

## 第一章 前言

隱孢子蟲 (*Cryptosporidium*)是造成水媒傳染疾病中常見的寄生性原生動物，能夠寄生在多種哺乳類動物、鳥類和人類體內；當隱孢子蟲脫離宿主環境將形成孢囊 (Oocysts)以抵抗各種環境條件<sup>(Fayer et al., 1997)</sup>。人類感染以腸道寄生為主，會導致隱孢子蟲症 (Cryptosporidiosis)且目前被認定對人類造成感染的主要物種為 *Cryptosporidium parvum*，主要傳播途徑為糞口傳染<sup>(O'Donoghue et al., 1995)</sup>，由宿主的糞便中排至環境，再經由環境水體造成傳染擴散的可能，曾經在 1993 年 4 月美國威斯康辛州 密爾瓦基發生過最嚴重一次隱孢子蟲症爆發，共有 40 萬人遭受感染<sup>(MacKenzie et al., 1994)</sup>；去年 8 月美國紐約州再度造成 746 人遭受感染，隱孢子蟲症對環境和人類健康的影響仍然存在，同時也是公共衛生領域所關心的議題。另外，隱孢子蟲孢囊大小為 4~6  $\mu\text{m}$ ，在淨水程序中若無法透過混凝沉澱單元將孢囊做有效去除，孢囊大小會落在砂濾池最難處理範圍內，容易造成處理效果不佳。過濾單元中，濾料表面會隨時間產生膠羽且增厚，則孢囊開始累積在砂濾池中，為了維持過濾功能會進行週期性反沖洗，孢囊也將會被沖洗出來，使得反沖洗廢水中隱孢子蟲孢囊含量為原水的 60 倍<sup>(Arora et al., 2001)</sup>。

另外，美國環保署 (USEPA)針對水媒傳染病先後制訂相關規定，表面水處理法則 (Surface Water Treatment Rule)，此法包括梨形鞭毛蟲之處理標準；表面水處理之加強法則 (Enhanced Surface Water Treatment Rule)，此法主要目的是隱孢子蟲的處理規範列入，以及美國資訊蒐集法則 (Information Collection Rule, ICR)，主要目的在蒐集三項資料，包括原水中各種微生物出現頻率、水廠對各種微生物處理能力和各種消毒副產物生成量的調查，以作為表面水處理法則修正的

依據。為了有效監測水體中隱孢子蟲的存在，檢測孢囊的方法陸續被發展出來，ICR 方法為第一個利用抗體專一性之螢光染色檢測水中隱孢子蟲孢囊的標準方法<sup>(USEPA, 1995)</sup>。目前普遍用來檢測隱孢子蟲孢囊的方法是美國環保署在 1999 年發展 Method 1622 及 1623，方法中改善過濾程序和採用免疫磁性分離法 (Immunomagnetic separation, IMS)，針對目標物抗體-抗原專一性反應，可具特異性地捕捉孢囊再與雜質分離。然而，Method 1622 及 1623 雖然是目前更新後的方法，卻在應用上仍有部分限制存在，包括在操作上有水樣濁度問題和藻類所發出自發性螢光皆會對檢測結果造成干擾；方法上為回收率低和變異性大<sup>(Jakubowski et al., 1996. Connell et al., 2000)</sup>。

近幾年，利用分子生物技術來檢測隱孢子蟲方法也陸續被發展出來，包括螢光原位雜交法 (Fluorescent *in situ* hybridization, FISH)、聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 等，可用來判斷孢囊活性、種類且專一性高，甚至具有定量功能。

本研究利用免疫磁性分離法搭配螢光顯微鏡進行隱孢子蟲孢囊檢測，評估不同水樣濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率之影響，目的是模擬反沖洗廢水之濁度影響孢囊檢測狀況。首先在方法上尋找最佳操作條件並利用濃縮程序中之不同操作條件如離心強度和離心時間，以及磁珠劑量和原水稀釋來改善濁度水樣中孢囊檢測回收率，作為未來水廠之反沖洗廢水再利用目標，其反沖洗廢水中孢囊含量影響處理單元之加藥劑量及處理效率之重要評估依據。

## 第二章 文獻回顧

### 2.1 隱孢子蟲之基本型態、特性及生命週期

隱孢子蟲在 1907 年由 Ernest Edward Tyzzer 在老鼠腸道內首次被發現，是一種寄生性原生動物，寄生在多種宿主體內，如鳥類、牛、羊等哺乳動物類，包括人類<sup>(Despommier *et al.*, 1994)</sup>。隱孢子蟲脫離宿主後，形成孢囊以抵抗各種環境條件<sup>(Fayer *et al.*, 1997)</sup>；孢囊在型態上呈卵型或圓球形，直徑為 4~6  $\mu\text{m}$ ，另外孢囊表面是由複合糖蛋白基質組成<sup>(Considine *et al.*, 2002)</sup>，使孢囊表面電性呈負電狀態<sup>(Karaman *et al.*, 1999; Considine *et al.*, 2002)</sup>，原因是孢囊表面有包括磷酸、羧基酸 (carboxylate) 和羧基 (carboxylic) 之官能基<sup>(Karaman *et al.*, 1999)</sup>。

當孢囊從環境中進入宿主體內後，每個孢囊含有 4 個孢子體 (Sporozoites)，此時具有感染性，當孢囊到達小腸後脫囊並附著在腸壁表面，進而熔合和包覆，開始成熟形成營養體 (Trophozoite)；接著進行分裂，無性生殖，營養體轉變成裂殖體 (Schizont)，內含有 8 個裂殖孢子 (Mercozoite)。有性生殖，裂殖孢子形成小配子體母細胞 (Microgamont) 進而成為大配子體母細胞 (Macrogamont)，產生受精卵 (Zygote)，最終成為孢囊，孢囊從腸壁上分離被排至糞便中。以上為隱孢子蟲之生命週期<sup>(Juraneck, D.D., 2000)</sup>，如圖 2.1 所示。

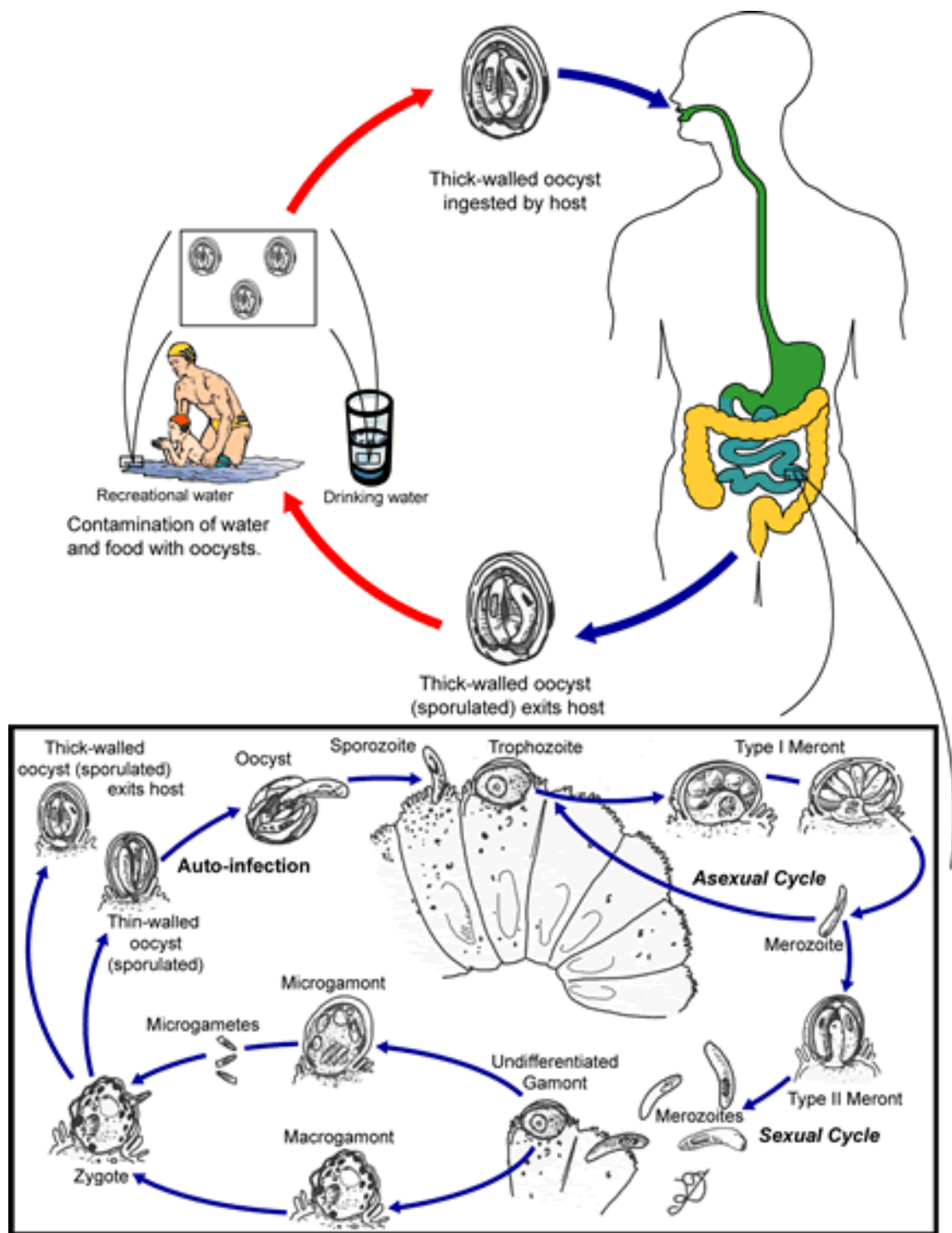


圖 2.1 隱孢子蟲之生命週期 (Juraneck, D.D., 2000)

## 2.2 隱孢子蟲症

隱孢子蟲在環境中具有長時間存在能力且具高感染性，僅需一顆孢囊就能引起感染<sup>(Hass and Rose, 1994)</sup>。隱孢子蟲寄生在人體內，會導致隱孢子蟲症，目前被認定對人類具有感染能力的物種為 *Cryptosporidium parvum*，隱孢子蟲症的主要傳播途徑為糞口傳染，其潛伏期為 4 到 6 天，產生症狀包括噁心、腹瀉和發燒等症狀，嚴重甚至死亡。在 1976 年，第一件人類遭受隱孢子蟲感染導致腹瀉症狀的案例出現<sup>(Nime et al., 1976.; Meisel et al., 1976)</sup>，直到 1982 年，美國波士頓、洛杉磯等各地開始發生愛滋病患受到隱孢子蟲感染，隱孢子蟲症才開始受到重視。糞口傳染造成擴散是孢囊從宿主的糞便中排至環境，經由環境水體造成物種感染大爆發的可能，過去至今持續有隱孢子蟲症案例發生，曾在 1993 年 4 月美國威斯康辛州 密爾瓦基發生過最嚴重一次隱孢子蟲症爆發，共有 40 萬人遭到感染，110 人死亡<sup>(MacKenzie et al., 1994)</sup>；2005 年 8 月美國紐約州又發生 746 人遭受感染。因此，隱孢子蟲症成為公共衛生領域持續關心的重要議題。

目前對於隱孢子蟲症仍無確切治療方式，主要靠人體自我免疫力治癒，則患者個人的免疫能力成為隱孢子蟲症嚴重於否的重要因素。一般患者至少需要幾天至一個月的時間康復，若免疫力較弱的患者或愛滋病 (AIDS) 患者則可能就需要數月甚至數年的時間痊癒。為了有效預防隱孢子蟲症的發生和控制，首要工作就是要避免公共之供水系統遭受孢囊污染，即可有效降低隱孢子蟲症爆發的可能。



## 2.3 各國對隱孢子蟲之法規及規範

人類遭受隱孢子蟲孢囊感染所造成隱孢子蟲症的問題始終存在，自 1976 年發生第一件人類遭受隱孢子蟲孢囊傳染引發隱孢子蟲症案例，接著 1982 年開始在美國各地發生愛滋病患容易發生隱孢子蟲症，1993 年在美國又發生最嚴重一次大流行，造成 40 萬人遭受感染和 104 人死亡，近年來美國紐約又發生 746 人遭受感染，說明隱孢子蟲存在對人體健康造成相當大的危害。因此，需要透過法規規範來掌握和控制水源中孢囊存在的數目，避免大流行的爆發及保障人體健康。世界各國開始針對隱孢子蟲存在開始訂定各項法規標準來限制和控制，以下針對美國、英國、日本和中國與隱孢子蟲相關規範描述如下。

### 美國



#### I. 表面水處理法 (The Surface Water Treatment Rule, SWTR)

在 1989 年 6 月通過，表面水處理法的目的在規範水源為表面水或受表面水影響的地下水之水廠操作標準的法規，其中包括第一次以法規作為規範來控制梨形鞭毛蟲為目的，其要求規範為所設計及操作標準，得以使梨形鞭毛蟲去除率或失活能力達 99.9%。

#### II. 蒐集資訊法 (Information Collection Rule, ICR)

在 1996 年 5 月公佈，乃為執行水質監測及數據紀錄的法則，主要目的在蒐集包括原水中各種微生物之出現頻率、水廠對各種微生物之處理能力和各種消毒副產物生成量之調查。其中包括梨形鞭毛蟲、隱孢子蟲和病毒等微生物調查。

### III. 過度性表面水加強法 (Interim Enhanced Surface Water Treatment Rule, IESWTR)

在 1998 年公佈，主要目的對隱孢子蟲建立一個可容忍之最大污染含量目標限值 (Maximum Contaminant Level Goal, MCLG)，和僅有過濾單元時，隱孢子蟲之去除率須達到 99%。MCLG 定為 0 的原因包括：1. 單一隱孢子蟲即可引發感染能力。2. 隱孢子蟲是目前水體中會導致水媒疾病的主要微生物。3. 此訂定規範將與表面水法及大腸桿菌法中所訂定隱孢子蟲規範相同。

#### 英國

第一個將飲用水中隱孢子蟲提出量化標準的國家。目前英國飲用水水質標準以 1989 年制定 Water Supply Regulations 為主要依據。在 1991 年 Water Industry Act 中要求水公司供水系統之處理效果須達水質標準且出流水中隱孢子蟲孢囊平均含量需低於 1 oocyst/10 L。

#### 日本

由厚生省在 1986 年提出〈供水系統隱孢子蟲暫行對策方針〉，要求出流水濁度低於 0.1 NTU。

#### 中國

2005 年 6 月實施〈城市供水水質標準〉，濁度由 1 NTU 提高標準為 0.5 NTU。因為濁度與水中梨形鞭毛蟲、隱孢子蟲孢囊在統計學上有相關性。因此，濁度越低其存在可能性越小。

## 2.4 水廠淨水程序處理隱孢子蟲

傳統水處理程序，包括混凝、沉澱、過濾和消毒單元。對於淨水處理程序對隱孢子蟲孢囊之去除效果則與梨形鞭毛蟲孢囊相差甚遠，主要原因是隱孢子蟲孢囊較小、沉澱速度慢以及對消毒劑的抵抗性較大 (Leland *et al.*, 1993)。

### 2.4.1 混凝沉澱

混凝主要是讓水中顆粒產生迅速聚集，過程中聚集膠凝，使水中不溶解性顆粒表面造成不穩定現象，經電性中和、架橋作用等作用機制來形成膠羽，進而以沉澱、過濾方式達到去除效果。常見混凝劑有氯化鐵、氯化鎂、聚氯化鋁和硫酸鋁等。混凝是影響水處理程序中移除隱孢子蟲最重要的作用 (Dugan *et al.*, 2001)。States *et al.* (2002) 利用不同混凝劑，如氯化鐵、聚氯化鋁和鋁鹽進行模廠試驗，隱孢子蟲平均去除率為 99.999% 且沒有因為 pH 下降造成隱孢子蟲去除的損失。另外，石灰軟化也是一種利用化學沉澱方式來移除濁度和顆粒性物質的處理程序。Logsdon (1994) 指出 13 個實廠規模的石灰軟化場中隱孢子蟲孢囊去除率為 99.68% 至 99.96%。

若以傳統沉澱池去除隱孢子蟲，結果發現毫無作用，除非沉澱池中有污泥膠羽和孢囊一同沉下。若未經混凝沉澱而直接進入砂濾池，會因為孢囊大小落在砂濾池最難處理之範圍，造成處理效果不佳。



## 2.4.2 過濾

砂濾池藉由濾料表面的機械篩除，以及濾料孔隙間之沉澱、吸附、攔截和擴散等作用，去除水中懸浮固體，包括孢囊。在良好操作條件下，快濾池對隱孢子蟲孢囊之去除率可達 96.8% 至 99%。當過濾作用隨時間增加時，濾料表面會產生膠羽增厚，同時孢囊開始產生累積於砂濾池中，為維持過濾效能則定期進行反沖洗，因而造成反沖洗廢水中隱孢子蟲孢囊含量為原水的 60 倍<sup>(Arora et al., 2001)</sup>。為此，反沖洗水之再利用，除水質之物理、化學條件考量外，隱孢子蟲孢囊含量之影響不容小覷。

## 2.4.3 消毒

淨水處理中消毒的主要目的為破壞微生物的感染性或活性，以避免因水中微生物存在而導致疾病的發生，如細菌、病毒和原生動物。水中最常用的方式為加氯消毒。然而，隱孢子蟲為水中最會抵抗惡劣環境的物種，甚至與高劑量氯接觸時間達 18 小時後仍未失活 (Inactivation)，以及與氯氨反應未有失活現象發生<sup>(Korich et al., 1990)</sup>。其他影響隱孢子蟲失活的因素，包括消毒劑的種類、接觸時間、加藥時機和 pH 值。因此，隱孢子蟲成為針對原生動物消毒效率的指標物種。

其他的消毒方式還有臭氧和紫外線 (UV)。消毒效率上，紫外線僅需相當低劑量 ( $1-9 \text{ mJ/cm}^2$ ) 可造成 99~99.9 % 的 *C. parvum* 失活<sup>(Craik et al., 2001)</sup>；臭氧僅需要濃度為 2 mg/L 和 1 分鐘的接觸時間，就能夠造成 99% 的 *C. parvum* 失活<sup>(Corona-Vasquez et al., 2002)</sup>。

