

ANÁLISIS DE MACRONUTRIENTES EN MUESTRAS DE PRADERA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA NIR

P. CASTRO¹, D. BAEZ¹ Y A. I. ROCA²

¹Departamento de Pastos y Cultivos. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM).

²Departamento de Producción Animal. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM).

Apartado 10, 15080 La Coruña

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es la obtención de ecuaciones de calibración NIRS para la determinación de P, Ca, Mg y K en muestras de pradera. Aunque los minerales no absorben energía en la región del infrarrojo próximo, algunos de los minerales en forrajes pueden ser estimados de forma indirecta a través de su asociación con moléculas orgánicas. Las mejores ecuaciones de regresión MPLS fueron las obtenidas utilizando la segunda derivada del espectro. Los valores del error de predicción (SEP) en validación externa fueron 0,46, 1,35, 0,20 y 2,98 para las determinaciones de P, Ca, Mg y K, respectivamente. Atendiendo a los valores de RPD (relación entre la desviación típica de los datos de referencia y el error de predicción) se puede obtener una buena predicción cuantitativa del Ca (RPD= 2,27) y aproximada de P, Mg y K (RPD= 1,79, 1,66 y 1,95, respectivamente). No obstante, estos datos son susceptibles de mejora mediante el incremento del número de muestras en el grupo de calibración.

Palabras clave: minerales, pradera, NIRS

INTRODUCCIÓN

La espectroscopía NIRS es una técnica analítica empírica que ha sido aplicada por este grupo de investigación para la determinación de parámetros nutritivos en varios forrajes, tales como praderas (Castro *et al.*, 2005a), maíz forrajero (Campo *et al.*, 2007), ensilados (Castro *et al.*, 2005b) y otros. La capacidad de NIRS para predecir el valor nutritivo y otras sustancias orgánicas se basa en las variaciones de energía debidas a vibraciones de los enlaces de hidrógeno y aunque los minerales no absorben energía en la región del infrarrojo algunos de los minerales en forrajes pueden ser estimados, de forma indirecta, a través de su asociación con moléculas orgánicas. Varios autores (Clark *et al.*, 1987; Vázquez de Aldana *et al.*, 1995; Halgerson *et al.* 2004; Petisco *et al.*, 2008 y Tremblay *et al.*, 2009) han desarrollado ecuaciones de calibración NIRS para la determinación de macro y micronutrientes en distintas especies forrajeras.

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de ecuaciones de calibración NIRS para la determinación de fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg) y potasio (K) además de la materia orgánica (MO) y proteína bruta (PB) en muestras de pradera.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se dispone de 220 muestras de praderas, sembradas con raigrás inglés (*Lolium perenne* L.) e italiano (*Lolium multiflorum* Lam.) y trébol blanco (*Trifolium repens* L.) y violeta (*Trifolium pratense* L.), procedentes de sistemas de producción lechera (150 muestras) y de ensayos de fertilización de suelos (70 muestras) analizadas por métodos convencionales para la determinación de MO, PB (Castro, 1994), P (AOAC, 1995), Ca, Mg y K (espectrofotometría de absorción atómica). Todas las determinaciones se realizaron en una disolución microKjeldahl excepto MO (analizador termogravimétrico

TGA-601, LECO Corporation, St. Joseph, MI 49085-2396). En la tabla 1, se resumen los resultados obtenidos para cada uno de estos componentes.

La obtención y registro de los espectros se realizó sobre muestra seca y molida y en duplicado, utilizando un espectrofotómetro NIRSystems 6500 (FOSS Analytical AS, Dinamarca). Se realizó una selección al azar de 40 muestras para validación y posteriormente se seleccionaron las muestras más representativas para calibración mediante un análisis discriminante basado en distancias de Mahalanobis (H), determinadas por análisis de componentes principales (PCA). Las muestras no seleccionadas para calibración se añadieron a las seleccionadas al azar para validación.

Tabla 1. Resultados obtenidos por análisis convencional

Componente	CALIBRACION					VALIDACION				
	N	Mínimo	Máximo	Media	SD	N	Mínimo	Máximo	Media	SD
MO ¹	105	82,46	95,09	89,98	2,32	114	85,35	94,58	90,27	1,89
PB ¹	105	4,64	26,82	14,12	4,40	109	5,02	24,05	13,89	4,13
P ²	105	1,40	5,07	3,47	0,81	106	1,46	5,33	3,54	0,84
Ca ²	105	2,30	28,67	7,07	4,95	98	3,33	18,96	6,14	3,07
Mg ²	98	0,86	3,20	1,62	0,39	101	0,94	2,52	1,61	0,33
K ²	98	13,75	51,79	31,51	8,14	95	16,41	52,75	32,55	6,22

