Peer J, 2016, 4: e2584.
- [20] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996-998.

- [21] KEIJSER B J F, ZAURA E, HUSE S M, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults[J]. *Journal of Dental Research*, 2008, 87(11): 1016–1020.
- [22] AN J Y, DARVEAU R, KAEBERLEIN M. Oral health in geroscience: animal models and the aging oral cavity[J]. *GeroScience*, 2018, 40(1): 1–10.
- [23] LASSALLE F, SPAGNOLETTI M, FUMAGALLI M, et al. Oral microbiomes from hunter-gatherers and traditional farmers reveal shifts in commensal balance and pathogen load linked to diet[J]. *Molecular Ecology*, 2018, 27(1): 182–195.
- [24] 唐灿, 刘诗雨, 程磊. 口腔微生物群落结构的影响因素[J]. *口腔疾病防治*, 2020, 28(6): 390–393.
- [25] SHAW L, RIBEIRO A L R, LEVINE A, et al. The human salivary microbiome is shaped by shared environment rather than genetics: evidence from a large family of closely related individuals[J]. *mBio*, 2017, 8(5): e01237–17.
- [26] LI F, TAO D Y, FENG X P, et al. Establishment and development of oral microflora in 12–24 month-old toddlers monitored by high-throughput sequencing[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 422.
- [27] AAS J A, GRIFFEN A L, DARDIS S R, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(4): 1407–1417.
- [28] SELWITZ R H, ISMAIL A I, PITTS N B. Dental caries[J]. *The Lancet*, 2007, 369: 51–59.
- [29] TAKAHASHI N, NYVAD B. The role of bacteria in the caries process[J]. *Journal of Dental Research*, 2011, 90(3): 294–303.
- [30] MCCORMACK M G, SMITH A J, AKRAM A N, et al. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection?[J]. *American Journal of Infection Control*, 2015, 43(1): 35–37.
- [31] BRENNAN C A, GARRETT W S. *Fusobacterium nucleatum*: symbiont, opportunist and oncobacterium[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(3): 156–166.
- [32] BOR B, BEDREE J K, SHI W, et al. *Saccharibacteria* (TM7) in the human oral microbiome[J]. *Journal of Dental Research*, 2019, 98(5): 500–509.
- [33] LIU H, ZHU J M, HU Q W, et al. *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2016, 50: 10–17.

责任编辑: 邹慧玲  
英文编辑: 柳 正

(上接第 283 页)

- [8] 赖秀清, 林桂华, 童旭华, 等. 烤烟上部叶带茎烘烤的技术研究[J]. *中国烟草科学*, 2006, 27(1): 29–31.
- [9] 刘奕平, 陈德清, 何健, 等. 一种在遮光环境内用水养熟烟叶的调制方法: CN110693060A[P]. 2020–01–17.
- [10] GB 2635—1992 烤烟[S].
- [11] YC/T 216—2007 烟草及烟草制品 淀粉的测定 连续流动法[S].
- [12] YC/T 159—2002 烟草及烟草制品 水溶性糖的测定 连续流动法[S].
- [13] YC/T 160—2002 烟草及烟草制品 总植物碱的测定 连续流动法[S].
- [14] YC/T 161—2002 烟草及烟草制品 总氮的测定 连续流动法[S].
- [15] YC/T 249—2008 烟草及烟草制品 蛋白质的测定 连续流动法[S].
- [16] 徐茜, 陈辉, 刘雪刚, 等. 影响南平烤烟生产气象因子的灰色因素分析与应用[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2010, 39(4): 337–340.
- [17] 孙光伟, 陈振国, 饶勇, 等. 烤烟晾晒变黄时间对烟叶烘烤效果的影响[J]. *中国烟草科学*, 2015, 36(3): 90–94.
- [18] 杨兴有, 刘国顺. 成熟期光强对烤烟理化特性和致香成分含量的影响[J]. *生态学报*, 2007, 27(8): 3450–3456.
- [19] 徐超华, 李军营, 崔明昆, 等. 延长光照时间对烟草叶片生长发育及光合特性的影响[J]. *西北植物学报*, 2013, 33(4): 763–770.
- [20] 杨永霞, 张嘉炜, 贾宏昉, 等. 成熟期温度对烟叶质体色素积累及香气成分的影响[J]. *烟草科技*, 2016, 49(5): 16–22.
- [21] 郑小雨, 白森, 祁春苗, 等. 烤烟上部叶的生态环境匹配度分析[J]. *河南农业大学学报*, 2020, 54(3): 520–525.
- [22] 柳文凤, 涂云, 权佳峰, 等. 烤烟成熟期不同温度对烟叶有机酸积累倾向的影响[J]. *贵州农业科学*, 2018, 46(7): 30–33.
- [23] 徐立猛, 于志军, 刘衡, 等. 建平地区烟叶烘烤损失成因调查研究[J]. *园艺与种苗*, 2021, 41(11): 64–66.
- [24] 仙立国, 黄一兰, 王松峰, 等. 烤烟品种翠碧一号上部叶适宜采收方式研究[J]. *中国烟草科学*, 2020, 41(4): 90–94.
- [25] 韦克苏, 蒋石香, 颜杭, 等. 采收成熟度对提高上部烟叶可用性的影响: 基于细支卷烟原料需求[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(23): 204–209.
- [26] 高真真, 刘扣珠, 李建华, 等. 成熟期积温对豫中烟区浓香型烤烟上六片产质量的影响[J]. *中国烟草学报*, 2019, 25(6): 38–49.

责任编辑: 罗慧敏  
英文编辑: 罗 维