

以兩種濃縮法分析台灣自來水原水及清水中 梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲含量

許昺慕¹ 黃志彬² 江國瑛¹ 許永華³

摘 要

在水樣中添加原蟲正控制組進行原蟲分析方法之原蟲回收率比較時，濾膜法比濾管法的原蟲回收率高，而在測試實際水樣時，濾管法則比濾膜法具較佳的偵測極限。當水樣濁度增加時，此二種分析方法的原蟲回收率皆會隨之下降，偵測極限值則會升高。以濾管法與濾膜法分析實際水樣的結果顯示，梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲廣泛存在於台灣的水體當中。在比較以濾管法與濾膜法分析原蟲之相關性時發現，以此兩種方法分析大淨水場之清水時，其分析結果具較佳的相關性。另外在原水中之原蟲含量與水質參數相關性的研究結果中顯示，濾管法所分析出的梨形鞭毛蟲含量與總菌落數、大腸桿菌群、糞便大腸菌群以及腸球菌之分析值具相關性，隱孢子蟲含量與糞便大腸菌群以及濁度具相關性。至於以濾膜法所測得之梨形鞭毛蟲含量則與總菌落數、糞便大腸菌以及濁度具相關性，而隱孢子蟲含量則不與任何指標微生物具相關性。目前大部分國家仍使用美國ICR原蟲分析法或其改良法進行飲用水之原蟲分析，因此瞭解各分析方法的回收效率、偵測極限以及這些方法在各種水體中的使用限制，乃是提升目前分析方法準確度與精密度之最佳方法。

一、前 言

梨形鞭毛蟲(*Giardia*)及隱孢子蟲(*Cryptosporidium*)已被證實廣泛存在於水體中，而且會寄生在宿主的腸道系統⁽¹⁾。近十年來全球已爆發多起梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲的大型感染案例⁽²⁻⁴⁾，而環保署委託本研究群所做的調查報告中，亦證實此二類原蟲存在於國內的表面水體中⁽⁵⁻⁶⁾。供水系統受此類原蟲污染乃是爆發梨形鞭毛蟲症與隱孢子蟲症流行的主要原因⁽⁷⁻⁹⁾，因此，對飲用水體進行梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲的分析，並由水廠在處理技術上提出對策，乃是防止該類原蟲疾病爆發流行的最佳方法。目前常用來分析水樣中梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲的分析方法為美國資訊蒐集法則(ICR)之原蟲分析法⁽¹⁰⁾，其採樣、分離與檢測方法分別為濾管過濾法、Percoll-Sucrose梯度澄清法以及免疫螢光抗體染色技術。此分析方法的樣本前處理步驟，並無法有效回收梨形鞭毛蟲及隱孢子蟲⁽¹¹⁾，因此新的採樣設備及水樣濃縮與原蟲分離方法也應運而生。1999年4月美國環保署所提之梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲分析方法—Method 1623⁽¹²⁾，即根據ICR之分析方法加以改進所得。其所使用的水樣收集方法包括濾膜法、渦流式離心法以及由Gelman公司針對收集此二類原蟲所開發的Envirochek濾管法，至於水樣的濃縮與雜質分離所使用的方法則為磁性抗體分離法(IMS)。雖然Method 1623的原蟲分析過程具有高回收率與低偵測極限之特性，但此法之操作成本過於昂貴，難以為大多數國家所接受。因此改良美國ICR原蟲偵測法，以提高其實用性與分析時之可信度，乃為大多數國家較可接受的折衷方法⁽¹³⁾。

¹ 國立交通大學環境工程研究所研究生

² 國立交通大學環境工程研究所教授

³ 行政院環保署環境檢驗所簡任研究員

本研究的主要目的乃是要評估兩種原蟲濃縮法-濾管法與濾膜法其原蟲回收率及偵測極限。另外，本研究亦要比較在實際的水樣採集過程，濾管法與濾膜法的原蟲分析結果以及原水中原蟲含量與水質參數間之相關性。

