



Control de calidad de ensilados a nivel de explotación: del laboratorio al campo

ANA SOLDADO CABEZUELO. Área de Nutrición, Pastos y Forrajes. asoldado@serida.org
ADELA MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ. Área de Nutrición, Pastos y Forrajes. admartinez@serida.org
SAGRARIO MODROÑO LOZANO. Área de Nutrición, Pastos y Forrajes. msmodrono@serida.org
BEGOÑA DE LA ROZA-DELGADO. Área de Nutrición, Pastos y Forrajes. broza@serida.org



Ensilado de maíz abierto para consumo.



La calidad de un ensilado resulta de la interacción entre la naturaleza del material de origen, su composición química y el proceso de conservación, y viene dada por su contenido en principios nutritivos, la digestibilidad de los mismos y por su fermentación. Su caracterización por métodos tradicionales exige un proceso analítico largo, tedioso y contaminante, por ello, se necesita un cambio radical en los procesos de análisis y control. La búsqueda de nuevas estrategias debería contemplar un alto potencial de muestreo, estimaciones rápidas, fiables e ideal-

mente a pie de campo a fin de tomar las determinaciones de manejo en el momento de ensilar y a bajo coste. Estas características se encuentran entre los atributos de la Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS).

En lo que respecta a la tecnología NIRS, podemos decir, que ya ha sido reconocida su capacidad para sustituir o complementar a los métodos analíticos tradicionales. Por otra parte, su utilización para la optimización de sistemas de alimentación animal, mediante el control de





forrajes y alimentos producidos en la propia explotación, implementa valor añadido en las producciones y sus comercializaciones. Todo ello, redundando en la mejora de la eficiencia de los procesos y fases que intervienen en la nutrición de los herbívoros y consiguientemente en una reducción de costes de producción y también de los medioambientales. Su aplicación en la medida de la calidad de la dieta (Stut and Tolleson, 2000), ingestibilidad y digestibilidad (de la Roza *et al.*, 2002, Soldado *et al.*, 2004), contenido en proteína, humedad, grasa, fibra, y demás parámetros nutritivos (Martínez *et al.*, 2004; de la Roza-Delgado *et al.*, 2006) en alimentos para animales ha sido ampliamente demostrada.

En la actualidad, las aplicaciones NIRS en laboratorio (*at-line*) sustituyen a la rutina en los laboratorios agrarios, permitiendo una evaluación rápida y precisa de los atributos de calidad. Sin embargo, a pesar de su rapidez, esta tecnología, presenta una serie de limitaciones que restringe su uso fuera de las condiciones de laboratorio, dado que los instrumentos NIRS tradicionales son muy "sensibles" a variaciones de temperatura y humedad. Ello hace que sea necesario transportar la muestra desde el punto de origen al laboratorio de control de calidad, originando una demora entre el proceso de muestreo y el resultado analítico, lo que en muchas ocasiones no posibilita una respuesta inmediata. Como consecuencia, se retrasa la toma de las medidas adecuadas cuya finalidad es obtener un ensilado de la mayor calidad posible a partir del forraje o la materia prima de la que se dispone, algo fundamental para elaborar raciones alimenticias de calidad y económicas, basadas en la gestión de los recursos propios de la explotación ganadera.

Para paliar estas limitaciones, los avances en la tecnología NIRS han hecho posible el desarrollo de sensores portátiles capaces de recoger la información espectroscópica directamente en el campo y sobre muestra intacta (Martínez *et al.*, 2010 a,b; Soldado *et al.*, 2013). El desarrollo, la evaluación y la implantación de estos sensores NIRS *on-site* permitirá incrementar la eficacia en la determinación de los parámetros de interés y proporci-

onará información relevante para la toma de decisiones en tiempo real. Sin embargo, aún existen numerosos problemas a resolver antes de la implantación de estos sistemas para el control de calidad en agroalimentación en general, y en alimentación animal en particular. Por todo ello, haciendo uso del equipamiento NIRS portátil disponible en el SERIDA, han sido evaluadas las posibilidades de transferencia de modelos de predicción-desarrollados en equipos *at-line* para parámetros nutritivos y fermentativos en ensilados, a los equipos *on-site*.