## 2.5 隱孢子蟲之檢測方法

美國環保署為了監測水中微生物包括細菌、病毒和原生動物等，早期發展出 ICR 方法，對象包括隱孢子蟲且檢測方法有三個階段：1. 採樣收集、濃縮，濾管過濾法。2. 分離純化，梯度澄清法 (Percoll-sucrose gradient)。3. 檢測，螢光顯微鏡。ICR 方法為第一個利用帶有螢光標記物之抗體來反應檢測隱孢子蟲孢囊之方法。不過，利用梯度澄清法分離後，上澄液仍可能因為仍含有顆粒和其他雜質包括藻類的存在，會對螢光顯微鏡進行觀察時造成干擾。因此，匣式過濾器 (Cartridge filter) 和梯度澄清法會造成 ICR 方法檢測回收率偏低問題 (Clancy *et al.*, 1994; LeChevallier *et al.*, 1995; McCuin *et al.*, 2001)。

隨後在 1999 年，分別發展出 Method 1622 及 1623 來改善 ICR 方法檢測回收率 (USEPA, 1999)。Method 1622 及 1623 改善方式包括：1. 利用新式過濾器來增加孢囊捕捉和流洗之效率。2. 採用免疫磁性分離法 (Immunomagnetic separation, IMS) 分離出水樣中孢囊，減少其他干擾。3. 染色程序，螢光抗體染色法，可幫助確認孢囊之特異性。4. 有效品保和品管的控制。雖然 Method 1622 及 1623 是更新後的方法，在應用上仍有改善空間，包括檢測回收率低和變動大 (Connell *et al.*, 2000)。

檢測隱孢子蟲孢囊方法可區分為過濾、分離和檢測三個程序，過濾程序可利用匣式過濾、濾膜過濾和 Envirochek 過濾器來進行過濾，將孢囊截留在濾膜或濾材上，再以流洗液將孢囊從濾膜及濾材上沖洗下來並收集。分離程序，主要包括梯度分離和免疫磁性分離兩種，梯度分離主要透過孢囊與溶劑之比重不同，經重力離心後出現分層，再將孢囊與雜質分離。免疫磁性分離法，利用抗體帶有磁性顆粒，經由抗體抗原反應捕捉到孢囊後，再以磁力將孢囊與雜質顆粒分離。檢測程

序，可以使用包括螢光顯微鏡、血球計數盤、流式細胞儀；甚至聚合酶鏈鎖反應 (PCR)也開始被應用。各階段及所使用之工具和方法將在下列各小節作詳細說明。

ICR 方法中在過濾程序中採用濾膜過濾來進行濃縮收集並以梯度分離法達到分離效果，最終利用螢光顯微鏡進行觀察計數。Method 1623 在鑑驗程序中提供多種工具包括螢光顯微鏡、血球計數盤和流式細胞儀作為方法建議工具，在濃縮和分離程序中建議利用 Envirochek 過濾器 and 免役磁性分離法來進行。本研究則僅利用磁性分離法並搭配螢光顯微鏡進行孢囊檢測來進行實驗，如圖 2.2 所示。



圖 2.2 隱孢子蟲孢囊檢測方法之流程圖

## 2.5.1 過濾

### 1. 匣式過濾 / 濾膜過濾

這兩種過濾器在 Method 1622 中被使用，構造上，匣式過濾器為 1  $\mu\text{m}$  孔隙之聚醚砜 (Polyethersulfone) 材料之平板式濾器；濾膜過濾則採用 1  $\mu\text{m}$  孔隙大小、直徑 293 mm 之聚碳酸酯 (Polycarbonate) 材料之刻痕式 (track-etched) 薄膜濾器。回收效率上，在已添加 100 至 250 顆孢囊之 10 L 試劑水中，匣式過濾回收率高於濾膜過濾 (分別為 47% 和 39%)，但差異性上不具有統計意義。清水中，反而是濾膜過濾高於匣式過濾 (分別為 22% 和 12%)，但相較於試劑水回收率皆有所下降，匣式過濾可能是因為被吸附孢囊的顆粒阻塞在濾器內，無法被流洗出來。濾膜過濾則是吸附孢囊的顆粒在平滑較容易被流洗下來 (Simmons *et al.*, 2001)。Hsu *et al.* (2000) 以自來水廠之原水和處理後水，其濁度分別為 32 及 1.2 NTU，利用匣式過濾和薄膜過濾來進行孢囊過濾濃縮，再以梯度分離法進行分離，其檢測回收率為 9~17%。結果說明兩種過濾器在使用限制上，匣式過濾較適用於高濁度水質；則濾膜過濾對於濁度水體其過濾效果有限，僅限適用於低濁度和高品質之處理過水。

### 2. Envirochek capsule

Envirochek 濾器與匣式過濾器的過濾原理方式相同，其過濾介質為特殊材質之親水性薄膜，孔隙大小為 1  $\mu\text{m}$ 。使用上，拋棄式的濾器避免重複使用所造成交錯污染水樣的可能；流洗過程中，操作者不會與過濾器接觸，因而操作者不會自行造成污染且孢囊容易被流洗出

來，因此僅需很少的分析時間和成本。Envirochek 濾器對隱孢子蟲孢囊會有大於 70%的回收率，因此成為 Method 1622 及 1623 所建議之採樣器。DiGiorgio *et al.* (2002) 利用大體積和標準體積之 Envirochek 濾器進行收集過濾表面水，其檢測回收率結果指出標準型濾器為 43 % (11 NTU)和 37 % (99 NTU)，大體積濾器為 51 % (11 NTU)，濁度自 20 NTU 開始上升至 99 NTU，孢囊檢測回收率下降為 36 %，結果發現 Envirochek 濾器在濁度 11~ 99 NTU，皆可表現出對孢囊檢測回收率之穩定性。另外，Kuhn *et al.* (2002) 主要比較中空纖維過濾器 and Envirochek 濾器對濁度表面水中隱孢子蟲孢囊檢測回收率評估，結果指出低濁度 (3.9 NTU)時，兩者回收率相似，分別為 74%及 71%；高濁度 (159 NTU)時，中空纖維過濾器為 0.4 %，Envirochek 濾器為 27.5%。結果顯示 Envirochek 濾器比較能夠抵抗濁度干擾。



## 2.5.2 分離

### 1. 免疫磁性分離法 (Immunomagnetic Separation, IMS)

主要利用抗體上標定鐵原子 (磁珠)，藉由抗體抗原專一性反應使含有磁珠之抗體和隱孢子蟲孢囊結合，再以磁性吸引力將環境 (液相) 基質中孢囊捕捉出來，有別於梯度分離法之不同比重及重力離心方式達到固液分離效果；免疫法的方式除了增加對特定目標物之專一性，同時可提高純化目標物效率和降低其他雜質干擾的可能性，其方法偵測極限為 10 oocysts/ L。

操作程序為首先將能與隱孢子蟲孢囊結合之磁性抗體加入含有孢囊之水樣中，經過充分反應時間，使磁性抗體可完全與水體樣本中孢囊藉由抗體抗原反應結合，經磁座之磁力將已經被磁性抗體所結合



之孢囊收集，因此已經被磁性抗體捕捉到之孢囊可有效從雜質顆粒中被分離出來。分離後，需添加 0.1N HCl 與已結合孢囊的磁珠混合，目的是破壞孢囊與磁珠間之鍵結，再以磁性力將磁珠收集，達到磁珠與孢囊分離效果，最終將孢囊進行螢光染色，在螢光顯微鏡下觀察。其作用原理和程序如圖 2.3 所示。

濁度對於免疫磁性分離法之影響性，Campbell *et al.* (1997) 指出濁度對於 IMS 程序會有影響，當濁度上升至 60~600 NTU，孢囊檢測回收率僅為 4.8%。McCuin *et al.* (2001) 利用 IMS 進行在濁度範圍是 50~5000 NTU 之孢囊檢測回收率，儘管水樣基質特徵有所差異，結果顯示 IMS 對於 *C. parvum* 孢囊檢測回收率相似。Hu *et al.* (2001) 控制 IMS 程序中雜質顆粒與總樣本體積比例來表示 IMS 程序中水樣濁度高低，從 1/40 (2500 NTU) 至 1/5 (20000 NTU)，其檢測回收率為 74~80%，說明濁度對 IMS 之影響差異不大。

另外，磁性抗體之種類可分為直接抗體和間接抗體，直接抗體是將孢囊抗體上直接標定磁珠；另一種為必須藉由第一劑抗體與第二劑抗體之兩階段作用。首先，將第一劑抗體加入樣本中與目標物反應，接著將標定磁珠的第二劑抗體與第一劑抗體作用，經特定反應時間後，會因為第一劑抗體和第二劑抗體結合形成目標物-第一劑抗體-第二劑抗體之複合物，此複合物再經由磁力將磁珠吸附並利用水洗過程與其他雜質分離。Bukhari *et al.* (1998) 比較兩種商業用磁珠分離套裝藥劑 Dynal 和 Crypto-Scan，在濁度為 50、500 和 5000 NTU 之三種不同水樣孢囊檢測回收率。結果顯示水樣濁度 50 和 500 NTU 時，檢測結果與試劑水相似；當濁度為 5000 NTU，檢測回收率則有所下降。Rochelle *et al.* (1999) 也利用相同之商業用磁珠分離套裝藥劑進行濁度為 210~11480 NTU 之隱孢子蟲孢囊檢測回收率，結果發現濁度對

於兩者檢測回收率影響並無統計上意義。

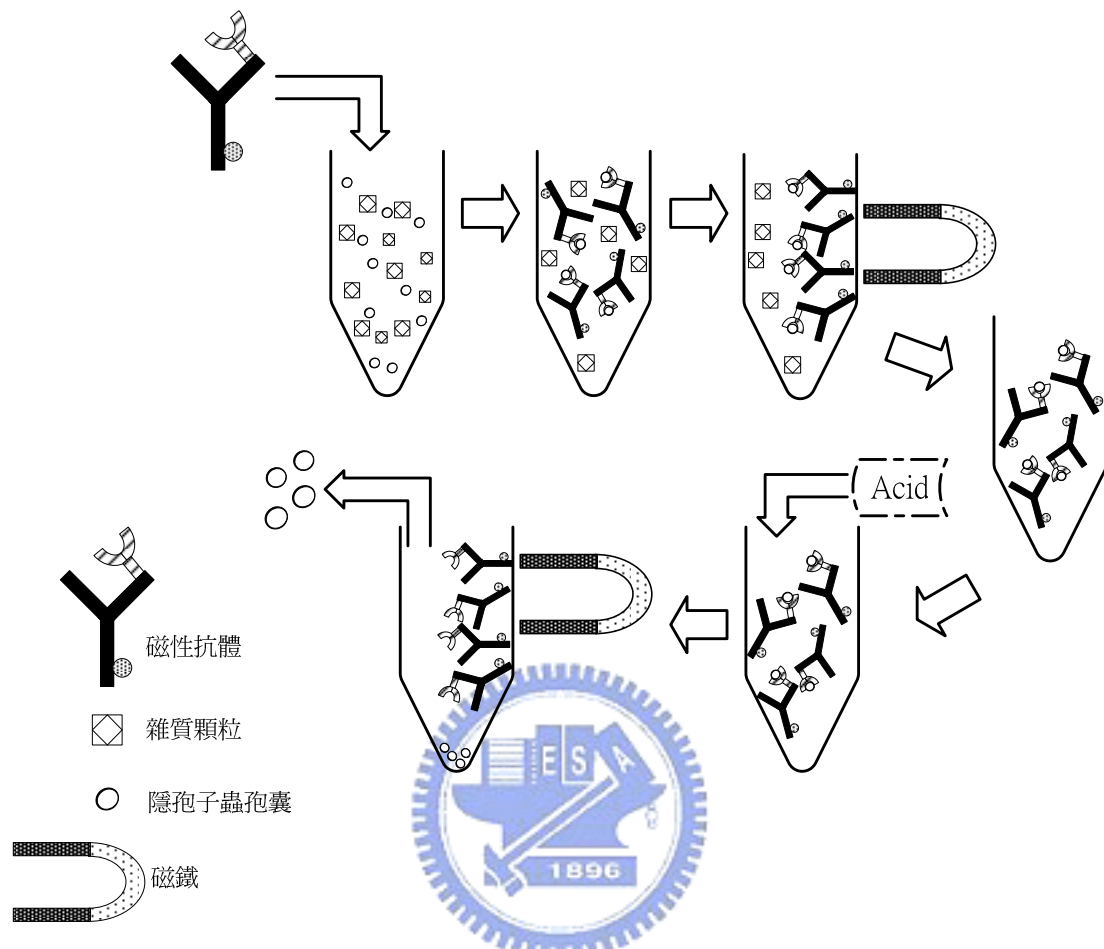


圖 2.3 免疫磁性分離法之原理和操作步驟

## 2. 梯度澄清法 (Percoll-sucrose gradient)

Percoll-Sucrose 溶液比重為 1.1，利用 Percoll-Sucrose 溶液與水樣混合，經重力離心作用使溶液中固體顆粒因比重不同造成梯度分層現象。因此，水樣中隱孢子蟲孢囊在 Percoll-Sucrose 混合液中與其他雜質顆粒分布在不同梯度層，再予以分離，達到純化效果。此方法特點在可將孢囊和雜質顆粒達到分離效果，但因為與雜質顆粒之比重相近而無法完全有效分離，造成孢囊流失和準確性不高，若當水體中含有大量的藻類或其它微生物時，會對分離效果有所影響。

### 2.5.3 檢驗

#### 1. 免疫螢光抗體法 (Immunofluorescence assay, IFA)

主要藉由抗原抗體反應產生專一性結合，方法原理是將目標抗原(欲檢測微生物)注入動物體內，誘發動物體內免疫系統產生抗體，再將其抗體注入其他動物體內，誘發產生第二劑抗體，最終將第二劑抗體標定螢光標記物，此螢光標記物可在特定波長之紫外光下發出特定螢光，因此當欲檢測微生物與第一劑抗體-螢光標記之第二劑抗體結合，把無法進行反應之抗體去除，即可得到帶有螢光標記物之欲檢測微生物，再經由螢光顯微鏡在特定波長下觀察，原如圖 2.4 所示。免疫螢光抗體法是目前用來檢測水體中隱孢子蟲的主要方法，只能觀察孢囊外型，無法判斷隱孢子蟲之活性和感染性<sup>(LeChevallier et al., 2003; Rochelle et al., 1997)</sup>。

利用本方法來檢測隱孢子蟲，所使用到之第一劑抗體為 Mouse IgM 和含有螢光標記物之第二劑抗體為 Goat Anti-mouse，所使用之螢光標記物為 Fluorescein isothiocyanate (FITC) ( $\lambda = 485 \text{ nm}$  excitation,  $\lambda = 535 \text{ nm}$  emission)，當 FITC 被特定波長激發時會放出蘋果綠的螢光<sup>(Mtambo et al., 1995)</sup>。另外，依照抗原抗體結合方式不同，抗體試劑包括直接免疫螢光抗體法 (Direct-Immunofluorescence Antibody Method)與非直接免疫螢光抗體法 (Indirect-Immunofluorescence Antibody Method)。

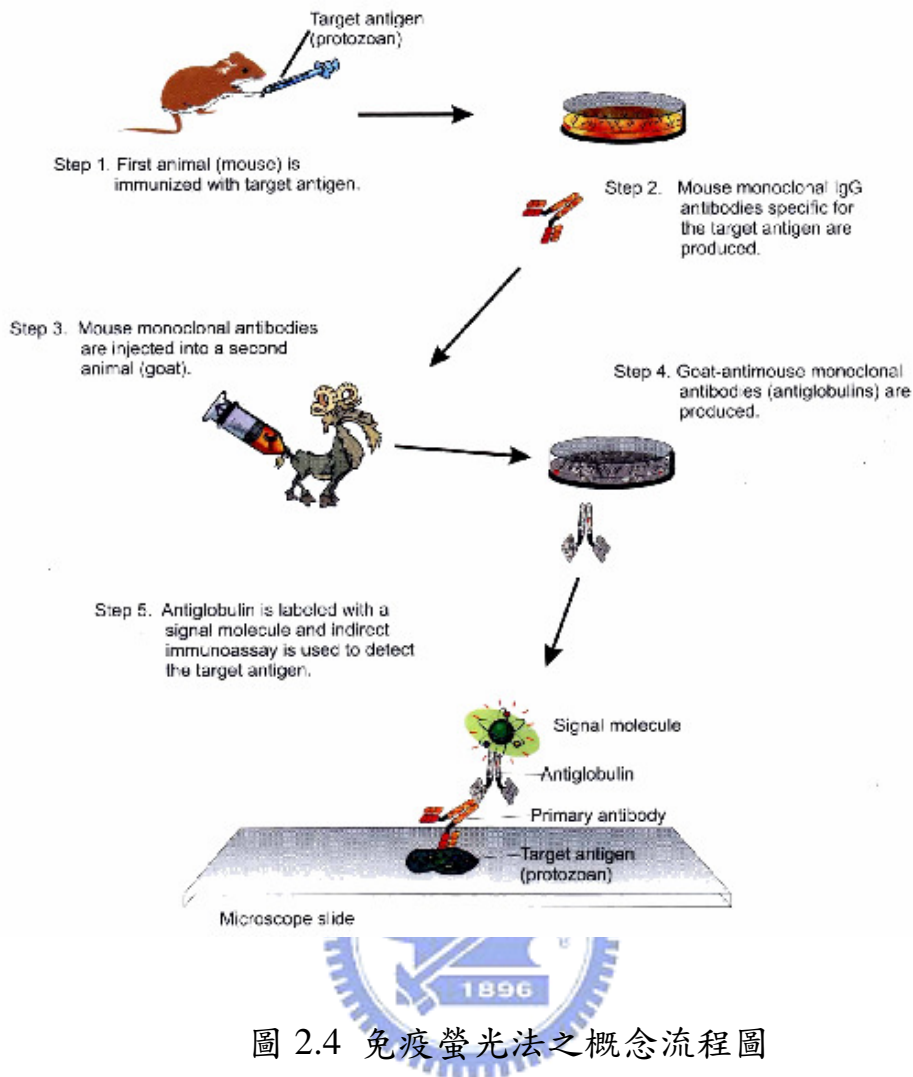


圖 2.4 免疫螢光法之概念流程圖

## 2. 血球計數盤 (Hemocytometer)

血球計數盤主要功能是用來計算單位體積的血液中血球之數目，在光學顯微鏡下觀察，依血球計數盤上刻度，可觀察並計數單位面積內之血球數，最終可得到單位體積血液中之血球數目。血球計數盤一般有兩個空室，其中細刻 9 個  $1 \text{ mm}^2$  的正方形，其中 4 個小落的正方形再細刻 16 個小格，深度為  $0.1 \text{ mm}$ ，總體積為  $1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 10^{-4} \text{ ml}$ ，如圖 2.5 所示。因此，當血球計數完畢後需再乘以  $10^4$ ，及表示每毫升中血球數目。應用在隱孢子蟲孢囊的計數上，將含有孢囊水體滴於計數盤上，以蓋玻片均勻施壓覆蓋，在顯微鏡下觀察，經過計

