

小型反射式光度計による牧草中硝酸態窒素含量の簡易推定法

藤吉弘子・梅田剛利・棟加登きみ子・井上信明
(畜産研究所)

家畜の硝酸塩中毒を回避するため、イタリアンライグラス、スーダングラス、ギニアグラスとアルファルファ中の硝酸態窒素含量を小型反射式光度計により簡易に推定する方法について検討した。

調製方法(生草、サイレージ)と草種が硝酸態窒素測定値に及ぼす影響は少なく、高速液体クロマトグラフによる公定法と小型反射式光度計による測定値は高い正の相関が認められ、測定値もほぼ一致した。

[キーワード: 生草, サイレージ, 草種, 硝酸態窒素, 公定法, 小型反射式光度計]

Establishment of a Simple Method for Detecting Nitrate-Nitrogen. FUJIYOSHI Hiroko, Taketoshi UMEDA, Kimiko MUNEKADO and Nobuaki INOUE (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikusino Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 19: 119-122 (2000)

This report describes a simple method for estimating nitrate nitrogen concentration in forage for the purpose of preventing nitrate poisoning. Whether the samples were green forage, silage or a few different kinds of grass, there was just a minor influence on the content of Nitrate-nitrogen as read by a portablereflection photometer. There was a high correlation between the HPLC analysis and the portable reflection photometer reading.

[Key words: forage, green forage, silage, nitrate nitrogen, HPLC, portable reflection photometer]

緒 言

飼料作物は草種、栽培条件や気象条件によって、硝酸態窒素含量が高くなることもある⁶⁾。このような飼料作物を牛に給与すると、急性の硝酸塩中毒による死亡事故⁶⁾、乳量の低下や繁殖障害などのダメージが心配される。硝酸塩中毒を回避するため、現場で迅速、簡易に測定できる硝酸態窒素の測定法が求められている。硝酸態窒素の測定方法にはカドミウム還元法¹⁴⁾、水蒸気蒸留法¹⁴⁾、サリチル硫酸法¹⁴⁾、安藤等の方法による比色法¹⁾等がある。

1996年に精度の高い高速液体クロマトグラフによる公定法¹³⁾が定められたが、測定には高額な測定機械が必要であり、測定前に機器の条件設定、標準液による検量線の作成等を行なう必要がある。簡易な測定方法として硝酸イオン電極法、硝酸試験紙法¹⁴⁾があるが、硝酸イオン電極法は測定方法に慣れないと正しい値を得ることが難しく、硝酸試験紙法は色票との比較から濃度を読みとるため、小さな濃淡の差は判定が難しい等問題点がある。

一方、小型反射式光度計はイオン検出定量用試験紙を使用することで、簡易にリン酸や硝酸等の多項目の分析が可能であり、測定に特別な試薬を必要とせず、結果が数値で表示されるなど取扱いが容易であることから、土壌分析⁴⁾に活用されている。飼料作物での測定については、小野内ら⁹⁾による流通飼料、山井ら¹²⁾と深沢ら³⁾による牧草で報告がある。しかし、スーダングラス、イタリアンライグラス、ギニアグラスの生草、サイレージでの適応例はない。近年、福岡県ではスーダングラスやイタリアンライグラス等の飼料作物を栽培し、ラップサイレージに調製する農家が増えている。そこで、スーダングラス、イタリアンライグラス、ギニアグラスの生草とサイレージ、アルファルファ乾草を対象にして、硝酸態窒素含量を公定法および小型反射式光度計で分析し測

