



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105748534 B

(45)授权公告日 2018.12.18

(21)申请号 201610281774.5

(22)申请日 2016.04.29

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105748534 A

(43)申请公布日 2016.07.13

(83)生物保藏信息

CGMCC No.11930 2015.12.24

CGMCC No.11931 2015.12.24

(73)专利权人 内蒙古和美科盛生物技术有限公司

地址 010051 内蒙古自治区呼和浩特市新城区成吉思汗大街与科尔沁北路交汇处孵化园7号楼

(72)发明人 黄卫强 姚国强

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

(54)发明名称

一种改善奶牛乳头微生态系统的复合乳酸菌乳头清洗液

(57)摘要

本发明提供一种改善奶牛乳头微生态系统的复合乳酸菌乳头清洗液，所述清洗液由两株植物乳杆菌L.plantarum SCI-01和L.plantarum SCI-02混和发酵的发酵液制备而成，清洗液中乳酸菌活菌浓度≥50亿CFU/mL，所述植物乳杆菌L.plantarum SCI-01和L.plantarum SCI-02于2015年12月24日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号分别为CGMCC No.11930和CGMCC No.11931。通过使用本发明清洗液对奶牛乳头进行定期清洗，能够有效抑制病原菌滋生，控制体细胞数，改善奶牛乳头微生态系统，从而有效降低隐性和临床乳房炎发病率，提高产奶量，提升奶品质。

(56)对比文件

CN 102120975 A,2011.07.13,

CN 103202391 A,2013.07.17,

CN 101185480 A,2008.05.28,

CN 103981123 A,2014.08.13,

CN 103911325 A,2014.07.09,

CN 104510779 A,2015.04.15,

CN 101700105 A,2010.05.05,

高鹏飞等.复合乳酸菌制剂在防治奶牛乳房炎方面的应用研究.《中国畜牧杂志》.2014,第50卷(第12期),第41-47页.

杨慧娟等.乳酸菌微生态制剂防治奶牛隐性乳房炎应用研究.《中国奶牛》.2014,(第17期),第51-54页.

审查员 全弘扬

权利要求书1页 说明书8页 附图7页

1. 一种改善奶牛乳头微生态系统的复合乳酸菌乳头清洗液，其特征在于，所述的复合乳酸菌乳头清洗液是由两株植物乳杆菌L.plantarum SCI-01和L.plantarum SCI-02混和发酵的发酵液制备而成，所述清洗液中乳酸菌活菌浓度 ≥ 50 亿CFU/mL，所述植物乳杆菌L.plantarum SCI-01和L.plantarum SCI-02的保藏编号分别为CGMCC No.11930和CGMCC No.11931。

2. 如权利要求1所述的一种改善奶牛乳头微生态系统的复合乳酸菌乳头清洗液，其特征在于，所述清洗液的制备方法包括如下步骤：

a. 菌种的活化：将-80℃冷冻保存的植物乳杆菌L.plantarum SCI-01和L.plantarum SCI-02接种于MRS液体培养基中37℃培养24小时，如此传代培养2次得到活化的菌种；

b. 配制发酵培养基：蔗糖50g/L，酵母粉20g/L，大豆蛋白胨10g/L，吐温-80 0.8g/L，用水充分溶解后121℃灭菌15min；

c. 制备种子培养液：将上述活化的菌种分别以1%的接种量接种于发酵培养基中，37℃混合发酵培养，发酵过程通过流加碱液控制pH 5.9以上至产酸停止，不再流加碱液时终止发酵，将发酵液无菌灌装，制得复合乳酸菌乳头清洗液。

3. 一株具有耐酸杀菌性能的植物乳杆菌L.plantarum SCI-01，其保藏编号为CGMCC No.11930。

4. 一株具有耐酸杀菌性能的植物乳杆菌L.plantarum SCI-02，其保藏编号为CGMCC No.11931。

一种改善奶牛乳头微生态系统的复合乳酸菌乳头清洗液

技术领域

[0001] 本发明涉及一种有效改善奶牛乳头微生态系统的复合乳酸菌乳头清洗液，该清洗液是由植物乳杆菌SCI-01 (*L.plantarum* SCI-01) 和植物乳杆菌SCI-02 (*L.plantarum* SCI-02) 发酵而成，属于微生态制剂领域。

背景技术

[0002] 奶牛乳房炎 (Bovine Mastitis) 是全球奶牛养殖业的顽疾，具有发生范围广、发病率高、难治愈、易复发等特点。无论隐性还是临床乳房炎都会对奶牛相关产业链造成直接和间接的影响。直接影响包括：奶牛产奶量和奶品质下降，产生的毒素破坏乳房上皮组织形成瘢痕组织，导致奶牛在整个泌乳期的生产性能下降，甚至丧失生产性能被提前淘汰。间接影响包括：造成牛乳加工性能下降，影响后期乳制品的加工品质；造成药物残留，致使人们无法食用。病原微生物入侵导致感染是引起奶牛隐性和临床乳房炎的主要因素，研究表明这些病原菌多达130多种，金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是导致奶牛乳房炎的主要病原菌，并且往往是两者或者三者共同作用，而非单独导致。实际情况表明，隐性乳房炎因其症状轻微、不易观察，所造成的损失往往高于临床型乳房炎。

[0003] 奶牛乳头药浴是奶牛养殖行业一直沿用的一项操作流程，是在挤奶前后及时采用特定的药液对奶牛乳头进行浸润，在一定程度上抑制或杀灭乳头表面和乳头导管中的致病菌，是预防隐性和临床乳房炎的有效措施之一。资料显示，传统药浴液的成分一般为：洗必泰、聚维酮碘、壬基酚聚氧乙烯醚 (NPE) 等，这些物质在抵抗病原菌的同时也对奶牛乳头区域存在刺激性，并且对周边环境造成一定的污染，甚至进入食物链危害人畜健康。目前中成药制剂和微生态制剂正在逐渐兴起，前者主要以黄连、香薷、芦荟等清热解毒的中成药为主要成分，后者主要以乳酸链球菌素等乳酸菌代谢产物为主要成分，研究表明乳酸菌对奶牛乳头微生态系统具有极其重要的作用，它们通过定植在乳头表面或内部，成为乳头生理屏障的重要组成部分，维持奶牛乳头微生态系统的菌群平衡。并且，这些乳酸菌能够刺激巨噬细胞、诱导产生干扰素、促进细胞分裂、产生抗体及促进细胞免疫等，增强奶牛乳头的非特异性和特异性免疫反应，最终提高奶牛乳头免疫能力，同时通过产生具有抑菌功效的代谢产物抵抗外源病原菌的入侵。因此，可以研制一种能够有效改善奶牛乳头微生态系统的复合乳酸菌乳头清洗液，在发挥预防奶牛隐性和临床乳房炎功能的前提下也实现无毒无副作用、无药物残留、不污染环境的目标，对奶牛养殖业具有十分重要的意义。

