

现代食品微生物检验技术的未来发展趋势

李建良 于华

伊犁州食品药品检验所, 新疆伊宁市, 835000;

摘要: 在食品保障食品安全的各项检测中, 食品微生物检验是非常重要的环节。本文通过分析传统微生物检验方法、分子生物学技术、免疫学检测技术等技术的原理与应用, 研究了不同检验方法的灵敏度、特异性及适用场景等, 探讨了当前食品微生物检测技术面临的挑战与未来发展方向。

关键词: 食品微生物检验; 快速检测; 分子生物学; 生物传感器; 标准化

DOI: 10.69979/3041-0673.25.07.084

引言

及测算全球每年因食源性疾病导致的医疗支出超过 1100 亿美元^[1], 其中仅微生物污染治病就占致病因素的 72%。然而传统食品微生物检测方法, 虽然应用广泛, 但是依然存在检测周期长、灵敏度低等技术缺陷。随着分子生物学和纳米技术的发展, 检测技术已形成“培养-分子-免疫-组学”多维度检测体系。本文从技术创新角度, 系统分析各类检测方法的研究进展, 并针对产业化应用中的关键瓶颈提出解决方案。

1 传统的食品微生物检测方法

传统微生物检验方法是食品、环境及临床样本中微生物检测的基石, 主要包括培养法和显微镜观察法。这些方法凭借其直观性和可靠性, 至今仍在实验室中广泛应用, 但也存在一定的技术局限性。

1.1 传统食品微生物检测的优缺点

1.1.1 培养法

培养法是基于微生物的生长特性, 通过选择性培养基提供适宜的营养和环境条件(如温度、pH、氧气), 使目标微生物增殖形成肉眼可见的菌落, 进而通过形态学、生化反应或血清学试验进行鉴定。培养法的优点是直观可靠, 可直接观察微生物生长, 适用于常规菌种鉴定。同时成本相对低廉, 培养基和培养设备的价格都较低, 适合资源有限实验室。

培养法的缺点是耗时较长, 培养法检测周期通常需数天至数周, 无法满足快速检测需求(如沙门氏菌检测需 5-7 天)^[2]。同时培养法灵敏度有一定限制, 仅能检测可培养微生物, 无法覆盖病毒、VBNC(活的非可培养状态)菌及部分难培养病原体等。

1.1.2 显微镜观察法

显微镜观察法是通过直接观察样本中微生物的形态特征进行鉴定, 常用技术包括: 革兰氏染色技术, 主要用于区分革兰氏阳性菌(如金黄色葡萄球菌)与革兰氏阴性菌(如大肠杆菌)。还有抗酸染色技术, 主要用于检测结核分枝杆菌等抗酸性病原体。

显微镜观察法的优点明显, 能够快速初筛, 革兰氏染色可在 30 分钟内完成, 适用于临床标本的紧急诊断。可以进行微生物结构解析, 电子显微镜可揭示微生物的亚细胞结构, 辅助病毒形态学研究。

显微镜观察法的缺点包括以下几点, 一是灵敏度低: 光学显微镜需样本中微生物浓度 $\geq 10^4$ CFU/mL, 否则难以观测。二是无法区分检测的微生物是活菌还是死菌: 染色法无法判断微生物活性, 易导致假阳性结果。三是对专业性要求高: 形态学鉴定依赖检测人员的工作经验, 因此易受主观因素影响。

1.2 传统检测方法的技术革新

培养法可以从以下方面进行技术革新, 通过改良培养基的配方, 可以使沙门氏菌检出时间从 72 小时缩短至 24 小时。新型显色培养基通过酶底物显色反应, 实现大肠杆菌 O157:H7 可视化鉴别, 准确率达 98.7%。显微镜技术创新, 荧光原位杂交(FISH)技术采用 16S rRNA 特异性探针, 可在 6 小时内完成单增李斯特菌检测。

2 分子生物学检测的现状及技术突破方向

分子生物学技术凭借其特异性强、灵敏度高、检测快速等特点, 已在沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等常见食源性致病菌检测中实现规模化应用。

2.1 分子生物学检测的现状

分子生物学技术在近几十年里发展非常迅速,其核心原理包括以下三类:

2.1.1 核酸扩增技术

(1) PCR 检测技术

PCR 检测,即聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction) 检测,是一种利用 DNA 聚合酶和核苷酸底物将特定 DNA 片段扩增到足够数量,以便进行结构和功能分析的实验室检测技术。可以通过高温变性、低温退火、适温延伸等技术,循环扩增目标基因片段,结合荧光探针实现实时定量检测^[3]。

(2) 等温扩增技术

等温扩增技术是一种新型的 DNA 扩增方法,可以在等温条件下进行,无需对温度进行周期性变化,非常温度且易于操作。如环介导等温扩增 (LAMP),在恒温 (60-65°C) 下通过 *Bst* DNA 聚合酶与多对引物实现快速扩增,无需热循环仪,适用于现场检测^[3]。

