

ANÁLISIS DE PASTOS MEDIANTE NIRS

P. CASTRO, B. FERNÁNDEZ-LORENZO Y J. VALLADARES.

Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, CIAM, Apartado 10, 15080 A Coruña

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de ecuaciones de calibración NIRS (Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano) para las determinaciones de materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), fibra con detergentes en medio ácido (ADF) y neutro (NDF), carbohidratos solubles en agua (CSA), digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (IVOMD) y digestibilidad *in vivo* de la materia seca (DMS) en pastos. Los espectros utilizados fueron obtenidos en dos equipos NIRS y procedían de ensayos de valor nutritivo, de mejora genética, de evaluación de especies y mezclas pratenses y de explotaciones ganaderas, representando una amplia variabilidad, tanto en composición química y botánica, como en condiciones de cultivo y de manejo del sistema animal-pasto.

Las determinaciones de MO y PB fueron las más precisas, con errores de validación cruzada, SECV= 1,45 y 0,85, y de predicción, SEP= 0,71 y 0,72, respectivamente; mientras que en las determinaciones de CSA, IVOMD y DMS los errores fueron mayores, SECV = 2,53; 4,44 y 4,24, respectivamente. El error de validación externa para la determinación de CSA fue SEP= 2,11, y SEP= 2,45 para IVOMD.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos estas ecuaciones se consideran adecuadas para el análisis de pastos, aunque es necesario mejorar su precisión en las determinaciones de digestibilidad.

Palabras clave: digestibilidad, proteína, energía, carbohidratos, pradera mixta

THE ANALYSIS OF HERBAGES BY NIRS

SUMMARY

NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) calibration equations were developed to determine organic matter (OM), crude protein (CP), acid (ADF) and neutral (NDF) detergent fibres, water soluble carbohydrates (CSA) and *in vitro* organic matter (IVOMD) and *in vivo* dry matter (DMD) digestibility. Spectra of a wide variability of herbages were recorded on two different spectrophotometers. OM and CP determinations were the most precise, standard errors of cross-validation SECV= 1.45, 0.85, and prediction, SEP= 0.71, 0.72, respectively. Standard errors of cross-validation for CSA, IVOMD and DMS were higher, SECV= 2.53, 4.44 and 4.24 respectively and errors of external validation, SEP= 2.11 for CSA and 2.45 for IVOMD. These equations resulted satisfactory but further samples of known digestibility must be added to improve their performance.

Key Words: digestibility, protein, energy, carbohydrates, mixed swards

INTRODUCCIÓN

El pasto es una comunidad dinámica de plantas herbáceas, con formación continua de tejidos nuevos durante la estación de crecimiento y desaparición de los viejos a través de procesos de senescencia, muerte y descomposición. Cuando es utilizado en pastoreo por los animales, éstos consumen sólo una parte del tejido nuevo, dependiendo de la especie animal, de las especies vegetales presentes y del manejo del sistema animal-pasto (Flores *et al.*, 1992). Por otra parte, y dado que es el alimento más barato y adecuado para los herbívoros, el conocimiento de su valor nutritivo es fundamental para su correcta utilización en las explotaciones ganaderas. El contenido en nutrientes del pasto, fundamentalmente proteína y energía utilizables por el animal, las especies botánicas que lo forman, su estado de desarrollo, la época del año (Zea, 1992; Givens *et al.* 1993a y 1993b) y el manejo de los animales en pastoreo (Francis y Smetham, 1985) son todos factores que condicionan su valor nutritivo.