[0004] 申请号201310479603.X《一种用于预防牛乳房炎的牛乳房清洗剂》公布了一种用于预防牛乳房炎的牛乳房清洗剂按质量百分比由0.1%~0.5%的乳酸链球菌素，0.02%~0.2%的ε-多聚赖氨酸，0.1%~1.5%的EDTA二钠，2%~10%的甘油，0.1%~1%的柠檬酸，1%~5%的聚乙烯吡咯烷酮和余量的纯水组成，目的是为了解决现有牛乳房清洗剂抑制和杀死引起牛乳房炎细菌的效果差以及易使牛奶中碘含量超标的问题。

[0005] 申请号201310094615.0《一种有效预防及改善牛乳房炎的复合乳酸菌微生态制

剂》公布了一种有效预防及改善牛乳房炎的复合微生态制剂,每克复合微生态制剂中干酪乳杆菌HM-09 (*L.casei* HM-09) 质量份数为10%,植物乳杆菌HM-10 (*L.plantarum* HM-10) 质量份数为10%,其余80%为沸石粉,同时复合微生态制剂中*L.casei* HM-09活菌数量 $\geq 2.5 \times 10^8$ cfu/g,*L.plantarum* HM-10活菌数量 $\geq 2.5 \times 10^8$ cfu/g;所述干酪乳杆菌HM-09 (*L.casei* HM-09) 和植物乳杆菌HM-10 (*L.plantarum* HM-10) 保藏编号分别为CGMCC No.6736和CGMCC No.6741。

[0006] 本发明提供的复合乳酸菌乳头清洗液不含有上述化学杀菌剂,且无需制成干粉制剂调配到饲料中饲喂奶牛。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种有效改善奶牛乳头微生态系统的复合乳酸菌乳头清洗液。

[0008] 本发明所述的复合乳酸菌乳头清洗液是由本发明提供的两株植物乳杆菌 *L.plantarum* SCI-01和*L.plantarum* SCI-02混和发酵的发酵液制备而成,所述清洗液中乳酸菌活菌浓度 ≥ 50 亿CFU/mL。

[0009] 本发明提供的菌株是从分离自内蒙古、蒙古国、甘肃、四川、新疆、青海、西藏自然发酵食品中的130株植物乳杆菌中精选得到的耐酸特性强(耐受pH 3.0)、生长性能好的2株 *L.plantarum* SCI-01和*L.plantarum* SCI-02。其中,*L.plantarum* SCI-01能够很好的定殖于动物乳头表面及内部,可有效抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、志贺氏菌、单胞李斯特氏菌的生长和繁殖。*L.plantarum* SCI-02产酸速度快,可有效抑制真菌、大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌、单胞李斯特氏菌的生长和繁殖。

[0010] 上述两株菌株已于2015年12月24日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC),保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所(邮编:100101),*L.plantarum* SCI-01菌种保藏编号:CGMCC No.11930,分类命名:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) ;*L.plantarum* SCI-02菌种保藏编号:CGMCC No.11931,分类命名:植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

[0011] 本发明提供的菌株具有以下优良杀菌特性(以抑菌圈直径表示)和耐酸特性:

[0012]

菌株	大肠杆菌 0157: H7(mm)	鼠伤沙门氏 菌(mm)	弗氏志贺氏 菌(mm)	金黄色葡 萄球菌 (mm)	单胞李斯 特氏菌 (mm)	无乳链球 菌(mm)
<i>L.plantarum</i> SCI-01	20.65 \pm 2.40	25.96 \pm 1.73	18.04 \pm 1.10	12.33 \pm 0.14	27.86 \pm 0.99	30.16 \pm 0.21
<i>L.plantarum</i> SCI-02	14.69 \pm 0.17	16.05 \pm 0.66	14.63 \pm 0.28	13.01 \pm 4.31	17.65 \pm 0.26	31.72 \pm 0.33
菌株	苯乳酸(mg/L)	胃液存活率 (%) (pH2.5)		胰液存活率 (%)		
		3h		4h		8h
<i>L.plantarum</i> SCI-01	53.95 \pm 0.35	76.55 \pm 0.79		98.21 \pm 0.45		98.71 \pm 0.58
<i>L.plantarum</i> SCI-02	61.30 \pm 0.42	74.95 \pm 1.95		96.24 \pm 3.24		97.02 \pm 2.67

[0013] 本发明所述复合乳酸菌乳头清洗液的制备方法包括如下步骤:

[0014] a. 菌种的活化:将-80℃冷冻保存的植物乳杆菌*L.plantarum* SCI-01和*L.plantarum* SCI-02接种于MRS液体培养基中37℃培养24小时,如此传代培养2次得到活化

的菌种；

[0015] b. 配制发酵培养基：蔗糖50g/L，酵母粉20g/L，大豆蛋白胨10g/L，吐温-80 0.8g/L，用水充分溶解后121℃灭菌15min；

[0016] c. 制备种子培养液：将上述活化的菌种分别以1%的接种量接种于发酵培养基中，37℃混合发酵培养，发酵过程通过流加碱液控制pH 5.9以上至产酸停止，不再流加碱液时终止发酵，将发酵液无菌灌装，制得复合乳酸菌乳头清洗液。

[0017] 利用上述方法制备而成的复合乳酸菌乳头清洗液，乳酸菌活菌浓度 ≥ 50 亿CFU/mL，可直接应用于清洗奶牛乳头。

[0018] 本发明通过使用上述植物乳杆菌发酵而成的复合乳酸菌乳头清洗液对试验奶牛乳头进行定期清洗，能够有效抑制病原菌滋生，控制体细胞数，改善奶牛乳头微生态系统。

[0019] 本发明还提供一种利用上述复合乳酸菌乳头清洗液清洗奶牛乳头的方法：

[0020] 奶牛进入奶厅后，利用38-40℃的温水清洁乳区，手动挤弃头三把奶，使用洁净干毛巾擦拭乳区，使用复合乳酸菌乳头清洗液清洗乳头，使用奶牛专用纸巾擦拭乳头，套奶杯并巡视脱杯漏气现象，挤奶完成后再次使用复合乳酸菌乳头清洗液清洗乳头；两次乳头清洗时间均控制在25-30秒。