¹g/ 100 g MS ²g/kg MS

Las ecuaciones de calibración se obtuvieron mediante regresión MPLS (mínimos cuadrados parciales) entre los datos espectrales y los resultados del análisis convencional utilizando la región del espectro comprendida entre 1100 y 2500 nm previa corrección de los efectos de dispersión de la luz mediante el tratamiento SNV (Standard normal variate) y de-trend, descrito por Barnes *et al.* (1993). Todas las operaciones de obtención, registro y selección de espectros y obtención y validación de ecuaciones de calibración NIRS se realizaron mediante el programa WinISI II, 1.5 (InfraSoft International, PA16870, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron seis ecuaciones de calibración para cada componente tres de ellas a partir de la 1ª derivada del espectro, incluyendo todas las muestras, restando peso a los *outliers* y con un paso de eliminación de *outliers*, y otras tres a partir de la 2ª derivada y los mismos tratamientos de los *outliers*. Se seleccionaron las mejores ecuaciones atendiendo al menor error típico de validación cruzada (SECV) y de predicción en la validación externa (SEP) así como al valor más alto de los coeficientes de determinación, R^2_{cv} y R^2_p , de validación cruzada y predicción, respectivamente. Las ecuaciones obtenidas a partir de la segunda derivada del espectro fueron más precisas que las obtenidas a partir de la primera derivada. Los valores de SECV y SEP fueron más bajos cuando se realizó un paso de eliminación de *outliers*, como cabía esperar, excepto para las determinaciones de MO y K en que los valores de SEP fueron más bajos cuando se utilizaron todas las muestras de calibración.

En las tablas 2 y 3 se resumen los resultados NIRS de validación cruzada y de predicción obtenidos con las ecuaciones NIRS seleccionadas y los estadísticos de las mencionadas ecuaciones y en la figura 1 se muestran las rectas de regresión entre los resultados NIRS y los datos de referencia en las determinaciones de P, Ca, Mg y K para el grupo de validación.

Tabla 2. Resultados obtenidos por análisis NIRS

Componente	VALIDACION CRUZADA					VALIDACION				
	N	Mínimo	Máximo	Media	SD	N	Mínimo	Máximo	Media	SD
MO ¹	105	83,49	95,45	89,99	2,30	114	85,66	95,41	90,18	1,96
PB ¹	104	4,97	27,05	14,15	4,39	109	4,57	23,06	13,84	4,01
P ²	104	1,11	5,20	3,48	0,69	106	1,10	4,66	3,49	0,66
Ca ²	104	0,12	21,86	6,89	4,22	98	2,43	19,99	6,25	3,35
Mg ²	97	0,96	2,67	1,62	0,33	101	1,11	2,54	1,62	0,32
K ²	98	12,24	53,10	31,45	7,62	95	18,12	50,08	32,23	5,37

¹g/ 100 g MS ²g/kg MS

Según Saeys *et al.* (2004) para valores de RPD (SD/SECV ó SD/SEP) menores que 1,5 el incremento en la precisión es mínimo comparado con la utilización de la media de los resultados y la calibración no sería útil. Si están comprendidos entre 1,5 y 1,75 sólo existe la posibilidad de distinguir entre valores altos y bajos, entre 1,75 y 2,0 pueden hacerse predicciones cuantitativas aproximadas. La predicción cuantitativa que puede realizarse cuando RPD está comprendida entre 2,0 y 3,0 es buena, porque el error de predicción es reducido a menos de la mitad del error cometido cuando utilizamos el valor medio de la composición, y por encima de 3,0 el error de predicción es reducido por un factor mayor que tres y las calibraciones son excelentes. Atendiendo a este criterio, solamente las determinaciones de MO y PB son excelentes, tanto en validación cruzada (RPD = 3,08 y 5,02 para MO y PB, respectivamente) como en validación externa (RPD= 3,20 y 5,17), y semejantes a las obtenidas anteriormente (Castro *et al.*, 2005) para muestras de pradera.

Tabla 3. Ecuaciones NIRS para el análisis de macronutrientes en praderas

Componente	CALIBRACION						VALIDACION			
	N	SEC	R ² _C	SECV	R ² _{CV}	SD/SECV	N	SEP	R ² _P	SD/SEP
MO	105	0,35	0,98	0,75	0,90	3,08	114	0,59	0,91	3,20
PB	104	0,63	0,98	0,88	0,96	5,02	109	0,80	0,96	5,17
P	104	0,43	0,72	0,51	0,61	1,59	106	0,46	0,70	1,79
Ca	104	1,44	0,90	2,50	0,69	1,80	98	1,35	0,84	2,27
Mg	97	0,19	0,76	0,26	0,58	1,53	101	0,20	0,60	1,66
K	98	3,46	0,82	4,37	0,71	1,86	95	2,98	0,74	1,95

N= n° de muestras; SEC, SECV y SEP= error típico de calibración, validación cruzada y predicción;

R²_C, R²_{CV} y R²_P= coeficientes de determinación de calibración, validación cruzada y predicción

Todos los valores de RPD para la determinación de los elementos minerales están comprendidos entre 1,5 y 2,5 permitiendo una buena predicción cuantitativa de Ca (RPD= 2,27 en validación) y aproximada de P, Mg y K (RPD= 1,79, 1,66 y 1,95, respectivamente).

