

Seosnurmen apilapitoisuuden määrittäminen NIRS-analysaattorilla kuivatusta näytteestä

Arja Nykänen¹⁾, Outi Kurri²⁾ ja Jukka Kemppainen³⁾

¹⁾ MTT, 51900 Juva, arja.nykanen@mtt.fi

²⁾ MTT, 31600 Jokioinen, outi.kurri@mtt.fi

³⁾ MTT, 88600 Sotkamo, jukka.kemppainen@mtt.fi

Tiivistelmä

Eri kasveja sisältävien seosnurmiensa viljelyssä ja varsinkin tutkimuksessa on tärkeää tietää eri kasvilajien osuus kasvustossa. Eri kasveilla on erilaiset ominaisuudet ja niiden osuutta kasvustoissa halutaan usein säätää. Nurmissa yleinen seos on apila-heinäseos. Tähän saakka apilan osuus on määritetty joko silmämääräisenä arviona koeruudulta tai käsin erottelemalla satonäytteestä. Nämä menetelmät ovat kuitenkin joko epätarkkoja ja subjektiivisia tai hyvin työläitä ja siis kalliita.

NIRS (Near Infrared reflectance Spectroscopy) on analysaattori, joka pystyy mittaamaan lähes mitä tahansa, kunhan sille saadaan kehitettyä tarpeeksi hyvä kalibrointi. NIRS mittaa näytteen pintaan absorboituneen ja näytteen pinnasta detektoreille heijastuneen lähi-infrapunavalon suhteellisen intensiteetin eri aallonpituuksilla. Analysaattorin etuna on mm., että näyte ei tarvitse muuta esivalmistelua kuin kuivatuksen ja jauhamisen, näytettä ei käsitellä kemiallisilla aineilla, analyysi on nopea ja helppo. Ulkomailla analysaattoria on käytetty menestyksekkäästi seosnurminäytteiden palkokasvipitoisuuden määrittämiseen. Tämän tutkimuksen tavoitteena on kehittää myös Suomeen MTT:lle toimiva kalibrointi seosnurminäytteen apilapitoisuuden määrittämiseen. Ensimmäinen kalibraatio on nyt valmis ja sitä verrataan nyt viiteen Saksassa tehtyyn kalibraatioon.

Kokeessa oli mukana 4 aiemmin raportoitua saksalaiseen aineistoon perustuvaa kalibraatiota, yksi suomalaisen näytemateriaaliin perustuva saksassa tehty kalibraatio sekä nyt Suomessa tehty suomalaisen materiaaliin perustuva kalibraatio. Kalibrointien näytemateriaali, kalibroinnin muodostaminen sekä NIRS-analysaattori olivat erilaisia, mutta kaikissa käytettiin kalibraatiosuoran validointiin PLS regressiota, jotta saatiin kehitettyä kalibraatiot, jotka perustuvat koko mitattuun valon spektriin. Näytemateriaaleina oli puna- ja valkoapilaa, sinimailasta ja erilaisia heiniä. Osassa kalibraatioita käytettiin vain puhtaita heinä- ja palkokasvinäytteitä, osassa oli vain seoksia ja osassa sekä puhtaita näytteitä että seoksia. Seokset oli joko tehty käsin puhtaista näytteistä sekoittamalla tai ns. luonnollisia näytteitä, joiden apilapitoisuus oli määritetty osanäytteestä. Kaikissa muissa paitsi Saksassa tehdyssä suomalaisen materiaaliin perustuvassa kalibraatiossa oli näytteitä 150-850 kpl. Kalibraatiot validoitiin tunnettuun palkokasvipitoisuuteen perustuvilla näytteillä.

Kaikki tässä vertailut kalibraatiot osoittautuivat käyttökelpoisiksi kalibraatioiksi. Hyvällä kalibraatiolla voidaan päästä $\pm 5\%$ tarkkuuteen, mikä on erittäin hyvä tulos. Käsin lajittelussakin voi kasveja mennä vääriin fraktioihin. Kalibraatio on sitä parempi, mitä laajempi näytepohja ja validointisarja sillä on. Suomessa kehitettyä kalibraatiota kehitetään jatkossa tältä pohjalta.

