

粗飼料の硝酸態窒素簡易測定法

青木大輔・米本貞夫・藤城清司*

A Simple Method for Determining Nitrate Nitrogen amount in Roughage

Daisuke AOKI, Sadao YONEMOTO and Seiji FUJISHIRO*

要 約

粗飼料中の硝酸態窒素濃度を農家現場で測定できるような簡易法を確立するため、家庭用ミキサーとメルコクアント試験紙を用いる方法で検討した。

家庭用ミキサーで粉碎、抽出を行い、メルコクアント試験紙で硝酸イオン濃度を測定することにより、乾草およびサイレージ中の硝酸態窒素を測定することが可能であった。

このことから、スーダングラス乾草、アルファルファ乾草、スーダングラス、アルファルファ以外の乾草、トウモロコシサイレージ、トウモロコシとソルガムの混播サイレージおよびソルガムサイレージについて、メルコクアント試験紙の読み取り値から原物中の硝酸態窒素濃度を算出するための回帰式を作成した。

その結果、下記の手順および回帰式で主な粗飼料中の現物中硝酸態窒素を測定することが可能であると考えられた。

測定手順

- ①ミキサー容器にあらかじめ900ml (乾草では990ml) の蒸留水をいれる。
- ②測定したいサイレージを秤で100 g (乾草では10 g) はかり取り、ミキサーの容器に入れ、フタをする。
- ③30秒間粉碎攪拌 (ミキシング) し、90秒間放置する。
- ④混濁液を東洋ろ紙 No 5 A でろ過する (一部で良い)。
- ⑤メルコクアント試験紙をろ液につけた後、手で振って余分なる液を振りはらう。
- ⑥60秒後に試験紙に添付されているカラースケールと色を比べ、その色の値を読む。
- ⑦⑥で読み取った値を前記の換算式に代入して硝酸態窒素濃度を算出する。

回帰式

スーダングラス乾草：

硝酸態窒素濃度 (原物中ppm) =メルコクアント試験紙の読み取り値×27.3+376.4

アルファルファ乾草：

硝酸態窒素濃度 (原物中ppm) =メルコクアント試験紙の読み取り値×16.7+237.9

スーダングラス、アルファルファ以外の乾草：

硝酸態窒素濃度 (原物中ppm) =メルコクアント試験紙の読み取り値×28.3+199

トウモロコシサイレージ：

硝酸態窒素濃度 (原物中ppm) =メルコクアント試験紙の読み取り値×1.49+19

トウモロコシとソルガムの混播サイレージ：

硝酸態窒素濃度 (原物中ppm) =メルコクアント試験紙の読み取り値×1.84+27

ソルガムサイレージ：

硝酸態窒素濃度 (原物中ppm) =メルコクアント試験紙の読み取り値×2.2

*3元嶺岡乳牛試験場

平成14年 8月30日受付

これらの回帰式は、すべて公定法と強い相関があり ($r=0.847\sim 0.977$)、農家現場で硝酸態窒素濃度を把握するためには十分であると考えられるが、試験紙の読み取り値としてサイレージでは200ppm 前後、乾草では50ppm 前後の値を示す部分はカラスケールの標準発色値に近いため読み取り値が集中しやすく、かつ硝酸態窒素濃度が高いものが含まれるので、公定法で分析を行う必要がある。

緒言

硝酸態窒素を多く含む作物を牛に給与すると急性硝酸塩中毒を引き起こしたり、受胎時期の遅延等の繁殖障害や泌乳能力の低下等の慢性中毒を引き起こすといわれている¹⁾。

千葉県における酪農・肉牛経営は飼養頭数の増加による糞尿排出量の増加などから、飼料畑への糞尿の多量施用が進み、自給飼料への硝酸態窒素の蓄積が危惧されている。

また流通乾草も相当量使用されているが、その栽培概要を知ることはほぼ不可能であり、流通乾草中の硝酸態窒素濃度についても懸念されている。

硝酸態窒素の測定は高速液体クロマトグラフィーを用いた方法が公定法²⁾としてあるが、これを農家現場で使用することは困難である。また簡易測定法としてはRQフレックス法³⁾やコンパクトイオンメーター法⁴⁾があるが、これらについても機材の価格等に問題があり農家現場での測定はほとんどされていないのが実状である。

