

基于培养法与16S rRNA测序的华北地区规模化牧场原料乳嗜冷菌多样性综合分析

杨 波^{1, 3}, 栗 慧^{1, 2, 3}, 王青山³, 武二斌⁴, 魏 东^{1, 2, 3*}

(1.河北北方学院河北省农产品食品质量安全分析检测重点实验室, 河北张家口 075000; 2.河北北方学院张家口特色农产品质量安全重点实验室, 河北张家口 075000; 3.河北北方学院农林科技学院, 河北张家口 075000; 4.张家口市动物卫生监督所, 河北张家口 075000)

摘 要: [目的]调查不同牧场、不同生产时间乳制品原料中嗜冷菌菌群结构组成和嗜冷微生物多样性。[方法]采集36份华北地区规模化牧场原料乳样品, 利用16S rRNA测序与传统分离培养的方法, 探讨不同牧场在不同季节生产的原料乳中菌群结构的变化关系以及嗜冷菌的多样性。[结果]利用传统培养技术对36份样品中的嗜冷菌进行分离和鉴定, 共归类到23个属和474个种, 其中假单胞菌属、不动杆菌属、黄杆菌属、莱茵海默氏菌、嗜冷杆菌属及肠杆菌属在属水平的占比依次递减。嗜冷菌的浓度范围在1.71~3.78 lgCFU/mL之间, 平均浓度为2.79 lgCFU/mL。36份样品利用16S rRNA扩增子测序分析共注释到37门、90纲、214目、358科、740属和12 301种, 微生物多样性丰度前十的优势属为不动杆菌、埃希氏菌属、代尔夫特食酸菌、产气单胞菌属、假单胞菌属、UCG-005菌属、链球菌属、普拉梭菌、棒杆菌属、黄杆菌属。[结论]嗜冷菌的浓度和微生物多样性在不同牧场、不同时间生产原料乳中嗜冷菌菌群结构组成和嗜冷微生物的多样性差异较大。本研究为华北地区原料乳中嗜冷菌微生物多样性的理论研究提供依据, 为华北地区牧场制定差异化嗜冷菌防控策略提供了数据支持。

关键词: 嗜冷菌; 原料乳; 微生物多样性

文章编号: 1671-4393 (2026) 02-0087-09

DOI:10.12377/1671-4393.26.02.14

Comprehensive Analysis of the Diversity of Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk of Large-scale Dairy Farms in North China Based on the Culture Method and 16S rRNA Sequencing

YANG Bo^{1, 3}, LI Hui^{1, 2, 3}, WANG Qingshan³, WU Erbin⁴, WEI Dong^{1, 2, 3*}

(1.Hebei Key Laboratory of Agricultural Products and Food Quality Safety Analysis and Testing, Hebei

基金项目: 河北省农产品食品质量安全分析检测重点实验室绩效补助经费项目 (22567613H); 河北省农业科技成果转化资金项目 (2025JNZ-S22)

作者简介: 杨 波 (1987-), 男, 河北石家庄人, 在读硕士, 研究方向为食品加工与安全;
栗 慧 (1992-), 女, 河北张家口人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为食品加工与安全;
王青山 (1982-), 男, 河北石家庄人, 在读硕士, 研究方向为食品加工与安全;
武二斌 (1976-), 男, 河北张家口人, 本科, 推广研究员, 研究方向为畜禽标准化养殖技术。

***通信作者:** 魏 东 (1971-), 男, 河北张家口人, 博士, 研究员, 研究方向为药物残留检测。

North University, Zhangjiakou Hebei 075000; 2.Zhangjiakou Key Laboratory of Quality and Safety of Characteristic Agricultural Products, Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075000; 3.College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075000; 4.Zhangjiakou Animal Health Supervision Institute, Zhangjiakou Hebei 075000)

Abstract: [Objective]To investigate the composition of psychrotrophic bacterial communities and the diversity of psychrotrophic microorganisms in dairy raw materials from different pastures and at different production times.[Method]36 raw milk samples were collected from large-scale pastures in North China.To investigate the alterations in bacterial community composition and the variety of psychrotrophic bacteria in raw milk from various pastures and seasons, researchers employed both 16SrRNA sequencing and conventional isolation and culture techniques.[Result]From the 36 samples, psychrotrophic bacteria were obtained and classified through conventional culturing techniques, identifying 474 species across 23 genera. At the genus level, the proportions were in the order of *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Rheinheimera*, *Psychrobacter*, and *Enterobacter*. The concentration of psychrotrophic bacteria ranged from 1.71 to 3.78 lgCFU/mL, with an average concentration of 2.79 lgCFU/mL. Analysis of the 36 samples using 16SrRNA amplicon sequencing annotated a total of 37 phyla, 90 classes, 214 orders, 358 families, 740 genera and 12 301 species. The top 10 dominant genera in terms of microbial diversity abundance were *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Delftia acidovorans*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, UCG-005, *Streptococcus*, *Faecalibacterium*, *Corynebacterium* and *Flavobacterium*. [Conclusion]Substantial variations were observed in the levels of psychrotrophic bacteria, the structure of psychrotrophic bacterial communities and the diversity of psychrotrophic microorganisms in raw milk sourced from various pastures and at various times. This research lays the groundwork for theoretical investigations into the microbial variety of psychrotrophic bacteria found in raw milk in Northern China and supplies data assistance for farms in the area to develop tailored strategies for managing and preventing psychrotrophic bacteria.

