學校實驗室的
微生物及生物工程實驗
安全指引

教育局

科學教育組

2021

學校實驗室的微生物及生物工程實驗安全指引

本安全指引的目的，旨在提醒中學實驗室使用者在進行微生物及生物工程實驗活動時採取必要的安全措施，以提高實驗室的安全水平。

根據「中華人民共和國生物安全法」，「生物安全」包括有效防範和應對危險生物因子及相關因素威脅，促進生物技術健康發展，保障人民生命健康，以及保護生物資源和生態環境。

維護生物安全是至為重要的，我們應採取安全措施，以減少處理微生物時的潛在風險，並盡量減低對工作環境、社區及生態環境的污染和危害。根據「生物安全法」、以及世界衞生組織（WHO）和美國疾病預防控制中心（CDC）的指引，本安全指引將討論處理微生物和其他生物工程樣本的主要生物安全標準和風險評估。

目錄

I. 處理微生物.....3
A. 微生物的傳播途徑.....3
B. 實驗室生物安全水平和微生物危險度級別的分類.....3
C. 標準微生物操作規範.....6
D. 培養微生物.....7
a) 製備培養基.....7
b) 標記和封蓋.....7
c) 無菌技術.....8
d) 培養微生物.....11
e) 觀察微生物培養物.....11
E. 消毒及棄置培養物和污染物.....12
F. 處理乙醇的安全注意事項.....12
G. 微生物溢出的處理.....13
H. 微生物實驗後的消毒.....13
II. 與生物工程有關的實驗.....14
A. 生物工程實驗的一般注意事項.....14
B. 處理脫氧核糖核酸（DNA）和其他生物分子.....14
C. 生物表達系統.....14
D. 電泳.....15

E. 試劑處理.....15
F. 組織培養.....15
G. 實驗後的消毒.....15
III. 風險評估.....16

I. 處理微生物

A. 微生物的傳播途徑

處理微生物培養物一般被認為具有潛在的危害性，因為處理者有可能與已知或未知的病原體有直接或間接的接觸。致病微生物可通過以下四個主要途徑進入人體：（1）微生物培養物直接從傷口或割傷的身體表面進入；（2）吸入微生物培養物的氣溶膠（或懸浮顆粒）；（3）微生物從眼睛、鼻子或口腔的黏膜進入；以及（4）攝取已被污染的食物或飲料。因此，應謹慎處理所有微生物及其不同形式的培養物。

B. 實驗室生物安全水平和微生物危險度級別的分類

在開始任何與微生物相關的工作之前，必須先了解使用具有潛在危險的活微生物所帶來的風險，以及相應實驗室設置的標準要求。

一般而言，世界衛生組織（WHO）將微生物分類為四個風險級別，從危險度第1級（最低風險）到危險度第 4 級（最高風險）；而美國疾病預防控制中心（CDC）將實驗室設置的要求分為四個生物安全水平。每個生物安全水平都有其控制使用微生物的特定措施、安全設備的標準及實驗室活動的類型。安全水平是按其對個人、環境和社區所作出的保護程度從低到高排列的。但是，微生物危險度級別的分類不一定與實驗室的生物安全水平相對應。

表 1 列出微生物的危險度級別與實驗室設置的生物安全水平（BSL）及其特定要求的關係。

表1

微生物的危險度級別	實驗室設置的生物安全水平 (BSL)	涉及的微生物	實驗室類型	實驗室操作規範	安全要求
1	1	• 沒有或較低個人和社區風險（例如大腸桿菌的非致病性菌株）	• 基礎教學； • 研究	• 標準微生物操作規範	• 需要開放式工作檯和水槽
2	2	• 中度個人風險； • 低社區風險（例如金黃色葡萄球菌）	• 初級保健服務； • 診斷服務； • 研究	• 1級加上進出限制； • 生物危害標示； • 適當的個人防護設備（PPE）	• 1 級加上生物安全櫃（BSC）*； • 高壓滅菌器
3	3	• 高個人風險； • 低社區風險（例如結核分枝桿菌）	• 特殊診斷服務； • 研究	• 2級加上進出限制； • 配有呼吸器的特殊個人防護設備	• 2 級加上適當的生物安全櫃（例如II級）； • 非手觸式水槽； 定向氣流； • 2 套自動關閉和上鎖的門
4	4	• 個人和社區風險較高（例如埃博拉病毒，或稱為伊波拉病毒）	• 危險病原體	• 3級加上正壓及供氣的全覆蓋式個人防護設備； • 進入之前要更換衣服； • 離開前先為保護衣物去污及淋浴	• 3 級加上隔離區； • III 級生物安全櫃（有專用的供氣和排氣設備）； • 真空和去污染系統