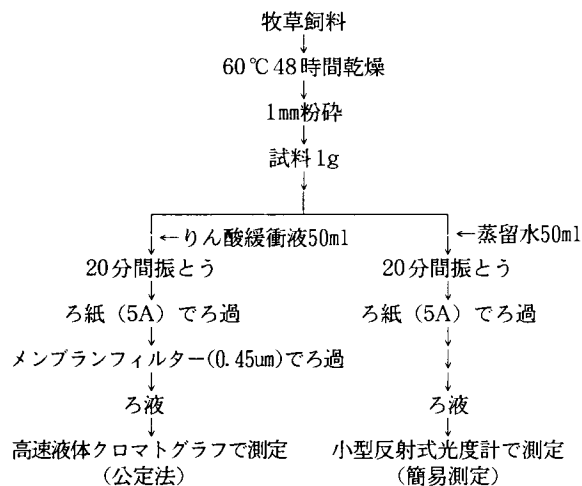
定値を比較検討した。

材料および方法

供試材料は1996、1997、1998年に栽培したもので、硝酸態窒素含量が幅広く段階的になるように施肥管理した飼料作物を用いた。生育ステージが伸長期から結実期までの1番草と2番草の生草とサイレージでスーダングラス(ヘイスーダン)182点、イタリアンライグラス(タチマサリ)36点、ギニアグラス(ナツカゼ)25点および流通粗飼料のアルファルファ乾草5点の合計248点を用いた。

小型反射式光度計による硝酸態窒素測定値が公定法による測定値と一致するかどうかを見るために、調製方法が異なる試料(生草とサイレージ)を用いて測定値の比較を行なった。さらに、草種によってそれぞれの測定値が一致するかどうかを見るために、スーダングラス、イタリアンライグラス、ギニアグラス、アルファルファを用いて測定値の比較を行なった。

公定法による硝酸態窒素測定は、60℃で48時間乾燥しウィレー粉砕器で1mmのメッシュを通した試料を用い、飼料分析基準¹³⁾に従いリン酸緩衝液を加え、振とう器で20分間振とうして抽出し、ろ紙(5種A)でろ過した抽出液をさらにメンブレンフィルター(0.45μm)でろ過を行い高速液体クロマトグラフで測定した。小型反射式光度計による硝酸態窒素測定は公定法による測定で用いた同一試料に蒸留水50mlを加え、振とう器で20分間振とうして抽出し、ろ紙(5種A)でろ過し、そのろ液を小型反射式光度計で測定した。高速液体クロマトグラフは日本分光製GULLIVERを使用し、ガードカラムはAsahipak NH2P-50G 4A、カラムはAsahipak NH2P-50 4Eを用いた。検出器は紫外吸光度検出器(測定波長210nm)を使用した。小型反射式光度計はメルク社製を使用した(第1図)。

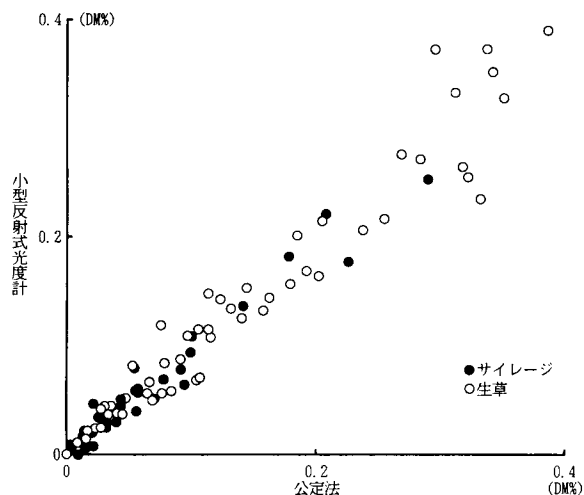


第1図 公定法と小型反射式光度計を用いた硝酸態窒素測定手順

結果

1 調製方法の違いが硝酸態窒素測定値に及ぼす影響

調製方法が異なる試料(生草, サイレージ)中の硝酸態窒素含量を, 公定法と小型反射式光度計を用いて測定した結果を第1表に示し, 散布図を第2図に示した。小型反射式光度計による測定では, 生草中硝酸態窒素測定値は, 公定法での測定値よりもやや高く測定され, サイレージ中硝酸態窒素測定値は, 公定法での測定値よりもやや低く測定されたが, 有意な差はなかった。次に, 公定法と小型反射式光度計で測定した硝酸態窒素含量測定値間の試料の調製方法による回帰推定式を第2表に示した。



