USO DE LA ESPECTROSCOPÍA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIR) PARA LA ESTIMACIÓN RÁPIDA DEL CARBONO ORGÁNICO Y LA RESPIRACIÓN BASAL EN SUELOS FORESTALES

César Guerrero Maestre, Raúl Zornoza Belmonte, Andrea Pérez Bejarano, Jorge Mataix-Solera, Ignacio Gómez Lucas y Fuensanta García-Orenes

GEA - Grupo de Edafología Ambiental. Dpto. de Agroquímica y Medio Ambiente. Universidad Miguel Hernández. Avda. del Ferrocarril, s/n. 03202-ELCHE (Alicante, España). Correo electrónico: cesar.guerrero@umh.es

Resumen

Existe un renovado interés en los estudios sobre el papel de los suelos forestales en el ciclo del carbono. En esos estudios es habitual analizar el carbono orgánico edáfico en un elevado número de muestras. Los métodos estándar disponibles para llevar a cabo esta analítica son lentos y en algunos casos caros. Por ello, disponer de técnicas rápidas, sencillas, no destructivas, que no empleen reactivos químicos y que sean baratas, es de gran interés. En este sentido, la espectroscopia por reflectancia en el infrarrojo cercano o NIR (*near infrared*), cumple con esas características. En la región espectral del NIR, la radiación es absorbida por la presencia de enlaces químicos tales como C-H, N-H, S-H, C=O y O-H de los compuestos (principalmente orgánicos) de la muestra. Como consecuencia, un espectro NIR contiene información sobre la composición química. Las relaciones entre dato real y estimado por NIR (r^2) fueron de 0,97 y 0,90 para carbono orgánico y respiración edáfica basal, respectivamente (usando más de 500 suelos). En muestras secas y tamizadas, en menos de 1 minuto se obtiene el espectro NIR, y con el mismo espectro se estiman ambos parámetros directamente, permitiendo procesar fácilmente entre 150 y 200 muestras por día.

Palabras clave: *Reflectancia difusa, Near-infrared, Quimiometría, Regresión PLS, Espectro*

INTRODUCCIÓN

Existe un renovado interés en los estudios sobre los suelos forestales, especialmente por su relevancia en el ciclo del carbono. Muchos de ellos se centran en la materia orgánica edáfica y su dinámica. Desde otros puntos de vista, sobre todo los relacionados con la calidad edáfica, los estudios que cuantifican la materia orgánica edáfica y los parámetros relacionados con su dinámica son de gran interés debido a que la materia orgánica influye directamente en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.

Existen varios métodos clásicos para analizar cuantitativamente la materia orgánica edáfica, algunos de ellos directos, y otros indirectos en los que la materia orgánica se estima tras medir carbono orgánico. Entre los más usados están los métodos gravimétricos, en los que la pérdida de peso por ignición (>450ºC) se relaciona con el contenido orgánico, método que puede ser poco preciso para determinados suelos. frecuentemen-

ISSN: 1575-2410

© 2008 Sociedad Española de Ciencias Forestales

te También se usan métodos de una oxidación química (caros, lentos y que emplean y generan sustancias peligrosas), en los que se suele medir carbono orgánico oxidable (WALKLEY & BLACK, 1934). El carbono orgánico total también se puede analizar usando analizadores elementales, tras eliminar el carbono inorgánico de la muestra, lo que lo convierte en algunos casos en un método poco accesible para muchos laboratorios, siendo laborioso, lento y caro (SANTI et *al*., 2006).

La determinación de la tasa de respiración edáfica basal es otro parámetro de indudable valor, ya que es un parámetro indicativo de la degradabilidad de la materia orgánica y de la actividad microbiana (principalmente la heterótrofa). Para su determinación se necesitan varios días de incubación, y los análisis son laboriosos si se usan las típicas trampas de álcali, o caros si se emplean cromatógrafos o respirómetros.