En las Figuras 1 y 2 se muestran los equipos y el modo de recogida de la información espectral, en ensilados en modo intacto, en fresco.

Las características de los equipos utilizados se describen a continuación:

- Instrumentación NIRS de laboratorio (Equipo Master): recoge la información espectral en un rango de longitudes de onda entre 400 y 2500 nm, empleando una cápsula rectangular porta muestras, llamada "natural", que presenta una ventana de cuarzo de 4,7 cm por 20 cm, permitiendo una superficie de irradiación de la muestra de 94 cm². Las muestras se analizan por duplicado, preparando dos cápsulas de cada muestra y en cada cápsula se recogen dos espectros, cada uno de los cuales es el resultado del promedio de 32 barridos espectrales.

Figura 1.-Equipo NIRS de laboratorio (Master, *at-line*).





↑
Figura 2.-Equipo NIRS portátil (Host, *on-site*).

- Instrumentación NIRS portátil (Equipo Host): recoge la información espectral en un rango de longitudes de onda entre 400 y 1700 nm. Para los ensayos en laboratorio se utilizan cápsulas placas petri, con una superficie de irradiación circular de 64 cm² y para el muestro en campo realiza medidas de forma directa sobre la muestra (ver Figura 2). Con este equipo para cada muestra se realizan 20 submuestreros. Es decir, se hacen 20 barridos espectrales, y posteriormente se promedian, obteniéndose un espectro lo más representativo posible, de la muestra analizada.

Desarrollo de modelos de predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en ensilados de maíz

De todos los tratamientos ensayados, los mejores resultados se obtuvieron apli-

cando un pretratamiento de corrección de línea de base (Standard Normal Variate and Detrend, SNVD) y un tratamiento matemático de primera derivada. En estas condiciones, se desarrolló el modelo en el rango completo del equipo *at-line* y en el rango de solapamiento de ambos equipos (400-1700 nm) para evaluar la viabilidad del modelo en el rango de longitudes de onda disponibles en el equipo portátil.

En la Tabla 1 se muestran comparadamente los resultados obtenidos. Los estadísticos de validación cruzada (SECV) y los coeficientes de correlación (1-VR) fueron comparables para ambos rangos de longitudes de onda, resultando satisfactorios para la mayoría de los parámetros.

No obstante, cabe destacar que para la proteína, el coeficiente 1-VR mostró un descenso de 0,121 puntos al reducir el rango de longitudes de onda, hecho probablemente relacionado con la eliminación de las bandas de proteína en torno a 1900-2200 nm. Por otro lado, las limitaciones relacionadas con el estrecho rango de valores de pH que poseen los ensilados de maíz (3,06-4,40) en un conjunto de 240 ensilados de maíz analizados, reducen la posibilidad de obtener modelos predictivos robustos. Con respecto a las cenizas, señalar que es un constituyente difícil de predecir con fiabilidad mediante el uso del NIR, ya que el fundamento de esta tecnología, se basa en la interacción de la radiación con los componentes orgánicos de las muestras

↘
Tabla 1.-Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros nutritivos y fermentativos en ensilados de maíz desarrollados con espectros recogidos en el equipo master en diferentes rangos de longitudes de onda.
MS: Materia seca;
CZ: Cenizas; PB: Proteína bruta;
FND: Fibra neutro detergente;
ALM: Almidón; F: Fresco;
DEMO: Digestibilidad de la materia orgánica;
NH₃: Nitrógeno amoniacal.
LACT: Ácido láctico;
ACET: Ácido acético;
SECV: error estándar de validación cruzada;
1-VR: Coeficiente de determinación de la validación cruzada;
RER: rango/SECV;
RPD: SD/SECV.