第2図 公定法と小型反射式光度計による生草, サイレージ中硝酸態窒素含量測定値の関係

第1表 公定法と小型反射式光度計による調製方法が異なる試料中の硝酸態窒素含量測定値 (DM%)

調製方法	測定方法	n	最小値	最大値	平均値+標準偏差
生草 ¹⁾	公定法	77	0.0000	0.7708	0.2531 ± 0.2102
	小型反射式光度計	77	0.0000	0.8577	0.2648 ± 0.2330
サイレージ ²⁾	公定法	49	0.0000	0.2905	0.0499 ± 0.0631
	小型反射式光度計	49	0.0000	0.2535	0.0472 ± 0.0631

1) イタリアンライグラス30点, スーダングラス34点, ギニアグラス13点
2) イタリアンライグラス 6点, スーダングラス31点, ギニアグラス12点

第2表 公定法(X)と小型反射式光度計(Y)による調製方法が異なる試料中硝酸態窒素測定値(DM%)の関係

調製	n	傾き	切片	r ¹⁾	se ³⁾
生草 ⁴⁾	77	1.084	-0.009	0.9778 ⁴²⁾	0.0446
サイレージ ⁵⁾	49	0.913	+0.002	0.9815*	0.0123

1) 相関係数: 公定法による測定値と小型反射式光度計による測定値との相関係数
2) ** p < 0.01
3) 標準誤差
4) イタリアンライグラス30点, スーダングラス34点, ギニアグラス13点
5) イタリアンライグラス 6点, スーダングラス31点, ギニアグラス12点

公定法と小型反射式光度計で測定した硝酸態窒素含量は, 生草, サイレージ共にほぼ一致し, それぞれ相関係数は0.9778, 0.9815と高い正の相関を示した。生草, サイレージ共に回帰推定式の傾きは, 1.084, 0.913と1に近く, 切片は-0.009, +0.002と0に近い式が得られた。

2 草種の違いが硝酸態窒素測定値に及ぼす影響

スーダングラス, イタリアンライグラス, ギニアグラスおよびアルファルファを用いて硝酸態窒素含量を公定法と小型反射式光度計で測定した結果を第3表に示し, 散布図を第3図に示した。小型反射式光度計による硝酸態窒素含量測定値はスーダングラスとアルファルファでやや高く測定され, ギニアグラスとイタリアンライグラスはやや低く測定されたが, 有意な差はなかった。次に, 公定法と小型反射式光度計で測定した硝酸態窒素含量測定値間の草種による回帰推定式を第4表に示した。

スーダングラス, イタリアンライグラス, ギニアグラスおよびアルファルファの4草種でそれぞれ相関係数は0.98以上の高い正の相関を示した。また, 回帰推定式の傾きは0.878から1.176であり, 切片は-0.010から+0.005であった。

考察

1 調製方法の違いが硝酸態窒素測定値に及ぼす影響

小型反射式光度計の測定原理は, 試料中の硝酸を試験紙に含まれる試薬により発色させ呈色部分に光をあて, 反射光の強弱で測定する¹⁶⁾ものである。

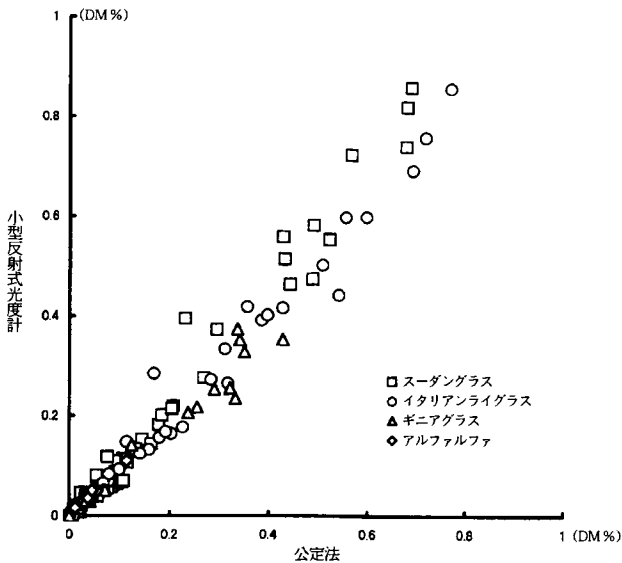
公定法である高速液体クロマトグラフの測定原理はカラムにより目的物質を分離し測定するものであり, 試料の調製方法に影響されず, サイレージであっても硝酸態窒素の測定が可能¹⁰⁾である。本報では小型反射式光度計による測定は, 硝酸態窒素の抽出操作を公定法と同じ方法で行なっている。公定法と小型反射式光度計による硝酸態窒素の測定において, 相違点は測定原理だけである。両測定法の測定値に有意な差はなく, 生草で相関係数は0.9778, サイレージで相関係数は0.9818と, 共に