[0021] 有益效果：

[0022] 本发明利用L.plantarum SCI-01和L.plantarum SCI-02进行发酵，研制了一种复合乳酸菌乳头清洗液，用于清洗奶牛乳头，能够有效抑制病原菌滋生，控制体细胞数，改善奶牛乳头微生态系统，从而有效降低隐性和临床乳房炎发病率，提高产奶量，提升奶品质。本发明制备使用的复合乳酸菌乳头清洗液不含有化学杀菌剂，对环境和牛乳无污染、无残留影响。此外相较于饲喂乳牛复合乳酸菌微生态制剂，本发明清洗液具有生产成本低、直接使用的优点。无需将乳酸菌菌株经发酵、干燥制备成粉末后再混合调配到饲料中饲喂使用，将菌株发酵液直接与奶牛乳头的日常清洗工作结合起来。此外除了具有防止乳房炎的功效外，还具有提高奶牛产奶量和改善牛奶品质的显著经济效果。

附图说明

[0023] 图1：特异性引物电泳图 (M-marker, A-无乳链球菌, B-大肠杆菌, C-金黄色葡萄球菌, D-乳杆菌)；

[0024] 图2：阳性克隆子质粒电泳图 (M-marker, A-无乳链球菌, B-大肠杆菌, C-金黄色葡萄球菌, D-乳杆菌)；

[0025] 图3：荧光定量PCR标准曲线；

[0026] 图4：实施例1的体细胞数测定结果 (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001)；

[0027] 图5：实施例1的活菌计数结果；

[0028] 图6：实施例1的荧光定量PCR检测结果 (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001)；

[0029] 图7：实施例1的四种细菌在实验组奶牛乳头中含量的变化情况；

[0030] 图8：实施例2的体细胞数检测结果；

[0031] 图9：实施例2的乳糖率的变化情况；

[0032] 图10：实施例2的蛋白率检测结果；

[0033] 图11：实施例2的总固体检测结果；

[0034] 图12:实施例2的试验奶牛日产奶量的统计结果;

[0035] 图13:实施例2的细菌总数检测结果;

具体实施方式

[0036] 以下结合具体实施例进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。下述实施例中涉及的方法、成分及用量,如无特殊说明,均为本领域技术人员所知常规方法。

[0037] 本发明所述复合乳酸菌乳头清洗液的制备方法包括如下步骤:

[0038] a. 菌种的活化:将-80℃冷冻保存的植物乳杆菌L.plantarum SCI-01和L.plantarum SCI-02接种于MRS液体培养基中37℃培养24小时,如此传代培养2次得到活化的菌种;

[0039] b.配制发酵培养基:将蔗糖50kg,酵母粉20kg,大豆蛋白胨10kg,吐温-80 0.8kg,水1000L,充分溶解后121℃灭菌15min;

[0040] c.制备种子培养液:将上述活化的菌种分别以1%的接种量接种于发酵培养基中,37℃混合发酵培养,发酵过程通过流加氨水控制pH 5.9以上至产酸停止,不再流加氨水时终止发酵,将发酵液无菌灌装,制得复合乳头清洗液,乳酸菌活菌浓度 ≥ 50 亿CFU/mL,下述实施例中可直接使用。

[0041] 实施例1通过荧光定量PCR技术对牛乳样品中的乳杆菌、大肠杆菌、无乳链球菌和金黄色葡萄球菌进行定量检测,实时监测了本发明所述复合乳酸菌乳头清洗液在试用过程中上述微生物在牛乳中的含量变化情况。应用傅里叶联机400系统测定该清洗液试用过程中牛乳中体细胞数的变化情况。采用平板计数法检测试验前后牛乳中菌落总数、乳酸菌数、大肠菌群数、葡萄球菌数、志贺氏菌数和沙门氏菌数的含量变化。

[0042] 实施例2应用傅里叶联机400系统测定本发明所述清洗液试用过程中牛乳中体细胞数、乳糖率、蛋白率、总固体的变化情况。采用美兰试验法,依据美兰褪色的时间判定牛乳中细菌总数的含量。统计试验前后实验牛只日产奶量的变化情况。

[0043] 研究方法:

[0044] 1.牛乳样品中宏基因组DNA的提取

[0045] 采用QIAamp DNA Stool Mini Kit试剂盒提取牛乳样品中微生物宏基因组DNA,具体方法参照试剂盒使用说明书。采用微量紫外分光光度计对宏基因组DNA的浓度和质量进行检测。

[0046] 2.特异性引物设计

[0047] 针对乳杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和无乳链球菌设计合成四组特异性引物,菌体引物信息见下表:

[0048] 表1特异性引物信息

[0049]

目的 细菌	引物 信息	扩增 片段 (bp)	退火 温度 (°C)
乳杆菌	Lac F: AGCAGTAGGGAATCTTCCA	341	58
	LacR: CACCGCTACACATGGAG		
大肠杆菌	E.co F: CATGCCGCGTGTATGAAGAA	95	58
	E.co R: CGGGTAACGTCAATGAGCAA		
无乳链球菌	Str.a F: TTTGGTGTTCACACTAGACTG	270	55
	Str.a R: TGTGTTAATTACTCTTATGCG		
金黄色葡萄 球菌	Sta.a F: GCGATTGATGGTGATACGGTT	279	55
	Sta.a R: AGCCAAGCCTTGACGAACAAAGC		

[0050] 扩增体系:反应体系50μL:10×PCR Buffer 5μL,25mmol/L Mg²⁺1.0μL,2.5mmol/L dNTPs 4μL,5mmol/L上下游引物各2μL,DNA模板100ng左右,5U/μL Taq酶0.5μL,dd H₂O补足至50μL。

[0051] 扩增条件:95℃变性5min;循环30次:95℃变性1min,退火45s,72℃延伸1min,然后72℃延伸7min,4℃保存。

[0052] 3. 外标准品的制备

[0053] 应用特异性引物扩增乳杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和无乳链球菌片段,检测后胶回收各自片段达到纯化的目的(图1)。而后将纯化的片段和pMD-19T载体连接,连接后转化到大肠杆菌感受态细胞中,挑选阳性克隆子酶切验证(图2),将验证过的阳性克隆子提取质粒,测定浓度后计算拷贝数作为外标准品以供后续试验未知样品中该菌属的定量使用。

[0054] 4. 荧光定量PCR技术检测样品中细菌的数量

[0055] 首先应用上述外标准品制作各个菌属的标准扩增曲线(图3),然后以标准曲线为依据,用各特异性引物定量检测样品中乳杆菌(Lactobacillus)、大肠杆菌(Escherichia Coli)、金黄色葡萄球菌(Streptococcus agalactiae)和无乳链球菌(Staphylococcus aureus)的数量。

[0056] 荧光定量PCR扩增体系:荧光定量PCR mix 10μL,10mmol/L上下游引物各0.8μL,DNA模板100ng左右,dd H₂O补足至20μL。

