

## ANÁLISIS DE PURINES MEDIANTE ESPECTROSCOPIA NIR

D. BÁEZ, P. CASTRO, J. CASTRO, A. GARCÍA

Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM), Apartado 10, 15080 La Coruña.  
dolores.baez.bernal@xunta.es

### RESUMEN

El vertido incontrolado de los purines producidos en las explotaciones lecheras es una fuente importante de contaminación pero su elevado contenido en nutrientes permite su uso como fertilizantes. La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) permite el análisis rápido y preciso de diversos productos. En este trabajo se desarrollaron ecuaciones de calibración NIR para la determinación de materia seca (MS) y orgánica (MO), pH, N total, P, Ca, Mg, K y Na sobre muestra seca y sobre el material fresco, utilizando en este caso una sonda de fibra óptica. El análisis en seco fue más preciso que en fresco excepto para la determinación de MS, con errores de validación cruzada (SECV) y de predicción (SEP) comprendidos entre 0,22 y 0,21, respectivamente, para pH y 43,66 y 32,81 para MO. Los valores de SECV y SEP en fresco oscilaron, respectivamente entre 0,30 y 0,18 para pH y 11,17 y 17,57 para el potasio. Para la determinación MO, P, Ca y Mg en fresco el coeficiente de determinación fue  $R^2 < 0,5$ . La precisión del análisis NIRS de purines debe ser mejorada mediante la incorporación de nuevas muestras al grupo de calibración. El análisis en fresco parece prometedor como un método rápido para su uso en recomendaciones de abonado.

**Palabras clave:** NIRS, purín, vacuno, transflectancia, fibra óptica.

### INTRODUCCIÓN

Los purines constituyen un residuo importante en las explotaciones lecheras comerciales en que los animales permanecen estabulados casi cuando no todo el año. Su vertido incontrolado es una fuente importante de contaminación ambiental, no obstante, pueden ser utilizados como fertilizantes por su contenido en nutrientes. Gran parte de los problemas de su aplicación al suelo, como las pérdidas de N, se debe a una falta de información sobre su composición, que varía enormemente dependiendo del sistema de producción, de la estación y del tipo de almacenamiento. El desarrollo de métodos rápidos para la determinación del N amoniacal (N-  $\text{NH}_3$ ) en el purín como el Quantofix, Agrolisier, etc (Van Kessel y Reeves, 2000) ha sido esencial a la hora de llevar a cabo una dosificación adecuada. Estos métodos son bastante precisos pero solo determinan el N amoniacal, y se pierde la información adicional que proporcionan las fracciones orgánicas de C y N en cuanto al N total disponible para la planta. Si se quiere llevar a cabo una utilización agronómica eficiente de purines, e incorporarlos en