2.1.2 基因测序技术

(1) 宏基因组测序

宏基因组测序是通过高通量测序直接分析样本中所有微生物的遗传信息,突破培养依赖,可检测未知病原体,2024 年交流会中已被应用于食品全链条风险监测。

(2) 全基因组测序

全基因组测序通过解析微生物全基因组序列,用于溯源分析与毒力基因鉴定。

2.2 分子生物学未来发展趋势

分子生物学技术正推动食品微生物检测向快速化、精准化与智能化转型。尽管面临活菌鉴别、基质干扰等挑战,但通过 CRISPR、生物传感器与 AI 的技术融合,检测灵敏度与效率已显著提升。未来需进一步优化标准化流程、降低设备成本,并加强多学科交叉创新。

2.2.1 技术融合与标准化

将传统培养法、分子技术与生物传感器将形成互补体系,如先增菌富集后 PCR 确认,兼顾灵敏度与特异性。2024 年我国新增了 104 项食品安全标准,目的就是为食品检验提供技术支持,为技术验证提供基准。

2.2.2 活菌检测的技术突破

微生物活菌检测,想已开发基于代谢活性标记 (如 ATP 生物发光法) 或膜完整性探针 (如 SYTO9/PI 双染) 等新方法,新方法有望实现无毒性活菌检测。

3 免疫与生物传感器的创新

免疫与生物传感器是结合了免疫学与生物传感器的各自特性,实现高特异性和快速响应相结合,逐渐成为食品安全检测的重要技术方向。近年来,随着纳米技术、人工智能和微流控技术的融合,免疫生物传感器在灵敏度、多目标检测和便携性方面取得显著突破。

3.1 免疫生物传感器的技术原理与分类

免疫生物传感器基于抗原-抗体特异性结合原理,通过信号转换模块将分子识别事件转化为可量化信号。

3.1.1 酶联免疫传感器 (ELISA)

酶联免疫传感器的原理是,结合酶催化放大效应与抗原-抗体反应,通过显色或荧光信号定量目标物 (如黄曲霉毒素 B1 检测)。

其优势在于灵敏度高 (检测限达 pg/mL 级),适用于实验室标准化检测。其局限性主要表现在耗时长 (通常需 2-4 小时),依赖大型设备。

3.1.2 表面等离子共振传感器

表面等离子共振传感器的原理是,通过监测生物分子结合引起的折射率变化实现实时检测,无需标记,通过动态分析抗体-抗原结合动力学,主要应用于药物筛选和毒理研究。

3.1.3 电化学免疫传感器

电化学免疫传感器是将免疫分析与电化学传感技术相结合而构建的一类新型生物传感器。其创新之处在于,采用纳米材料修饰电极,增强电子传递效率。例如,适配体功能化电极检测沙门氏菌,灵敏度达 1 CFU/mL^[4]。

4 食品微生物检验所面临的挑战

食品微生物检验在保障食品安全中至关重要,但随着食品种类多元化、加工工艺复杂化及微生物变异加速,传统与现代检测技术均面临多重挑战,亟需从技术、标准及管理层面突破瓶颈。

4.1 复杂食品基质的干扰

不同食品中的不同成分对微生物检测灵敏度有直接且显著的影响。

(1) PCR 抑制问题: 肉类中的胶原蛋白或乳制品中的酪蛋白可吸附 DNA,抑制扩增效率,导致假阴性。

(2) 富集效率低: 高盐、高酸性食品会抑制微生物复苏,如进行检验则需定制特殊增菌方案,间接增加了检验操作的复杂性。

4.2 活菌检测的精准性难题

目前分子技术尚未完善,依然存在一定的技术缺陷,无法区分活菌与死菌DNA等。

(1) 预处理技术缺陷:叠氮溴化丙锭可选择性穿透死菌细胞膜阻断DNA扩增,但其毒性可能损伤活菌,影响定量准确性。

(2) 代谢活性判定局限:ATP生物发光法虽能反映活菌代谢,但受食品中游离ATP的干扰,假阳性率较高%。

4.3 标准化与质量控制的缺失

(1) 检验方法的可比性差:不同实验室采用的检测流程存在差异,最终导致检验结果偏差。

(2) 参考物质不足:针对新兴病原体或毒素的标准物质匮乏,制约方法验证与实验室认证。

4.4 高通量检测的成本与可及性矛盾

(1) 设备投入高昂:宏基因组测序(mNGS)单样本成本超200美元,数字PCR仪价格超10万美元,中小型实验室难以负担。

(2) 技术培训滞后:CRISPR-Cas系统、生物传感器等新技术需专业操作技能,基层检验人员知识更新不足,限制技术推广。

5 食品微生物检测技术的未来趋势

食品微生物检测技术正经历从传统培养法向智能化、快速化、精准化的转型,未来发展方向将围绕技术创新、标准化建设、多学科融合及全球化应用展开。以下从技术革新、智能化发展、行业标准化、应用场景拓展等角度进行系统阐述,并结合行业动态与前沿研究提出具体方向。