	Rango 400 - 2500 nm				Rango 400 - 1710 nm			
	SECV	1-VR	RER	RPD	SECV	1-VR	RER	RPD
pH	0,127	0,354	7,463	1,244	0,127	0,391	7,669	1,279
MS (%)	0,850	0,939	24,334	4,056	0,908	0,942	24,832	4,139
CZF (%)	0,126	0,603	9,517	1,587	0,143	0,513	8,621	1,437
PBF (%)	0,114	0,838	14,919	2,487	0,146	0,717	11,185	1,864
FND _F (%)	1,494	0,833	14,522	2,431	1,409	0,849	15,457	2,576
ALM _F (%)	0,954	0,818	14,065	2,344	0,939	0,829	14,512	2,41
DEMO (%)	1,895	0,604	9,557	1,593	1,876	0,607	9,489	1,582
NH ₃ (mg/dl)	3,938	0,858	15,957	2,659	4,675	0,769	12,248	2,041
LACT (mg/dl)	224,839	0,885	17,723	2,954	280,401	0,831	14,538	2,423
ACET (mg/dl)	132,606	0,876	14,725	2,849	177,094	0,807	11,538	2,272

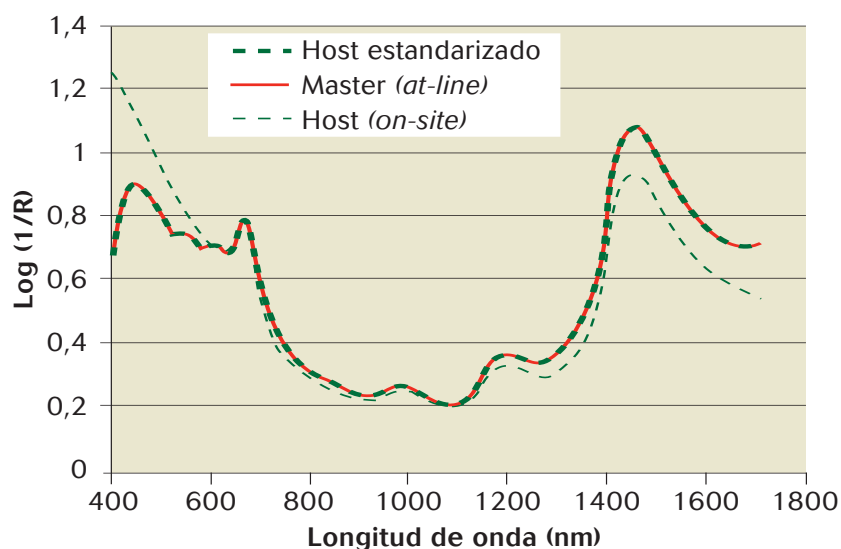
y las cenizas representan la parte mineral del alimento, hecho por el cual, solo se pueden estimar de forma indirecta. Por su parte, la complejidad de la determinación analítica de la digestibilidad enzimática de la materia orgánica, requiere disponer de mayor número de muestras para mejorar los resultados obtenidos.

Estandarización de equipos NIRS y validación externa del modelo predictivo

Una vez evaluada la viabilidad del modelo de calibración desarrollado en el rango de solapamiento de ambos equipos (master y host), se estableció una estrategia de estandarización para minimizar las diferencias entre los espectros recogidos en los dos instrumentos. Para ello, en ambos equipos se recogieron los espectros de 10 muestras de ensilados de maíz en fresco, ya que según Fearn (2001), la mejor opción en los procedimientos de normalización consiste en utilizar muestras reales, a los que se les aplicó un tratamiento matemático de ajuste de longitudes de onda patentado por Shenk y Westerhaus (1995). Este procedimiento de ajuste corrige las diferencias de los instrumentos en longitudes de onda y absorbancias, ajustándolas a un modelo cuadrático.

En la Figura 3, se muestran los espectros NIRS promedio de las 10 muestras recogidas en ambos equipos, antes de la estandarización y después del procedimiento de ajuste de los espectros del equipo portátil para conseguir la máxima similitud con los del equipo de laboratorio.