圖 1 II 級生物安全櫃

*註解：生物安全櫃（BSC）為實驗操作員和病原微生物之間提供物理阻隔，生物安全櫃分為三類：I 級生物安全櫃通常用於處理具傳染性廢物；II 級生物安全櫃（圖 1）通常用於培養細胞和分離病毒；而III級生物安全櫃則用於處理可引致高死亡率疾病的微生物。

C. 標準微生物操作規範

本章節所述的標準微生物操作規範適用於香港的一般中學生物實驗室。這些做法包括：

1. 穿着實驗袍以防止個人衣物受到污染。

2. 在進行預期有微生物或其他有害物質濺起的步驟時，必需佩戴安全護目鏡。

3. 處理任何化學或生物樣本之前，請佩戴乳膠或丁腈手套。傷口必須用無菌敷料覆蓋。 **請勿清洗或重複使用一次性手套**。

4. 在教師或實驗室技術員的指導下，佩戴額外的個人防護設備（PPE），例如外科口罩。

5. 束起長髮及固定領帶。

6. 嚴禁在實驗室飲食。

7. 採用無菌技術處理微生物培養物。實驗前後，使用消毒劑清潔實驗檯表面並洗手。實驗後，將所有不需要的培養物適當地消毒和棄置。

8. 應使用移液器協助轉移液體培養物，**實驗室內嚴禁用口吸法操作移液管**。

9. 將廢棄的培養基倒入盛有 10% 氯漂白劑的廢棄物貯存容器。

D. 培養微生物

a) 製備培養基

應根據供應商提供的說明書製備培養基，如果需要對培養基進行高壓滅菌，容器不應盛載至超過其總體積的一半。

b) 標記和封蓋

用防水筆在培養皿的底部（即用作盛載瓊脂的部分）的邊沿作標記，而不是蓋子上面（圖 2），以避免底部與蓋子分開後造成混淆。移動培養皿時，應握住整套培養皿（底部和蓋子合在一起）。

培養微生物前，應用膠紙將培養皿封好（圖 2），以避免培養皿的底部和蓋子意外分離。這種封蓋模式可讓培養的微生物進行氣體交換。盡量避免把培養皿完全密封，因為這樣做會妨礙空氣流動，並造成缺氧環境有利於厭氧微生物的生長。

