

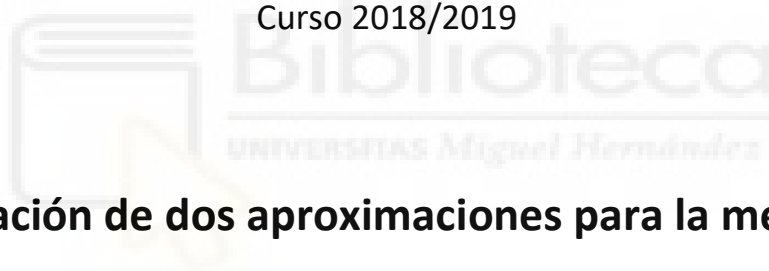


UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Grado en Ciencias Ambientales

Trabajo de Fin de Grado

Curso 2018/2019



Comparación de dos aproximaciones para la medida del carbono orgánico del suelo: un método de referencia en el laboratorio y el método por infrarrojo cercano (NIR)

Valeriano Martínez García

Tutor: César Guerrero Maestre

Elche, septiembre de 2019

ÍNDICE

| | |
|---|--------------|
| RESUMEN | 0 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1-5 |
| 1.1. El carbono orgánico en el suelo | 1 |
| 1.2. Iniciativa 4‰ y Cambio Climático | 1 |
| 1.3. Monitorización del carbono orgánico del suelo | 2 |
| 2. OBJETIVOS | 5 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 6-11 |
| 3.1. Descripción y muestreo de la zona | 6 |
| 3.2. Muestras de suelo..... | 6 |
| 3.3. Método de análisis de referencia | 8 |
| 3.4. Método de análisis por infrarrojo cercano (NIR) | 8 |
| 3.5. Diferencia mínima detectable (DMD) | 9 |
| 3.6. Errores en los métodos de análisis | 9 |
| 3.6.1. Error en el método de referencia (Walkley-Black)..... | 10 |
| 3.6.2 Error en el método por infrarrojo cercano (NIR) | 11 |
| 3.7. Corrección de la DMD | 11 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 12-20 |
| 4.1. Valores del carbono orgánico en el suelo | 12 |
| 4.2. Errores..... | 13 |
| 4.2.1. Error en el método de referencia (Walkley-Black)..... | 13 |
| 4.2.2 Error en NIR..... | 14 |
| 4.2.3 Valores de los errores | 16 |
| 4.3. Diferencia mínima detectable..... | 16 |
| 4.3.1 DMD ideal | 16 |
| 4.3.2 DMD corregida en el método de referencia | 17 |
| 4.3.3 Diferencia mínima detectable en infrarrojo cercano (NIR)..... | 18 |
| 4.4. Diferencias entre los dos métodos | 19 |
| 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA FUTURA | 21 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 22 |
| ANEXOS | 23-24 |

RESUMEN

El carbono orgánico del suelo (COS) es ampliamente aceptado como un indicador de calidad en los suelos. Esto implica la necesidad que tenemos de monitorizarlo, detectando cambios que frecuentemente son muy pequeños.

En este trabajo, se utilizan dos aproximaciones para la medida del carbono orgánico del suelo, un método de referencia en el laboratorio, y la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), estudiando cuál es más eficiente detectando cambios. El error que tiene el método de referencia es menor, pero cuando se reduce el número de muestras que se analizan, NIR puede suponer un método alternativo con resultados similares.

Palabras clave: carbono orgánico del suelo, monitorización, cambios muy pequeños, método de referencia, espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR).

ABSTRACT

The soil organic carbon (SOC) is widely accepted as an indicator of soil quality. This implies the need we have to monitor it, detecting changes that are often very small. This is a problem because there is no method that gives us the real value of soil organic carbon.

The objective of this study is to use two approaches to measure the soil organic carbon, a reference method in the laboratory, and near infrared spectroscopy (NIR), studying which is more efficient when quantifying changes. The reference method is smaller, but when the number of samples analyzed is reduced, NIR could be an alternative method with similar results.

Key words: soil organic carbon, monitoring, very small changes, reference method, near infrared spectroscopy (NIR).

ABREVIATURAS

COS: Carbono orgánico del suelo

NIR: near infrared (infrarrojo cercano)

DMD: Diferencia mínima detectable

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El carbono orgánico en el suelo

El carbono orgánico del suelo (COS) es ampliamente aceptado como un indicador de la calidad del suelo, ya que tiene una gran importancia en todos los procesos que se dan en el suelo, mejorando su estructura, fertilidad y capacidad de almacenamiento de agua. (Podmanicky *et al*, 2011)

El COS constituye la mayor reserva de Carbono de los ecosistemas terrestres (Lal, 2008), existiendo tres veces más Carbono que en la atmósfera. Por ello, los suelos son reconocidos como el segundo almacén de este elemento en el planeta después de los océanos, además de constituir uno de los componentes más importantes de la biosfera. Por su parte, el COS presente en los suelos agrícolas representa aproximadamente el 10% del Carbono orgánico total almacenado en todos los suelos en la superficie de la tierra (Paustian *et al*, 1997).

A pesar de la baja proporción que supone el COS en los suelos agrícolas a nivel mundial, su disminución ha tenido, a lo largo de varias décadas, una importante repercusión en el aumento de las concentraciones de gases de efecto invernadero (GEI) (European Environment Agency, 2016)

A lo largo de los años, el contenido de COS ha disminuido considerablemente debido a la conversión de los ecosistemas naturales en ecosistemas agrarios y diversos procesos de degradación, como la erosión, salinización o la reducción de la disponibilidad de nutrientes. Se estima que la reserva COS se ha reducido entre un 25% y un 75%, dependiendo del clima, el tipo de suelo y la gestión del mismo (Lal, 2011).

De ahí aparece la iniciativa 4 por mil, que pretende utilizar el manejo del suelo (prácticas agrícolas) para incrementar el COS de los suelos, manteniendo la fertilidad y la productividad del suelo, conservar la biodiversidad y aumentar la capacidad de un suelo a un clima cambiante.

1.2. Iniciativa 4‰ y Cambio Climático

La agricultura contribuye al cambio climático, se ve afectada por él, y además tiene la capacidad de mitigarlo. La mayor parte de las emisiones generadas por la agricultura están relacionadas con prácticas en el ámbito agrario, como la deforestación, el agotamiento de los suelos agrícolas por sobreexplotación y el excesivo laboreo del suelo, manejo inadecuado de

turberas y zonas húmedas; mientras que otras prácticas, por el contrario, son susceptibles de almacenar carbono, tanto en los suelos como en la biomasa.

La iniciativa “4 por 1000” pretende que la agricultura tenga un papel relevante en la mitigación y adaptación al cambio climático, ya que incluso un pequeño incremento en el almacenamiento de COS es crucial para mejorar la fertilidad de los mismos y la producción agrícola.

Los fundamentos de la iniciativa “4 por 1000”, proponen mejorar el contenido en materia orgánica incrementando un 4 por mil el COS, a través de la implementación de prácticas agrícolas mecánicas, culturales o biológicas, contribuyendo a preservar la calidad de los suelos, así como restaurar los suelos fragilizados y desertizados con el fin de mejorar la seguridad alimentaria, propiciar la adaptación al cambio climático y contribuir su atenuación.

1.3. Monitorización del carbono orgánico del suelo

El manejo del suelo puede modificar el contenido en COS, por lo tanto, se necesita monitorizar este cambio de COS en el tiempo. (Ecuación 1).

$$\Delta COS = |COS_{t_0} - COS_{t_1}| \quad \text{(Ecuación 1)}$$

donde ΔCOS es el incremento de COS (en valor absoluto), COS_{t_0} es el COS medido en el primer muestreo y COS_{t_1} es el COS medido en el re-muestreo.

