

孵化前期二氧化碳调控对蛋鸡种蛋孵化胚胎的影响

童 勤^{1,2,3}, 朱丽蓉^{1,2}, 刘 畅^{1,2}, 郑炜超^{1,2,3*}, 韩胜强^{1,2,4}, 李 杜⁵

(1. 中国农业大学水利与土木工程学院, 北京 100083; 2. 农业农村部设施农业工程重点实验室, 北京 100083; 3. 北京市畜禽健康养殖环境工程技术研究中心, 北京 100083; 4. 江苏立华牧业股份有限公司, 常州 213168; 5. 北京市华都峪口禽业有限责任公司, 北京 101206)

摘 要: 为探究孵化前期高浓度 CO₂ 调控对蛋鸡种蛋孵化的影响机制, 该研究以京红 1 号蛋鸡种蛋为试验对象, 在孵化前期 (0~10 d) 处理组通过补充 CO₂ 的方式保持 CO₂ 浓度 1%, 对照组 CO₂ 浓度小于 0.25%, 对比研究了 1% CO₂ 浓度处理对种蛋孵化的影响。结果表明, CO₂ 处理组与对照组的受精蛋孵化率无显著性差异 ($P>0.05$); 第 9 天和第 12 天 CO₂ 处理组的胚胎质量和相对胚胎质量显著高于对照组 ($P<0.05$); 第 3 天、第 6 天和第 9 天 CO₂ 处理组的蛋白 pH 值显著低于对照组 ($P<0.05$); 第 11 天, CO₂ 处理组和对照组尿囊绒毛膜 (CAM, Chorioallantoic Membrane) 血管发育密度无显著性差异 ($P>0.05$); 第 0 天、第 6 天、第 12 天两组的蛋壳和胚胎钙含量不存在显著差异。在蛋鸡种蛋孵化前期 (0~10 d) 保持 1% 浓度的 CO₂, 降低了蛋白 pH 值, 加速了胚胎发育, 但未影响孵化率。

关键词: 二氧化碳; 动物; 孵化; 胚胎发育; 孵化率

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.16.022

中图分类号: S8

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2021)-16-0177-07

童勤, 朱丽蓉, 刘畅, 等. 孵化前期二氧化碳调控对蛋鸡种蛋孵化胚胎的影响[J]. 农业工程学报, 2021, 37(16): 177-183.

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.16.022 <http://www.tcsae.org>

Tong Qin, Zhu Lirong, Liu Chang, et al. Effects of carbon dioxide regulation during early incubation stage on the hatching embryos of layer eggs[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2021, 37(16): 177-183. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2021.16.022 <http://www.tcsae.org>

0 引 言

孵化环境直接影响雏鸡质量, 其中二氧化碳 (CO₂) 作为重要的气体环境因子, 对家禽胚胎发育起重要作用^[1-2]。在自然孵化过程中, 母鸡在孵化的前 9 d 集中孵蛋, 种蛋周围通风较差, 限制了胚胎早期的氧气量, 二氧化碳浓度可达到 0.9%, 氧气浓度降为 20.3%^[3]。然而长期以来, CO₂ 被认为是孵化的副产品, 较高浓度的 CO₂ 不利于胚胎的发育^[4-5]。因此现代巷道式孵化通常保持较高的通风以将孵化器内的 CO₂ 浓度保持在较低水平, 这可能影响孵化质量的提高, 过度通风换气又造成了一定程度的能源浪费。

近年来, 研究人员开始关注在种蛋的孵化过程人工进行 CO₂ 调控, 以提高孵化质量。研究发现, 孵化前 10 d 通过减少通风提高二氧化碳浓度, 可以刺激胚胎生长并提高孵化率^[6-8], 且在胚胎发育后期, 鸡胚能够耐受较高浓度的 CO₂^[9]。Sadler 等^[10]以蛋鸡种蛋 (White Leghorns) 为试验对象, 在胚胎发育前 48 h 分别使用 0%、1%、2% 和 4% 浓度 CO₂ 处理, 在 48 h 使用 10 倍放大的解剖镜观察胚胎长度与体节数, 发现胚胎长度和平均体节数随着

CO₂ 浓度增加而增加。Bruggeman 等^[11]使用 43 周龄的肉鸡 (Cobb) 种蛋, 处理组 CO₂ 浓度在胚胎发育的第 25~96 h 逐渐上升至 1.5%, 保持 1.5% 持续到第 10 天 (240 h), 发现处理组的胚胎质量有更高的趋势, 尤其在第 6 天和第 10 天差异显著。Willemssen 等^[12]使用肉鸡 (Cobb) 种蛋, 在胚胎发育的前 10 d, 以减少通风的方式使孵化箱内 CO₂ 浓度缓慢提升至 1%, 发现 CO₂ 处理组的胚胎死亡率显著下降。Tona 等^[13]使用肉鸡 (Ross) 和蛋鸡 (Isa Brown) 种蛋, 在胚胎发育前 10 d 处理组中 CO₂ 浓度从 0.05% 增至 1%, 对照组始终保持在 0.1% 以下, 发现 CO₂ 处理使得内部啄壳时间、外部啄壳时间和出雏时间均缩短。以上研究表明孵化前 10 d 增加 CO₂ 浓度对胚胎发育有积极影响, 但目前高浓度 CO₂ 调控对蛋鸡种蛋孵化的影响机制尚不清楚。

胚胎在发育过程中有 3 种气体交换方式: 在胚胎发育 0~4 d 左右通过卵黄囊血管进行气体交换; 尿囊绒毛膜 (CAM, Chorioallantoic Membrane) 血管, 在胚胎发育第 5 天开始形成, 第 8 天成为气体交换的主要器官^[6]; 第 19 天左右, 雏鸡啄破内壳膜, 喙进入气室, 尿囊绒毛膜血管退化, 开始进行肺呼吸^[14]。长时间暴露于低氧环境会促进胚胎血管形成、心脏血液输出量改变, 促进心血管发育, 进而可能会促进胚胎代谢及发育^[15]。前 10 d 高 CO₂ 浓度会使得 O₂ 浓度降低, 进而可能影响尿囊绒毛膜血管发育。CO₂ 在蛋白中高溶解度, 较高 CO₂ 水平在孵化早期使蛋白液化, 蛋白 pH 值下降, 这可能使得胚胎