二、研究方法與實驗設備

正控制組的製備以及水樣之選取

本研究中所使用的梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲之標準品乃購自Ensys公司(Ensys, Inc., NC, USA)，原蟲使用前先以0.1%磷酸鹽緩衝溶液(PBS)稀釋，再加入水樣中。正控制實驗中所使用的原水與清水乃取自新竹第一淨水場，水樣中原蟲的添加量約為 10^4 至 10^5 parasites/10L。製備含已知數量原蟲之正控制組的目的，是要用來評估濾管法與濾膜法之原蟲回收率。本研究在實際水樣的原蟲分析部分，乃自國內五處淨水場選取20組原水水樣、20組清水水樣，並自六處位於台北與桃園縣境的簡易自來水設施選取12組水樣，共計52組水樣。

原蟲採樣與分離之設備及步驟

本研究乃同時以濾管法與濾膜法進行水樣中的原蟲分析。其中，濾管法的主要採樣設備包括長25.4 cm、孔徑1 μ m的聚丙烯管(M39R10A; Commercial Filters Parker Hannifin Corp., IN, USA)，並以商用LT-10濾管盛裝。至於濾膜法的設備則包括直徑142 mm的圓盤過濾器(Millipore Corp., MA, USA)以及孔徑3 μ m之Polycarbonate濾膜(Osmonics Inc., USA)。濾管法的濃縮步驟主要參照ICR原蟲分析法⁽¹⁰⁾，濾膜法的濃縮步驟則參照Method 1623⁽¹²⁾，兩種方法之採樣與分離步驟概略敘述如下：

在濾管法部分，受測水體經濾管過濾後乃將濾心取出，將濾心由內而外切成三等分，依序放入三個鐵胃袋中並加入流洗液(phosphate-buffered saline, 1% Tween 80, 1% SDS)，以鐵胃揉洗。揉洗完畢後收集流洗液(約0.7-1.2 L)，並分別倒入50 mL的離心管中。經離心步驟後，將上清液倒掉並加入與沈澱顆粒等體積的10%福馬林溶液。在原蟲與雜質分離步驟中，首先加入流洗液使總體積達20 mL並將30 mL的Percoll-Sucrose(比重1.1)以注射管由溶液的下層注入。離心後，吸取上層25 mL的溶液，置於新的離心管中，再加入25 mL的流洗液，以1050 \times g的轉速離心10分鐘，將上層45 mL的溶液吸出，剩下的5 mL溶液則以免疫螢光抗體分析法進行染色。至於濾膜法部分，受測水體經濾膜過濾後，乃將濾膜由原盤過濾器中取出並放在小塑膠盤中，然後加入流洗液(phosphate-buffered saline, 1% Tween 80, 1% SDS)以手指慢慢搓揉，直至將濾膜上的顆粒洗出。至於濾膜法後續的濃縮、分離以及檢測步驟則與濾管法相同。

免疫螢光抗體法之操作步驟

本研究中原蟲的染色與鏡檢步驟主要乃依ICR中梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲之螢光免疫抗體分析法⁽²⁾。該方法之操作首先將支撐濾紙及醋酸纖維濾紙平鋪在十管過濾器的濾口，並以1磅重的鋼圈固定。各濾管中乃陸續加入經前處理過的採樣溶液、1%的BSA、10% Normal Goat Serum、第一劑抗體試劑(Primary Antibody Reagent)以及標示劑(Labeling Reagent)。加入第一劑抗體試劑與標示劑時，樣本必須於室溫中反應25分鐘，反應後以幫浦將試劑抽掉，並以2 mL的1 \times PBS來沖洗濾紙，重複四次。在濾紙脫水步驟，各濾管中乃依序加入10、20、40、80、90.2%含5%甘油的酒精溶液1.9 mL，隨後將醋酸纖維濾紙放在玻片上，並加入

DABCO-Glycerol使濾紙透明化以及穩定待測物。

以螢光顯微鏡(Olympus, Japan)鏡檢時，放大倍率需為200倍以上。當有橢圓形的螢光出現時，將鏡頭轉為油鏡鏡頭或是相位差顯微鏡來觀察原蟲內部構造，並記錄下所看到的胞器外形及內部胞器。將空囊體(Empty Cysts)及有胞器的囊體分開記錄及計數，兩者相加即為梨形鞭毛蟲孢囊用免疫螢光抗體法計數得出的總數。當出現卵形或圓球形螢光點時，亦將鏡頭轉為油鏡鏡頭或是相位差顯微鏡，觀察並記錄胞器的外部形態及內部構造，將空卵孢囊(Empty Oocysts)及有胞器的卵孢囊分開記錄，兩者相加即為隱孢子蟲卵孢囊用免疫螢光抗體法計數所得出的總數。