そこで、農家現場で「簡単に」「安価で」「即座に」「誰にでも」測定できる粗飼料中の硝酸態窒素の測定法について、粉碎、抽出については家庭用ミキサーを、また、測定はメルコクアント試験紙(ドイツメルク社製 Nitrat-Test 試験紙)を用いることができるかを検討した。

メルコクアント試験紙は主に水質検査に用いられ、水溶液中の硝酸イオンが芳香属アミンをジアゾ化するという性質を利用し、硝酸イオンが存在すると反応部が、赤紫色に発色する⁵⁾ものである。

I メルコクアント試験紙の特性把握

材料及び方法

メルコクアント試験紙の特性を把握するために、硝酸イオン濃度が10~500ppmの硝酸カリウム標準液および1997年6月に県内農家より収集した6点の乾草(スーダングラス4点、アルファルファ2点)から公定法²⁾にのっとり抽出した乾草抽出液(以下公定法抽出液)を用いて、試験紙を浸してから10秒毎に添付されているカラーチャートで発色を測定し、比色判定までの適切な時間と濃度に対応した発色を呈するかを検討した。

結果及び考察

硝酸カリウム標準液での結果では250ppm以上の濃度ではやや高めに読み取れた。また比色判定までの時間は、30秒

より短いと発色しきらず、また120秒以上では、褪色して行く事もあったので、60秒がよいと考えられた(図1)。

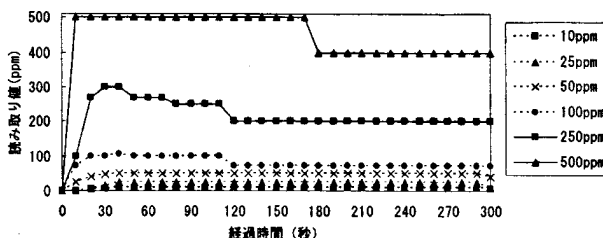


図1 硝酸カリウム標準液でのメルコクアント試験紙の読み取り値の経時的変化

また、公定法抽出液でも発色は60秒で安定したので、比色時間は、60秒が良いと考えられた(図2)。以上のことから抽出液に試験紙を浸してから60秒後に比色判定すれば、メルコクアント試験紙の発色は安定しており、ある程度の硝酸態窒素の推定は可能であると考えられた。

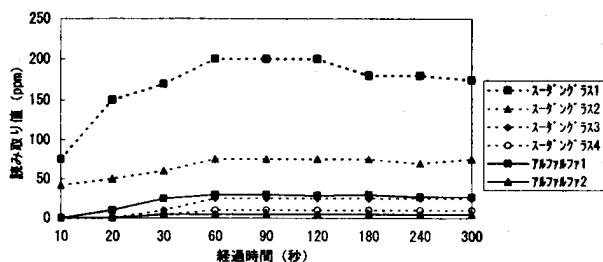


図2 公定法抽出液でのメルコクアント試験紙の読み取り値の経時的変化

II 公定法とメルコクアント試験紙の比較検討

材料及び方法

1997年6月に県内農家より収集した13点の乾草(スーダングラス10点、アルファルファ2点、チモシー1点)の公定法抽出液の硝酸態窒素濃度を、公定法²⁾とメルコクアント試験紙で測定し、メルコクアント試験紙の測定精度の検討を行った。なおメルコクアント試験紙の読みとり値は水溶液中の硝酸イオン濃度を示すため、下記の式で、硝酸態窒素濃度に換算した。(以下の実験でも同様にしてメルコクアント試験紙の読みとり値から換算した。)

換算式

乾物中硝酸態窒素濃度(ppm/DM)

$$= \text{メルコクアント試験紙の読み取り値(ppm)} \times \text{希釈倍率} \times 0.2258 / (\text{乾物率}(\%) / 100)$$

結果及び考察

メルコクアント試験紙からの換算値と公定法²⁾での数値を比較したところ、メルコクアント試験紙は、硝酸態窒素濃度を低く測定してしまうものの公定法と非常に強い正の相関があり(図3)、メルコクアント試験紙は硝酸態窒素の測定に使用可能であると考えられた。