收稿日期: 2021-05-27 修订日期: 2021-07-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31802109)

作者简介: 童勤, 博士, 副教授, 研究方向为畜禽环境控制。

Email: tongqin@cau.edu.cn

*通信作者: 郑炜超, 博士, 副教授, 研究方向为畜禽设施养殖工艺与环境控制。Email: weichaosheng@cau.edu.cn

吸收更多营养促进胚胎发育^[16]。在胚胎的代谢中钙是最重要的矿物质,钙从蛋壳转移至胚胎中提供发育所需^[17]。蛋内容物和胚胎的钙含量自孵化第 12 天起显著上升,二氧化碳与水的作用可使蛋壳中碳酸钙转化成可溶的碳酸氢钙,进而更好的转移钙,这可能有利于胚胎发育。

本文以京红 1 号蛋鸡种蛋为试验对象,研究在胚胎发育前 10 d 保持 1%浓度的 CO₂ 对种蛋孵化率和胚胎发育情况的影响,根据尿囊绒毛膜(CAM)血管发育情况、蛋白 pH 值变化、蛋壳和胚胎钙含量变化,探究孵化前期 CO₂ 调控对蛋鸡种蛋孵化的影响机制。

1 材料与方法

1.1 孵化箱与二氧化碳调控系统

本试验使用 2 台相同的全自动孵化器(OvaEasy 380 Advance EX Series II, Brinsea, 英国),孵化器尺寸为 800 mm×420 mm×820 mm(长×宽×高),每台孵化器可以孵化放 300 枚种蛋。两台孵化器放置于同一房间,室内的通风量设置为 500 m³/h。本试验所用的全自动孵化器在设置温度和湿度等相关条件后,孵化期自动调节通风量。室内装有一台 2000 W 的工业暖风机(SY-N2KWPTC220, 中国)作为热源,工业暖风机配备温度控制器(MK-SM5, 中国),调控精度为 0.1 °C,保证室内温度维持在 25 °C 左右。室内装有一台负压风机(SF-2.5-4 管道式-380 V, 中国),通风量设置为 500 m³/h,且室内还配备一台室内循环风机,用以保证室内环境的均衡。试验开始前为每台孵化器设计并构建基于控制器 ZK2N PLC 的 CO₂ 动态调控系统,用于调控孵化箱内 CO₂ 浓度,并实时监测环境数据。具体方案如下:

1) 使用浓度为 99.999% 的 CO₂ 气瓶向孵化箱内补充气体,通过控制电磁阀的通闭时间调控 CO₂ 浓度。

2) 孵化箱内部上端安装 CO₂ 传感器、温湿度传感器、O₂ 传感器,孵化过程中实时监测 CO₂、温度、湿度、O₂ 数值,并将电压模拟信号传送给 CO₂ 调控系统进行处理。当 CO₂ 传感器所检测信号低于设定值时,调控系统传递高电平给电磁阀,电磁阀打开,CO₂ 进行补充直至达到设定值。

3) 通过触摸屏(S430A)实现环境数据的实时监测,使用 Arduino SD 模块进行数据存储。

CO₂ 调控系统以控制器(ZK2N PLC)为核心,由控制器、传感器、上位机、存储模块、驱动模块、执行机构 6 部分组成,如图 1 所示。

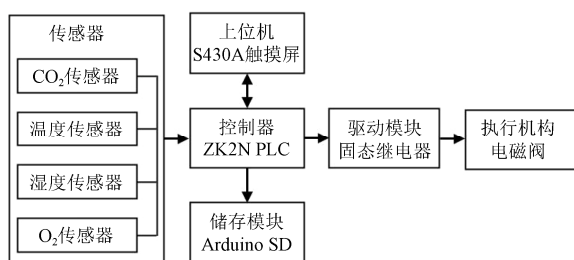


图 1 CO₂ 调控系统组成

Fig.1 The composition of the CO₂ control system

图 2 为控制系统的流程图,实现对 CO₂ 浓度的调控

及 CO₂ 浓度、温度、湿度和 O₂ 浓度的数据采集。ZK2NPLC 的 AD 模拟量采用中断输入输出模式,因此调控 CO₂ 浓度的同时进行数据采集和运算。控制步骤如图所示:首先控制器通电,控制器置初始状态,紧接着将数据寄存器清零(数据计算、寄存)。将 VAISALAGMP251 CO₂ 传感器的实时 CO₂ 数据与 D100 寄存器中的 1% CO₂ 浓度进行比较,如果 CO₂ 浓度低于 1% PLC 则发出脉冲信号使固态继电器置 ON,随后气体电磁阀打开进行 CO₂ 气体补充,CO₂ 浓度达到 1%时停止气体补充,至此完成一个控制循环。