El éxito de la estandarización se evaluó comparando las distancias espectrales GH (distancia al centro poblacional) y NH (distancia vecinal), obtenidas al aplicar el modelo desarrollado sobre otro colectivo de 10 muestras de ensilado de maíz (validación externa) analizadas en



ambos equipos, antes y después de la estandarización del equipo portátil (host) con el equipo de laboratorio (master).

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos. Tras la estandarización los valores de GH y NH disminuyen significativamente hasta valores próximos a los obtenidos en el equipo *at-line* y se ajustan o están muy próximos a los valores recomendados ($GH < 3$ y $NH < 1,2$), lo que significa que los espectros de la población de validación no se encuentran alejados de los del colectivo de calibración y, por tanto, es posible utilizar el modelo desarrollado en el equipo *at-line* para llevar a cabo el análisis de muestras en el equipo *on-site*.

Para confirmar el éxito de este procedimiento, se llevó a cabo la predicción de la calidad nutritiva y fermentativa sobre el colectivo de 10 muestras de ensilado de maíz (validación externa) y se evaluaron los resultados utilizando un test de comparación de medias (*t de Student*) entre los valores de referencia, obtenidos por vía húmeda, y los predichos en el equipo *on-site*, después de la estandarización utilizando el modelo predictivo desarrollado.

↑
Figura 3.-Espectro promedio del colectivo de estandarización recogido en el equipo de laboratorio (*at-line*), y portátil (*on-site*), antes y después de la estandarización.

Equipo <i>at-line</i>		Equipo <i>on-site</i>	
		Sin estandarización	Con estandarización
GH	1,42	136,28	2,01
NH	0,79	120,64	1,34

←
Tabla 2.-Estadísticos GH (distancia al centro poblacional) y NH (distancia vecinal) para la evaluación de la estandarización de los equipos.



Tabla 3.-Validación externa mediante comparación de muestras emparejadas (test t de Student) entre valores de referencia y predichos NIRS *on-site*.

P>0,05: no significativo
($t_{\text{calculado}} < t_{\text{teórico}}$); $t_{\text{teórico}}$ para 9 grados de libertad = 1,83;
MS: Materia seca;
CZ: Cenizas;
PB: Proteína bruta;
FND: Fibra neutro detergente;
ALM: Almidón; F: Fresco;
DEMO: Digestibilidad de la materia orgánica;
NH₃: Nitrógeno amoniacal.
LACT: Ácido láctico;
ACET: Ácido acético.



Tabla 4.-Estadísticos de calibración NIRS para la predicción de parámetros fermentativos en ensilados de hierba desarrollados con espectros recogidos en el equipo master en el rango de longitudes de onda de solapamiento de los equipos master y host (400-1700 nm).

MS: Materia seca;
NSOL: g Nitrógeno Soluble
NNH₃: mg de Nitrógeno amoniacal/100ml de jugo,
LACT: Ácido láctico;
BUT: Ácido Butírico;
*: g/100ml de jugo;
SEC: Error estándar de calibración;
RSQ y 1-VR coeficientes de determinación de calibración y validación cruzada;
SECV: Error estándar de validación cruzada.

	Primera derivada	
	$t_{\text{calculado}}$	P
pH	0,812	0,219
MS (%)	1,345	0,106
CZ _F (%)	-0,910	0,193
PB _F (%)	0,088	0,466
FND _F (%)	-1,326	0,109
ALM _F (%)	-2,419	0,019
DEMO (%)	-0,493	0,317
NH ₃ (mg/dl)	-1,087	0,153
LACT (mg/dl)	-1,119	0,146
ACET (mg/dl)	-0,174	0,433

En la Tabla 3 se observa que no existen diferencias significativas al comparar los resultados de la medida de cada constituyente, entre los métodos de referencia y NIRS, a excepción del almidón. Los resultados obtenidos para este parámetro, muestran un sesgo positivo que está dentro del margen de error de la incertidumbre del método de referencia, inherente además a la complejidad espectral que supone el análisis NIRS de ensilados de maíz en fresco, puesto que el almidón se almacena en el grano.