Los valores más bajos de SECV y SEP fueron los obtenidos para el Mg, 0,26 y 0,20, respectivamente, mientras que los más altos fueron los obtenidos para el K, 4,37 y 2,98. Los valores de SECV y SEP fueron 0,51, 0,46 y 2,50, 1,35 para el P y el Ca, respectivamente. En general, los datos encontrados en la bibliografía consultada fueron mejores que los obtenidos en este trabajo, sobre todo los obtenidos por Tremblay *et al.* (2009), pero las muestras utilizadas por estos autores procedían de un cultivo monofito (*Phleum pratense L.*) frente a la variabilidad en composición botánica de las muestras que nos ocupan. Sin embargo, Vázquez de Aldana *et al.* (1995), utilizando muestras de pastos

naturales, obtuvieron valores de SEP similares a los encontrados en este trabajo para Ca y Mg (0,83 y 0,15, respectivamente) y más bajos para P y K.

CONCLUSIONES

Las ecuaciones de calibración NIRS obtenidas permiten una buena predicción cuantitativa del Ca (RPD= 2,27) y aproximada de P, Mg y K (RPD= 1,79, 1,66 y 1,95, respectivamente). Estos resultados se pueden mejorar añadiendo muestras al grupo de calibración para mejorar la distribución estadística de los datos de referencia y, por otra parte, revisando los métodos de referencia utilizados.

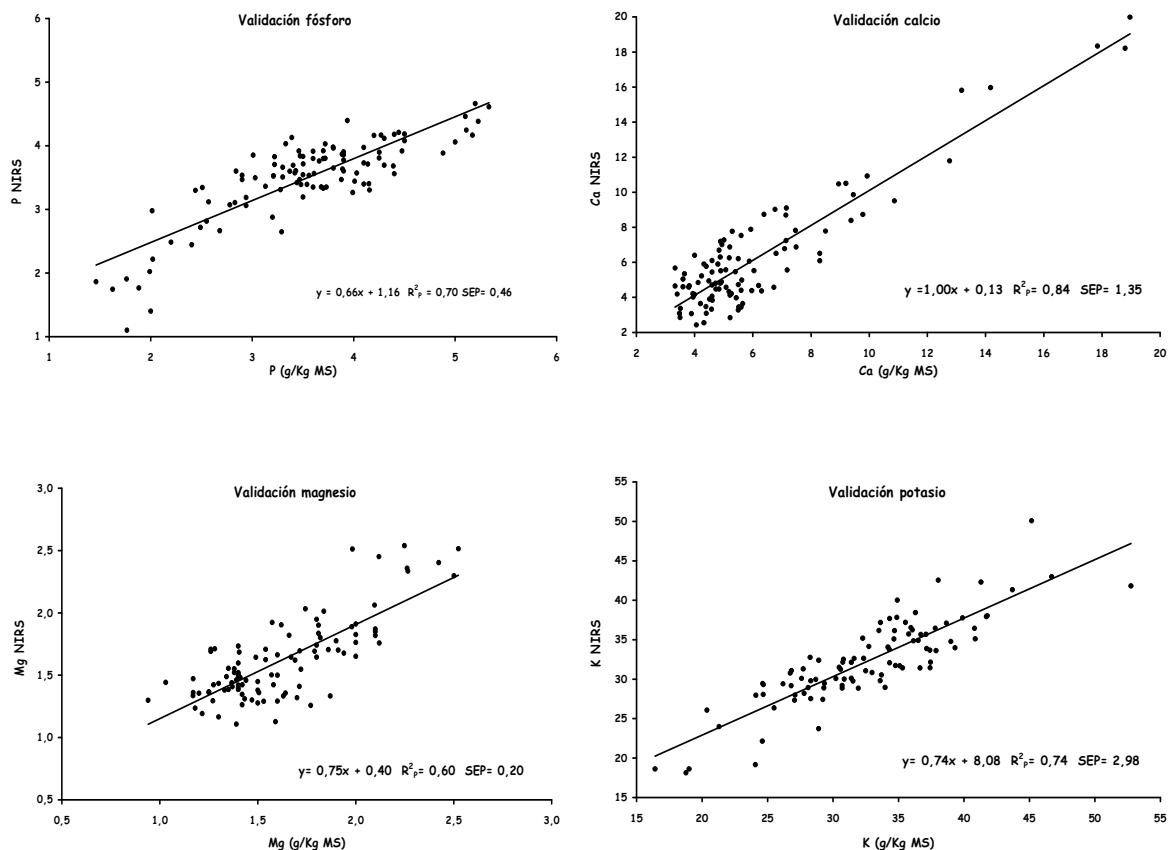


Figura 1. Regresión entre resultados NIRS de validación y datos de laboratorio para P, Ca, Mg y K