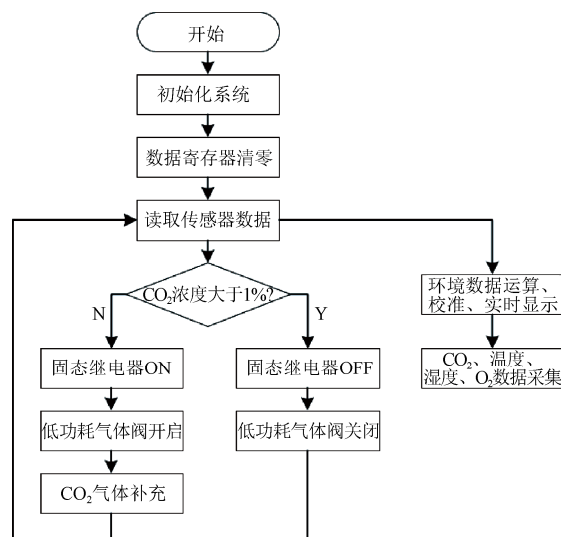


图 2 CO₂ 控制系统流程图

Fig.2 Flow chart of CO₂ control system

1.2 孵化种蛋和试验处理

入孵当天从孵化场选择京红 1 号 28~50 周龄的种蛋分 3 批次直接运输到实验室进行孵化,运输过程中运输车温度为 18~20 °C,湿度为 60%~70%。种蛋在孵化场存储 1~3 d,保存温度为 22~23 °C,湿度为 65%~75%。将种蛋随机分成 2 组,每组 300 枚,对照组平均蛋质量为 (60.72±3.50) g,处理组的平均蛋质量为 (61.06±3.62) g,将种蛋消毒后随机放入 2 台全自动孵化器内进行孵化。处理组在孵化前 10 d 控制 CO₂ 浓度为 1%,1%浓度 CO₂ 从孵化开始持续到孵化第 10 天(240 h),第 240 h 时停止补充 CO₂,整个孵化过程中对照组 CO₂ 浓度在 0.25% 以下。孵化箱温度设置为 37.6 °C,相对湿度 0~18 d 为 50%,19~21 d 为 60%。每 90 min 自动翻蛋,角度为 90°。进行 3 次重复试验,为消除孵化箱对试验结果的影响,不同批次试验时 2 台孵化箱交替用于处理组和对照组。

1.3 测试指标

1) 孵化率及雏鸡质量

512 h 关闭孵化器,清点雏鸡出壳数量,并计算孵化率,对处理组和对照组的所有雏鸡进行质量评价,方法参考 Tona 等^[18]研究。

受精蛋孵化率计算如下式所示:

$$\text{受精蛋孵化率} = \frac{\text{雏鸡数量}}{\text{入孵蛋数} - \text{采样蛋数} - \text{未受精蛋数}} \times 100\%$$

(1)

2) 胚胎发育

在第 6 天(144 h)、第 9 天(216 h)、第 12 天(288 h)、第 15 天(360 h)、第 18 天(432 h), 分别随机选取 CO₂ 处理组和对照组 15 枚种蛋, 使用 304 不锈钢开蛋器(K0154, 中国)打开种蛋钝端处蛋壳, 取出胚胎吸水后使用电子天平(JM-0.001, 中国)称质量。称取胚胎绝对重量, 计算公式如下:

$$\text{相对胚胎质量} = \frac{\text{胚胎质量}}{\text{种蛋质量}} \times 100\% \quad (2)$$

3) 尿囊绒毛膜(CAM)血管发育

在胚胎发育第 11 天(264 h), CO₂ 处理组和对照组分别随机取 3 枚发育正常的种蛋, 参考 Verhoelst 等^[19]方法分析尿囊绒毛膜血管发育情况。尿囊绒毛膜血管在第 11 天时完全附着在蛋壳内表面, 使用开蛋器打开种蛋钝端处蛋壳, 再用解剖针和手术剪(BY-3143, 中国)去除种蛋白、蛋黄和胚胎等内容物, 随后在蛋壳内充满 10% 的中性福尔马林固定液(上海圻明生物科技有限公司, 中国)并保持 24 h, 将红细胞固定在血管中。固定 24 h 后, 将种蛋排空并分成 3 段, 使用微型切割机(MNT-995201B-786, 中国)将中间段均分成 8 部分, 如图 3a 所示。

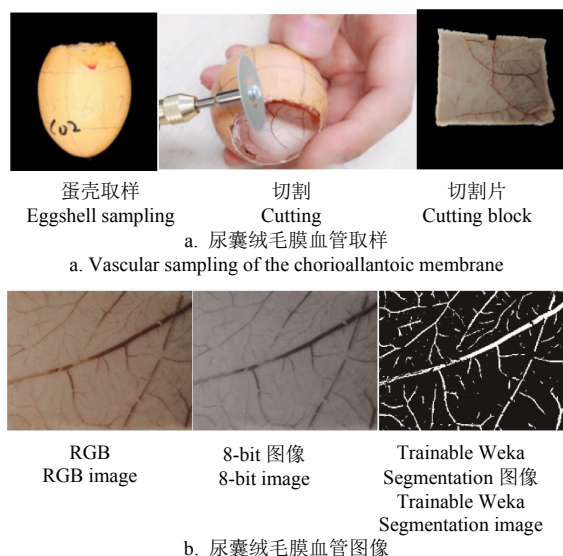


图 3 尿囊绒毛膜血管取样及图像

Fig.3 Vascular sampling and image of the chorioallantoic membrane

使用微距镜头(15×, 对焦距离 3~6 cm, BL-058, 中国)对中间段每部分进行拍照, 将拍摄初始图像裁剪成分辨率 1 024×800 (像素) 的图片, 水平和垂直分辨率为 96 dpi。用 Image J (Rawak Software, Inc. 德国) 首先将 1 024×800 (像素) 图片由 RGB Color 转化成 8-bit 类型的图片, 然后用 Trainable Weka Segmentation 机器学习插件对血管和非血管背景进行识别学习, 最后再次将处理好的图片由 8-bit 转化成 RGB Color, 使用 Threshold 自动计算出血管面积所占采样蛋壳比例。

4) 蛋白 pH 值

胚胎发育第 0 天(0 h)、第 3 天(72 h)、第 6 天

(144 h)、第 9 天(216 h)、第 12 天(288 h) 和第 15 天(360 h), 分别随机取 CO₂ 处理组和对照组 15 枚种蛋, 使用 304 不锈钢开蛋器打开种蛋钝端处蛋壳, 使用蛋白分离器分离出蛋白。使用高精度手持 pH 计(台湾衡欣 AZ8601, 精度 0.02, 中国)检测蛋白 pH 值。

