

MALDI-TOF-MS 鉴定奶牛舍空气与原料乳中细菌 菌群结构

刘洋¹, 赵楠¹, 许晓曦¹, 皮冰冰¹, 梁兴博¹, 张书义², 张艳杰³

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030) (2. 上海晨冠乳业有限公司, 上海 201401)

(3. 全国畜牧总站, 北京 100125)

摘要: 以哈尔滨周边地区不同养殖规模奶牛场为研究对象, 针对春、夏季牛舍空气中微生物数量、菌群结构及原料乳中微生物种类进行检测和分析, 以探讨奶牛饲养环境对原料乳品质及安全性的影响。本研究使用国产安德森六级空气微生物采样器采样, 将样本在 37 °C 时培养 48 h 后计数、分离、纯化, 以基质辅助激光解析飞行时间质谱对纯化的菌株进行鉴定。结果表明, 相同牛舍不同季节微生物含量有显著性差异 ($p < 0.05$), 不同牛舍封闭季节空气中微生物含量差异性不显著 ($p > 0.05$); A、C 两牛舍敞开季节空气中微生物含量无显著性差异 ($p > 0.05$), 而与 B 牛舍存在显著性差异 ($p < 0.05$)。牛舍空气中共鉴定出细菌 116 株, 其中葡萄球菌属占 32.76%, 芽孢杆菌属占 45.69%; 原料乳中鉴定出细菌 56 株, 其中乳酸菌占 41.07%、肠杆菌占 30.06%、葡萄球菌属占 12.50%, 且牛舍空气中与原料乳中微生物同源性较不明显。

关键词: 奶牛舍; 原料乳; 空气微生物; 菌群构成

文章编号: 1673-9078(2016)10-304-309

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.045

Identification of Microbial Flora in Cow Shelter and Raw Milk by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)

LIU Yang¹, ZHAO Nan¹, XU Xiao-Xi¹, PI Bing-bing¹, LIANG Xing-bo¹, ZHANG Shu-yi², ZHANG Yan-jie³

(1. College of Food Science Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China) (2. Shanghai Chenguan Dairy

Co., Ltd, Shanghai 201401, China) (3. National Animal Husbandry Station, Beijing 100125, China)

Abstract: Dairy farms of different scales in the surrounding area of Harbin were selected as the study objects, and the number of microorganisms and flora composition in cow shelters and the microbial species present in raw milk were determined and analyzed in both spring and summer. The aim of this study was to explore the effects of the breeding environment on the quality and safety of raw milk. The Andersen six-stage sampler was employed to collect microorganism samples in the air, and the samples were cultured at 37 °C for 48 h, followed by counting, isolation, and purification. The isolated cultures were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Results showed significant differences in microbial content in the same cow shelter between spring and summer ($p < 0.05$). No significant differences were found in the microbial content among different cow shelters in the season during which the shelter was enclosed. In the season during which the cow shelter was open, there were no significant differences in microbial content between cow shelters A and C ($p > 0.05$). However, both of these shelters were significantly different from cow shelter C in terms of microbial content ($p < 0.05$). There were 116 strains of bacteria identified in the air of cow shelters, including 32.76% *Staphylococcus* spp. and 45.69% *Bacillus* spp.; there were 56 strains of bacteria identified in the raw milk, including 41.07% lactic acid bacteria, 30.06% *Enterobacter* spp., and 12.50% *Staphylococcus* spp. The homology between microorganisms in the air of cow shelters and those in the from raw milk was not significant.

Key words: cow shelter; raw milk; airborne microorganism; flora composition

收稿日期: 2015-10-22

基金项目: 国家 2011 计划 “食品安全与营养协同创新中心”

作者简介: 刘洋 (1988-), 男, 硕士, 研究方向: 乳品安全; 通讯作者: 许晓曦 (1968-), 女, 教授, 研究方向: 乳品科学与技术

乳品工业是我国重要的食品工业之一,乳制品因其特有的风味和营养物质被人们所接受并成为了生活中重要的能量和营养来源,这也带动了乳制品行业的高速发展。但在各方竞争和压力下乳制品安全问题频出,尤其体现在微生物菌体和毒素污染方面。

