

单色绿光环境对孵化中种蛋蛋壳理化特性的影响

俞 玥^{1,2}, 蒋劲松³, 郑成煌³, 钟镇涛¹, 泮进明^{1*}

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310058; 2. 江苏科技大学粮食学院, 镇江 212100;
3. 杭州朗拓生物科技有限公司, 杭州 310016)

摘 要: 蛋壳是鸡胚发育过程中与外界环境进行气体和热量交换的重要媒介, 其结构、形态等因素均为影响鸡胚发育的重要因素。单色绿光照射可缩短种蛋孵化时间, 促进出雏、提高种蛋孵化率。有鉴于此, 该研究针对单色绿光调控孵化过程中的种蛋蛋壳色度、蛋壳结构、色素含量及元素含量等因素进行监测, 从种蛋蛋壳特性变化的角度探究单色绿光在种蛋孵化过程中促进雏鸡出雏的机制。结果表明, 与传统黑暗孵化环境相比较, 孵化过程单色绿光形成的光环境促使蛋壳对孵化环境产生适应性响应, 蛋壳表面亮度显著降低 ($P<0.01$), 抑制了蛋壳中绿色色素-胆绿素的分解 ($P<0.01$)。且单色绿光有助于鸡胚吸收利用蛋壳中的 Ca 元素, 显著促进孵化过程中蛋壳表面孔隙面积的风化增大 ($P<0.0001$), 提高蛋壳的通透性及散热效果, 利于出雏期间雏鸡出壳, 有助于促进出雏并降低孵化死亡率。该研究阐释了单色绿光孵化过程中种蛋蛋壳特性的变化, 为单色绿光促进种蛋出雏及其在孵化产业的应用奠定了一定的理论基础。

关键词: 光照; 物理特性; 化学特性; 单色绿光; 蛋壳色度; 蛋壳色素; 蛋壳孔隙面积; 出雏

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.10.035

中图分类号: S831.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2022)-10-0296-07

俞玥, 蒋劲松, 郑成煌, 等. 单色绿光环境对孵化中种蛋蛋壳理化特性的影响[J]. 农业工程学报, 2022, 38(10): 296-302.

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.10.035 <http://www.tcsae.org>

Yu Yue, Jiang Jinsong, Zheng Chenghuang, et al. Effects of monochromatic green light environment on the physical and chemical properties of eggshell during incubation[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2022, 38(10): 296-302. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.2022.10.035 <http://www.tcsae.org>

0 引 言

孵化是整个种禽生产中的最后一个环节, 孵化出健壮活泼的鸡苗是提高肉鸡生产性能的一个关键因素, 提高孵化率和健雏率一直是家禽生产的研究热点。影响禽蛋孵化效果的因素主要包括遗传背景、种蛋储存条件和孵化环境等^[1-3]。温度、相对湿度和翻蛋时间及角度是影响禽类孵化效果的主要因素, 在现代孵化产业中已优化得出较为成熟的体系^[4]。然而, 适宜禽类胚胎生长发育的环境条件设定均来自于模拟自然孵化。自然孵化条件下, 母禽的翻蛋、离巢觅食等行为都会使得种蛋在孵化期间得到大量的光照刺激^[5]。部分研究者采用荧光灯、LED等冷光源改变孵化中种蛋的光环境进行孵化调控^[6-10], 其中LED光源适用于开展不同单色光谱对鸡胚发育的影响探究。

现有研究表明, 光照可以在家禽的孵化过程中对胚胎发育及出雏后的生长产生显著的影响^[6,11-15]。采用单色

绿光刺激能够提高鸡胚和雏鸡育成期间的体质量和肌肉重量^[6-7,13,15-16], 且单色绿光处理能够促进鸡胚肌细胞的增殖、分裂以及分化, 促进肌纤维的有序排列, 且升高鸡胚的肌细胞生成素和 Pax7 的表达水平^[6]。本课题组前期采用单色绿光对孵化中的鸡种蛋进行调控, 结果表明单色绿光可缩短种蛋孵化时间、提高种蛋孵化率、促进出雏及雏鸡生长后期的抗应激能力, 并在研究过程中发现种蛋蛋壳颜色受单色绿光照射后会发生显著变化^[13,15]。

除环境因素外, 种蛋本身的品质特性也是影响孵化效果的重要因素。其中, 蛋壳是种蛋发育过程中抵抗外界细菌侵入及伤害的物理屏障, 起着控制胚胎发育与外界进行水气交换等重要生理活动的作用^[17-21]。现有研究表明气体扩散的速度与蛋壳厚度无关, 而是由多分支孔状结构的直径大小决定, 厚蛋壳具有更为复杂的孔状结构分支可以为氧气流通提供更多通道^[22-23]。高密度的蛋壳孔状结构可提高种蛋内部环境与外界的气体交换能力, 显著提高种蛋孵化率, 并且可以缩短总体孵化时间^[24]。除此之外, 蛋壳壳膜的超微结构也显著影响种蛋的呼吸强度^[25]。蛋壳表面的孔状结构数量与细菌侵入程度呈显著性负相关^[26], 从而影响孵化期间的胚胎成活率及总孵化率。蛋壳颜色可在一定程度上反映种蛋的品质, 与蛋壳厚度、蛋壳质量、蛋壳强度和蛋内成分等品质指标均具有一定的关联性^[27], 并对种蛋孵化率和胚胎发育产生一定的影响。在光照调控种蛋孵化过程中, 蛋壳颜色差异导致光透过率存在显著差异, 进而影响种蛋的孵化率以及胚胎

收稿日期: 2022-01-30 修订日期: 2022-04-09

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31902204); 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-40); 潮州市科技公益性技术应用研究项目 (重点) (2018GZ28)

作者简介: 俞玥, 博士, 讲师, 研究方向为畜禽养殖环境调控及信息感知。

Email: yuyueoffice2012@126.com

*通信作者: 泮进明, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为畜禽养殖环境调控及信息感知。Email: panhouse@zju.edu.cn

