

Einsatz der Diodenspektrometer auf Kleinparzellenerntemaschinen zur operativen Auswertung des Grünlandfutters

Ing. Reinhard Resch / HBLFA Raumberg-Gumpenstein

1. Einleitung

An der HBLFA Raumberg-Gumpenstein wurde im Jahr 2004 ein NIR-Spektrometer mit einem Diodenarray gekauft, um frische Grünlandfutterproben auf den Wassergehalt zu untersuchen. In Kombination mit einem Grünfuttermollerter sollte dieses System innerhalb von drei bis fünf Versuchsjahren soweit kalibriert sein, dass für diverse Futterpflanzenarten eine präzise Schätzung der Trockenmasse möglich ist.

Gleichzeitig soll in diesem Zeitraum geprüft werden, inwieweit es im Frischzustand der Proben möglich ist, neben dem Wassergehalt, auch andere organische Parameter wie Rohprotein, Rohfaser, Verdaulichkeit der organischen Masse etc. im Messbereich von 380 bis 1690 nm zu erfassen.

2. Material und Methodik

2.1 DA-Spektrometer – CORONA 45 VISNIR (Fa. Carl ZEISS Jena GmbH)

Das Spektrometer kann einen Messbereich von 380 bis 1690 nm erfassen. Dieses HR-Gerät (High Resolution) verfügt über ein Diodenarray mit 24 Dioden. Der verwendete Drehteller (Turnstep) mit aufgesetzter Küvette kann in 3 unterschiedlichen Geschwindigkeiten gesteuert werden (siehe *Abbildung 1*). An der HBLFA Raumberg-Gumpenstein wurde die Drehgeschwindigkeit 2 über die Steuerungssoftware CORA gewählt. Die gut zerkleinerte Probenmenge für die Messung beträgt zwischen 100 und 200 g Frischmasse (siehe *Abbildung 2*). Diese Probe wird mit einem flachen Metallgewicht von 1,23 kg (siehe *Abbildung 3*) beschwert, damit ist die Probenvorbereitung abgeschlossen und die Messung kann beginnen. Die Messdauer beträgt 5 Sekunden, die Messintervalle 20 ms. Der Drehteller ist zur Lichtquelle exzentrisch angeordnet, sodass durch die Drehung jeder Messpunkt einen anderen Bereich der Probe erfasst. Aus den gesamten Messungen (ca. 15) einer Probe ergibt sich ein sogenanntes Multispektrum. Die Messung mit dem Drehteller ergibt standardisierte Bedingungen bezüglich des konstanten Messabstandes der Probe von 16 mm zur Optik, was gegenüber der Messung auf ein Förderband einen enormen Vorteil ergibt.



Abbildung 1:
CORONA 45 VISNIR
mit Drehteller



Abbildung 2:
Probenvorbereitung
für die Spektralmessung



Abbildung 3:
Probenbeschwerung

2.2 Steuerungssoftware – CORA (Fa. Carl ZEISS Jena GmbH):

Dieses Programm ist in der Lage aus den Einzelspektren einer Probe die Ausreißerspektren herauszufiltern, um ein repräsentatives Mittelwertspektrum für die gesamte Probe zu ermitteln. Wesentlich in der Gerätesteuerung ist der Schwarz/Weiß-Abgleich, der für die Grundkalibrierung des DA-Spektrometers essentiell ist. Mit den standardisierten Farben weiß bzw. schwarz werden hierbei die extremsten Gegensätze vermessen, um optimale Messwerte zu erhalten.

