

水樣濁度對以免疫磁性分離法進行隱孢子蟲孢囊檢測回收率之影響

黃志彬、張智淵、吳璧如

交通大學環境工程研究所

摘要

隱孢子蟲是常見水媒傳染病，以糞口傳染作為感染途徑，受到感染的宿主會導致隱孢子蟲症。目前淨水場消毒單元並無法有效抑制孢囊生長，仍以砂濾池作為去除孢囊之最後一道防線。除了持續監測出流水中孢囊存在的可能性外，反沖洗水中孢囊含量為反沖洗水再利用之重要參考依據。目前普遍用來分離隱孢子蟲孢囊之方法為免疫磁性分離法，其利用抗體抗原之專一性反應，可有效捕捉到孢囊來與雜質分離。因此，針對濁度對隱孢子蟲檢測之影響，本研究先以自行添加隱孢子蟲孢囊在人工濁水中，探討濁度對以免疫磁性分離法檢測隱孢子蟲孢囊影響，後續再以淨水場之反沖洗水做進一步檢測回收率評估。

本研究首先針對免疫磁性分離法中 0.1N HCl 破壞磁珠和孢囊之間鍵結試驗，得到最佳操作條件為混合時間 30 秒，混合 3 次。再以高嶺土顆粒製備人工濁水，進行濁度對於隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響之探討，結果發現適當的濁度會促進孢囊偵測回收率，其濁度為 0.5 NTU。當濁度大於 0.5 NTU，孢囊檢測回收率隨濁度增加所而逐漸下降，尤其當濁度為 10 ~ 40 NTU 最為明顯且 $r^2 = 0.999$ 。最終利用包括濃縮程序之離心力、離心時間、磁珠劑量和人工濁水稀釋來改善濁度水體之孢囊檢測回收率，其中濁度稀

釋可有效提升孢囊檢測回收率。此外，目前以新竹第一淨水場之反沖洗水進行隱孢子蟲孢囊檢測，反沖洗水濁度為 834 NTU，初步結果顯示無法偵測到孢囊，可能原因是受到濁度干擾所致，因此可利用濁度稀釋來改善檢測回收率，未來將以北部原蟲出現機率高水之水場反沖洗水作測試。

關鍵字：隱孢子蟲、免疫磁性分離法、濁度

1.前言

隱孢子蟲是造成水媒傳染疾病中常見的原生動物，主要寄生在多種哺乳類動物、鳥類和人類體內，目前被認定對人類造成感染的主要物種為 *Cryptosporidium parvum*，遭受感染的染宿主會導致隱孢子蟲症 (Cryptosporidiosis) 且以糞口傳染為主要傳播途徑⁽¹⁾。過去曾經在 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⁽²⁾，2005 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。隱孢子蟲脫離宿主後會形成孢囊來抵抗環境，隱孢子蟲孢囊大小為 4~6 μm 且具抗氯性，因此加氯消毒單元無法有效抑制隱孢子蟲生長。淨水程序中若無法透過混凝沉澱單元將孢囊有效去除，孢囊大小會落在砂濾池最難處理範圍內造成處理效果不佳，進行週期性砂濾池反沖洗使去除濾料表面膠羽和孢囊以維持過濾功能，同時造成反沖洗水中具孢囊存在且其含量為原水的 60 倍⁽³⁾。

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⁽⁴⁾，而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 雖然是目前新穎方法，在應用上仍有部分限制存在，包括水樣濁度和藻類所發出自發性螢光皆會對檢測結果造成干擾，因此造成檢測回收率低和變異性大之問題⁽⁴⁾。

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。首先在免疫磁性分離法中尋求最佳操作條件並利用濃縮程序中之不同離心強度和不同離心時間，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。最終檢測淨水場之反沖洗水中孢囊含量及濁度影響評估。

2. 實驗材料與方法

2.1 水樣來源 本研究所使用的水樣包括去離子水、利用高嶺土顆粒製備之人工濁水和淨水場之反沖洗水（台灣省自來水公司新竹第一淨水場、台北市自來水營業處長興淨水場）。