发育等^[27-30]。

因此，基于本课题组前期发现的单色绿光提升孵化性能及引起蛋壳颜色发生变化的现象^[13,15]，本文进一步通过对单色绿光调控孵化过程中种蛋蛋壳色度、色素含量、元素含量及其表层孔隙特征的测定，探究单色绿光调控对种蛋蛋壳特性的影响，从蛋壳特性变化的角度阐释单色绿光促进雏鸡出雏的相关机制，本研究的开展有助于丰富和拓展光照孵化产业实施的理论基础及应用创新。

1 材料与方法

1.1 试验对象

试验筛选同日生产的岭南黄鸡（54 周龄，浙江群大畜牧养殖有限公司）种蛋 400 枚，蛋质量区间为 57~61 g。种蛋挑选时间为产蛋当日 09:00，完成挑选运输至浙江大学。种蛋抵达实验室后，立刻进行质量记录、标记及孵化前消毒。

1.2 色度测定方法

试验采用色差仪（CR-400，KONICA，日本）测定样品色差。色差仪采用 Lab 色彩模型，以标准白板（KONICA，日本）作为基准值，获取检测对象的 L^* （亮度）、 a^* （红-绿值）和 b^* （黄-蓝值）和比色后的色差数据 ΔL^* （ ΔL^* 是正值，偏亮；是负值，偏暗）、 Δa^* （ Δa^* 是正值，偏红；是负值，偏绿）、 Δb^* （ Δb^* 是正值，偏黄；是负值，偏蓝）和根据公式（1）计算色差 ΔE 。

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (1)$$

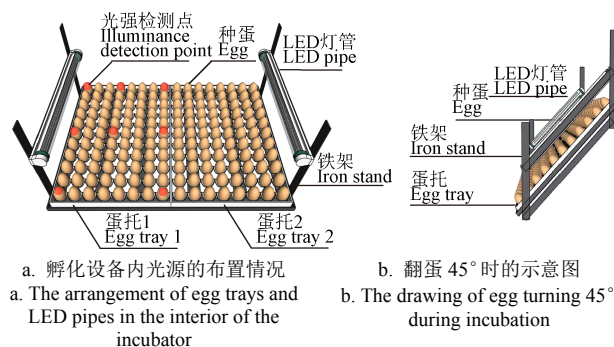
1.3 光源与光照制度

本试验采用 NK-525 型微电脑全自动孵化控制器（山东农科孵化设备有限公司），孵化设备内蛋托的排布及 LED 灯条的布置由图 1 所示。两个 LED 灯管安置高于蛋托 10 cm 的位置。两个 60 cm 长 LED 绿光（ 525 ± 15 ）nm 灯管（杭州朗拓生物科技有限公司）安装在个蛋托（ $36 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$ ）的两侧。光照从两个蛋托的侧边照射向中间区域。光照处理组的灯条由脉冲调控控制器（杭州朗拓生物科技有限公司）进行调控。在每个蛋托上均匀选取 9 个点（图 1）采用精密数显照度计（Mastech MS6610，Precision Mastech Enterprises，中国香港）对每个点进行左、右、水平三个点的光强测定，每个蛋托总测定次数为 27 次^[13]。基于前期研究的光强、光周期的优化研究结果，选取 120~220 lx、光照 18 h：黑暗 6 h（L：D=18：6）的光照方式作为光照处理组的方案。图 1 为孵化设备内光源的布置情况，包括在翻蛋及不同角度下的光源与种蛋距离的示意图。

1.4 试验动物处理

本试验采用 NK-525 型微电脑全自动孵化控制器（山东农科孵化设备有限公司），孵化设备的规格为长 110 cm×宽 100 cm×高 90 cm。孵化前，每个孵化设备提前运行 15 个工作日，并用标准温度计及标准湿度计对孵化设备进行校正与实时监测。在整个试验中的孵化条件为：温度为（ 37.8 ± 0.1 ）℃，相对湿度为 60%±1%。孵化过程中，每 2 h 对孵化设备的温度进行监测，以保证孵

化效果及温度的一致性。在 18 d 时，采用照蛋器（Cool-Lite Tester，GQF）对种蛋进行照蛋查验，挑选剔除无精蛋及死胚蛋。孵化期间，种蛋的翻蛋角度为前后 45°，翻蛋间隔时间为 2 h，18 d 停止翻蛋转移至出雏框内进行出雏。



注：图中深色位置均为光照强度检测点。

Note: The dark positions were for the measurement of light intensity.

图 1 孵化设备内光源的布置情况和在翻蛋 45° 时的示意图

Fig.1 The arrangement of egg trays and LED pipes in the interior of the incubator and drawing of egg turning 45° during incubation

1.5 样本采集及处理

将种蛋分别分成光照组和黑暗组（对照组）2 个处理组，共 6 个试验组，每组 132 个样本。在孵化期间的第 0（孵化前）、4、8、12、16、20 d（孵化结束）对各个试验组进行采样，每个试验组每次采集 10 枚种蛋。样本采集后，首先进行蛋壳色度测量，测量后进行蛋壳样品采集及清洗（去离子水清洗 3 次）后进行干燥处理，处理后的样品进行蛋壳元素及色素含量的测定。

1.6 蛋壳微观结构观察

分别在孵化的 0 d（孵化前）和 20 d（孵化结束）两个时间点，在各处理组分别取 3 枚种蛋钝端蛋壳进行清洗自然晾干预处理，后进行微观结构图像获取与分析，具体步骤如下：

1) 微观结构图像获取：选取样品中心区域 5 mm×5 mm 面积，将样品外表面向上粘于样品台上进行喷金处理；预处理完成后，采用扫描电子显微镜（TM-1000，HITACHI，日本）观察样品的外表面（×600），并对每个样品随机选择 3 个视野获取图像。

2) 图像处理与数据获取：先将获取的蛋壳外表面显微图像信息进行二值化处理（Image Pro Plus 6.0），获得二值化图像，随后进行白色像素数值计算，根据比例尺将像素数值转化为孔隙面积值。

