DOI:10.12441/spyswjs.20251113001 [文章编号] 1673-1689(2026)08-0033-11

基于宏基因组的UHT乳中关键致腐微生物鉴定及机制研究

刘祺琛[1] 崔高阳[1] 徐 琛[1] 卢智华[2] 白晓玲[2] 张书文[1] 逄晓阳[1] 李 旭[1*]

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所,北京,100193; 2. 内蒙古蒙牛乳业股份有限公司,内蒙古 呼和浩特,011500)

摘要:【目的】明确导致超高温瞬时杀菌(ultra high temperature instantaneous sterilization, UHT)乳腐败变质的关键微生物及其作用机制,为乳品企业污染溯源、杀菌工艺优化及卫生控制提供科学依据,以保障液态奶质量安全并延长货架期。【方法】采集工厂坏包样品及其对应的生乳留样,利用宏基因组测序技术系统分析生乳与UHT乳坏包样品的微生物群落结构和功能基因差异,锁定坏包样品中特异性富集的微生物,再结合其耐热响应、芽孢形成能力及蛋白质与脂肪水解等关键代谢通路进行综合分析。【结果】宏基因组分析结果显示,热噬淀粉芽孢杆菌(*Caldibacillus thermoamylovorans*, *C. thermoamylovorans*)在坏包样品中特异性富集。该菌株具备较强的耐热性、芽孢形成能力以及蛋白质和脂肪水解活性。在坏包样品中,相关功能基因显著表达,表明该菌株是引发UHT乳腐败变质的关键微生物。【结论】该研究从宏基因组层面精准识别了导致UHT乳腐败的关键微生物——热噬淀粉芽孢杆菌,并探究了其潜在致腐机制,对乳品加工企业实现精准污染溯源、保障液态奶产品质量安全与延长货架期具有重要指导意义。

关键词:宏基因组;液态奶;超高温瞬时杀菌;芽孢杆菌属;热噬淀粉芽孢杆菌

Metagenomic-based Identification of Key Spoilage Microorganisms in UHT Milk and Their Spoilage Mechanisms

LIU Qichen[1] *CUI Gaoyang*[1] *XU Chen*[1] *LU Zhihua*[2] *BAI Xiaoling*[2] *ZHANG Shuwen*[1] *PANG Xiaoyang*[1] *LI Xu*[1*]

(1. Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Mengniu Dairy Co., Ltd., Hohhot 011500, China)

Abstract: [**Objective**] This study identified the key spoilage microorganism responsible for ultra high temperature instantaneous sterilization (UHT) milk deterioration and clarified the spoilage mechanism, aiming to support contamination tracing, processing optimization, and sanitation control in dairy production companies and thus ensure the quality and safety and extend the shelf life of liquid milk. [**Method**] Spoiled UHT milk and corresponding raw milk samples were collected. Metagenomic sequencing was employed to compare microbial communities and functional genes between the two types of samples. Microorganisms specifically enriched in the deteriorated samples were identified. Furthermore, heat tolerance, spore formation, and protein/lipid degradation pathways were comprehensively analyzed. [**Result**] *Caldibacillus thermoamylovorans* (*C. thermoamylovorans*) was uniquely enriched in spoiled UHT milk. The strain demonstrated strong heat tolerance, spore-forming

基金项目:中央引导地方计划项目(2024ZY0037);国家奶牛产业技术体系项目(CARS-35);山东省重点研发计划项目(2024TZXD021);上海市奶业优势特色产业集群项目(No. 2023);克拉玛依市重点研发计划项目(2024zdyf0007)。

通信作者:李旭(1988—),男,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要从事乳品质量安全检测和控制技术研究。E-mail: lixu@caas.cn

收稿日期:2025-11-13 **修回日期:**2025-12-28

capacity, and active proteolytic and lipolytic functions. Related functional genes showed high expression in spoiled samples, confirming the role of *C. thermoamylovorans* as the primary spoilage microorganism. [**Conclusion**] This study identified *C. thermoamylovorans* as the dominant spoilage microorganism and revealed its potential spoilage mechanism at the metagenomic level. The findings provide practical guidance for accurate contamination tracing, quality and safety guarantee, and shelf-life improvement of liquid milk in dairy processing companies.

Keywords: metagenome; liquid milk; ultra high temperature instantaneous sterilization; *Bacillus*; *Caldibacillus thermoamylovorans*

UHT乳因具备较长的货架期、良好的贮存稳定性和运输便利性，已成为中国消费量最高的液态奶产品之一[1]。然而，即使经过严格的热处理工艺，耐热或其他耐不良环境的微生物仍可能在加工、贮存或流通阶段引发产品腐败变质[2]，导致凝乳、沉淀、脂肪分层、产生异味等质量缺陷[3]。此类腐败变质问题不仅严重影响产品感官品质和稳定性，还会造成经济损失和品牌信誉受损等问题。因此，识别引发腐败的关键微生物并阐明其腐败机制，是提升UHT乳质量安全亟待解决的重要科学问题[4]。

耐热菌（特别是*Bacillus*）是引发UHT乳腐败的主要微生物，主要是因为其芽孢对高温具有高度耐受性[5]。传统检测方法存在明显局限性，如对低丰度或难培养微生物易发生漏检等[6]。此外，实际的微生物组成和致腐原因可能更复杂。近年来，随着宏基因组测序技术的应用，研究者能够更全面地解析乳品中微生物的群落结构及其潜在功能。已有研究证实，宏基因组学不仅能够实现物种水平乃至菌株水平的高精度鉴定，还能解析微生物功能基因的表达模式，从而揭示乳品腐败的生物学机制[7]。目前，导致UHT乳腐败的微生物来源、优势菌群演替特征及关键功能通路仍存在争议，尤其是腐败是否源于原料奶污染，仍缺乏证据。

为有效解决UHT乳坏包问题，本研究基于宏基因组学技术，深入挖掘导致UHT乳坏包的关键致腐因子，系统分析生乳及坏包样品的微生物群落组成和关键功能基因特征，旨在精准识别导致UHT乳腐败的关键微生物及其潜在致腐机制，为乳品加工企业精准溯源污染、优化除菌工艺与生产流程、保障乳制品质量安全提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