Avainsanat: nurmi, apilapitoisuus, puna-apila, NIRS

Johdanto

Seosnurmien, Suomessa tyypillisesti puna-apilan (*Trifolium pratense*) ja heinien seokset, viljelyssä on tärkeää tietää niiden apilapitoisuus, koska apilan määrällä on merkitystä sekä karjan ruokinnassa että esimerkiksi tilan typpitaseiden laskennassa. Nurmen apilapitoisuuden perusteella voi arvioida myös nurmen lannoitusvaikutusta seuraavalle kasville. Apilapitoisten nurmien tutkimuksessa nurminäytteen apilapitoisuuden tunteminen on ensisijaisen tärkeää. Ruuduilta kerättyjen näytteiden lajittelu käsin eri kasvifraktioihin on työlästä ja aikaa vievää eli siis myös kallista. Nopeaa ja luotettavaa menetelmää tarvitaan.

NIRS (Near Infrared Reflectance Spectroscopy) on lähi-infrapunaspektroskopiaan perustuva menetelmä, jonka tärkeimmät edut ovat määrittysten nopeus, näytteiden esikäsitteilyä ei tarvita, ei kemikaaleja, soveltuu prosessiolosuhteisiin (on line- mittaukset), monta parametria samalla mittauksella ja stabiilit laitteet. Infrapuna-spektroskopia otettiin ensimmäiseksi käyttöön viljan analysoinnissa jo noin 30 vuotta sitten. NIRS mittaa näytteen pintaan absorboituneen ja näytteen pinnasta detektoreille heijastuneen lähi-infrapuna-avalon suhteellisen intensiteetin eri aallonpituuksilla (yleensä 1 100 - 2 500 nm). Absorboituneen valon %-osuus vaihtelee aallonpituuden, näytteen kemiallisen ja fysikaalisen rakenteen mukaan. Tästä osuudesta laite laskee näytteen ainesosakoostumuksen. Sopivien kalibrointien jälkeen voidaan eri aineosat analysoida näytteestä samanaikaisesti.

Useissa tutkimuksissa on todettu, että NIRS -analysointilaitteilla pystytään määrittämään seosnurminäytteestä sen palkokasvipitoisuus (Petersen et al., 1987, Coleman et al., 1990, Wachendorf et al., 1999, ja Locher et al., 2005a, 2005b). Näissä tutkimuksissa käytettiin kussakin erilaisia kalibrointitapoja ja erilaisia kasveja.

Tässä esityksessä vertaillaan viittä erilaista NIRS-kalibraatiota kuivatun ja jauhetun seosnurminäytteen apilapitoisuuden määrittämiseksi. Suomalaisen kalibraation kehittäminen kuuluu MMM:n rahoittaman Luomututkimusohjelman 2003-2005 projektiin 'Puna-apila tehokkaasti luomumaidoksi'.

Aineisto ja menetelmät

Näyttemateriaali kalibraatioissa

Syksyllä 2003 verrattiin erilaisia kalibrointeja nurminäytteiden apilapitoisuuden määrittämiseksi Münchenin teknillisessä yliopistossa ja Christian-Albrechts yliopistossa Kielissä. Kaikki kalibroinnit testattiin suomalaisesta näyttemateriaalista tehdyillä 10 seosnäytteellä, joissa apila ja heinä oli sekoitettu käsin punnitsemalla tietyn apilapitoisuuden mukaisiksi seoksiksi kuivatuista ja jauhetuista puhtaista heinä- ja apilänäytteistä. Näytteet oli kerätty vuonna 2003 kahdeksalta eri peltolohkolta, jotka olivat joko tavanomaisesti tai luonnonmukaisesti viljeltyjä. Näytteet olivat joko ensimmäisen tai toisen niiton sadosta.