算即可得到單位水樣所含孢囊數目。血球計數盤是 Method 1623 中建議檢測方法，也是目前最常用來觀察、計算孢囊數目的方法之一。

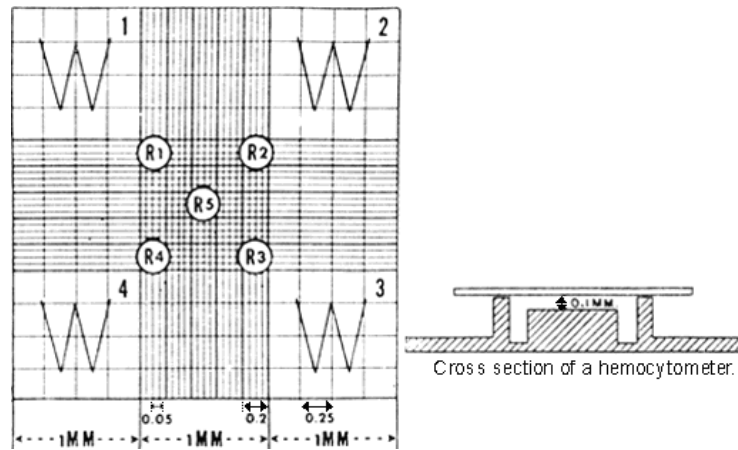


圖 2.5 血球計數盤俯視及側視圖 (USEPA, 2001)

### 3. 流式細胞儀 (Flow Cytometry)



流式細胞儀主要是為了可快速偵測流體水柱中連續之顆粒或細胞，被偵測到之顆粒或細胞會被雷射光激發後產生光學訊號，光學訊號可再轉換成電子訊號，利用電腦分析可以得到顆粒或細胞特性，偵測流程如圖 2.6 所示。當顆粒本身帶有螢光物質或被帶有螢光物質的抗體染劑染色後，會產生出波長不等的螢光，依照光的波長及強度變化，即可測出顆粒大小或特定與螢光抗體結合情形。

在 1993 年首次被用來檢測表面水體中隱孢子蟲孢囊，流式細胞儀所需要偵測樣本時間非常短暫，且有良好再現性。因此，相較於螢光顯微鏡觀察方法判定孢囊計數，其可節省人力、時間 (Vesey *et al.*, 1993)。然而，流式細胞儀缺點在於無法判定孢囊種類和活性、自發性螢光之藻類和非球型顆粒都會有產生干擾或誤判的可能 (Vesey *et al.*, 1994)。



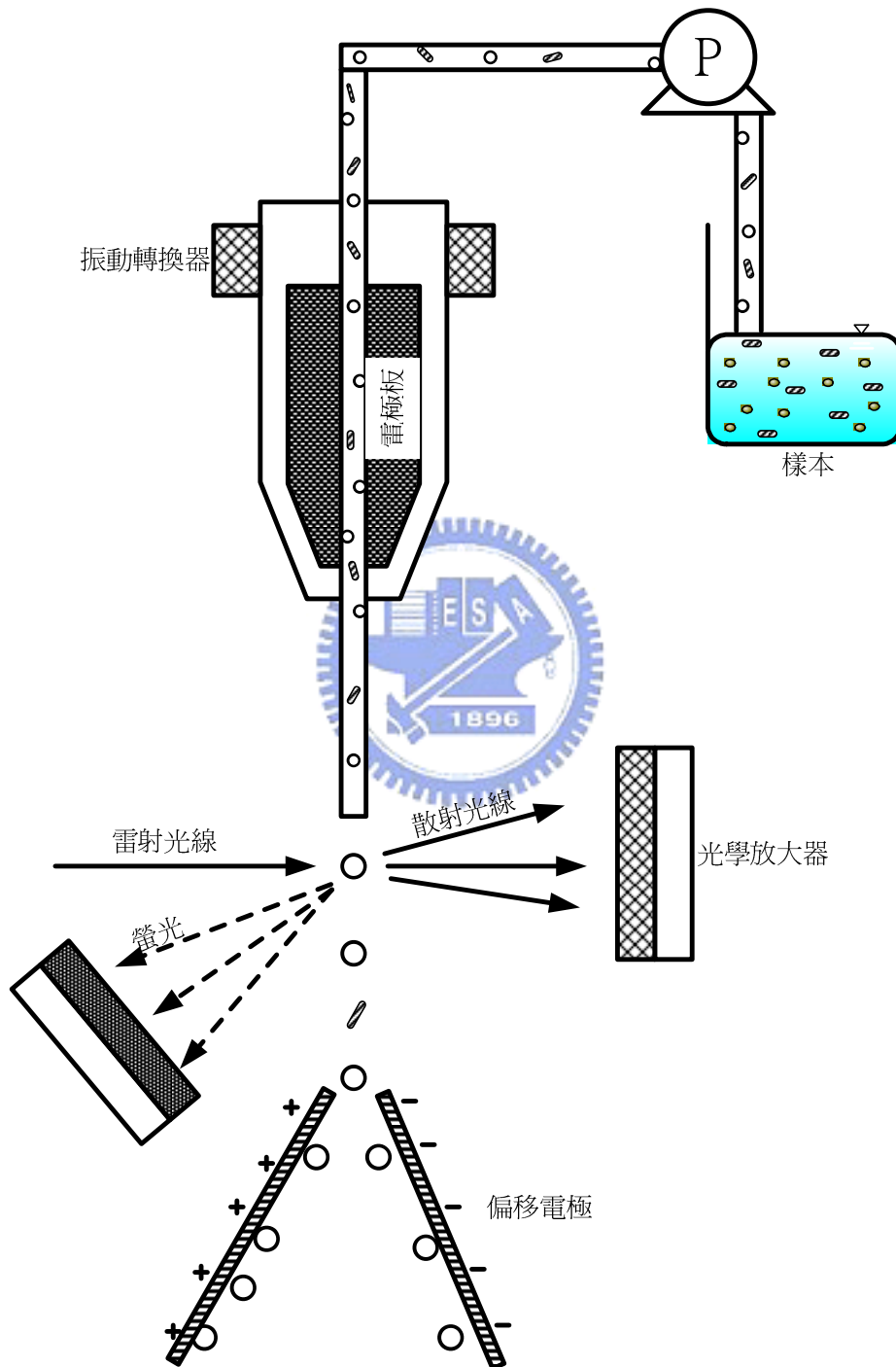


圖 2.6 流式細胞儀之偵測流程圖

#### 4. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) / PI (propidium iodide)

DAPI 是針對細胞 DNA 進行染色，選用螢光顯微鏡之 UV 濾鏡 ( $\lambda = 350$  nm excitation,  $\lambda = 450$  nm emission) 進行觀察，呈天藍色。PI 是利用細胞膜之通透性，染劑滲入細胞質染色，PI ( $\lambda = 500$  nm excitation,  $\lambda = 630$  nm emission) 會呈紅色。因此，DAPI/PI 之染色特徵，如表 2.1 所示<sup>(黃氏, 1999)</sup>。綜合 DAPI/PI 所染色結果，隱孢子蟲孢囊之存活關係，如表 2.2 所示<sup>(USEPA, 2001a; 2001b)</sup>。當 DAPI/PI 皆屬負反應時，孢囊需要進一步以相位差顯微鏡進行存活狀況判定，而其餘的染色狀況皆判定為所檢測之孢子已經死亡。

表 2.1 DAPI/PI 染色特徵

染劑	染色特徵狀況
DAPI	1. 僅孢囊的細胞核呈天藍色。 2. 孢囊內部沒被染色，僅有孢囊壁外側呈現藍圈狀染色。 3. 除細胞核呈現天藍色外，部份細胞質也被染色。 4. 細胞質被染成藍色。
PI	1. 孢囊內部沒被染色，外部細胞壁也沒被染色。 2. 細胞核被染成紅色。 3. 內部細胞質被染成紅色。

DAPI：狀況(1)(3)(4)，DAPI 呈正反應。狀況(2)，DAPI 呈負反應。

PI：狀況(1)，PI 呈正反應。狀況(2)(3)，PI 呈負反應。

表 2.2 隱孢子蟲孢囊之存活關係

染劑		孢囊存活性判定
DAPI	PI	
+	+	死亡
+ <sup>a</sup>	-	死亡
+	-	存活
-	- <sup>b</sup>	以顯微鏡 <sup>c</sup> 做進一步觀察

a：不僅細胞核染色，細胞質也被染色。

b：DAPI-/PI- 狀態有轉換成 DAPI+/PI- 的可能。

c：相位差顯微鏡(differential interference contrast, DIC)

## 5. 聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

原理是將欲放大的 DNA 片段兩端分別設計一個前置引子 (Forward primer) 和反置引子 (Reverse primer)，然後將溫度提高使得雙股的目標 DNA 變性成單股，將 rRNA 之引子與已經變性的單股目標 DNA 配對結合後，利用 DNA 聚合酵素 (DNA polymerase) 以目標 DNA 的兩股分別做為模板來合成新的 DNA 股，如此週期循環，即可以  $2^n$  的速率增加 DNA 產物，如圖 2.7 所示。

在隱孢子蟲檢測應用上，PCR 主要優點在於花費時間少、可辨識物種、高靈敏度和再現性，甚至 Real-Time PCR 具有定量功能 (Johnson *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 1998; Sturbaum *et al.*, 2002; Quintero-Betancourt *et al.*, 2003)；反觀，腐植酸會成為 PCR 抑制物影響 PCR 放大效果，應盡可能避免 (Morgan *et al.*, 1998)。然而，欲得到 PCR 最佳操作條件之結果和效率，孢囊的濃縮和純化為相當重要的程序。

由以上各種檢測方法顯示，任何一種方法都具有其優點缺點，如表 2.4 所示。因此，需要針對研究目標來選擇適當檢測方法和工具是相當重要的。

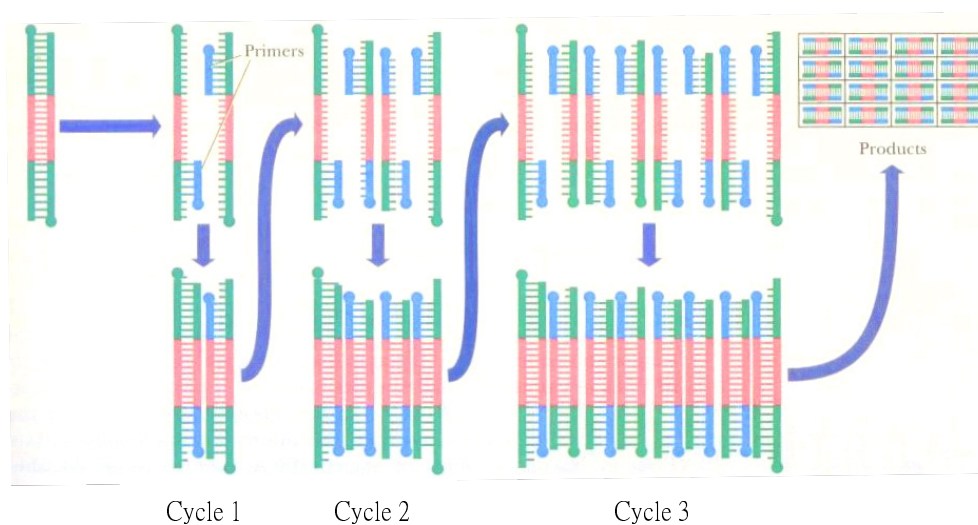


圖 2.7 PCR 原理之流程圖

表 2.3 各檢測方法之特點比較

方法	特點
免疫螢光抗體法	專一性高 會產生誤判、耗時，無法判定死活和感染性
血球計數盤	偵測快速、計數方便 不具專一性
流式細胞儀	偵測快速、靈敏度高、再現性良好、 顆粒若非球狀易造判斷誤差
DAPI / PI	主要作為判定孢囊存活性功能 會受環境影響
聚合酶連鎖反應	偵測快速、可辨識物種、高靈敏度和再現性 無法判定死活

## 2.6 濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率之影響

在 Method 1623 方法中，建議操作條件為控制在低濁度狀況下進行，以維持方法之準確性和再現性。然而，顆粒在水中所形成濁度問題對方法中各程序的影響原因在顆粒大小和顆粒數目。在過濾濃縮程序中，當水樣中含有過多顆粒數目或含有較大顆粒時，會不易將過濾器流洗乾淨，造成孢囊在過濾器上殘存留現象。在免疫磁性分離程序中，過多顆粒數目會對孢囊造成阻礙減損磁珠捕捉孢囊能力。顯微鏡檢驗會因為顆粒出現遮蔽現象，造成觀察上誤判之情形發生。水中顆粒方法之對每一階段程序包括過濾、免疫磁性分離法和顯微鏡檢驗都會造成影響來對於孢囊檢測回收率有所變動，因而影響隱孢子蟲孢囊之檢測回收率變異性較大。Francy *et al.* (2004) 利用 Method 1623 進行河水中隱孢子蟲孢囊調查，發現當濁度高於 100 NTU 時，孢囊檢測回收率與濁度呈現負相關且平均回收率小於 20%。

雖然濁度對孢囊檢測回收率會造成干擾，但適當的濁度亦可以促進孢囊檢測回收率。因為孢囊可能會附著在顆粒上，更容易被濃縮收

集和增加孢囊與磁珠接觸機會。Feng *et al.* (2003) 評估濁度對於 *C. parvum* 孢囊檢測回收率影響，結果發現清水 (濁度為 5 NTU) 檢測回收率為 82%，其他包括過濾後之清水 (濁度為 0.3 NTU)、自來水 (濁度為 0.2 NTU) 和自行添加顆粒之自來水 (濁度為 4.5 NTU)，檢測回收率分別為 16%、15% 和 70%。作者也針對蓄水池中濁度對於孢囊檢測回收率之影響，當濁度 1.8~5 NTU 時，檢測回收率隨濁度增加而上升；當 5~40 NTU 時，檢測回收率則隨濁度增加而下降。Hu *et al.* (2004) 和 Feng *et al.* (2003) 研究結果極為相似，研究中以自行添加顆粒大小為 5~40  $\mu\text{m}$  的矽顆粒於自來水中，濁度範圍皆為 2.5~20 NTU，結果都發現當濁度為 10 NTU，檢測回收率最高，分別為 86% 和 90%。當 2.5~10 NTU，兩者檢測回收率趨勢皆隨濁度增加而上升；10~20 NTU，兩者檢測回收率趨勢皆隨濁度增加而下降。濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響之文獻整理要點如表 2.4 所示。





表 2.4 濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響之文獻整理要點

作者	年份	濁度 (NTU)	原水來源	孢囊檢測回收率 (%)	備註
Campbell <i>et al.</i>	(1997)	40~600		4.8~147	
Bukhari <i>et al.</i>	(1998)	50~5000	河水	66~80	比較不同 IMS 試劑。
Rochelle <i>et al.</i>	(1999)	210~11480		62~100	濁度與檢測回收率並無顯著相關。
Hsu <i>et al.</i>	(2000)	1.2~32	自來水場處理水	9~17	以 Percoll-Sucrose 進行分離程序。
Hsu <i>et al.</i>	(2001)	2500~20000		74~80	以控制孢囊體積與總雜質顆粒體積來表示濁度狀況。
McCuin <i>et al.</i>	(2001)	50~5000	河水	65~77	500~5000 NTU 之回收率且統計上無顯著差異。
DiGiorgio <i>et al.</i>	(2002)	11~99	蓄水池、湖水、 河水	36~51	比較不同收集過濾器之效率。
Kuhn <i>et al.</i>	(2002)	3.9~159	自來水、河水	0.4~74	比較不同收集過濾器之效率。
Feng <i>et al.</i>	(2003)	1.8~40	蓄水池水體	25~85	當濁度 5 NTU 回收率最高 (85%)。濁度小於 5 NTU 時，回收率隨濁度增加而增加；當大於 5 NTU 後，回收率隨濁度增加逐漸下降。
		2.5~20	自行配製含砂顆 粒水樣	37~90	顆粒大小為 5~40 $\mu\text{m}$ 。 當濁度為 10 NTU 檢測回收率最高 (90%)。 濁度小於 10 NTU 時，回收率隨濁度增加而增加；當大於 10 NTU 後，回收率逐漸下降且具有統計意義。
Hu <i>et al.</i>	(2004)	2.5~20	自行配製含砂顆 粒水樣	35~86	顆粒大小為 5~40 $\mu\text{m}$ 。 當濁度為 10 NTU 檢測回收率最高 (86%)。 濁度小於 10 NTU，回收率隨濁度增加而增加；當大於 10 NTU 後，回收率逐漸下降且具有統計意義。
Francy <i>et al.</i>	(2004)	<10~100	河水	2.9~56	