Keywords: psychrotrophic bacteria; raw milk; microbial diversity

牛乳营养丰富，是世界上消费量最大的乳制品原料^[1]。原料乳作为乳制品的基础，其质量直接关系到最终产品的品质与安全。嗜冷菌是一类能够在低温环境下快速生长繁殖的微生物，在原料乳的冷藏储存与加工过程中扮演着重要角色。近年来，随着对原料乳质量要求不断提高，原料乳中嗜冷菌相关研究受到了广泛关注。

已有诸多研究对嗜冷菌与原料乳质量间关系展开分析。如Ahmed等^[2]对不同规模牧场原料乳样品进行研究，发现在储存0 天至第3周的冷藏乳样中，嗜冷菌数量没有显著变化且相对较低，而从第3周开始，嗜冷菌数量迅速上升，至28 天，嗜冷菌数量升至7.35 lgCFU/mL，然而在不同规模牧场采集的原料

乳中，嗜冷菌的数量显著不同 ($P<0.01$)，表明牧场不同的饲养管理模式是导致乳中嗜冷菌数量不同的原因。

此外，探究原料乳中嗜冷菌的种类组成和多样性也具有重要研究价值。Du等^[3]结合传统的微好氧培养和PacBio单分子实时测序技术对我国不同省份原料乳进行调查，检测其中嗜冷菌具有较高的物种多样性和种群组成，共鉴定21 个属59 个种。其中以假单胞菌属最为突出，占58.9%。不同产地的原料乳中嗜冷菌种类组成具有差异性。该研究为未来建立有针对性的嗜冷菌控制策略提供了指导。

嗜冷菌分泌的胞外酶对原料乳质量安全的也有显著影响。在低温储藏条件下，嗜冷菌分泌的蛋白

酶可水解原料乳及其蛋白质,影响乳制品的风味和产品品质。虽然目前对嗜冷菌的研究已有一定成果,但对嗜冷菌在原料乳中的生长控制机制和胞外酶作用机理,以及建立高效的嗜冷菌综合防控技术体系等,还亟待研究人员系统性、深入地开展研究。

本研究采集华北地区3个规模化牧场的36份生乳样品,通过16S rRNA测序技术和传统分离培养结合的方法,分析了生乳中嗜冷菌的群体数量、菌群结构和牧场、季节差异。通过16S rRNA测序技术全面展示生乳中嗜冷菌的微生物组成情况及其相互关系,为华北地区规模化牧场制定嗜冷菌防控措施提供科学依据和数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

生乳样品来自华北的3个规模化牧场(标记为A、B、C),分别采集于3个牧场的冷链运输奶罐车;其中每个季节春季、夏季、秋季和冬季各采集3个,共计36个样本。牧场A春、夏、秋、冬样品记录为A1、A2、A3、A4,另外2个牧场编号以此类推。装有样本的灭菌三角瓶置于有冰袋的保温箱中保存,送至微生物室进行无菌分装、检测。

MPC琼脂培养基,青岛海博生物技术有限公司;离心柱试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;磷酸盐缓冲液,北京陆桥技术股份有限公司;通用引物27F、1492R,生工生物工程(上海)股份有限公司;建库试剂盒(The NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit),美国New England Biolabs (NEB)公司。

1.2 主要仪器设备

SW-CJ-2FD洁净工作台,苏州尚田洁净技术有限公司;DDY-6C电泳仪,北京市六一生物技术有限公司;TMS9001-450CN低温生化培养箱,浙江托莫斯科科技有限公司;MiniAmp Plus PCR仪,美国Thermo Fisher Scientific公司;T100 PCR仪,美国BIO-RAD公司;NovaSeq 6000测序上机仪器,美国Illumina公司。

1.3 试验方法

1.3.1 嗜冷菌一代测序——Sanger测序(多分子,单克隆)

(1)嗜冷菌计数及分离纯化。用无菌吸管取1 mL样品接入9 mL磷酸盐缓冲液中混匀,制成 10^{-1} 稀释度,连续进行3次10倍稀释,每个梯度均做2个MPC培养基平板倾注,在 $(6.5 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养箱中培养10天,进行计数嗜冷菌^[4]。再从计数的平板中挑选菌落大小、色泽、形状、边缘规则度、菌体形态等外观特性等不同的20个菌落于MPC平板上进行第1次纯化,再将经过第1次纯化培养的菌种接种在MPC试管小斜面上进行第2次纯化。连续3次纯化,得到较纯的单一菌落,随后挑取单一菌落进行扩大培养,并用含有20%甘油的管冻存于 -75°C 备检。