El análisis químico de los forrajes en general y de los pastos en particular tiene por objeto determinar su contenido en nutrientes y otros componentes que favorecen o inhiben la utilización de los mismos por el animal (Barnes, 1973) para, a través de ecuaciones de regresión, estimar su valor nutritivo definido como la respuesta obtenida, en términos de producción animal por unidad de alimento ingerido (Van Soest, 1983). Durante el período 1981-1987, se realizaron en el CIAM ensayos *in vivo* para determinar la digestibilidad del pasto en diferentes situaciones incluyendo composición botánica (natural, sembrado), estado vegetativo (rebrotos), forma de presentación (entero, picado) y condiciones estacionales (primavera, otoño). Muestras de los diferentes ensayos fueron analizadas en el laboratorio, determinando su contenido en materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), fibra con detergentes en medio ácido (ADF) o neutro (NDF), carbohidratos solubles en agua (CSA) y su digestibilidad *in vitro* con líquido ruminal (IVOMD), estableciendo ecuaciones de regresión entre los parámetros de laboratorio y la digestibilidad *in vivo*. Además se obtuvieron ecuaciones de calibración NIRS (Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano) tanto para la digestibilidad *in vivo* de la materia seca (DMS) como para los restantes parámetros de laboratorio (Castro, 1994) utilizando un espectrofotómetro Neotec 6250 mediante el programa NSAS (NIR Spectral Análisis Software). Posteriormente, se obtuvieron ecuaciones de calibración NIRS para determinar MO, PB, ADF, NDF, CSA e IVOMD en ensayos de mejora genética de raigrás inglés, *Lolium perenne*, L. (Castro y Oliveira, 1996) utilizando un espectrofotómetro NIRSystem 6500 (Foss NIRSystem, Silver Spring, Washington, USA) mediante WinISI Software. v. 1.5 (InfraSoft International, Port Matilda, PA, USA). Estas calibraciones fueron actualizadas de forma sistemática añadiendo al grupo de calibración otras especies y mezclas pratenses procedentes de ensayos del CIAM y de la Universidad de Santiago (Campus de Lugo).

El objeto del presente trabajo es reunir los espectros obtenidos en ambos equipos y obtener calibraciones NIR para la determinación no solo de los parámetros de laboratorio sino también de digestibilidad *in vivo* de la materia seca (DMS).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 3 grupos de espectros: A. 366 espectros, 92 de los cuales eran de digestibilidad *in vitro* conocida, de raigrás inglés, dactilo y praderas mixtas, procedentes de ensayos de mejora genética, evaluación de variedades y explotaciones lecheras, obtenidos en el espectrofotómetro NIRSystem 6500 y seleccionados mediante análisis discriminante para calibración (Algoritmo SELECT de WinISI 1.5); B. 212 espectros (NIRsystem 6500) seleccionados al azar, antes de la selección discriminante, para validación externa de las calibraciones obtenidas con el grupo A y C. formado por los 178, obtenidos en el equipo NEOTEC 6250, convertidos a formato ISI, mediante la opción *Convert Files*, del programa WinISI 1.5, y procedentes de ensayos de valor nutritivo y digestibilidad *in vivo* conocida, representando una amplia variabilidad en composición, química y botánica, condiciones climáticas y estacionales, estado vegetativo y manejo del alimento en oferta. Cabe señalar que en los casos en que el mismo alimento se ofreció a los animales entero o picado, la digestibilidad *in vivo* de la oferta picada fue menor que la de la entera, a pesar de que su digestibilidad *in vitro* y su composición química fue semejante (Castro, 1994). Para evitar esta dualidad, atribuible a la selección ejercida por el animal, se eliminaron los espectros correspondientes a la oferta entera resultando 126 muestras de digestibilidad *in vivo* conocida. Tanto los espectros de las muestras del grupo A, como los de los grupos B y C fueron obtenidos en duplicado y calculada su media, de forma que cada espectro corresponde a una muestra. Todas las muestras se secaron en estufa de aire forzado a 80 °C y se molieron a 1mm. (Castro, 1996) para su análisis tanto por el método de referencia como mediante NIRS. La lectura NIRS en NEOTEC 6250 se realizó, entre 1100 y 2500 nm con intervalos de lectura de 2 nm, con módulo de transporte, mientras que en NIRSystem 6500 el rango de lectura fue de 400–2500, 2, con módulo giratorio, y se redujo el rango (TRIM, WinISI 1.5) a 1100-2500,2 nm. En ambos casos se utilizó una cápsula circular. La estandarización de los espectros del grupo C se realizó mediante el algoritmo CLONE del programa WinISI, 1.5, utilizando los espectros de 30 muestras de calibración universal, obtenidos en ambos equipos.

Los datos de referencia para MO, PB, ADF, NDF, CSA, IVOMD y DMS fueron los descritos por Castro (1994) para las muestras del grupo C, pero las muestras patrón de digestibilidad *in vivo* conocida, utilizadas para la corrección del efecto tanda en la determinación de IVOMD en el grupo A fueron distintas. Además, los carbohidratos solubles en parte de las muestras de los grupos A y B fueron determinados según Castro (2000). Todos los datos de laboratorio se obtuvieron sobre la muestra seca al aire pero fueron expresados como % sobre materia seca, excepto IVOMD (% sobre MO), teniendo en cuenta el valor de la humedad residual en la muestra seca, determinada por secado en estufa a 100 °C.