數據分析與計算

計算濾管法與濾膜法之原蟲整體回收率時，必須收集正控制組過濾前與經 Percoll-sucrose 分離純化後的水樣，二者經免疫螢光抗體法染色後，計算原蟲之變化量即可求得。至於偵測極限的計算方法乃依下列公式所示：

$$X = \frac{100}{V \times F \times R} \quad (1)$$

其中X為每100 L水樣中原蟲之偵測極限值，V為過濾水樣體積，F為流洗液用於梯度澄清步驟的體積比，R為梯度澄清後之液體以螢光免疫抗體進行檢測的體積比。水樣中梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲的含量，乃是由螢光顯微鏡所觀察到的原蟲數量，經回收率與偵測極限值的換算所求得。本研究除了比較以濾管法與濾膜法分析實際水樣時，其原蟲含量的相關性外，亦比較原水中原蟲含量與濁度、總菌落數、大腸桿菌群、*E. coli*、糞便大腸菌群、腸球菌等水質參數之相關性。指標微生物的檢測方法乃參照美國APHA的標準方法⁽¹⁴⁾，相關性之分析則是以STATISTICA軟體(StatSoft, Inc., USA)中無母數相關性分析法—Spearman R進行計算。

三、結果與討論

濾管法與濾膜法原蟲回收率之評估

以濾管法與濾膜法進行原蟲分析時，梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲在原木與清水中之回收率如圖 1 所示。在採樣過程中，濾管法所過濾之水樣體積皆為 40 L，濾膜法所過濾的清水體積為 20 L，濾膜法所過濾的原水體積則少於 2 L。以濾管法進行清水之原蟲分析時，梨形鞭毛蟲的平均回收率為 30.0±% (SD = 11.7%, n = 8)，隱孢子蟲的平均回收率為 9.8±4.5% (n = 8)。以濾管法進行原木之原蟲分析時，梨形鞭毛蟲的平均回收率為 28.4±11.0% (n = 4)，隱孢子蟲的平均回收率為 9.3±3.3% (n = 4)。使用濾膜法進行原木過濾時，梨形鞭毛蟲的平均回收率為 38.2±18.5% (n = 4)，隱孢子蟲的平均回收率為 16.0±1.7% (n = 3)，而以濾膜法進行清水過濾時，梨形鞭毛蟲的平均回收率為 40.44±9.7% (n = 5)，隱孢子蟲的平均回收率為 17.5±3.2% (n = 5)。

進行原蟲分析方法回收率評估時，其誤差主要來自計算正控制組中原蟲含量所產生的誤差以及原蟲分析過程所產生的操作誤差。在比較原木與清水間原蟲回收率時可發現，不論使用濾管法或濾膜法，清水的原蟲回收率皆比原木高。此外，本研究結果亦顯示，不論使用何種水樣，濾膜法的原蟲回收率皆比濾管法高。而隱孢子蟲在所有水樣中以任一種分析方法所測得之回收率皆比梨形鞭

毛蟲低，其可能原因為隱孢子蟲之卵孢囊較小，不但較容易透過濾材，而且會截留於採樣濾材較深處，導致在過濾與流洗過程其回收率較低。

濾管法及濾膜法之原蟲偵測極限

以濾管法及濾膜法分析實際水樣時，各種水質型態的原蟲偵測極限值如圖 2 所示。整體而言，大淨水場的清水其原蟲平均偵測極限值最低，大淨水場的原水之原蟲平均偵測極限值最高。以濾管法進行原蟲分析時，所求得之偵測極限值較為穩定，其在原水、清水以及簡易自來水中的原蟲平均偵測極限值分別為 $14.4 \pm 4.7 / 100 \text{ L}$ ($n = 10$)、 $5.2 \pm 2.6 / 100 \text{ L}$ ($n = 10$) 以及 $6.3 \pm 3.7 / 100 \text{ L}$ ($n = 6$)。所有由濾膜法所求得之原蟲偵測極限值皆比濾管法所求得的偵測極限值为高，其在清水以及簡易自來水中的原蟲平均偵測極限值分別為 $20.5 \pm 16.0 / 100 \text{ L}$ ($n = 10$) 以及 $24.8 \pm 14.7 / 100 \text{ L}$ ($n = 6$)。以濾膜法分析大型水廠之原水時，由於濁度過高，所能過濾的原水體積太少，以致於平均偵測極限值高達 $259.3 \pm 289.6 / 100 \text{ L}$ 。此平均偵測極限值乃比濾膜法之水廠清水偵測極限值高 16 倍，也比簡易自來水之偵測極限值高 10.4 倍。