Cuando se quiere hacer un monitoreo, si las diferencias son muy evidentes, es decir, si el cambio de COS (ΔCOS) es muy grande, incluso con un pequeño número de muestras se podrá detectar el cambio (Figura 1.1a). Sin embargo, en los escenarios habituales que se encuentran los suelos encontramos diversos problemas que dan como resultado una potencia estadística baja, dificultando medir el cambio de COS. Desde el punto de vista estadístico, en un suelo que se pretenda incrementar el COS (ΔCOS) modificando el manejo, uno de los principales problemas que aparecen es que las diferencias en el COS presentan **cambios muy pequeños**, siendo muy complicado detectar un cambio en intervalos de tiempo bajos. Otro factor a tener en cuenta es la distribución del COS, al ser muy variable en el espacio, muestra una heterogeneidad y **varianza alta**. Además, en muchas circunstancias, los **recursos económicos** no son muy altos, haciendo que el número de muestras recolectadas sea bajo.

La Figura 1.1b representa una situación con una potencia estadística baja (64%), por lo que conseguir detectar si hay diferencias estadísticamente resulta muy complicado. Cuanto más pequeñas sean las diferencias entre las dos medias, más fácil será detectar el cambio en el ΔCOS y el error de tipo II disminuirá.

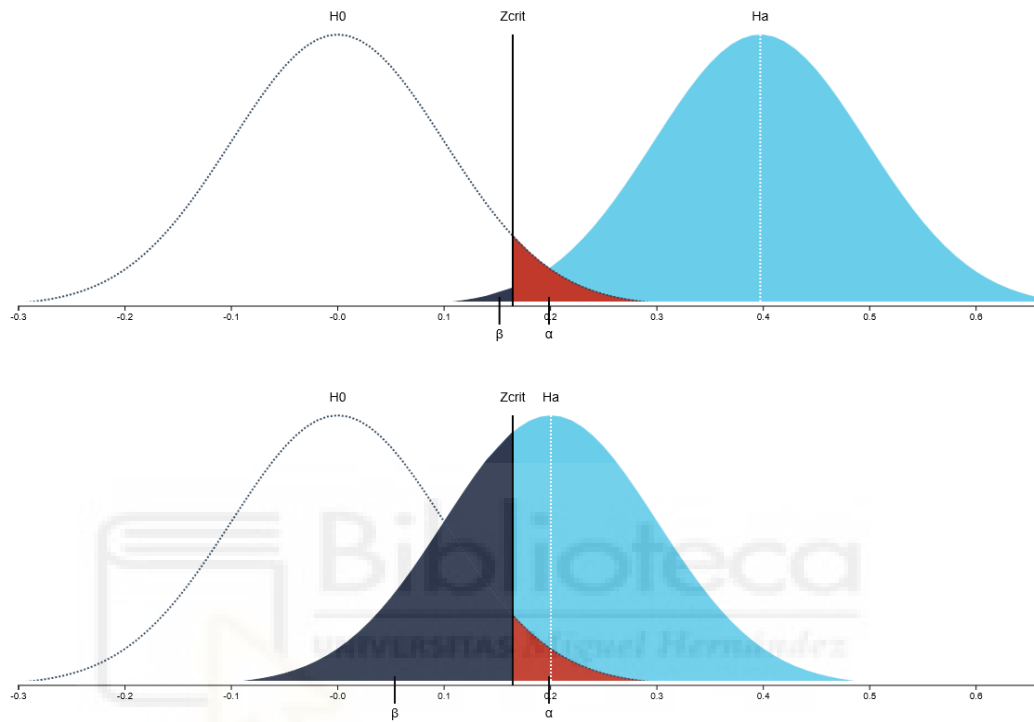


Figura 1.1. a (superior) y b (inferior). Representación gráfica de dos situaciones hipotéticas. H_0 representa la media del COS en tiempo cero, H_a representa el re-muestreo. La sección azul oscuro representa el error de tipo II ($\beta=1\%$ en **a**, 36% en **b**), la sección roja representa el error de tipo I ($\alpha=5\%$, en **a** y **b**) y la sección azul claro representa el poder estadístico ($1-\beta=64\%$ en **a**, 99 en **b**). El número de muestras (n) es 100.

Para solucionar estos problemas y llegar a una situación como la Figura 1.1b, se emplean diferentes modos de aumentar la potencia estadística. En primer lugar, se puede **incrementar el tiempo** hasta que se vuelve a muestrear (por ejemplo, un tiempo de espera de 5 a 20 años), debido a que el COS tiende a aumentar con un buen manejo del suelo, hasta que el cambio sea suficientemente grande para poder medirlo. En algunos casos, los tiempos de espera pueden ser tan altos que el tiempo puede ser excesivo.

Otra opción para aumentar la potencia estadística, es **aumentar el número de muestras**, si se aumenta el número de muestras, la potencia estadística aumenta, pero el coste económico es mayor. En muchos casos, debido a ese alto coste, no todas las muestras se pueden analizar

en el laboratorio, por lo que se realizan muestras compuestas. Las **muestras compuestas** son el conjunto de varias sub-muestras individuales, que han sido agrupadas tomando una pequeña parte de cada una. Las muestras compuestas **reducen el coste** de analizar el total de las muestras en el laboratorio y, además, reducen la varianza. Esto hace que el cambio sea más fácil de detectar. Entre las desventajas, cabe destacar que se pierde información espacial de la zona. Para aumentar el número de muestras, se pueden utilizar métodos alternativos como la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), que permite aumentar el número de muestras, aunque el error del método es mayor. Con todas estas soluciones, se contribuye a incrementar el poder estadístico, facilitando la capacidad de detectar cambios en el suelo y evitando llegar a conclusiones erróneas sobre cómo está afectando un determinado manejo al COS. La Figura 1.1a se representa una potencia estadística es muy alta (99%), por lo que el cambio que se pretende detectar es mucho más sencillo. El objetivo de las soluciones anteriores es obtener una diferencia entre las medias de COS similar. En la Tabla 1.1. se muestra un resumen de los efectos positivos y negativos de las soluciones descritas.

Tabla 1.1. Efectos positivos y negativos del tiempo, aumento en el número de muestras, uso de muestras compuestas y NIR

| | Efecto positivo | Efecto negativo |
|---|---------------------------------|---|
| Tiempo | Aumenta Δ COS | Tiempo excesivo |
| Aumentar número de muestras (n) | Aumenta la potencia estadística | Coste económico |
| Muestras compuestas | Reduce la varianza y el coste | Menos muestras. Se pierde información espacial de la zona |
| Espectroscopia infrarrojo cercano (NIR) | Aumenta el número de muestras | Aumenta el error del método |

En este trabajo, se van a comparar dos métodos para estimar el COS, el método de análisis de referencia de Walkley-Black (Walkley, A. y I. A. Black, 1934), que consiste en analizar las muestras en el laboratorio, y el método de análisis por infrarrojo cercano (NIR). El método clásico de Walkley-Black será considerado como el método de referencia para analizar el COS. Es un método caro al ser un método lento que implica el uso de reactivos. Si el número de muestras que se quieran analizar es muy alto, el coste de esos análisis puede ser inabordable.