[0057] 荧光定量PCR扩增条件:95℃变性20s;循环40次:95℃变性5s,退火30s,72℃延伸35s。

[0058] 5. 活菌计数

[0059] 采用稀释平板计数法,基于下表所示的培养基和培养条件,对牛乳样品中的菌落总数、乳酸菌数、大肠菌群数、葡萄球菌数、志贺氏菌数和沙门氏菌数进行活菌检测。

[0060] 表2活菌计数方法

[0061]

测定项目	测定方法	参照
菌落总数	琼脂培养基37℃倾注平板计数	GB 4789.2—2010
乳酸菌数	MRS培养基37℃厌氧培养倾注平板计数	GB 4789.35—2010
大肠菌群数	VRBA培养基37℃培养涂布平板计数	GB 4789.3—2010
葡萄球菌数	BP培养基37℃涂布平板计数	GB 4789.10—2010

志贺氏菌数	XLD培养基37℃涂布平板计数	GB 4789.5—2012
沙门氏菌数	BS培养基37℃培养涂布平板计数	GB 4789.4—2010

[0062] 6.采用美兰实验法检测细菌总数

[0063] 利用微生物(微生物分泌出还原酶,使美兰还原而褪色,还原反应的速度和所存在的细菌数量有关,根据美兰褪色的时间估计牛乳中的细菌含量)及体细胞,其浓度愈大,代谢愈旺盛,单位时间内消耗氧愈多,美兰还原褪色,时间相应变短,反之,美兰褪色时间则相应变长。在一定容量的牛乳内加入定量的美兰,塞上胶塞以隔绝外界氧,在38℃-40℃水浴中静置观察美兰褪色时间的长短。根据褪色的时间评定牛乳的品质。

[0064] 表3美兰计数对照表

[0065]

牛乳的质量	褪色时间	相当每毫升牛乳中的细菌总数/cfu/mL
优	>5.5h	$<5.0 \times 10^5$
良	4h-5.5h	$5.0 \times 10^5-2.0 \times 10^6$
合格	2h-4h	$2.0 \times 10^6-4.0 \times 10^6$
较差	1h-2h	$4.0 \times 10^6-5.0 \times 10^6$
差	20min-1h	$5.0 \times 10^6-2.0 \times 10^7$
劣	<20min	$>2.0 \times 10^7$

[0066] 7.利用傅里叶400联机系统检测牛乳体细胞数、乳糖率、蛋白率和总固体。

[0067] 实施例1:

[0068] 复合乳酸菌乳头清洗液对奶牛乳头微生态系统的改善作用。包括复合乳酸菌乳头清洗液对试验奶牛体细胞数及其乳头微生态系统中大肠杆菌、无乳链球菌、金黄色葡萄球菌三种病原菌含量和活菌数量的控制作用,以及对乳杆菌的保持作用。

[0069] 试验样品采集:

[0070] 试验前对参加试验的25头泌乳天数在30-120天的荷斯坦奶牛进行采样,左侧乳头为实验组,右侧乳头为对照组。采样后实验组采用本发明复合乳酸菌乳头清洗液进行清洗,对照组采用牛场一直使用的滴宝乳头药浴液进行药浴,24小时后进行第二次采样,按照上述方法持续试用第6天进行第三次采样,持续试验第10天进行第四次采样,采样后随机选取7头奶牛,左右两侧乳头均用蒸馏水代替原有产品继续试验,48小时后(共用4次)进行第五次采样。样品采集时,先用无菌水对奶牛乳头和乳晕进行清洗,并用一次性奶牛专用纸巾进行擦拭,随即手动挤奶采样(保留前三把奶),每份样品采集约100mL,平均分装到三支50ml无酶无菌保存管中,1号管加入1g重铬酸钾,用作体细胞数测定;2号管不作处理,用作微生物活菌计数检测;3号管中添加适量保护剂防止DNA降解,充分摇匀后迅速放入液氮中速冻后送回实验室分析。所有分析项均在48小时内完成。

[0071] 试验结果:

[0072] 体细胞检测结果显示(图4)持续试验第6天,实验组牛乳体细胞数显著低于对照组($*P<0.05$),继续试验该水平能够得到保持。

[0073] 活菌培养计数结果显示(图5),试验后实验组的乳酸菌数明显高于对照组,大肠菌群和葡萄球菌数明显低于对照组,菌落总数高于对照组,这与乳酸菌数的升高有密切关系,志贺氏菌和沙门氏菌在试验前后的奶牛乳头中均无检出。

[0074] 将试验过程按照产品试用前、产品试用后和改用蒸馏水后三个时间阶段，分析三个阶段乳杆菌、大肠杆菌、无乳链球菌和金黄色葡萄球菌的含量变化，并比较分析上述四种细菌在每个时间阶段实验组与对照组奶牛乳头中的含量。如图6所示，乳杆菌在产品试用前实验组和对照组乳头中的含量(单位: $1g\text{ copies/mL}$)分别为:2.87E+04和2.01E+04,差异不显著；产品试用后含量分别变为:1.15E+05和3.18E+04,差异极显著($P<0.001$)；改用蒸馏水后含量分别变为1.68E+04和1.01E+04,差异显著($P<0.05$)，由此可见牧场原有药浴液和复合乳酸菌乳头清洗液在保持牛乳中乳杆菌含量方面均可发挥一定的功效，并且后者的作用效果优于前者。我们进一步将左右侧牛乳进行均匀混合后可以看到使用乳酸菌乳头清洗液约10天后，奶牛乳头中乳杆菌的含量显著高于使用前($P<0.01$)，而改用蒸馏水48h后乳头中乳杆菌的含量显著低于使用前($P<0.01$)。

[0075] 大肠杆菌在产品试用前实验组和对照组乳头中的含量分别为:1.42E+04和1.53E+04,差异不显著；产品试用后含量分别变为:4.64E+03和1.70E+04,差异极显著($P<0.001$)；改用蒸馏水后含量分别变为1.96E+04和2.25E+04,差异不显著，由此可见牧场原有药浴液和复合乳酸菌乳头清洗液在控制牛乳中大肠杆菌含量方面均可发挥一定的功效，并且后者的作用效果优于前者。我们进一步将左右侧牛乳进行均匀混合后可以看到使用复合乳酸菌乳头清洗液约10天后，牛乳中大肠杆菌的含量显著低于使用前($P<0.001$)，而改用蒸馏水48h后牛乳中大肠杆菌的含量显著高于使用前($P<0.01$)。

