การศึกษาครั้งนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) สำเร็จจำนวน 3 โคลน ที่จำเพาะต่อโปรตีน CYP1A (ตัวชี้วัดชีวภาพ) พบว่ามี 2 isoform คือขนาด 56 และ 74 KDa วิเคราะห์โดยเทคนิค Western Blot ทั้งนี้ความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้มีการทดสอบยืนยันด้วนเทคนิค Dot blot และ Immunohistochemistry ในปลาชนิดอื่นๆ และกุ้งขาว และได้นำ Mab ตรวจการแสดงออกของ โปรตีน CYP1A ในปลาทะเลธรรมชาติตามแนวชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี แต่ได้ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี, PAb ตรวจในหอยแมลงภู่จากฟาร์มเลี้ยง มี 3 สถานีเก็บตัวอย่างเปรียบเทียบคือ อ่างศิลา เกาะลอยศรีราชา และแหลมท้าวเทวา

การสำรวจทั้งฤดูฝนและฤดูแล้งตลอดปีพ.ศ. 2550-2552 มีการพบปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* รวมส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 0 to 10^3 CFU/ml ทั้งในไตปลาทะเลและทางเดินอาหารหอยแมลงภู่ และพบส่วนใหญ่เป็น *Vibrio alginolyticus* มีชนิดก่อโรคแต่มีปริมาณเล็กน้อยคือ *Vibrio parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* และมีการพบปริมาณและชนิดของพาราไซท์ภายนอกและภายในจากในปลาทะเลอีกจำนวนหนึ่งในกลุ่ม Plathyhelminthes, Acantocephla และ Arthropoda พบโปรตีน CYP1A ได้ทั้งปลาทะเล และหอยแมลงภู่

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ของการปรากฏสาร PAHs ในดินตะกอน ในปลาทะเล และหอยแมลงภู่ และการแสดงออกของโปรตีน CYP1A ในสัตว์ทะเล พบว่าค่าความเข้มข้นของสาร PAHs ในปลาทะเล (ประมาณ 20 ชนิด) ตลอด 3 ปี มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ($p=0.002$) ระหว่างปีที่ทำการศึกษา โดยพบความเข้มข้นของสาร PAHs สูงสุดในพศ. 2550 (ความเข้มข้นรวมเฉลี่ยของ PAHs เท่ากับ 0.126 µg/g) อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างของความเข้มข้นของสาร PAHs ในแต่ละฤดูกาล (ฤดูแล้งและฤดูฝน) ของแต่ละปี และระหว่างสถานีทั้ง 3 สถานี ส่วนผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าความเข้มข้นของสาร PAHs ในหอยแมลงภู่ พบว่ามีความแตกต่างของค่าความเข้มข้นที่ตรวจพบระหว่างสถานีที่เก็บตัวอย่าง โดยความเข้มข้นของสาร PAHs ในหอยแมลงภู่ที่สถานีอ่างศิลาสูงที่สุด (ค่าเฉลี่ย 0.8492 µg/g) ส่วนค่า PAHs ในตะกอนดินที่สถานีแหลมท้าวเทวาสูงที่สุด (ค่าเฉลี่ย 0.3467 µg/g) ซึ่งสูงกว่าอ่างศิลาและศรีราชาที่ไม่พบสาร PAHs เลย อย่างไรก็ตาม ไม่พบความต่างระหว่างฤดูกาล (ฤดูแล้งและฤดูฝนของความเข้มข้น PAHs ในทั้งหอยแมลงภู่ ($p = 0.121$) และตะกอนดิน ($p=0.180$)

เมื่อพิจารณาข้อมูลของทุกสถานี สหสัมพันธ์ (Correlations) ระหว่างความเข้มข้นของสาร PAHs ในหอยแมลงภู่และตะกอนดิน ใน ปี 2552 พบว่าความเข้มข้นของสาร PAHs ในหอยแมลงภู่ แปรผกผันกับความเข้มข้นที่พบในตะกอน (ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์=-0.459, $p=0.055$) แต่เมื่อพิจารณา เฉพาะค่าที่ตรวจพบที่สถานีแหลมเท้าเทวา (ค่าความเข้มข้นอยู่ในระดับที่ตรวจวัดได้) พบว่าความเข้มข้นของสาร PAHs ที่พบในหอยแมลงภู่ มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับความเข้มข้นของค่าที่พบในตะกอนดิน (ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ที่ 0.654, $p=0.159$)