En las situaciones donde ese coste económico sea muy alto, podemos recurrir a métodos de análisis más baratos como el infrarrojo cercano (NIR). Se desconoce que aproximación es más eficaz, pero para poder determinarlo, se necesita un valor que nos informe de qué método es capaz de detectar esa diferencia en el COS. En este trabajo, se va a utilizar la **diferencia mínima detectable (DMD)**, que indica cuando estadísticamente se puede detectar un cambio de COS. La DMD depende en gran medida del error que tenga cada método, por lo que se deberá estudiar el error producido en cada uno de los métodos.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es comparar la DMD obtenida con distintas configuraciones, utilizando muestras individuales y muestras compuestas analizadas por un método de referencia en el laboratorio y utilizando un método que permita incrementar el número de muestras, pero con error mayor (infrarrojo cercano).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción y muestreo de la zona

Las muestras de suelo usadas para este trabajo fueron recolectadas en una parcela agrícola ubicada en Casas de Ves, en la provincia de Albacete. A lo largo de la parcela, que ocupa aproximadamente 6.5 hectáreas, se tomaron 100 muestras de suelo superficial (0-10 cm) usando una sonda manual. Las muestras fueron secadas al aire en el laboratorio durante 2 semanas aproximadamente, una vez secas fueron tamizadas a 2 milímetros. Posteriormente, se analizó el COS (ver detalles en Materiales y Métodos, Método de análisis de referencia), y fueron escaneadas en un espectrofotómetro FT-NIR (ver sección Método de análisis por infrarrojo cercano NIR).

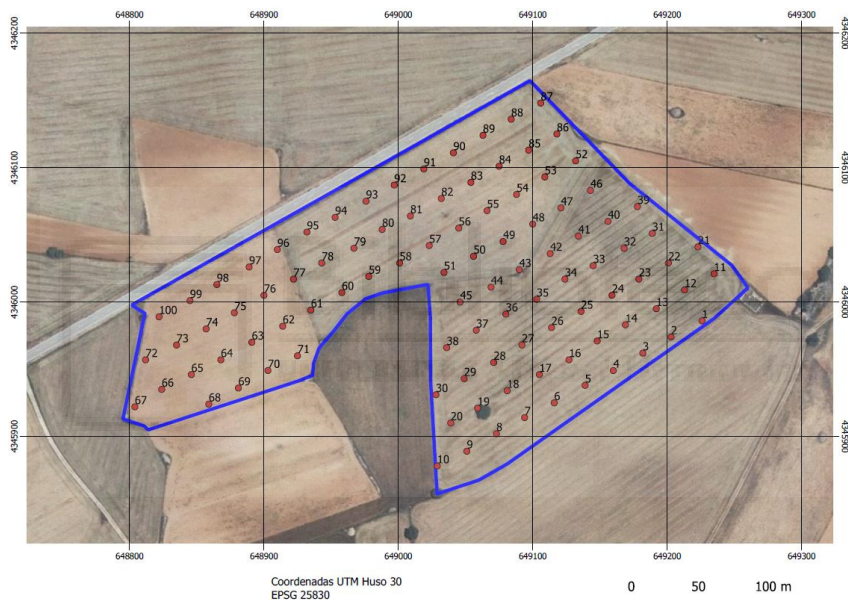


Figura 3.1. Muestras individuales tomadas en la parcela de Casas de Ves (Albacete).

La Figura 3.1 representa la zona donde fueron recolectadas las muestras.

3.2. Muestras de suelo

En este trabajo se dispone de dos tipos de muestras:

- **Muestras individuales:** se trata de las 100 muestras de suelo tomadas individualmente a lo largo de la parcela (ver Figura 3.1).
- **Muestras compuestas:** se trata de muestras de suelo que están constituidas por la mezcla de varias de las muestras individuales. En la Tabla 3.1 se indica el número de muestras que se juntan

(columna central) para obtener una muestra compuesta, y cuantas muestras compuestas (n) resultan (columna derecha), siempre que mantengamos el mismo esfuerzo en campo (100 puntos de muestreo). A modo de ejemplo, en la última fila de la Tabla 3.1 si se juntan 20 muestras individuales, se obtiene un total de 5 muestras compuestas. Puesto que sólo se analizaría el COS en esas 5 muestras compuestas, se abarata 20 veces los costes de laboratorio (de análisis de COS). Esta aproximación asume que el COS medido en una muestra compuesta es igual a la media obtenida usando los valores de COS de las muestras individuales que forman la compuesta. Por ejemplo, si una muestra compuesta está formada por la mezcla de 5 muestras (a partes iguales), cuyos valores de COS son 2, 4, 4, 3 y 2, el valor teórico de esa muestra compuesta debe ser de 3, y si realizamos un análisis real, su valor debe coincidir y ser 3.

Tabla 3.1. Configuración de las muestras compuestas virtuales. El esfuerzo realizado en el campo es el mismo en todas las situaciones, el número de muestras individuales agrupadas en cada compuesta indica cuantas muestras se mezclan para obtener una compuesta, y n es el número final de muestras compuestas.

| Esfuerzo en el campo | Nº de muestras individuales agrupadas en cada compuesta | Número de muestras (n) |
|----------------------|---|----------------------------|
| 100 | 1 | 100 |
| 100 | 5 | 20 |
| 100 | 10 | 10 |
| 100 | 20 | 5 |

A medida que más muestras individuales se agrupan, menos costes de laboratorio supone, y además la varianza de esas muestras será cada vez menor, ya que al juntar muestras de puntos distintos estamos eliminando parte de la variación espacial. Puesto que la media física y la media teórica coinciden, esto nos permite hacer compuestas "virtuales" (en ordenador), sin la necesidad de llevar a cabo las mezclas reales. Eso también nos permite calcular la varianza de las muestras compuestas de la Tabla 3.1, y repetirla simulándola 200 veces. Esa repetición es importante, ya que nos permite obtener datos más representativos y robustos, puesto que el número posible de combinaciones es muy alto, y trabajar sólo con una configuración podría dar resultados poco representativos.

3.3. Método de análisis de referencia

Es el método de análisis de referencia o clásico de Walkley-Black. para estimar el COS en el laboratorio. Es un proceso lento, destructivo de una pequeña parte de la muestra y con un coste económico alto, asociado a los reactivos implicados, generando residuos peligrosos.

La cuantificación del carbono orgánico se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor de reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico. Después de un tiempo de reacción, se realiza la valoración volumétrica del dicromato que ha quedado sin reaccionar analizando el cambio de color (colorimetría).

3.4. Método de análisis por infrarrojo cercano (NIR)

La espectroscopia es un método relativamente rápido, barato y no destructivo de las muestras que se analizan. La espectroscopia del suelo utiliza la interacción de la radiación electromagnética con la materia para caracterizar la composición física y química de la muestra del suelo. La muestra de suelo recibe la luz, que es reflejada dependiendo de las vibraciones moleculares que corresponden a la composición mineral y orgánica de los suelos. La luz reflejada o absorbida es recogida en diferentes longitudes de onda por un detector. El patrón resultante se conoce como un espectro. La espectrometría infrarroja se utiliza ampliamente en la industria para la investigación científica, ya que es una técnica rápida y fiable para medidas, control de calidad y análisis dinámicos.