### 第三章 實驗材料、設備及方法

#### 3.1 藥品

1. **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**：廠牌為 Panreac，英文品名為 di-Sodium Hydrogen Phosphate，試藥級，分子量為 141.96 g/mole。
2. **NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**：廠牌為 Riedel-de Haen，英文品名為 Sodium phosphate monobasic puriss，分析級，分子量為 119.98 g/mole。
3. **NaNO<sub>3</sub>**：廠牌為 J.T.Baker，英文品名為 Sodium Nitrate, Crystal，分析級，分子量為 84.99 g/mole。
4. **NaHCO<sub>3</sub>**：廠牌為 Merck，英文品名為 Sodium hydrogen carbonate，分析級，分子量為 84.01g/mole。
5. **NaCl**：廠牌為 J.T.Baker，英文品名為 Sodium Chloride, Crystal，分析級，分子量為 58.44 g/mole。
6. **Kaolin**：廠牌為 Sigma，英文品名為 Kaolin (Hydrated Aluminum Silicate)，試藥級，顆粒粒徑為 0.1-4 μm。
7. **HCl**：廠牌為久島藥品株式會社，英文品名為 Hydrochloric acid，試藥級，分子量為 36.46 g/mole。

8. **NaOH**：廠牌為 Panreac，英文品名為 Sodium Hydroxide，試藥級，分子量為 40.0 g/mole。
9. **隱孢子蟲孢囊標準品**：廠牌為 Waterbrone Inc.，*Cryptosporidium parvum* oocysts，從受到感染小牛糞便中分離純化後保存在 5% 福馬林中，濃度為  $10^7$  oocysts/ 8 ml，需保存在 4°C 環境中。
10. **免疫磁珠套裝試劑**：廠牌為 Dynal，產品名稱為 Dynabeads® GC-Combo kit，產品編號 730.02，需保存在 2~8°C 環境中。套裝試劑包括 (1) Dynabeads anti-*Cryptosporidium* (2) Dynabeads anti-*Cryptosporidium* (3) 10X SL™-Buffer A (4) 10X SL™-Buffer B。
11. **免疫螢光套裝染劑**：廠牌為 Waterbrone Inc.，產品名稱為 Aqual-Glo™ G/C direct comprehensive kit，產品編號 No. A100FLK，需保存在 4°C 環境中。套裝染劑包括 (1) Working dilution reagent (2) 正控制組 (3) 20X Wash buffer (4) counterstain (5) Mounting medium (6) Slides。
12. **透明指甲油**：為一般市面販售之透明指甲油。

### 3.2 材料

1. **磷酸緩衝溶液 (Phosphate buffered saline, PBS)**：溶解 0.27 g 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.1 g 的  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  和 2.2 g 的  $\text{NaCl}$ ，以去離子水 (DI water) 稀釋至 250 ml，調整 pH 為 7.2，保存於 4°C 冰箱中。
2. **0.5 M  $\text{NaHCO}_3$  溶液**：溶解 4.2 g 的  $\text{NaHCO}_3$ ，以去離子水稀釋至 100 ml，製備 0.5 M  $\text{NaHCO}_3$  溶液。
3. **0.5 M  $\text{NaNO}_3$  溶液**：溶解 4.2 g 的  $\text{NaNO}_3$ ，以去離子水稀釋至 100 ml，製備 0.5 M  $\text{NaNO}_3$  溶液。
4. **0.1M  $\text{NaCl}$  溶液**：溶解 2.9 g 的  $\text{NaCl}$ ，以去離子水稀釋至 500 ml，製備 0.1 M  $\text{NaCl}$ 。
5. **0.1M  $\text{CaCl}_2$  溶液**：溶解 5.5 g 的  $\text{CaCl}_2$ ，以去離子水稀釋至 500 ml，製備 0.1 M  $\text{CaCl}_2$ 。
6. **人工濁水儲備溶液**：以 Sigma 公司產品之高嶺土顆粒製備，將 2.5 g 高嶺土顆粒稀釋至 5 L，再分別添加  $5 \times 10^{-4}$  M  $\text{NaHCO}_3$  和  $\text{NaNO}_3$  來維持溶液中鹼度和導電度，pH 為 7.5，經 200 rpm 1hr 攪拌後，靜置 10 hr，取上澄液 500 ml 作為人工濁水儲備溶液。

7. **隱孢子蟲孢囊儲備溶液 (Oocysts stock solution):**孢囊之標準品以 0.1% PBS 溶液稀釋至特定體積，以符合所需特定濃度之孢囊儲備溶液。
  
8. **酸/鹼液:**分別以試藥級之 HCl 和 NaOH，分別製備 1 N、0.1 N 之 HCl 和 NaOH。





### 3.3 設備

#### 1. pH/Ion meter

WTW 公司製造，型號 InoLab pH/ION Level 2，可量測 pH 和離子濃度，實驗前必須以 pH 校正液 pH4、pH7 進行校正，才可進行實驗測定。

#### 2. 濁度計

Hach 公司製造，型號 2100P，可量測濁度範圍為 0~1000 NTU。用來分析人工配製濁水之濁度值。

#### 3. 懸臂式濾管振盪器

Pall 公司製造，型號 4821，可振盪速度為 100~700 osc/min，主要適用於 Enviocheck sampling capsule 流洗隱孢子蟲孢囊。同時可夾帶 8 枝 Enviocheck sampling capsule 進行實驗。本實驗用來均勻混合含隱孢子蟲孢囊之人工濁水，以模擬實際 Enviocheck sampling capsule 流洗後之水樣狀態。

#### 4. 磁性抗體分離設備

Dishung 公司製造，型號 SD-50，轉速範圍為 0~60 rpm，時間可控制 0~60 min。主要功能為放置平板試管 (flat-sided tube)，進行免疫抗體磁珠與水樣中隱孢子蟲孢囊結合反應。

#### 5. 磁座

Dynal 公司製造，型號 MPC®-1 和 MPC®-M，分別固定平板試管 (Dynal® L10) 和 1.5 ml 尖底試管，以進行磁性分離步驟。

## 6. 振盪器

Lab extreme, Inc 製造，型號 Thermollyne Type 16700 Maxi Mix Mixer，使溶液均勻之功能。

## 7. 離心機

BOECO 製造，型號 U-320R，離心強度 (RCF)最大可控制至 2700，可控制操作溫度條件-20°C~40°C，主要作為固液分離之功能。

## 8. 烘箱

Binder 公司製造，型號 VD 23，溫度可控制在 5~200°C。主要作為乾燥去除水分之功能。

## 9. 雷射繞射粒徑分布分析儀

Malvern 公司製造，型號 Mastersizer 2000 之雷射繞射粒徑分布分析儀，主要功能為測量水中之顆粒粒徑分布。原理為利用氬氣紅光雷射配合藍光雷射穿過一組反傅立葉鏡頭，再透過水中顆粒，經過多角度測量器測出粒徑分布範圍，可偵測顆粒粒徑範圍為 0.02~2000  $\mu\text{m}$ 。

## 10. 高濃度奈米、界面電位、分子量量測儀

Malvern 公司製造，型號 Zetasizer Nano ZS 之界達電位和分子量量測儀。主要功能為量測水中顆粒之界達電位和粒徑分布情形，可偵測顆粒粒徑範圍為 0.6~6000 nm，界面電位為結合雷射都卜勒法解決低介電常數粒子的量測困擾，並能夠對水分散和非水分散體系中的 zeta 電位進行精確的測量。

## 11. 螢光顯微鏡

Nikon 公司製造，型號 E400，顯微鏡本身含有 10×之目鏡，搭配 20×、40×和 100×物鏡，外接高壓汞燈源作為能量提供者以便進行能量激發，波長控制為 450~490 nm，會發出藍光。

## 12. 數位相機

Nikon 公司製造，型號 Coolpix 990，334 萬像素。主要功能將螢光顯微鏡下視野所觀察之結果作照相紀錄。



### 3.4 實驗架構與方法

#### 3.4.1 實驗架構

本研究以免疫磁性分離法進行隱孢子蟲孢囊檢測回收率，第一階段以純水決定 0.1N HCl 混合之最佳操作條件；第二階段以人工濁水探討濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響，再藉由改變濃縮程序之操作條件、磁珠劑量和原水稀釋來改善濁度水樣之孢囊檢測回收率。研究架構圖如圖 3.1 所示。

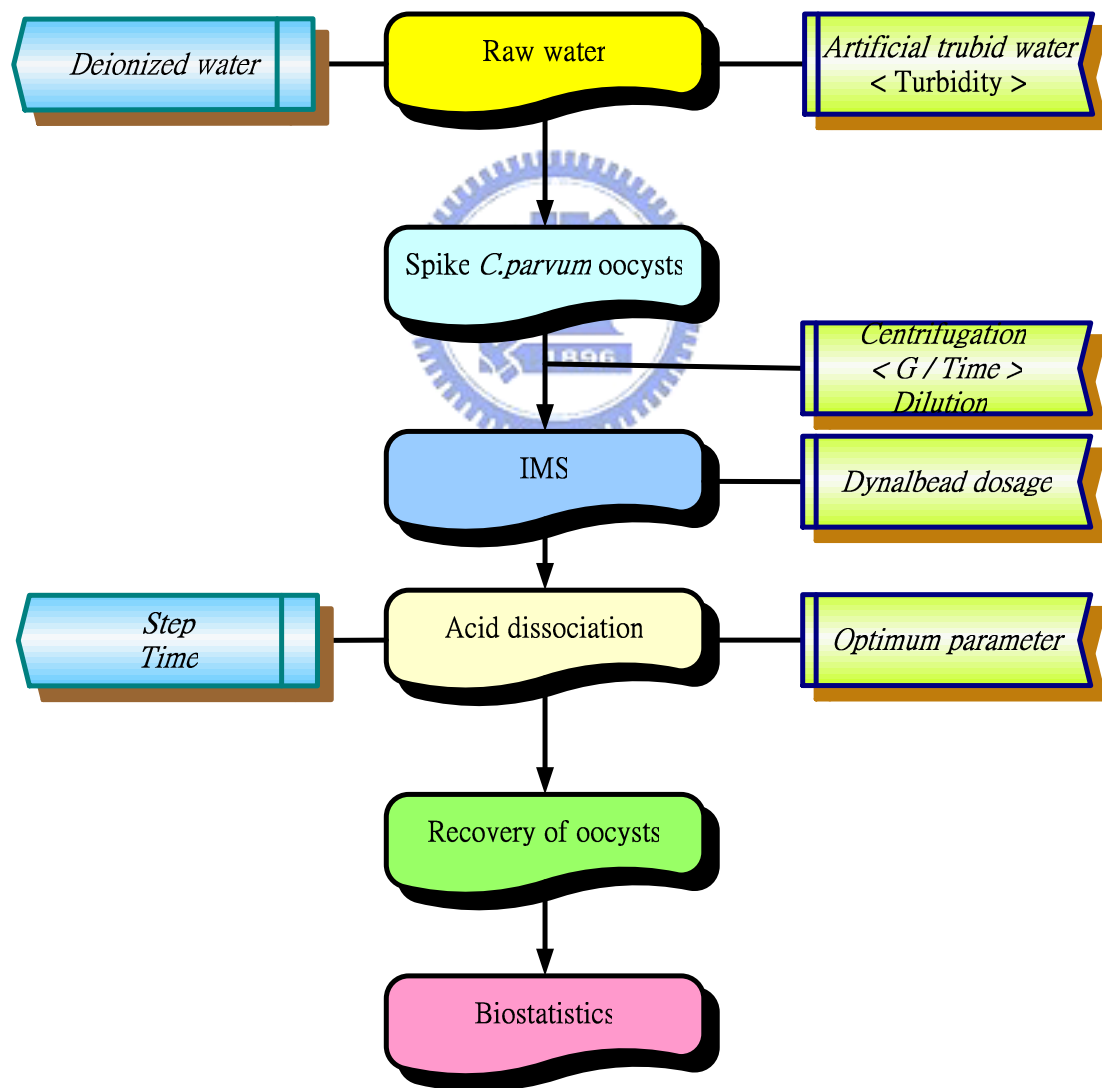


圖 3.1 研究架構圖

### 3.4.2 實驗方法

本實驗以自行添加隱孢子蟲孢囊方式以免疫磁性分離法進行孢囊檢測回收率評估，實驗主題分為鍵結分離試驗和人工濁水試驗，實驗方法描述如下。

#### 1. 自行添加隱孢子蟲孢囊數目控制

目的在確定每次實驗水樣中所添加之孢囊數目，每批次實驗需要將孢囊儲備溶液直接進行免疫螢光染色，染色程序主要參照 Waterbrone 公司之螢光染劑之操作步驟。實驗進行前，需要先將產品所含 SuperStick™ 玻片取出且使玻片恢復至室溫狀態。再將隱孢子蟲孢囊儲備溶液自 4 °C 冰箱中取出，以振盪器振盪 2 分鐘後加以輕微搖晃，使孢囊在溶液中均勻分布。

從孢囊儲備溶液中取出 30  $\mu$ l 滴至 SuperStick™ 玻片上，放置烘箱以 45 °C 風乾。添加 1 滴 Aqua-Glo G/C antibody reagent 至玻片上，利用拋棄式滴管撥勻，將玻片放置塑膠盒中且放置烘箱中在 37 °C 下靜置 30 分鐘。靜置完畢後，將玻片取出且傾斜玻片，以 200  $\mu$ l 之 1 $\times$  Wash buffer，反覆沖洗玻片五次，最終以清潔的紙巾或無菌吸管將多餘試劑吸去，注意不要碰觸到樣本且不得使玻片乾燥。清洗完畢後，添加 1 滴 counterstain 且靜置 1 分鐘，再以相同清洗程序，以 200  $\mu$ l 之 1 $\times$  Wash buffer 反覆沖洗玻片 3 次，最終以清潔的紙巾或無菌吸管將多餘試劑吸去。最終將玻片放入烘箱以 45 °C 下風乾。將玻片取出放至平面上，添加 1 滴 Mounting Medium 後蓋上玻片，用清潔紙巾吸去玻片周圍多餘固定液，即可以透明指甲油塗抹於玻片周圍，完成封片。



利用螢光顯微鏡進行觀察計數，觀察前需要先打開汞燈源且暖機 15 分鐘，將樣本玻片放至觀察平台，並將調整波長為  $\lambda = 450\sim 490\text{ nm}$  之範圍，同時螢光顯微鏡物鏡為  $20\times$  狀態之下進行觀察。以粗調節輪調整平台高度來控制對焦，進行觀察及計數器方式計數，其計數路線如圖 3.2 所示。

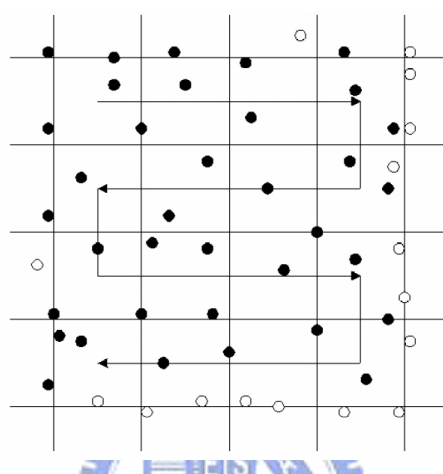


圖 3.2 顯微鏡視野下進行計數之觀察路線圖 (USEPA, 2001)

## 2. 鍵結分離試驗

為了掌握免疫磁性分離法對於隱孢子蟲孢囊檢測效率，本試驗中磁性分離程序中之控制條件如反應時間和轉速皆參照 Method 1623。本實驗主要針對  $0.1\text{N HCl}$  破壞孢囊與磁珠之間鍵結，使孢囊與磁珠分離，因此進一步以  $0.1\text{N HCl}$  混合次數和  $0.1\text{N HCl}$  混合時間來進行進行孢囊檢測回收率評估。實驗流程如圖 3.4 所示。

首先在  $1.5\text{ ml}$  離心管中添加  $100\ \mu\text{l}$   $10\times\text{ SL-buffer A}$ 、 $100\ \mu\text{l}$   $10\times\text{ SL-buffer B}$ 、 $720\ \mu\text{l}$  無菌水和  $30\ \mu\text{l}$  之孢囊儲備溶液，並添加  $50\ \mu\text{l}$  Dynabeads® anti-*Cryptosporidium* (磁珠)使溶液總體積為  $1000\ \mu\text{l}$ 。在添加磁珠前需以振盪器振盪 30 秒，以避免磁珠沉澱。將  $1.5\text{ ml}$  離心

管固定於磁性抗體分離器上，以轉速為 18 rpm 混合 1 小時。混合完畢後，將離心管放置在 MPC-M 磁座上且貼近磁座固定，以每秒一次之轉速緩和搖晃旋轉 180 度且維持 1 分鐘（管壁會出現褐色條斑）。接著在離心管與磁座不分開狀態下，將試管內液體傾倒去除且避免擾動管壁上之磁珠。離心管自磁座上取下後，加入 50  $\mu\text{l}$  之 0.1N HCl 且以振盪器振盪。在 0.1N HCl 混合時間試驗中，其振盪混合時間分別為 30（標準方法建議值）、60、120、180 和 240 秒，混合 1 次；0.1N HCl 混合次數試驗中，其振盪混合時間為 30 秒，反覆混合 5 次。每次混合後需靜置於 MPC-M 磁座上 10 分鐘。最終需添加 5  $\mu\text{l}$  之 1N NaOH 至 SuperStick™ 玻片上，再將離心管不離開磁座的狀態下將全量含孢囊之 HCl 溶液轉移滴至 SuperStick™ 玻片上。隨後進行免疫螢光染色程序及螢光顯微鏡檢驗，最終計算檢測回收率和生物統計分析。



### 3. 人工濁水試驗

主要在探討水樣濁度對孢囊檢測影響，因此以人工濁水進行試驗來評估濁度對孢囊檢測回收率影響並嘗試以濃縮程序、磁珠添加劑量和原水稀釋來改善濁度水樣之孢囊檢測回收率，實驗流程和操作流程如圖 3.3 和圖 3.4 所示。

試驗進行時，利用高嶺土顆粒配製不同濁度之人工濁水，濁度分別為 0.5、1、10、20、30、40、50 和 100 NTU 之 50 ml 水樣進行實驗，另外無添加高嶺土顆粒水樣作為空白組，表示沒有受到濁度干擾。添加孢囊至樣本中，以懸臂式濾管振盪器 600 osc/min 混合 25 分鐘，混合後以離心力 1500 $\times$ G，時間為 15 min 進行離心，此時需要判斷固體物體積（磁性顆粒可負荷固體顆粒體積為 0.5 ml）。判斷完畢