La espectroscopia de reflectancia difusa en el infrarrojo cercano, más conocida como NIR (del inglés "*near infrared*"), ofrece interesantes ventajas sobre estos otros métodos analíticos. Se trata de una técnica no destructiva, en la que en menos de un minuto se obtiene el espectro de la muestra. Cabe decir que el pre-tratamiento que se ha de efectuar en las muestras de suelo es mínimo, bastando un secado al aire seguido de un tamizado. En la región espectral del NIR la radiación es absorbida diferencialmente por enlaces químicos tales como C-H, N-H, S-H, C=O y O-H de las moléculas de la muestra. Este tipo de enlaces los encontraremos mayoritariamente en las moléculas orgánicas, pero también en algunas inorgánicas (VISCARRA-ROSSEL et *al*., 2006). Como consecuencia, un espectro NIR contiene información sobre la composición química. Debido a que algunas bandas de absorción son muy anchas, pudiendo ocultar parcialmente unas a otras, los espectros NIR no son directamente interpretables, quedando la información solapada. Pero gracias al reciente desarrollo de la capacidad de computación de los ordenadores, esa información puede ser extraída con relativa facilidad usando sofisticados métodos estadísticos conocidos con el nombre de quimiométricos, los cuales también se han desarrollado ampliamente en los últimos años. Para poder llevar a cabo esa extracción de la información, es necesario crear modelos en los que la respuesta espectral se calibre usando muestras donde se conoce la concentración del analito o analitos de interés (BLANCO & VILLARROYA, 2002).

El objetivo de este trabajo es estudiar el potencial de la espectroscopia de reflectancia difusa en el infrarrojo cercano (NIR) como método de análisis rápido, preciso, barato y limpio para el análisis del carbono orgánico y la respiración edáfica basal de suelos forestales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Suelos

En este trabajo se trabajaron con varios conjuntos de muestras de suelos forestales procedentes de 13 zonas de la provincia de Alicante. Los suelos comprenden *calcixeroles, haploxeroles, torriorthents* y *xerorthents*. De las 526 muestras, unas 30 muestras procedían de suelos agrícolas, y otras 30 de suelos agrícolas abandonados. Todas las muestras fueron secadas al aire durante dos semanas aproximadamente, y tamizadas (<2mm). Posteriormente, se analizó el carbono orgánico, la respiración edáfica basal y se obtuvieron sus espectros NIR.

Análisis clásicos

El carbono orgánico fue analizado usando dicromato potásico como oxidante (WALKLEY & BLACK, 1934). La respiración edáfica basal se calculó usando las tasas de respiración comprendidas entre el tercer y quinto día después de rehumedecer las muestras de suelo al 50% de su capacidad de campo (incubadas a 25ºC). Para ello se usó un respirómetro Micro-Oxymax (Columbus, USA), el cual medía la concentración de CO_2 liberado a diferentes intervalos de tiempo.

Obtención de los espectros NIR

Para la obtención de un espectro NIR, aproximadamente 50 gramos del suelo seco y tamizado (<2mm) fueron colocados en placas Petri de vidrio, y se escanearon (reflectancia difusa) entre los 12.000 y los 3.800 cm^{-1} (equivalente a 830 y 2.630 nm) usando un espectrofotómetro FT-NIR (Fourier-Transform NIR, MPA, Bruker Optik GmbH, Alemania). Este aparato está equipado con una serie de accesorios que permiten el escaneado de grandes superficies de muestra. En

cada uno de los escaneos se obtiene un espectro que es promedio de 64. Cada muestra fue escaneada dos veces, y sus espectros promediados de nuevo. La resolución espectral usada fue de 8 cm^{-1}, resultando en espectros formados por más de 2.000 datos de absorbancia (obtenida a partir de la reflectancia). Con posterioridad, estos espectros fueron transformados automáticamente desde número de onda (cm^{-1}) a longitud de onda (nm), obteniendo nuevos espectros con 1.000 datos de absorbancia ente los 830 y los 2.630 nm. El tiempo empleado para cada una de las muestras es aproximadamente de 1 minuto, no siendo necesario el empleo de ningún reactivo químico.