原料乳和产品加工过程是乳制品中微生物污染的主要来源。奶牛隐性乳房炎是原料乳中微生物的主要来源,约有150多种病原体会引起奶牛隐性乳房炎,其中以葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌为主,约占整个奶牛乳房炎病例90%以上^[3],因此奶牛的健康是保证原料乳质量的重要因素。奶牛饲养环境的空气微生物中含有细菌、真菌孢子等,当牛舍通风良好时其含量为 $10^2\sim 10^4$ CFU/m³^[1],菌群构成中主要是葡萄球菌和肠杆菌^[2]。Crowe等^[4]、Urbain^[5]等指出,空气质量差会导致动物发生呼吸道、免疫力下降等疾病,特别是空气中微生物及其代谢产物,是影响奶牛健康的潜在因素。奶牛养殖环境中的微生物及其代谢产物形成的气溶胶不仅影响奶牛的健康、生产能力,还会导致气源性传染病的流行而影响原料乳质量。

原料乳生产和榨乳过程会影响原料乳质量,牛舍和榨乳间内的空气洁净状况会影响原料乳中微生物数量。通过对榨乳环境和设备的检测发现:原料乳中微生物大多来自榨乳过程;奶牛的乳房、榨乳设备、榨乳环境都会直接影响原料乳中的微生物数量和种类^[6]。乳制品生产过程中病原微生物的引入可通过良好操作规范(GMP)进行控制,所以原料乳生产过程中由微生物导致的风险必须严格控制。所以,控制牛舍空气中微生物可以在一定程度上保证奶牛健康,对保障原料乳质量与安全具有重要意义。

目前,对于牛舍空气中微生物的研究主要集中于微生物种类、浓度、含量、传播条件以及与奶牛疾病相关性等方面。对于牛舍空气中微生物鉴定的常用方法都不能满足高通量、快速的要求;而用MALDI-TOF-MS方法鉴定牛舍空气中微生物很少有报道。MALDI-TOF-MS系统现在主要用于病原微生物、食源性致病菌鉴定以及流行病学方面;该系统不但能满足快速、高通量的要求外还有高准确性。Veen^[7]等人证实MALDI-TOF-MS在基因水平上可以正确鉴别95.1%的菌株,在种的水平正确鉴别率为85.6%;李楠^[8]等以16SrRNA测序法为验证MALDI-TOF-MS法鉴定养猪场空气微生物的准确性,结果显示91.0%、95.7%被准确鉴定到种、属的水平。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂粉、蒸馏水、BHIA培养基、BHI培养基、草酸铵结晶紫溶液、鲁格尔碘液、沙黄溶液、无水乙醇(分析纯)、乙腈(色谱纯)、甲酸(色谱纯)、含血管紧张素等11种多肽的4 mmol/L标准物质混合物, α -氰基-4-羟基肉桂酸(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)在50%乙腈(含2.5%甲酸)中的饱和溶液。

1.2 主要仪器与设备

固体空气微生物采样器(安德森六级)、pH计、微生物培养箱、超净工作台、接种环、酒精灯、显微镜、布鲁克道尔顿公司Autoflex TOF/TOF III质谱仪。

1.3 试验方法

1.3.1 空气微生物的采样方法

选取哈尔滨周边三个不同养殖方式及规模牧场的牛舍,分别为牛舍A(位于哈尔滨市呼兰区一奶牛养殖小区,奶牛存栏数量500头左右,封闭式牛舍)、牛舍B(位于哈尔滨市双城区一家庭牧场,奶牛存栏数量100头左右,春、冬两季封闭式,夏、秋两季敞开式)、牛舍C(位于哈尔滨市道外区一牧场,奶牛存栏数量1200头左右,封闭式牛舍)。将国际标准的安德森六级空气微生物采样器置于奶牛舍中,以普通营养琼脂培养基(NA培养基)为采样介质,采样器高度为距地面1.2 m左右,按梅花状分布选取5个避开通风口的点进行牛舍空气微生物采样,采样流量为28.3 L/min,采样时间为1 min。