Las ecuaciones de calibración NIRS, se obtuvieron mediante regresión por mínimos cuadrados parciales, MPLS (WinISI 1.5) de la segunda derivada del espectro y los datos de referencia, en todos los casos. La validación externa se realizó mediante regresión lineal entre los resultados NIRS y los datos de referencia para las muestras de validación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por una parte se obtuvieron las ecuaciones de calibración NIRS (1) con los espectros del grupo A y se validaron con los del grupo B para el espectrofotómetro NIRSystem 6500. Los resultados estadísticos de calibración, validación cruzada y validación externa se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Ecuaciones de calibración NIRS (1) para el análisis de pastos (NIRSYSTEM 6500)

Componente	Calibración						Validación				
	N	Media	s	SEC	R ² c	SECV	N	Media	SD	SEP	R ² p
MO	366	90,31	2,58	0,73	0,92	0,89	211	91,00	2,05	0,70	0,88
PB	366	12,43	4,79	0,63	0,98	0,76	212	11,85	4,14	0,74	0,97
ADF	364	30,57	4,91	1,19	0,94	1,41	205	29,21	4,49	1,28	0,93
NDF	311	52,49	7,80	1,97	0,94	2,28	125	52,61	6,52	2,09	0,91
CSA	295	17,17	8,07	2,14	0,93	2,40	161	18,24	7,47	1,95	0,94
IVOMD	92	75,66	5,90	1,37	0,95	1,82					

N= n° de muestras, s= desviación típica, R²c y R²p= coeficientes de determinación de calibración y validación, SEC, SECV y SEP, errores típicos de calibración, validación cruzada y predicción, respectivamente

Por otra parte, se amplió el grupo C con espectros seleccionados en el grupo A, mediante el algoritmo SELECT (WinISI 1.5) y se obtuvieron las ecuaciones de calibración (2) cuyas características se resumen en la tabla 2. Además, tratando de mejorar los resultados, se estandarizaron los espectros del grupo C y se añadieron los seleccionados anteriormente en el grupo A, obteniendo las ecuaciones resumidas en la tabla 3. El grupo de validación en estos dos casos estaba formado por los espectros no seleccionados en el grupo A y los del grupo B. Las ecuaciones obtenidas con los espectros estandarizados fueron claramente menos precisas (SECV= 1,73 a 4,59 y SEP= 0,96 a 5,06, para MO y digestibilidad, respectivamente, Tabla 3) que las obtenidas con los espectros sin estandarizar (SECV= 0,85 a 4,44 y SEP= 0,72 a 2,45, para PB y digestibilidad, respectivamente, Tabla 2), para todas las determinaciones, tanto en validación cruzada (SECV) como en validación externa (SEP), mientras que la precisión de las ecuaciones obtenidas con las muestras del grupo A (SECV= 0,73 para MO a 2,14 para CSA y SEP= 0,70 para MO a 2,09 para NDF, Tabla 1) fue semejante a la obtenida con la mezcla de espectros sin estandarizar, sobre todo si se tiene en cuenta su mayor variabilidad en todos los aspectos. El hecho de que las ecuaciones obtenidas con espectros estandarizados sean menos precisas puede ser atribuido a que los 30 espectros de calibración universal utilizados para obtener el archivo de estandarización fueron obtenidos en NEOTEC 6250 con posterioridad a la lectura de las muestras del grupo C, cuya lectura se realizó en el equipo recién adquirido.

Tabla 2. Ecuaciones NIRS (2) para el análisis de pastos (NEOTEC 6250 + NIRSYSTEM 6500)

Componente	Calibración						Validación				
	N	Media	s	SEC	R ² c	SECV	N	Media	SD	SEP	R ² p
MO	325	89,75	2,86	1,17	0,83	1,45	387	91,05	2,05	0,71	0,88
PB	317	13,37	4,79	0,71	0,98	0,85	389	11,40	4,20	0,72	0,97
ADF	323	32,38	5,35	1,43	0,93	1,69	383	29,34	4,30	1,47	0,89
NDF	308	53,39	8,33	2,15	0,93	2,68	254	53,40	6,58	2,38	0,91
CSA	268	12,47	6,53	2,23	0,88	2,53	304	18,19	6,96	2,11	0,91
IVOMD	153	70,33	7,55	4,13	0,70	4,44	79	79,21	5,09	2,45	0,78
DMS	126	70,48	7,90	3,80	0,77	4,24					

N= n° de muestras, s= desviación típica, R²c y R²p = coeficientes de determinación de calibración y validación, SEC, SECV y SEP, errores típicos de calibración, validación cruzada y predicción, respectivamente