Construcción de los modelos

Para la construcción de los modelos se usó la siguiente estructura general:

$$Y = b \cdot X \quad [1]$$

en donde Y (variable dependiente) es el parámetro a estimar (carbono orgánico o respiración edáfica basal), b es una función de calibración y X (variables independientes) es la información espectral contenida en los espectros NIR. Los dos modelos definidos fueron:

$$\text{Carbono orgánico} = b_{co} \cdot \text{NIR} \quad [2]$$

$$\text{Respiración edáfica basal} = b_{reb} \cdot \text{NIR} \quad [3]$$

Para ello se definieron previamente tres matrices:

- La primera matriz fue la matriz con los datos espectrales NIR. Esta matriz tenía las siguientes dimensiones: 526 filas (una por muestra) y 1000 columnas (una para cada uno de los 1000 datos de absorbancia que hay entre 830 y 2.630 nm). Esta matriz es el término X en las ecuaciones [1], [2] y [3].
- La segunda matriz está compuesta por 526 filas (una por muestra), y una columna (con el dato de carbono orgánico). Esta matriz es el término Y en las ecuaciones [1] y [2].
- La tercera matriz está compuesta por 526 filas (una por muestra), y una columna (con el dato de respiración edáfica basal). Esta matriz es el término Y en las ecuaciones [1] y [3].

Para la construcción de los modelos, es decir, la obtención empírica de las funciones de calibración b_{co} (para el carbono orgánico) y b_{reb} (para la respiración edáfica basal) que relacionan la información espectral (NIR) con los parámetros de interés (carbono orgánico y respiración edáfica basal) se usaron regresiones múltiples PLS (*partial least squares*). Las regresiones PLS son usadas frecuentemente como método quimiométrico en el análisis con NIR (McCarty et *al*., 2002; Viscarra-Rossel et *al*., 2006). En la regresión PLS la matriz NIR se reduce a unos cuantos componentes (vectores PLS), de manera similar a un análisis de componentes principales, pero durante la extracción de los componentes vectores PLS, el dato de la variable independiente es tenido en cuenta. El número de vectores PLS que se incluyen en la regresión determinan el rango del modelo. Los primeros vectores PLS son los que mayor información aportan para la estimación del parámetro. En términos generales se prefieren modelos con poco rango, ya que usar muchos vectores PLS aumenta la probabilidad de incluir ruido al modelo. La regresión PLS es especialmente útil para trabajar con datos que muestran colinealidad (Blanco & Villaroya, 2006). Durante la construcción de los modelos se evaluaron diferentes pre-procesamientos de los espectros, tales como primeras y segundas derivadas, correcciones en la línea base del espectro, normalización del vector, normalización de máximos y mínimos, etc. Estos pre-procesamientos son los típicos en quimiometría con datos espectrales, y su intención en reducir interferencias ópticas en los espectros que no están relacionadas con la composición química de la muestra. En algunos casos, un tamaño de partícula diferente, o una diferente densidad, lleva a interferencias ópticas no deseadas. Por ejemplo, las derivadas incrementan la resolución de los picos espectrales (Figura 1). En otros casos se busca eliminar la "altura", y para usar sólo la "forma" del espectro (por ejemplo la normalización de máximos y mínimos). Durante la modelización se construyeron más de 1.000 modelos, ya que se evaluaron los diferentes pre-procesamientos citados, así como combinaciones de ellos. Todas estas operaciones se realizaron automáticamente usando el programa OPUS 5.5 (Bruker Optik GmbH, 2004), diseñado para el análisis quimiométrico de datos espectrales. Los datos de carbono orgánico y respiración edáfica basal también fueron pre-tratados, con el fin de mejorar su semejanza a una distribución normal.