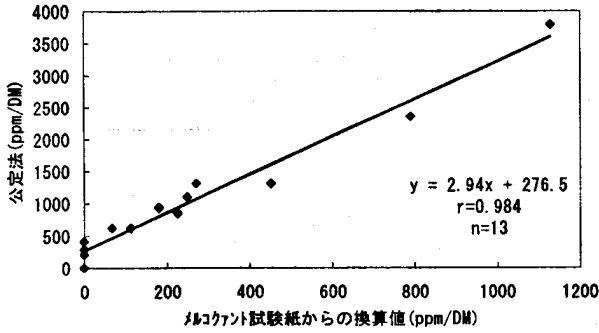


図3 公定法での抽出における測定法の相関

Ⅲ 簡易抽出法(以下ミキサー法)の検討

簡易に粉碎と抽出を行うために、家庭用ミキサーを用いての粉碎時間および抽出時間を検討した。

Ⅲ-1 粉碎(ミキシング)時間の検討

材料及び方法

1997年6月に県内農家より収集した6点の乾草(スーダングラス4点、アルファルファ2点)を、蒸留水で100倍希釈し、家庭用ミキサーを用いて10秒から50秒の間で10秒間隔でミキシングし、60秒放置(抽出)後、東洋ろ紙NO5Aでろ過し、ろ液をメルコクアント試験紙で測定し、ミキシングの時間を検討した。

結果及び考察

ミキシング(粉碎)時間は、20秒未満だと発色がやや弱く、30秒以降安定したので、30秒が良いと考えられた(図4)。60秒以降はミキサーのモーターが過熱したため、検討を中止した。

また今回、発色が十分に得られたので乾草の場合のサンプルの希釈倍率は100倍でよいと考えられた。

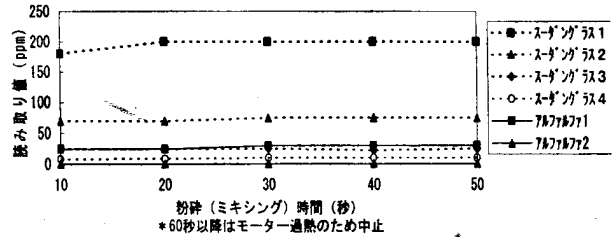


図4 粉碎(ミキシング)時間の検討
(抽出時間は60秒で固定)

Ⅲ-2 抽出(放置)時間の検討

材料及び方法

1997年6月に県内農家より収集した6点の乾草(スーダングラス4点、アルファルファ2点)を、100倍希釈し、家庭用ミキサーを用いて30秒間粉碎(ミキシング)し、10秒~300秒の間で抽出(放置)時間を変え、東洋ろ紙NO5Aでろ過した後、メルコクアント試験紙で測定し、抽出時間を検討した。

結果及び考察

抽出(放置)時間が60秒未満では発色が弱く、抽出が不十分と考えられ、90秒以降で安定したので、抽出(放置)時間は90秒がよいと考えられた(図5)。

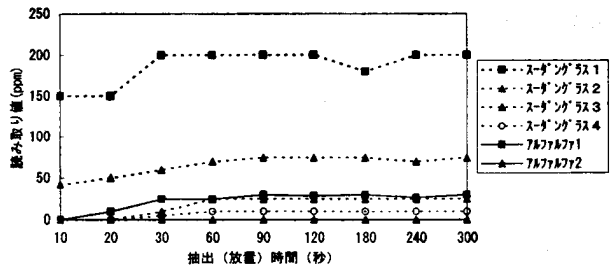


図5 抽出(放置)時間の検討

Ⅳ 抽出法の比較検討

材料及び方法

1997年6月に県内農家より収集した13点の乾草(スーダングラス10点、アルファルファ2点、チモシー1点)を用いて、公定法抽出液とミキサー法での抽出液を液体クロマトグラフィー法(公定法²⁾)で測定し、ミキサー法での抽出程度を検討した。

結果及び考察

ミキサー法での抽出液と公定法抽出液を比較したところ、ミキサー法抽出液は、公定法抽出液よりもやや高く測定されたが、両者に強い正の相関がみられ($r=0.876$)、充分抽

出されているものと考えられた (図6)。

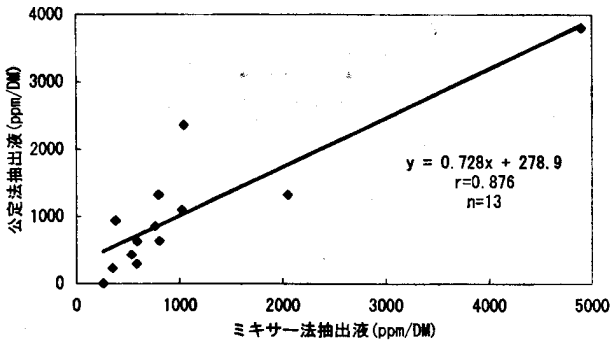


図6 液体クロマトグラフィー法での測定における抽出法の相関

V 公定法と簡易法の比較検討

材料及び方法

1997年6月に県内農家より収集した13点の乾草(スーダングラス10点、アルファルファ2点、チモシー1点)を用いて公定法²⁾とメルコquant試験紙とミキサー法の組み合わせ(以下メルコquant試験紙法)による方法で硝酸態窒素濃度を測定し、両者の関係を検討した。