琼脂培养基、孟加拉红培养基、LB肉汤培养基、LM肉汤培养基、革兰氏染色试剂盒、无菌磷酸盐缓冲溶液：青岛海博生物技术有限公司；强力土壤DNA提取试剂盒：美国MoBio公司；通用型逆转录酶（HiScript® II Super-Mix）、qPCR反应体系（ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix）、VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3高效DNA文库构建试剂盒（ND607）：南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

实时荧光定量PCR仪：CFX96 Touch型，美国Bio-Rad Laboratories公司；PCR热循环仪：C1000 Touch型，美国Bio-Rad Laboratories公司；高通量组织研磨器：SCIENTZ-48型，宁波新芝生物科技股份有限公司；pH计：ST3100型，美国奥豪斯仪器有限公司；涡旋混匀仪：MX-S型，大龙兴创实验仪器（北京）股份公司；凝胶成像系统：FR-1000型，上海复日科技有限公司。

1.3 样品处理

收集不同牧场的生乳，留样3份（A1、A2、A3），乳品加工厂将生乳在大型奶罐中混合，进行超高温瞬时杀菌处理，取1份UHT乳成品异常包装样品（A4）用于分析。样品经液氮速冻后，即刻置于−80 ℃保存。为提高取样代表性，样品在低温下完全融化后，充分涡旋混匀，每个样品取3次、每次20 mL，即共对12个样品进行核酸提取和测序分析。

1.4 提取样品中的微生物基因组

参照强力土壤DNA提取试剂盒说明书的操作流程提取样品的微生物总基因组。用1 g/dL琼脂糖凝胶电泳和实时荧光定量PCR仪检测DNA的纯度、含量和完整性，检测合格的DNA于−20 ℃保存，用于后续建库测序[8-10]。

1.5 建库测序

用超声波破碎仪将基因组DNA随机打断成长度约300 bp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[11-13]。文库构建完成后，使用Qubit 2.0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qPCR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，将不同文库按照有效浓度及目标下机数据量汇集，然后在Illumina NovaSeq 4000平台测序[14-19]。

1.6　数据分析处理

使用Trimmomatic软件（v0.36）对Illumina NovaSeq 4000下机原始数据进行质控，将得到的高质量序列使用基因组组装软件MEGAHIT（v1.0.6）进行组装。将测序数据匹配到组装的contig序列片段，评估组装过程中序列利用率，采用Prodigal软件对组装得到的contig序列进行开放阅读框（open reading frame，ORF）预测。使用CD-HIT软件对预测的基因序列以0.95的相似度去除冗余，得到非冗余基因集，并采用Bowtie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品中的丰度信息，得到标准化基因丰度表，通过样品间相关性和维恩分析对物种组成进行比对分析。利用基因组信息进行功能性分析，使用DIAMOND软件（v5.1）将非冗余基因与各功能数据库进行比对，筛选序列相似性最高的蛋白质，得到功能注释信息。对于每条序列的比对结果，选取得分最高的比对结果（one HSP>60 bits）进行后续分析，根据功能注释结果和基因丰度表，可获得各个样品在各个分类层级上的基因数目[20-26]。

2　结果与讨论

2.1　测序数据质控结果

测序数据的数据量和质量是进行下一步准确宏基因组分析的关键。通过去除接头片段和低质量序列，严格控制数据质量。如表1所示，A1、A2、A3、A4样品去除低质量数据后分别得到85 683 158、85 716 342、84 824 060、81 854 336个序列，均能满足检测要求。

表1　测序数据统计

Table 1　Statistics of sequencing data

样品	总序列数/个	原始碱基数/Gb	干净序列数/个	去除低质量碱基后的总碱基数/Gb	去宿主序列数/个	总碱基数/Gb	GC占比/%	Q20值/%	Q30值/%
A1	86 411 934	12.361 3	85 683 158	12.221 4	22 377 108	3.097 5	47.58	97.49	92.96
A2	86 432 704	12.364 3	85 716 342	12.225 7	21 516 780	2.977 7	47.73	97.47	92.86
A3	85 561 552	12.239 7	84 824 060	12.096 6	19 308 358	2.668 6	48.95	97.50	92.95
A4	82 152 170	11.752 0	81 854 336	11.682 5	81 664 630	11.371 4	37.44	97.78	93.27

注：Q20值表示干净序列质量值≥20的碱基所占的百分比；Q30值表示干净序列质量值≥30的碱基所占的百分比。

此外，A1、A2、A3样品中的去宿主序列数及总碱基数均显著低于A4样品。其主要原因可能有以下2点：首先，A1、A2和A3样品作为未经加工处理的生乳，其微生物负荷及遗传背景受原料来源、挤奶过程中的外源污染以及环境因素的影响较为复杂，测序数据中包含大量来自奶牛体细胞、核酸碎片的宿主基因组序列，导致过滤后有效微生物序列大幅损失；其次，生乳中部分原生微生物处于低代谢或休眠状态，其DNA片段化程度较高，也会影响有效测序信息的保留比例。相比之下，A4样品是经过均质、UHT及灌装等多级加工处理的成品奶，其宿主来源核酸、环境微生物以及非耐热菌，在加工过程中会被灭活或降解，从而显著降低了测序背景信号。已有研究表明，巴氏杀菌和UHT处理可显著减少哺乳动物细胞残余DNA及大部分非耐热菌遗传物质，从而提高测序数据中目标污染微生物信号的相对占比[27]。同时，那些能够耐受加工条件的芽孢形成菌，可能在贮存阶段发生选择性增殖，从而使过滤后获得的目标微生物遗传信息比例更高、背景更清晰。样品测序数据的GC占比也有明显差异，A1、A2、A3样品的GC占比差异不显著，分别为47.58%、47.73%和48.95%；而A4样品的GC占比显著低于其他3个样品，仅37.44%，表明不同样本中遗传信息和微生物组成存在显著差异。4个样品测序数据的Q20值均大于97%，表明以上4组测序数据满足质控要求，可进行遗传信息组装、比较和分析。