在完成培養後，可用石蠟封口膜把培養皿密封（圖 3），並於觀察前以 4ºC 存放，藉此保持培養基濕潤，以及減少在觀察培養基的過程中引入污染。

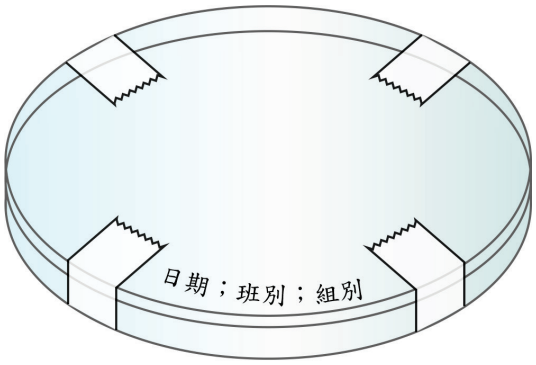


圖 2

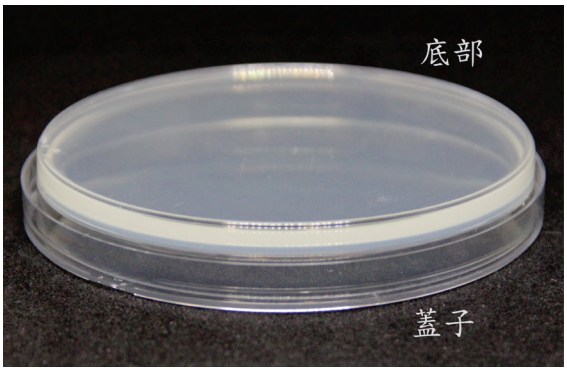


圖 3

c) 無菌技術

為確保培養物不會受到環境中微生物的污染，以及環境不受所處理的微生物污染，在微生物實驗中使用無菌技術來轉移微生物是很重要的。

1. 無菌區：

- 所有與微生物有關的操作均應在火焰周圍的無菌區（即有穩定上升氣流的範圍）內進行。
- 在進行任何程序前，先點燃本生燈，讓本生燈火焰燃燒 20 秒，以確保有足夠時間對周圍的空氣進行滅菌。

2. 消毒容器的開口：

- 擰開容器（例如瓶子、液體培養基管、培養瓶）的蓋子時，應將容器保持在約 45º 或更傾斜的位置，並要確保容器內的載物不會溢出（圖 4），以免空氣中的微粒進入。在擰開蓋子後，用一隻手把蓋子握住，再用另一隻手將容器的開口在火焰上以打圈方式移動 3 至 4 次，以燃燒掉任何污染物（圖 4）。

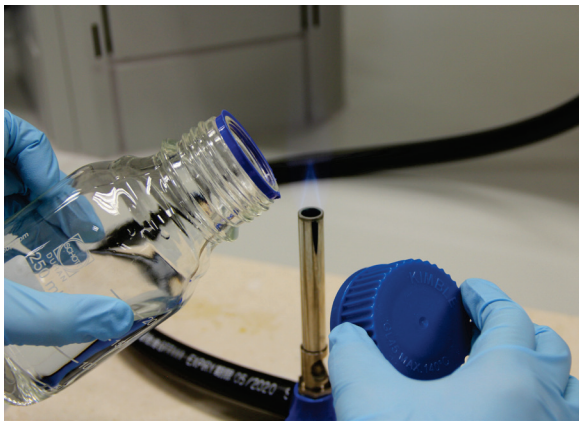


圖 4

- 在添加或移走液體時，保持容器傾斜。
- 再次以火焰消毒容器的開口，讓其稍微冷卻，然後重新蓋上容器的蓋子。

3. 轉移微生物：

- 當轉移微生物到液體培養基管或培養平板時，打開管口或平板的時間應盡可能縮短，以減少暴露在大氣的時間。
- 當處理開口較大的培養皿時，應將培養皿的蓋子打開約至 45º 或盡量減少暴露（圖 5）。

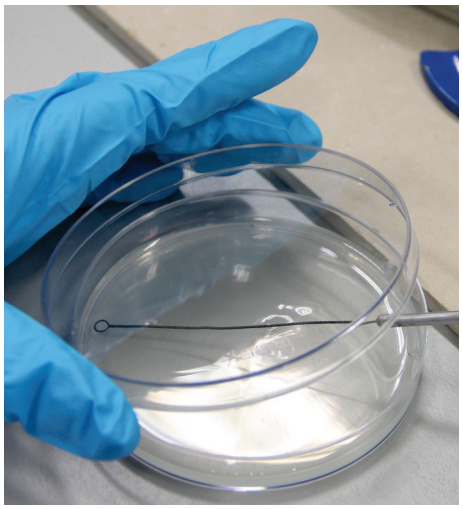


圖 5

4. 接種環消毒：

- 若使用可重用的接種環，須將接種環放於火焰的藍色錐體尖端（圖 6），藍色錐體是火焰中最熱的部分。將接種環燒至通紅（圖 6），然後讓其冷卻。每次使用後，必須將接種環燒至通紅，以作消毒；待其冷卻後，才可將之貯存。
- 若使用一次性的接種環，在每次處理不同的微生物樣本時，都應使用新的。丟棄用過的接種環前，要以 10% 氯漂白劑消毒。