Kokeessa oli mukana 4 aiemmin raportoitua saksalaiseen aineistoon perustuvaa kalibraatiota (Wachendorf et al., 1999, Locher et al., 2005a, 2005b) (Taulukko1). Kalibrointien näyttemateriaali, kalibroinnin muodostaminen sekä NIRS-analysointilaitteet olivat erilaisia, mutta kaikissa käytettiin kalibraatiosuoran validointiin PLS regressiota, jotta saatiin kehitettyä kalibraatiot, jotka perustuivat koko mitattuun valon spektriin. Kalibraatiossa K oli materiaalina 282 luonnollista puna-apilaraiheinänäytettä, jotka oli niitetty viikon välein eri tavoin lannoitetuilta koeruuduilta yhtenä vuonna. Todellinen apilapitoisuus määritettiin vierekkäisestä osänäytteestä käsin lajittelemalla. Locher et al (2005a, 2005b) kehittivät 3 erilaista kalibraatiota (M1-M3) käsin lajitelluista monikasviseoksista, joissa oli puna-apilaa, sinimailasta ja heiniä. Näytteet oli kerätty 1999-2002 useilta eri luomutilalta Baijerissa, Saksassa. Kalibraatiossa M1 oli 334 puhdasta palkokasvi- ja heinänäytettä yhdeltä tilalta. Kalibraatio M2 sisälsi edellisen materiaalin lisäksi samalta tilalta kerätyt ja käsin tehdyt 63 seosnäytettä. Tähän näyteaineistoon lisättiin vielä 120 puhdasta palkokasvi- ja heinänäytettä erilaisilta pelloilta kalibraation M3 muodostamiseksi.

Edellisten lisäksi tehtiin Münchenissä Suomesta kerätyistä näytteistä kalibraatio (F1), joka koostui 17 puhtaasta heinänäytteestä ja 17 puhtaasta puna-apilänäytteestä (Taulukko 1), jotka oli kerätty samoin kuin vertailuaineistona käytetty näyttemateriaali.

Suomessa aloitettiin tänä vuonna oman kalibraation kehittäminen MTT:n Kemian laboratorion NIRS-analysointilaitteella. Kalibraation (F2) aineisto koostuu tällä hetkellä 74 heinänäytteestä, 54 puna-

apilanäytteestä sekä käsin tehdyistä 28 seoksesta. Näytteet on kerätty 2003-2004 neljältä eri paikkakunnalta kahdesta niitosta. (Taulukko 1).

Taulukko 1. Vertailussa käytettyjen kalibraatioiden näytemateriaali.

Kalibraatio	Viite	Kalibraationäytteet
K	Wachendorf et al 1999	282 luonnollista puna-apila- ja heinäseosta, lannoituskokeelta
M1	Locher et al 2005a	334 heinä- ja palkokasvinäytettä yhdeltä tilalta
M2	Locher et al 2005a	M1 + 63 käsin tehtyä seosta heinistä ja palkokasveista, yhdeltä tilalta
M3	Locher et al 2005b	M2 + 120 palkokasvi- ja heinänäytettä, kerätty erilaisilta pelloilta
F1		17 heinä- ja 17 puna-apilanäytettä Suomesta
F2		74 heinä- ja 54 puna-apilanäytettä ja 28 käsin tehtyä seosta Suomesta

NIRS analysaattorit

Kalibroinnin K analysaattori oli monokromaattori (FOSS, USA). Kalibraatiot M1-M3 ja F1 mitattiin ja validoitiin FT-NIRillä (Vector, BRUKER, Ettlingen, Saksa). Suomessa tehty kalibraatio F2 tehtiin InfraAnalyzer 500:lla (BRAN+LUEBBE GmbH, Saksa). Validointi tehtiin kaikissa kalibraatioissa PLS regressiolla, joka laskettiin ohjelmistoilla ISI (Kiel), OPUS (Munich) ja Sesame 3.1 (Suomi).

