

原料乳及牧场环境中的微生物多样性及嗜冷菌污染源分析

胡少震^{1,2}, 逯刚³, 喻东威³, 吕加平², 张书文², 李莲瑞^{1*}, 逢晓阳^{2*}

¹塔里木大学生命科学与技术学院 新疆阿拉尔 843300

²中国农业科学院农产品加工研究所 北京 100193

³内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司 呼和浩特 011517)

摘要 原料乳中嗜冷菌超标会产生较高水平的耐热蛋白酶和脂肪酶,这两种酶是导致产品进入货架期后出现质量问题的重要原因。为探究牧场奶牛生活环境以及原料乳在流转过程中不同环节的微生物多样性,找出牧场中嗜冷菌的污染来源,本研究选取河北地区某规模化奶牛养殖场,采集 TMR 饲料、牛舍垫土、头三把奶、头三把奶之后的常规乳以及储奶罐中的原料乳等样品,利用宏基因组测序技术对所有样品的菌群结构、嗜冷菌种类及丰度进行分析。结果表明:在门水平上,主要微生物为变形菌门、厚壁菌门、放线菌门,在属水平上主要是无形体属、链球菌属、肠球菌属、短螺菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌。此外对样品中的关键嗜冷菌(假单胞菌)进行分析,牛舍垫土的多样性最丰富的,包含了牧场中常规乳及储奶罐中乳假单胞菌种类的 99.63%和 96.39%,说明牛舍垫土是各类假单胞菌潜在的污染源。

关键词 宏基因组测序技术;微生物多样性;嗜冷菌;假单胞菌;污染源

文章编号 1009-7848(2024)03-0258-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.026

原料乳作为乳制品加工的重要原料,从产生到最终加工成不同的乳制品需要一个较长的过程,在整个链条中极易受到微生物的污染^[1-2]。随着冷链物流在乳品行业中的应用,嗜温性细菌生长受到抑制,而有些细菌在长期进化中,一方面通过膜蛋白的磷酸化、去磷酸化代谢反应完成对温度的感知,另一方面通过提高细胞膜流动性,分泌嗜冷酶及嗜冷蛋白,从而抵抗外界低温环境^[3]。研究发现细菌在低温下上调表达的蛋白与细胞膜上的物质转运途径密不可分,说明这些细胞膜表面的蛋白是这些细菌具有嗜冷特性的关键^[4]。这些细菌的耐冷特性使细菌在低温下继续生长,成为原料乳中的优势菌群,它们广泛存在于乳制品加工和生产的所有环节^[5-6]。假单胞菌是原料乳中主要污染菌,它携带 *aprX* 和 *LipA* 基因,能表达胞外蛋白酶和脂肪酶^[7-9]。这些酶普遍具有耐热性,即使通过 135 °C 1 min 处理仍有较高的酶残留率^[10]。残留的酶活进入货架期后导致产品的蛋白水解、凝胶沉

淀、脂肪上浮、酸败等不良现象,严重影响产品货架期质量^[11-12]。

嗜冷菌作为导致长期乳质变的指示菌株,它的存在对乳制品品质是一个巨大的威胁。为减少嗜冷菌对乳制品的危害,近些年国内外许多学者对原料乳中的微生物及其嗜冷菌进行研究,在原料乳中常见的嗜冷菌主要包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)^[13-14]等。Vithanage 等^[5]基于纯培养方法从不同新鲜乳中分离鉴定了 927 株嗜冷菌,其中假单胞菌属数量占比达到总分离菌株的 1/5。2017 年, Yuan 等^[1]在不同季节从中国不同地区采集的原料乳中分离鉴定了 480 株嗜冷菌,其中假单胞菌数量占总分离菌株的 58.8%,在假单胞菌属下被分为 25 个种,荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)丰度最高占总假单胞的 15.8%,其次是莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)和嗜冷假单胞菌(*Pseudomonas psychrophila*),分别占比为 7.1%和 5.4%,此外有 12.3%的假单胞菌未被分类。通过对原料乳中假单胞菌的分类鉴定及污染源研究,可在很大程度上减少嗜冷菌对原料乳造成的危害。

假单胞菌产生的耐热脂肪酶和蛋白酶会缩短长保质期奶(UHT 乳)的货架期。找到牛乳中假单

收稿日期: 2023-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172190,31871833);
呼和浩特市科技计划项目(2021-农-重-1)

第一作者: 胡少震,男,硕士生

通信作者: 李莲瑞 E-mail: lilianrui51@163.com

逢晓阳 E-mail: pangxiaoyang@163.com

胞菌的主要污染来源,采取有效防控措施才是提升乳制品质量的关键。虽有研究表明原料乳中的微生物污染与牧场环境(如奶牛卧土、空气)及挤奶设备、挤奶程序的整体卫生状况密切相关^[15],但是目前嗜冷菌的污染源尚未定论,这对嗜冷菌的科学防控带来挑战,是亟待解决的产业问题。