5) 蛋壳与胚胎钙含量

在胚胎发育第 0 天、第 6 天和第 12 天, CO₂ 处理组和对照组分别随机取 3 枚种蛋, 首先使用 304 不锈钢开蛋器打开种蛋钝端处蛋壳, 配合使用解剖针和手术剪(BY-3143, 中国)将胚胎和蛋壳进行分离; 称取适量样品至聚四氟乙烯消解罐中, 加入 5 mL 硝酸静置, 反应结束后密封放入微波消解仪(MILESTONE-ETHOS1, 意大利), 按照顺序 100 °C 保持 3 min、140 °C 保持 3 min、160 °C 保持 3 min、180 °C 保持 3 min、190 °C 保持 15 min; 待温度冷却至 50 °C 以下, 取出消解罐放入通风橱中, 打开消解罐用超纯水润洗, 转移至 50 mL 容量瓶中, 用超纯水稀释至定容刻度, 最后使用电感耦合等离子光谱仪(Perkin Elmer-optima 8000, 美国)和钙元素标准溶液(国家有色金属及电子材料分析测试中心, 中国)检测样品钙含量。

1.4 数据处理

试验数据均使用 IBM SPSS Statistics 25.0 (国际商业机器公司 IBM, 美国) 和 Microsoft Office Excel 2019 (微软股份有限公司 Microsoft Corporation, 美国) 进行统计分析, 以均数±标准差表示。其中孵化率采用独立样本 T 检验。采用混合模型对影响鸡胚发育指标的日龄、二氧化碳处理进行主体效应检验, 批次作为随机效应。其中, $P < 0.05$ 表示差异显著。

一般线性模型 1:

$$Y_1 = \mu + A_i + C_j + B_k + AC_{ij} + AB_{ik} + CB_{jk} + \varepsilon \quad (3)$$

式中 Y_1 是胚胎质量、相对胚胎质量、pH 值或钙含量, μ 是均值, A 是日龄 (其中, 当 Y_1 是胚胎质量或相对胚胎质量时, $i=6, 9, 12, 15, 18$; 当 Y_1 是 pH 值时, $i=0, 3, 6, 9, 12, 15$; 当 Y_1 是钙含量时, $i=0, 6, 12$), C 是 CO₂ 处理 (j =处理组、对照组), B 是批次 ($k=1, 2, 3$), ε 为误差。

一般线性模型 2:

$$Y_2 = \mu + C_j + B_k + CB_{jk} + \varepsilon \quad (4)$$

式中 Y_2 是 CAM 比值。

文中的图均使用 Origin 2018 (Origin Lab, 美国) 制作。

2 结果与分析

2.1 孵化期 CO₂ 浓度

基于 ZK2NPLC 的 CO₂ 动态调控及环境数据采集系统和基于 Arduino 的环境数据采集系统进行实验, 图 4 为处理组和对照组孵化箱 CO₂ 浓度在基于 ZK2NPLC 的 CO₂ 动态调控及环境数据采集系统调控下的实际监测值, 整个孵化期对照组 CO₂ 浓度在 0.25% 以下, 第 0~10 天 CO₂ 浓度理论值为 1%, 实际监测值在 (0.96±0.04)% 之间,

达到了预设的试验条件, 孵化设备和 CO_2 动态调控及环境数据采集系统的所有设备运行良好。

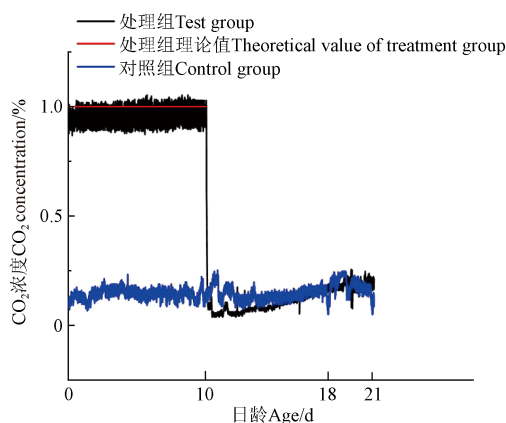


图4 孵化期间处理组和对照组孵化箱 CO_2 浓度

Fig.4 CO_2 concentration in incubator of treatment group and control group during incubation

2.2 孵化率分析

统计分析结果显示 CO_2 处理组和对照组的受精蛋孵化率分别为 $(89.17 \pm 2.53)\%$ 和 $(91.57 \pm 1.03)\%$, 差异不显著 ($P > 0.05$)。处理组和对照组雏鸡品质评分为 100 分的占比分别为 76.22% 和 74.05%, 处理组和对照组雏鸡品质评分为 90~100 分的占比分别为 18.68% 和 20.91%, 处理组和对照组雏鸡品质评分为 80~90 分的占比分别为 4.36% 和 3.97%, 处理组和对照组雏鸡品质评分在 80 分以下的占比分别为 0.74% 和 1.07%。本研究试验中早期胚胎可以耐受 1% 浓度 CO_2 , 孵化环境条件中 O_2 浓度应该是影响孵化率的关键, 孵化前期处理组 O_2 浓度维持在 $(20.2 \pm 0.1)\%$, 该 O_2 浓度不会对胚胎生长产生负面影响。

2.3 胚胎发育分析

经过 6 d 的发育, 胚胎器官已经形成, 此时可以解剖分离称质量, 从第 6 天开始测量胚胎质量, 在此后每隔 2 d 对胚胎质量进行跟踪测试。胚胎质量变化和相对胚胎质量变化如图 5 所示, 处理组和对照组在第 9 天胚胎重分别为 $(1.747 \pm 0.177) \text{ g}$ 和 $(1.556 \pm 0.137) \text{ g}$, 第 12 天分别为 $(5.182 \pm 0.491) \text{ g}$ 和 $(4.606 \pm 0.440) \text{ g}$; 处理组和对照组在第 9 天相对胚胎重分别为 $(3.16 \pm 0.37)\%$ 和 $(2.83 \pm 0.28)\%$; 第 12 天分别为 $(9.39 \pm 0.97)\%$ 和 $(8.51 \pm 0.76)\%$ 。在胚胎发育第 9 天和第 12 天, CO_2 处理组和对照组胚胎质量和相对胚胎质量存在显著差异 ($P < 0.05$); 在胚胎发育第 6 天、第 15 天和第 18 天, CO_2 处理组和对照组胚胎质量和相对胚胎质量无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.4 尿囊绒毛膜 (CAM) 血管发育分析