การศึกษานี้ตรวจพบปริมาณสาร PAHs ในปลาทะเล ในระดับที่ค่อนข้างต่ำอยู่ในช่วง 0-0.3 µg/g โดยมีปลาที่ตรวจพบสาร PAHs คิดเป็น 70.73% และปลาที่มีการแสดงออกของโปรตีน CYP1A คิดเป็น 46.3%

ของปลาที่วิเคราะห์ทั้งหมด และจากปลาทะเลที่ตรวจพบสาร PAHs พบว่ามีปลาที่มีการแสดงออกของโปรตีน CYP1A ประมาณ 50 % ของความเข้มข้นแต่ละระดับ ทั้งนี้ สัดส่วนของปลาทะเลที่มีการแสดงออกของโปรตีน CYP1A ที่ศึกษาในฤดูแล้ง มีค่าสูงกว่าในฤดูฝน (ค่าเฉลี่ย = 64.21±13.48 % และ 37.97±19.09 % สำหรับฤดูแล้ง และฤดูฝน ตามลำดับ, p= 0.002) ในขณะที่ปริมาณของสาร PAHs ในหอยแมลงภู่ ใน ปี 2552 มีปริมาณที่ค่อนข้างสูงอยู่ในช่วง 0.05-1.3 μg/g (18 ตัวอย่าง) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของโปรตีน CYP1A ในทุกตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ จากข้อมูลที่มีการพบ CYP1A ในปลาทะเลและหอยแมลงภู่ บ่งชี้สัตว์น้ำมีการสัมผัสกับสารกระตุ้นการสร้างโปรตีน CYP1A ที่ปนเปื้อนอยู่ในระบบนิเวศน์ทางทะเล ดินตะกอน หรือตามห่วงโซ่อาหาร ตามชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เหล่านี้สามารถใช้ในการประเมินความเสี่ยงของสาร PAHs ต่อทรัพยากรสิ่งมีชีวิตและแหล่งน้ำ เพื่อหาแนวทางการจัดการความเสี่ยงทางสิ่งแวดล้อมเบื้องต้น อันเนื่องจากการสะสมของสาร PAHs ในสัตว์ทะเล

ผลทดลองการจัดการความเสี่ยงเบื้องต้นทางสิ่งแวดล้อมของทรัพยากรทางทะเลเพื่อศึกษาระยะเวลาและปริมาณสาร PAHs ที่ตกค้างเหลือในหอยแมลงภู่ได้ถูกทดลอง โดยให้หอยแมลงภู่สัมผัสสาร PAHs (20 ppb) เปรียบเทียบกับ น้ำมันดิบ Crude oil (0.5 ppm) โดยมีตัวชี้วัดชีวภาพ CYP1A เป็นตัวบ่งชี้การสัมผัส ผลการทดลองพบว่า ชุดทดลองให้หอยแมลงภู่สัมผัสสาร PAHs หลัง 1 วัน และ 5 วัน ปริมาณสาร PAHs ยังมีค่าสูงมาก แม้หลังวันที่ 10 ปริมาณจะลดลง 10 เท่าตัว แต่ค่าก็ยังสูงกว่าชุดหอยแมลงภู่สัมผัสกับ Crud oil ตัวชี้วัดชีวภาพ CYP1A ในหอยแมลงภู่ก็ยืนยันการสัมผัสสารทั้ง PAHs และ Crud oil ข้อมูลเหล่านี้ช่วยในการประเมินความเสี่ยงและความปลอดภัยของผู้บริโภคทรัพยากรสิ่งมีชีวิตจำพวกหอย อาศัยตามแนวชายฝั่งทะเลที่มีปัญหาน้ำมันรั่วไหล บ่งชี้สามารถรับประทานหอยได้หลังจาก 10 วัน

แผนงานวิจัยได้มีการอบรมจำนวน 2 โครงการ เพื่อถ่ายทอดความรู้และเทคโนโลยี่สู่สาธารณะคือ เรื่อง การใช้ตัวชี้วัดชีวภาพ Cytochrome P450ในการประเมินการสัมผัสของปลาทะเลต่อสารพิษ โดยเทคนิคทางโมโนโคลนอลแอนติบอดี (มีทฤษฎีและปฏิบัติการ จำนวน 3 วัน) ต่อนักวิทยาศาตร์ และเรื่อง ผลกระทบน้ำมันรั่วไหลในทะเลต่อฟาร์มหอยแมลงภู่และการประเมินค่าความเสียหาย (มีทฤษฎีระยะเวลา 1 วัน) ต่อผู้ประกอบการเลี้ยงหอยแมลงภู่