宏基因组测序在分子生物学迅速发展的大环境下,凭借测序深度高,物种注释准确,以检测到低丰度的微生物等优点而在微生物多样性研究中广泛应用^[16]。本研究采用宏基因组测序技术,对河北地区的某规模化牧场的不同环节的新鲜乳和生境样品进行微生物多样性分析,同时分析嗜冷菌种类及丰度,确定该牧场嗜冷菌的主要污染来源,为制定牧场嗜冷菌的科学防控策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料:TMR 饲料、牛舍垫土、头三把奶、牧场常规乳、牧场储奶罐奶样(每类样品采集 5 个),均采集自河北地区某规模化奶牛养殖场。

试剂:MOBIO PowerSoil® DNA 提取试剂盒,美国 MOBIO 公司;KAPA Library Quantification Kit,KAPA 公司;TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kit,NovaSeq Reagent Kits(300 cycles),Illumina 公司;NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit,New England Biolabs (NEB) 公司;Agilent DNA 1000 Kit,美国安捷伦科技公司;Agencourt AMPure XP,Beckman Coulter 公司。

1.2 仪器与设备

Covaris 超声波破碎仪,Covaris 公司;ABI 9700 PCR 仪,ThermoFisher 公司;ABI StepOne-Plus Real-Time PCR System,ThermoFisher;NovaSeq 高通量二代测序仪,Illumina 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集 将 50 mL 离心管、采样袋于 121 °C 灭菌 20 min,TMR 饲料、牛舍垫土各取 500 g 于无菌采样袋,头三把奶、牧场常规乳、牧场储奶罐奶样在挤出 30 min 之内取 50 mL 至无菌离心管中,将所有样品置于 -80 °C 冷冻保存。

1.3.2 样品微生物基因组的提取 样品中全部微

生物基因组提取方法参照 PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA)^[17]。基因组通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和完整性,Qubit 荧光定量仪对 DNA 浓度进行精确定量。将 DNA 浓度和纯度合格的储存在 -20 °C 用于后续的建库、上机。

1.3.3 建库测序 检测合格的 DNA 样品用 Covaris 超声波破碎仪将基因组 DNA 随机打断成长度约 300 bp 左右的小片段,经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成整个文库制备。文库构建完成后,使用 Qubit2.0 进行初步定量,稀释文库至 2 ng/μL,随后使用 Agilent 2100 对文库的插入片段进行检测,插入片段符合预期后,使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度 >3 nmol/L),以保证文库质量。文库质检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后在 Illumina NovaSeq4000 平台测序^[18-19]。

1.3.4 数据分析处理 Illumina NovaSeq4000 下机原始数据,使用 Trimmomatic(v0.36)软件进行测序数据的质控^[20]。将得到的高质量序列 clean reads 使用宏基因组组装软件 MEGAHIT(v1.0.6)^[21]对测序样本进行组装。将测序数据比对到组装的 contig 序列片段上以评估组装过程中 reads 利用率。采用 prodigal^[22]软件对组装得到 contig 序列进行 ORF (Open Reading Frame) 预测,使用 CD-HIT^[23]软件对预测的基因序列以 0.95 相似度进行去除冗余,得到非冗余基因集并采用 Bowtie^[24]软件将测序数据与构建的非冗余基因集进行比对,统计单个基因在不同样本的丰度信息,并将其进行标准化计算得到基因丰度表。通过两个常用的方法及其数据库对物种组成做了比对分析。分别是基于 reads 使用 diamond^[25]比对 nr 数据库结合 megan6^[26]解析进行物种组成分析以及基于 reads 的 MetaPhlAN 比对分析,以下除了单独 MetaPhlAN^[27]分析模块之外都是基于 nr 注释的结果。

1.3.5 多元统计学分析 使用多层次圈图表示不同样品中微生物多样性,使用热图对不同样品间进行优势菌的可视化处理,柱状图分析不同样品的丰度。

2 试验结果

2.1 质控结果

按照 1.3.4 节中质控,对原始测序序列(raw reads)进行数据优化,结果如表 1 所示,原料乳中的 GC 含量在 44%左右,牛舍垫土 GC 含量在

61.49%,TMR 饲料的 GC 含量在 51.73%,说明原料乳的微生物结构与环境样品有很大区别。所有样品质控后数据的 Q20 都在 96%以上,Q30 都在 91%以上,说明测序质量较好。

表 1 不同样品质控结果

Table 1 Quality control results of different samples

样本编号	质控后总 reads 数目	GC 含量/%	Q20	Q30
B_90	36 008 323	44.34	96.83	91.59
F_90	32 729 504	44.43	97.06	92.12
P_s	40 895 302	61.49	97.94	94.18
TMR	42 575 139	51.73	97.42	92.81
储奶罐总样	36 402 204	44.44	96.85	91.67

注:reads:测序得到的每一条序列称为一个 Reads;GC 含量:质控后数据 G 和 C 两种碱基占总碱基的百分比;Q30:质控后数据质量值大于或等于 30 的碱基所占的百分比;Q20:质控后数据质量值大于或等 20 的碱基所占的百分比;B_90:90 号牛正常乳;F_90:90 号牛前三把奶;P_s:牛舍垫土;TMR:TMR 饲料。