(2)嗜冷菌鉴定。用一次性10 μL 接种环挑取MPC试管小斜面第3次纯化的菌至无菌磷酸盐缓冲液中,充分振摇混匀,形成均匀的菌悬液。利用DNA提取试剂盒(离心柱)从细菌菌悬液中提取基因组,随后采用细菌通用引物27F和1492R对纯培养物进行PCR扩增^[5-9],之后送至河北本元生物科技有限公司进行正向、反向常规DNA测序分析^[10]。

1.3.2 16S rRNA测序技术

(1)样本DNA抽提。采用CTAB法对采集的36个样本进行微生物群落总基因组DNA抽提,并通过1%的琼脂糖凝胶电泳检测抽提基因组DNA的质量^[7, 11]。

(2)PCR产物获取。引物位置:16SV4(515F+806R)区,细菌多样性;18SV4(528F+706R)区,真核微生物多样性;ITS1(ITS5-1737F+ITS2-2043R)区,真菌多样性;扩增16SV3-V4、V4-V5、V5-V7等区域;古菌的16SV4-V5、V8;18SV9、ITS2。引物见表1。

每个PCR反应体系中加入15 μL Phusion高保真PCR主混合液、0.2 μmol 引物以及10 ng基因组DNA模板。首先在 98°C 下变性1 min,接着进行30个循环: 98°C 10 s、 50°C 30 s和 72°C 30 s。最后在 72°C 延伸5 min。

表 1 引物信息
Table 1 Primer Information

类型	区域	引物序列（5’ -3’ ）
细菌	16Sv4	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, GGACTACHVGGGTWTCTAAT
细菌	16Sv34	CCTAYGGGRBGCASCAG, GGACTACNNGGTATCTAAT
细菌	16Sv45	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, CCGTCAATTCCTTTGAGTTT
细菌	16Sv57	AACMGGATTAGATACCKG, ACGTCATCCACCTTCC
真核生物	18Sv4	GCGGTAATTCCAGCTCCAA, AATCCRAGAATTCACCTCT
真菌	ITS1-1F	CTTGGTCATTAGAGGAAGTA- A,GCTGCGTCTTCATCGATGC
真菌	ITS1-5F	GGAAGTAAAAGTCGTAA- CAAGG,GCTGCGTTCTTCATC- GATGC
真菌	ITS2	GCATCGATGAAGAACGCAGC, TCCTCCGCTTATTGATATGC
新古菌 V4	Novel-Ar- chaea-V4	CAGCCGCCGCGGTAA, GTGCTCCCCGCCAATTCCT

（3）PCR产物的合并与净化。利用磁珠对PCR产物进行纯化，按照其浓度进行等比例混合，充分混合均匀后，检测产物并回收所需条带。

（4）文库构建和上机测序。在文库构建完成后，通过Qubit和qPCR进行定量分析，确认文库符合标准后再进行上机测序。

1.3.3 生物信息分析

基于条形码序列和PCR扩增引物序列，从上述数据中提取出各样本数据；随后对双端数据进行合并，去除条形码和引物序列后，利用FLASH软件（版本1.2.11），将每个样本的reads进行合并，得到的合并序列被称为原始标签数据（RawTags）^[12]。随后，使用Cutadapt软件匹配并剪除反向引物序列，以避免其影响后续分析；通过fastp软件（版本0.23.1）对合并得到的RawTags进行严格的质量控制和过滤，确保获得高质量的标签数据（CleanTags）^[13]；经上述处理，对标签序列进行去除嵌合体序列的操作，标签序列通过与物种注释数据库（Silva数据库，[\[www.arb-silva.de/for\]\(https://www.arb-silva.de/for\) 16S/18S，Unite数据库，<https://unite.ut.ee/for> ITS）进行对比检测，识别并去除嵌合体序列，以获得最终的有效数据（EffectiveTags）^{\[14\]}；然后，对获取的EffectiveTags使用QIIME2软件中的DADA2模块进行噪声去除，从而得到最终的扩增子序列变异（Amplicon Sequence Variants，ASVs）和特征表^{\[15\]}；物种的注释通过QIIME2软件完成，其中16S和18S的数据库采用Silva138.1，而ITS则使用Unitev9.0数据库。对于非典型区域，使用micro_NT数据库（从NT库中提取的古菌、真菌、病毒、细菌子库）进行注释。](https://</p></div><div data-bbox=)

1.3.4 微生物多样性研究分析

采用诺禾致源云平台（<https://cn.novogene.com/>）和Origin2024b进行所有数据分析。

1.4 数据分析

数据以平均值加减标准差（SD）的形式展示；采用IBMSPSS Statistics统计软件版本29.0.1.0（171）进行单样本t检验，以计算不同样本之间的嗜冷菌计数结果；利用NCBI（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）数据库中的NucleotideBLAST工具对一代测序所得的序列进行物种信息的鉴定。