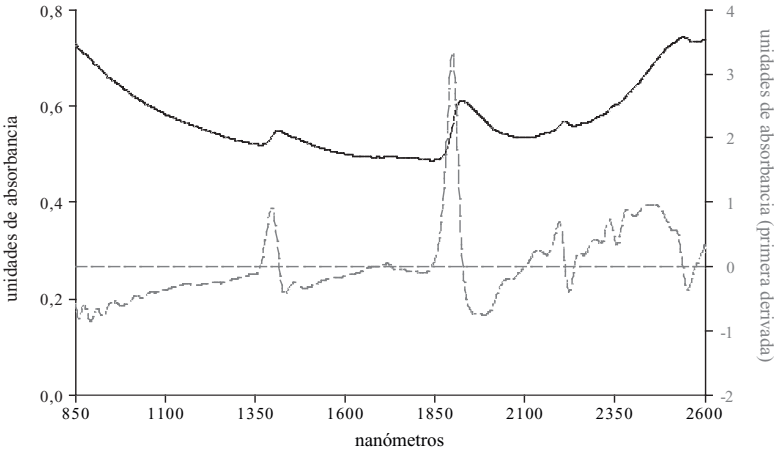

***Figura 1**. Espectro NIR típico de un suelo (en negro; línea continua) y primera derivada del espectro (en gris; línea discontinua), tratamiento que acentúa los picos de absorción, además de eliminar ciertos efectos en la línea base del espectro*

El método usado para la construcción de los modelos fue el de "test set validation". En este método se divide la población de muestras (n = 526) en dos conjuntos (o sets), uno con el que se calibra y otro con el que se valida. Un 50% de las muestras fue usado para la calibración (n = 263), quedando el otro 50% para la validación del modelo (n = 263). Los modelos que finalmente fueron seleccionados eran aquellos que tenían los valores de r^2 más altos, bajos valores de RMSEE ("*root mean standard error of estimation*"), y que además tenían rangos pequeños. Se calculó el RPD, que es una ratio entre la desviación estándar de los datos y el RMSEE del modelo, y que suele servir para clasificar la calidad de los modelos. Cuando los valores del RPD son menores de 2 no se pueden usar los modelos para hacer predicciones. Cuando este valor está entre 2 y 2,5 las predicciones serán aproximadas. Si el RPD está entre 2,5 y 3, las predicciones serán consideradas como buenas, y para valores mayores de 3, serán consideran excelentes.

RESULTADOS

Se han obtenido varios modelos adecuados para estimar el carbono orgánico edáfico usando NIR. El mejor modelo obtenido muestra valores de r^2 mayores de 0,97 (Figura 2). Durante la fase de calibración, 5 muestras quedaron identificadas como "*outliers*", y sólo 3 durante la validación. Previamente, los datos de carbono orgánico fueron transformados (elevándolos a 0,4) para mejorar su semejanza a una distribución normal. En este modelo se utilizaron espectros pre-tratados con la primera derivada y un método de corrección de la dispersión ("*multiplicative scattering correction*"). El RPD obtenido en la validación fue mayor de 6. También se han obtenido varios modelos adecuados para estimar la respiración edáfica basal usando NIR. El mejor modelo obtenido muestra valores de r^2 mayores de 0,90 (Figura 2). El número de "*outliers*" observado es igual que en el caso anterior. Previamente, los datos de respiración edáfica basal fueron transformados (elevándolos a 0,25) para mejorar su semejanza a una distribución normal. En este caso, los mejores resultados se obtuvieron con espectros pre-tratados con la primera derivada junto con una opción de corrección de la línea base del espectro ("*straight line subtraction*"). El RPD en la validación fue mayor de 3,5. Tanto para este modelo como para el del carbono orgánico, el rango fue de 12.

DISCUSIÓN

Los altísimos valores de r^2 y de RPD obtenidos en las validaciones muestran la alta precisión del NIR como técnica para estimar el