planes de abonado como si se tratase de fertilizantes inorgánicos, es necesario el desarrollo de técnicas analíticas rápidas, precisas y de bajo coste para la determinación de sus nutrientes. Los métodos convencionales para la determinación de nutrientes en otros productos agrarios resultan adecuados para el análisis de purines pero resultan lentos, laboriosos, caros y peligrosos. La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) ha sido utilizada con éxito para medidas cuantitativas de componentes de diversos materiales. Hasta el momento, son pocos los trabajos realizados aplicando la tecnología NIR a muestras de purines (Reeves y van Kessel, 2000a, 2000b) o materiales compostados. Reeves y van Kessel (2000a) encontraron que mediante NIRS se podía determinar con precisión la humedad y los contenidos de C total, N total y el N amoniacal en muestras de purín de vacuno, pero no encontraron buenas calibraciones para el P y el K debido a que los aniones no absorben a estas longitudes de onda. Utilizando otras herramientas matemáticas y estadísticas, previamente utilizadas en el análisis de suelos, Malley *et al.*, (2002) consiguieron mejorar bastante los resultados y obtuvieron buenas calibraciones para P, Na y Mg ( $R^2$  entre 0,93 y 0,99) y  $> 0,80$  para el K, Ca, conductividad y pH en muestras de purín de porcino. En el CIAM se ha aplicado la técnica NIRS desde los años 90, para el análisis de forrajes, verdes y conservados (ensilados). Se han desarrollado ecuaciones de calibración NIR para determinar la materia seca, pH, N amoniacal, ácidos láctico y butírico, tanto en seco, como en fresco, en silos de hierba y maíz (Castro *et al.*, 2002a; Castro *et al.*, 2002b; Castro *et al.*, 2003). El objetivo de este trabajo es la obtención de las ecuaciones de calibración NIR, para el análisis de purines lo que constituirá una herramienta analítica muy útil, rápida y sencilla, para llevar a cabo las aplicaciones de purines en campo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó una colección de 204 muestras de purines de vacuno recogidas en las fosas de explotaciones lecheras durante 2004-08. Las muestras se mantenían refrigeradas hasta su llegada al laboratorio y eran congeladas hasta proceder al análisis. En el momento de iniciarlo las muestras eran descongeladas y se secaban en una estufa a 105 °C para determinar la materia seca (MS) y posteriormente ser molidas a un tamaño  $< 1$  mm. La determinación de materia orgánica (MO) se realizó mediante el autoanalizador termogravimétrico TGA-601 (LECO Co., Michigan, USA). La determinación de nutrientes se realizó sobre la muestra fresca, previa oxidación de la misma mediante una digestión Kjeldahl (AOAC, 2000) con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno utilizando el horno microondas de laboratorio Ethos MOD, Milestone Srl, Sorisole (BG) Italia. El N total se determinó colorimétricamente mediante la reacción del azul de indofenol utilizando un autoanalizador de flujo continuo AA III (Mét. G-188-97, Rev. 2, Bran+Luebbe, Analyzer Division, Norderstedt, Alemania). EL P se determinó colorimétricamente, mediante la reacción del ión ortofosfato con molibdato amónico y ácido ascórbico para formar fosfomolibdato amónico de color azul. El Ca, Mg, K y Na se determinaron por espectroscopía de absorción atómica. Todas las determinaciones se realizaron en duplicado.

Los espectros de las muestras secas y molidas se leyeron en duplicado en el módulo de *spinning* del espectrofotómetro (en cápsula circular) como  $\log 1/R$ , ( $R$ =reflectancia), en un equipo 6500 (Foss NIRSystems, MD, USA). Los espectros resultantes fueron reducidos para calibración a la región NIR, 1100-2500,2 nm (programa TRIM, WinISI II 1.5, Infrasoft Internacional, PA16780, USA).

Se seleccionó al azar un 10% de las muestras para validación externa y entre las muestras restantes se seleccionaron las representativas para calibración, mediante un análisis discriminante basado en la distancia de Mahalanobis calculada por componentes principales (SELECT, Win ISI 1.5). Los espectros NIRS se transformaron matemáticamente mediante el tratamiento SNV y D-trend (Barnes *et al*, 1989) para corregir los efectos de la dispersión de la luz y la tendencia. Se realizaron ocho modos de calibración descritos por dos números: el primero corresponde a la derivada (primera o segunda) de los datos espectrales, y el segundo está relacionado con el tratamiento de *outliers*, muestras no representadas en el grupo de calibración, (D: resta peso en la calibración, 1: un paso de eliminación de *outliers*, 2: dos pasos de eliminación de *outliers*). Finalmente, las ecuaciones de calibración se obtuvieron por regresión MPLS (mínimos cuadrados parciales), realizándose una validación cruzada. La validación externa de las ecuaciones NIR se realizó mediante regresión lineal entre los resultados NIR y los datos de referencia del grupo de validación formado por las muestras seleccionadas al azar y las no seleccionadas para calibración.

El análisis de las muestras en fresco se realizó utilizando un módulo de sonda de fibra óptica en modo de transflectancia con un paso óptico de 0,2 mm y manteniendo la agitación durante la recogida de espectros. En este caso se realizaron cinco lecturas por muestra. Teniendo en cuenta, el efecto del agua sobre los espectros NIR se utilizaron distintos segmentos espectrales para la obtención de las ecuaciones de calibración. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se eliminó el segmento 1850-1970 nm, que corresponde a la banda de absorción del agua. Tanto para el análisis en seco como en fresco, se utilizaron todas las ecuaciones para analizar el grupo de validación comparando los resultados NIRS con los obtenidos por vía húmeda y se seleccionaron aquellos tratamientos que proporcionaban los errores estándar de validación cruzada en calibración (SECV) y de predicción (SEP) más bajos y los coeficientes de determinación ( $R^2_c$  y  $R_p^2$ ) más altos.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores medios, el rango y la desviación estándar de los diferentes parámetros de las muestras que conforman los grupos de calibración y validación, en seco, aparecen en la Tablas 1 y 2. Se puede observar que los valores de los parámetros en el grupo de validación están incluidos en el intervalo de variación del grupo de calibración. Los estadísticos de calibración y validación externa para cada uno de ellos se presentan en las Tablas 1 y 2.