2.3 Chemometriesoftware – Unscrambler 9.1 (Fa. CAMO)

Die Auswertung der GRAMS-Spektren benötigt eine spezielle Software. An der HBLFA Raumberg-Gumpenstein wird mit dem Programm „Unscrambler 9.1“ gearbeitet. Durch die hohe Auflösung lassen sich die Unebenheiten im Spektrum mittels Transformation (Reduce-Average) ohne Problem glätten, um die Kurve zu verbessern. Die daraus resultierenden Daten werden mit Hilfe der PLS-Regression (Partial Least Square Regression) für die Erstellung eines Kalibrationsmodells bearbeitet. Diese PLS-Regression ist eine multivariate Regression, die vor allem in der Spektroskopie zur Kalibrierung von Eigenschaften aus Spektren verwendet wird. Mit der Prozedur „Prediction“ ist es mit der Software Unscrambler möglich das Kalibrationsmodell an unabhängigen Referenzproben zu validieren bzw. Parameter an nicht referenzierten Spektraldaten zu schätzen. Die Spektralinformation des Wellenlängenbereiches 380 bis 1690 nm (siehe *Abbildung 4*) wurde an der HBLFA Raumberg-Gumpenstein für organische Parameter wie Rohprotein, Rohfaser und Verdaulichkeit der organischen Masse verwendet, für die Trockenmasse genügte der Bereich von 800 bis 1690 nm

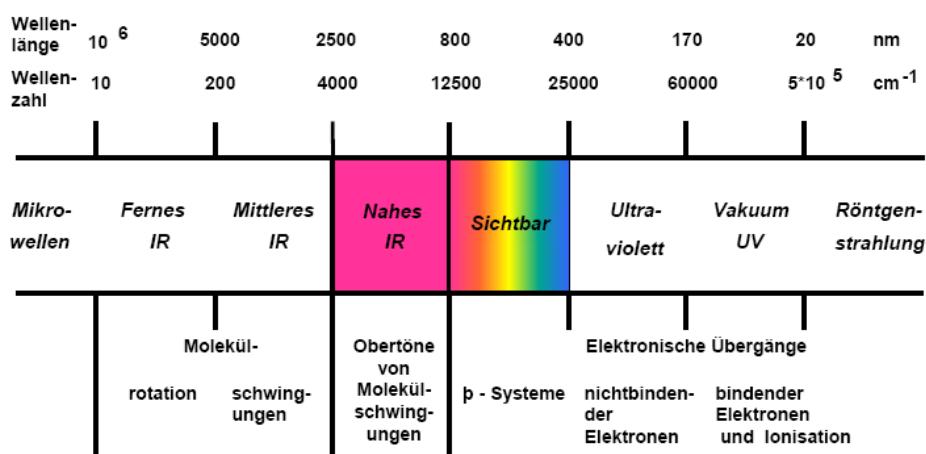


Abbildung 4: Spektralbereiche elektromagnetischer Strahlung

2.4 TM-Referenzdaten

Die frische Futterprobe kommt unmittelbar nach der Spektralmessung durch CORONA 45 VISNIR zur Probeneinwaage (Einwaage von 600 g) und anschließend in den Trockenschrank (umbebauter Großkühlschrank mit Innenmaß B120 x T90 x H204 cm mit Zuluftentfeuchtung). Die Trocknungsdauer ist mindestens 48 Stunden bei einer Temperatur von 55° C. Das Probenbehältnis für den Trockenschrank ist eine Holzkiste mit den Innenmaßen B37 x T27,5 x H14 cm (Kistenboden aus Hartfaserplatte 4 mm mit 18 Lochungen á 3,5 cm). Über den Kistenboden ist ein Kunststoffnetz mit einer Maschenweite von 1 mm gespannt. Die Gewichtsbestimmung erfolgt unmittelbar nach der Trocknung mit einer digitalen Waage (Anbindung an PC-Wiegesystem), die Probe weist in diesem Zustand eine Trockenmasse von ca. 96 % auf. Die Probenvermahlung erfolgt mittels Schneidmühle mit einem Siebeinsatz (Lochung von 1,0 mm). Die gemahlene Futterprobe wird etwa 1 Woche lang bei Raumtemperatur gelagert bevor das Restwasser bestimmt wird. Die Restwasserbestimmung erfolgt gravimetrisch mittels Brabender-Schnellbestimmung (Standardmessverfahren), hier wird 30 Minuten bei 130°C getrocknet.