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC, 1995. Phosphorus in water. Photometric method. En: *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists Internacional*, 16 th Edition, Cunnif, P. (Ed), Ass. Offic. Anl. Chem. Intern., Arlington, VA. Cahpt. **11**, 20-21.

BARNES, R. J.; DANHOA, M. S.; LISTER, S. J., 1993. Correction to the description of Standard Normal Variate (SNV) and De-trend (DT) transformations in practical spectroscopy with applications in food and average análisis. *J. of Near Infrared Spec.* **1(3)**, 185-186.

CAMPO RAMIREZ, L.; CASTRO GARCIA P.; MORENO-GONZALEZ, J., 2007. Calibración NIRS para estimar la digestibilidad de la materia orgánica de la planta entera de maíz en híbridos seleccio-

nados para forraje. En: *Los sistemas forrajeros: entre la producción y el paisaje*. Actas de la Sociedad Española para el Estudio de los Pastos (SEEP) Vitoria-Gasteiz, 461-467.

CASTRO, P., 1994. Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo próximo (NIRS) y evaluación nutritiva de pastos. *Tesis doctorales en microfichas*, **408**, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Santiago, pp. 121.

CASTRO, P.; FERNANDEZ-LORENZO, B.; VALLADARES, J. 2005a. Análisis de pastos mediante NIRS. En: *Producciones Agroganaderas: Gestión eficiente y conservación del medio natural*. K. OSORO *et al.* (Eds.). AsturGraf, S.L. Gijón (España), 73-80.

CASTRO, P.; FLORES, G.; GONZALEZ-ARRAEZ, A.; CASTRO, J.; FERNANDEZ-LORENZO, B., 2005b. Nutritive quality of silages by conventional laboratory methods and near infrared reflectance spectroscopy. En: *Proc. Of the XXth Internacional Grassland Congress*. F.P. O'Mara *et al.* (Eds.) Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 261.

CLARK, H. D.; MAYLAND, H. F.; LAMB, R. C., 1987. Mineral Análisis of Forages with Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Agrom. J.*, **79**, 485-490.

HALGERSON, J. L.; SHEAFFER, C. C.; MARTIN, N. P.; PETRESON, P. R.; WESTON, S. J., 2004. Near-Infrared Reflectance Spectroscopy Prediction of Leaf and Mineral Concentrations in Alfalfa. *Agrom. J.*, **96**, 344-351.

PETISCO, C.; GARCIA-CRIADO, B.; VAZQUEZ DE ALDANA, B. R.; GARCIA-CIUDAD, A.; MEDIAVILLA S., 2008. Ash and Mineral Contents in Leaves of Woody Species: Analysis by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **39**, 905-925.

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.

TREMBLAY, G. F.; NIE, Z.; BELANGER, G.; PELLETIER, S.; ALLARD, G., 2009. Predicting timothy mineral concentrations, dietary cation-anion difference, and grass tetany index by near-infrared reflectance spectroscopy. *J. Dairy Sci.*, **82**, 4499-4506.

VAZQUEZ DE ALDANA, B.R.; GARCIA-CRIADO, B.; GARCIA-CIUDAD, A. y PEREZ CORONA, M.E., 1995. Estimation of mineral content in natural grasslands by near infrared reflectance spectroscopy. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **26**, 1383-1396.

ANALYSIS OF MACRONUTRIENTS IN MIXED SWARDS SAMPLES BY NIR SPECTROSCOPY

SUMMARY

The aim of this work was to develop NIRS calibration equations to determine P, Ca, Mg and K in mixed swards samples. Although minerals do not absorb energy in the near infrared spectrum, some of the inorganic minerals in forage can be predicted by NIRS through the association with organic molecules. The best equations of MPLS regression were obtained by using the second derivative of spectra. Standard error values of prediction (SEP) in external validation were 0.46, 1.35, 0.20 and 2.98 for P, Ca, Mg and K, respectively. Taking into account RPD values (standard deviation of reference data and SEP ratio) a good quantitative prediction of Ca (RPD= 2.27) and approximately of P,

Mg, and K (RPD= 1.79, 1.66 and 1.95, respectively) can be achieved. Nevertheless, these results might be improved by adding samples to the calibration set.

Key words: minerals, mixed swards. NIRS