1.7 蛋壳色素和元素含量测定

样品烘干后采用超高速粉碎机进行预处理，得到细粉样品。随后进行蛋壳色素（胆绿素和原卟啉）含量测定，具体步骤如下：在 50℃ 烘箱中 12 h 烘干后用超高速粉碎机（Q-250B，浙江哈瑞工贸有限公司）将蛋壳粉碎成细粉样（过 40 目筛，≤0.425 mm）。采用紫外分光光度计对蛋壳中原卟啉和胆绿素含量进行测定^[31]。

从上述已粉碎的蛋壳细粉中取少量样品进行硝酸消解，用电感耦合等离子体质谱仪（Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry，ICP-MS）（Optima 8000，

PerkinElmer, 美国)测定不同样品中的 K、Na、Ca、Mg、P 元素含量, 单位为 mg/g。每个组选取 6 个样本进行两两合并后进行检测。

1.8 数据分析

利用 Graphpad Prism 7.0 软件对各组各采样日的蛋壳色度、色素、元素和孔隙密度绘制数据分布图, 并进行 Two-way ANOVA 分析 Tukey 多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 种蛋蛋壳色度变化

1) 亮度值 L^* 值

图 2a 为不同处理组在孵化期间种蛋蛋壳亮度 L^* 值的变化对比情况, 结果表明, 与黑暗组相比较, 单色绿光处理孵化会降低种蛋蛋壳的亮度, 即 ΔL^* 值负值增加。

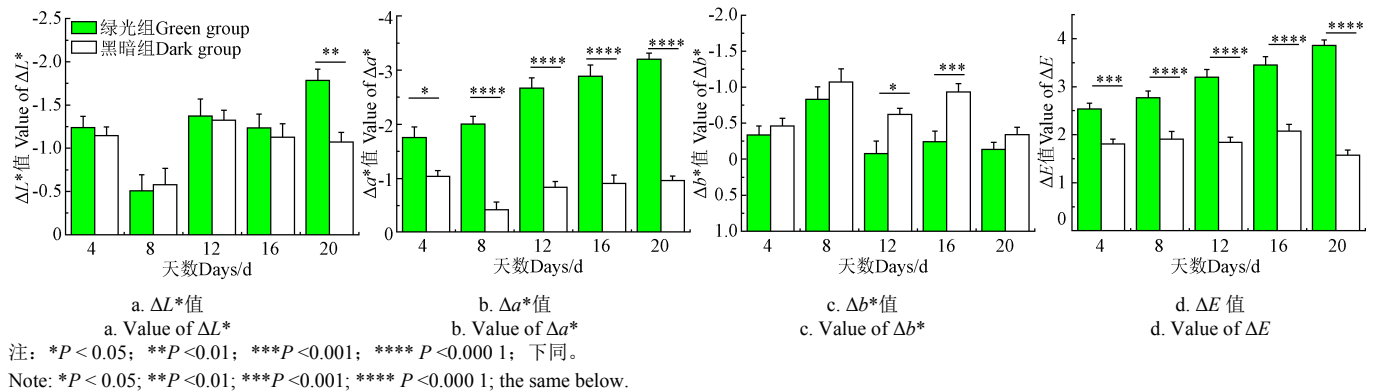


图 2 不同处理组孵化期间蛋壳色度变化对比

Fig.2 Comparison of color change of eggshell in different treatments during incubation

3) 黄-蓝 b^* 值

图 2c 为不同处理组在孵化期间种蛋蛋壳黄-蓝 b^* 值的变化对比情况。在孵化早期, 4~8 d 时的各处理组样本的黄-蓝 Δb^* 值发生略微负值减小, 但有无光照处理无显著性差异 ($P > 0.05$)。孵化中期, 12~16 d 时两组之间发生显著性差异 ($P < 0.05$), 黑暗组蛋壳相对于单色绿光处理组 Δb^* 值显著负值增加。但孵化结束 20 d 时, 两处理组蛋壳 Δb^* 值无显著性差异。因此, 综上所述比较 4 d 与 20 d 时, 单色绿光处理组与黑暗孵化组的种蛋蛋壳 Δb^* 值均无显著性的差异 ($P > 0.05$)。由以上结果推论, 单色绿光对孵化前期和后期种蛋蛋壳的黄-蓝 Δb^* 值均无显著性的影响。

4) 色差值 ΔE

图 2d 为不同处理组在孵化期间种蛋蛋壳色差 ΔE 值的变化对比情况。孵化期间 2 个处理组的种蛋蛋壳色差 ΔE 值在孵化期 4 d 时就与黑暗组之间产生了显著性差异 ($P < 0.001$)。并且在孵化期 20 d, 单色绿光处理组蛋壳 ΔE 值约为黑暗孵化组蛋壳色度 ΔE 的 2.4 倍, 表明相对于黑暗处理组, 单色绿光处理使得孵化期间种蛋蛋壳的色差值产生了显著性的变化 ($P < 0.001$)。

2.2 蛋壳色素

蛋壳的颜色主要受原卟啉-IX 和胆绿素两种色素的影响^[27,32]。图 3 为不同处理组在孵化期间蛋壳原卟啉-IX

单色绿光处理组的蛋壳亮度 ΔL^* 值在孵化前期和中期 (4 d、12 d 和 16 d) 与黑暗组相比负值略大 ($P > 0.05$), 但在孵化结束 20 d 时与黑暗组之间呈现显著性差异 ($P < 0.01$)。由此可见, 单色绿光处理在孵化期间负向增大了种蛋蛋壳的亮度 ΔL^* 值, 即蛋壳亮度降低。