Los espectros NIR contienen gran cantidad de información sobre la composición de la muestra, como por ejemplo la cantidad de COS, arcilla, carbonatos, etc. Pero es una información que no es directamente interpretable, y para obtenerla, es necesario recurrir a aproximaciones empíricas, es decir, usando calibraciones o modelos. En las calibraciones, se toma un conjunto de muestras en las que se analiza el parámetro o propiedad de interés con exactitud, usando métodos de análisis clásicos o de referencia como Walkley-Black para el caso del COS. Además de ese conjunto de muestras se dispone de sus espectros NIR. Mediante técnicas de regresión multivariante se relacionan las características espectrales con el valor de COS. Una vez obtenido el modelo o calibración que relaciona COS y espectros, esa calibración permite estimar el COS en nuevas muestras a través del espectro, que se obtiene en segundos y sin tener que usar reactivos químicos. La calidad de las predicciones va a depender de que las muestras usadas para calibrar el modelo sean parecidas a las que queremos predecir. En este trabajo se han

estimado los valores de COS mediante un modelo NIR que fue calibrado con 176 muestras de suelo de Tarazona de la Mancha, con características similares a las muestras de la zona de estudio (Casas de Ves). También se han usado valores de COS estimados por ese modelo tras haber sido recalibrado con 10 muestras de Casas de Ves. A pesar de que las muestras son bastante similares, en cuanto a clima, material de origen de los suelos, etc. esa re-calibración intenta asegurar que el modelo contiene muestras similares a las que queremos predecir.

3.5. Diferencia mínima detectable (DMD)

La DMD se define como la diferencia entre dos medias que puede ser estadísticamente detectada. En función de los valores de la varianza, el tamaño de muestra y de las tasas de error de tipo I y II, se obtiene el valor de la DMD. Para conocer su valor se utiliza la siguiente ecuación,

$$DMD (\Delta COS) = \sqrt{\frac{(t_{(\alpha/2)} + t_{(1-\beta)})^2 \cdot 2 \cdot (\sigma)^2}{n}} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

donde t son los valores de la distribución t (asociados a los grados de libertad), α y β son los niveles de seguridad, σ^2 es la varianza media de las muestras, y n es el número de muestras. Este enfoque estadístico determina la diferencia significativa más pequeña que se puede detectar en dos momentos de monitoreo en el tiempo. De este modo, podemos conocer cuando estadísticamente tiene sentido realizar el re-muestreo, siendo capaces de poder detectar un cambio en el COS.

En este estudio, para evitar el error de tipo I (α , falso positivo), se ha utilizado un nivel de seguridad del 95%, y en el error de tipo II ($1-\beta$, falso negativo), se utiliza un nivel de seguridad del 5%. Los valores de t se obtienen según los valores de los grados de libertad (Sakal, R. R., y Rohlf, F. J., 1987).

3.6. Errores en los métodos de análisis

El error experimental es la desviación que se produce entre el valor medido respecto del valor real. El valor real no podemos conocerlo, pero podemos aproximarnos a él. En general, los métodos tienen errores que dependen del procedimiento y la tecnología para realizar la medición.

El objetivo de cuantificar los errores de los métodos de análisis es para realizar una corrección de la DMD. De este modo, un método que sea menos erróneo que otro tendrá una mayor potencia estadística (ver apartado 3.7, Corrección de la DMD).

3.6.1. Error en el método de referencia (Walkley-Black)

A pesar de que el método de referencia es un método para analizar COS considerado como "método de referencia", estándar, y haber sido muy usado por su relativa simplicidad (no es necesario disponer de grandes equipos), se trata de un método que también tiene errores, y por ello también se deben cuantificar para corregir la DMD. En este caso, calcularemos el error que se produce durante el proceso de análisis de COS (repetitividad). Para calcularlo, empíricamente, se va a utilizar otro conjunto de 100 muestras de una zona relativamente cercana (Tarazona de la Mancha), con suelos muy similares a los de este estudio. En este set, 100 muestras fueron analizadas por duplicado, y 40 de ellas han sido analizadas por triplicado.

Con los datos de ese set, de manera empírica, vamos a calcular dos errores: (1) el error de este método cuando se mide la diferencia de medias, y (2) el error del método midiendo la **varianza** del conjunto de muestras. Para el primer caso, **error cuando se mide la diferencia de medias**, se procedió de la siguiente manera:

- 1.- De este set se calcula su media, pero el valor de COS de cada una de las 100 muestras no es la media de sus réplicas de laboratorio, sino que el valor de COS que se le asigna a cada muestra es un valor seleccionado al azar de entre los duplicados (o de entre los triplicados si es una de las 40 muestras analizadas por triplicado).
- 2.- Se repite ese proceso de asignación aleatoria para obtener otra media del set. En algunas muestras, el valor de COS asignado ahora será distinto al asignado en la configuración anterior.
- 3.- Se calcula la diferencia de medias que existente en ambos sets. Esa diferencia es atribuible a la repetitividad del método de análisis, que es la que hace que esas dos configuraciones del mismo set puedan tener medias diferentes.
- 4.- Los puntos anteriores se repiten 2000 veces con la ayuda del programa Excel.
- 5.- Finalmente, tras convertirlas a su valor absoluto, se calcula un valor medio de esas 2000 diferencias. En la Figura 3.3 se puede ver un histograma con la distribución de esas 2000 desviaciones.

En los pasos anteriores también se calculaba la varianza de cada set en cada una de las diferentes configuraciones. De modo que el error midiendo la varianza se obtuvo de la manera anteriormente descrita, pero en lugar de medir la diferencia de medias, se cuantificaba la diferencia de las varianzas. En la Figura 3.4 se puede ver un histograma con la distribución de esas 2000 diferencias entre varianzas.

3.6.2 Error en el método por infrarrojo cercano (NIR)

Para calcular el error en NIR se procede de manera más simple, ya que es por simple diferencia respecto a los valores reales, considerando que éstos (valores reales) son aquellos medidos por el método de referencia Walkley-Black. Por ello, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Error midiendo la media con NIR} = | \text{COS}_{\text{real}} - \text{COS}_{\text{NIR}} | \quad \text{(Ecuación 3)}$$

donde COS_{real} es la media de los 100 valores de COS analizados mediante el método de referencia en las 100 muestras de Casas de Ves, y COS_{NIR} es la media de los 100 valores de COS estimados por NIR en las mismas muestras (las 100 muestras de Casas de Ves). Puesto que nos interesa conocer el error midiendo la diferencia de medias, es decir, el error midiendo ΔCOS , este valor se multiplicará por dos, ya que debemos suponer que en la otra media a comparar también se dará este mismo error.

$$\text{Error midiendo la varianza con NIR} = | \sigma_{\text{real}}^2 - \sigma_{\text{NIR}}^2 | \quad \text{(Ecuación 4)}$$

donde, σ_{real}^2 es la varianza de los valores calculados usando Walkley-Black, y σ_{NIR}^2 es la varianza de los valores estimados con NIR. Este error, y al igual que el anterior, siempre serán usados en valor absoluto para corregir la DMD (ver siguiente punto 3.7).

Estos dos errores se calculan con los valores antes de que sean recalibrados y después de realizar el recalibrado de los modelos NIR.

3.7. Corrección de la DMD

Una vez que tenemos cuantificados los errores, se introducen en la Ecuación 2 de la DMD que se considera “ideal”, para corregirla.

$$\text{DMDC} = \sqrt{\frac{(t_{(\alpha/2)} + t_{(1-\beta)})^2 \cdot 2 (\sigma^2 + |\text{Error } \sigma^2|)}{n}} + |\text{Error } \Delta\text{COS}| \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Donde t son los valores de la distribución t , α y β son los niveles de seguridad, σ^2 es la varianza media de las muestras, n es el número de muestras, $\text{Error } \sigma^2$ es el error en la varianza y $\text{Error } \Delta\text{COS}$ es el error en la diferencia de medias.

Los errores se añaden en valor absoluto para que sean positivos y la DMD siempre se incrementa, penalizando el error. De modo que la DMD corregida siempre será mayor que la DMD sin errores, disminuyendo la potencia estadística.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Valores del carbono orgánico en el suelo

Se calculó el COS de las muestras que corresponden a la zona de “Casas de Ves” por el método de análisis de referencia (Walkley-Black), los resultados se muestran en la Figura 4.1.