2 结果

2.1 基于分离培养方法对嗜冷菌进行分析

运用（6.5±1）℃培养10天的方法对36份样本中的嗜冷菌含量进行检测。结果显示，嗜冷菌含量

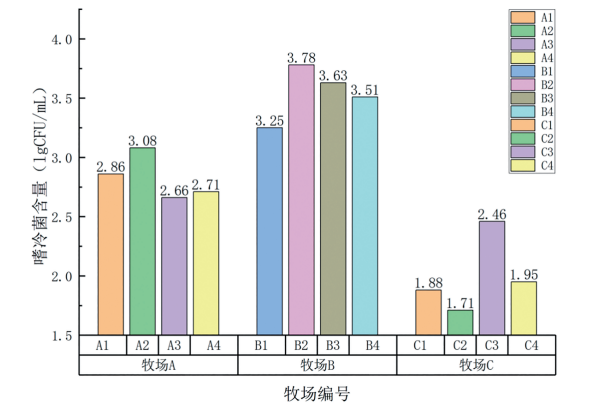


图 1 各样本嗜冷菌含量
Figure 1 Content of Psychrotrophic Bacteria in Each Sample

1.71~3.78 lgCFU/mL，平均2.79 lgCFU/mL，见图1。其中牧场B中嗜冷菌平均含量最高，说明不同的牧场因卫生管理差异、风险控制措施差异及冷链物流车管理的差异，造成环境和原料乳的菌量较高。

2.2 嗜冷菌鉴定

在实验室检测及培养样本36个，依据菌落大小、色泽、形状、边缘规则度、菌体形态等外观特性，选出典型性状菌落，连续纯化3代，最终分离出20种。进行一代测序，对测序序列通过NCBI网站对比，得出数据（图2），分离鉴定出23个属（474种）。牧场A分离出17个属（219种）；牧场B分离出22个属（336种）；牧场C分离出13个属（156种）。结合上述分析结果，牧场B样本中嗜冷菌的平均含量最高，说明该牧场中嗜冷菌的物种组成比其他牧场更为丰富，反映了该牧场因卫生管理、风险控制措施及冷链物流管理等差异，造成环境和原料乳的物种丰度较高，牧场B应着重改善卫生管理、风险管控、冷链物流车管理等，从而降低嗜冷菌含量。在36个样本的分离分析中，假单胞菌属、不动杆菌属、黄杆菌属、莱茵海默氏菌、嗜冷杆菌属和肠杆菌属是分离频率最高的属；其中荧光假单胞菌、鲁氏不动杆菌属、黄杆菌、莱茵海默氏菌、嗜冷杆菌和肠杆菌是分离频率较高的种^[15, 16]；在分析36个样

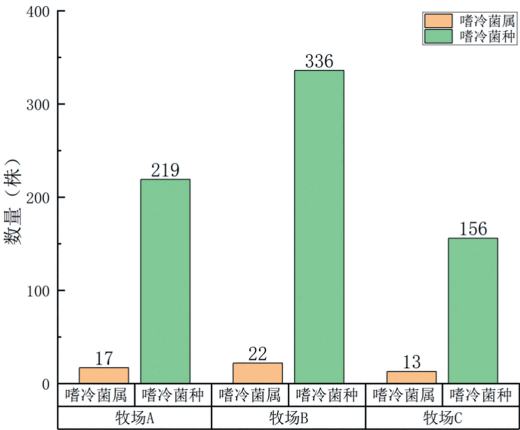


图2 各样本中分离鉴定出嗜冷菌的属种多样性
Figure 2 Diversity of Genera and Species of Psychrophilic Bacteria Isolated from Each Sample

本时，在32个样本中鉴定出186株荧光假单胞菌和92株嗜冷假单胞菌，荧光假单胞菌在种水平上是所有样本中占比最高的菌株^[7]。

2.3 利用一代测序技术分析样本中的微生物多样性

采用一代测序方法对36个样本的物种多样性进行了测试。根据不同牧场不同季节的香农指数得出，所有样本的曲线均趋于平缓，表明测序深度足以反映样本的微生物群落多样性，该结果合理、真实、有效，牧场A、牧场B、牧场C的香农指数存在显著差异，能够反应出微生物群落结构的复杂性和均匀度具有明显的样本间异质性，间接反应各个牧场的管理现状。物种多样性牧场B>牧场A>牧场C（图3）。牧场B因卫生管理差异、风险控制措施差异及冷链的物流车管理等差异，造成原料乳中物种多样性较高。

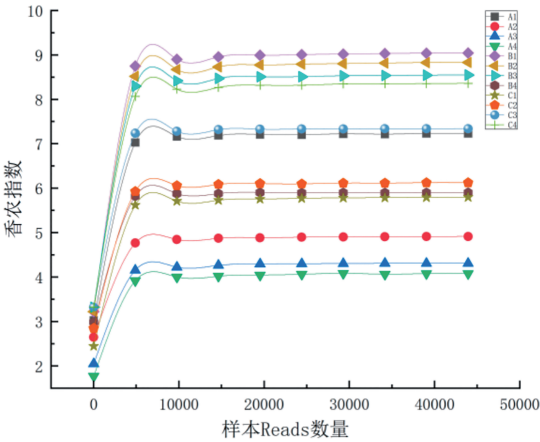


图3 各种样本香农指数稀释曲线
Figure 3 Dilution Curves of Shannon Index for Each Sample

Rank-Abundance曲线可用于描述样本中物种丰富度与群落均匀度。如图4所示，物种的多样性水平越高，曲线在水平方向的延伸范围越大；曲线越光滑，该样本中物种分布越均匀^[17]。从图4曲线得出，牧场B物种多样性水平最高、分布最均匀，微生物种类牧场B>牧场A>牧场C，因此需从卫生管理差异、风险控制措施的差异以及冷链物流车等差异，采取相应的管理措施进行改善，杜绝微生物对乳及乳制品质量产生影响。