結果及び考察

メルコquant試験紙法と公定法²⁾を比較したところ、メルコquant試験紙法は、硝酸態窒素濃度を低く測定してしまうものの、両者に強い正の相関がみられ($r=0.954$)、メルコquant試験紙法で測定が可能であると考えられた(図7)。

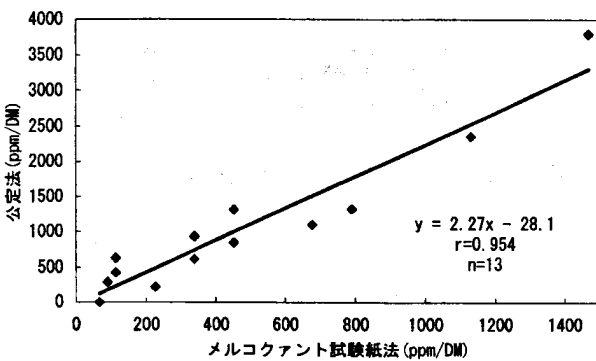


図7 メルコquant試験紙法と公定法の相関

VI 乾草における簡易測定法の確立

材料及び方法

乾草における簡易測定法を確立するために、1997年6月から7月に県内農家より収集した流通乾草のスーダングラス38点、アルファルファ25点、チモシー9点、エンバク7

点、バミューダグラス55点、トールフェスク1点の計85点を用いて、メルコquant試験紙法と公定法²⁾で硝酸態窒素濃度を測定し、メルコquant試験紙法が簡易測定法として有効であるか検討を行った。

結果及び考察

公定法²⁾とメルコquant試験紙法の相関係数は高く($r=0.919$)、メルコquant試験紙法の値から公定法²⁾の値を予測する回帰式の作製が可能であった(図8)。

しかし、草種により硝酸態窒素濃度の分布にかたよりが

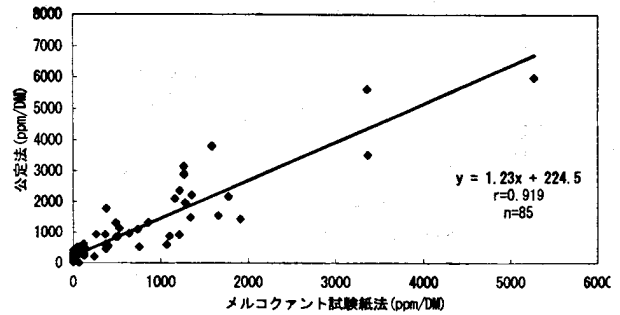


図8 メルコquant試験紙法と公定法の相関

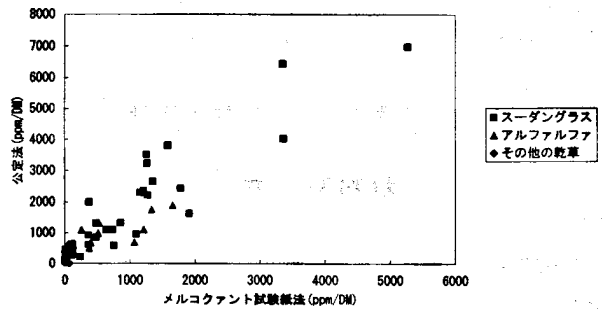


図9 硝酸態窒素の分布

みられたので(図9)、各草種毎に検討したところ、スーダングラス及びアルファルファでも相関係数は各々0.911(図10)と0.858(図11)であり、この2草種では各々専用の回帰式を作成できると考えられた。