2.5 Anordnung der Optik an der HBLFA Raumberg-Gumpenstein

Im Jahr 2005 wurde das DA-Spektrometer (CORONA 45 VISNIR von Fa. ZEISS) auf dem Grünfuttervollernter HEGE 212 montiert, um Spektren unmittelbar nach der Ernte und Probenvorbereitung (mittels Häcksler) aus dem Probenstrom eines Förderbandes zu messen. Hier kam es in der Probenvorlage zu großen Differenzen im Messabstand der Probe zur Optik. Außerdem war der Probenstrom auf dem Förderband sehr unregelmäßig, sodass die Anzahl an gültigen Einzelmessungen oftmals stark reduziert werden musste. Diese Schwierigkeiten wurden dadurch umgangen, dass das CORONA-Gerät mit einem Drehteller ausgestattet wurde und in adaptierter Weise auf dem Vollernter neu montiert wurde. Diese

Anordnung lieferte sehr brauchbare Spektraldaten, war jedoch von einer Person auf der Plattform nur unter großem Zeitaufwand (ca. 90-120 Sekunden / Parzelle) zu bedienen. Im Jahr 2006 fiel schließlich die Entscheidung, dass das CORONA 45 VISNIR-Gerät in einem Laboratorium aufgestellt wird, damit den angesprochenen Problemen sowie den stark schwankenden Aussenbedingungen ausgewichen werden kann.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Nahinfrarotspektroskopie (NIR) ist vom Prinzip her ein indirektes Messverfahren, welches die spektroskopisch-physikalischen Eigenschaften der Probe widerspiegelt. Die vorbereitete Probe wird an der HBLFA Raumberg-Gumpenstein mit Licht einer definierten Wellenlänge (380 bis 1690 nm) bestrahlt, gemessen wird der reflektierte Strahlungsanteil in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Das Ergebnis der Messung wird zur quantitativen Bestimmung von Wasser und organischen Inhaltsstoffen genutzt. Nach DIETERLE et al. (2003) sind aus den engen Korrelationen zwischen den Ergebnissen der NIRS-Messungen und der Referenzmethoden mit Hilfe von statistischen Auswerteverfahren Kalibrierungen zu erstellen und durch geeignete, unabhängige Proben zu validieren.

3.1 Erstellung von Kalibrationsmodellen

An der HBLFA Raumberg-Gumpenstein kommt die Chemometriesoftware „Unscrambler 9.1“ für die Aufbereitung der Spektraldaten und deren Auswertung zum Einsatz. Die Auswertung der hohen Informationsdichte der Spektraldaten bedarf einer speziellen Methodik und zwar der Hauptkomponentenanalyse. Bei diesem Verfahren wird eine geringe Anzahl von Wellenlängen selektiert, welche die größte Aussagekraft für die Vorhersage eines referenzierten Parameters besitzen. Die sogenannte PLS-Regression (Partial Least Square Regression) führt in ihrem prozeduralen Ablauf zuerst eine Hauptkomponentenanalyse durch und rechnet in weiterer Folge eine ausgewählte Anzahl von Ableitungen, um sich an das Optimum der Vorhersage zu nähern. Das abgeleitete Kalibrationsmodell wird gespeichert und kann nach einer Validierung mit unabhängigen Daten schließlich für die Vorhersage eines Parameters herangezogen werden. Es hat sich bei der Auswertung der Trockenmasse herausgestellt, dass der Spektralbereich von 800 bis 1690 nm ausreicht für andere organische Parameter war es besser den Spektralbereich von 380 bis 1690 nm zu verwenden.