2) 红-绿 a^* 值

图 2b 为不同处理组在孵化期间种蛋蛋壳红-绿 a^* 值的变化对比情况, 结果表明种蛋蛋壳在单色绿光照射下红-绿 Δa^* 值呈现负值增加, 且在整个孵化期间从第一次采样时间起 (4 d) 就显著高于黑暗组的种蛋蛋壳 ($P < 0.05$) 直至 20 d ($P < 0.0001$) 显著性差异逐渐增强, 并且黑暗组的种蛋蛋壳红-绿 Δa^* 值在孵化期间 (12~20 d) 的趋势较为稳定。由此可知, 单色绿光处理会使种蛋蛋壳的红-绿 Δa^* 值显著性负向增大, 即种蛋蛋壳颜色逐渐偏绿。

含量的变化对比情况。随着孵化时间的增加, 单色绿光处理组和黑暗组中的种蛋蛋壳原卟啉-IX 含量均随着孵化时间呈现略微降低趋势, 但在整个孵化期间无显著性差异 ($P > 0.05$), 组间亦无显著性差异 ($P > 0.05$)。

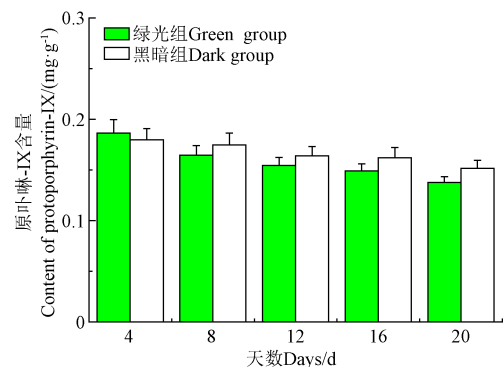


图 3 不同处理组孵化期间蛋壳原卟啉-IX 含量的变化对比
Fig.3 Comparison of content of protoporphyrin-IX in eggshell in different treatments during incubation

图 4 为不同处理组在孵化期间蛋壳胆绿素的变化对比情况。试验结果表明, 在孵化期间, 黑暗组种蛋蛋壳胆绿素含量在 0~4 d 基本保持稳定, 4 d 之后发生显著性的下降 ($P < 0.01$)。单色绿光组种蛋蛋壳胆绿素含量在 0~12 d 基本保持稳定, 12 d 之后发生显著性下降 ($P < 0.01$)。且从孵

化 8~20 d（孵化结束），受单色绿光照射的种蛋蛋壳胆绿素含量下降值显著低于黑暗下孵化的种蛋蛋壳（ $P<0.01$ ）。综上，单色绿光处理有减缓孵化中种蛋蛋壳胆绿素分解的作用，此结果与色度分析结果一致，进一步表明单色绿光处理有减缓种蛋蛋壳胆绿素分解的作用，使得单色绿光处理下的种蛋蛋壳相对于黑暗组的种蛋蛋壳偏绿。

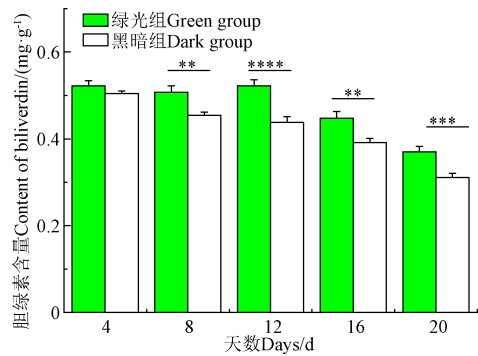


图 4 不同处理组孵化期间蛋壳胆绿素含量的变化对比
Fig.4 Comparison of content of biliverdin in eggshell in different treatments during incubation

2.3 蛋壳元素含量

如表 1 所示，孵化期间种蛋壳 P 含量呈显著性上升趋势（ $P<0.0001$ ），从孵化的 12~20 d，单色绿光处理下的种蛋壳 P 含量均略高于黑暗孵化组，但整个孵化期间

两组之间的 P 含量无显著性差异（ $P>0.05$ ）。孵化期间种蛋壳中的 Ca 含量呈显著下降趋势（ $P<0.0001$ ）。种蛋壳中的 Ca 元素是胚胎发育中后期的主要 Ca 源。从 12 d 起，蛋壳 Ca 含量下降幅度增大，此阶段也是胚胎骨骼的快速发育阶段，对 Ca 含量的需求量增大。在孵化 16 d 和 20 d 时，与黑暗组相比较，单色绿光处理组的蛋壳的 Ca 元素含量显著降低（ $P<0.001$ ），且单色绿光处理组 20 d 时蛋壳的 Ca 含量（相对 4 d 时下降 9.5%）。综合分析结果说明，孵化过程中单色绿光处理有显著促进胚胎吸收 Ca 元素的作用。

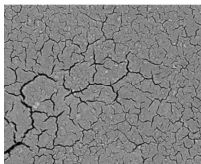
孵化期间种蛋壳中的 K、Na 含量呈显著性的下降趋势（ $P<0.0001$ ），但单色绿光处理组与黑暗组之间无显著性差异。且单色绿光处理组与黑暗组之间的蛋壳 Mg 含量总体上无显著性差异（ $P>0.05$ ）。因此，单色绿光处理并未对孵化期间蛋壳的 K、Na、Mg 元素的吸收转运产生影响。

2.4 蛋壳孔隙面积

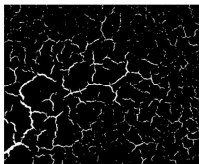
孵化期间种蛋的钝端位置朝上且为受光照的主要部位，本研究对种蛋钝端蛋壳外表面的微观结构图像进行测定，并对其微观扫描图像进行处理分析，二值化处理前后图像如图 5a、b 所示，对不同处理组的蛋壳外表面孔隙面积进行计算及统计分析对比。如图 5c 所示，受单色绿光处理的蛋壳表面孔隙面积显著高于黑暗环境下的样品的孔隙面积（ $P<0.0001$ ）。综上所述，孵化中单色绿光处理有增大蛋壳外表面孔隙面积的作用。

表 1 不同处理组孵化期间蛋壳 P、Ca、K、Na、Mg 元素含量的变化对比
Table 1 Comparison of concentration of element changes (P, Ca, K, Na, Mg) of eggshell in different treatments during incubation (mg·g⁻¹)