第3表 公定法と小型反射式光度計による草種が異なる試料中の硝酸態窒素含量測定値

(DM%)

草種	測定方法	n	最小値	最大値	平均値+標準偏差
スーダングラス ¹⁾	公定法	65	0.0017	0.6900	0.1484±0.1847
	小型反射式光度計	65	0.0000	0.8577	0.1648±0.2195
イタリアンライグラス ²⁾	公定法	36	0.0000	0.7708	0.2482±0.2231
	小型反射式光度計	36	0.0000	0.8550	0.2476±0.2325
ギニアグラス ³⁾	公定法	25	0.0000	0.4286	0.1348±0.1464
	小型反射式光度計	25	0.0000	0.3736	0.1230±0.1310
アルファルファ ⁴⁾	公定法	5	0.0115	0.1138	0.0526±0.0338
	小型反射式光度計	5	0.0168	0.1106	0.0531±0.0314

1) スーダングラス生草34点, サイレージ31点 2) イタリアンライグラス生草30点, サイレージ 6点
3) ギニアグラス生草13点, サイレージ12点 4) アルファルファヘイベール 3点, アルファルファヘイキューブ 2点



第3図 公定法と小型反射式光度計による4草種中硝酸態窒素含量測定値の関係

第4表 公定法(X)と小型反射式光度計(Y)による草種の異なる試料中の硝酸態窒素測定値(DM%)の関係

草種	n	傾き	切片	r ¹⁾	se ³⁾
スーダングラス	65	1.176	-0.010	0.9896***	0.0320
イタリアンライグラス	36	1.029	-0.008	0.9877**	0.0374
ギニアグラス	25	0.878	+0.005	0.9822**	0.0256
アルファルファ	5	0.921	+0.005	0.9941**	0.0044
全体	131	1.073	-0.006	0.9832**	0.0389

1) 相関係数: 公定法による測定値と小型反射式光度計による測定値との相関係数

2) ** p < 0.01

3) 標準誤差

高い相関がある。また、回帰推定式では生草, サイレージ共に傾きは1.084, 0.913と1に近く, 切片は-0.009, +0.002と0に近い式が得られ, 実用的には公定法の値を高い精度で推定可能と判断された。しかし, 両測定法の測定値間には測定試料の調製方法の違いによる若干の差が認められた。つまり, 生草では, 小型反射式光度計による硝酸態窒素含量測定値が, 公定法による硝酸態窒素含量測定値よりもやや高めに測定され, サイレージでは小型反射式光度計による硝酸態窒素含量測定値が, 公定法による硝酸態窒素含量測定値よりもやや低めに測定される傾向がみられた。山井ら¹²⁾はサイレージでは小型反射式光度計による測定値は公定法の値よりも

やや低くなると報告しており, 本報の結果とほぼ同じ結果であった。また, 小型反射式光度計による硝酸態窒素測定値が公定法による測定値よりも低めに測定されたことについては, サイレージ調製による生成妨害物の検出を要する¹²⁾と報告している。海老根ら²⁾は, サイレージの新鮮物に水を加えて処理した抽出液では乾燥粉碎処理した試料を抽出し硝酸態窒素をイオンクロマトグラフで測定した値よりも低く, サイレージ新鮮物そのままでの測定が不可であることを示唆している。