偵測極限值的高低，主要乃取決於分析方法所能過濾的水量，而高偵測極限值會導致真值與偵測值上產生較大的誤差。造成濾膜法偵測極限值過高之原因，主要在於濾膜極易被水體中的雜質顆粒所堵塞。濾管法較適用於用在水質較差的水體，因為此種水體中原蟲含量較多，可忍受濾管法的低回收率。另外，此類水體通常需要較低的偵測極限來估算原蟲之含量，以免其分析值經放大後與真值差距過大。至於濾膜法則適用於水體中顆粒少、水質較佳的水體，此種水體中原蟲含量極少，因此需要以原蟲回收率較大的方法分析，才不致使誤差過大。

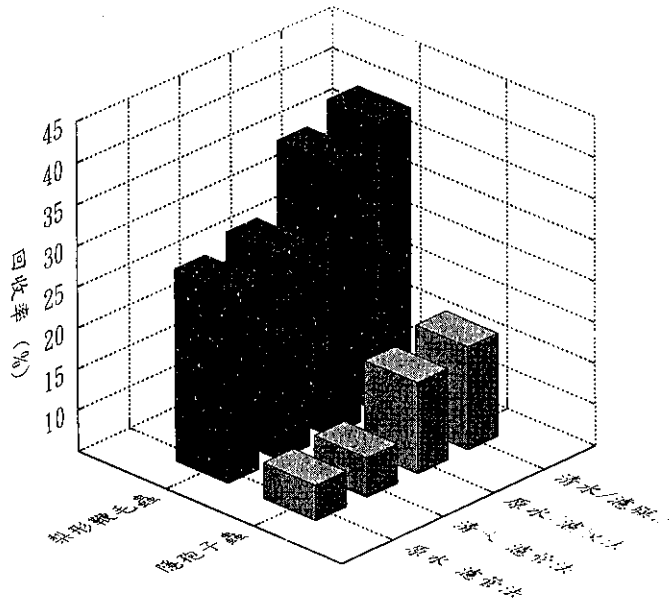


圖 1 原水與清水以濾管法與濾膜法進行分析時梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲之回收率