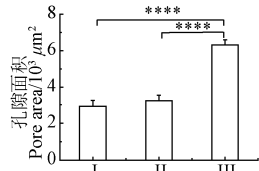
元素 Element	组别 Groups	天数 Day/d					P 值
		4	8	12	16	20	
P	黑暗组 Dark group	1.22±0.029	1.291±0.023	1.275±0.034	1.322±0.030	1.453±0.029	$P<0.0001$
	绿光组 Green group	1.229±0.033	1.247±0.060	1.317±0.046	1.365±0.041	1.539±0.037	$P<0.0001$
	P 值	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	
K	黑暗组 Dark group	0.532±0.011	0.442±0.016	0.445±0.004	0.42±0.005	0.398±0.004	$P<0.0001$
	绿光组 Green group	0.517±0.012	0.475±0.011	0.444±0.008	0.417±0.003	0.403±0.003	$P<0.0001$
	P 值	$P>0.05$	$P<0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	
Mg	黑暗组 Dark group	4.382±0.073	4.703±0.076	4.69±0.043	4.67±0.068	4.468±0.070	$P<0.01$
	绿光组 Green group	4.736±0.110	4.481±0.078	4.491±0.094	4.754±0.126	4.747±0.123	$P>0.05$
	P 值	$P<0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	
Na	黑暗组 Dark group	0.969±0.011	0.942±0.026	0.925±0.013	0.913±0.026	0.845±0.003	$P<0.0001$
	绿光组 Green group	1.002±0.010	0.923±0.019	0.939±0.016	0.883±0.023	0.838±0.007	$P<0.0001$
	P 值	$P<0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	
Ca	黑暗组 Dark group	396.272±0.746	392.748±0.758	384.316±1.390	375.833±1.420	362.743±0.655	$P<0.0001$
	绿光组 Green group	394.782±1.418	391.395±0.572	383.998±1.565	369.523±1.12	357.429±1.108	$P<0.0001$
	P 值	$P>0.05$	$P>0.05$	$P>0.05$	$P<0.01$	$P<0.01$	



a. 二值化处理前蛋壳显微图像
a. Microscope images of eggshell before binary segmentation



b. 二值化处理后显微图像
b. Microscope images of eggshell after binary segmentation



c. 孵化前后蛋壳孔隙面积
c. Difference of pore area of eggshell from start to finish of incubation

注：I：孵化 0 d；II：黑暗孵化 20 d；III：单色绿光孵化 20 d。
Note: I: incubation 0 d; II: Dark incubation 20 d; III: Green light incubation 20 d.

图 5 二值化处理前后的蛋壳显微图像，以及孵化前后蛋壳孔隙面积的比较

Fig.5 Microscope images of eggshell before or after binary segmentation before segmentation, after segmentation and pore area of eggshell from start to finish of incubation

3 讨论

大量研究表明,不同品种种蛋拥有不同的蛋壳品质(厚度、颜色、力学特性等),对胚胎发育有着重要的影响。本研究结果表明,与黑暗组相比较,孵化期间的单色绿光处理显著提高了种蛋蛋壳的色差 ΔE 值 ($P<0.001$),色彩模型中的 a^* 值负向发生了显著性的变化 ($P<0.05$),即蛋壳的颜色偏绿;本研究中单色绿光处理导致蛋壳的 ΔL^* 值显著负值增加 ($P<0.001$),蛋壳亮度降低。孵化期间的蛋壳色素含量也随着孵化时间而降低,与黑暗环境孵化对比,单色绿光处理可以显著性减缓胆绿素的分解 ($P<0.01$)。

种蛋蛋壳中的元素含量也会随着孵化进程而改变,其中蛋壳的 Ca、K、Na 含量显著性下降 ($P<0.0001$),P 含量显著性上升 ($P<0.0001$)。相对于黑暗孵化组,单色绿光有促进 Ca 元素被胚胎利用吸收的作用。孵化过程本身会显著增大蛋壳外表面的孔隙面积,由结果可知,相对于黑暗孵化组,单色绿光处理显著促进了孵化过程中蛋壳表面孔隙面积的加大。

在种蛋的孵化期间,高温、高湿和胚胎自身发育生理过程都是影响蛋壳色度的重要因素。有文献报道光子的攻击也会造成物质中色素的降解^[33]。温度调节假说提出,蛋壳中的原卟啉和胆绿素两种主要色素的红外反射率,可以保护种蛋内容物免受太阳辐射引起的过热,特别是在孵化期间^[34]。也有证据表明,原卟啉色素可以集中在蛋壳因缺钙而变薄的区域,通过补偿蛋壳强度的降低和这些区域渗透性的增加来加强对胚胎的保护^[35],此结论与本研究的结论相符合。

除此之外,也有研究发现在地上筑巢的开放式筑巢物种中,蛋壳亮度和捕食率之间存在中等程度的正效应,表明较亮的蛋壳可能更易被捕食者发现,因此推论种蛋在孵化的光照过程中对孵化光环境进行响应调节,降低蛋壳表面亮度,促进原卟啉-IX 的降解且抑制蛋壳中胆绿素的分解,致使种蛋蛋壳亮度低、颜色偏绿,更适应在单色绿光环境下孵化^[36]。该结论也表明,自然界中鸟类种蛋孵化过程中,蛋壳颜色也会因受到自然光的照射而发生改变^[37-38],且自然界中鸟类种蛋蛋壳的色彩本身就是鸟类抵御外界天敌的保护色彩,种蛋表面的颜色会随着外界环境改变而改变,以拟态的形式对自然界中的环境、天敌、寄主等因素产生适应性^[39]。