サイレージは発酵過程を経るため, 抽出液には各種有機酸類が多く含まれる。乾燥粉碎処理したサイレージは乾燥処理により揮発性物質が失われるが有機酸の全てが消失するわけではない。これに対し, 生草は各種有機酸類を含まない。このため, サイレージでは小型反射式光度計による測定値が低くなった原因として, 有機酸の影響が考えられ, 生草では有機酸の影響がなかったと推察されるが, 更なる検討が必要である。

2 草種の違いが硝酸態窒素測定値に及ぼす影響

草種の影響は若干あると考えられるが, 公定法と小型反射式光度計による硝酸態窒素含量測定値間に有意な差はなく, 回帰推定式はスーダングラス, イタリアンライグラス, ギニアグラスおよびアルファルファの4草種でそれぞれ相関係数は0.98以上の高い正の相関を示した。また, 回帰推定式の傾きは0.878から1.176であり, 切片は-0.010から+0.005であり, 推定精度が高く実用的であると考えられた。小型反射式光度計による測定値はスーダングラスとアルファルファではやや高く, ギニアグラスとイタリアンライグラスではやや低くなる傾向がみられた。小野内ら⁹⁾は小型反射式光度計で硝酸態窒素を測定する場合, アルファルファのようなカルシウム含有率が高い作物でも抽出液を十分に希釈すればイオンの影響はないと報告している。しかし, 小型反射式光度計での硝酸態窒素測定において, カルシウムイオン以外に測定を妨害するとされている夾雑物に, カリウムイオンとマグネシウムイオン¹⁶⁾がある。伊東ら⁵⁾は, きゅう肥の多施用により, 作物の窒素, リン酸, カリウムの含量が増加し, 特にカリウムは著しく高くなり, 反対にカルシウムの含量は低下することを報告している。硝酸態窒素が多く含まれる作物では肥料の多施用により, カリウム含量も多いことが推察される。標準的な施肥管理で栽培した飼料作物の乾物中無機物含量は, スーダングラス, イタリアンライグラス¹⁵⁾はほぼ同量で, カルシウム

第5表 公定法と小型反射式光度計での硝酸態窒素測定値の相関係数 (r) が同一の母集団に属する仮説の検定

標 本	n	d. f=n-3	r	z ¹⁾	加重 z=(n-3)z	加重平均 =(n-3)z ²	補正 z
スーダングラス 生草	34	31	0.987	2.514	77.934	195.926	2.510
スーダングラス サイレージ	31	28	0.980	2.298	64.344	147.863	2.294
イタリアンライグラス 生草	30	27	0.986	2.478	66.906	165.793	2.474
イタリアンライグラス サイレージ	6	3	0.994	2.903	8.709	25.282	2.899
ギニアグラス 生草	13	10	0.962	1.973	19.730	38.927	1.969
ギニアグラス サイレージ	12	9	0.997	3.188	28.692	91.470	3.184
アルファルファ 乾草	5	2	0.994	2.903	5.806	16.855	2.899
	131	110			272.121	682.116	271.681
					平均のz=2.474	673.227	z=2.470
			平均のr=0.986			x ² =8.889	r=0.985

1) z: 共通の母相関係数変換のための相関係数

は0.37~0.54%, カリウムは2.22~4.91%, マグネシウムは0.11~0.27%である。ギニアグラス⁷⁾はスーダングラス, イタリアンライグラスよりもマグネシウム含量がやや多く0.17~0.32%であり, カルシウムは0.36~0.48%, カリウムは2.11~3.42%である。マメ科牧草であるアルファルファ¹⁵⁾はイネ科牧草に比べるとカルシウムとマグネシウムが多く, それぞれ1.33%と0.30%で, カリウムは2.52%である。これらのことから, 草種により作物体中無機物の含有率が異なり, さらに施肥管理や気象条件により作物体中無機物の含有率が変化することが, 硝酸態窒素測定値に影響を及ぼした原因として考えられたが, 今後更なる検討が必要である。