1.3.2 空气和原料乳中微生物样品的培养、计数、扩培与纯化

将采集的空气微生物样品的培养皿置于37℃的培养箱中培养48 h,记录不同牧场、不同采样点、各级培养皿上的菌落数,根据下述公式对空气中微生物数量进行计算:

$$X = \frac{N}{QT}$$

X-空气中微生物含量(CFU/m³); N-六级培养皿中菌落总数; Q-采样流量(28.3 L/min); T-采样时间(min)。

原料乳中微生物菌落总数的计算按照GB 4789.2-2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》进行样品处理培养。根据下述原则对原料乳中的微生物进行计数:

若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范

围内, 计算两个平板菌落数的平均值, 再将平均值乘以相应稀释倍数, 作为每g(mL)样品中菌落总数结果。

若有两个连续稀释度的平板菌落数在适宜计数范围内时, 按以下公式计算:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

式中: N -样品中菌落数; $\sum C$ -平板(含适宜范围菌落数的平板)菌落数之和; n_1 -第一稀释度(低稀释倍数)平板个数; n_2 -第二稀释度(高稀释倍数)平板个数; d -稀释因子(第一稀释度)。

在培养好的培养皿中挑取生长状态良好的单菌落接种到 BHI 培养基中, 37 °C 摇床震荡培养 24 h。然后在划线接种到 BHIA 培养基上 37 °C 培养 18~24 h, 生长成单菌落备用。

1.3.3 革兰氏染色

通过革兰氏染色法对分离、纯化后的微生物进行初步筛选, 步骤如下:

涂片→初染→媒染→脱色→复染→镜检

1.3.4 MALDI-TOF MS 微生物快速鉴定

1.3.4.1 样品前处理

在 1.5 mL EP 管中加入 300 μ L 无菌蒸馏水, 用无菌枪头从 BHIA 培养基上挑取 5~10 mg 的新鲜单菌落于 EP 管中、混匀, 再加入 900 μ L 无水乙醇, 震荡混匀, 于 10000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液, 在相同条件下进行二次离心, 吸取上清弃去, 然后在 EP 管

中加入 30 μ L、70%甲酸, 混匀、加入 30 μ L 乙腈、混匀、10000 r/min 离心 2 min, 备用。(布鲁克道尔顿公司)

1.3.4.2 点样

在 MALDI 样品靶板的适当位置点置标准品, 然后吸取 1 μ L 上述上清液点置于 MALDI 样品靶板上, 室温下晾干, 在晾干后的样品点上覆盖 1 μ L 基质溶液, 晾干后进行质谱分析。(布鲁克道尔顿公司)

1.3.4.3 质谱分析

SmartBeam 激光器, 线性正离子模式, 波长 355 nm, 每个样品谱图累积 200 个激光脉冲信号, 质荷比 m/z 为 2~20 ku, 延迟提取时间 200 ns, 加速电压 20 kV, 提取电压 18.6 kV, 聚焦电压 6.5 kV。(布鲁克道尔顿公司)

1.3.5 数据统计分析

采用 Statistix 8 软件对所得到的数据进行统计分析, 用 LSD 进行平均数之间显著性差异分析, $p < 0.05$ 表示差异显著, 采用 Word 2007 软件作表。

2 结果与讨论

2.1 各牧场牛舍空气中细菌菌落总数

本次实验选取 3 栋双侧栓系结构的牛舍, 在梅花状分布选取 5 个不同点进行采样, 各牛舍空气中微生物菌落总数见表 1、表 2。

表 1 各牛舍春季空气微生物菌落总数 ($\times 10^3$ CFU/ m^3)

Table 1 Total count of airborne microorganisms in cow shelters during spring ($\times 10^3$ CFU/ m^3)

	采样点 1	采样点 2	采样点 3	采样点 4	采样点 5	平均
牛舍 A	8.27	11.02	10.81	11.48	9.75	10.27 \pm 1.28 ^{Aa}
牛舍 B	9.42	10.88	11.66	10.95	10.50	10.68 \pm 0.82 ^{Aa}
牛舍 C	10.14	10.78	11.06	10.64	10.35	10.63 \pm 0.36 ^{Aa}