本研究还发现种蛋蛋壳外表面孔隙面积随着孵化的进程增大,这与研究结果中单色绿光处理促进 Ca 元素吸收相符合,单色绿光处理增大了蛋壳风化程度,从而增加了蛋壳外表面孔隙面积。本课题组前期研究表明,与传统黑暗孵化相比,单色绿光处理可使出雏高峰期前置 12 h^[15],该研究结果也与现有的相关研究结果相一致^[9]。由此推论,虽然 LED 单色绿光属于冷光源,但光照仍属于种蛋孵化期间能量摄入源,且在种蛋孵化后期种蛋自行产热较大,因此种蛋对孵化环境产生响应,蛋壳孔隙面积的增大进一步提高了蛋壳的通透率,进行散热,并同时可以为胚胎发育和后期出雏过程提供更加充足的氧气,促进胚胎提前出雏,提高出雏效率。

Ca 元素为蛋壳中含量最高的元素,其次 Na、K、Mg 等元素为蛋壳中含量较高的元素^[40]。Ca、Na、Mg、K 等元素与蛋壳质量密切相关,且蛋壳质量对孵化后期出雏过程影响较大^[41-42]。首先,蛋壳是胚胎发育的主要 Ca 源^[43],伴随着胚胎发育(特别在 12 d 之后)对 Ca 元素需求的增大,蛋壳中的 Ca 元素含量发生显著性下降^[44]。在单色绿光的作用下,孵化期间蛋壳中其他元素也发生了变化。其中蛋壳的 K 含量显著性下降,P 含量显著性上升。单色绿光处理组的蛋壳 Ca 含量在孵化早期相对于黑暗孵化组无显著性差异,但数值从 12 d 起略微低于黑暗组。相对于其他元素,Ca 元素在蛋壳的中占比最高(30%~40%)^[37,40],略微的差异也在一定程度上表明吸收的差异性,并且在孵化后期 16~20 d 期间单色绿光处理组蛋壳 Ca 含量显著低于黑暗处理组,因此推断单色绿光有促进 Ca 元素被胚胎利用吸收的作用。P 元素是生命活动中的重要元素,但蛋壳并不是胚胎发育过程中的 P 源^[45],种蛋中的 P 元素主要存在于卵黄(80%~85%)和蛋白(15%~20%)当中。本研究中发现蛋壳中的 P 含量会随着种蛋的孵化进行显著升高 ($P<0.0001$),然而,此类研究目前并无一致性的结论,需要扩大孵化品种等因素进行深入研究^[46]。

本课题组前期的研究表明,与传统黑暗环境孵化相比较,在孵化期间对种蛋进行单色绿光的处理,可以显著降低种蛋早期的死亡率 2% ($P<0.001$),提高种蛋的孵化率约 5% ($P<0.001$),出雏高峰期提前约 12 h,促进出雏^[15]。这可能与蛋壳中的天然色素原卟啉具有保护外壳免受革兰氏阳性菌感染的光依赖性抗菌机制有关^[47]。并且胆绿素是负责蓝绿色蛋壳着色的色素^[48],作为一种抗氧化剂在蛋壳表面存在,同样可以提高胚胎在孵化过程中的机体抗氧化能力,且单色绿光处理抑制了孵化过程中胆绿素的降解,进一步降低了胚胎在孵化过程中的死亡率,提高孵化率促进出雏。本研究的结果进一步表明单色绿光处理提升了种蛋对环境的适应性,有效的促进了出雏效率,有助于了解发育期间胚胎对环境的适应能力及相关机理。

4 结论

本研究表明,在种蛋的孵化期间提供单色绿光刺激,有助于提升蛋壳中 Ca 元素被胚胎吸收利用,显著促进了孵化过程中蛋壳表面孔隙面积的加大 ($P<0.0001$),进一步提高了蛋壳通透性及散热能力,为胚胎发育和后期出雏过程提供充足的氧气,提高出雏效果。且在孵化过程中单色绿光形成的光环境促使种蛋对孵化环境产生响应,显著降低蛋壳表面亮度 ($P<0.01$),并抑制蛋壳中胆绿素的分解 ($P<0.01$),从而降低种蛋在孵化期间的被捕食概率,增强对过剩热量的调节能力。本研究从蛋壳特性变化的角度解释了单色绿光可缩短种蛋孵化时间、提高种蛋孵化率的可能的机理,为单色绿光在孵化产业中的应用奠定了一定的理论基础。

[参考文献]

- [1] Narushin V, Bogatyr V, Romanov M N. Relationship between hatchability and non-destructive physical measurements of chicken eggs[J]. The Journal of Agricultural