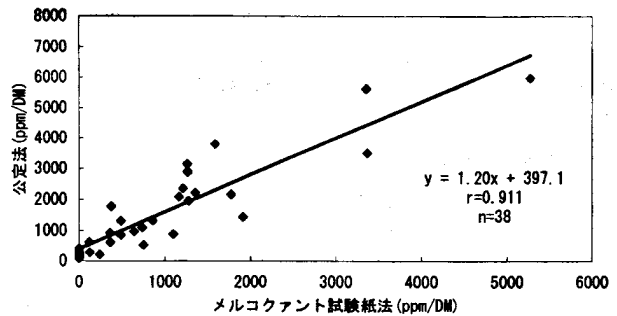


図10 スーダングラス乾草におけるメルコquant試験紙法と公定法の相関

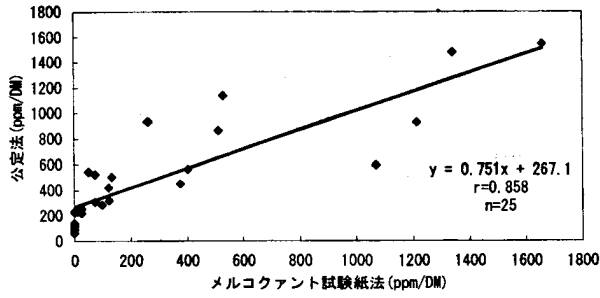


図 11 アルファルファ乾草におけるメルコ quant 試験紙法と公定法の相関図

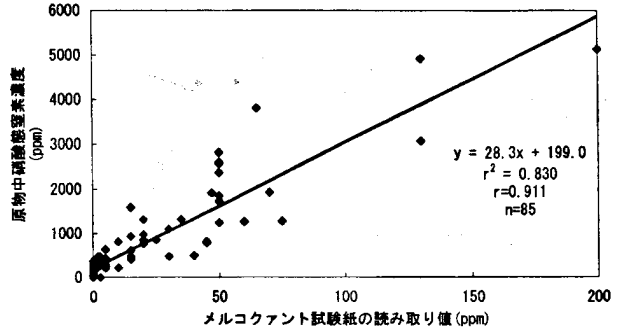


図 14 全サンプルにおけるメルコ quant 試験紙の読み取り値と原物中硝酸態窒素濃度の相関

また、原物中硝酸態窒素濃度を測定するための回帰式は以下のとおりである(図12~14)。なおスーダングラス乾草、アルファルファ乾草以外の草種については、今回収集した全サンプルを用いて作成した回帰式を用いることとした。

スーダングラス乾草：

硝酸態窒素濃度(原物中ppm) = メルコ quant 試験紙の読み取り値 \times 27.3 + 376.4

アルファルファ乾草：

硝酸態窒素濃度(原物中ppm) = メルコ quant 試験紙の読み取り値 \times 16.7 + 237.9

スーダングラス、アルファルファ以外の乾草：

硝酸態窒素濃度(原物中ppm) = メルコ quant 試験紙の読み取り値 \times 28.3 + 199

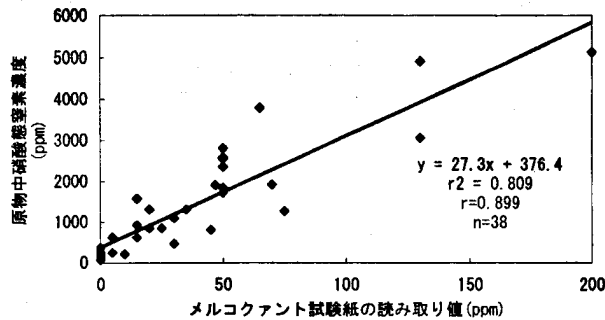


図 12 スーダングラス乾草におけるメルコ quant 試験紙の読み取り値と原物中硝酸態窒素濃度の相関

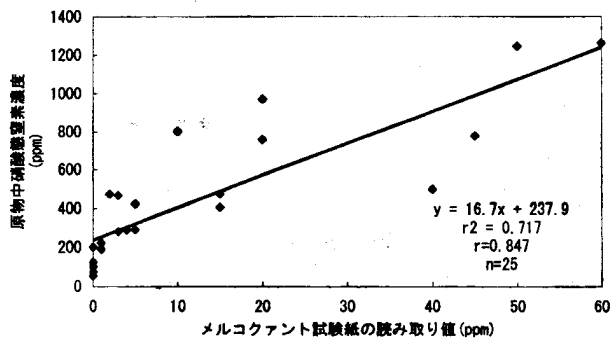


図 13 アルファルファ乾草におけるメルコ quant 試験紙の読み取り値と原物中硝酸態窒素濃度の相関

VII サイレージにおける簡易測定法の検討

サイレージ中の硝酸態窒素を測定するための簡易測定法を家庭用ミキサーを用いた簡易粉碎抽出とメルコ quant 試験紙を組み合わせたメルコ quant 試験紙法で行えるかを検討した。