表 2 各牛舍夏季空气微生物菌落总数 ($\times 10^3$ CFU/ m^3)

Table 2 Total count of airborne microorganisms in cow shelters during summer ($\times 10^3$ CFU/ m^3)

	采样点 1	采样点 2	采样点 3	采样点 4	采样点 5	平均
牛舍 A	5.45	7.53	8.30	6.73	5.45	6.69 \pm 1.26 ^{Ab}
牛舍 B	1.66	3.46	4.13	4.16	2.47	3.18 \pm 1.09 ^{Bb}
牛舍 C	5.94	10.07	10.00	5.55	5.16	7.34 \pm 2.47 ^{Ab}

注: a、b 表示相同牛舍不同季节微生物含量差异性; A、B 表示不同牛舍相同季节的微生物含量差异性; 相同字母表示差异性不显著 ($p > 0.05$), 不同字母表示差异性显著 ($p < 0.05$)。

由上表可以看出相同牛舍在封闭和开放两个季节微生物含量有显著性差异, 说明开放季节牛舍通风良好的情况下可以明显降低空气中微生物含量; 不同牛舍在封闭季节空气中微生物含量差异性不显著, 在开放季节 A、C 两牛舍空气中微生物含量差异性不显著, 而 B 牛舍在本身是完全敞开式结构, 因此差异显著。

说明在相同的清理条件和奶牛饲养数量的前提下, 通风是否良好、牛舍的敞开状况以及气候是决定牛舍中空气微生物含量的重要因素。

2.2 原料乳中微生物菌落总数

三个牛舍均使用自动榨乳机榨乳, 榨乳后牛乳直

接泵入 4 °C 冷藏罐，将在春、夏两季节各牛舍采集的原料乳按 1.3.2 所述方法进行培养、计数得到，如表 3 所示。

健康奶牛所分泌的原料乳处于相对无菌状态，但原料乳从被挤出到储存运输环节都可能受到微生物的污染，原料乳中的微生物主要来源于：牛体表面（奶牛的身体及乳房表面很容易被粪便、土壤、青贮饲料、粗饲料、草垫等污染，使得牛体、乳房、乳头表面附着有大量的细菌和孢子）、水源、牛舍及附属设施、榨乳设备、贮存设备、运输设备等。

表 3 原料乳中微生物菌落总数 (×10⁶CFU/mL)

	春季	夏季	平均
牛舍 A	3.20	2.80	3.00±0.22 ^A
牛舍 B	2.60	3.00	2.80±0.28 ^A
牛舍 C	2.40	2.60	2.50±0.14 ^A

注：A、B 表示不同季节相同牛舍原料乳微生物含量差异性，相同字母表示差异性不显著 (p>0.05)。

从上表可以看出，相同牛舍所采集的原料乳在春、夏两季节微生物菌落总数无显著性差异。而其菌落总数符合 GB 19301-2010《食品安全国家标准 生乳》中所规定的≤2.0×10⁶ CFU/mL。由此可见，在相同饲养环境、相同榨乳方式及相同贮存运输条件下，原料乳中菌落总数无显著性差异。

2.3 牛舍空气中细菌革兰氏染色、鉴定结果

牛舍中空气微生物的主要来源有：奶牛的呼吸废气、排泄物、牧草与饲料以及牛舍内外空气的交换。而大气中的微生物主要植物、动物的活动、人类的生产生活活动、污水、废气、土壤、灰尘等；同时奶牛的身体也是微生物极大的贮存体、繁殖体和散发源。因此，牛舍空气中微生物来源广泛，控制较难。

以三栋牛舍为整体样本对其进行空气中细菌种类鉴定，从该样本中共分离出细菌 116 株，其中革兰氏阳性菌有 72 株、革兰氏阴性菌 44 株，鉴定结果见表 4。

表 4 牛舍中空气微生物种类

菌株中文名	菌株拉丁文名	菌株数量
马胃葡萄球菌	<i>Staphylococcus equorum</i>	9 株
表皮葡萄球菌	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2 株
产色葡萄球菌	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	8 株
沃氏葡萄球菌	<i>Staphylococcus warneri</i>	3 株
耳葡萄球菌	<i>Staphylococcus auricularis</i>	1 株
腐生葡萄球菌	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1 株