对宏基因组测序数据进行组装分析：基于 de Bruijn graph 原理，利用拼接软件 MEGAHIT 进行基因组组装，筛选 800 bp 以上的连续片段用于后续分析[28-31]。如图 1 所示，A1、A2、A3 样品的连续片段总数分别为 29 569、28 001、24 752 个，而 A4 样本的连续片段总数仅为 590 个。但 A4 样品中连续片段长度显著高于其他样品，最长的连续片段长度达 230 955 bp，远超其余 3 个样品。综上，A4 样品的测序数据与其他 3 个样品差异显著，A4 样品数据连续片段数量少，但长度更长。结合 A4 样品特性，推测其微生物类群和遗传信息来源相对单一，因此通过拼接可获得更长的连续片段长度。

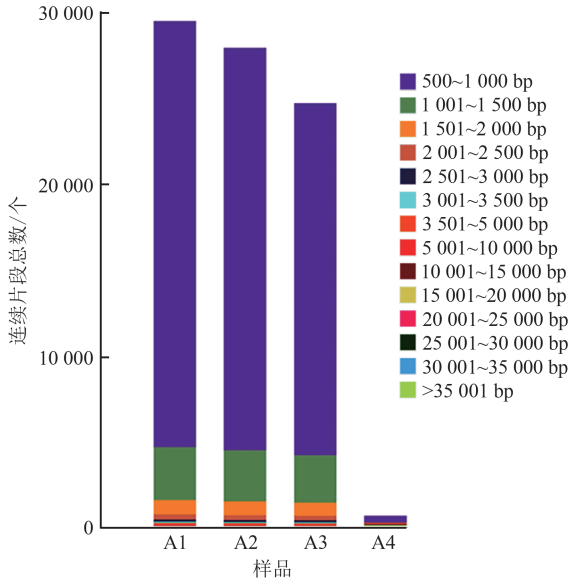


图 1　片段长度分布

Fig. 1　Length distribution of contigs

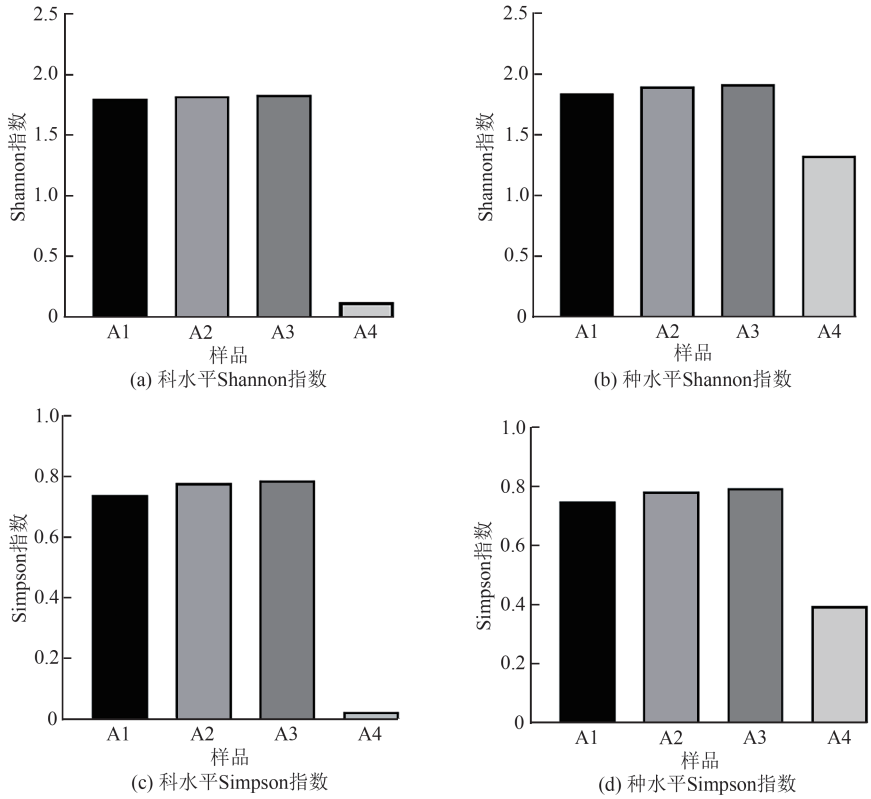
2.2　α 多样性分析

采用 Shannon 指数和 Simpson 指数评价不同样品微生物群落的 α 多样性。Shannon 指数能综合反映微生物群落丰富度和均匀度，其值越高表示微生物群落多样性越高。如图 2 所示，A1、A2 和 A3 样品在科水平的 Shannon 指数均为 1.8 左右，在种水平分别为 1.84、1.89 和 1.91，三者差异较小，表明 A1、A2、A3 样品具有相近的微生物群落多样性。相比之下，A4 样品在科水平的 Shannon 指数显著降低至 0.1 左右，Simpson 指数接近 0.02；其在种水平的 Shannon 指数和 Simpson 指数分别为 1.31 和 0.39，虽较科水平有所升高，但仍低于 A1、A2、A3 样品。上述结果表明，A4 样品的微生物群落多样性整体降低，且在科水平表现出更明显的微生物群落集中现象，其微生物群落结构受少数优势类群主导。

2.3　样品的微生物群落分布

将基因集在界水平上进行分类，其中细菌是 4 个样品中的主要生物类群，同时细菌也是导致 A4 样品腐败变质的关键类群（细菌界相对丰度 98.9%）。从采集的 4 个样品中共鉴定出 139 种微生物，分属于 15 门 21 纲 28 目 46 科 82 属。为了进一步明确导致 UHT 乳（A4）腐败的关键微生物，对 4 个样品在门、属、种水平上相对丰度前 30 位的物种进行深入比较分析。如图 3 所示，在门水平上，A1、A2、A3 样品物种分布基本一致，样品间不同物种相对丰度差异不超过 1.2%，相对丰度由高到低依次为 Firmicutes、Proteobacteria 和 Nucleocytoviricota；在属水平上，A1、A2、A3 样品中相对丰度前 5 的微生物属为 Firmicutes 的 *Staphylococcus*、*Bacillus*、*Streptococcus* 和 Proteobacteria 的 *Anaplasma* 和 *Klebsiella*，其中 *Staphylococcus* 的相对丰度最高（35.8%~38.2%）。A4 样品微生物分布与其他样品差异显著，A4 样品中微生物类群相对单一，Firmicutes 的相对丰度超过 99.8%，且均为 Bacillaceae，其中 *Caldibacillus* 的相对丰度超过 88.4%，其次为 *Bacillus*（6.1%）、*Metabacillus*（1.8%）、*Geobacillus*（1.1%）和 *Aeribacillus*（0.7%）。

