การประเมินปัญหาอุปสรรคในการขยายพันธุ์นกกระสาคอดำ Black-necked Stork (*Ephippiorhynchus asiaticus*) ในกรงเลี้ยง โดยวิธีศึกษาฮอร์โมน ในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี

Assessment of breeding difficulties in captive Black-necked Stork (*Ephippiorhynchus asiaticus*) by hormonal study at Khao Kheow Open Zoo,Thailand.

อุราพิกา กองพรหม[1], ชัยณรงค์ ปั้นคง[1], ปิ่นอนงค์ ทองนพคุณ[1], นิตยา เพชรสุกร[1], ทรงกลด ภู่ทอง [2] และรัฐพันธ์ พัฒนรังสรรค์[3]

Urarikha Kongprom, Chainarong Punkong, Pinanong Thongnoppakun, Nittaya Petsukorn,

Shongkrod Poothong, and Rattapan Pattanarangsan

[1] งานวิจัย ฝ่ายอนุรักษ์ วิจัยและสุขภาพสัตว์, สวนสัตว์เปิดเขาเขียว 235 หมู่7 ต.บางพระ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี

[2] สถานีเพาะเลี้ยงนกน้ำบางพระ, เขตห้ามล่าพันธุ์สัตว์ป่า จ. ชลบุรี

[3] คณะสัตว์แพทย์, มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จ. นครปฐม

1.บทนำ

นกกระสาคอดำ (*Ephippiorhynchus asiaticus*) จัดเป็นหนึ่งในนกที่มีความสูงมากที่สุดในกลุ่มนกกระสาที่ยังคงเหลืออยู่ในปัจจุบัน เมื่อกว่า 30 ปีก่อนนกชนิดนี้มีถิ่นอาศัยแพร่กระจายพันธุ์และสามารถพบได้ทั่วไปในเขตพื้นที่ชุ่มน้ำต่างๆ ของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ยกเว้นประเทศมาเลเซีย, อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์) รวมถึงบางส่วนของทวีปออสเตรเลียด้วย แต่ปัจจุบันนกกระสาคอดำในธรรมชาติถูกจัดอยู่ในสถานภาพที่ถูกคุกคามโดยเฉพาะในหลายประเทศของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับในประเทศไทยนกระสาคอดำได้ถูกจัดว่าสูญพันธุ์ไปแล้วจากธรรมชาติ สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการสูญพันธุ์คือประสบปัญหาจากการถูกล่าอย่างต่อเนื่องและถิ่นที่อยู่อาศัยถูกทำลายจากการพัฒนาประเทศ ทั้งนี้พบว่ายังมีจำนวนประชากรเล็กน้อยหลงเหลืออยู่ในสภาพของกรงเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ซึ่งถือเป็นกลุ่มประชากรสุดท้ายที่มีความสำคัญต่อการอนุรักษ์และรักษาไว้ซึ่งกลุ่มของนกกระสาชนิดนี้ โดยจัดเป็นหนึ่งในพันธะกิจหลักขององค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ที่เป็นการส่งเสริมการอนุรักษ์นอกถิ่นอาศัยและช่วยคงความหลากหลายทางชีวภาพ ทั้งนี้นกกระสาคอดำจัดเป็นสัตว์อีกชนิดหนึ่งที่อยู่ในแผนการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ของสวนสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการขยายพันธุ์นกกระสาคอดำในกรงเลี้ยง เป็นเรื่องที่มีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้การขยายพันธุ์ประสบความสำเร็จได้ยาก ไม่ว่าจะเป็นภาวะความไม่สมบูรณ์พันธุ์และการไม่สามารถจับคู่ได้ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการศึกษาแรกที่อธิบายถึงการทำงานของระบบสืบพันธุ์ในสัตว์ด้วยการตรวจวิเคราะห์และติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมน ทั้งนี้ในการศึกษาด้วยรูปแบบดังกล่าวสามารถที่จะใช้ในการพิสูจน์ทราบสถานภาพของระบบสืบพันธุ์ในสัตว์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้วางแผนในการจัดการกรงเลี้ยงได้อย่างเหมาะสมให้นกกระสาคอดำมีคุณภาพชีวิตที่ดีสามารถขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้ อันเป็นการส่งเสริมการอนุรักษ์นกที่ใกล้สูญพันธุ์ชนิดนี้ได้อย่างยั่งยืนต่อไป

การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธีการแบบ Enzyme immunoassays (EIAs) ได้รับการพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจประเมินฮอร์โมน เมตะบอไลเตสในกลุ่มสัตว์ที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงชนิดต่างๆ ทั้งนี้กระบวนการตรวจทาง EIA มีข้อได้เปรียบ กว่าการตรวจทางRadio immunoassays (RIA) ตรงที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงมากนักและไม่ต้องมีการใช้กัมมันตภาพรังสี โดยการวิเคราะห์มีความไวในการตรวจได้เทียบเท่าหรือดีกว่าการตรวจทาง RIA (Czekala *et al*., 1986)

การศึกษาแบบไม่ทำการจับบังคับหรือรบกวนตัวสัตว์ (Noninvasive methods) โดยการตรวจวัดปริมาณของสเตียรอยด์ฮอร์โมนในตัวอย่างมูลสัตว์นั้นเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความเหมาะสมสำหรับสัตว์ที่อยู่ในสภาพของกรงเลี้ยง (Rupert *et al*., 2005) ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบและอาการบาดเจ็บที่อาจจะเกิดขึ้นกับสัตว์ในภายหลัง โดยอาศัยหลักการที่ว่า "ฮอร์โมน" ถูกสร้างจากระบบต่อมไร้ท่อต่างๆ และถูกส่งเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อผ่านไปยังอวัยวะเป้าหมาย จากนั้นจะถูกหมุนเวียนผ่านเข้าไปภายในตับซึ่งจะถูก metabolized เปลี่ยนแปลงสภาพเป็นอนุพันธ์ต่างๆ จากนั้นจะถูกส่งต่อเข้าลำไส้ในรูปของน้ำดีซึ่งจะเข้าสู่กระบวนการเผาผลาญอาหารของร่างกาย (metabolites) และถูกขับถ่ายออกโดยปนมากับอุจจาระ ที่จะมีการเรียกรวมๆ สเตียรอยด์ทั้งหมดที่อยู่ในอุจจาระว่า "Fecal steroids" (Erich *et al*., 2005)

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมนในนกกระสาคอดำด้วยวิธีการสกัดจากอุจจาระ เพื่อใช้ประเมินการจัดการกรงเลี้ยง

2.2 เพื่อประเมินสภาพทางสรีระวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในสัตว์แต่ละตัวในแต่ละช่วงการสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย

2.3 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณฮอร์โมนของนกกระสาคอดำตลอดช่วงปี

3. วิธีการศึกษา

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ (Essential Component of the EIA)

- Solid Phase: polystyrene microtiter plate (Nunc Immuno plate)
- Antibody: Polyclonal Antibody and Monoclonal Antibody
- Coating buffer: Carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6
- Wash solution: Nacl and Tween 20 solution
- Enzyme conjugate (tracer): Horseradish peroxidase (HRP)
- Assay buffer: Phosphate or Tris buffers pH 7.0
- Standards: Known concentrations of hormone (Sigma Diagnostics)
- Substate: Chromagen (ABTS) and catalyst (Hydrogen peroxide) Substrate
- Reading: Spectrophotometer or Plate reader

3.2 การเก็บตัวอย่างมูลนกกระสาคอดำ

สุ่มเก็บตัวอย่างมูลของนกกระสาคอดำครั้งละ 10-20 กรัม สัปดาห์ละ 1-3 ตัวอย่าง เป็นเวลา 12-24 เดือน เลือกเก็บแต่ตัวอย่างมูลที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันเพื่อให้ได้สเตียรอยด์ฮอร์โมนที่มีการกระจายตัวกันอย่างสม่ำเสมอในตัวอย่าง มูลจะต้องมีลักษณะสดใหม่ ไม่แห้งและไม่มีเศษวัสดุอื่นปนอยู่ในตัวอย่าง มูลที่ได้จะถูกเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิแช่แข็ง -20 °C จนกว่าจะถูกนำเข้าสู่กระบวนต่อไป