模仿葡萄球菌	<i>Staphylococcus simulans</i>	1 株
琥珀葡萄球菌	<i>Staphylococcus succinus</i>	2 株
头葡萄球菌	<i>Staphylococcus capitis</i>	1 株
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 株
环状芽孢杆菌	<i>Bacillus circulans</i>	1 株
类短短芽孢杆菌	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	4 株
蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	30 株
纺锤形赖氨酸芽孢杆菌	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	3 株
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>	1 株
短小芽孢杆菌	<i>Bacillus pumilus</i>	2 株
地衣芽孢杆菌	<i>Bacillus licheniformis</i>	4 株
弯曲芽孢杆菌	<i>Bacillus flexus</i>	1 株
巨大芽孢杆菌	<i>Bacillus megaterium</i>	5 株
沙福芽孢杆菌	<i>Bacillus safensis</i>	2 株
鲁氏不动杆菌	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	4 株
类芽孢杆菌	<i>Paenibacillus timonensis</i>	2 株
克氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter koseri</i>	2 株
金橙黄微小杆菌	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	1 株
萎蔫短小杆菌	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1 株
节杆菌	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	7 株
粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	1 株
巨球菌	<i>Macrocooccus caseolyticus</i>	1 株
酪黄肠球菌	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1 株
绿色气球菌	<i>Aerococcus viridans</i>	1 株
玫瑰色库克菌	<i>Kocuria rosea</i>	1 株
嗜肉库克菌	<i>Kocuria carniphila</i>	1 株
反硝化琼斯菌	<i>Jonesia denitrificans</i>	1 株
纤维化纤维微细菌	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	1 株

使用 MALDI-TOF-MS 快速鉴定细菌于 1996 年首次报道，之后又成功用于食品和环境中的真菌和细菌的检测^[7-9]。Veen^[7]等人对 980 株细菌和酵母进行确认，认为 MALDI-TOF-MS 鉴定种的准确率明显好于传统的生化方法，而对于混杂菌群的细菌的鉴定方面明显好于传统方法；同时 MALDI-TOF-MS 在普通病原菌（单增李斯特氏菌、阪崎肠杆菌等）、多血清型细菌尤其是沙门氏菌、非发酵细菌的鉴定都有较高的准确率。因此，本方法对于牛舍空气微生物的鉴定具有一定的准确率^[10]。国内也有许多利用 MALDI-TOF-MS 技术进行食源性致病菌鉴定的相关报道，主要对芽孢杆菌属、志贺氏菌、致泻性大肠埃希氏菌属、粘质沙雷氏菌、金黄色葡萄球菌、肠炎耶尔森氏菌等进行了鉴定区分。目前，MALDI-TOF-MS 有用于猪舍、禽舍中空气微生物鉴定的报道，而且具有较高的准确性。因此，

该方法用于牛舍空气中微生物的鉴定具有一定的可靠性。

从上表可以看出在 116 株样本中, 葡萄球菌属有 38 株, 芽孢杆菌属有 53 株, 以上两种菌属在该采样期含量较高为牛舍空气中微生物的优势菌群。这与金兰梅等^[10]人的研究结果相似, 主要为葡萄球菌、链球菌、芽孢杆菌和肠杆菌; S.Popescud^[2]等在牛舍空气中分离出绿色气球菌、葡萄球菌、肠杆菌、粪肠球菌。而在之前报道中没有出现的纤维化纤维微细菌、反硝化琼斯菌、嗜肉库克菌、玫瑰色库克菌、萎蔫短小杆菌、沙福芽孢杆菌、绿色气球菌均为革兰氏阳性菌且主要分布于土壤中; 金橙黄微小杆菌、克氏柠檬酸杆菌(主要存在于动物粪便中)、鲁氏不动杆菌(主要存在于土壤和废水中)为革兰氏阴性菌。所以牛舍所处的地理位置和周边环境不同, 牛舍空气中细菌的数量以及菌群组成会出现一定差异, 不同区域的牛舍空气中微生物含量及种类都具有各自地区的特点。