2.2 宏基因组组装结果

采用宏基因组组装软件 MEGAHIT(v1.0.6)对测序样本进行组装,过滤掉组装结果中 500 bp 以下的片段,计算每个样品的组装效率,结果显示 90 号牛前三把奶、90 号牛前三把奶后的正常乳、

储奶罐中乳、TMR 饲料中能匹配到基因库的数据占比均在 87%以上,牛舍垫土为 52.11%,说明牛舍垫土的微生物有许多未被发现的新物种,比其他样品更加复杂。

表 2 不同样品的组装结果

Table 2 Assembly results of different samples

样本编号	组装后 reads 数目	匹配 reads 数目	匹配比率
B_90	72 016 646	64 420 766	0.894526051657557
F_90	65 459 008	57 858 702	0.883892129865457
P_s	81 790 604	42 622 994	0.521123355440681
TMR	85 150 278	74 342 124	0.873069656918795
储奶罐总样	72 804 408	65 377 106	0.897982797964651

2.3 基因丰度分析

利用 CD-HIT 软件得到非冗余基因集,计算不同基因在不同样品中的丰度,结果如图 1 所示,5 个样品的共有基因为 160 个,最外圈显示的是每种样品特有的基因,其中牛舍垫土中特有的基因有 538 863 个,说明该样品中有许多样品中没有的微生物。

2.4 不同样品微生物多样性分析

图 2 使用 Krona 软件对物种注释结果进行可视化展示,圆圈从内到外依次代表不同的分类级别,依次为界(Domain)、门(Phylum)、纲(Class)、

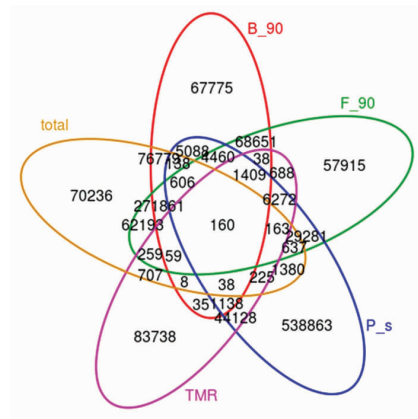
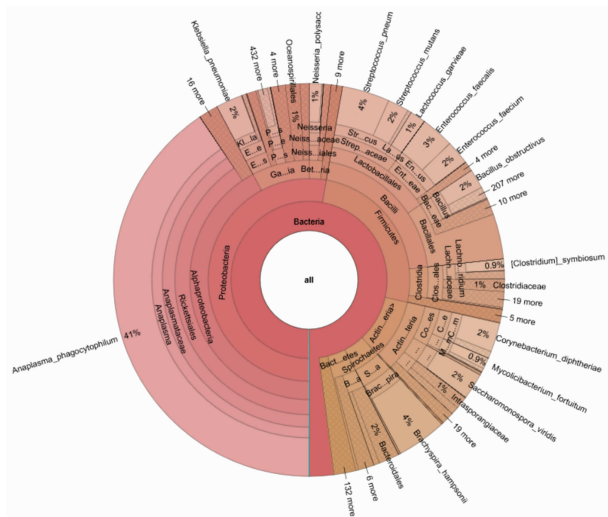


图 1 不同样品的基因丰度

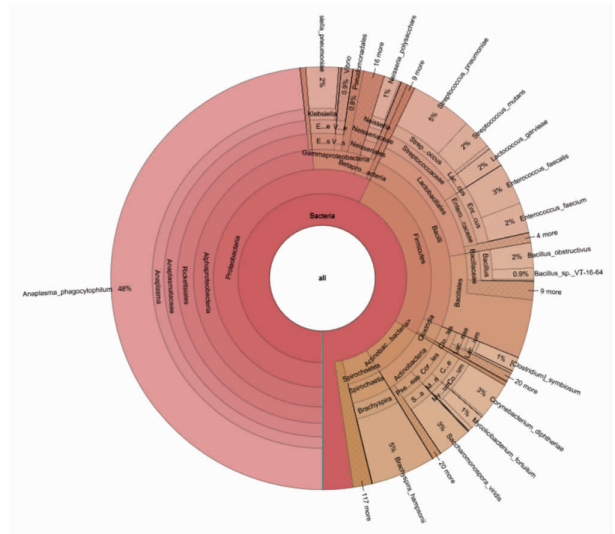
Fig.1 Gene abundance of different samples

目 (Order)、科 (Family)、属 (Genus)、种 (Species), 扇形的大小代表不同物种注释结果的相对比例。原料乳中在门水平主要为变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、放线菌门 (*Actinobacteria*), 90 号牛前三把奶、90 号牛前三把奶后的正常乳、储奶罐中乳中变形菌门的占比分别为 52.76%, 57.20%, 61.96%, 厚壁菌门的占比分别为 25.77%, 26.25%, 24.96%, 放线菌门占比分别为 9.60%, 7.82%, 5.82%, 其中假单胞菌 (*Pseudomonas*)、肠杆菌 (*Enterobacteria*)、不动杆菌 (*Acinetobacter*) 都是原料乳中的主要污染嗜冷菌, 属于变形菌门, 这些嗜冷菌在冷链运输中快速生长, 所产生的蛋白酶、脂肪酶水解乳中的蛋白质和