Tulokset ja tulosten tarkastelu

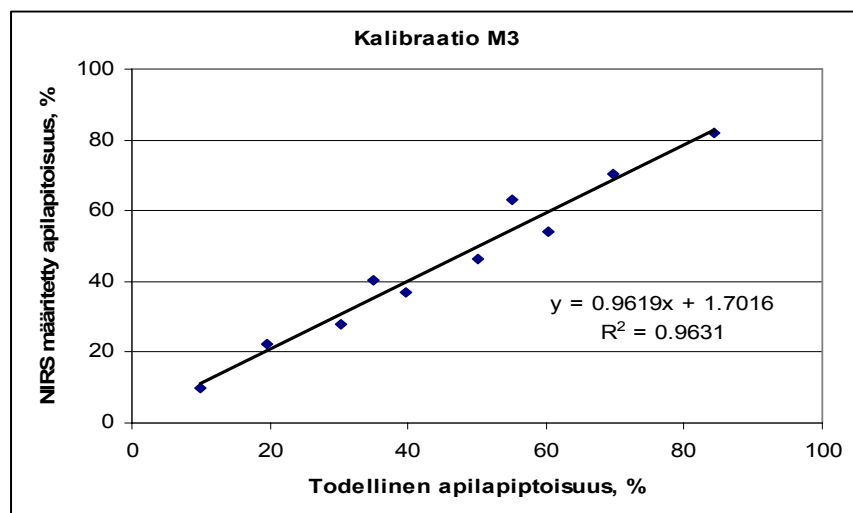
Kaikki testatut kalibroinnit toimivat hyvin, vaikka kalibraatioiden alkuperä on hyvinkin erilainen. Taulukkoon 1 on koottu erilaisia virhetermejä kuvaamaan kalibrointien tarkkuutta. RMSEP (Root mean square error of prediction) ja SEP (Standard error of prediction) kuvaavat testinäytteiden määrittämisvirhettä, kun taas RMSECV (Root mean square error of cross-validation) kuvaa kalibraation ristiin validoinnin virhettä. Bias on ennustettujen ja referenssiominaisuusarvojen välillä oleva keskimääräinen ero. Kalibroinnin F1 tulos on myös hyvä, vaikka se perustuu erittäin pieneen näytemäärään. Tämä johtunee siitä, että testiseokset oli tehty kalibroinnissa käytetyistä näytteistä.

Taulukko 2. NIRS-kalibraatioiden vertailu seosnurminäytteiden apilapitoisuuden määrittämisessä. (RMSECV =Root mean square error of cross-validation, SEP =Standard error of prediction, RMSEP = Root mean square error of prediction)

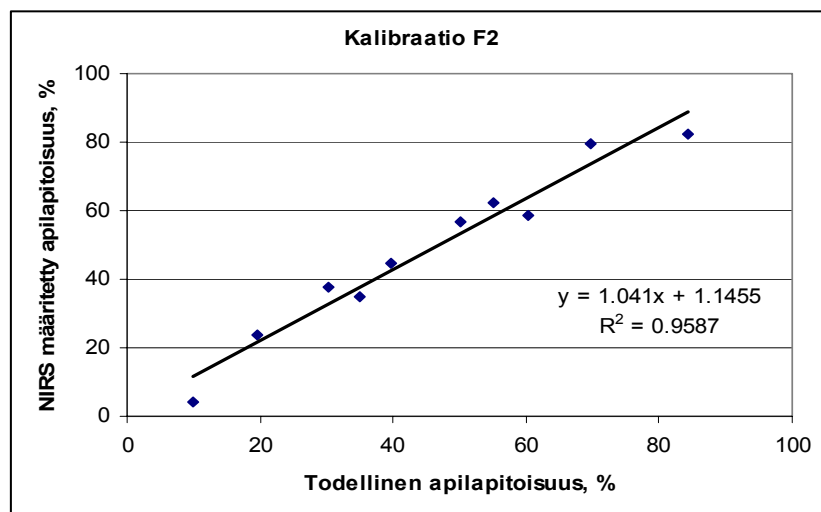
Julkaistun kalibroinnin viite	nimi	RMSECV	SEP	bias	RMSEP
		----- % apilapitoisuus -----			
Wachendorf et al. 1999	K		6.5	0.4	6.5
Locher et al. 2005a	M1	2.3	5.2	-2.0	5.6
Locher et al. 2005a	M2	2.5	5.0	1.6	5.3
Locher et al. 2005b	M3	3.7	4.4	-0.5	4.4
	F1	2.5	4.8	-6.8	8.3
	F2		6.8		6.0