空气是人类和畜禽赖以生存的必要因素, 微生物对奶牛生产能力的影 响在很多情况下是通过牛舍空气污染造成的, 而牛舍微生物污染还会引起传染病的流行。因此, 空气微生物的污染程度是衡量牛舍空气质量的重要指标, 保证牛舍空气质量对于奶牛的健康及原料乳质量有重要意义。所以, 及时清理牛舍、保持牛舍通风可以控制牛舍空气微生物数量。

2.4 原料乳中细菌鉴定结果

原料乳中的微生物有: 病原微生物, 主要有葡萄球菌属、沙门氏菌属、志贺氏菌属、链球菌属以及大肠埃希氏菌; 腐败菌主要为一些嗜冷菌; 有益微生物主要为乳酸菌。

在原料乳样品中分离、纯化、鉴定出微生物 56 株, 其中革兰氏阳性菌 28 株、革兰氏阴性菌 28 株, 结果见表 5。

表 5 原料乳中微生物种类

Table 5 Species of microorganisms in raw milk

菌株中文名	菌株拉丁文名	菌株数量
木糖葡萄球菌	<i>Staphylococcus xylosus</i>	1
人葡萄球菌	<i>Staphylococcus hominis</i>	6
乳酸链球菌	<i>Streptococcus lactis</i>	5
阿氏肠杆菌	<i>Enterobacter asburiae</i>	4
阴沟肠杆菌	<i>Enterobacter cloacae</i>	6
乳酸乳球菌	<i>Lactococcus lactis</i>	10
乳明串珠菌	<i>Leuconostoc lactis</i>	8
变异库克菌	<i>Kocuria varians</i>	1
嗜根库克菌	<i>Kocuria rhizophila</i>	1

肠球菌	<i>Enterococcus devriesei</i>	2
深红红球菌	<i>Rhodococcus ruber</i>	1
蜂房哈夫尼菌	<i>Hafnia alvei</i>	7
多食鞘氨醇杆菌	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	2
嗜麦芽寡养单胞菌	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2

从上表可以看出在 56 株样本中, 乳酸菌 23 株占所有菌株的 41.07%, 肠杆菌 17 株占所有菌株的 30.36%, 葡萄球菌 7 株占所有菌株的 12.50%, 符合原料乳中主要微生物种类; 其中肠杆菌分布广泛、寄生范围较大, 人、动物、植物都有寄生和共生, 也可在土壤和水中存在; 而葡萄球菌为引起奶牛隐性乳房炎的主要细菌之一。

原料乳中除以上细菌外, Dina Ratts^[11]等还分离出的假单胞菌属, 吕元^[12]等分离出荧光假单胞菌、鲁氏不动杆菌、阪崎肠杆菌、蜂房哈夫尼菌、少动鞘氨醇杆菌。但变异库克菌、嗜根库克菌、深红红球菌(革兰氏阳性球菌, 在土壤和海洋中有分布)、多食鞘氨醇杆菌(革兰氏阴性直杆菌, 在土壤中有分布)和嗜麦芽寡养单胞菌在文献中几乎没有报道。原料乳中的菌群结构受所处地理环境、奶牛饲养模式以及冷藏时间和冷藏温度影响, 因而不同地区原料乳菌群结构不同。

3 结论

3.1 对奶牛场牛舍中空气微生物进行春、夏两季采样培养、计数, 其平均含量为: 牛舍 A 为 10.27×10^3 CFU/m³、 5.89×10^3 CFU/m³、牛舍 B 为 10.68×10^3 CFU/m³、 3.18×10^3 CFU/m³、牛舍 C 为 10.63×10^3 CFU/m³、 7.34×10^3 CFU/m³; 相同牛舍在春、夏两季节微生物含量差异性显著 ($p < 0.05$), A、B、C 三牛舍在春季空气中微生物含量差异性不显著 ($p > 0.05$), A、C 牛舍在夏季微生物含量差异性不显著而与 B 牛舍差异性显著。在相同饲养条件下牛舍空气中微生物含量与牛舍通风情况有密切的关系。原料乳中微生物含量在不同季节差异性不显著 ($p > 0.05$)。