Ensilados de hierba

Aplicando una metodología similar a la descrita para los ensilados de maíz, y haciendo uso de un colectivo de calibración de ensilados de hierba en fresco que incluye: 260 muestras de calibración, 5 muestras para la estandarización de los instrumentos y 12 para la validación externa; se procedió a desarrollar la sistemática de transferencia de los modelos de predicción de parámetros fermentativos en ensilados de hierba.

En la Tabla 4, se detallan los estadísticos de calibración de los modelos desarrollados para parámetros fermentativos en el rango de longitudes de onda comprendido entre 400-1700 nm. Los resultados muestran que para todos los parámetros se obtienen coeficientes de determinación superiores a 0,7, hecho que posibilita su empleo para la predicción cuantitativa de todos los parámetros en estudio.

A continuación, para llevar a cabo la transferencia de los modelos al equipamiento portátil, siguiendo la misma estrategia que se planteó para ensilados de maíz, fue necesario recoger la huella espectral de 5 muestras de estandarización, en ambos equipamientos. En la Figura 4 se muestra el espectro medio de esta población en el equipo master (laboratorio) y en el host (portátil) antes (Figura 4a) y después de la estandarización (Figura 4b) que resultó necesaria a la vista de las diferencias tanto en lo referente al rango espectral (400-2500 nm vs. 400-1700 nm) como a la respuesta en reflectancia. En la Figura 4b, se puede observar la concordancia entre los espectros medios recogidos en ambos equipamientos tras la estandarización de los espectros del equipo portátil utilizando como master el equipo de laboratorio.

En la Tabla 5, se muestra la disminución de los estadísticos GH y NH tras la estandarización espectral. Estos estadísticos son ligeramente superiores a los recomendados (GH <3 y NH <1,2), hecho que podría limitar el éxito de la transferencia de los modelos de predicción. Por ello, la validación externa resultó decisiva para evaluar las mínimas diferencias espectrales que originaron valores de GH y NH superiores a los recomendados, aunque no aberrantes.

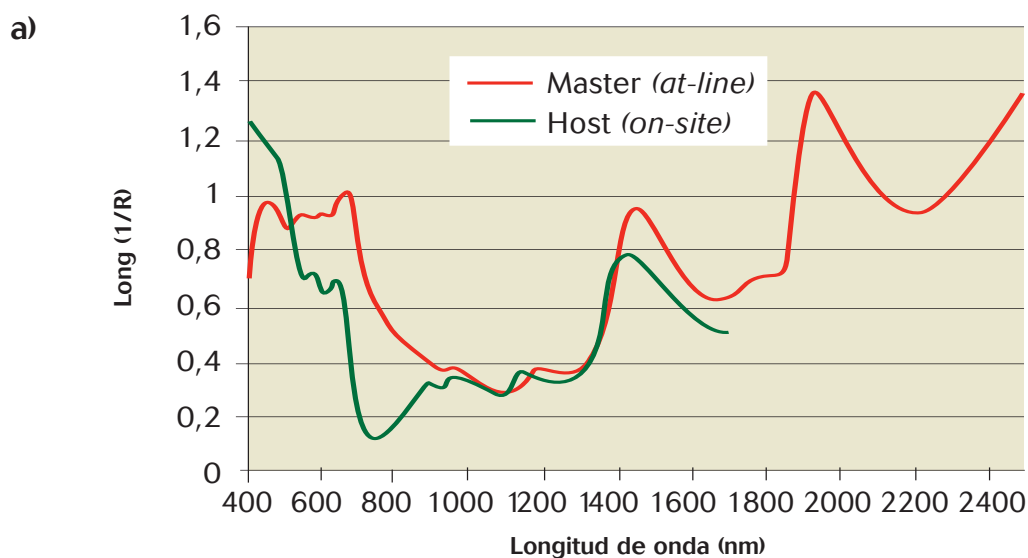
La evaluación de la capacidad predictiva de los modelos, se realizó utilizando un colectivo de validación externa de 12 muestras, y comparando estadísticamente los valores de referencia y los obtenidos con los espectros del equipo portátil estandarizados. Los resultados estadísticos no muestran diferencias significativas salvo en el caso del NNH₃ (P=0,05).