Los datos de referencia y las características de las ecuaciones de calibración NIR para el análisis en fresco se resumen en las Tablas 3 y 4 para los grupos de calibración y validación, respectivamente.

**Tabla 1. Datos de referencia y ecuaciones de calibración NIRS en seco.**

Parámetro	N	Media	Rango	s	Mat	Nc	R <sup>2</sup>	SEC	SECV	RPD	RER
MS (%)	92	7,9	1,9-27,3	3,9	1D	92	0,79	1,82	3,28	1,20	7,9
MO (g kg <sup>-1</sup> )	92	722	400-879	94,4	11	85	0,87	32,8	43,7	2,15	11,0
pH	90	8,3	7,5-9,0	0,24	1D	90	0,54	0,16	0,22	1,08	6,9
N (g kg <sup>-1</sup> )	92	39,8	17,1-81,1	10,7	21	85	0,59	5,08	6,21	1,75	10,3
P (g kg <sup>-1</sup> )	92	9,0	3,8-21,0	3,9	22	81	0,59	1,47	1,72	2,26	10,0
K (g kg <sup>-1</sup> )	92	35,3	7,1-78,1	15,0	12	82	0,92	4,15	6,99	2,14	10,2
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	92	31,1	7,4-115,8	22,3	11	83	0,90	6,60	10,79	2,09	10,1
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	92	6,9	2,5-13,3	2,1	1D	92	0,78	0,98	1,63	1,30	6,6
Na (g kg <sup>-1</sup> )	92	8,0	1,1-27,6	4,6	11	84	0,79	1,57	2,61	1,78	10,2

MS= materia seca, MO= materia orgánica, s= desviación típica, Mat= tratamiento matemático, N y N<sub>c</sub>= n° total de muestras y en la ecuación, R<sup>2</sup>= coeficiente de determinación, SEC y SECV= error típico de calibración y de validación cruzada, RPD= s/SECV, RER= Relación entre el rango de calibración y SECV.

**Tabla 2. Datos de referencia y validación externa de las ecuaciones NIRS en seco.**

Parámetro	N	Media	Rango	s	Rp <sup>2</sup>	SEP	RPD	RER
MS (%)	112	7,8	3,2-13,6	2,1	0,47	1,62	1,29	6,4
MO (g kg <sup>-1</sup> )	112	750	459-865	70,4	0,79	32,81	2,15	12,4
pH	111	8,3	7,3-8,7	0,26	0,43	0,21	1,25	6,6
N (g kg <sup>-1</sup> )	112	39,9	24,5-59,2	7,0	0,61	4,39	1,59	7,9
P (g kg <sup>-1</sup> )	112	8,2	4,8-14,4	1,7	0,46	1,27	1,34	7,5
K (g kg <sup>-1</sup> )	112	41,3	18,2-74,3	12,6	0,74	6,84	1,84	8,2
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	112	23,5	6,9-91,5	14,3	0,76	7,03	2,03	12,0
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	112	6,4	3,6-10,4	1,3	0,40	1,18	1,08	5,8
Na (g kg <sup>-1</sup> )	112	7,7	2,6-20,8	3,0	0,44	2,46	1,21	7,4

MS= materia seca, MO= materia orgánica, s= desviación típica, N= n° de muestras de validación externa, Rp<sup>2</sup>= coeficiente de determinación, SEP= error típico de predicción, RPD= s/SEP, RER= rango/SEP.