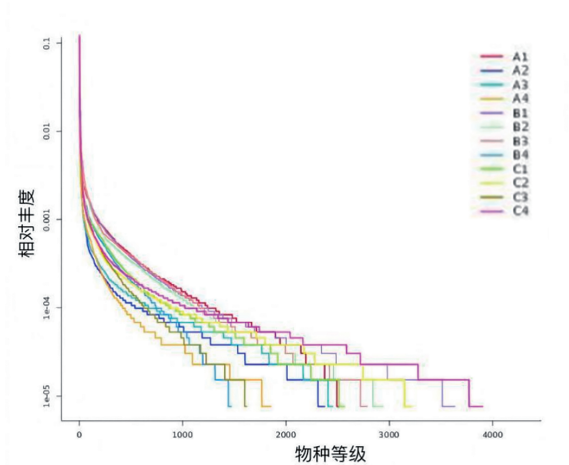


图 4 各样本物种丰度等级曲线

Figure 4 Curve of Abundance Levels for Each Sample Species

运用16S rRNA测序结果，一共得到724 598 条双端reads，经过双端拆分、双端reads拼装、去嵌合体及单序列、序列去重等处理，得到最终有效数据。使用QIIME2软件的DADA2插件降噪，降噪步骤包括噪音过滤和错误纠正，最终获取得到的ASVs及特征表。随后使用QIIME2软件对测序reads物种注释，并进行下一步处理。经过DADA2降噪处理后，36 个样本共产生683 671 条序列，每个样品序列数量为49 117~97 930，最终获得12 301 个ASVs。

2.3.1 维恩图对比分析

通过统计分析多个样本中共同和独特的微生物种类数量，韦恩图可直观展示样本之间微生物种类组成的相似性和重叠程度^[7]。对3 个牧场不同季节的原料乳样本进行系统、全面的分析，图5（a）显示，牧场A原料乳样本中共有275 种细菌，A1样本的

多样性水平最高，拥有2 530 种微生物。A1样本中特有物种有1 307 种，而A2、A3、A4样本中的特有物种数量约为1 200 种。基于微生物的多样性，原料乳的质量在不同季节间存在一定差异。

图5（b）展示了牧场B原料乳样本中微生物的构成。牧场B原料乳样本在菌种层面共有403 种。其中，B1样本的多样性水平最高，拥有3 759 种微生物。B1样品中特有的物种有1 740 种，B2样本中有702 种，B3样本中有1 102 种，B4样本中有1 038 种。不同季节的原料乳质量有较大差异，其中B2样本所属B牧场（夏季）微生物管控效果最佳。

图5（c）展示了牧场C原料乳样本中微生物的构成。牧场C原料乳在菌种层面共有478 种。其中，C2样本的多样性水平最高，达3 998 种。C1样本中特有的物种有107 种，C2样本中有2 088 种，C3样本中有1 539 种，C4样本中有571 种。基于微生物多样性分析，不同时段的原料乳质量有明显差异，其中C1样本所属牧场（春季）微生物管控效果最佳。

图5（d）展示了牧场A、牧场B和牧场C原料乳中微生物的构成。3 个牧场不同季节的原料乳在微生物种层面上共有1 805 种，牧场C样本中含量最高，拥有7 624 种。牧场A样本中特有的菌种有3 192 种，牧场B样本中有3 756 种，牧场C样本中有3 981 种。基因微生物多样性分析，不同牧场的原料乳品质存在显著差异。通过对以上菌群进一步研究分析发现，部分菌群能够产生耐热的碱性金属蛋白酶、脂肪酶和磷脂酶，导致原料乳变色、产生异味、黏