对 CO_2 处理组和空白对照组的各 24 个尿囊绒毛膜血管样品进行图像分析, CO_2 处理组和对照组的血管比例分别为 $(11.81 \pm 2.41)\%$ 和 $(11.74 \pm 2.31)\%$, 两组数据在统计学上不存在显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.5 蛋白 pH 值分析

统计分析显示日龄和处理组对蛋白 pH 值影响显著

($P < 0.05$)。前期研究表明在孵化第 1~3 天蛋白 pH 值会显著升高随后逐渐降低, 蛋白从第 12~13 天开始被吸收, 到孵化的第 16 天被吸收完^[20]。本研究从孵化第 0 天开始每隔 2 d 对蛋白 pH 值进行跟踪测试, 种蛋的蛋白 pH 值的变化如图 6 所示。随着胚胎发育的进行, 蛋白 pH 值整体变化趋势为先升高后降低, 第 3 天达到峰值。第 3 天、第 6 天和第 9 天 CO_2 处理组的蛋白 pH 值分别是 8.82 ± 0.19 , 8.20 ± 0.20 和 7.85 ± 0.19 , 对照组的蛋白 pH 值分别是 9.27 ± 0.13 , 8.56 ± 0.24 和 8.21 ± 0.29 。 CO_2 处理组蛋白 pH 值整体低于处理组, 且在第 3 天, 第 6 天和第 9 天存在显著差异 ($P < 0.05$)。

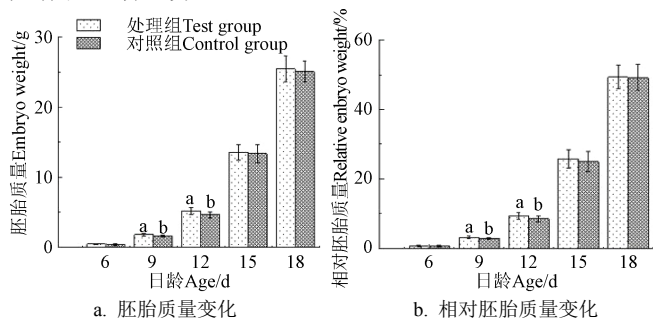


图5 胚胎质量和相对胚胎质量变化
a. 胚胎质量变化 b. 相对胚胎质量变化
注: 同一天的不同字母代表两组数据间有显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。
Note: There are significant differences between the different letters mark on the same day ($P < 0.05$), the same as.

Fig.5 Changes in embryo weight and relative embryo weight

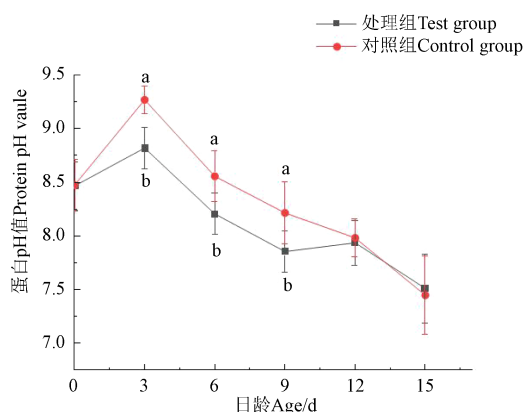


图6 蛋白 pH 值变化

Fig.6 Changes of the albumen pH value

2.6 蛋壳钙与胚胎钙含量分析

经过 6 d 的发育, 胚胎器官已经形成, 此时采集胚胎样品对钙含量进行检测, 跟踪充 CO_2 前后钙含量变化。在胚胎发育第 0 天测试种蛋壳钙含量, 在第 6 天和第 12 天测试胚胎和种蛋壳的钙含量, 结果如表 1 所示, 统计分析显示日龄和处理组对蛋壳钙含量影响不显著 ($P > 0.166$), 日龄对胚胎钙含量影响显著 ($P = 0.014$), 处理组对胚胎钙含量影响不显著 ($P = 0.143$)。从第 0 天到第 12 天蛋壳钙含量变化不大, 且处理组和对照组的差异不显著 ($P > 0.05$); 第 12 天胚胎的钙含量显著高于第 6 天 ($P < 0.05$), 而孵化同一时期处理组和对照组胚胎的钙含量不存在显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 不同天数的蛋壳和胚胎钙质量分数

Table 1 The calcium content of eggshell and embryo with different days ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

指标 Index	组别 Group	第 0 天 Day 0	第 6 天 Day 6	第 12 天 Day 12
蛋壳 Eggshell	处理组	304 556±23 405 329 556±35 616 307 111±51 707		
	对照组	316 667±21 909 323 889±32 251 312 444±42 155		
胚胎 Embryo	处理组	/	177±57b	629±246a
	对照组	/	199±107b	510±184a

注: 同一组不同字母代表不同天数的数据有显著性差异。

Note: There are significant differences in data that the same group of different letters mark represents different days.

3 讨 论

在 Taylor 等^[21-22]的研究中, 在胚胎发育的 0~4 d, CO_2 浓度在 0~1% 时对孵化率无影响, 当 CO_2 浓度高于 1.1% 时, 孵化率会显著降低; 胚胎发育的 5~8 d, CO_2 浓度高于 3% 会显著降低孵化率; 胚胎发育的 9~12 d, CO_2 浓度高于 5% 会显著降低孵化率。Sadler 等^[10] 研究中, 第 10~21 天 CO_2 浓度从 1% 逐渐升至 5% 对孵化率无显著性影响。Gildersleeve^[6] 使用火鸡种蛋在胚胎发育的 0~10 d 保持 0.3% 浓度的 CO_2 , 相对于对照组 0.1% CO_2 浓度, 孵化率显著提高, 这与 Taylor 等^[21-22] 和 Sadler 等^[10] 的研究结果不一致, 造成这种现象可能与物种差异有关, 因为自然孵化巢中 CO_2 浓度在不同物种间变化很大。De Smit 等^[23] 在胚胎发育 0~10 d 通过减少通风的方式提高孵化器内 CO_2 浓度至 1.5%, 与对照组相比孵化率无显著性差异。上述研究与本试验结果一致, 孵化前期高浓度 CO_2 不会影响孵化率, 说明早期胚胎可以耐受 1% 浓度 CO_2 。