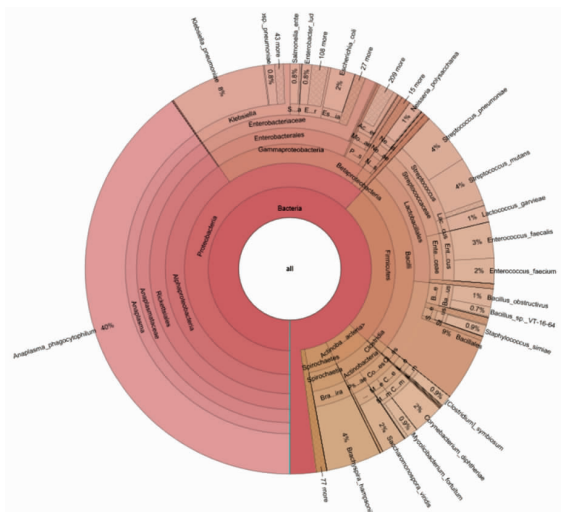
脂肪, 给长期奶 (例如 UHT 乳) 带来巨大的危害。原料乳在属水平主要微生物包括链球菌属 (*Streptococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 等, 其中芽孢杆菌属有非常强的生存能力, 需要 100 °C 灭菌 20 min 以上才能失活, 在牧场环境中应该对该菌加大防范。TMR 饲料由于 pH 值较低, 微生物多样性较单一, 主要的优势菌是醋杆菌属 (*Acetobacter*), 占比在 80% 以上。牛舍垫土在门水平主要是变形菌门和放线菌门, 是微生物群种类最多、多样性最丰富, 在种水平检测到假单胞菌 676 种, 不动杆菌 277 种, 嗜冷杆菌 (*Psychrobacter*) 54 种, 其中包括没有明确分类的 (*Pseudomonas* sp. 18AGIII、*Psy-*



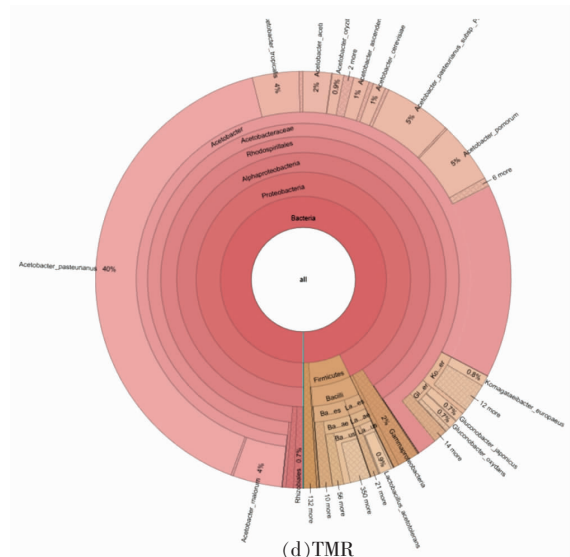
(a)F_90



(b)B_90



(c)total



(d)TMR

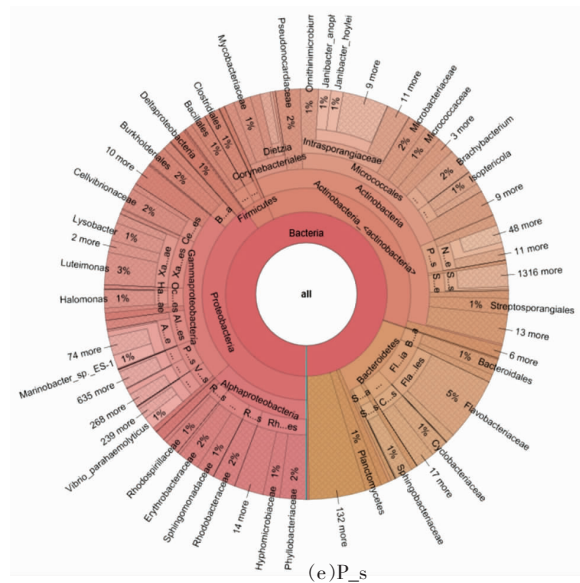


图2 不同样品微生物多样性

Fig.2 Microbial diversity of different samples

chrobacter sp. JB385、*Acinetobacter* sp. C15 等菌株)、无法培养的以及一些没有被研究者发现的菌株,是新鲜乳的微生物潜在污染源,它们的产酶特性、生理生化特征并未明确,对原料乳可能存在潜在的破坏。

2.5 属水平不同样品间微生物多样性分析

从属水平各取样点细菌群落的 Top 30 菌属做热图(图 3),原料乳中主要菌株包括无形体属、链球菌属、肠球菌属、短螺菌属、芽孢杆菌属,TMR 饲料除了醋杆菌属(*Acetobacter*)外,还有一定数