在种水平上进一步分析不同样品的微生物分布差异，见图 4。A1、A2、A3 样品的微生物分布相似，高相对丰度的微生物物种依次为 *Staphylococcus aureus*、*Anaplasma phagocytophilum*、*Klebsiella pneumoniae*、*Bacillus cereus*、*Streptococcus pneumoniae*、*Acetanaerobacterium elongatum* 等；而 A4 样品中的 *Caldibacillus thermoamylovorans*（*C. thermoamylovorans*）占绝大多数，相对丰度超过 76.3%，除了其他属（others）以外，其次是热噬芽孢杆菌属的 *Caldibacillus hisashii*（*C. hisashii*），相对丰度为 6.8%。此外，在 A4 样品中还鉴定到多种其他芽孢杆菌：*Bacillus thermophilus*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus coagulans*。而在 A1、A2、A3 样品中相对丰度较高的金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）、肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）在 A4 样品中的相对丰度均不到 0.1%。结合测序结果可知，

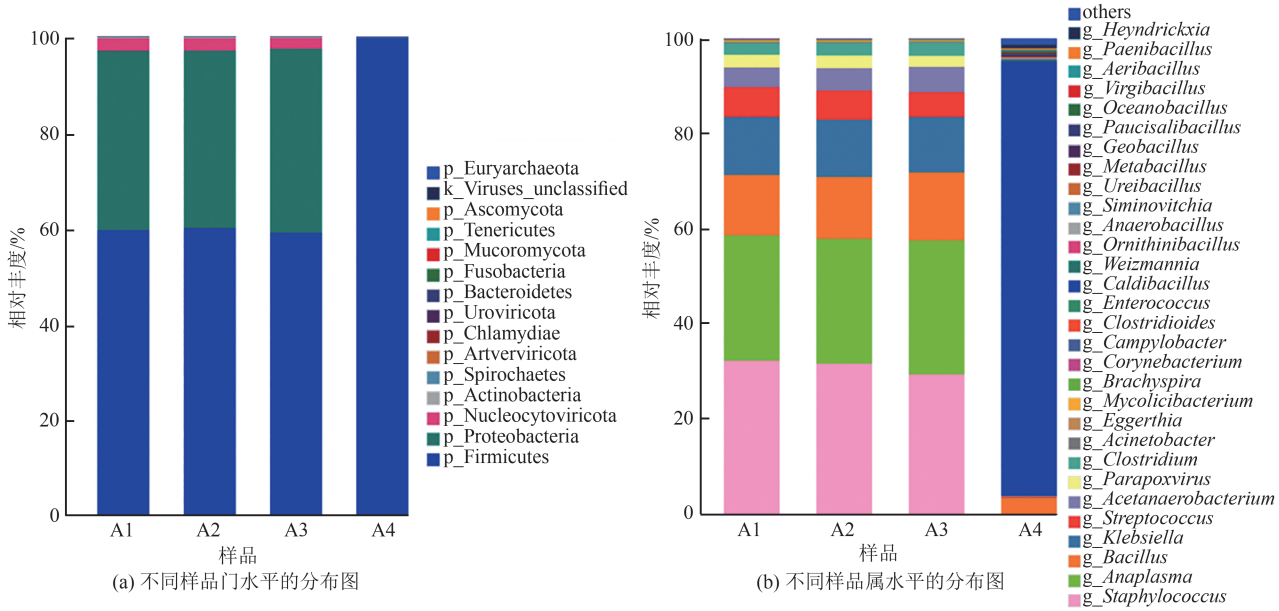


(a) 科水平Shannon指数　(b) 种水平Shannon指数

(c) 科水平Simpson指数　(d) 种水平Simpson指数

图 2　样品的 α 多样性分析

Fig. 2　Analysis of α diversity for samples



(a) 不同样品门水平的分布图　(b) 不同样品属水平的分布图

图 3　样品的微生物群落分布图

Fig. 3　Microbial community distribution across samples

UHT处理已有效清除A1、A2、A3原料乳中的大多数微生物，包括金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌和肺炎链球菌等常见致病菌。需要注意的是，芽孢杆菌具有较强的耐热性，其芽孢能够抵抗高温，因此仍可能有少量耐热菌存活于处理后的产品中。在本研究中，*C. thermoamylovorans* 表现出明显生存优势，在常温贮存条件下，该菌可恢复生长并逐渐积累，最终在A4样品中成为绝对优势菌。

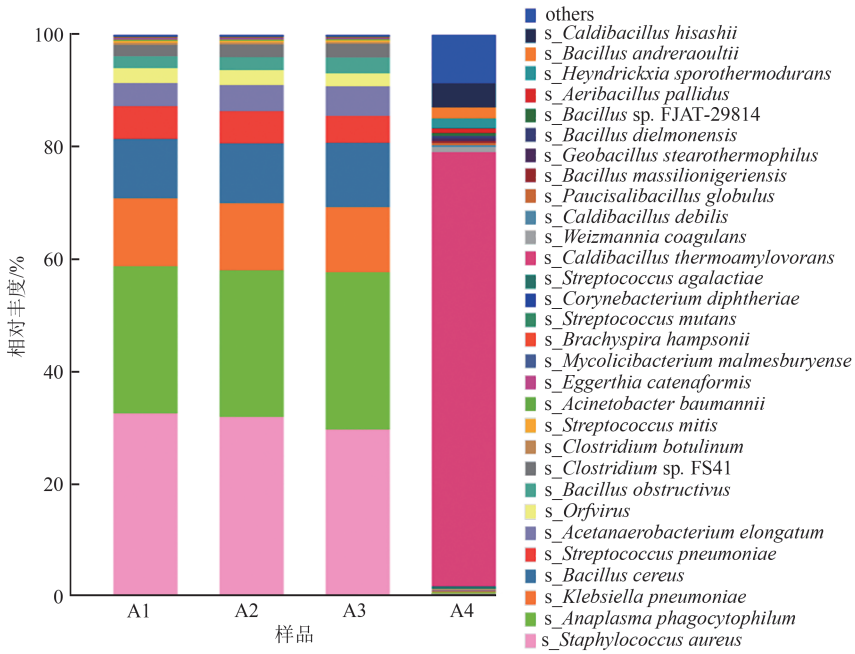


图 4　样品在种水平上的微生物群落分布图

Fig. 4　Microbial community distribution at the species level across samples

从潜在污染来源分析，*C. thermoamylovorans* 仅在 A1 样品中检测到，而在 A2、A3 样品中未检出。虽然 *C. thermoamylovorans* 在 A1 样品中的相对丰度较低，但这一结果仍能说明 A4 样品中该菌的大量存在可能与 A1 原料乳来源或相关收集流程有关。同时，由于芽孢杆菌可在设备表面或输送系统中长期存活，不排除其在加工系统中存在隐性污染或以生物膜形式积累的可能性。