2.2 隱孢子蟲孢囊儲備溶液 本研究中鍵結分離試驗和人工濁水試驗皆是以自行添加隱孢子蟲孢囊來進行，孢囊來自於 Waterborne, Inc. (New Orleans, LA, USA) 之產品，隱孢子蟲孢囊標準溶液濃度為 10^7 oocysts/ 8 ml。本研究利用 0.1% PBS 溶液稀釋，製備隱孢子蟲孢囊儲備溶液，其最終濃度為 200 oocysts/ 10 μ l。

2.3 免疫磁性分離法 主要根據 USEPA Method 1623，並參照磁珠製造公司 Dynal Co. 之操作手冊中操作步驟進行，本研究依相同濃度等比例稀釋後進行。首先將 500 μ l 之 10 \times SL-buffer A/B 和 50 μ l 之 Dynabeads (磁珠) 添加至

平板試管中，並放置磁性抗體分離器上以轉速 18 rpm，旋轉 1 h。將以結合孢囊之磁珠利用磁性顆粒收集器 (MPC-1)收集，把懸浮液去除。再利用 1× SL-buffer A 將以結合孢囊之磁珠從平板試管轉移至 1.5 ml 離心管，再利用磁性顆粒收集器 (MPC-M)收集，把懸浮液去除。最終添加 50 μl 之 0.1 N HCl 至 1.5 ml 離心管中且震盪混合，再全量轉移至 SuperStick™ 玻片上，轉移前需先在 SuperStick™ 玻片上添加 5 μl 之 1 N NaOH。最終進行免疫螢光染色及螢光顯微鏡 (E400, Nikon, Japan)檢驗。

2.4 免疫螢光染色 主要根據 USEPA Method 1623，並參照螢光抗體染劑製造公司 Waterborne, Inc.之操作手冊建議步驟進行。首先將含有孢囊之玻片放置烘箱中風乾，再添加 1 滴 Aqua-Glo G/C antibody reagent 至玻片上並均勻分散。把玻片放置塑膠盒中並放置烘箱中，溫度為 37 °C 靜置 30 分鐘。以 1× Wash buffer 清洗玻片後並添加 1 滴 counterstain 且靜置 1 分鐘。再次以 1× Wash buffer 清洗玻片後，放置烘箱中風乾。最終添加 1 滴 Mounting Medium 並蓋上玻片。

2.5 檢測回收率計算 樣本經螢光抗體染色後，利用螢光顯微鏡進行觀察辨識和計數，最終計算樣本之孢囊檢測回收率。孢囊檢測回收率公式如公式二所示。

$$R(\%) = \frac{N}{T} \times 100 \quad (\text{公式二})$$

R 表示檢測回收率

N 表示水樣中檢測到孢囊數目

T 表示自行添加至水樣中孢囊數目

3.結果與討論

3.1 鍵結分離試驗

本實驗自行添加隱孢子蟲孢囊數目為 467 ± 41 顆於 1.5 ml 去離子水中，經免疫磁性分離並固定 0.1N HCl 與已結合磁珠-孢囊混合時間為 30 秒，反覆進行五次，最終檢測到五次累積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 1 結果發現，隨著 0.1N HCl 與磁珠-孢囊混合次數增加，累積孢囊數目有明顯提升。當進行第三次 0.1N HCl 與磁珠-孢囊混合時，孢囊累積數目已達穩定。累積五次 0.1N HCl 與磁珠-孢囊混合所得最終檢測之孢囊數目分別為 142、184 和 186 顆，同時計算其孢囊平均檢測回收率為 41%。結果發現當僅進行第一次 0.1N HCl 與磁珠-孢囊混合時，無法完全將孢囊和磁珠分離使第一次混合所得到檢測之孢囊數目較少，表示有部份孢囊與磁珠之間鍵結仍未完全遭破壞，造成現殘餘鍵結存在的現象。為了可將孢囊與磁珠之間鍵結破壞完全，進行多次反覆 0.1N HCl 與孢囊-磁珠混合步驟使最終檢測之孢囊數可較完全。針對破壞磁珠與孢囊之間鍵結效率，本研究之先前試驗曾延長 0.1N HCl 與孢囊-磁珠混合時間及提升 HCl 濃度，最終檢測孢囊數目並無顯著提升甚至 HCl 濃度過高造成破壞孢囊（數據沒有展示）。因此，本研究之 0.1N HCl 與孢囊-磁珠混合之最佳操作條件為混合頻率是每次 30 秒，反覆進行 3 次混合，最終累積檢測孢囊數目和檢測回收率。同時，本研究中人工濁水試驗亦參照以此最佳操作條件來進行。