Tabla 3. Ecuaciones NIRS para el análisis de pastos (NEOTEC 6250 STD + NIRSYSTEM 6500)

Componente	Calibración						Validación				
	N	Media	s	SEC	R ² c	SECV	N	Media	SD	SEP	R ² p
MO	325	89,75	2,86	1,48	0,73	1,73	387	91,05	2,05	0,96	0,81
PB	316	13,49	4,91	1,72	0,88	2,24	389	11,40	4,20	2,13	0,83
ADF	323	32,38	5,35	2,50	0,78	2,80	383	29,34	4,30	1,90	0,86
NDF	308	53,39	8,33	3,22	0,85	3,97	254	53,40	6,58	3,53	0,80
CSA	268	12,47	6,53	3,10	0,77	3,52	304	18,19	6,96	2,48	0,90
IVOMD	153	69,87	7,62	4,37	0,67	4,45	79	79,21	5,09	5,06	0,48
DMS	126	70,48	7,90	4,35	0,71	4,59					

N= n° de muestras, s= desviación típica, R²c y R²p = coeficientes de determinación de calibración y validación, SEC, SECV y SEP, errores típicos de calibración, validación cruzada y predicción, STD= estandarizados

Por otra parte, cabe destacar la precisión en la determinación de PB (SECV y SEP < 1) frente a los errores, relativamente altos, en las determinaciones de CSA (SECV y SEP ≥ 2) y digestibilidad (SECV > 4), tanto para la digestibilidad *in vivo* como para IVOMD, sobre todo en las ecuaciones (2) obtenidas con espectros mezclados, aunque fueron semejantes a los obtenidos por Castro (1994). La variabilidad tanto en la fuente de espectros como en características de las muestras, y también los distintos métodos de obtención de los datos de referencia para CSA y los distintos patrones para IVOMD pueden ser la causa de estos errores.

Finalmente se compararon los resultados de validación de las ecuaciones de digestibilidad *in vitro* obtenidas con los espectros del grupo A, IVOMD(1) y de las obtenidas con los del grupo combinado IVOMD(2), con los estimados para la digestibilidad *in vivo*, DMS *in vivo*. La figura 1 muestra las rectas de regresión entre los resultados obtenidos mediante NIRS para la digestibilidad *in vitro* e *in vivo*.