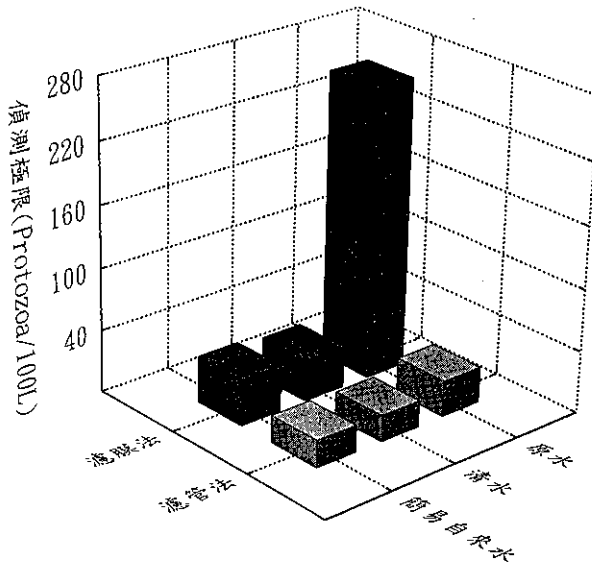


圖 2 以濾管法及濾膜法分析實際水樣時原蟲的偵測極限

濾管法及濾膜法分析國內水樣中原蟲含量之結果

本研究中淨水場原水、清水以及簡易自來水的採樣體積、原蟲含量、濁度以及指標微生物之分析值乃列於表 1 與表 2。研究結果顯示，梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲廣泛存在於台灣的水體當中。五處大淨水場之原水以濾管法進行原蟲分析時，梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲的平均含量分別為 588.5 cysts/100 L 與 682.6 oocysts/100 L。以濾膜法進行原水分析時，其梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲的平均含量則分別為 2,408.2 cysts/100 L 與 1,928.8 oocysts/100 L。五處淨水場之清水以濾管法進行原蟲分析時，其梨形鞭毛蟲的平均含量為 57.0 cysts/100 L，隱孢子蟲的平均含量為 158.0 oocysts/100 L；以濾膜法進行分析時，其梨形鞭毛蟲的平均含量為 84.5 cysts/100 L，隱孢子蟲的平均含量為 70.4 oocysts/100 L。當六處簡易自來水以濾管法進行分析時，梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲的平均含量分別為 195.2 cysts/100 L 與 70.0 oocysts/100 L；以濾膜法進行分析時，梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲的平均含量則分別為 273.9 cysts/100 L 與 109.1 oocysts/100 L。

在兩種原蟲分析法相關性之比較上，以濾管法與濾膜法分析水廠清中原蟲含量時，其分析結果最具相關性(Spearman $R = 0.882$, $p < 0.001$)，分析水廠原水時亦具有不錯之相關性(Spearman $R = 0.683$, $p < 0.001$)，分析簡易自來水時則此兩種分析方法不具相關性(Spearman $R = 0.334$, $p = 0.150$)。造成濾管法與濾膜法分析結果不同的原因有偵測極限值的差異、分析過程所產生的誤差以及每次的採樣皆可視為獨立事件。

表 1 淨水場原水與清水中原蟲含量與水質參數

水樣種類	採樣器材	採集水量(公升)	囊孢子含量(Cysts/100L)	卵孢子含量(Oocysts/100L)	總菌落數(CFU/ml)	大腸桿菌密度(CFU/100mL)	<i>E. coli</i> (CFU/100mL)	糞便大腸菌(CFU/100mL)	腸球菌(CFU/100mL)	濁度(NTU)
原水-1	濾管	225	540	117	9.9×10^4	2.4×10^5	1.7×10^4	9.5×10^4	1.4×10^4	320
	濾膜	0.88	4,929	<5,887						
原水-1	濾管	200	3,175	921	1.7×10^5	3.8×10^6	1.05×10^5	1.29×10^5	2.65×10^3	110
	濾膜	2.05	3,190	1,524						
清水-1	濾管	400	123	189	<1	24	10	<10	<10	4.0
	濾膜	19	<130	<300						
清水-1	濾管	300	92	157	<5	2	1.5	<1	<1	0.4
	濾膜	12.6	687	<113						
原水-2	濾管	200	119	<180	3.2×10^3	2.5×10^4	1.6×10^3	588	80	41
	濾膜	4.39	350	712						
原水-2	濾管	200	554	613	2.7×10^4	4.2×10^3	150	1.6×10^3	<1	9.1
	濾膜	3.2	11,027	2,441						
清水-2	濾管	400	63	292	5	113	99	2	<1	1.9
	濾膜	24	<108	<250						
清水-2	濾管	300	103	<38	<5	2	1	<1	<1	0.4
	濾膜	50	49	<29						
原水-3	濾管	200	<29	2,079	729	3.3×10^4	2.0×10^3	2.2×10^3	38	25
	濾膜	4.1	425	2,033						
原水-3	濾管	150	583	888	4.45×10^4	2.85×10^5	100	1.03×10^4	2.95×10^2	39
	濾膜	1.6	3,268	7,813						
清水-3	濾管	400	<17	<52	<5	14	4	<1	<1	0.9
	濾膜	20	41	<95						
清水-3	濾管	300	143	183	<5	4	2	<1	<1	0.4
	濾膜	30	41	143						
原水-4	濾管	200	28	<84	471	3.4×10^4	1.0×10^3	503	33	3.3
	濾膜	16	<54	130						
原水-4	濾管	250	286	871	1×10^4	3.5×10^4	1.6×10^3	2.4×10^3	43	1.5
	濾膜	5	349	3,333						
清水-4	濾管	400	<22	<67	<1	19	7	<1	<1	0.5
	濾膜	20	<31	<71						
清水-4	濾管	300	31	32	<1	2	<1	<1	<1	0.4
	濾膜	50	12	86						
原水-5	濾管	200	41	<125	3.65×10^4	3.4×10^5	2.0×10^3	550	2	1.5
	濾膜	2.8	<622	<2,473						
原水-5	濾管	100	260	1,319	2.5×10^3	5.35×10^4	1×10^3	300	14	51
	濾膜	1.6	545	1,302						
清水-5	濾管	200	<9	<27	5	4	1	<1	<1	0.7
	濾膜	13.5	<61	<141						
清水-5	濾管	250	16	728	5	9	7	1	<1	2.3
	濾膜	30	14	475						