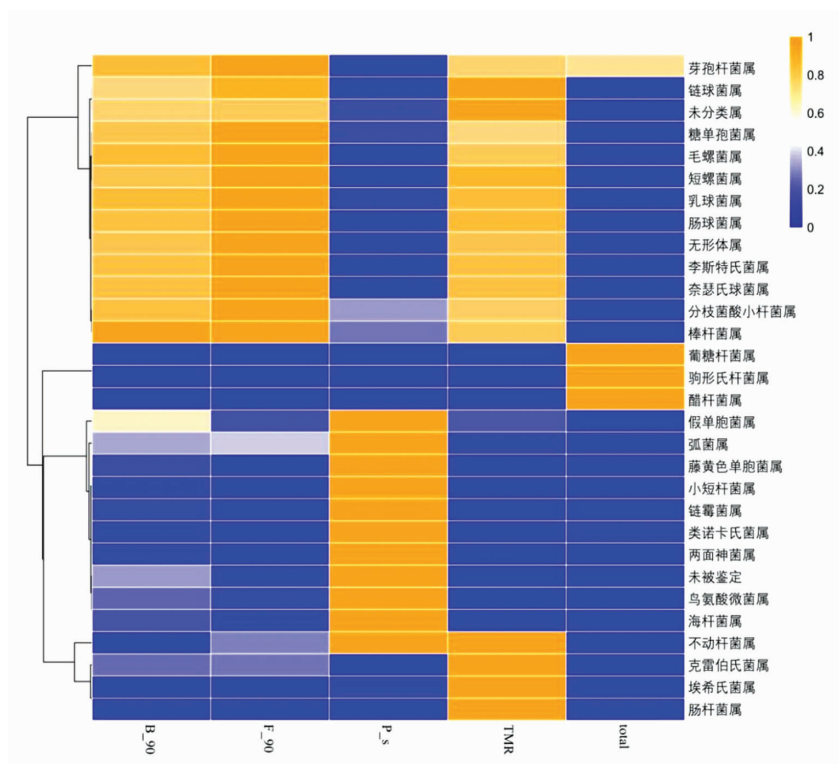


图3 属分类水平不同样本间菌株丰度热图

Fig.3 Heat map of strain abundance between samples at the taxonomic level of the genus

量的芽孢杆菌,牛舍垫土中主要菌株包括两面神菌属(*Janibacter*)、藤黄色单胞菌属(*Luteimonas*)、海杆状菌属(*Marinobacter*)、假单胞菌属、不动杆菌属,除此之外,牛舍垫土中还包括 7.83%的属未知,2.40%的属未分类。假单胞菌属作为原料中的主要污染菌,在牛舍垫土中丰度很高,在 TMR 饲料中丰度极低,并且 90 号牛头三把奶比该牛的常规乳中假单胞菌含量高很多。因此原料乳中的假单胞菌污染源大概率是源自牛舍垫土,可通过改善牧场的奶牛生活环境,并严格执行“弃掉头三把奶”,均可有效降低原料乳中假单胞菌数量。

2.6 不同样品中假单胞菌株多样性

宏基因测序技术是将样品中微生物所有破碎序列进行拼接,可以在种水平进行准确鉴定,结果如表 3 所示,所有样品在种水平共注释了 676 种假单胞菌,90 号牛正常乳、90 号牛前三把奶、牧场储奶罐总样乳、TMR 饲料、牛舍垫土分别注释了 269,433,639,368,194 种假单胞菌,如图 4 将 676 种假单胞菌绘制热图,颜色代表不同假单胞菌在不同样品中的丰度,结果显示在牛舍垫土中有超过 600 种假单胞菌的丰度高于其它样品,说明牛舍垫土是各类假单胞菌潜在的污染源。图 5 显示的是牛舍垫土和 90 号牛前三把奶假单胞种类占 90 号牛正常乳、牧场储奶罐总样乳假单胞菌的比例,其中牛舍垫土中是假单胞种群最丰富的,包含了 90 号牛正常乳、牧场储奶罐总样乳中假单胞菌种类的 99.62%和 95.36%,90 号牛前三把奶中包含了 90 号牛正常乳、牧场储奶罐总样乳的 95.54%和 91.08%。将样品中前 25 类假单胞菌显示其丰度,结果如图 6 所示,90 号牛头三把奶中假单胞菌主要包括:荧光假单胞菌(15%)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)(11%)、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)(5%)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)(3%);90 号牛常规乳中假单胞菌主要包括:铜绿假单胞菌(6%)、恶臭假单胞菌(6%)、丁香假单胞菌(4%)、荧光假单胞菌(1%);原料乳混样中假单胞菌主要是铜绿假单胞菌(82%)、丁香假单胞菌(2%)、恶臭假单胞菌(1%);牛舍垫土中假单胞菌主要种类包括:施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)(12%)、波尔扎诺假单胞菌(*Pseudomonas bauzanensis*)(7%)、铜绿