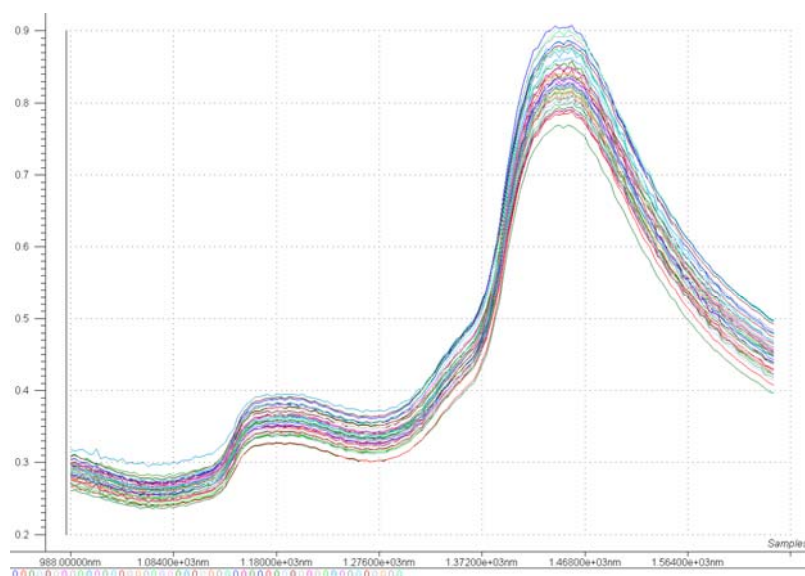


Abbildung 5: NIR-Absorptionsspektren von 12 Sorten Lolium perenne in 4-facher Wiederholung

3.2 Spektralanalyse am Beispiel eines Sortenversuches (*Lolium perenne*) aus 2005, Standort Gumpenstein, 2. Aufwuchs

Der zur Auswertung verwendete Spektralbereich umfasste den Bereich von 988 bis 1620 nm. Die insgesamt 12 Prüfobjekte in 4-facher Wiederholung zeigten im Bereich von 1450 nm einen typischen Absorptionspeak für Wasser. Es traten Differenzen in den Messdaten von maximal 0,14 log 1/R (siehe *Abbildung 5*) bei 1450 nm auf.

Bei der Erstellung der Kalibration wurde eine PLS-Regression angewendet, welche ein sehr gutes Ergebnis lieferte. Mit einem Bestimmtheitsmaß (r^2) von 0,99 lag für die 48 Referenzdatensätze eine sehr gute Beziehung vor. Der mittlere Schätzfehler des Modells betrug nur 1,3 g/kg Trockenmasse, was einer optimalen Vorhersagequalität entspricht (siehe *Abbildung 6*).