Kalibrointien toimivuus validoitiin testinäytteillä, joita ei oltu käytetty itse kalibraatiossa. Kaikki kalibraatiot ennustivat näytteiden apilapitoisuuden erittäin hyvin. Korrelaatiokeroin oli 0,96 parhailla kalibraatioilla M3 ja F2 (Kuvat 1 ja 2), mikä on erittäin hyvä tulos. Kalibraatio toimii sitä paremmin, mitä laajempi sen muodostamisessa ja validoinnissa käytetty aineisto on. Eli näytteitä täytyy kerätä useamman vuoden ajan erilaisilta pelloilta erilaisina kasvuaikoina. Kalibroinneilla voidaan päästä $\pm 5\%$ tarkkuuteen, jolloin muut virhelähteet näytteiden otossa ja käsittelyssä voivat aiheuttaa jopa suuremman virheen.

NIRS on siis hyvä menetelmä kuivatun ja jauhetun seosnurminäytteen apilapitoisuuden analysoimiseen. Koeruutujen niittokoneisiin on jo saatavissa lisälaitteena satozilppuri, joka ottaa näytteen sadosta tietyn määräjain ja tämä näyte voidaan käsitellä kuten mikä tahansa kemiallinen näyte ilman käsin erottelua eri kasveihin. Erottelua tarvitaan ainoastaan siinä tapauksessa, kun apilasta ja heinästä halutaan tehdä kasvikohtaisia analyysejä.



Kuva 1. NIRS -kalibraation M3 ennustamat arvot testinäytteiden apilapitoisuuksille.



Kuva 2. NIRS -kalibraation F2 ennustamat arvot testinäytteiden apilapitoisuuksille.

Johtopäätökset

Kaikki tässä esitetyt kalibraatiot osoittautuivat hyviksi ennustamaan kuivatun ja jauhetun seosnurmi-näytteen apilapitoisuutta. Hyvä kalibraatio voi päästä jopa $\pm 5\%$ tarkkuuteen, mikä on oikein hyvä tarkkuus, kun otetaan huomioon muut virhelähteet. Kalibraatio on sitä parempi, mitä laajempi näytepohja ja validointisarja sillä on. Suomessa kehitettyä kalibraatiota kehitetään jatkossa tältä pohjalta.

Kirjallisuus

- Coleman, S.W., Christiansen, J.S. & Shenk, J.S.** 1990. Prediction of Botanical Composition using NIRS Calibrations Developed from Botanically Pure Samples. *Crop Science*. 30: 202-207.
- Locher, F., H. Heuwinkel, R. Gutser & U. Schmidhalter.** 2005a. Development of Near Infrared Reflectance Spectroscopy Calibrations to Estimate Legume Content of Multispecies Legume-Grass Mixtures *Agronomy Journal*. 97: 11-17.
- Locher, F., H. Heuwinkel, R. Gutser & U. Schmidhalter.** 2005b. The Legume Content in Multispecies Mixtures as Estimated with Near Infrared Reflectance Spectroscopy: Method Validation. *Agronomy Journal*. 97: 18-25.
- Petersen, J.C., Barton, II, F.E., Windham, & Hoveland, C.S.** 1987. Botanical composition definition of Tall fescue-White Clover mixtures by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Crop Science*. 27: 1077-1080.
- Wachendorf, M., Ingwersen, B. & Taube, F.** 1999. Prediction of the clover content of red clover- and white clover-grass mixtures by near-infrared reflectance spectroscopy. *Grass and Forage Science*. 54:87-90.