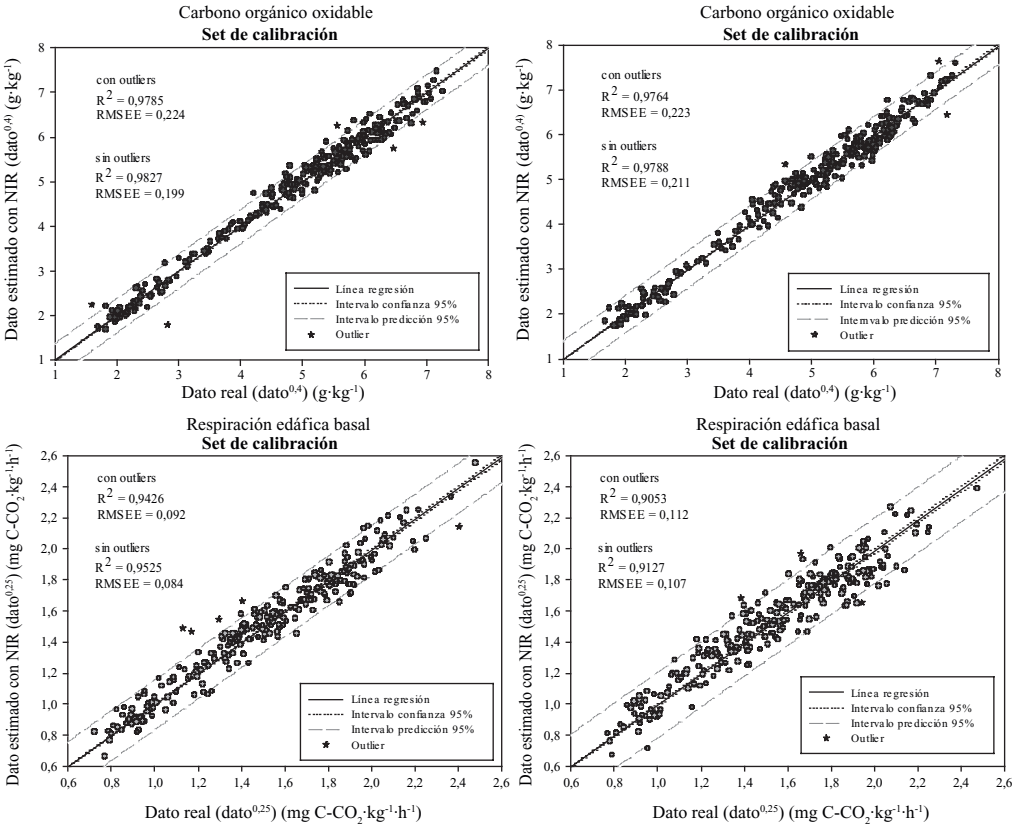

***Figura 2**. Relaciones entre los datos reales (usando métodos clásicos) y los estimados con NIR. Gráficos superiores: carbono orgánico. Gráficos inferiores: respiración edáfica basal. En ambos casos en la figura izquierda se muestran las calibraciones (con el 50% de las muestras; n=263), y en la derecha las validaciones (con el otro 50%, n=263)*

carbono orgánico y la respiración edáfica basal. Otros autores también han observado altas correlaciones entre los espectros NIR de los suelos y su contenido en carbono orgánico (McCarty et *al*., 2002; Viscarra-Rossel et *al*., 2006), siendo lógico debido al tipo de moléculas que son cuantificables por ambos métodos (NIR y oxidación química con dicromato). En el caso de la respiración edáfica inciden más factores, y quizás por ello las relaciones entre métodos (respirómetro y NIR) son algo menores. Debemos de tener en cuenta que la cantidad de CO_2 liberado de una muestra durante un periodo de tiempo, y que cuantificamos como respiración edáfica basal, no se corresponderá solamente con los compuestos orgánicos pertenecientes a una fracción potencialmente mineralizable, que son los que a *priori* el NIR será sensible. Existen procesos bióticos y abióticos en los que la producción de CO_2 no sólo se debe a la degradación microbiana de esos compuestos potencialmente mineralizables. Determinados aspectos relacionados con la fisiología de los microorganismos edáficos influirán en una mayor o menor tasa de respiración (por ejemplo, eficiencia en la asimilación del carbono). A pesar de ello, la alta correlación observada sugiere que las tasas de respiración vendrán dadas principalmente por características de la materia orgánica edáfica, algo a lo que un espectro NIR será muy sensible. De este modo, la espectroscopia de reflectancia difusa en el infrarrojo cercano (NIR) se muestra como una técnica útil para abordar estudios en donde se deba cuantificar sustancias que conten-