後，利用無菌吸管將上澄液去除至固體物表面且避免擾動固體物。判斷方式如下：

**若固體物體積小於或等於 0.5 ml：**直接振盪混合後移至平板試管，可用 PBS 溶液洗滌離心瓶（避免孢囊殘存），再以無菌水定量至 5 ml。

**若固體物體積大於 0.5 ml：**以固體物體積計算來決定應分裝出次樣本數目 (subsamples)，以符合每樣本固體固物體積小於 0.5 ml。公式如：

$$\frac{\text{固體物體積}(ml)}{0.5(ml)} \times 5(ml) = \text{總體積}(ml)$$

◆ 以固體物體積為 1.2 ml 為例：

總體積

$$\frac{1.2(ml)}{0.5(ml)} \times 5(ml) = 12(ml)$$

樣本數

$$\frac{12(ml)}{5(ml)} = 2.4 \quad , \text{則需要 3 個次樣本}$$

每樣本所裝體積

$$\frac{12(ml)}{3(\text{subsamples})} = 4ml / \text{subsample}$$

◆ 表示將分別吸取 4 ml 至 3 支平板試管，以無菌水定量至 5 ml。

再分別添加 500  $\mu$ l 10 $\times$  SL-buffer A、500  $\mu$ l 10 $\times$  SL-buffer B 和 50  $\mu$ l 之 Dynabeads® (磁珠)至平板試管中，並以無菌水定量至 5 ml。在添加磁珠前需以振盪器振盪 30 秒，以避免磁珠沉澱。將平板試管固定於磁性抗體分離器上，以轉速為 18 rpm 混合 1 小時。混合完畢後，將平板試管放置在 MPC-1 磁座上且平板面貼近磁座固定，以每秒一次之轉速緩和搖晃旋轉 90 度且維持 2 分鐘，接著在平板試管與磁座不分開狀態下，將試管內液體傾倒去除。試管從磁座上取下後，添加 1 ml 之 1 $\times$  SL-buffer A 於平板試管中，輕微搖晃混合後，全量轉移至 1.5 ml 之離心管中。隨後把離心管放置在 MPC-M 磁座上且貼近磁座固定，離心管被放置在 MPC-M 磁座上且貼近磁座固定，以每秒一次之轉速緩和搖晃旋轉 180 度且維持 1 分鐘 (管壁會出現褐色條斑)。接著在離心管與磁座不分開狀態下，將試管內液體傾倒去除且避免擾動管壁上之磁珠。離心管自磁座上取下後，加入 50  $\mu$ l 之 0.1N HCl 且以振盪器振盪 30 秒，反覆混合 5 次。每次混合後需靜置於 MPC-M 磁座上 10 分鐘。最終需添加 5  $\mu$ l 之 1N NaOH 至 SuperStick™ 玻片上，再將離心管不離開磁座的狀態下將全量含孢囊之 HCl 溶液轉移滴至 SuperStick™ 玻片上。隨後進行免疫螢光染色程序並利用螢光顯微鏡檢驗，最終計算檢測回收率和生物統計分析。

#### 4. 檢測回收率計算

檢測回收率計算為添加至樣本中之孢囊數目作為分母，其數目以儲備溶液直接進行螢光抗體染色及螢光顯微鏡下觀察和計數，利用計數器計算之累積得到總孢囊數目為主。分子則為樣本進行免疫磁性分離程序後，再經螢光抗體染色，最終在螢光顯微鏡下進行觀察和計數，利用計數器計算之累積得到總孢囊數。將樣本中檢測到孢囊數目

(N)與添加至樣本中孢囊數目 (T)相除，乘上 100，即可得到隱孢子蟲孢囊之檢測回收率 (R)，計算公式如下：

$$R(\%) = \frac{N}{T} \times 100$$

R=檢測回收率

N=樣本中檢測到孢囊數目

T=添加至樣本中孢囊數目

## 5. 統計分析

針對本研究中各參數對檢測回收率影響之統計意義，利用生物統計中 t 檢定 (t-test, unpaired) 和簡單直線回歸分析 (Regression analysis)，來檢定參數間是否達到顯著差異達到統計學上意義及相關性。本研究所使用之生物統計分析以 Sigma plot 軟體所內建之統計功能。



鍵結分離試驗	人工濁水試驗
1. 去離子水。 2. 添加隱孢子蟲孢囊。 3. 添加 100 $\mu$ l 10 $\times$ SL-buffer A、100 $\mu$ l 10 $\times$ SL-buffer B 和 50 $\mu$ l 磁珠，以 720 $\mu$ l 無菌水，總體積為 1 ml。	1. 高嶺土顆粒水樣-濁度為 0.5、1、10、20、30、40、50 和 100 NTU，水樣體積 50 ml。 2. 添加隱孢子蟲孢囊。 ◆ <b>水樣稀釋</b> -水樣混合後取出 25 ml，以純水稀釋至 50 ml。 ◆ <b>濃縮程序試驗之不同離心力 (G 值)</b> -G 值為 1500、2000、2500 和 2700，離心時間 15 分鐘。 ◆ <b>濃縮程序試驗之不同離心時間</b> -G 值為 1500，離心時間為 15、30 和 60 分鐘。 3. 添加 0.5 ml 100 $\mu$ l 10 $\times$ SL-buffer A、0.5 ml 100 $\mu$ l 10 $\times$ SL-buffer B 和 50 $\mu$ l 磁珠，以無菌水定量至 5 ml。 ◆ <b>磁珠劑量試驗</b> ，磁珠劑量為 50、100 和 150 $\mu$ l 至平板試管中。

固定試管以轉速 18 rpm 混合 1 小時

鍵結分離試驗	人工濁水試驗
1. 轉移已結合孢囊之磁珠至 1.5 ml 離心管且放於磁座(MPC-M)上混合 2 分鐘，再傾倒去除懸浮液。 2. 添加 0.1N HCl，以振盪器振盪。 ◆ 混合時間試驗-0.1N HCl 與磁珠混合時間為 30、60、120、180 和 240 秒，混合 1 次。 ◆ 混合次數試驗-0.1N HCl 與磁珠混合 30 秒，混合 5 次。	1. 放置平板試管於磁座(MPC-1)上混合 2 分鐘，再傾倒去除懸浮液。 2. 磁珠轉移至 1.5 ml 離心管且放於磁座(MPC-M)上混合 1 分鐘，再傾倒去除懸浮液。 3. 添加 0.1N HCl，以振盪器振盪混合 30 秒，混合 3 次。

靜置於磁座(MPC-M)10 分鐘

添加 1 N NaOH 於 SuperStick™ 玻片上

全量轉移已破壞後之孢囊溶液至 SuperStick™ 玻片上

進行螢光抗體染色

螢光顯微鏡觀察及計數

圖 3.3 本研究之操作流程圖

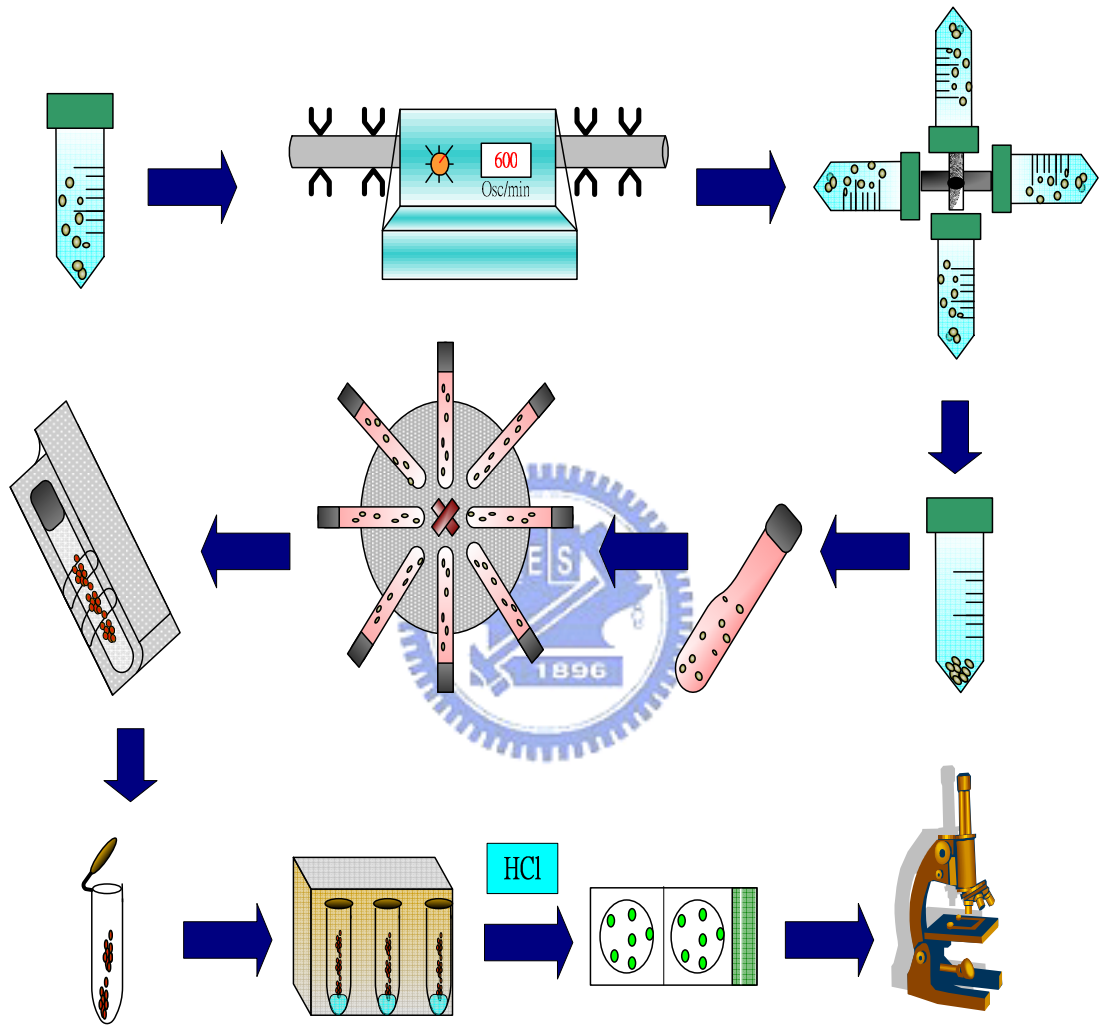


圖 3.4 本研究之實驗流程圖

## 第四章 結果與討論

### 4.1 水樣性質

本研究以實驗室規模進行實驗，研究中水樣依試驗可區分為：第一階段，鍵結分離試驗，為了掌握免疫磁性分離法之基本操作狀況，而需避免包括雜質顆粒、pH 或離子強度等水質狀況干擾。因此，本階段實驗中使用 Millipore 公司之造水設備所供應的去離子水作為純水來源以維持水質條件狀況。第二階段，人工濁水試驗，本階段主要探討濁度對於以磁性分離法檢測隱孢子蟲孢囊之檢測回收率影響，濁度來源是利用高嶺土顆粒製備人工濁水且製備方法參照 Wang *et al.* (2001)，高嶺土顆粒組成成分為 Hydrated Aluminum Silicate，以模擬天然原水之顆粒組成成分包括矽、氧化鋁。本研究中人工濁水基本水質特性如表 4.1 及顆粒粒徑分布如圖 4.1 所示。

表 4.1 人工濁水水質特性

水質項目	人工原水
pH 值	7.58
濁度 (NTU)	250
顆粒粒徑 ( $\mu\text{m}$ )	0.1~10
界達電位 (mV)	-46.0
導電度 (mS/cm)	0.151

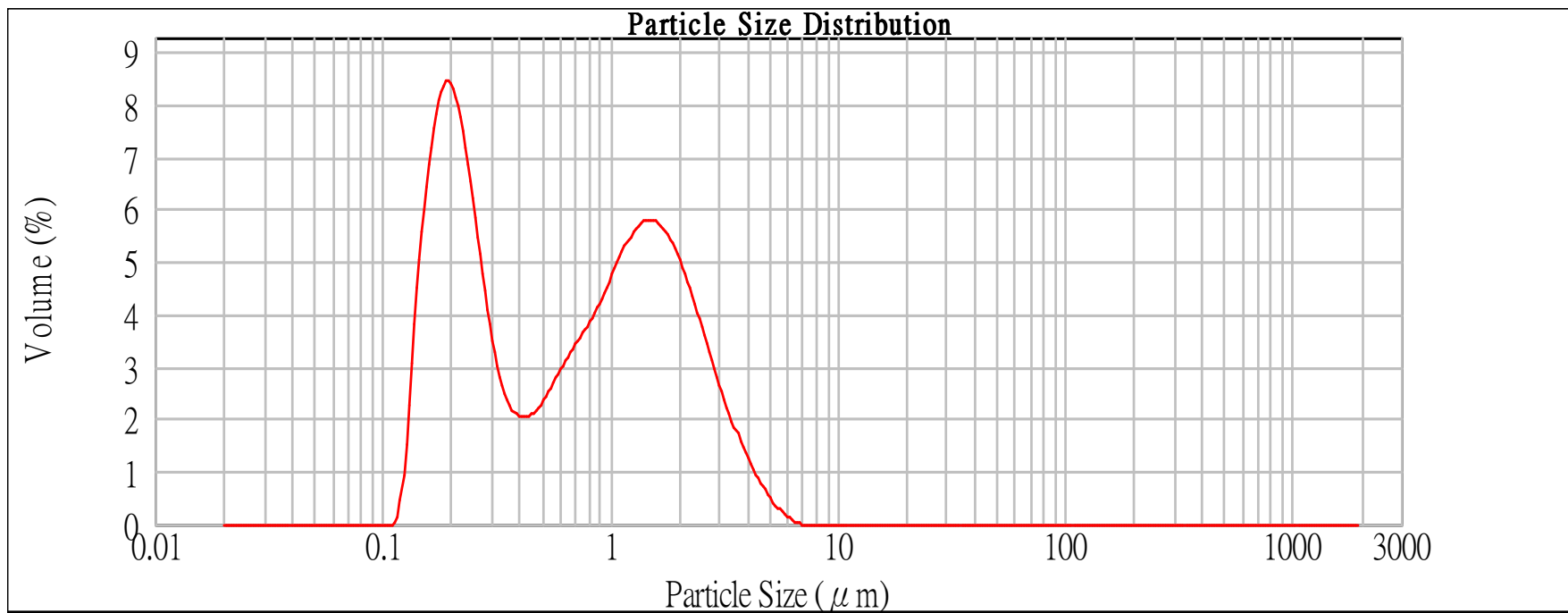


圖 4.1 高嶺土顆粒配製人工濁水之粒徑分布

## 4.2 自行添加隱孢子蟲孢囊

本研究中隱孢子蟲孢囊來源為 Waterborn 公司所製造之標準品，其濃度為  $10^7$  oocysts/ 8 ml。由於孢囊表面含有複合糖蛋白之基質組成特性且屬顆粒性物質，容易出現團聚現象，造成孢囊數目控制不易。為了能定量單位體積內所含孢囊數目，則以 0.1% PBS 溶液作為稀釋液，稀釋特定體積之隱孢子蟲孢囊標準品，經免疫螢光法染色和螢光顯微鏡觀察計數，來了解所稀釋倍數可得之孢囊數目，作為製備隱孢子蟲孢囊儲備溶液之濃度考量依據。

由圖 4.2 結果發現，當每毫升 0.1% PBS 稀釋液中所含標準品體積以對半稀釋倍數減少，所得孢囊數目也逐漸下降。其中所配製稀釋濃度分別為 20、10、5、2.5、1.25 和 0.625  $\mu$ l 孢囊標準品/ml，經螢光顯微鏡觀察計數得到每 10  $\mu$ l 染色體積所含孢囊數目分別為  $188\pm 47$ 、 $105\pm 28$ 、 $49\pm 15$ 、 $26\pm 17$ 、 $14\pm 5$  和  $14\pm 4$  oocysts/10  $\mu$ l，以 10 重複進行後，將數據做直線迴歸分析，得到孢囊數目和稀釋標準品濃度之間線性關係為  $Y=5.16+9.27X$ ， $r^2=0.9964$ ，此顯示標準品稀釋體積與孢囊數目呈線性關係。

根據上述實驗結果來自行製備隱孢子蟲孢囊儲備溶液，為了確切控制孢囊儲備液之單位體積所含孢囊數目，以有效控制添加至樣本中之孢囊數，實驗取 100  $\mu$ l 之孢囊標準品以 0.1% PBS 溶液稀釋至 5 ml，配製隱孢子蟲孢囊儲備溶液。

由圖 4.3 結果發現，隨儲備溶液體積增加，孢囊數目也有提升。其中分別從儲備溶液取出 1、5、10、30 和 50  $\mu$ l，經免疫螢光法染色和螢光顯微鏡觀察計數得到孢囊數目分別為  $5\pm 7$ 、 $44\pm 19$ 、 $119\pm 37$ 、 $234\pm 67$  和  $461\pm 148$  顆，以 5 重複（總樣本數  $N=25$ ）後，做直線迴歸分析，儲



備溶液體積與其所含孢囊數目之關係為  $Y=8.86X+2.42$ ， $r^2=0.9833$ 。  
 因此本研究實驗中配製 100  $\mu$ l STD/ 5 ml 0.1% PBS 作為孢囊儲備溶液，可將實驗之孢囊數目控制在 161~464 顆之間。