表 3 假单胞菌物种数量

样本编号	B_90	F_90	P_s	TMR	total
物种种类	269	433	639	368	194

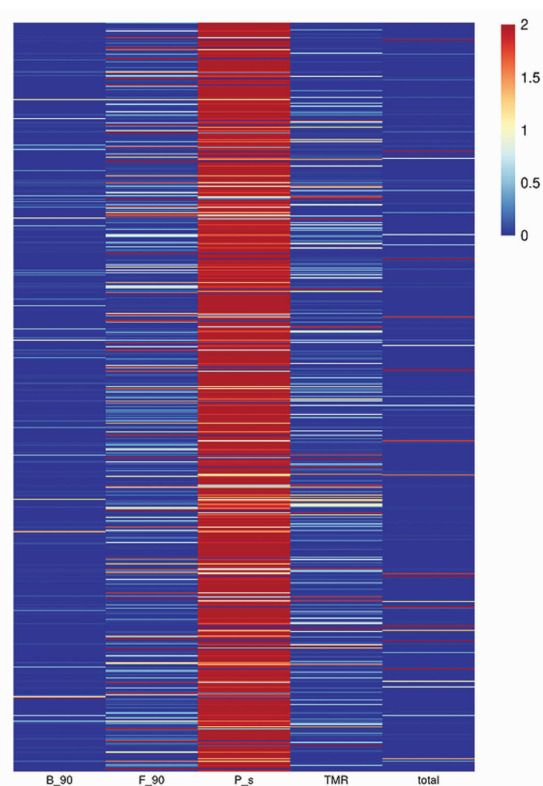
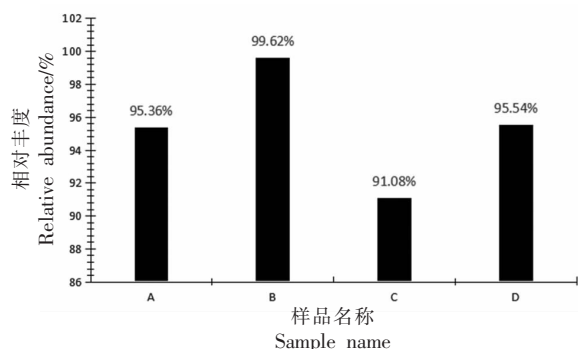


图 4 假单胞菌种分类水平不同样本间丰度热图

Fig.4 Heat map of abundance between different samples of *Pseudomonas* species taxonomic level



注:A、C 分别表示常规乳、牧场储奶罐总样乳中微生物种类占前三把奶的比例;B、D 分别表示常规乳、牧场储奶罐总样乳中微生物种类占牛舍垫土的比例。

图 5 不同样品中假单胞菌种类比例

Fig.5 Proportion of *Pseudomonas* species in different samples

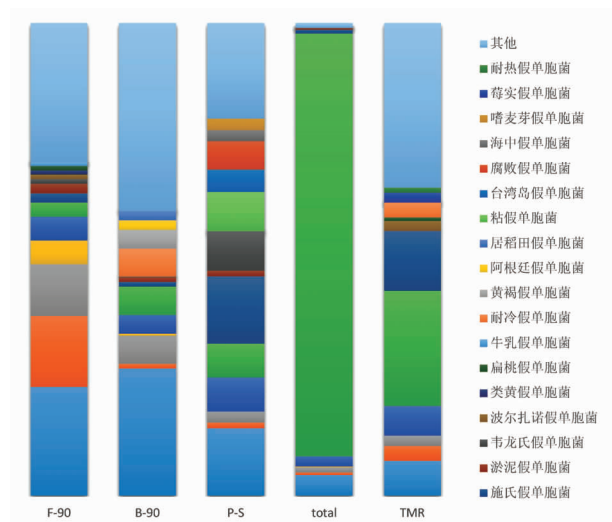


图6 基于高通量测序不同样本假单胞菌的丰度图

Fig.6 Abundance of *Pseudomonads* in different samples based on high-throughput sequencing

假单胞菌(6%)、荧光假单胞菌(1%)。通过对原料乳中的假单胞多样性进行研究,明确不同采样环节的主要污染假单胞菌,给牧场嗜冷菌的污染防控提供基础研究背景。

3 讨论与结论

以上试验结果表明,原料乳和牧场环境中存在极为丰富的微生物,在门水平主要包括变形菌门、厚壁菌门、放线菌门,与马静等^[30]研究一致,优势菌门都是变形菌门、厚壁菌门、放线菌门,但是菌的丰度有所区别,可能是它们研究的地区是青海地区(海拔较高)所导致,在属水平主要微生物为链球菌属、乳球菌属、肠球菌属、芽孢杆菌属,周杏荣等^[31]的研究中原料乳的优势属为肠球菌属、不动杆菌属,与本研究中优势属不同,可能是由于不同温度、地域及微生物的生存环境不同有关。假单胞菌作为导致原料乳变质的主要菌株存在原料乳及牧场环境的每一个环节,在所有样品中共注释了676种,原料乳丰度最高的假单胞菌是荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、丁香假单胞菌、铜绿假单胞菌,牛舍垫土中有639种假单胞菌,其中包括许多未准确分类的、未分离鉴定的,它们的产酶特性、生理生化并不明确,对原料乳有潜在的危害性,这一结果与Marchand等^[32]研究基本一致,但