VII-1 サイレージにおける希釈倍率の検討

材料及び方法

1997年度に嶺岡乳牛試験場において調製したトウモロコシサイレージ3点、トウモロコシとソルガムの混播サイレージ4点の計7点を用い、ミキサーを用いて簡易抽出を行う場合の希釈倍率について、サイレージの水分および予想される硝酸態窒素濃度を勘案し10倍および20倍に設定し、その抽出液をメルコ quant 試験紙で測定し、公定法²⁾と比較した。なお粉碎(ミキシング)時間及び抽出(放置)時間は乾草の場合と同様に各々30秒、90秒とした。

結果及び考察

希釈倍率を10倍、20倍として公定法²⁾との相関を比較検討した結果、20倍希釈の場合の相関係数は $r = 0.944$ (図15)、10倍希釈の場合の相関係数は $r = 0.965$ (図16) とともに高い正の相関があったが、相関係数がより高い10倍希釈が適当と考えられた。

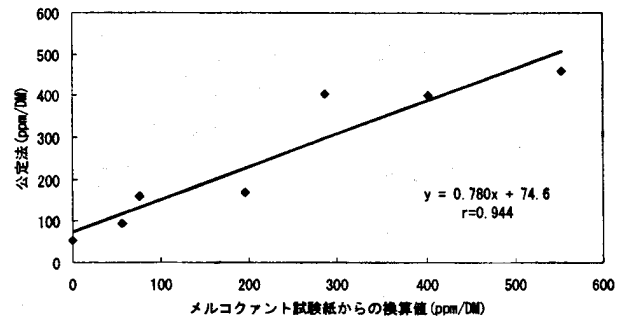


図 15 乾物換算したメルコ quant 試験紙からの換算値と公定法の相関(20倍希釈)

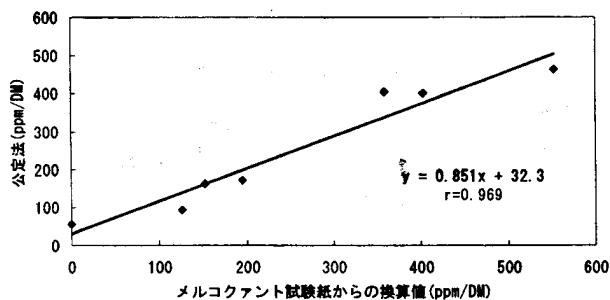


図16 乾物換算したメルコクアント試験紙からの換算値と公定法の相関(10倍希釈)

Ⅶ-2 サイレージにおける簡易測定法の確立

材料及び方法

1997年度から1998年度に、本県の飼料分析センターで分析を行った、県内農家で調製されたトウモロコシサイレージ66点、トウモロコシとソルガムの混播サイレージ33点、ソルガムサイレージ30点の計129点を用いて、メルコクアント試験紙法と公定法²⁾で硝酸態窒素濃度を測定した。

結果及び考察

メルコクアント試験紙法と公定法²⁾を比較したところ、両者に高い正の相関があった ($r=0.968$, $p<0.01$, 図17) ことから、メルコクアント試験紙法での測定が可能であると考えられた。