圖 6

5. 塗抹棒消毒：

- 當使用可重用的塗抹棒（即玻璃或金屬），先將其浸入盛有 70% 乙醇*的燒杯中，然後將棒子放在火焰上輕輕地掃動，以燃燒掉所有附着的微生物（圖 7），再讓其冷卻。每次使用完塗抹棒後，必須按上述程序將之消毒，才可貯存。
- 若使用一次性的塗抹棒（即塑料塗抹棒），在每次處理不同的微生物樣本時，都應使用新的塗抹棒。丟棄用過的塗抹棒前，要以 10% 氯漂白劑消毒。

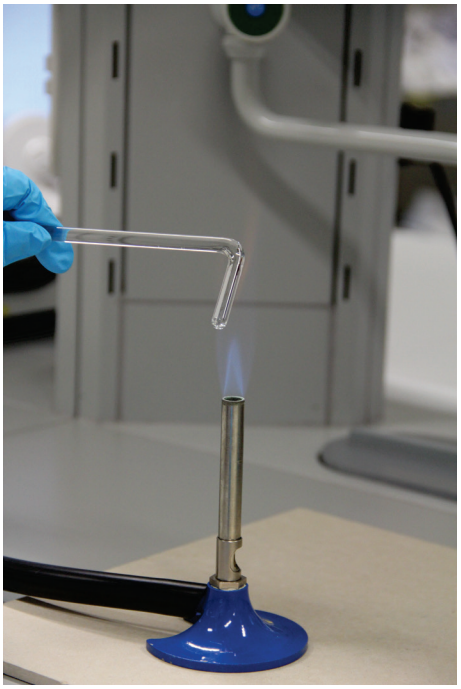


圖 7



*注意：切勿把燒熱的塗抹棒放入乙醇，因為乙醇可能因而着火。一旦乙醇着火，以一塊防火板（尺寸須大於燒杯開口）覆蓋燒杯，以切斷氧氣供應，從而熄滅火焰。

d) 培養微生物

大部分在學校實驗中使用的微生物，均可在 30ºC 以下良好地生長；應避免以 37ºC 或接近 37ºC 的溫度來培養微生物，這可能會有助一些在人體溫度下可茁壯成長的潛在病原微生物的生長。

應在密閉空間培養微生物，例如培養箱或上鎖的預備室內。在培養期間，蓋好的瓊脂平板應倒置存放（圖 8），以確保在平板蓋上形成的任何冷凝物都不會滴落在瓊脂上，避免洩漏的風險。

培養箱使用前後，須以 70% 乙醇或 10% 氯漂白劑消毒。如連續使用培養箱，則需進行週期性消毒，例如：每週一次。

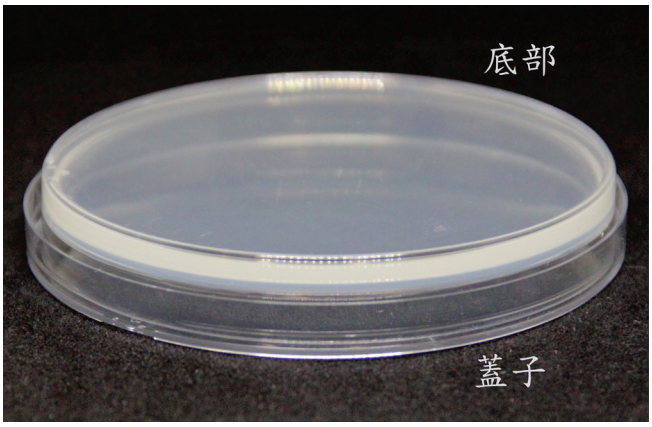


圖 8

e) 觀察微生物培養物

觀察樣本時，注意樣本是否處於密封狀態，例如用石蠟封口膜密封培養皿或把培養皿放置在密封的透明塑料袋內。**不建議打開含有微生物培養物的培養皿進行觀察。**

E. 消毒及棄置培養物和污染物

需棄置的培養物應收集在危害品丟棄袋內，並以 121°C、15 psi 壓力下的壓力蒸汽（高壓滅菌器）中消毒至少 30 分鐘，或浸入 10% 氯漂白劑中至少2小時。所有被微生物污染的材料或實驗室耗材也應以相同的方式進行處理，才能丟棄。