是本研究是基于宏基因测序,将丰度极低(<0.01%)的假单胞都准确鉴定,并明确显示在样品中的丰度,这为嗜冷菌的科学防范起到了重要的作用。

本试验还发现假单胞菌属在牛舍垫土中丰度很高,在TMR饲料中丰度极低,并且90号牛头三把奶比该牛的常规乳中假单胞菌含量高很多。此外在假单胞菌种水平,牛舍垫土有大于600种假单胞菌的相对丰度是远远高于其它样品的,此外常规乳中99.62%假单胞菌种类可以在牛舍垫土中找到,在前三把奶中也可以找到常规乳中95.54%假单胞菌,这与李建洲等^[33]的研究结果相似,原料乳中假单胞菌的污染来源大概率来自牛舍垫土。

针对本研究结果,原料乳中嗜冷菌污染途径大概率是通过牛舍垫土污染奶牛乳头到达原料乳中。应加大对牛场环境和消毒重视,定期翻晒卧床土,保持牛体的清洁度以及在采奶过程中严格执行扔弃头三把奶可以减少嗜冷菌对原料乳的污染。

参 考 文 献

- [1] YUAN L, SADIQ F A, LIU T, et al. Psychrotrophic bacterial populations in Chinese raw dairy milk[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 84: 409-418.
- [2] CHAMPAGNE C P, LAING R R, ROY D, et al. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control[J]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 1994, 34(1): 1-30.
- [3] 张抒杨, 胡征, 陶冶, 等. 耐冷细菌适应低温机制研究进展及应用[J]. *山东化工*, 2017, 46(17): 63-65.
ZHANG S Y, HU Z, TAO Y, et al. Research progress and application of cold-tolerant bacterial adaptation mechanism [J]. *Shandong Chemical Industry*, 2017, 46(17): 63-65.
- [4] 郭晓涵. 南极海洋细菌 *Poseidonibacter antarcticus* SM1702~T 多相分类学及耐冷机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2020.
GUO X H. Multiphase taxonomy and cold tolerance mechanisms of the Antarctic marine bacterium *Po-*

- seidonibacter antarcticus* SM1702~T[D]. Jinan: Shandong University, 2020.
- [5] VITHANAGE N R, DISSANAYAKE M, BOLGE G, et al. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential[J]. International Dairy Journal, 2016, 57(12): 80–90.
- [6] MARATHE S A, CHOWDHURY R, BHATTACHARYA R, et al. Direct detection of *Salmonella* without pre-enrichment in milk, ice-cream and fruit juice by PCR against *hlyA* gene[J]. Food Control, 2012, 23(2): 559–563.
- [7] MAIER C, HUPTAS C, VON NEUBECK M, et al. Genetic organization of the *aprX*-*lipA2* operon affects the proteolytic potential of *Pseudomonas* species in milk[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1190–1203.
- [8] MATÉOS A, GUYARD-NICODÈME M, BAGLINIÈRE F, et al. Proteolysis of milk proteins by *AprX*, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk[J]. International Dairy Journal, 2015, 49: 78–88.
- [9] ZHANG C Y, BIJL E, SVENSSON B, et al. The extracellular protease *AprX* from *Pseudomonas* and its spoilage potential for UHT milk: A review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2019, 18(4): 834–852.
- [10] ZHANG S W, LI H J, ULUKO H, et al. Investigation of protease production by *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 and degradation on milk proteins[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2015, 39(6): 2466–2472.
- [11] GARGOURI A, HAMED H, ELFEKI A. Analysis of raw milk quality at reception and during cold storage: Combined effects of somatic cell counts and psychrotrophic bacteria on lipolysis[J]. Journal of Food Science, 2013, 78(9): M1405–M1411.
- [12] ZHANG D, PALMER J, TEH K H, et al. Identification and selection of heat-stable protease and lipase-producing psychrotrophic bacteria from fresh and chilled raw milk during up to five days storage[J]. LWT—Food Science and Technology, 2020, 134: 110165.
- [13] REN Z Y, LI N, ZHAO J X, et al. An Illumina MiSeq sequencing-based method using the *mreB* gene for high-throughput discrimination of *Pseudomonas* species in raw milk[J]. LWT—Food Science and Technology, 2022, 163: 113573–113582.
- [14] YANG X Y, GUO X J, LIU W P, et al. The complex community structures and seasonal variations of psychrotrophic bacteria in raw milk in Heilongjiang Province, China[J]. LWT—Food Science and Technology, 2020, 134: 110218–110229.
- [15] 韩秋红, 李琴, 李凯锋. 嗜冷菌对乳制品加工及贮存的影响和控制措施[J]. 现代食品, 2018, 15(24): 73–75.
- HAN Q H, LI Q, LI K F. Effects and control measures of cryophilic bacteria on the processing and storage of dairy products[J]. Modern Food, 2018, 15(24): 73–75.
- [16] MASOUD W, TAKAMIYA M, VOGENSEN F K, et al. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing[J]. International Dairy Journal, 2011, 21(3): 142–148.
- [17] CLEMENT B G, KITTS C L. Isolating PCR-quality DNA from human feces with a soil DNA kit[J]. BioTechniques, 2000, 28(4): 640–646.
- [18] JEON S A, PARK J L, PARK S J, et al. Comparison between MGI and Illumina sequencing platforms for whole genome sequencing[J]. Genes & Genomics, 2021, 43(7): 713–724.
- [19] KOROSTIN D, KULEMIN N, NAUMOV V, et al. Comparative analysis of novel MGISEQ-2000 sequencing platform vs Illumina HiSeq 2500 for whole-genome sequencing[J]. Plos One, 2020, 15(3): e0230301–e0230313.
- [20] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114–2120.
- [21] LI D H, LIU C M, LUO R B, et al. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph[J]. Bioinformatics, 2015, 31(10): 1674–1676.
- [22] DOUG H, LOCASCIO P F, HAUSER L J, et al. Gene and translation initiation site prediction in metagenomic sequences[J]. Bioinformatics, 2012(17): 2223–2230.
- [23] LI W D, JAROSZEWSKI L, GODZIK A. Clustering