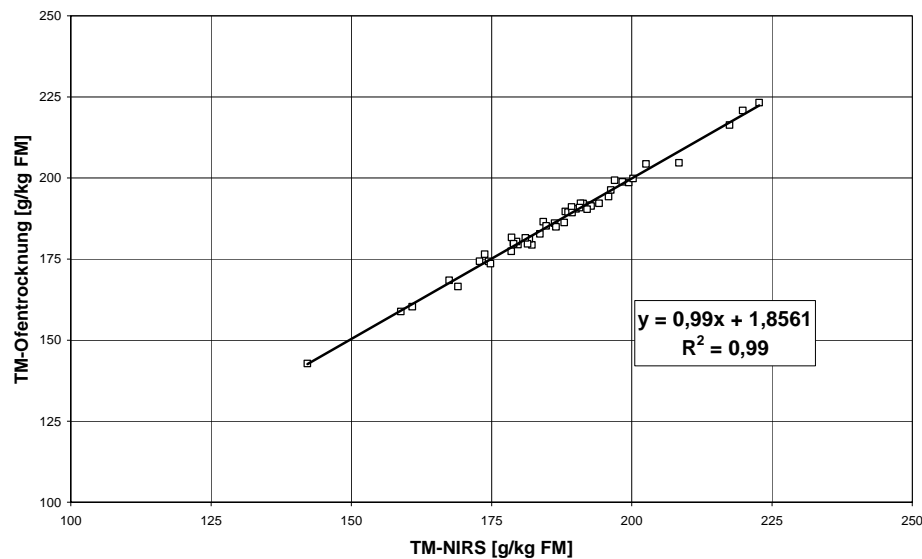


Abbildung 6: Kalibrierung mit PLS-Regression für Trockenmasse

3.3 Spektralanalyse unterschiedlicher Futterpflanzen und Aufwüchse 2005, Standort Gumpenstein

In *Abbildung 7* werden Spektren (Wellenlänge 380 bis 1690 nm) von 9 verschiedenen Futterpflanzenarten dargestellt. Neben der Differenz von max. 0,3 log 1/R im Bereich von 1450 nm (Wasserpeak), konnten gleichzeitig große Unterschiede im sichtbaren Spektralbereich (Wellenlänge 380 bis 800 nm) festgestellt werden. Die Farbintensität unterscheidet sich zwischen *Lolium perenne* und *Phleum pratense* deutlich. *Lolium perenne* weist im sichtbaren Spektrum wesentlich höhere Absorptionswerte auf wie *Phleum pratense*.

Der Informationswert im Wellenlängenbereich von 380 bis 800 nm ist aufgrund der starken Differenzierung der Messungen als vielversprechend für qualitative Parameter zu bewerten.

Im Jahr 2005 wurden insgesamt 268 frische Futterproben von verschiedenen Futterpflanzen mit TM-Referenzwerten für eine generelle Kalibration herangezogen. Als Ergebnis konnte ein Bestimmtheitsmaß (r^2) von 0,793 erzielt werden, der mittlere Schätzfehler für eine Prädiktion (Standarderror of Estimates) betrug 14,2 g TM/kg FM. Diese Kalibration ist für die Anwendung in der Praxis unbefriedigend, der Schätzfehler sollte auf jeden Fall unter 10 g TM/kg FM liegen. An der HBLFA Raumberg-Gumpenstein wird in den nächsten Jahren eine umfangreichere Sammlung von Spektraldaten und Referenzwerten durchgeführt, um gute Kalibrationsmodelle für eine bessere Schätzung zur Verfügung zu haben.