Bruggeman 等^[11] 在胚胎发育第 25~96 小时, 将孵化器内 CO_2 浓度提升至 1.5% 左右, 保持 CO_2 浓度直到 240 h, 加速了胚胎发育, 在第 6 天和第 9 天 CO_2 处理组胚胎重量显著高于对照组。De Smit 等^[23] 在胚胎发育过程中减少通风, 处理组在前 10 d 缓慢上升至 0.7%, 观察到胚胎发育的第 10~18 天, 处理组的胚胎平均重量显著大于对照组 (CO_2 浓度小于 0.1%)。本研究表明孵化前期 (0~10 天) 采用 1% 浓度的 CO_2 处理会加速中期胚胎发育。孵化前期, 胚胎主要利用蛋白中的蛋白质, 前期补充 CO_2 使蛋白液化可能促进了胚胎从蛋白吸收营养, 从而加速了胚胎发育。第 12 天时, 鸡胚消化系统发育完全, 随着胚胎的发育, 卵黄中的蛋白成为胚胎蛋白质的主要来源。处理组停止补充 CO_2 后, 随后两组的胚胎发育的显著性差异消失。

尿囊绒毛膜 (CAM) 血管是胚胎发育过程中的呼吸器官, 是不同气体浓度条件下胚胎发育的重要参考, 其发育情况可能会对胚胎发育、胚胎健康状况产生影响^[12]。孵化约 100 h 绒毛膜和尿囊膜融合时 CAM 血管开始形成, 第 6 天 CAM 血管与内壳膜接触, 第 11 天 CAM 血管完全附着在蛋壳内表面, 此时采样对 CAM 血管的干扰最小, 能够观察到发育中完整的 CAM 血管, 到第 12 天 CAM 血管延伸到内壳膜的整个表面, 此时发育完全^[19]。

Dusseau 等^[24] 在胚胎发育第 7~10 天, 处理组使用 15% 浓度 O_2 、85% 浓度 N_2 的气体环境, 对照组使用 21% 浓度 O_2 (室内空气) 的气体环境, 发现处理组尿囊绒毛膜血管密度显著性大于对照组 ($P < 0.05$)。在医学研究中缺氧是明确的血管生成刺激物, Bradbury 等^[25] 研究表明, 胚胎缺氧时缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor-1) 刺激血管内皮生长因子 (VEGF, vascular endothelial growth factor) 的形成, 进而刺激血管生成。本研究表明, 在胚胎发育的第 0~10 天 1% 浓度 CO_2 处理对尿囊绒毛膜血管发育无显著影响。在低氧环境下孵化的鸡胚尿囊绒毛膜血管有增生反应, 使得血管密度增加的启动信号最有可能是氧气供应减少, 本研究采用补充 CO_2 的方式, 孵化前期处理组 O_2 浓度维持在 (20.2±0.1) %, 可能该 O_2 浓度尚不足以引起尿囊绒毛膜血管增生的反应。

Ono 等^[26] 做了产蛋前和产蛋后鸡蛋蛋白 pH 值变化, 当鸡蛋在输卵管和壳腺中时, 蛋白 pH 值均保持在 7.0~7.3 之间, 刚产下的蛋蛋白 pH 值为 7.3~7.4, 贮藏 5 d 后 pH 值达到 9.0。根据 Henderson-Hasselbalch 公式 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$), 受精蛋蛋白 pH 值升高趋势是由于 CO_2 (以物理形式存在蛋中) 从种蛋内部扩散到种蛋外部导致 H^+ 减少造成的^[27]。Sadler 等^[10] 在胚胎发育前 48 h, 分别使用 0.3%、2.3%、4.2% 和 6.5% 浓度的 CO_2 进行处理, 结果发现随着 CO_2 浓度的升高蛋白的 pH 值降低。本研究在胚胎发育的第 0~10 天使用 1% 浓度 CO_2 进行处理, 同样发现 CO_2 处理组的蛋白 pH 值显著低于对照组。Ono^[28] 研究了蛋清的 pH 值对鹌鹑胚胎体外培养活力的影响, 发现当胚胎作为裸卵培养时围绕胚胎的蛋白中 pH 值较高似乎对它们的发育是不利的, 蛋白 pH 值较低的胚胎的存活率较高, 较低的蛋白 pH 值为胚胎发育提供了有利的环境条件。 CO_2 在蛋白中高度可溶, 环境中的高浓度 CO_2 可能在孵化早期使蛋白液化, 促进胚胎吸收更多的营养, 从而刺激并加速胚胎发育^[14]。

Johnston 等^[29] 研究了蛋壳、蛋白和蛋黄中的钙分布及其在胚胎发育中的贡献, 胚胎发育前 9 天蛋黄和蛋白是胚胎钙的主要来源, 之后胚胎骨骼开始形成, 蛋壳钙成为胚胎发育的主要来源。由于环境 CO_2 浓度的升高使得蛋白 pH 值降低, 这可能为促进蛋壳中钙向胚胎转移提供一种有利的环境^[30]。然而本研究中处理组的蛋壳和胚胎钙含量与对照组无显著差异。这可能是由于在孵化前期胚胎处于卵裂及器官形成期, 所需钙含量较少, 由卵内容物提供即可满足生长发育需求, 此时期由于蛋壳不是胚胎发育的主要钙源, 因此蛋壳的钙变化较小。房兴堂等^[31] 研究了不同胚龄乌骨鸡胚胎钙含量变化表明在胚胎发育第 6 天、第 12 天、第 18 天和第 21 天乌骨鸡胚胎钙含量分别为 32.96、88.97、1164.4、2626.9 mg/kg , 随着发育的进行胚胎中钙的含量不断增加, 而且发育后期胚胎钙含量增加的总量大大增加。本研究中第 12 天胚胎钙含量高于第 6 天, 也呈现显著的增长。第 12 胚龄钙的转移是重要转折点, 这时候蛋壳开始为胚胎发育提供钙,

为出壳后的雏鸡发育提供所需要的钙。

4 结 论

本研究以 28~50 周龄的蛋鸡(京红 1 号)种蛋为试验对象,构建了孵化箱 CO₂ 调控系统,研究了孵化前期(0~10 d)1%浓度的 CO₂ 调控对蛋鸡孵化的影响,主要结论如下:

1) CO₂ 处理组和对照组的受精蛋孵化率分别为(89.17±2.53)%和(91.57±1.03)%,差异不显著($P>0.05$)。孵化前期(0~10 d)1%浓度 CO₂ 调控未对孵化率产生不良影响。

2) 孵化前期(0~10) d 1%浓度 CO₂ 调控加速了早期胚胎发育,处理组和对照组在第 9 天胚胎质量分别为(1.747±0.177) g 和(1.556±0.137) g,第 12 天分别为(5.182±0.491) g 和(4.606±0.440) g;处理组和对照组在第 9 天相对胚胎质量分别为(3.16±0.37)%和(2.83±0.28)%;第 12 天分别为(9.39±0.97)%和(8.51±0.76)%。处理组的胚胎质量和相对胚胎质量在第 9 天和第 12 天显著高于对照组。

3) 第 3 天、第 6 天和第 9 天 CO₂ 处理组的蛋白 pH 值分别是 8.82±0.19, 8.20±0.20 和 7.85±0.19,对照组的蛋白 pH 值分别是 9.27±0.13, 8.56±0.24 和 8.21±0.29。第 3 天、第 6 天和第 9 天 CO₂ 处理组的蛋白 pH 值显著低于对照组。CO₂ 会使蛋白液化,加速了胚胎对营养物质的吸收。

综上所述,在蛋鸡种蛋孵化前期(0~10 d)保持 1%浓度的 CO₂,加速了胚胎发育,但未影响孵化率;CO₂ 处理降低了蛋白 pH 值,可能加快了营养物质吸收,促进了胚胎发育。

[参 考 文 献]

- [1] Decuypere E, Bruggeman V. The endocrine interface of environmental and egg factors affecting chick quality[J]. Poultry Science, 2007, 86(5): 1037-1042.
- [2] Hulet R M. Symposium: Managing the embryo for performance managing incubation: Where are we and why?[J]. Poultry Science, 2007, 86(5): 1017-1019.
- [3] Boutilier R G, Gibson M A, Toews D P, et al. Gas exchange and acid-base regulation in the blood and extraembryonic fluids of the developing chicken embryo[J]. Respiration Physiology, 1977, 31(1): 81-89.
- [4] Lindgren I, Altimiras J. Sensitivity of organ growth to chronically low oxygen levels during incubation in Red Junglefowl and domesticated chicken breeds[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2011, 90(1): 126-135.
- [5] 王凤华,李文红,滕可导. 影响鸡种蛋孵化率的因素[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(2): 133-135.
- [6] Gildersleeve R P, Boeschen D P. The effects of incubator carbon dioxide level on turkey hatchability[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 1983, 62(5): 779-784.
- [7] De Smit L, Bruggeman V, Tona J K, et al. Embryonic developmental plasticity of the chick: Increased CO₂ during early stages of incubation changes the developmental trajectories during prenatal and postnatal growth[J]. Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology, 2006, 145(2): 166-175.
- [8] Tona K, Onagbesan O, Bruggeman V, et al. Non-ventilation during early incubation in combination with dexamethasone administration during late incubation 1: Effects on physiological hormone levels, incubation duration and hatching events[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2007, 33(1): 32-46.
- [9] Everaert N, Kamers B, Witters A, et al. Effect of four percent carbon dioxide during the second half of incubation on embryonic development, hatching parameters, and posthatch growth[J]. Poultry Science, 2007, 86(7): 1372-1379.
- [10] Sadler W W, Wilgus H S, Buss E G. Incubation factors affecting hatchability of poultry eggs[J]. Poultry Science, 1953, 33(6): 1108-1115.
- [11] Bruggeman V, Witters A, De Smit L, et al. Acid-base balance in chicken embryos (*Gallus domesticus*) incubated under high CO₂ concentrations during the first 10 days of incubation[J]. Respiratory Physiology & Neurobiology, 2007, 159(2): 147-154.
- [12] Willemsen H, Tona K, Bruggeman V, et al. Effects of high CO₂ level during early incubation and late incubation in ovo dexamethasone injection on perinatal embryonic parameters and post-hatch growth of broilers[J]. British Poultry Science, 2008, 49(2): 222-231.
- [13] Tona K, Everaert N, Willemsen H, et al. Effects of interaction of incubator CO₂ levels and mixing hatching eggs of different embryo growth trajectory on embryo physiological and hatching parameters[J]. British Poultry Science, 2013, 54(4): 545-551.
- [14] Fernandes J I M, Bortoluzzi C, Schmidt J M, et al. Single stage incubators and hypercapnia during incubation affect the vascularization of the chorioallantoic membrane in broiler embryos[J]. Poultry Science, 2017, 96(1): 220-225.
- [15] Lindgren I, Altimiras J. Sensitivity of organ growth to chronically low oxygen levels during incubation in Red Junglefowl and domesticated chicken breeds[J]. Poultry Science, 2011, 90(1): 126-135.
- [16] Druyan S, Levi E, Shinder D, et al. Reduced O₂ concentration during CAM development: Its effect on physiological parameters of broiler embryos[J]. Poultry Science, 2012, 91(4): 987-997.
- [17] 范亮,张戎,姜铁民,等. 鸡胚蛋在孵化期间营养成分变化的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2012, 111(2): 161-165.
- [18] Tona K, Bamelis F, Ketelaere B D, et al. Effects of egg storage time on spread of hatch, chick quality, and chick juvenile growth[J]. Poultry Science, 2003, 82(5): 736-741.
- [19] Verhoelst E, De Ketelaere B, Bruggeman V, et al. Development of a fast, objective, quantitative methodology to monitor angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane during development[J]. The International Journal of Developmental Biology, 2011, 55(1): 85-92.
- [20] Carlea L, Miclea V, Zahan M, et al. The Effect of supplemental carbon dioxide in chicken incubation with eggs from heavy breeder parents[J]. Lucrari Stiintifice - Zootehnie si Biotehnologii, Universitatea de Stiinte Agricole si Medicina Veterinara a Banatului Timisoara, 2012, 45(1): 136-141.
- [21] Taylor L W, Sjodin R A, Gunns, C A. The gaseous environment of the chick embryo in relation to its development and hatchability 1: Effect of carbon dioxide and oxygen levels during the first four days of incubation upon hatchability[J]. Poultry Science, 1956, 35(6): 1206-1215.
- [22] Taylor L W, Kreutziger G O. The gaseous environment of the