Parámetro	SEC	RSQ	SECV	1-VR
pH	0,282	0,77	0,316	0,72
MS (%)	2,158	0,92	2,844	0,89
NNH ₃ *	20,923	0,88	29,266	0,76
NSOL	0,052	0,87	0,068	0,78
LACT*	491	0,79	575	0,71
BUT*	231	0,80	275	0,72

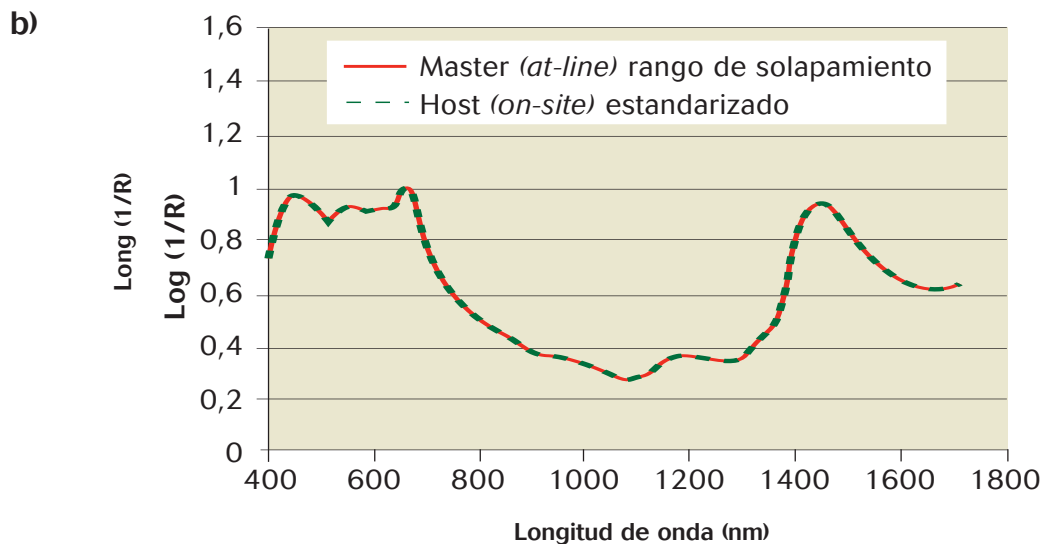


	Equipo <i>at-line</i>	Equipo <i>on-site</i>	
		Sin estandarización	Con estandarización
GH	1,55	79,36	4,93
NH	1,06	74,38	3,21

←
Tabla 5.-Estadísticos GH (distancia al centro poblacional) y NH (distancia vecinal) para la evaluación de la estandarización de los equipos.



←
Figura 4.-Espectro promedio del colectivo de validación externa en ambos equipamientos NIRS: a) espectros originales; b) espectros corregidos por el rango de solapamiento y estandarizados.



↙
Tabla 6.-Estadísticos del test de comparación de medias entre los valores de referencia y los predichos NIRS con el equipo portátil en el colectivo de validación externa de ensilados de hierba en fresco.
MS: Materia seca; NSOL: g NSOL: g Nitrógeno soluble /100ml de jugo; NNH₃: mg de Nitrógeno amoniacal/100ml de jugo; LACT: Ácido láctico; BUT: Ácido Butírico; *: g/100mL de jugo
P: Significación estadística; P>0,05 = No significativo (NS).

Parámetro	Referencia	Equipo <i>on-site</i>	P
pH	4,79	4,69	NS
MS (%)	31,26	32,84	NS
NNH ₃ *	136	173	0,05
NSOL	0,45	0,65	NS
LACT*	1397	1617	NS
BUT*	835	724	NS





Toma de espectros del
ensilado de maíz on-site.