- Science, 2016, 154(2): 359-365.
- [2] Iqbal J, Khan S H, Mukhtar N, et al. Effects of egg size (weight) and age on hatching performance and chick quality of broiler breeder[J]. Journal of Applied Animal Research, 2016, 44(1): 54-64.
- [3] Khalil H A, Hanafy A M, Hamdy A M. Effect of artificial and natural day light intensities on some behavioral activities, plumage conditions, productive and physiological changes for Japanese quail[J]. Asian Journal of Poultry Science, 2016, 10: 52-63.
- [4] 陈哲, 陈永霞, 于建宁, 等. 光照在禽蛋孵化期的应用和研究进展[J]. 中国家禽, 2018, 40(4): 1-6.
Chen Zhe, Chen Yongxia, Yu Jianning, et al. Application and research progress of illumination during avian hatching process[J]. China Poultry, 2018, 40(4): 1-6. (in Chinese with English abstract)
- [5] 陈哲, 于建宁, 朱欢喜, 等. 单色光红光影响家禽繁殖性能的研究进展[J]. 中国家禽, 2016, 38(23): 41-45.
Chen Zhe, Yu Jianning, Zhu Huanxi, et al. Research progress on the effect of monochromatic red light on reproductive performance of poultry[J]. China Poultry, 2016, 38(23): 41-45. (in Chinese with English abstract)
- [6] Halevy O, Piastun Y, Rozenboim I, et al. In ovo exposure to monochromatic green light promotes skeletal muscle cell proliferation and affects myofiber growth in posthatch chicks[J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2006, 290: 1062-1070.
- [7] Rozenboim I, Huisinga R, Halevy O, et al. Effect of embryonic photostimulation on the posthatch growth of turkey poults[J]. Poultry Science, 2003, 82: 1181-1187.
- [8] Dishon L, Avital-Cohen N, Zaguri S, et al., The effect of selected in ovo green light photostimulation periods on post-hatch broiler growth and somatotropic axis activity[J]. Poultry Science, 2021, 100: 101229.
- [9] Tong Q, McGonnell I M, Demmers T G M, et al. Effect of a photoperiodic green light programme during incubation on embryo development and hatch process[J]. Animal, 2018, 12: 765-773.
- [10] Ma S, Wang Z, Cao J, et al. BMAL1 but not CLOCK is associated with monochromatic green light-induced circadian rhythm of melatonin in chick pinealocytes[J]. Endocrine Connections, 2019, 8: 57-68.
- [11] Cooper J. Effect of light during incubation on hatchability of turkey eggs[J]. Poultry Science, 1972, 51: 1105-1108.
- [12] Rozenboim I, Biran I, Uni Z, et al. The effect of monochromatic light on broiler growth and development[J]. Poultry Science, 1999, 78: 135-138.
- [13] 俞玥. LED光调控鸡胚孵化及蛋壳光透过特性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
Yu Yue. Research of LED Light Stimulation for Chicken Embryo and Light Transmittance of Eggshell during Incubation[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016. (in Chinese with English abstract)
- [14] 钟镇涛. LED绿光调控种蛋孵化胚胎代谢和出雏特性的机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
Zhong Zhentao. Research of LED Green Light Stimulation on Metabolism and Hatching Traits of Chicken Embryo during Incubation[D]. Hangzhou, Zhejiang University, 2018. (in Chinese with English abstract)
- [15] Yu Y, Li Z, Zhong Z, et al. Effect of monochromatic green LED light stimuli during incubation on embryo growth, hatching performance, and hormone levels[J]. Transactions of the ASABE, 2018, 61(2): 661-669.
- [16] Wang P, Sun Y, Li Y, et al. Monochromatic green light stimulation during incubation shortened the hatching time via pineal function in White Leghorn eggs[J]. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2021, 12: 1-10.
- [17] Board R, Halls N. The cuticle: A barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg[J]. British Poultry Science, 1973, 14: 69-97.
- [18] Favier G I, Escudero M, Velázquez L, et al. Reduction of *Yersinia enterocolitica* and mesophilic aerobic bacteria in egg-shell by washing with surfactants and their effect on the shell microstructure[J]. Food Microbiology, 2000, 17: 73-81.
- [19] Kaewmanee T, Benjakul S, Visessanguan W. Changes in chemical composition, physical properties and microstructure of duck egg as influenced by salting[J]. Food Chemistry, 2009, 112: 560-569.
- [20] De Reu K, Grijspeerdt K, Messens M, et al. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 112: 253-260.
- [21] 王娇娇, 王巧华, 曹芮, 等. 不同 CO₂ 浓度下鸡蛋呼吸仿真分析及验证[J]. 农业工程学报, 2021, 37(6): 302-308.
Wang Jiaojiao, Wang Qiaohua, Cao Rui, et al. Simulation analysis and verification of egg respiration under different CO₂ concentrations[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2021, 37(6): 302-308. (in Chinese with English abstract)
- [22] Nascimento V, Cranston S, Solomon S. Relationship between shell structure and movement of *Salmonella enteritidis* across the eggshell wall[J]. British Poultry Science, 1992, 33: 37-48.
- [23] Hechenleitner E M, Grellet-Tinner G, Foley M, et al. Micro-CT scan reveals an unexpected high-volume and interconnected pore network in a Cretaceous *Sanagasta* dinosaur eggshell[J]. Journal of the Royal Society Interface, 2016, 13: 20160008.
- [24] Seymour R S, Roberts J D. Oxygen uptake by the aquatic eggs of the Australian frog *Crinia georgiana*[J]. Physiological Zoology, 1995, 68: 206-222.
- [25] 马逸霄, 田雅宁, 王巧华. 鸡蛋蛋壳膜超微结构与呼吸强度的相关关系[J]. 农业工程学报, 2022, 38(4): 316-323.
Ma Yixiao, Tian Yaning, Wang Qiaohua. Correlation between eggshell membrane ultrastructure and respiration intensity[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2022, 38(4): 316-323. (in Chinese with English abstract)
- [26] Krystianiak S, Kożuszek R, Kontecka H, et al. Quality and ultrastructure of eggshell and hatchability of eggs in relation to eggshell colour in pheasants[J]. Animal Science Papers and Reports, 2005, 23: 5-14.
- [27] Taha A E. Analyzing of quail eggs hatchability, quality, embryonic mortality and malpositions in relation to their shell colors[J]. Online Journal of Animal and Feed Research, 2011, 1: 267-273.
- [28] Shafey T, Al-Mohsen T, Al-Sobayel A, et al. Effects of eggshell pigmentation and egg size on the spectral properties and characteristics of eggshell of meat and layer breeder eggs[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2002, 15: 297-302.
- [29] Shafey T. Effect of lighted incubation on embryonic growth and hatchability performance of two strains of layer breeder eggs[J]. British Poultry Science, 2004, 45: 223-229.
- [30] Shafey T, Ghannam M, Al-Batshan H, et al. Effect of pigment intensity and region of eggshell on the spectral transmission of light that passes the eggshell of chickens[J]. International Journal of Poultry Science, 2004, 3: 228-233.
- [31] 张学武. 卢氏绿壳鸡蛋蛋壳腺中胆绿素时空变化及鸡蛋品质的变化[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012.
Zhang Xuewu. The Spatial Temporal Changes of Biliverdin in the Shell Gland and the Changes of Egg Quality of Green-Eggshell of Lushi Chicken[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2012. (in Chinese with English abstract)
- [32] Zhao R, Xu G Y, Liu Z Z, et al. A study on eggshell pigmentation: Biliverdin in blue-shelled chickens[J]. Poultry Science, 2006, 85: 546-549.
- [33] 张凯. 鸭蛋壳的力学特性及多孔超微结构的渗透特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.