**Tabla 3. Datos de referencia y ecuaciones de calibración NIRS en fresco.**

Parámetro	N	Media	Rango	s	Mat	Nc	R <sup>2</sup>	SEC	SECV	RPD	RER
MS (%)	100	8,4	0,34-16,8	2,6	22	88	0,87	0,785	1,02	2,59	16,2
pH	98	8,2	7,0-9,0	0,4	1D	98	0,71	0,23	0,30	1,44	6,9
N (g kg <sup>-1</sup> MS )	98	40,1	5,8-81,8	10,7	21	90	0,60	4,83	6,16	1,74	12,3
K (g kg <sup>-1</sup> MS)	99	37,9	9,6-121,4	16,6	10	99	0,75	8,28	11,17	1,48	10,0
Na (g kg <sup>-1</sup> MS )	87	85,5	1,1-27,7	4,6	1D	87	0,57	3,02	3,64	1,26	7,3

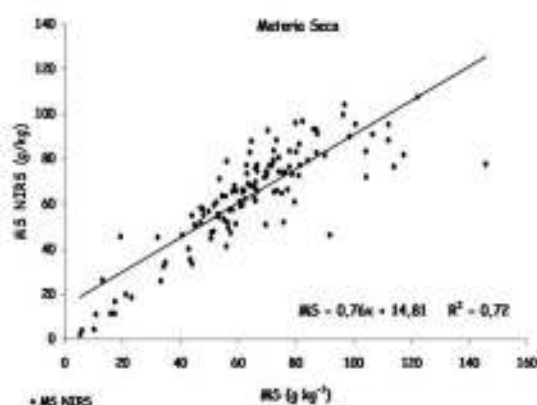
MS= materia seca, MO= materia orgánica, s= desviación típica, Mat= tratamiento matemático, N y N<sub>c</sub>= n° total de muestras y en la ecuación, R<sup>2</sup>= coeficiente de determinación, SEC y SECV= error típico de calibración y de validación cruzada RPD= s/SECV, RER= Relación entre el rango de calibración y SECV.

**Tabla 4. Datos de referencia y validación externa de las ecuaciones NIRS en fresco**

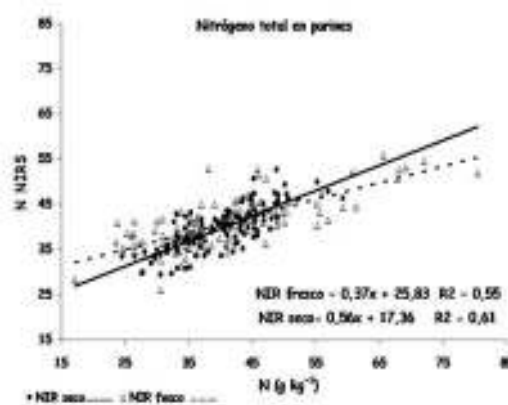
Parámetro	N	Media	Rango	s	Rp <sup>2</sup>	SEP	RPD	RER
MS (%)	124	6,4	0,53-14,6	2,5	0,72	1,31	1,89	10,7
pH	121	8,3	7,3-8,7	0,3	0,53	0,18	1,47	7,8
N (g kg <sup>-1</sup> MS )	124	40,6	17,1-80,4	10,8	0,55	7,69	1,40	8,2
K (g kg <sup>-1</sup> MS)	124	44,8	9,9-165,6	24,6	0,49	17,57	1,40	8,9
Na (g kg <sup>-1</sup> MS )	116	9,4	2,3-56,9	7,2	0,28	6,17	1,17	8,8

MS= materia seca, MO= materia orgánica, s= desviación típica, N= nº de muestras de validación externa, Rp<sup>2</sup>= coeficiente de determinación, SEP= error típico de predicción, RPD= s/SEP, RER= rango/SEP.

La Figura 1 muestra la relación entre los valores obtenidos por NIRS, en fresco, para la determinación de la materia seca y los datos de referencia y la Figura 2 representa los resultados obtenidos por NIRS, en fresco y en seco, para el contenido en nitrógeno total frente a los datos de laboratorio.