3.2 对牛舍空气中的细菌共分离鉴定出 116 株, 主要为葡萄球菌属和芽孢杆菌属, 其中葡萄球菌属占 32.76%, 芽孢杆菌属占 45.69%; 原料乳中微生物主要为乳酸菌占 41.07%、肠杆菌占 30.36%、葡萄球菌占 12.50%与原料乳中存在的微生物种类相符合。原料乳中的微生物主要为乳酸菌、肠杆菌、葡萄球菌, 且牛舍空气中与原料乳中无相同菌株。因此, 要控制原料乳中微生物含量应从奶牛健康、榨乳环境、榨乳设备卫生条件、原料乳储存运输条件等方面入手。

参考文献

- [1] Dungan R S, Leytem A B, Bjorneberg D L. Concentration of airborne endotoxin and microorganism at a 10000-cow open-freestall dairy [J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 89: 3300-3309
- [2] S Popescu, C Borda, E A Diugan. Microbiological air quality in tie-stall dairy barns and some factors that influence it [J]. *African Journal of Agricultural Research*, 2011, 6(32): 6726-6734
- [3] 王娜,高学军.哈尔滨地区奶牛隐性乳房炎病原菌的分离鉴定[J].*东北农业大学学报*,2011,42(2):29-32
WANG Na, GAO Xue-jun. Isolation and identification of pathogenic bacteria of bovine subclinical mastitis in Harbin [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42(2): 29-32
- [4] Crow e C K, Harris D L, Elliot t L P, et al. A possible relationship between low facility dust and endotoxin levels and improved growth rates in pigs reared by isowean (SM) [J]. *Swine Health and Production*, 1996, 4(5): 231-236
- [5] Urbain B, Prouvost J F, Beerens D, et al. Chronic exposure of pigs to air borne dust and endotoxins in an environmental chamber: Technical note [J]. *Veterinary Research*, 1996, 27(6): 569- 578
- [6] 马园,葛武鹏,马海峰,等.原料奶生产环节微生物污染分析及防控措施研究[J].*西北农林科技大学学报*,2012,40(7): 187-192
MA Yuan, GE Wu-peng, MA Hai-feng, et al. Study on the prevention measures of microbes of raw milk in reception system [J]. *Journal of Northwest A & F University*, 2012, 40(7): 187-192
- [7] Van Veen S Q, Claas E C, Kuijper E J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(3): 900-907
- [8] 李楠,刘文森,刘林娜,等.MALDI-TOF质谱技术及Biotyper数据库在养殖场空气微生物鉴定中的应用[J].*中国兽医学报*,2014,34(12):2031-2034
LI Nan, LIU Wen-sen, LIU Lin-na, et al. The application of the MALDI-TOF MS and biotyper database in the identification of farm airborne microorganisms [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(12): 2031-2034
- [9] Emami K, Askari V, Ullrich M, et al. Characterization of bacteria in ballast water using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. *Plos One*, 2012, 7(6): e38515
- [10] 陈信忠,龚艳清,郭书林.MALDI-TOF-MS在病原微生物鉴定中的研究进展[J].*生物技术通报*,2014,6:43-47
CHEN Xin-zhong, GONG Yan-qing, GUO Shu-lin. Progress in application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in identification of pathogenic microorganism [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, 6: 43-47
- [11] 金兰梅,伍清林,吕丽珍,等.不同乳牛环境空气中细菌含量的比较研究[J].*中国畜牧兽医*,2010,37(12):131-135
JIN Lan-mei, WU Qing-lin, LV Li-zhen, et al. The comparison research of airborne bacteria amount in different cow house [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine* 2010, 37(12): 131-135
- [12] Ratts D, Ofek M, Minz D, et al. Molecular analysis of bacterial communicates in raw milk and impact of refrigeration on its structure and dynamics [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(3): 465-471
- [13] 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
LV Yuan, YE Xing-qian. Isolation and identification species of psychrophilic microorganisms from raw milk provided by the pastures in hangzhou district [J]. *China Dairy Industry*, 2012, 40(3): 43-46