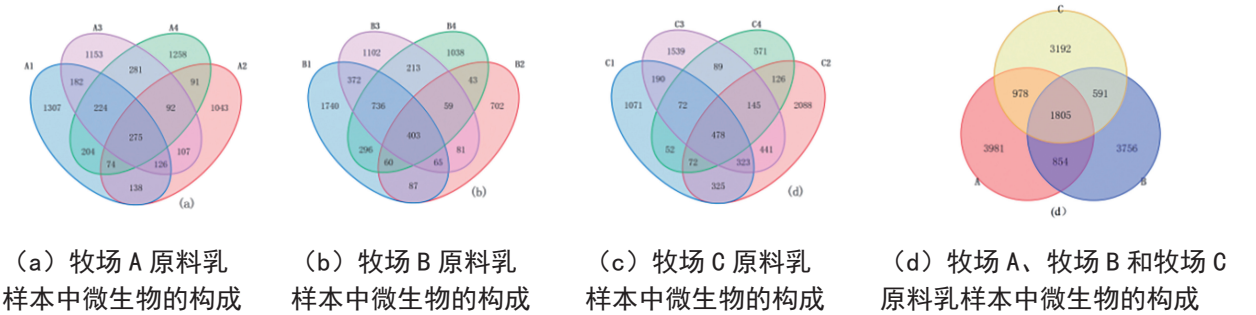


图 5 各牧场原料乳样本中微生物的构成

Figure 5 Composition of Microorganisms in Raw Milk Samples from Each Pasture

度增加、凝胶化和酸败。蛋白酶主要作用于分解乳中酪蛋白，释放氨基酸，带来苦味并引发凝胶化过程。同时，脂肪酶能够分解甘油三酯，促进脂肪的氧化，使牛乳产生浓烈的苦味和腐臭味，导致脂肪上浮并使牛奶变得酸涩。此外，微生物会产生可以破坏乳脂肪球膜（MFGM）的酶，释放出包括脂蛋白脂酶和碱性磷酸酶在内的脂类和蛋白质，以及附着在MFGM上的内源酶。因而，微生物和内源酶共同影响牛乳的营养成分，最终导致牛乳质量下降直至腐败。

原料乳中所含物种多样性越高，在运输和储存过程中发生品质下降的风险就越高。因此，需通过改善原料乳储运过程中的环境条件和时间参数等，以有效抑制原料乳的劣变。

2.3.2 群落柱状图构成的分类分析结果

使用16S rRNA测序技术对样本进行微生物多样性分析^[7]。从36个样本中分离出细菌种群，涵盖37个门、90个纲、214个目、358个科、740个属以及12 301个种。图6展示了在属水平上相对丰度最高的牧场，图例按微生物丰度从高到低排序，从图中可见，微生物多样性中丰度排名前十的优势属包括不动杆菌、埃希氏菌属、代尔夫特食酸菌、产气单胞菌属、假单胞菌属、UCG-005菌属、链球菌属、普拉梭菌、棒杆菌属和黄杆菌属^[7]。其中，假单胞菌属和黄杆菌属在相关研究中被认定为原料乳中嗜冷菌

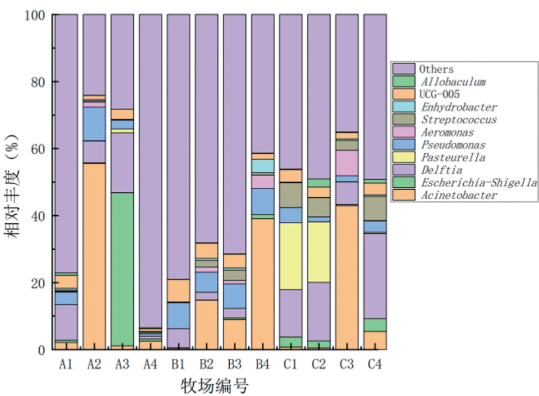


图 6 各牧场原料乳样本中微生物分类分析结果
Figure 6 Microbial Classification Analysis Results of Raw Milk
Samples from Each Pasture

的优势菌^[3]，大多数能产生耐高温的蛋白酶和脂肪酶等胞外水解酶。特别是假单胞菌属，其为嗜冷菌的核心种群，严重影响乳及乳制品质量，表现为营养价值降低、不良风味（如苦味和酸败味）、液态乳的凝胶化和乳制品货架期缩短等^[18]。假单胞菌分泌的碱性蛋白酶在超高温瞬时灭菌（UHT）处理后仍保留40%活性^[19]，这可能导致苦味的形成^[15]。此外，不动杆菌、埃希氏菌属、代尔夫特食酸菌和产气单胞菌属在原料乳中也普遍存在^[7]。

3 讨论

原料乳中的嗜冷菌会产生耐热性较强的蛋白水解酶与脂肪分解酶，这类酶即使在热处理后仍具有活性，可能会对乳制品，尤其是UHT奶的质量和保质期造成一定影响^[20]。因此研究原料乳中嗜冷菌的多样性和结构，才能从原料乳源头管控污染。本文旨在通过16S rRNA测序与传统分离培养方法相结合，对华北地区不同牧场不同季节原料乳中嗜冷菌的多样性和结构组成进行探究，为该地区原料乳中嗜冷菌群落多样性研究提供数据参考，并为我国从牧场原料乳源头实施嗜冷菌防控策略提供理论支持。