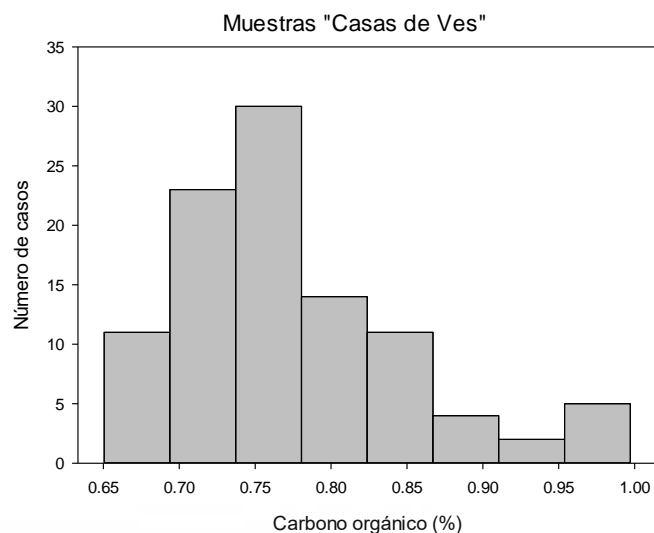


Figura 4.1. Valores del carbono orgánico del suelo. Las muestras están agrupadas dependiendo del porcentaje de COS que tengan en los diferentes números de casos. El COS se calculó tal y como se muestra en el apartado Materiales y Métodos, método de análisis de Walkley-Black.

Se observó que la mayoría de las muestras se sitúan entre 0,65% y 0,85%. Cabe destacar que más de la mitad de las muestras aparecen entre 0,70% y 0,80%. Una vez superado el 0,85%, se va reduciendo la cantidad de muestras.

Se realizó la simulación de cómo cambia la varianza en las diferentes configuraciones de muestras compuestas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.2 y en la Figura 4.2

Tabla 4.2. Varianza media obtenida en las 200 simulaciones de las muestras compuestas.

| Muestras analizadas | Nº de muestras individuales agrupadas en cada compuesta | Varianza |
|---------------------|---|------------|
| 100 | 1 | 0,00622193 |
| 20 | 5 | 0,00122928 |
| 10 | 10 | 0,0006103 |
| 5 | 20 | 0,00028902 |

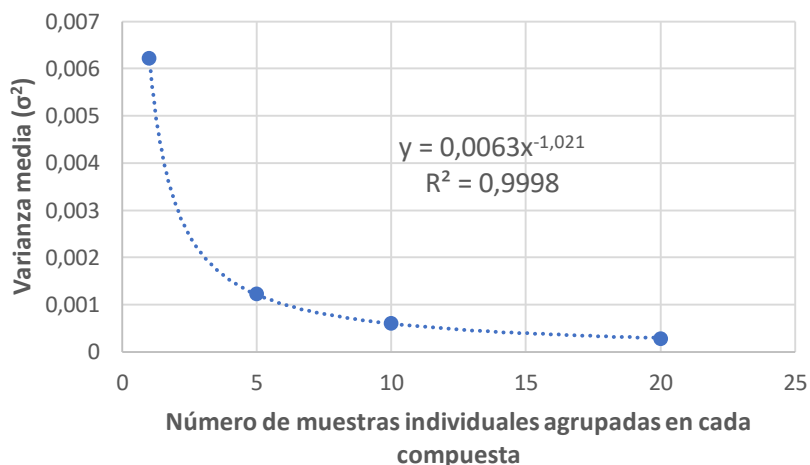


Figura 4.2. Disminución de la varianza. Las muestras compuestas (puntos azules) corresponden al valor medio de la varianza (σ^2).

En la Figura 4.2 se observa a medida que aumentamos el número de agrupaciones en muestras compuestas, la varianza disminuye exponencialmente. La reducción más destacable en la varianza corresponde del análisis de 100 muestras ($\sigma^2=0,00622193$), a tener que analizar solo 20 muestras. ($\sigma^2=0,00122928$), disminuyendo 5 veces la varianza.

4.2. Errores

4.2.1. Error en el método de referencia (Walkley-Black)

Se calculó el error en la diferencia de medias y en la varianza. Estos errores corresponden a la precisión en el laboratorio. Son los errores pesando las muestras de suelo o el error en los mL de sal de Mohr en la valoración. Estos errores están alrededor de cero, de forma que se reducen realizando repeticiones, aproximándose al valor real. Los resultados se muestran en la Figura 3.3 y Figura 3.4

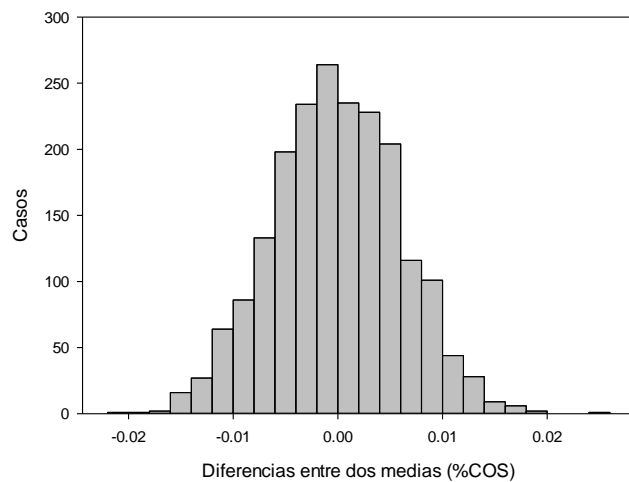


Figura 4.3. Histograma donde se representa el error midiendo la diferencia entre medias.

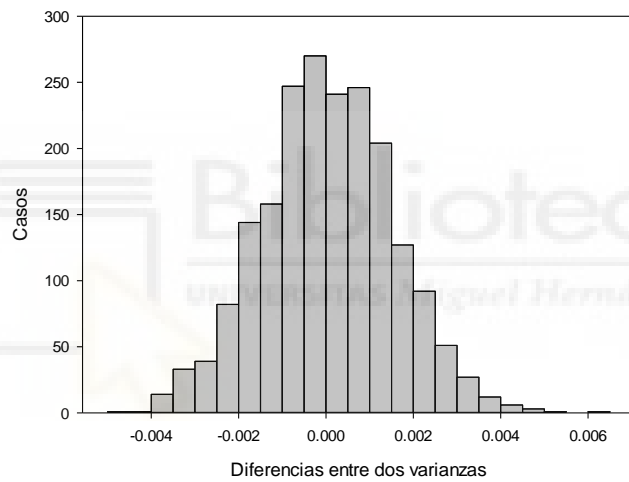


Figura 4.4. Histograma donde se representa el error midiendo la varianza entre medias.

En la figura 4.3 y 4.4 se observa una distribución normal de las simulaciones realizadas para calcular el error en la diferencia entre dos medias (de %COS) y la diferencia entre dos varianzas.

4.2.2 Error en NIR

Se calculó el error midiendo la media con NIR. En la Figura 4.5, se muestran los resultados promedio COS_{real} (método de referencia) y los valores promedio de COS de NIR sin recalibrar y NIR recalibrado.