**Figura 1. Relación entre los valores de materia seca obtenidos por NIRS en fresco y los datos de referencia.**



**Figura 2. Relación entre los valores de N total obtenidos por NIRS, en fresco y en seco, y los datos de referencia.**

Para la interpretación de los resultados hay que tener en cuenta que según Williams (2003) se definen siete niveles de precisión de la calibración basado en los valores Rc<sup>2</sup>: hasta 0,25 las calibraciones NIRS no pueden utilizarse, entre 0,26 y 0,49 la correlación es muy pobre, entre 0,50 y 0,64 la calibración es válida para estimaciones groseras porque más del 50% de la varianza en Y es explicada por la varianza en X, entre 0,66 y 0,81 la calibración puede ser utilizada para exploración, investigación y predicciones aproximadas, entre 0,83 y 0,90 es útil para la mayoría de las aplicaciones, incluyendo control de calidad y por encima de 0,98 la calibración se podrá utilizar en cualquier aplicación. Sin embargo, Rc<sup>2</sup> nos da información sobre la calidad de la calibración pero no da información sobre la precisión y exactitud en la predicción. Millmier *et al.* (2000) identificaron cuatro niveles de exactitud en la predicción basándose en los valores RER (rango de valores de X/ SECV o SEP): si es < 4 no es utilizable, entre 4 y 8 la calibración puede distinguir entre valores altos y bajos, entre 8 y 12 hay posibilidad de predecir cuantitativamente datos y por encima de 12

indica una buena predicción, pero RER es bastante sensible a la presencia de *outliers* de composición. El RPD (s/SECV o SEP) es menos sensible a este tipo de *outliers* y para materiales heterogéneos como purines, se pueden definir cuatro niveles de RPD sugeridos por Saeys *et al.* (2004): por debajo de 1,5 el incremento en la precisión es mínimo respecto a la media de los resultados y la calibración no sería útil, entre 1,5 y 1,75 sólo permite distinguir entre valores altos y bajos, entre 1,5 y 2,0 pueden hacerse predicciones cuantitativas aproximadas, entre 2,0 y 3,0 la predicción cuantitativa que puede realizarse es buena porque el error de predicción es menor que la mitad del error cometido utilizando el valor medio y por encima de 3,0 las calibraciones son excelentes.

Según los resultados obtenidos en seco (Tablas 1 y 2), y teniendo en cuenta el criterio de Saeys *et al.* (2004), se encontraron calibraciones útiles para estimaciones groseras del Ca y Mg, predicciones aproximadas del N total y Na y buenas para el P total y la MO. Sin embargo en predicción, las calibraciones obtenidas no serían aceptables para la determinación de P total, Mg y Na, y se podría distinguir entre valores altos y bajos en cuanto al N total, realizar predicciones cuantitativas aproximadas de K y buenas predicciones de MO y Ca.

En cuanto al análisis en fresco (Tablas 3 y 4) solamente se presentan los resultados de calibración y validación externa correspondientes a las ecuaciones con un coeficiente de determinación en calibración superior a 0,5. Las determinaciones del contenido en MO, P, Ca y Mg no alcanzaron coeficientes superiores a 0,5 y, siguiendo criterio de Saeys *et al.* (2004), únicamente la determinación de MS es buena para el grupo de calibración y aproximada en predicción.

## CONCLUSIONES

El análisis de los espectros obtenidos a partir de muestras secas y molidas de purines de vacuno ha permitido establecer ecuaciones de calibración aceptables para varios parámetros. La validación externa realizada con un grupo amplio de muestras indica que las ecuaciones son útiles para discriminar contenidos en N total, realizar predicciones cuantitativas aproximadas de K y buenas predicciones de la MO y Ca. La robustez en la estimación debe ser mejorada mediante la incorporación de muestras que amplíen el rango de variabilidad de los parámetros.