gan moléculas con enlaces C-H, N-H, S-H, C=O y O-H, ya que éstas absorben notablemente la radiación en esta región del espectro electromagnético (VISCARRA-ROSSEL et *al.*, 2006). Para poder usar esta técnica como una herramienta predictiva, es necesario desarrollar previamente modelos para cada uno de los parámetros deseados (BLANCO & VILLAROYA, 2006). Tras esta fase de calibración (y validación), esta técnica muestra numerosas ventajas frente a otras, sobre todo en aquellas situaciones en donde se deban analizar cientos o miles de muestras. Para ello, se deben de analizar los parámetros en un conjunto de muestras, obtener sus espectros, y buscar la ecuación o modelo que relacione la información espectral con aquella a calibrar. Los modelos o ecuaciones deben validarse con otro conjunto (o set) de muestras en donde se disponga tanto de sus espectros como del dato analítico a estimar, con el fin de verificar que el modelo funciona correctamente. Tras esta fase de calibración (y validación), esta técnica muestra numerosas ventajas frente a otras, sobre todo en aquellas situaciones en donde se deban analizar cientos o miles de muestras. El pretratamiento que es necesario realizar en las muestras de suelo para obtener su espectro NIR es mínimo (secado al aire y tamizado a < 2mm). El tiempo empleado para la obtención del espectro es menor de 1 minuto, no empleando reactivos químicos. Una vez tenemos el espectro de una muestra, en él podremos estimar simultáneamente los parámetros calibrados (en este caso carbono orgánico y respiración basal). Por ello, podemos decir que esta técnica es rápida, precisa, sencilla, barata y limpia. Debemos tener en cuenta que, además, para algunos parámetros, esta técnica es más sensible que la técnica clásica o de referencia (SHEPHERD & WALSH, 2006). Es interesante destacar que existen determinados índices estadísticos, como la distancia de Mahalanobis, que nos pueden alertar sobre la aplicabilidad o no de un modelo a una muestra nueva. En este sentido, cuando las muestras usadas para la construcción del modelo sean muy diferentes de aquellas a las que se les va a aplicar el modelo, se aconseja recalibrar los modelos incluyendo en ellos entre un 5-10% de las muestras nuevas (SHEPHERD & WALSH, 2002). Ello evidentemente implica analizar con el método clásico o de referencia ese conjunto de muestras (5-10%), pero puede mejorar sensiblemente la precisión de las estimaciones. Cuanto mayor sea la heterogeneidad que engloben los modelos, mayor aplicabilidad directa tendrán.

BIBLIOGRAFÍA

BLANCO, M. & VILLARROYA, I.; 2002. NIR spectroscopy: a rapid-response analitycal tool. *Trac-Trend Anal. Chem.* 21: 240-250.

MCCARTY, G.W.; REEVES III, J.B.; REEVES, V.B.; FOLLET, R.F. & KIMBLE, J.M.; 2002. Mid-infrared and near-infrared diffuse reflectance spectroscopy for soil carbon measurement. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66: 640–646.

SANTI, C. CERTINI, G. & DÁCQUI, L.P.; 2006. Direct determination of organic carbon measurement. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66: 640-646.

SHEPHERD, K.D. & WALSH, M.G.; 2002. Development of reflectance spectral libraries fpr characterization of soil properties. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66: 988-998.

SHEPHERD, K.D. & WALSH, M.G.; 2006. Diffuse reflectance spectroscopy for rapid soil analysis. *In*: R. Lal (ed.), *Encyclopedia of soil science*: 480-484. Taylor & Francis. Boca Raton.

VISCARRA ROSSEL, R.A.; WALVOORT, D.J.J.; MCBRATNEY, A.B.; JANIK, L.J. & SKJEMSTAD, J.O.; 2006. Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties. *Geoderma* 131: 59–75.

WALKLEY, A. & BLACK, I.A.; 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil O.M. and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29–38.