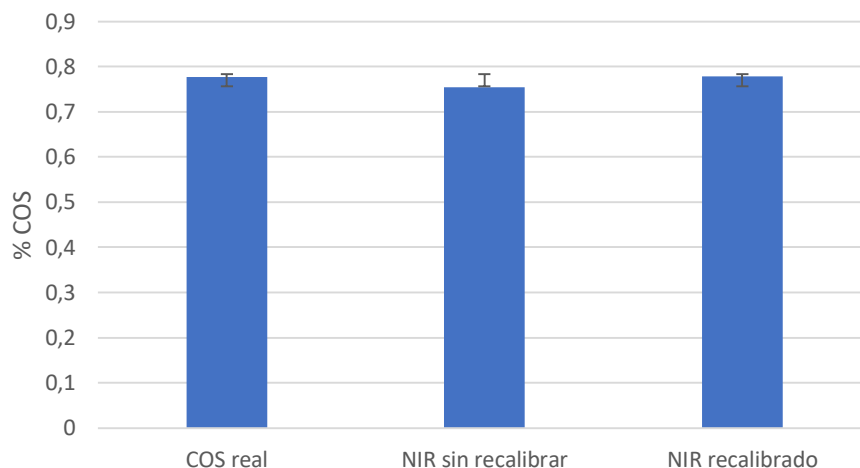


Figura 4.5. El gráfico representa el promedio de COS (%) en el método de referencia, NIR sin recalibrar y NIR recalibrado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

El valor de COS real (0,776%) es muy similar a los valores que se han obtenido en NIR sin recalibrar (0,754%) y NIR después de recalibrar (0,778%).

Se calculó el error midiendo la varianza con NIR. En la Figura 4.6 se representan los errores en la varianza para NIR sin recalibrar y NIR recalibrado.

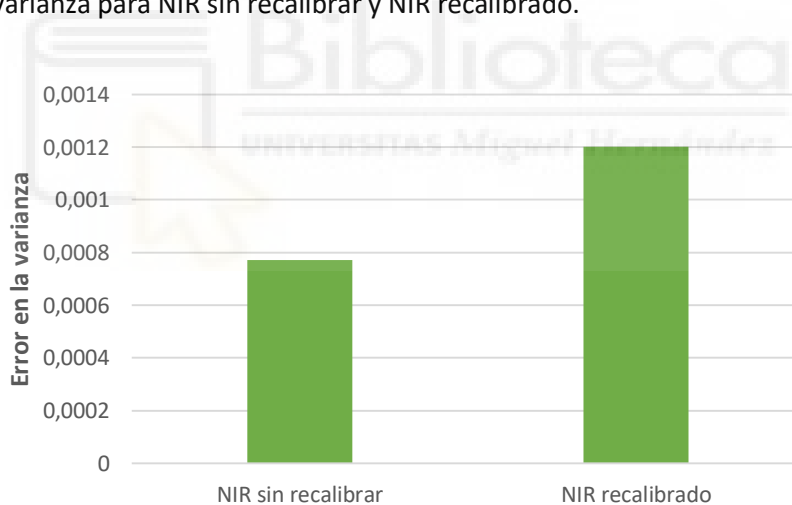


Figura 4.6. El gráfico representa la diferencia en el error de la varianza en NIR sin recalibrar y NIR recalibrado.

El error en la varianza de NIR sin recalibrar (0,00077) es aproximadamente la mitad que después de recalibrar el modelo con 10 muestras de Casas de VES (0,00120). En este caso el modelo empeora un poco la varianza.

4.2.3 Valores de los errores

Tabla 4.2. En la tabla se muestran los valores de los errores en la diferencia de medias y en la varianza, en el método de referencia, NIR sin recalibrar y NIR recalibrado.

| Método de análisis | Error en la diferencia de medias | Error en la varianza |
|----------------------|----------------------------------|----------------------|
| Método de referencia | 0.00489087 | 0.00119743 |
| NIR sin recalibrar | 0.04460184 | 0.00077199 |
| NIR recalibrado | 0.004066862 | 0.001200535 |

Estos errores son los que se utilizan para la corrección de la DMD (Materiales y Métodos, Corrección de la DMD) en la Ecuación 3.

4.3. Diferencia mínima detectable

4.3.1 DMD ideal

Se calculó la DMD utilizando la Ecuación 2 (sin considerar los errores), con los valores obtenidos por el método de referencia. Los resultados se indican en la **Figura 4.7.**

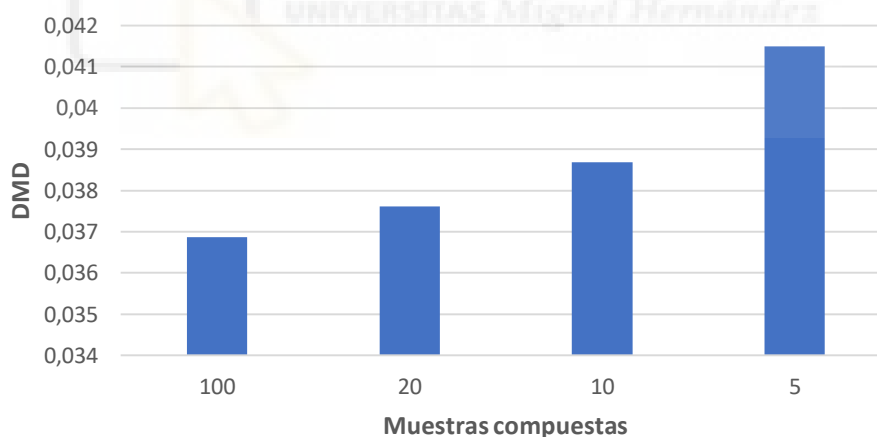


Figura 4.7. Cálculo de la DMD ideal. En el gráfico se representa la DMD en función de las muestras compuestas.

Se observó que los 4 grupos de muestras compuestas se sitúan entre 0,036 y 0,042. El menor valor se encuentra cuando analizamos el total de las muestras (100), y el mayor valor cuando reducimos el número de muestras analizadas hasta 5. La disminución en la varianza (Figura 4.2) queda compensada por el descenso en el número de muestras (n), obteniendo un balance neutro entre el número de muestras y la varianza. Este leve incremento de la DMD es debido a

que los valores de la distribución t (Ecuación 2), aumentan cuando decrecen los grados de libertad (al reducir el número de muestras).

Se concluyó que el aumento de muestras compuestas hace que aumente levemente la DMD ideal, pero con un coste menor (hasta 20 veces analizando 5 muestras compuestas).

4.3.2 DMD corregida en el método de referencia

Se calculó la DMD obtenida en las distintas configuraciones de muestras compuestas una vez que se han introducido los errores. Los resultados se muestran en la **Figura 4.8**.

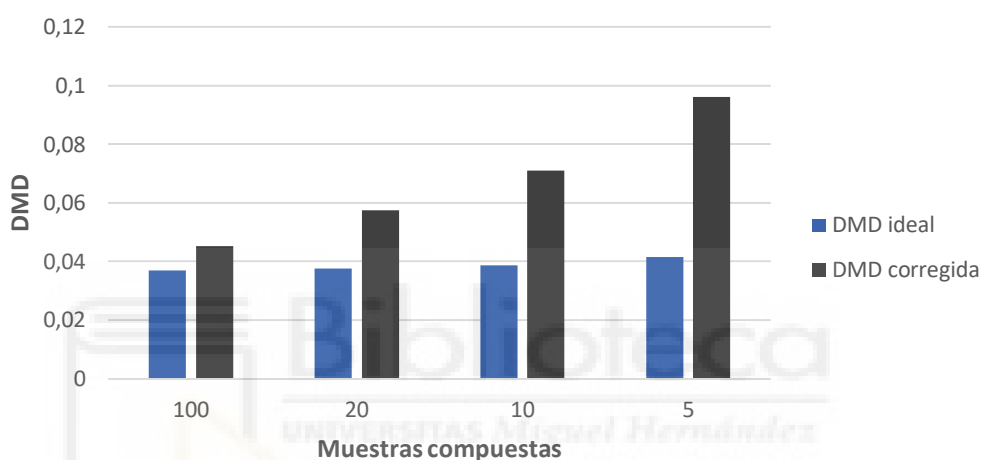


Figura 4.8. Comparación de la DMD corregida y la DMD ideal. El gráfico muestra la DMD ideal y la DMD corregida. Se representa la DMD en función de las muestras compuestas.