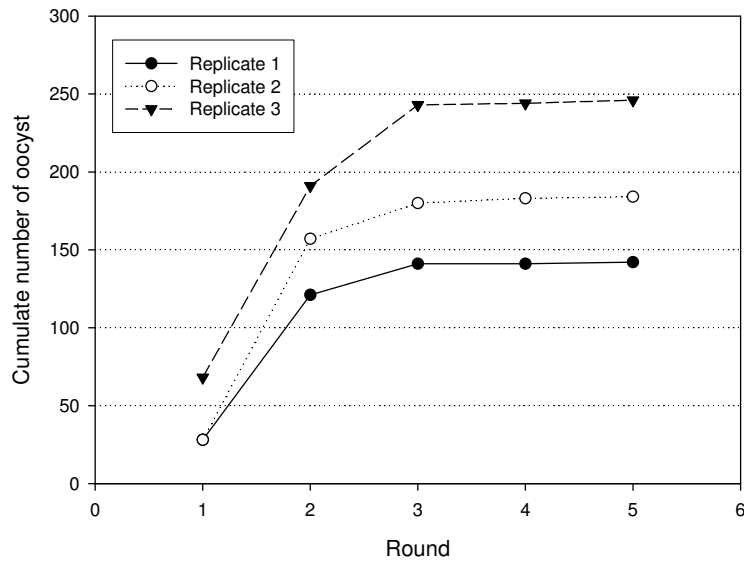


圖 1 0.1N HCl 與已結合孢囊磁珠之混合次數對孢囊數目關係

3.2 人工濁水試驗

利用高嶺土顆粒配製不同濁度之人工濁水來探討顆粒濁度對孢囊檢測回收率影響且人工濁水水質特性及粒徑分布如表 1 和圖 2 所示。本實驗中水樣濁度分別為 0.5、1、10、20、30、40、50 和 100 NTU，及無添加高嶺土顆粒之純水水樣作為對照組，並且控制固體物體積皆小於 0.5 ml 以維持在含雜質固體物環境中之磁珠捕捉孢囊能力，可避免由於分裝樣本造成之孢囊損失誤差。本實驗以 4 重複(總樣本數 $N=33$)進行，自行添加含 244 ± 96 顆隱孢子蟲孢囊於 50 ml 水樣中，經免疫磁性分離法並依據 0.1N HC 之最佳操作條件進行。由圖 3 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，同時表示適當的濁度可以促使孢囊與雜質顆粒碰撞結合來增加孢囊檢測回收率⁽⁵⁾。針對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)，當水樣濁度為 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 ($p < 0.05$)。Hu *et al.* (2004) 指出當研究中自行添加含砂顆水體，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。

對於 0.5~100 NTU 範圍內濁度與孢囊檢測回收率關係進行直線回歸分析，結果為當濁度在 1~50、1~40 和 10~40 NTU 之範圍內其濁度對孢囊檢測回收率影響關係最為顯著且線性關係分別為 $r^2 = 0.975$ 、 $r^2 = 0.996$ 和 $r^2 = 0.999$ ，如表 3 所示。

表 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 (μm)	0.1~10
界達電位 (mV)	-46.0
導電度 (mS/cm)	0.151