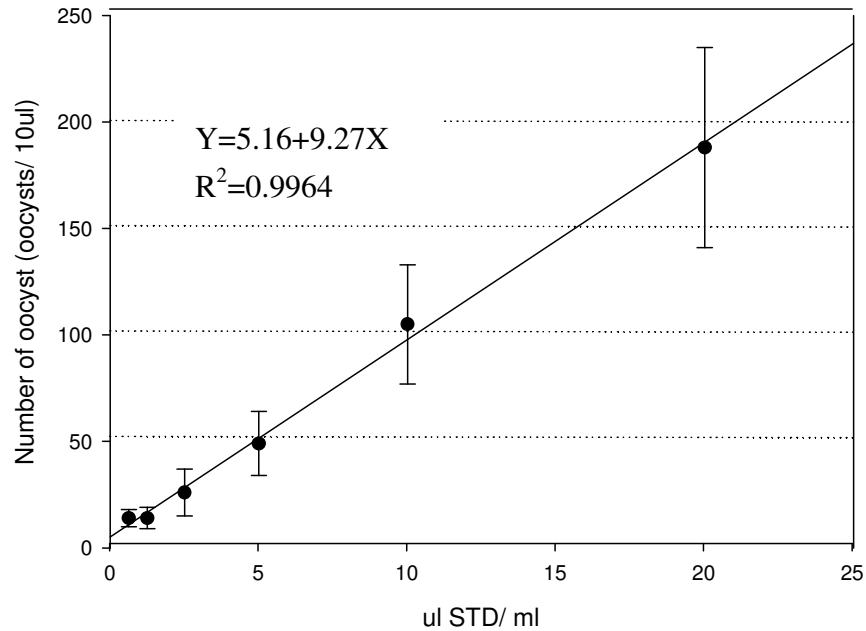


圖 4.2 隱孢子蟲孢囊標準品稀釋體積與孢囊數目之關係

\* STD 表示隱孢子蟲孢囊標準品( $10^7$  oocysts/ 8 ml)

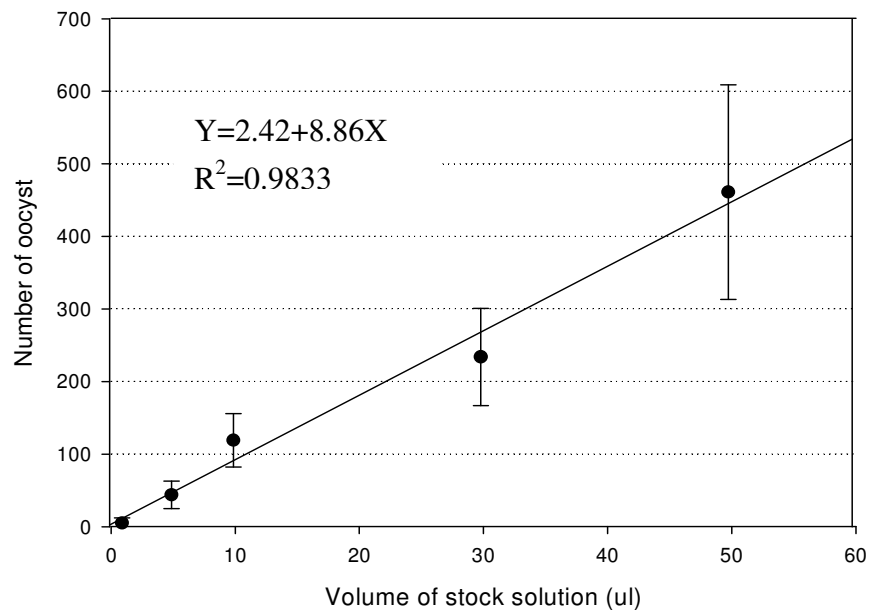


圖 4.3 隱孢子蟲孢囊儲備體積與所含孢囊數目之關係

### 4.3 鍵結試驗之最佳操作條件

#### 4.3.1. 0.1N HCl 混合時間對孢囊數目及檢測回收率影響

本研究中所採用磁珠是 Dynal 公司所生產的磁珠，Method 1623 中磁性分離程序所建議磁珠添加劑量為 100  $\mu$ l 磁珠，在總體積為 10 ml 之含孢囊及雜質溶液中，雜質顆粒體積與總溶液體積必須控制在 1/20 以內，分離後添加 0.1N HCl 混合，將孢囊進行螢光染色觀察<sup>(USEPA, 2001)</sup>。然而，本研究初步以純水進行磁珠捕捉孢囊能力評估，先前實驗已經分別以相等比例和過量比例之磁珠添加劑量，添加至總體積為 1 ml 之含自行添加孢囊純水中，在 1.5 ml 體積之離心管且無顆粒及其他基質干擾中進行，以確定在純水中有足夠磁珠劑量來捕捉孢囊。此部分實驗經多次染色及螢光顯微鏡觀察試驗，結果卻無法得到有效之孢囊檢測回收率，最高僅達 20%。

為此，我們進行了此項實驗，以探討在足夠磁珠劑量下，不同 0.1N HCl 與已結合孢囊磁珠之混合時間對孢囊數目及孢囊檢測回收率之關係。本實驗以純水在 1.5 ml 之離心管中進行，其中自行添加隱孢子蟲孢囊數目為  $161 \pm 47$  顆，經磁性分離後，0.1N HCl 與已結合孢囊磁珠混合時間為 30 (此為標準方法建議值)、60、120、180 和 240 秒，以五重複進行 (總樣本數  $N=21$ )。由圖 4.4 結果發現，隨 0.1N HCl 作用時間增加，可檢測到孢囊數目無明顯變化，孢囊數目分別平均為 76、74、73、69 和 63 顆，則孢囊平均檢測回收率為 39~47%。檢測回收率未隨時間增加而顯著變化，此結果顯示藉由延長 0.1N HCl 混合時間並無法有效提升隱孢子蟲孢囊之檢測回收率。但也證實僅需混合 30 秒，0.1N HCl 即可有效破壞孢囊與磁珠之間鍵結，換句話說，標準方法所建議之 0.1N HCl 混合所需時間是足夠的。

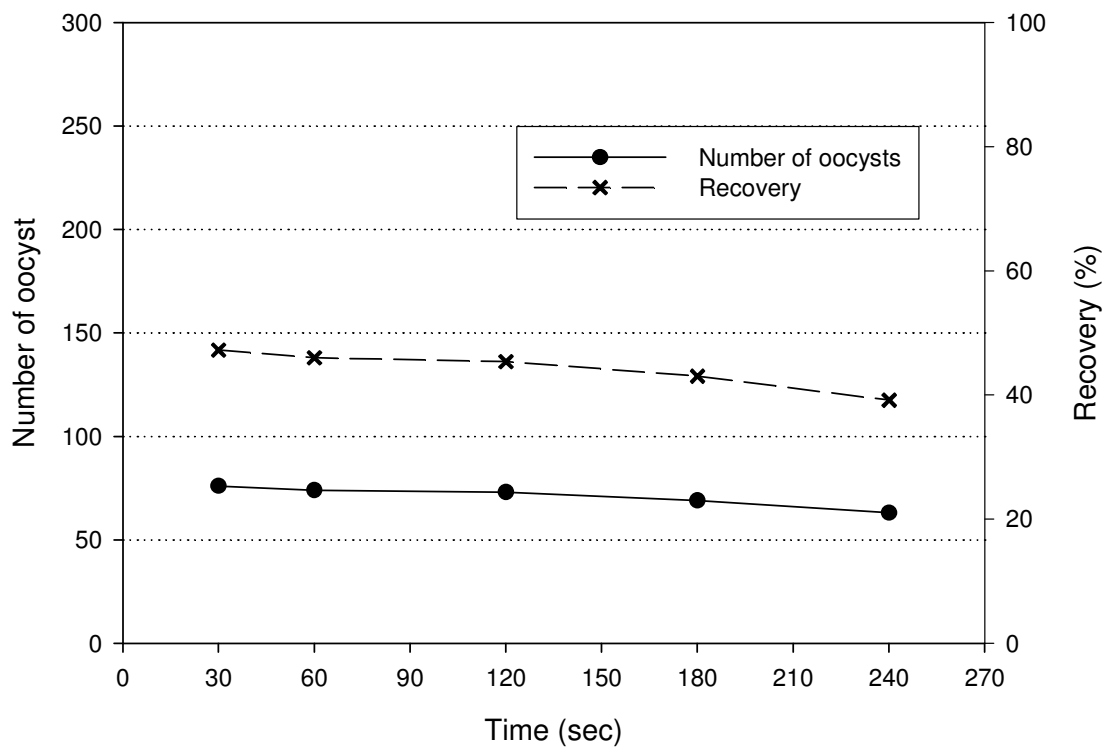


圖 4.4 0.1N HCl 與已結合孢囊之磁珠混合時間對孢囊數目及檢測回收率之關係

#### 4.3.2. 0.1N HCl 混合次數對孢囊數目及檢測回收率影響

在 4.3.1 結果發現延長 0.1N HCl 混合時間雖然無法有效提升孢囊檢測回收率，然而證實出 0.1N HCl 混合時間僅需 30 秒，即可有效破壞孢囊與磁珠之間鍵結。因此，本實驗選擇固定 0.1N HCl 混合時間 30 秒，以增加 0.1N HCl 與已結合孢囊磁珠之混合次數，探討 0.1N HCl 混合次數對孢囊數目及檢測回收率之關係。

本實驗以純水在 1.5 ml 之離心管中進行，自行添加隱孢子蟲孢囊數目為  $467 \pm 41$  顆，經磁性分離後，固定 0.1N HCl 與已結合孢囊磁珠混合時間為 30 秒，反覆進行五次，最終累積計算所檢測到之孢囊數目及檢測回收率，以三重複進行 (總樣本數  $N=15$ )。

由圖 4.5 結果發現，隨著 0.1N HCl 混合次數增加，累積孢囊數目有明顯提升，至第三次混合，孢囊累積數目已達穩定，最後兩次再混合時，孢囊累積數目並無顯著提升。第一次混合時，可檢測到之孢囊數目分別為 28、28 和 68 顆。第二次可檢測到孢囊數目可得 93、129 和 123 顆，第三次則為 20、23 和 52 顆，最後兩次得到孢囊數目總合分別為 1、4 和 3 顆。因此最終累積五次所檢測到之孢囊數目分別為 142、184 和 186 顆並計算出孢囊平均檢測回收率為 41%。結果發現第一次混合並無法完全將孢囊和磁珠之間鍵結破壞，出現殘餘鍵結的現象。為了將孢囊與磁珠之間鍵結破壞完全，採多次混合步驟使所得到之檢測孢囊數可較完全。

另外，此實驗結果與 4.3.1 實驗結果比較發現，結果顯示在 0.1N HCl 混合時間皆為 30 秒狀況下，單次和多次混合步驟所得到之平均孢囊檢測回收率為 47% 和 41%，差異不大。雖然兩者得到之孢囊檢測回收率相近，多次混合步驟所得到之檢測孢囊數較完全，即可維持

檢測回收率之準確性。故本研究建議之最佳操作條件為 0.1N HCl 混合頻率是每次 30 秒，反覆進行 3 次混合，最終累積計算孢囊數目和檢測回收率。同時，本研究後續實驗，皆以此最佳操作條件下進行。

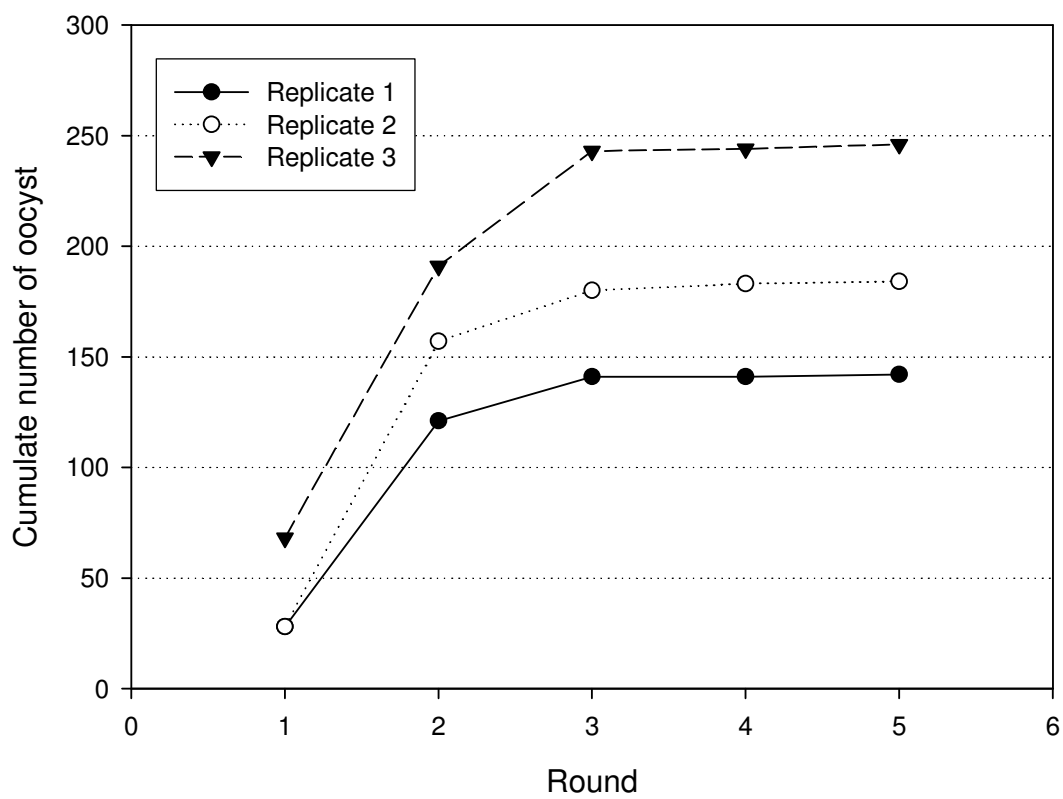


圖 4.5 0.1N HCl 與已結合孢囊磁珠之混合次數對孢囊數目關係



## 4.4 人工濁水試驗

### 4.4.1 濁度對孢囊檢測回收率影響

本實驗探討濁度對於利用免疫磁性分離法來檢測隱孢子蟲孢囊之影響，利用高嶺土顆粒配製不同濁度之人工濁水來模擬檢測隱孢子蟲孢囊方法中過濾濃縮程序之流洗液濁度狀況。本實驗中水樣濁度分別為 0.5、1、10、20、30、40、50 和 100 NTU，以及無添加高嶺土顆粒之純水水樣且固體物體積皆小於 0.5 ml (標準方法中 IMS 程序之建議操作條件，維持在含雜質固體物環境中之磁珠捕捉孢囊能力)，可以避免由於分裝樣本造成之孢囊損失誤差，原因是若水樣濁度造成樣本中固體物體積大於 0.5 ml，則需要依標準方法中 IMS 程序之建議操作條件來分裝樣本。水樣體積為 50 ml，水樣中自行添加含  $244 \pm 96$  顆隱孢子蟲孢囊，以 4 重複 (總樣本數  $N=33$ ) 進行，其中免疫磁性分離程序中 0.1N HCl 混合之操作條件參照結果 4.3.2 之最佳操作條件進行。

由圖 4.6 結果發現，當濁度小於 0.5 NTU 時，孢囊檢測平均檢測回收率隨濁度增加而提升，檢測回收率由 41% 提升至 66%。隨後在 0.5~100 NTU，孢囊檢測回收率開始隨濁度增加而下降，檢測回收率從 66% 下降至 3%。本實驗以 0.5 NTU 之 66% 孢囊檢測回收率為最高者。針對有無濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響進行生物統計分析 (*Unpaired t test*)，結果以 1、30、40、50 和 100 NTU 對無添加高嶺土顆粒水樣之間具有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。LeChevallier *et al.* (1995) 指出水樣中有適當濁度，可促使孢囊與雜質顆粒碰撞結合來增加孢囊檢測回收率。Feng *et al.* (2003) 研究發現當蓄水池中濁度為 1.8~5 NTU 時，孢囊檢測回收率會隨濁度增加而上升；濁度增加至 5~40 NTU，

其檢測回收率則隨濁度增加逐漸下降且具統計意義。Hu *et al.* (2004) 研究中自行添加含矽顆粒水體，當濁度為 2.5~10 NTU，檢測回收率隨濁度增加而上升；在 10~20 NTU 範圍內，其檢測回收率則隨濁度增加而下降且具統計意義。同時也指出孢囊檢測回收率會受到顆粒大小和顆粒濁度影響，檢測回收率隨濁度上升之原因可能是孢囊附著在顆粒上，因而容易被濃縮收集。

由圖 4.6 結果顯示，進一步針對 0.5~100 NTU，濁度與孢囊檢測回收率關係進行統計分析。結果顯示在濁度在 1~50 NTU，孢囊檢測回收率分別為 61%、53%、40%、28%、17%和 14%。其中 1~50、1~40 和 10~40 NTU 之濁度與孢囊檢測回收率經直線回歸分析後，其線性關係分別為  $r^2 = 0.975$ 、 $r^2 = 0.996$  和  $r^2 = 0.999$ ，說明以上濁度範圍內之濁度對於孢囊檢測回收率影響顯著且具線性關係。