La Figura 4.8 representa un aumento muy grande en la DMD corregida en comparación a la DMD ideal. El valor mínimo en la DMD es el resultado de analizar las 100 muestras en el laboratorio (0,04515). El valor máximo de DMD se encuentra en el análisis de 5 muestras compuestas (0,09625), aproximadamente el doble que analizar las 100 muestras.

Se observó el aumento considerable de la DMD una vez introducidos los errores en comparación a la DMD ideal. La diferencia que existe entre la DMD analizando el total de muestras (100) y analizar muestras compuestas (20,10 y 5) afecta de manera muy clara, siendo evidente que el error penaliza cuando el número de muestras que se analizan disminuye. Esto se debe a que en la ecuación de la DMD corregida (Ecuación 3) cuando se reduce el número de muestras analizadas y se reduce la varianza al agrupar las compuestas, el error se mantiene constante, ya que corresponde al error que se produce en el método. Agrupar demasiadas muestras lleva asociada una DMD alta, lo que podría dificultar detectar un cambio en el COS.

Se concluyó que la DMD tiene que ser corregida, ya que a medida que se aumentan el uso de compuestas, el error aumenta proporcionalmente en relación al número de muestras que se analizan.

4.3.3 Diferencia mínima detectable en infrarrojo cercano (NIR)

Se calculó la DMD corregida, una vez que se han introducidos los errores en la media y en la varianza (Ecuación 3 y Ecuación 4), para los valores de NIR sin recalibrar y después del recalibrado. Los resultados se muestran en la Figura 4.9.

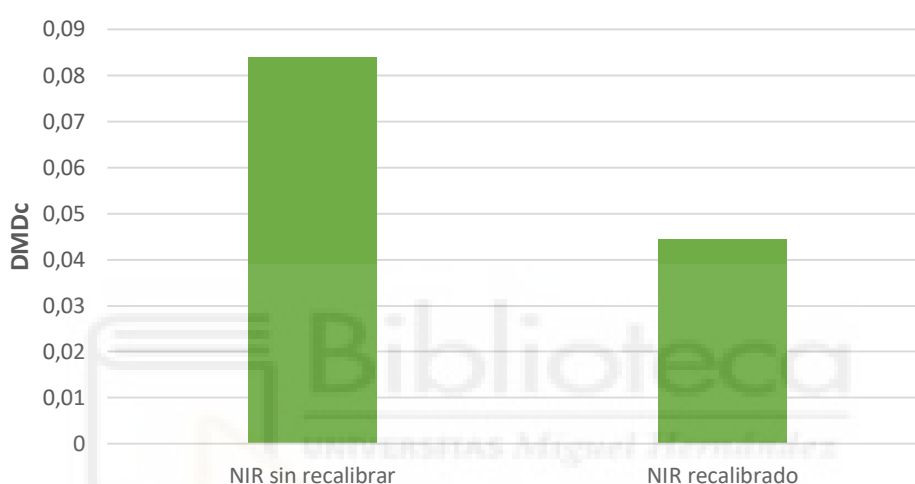


Figura 4.9. Diferencia mínima detectable en NIR sin recalibrar y NIR recalibrado.

Se observó que la DMD tiene un valor de 0,08369 sin recalibrar. Después del recalibrado con 10 muestras de suelo de Casas de Ves, la DMD tiene un valor de 0,04433. Esto reduce la DMD aproximadamente a la mitad, lo que supone una mejora muy importante a la hora de detectar un cambio. La reducción en el valor de NIR después de ser recalibrado es debido a que el modelo realizado incluye 176 muestras de suelo de una zona adyacente (Tarazona de la Mancha, Albacete) con características similares en su composición, además de incluir en el modelo 10 muestras a las que se les da mayor importancia para que sea capaz de predecir el valor de las muestras con mayor precisión. Este resultado implica que, si se dispone de un modelo preciso, podemos obtener un valor de DMD muy similar (incluso menor) en lugar de analizar el total de muestras en el laboratorio. Cuando se tiene un modelo para estimar el COS, conviene recalibrarlo para que se adapte a las características del suelo de la zona donde se va a

aplicar, para predecir con mayor exactitud las muestras. Se concluyó que realizar el recalibrado afecta de forma importante a la DMD.

4.4. Diferencias entre los dos métodos

Una vez que tenemos calculadas la DMD corregida en todas las configuraciones diferentes, se representan todas en conjunto. El resultado se muestra en la Figura 4.10.

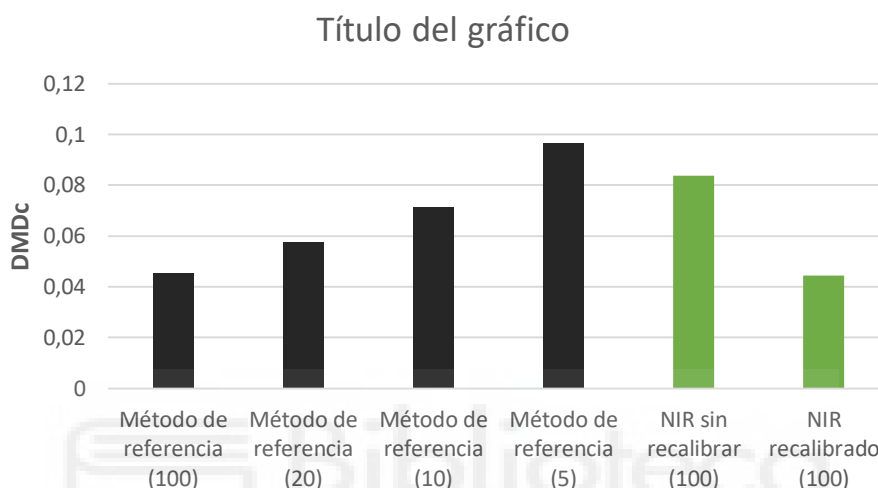


Figura 4.10. Distribución de las DMD en función del método de análisis realizado y el error que tienen. En el eje de abscisas se muestran los métodos de análisis realizados y el número de muestras analizadas y en el eje de ordenadas se muestran los valores de DMD.

En la Figura 4.10 se observa que los dos valores más altos en la DMD son los calculados por el método de referencia con 5 muestras compuestas (0,09624) y NIR antes de ser recalibrado (0,08369). Los valores mínimos se obtienen por el método de referencia analizando las 100 muestras en el laboratorio (0,04515) y en el método de NIR después de haber recalibrado con 10 muestras de Casas de Ves (0,04433).

Para poner en contexto estos valores, se han utilizado datos de una zona cercana donde hubo un cambio en el manejo (cambio de laboreo convencional a dejar de labrar el suelo), ahí se detectó una variación de COS (ΔCOS) del 0,5% en 20 años. Por ejemplo, si el COS en t_0 es del 1%, al cabo de 2 años será del 1,05%, de modo que esa diferencia (0,05%) solo se podrá detectar si se utiliza el método de referencia con 100 muestras (una DMD de 0,0451), o con NIR recalibrado con 100 muestras (una DMD de 0,443). En la Tabla 4.3 se representa el tiempo para detectar la diferencia en el COS de un suelo en cada caso.