表 2 簡易自來水中原蟲含量與水質參數

水樣種類	採樣器材	採集水量(公升)	囊孢子含量(Cysts/100L)	卵孢子含量(Oocysts/100L)	總菌落數(CFU/1ml)	大腸桿菌群密度(CFU/100ml)	<i>E. coli</i> (CFU/100ml)	糞便大腸菌(CFU/100ml)	腸球菌(CFU/100ml)	濁度(NTU)
原水-1	濾管	250	32	98	2.2×10 ⁴	4.15×10 ³	500	30	26	0.8
	濾膜	10	448	357						
原水-2	濾管	250	988	322	1.0×10 ⁴	5.75×10 ⁴	1.0×10 ³	2.9×10 ³	11	0.3
	濾膜	10	1,046	179						
原水-3	濾管	250	151	<92	3.5×10 ³	1.75×10 ⁴	750	310	46	0.4
	濾膜	15	149	119						
原水-4	濾管	300	<5	<15	10	132	14	1	<1	0.1
	濾膜	60	<22	<52						
原水-5	濾管	200	<7	<21	192	2.7×10 ³	10	<10	<10	0.3
	濾膜	34.7	<38	<90						
原水-6	濾管	250	<24	<72	550	9.9×10 ³	1.3×10 ³	1.1×10 ³	<10	1.5
	濾膜	20	<131	<313						

原蟲含量與水質指標之相關性

各水廠原水以及簡易自來水的水樣以濾管法與濾膜法進行分析後，所得之原蟲含量值與水質指標的相關性分析值乃列於表 3。以濾管法所測得的梨形鞭毛蟲含量與總菌落數(Spearman R = 0.797, p < 0.001)的相關性最高，依次為糞便大腸菌群(Spearman R = 0.700, p = 0.002)、大腸桿菌群(Spearman R = 0.657, p = 0.005)以及腸球菌(Spearman R = 0.505, p = 0.045)。以濾管法所測得的隱孢子蟲含量則僅與糞便大腸菌群(Spearman R = 0.555, p = 0.025)以及濁度(Spearman R = 0.533, p = 0.033)具相關性。至於以濾膜法所測得之梨形鞭毛蟲含量也是與總菌落數(Spearman R = 0.715, p = 0.002)間的相關性最高，依次為糞便大腸菌群(Spearman R = 0.642, p = 0.007)及濁度(Spearman R = 0.589, p = 0.016)。而以濾膜法所測得之隱孢子蟲含量則與濁度以及任何指標微生物皆不具相關性。

表3 濾管法與濾膜法所測得之原蟲含量與水質參數的相關性分析之結果

分析方法	原蟲	總菌落數	大腸桿菌群	<i>E. coli</i>	糞便大腸菌群	腸球菌
濾管法	<i>Giardia</i>	R = 0.794 P < 0.001	R = 0.657 P = 0.006	R = 0.229 P = 0.391	R = 0.700 P = 0.002	R = 0.505 P = 0.045
	<i>Cryptosporidium</i>	R = 0.418 P = 0.107	R = 0.454 P = 0.077	R = 0.271 P = 0.309	R = 0.555 P = 0.025	R = 0.354 P = 0.178
濾膜法	<i>Giardia</i>	R = 0.715 P = 0.002	R = 0.394 P = 0.131	R = 0.154 P = 0.576	R = 0.642 P = 0.007	R = 0.456 P = 0.076
	<i>Cryptosporidium</i>	R = 0.360 P = 0.170	R = 0.271 P = 0.309	R = 0.049 P = 0.856	R = 0.454 P = 0.077	R = 0.377 P = 0.149