[0076] 无乳链球菌在产品试用前实验组和对照组乳头中的含量分别为:4.87E+04和4.51E+04,差异不显著；产品试用后含量分别变为:9.63E+03和3.20E+04,差异极显著($P<0.001$)；改用蒸馏水后含量分别变为2.46E+04和6.57E+04,差异极显著($P<0.001$)，由此可见牧场原有药浴液和复合乳酸菌乳头清洗液在控制牛乳中无乳链球菌含量方面均可发挥一定的功效，并且后者的作用效果优于前者。我们进一步将左右侧牛乳进行均匀混合后可以看到使用复合乳酸菌乳头清洗液约10天后，奶牛乳头中无乳链球菌的含量显著低于使用前($P<0.001$)，而改用蒸馏水48h后乳头中无乳链球菌的含量与使用前差异不大，进一步说明复合乳酸菌乳头清洗液对奶牛乳头中无乳链球菌的控制作用作用要优于牧场原有药浴液。

[0077] 金黄色葡萄球菌在产品试用前实验组和对照组乳头中的含量分别为:1.11E+03和1.08E+03,差异不显著；产品试用后含量分别变为:1.14E+03和1.29E+03,差异不显著；改用蒸馏水后含量分别变为3.16E+03和2.90E+03,差异仍不显著，进一步将左右侧牛乳进行均匀混合后可以看到使用复合乳酸菌乳头清洗液约10天后，奶牛乳头中金黄色葡萄球菌的含量与使用前大致相当，而停止药浴48h后乳头中金黄色葡萄球菌的含量显著高于使用前($P<0.001$)。由此可见牧场原有药浴液和复合乳酸菌乳头清洗液在控制奶牛乳头中无乳链球菌含量方面均可发挥一定的功效，并且二者作用效果相当。

[0078] 进一步对实验组乳杆菌、大肠杆菌、无乳链球菌和金黄色葡萄球菌的含量构建变化曲线图7,由图可见乳酸菌药浴液使用24h后，乳杆菌在牛乳中的含量出现激增，其余三种细菌均出现不同程度的下降；持续使用第6天，乳杆菌含量有所下降，大肠杆菌和无乳链球菌的含量进一步下降，金黄色葡萄球菌的含量有所增加；持续使用第10天，四种细菌的含量仍保持上述水平，无明显变化；改用蒸馏水持续48h后，乳杆菌含量出现骤降，大肠杆菌、无乳链球菌和金黄色葡萄球菌的含量出现激增。可见使用复合乳酸菌乳头清洗液可以在一定

程度上增加奶牛牛乳中乳杆菌的含量,降低大肠杆菌和无乳链球菌的含量,控制金黄色葡萄球菌的含量。

[0079] 综上所述,在控制奶牛乳头中大肠杆菌和无乳链球菌含量方面,本发明复合乳酸菌乳头清洗液的功效明显优于牧场一直使用的滴宝乳头药浴液。在控制金黄色葡萄球菌含量方面,复合乳酸菌乳头清洗液的作用功效能够达到滴宝乳头药浴液水平,作用效果大致相当。由于复合乳酸菌乳头清洗液中添加了乳杆菌,使用时不仅可以有效控制导致奶牛隐性或临床乳房炎的无乳链球菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌三种主要病原菌的生长和繁殖,更可以将一定含量的乳杆菌保留在乳头表面和乳头导管中,因此复合乳酸菌乳头清洗液在保持牛乳中乳杆菌含量方面也明显优于滴宝乳头药浴液。

[0080] 实施例2:

[0081] 复合乳酸菌乳头清洗液对试验奶牛的体细胞数及其乳头中细菌总数的控制作用,对试验奶牛产奶量及其乳头中乳糖率、蛋白率和总固体的提升作用。

[0082] 试验样品采集:

[0083] 试验前对参加试验的30头泌乳天数在30-120天的荷斯坦奶牛进行采样,左侧乳头为试验组,右侧乳头为对照组。采样后实验组采用复合乳酸菌乳头清洗液进行清洗,对照组采用牛场一直使用的香连护乳宝中成药药浴液进行药浴,均在每日三次挤奶完成后使用专业奶牛乳头药浴杯进行。连续试验一个月,在试验开始后第3天、1周、2周、3周和1个月进行采样。样品采集方式同实施例1。

[0084] 试验结果:

[0085] 体细胞数检测结果显示(图8),实验组和对照组在试验开始3天后出现一定的差异,2周后实验组明显低于对照组,并且在后续试验过程中能够得到保持;乳糖率检测结果显示(图9),实验组在1周后明显高于对照组,并且在后续试验过程中能够得到保持,其中2周时实验组和对照组差异显著($*P<0.05$) ;蛋白率检测结果显示(图10),试验过程中实验组与对照组无明显差异,但一直保持实验组高于对照组的趋势;总固体检测结果显示(图11) ,实验组在试验开始1周后明显高于对照组,之后一直呈现实验组高于对照组的趋势,其中2周时实验组和对照组差异显著($*P<0.05$) ;试验奶牛左侧乳头为实验组,右侧乳头为对照组,同一试验奶牛左侧和右侧乳头日产奶量的加和即为该试验奶牛的日产奶量,将试验前后试验奶牛日产奶量进行统计(图12),结果显示试验后较试验前提高了4.5%。

[0086] 采用美兰实验法,通过样品在(38-40) °C水浴中美兰褪色时间的长短判定细菌总数。依据含有不同细菌总数的样品在总样品中所占比例的不同,构建百分比堆积图(图13) ,如图所示随着试验的进行,实验组和对照组的细菌总数均呈现一定的变化,对应美兰计数对照表可以发现,实验组牛乳质量呈现由“‘优、良、合格和差’各占一定比例”向“只有‘优和良’”发展的趋势,其中“良”的比例明显扩大。