在《T/DAC003-2017 中国奶业协会团体标准 学生饮用奶 生牛乳》中，原料乳中嗜冷菌数量要求≤1 万CFU/mL^[21]。在本研究检测的36个原料乳样本中，嗜冷菌含量为1.71~3.78 lgCFU/mL，平均含量为2.79 lgCFU/mL，均满足食品国家相关标准。研究表明，嗜冷菌的浓度差异可能与奶牛饲养环境、水源、挤奶环境、奶牛自身状况及冷链运输的时间有关^[22]。当原料乳中含有6 lgCFU/mL嗜冷菌时，将会严重影响乳及乳制品的质量^[23]。本研究来自3个牧场的原料乳样本中，嗜冷菌含量表现为牧场B>牧场A>牧场C，可能与牧场水源、牛舍、卧床、挤奶设施等环境中嗜冷菌污染水平相对较高有关，导致原料乳中的定值和污染增加，此结果与相关研究结论一致^[24]。因此，需通过定期更新卧床下部垫料、强化挤奶杯组的消毒程序等措施，同时改善饲草储存环境，从而降低嗜冷菌的初始污染水

平。从源头控制原料乳中嗜冷菌的数量和浓度至关重要，后续可建立基于嗜冷菌含量的乳制品评价与定量分析检测技术，以缩短原料乳收购环节检测时间。牧场水源、牛舍、卧床、挤奶设施等是嗜冷菌污染的主要来源，亟需构建从源头至加工环节再到最终产品的全链条嗜冷菌管控体系，这是牧场及乳品企业未来共同努力的方向。

传统分离培养技术为分离嗜冷菌的金标准^[25]。本研究采用传统分离培养技术与嗜冷菌一代测序（Sanger测序，多分子和单克隆）从华北地区3个规模化牧场原料乳样本中共鉴定出42属93种嗜冷菌株菌种，首次系统揭示华北地区不同牧场环境和原料乳中嗜冷菌的复杂菌群结构。其中，分离自3个牧场36个样本的嗜冷菌中假单胞菌属、链球菌属、不动杆菌属为优势菌属，其菌株出现频次最高，与前人研究结论一致^[26, 27]。假单胞菌属的荧光假单胞菌对乳及乳制品的品质有重要影响^[19, 28]，本研究分离所得菌株中荧光假单胞菌含量最高，在36个样本中分离得到8株荧光假单胞菌，2株嗜冷假单胞菌。由于假单胞菌属的菌属对乳和乳制品品质有重要影响，因此对假单胞菌属的分离培养将会是今后分离培养工作的重要部分。然而，除假单胞菌、链球菌和不动杆菌外，棒状杆菌和肠杆菌亦不可忽视。棒状杆菌和肠杆菌在牛乳中构成显著的粪便污染风险，因此需加强对奶牛饲养环境中直接或者间接接触环节的管控，如在牧场饲养过程中强化对肠杆菌和链球菌的防控工作，从而降低奶牛发生疾病的几率。Yuan等^[4]研究了牛乳中主要嗜冷菌的影响及其控制方法，传统（6.5±1）℃培养10天的方法虽具备分离单菌株、为后续深入研究提供材料基础的优势，但其存在培养周期长、难以系统揭示嗜冷菌多样性和结构特征的局限性。

本研究利用16SrRNA测序分析方法对华北地区3个牧场原料乳样本进行微生物多样性分析。结果显示，原料乳中微生物菌群主要由十大属构成，分别是：不动杆菌、埃希氏菌属、代尔夫特食酸菌、产气单胞菌属、假单胞菌属、UCG-005菌属、链球

菌属、普拉梭菌、棒杆菌属、黄杆菌属。同时，本研究发现不同牧场、不同生产时间的原料乳中，嗜冷菌菌群结构组成差异和嗜冷微生物的多样性有显著差别。本研究中，不动杆菌在菌属结构中丰度最高，采用（6.5±1）℃培养10天方法分离纯化所得含量最高的是假单胞菌，两种方法结果存在差异，可能是由于不动杆菌最适宜生长温度是35℃，在6.5℃时生长缓慢，在分离纯化中数量较少、菌落较小，不易被察觉，因此两种方法分析结果存在差异。当前不动杆菌属相关研究较少，本研究可为嗜冷菌的后续深入研究提供参考。同时，结合16S rRNA测序分析技术与传统分离培养技术，将更有助于嗜冷菌多样性及其群落结构的研究。

4 结论

本研究揭示了华北地区3个规模化牧场原料乳中嗜冷菌群具有复杂多样性。其中，牧场B假单胞菌属丰度最高，表明该牧场需针对性地完善卫生管理措施和控制流程。嗜冷菌产生的脂肪酶、蛋白酶对原料乳及乳制品构成潜在质量威胁，然而目前尚未建立针对嗜冷菌的专项控制策略。因此，牧场可通过管控水源、牛舍、饲草、卧床、挤奶设施等，从源头控制嗜冷菌对原料乳的污染，进而杜绝对乳制品造成的质量风险。后续研究应重点针对上述关键环节，系统分析其对原料乳中嗜冷菌污染的影响机制，从源头建立的防控体系，以有效减少或杜绝嗜冷菌对原料乳的污染。同时，需建立适用于牧场与加工厂的快速检测技术，实现对原料乳中嗜冷菌及其代谢酶活性的快速监测与精准定量。