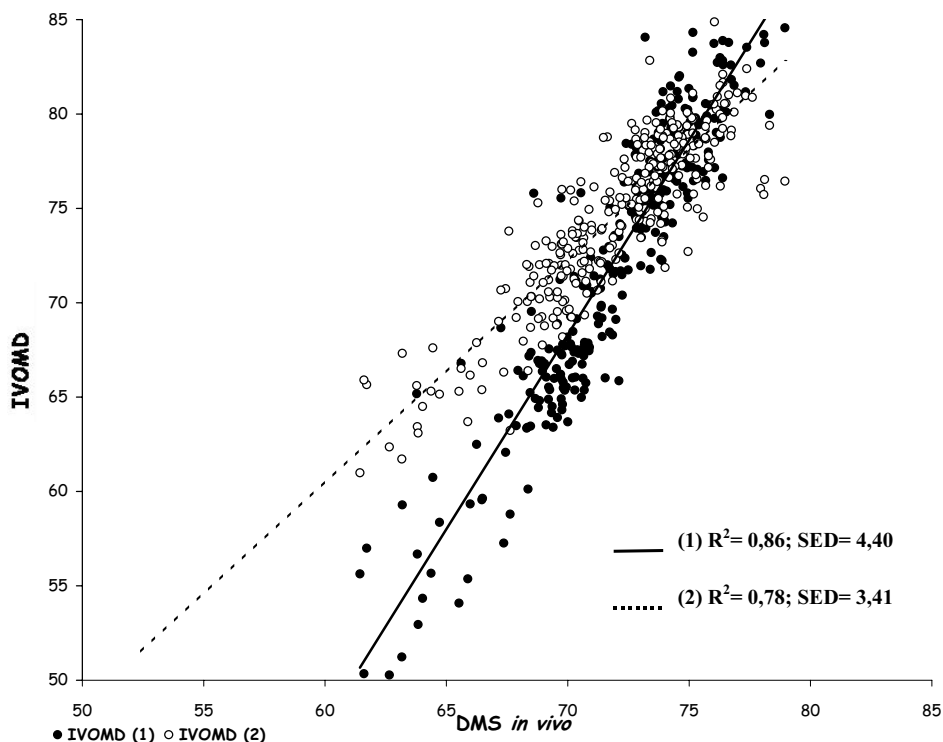


Figura 1. Relación entre digestibilidades estimadas por NIRS en

Aunque los coeficientes de determinación entre los datos estimados por la ecuación IVOMD(1), $R^2 = 0,86$, y los estimados para *in vivo* fue más alta que los obtenidos por la ecuación IVOMD(2), $R^2 = 0,78$, la figura 1 muestra que en este caso la pendiente de la recta es más próxima a uno. Por otra parte, el error típico entre ambas estimaciones de *in vitro* (SED= 4,40 y 3,41) e *in vivo* resultaron altas, principalmente para los valores extremos de digestibilidad, pero semejantes a los obtenidos en trabajos anteriores (Castro, 1994). Teniendo en cuenta estos resultados y que la digestibilidad *in vitro* se determina como MO digestible/100 g de MO mientras que la digestibilidad *in vivo* está expresada como % de MS digestible los resultados obtenidos fueron aceptables. Lamentablemente, no disponemos de más muestras de pasto evaluadas *in vitro* o *in vivo*, para comprobar estos

resultados, pero dado que el valor nutritivo del pasto está muy condicionado por el manejo de los animales en pastoreo y teniendo en cuenta los valores de los coeficientes de determinación obtenidos, estas ecuaciones pueden ser aceptables para la estimación de la digestibilidad, aunque es necesario añadir muestras de digestibilidad conocida para mejorar su precisión.

CONCLUSIONES

La utilización de espectros obtenidos en dos espectrofotómetros NIRS no afecta a la precisión de las determinaciones de materia orgánica, proteína bruta y fibra. Las determinaciones de carbohidratos solubles y de digestibilidad, tanto *in vivo* como *in vitro*, fueron menos precisas, y deben ser mejoradas mediante la incorporación de nuevas muestras al grupo de calibración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNES, R.F., 1973. Laboratory methods of evaluating feeding value of herbage. En: *Chemistry and Biochemistry of herbages*, Vol.3: 179-214. Ed. G. W. Buttler and R. W. Bailey, Academic Press, London, UK

CASTRO, P., 1994. *Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo próximo (NIRS) y evaluación nutritiva de Pastos*. Tesis Doctoral. Microficha N° 408, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Santiago, 121 pp. Santiago de Compostela.

CASTRO, P., 1996. Efecto de tres temperaturas de secado sobre la composición química de forrajes y heces. En: *XXXVI Reunión Científica de la SEEP*: 365-368. Ed. Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. La Rioja

CASTRO, P., 2000. Determinación de carbohidratos no estructurales en forrajes. En: *III Reunión Ibérica de Pastos y Forrajes*: 447-453. Ed. Consellería de Agricultura, Gandería e Política Agroalimentaria, Santiago de Compostela.

CASTRO, P. y OLIVEIRA, J.A., 1996. Breeding for quality: Análisis of perennial rye grass by NIRS. *Grassland and land use systems*. Summaries of 16th EGF Meeting, 42. Ed. G. Parente. Grado (Gorizia), Italia

FLORES, G.; ARRAEZ, A.G. y DIAZ, M., 1992. Manexo de pastoreo sobre pastos sementados na producción ovina. *II xornadas pratenses*, Universidad de Santiago/EUETA-ETSEA, Lugo 25-28 abril. Ed. J. Piñeiro: 113-130

FRANCIS, S.M. y SMETHAM, M.L., 1985. Pasture utilization and its effect in herbage quality. *Proc. New Zealand Grassl. Assoc.*, **46**: 221-225

GIVENS, D.I.; MOSS, A.R. y ADAMSON, A.H., 1993a. Influence of growth stage and season on the energy value of fresh herbage. 1. Changes in energy content. *Grass and forage Sci.*, **48**: 166-174

GIVENS, D.I.; MOSS, A.R. y ADAMSON, A.H., 1993b. Influence of growth stage and season on the energy value of fresh herbage. 2. Relationships between digestibility and metabolizable energy content and various laboratory measurements. *Grass and forage Sci.*, **48**: 175-180

VAN SOEST, P.J., 1983. Analytical systems for evaluation of feeds. En: *Nutritional Ecology of the ruminant*, 75-94. 2nd. Ed., O&B Books, Oregon, USA

ZEA, J., 1992. Los pastos para la producción de carne. *II jornadas pratenses*, Universidad de Santiago/EUETA-ETSEA, Lugo 25-28 abril. Ed. J. Piñeiro: 131-158