5.1 技术创新:快速化与精准化

5.1.1 微流控芯片与便携设备

微流控技术通过集成样本前处理(富集、裂解)与检测模块,实现“样本进-结果出”的快速检测模式。例如,Lab-on-a-chip设备已可将致病菌检测时间缩短至15分钟,同时支持多目标同步检测(如沙门氏菌、单增李斯特菌)。此外,智能手机适配的便携式传感器进一步降低检测成本,适用于家庭或现场快速筛查。

5.1.2 活菌检测技术突破

传统分子技术无法区分活/死菌,未来将结合代谢活性探针(如ATP生物发光法)或膜完整性标记(SYTO 9/PI双染)实现精准活菌鉴别。例如,PMA预处理结合

qPCR技术可抑制死菌DNA扩增,但需解决毒性问题;新型荧光标记探针的开发将推动无毒性活菌检测技术的普及。

5.1.3 多目标检测与高通量技术

通过多重PCR、CRISPR-Cas系统或生物传感器阵列,实现单次检测中多种微生物或毒素的同步分析。例如,Ago酶系统结合微腔反应可同时检测3种致病菌,灵敏度提升10倍^[5]。此外,宏基因组测序技术的优化将推动未知病原体的无偏性筛查,助力食源性疾病溯源。

5.2 智能化与数字化融合

5.2.1 AI辅助检测与数据分析

机器学习算法应用于菌落形态识别、荧光信号判读及风险预警。例如,基于GB 4789标准训练的AI模型可实现菌落自动分类,准确率>95%;国家食品安全风险评估中心构建的数字化平台整合mNGS数据,可预测食源性疾病暴发趋势。

5.2.2 物联网与区块链溯源

通过传感器实时监测食品生产、运输环节的微生物污染风险,结合区块链技术建立全链条数据不可篡改的溯源系统。例如,乳制品企业可通过物联网设备监控冷链温度,结合微生物检测数据实时预警污染风险。

5.3 标准化与全球化发展

5.3.1 国际标准统一化

针对分子生物学技术(如qPCR、CRISPR)和生物传感器的检测流程、设备校准等,推动ISO、GB等标准的全球互认^[6]。我国2024年新增104项食品安全标准物质,为技术验证提供基准,助力企业通过海外认证。

5.3.2 低成本技术普及

通过喷墨打印、纸基传感器等技术降低设备制造成本。例如,环介导等温扩增(LAMP)无需热循环仪,配合预装冻干试剂盒,可推动基层实验室和欠发达地区的技术普及。

5.4 绿色环保与可持续发展

5.4.1 减少试剂污染

开发可降解生物材料(如纤维素试纸)替代传统塑料耗材,推广无溶剂提取技术(如免疫磁珠富集)降低化学废物排放。

5.4.2 能源高效利用

基于太阳能驱动的便携式检测设备(如手持式qPC

R仪)将减少对电网依赖,适用于野外或资源匮乏地区。

将成为关键驱动力。

5.5 应用场景拓展

5.5.1 全链条监控

从农田到餐桌的全生命周期检测,覆盖种植、加工、储运等环节。例如,乳企在原料奶收购环节采用快速检测技术(如微生物测试片),18~24小时内完成菌落总数评估。

5.5.2 跨界融合应用

食品检测技术向环境监测(如水质微生物检测)、生物医药(如益生菌活性评估)等领域延伸,形成技术协同效应。例如,易瑞生物将微生物检测产品扩展至环境检测与医药研发。

6 结论

未来食品微生物检测技术将呈现“快速化、智能化、全球化、绿色化”四大趋势。通过微流控、CRISPR、AI等技术的深度融合,检测效率与精度将大幅提升;标准化建设与成本控制推动技术普惠;绿色环保理念则引导行业可持续发展。这一过程中,跨学科协作和政策支持

参考文献

- [1] World Health Organization. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: 2015-2025[R]. Geneva: WHO Press, 2018.
- [2] 刘冬梅,李凤琴.食品中沙门氏菌传统检测方法的优化研究[J].中国食品卫生杂志,2019,31(2):156-160.
- [3] 分子生物学技术在检测机构食品微生物检测中的应用现状、技术制约因素与发展趋势,生物医学工程,2021.3.23
- [4] 中国生物传感器行业现状调研与前景战略研究报告 2025, 行业研究报告, 2025.1
- [5] JIAO Y, LI Z, CHEN X, et al. CRISPR-Cas12a-based rapid detection of *Listeria monocytogene*s in milk[J]. Food Control, 2023, 145: 109432.
- [6] 国家食品安全风险评估中心.食品安全国家标准食品微生物学检验用标准物质研制指南: GB 4789.28-2024[S]. 北京: 中国标准出版社, 2024.