3.3 เก็บรักษาตัวอย่างหรือทำให้แห้ง

กรณีที่ยังไม่สามารถทำตัวอย่างให้แห้งได้ทัน สามารถทำการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในกล่องทึบแสงที่มีฝาปิดเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างสัมผัสกับความชื้นหรือแสง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาสภาพของอุจจาระจากแบคทีเรีย และเป็นการป้องกันไม่ให้สเตียรอยด์มีการเปลี่ยนแปลงสภาพไป

นำตัวอย่างที่แช่แข็งเก็บรักษาสภาพมาทำให้แห้งด้วยการไล่ความชื้นออกจากตัวอย่างด้วยการโดยการใช้เครื่อง lyophilizer หรือนำเข้าตู้อบ (hot air oven) เป็นระยะเวลาไม่น้อยกว่า 96 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงอีก จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างด้วยการใส่หีบห่อทึบแสง ใส่สารดูดความชื้นลงไปเพื่อป้องกันความชื้น seal ปิดฝาให้สนิทนำไปเก็บไว้ภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่เย็นและมืด ป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสเตียรอยด์ (Erich *et al*., 2005;Tony *et al*., 2005) เพื่อรอนำไปสกัดฮอร์โมนต่อไป

3.4 การสกัดสเตียรอยด์ฮอร์โมนจากอุจจาระ

ทำการสกัดด้วยวิธีการต้ม(Dry and Wet Weight Fecal Extraction–Boiling Method) ใช้ตัวอย่างมูลนกเงือก 0.2 g สกัดด้วย Ethyl alcohol 90 % แล้วเก็บสารละลายที่ได้ไว้ใน dilution buffer แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน

ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Enzyme immunoassay แบบ Competitive ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ตามกระบวนการของ Dr. Janine Brown และคณะ (2004)

อาศัยหลักการตรวจแบบ ELISA คือ การเคลือบพื้นผิวของแผ่นเพลท ด้วยแอนติบอดี้(antibody) ที่จำเพาะต่อแอนติเจน (antigen) ที่ต้องการตรวจหาในสารตัวอย่าง ซึ่งจะถูกเติมลงไปพร้อมกับแอนติเจน ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์คอนจูเกต (enzyme conjugate) โดยทั้งคู่จะแย่งกันลงไปจับกับ แอนติบอดี้ที่เคลือบผิวเอาไว้ ซึ่งจะขึ้นกับจำนวนฮอร์โมน เช่น ถ้าตัวอย่างมีฮอร์โมนมากกว่าก็จะจับกับ แอนติบอดีได้มากกว่า และเมื่อเติมซับสเตรท (substrate) ก็จะได้สีที่เข้มต่างกันตามจำนวนของแอนติเจน และ คอนจูเกต ซึ่งสามารถทำการตรวจวัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยเครื่องอ่านเพลท

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าเฉลี่ยข้อมูลแสดงในรูปของ Mean ± SEM. คำจำกัดความของสภานภาพการสืบพันธุ์อยู่บนพื้นฐานของรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมน ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยฐานปริมาณฮอร์โมนในสัตว์ที่ไม่ได้ตั้งท้องจะใช้วิธีการคำนวนซ้ำๆ แบบ iterative process โดยตัดค่าที่เกิน 1.5 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (1.5 SD) ออกแล้วทำการคำนวนซ้ำไปเรื่อยๆ จนไม่มีค่าใดเกินกว่า 1.5 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานอีก [Brown *et al*., 1994, 2001]