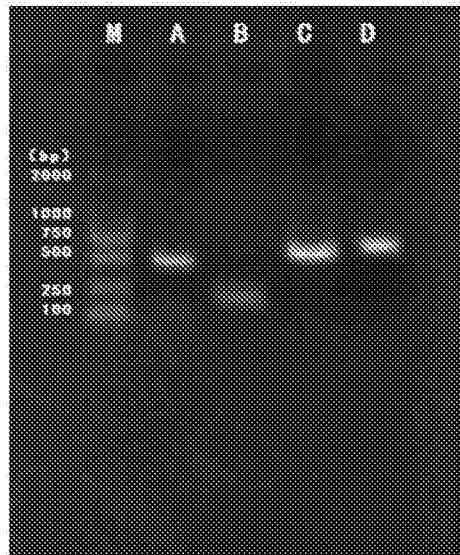


图1

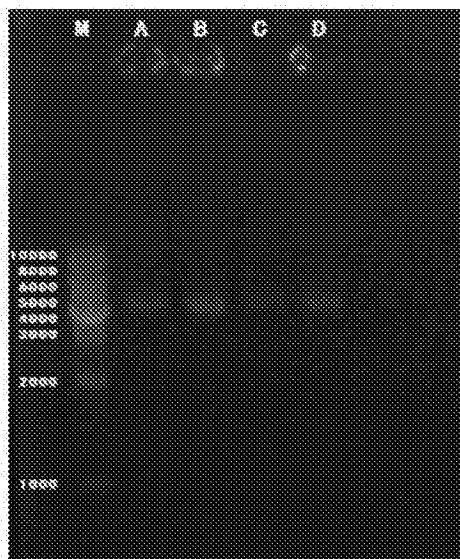


图2

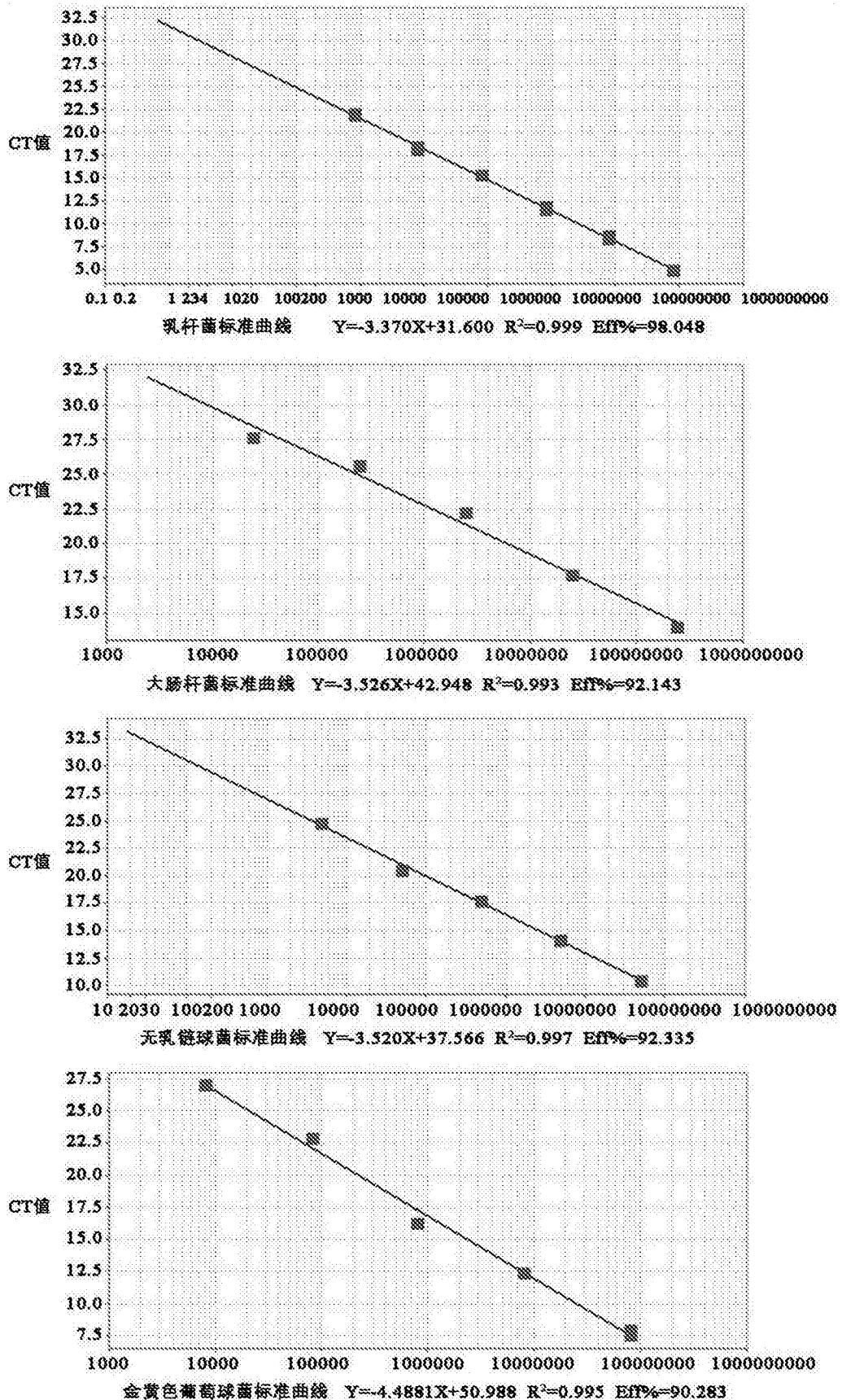


图3

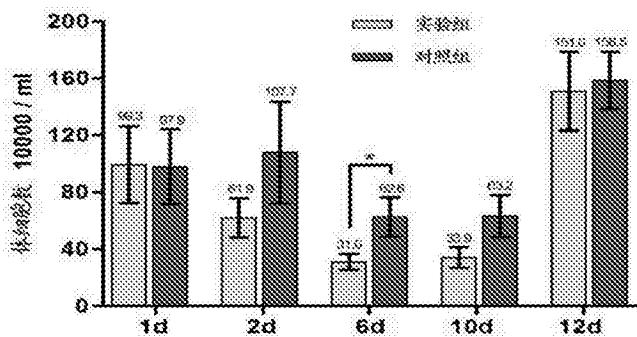


图4