- of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases[J]. *Bioinformatics-Oxford*, 2001, 17(3): 282-283.
- [24] LANGMEAD B. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(3): R25-R34.
- [25] BUCHFINK, BENJAMIN, CHAO, et al. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. *Nature Methods*, 2014, 12(1): 59-63.
- [26] HUSON D H, BEIER S, FLADE I, et al. MEGAN Community edition—interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data [J]. *PLoS Computational Biology*, 2016, 12(6): e1004957-e1004968.
- [27] TIN D, TRUONG, ERIC A, et al. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(10): 902-903.
- [28] 依胜男, 张书文, 芦晶, 等. 不同储藏温度对超巴氏奶货架期理化指标及风味的影响[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(21): 15-20, 28.
- YI S N, ZHANG S W, LU J, et al. Effect of different storage temperatures on the physicochemical parameters and flavor of ultra-pasteurized milk during shelf life[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2020, 41(21): 15-20, 28.
- [29] MADEC M, MEJEAN S, MAUBOIS J. Retention of *Listeria* and *Salmonella* cells contaminating skim milk by tangential membrane microfiltration ("Bactocatch" process) [J]. *Dairy Science & Technology*, 1992, 72(3): 327-332.
- [30] 马静, 王迅, 孙璐, 等. 青海地区不同海拔高度牦牛乳微生物多样性研究[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(8): 4491-4501.
- MA J, WANG X, LIU L, et al. Microbial diversity of yak milk at different altitudes in Qinghai [J]. *Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(8): 4491-4501.
- [31] 周杏荣, 周辉, 罗洁, 等. 南山牧场生鲜牛乳理化指标与微生物多样性对比分析[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(3): 101-107.
- ZHOU X R, ZHOU H, LUO J, et al. Comparative analysis of physicochemical indicators and microbial diversity of raw cow's milk from Nanshan Farm[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2021, 42(3): 101-107.
- [32] MARCHAND S, HEYLEN K, MESSENS W, et al. Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples[J]. *Environmental Microbiology*, 2010, 11(2): 467-482.
- [33] 李建洲, 赵艳坤, 王富兰, 等. 新疆乌昌地区与喀什地区规模化牛场嗜冷菌分离鉴定及污染源分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(5): 1498-1505.
- LI J Z, ZHAO Y K, WANG F L, et al. Isolation, identification and contamination source analysis of *Clostridium perfringens* from large-scale cattle farms in Wuchang and Kashgar regions of Xinjiang [J]. *China Veterinary Animal Husbandry*, 2020, 47(5): 1498-1505.

Microbial Diversity and Contamination Sources of Psychrophilic Bacteria in Raw Milk and in Pastures Environment

Hu Shaozhen^{1,2}, Lu Gang³, Yu Dongwei³, Lü Jiaping², Zhang Shuwen², Li Lianrui^{1*}, Pang Xiaoyang^{2*}

¹College of Life Sciences and Technology, Tarim University, Alaer 843300, Xinjiang

²Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193

³Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Limited by Share Ltd, Hohhot 011517

Abstract Excessive psychrophilic bacteria in raw milk can produce high levels of heat-stable protease and lipase, both of which are important causes of quality problems when cow's milk enters the shelf life. In order to explore the microbial diversity of cows' living environment in pasture and different stages in the raw milk circulation process, the pollution source of psychrophilic bacteria in the pasture was found out. In this study, we collected five samples in a large-scale dairy farm in Hebei Province: TMR feed, cowshed pad soil, the first three milks, the normal milk after the first three milks, and the raw milk in the milk tank, and analyzed the bacterial community structure, psychrophilic species, abun-

dance of psychrophilic bacteria in all samples by using metagenomic shotgun sequencing technology. The results showed that the mainly microbial were *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria* at phylum level. At the genus level, the main genera were *Anaplasma*, *Streptococcus*, *Enterococci*, *Spirospirita*, *Bacillus*, and *Pseudomonas*. The soil of the barn contains 99.63% and 96.39% of the species of *Pseudomonas* in the normal milk and the total milk of the pasture storage tank, indicating that the soil of the barn mat is a potential source of pollution of various types of *Pseudomonas*.

Keywords metagenomic shotgun sequencing technology; microbial diversity; psychrophilic bacteria; *Pseudomonas*; sources of pollution