参考文献

- [1] Dai L, Hu S, Pang X, et al. Community diversity of psychrophilic bacteria in dairy farm raw milk and its characteristic enzyme production at different temperature[J]. Food Bioscience, 2023, 54: 102921.
- [2] Ahmed S, Sumon S M, Hossain M, et al. Prevalence of psychrotrophic bacteria during frozen storage of raw milk[J]. Annals of Bangladesh Agriculture, 2021, 24 (1): 65-76.
- [3] Du B, Meng L, Liu H, et al. Single Molecule real-time

- sequencing and traditional cultivation techniques reveal complex community structures and regional variations of psychrotrophic bacteria in raw milk[J].Frontiers in Microbiology, 2022 (13): 853263.
- [4] Yuan L, Sadiq F A, Liu T, et al. Psychrotrophic bacterial populations in Chinese raw dairy milk[J].Food Science & Technology, 2017 (84): 409-418.
- [5] Dees P M, Ghiorse W C. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA[J].FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35 (2): 207-216.
- [6] 谭利涛, 成胜, 苏杭, 等. 真菌内生蜡样芽孢杆菌7-1y的分离鉴定及其功能探索[J].江西农业大学学报, 2022, 44 (4): 900-909.
- [7] 祁腾, 张凤, 韩英, 等. 西北地区各牧场中嗜冷微生物多样性研究[J].中国乳品工业, 2024, 52 (12): 23-29.
- [8] 李兰君, 刘玳含, 刘建斌, 等. 连作对设施番茄土壤微生物及酶活性的影响[J].江苏农业科学, 2018, 46 (18): 130-134.
- [9] 代良超. 原料乳中嗜冷菌对UHT乳品质及货架期的影响研究[D].沈阳: 沈阳农业大学, 2023.
- [10] 卢延想. 高温大曲中产香微生物的筛选及应用研究[D].天津: 天津科技大学, 2021.
- [11] 谢宪, 邓勋, 宋丽文, 等. 落叶松枯梢病罹病叶及病梢真菌多样性[J].林业科学, 2024, 60 (10): 76-85.
- [12] 尚婷婷, 孟军, 曾亚琦, 等. 新生伊犁马马驹后肠道微生物母源传递特征的研究[J].动物营养学报, 2024, 36 (9): 5860-5871.
- [13] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from illumina amplicon sequencing[J].Nature Methods, 2013, 10 (1): 57-59.
- [14] Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J].Bioinformatics, 2011, 27 (16): 2194-2200.
- [15] 郭小杰. 原料乳中嗜冷菌多样性及其主要水解酶特性研究[D].哈尔滨: 东北农业大学, 2020.
- [16] 杨振泉, 周海波, 高璐, 等. 超声波协同流水净化对克氏原螯虾中菌落总数及菌相构成的影响[J].食品科学, 2015, 36 (17): 173-178.
- [17] 简程芳, 张博宇, 王存萍, 等. 藏族药二十五味松石丸调控肠道菌群改善非酒精性脂肪性肝炎的作用机制研究[J].中国中药杂志, 2022, 47 (8): 2038-2048.
- [18] Zhuang J, Hou Y, Wang Y, et al. Relationship between microorganisms and milk metabolites during quality changes in refrigerated raw milk: A metagenomic and metabolomic exploration[J].International Journal of Food Microbiology, 2024 (425): 110891.
- [19] Wang Y, Han X, Chen X, et al. Potential harmful of extracellular proteases secreted by *Pseudomonas fluorescens* W3 on milk quality[J].Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45 (3): e15192.
- [20] Aouadhi C, Tbarki R, Boukari W, et al. Impact of psychrotrophic bacteria in raw milk on the quality and stability of UHT milk in Tunisia[J].International Dairy Journal, 2025 (167): 106262.
- [21] 中国奶业协会. T/DAC003-2017 中国奶业协会团体标准 学生饮用奶 生牛乳[S].
- [22] Qin X, Cheng J, Qiu Y, et al. Characterization of psychrotrophic and thermotolerant bacteria in raw milk using a multi-omics approach[J].Microbial Genomics, 2024, 10 (11): 1-13.
- [23] Clements R S, Wyatt D M, Symons M H, et al. Inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *pseudomonas fluorescens* proteases in ultrahigh-temperature-treated milk[J].Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56 (4): 1188-1190.
- [24] Druce R G, Thomas S B. An ecological study of the psychrotrophic bacteria of soil, water, grass and hay[J].Journal of Applied Bacteriology, 1970, 33 (2): 420-435.
- [25] Vithanage N R, Yeager T R, Jadhav S R, et al. Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk[J].International Journal of Food Microbiology, 2014 (189): 26-38.
- [26] Porcellato D, Aspholm M, Skeie S B, et al. Microbial diversity of consumption milk during processing and storage[J].International Journal of Food Microbiology, 2018 (266): 21-30.
- [27] Li N, Wang Y, You C, et al. Variation in raw milk microbiota throughout 12 months and the impact of weather conditions[J].Scientific Reports, 2018, 8 (1): 2371.
- [28] 吕元, 叶兴乾. 杭州地区原料奶中嗜冷菌的分离鉴定[J].中国乳品工业, 2012, 40 (3): 43-46.