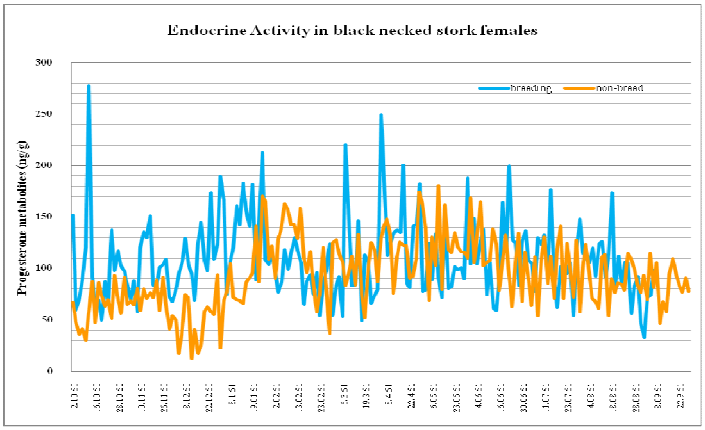
4. ผลการศึกษาและสรุปผล

จากผลการศึกษาการประเมินปัญหาอุปสรรคในการขยายพันธุ์นกกระสาคอดำ Black-necked Stork (*Ephippiorhynchus asiaticus*) ในกรงเลี้ยง โดยวิธีศึกษาปริมาณฮอร์โมน สามารถแสดงผลเป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้

นกกระสาคอดำเพศเมีย

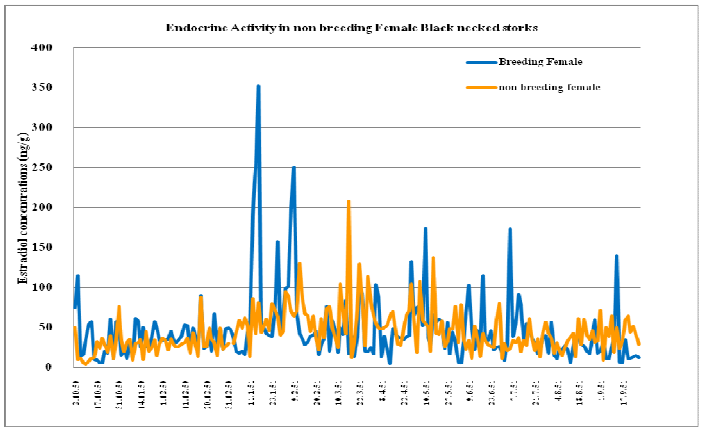
จากการศึกษาปริมาณฮอร์โมนในเพศเมียทั้งหมด พบว่ามีข้อบ่งชี้ที่แสดงให้เห็นถึงการทำงานของรังไข่ โดยพบว่ารังไข่ในระบบสืบพันธุ์ของนกกระสาคอดำเพศเมียมีการทำงานเป็นช่วงฤดูกาลโดยแสดงถึงความแตกต่างในบางช่วงเดือนของรอบปี ซึ่งแสดงได้ในช่วงที่เป็นฤดูกาลสืบพันธุ์ (เดือนตุลาคม-พฤศจิกายน หรือ มกราคม-กุมภาพันธ์) ทั้งนี้พบว่าช่วงที่เป็นระยะพักหรือ Anestrous มีความยาวนานอยู่ในช่วง 8 ถึง 10 เดือนต่อเนื่องกัน จากการศึกษาในเพศเมียทั้งหมด 3 ตัว มีเพียงตัวเดียวที่ประสบความสำเร็จในการจับคู่และให้ลูกได้ตลอดช่วงระยะเวลา 2 ปีของการศึกษา ส่วนที่เหลือไม่ประสบความสำเร็จในการจับคู่ขยายพันธุ์ (โดยมีเพศเมียจำนวน 1 ตัว ป่วยและตายในเวลาต่อมา) จากการศึกษาไม่พบความแตกต่าง ($P > 0.05$) ของช่วง