在學校內使用高壓滅菌器（圖 9）均需遵守勞工處所訂立的《鍋爐和壓力容器操作規範》（ https://www.labour.gov.hk/tc/news/pdf/CoPOwners.pdf）。高壓滅菌器必須在勞工處登記，並由指定的檢查員定期檢查。除非根據《鍋爐和壓力容器條例》第 9 條給予豁免，否則高壓滅菌器應由合格人員操作（https://www.elegislation.gov.hk/hk/cap56）。嚴禁學生操作高壓滅菌器。



圖 9

F. 處理乙醇的安全注意事項

乙醇雖然易燃，但在進行微生物實驗時，卻要經常使用乙醇及本生燈火焰以達致消毒目的。如果乙醇意外着火，不要驚慌，應立即通知教師或實驗室技術員，並要注意：

1. 如果乙醇在容器中着火，請以一塊防火板（尺寸須大於容器開口）覆蓋容器；
2. 如果乙醇在實驗檯上着火，而範圍很小，請關掉本生燈並移開所有易燃物體或燃料，以免火勢迅速蔓延；以及
3. 如果火勢很大，則應使用滅火器或滅火毯。

G. 微生物溢出的處理

如有微生物培養物溢出，應立即向教師或實驗室技術員報告，並由他們處理。清理溢出物時，應佩戴防護手套和穿着實驗袍。必要時戴上口罩，切忌吸入由溢出物形成的氣溶膠。

溢出物應以浸有消毒劑（例如 70% 乙醇或 10% 氯漂白劑）的紙巾覆蓋， 覆蓋時間至少 15 分鐘，然後掃入生物危害或化學廢物袋內，受污染的區域也應進行適當消毒。萬一皮膚接觸到溢出物，請立即用肥皂和水徹底清洗，必要時尋求醫療協助。

H. 微生物實驗後的消毒

在每次完成微生物實驗後，應立即用消毒劑（如 70% 乙醇或 10% 氯漂白劑）擦拭實驗檯表面和實驗區域。**在使用消毒劑之前，確保所有火源已關上**。

進行微生物實驗後，用肥皂和水徹底洗手。應用紙巾擦乾雙手，然後將紙巾放進有蓋的廢棄物貯存容器中。

II. 與生物工程有關的實驗

A. 生物工程實驗的一般注意事項

為了實驗室安全以及避免污染，在生物工程實驗中應採取預防措施，特別是在處理脫氧核糖核酸（DNA）、細胞和組織培養物時。如有必要，應採用無菌技術。

所有皮膚上的傷口均應使用無菌敷料覆蓋，亦應佩戴防護手套，建議穿着實驗袍以防止個人衣物被污染；實驗前後要清潔雙手。

進行生物工程實驗時，可能會操作細菌細胞。如有需要，應採取第（I）部分所述的「處理微生物」中必要的預防措施。在使用實驗套件和精巧設備之前，請先閱讀操作手冊，以熟悉操作步驟。小心處理所有移液器，以免在移液過程中形成氣溶膠，**嚴禁用口吸法操作移液管**。

B. 處理脫氧核糖核酸（DNA）和其他生物分子

在生物工程或分子生物學的研究中，常會涉及分離、分析和操作DNA及其他生物分子等程序。學校應確保使用的所有樣本都是生物安全的。嚴禁使用具有潛在危險的DNA片段，例如具有高活性的生物分子和完整長度的病毒基因組。

C. 生物表達系統

生物表達系統一般包括載體和宿主細胞，在生物安全水平 1（BSL-1）的常規工程實驗中，建議使用非致病性的細菌作為宿主細胞，尤其大腸桿菌（*E. coli*）和酵母。用作 BSL-1 載體和用作宿主細胞的大腸桿菌常見例子分別包括 pUC18 質粒和 K12 菌株。因 pUC18 質粒的序列已被完全排序，方便使用，而 K12 則是一種非致病性的大腸桿菌菌株。此外，釀酒酵母（學名：*Saccharomyces cerevisiae*）是一種常用於分子克隆的酵母例子。