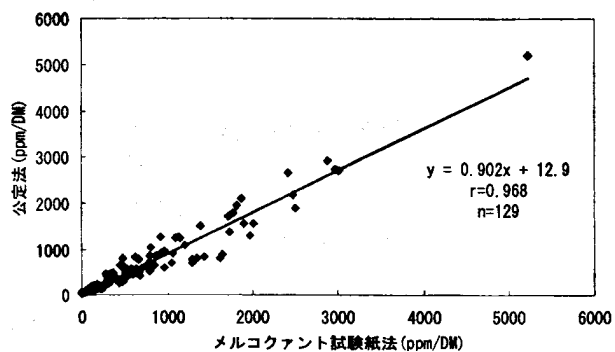


図17 サイレージにおけるメルコクアント試験紙法と公定法の相関

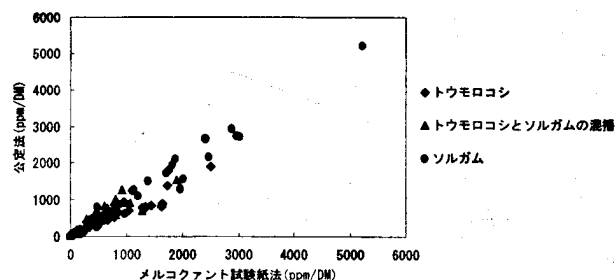


図18 サイレージにおける硝酸態窒素の分布

しかし、草種により硝酸態窒素濃度の分布にかたよりがみられたので(図18)、各草種毎に検討したところ、それぞれで高い正の相関があり(トウモロコシ: $r=0.948$, 図19、トウモロコシとソルガムの混播: $r=0.921$, 図20、ソルガム: $r=0.983$, 図21)、この3草種では各々専用の回帰式を作製できると考えられた。

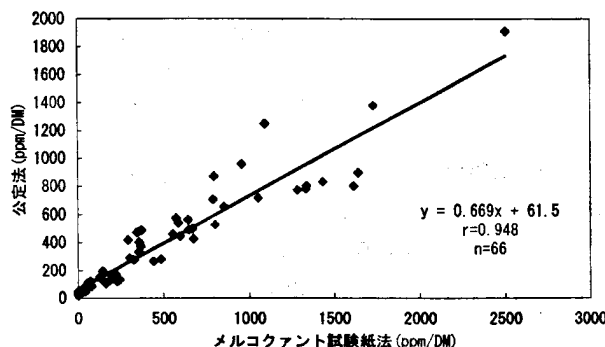


図19 トウモロコシサイレージにおけるメルコクアント試験紙法と公定法の相関

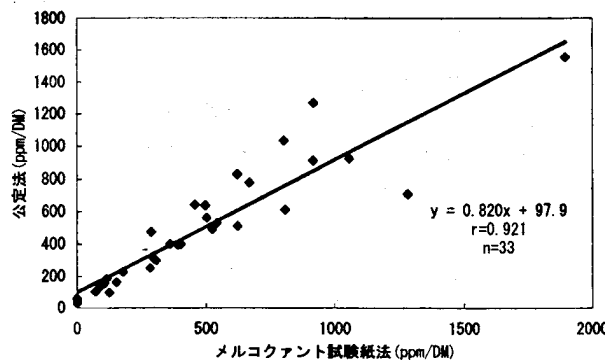


図20 トウモロコシとソルガムの混播サイレージにおけるメルコクアント試験紙法と公定法の相関

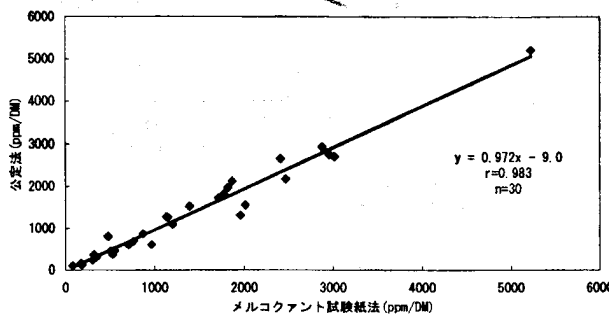


図21 ソルガムサイレージにおけるメルコクアント試験紙法と公定法の相関

また、原物中硝酸態窒素濃度を測定するための回帰式は以下のとおりである(図22~24)。

トウモロコシサイレージ:

硝酸態窒素濃度(原物中ppm) = メルコクアント試験紙の読み取り値 $\times 1.49 + 19$

トウモロコシとソルガムの混播サイレージ:

硝酸態窒素濃度(原物中ppm) = メルコクアント試験紙の読み取り値 $\times 1.84 + 27$

ソルガムサイレージ:

硝酸態窒素濃度（原物中ppm）＝メルコクアント試験紙の読み取り値×2.2

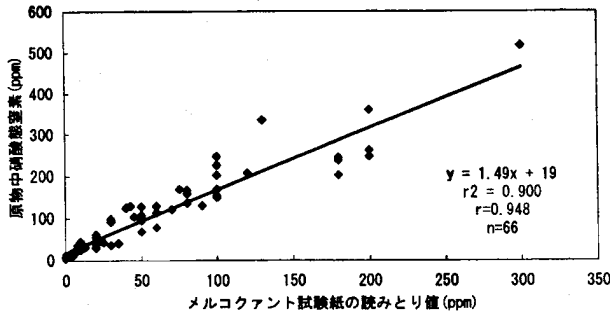


図22 トウモロコシサイレージにおけるメルコクアント試験紙の読み取り値と現物中硝酸態窒素の相関

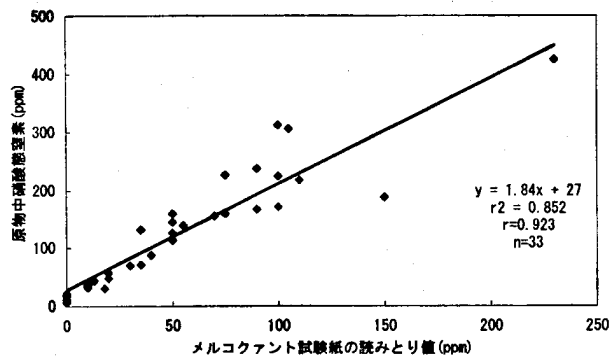


図23 トウモロコシとソルガムの混播サイレージにおけるメルコクアント試験紙の読み取り値と現物中硝酸態窒素の相関

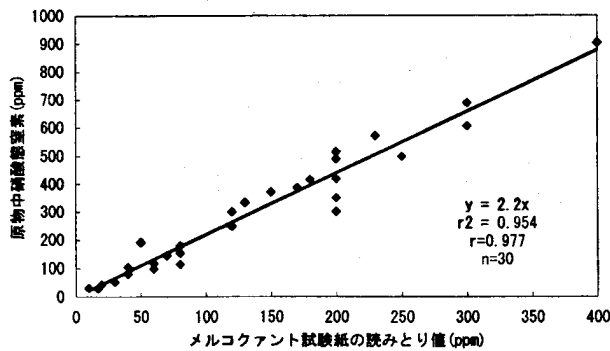


図24 ソルガムサイレージにおけるメルコクアント試験紙の読み取り値と現物中硝酸態窒素の相関

なお、実際の測定手順については以下のとおりである。

- ①ミキサー容器にあらかじめ900ml（乾草では990ml）の蒸留水をいれる。
- ②測定したいサイレージを秤で100g（乾草では10g）はかり取り、ミキサーの容器に入れ、フタをする。
- ③30秒間粉碎攪拌（ミキシング）し、90秒間放置する。
- ④混濁液を東洋ろ紙NO5Aでろ過する（一部で良い）。
- ⑤メルコクアント試験紙をろ液につけた後、手で振って余分なろ液を振りはらう。
- ⑥60秒後に試験紙に添付されているカラーズケールと色を比べ、その色の値を読む。
- ⑦⑥で読み取った値を前記の回帰式に代入して硝酸態窒素

濃度を算出する。

また留意点は以下のとおりである。

アルファルファ、スーダングラス以外の乾草は全サンプルで作成した回帰式を用いる。

ろ過は、ガーゼ、タオルなどでも可能である。また蒸留水がない場合は飲料水でも可能であるが、その場合は水自体の硝酸態窒素の有無をメルコクアント試験紙で調査する必要がある。

メルコクアント試験紙の発色部は、硝酸態窒素濃度が高くなるほど濃い赤紫色に発色する。またカラーズケールは、0、10、25、50、100、250、500の各ppmの場合の色を表示しており、各色の中間（たとえば、50ppmの色よりも濃く、100ppmの色よりも薄いので、70ppmとして判定するなど）を判定する必要がある。

メルコクアント試験紙はグリース反応を応用しており微量ながら亜鉛やカドミウムを含むことも考えられるので、使用後のものはストックし、適正に処理する必要がある。

試験紙の読み取り値としてサイレージでは200ppm前後、乾草では50ppm前後の値を示す部分はカラーズケールの標準発色値に近いいためか読み取り値が集中しやすく、かつ硝酸態窒素濃度が高いものが含まれることから、公定法で分析を行う必要がある。

参考文献

- 1) 坂本斉 (1997), ホルスタイン種経産牛の受胎時期の遅延要因に関する検討—分娩後の硝酸態窒素摂取量、平均体重および乳脂補正乳量—, 家畜人工授精 5月号: p 10-15
- 2) 早川俊明 (1997), 乾草・サイレージの硝酸態窒素含量と公定分析法, 畜産技術507: p 24-30
- 3) 自給飼料品質評価研究会 (2002), 改訂粗飼料の品質評価ガイドブック: p 33-35
- 4) 増子孝義 (1996), 現場でサイレージを科学的に評価しよう, DairyJapan 第41巻第5号付録: p 25-27