2.4　物种丰度聚类热图

为了进一步分析不同样品间微生物组成差异，对种水平的丰度进行热图聚类分析。选取丰度排名前 50 的微生物进行聚类，并通过颜色梯度反映其在不同样品中的丰度变化，同时以聚类树状结构展示样品间群落结构的相似度。该分析方法不仅能够揭示高丰度和低丰度菌群的分布特征，也有助于识别在不同样品中特异性富集或消失的关键微生物类型。由图 5 可知，A1、A2、A3 样品聚类距离较近，表明其微生物群落结构具有较高相似性。这 3 组样品中微生物群落分布较均衡，未出现明显的单一优势菌。其中，*Staphylococcus aureus* 和 *Anaplasma phagocytophilum* 的丰度最高，是共同的优势菌种。此外，*Klebsiella pneumoniae*、*Bacillus cereus*、*Streptococcus pneumoniae* 和 *Acetanaerobacterium elongatum* 等物种在 3 个样品中均呈梯度分布，进一步印证了 3 份生乳的环境暴露水平及污染结构具有一致性。A4 样品的微生物群落结构明显偏离于 A1、A2、A3 样品的聚类分组，呈现单一菌群占绝对优势的状态，微生物群落分布特征表现出高度集中性。*C. thermoamylovorans* 在 A4 样品中的丰度显著高于其他菌种，其余微生物的丰度则接近检测下限。这种单菌主导的结构特征完全符合经高温处理后残留的耐热芽孢杆菌重新生长并占据生态位的典型模式。综上所述，热图聚类分析进一步验证了宏基因组分析结果，即生乳样品中微生物群落结构复杂且多样，经过热处理筛选及常温贮存环境，UHT 乳样品中最终形成了由耐热芽孢杆菌主导的单一微生物群落结构。这一发现不仅有助于探究 UHT 乳的腐败机制，也可为进一步开展来源追踪及污染控制提供数据支撑。

由表2可知，A4坏包样品中 *C. thermoamylovorans* 的碱基注释占比达 77.51%，显著高于其他物种；图 5~6 的结果进一步表明，*C. thermoamylovorans* 为 A4 样品的优势菌，同时 *C. thermoamylovorans* 可形成耐热性极强的芽孢，是 UHT 乳贮藏期腐败变质的重要风险菌之一[32-34]。表 2 中 A1 样品亦检出 *C. thermoamylovorans*，说明 A4 坏包样品中的污染菌株可能与 A1 样品来源相关。

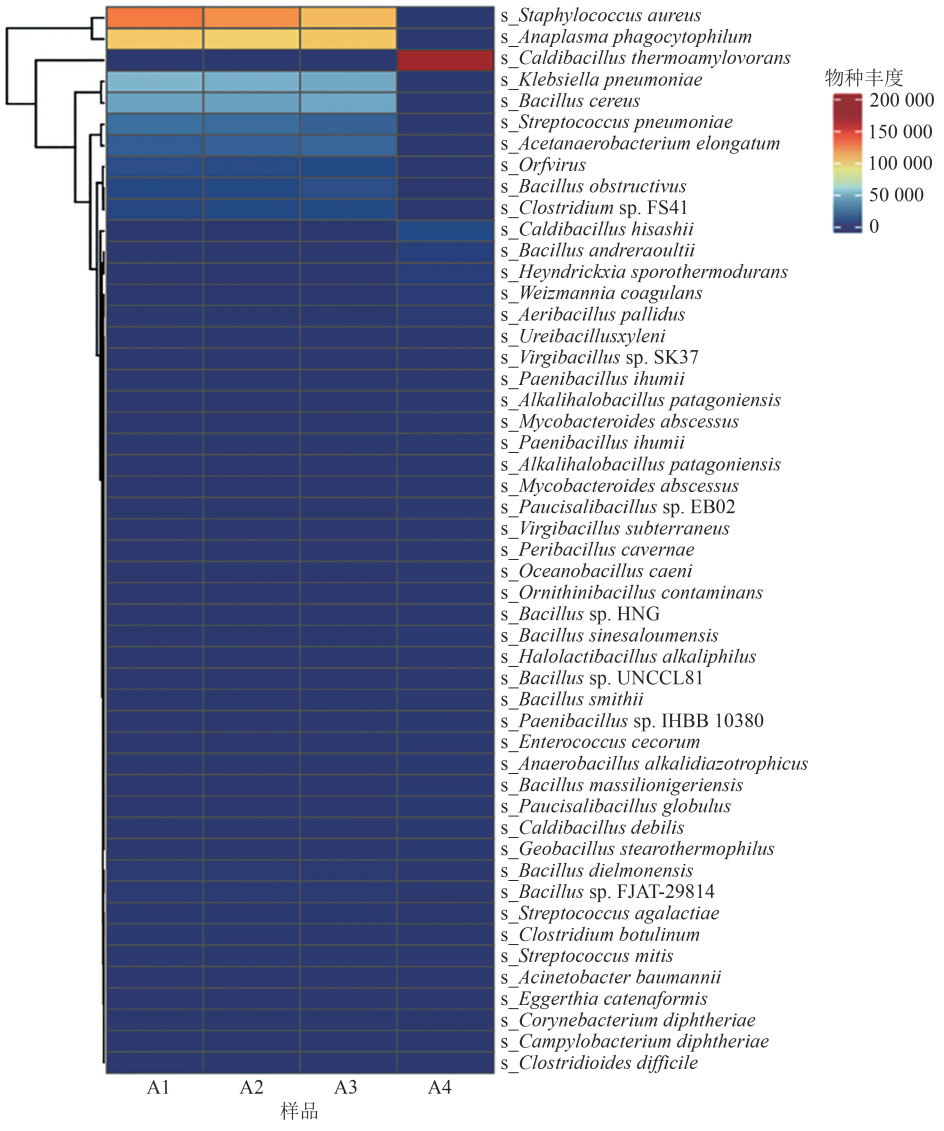


图5　样品的物种丰度聚类热图

Fig. 5　Heatmap of species abundance across samples

表2　样品种水平碱基注释占比

Table 2　Relative abundance at the species level across samples

样品	种水平碱基注释占比/%			
	C. thermoamylovorans	*Heyndrickxia sporothermodurans*	*Weizmannia coagulans*	*Aeribacillus pallidus*
A1	2.71×10^{-5}	0	0	6.68×10^{-6}
A2	0	0	0	0
A3	0	0	0	0
A4	77.51	4.32	2.00	0.90