อายุระหว่างเพศเมียที่จับคู่ได้และจับคู่ไม่ได้ (paired and non-paired females) ทั้งนี้พบว่าปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในช่วงที่เป็นฤดูกาลสืบพันธุ์ของนกกระสาคอดำระหว่างเพศเมียที่จับคู่ขยายพันธุ์ได้กับกลุ่มที่ไม่จับคู่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเพศเมียที่จับคู่ได้และมีพฤติกรรมการขยายพันธุ์จะมีปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงกว่าเพศเมียอีก 2 ตัว ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่จับคู่ สำหรับในช่วงเดือนอื่นๆ ของปีพบว่าระดับของปริมาณฮอร์โมนมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 1) สำหรับการศึกษาค่าเฉลี่ยพื้นฐานของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (baseline concentrations of fecal progesterone) ของเพศเมียทั้งหมด (ไม่นับรวมช่วงเวลาที่มีการสืบพันธุ์) พบว่านกกระสาคอดำเพศเมียมีค่าเฉลี่ยพื้นฐานของฮฮร์โมนโปรเจสเตอโรนเฉลี่ยเท่ากับ 77.8 ± 1.91 ng/g of dry feces, พิสัย 12 - 180 ng/g



ภาพที่.1. Fecal progesterone concentrations in an individual Black-necked Stork female throughout average one year round.

สำหรับการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน 17 -ß เอสตราไดออล เมตะบอไลเตส (17-ß Estradiol metabolite) ในนกกระสาคอดำเพศเมีย จากผลการศึกษาพบว่าแบบแผนของฮอร์โมนดังกล่าวค่อนข้างที่จะแปรปรวนสูง มีการขึ้นและลงสลับกัน จึงอาจไม่สามารถนำมาใช้แสดงหรือชี้บ่งช่วงของการตกไข่ได้อย่างชัดเจนมากนักในการศึกษาที่มีการเก็บตัวอย่างแบบ 3 ครั้งต่อสัปดาห์ (ภาพที่ 2.) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมน 17-ß Estradiol ระหว่างเพศเมียที่จับคู่ขยายพันธุ์ได้กับกลุ่มที่จับคู่ไม่ได้พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งนี้ในเพศเมียที่จับคู่ขยายพันธุ์ได้มีระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมน 17-ß Estradiol สูงกว่ากลุ่มเพศเมียที่จับคู่ไม่ได้เล็กน้อย สำหรับการตรวจวัดระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอล (fecal cortisol) เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างเพศเมียที่จับคู่ได้กับกลุ่มที่จับคู่ไม่ได้ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P < 0.05$) โดยเพศเมียที่จับคู่ได้มีระดับความเข้มข้นของคอร์ติซอลต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้จับคู่ ซึ่งมีระดับความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 17.58±1.04 ng/g และ 23.57±1.03 ng/g of dry feces ตามลำดับ นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่านกกระสาคอดำคู่พ่อแม่พันธุ์ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวสามารถทำรังวางไข่ได้ 2 ครั้งต่อปี จากแผนการจัดการกรงเลี้ยงของสวนสัตว์ฯ