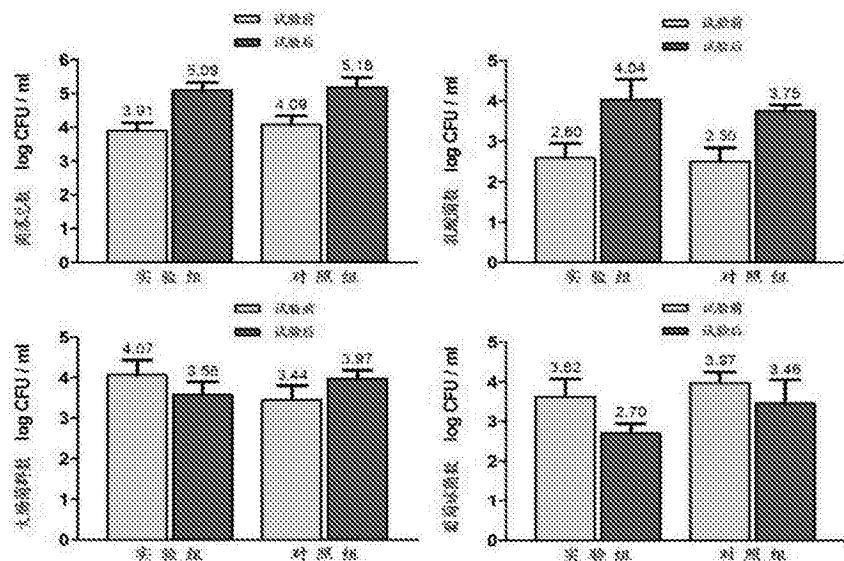


图5

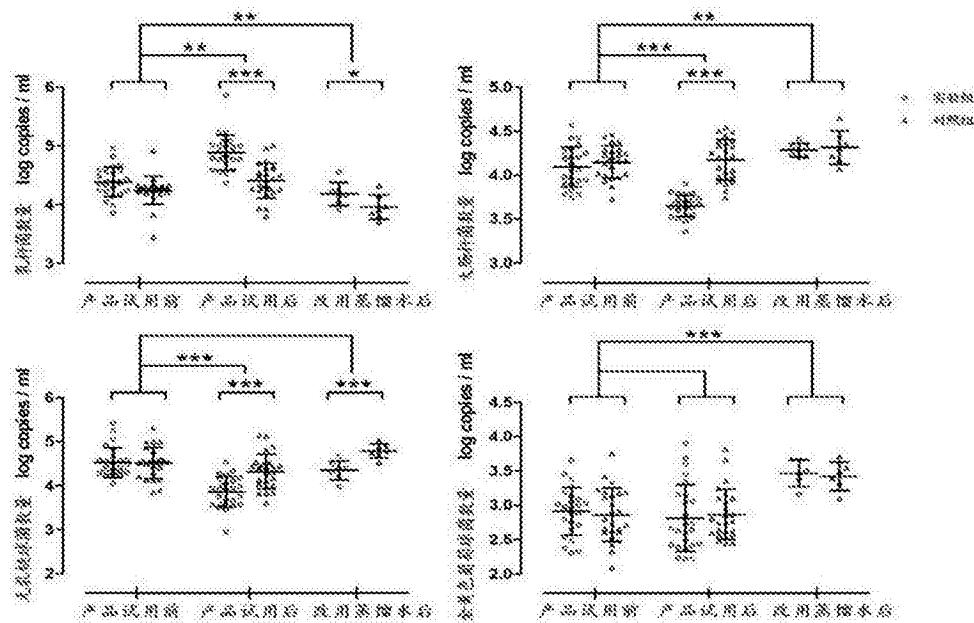


图6

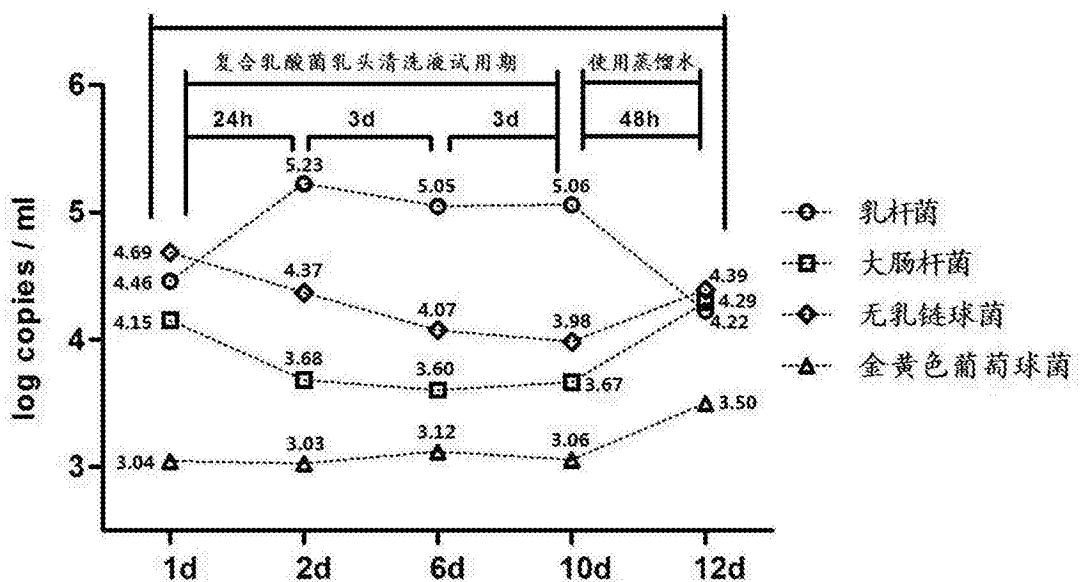


图7

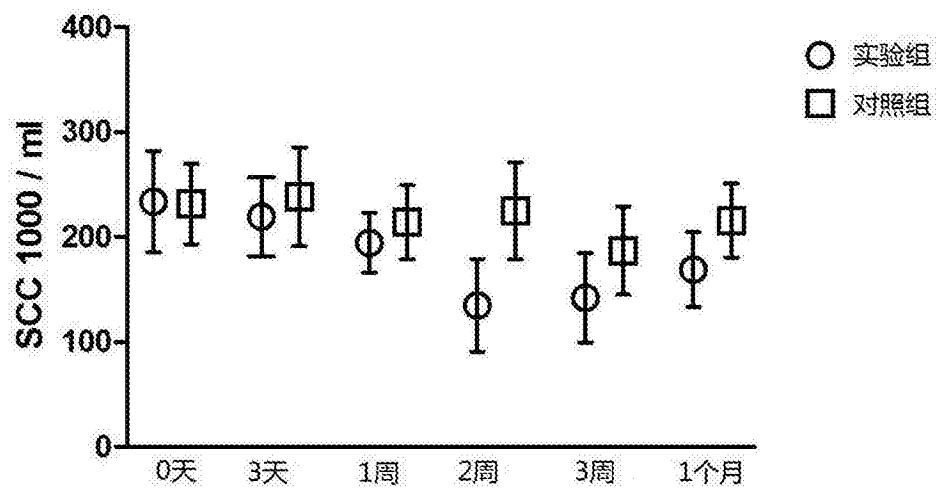


图8

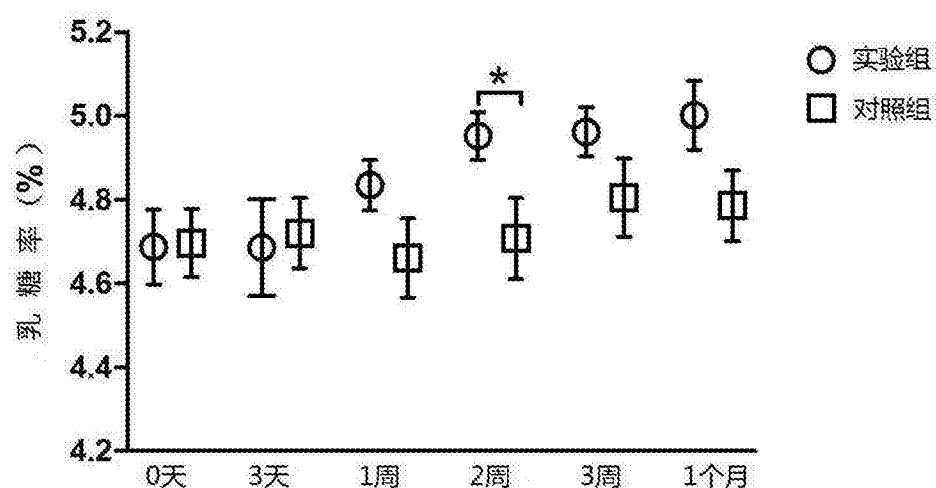