- chick embryo in relation to its development and hatchability 4: Effect of carbon dioxide and oxygen levels during the period of the thirteenth through the sixteenth days of incubation[J]. Poultry science, 1969, 48(3): 871-877.
- [23] De Smit L, Bruggeman V, Debonne M, et al. The effect of non-ventilation during early incubation on the embryonic development of chicks of two commercial broiler strains differing in ascites susceptibility[J]. Poultry Science, 2008, 87(3): 551-560.
- [24] Dusseau J W, Hutchins P M. Hypoxia-induced angiogenesis in chick chorioallantoic membranes: A role for adenosine[J]. Respir Physiol, 1988, 71(1): 33-44.
- [25] Bradbury J. Breathing hard to keep up with HIF-1[J]. Lancet, 2001, 358(9294): 1704-1704.
- [26] Ono T, Murakami T, Tanabe Y, et al. Culture of naked quail (*Coturnix coturnix japonica*) ova in vitro for avian transgenesis: Culture from the single-cell stage to hatching with pH-adjusted chicken thick albumen[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1996, 113(3), 287-292.
- [27] Sato M, Noda K, Kino K, et al. Comparison of heat production and plasma lipid metabolites between meat-and egg-types of Nagoya breed chicken during embryonic development[J]. Animal Science Journal, 2007, 78(6): 613-618.
- [28] Ono T, Murakami T, Mochii M, et al. A complete culture system for avian transgenesis, supporting quail embryos from the single-cell stage to hatching[J]. Developmental Biology, 1994, 161: 126-130.
- [29] Johnston P M, Comar C L. Distribution and contribution of calcium from the albumen, yolk and shell to the developing chick embryo[J]. The American Journal of Physiology, 1955, 183(3): 365-370.
- [30] Gillespie J I, McHanwell M. Measurement of intra-embryonic pH during the early stages of development in the chick embryo[J]. Cell Tissue Res, 1987, 247(2): 445-51.
- [31] 房兴堂, 闫莉, 石延玲, 等. 孵化期间乌骨鸡种蛋水分和钙变化及胚胎生长的研究[J]. 中国家禽, 2002, 24(11): 13-15.

Effects of carbon dioxide regulation during early incubation stage on the hatching embryos of layer eggs

Tong Qin^{1,2,3}, Zhu Lirong^{1,2}, Liu Chang^{1,2}, Zheng Weichao^{1,2,3*}, Han Shengqiang^{1,2,4}, Li Du⁵

(1. College of Water Resources and Civil Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Key Laboratory of Agricultural Engineering in Structure and Environment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100083, China; 3. Beijing Engineering Research Center for Animal Healthy Environment, Beijing 100083, China; 4. Jiangsu Lihua Animal Husbandry Co., Ltd., Changzhou 213168, China; 5. Beijing Huadu Yukou Poultry Industry Co., Ltd., Beijing 101206, China)

Abstract: Environmental parameters generally determine the incubation performance and chick quality, one of which is carbon dioxide (CO₂). However, the mechanism still remains unclear, particularly the effects of high CO₂ levels during early incubation on the hatching quality. In this study, three batches of fertile eggs from Jinghong No. 1 were incubated in two small-scale incubators, in order to investigate the influence of normal and higher CO₂ levels during the early stage of incubation (0-10 d). The treatment and control incubator maintained the CO₂ concentration of 1% and below 0.25%, respectively. The incubators were also swapped for the next batch. A higher CO₂ level was controlled during the incubation using a purpose-built system with CO₂ sensors and a CO₂ gas adding unit. The specific parameters were measured, including hatchability, chick quality, embryo weight, and relative embryo weight at the 6th, 9th, 12th, 15th, and 18th day, vascular development density of allantoic chorion (CAM) at day 11, albumen pH at day 0, day 3, day 6, day 9, day 12 and day 15, and the calcium content of eggshells and embryos at day 0, day 6 and day 12. The results showed that the CO₂ concentrations in the treatment and control incubator were achieved the target levels of about (0.96±0.04)%, lower than 0.25%. There was no significant difference between the two groups in hatchability and fertilized egg hatchability, where were (89.17±2.53)% and (91.57±1.03)% in the treatment and control group, respectively. Moreover, the higher CO₂ during early stage did not have much effect on the chick quality. The vascular development density of CAM on the 11th day had no significant difference between the treated and control groups, because the O₂ concentration was maintained around (20.2±0.1)%. There was also no significant difference in the calcium content of eggshells and embryos in the treated and control groups ($P>0.05$), but the calcium content of embryos increased significantly from day 6 to day 12 in both groups ($P<0.05$). However, the embryo weight and relative embryo weight in the treatment group were significantly higher than those in the control group on the 9th and 12th day ($P<0.05$), but they were not consistent on day 6, day 15, and day 18 ($P>0.05$). The effect of higher CO₂ on the embryo weight only occurred around the final stage of CO₂ stimulation. The reason was that the liquefaction of protein by CO₂ contributed greatly to promote the embryo absorption of nutrients from the protein, thereby accelerating embryonic development. But the effects just remained for a short term, until the CO₂ level was lower. Furthermore, the albumen pH in the treatment group was lower than that in the control group, due mainly to the higher external CO₂ level, particularly the significant differences on the 3rd, 6th, and 9th days. The overall change trend of protein pH value increased first and then decreased, finally reaching the peak on day 3. Consequently, 1% CO₂ treatment during the early stage of incubation (0-10 d) lowered the protein pH, while accelerated the embryo development without affecting the hatchability and chick quality.

Keywords: carbon dioxide; animals; hatching; embryonic development; hatchability