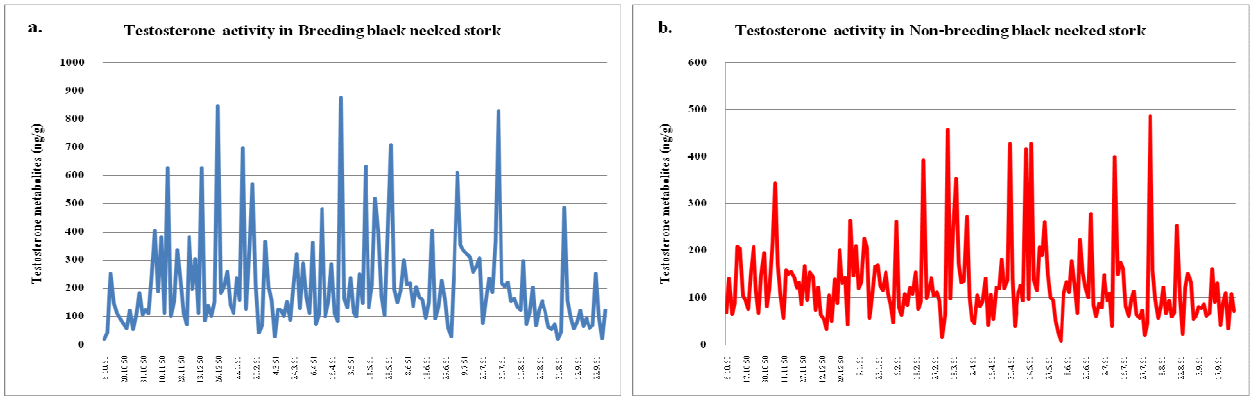


ภาพที่.2. Fecal 17-ß Estradiol concentrations in an individual Black-necked Stork females throughout average one year round.

นกกระสาคอดำเพศผู้

ในการศึกษาโครงสร้างอายุของนกกระสาคอดำเพศผู้จำนวน 4 ตัว พบว่าเพศผู้ที่จับคู่และขยายพันธุ์ได้จะมีอายุมากกว่าเพศผู้อีก 3 ตัวที่จับคู่ไม่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ซึ่งแตกต่างกับที่พบในเพศเมีย ทั้งนี้ในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเพศผู้คือฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Fecal Testosterone) ที่สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 3 a, b พบว่าแนวโน้มโดยเฉลี่ยของปริมาณฮอร์โมนไม่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงที่เป็นช่วงฤดูกาล (seasonality in testicular activity) แต่ในเพศผู้ที่จับคู่แล้วจะมีระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนสูงกว่าเพศผู้ในกลุ่มที่ยังจับคู่ไม่ได้และมีอายุน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยมีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเฉลี่ยทั้งหมดในรอบปีเท่ากับ 205.60±13.10 ng/g of dry feces (พิสัย 21-877 ng/g) และ128.71±4.76 ng/g of dry feces (พิสัย 8-1,042 ng/g) ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มของเพศผู้ที่ไม่จับคู่จำนวน 3 ตัวพบว่ามีความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

นอกจากนี้ยังพบว่าในนกกระสาคอดำเพศผู้ที่ไม่ได้จับคู่จะมีระดับของฮอร์โมนความเครียด (stress hormone) หรือฮอร์โมนคอร์ติซอล (Fecal Cortisol) สูงสุดในช่วงฤดูร้อน ส่วนเพศผู้ที่จับคู่แล้วจะมีระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอล (Fecal Cortisol) สูงสุดในช่วงที่เป็นฤดูกาลสืบพันธุ์



ภาพที่ 3 a, b. Fecal Testosterone concentrations in an individual Black-necked Stork males

throughout average one year round.

5. เอกสารอ้างอิง

Brown, J.L., Wasser, S.K., Wildt, D.E. and Graham, L.H. 1994. **Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non-invasively in feces**. Biol Reprod. 51: 776-786.

Brown, J.L., Bellem, A.C., Michael, F., Wildt, D.E. and Roth, T.L. 2001. **Comparative Analysis of Gonadal and Adrenal Activity in The Black And White Rhinoceros in North America by Noninvasive Endocrine Monitoring**. Zoo Biology. 20: 483-486.

Brown, J.L., Walker, S. and Steinman, K. 2004. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species, 2nd edition,** Smithsonian institution. USA.

Czekala, N.M., Gallusser, S., Meier, M.E., Lasley, B.L. 1986. **The development and application of an enzyme immunoassay for urinary estrone conjugates**. Zoo Biology. 5: 1-16.

Erich Mostl, Sophi Rettenbacher, And Rupert Palme. 2005. **Measurement of Corticosterone Metabolites in Birds' Droppings: An Analytical Approach**. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1046: 17–34.

Palme, R. 2005. **Measuring Fecal Steroids Guidelines for Practical Application.** Academy of science, New York.

Toni E. Ziegler, and Daniel J. Wittwer. 2005. **Fecal Steroid Research in the Field and Laboratory Improved Methods for Storage, Transport, Processing, and Analysis**. University of Wisconsin. American Journal of Primatology, 67 : 159-174.