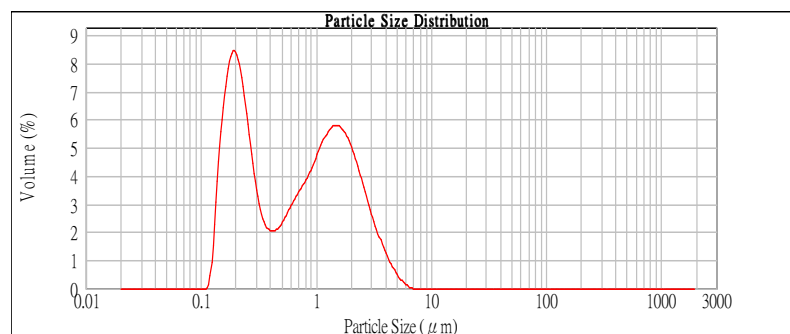


圖 2 高嶺土顆粒配製人工濁水之粒徑分布

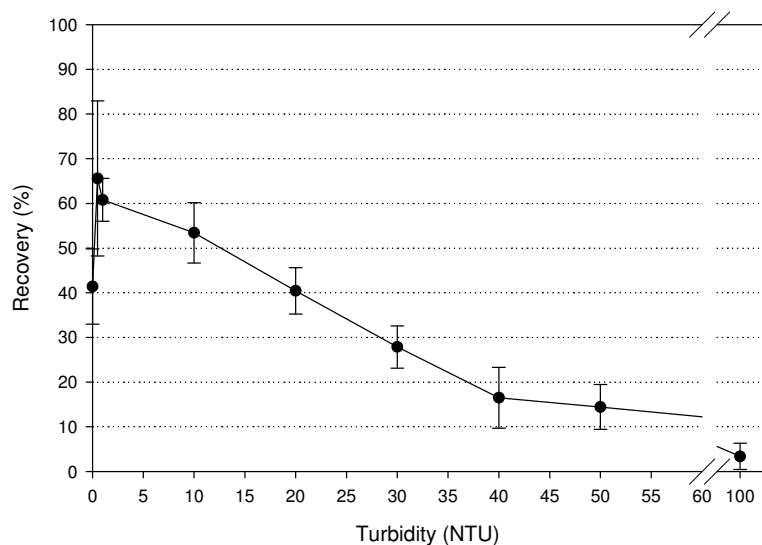


圖 3 濁度對隱孢子蟲孢囊檢測回收率影響關係

表 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

3.3 改善濁度水樣之孢囊檢測回收率

為了達到改善濁度對孢囊檢測回收率之影響，本研究先前試驗曾進行包括濃縮程序中不同離心強度和不同離心時間，以及磁珠劑量和稀釋流洗液來改善孢囊檢測回收率。其中不同離心強度、不同離心時間和磁珠劑量皆無法達到顯著改善(無數據展示)。最終以稀釋流洗液來改善流洗液之孢囊檢測回收率，以降低流洗液濁度對孢囊檢測回收率影響。本實驗以 4 重複試驗 (總樣本數 $N=30$) 進行，自行添加 244 ± 96 顆隱孢子蟲孢囊於 50 ml 水

樣中，將自行配製濁度為 20、40 和 100 NTU 以及無添加高嶺土顆粒之純水樣稀釋 50% 且期望稀釋後水樣中所存在自行添加之孢囊數目成等比例被稀釋。由圖 4 結果發現，無論稀釋前後，隨流洗液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無添加高嶺土顆粒之 41.4% 下降至 100 NTU 之 3.38%，稀釋後孢囊檢測回收率從無添加高嶺土顆粒之 54.1% 下降至 100 NTU 之 2.44%。另外，再分別比較相同濁度稀釋前後之孢囊檢測回收率，圖 4 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升緩和，其中以 20 NTU 之提升效過最好且提升效率為 13.1%，說明稀釋流洗液可促使孢囊檢測回收率提升且以低濁度較為明顯。