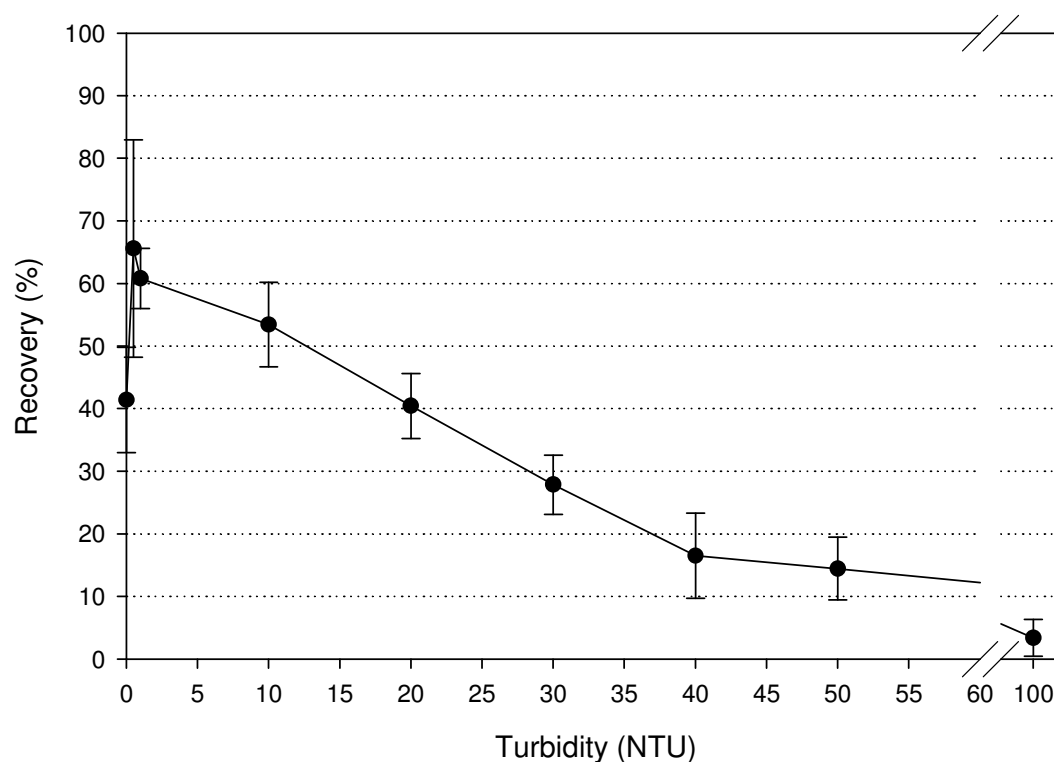


圖 4.6 濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響關係

表 4.2 不同濁度下隱孢子蟲 (*C. parvum*) 孢囊檢測回收率

Turbidity (NTU)	Recovery (%) [mean±sd]***	Biostatistics ( <i>t</i> -test, unpaired)
Blank*	41.39±8.40	
0.5	65.57±17.37	
1	60.79±4.80	**
10	53.42±6.74	
20	40.44±5.19	
30	27.87±4.73	**
40	16.50±6.80	**
50	14.45±5.01	**
100	3.38±2.94	**

\*無添加高嶺土顆粒水樣。

\*\*具有顯著差異( $p < 0.05$ )，以 Student *t* test, unpaired 進行檢定。

\*\*\*總樣本數目為 32 (總樣本數  $N=32$ )

表 4.3 濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率之直線迴歸分析結果

Turbidity (NTU)	Formula	$r^2$
1-50	$Y=61.47-1.03X$	0.975
1-40	$Y=63.36-1.17X$	0.996
10-40	$Y=65.39-1.23X$	0.999

## 4.4.2 改善濁度對孢囊檢測回收率之影響

### 4.4.2.1 不同離心力 (G 值)對孢囊檢測回收率影響

在 Method 1623 方法檢測流程中，進行免疫磁性分離程序之前，會先透過重力離心方式使樣本達到孢囊濃縮的目的，因此當水樣中含有顆粒性物質包括雜質顆粒及孢囊，皆會經固液分離方式達到濃縮收集的效果。Hu *et al.* (2004)指出孢囊可能因附著在顆粒上，因而容易被濃縮收集，使孢囊檢測回收率上升。

本實驗要探討濃縮程序中相同離心時間下，增加離心力 (G 值)對有無濁度之孢囊檢測回收率影響及改善濁度水體之孢囊檢測回收率。由實驗結果 4.3.1 可知，濁度對孢囊檢測回收率下降影響以 10~40 NTU 最具相關性，且 40 NTU 之孢囊檢測回收率較低。因此本研究之 4.3.2 實驗中皆以無添加高嶺土顆粒水樣和 40 NTU 水樣作為代表有無濁度水樣表示。實驗中樣本體積是 50 ml，樣本中自行添加孢囊數目為  $172 \pm 47$  顆，以 4 重複 (總樣本數  $N=27$ ) 進行。離心力分別控制在  $G=1500$ 、 $2000$ 、 $2500$  和  $2700$ ，其中  $G=2700$  為儀器可操作之最大值，離心時間為 15 分鐘。

由圖 4.7 結果顯示，當無添加高嶺土顆粒水樣，隨 G 值增加孢囊檢測回收率沒有顯著的變化，檢測回收率為 31.6~47.7%。當 40 NTU 時，檢測回收率隨 G 值增加有所變化，檢測回收率分別為  $G=1500$  (16.5%)、 $G=2000$  (5.2%)、 $G=2500$  (10.9%)和  $G=2700$  (7.8%)，檢測回收率受到 G 值影響而有些微下降。結果顯示在無顆粒濁度干擾下，增加離心力提升並無法促使濃縮效率增加，進而提升孢囊檢測回收率。濁度水樣中，增加離心力並無法提升濁度水樣之孢囊檢測回收率，反而造成檢測回收率損失，推測原因是水樣中顆粒性雜質在高離

心力下，會因為顆粒與孢囊碰撞對孢囊造成破壞，使孢囊出現不完整及損失。Method 1623 指出，當樣本中含有砂礫性物質，高離心作用力可能會對孢囊造成損失<sup>(USEPA, 2001)</sup>。

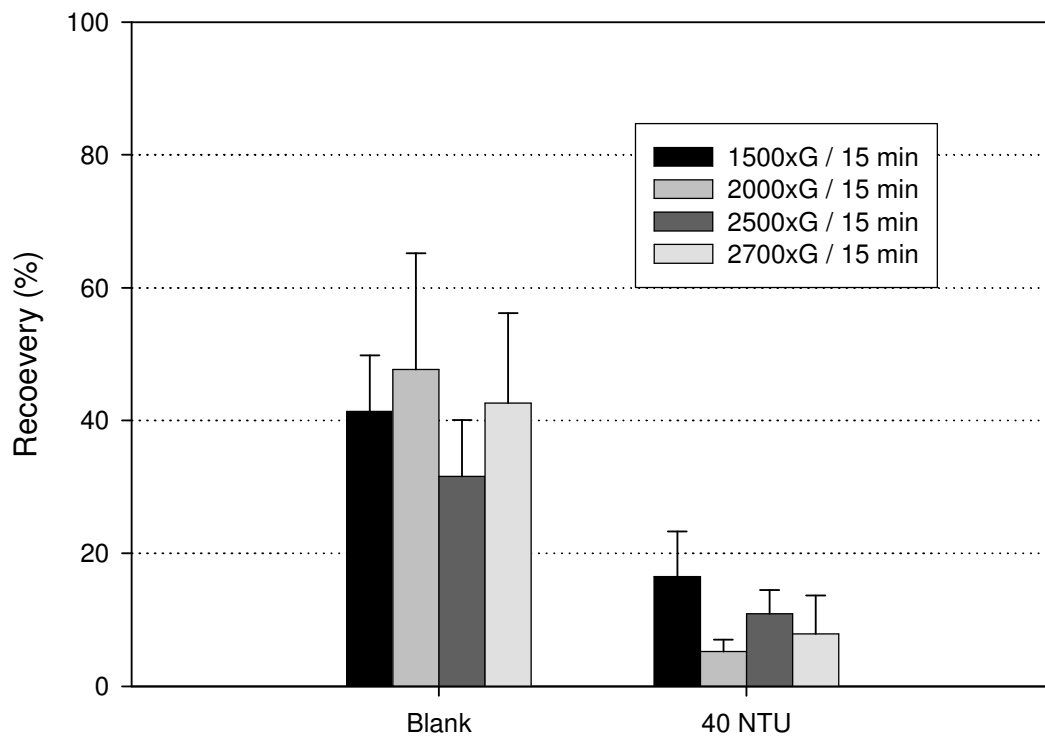


圖 4.7 無添加高嶺土顆粒水樣和 40 NTU 下之相同離心時間不同離心力 (G 值)對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響

#### 4.4.2.2 不同離心時間對孢囊檢測回收率之影響

由上述實驗 4.3.2.1 結果可知提升離心力並無法改善孢囊檢測回收率，反而在 40 NTU 之濁度水樣中，其孢囊檢測回收率會因為受到離心力影響而下降。因此本研究則以固定離心力而延長離心時間，來探討濃縮程序中有無濁度之孢囊檢測回收率影響變化及改善濁度水體之孢囊檢測回收率。實驗以 4 重複 (總樣本數  $N=21$ ) 進行，水樣本中自行添加孢囊數目為  $307\pm 94$  顆，離心力則以  $G=1500$  (此為標準方法建議值)，離心時間分別為 15 (標準方法建議值)、30 和 60 min，水樣分別以無添加高嶺土顆粒水樣和 40 NTU 水樣作為代表。

由圖 4.8 結果發現，無添加高嶺土顆粒水樣，延長離心時間對於孢囊檢測回收率沒有顯著變化，其檢測回收率為 41.4~49.7%，差異不大。當 40 NTU 時，檢測回收率隨時間延長而下降，分別為 15 min (16.5%)、30 min (5.7%) 和 60 min (3.9%)。將 30 及 60 min 對 15min 進行生物統計分析，兩者對 15 分鐘之檢測回收率皆具有統計上顯著差異 (*t test, unpaired,  $p < 0.05$* )。研究結果發現在離心力過大時會破壞孢囊之完整性，因此本實驗在相同離心力下延長離心時間，對無添加高嶺土顆粒水樣而言，濃縮程序沒有提升孢囊檢測回收率；對濁度水樣而言，孢囊檢測回收率沒有達到改善，反而對孢囊檢測回收率有所影響，顯示延長離心時間對孢囊檢測回收率會下降且具統計意義。



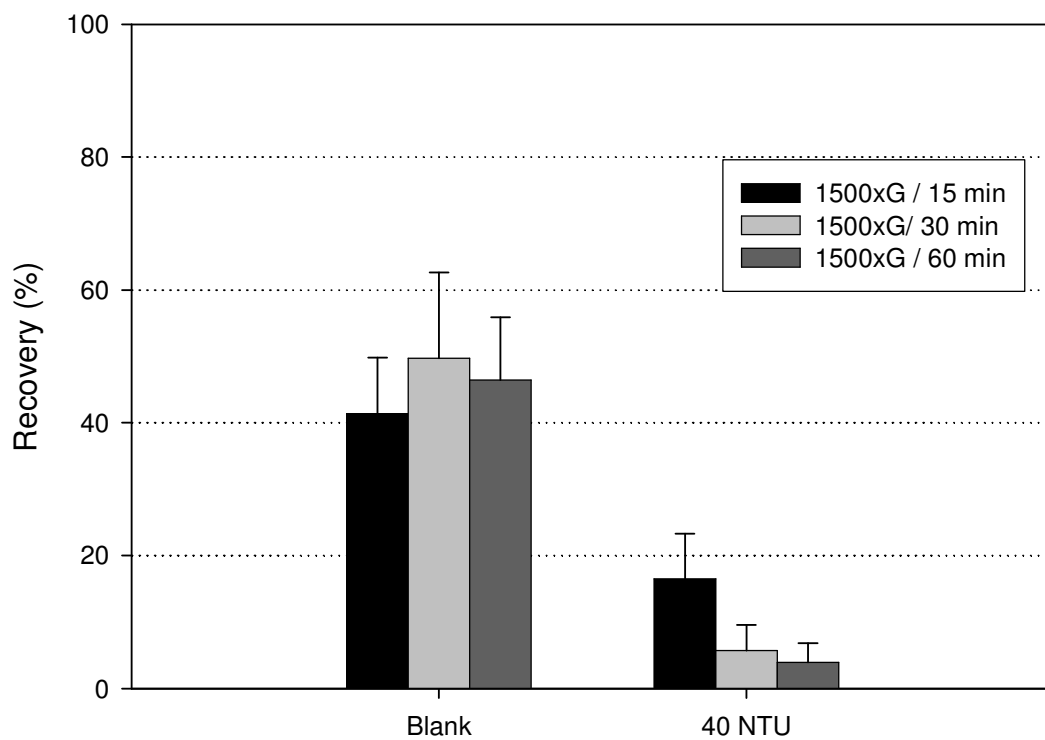


圖 4.8 無添加高嶺土顆粒水樣和 40 NTU 下之不同離心時間相同離心力 (G 值)對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響

#### 4.4.2.3 磁性抗體劑量對孢囊檢測回收率影響

本實驗要探討磁珠劑量對有無濁度水體之孢囊檢測回收率比較，標準方法中建議磁珠添加 100  $\mu\text{l}$  磁珠在總體積為 10 ml 之含孢囊及雜質溶液中，雜質顆粒體積與總溶液體積比須控制在 1/20 (USEPA, 2001)。本實驗在濃縮程序後，仍控制相同雜質顆粒體積與總溶液體積比例。在總體積為 5 ml 之樣本溶液中，濁度以無添加高嶺土顆粒水樣和 40 NTU 水樣作為代表，磁珠添加劑量分別為 50、100 和 150  $\mu\text{l}$  磁珠，樣本中自行添加孢囊數目為  $244 \pm 96$  顆，以 4 重複 (總樣本數  $N=22$ ) 進行，0.1N HCl 混合條件採用結果 4.3.2 之最佳操作條件進行。

由圖 4.9 結果發現，不論在無添加高嶺土顆粒水樣和 40 NTU 水樣中隨磁珠劑量增加，孢囊檢測回收並無明顯變化。無添加高嶺土顆粒水樣之孢囊檢測回收率分別為 41.4%、47.0% 和 45.6%。40 NTU 水樣分別為 16.5%、14.6% 和 11.1%。結果顯示在無濁度干擾下，添加磁珠劑量並無法促進孢囊檢測回收率；濁度水體中，增加磁珠劑量仍無法改善濁度水體中之孢囊檢測回收率。另外，也證實目前磁珠添加劑量為具足夠能力捕捉孢囊。

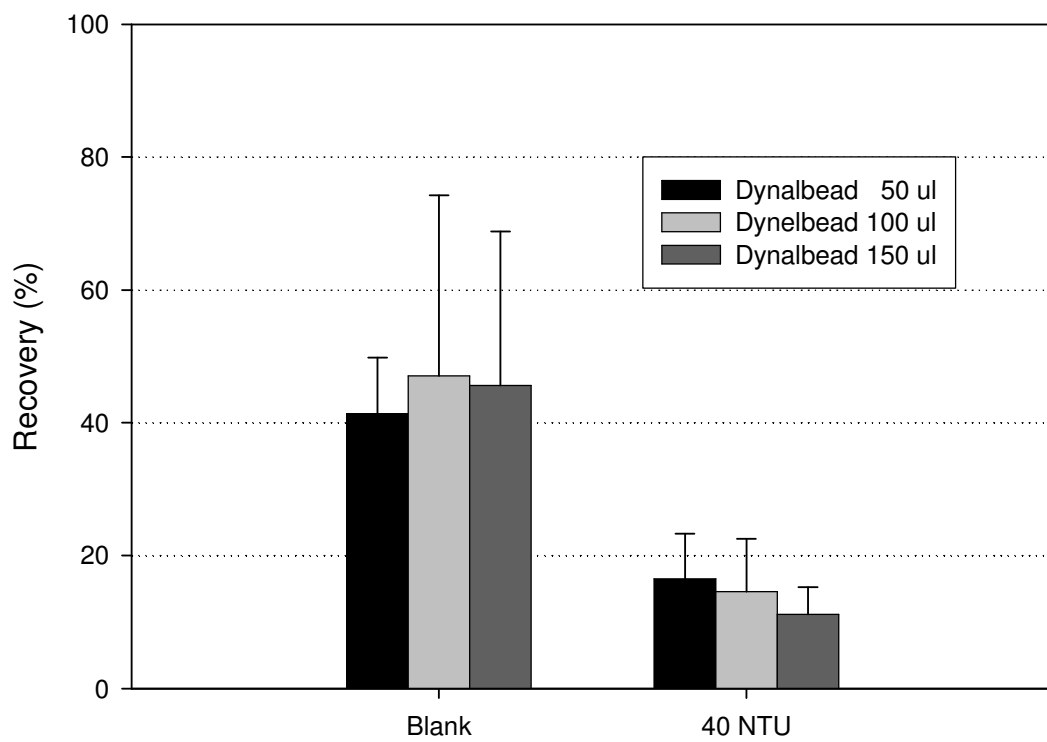


圖 4.9 無添加高嶺土顆粒水樣和 40 NTU 下之不同磁珠劑量對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響

#### 4.4.2.4 原水稀釋對孢囊檢測回收率影響

本實驗目的在改善濁度水體之孢囊檢測回收率，探討將含孢囊及雜質顆粒之原水樣本稀釋，以降低濁度對孢囊檢測回收率影響，得到稀釋後濁度水體與孢囊檢測回收率間之關係。水樣體積為 50 ml，水樣中自行添加隱孢子蟲孢囊數目為  $244 \pm 96$  顆，在 50 ml 離心管中進行 4 重複試驗 (總樣本數  $N=30$ )，原始濁度水樣其濁度分別為 20、40 和 100 NTU，以及及無添加高嶺土顆粒之純水水樣，從樣本中取出 25 ml，再以純水定量至 50 ml，相當於稀釋 50%。稀釋後水樣中所存在自行添加之孢囊數目以孢囊原始添加劑量一半作為期望值。

由圖 4.10 結果發現，無論稀釋前後，隨濁度增加孢囊檢測回收率皆下降，稀釋前孢囊檢測回收率從 41.4% (Blank) 下降至 3.38% (100 NTU)；稀釋後孢囊檢測回收率從 54.1% (Blank) 下降至 2.44% (100 NTU)。另外，分別比較相同濁度稀釋前後之孢囊檢測回收率，圖 4.10 結果發現，稀釋後濁度水體之孢囊檢測回收率有所提升，但提升程度隨濁度上昇緩和。隨濁度增加其提升效率分別為 12.7% (Blank)、13.1% (20 NTU)、3.8% (40 NTU) 和 1.5% (100 NTU)。雖然稀釋原水可促使檢測回收率提升，但隨濁度增加效率上升緩和。其中以 20 NTU 之提升效過最好，提升效率為 13.1%。雖然稀釋原水可促使檢測回收率提升，但仍以低濁度較為明顯。

由圖 4.11 顯示本研究之正控制組在螢光顯微鏡下觀察所得到觀察畫面。隱孢子蟲孢囊經過免疫螢光染色後在螢光顯微鏡 ( $\lambda=450\sim 490$  nm) 下會呈現蘋果綠之螢光。