2.5　功能水平分析

通过EggNOG数据库对4个样品的微生物基因功能进行注释。由图7可知，七大功能类别中除药物开发（Drug Development）功能模块外，其余均成功注释。与上述微生物群落结构结果一致，A1、A2、A3样品在功能注释上表现出高度一致性，其中与遗传信息处理（Genetic Information Processing）相关的功能基因占比最高（63.21%）。结果表明，3组样品的微生物群落在功能层面具有较高的一致性，其功能组成主要与微生物细胞的基础生命活动有关，包括遗传信息的复制、转录及调控等过程。相比之下，A4样品呈现出明显不同的功能特

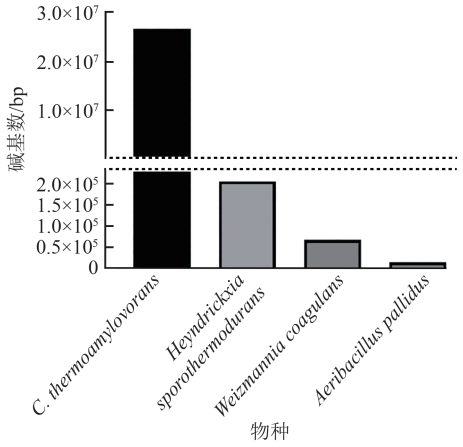


图 6　A4 样品的物种碱基注释

Fig. 6　Taxonomic annotation of sample A4

征，其遗传信息处理相关功能显著减少，而与新陈代谢（Metabolism）、环境适应（Environmental Information Processing）和细胞进程（Cellular Processes）相关的功能基因占据主导地位。这一功能构成转变与上述微生物群落单一化、耐热芽孢杆菌占优势的群落结构变化趋势高度吻合，表明 A4 样品中的微生物不仅具有耐受高温处理的能力，还能够在长期常温贮存条件下维持高代谢活性并成为优势菌属。

KEGG 数据库功能注释结果见表 3。A4 样品中多项与能量获取及极端环境适应相关的代谢功能显著富集：金属离子稳态与抗氧化系统相对丰度最高（891），说明多数菌群具备较强的氧化应激耐受性和金属离子调控能力；糖 PTS 系统 EIIA 组分相对丰度高达 775，表明多数菌群具备高效的碳源摄取与糖代谢能力，可在营养有限或单一乳糖环境下快速获得生长能量；氧化磷酸化和核糖体遗传处理显著富集，说明多数菌群的能量代谢与蛋白质合成能力处于活跃状态；与芽孢形成密切相关的 *spo0A* 和 *cheB* 基因明显表达，进一步表明多数菌群能够在不利环境下形成芽孢并完成生命周期转换。这些