3 硝酸態窒素含量の簡易推定

本報ではスーダングラス, イタリアンライグラス, ギニアグラスおよびアルファルファの4草種とも, 小型反射式光度計と公定法による測定値間には1に近い相関係数が求められた。この関係は調製方法についても同様であり, 小型反射式光度計による測定は, 公定法による測定値を高い精度で推定できると考えられた。そこで, スーダングラス, イタリアンライグラス, ギニアグラスおよびアルファルファの4草種について, 小型反射式光度計と公定法による硝酸態窒素含量測定値間に1に近い共通の母相関係数が存在する仮説の検定をスネデガー¹¹⁾の方法を用いて行った(第5表)。その結果, これらの4草種は, 小型反射式光度計と公定法による硝酸態窒素含量測定値間に共通の母相関係数0.986から抽出された標本集団であることが認められた。したがって4草種について硝酸態窒素含量は, 小型反射式光度計による測定で得られた結果を1.073で除し, 0.006加算することにより公定法による硝酸態窒素含量測定値を推定することが可能(第4表)と考えられた。

以上のことから, スーダングラス, イタリアンライグラス, ギニアグラスおよびアルファルファの4草種については, 試料の調製方法や草種の影響を受けることなく, 小型反射式光度計により硝酸態窒素含量の公定法の値を高い精度で推定できると考えられる。

引用文献

- 1) 安藤忠男・尾形昭逸(1980)硝酸態窒素の微量迅速定量法. 土肥誌 51, 1: 48-54.
- 2) 海老根元彦・小野崎敦夫・木下強(1991)サイレー

ジのイオンクロマトグラフによる硝酸態窒素の定量法の検討. 栃木酪農試験報 115: 1-6.

- 3) 深沢芳隆・津田公男(1998)反射式光度計を用いた粗飼料中硝酸態窒素含量の簡易測定法. 茨城畜産試験報 26: 17-20.
- 4) 井上恵子・山本富三・末信真二(1997)イチゴ'とよのか'本圃における土壌の無機態窒素濃度の簡易診断法, 第1報土壌の無機態窒素濃度の簡易測定法. 福岡農総試験報 16: 39-43.
- 5) 伊東祐二郎・塩崎尚郎・橋本秀教(1982)多腐植黒ボク土の畑地における牛ふん尿肥の大量連用と土壌の肥沃性. 九農試報告 22, 2: 259-320.
- 6) 森本宏(1985)改著飼料学, 養賢堂, 東京: pp534-535.
- 7) 森山高広・仲宗根一哉・長崎祐二・庄子一成・安谷屋兼二・玉代勢秀正・池田正治(1990)ギニアグラスの刈取適期. 沖縄畜試研報 28: 85-98.
- 8) 元井霞子(1993)牛の硝酸塩中毒とその対策. 畜産の研究 47, 1: 45-51.
- 9) 小野内栄治・芹澤正文・小山弘(1998)県内流通飼料の栄養成分および硝酸態窒素濃度変動の検討(第2報)乾草中の硝酸態窒素濃度簡易測定法の検討. 静岡畜試研報 26: 17-20.
- 10) 鈴木茂孝・白井裕治(1995)高速液体クロマトグラフィによる牧草中の亜硝酸および硝酸態窒素の同時定量法. 飼料研究報告 20: 1-11.
- 11) スネデガー統計的方法(1963)岩波書店, 東京: pp164-165.
- 12) 山井英喜・吉田宣夫・関根貴司・清水博之・並木勝治(1998)牧乾草の硝酸態窒素含量簡易測定法の確立(第1報)RQフレックス法と液体クロマトグラフ法の比較. 埼玉畜研報 2: 100-103.
- 13) 飼料分析基準, 7畜B第1660号, 17.
- 14) 自給飼料品質評価研究会編(1995)粗飼料の品質評価ガイドブック. 日本草地協会, 東京: pp95-101.
- 15) 農林水産省農林水産技術会議事務局編(1995)日本標準飼料成分表, 中央畜産会, 東京: pp186-193.
- 16) リフレクトケント試験紙取扱説明書, 関東化学株式会社: 40-42.