图9

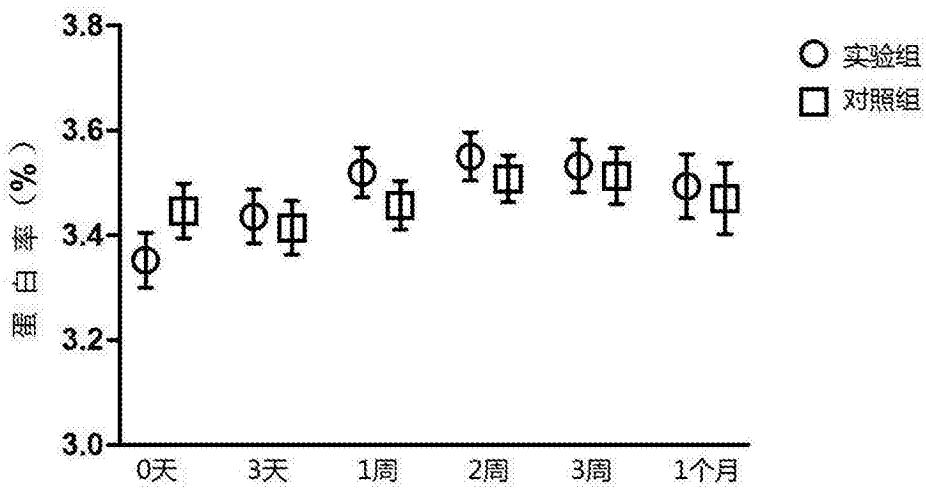


图10

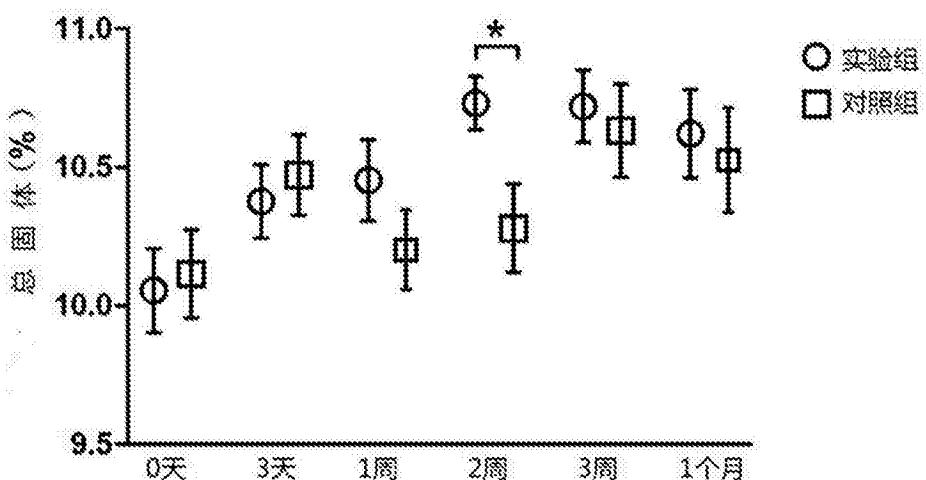


图11

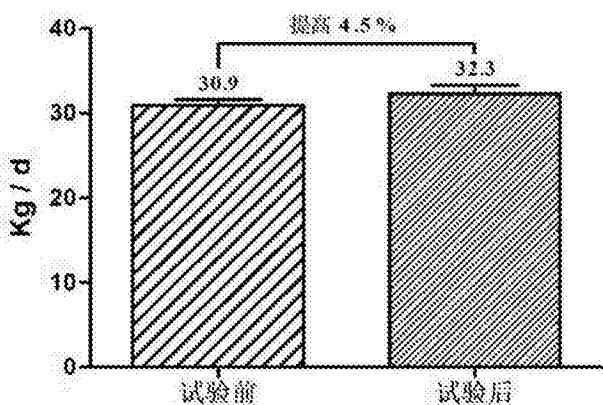


图12

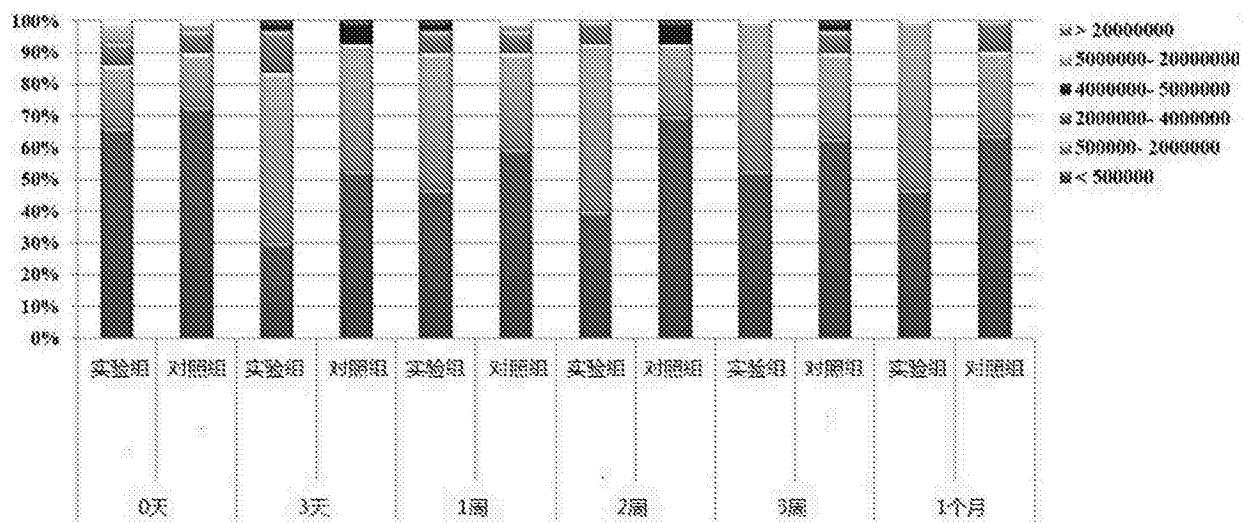


图13