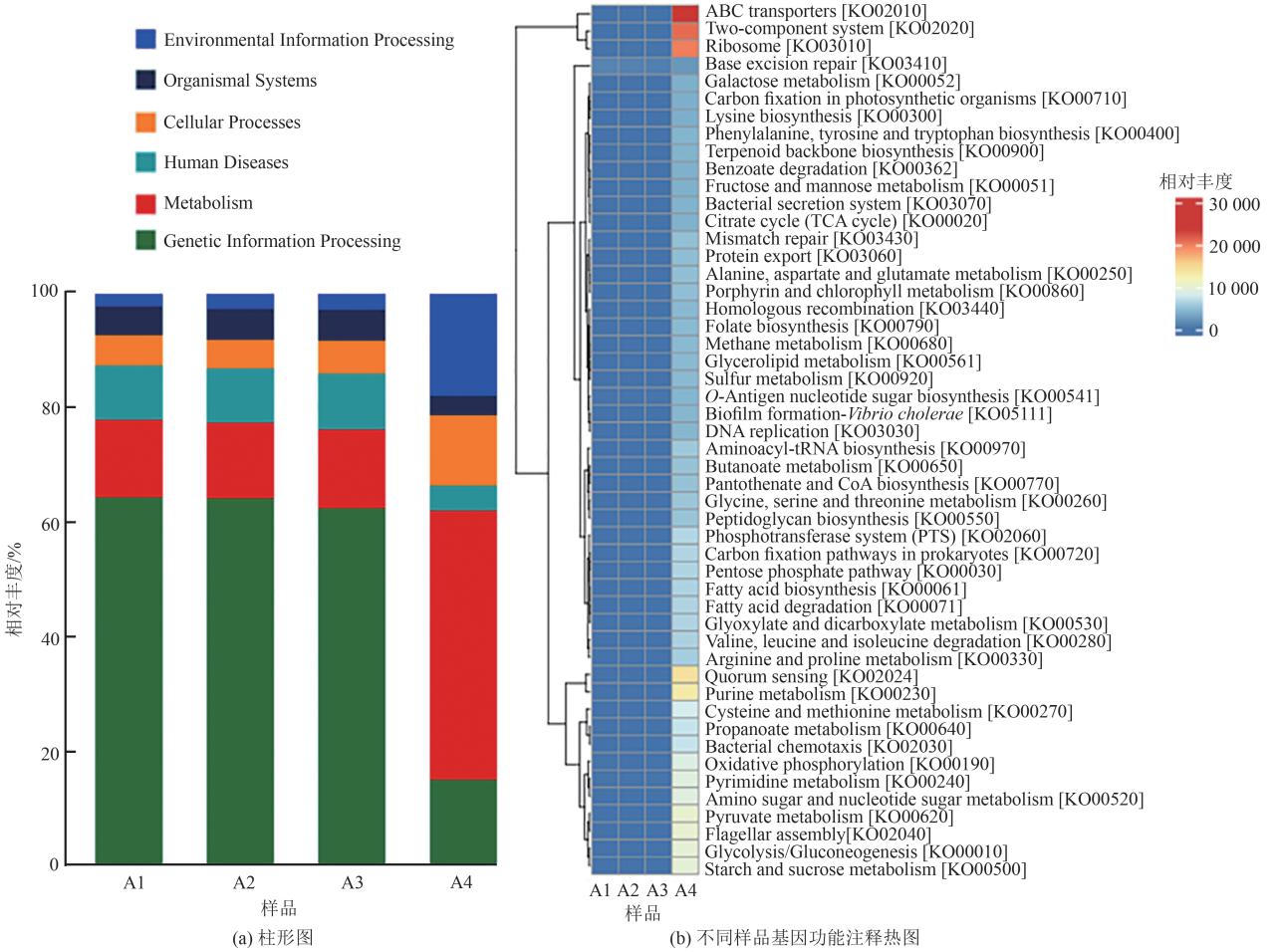


图 7　功能注释分析

Fig. 7　Functional annotation analysis

表3 KEGG数据库功能注释分析表

Table 3 KEGG database functional annotation analysis

KO	KO基因名称	KO功能注释	相对丰度
K06726	*rbsD*	*D*-核糖吡喃酶	476
K03563	*csrA*	生物膜形成	720
K02892	*RP-L23*	核糖体遗传处理	695
K03075	*secG*	前蛋白转位酶亚基	681
K01952	*PFAS*	磷酸核糖基甲酰甘氨酸脒合酶	713
K00128	*ALDH*	NAD^+途径	710
K02777	*crr*	糖PTS系统EIIA组分	775
K01489	*cdd*	胞苷脱氨酶	340
K02110	*ATPF0C*	氧化磷酸化	748
K07213	*ATOX1*	金属离子稳态与抗氧化系统	891
K07699	*spo0A*	孢子形成蛋白	188
K03412	*cheB*	孢子转录因子	195

显著表达的功能特征与*C. thermoamylovorans*已知生理生态特性高度吻合。*C. thermoamylovorans*属于典型的嗜热、耐热芽孢杆菌，能够在高温灭菌过程中以芽孢形式存活，并在后续贮存阶段恢复生长。此外，*C. thermoamylovorans*可分泌热稳定淀粉酶、蛋白酶及脂肪酶，导致乳糖、酪蛋白及脂类分解，进而引发产品产生酸败、苦味、絮凝或蛋白质失稳等腐败现象。功能注释的结果进一步说明了A4样品中微生物群落向耐热、具备高代谢能力和生境优势型菌株演替，并验证了*C. thermoamylovorans*是导致UHT乳贮存期腐败的关键致腐菌。

综上所述，宏基因组功能注释结果与微生物群落结构分析具有高度一致性，进一步确认了*C. thermoamylovorans*是导致UHT乳贮存期腐败的关键微生物。该菌不仅具备较强的糖代谢与能量获取能力，还可通过芽孢形成机制抵抗UHT处理，从而在极端加工条件下存活并在贮存过程中恢复生长。同时，该菌能够分泌多种具有热稳定性的酶类及次生代谢产物，导致产品品质损失。由此可见，*C. thermoamylovorans*污染是导致UHT乳产生隐性腐败风险的核心因素。

3 结论

本研究围绕生乳微生物的多样性特征展开分析，并对UHT乳中关键致腐微生物进行识别与解析，基于宏基因组测序技术揭示了生乳与UHT乳中耐热芽孢杆菌污染与致腐风险。结果表明，生乳作为开放性原料，携带复杂微生物群落，其中芽孢杆菌是最主要的潜在污染菌。除了传统关注的*Bacillus*与*Geobacillus*外[35-37]，*Caldibacillus*作为新兴的极端耐热芽孢杆菌，已在生乳中检出多个阳性结果，对后续灭菌工艺构成潜在威胁。

研究发现*C. thermoamylovorans*为变质UHT乳的核心致腐微生物。该菌依靠产芽孢机制耐受超高温处理，并凭借增强的糖代谢、芽孢萌发与应激响应能力，在乳制品货架期内能迅速恢复生长并成为优势菌。宏基因组分析结果表明，*C. thermoamylovorans*有分泌脂肪酶、糖苷酶等相关腐败酶的遗传潜力，这些酶是导致乳品酸败、凝聚、分层及货架期产品坏包的根本原因。

乳制品中的耐热芽孢杆菌污染既可能来源于生乳原料端，也可能在加工设备表面以生物膜的形式累积，并持续产生污染风险。应从源头卫生管控、生产过程管理及终端杀菌策略3个层面协同管理。例如：控制牧场关键点位的芽孢杆菌污染；精准检测和评估生乳样品的耐热芽孢杆菌污染；工厂可尝试将“预巴杀”芽孢激活和其他前除菌工艺相结合，再进行UHT处理，最大程度降低乳制品耐热芽孢杆菌污染风险。综上，本研究明确了乳制品中的一种关键致腐微生物，为UHT乳中耐热芽孢杆菌的精准识别、机制解析与风险控制提供了科学依据，为乳制品质量安全保障提供了理论支撑。

参考文献

[1] Li S W，Lopez R A，Zhu C，et al. Consumer preferences for sustainably produced ultra-high-temperature milk in China[J]. Journal of Dairy Science，2023，106(4)：2338-2346.

[2] You L J，Yang C C，Jin H，et al. Metagenomic features of traditional fermented milk products [J]. LWT-Food Science and Technology，2022，155：112945.

[3] Flint S，Gonzaga Z J，Good J，et al. *Bacillus thermoamylovorans*—a new threat to the dairy industry：a review[J]. International Dairy Journal，2017，65：38-43.

[4] 侯霞霞，王云霞，刘丽君，等. 生牛乳中芽孢杆菌的分离鉴定及其耐热性[J]. 乳业科学与技术，2022，45(6)：1-6. Hou X X，Wang Y X，Liu L J，et al. Isolation，identification and heat resistance of *Bacillus* from raw milk

[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2022, 45(6): 1-6.(in Chinese)

[5] 代宏超. 市售液态奶中蜡样芽孢杆菌流行特征、致腐能力及在营养胁迫下存活特性研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2025: 17-18.