This study successfully developed three monoclonal antibodies (MAbs) specific to Cytochrome P450 1A (CYP1A) bio-marker protein in Asian seabass (*Lates calcarifer*). Using Western Blot, we found two isoforms of this protein at 56 and 74 KDa. We also tested the cross specificity of the monoclonal antibodies to other marine fish species, Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*), and green mussel (*Perna veridis*) using the Dot Blot and Immunohistochemistry techniques. MAbs could not bind the CYP 1A protein in Pacific white shrimp and green mussel. Our study, then, used the MAbs of CYP1A to detect its expression in wild marine fish and used polyclonal antibodies to detect the same protein in cultured green mussel in both wet and dry seasons of 2550 to 2552 at three stations in the coastal areas of Chonburi province (Angsila, Koh Loi Sriracha and Lamthawthewa).

We also monitored the presence of *Vibrio* bacteria in marine fish species and green mussel. Total Vibrio counts ranged from 0 to10^3 CFU/ml for both groups of animal. Most of the counts consisted of a non pathogenic species, *V. alginolytiucs*. A few counts of pathogenic species included *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. We also detected parasites (Platyhelmintis, Acantocephala, and Arthropoda) in these animals. We detected the expression of CYP1 A in both marine fish species and green mussel.

Based on the results from the two subprojects, we explored the relationships between the concentration of PAHs in sediment, marine fish species and mussels and the expression of CYP1A protein. The concentration detected in marine fish varied among years ($p=0.0002$), with the highest concentration detected in 2550 (mean PAHs concentration = 0.126 μg/g). However, the fish PAHs concentration did not differ among seasons and sites. The mussel PAH concentrations were varied among sites, with the highest concentration in at Ang Sila station (mean concentration = 0.8492 μg/g). The sediment PAHs concentrations were highest at Lamthawthewa (mean=0.3467 μg/g); the PAHs concentrations were non detectable in the two other sites. However, we did not detect the differences among seasons in mussel and sediment PAH concentration.

The mussel PAH concentration were negatively correlated with the PAHs concentrations detected in sediment based on the data at all sites (r^2=-0.459, $p=0.055$). Based on the data at Lamthawthewa (only sampling location with detectable level of PAHs), however, the mussel PAHs concentration were positively with the sediment concentration (r^2= 0.654, $p=0.159$).

PAHs concentrations detected in marine fish were low, ranging from 0-0.3 μg/g. Of all individuals examined, 70.73% had detectable level of PAHs and CYP1A protein was expressed in 46.3% of

individuals examined. Within each level of PAHs detected, approximately 50% of individuals examined expressed a detectable level of CYP1A. The proportion of individuals expressing CYP1A protein varied between seasons (three years); the proportions detected in dry season (mean proportion = 64.21±13.48 %) was higher than those detected in wet season (mean proportion = 37.97±19.09 %). On the other hand, the PAHs concentration detected in mussel were high ranging from 0.05-1.3 μg/g (18 individuals) and all individuals expressed a detectable level of CYP1A protein. The expression of CYP1A biomarker in marine animals indicated that these animals were exposed to CYP1A inducers present in the environment or accumulated in the food chain. The different ecological roles and preferred habitats of these species may determine the level of CYP1A expression. These data can be used to monitor impacts of PAHs to living aquatic resources and to manage the risks of PAHs accumulation in marine animals.

To evaluate the time required for the animals to reduce PAHs levels after the exposure, we investigated the resident time of PAHs in green mussel exposed to PAHs (20 ppb) compared to crude oil (0.5 ppm) using CYP1A protein as a biomarker. Results showed that green mussel retained a high concentration of pollutant after 1 and 5 days. After 10 days, pollutant concentration had decreased 10 folds although values were consistently higher in individuals exposed to crude oil. A biomarker CYP1A confirmed the exposure to PAHs and crude oil. These findings may help the risk assessment of oil spills or leakages to consumer's health. We suggest that green mussels may be consumed after at least 10 days post exposure.

We organized two training courses for scientists and green mussel farmers. For scientists, we hosted a 3-day workshop on 'Application of cytochrome P450 (CYP1A) as a biomarker to detect exposure to organic toxicants in marine fish using monoclonal antibody technique'; the content consisted of theory and practicum. For Green mussel farmers, we hosted a 1-day workshop on 'Effect of oil spill to green mussel farm and risk assessment'.