Conclusiones

El presente trabajo ha demostrado que las bibliotecas de espectros recogidos en equipos *at-line* con muestra intacta, pueden ser transferidas a otros equipamientos NIRS portátiles, menos sensibles a cambios de temperatura y humedad, posibilitando su aplicabilidad para obtener información en tiempo real, sobre constituyentes nutricionales y fermentativos de los ensilados de hierba y maíz de forma intacta a pie de campo.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al INIA por la financiación de los proyectos INIA RTA2008-00113-C02 e INIA RTA2010-00128-00, ambos cofinanciados con fondos FEDER, así como al personal técnico del Laboratorio de Nutrición del SERIDA por su colaboración.

Referencias bibliográficas

DE LA ROZA-DELGADO, B.; MARTÍNEZ, A.; MODROÑO, S.; ARGAMENTERÍA, A. 2002. Measurements of metabolic parameters in lactating dairy cows with near infrared reflectance spectroscopy analysis using cattle faecal samples. In: Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference. NIR Publications. Chichester UK. pp. 371-374.

DE LA ROZA-DELGADO, B.; SOLDADO, A.; MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A.; VICENTE, F.; MODROÑO, S. 2006. NIRS as a tool to predict nutritive quality of raw Total Mixed Rations with silages incorporated. Sustainable Grassland Productivity Grassland Science in Europe, Eds.: J. Lloveras; A. González-Rodríguez; O. Vázquez Yáñez; J. Piñeiro; O. Santamaría; L. Olea and M. J. Poblaciones; ISBN.:84 689 6711 4. Artes Gráficas Marcipa (Badajoz), 11: 571-573.

MARTÍNEZ, A.; MARTÍNEZ, S.; FERRERO, I.; FERNÁNDEZ, O.; MODROÑO, S.; JIMENO, V.; SOLDADO, A.; PÉREZ-HUGALDE, C.; FUENTES-PILA, J.; DE LA ROZA-DELGADO, B. 2004. The potential of calibration transfer to quality control of undried Maize silage. Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of 11th International Conference on Near Spectroscopy. Eds. A.M.C. Davies y A. Garrido-Varo, UK. ISBN.:0 9528666 4 1. 285-290.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.; SOLDADO, A.; GONZÁLEZ, A.; MODROÑO, S. y DE LA ROZA-DELGADO, B. (2010a) Transferencia de ecuaciones NIRS desarrolladas en equipos de laboratorio (*at-line*) a equipos portátiles para el control de calidad en campo de ensilados de hierba. En: Calleja A. *et al.* (eds.) *Pastos: Fuente natural de energía*, pp161-167. Zamora, España: Sociedad Española para el Estudio de los Pastos.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A.; SOLDADO, A.; GONZÁLEZ, A.; VICENTE, F. y DE LA ROZA-DELGADO, B. (2010b) NIRS onsite vs. *at-line*: Transferability and robustness of chemometric models on fresh silages. En: *Proceedings of NIR on the GO IV Conference*. 53-55. Pádova, Italia.

SHENK, J. S. y WESTERHAUS, M. O. (1995) *Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Monograph, NIRSystems.

SOLDADO, A.; DE LA ROZA-DELGADO, B.; MARTÍNEZ, A.; MODROÑO, S.; VICENTE, F.; ARGAMENTERÍA, A. 2004. NIRS: a tool to predict ruminal degradability in feedstuffs. In: *Proceeding of 11th International Conference on Near Spectroscopy*. pp. 679-684. Ed: A. M. C. Davies and A. Garrido-Varo. NIR Publications. Chichester UK.

SOLDADO, A.; FEARN, T.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. y DE LA ROZA-DELGADO, B. (2013) The transfer of NIR calibrations for undried grass silage from the laboratory to on-site instruments: Comparison of two approaches, *Talanta*, 105, 8-14.

STUTH, J. W.; TOLLESON, D. R. 2000. *Monitoring the nutritional status of grazing animals using near infrared spectroscopy. Compendium on continuing* Ed. For the Pract. Vet. 22:S108-S115. ■