D. 電泳

DNA片段或其他生物分子的電泳應在低電壓（例如 ≈ 75−100 V）下進行。在接通電源之前，須確保裝置的電線接駁妥當；切勿用濕手或濕手套觸摸電器裝置。從電泳槽中取出凝膠進行染色之前，須先把裝置的電源關掉。如果使用自製的電泳裝置，應確保裝嵌的儀器可安全使用。

當使用紫外線（UV）透照儀觀察電泳凝膠中的熒光標記時，應佩戴能吸收紫外線的個人防護設備，例如丁腈或乳膠手套以及防紫外線眼鏡或面罩，因為紫外線對皮膚和眼睛有危害。

E. 試劑處理

應先查閱試劑（例如限制酶和染料）的毒性或有害性，並採取適當的預防措施。例如，應採用合適的 DNA 染劑，不應在學校中使用能與核酸特異性結合的**溴化乙錠**和**碘化丙啶**（兩者均是誘變劑），應使用非特異性染料亞甲藍作染色之用；此外，亦可使用非誘變的DNA染劑或等效物，如 GelRed 和 GelGreen。光敏化學品（例如溴化銀、氯化銀）應貯存在琥珀色器皿或用鋁箔覆蓋的容器中；對溫度敏感的化學品則應按照製造商建議的貯存條件進行貯存。

F. 組織培養

無菌環境對操作組織培養物尤其重要。在組織培養中，以植物細胞或組織較為常用，如培養動物細胞，則須確保該細胞並不含致病源。組織培養涉及的試劑可能是有害的，因此應小心處理。

G. 實驗後的消毒

所有盛載過 DNA、生物分子、細菌細胞和組織培養物的玻璃器皿和塑料器皿均應視為受污染的器皿。在清潔或丟棄前，應將這些器皿放在消毒劑（例如 10% 氯漂白劑）中浸泡至少 2 個小時，或施行高壓滅菌（在高壓滅菌器中，以 121°C、15 psi 壓力的蒸汽滅菌至少 30 分鐘）。

每節實驗課後，應立即用消毒劑（例如 70% 乙醇或 10% 氯漂白劑）擦拭實驗檯表面。用肥皂和水徹底洗手，可重複使用的護目鏡應根據製造商的說明進行清潔和消毒。

III. 風險評估

準備微生物或生物工程實驗時，應考慮以下因素來進行風險評估：

因素	說明
1. 要研究的微生物類型和建議的生物安全水平	評估微生物培養物的風險水平
2. 實驗程序	計劃周密的實驗程序可將潛在風險降至最低
3. 培養物的容量	應使用最小量的液體培養物以將潛在風險降至最低
4. 培養基的成分	盡量使用選擇性或差異性培養基來培養目標微生物；以減少培養其他有害微生物的風險
5. 培養條件	盡量使用特定的培養條件來培養目標微生物；減少培養其他有害微生物的風險
6. 實驗室設施及設備	足夠實驗使用（分組或個人）
7. 正確的處置程序	盡量減少污染
8. 教師和實驗室技術員的專業知識	具備進行實驗所需的知識和技能
9. 學生的學習水平	對所進行的實驗有足夠的前備知識和技能

盡量避免從潛在危險源（如污水、動物或人的黏液、膿液和糞便）中分離和培養微生物。從這些來源採集的樣本可能包含大量的病原微生物。如果對未知來源的微生物進行培養，必須遵循生物安全水平2（BSL-2）的實驗程序。

參考資料：

https://www.cdc.gov/training/quicklearns/biosafety/

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42981/9241546506_chi.pdf?sequence=3&isAllowed=y

https://www.labour.gov.hk/tc/news/pdf/CoPOwners.pdf

https://www.elegislation.gov.hk/hk/cap56

http://npc.people.com.cn/BIG5/n1/2020/1018/c14576-31895849.html