- Zhang Kai. Research on Mechanics of Duck Eggshells and Its Permeability of Porous Ultrastructure[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012. (in Chinese with English abstract)
- [34] Bakken G, Vanderbilt V, Buttemer W, et al. Avian eggs: Thermoregulatory value of very high near-infrared reflectance[J]. *Science*, 1978, 200: 321-323.
- [35] Gosler A G, Higham J P, Reynolds S J. Why are birds' eggs speckled?[J]. *Ecology Letters*, 2005, 8: 1105-1113.
- [36] Hanley D, Cassey P, Doucet S M. Parents, predators, parasites, and the evolution of eggshell colour in open nesting birds[J]. *Evolutionary Ecology*, 2013, 27: 593-617.
- [37] Paterson D. The effect of sunlight on the tints of birds' eggs[J]. *Nature*, 1897, 56: 11.
- [38] Cassey P, Hauber M E, Maurer G, et al. Sources of variation in reflectance spectrophotometric data: A quantitative analysis using avian eggshell colours[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2012, 3: 450-456.
- [39] Hanley D, Sulc M, Brennan P L, et al. Dynamic egg color mimicry[J]. *Ecology and Evolution*, 2016, 6: 4192-4202.
- [40] 朱腾高, 陈静, 吴德波, 等. ICP-MS 顺次分析鸡蛋壳中微量元素[J]. *质谱学报*, 2021, 42(4): 487-494.
- Zhu Tenggao, Chen Jing, Wu Debo, et al. Analysis of trace elements in egg shells by ICP-MS[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2021, 42(4): 487-494. (in Chinese with English abstract)
- [41] Abdel-Salam Z A, Abdou A M, Harith M A. Elemental and ultrastructural analysis of the eggshell: Ca, Mg and Na Distribution During embryonic development via LIBS and SEM Techniques[J]. *International Journal of Poultry Science*, 2006, 5(1): 35-42.
- [42] Park J A, Sohn S H. The influence of hen aging on eggshell ultrastructure and shell mineral components[J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2018, 38(5): 1080-1091.
- [43] Navarro J Y, Lahti D C. Light dulls and darkens bird eggs[J]. *PloS One*, 2014, 9: e116112.
- [44] Packard M J, Packard G C. Patterns of mobilization of calcium, magnesium, and phosphorus by embryonic yellow-headed blackbirds (*Xanthocephalus xanthocephalus*)[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 1991, 160: 649-654.
- [45] 李吕木, Peebles D. 孵化期间鸡胚、肝脏、卵黄及蛋白组成的变化及其相关关系[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(6): 574-577.
- Li Lvmu, Peebles D. Chick embryo liver yolk and albumen compositional changes and their relationships during incubation[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(6): 574-577. (in Chinese with English abstract)
- [46] Szeleszczuk Ł, Kuras M, Pisklak D, et al. Analysis of the changes in elemental composition of the chicken eggshell during the incubation period[J]. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 2016, 26(3): 583-587.
- [47] Ishikawa S, Suzuki K, Fukuda E, et al. Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments[J]. *FEBS Letters*, 2010, 584: 770-774.
- [48] Gorchein A, Lim C, Cassey P. Extraction and analysis of colourful eggshell pigments using HPLC and HPLC/electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Biomedical Chromatography*, 2009, 23: 602-606.

Effects of monochromatic green light environment on the physical and chemical properties of eggshell during incubation

Yu Yue^{1,2}, Jiang Jinsong³, Zheng Chenghuang³, Zhong Zhentao¹, Pan Jinming^{1*}

(1. School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. School of Grains Science and Technology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212100, China; 3. Hangzhou LightTalk Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310016, China)

Abstract: Incubation is the last step of the whole breeding for the better performance of poultry production. Among them, the hatching rate and healthy chick rate can be always considered research hotspots in the field. Particularly, lighting has been one of the most important environmental conditions during poultry hatching in recent years. Cold light sources can be used to regulate the hatching, including fluorescent lamps and LED. The light environment can be tailored for the eggs breeding during the hatching process. Alternatively, the LED light source can be used to explore the significant influence of different monochromatic spectra on chicken embryo development and growth after hatching. Eggshell is an important medium of gas exchange between chicken embryos and the outside world during chicken embryo development. The eggshell can be antibacterial to effectively resist external physical damage. Meanwhile, the structure and morphology of eggshells are also important factors affecting the development of chicken embryos. As reported in previous research, the performance of hatching depends largely on the physical and chemical properties of the eggshell. More importantly, the monochromatic green light irradiation can shorten the hatching time of breeding eggs, leading to a higher hatching rate and the anti-stress ability of chicks. In this study, the fertilized eggs were treated with the monochrome green light by LED lamps from the two sides of the egg tray during the whole incubation process. Specifically, the illumination period was L:D= 18:6, and the illumination intensity was 120-220 lx. The influencing factors were monitored during incubation with the monochrome green light regulation, such as eggshell color, eggshell structure, pigment content, and element content. An optimal mechanism for the chick hatching was established under the monochrome green lighting. The results indicated that the incubation environment of monochromatic green light promoted the adaptive response of the eggshell. Also, the surface brightness L^* of the eggshell decreased significantly ($P < 0.01$), and the decomposition of biliverdin in the eggshell was inhibited ($P < 0.01$). In addition, the monochrome green light was beneficial to the absorption and utilization of Ca element in the eggshell. There was also a significant increase in the weathering and the pore area of the eggshell surface during hatching ($P < 0.0001$). Consequently, the enhanced permeability and heat dissipation of eggshell were achieved to improve the hatchability for less mortality during the hatching process. This finding can also provide the promising prospect for the better hatchability and utilization of monochrome green light in the incubation industry, as well as promoting the coordinated development of the poultry industry and energy conservation to enhance sustainable agriculture.

Keywords: light; physical properties; chemical properties; monochromatic green light; eggshell chroma; eggshell pigment; pore area of eggshell; hatching