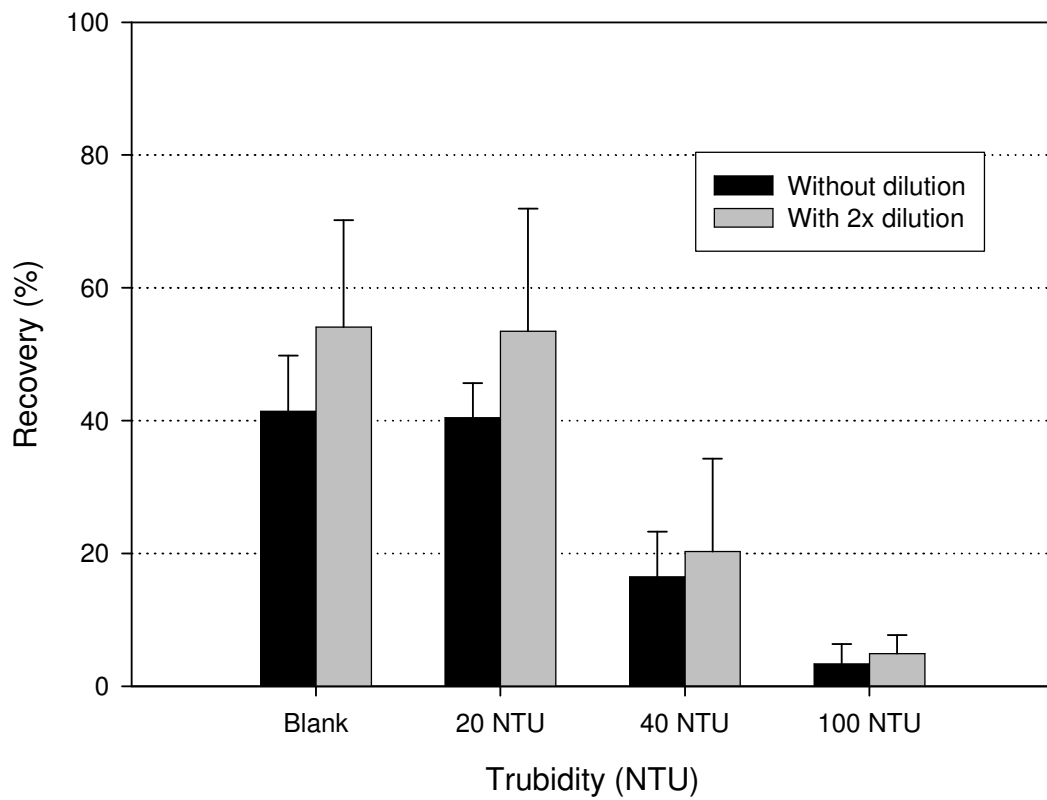


圖 4.10 不同濁度水樣稀釋前後濁度水體之隱孢子蟲孢囊檢測回收率

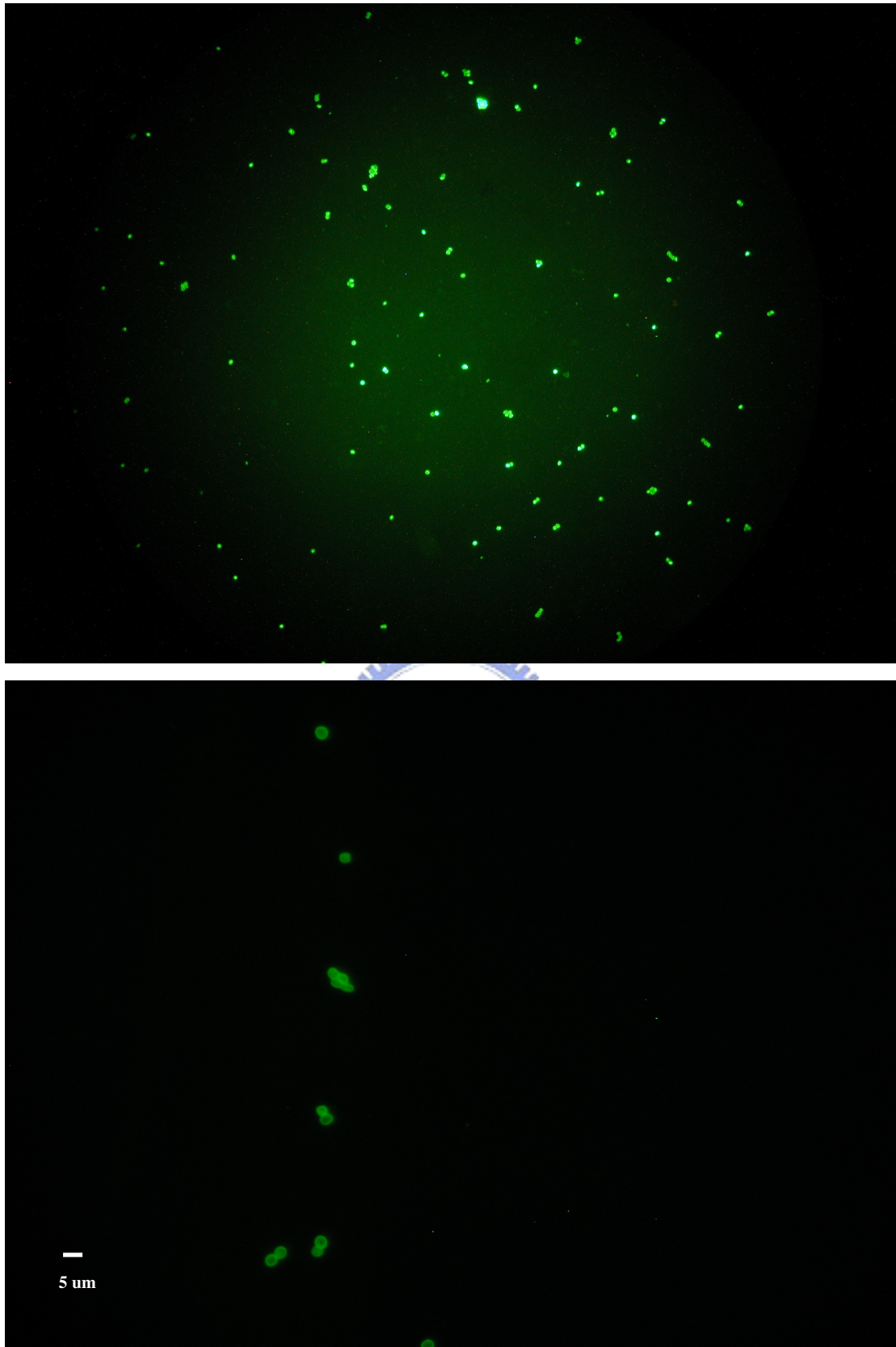


圖 4.11 隱孢子蟲孢囊之正控制組(Nikon E400/ 200×/  $\lambda= 450\sim 490$  nm)



## 第五章 結論與建議

### 5.1 結論

1. 延長 0.1N HCl 混合時間無法提升隱孢子蟲孢囊之檢測回收率，需混合 30 秒時間，0.1N HCl 可破壞孢囊與磁珠之間鍵結。同時驗證標準方法所建議之 0.1N HCl 混合所需時間。
2. 增加 0.1N HCl 混合次數可使孢囊與磁珠之間鍵結破壞完全，得到孢囊數之完整性及提升檢測回收率之準確性。
3. 鍵結分離試驗中最佳操作調條件為 0.1N HCl 混合次數 3 次，每次 30 秒。
4. 當濁度範圍在 0~0.5 NTU，孢囊檢測回收率隨濁度增加而提升，隨後 0.5~100 NTU，孢囊檢測回收率則開始隨濁度增加而下降且具生物統計意義。
5. 當濁度範圍在 10~40、1~40、和 1~50 NTU，檢測回收率與濁度之間呈線性關係下降且  $r^2=0.999$ 、 $r^2=0.995$  和  $r^2=0.975$ 。
6. 濃縮程序中，離心力提升和延長離心時間皆無法有效提升孢囊檢測回收率。
7. 濁度水體中，增加磁珠劑量無法有效改善濁度水體中之孢囊檢測回收率。另外，標準方法所建議之添加劑量已足夠能力捕捉孢囊，無需增加磁珠劑量造成磁珠成本問題。
8. 稀釋低濁度水樣中可提升孢囊檢測回收率，尤其在 20 NTU 水樣中較明顯。

## 5.2 建議

1. 本研究之操作程序費時、費力，需積極發展新方法才增加檢測效率。
2. 分子生物技術陸續被發展出來，未來可利用分子生物技術作為研究之佐證依據，增加鑑定隱孢子蟲之能力。
3. 對於水樣雜質顆粒之濁度問題，仍為孢囊之檢測限制，因此將孢囊與雜質顆粒之間達有效分離，仍為最迫切解決之問題。
4. 未來檢測反沖洗廢水時，考慮其高濁度水質條件，建議稀釋原水，以降低對磁性分離法之干擾，避免誤差造成檢測回收率損失且稀釋後亦可減少磁珠之用量，降低檢測成本。



## 參考文獻

- Arora, H., Giovanni, G.D., and LeChevallier, M. 2001. Spent filter backwash water containments and treatment strategies. *J. AWWA*. 39, 100-112.
- Bukhari, Z., McCuin, R.M., Fricker, C.R., and Clancy, J.L. 1998. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4495-4499.
- Butkus, M.A., Bays, J.T., and Labare, M.P. 2003. Influence of Surface Characteristics on stability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3819-3825.
- Campbell, A., Smith, H. 1997. Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from water samples: round robin comparison of techniques. *Wat. Sci. Tech.* 35, 397-401.
- Connell, K., Scheller, J., Miller, K., Rodgers, C.C. 2000. Performance of method 1622 and 1623 in the ICR supplemental surveys. Proceedings of AWWA Water Quality Technology Conference, Salt Lake City, Utah. American Water Works Association, Denver, Colo. On CD-ROM.
- Clancy, J.L., Gollnitz, W.D., and Tabib, Z. 1994. Commercial labs : How accurate are they?. *J. Am. Water Works Assoc.* 86(5), 89-97.
- Craik, S.A., Weldon, D., Finch, G.R., Bolton, J.R., and Belosevic, M. 2001. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium and low pressure ultraviolet radiation. *Water Sci. Res.* 35, 1387-1398.
- Considine, R.F., Dixon, D.R., and Drummond, C.J. 2002. Oocysts of *Cryptosporidium parvum* and model sand surface in aqueous solutions: an atomic force microscope (AFM) study. *Water Res.* 36, 3421-3428.
- Corona-Vasquez, B., Samuelson, A., Rennecker, J.L., and Marinas, B.J. 2002. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine. *Wat Res.* 36, 4053-4063.
- DiGiorgio, C.L., Gonzales, D.A., and Huitt, C.C. 2002. *Cryptosporidium* and *Garidia* recoveries in natural waters by using Environmental Protection Agency Method 1623. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5952-5955.
- Despommier, D.D., Gwadz, R.W., and Hotez, P.J. 1994. *Cryptosporidium sp.* And *Cryclospora sp.* In: Despommier, D.D. (Ed), Parasitic diseases. Springs-Verlag, New York, 169-174.
- Dugan, N.R., Fox, K.R., Owens, J.H., and Miltner, R.J. 2001. Controlling *Cryptosporidium* oocysts using conventional filtration. *J. AWWA*. 93, 64-77.

Feng, Y.Y., Ong, S.L., Hu, J.Y., Song, L.F., Tan, X.L., and Ng, W.J. 2003. Effect of particles on the recovery of *Cryptosporidium* oocysts from source water samples of various turbidities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1898-2903.

Francy, D.S., Simmons, O.D., Ware, M.W., Granger, E.J., Sobsey, M.D., and Schaefer, F.W. 2004. Effect of seeding procedures and water quality on recovery of *Cryptosporidium* oocysts from stream water by using U.S. Environmental Protection Agency Method 1623. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4118-4128.

Fayer, R., Speer, C.A., and Dubey, J.P. 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer, R. (Ed.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, 2-27.

Haas, C.N., and Rose, J.B. 1994. Reconciliation of microbial risk model risk models and outbreak epidemiology: The case of the Milwaukee outbreak. In Proc. Annual Conf. Am. Wat. Assoc., New York, USA, 517-522.

Hsu, B.M., Hung, C.P., Hsu, Y.F., Jiang, G.Y., and Hsu, C.L. 2001. Evaluation of two concentration methods for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. *Wat. Res.* 35, 419-424.

Hsu, B.M., and Hung, C.P. 2001. Performance of the immunomagnetic separation method for *Cryptosporidium* in water under various operation conditions. *Biotechnol. Prog.* 17, 1114-1118.

Hu, J.Y., Feng, Y.Y., Ong, S.L., Ng, W.J., Song, L.F., Tan, X.L., and Chu, X.N. 2004. Improvement of recoveries for the determination of protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water using method 1623. *J. Microbiol. Meth.* 58, 321-325.

Johnson, D.W., Pieniasek, N.J., Griffin, D.W., Misener, L., and Rose, J.B. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3849-3855.

Jakubowski, W., Boutros, S., Faber, W., Fayer, R., Ghiorse, W., LeChevallier, M., Rose, J., Schaub, S., Singh, A., and Stewart, M. 1996. Environmental method for *Cryptosporidium*. *J. Am. Water Works Assoc.* 88, 107-121.

Kuhn, R.C., and Oshima, K.H. 2002. Hollow-fiber ultrafiltration of *Cryptosporidium parvum* oocysts from a wide variety of 10-L surface water samples. *Can. J. Microbiol.* 48, 542-549.

Kuhn, R.C., Rock, C.M., and Oshima, K.H. 2002. Effects of pH and magnetic material on immunomagnetic separation of *Cryptosporidium* oocysts from concentrated water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2066-2070.

Korich, DG., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A., and Sterling, CR. 1990. Effect of ozone, chlorine dioxide, chlorine and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocysts viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1423-1428.

Leland, D., Mcanulty, J., Keene, W., and Stevens, G. 1993. A Cryptosporidiosis outbreak in a filtered public water supply. *J. AWWA*. 85, 34-42.

Logsdon, G. 1994. The removal and disinfection efficiency of lime softening processes for *Giardi* and viruses. AWWARF, AWWA, Denver, Co.

LeChevallier, M.W., Norton, W.D., Siegel, J.E., and Abbaszadegan, M. 1995. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 690-697.

LeChevallier, M.W., Di Giovanni, G.D., Clancy, J.L., Bukhari, Z., Rosen J.S., Sobrinho, J., and Frey, M.M. 2003. Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium spp.* in source water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 971-979.

Mtambo M, M.A., Nash, A.S., Wright, S.E., Smith, H.V., Blewett, D.A., and Jarrett, O. 1995. Prevalence of specific anti-*Cryptosporidium* IgG IgM and IgA antibodies in cat sera using an indirect immunofluorescence antibody test. *Vet. Parasitol.* 60,37-43.

Morgan, U.M., and Thompson, R.C.A. 1998. PCR detection of *Cryptosporidium* : The way forward? *Parasitology Today*. 14,241-245.

McCuin, R.M., Bukhari, Z., Sobrinho, J., and Clancy, J.L. 2001. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. *J. Microbiological methods*. 45, 69-76.

MacKenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., and Davis, J.P. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331, 161-167.

Meisel, J.E., Perera, D.R., and Meloigro, C. 1976. Overwhelming watery diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*. 70, 1156-1160.

Nime, F.A., Burek, J.D., and Page, D.L. 1976. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology*. 70, 592-598.

O'Donoghue, P. 1995. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25, 139-195.

Quintero-Betancourt, W., Gennaccaro, A.L., Scott, T.M., and Rose, J.B. 2003. Assessment of method for detection of infections *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5380-5388.

Rochelle, P.A., De Leon, R., Johnson, A., Stewart, M.H., and Wolfe, R.L. 1999. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 841-845.

Rochelelle, P.A., De Leom, R., Stewart, M.H., and Wolfe, R.L. 1997. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 106-114.

Simmons, O.D., Sobsey, M.D., Schaefer, F.W., Francy, D.S., Nally, R.A., and Heaney, C.D. 2001. Evaluation of USEPA Method 1622 for detection of *Cryptosporidium* oocysts in stream waters. *J. AWWA.* 93, 78-87.

Sturbaum, G.D., Klonicki, P.T., Marshall, M.M., Jost, B.H., Clay, B.L., and Sterling, C.R. 2002. Immunomagnetic separation (IMS)-fluorescent antibody detection and IMS-PCR detection of seeded *Cryptosporidium parvum* oocysts in natural waters and their limitations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2991-2996.

U.S. Environmental Protection Agency 1995. ICR Protozoan Method for Detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Water by a Fluorescent Antibody Procedure. Office of Ground Water and Drinking Water, Washington, DC. Publication EPA-814-B-95-003.

U.S. Environmental Protection Agency 1999b. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration, Immunomagnetic Separation, and Fluorescent Antibody. Office of Water, Washington, DC. Publication EPA-821-R-99-006.

Vesey, G., Slade, J.S., Byrne, M., Shepherd, K., Dennis, P.J., and Fricker, C.R. 1993. Routine monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in water using flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 87-90.

Vesey, G., Hutton, P., Champion, A., Ashbolt, N., Williams, K.L., Warton, A., and Veal, D. 1994. Application of flow cytometric method for the routine detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. *Cytometry.* 16, 1-6.

江國瑛，本審自來水中梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲存在性調查及其分析方法之評估，國立交通大學環境工程研究所碩士論文，民國 88 年。

許曷慕，梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲分析方法評估與存在性調查及其囊體表面性質與過濾行為之探討，國立交通大學環境工程研究所博士論文，民國 89 年。

黃志彬等，自來水水源中梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲調查及淨水處理對其去除能力之評估，行政院環保署期末報告，民國 87 年。

黃志彬等，飲用水水源中致病性微生物-梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲調查及管制評估，行政院環保署期末報告，民國 88 年。

董文蘭，以聚合酶鏈鎖反應偵測水中之隱孢子蟲，私立逢甲大學環境工程與科學學系碩士論文，民國 94 年。

楊正邦，反沖洗廢水處理技術之研究，國立台灣科技大學化學工程系碩士論文，民國 94 年。