A la vista de los resultados también se puede concluir que la precisión del análisis de purines en fresco utilizando el módulo de sonda de fibra óptica es bastante menor que la obtenida en el análisis con muestras secas y molidas. No obstante la precisión obtenida en la determinación de la MS pone de manifiesto la utilidad de la sonda de fibra óptica para obtener predicciones cuantitativas bastante aproximadas de este parámetro, hecho que, desde un punto de vista práctico, tiene la ventaja de eliminar el tiempo de secado, la molienda y la necesidad de mano de obra para realizar estas operaciones. Además, la posible incorporación de la sonda de fibra óptica a equipos portátiles hace especialmente atractivo su uso en determinadas situaciones, como la obtención de un dato rápido para recomendaciones de abonado.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA "RTA-04-156" con participación del Fondo Social Europeo a través del contrato doctores (D. Báez) del Sistema INIA-CCAA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC, 2000. Nitrogen (Total) in Fertilizers. Kjeldahl Method. AOAC Official Method 955.04. En: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16<sup>th</sup> Edition, **1**, Ch. 2, p. 13.
- BARNES, R. J.; DHANOA, M. S.; LISTER, S. J., 1989. Standard Normal Variate and De-trending of near diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectroscopy*, **43**, 772-777.
- CASTRO, P.; CARDELLE, M.; VARELA NOVOA, C., 2002a. Fermentation quality of herbage silages by NIRS : dried or undried samples? *Proc 19th General Meeting of the European Grassland Federation*, 188-189. La Rochelle (Francia).
- CASTRO, P.; FLORES, G.; GONZÁLEZ-ARRÁEZ, A.; CASTRO, J., 2002b. Nutritive quality of herbage silages by NIRS: dried or undried samples. *Proc 19th General Meeting of the European Grassland Federation*, 190-191. La Rochelle (Francia).
- CASTRO, P.; FLORES, G.; GONZÁLEZ ARRÁEZ, A.; CASTRO, J.; DÍAZ-VILLAMIL, L., 2003. Nutritive Quality of Maize Silage by NIRS. *Proc 11th International Conference on Near Infrared Spectroscopy*, 190-191. Córdoba.
- MALLEY, D. F.; YESMIN, L.; EILERS, R. G., 2002. Rapid analysis of Hog manure and manure-amended soils using near-infrared spectroscopy. *Soil Sci Soc Am J*, **66**, 1677-1686.
- MILLMIER, A.; LORIMOR, J.; HURBURGH, C.; FULHAGE, C.; HATTEY, J.; ZHANG, H., 2000. Near-infrared sensing of manure nutrients. *Trans ASAE*, **43**, 903-908.
- REEVES III, J. B.; VAN KESSEL, J. S., 2000a. Near-Infrared spectroscopic determination of carbon, total nitrogen, and ammonium-N in dairy manures. *J Dairy Sci*, **83**, 1829-1836.
- REEVES III, J. B.; VAN KESSEL, J. S., 2000b. Determination of ammonium-N, moisture, total C and total N in dairy manures using a near infrared fibre-optic spectrometer. *J Near Infrared Spectrosc*, **8**, 151-161.
- SAEYS, W.; DARIUS, P.; RAMON, H., 2004. Potential for on-site analysis of hog manure using a visual and near infrared diode array reflectance spectrometer. *J Near Infrared Spectrosc*, **12**, 299-309.
- VAN KESSEL J. S.; REEVES III, J. B., 2000. On farm quick tests for estimating nitrogen in dairy manure. *J Dairy Sci*, **83**, 1837-1844.
- WILLIAMS, P., 2003. *Near infrared technology-Getting the best out of light*. PDK Projects, Nanaimo, Canada.

## SUMMARY

### ANALYSIS OF SLURRY BY NIR SPECTROSCOPY

The use of slurry from dairy farms is a good practice because of environmental and economic reasons, and near reflectance spectroscopy has been shown to be a fast, cheap and precise method to analyze various materials. The aim of this work was to develop NIR calibration equations to determine dry matter (MS), organic matter (MO), pH, total N, P, Ca, Mg, K and Na in dried and undried samples of slurry. A fiber optic attachment was used to analyze undried

samples. Precision of *dry* analysis was higher than that of *fresh* analysis with the exception of dry matter. Cross-validation (SECV) and prediction (SEP) errors of *dry* determinations ranged from 0.22 and 0.21 respectively for pH and 43.66 and 32.81 for organic matter. SECV and SEP for *fresh* analysis ranged from 0.30 and 0.18 for pH and 11.17 and 17.57 for potassium. Determination coefficients of MO, P, Ca and Mg were lower than 0.5 in *fresh* analysis. *Fresh* analysis may be a very useful tool as a fast method of analysis in fertilizers recommendations but precision of NIR analysis of slurry must be improved by adding further samples to the calibration set

**Key words:** Near-infrared reflectance spectroscopy, slurry, dairy, transfectance, optic fiber.