四、結 論

1. 在原蟲分析方法之回收率的比較上，清水的原蟲回收率皆比原水高，濾膜法的原蟲回收率比濾管法高，梨形鞭毛蟲的回收率比隱孢子蟲高。
2. 以濾管法及濾膜法分析實際水樣時，濾管法所求得之偵測極限值較為穩定，濾膜法所求得之偵測極限值則波動較大，尤其以濾膜法分析淨水場原水之平均偵測極限值高達 $259.3 \pm 289.6/100 \text{ L}$ 。
3. 台灣的水體中，梨形鞭毛蟲與隱孢子蟲的含量頗高。以濾管法與濾膜法同時分析水廠原水與清水中原蟲含量時，證實此兩種分析方法皆具相關性。
4. 以濾管法所求得的梨形鞭毛蟲含量與水質指標之相關性依序為總菌落數、糞便大腸菌群、大腸桿菌群與腸球菌；隱孢子蟲含量只與糞便大腸菌群以及濁度具相關性。至於以濾膜法所求得之梨形鞭毛蟲含量與水質指標之相關性依序為總菌落數、糞便大腸菌群與濁度；而隱孢子蟲含量則不與任何指標微生物具相關性。

五、致 謝

本研究承蒙行政院環保署之經費補助(計畫編號 EPA-88-J102-03-008)及環檢所王鵬榮副研究員之協助，謹致謝意。

參 考 文 獻

1. Cook G. C., Entamoeba histolytica and Giardia lamblia infection: current diagnostic strategies, *Parasite*, 2(2): 107-112, 1995.
2. Fout G. S., Schaefer III, F. W., Messer J. W., Dahling D. R. and Stetler R. E., ICR Microbial Laboratory Manual, EPA 600/R-95/178. USEPA, Ofce. of Research and Development, Washington, DC, 1996.
3. SoloGabriele H. and Neumeister S., US outbreaks of cryptosporidiosis, *J. Am. Water Works Assoc.*, 88(9): 76-86, 1996.
4. Kramer M. H., Herwaldt B. L., Craun G. F., Calderon R. L. and Juranek D. D., Waterborne disease: 1993 and 1994, *J. Am. Water Works Assoc.*, 88(3): 66-80, 1996.
5. Hsu B. M., Huang C. P., Jiang G. Y. and Hsu C. L. L., The prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Taiwan water supplies, *J. Toxicol. Env. Heal. A*, 57(3): 149-160, 1999.
6. Hsu B. M., Huang C. P., Hsu C. L. L., Hsu Y. F. and Yeh J. H., Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in the Kau-Ping River and its watershed in southern Taiwan, *Water Res.*, 33(11): 2701-2707, 1999.
7. Teunis P. F. M., Medema G. J., Kruidenier L. and Havelaar A. H., Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in drinking water from a surface water source, *Wat. Res.*, 31(6): 1333-1346, 1997.
8. Eisenberg J. N. S., Seto E. Y. W., Colford J. M., Olivieri A. and Spear R. C., An analysis of the Milwaukee cryptosporidiosis outbreak based on a dynamic model of the infection process, *Epidemiology*, 9(3): 255-263, 1998.

9. Perz J. F., Ennever F. K. and Le Blancq S. M., Cryptosporidium in tap water - comparison of predicted risks with observed levels of disease, *Am. J. Epidemiol.*, 147(3): 289-301, 1998.
10. USEPA, ICR Protozoan Method for Detecting Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in Water by a Fluorescent Antibody Procedure, *EPA/814-B-95/003. USEPA, Ofce. of Ground Water and Drinking Water, Washington, DC.*, 1995.
11. LeChevallier M. W., Norton W. D., Siegel J. E. and Abbaszadegan M., Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2): 690-697, 1995.
12. USEPA, Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/ IMS/ FA, *EPA/821-R-99/006. USEPA, Ofce. of Water, Washington, DC.*, 1999.
13. Clancy J. L. and Hansen J., Uses of protozoan monitoring data, *J. Am. Water Works Assoc.*, 91(5): 51-65, 1999.
14. APHA, Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, *19th ed. Am. Publ. Hlth. Assoc.*, Washington, D.C., 1995.