最終本研究對於長興淨水場、新竹第一淨水場之反沖洗水樣進行隱孢子蟲和梨形鞭毛蟲孢囊檢測，兩水場之反沖洗水水質條件及原蟲孢囊含量如表四所示。新竹第一淨水場和長興淨水場之反沖洗水濁度分別為 834 和 337 NTU，則新竹第一淨水場過濾濃縮後流洗液依據標準方法中流洗液固體物體積佔水樣總體積 1/20 之比例原則須加以稀釋後進行免疫磁性分離法，結果顯示隱孢子蟲與梨形鞭毛蟲孢囊皆小於偵測極限 (non-detectable, N.D)；另外，長興淨水場之反沖洗之固體物含量不需進行稀釋步驟所得到隱孢子蟲和梨形鞭毛蟲孢囊含量分別為 37.5 cysts/10L 和 25 oocysts/10L，上述結果說明新竹第一淨水場之孢囊含量檢測透過稀釋流洗液之改善步驟仍無法有效檢測出孢囊含量，突顯出免疫磁性分離法受到高濁度之干擾仍然存在。

表 4 淨水場反沖洗水之水質條件及原蟲含量

淨水場名稱	濁度 (NTU)	流洗液濁度 (NTU)	pH 值	隱孢子蟲胞囊 (oocysts/10L)	梨形鞭毛蟲胞囊 (cysts/10L)
新竹第一淨水廠	834	14400	7.5	<200	<200
長興淨水廠	337	3630	7.0	25	37.5

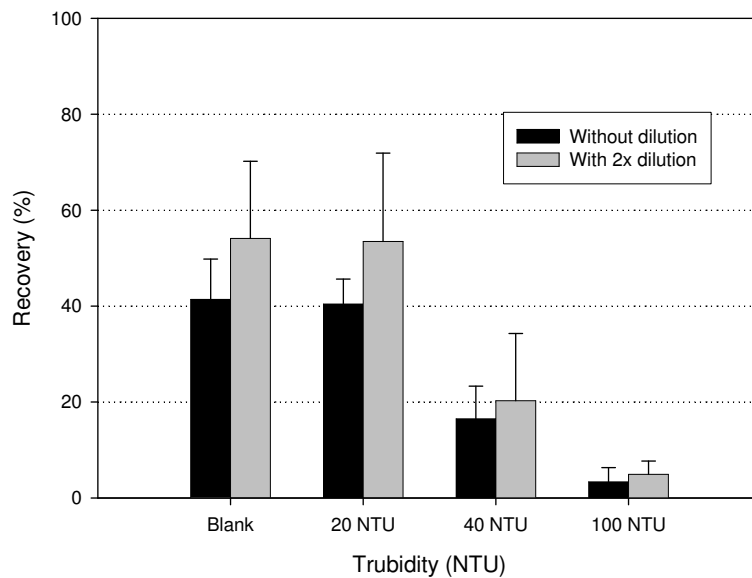


圖 4 不同濁度水樣稀釋前後濁度水體之隱孢子蟲胞囊檢測回收率

4. 結論

免疫磁性分離法為目前普遍檢測隱孢子蟲和梨形鞭毛蟲胞囊之方法，本研究針對提升胞囊檢測回收率、探討濁度對於免疫磁性分離法影響和淨水場之反沖洗水中隱孢子蟲和梨形鞭毛蟲之胞囊含量檢測。結果發現免疫磁性分離法中 0.1N HCl 與胞囊-磁珠混合之最佳操作條件頻率為混合次數 3 次，每次 30 秒。當濁度範圍在 0~0.5 NTU，胞囊檢測回收率隨濁度增加而提升，隨後 0.5~100 NTU，胞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，其中濁度範圍在 10~40、1~40、和 1~50 NTU 內胞囊檢測回收

率與濁度關係呈線性關係下降且 $r^2=0.999$ 、 $r^2=0.995$ 和 $r^2=0.975$ ，最終利用稀釋流洗液來提升孢囊檢測回收率並且發現長興淨水場之反沖洗水中含較多孢囊存在。

參考文獻

1. O'Donoghue, P. 1995. Cryptosporidium and Cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25, 139-195.
2. 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.
3. Arora, H., Giovanni, G.D., and LeChevallier, M. 2001. Spent filter backwash water containments and treatment strategies. *J. AWWA.* 39, 100-112.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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. Microbiological Methods.* 58, 321-325.