[6] 严卓彦, 谭宇翔, 林吉恒, 等. 宏基因组测序法在药品污染细菌鉴定与溯源中的应用研究[J]. 中国药学杂志, 2024, 59(11): 1041-1046.
Yan Z Y, Tan Y X, Lin J H, et al. Evaluation of the application value of metagenomic sequencing in identification and tracing of bacteria contaminating drugs [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2024, 59(11): 1041-1046.(in Chinese)

[7] 高沙尔•卡依尔哈力, 付志昂, 欧阳单华, 等. 宏基因组分析新疆北部地区马乳中菌群结构及功能基因[J]. 食品与生物技术学报, 2025, 44(5): 116-126.
Kayierhali G S E, Fu Z A, Ouyang D H, et al. Metagenomic analysis of microbial community structure and functional genes in horse milk from northern Xinjiang[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2025, 44(5): 116-126.(in Chinese)

[8] 周立光, 杨明喆, 冯会粉, 等. 复合益生菌产品菌种鉴定及活菌定量检测方法[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(9): 235-244.
Zhou L G, Yang M Z, Feng H F, et al. Study on methods of species identification and quantitative detection of viable cells in composite probiotics products [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(9): 235-244.(in Chinese)

[9] Lai S Y, Pan S J, Sun C Q, et al. metaMIC: reference-free misassembly identification and correction of *de novo* metagenomic assemblies[J]. Genome Biology, 2022, 23(1): 242.

[10] Vakhlu J, Sudan A K, Johri B N. Metagenomics: future of microbial gene mining [J]. Indian Journal of Microbiology, 2008, 48(2): 202-215.

[11] 刘文虎, 刘光钱, 张芮, 等. 基于宏基因组解析中温大曲成熟前后的微生物群落功能差异[J]. 生物工程学报, 2024, 40(3): 877-894.
Liu W H, Liu G Q, Zhang R, et al. Metagenomics unveils the differences in the functions of microbial community of medium-temperature Daqu before and after maturation [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(3): 877-894.(in Chinese)

[12] 高世勇, 魏新瑞, 唐博琪, 等. 基于宏基因组学的肠道微生物研究进展[J]. 中药药理与临床, 2024, 40(3): 115-119.
Gao S Y, Wei X R, Tang B Q, et al. Research advances in intestinal microbiota based on metagenomics [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2024, 40(3): 115-119.(in Chinese)

[13] Patel T, Chaudhari H G, Prajapati V, et al. A brief account on enzyme mining using metagenomic approach [J]. Frontiers in Systems Biology, 2022, 2: 1046230.

[14] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.

[15] 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.

[16] Li D H, Luo R B, Liu C M, et al. MEGAHIT v1.0: a fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices[J]. Methods, 2016, 102: 3-11.

[17] Hyatt D, Chen G L, LoCascio P F, et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(1): 119.

[18] Qin J J, Li R Q, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.

[19] Zeller G, Tap J, Voigt A Y, et al. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer[J]. Molecular Systems Biology, 2014, 10(11): MSB145645.

[20] Villar E, Farrant G K, Follows M, et al. Environmental characteristics of Agulhas rings affect interocean plankton transport[J]. Science, 2015, 348(6237): 1261447.

[21] Cotillard A, Kennedy S P, Kong L C, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness[J]. Nature, 2013, 500(7464): 585-588.

[22] Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers [J]. Nature, 2013, 500(7464): 541-546.

[23] Buchfink B, Xie C, Huson D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. Nature Methods, 2015, 12(1): 59-60.

[24] Ondov B D, Bergman N H, Phillippy A M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 385.

[25] Avershina E，Frisli T，Rudi K. *De novo* semi-alignment of 16S rRNA gene sequences for deep phylogenetic characterization of next generation sequencing data[J]. Microbes and Environments，2013，28(2)：211-216.

[26] Noval Rivas M，Burton O T，Wise P，et al. A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology，2013，131(1)：201-212.

[27] McHugh A J，Feehily C，Fenelon M A，et al. Tracking the dairy microbiota from farm bulk tank to skimmed milk powder[J]. MSystems，2020，5(2)：e00226-e00220.

[28] Segata N，Izard J，Waldron L，et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. Genome Biology，2011，12(6)：R60.

[29] Coorevits A，Logan N A，Dinsdale A E，et al. *Bacillus thermolactis* sp. Nov.，isolated from dairy farms，and emended description of *Bacillus thermoamylovorans*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，2011，61(8)：1954-1961.

[30] 王小璐，杨永龙，王美华，等. 乳制品中芽孢杆菌的研究进展[J]. 食品科技，2021，46(5)：20-24.
Wang X L，Yang Y L，Wang M H，et al. Research progress of *Bacillus* in dairy product[J]. Food Science and Technology，2021，46(5)：20-24.(in Chinese)

[31] Zhang R，Liu W C，Liu Y，et al. Impact of water quality variations on the microbial metagenome across coastal waters in Shenzhen，South China[J]. Ocean & Coastal Management，2021，208：105612.

[32] Luo J F，Ledgard S. New Zealand dairy farm systems and key environmental effects [J]. Frontiers of Agricultural Science and Engineering，2021，8(1)：148.

[33] Berendsen E M，Krawczyk A O，Klaus V，et al. *Bacillus thermoamylovorans* spores with very-high-level heat resistance germinate poorly in rich medium despite the presence of ger clusters but efficiently upon exposure to calcium-dipicolinic acid [J]. Applied and Environmental Microbiology，2015，81(22)：7791-7801.

[34] Coorevits A，De Jonghe V，Vandroemme J，et al. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms[J]. Systematic and Applied Microbiology，2008，31(2)：126-140.

[35] Lücking G，Stoeckel M，Atamer Z，et al. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage[J]. International Journal of Food Microbiology，2013，166(2)：270-279.

[36] Scheldeman P，Pil A，Herman L，et al. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms[J]. Applied and Environmental Microbiology，2005，71(3)：1480-1494.

[37] Sun T M，Wang R，Sun Y N，et al. The global prevalence of *Bacillus* spp. in milk and dairy products：a systematic review and meta-analysis[J]. Foods，2025，14(15)：2599.