Tabla 4.3. Tiempo (mínimo) para detectar un cambio en el COS en función de la DMD obtenida en cada método de análisis.

| Método de análisis | DMD | Tiempo para detectar el cambio |
|-----------------------------------|--------|--------------------------------|
| Método de referencia (100) | 0,0452 | 1 año y 10 meses |
| Método de referencia (20) | 0.0576 | 2 años y 4 meses |
| Método de referencia (10) | 0.0711 | 2 años y 10 meses |
| Método de referencia (5) | 0.0952 | 3 años y 10 meses |
| NIR sin recalibrar (100) | 0,0837 | 3 años y 4 meses |
| NIR recalibrado (100) | 0,0443 | 1 año y 9 meses |

La Tabla 4.3 muestra que los tiempos de espera no son muy altos, de modo que la diferencia entre la configuración de 100, 20, 10 y 5 muestras compuestas, el máximo de tiempo de espera entre ellos es de 2 años. La diferencia entre utilizar el método de referencia con 100 y 20 muestras compuestas es de 6 meses, lo que conlleva un ahorro de 5 veces el coste.

La comparación más importante, es el análisis de 10 muestras compuestas en el laboratorio por el método de referencia frente a NIR después del recalibrado, ya que, si se tiene en cuenta el coste económico, el precio es el mismo. El esfuerzo necesario para recalibrar el modelo requiere analizar 10 muestras de Casa de Ves en el laboratorio, recalibrando el modelo y obteniendo un valor de DMD de 0,04433, una DMD más baja que en el método de referencia (en 10 muestras compuestas), por lo que se puede concluir que, en esta configuración, NIR es más eficaz midiendo un cambio en el COS.

5. CONCLUSIONES Y PRYECCIÓN FUTURA

De los resultados obtenidos se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- La DMD tiene que ser corregida para obtener datos más reales. La diferencia entre introducir el error y la ideal es muy grande.
- El modelo de NIR tiene que ser recalibrado. Las diferencias en la DMD del modelo recalibrado y sin recalibrar es muy grande.
- Analizar un número de muestras reducido (compuestas) penaliza mucho el error, sin embargo, reduce mucho el precio y puede dar valores de DMD similares.
- El método NIR permite obtener de manera más eficaz una DMD más baja en comparación a utilizar muestras compuestas al mismo coste.
- La DMD corregida es una forma justa de comparar métodos, al tener en cuenta el tamaño de la muestra, la varianza, y el error presente en cada método.

Se plantean las siguientes perspectivas futuras:

- Comparar con otras tasas de aumento de carbono orgánico, analizando las diferencias de tiempo entre los métodos de análisis.
- Utilizar otros métodos existentes para medir el COS y los errores que tienen, para ponerlos en comparación con estos métodos.
- Utilizar varianzas diferentes para analizando cómo influye el error en situaciones donde las varianzas sean mucho mayores.

6. BIBLIOGRAFÍA

European Environment Agency (Approximated EU greenhouse gas inventory: emission estimates for 2015. Disponible en: <http://www.eea.europa.eu/publications/approximated-eu-ghginventory-2015> (12.11.16).

FAO. 2019. *Measuring and modelling soil carbon stocks and stock changes in livestock production systems: Guidelines for assessment (Version 1)*. Livestock Environmental Assessment and Performance (LEAP) Partnership. Rome, FAO. 170 pp.

Lal, R. (2008). Carbon sequestration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 815–830.

Lal, R. (2011). Sequestering carbon in soils of agro-ecosystems. *Food Policy* 36, S33–S39.

Paustian, K.; Andrén, O.; Janzen, H.H.; Lal, R.; Smith, P.; Tian, G.; Tiessen, H.; Van Noordwijk, M.; Wooster, P.L. (1997). Agricultural soils as a sink to mitigate CO₂ emissions. *Soil Use and Management* 13, 230-244. Lal, 2011.

Podmanicky, L.; Balázs, K.; Belényesi, M.; Centeri, Cs.; Kristóf, D.; Kohlheb, N. (2011). Modelling soil quality changes in Europe. An impact assessment of land use change on soil quality in Europe. *Ecological Indicators* 11 (1), 4-15.

Quinn, G. P. and Keough, M. J. (2016). Chapter 9 Multifactor analysis of variance. *Experimental Design and Data Analysis for Biologists* (pp 208-261). New York, Cambridge University Press.

Sokal, R. R., and Rohlf, F. J. (1987). *Introduction to biostatistics*. Second edition. New York, Freeman.

Walkley, A. and I. A. Black. (1934). An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-37.

ANEXOS

- **Procedimiento en el método de análisis de referencia (Walkley-Black)**

- Reactivos utilizados:

Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$): el oxidante de la reacción.

Sal de Mohr. Sulfato amónico ferroso, su elaboración se realiza antes de su uso, debido a que la disolución pierde su potencial reductor en presencia de oxígeno atmosférico.

Ácido sulfúrico (H_2SO_4). (Pureza superior al 96%).

Ácido fosfórico (H_3PO_4). (Pureza superior al 96%).

Difenilamina (C_6H_5)₂NH): indicador utilizado para la valoración.

Para el análisis de las 100 muestras, se llevan a cabo 5 tandas de 20 muestras y tres blancos (23 valoraciones cada tanda).

1. Se pesa alrededor de 1 g de cada muestra previamente tamizada a 2 mm y se coloca en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
2. Se añade 10 mL de dicromato de potasio medidos en un dispensador, girando el matraz entrando en contacto con toda la muestra.
3. Se añade 20 mL de ácido sulfúrico, comenzando la reacción. Dejamos 20 segundos de retraso entre cada muestra. La reacción dura 30 minutos.
4. Una vez transcurridos los 30 minutos, la reacción se detiene con 100 mL de agua siguiendo el mismo patrón de 20 segundos para que cada muestra reaccione durante 30 minutos, reduciendo el error en el método.
5. Se añaden 10 mL de ácido fosfórico.
6. Se añaden 3 gotas de indicador de difenilamina.
7. Se realiza la valoración volumétrica donde el color cambia de un color naranja oscuro a un verde oscuro.

-Cálculo del COS

Una vez que hemos obtenido el valor del volumen en la valoración, calculamos el porcentaje de carbono orgánico de cada muestra con la siguiente fórmula:

$$\%COS = \frac{(V - V') \cdot N \cdot F \cdot 0,39}{m (g)} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Ecuación 1: Cálculo del COS en porcentaje una vez terminado el análisis en el laboratorio. Donde V es el volumen de sal de Mohr medida en la bureta, V' es el volumen medio de los tres blancos, N es la normalidad de la sal de Mohr (0,5), F es el factor de corrección del blanco, $0,39$ es el factor de corrección del carbono orgánico y m es la masa de suelo pesada en la balanza, en gramos.

- **Procedimiento de escaneado en infrarrojo cercano NIR**

El equipo utilizado para obtener los espectros de las muestras, es un espectrofotómetro de infrarrojo cercano (FT-NIR, modelo MPA, Bruker). El equipo tiene que ser encendido al menos una hora antes de usarlo para que pueda ofrecer medidas robustas y estables. En este caso, al ser un total de 100 muestras, el escaneado se puede realizar en pocas horas. Las muestras fueron escaneadas por duplicado en días diferentes. Para el escaneado, se usan dos placas de Petri para preparar una mientras se analiza otra.

1. Las muestras se colocan todas en orden para tener facilidad a la hora de prepararlas.
2. Se extiende el total de la muestra sobre una placa de Petri, evitando agitarla para que no sedimenten las partículas de menor tamaño.
3. La placa se coloca en el compartimento de la muestra, donde se escanea, obteniendo un espectro para cada muestra.
4. Cada 5 minutos aproximadamente, se realiza un *background*, donde el detector se cierra para calibrar el equipo y que se adapte a las diferentes temperaturas del ambiente.