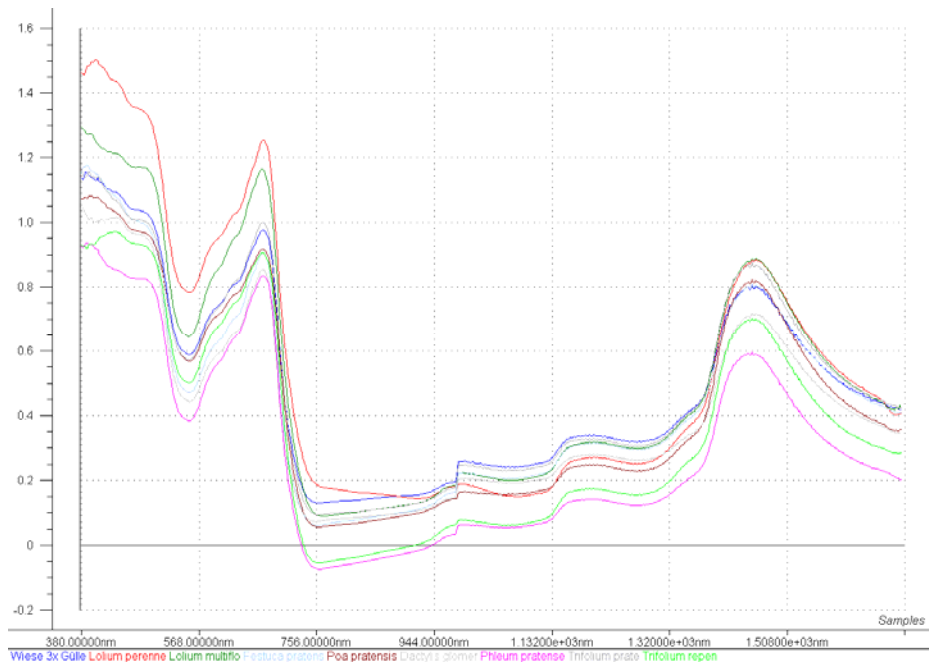


Abbildung 7: NIR-Absorptionsspektren von unterschiedlichen Futterpflanzenarten

Am Beispiel einer Untersuchung der FAL Braunschweig wird vor Augen geführt mit welcher Präzision eine Schätzung durchgeführt werden kann, wenn nur mit einer Futterpflanzenart gerechnet wird (siehe *Abbildung 8*).

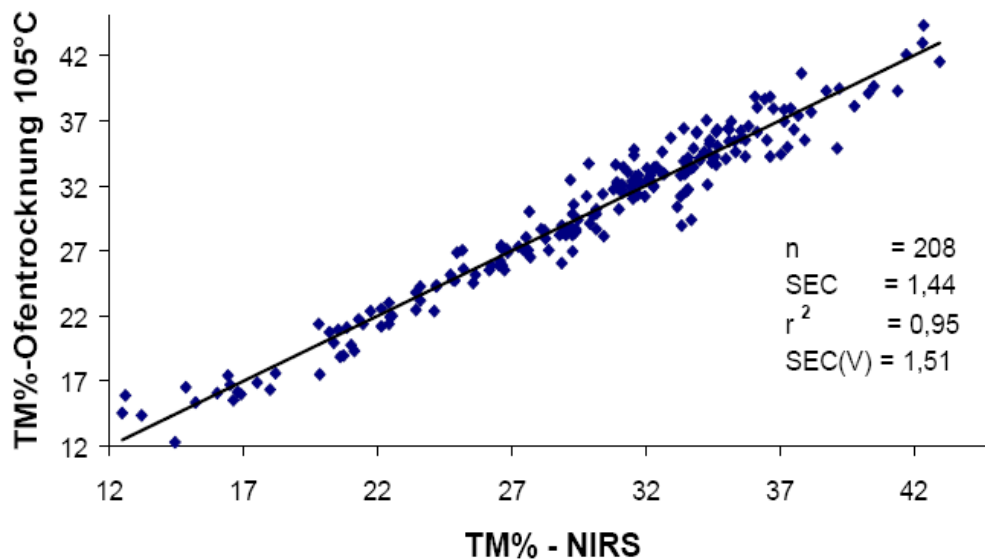


Abbildung 8: NIRS-Harvest Line, Ermittlung TM % in frischen Futterpflanzen (HÄUSLER, RODE und PAUL, 2001)

3.4 Validierung von Kalibrationsmodellen

Die erste Prüfung bzw. Validierung eines Kalibrationsmodelles erfolgt an referenzierten Spektraldaten von anderer, also unabhängiger Probenherkunft. Im folgenden Beispiel wurde das Kalibrationsmodell des oben angeführten Lolium-Sortenversuches vom 2. Aufwuchs 2005 auf den Datensatz des gleichen Lolium-Sortenversuches des 3. Aufwuchses angewendet.

Vom 3. Aufwuchs lagen entsprechende TM-Analysen (Ofentrocknung) vor, um die vorhergesagten Werte mit den Referenzwerten in einer Regressionanalyse zu untersuchen. In der *Abbildung 8* ist ersichtlich, dass die Datenstreuung sehr groß ist und die Varianz der Daten mit diesem Modell nur zu 25 % erklärt werden kann ($r^2 = 0,2521$). Auf den ersten Blick ist dieser Wert ernüchternd, richtet man den Blick allerdings auf den mittleren Schätzfehler so ist dieser mit 6,8 g TM/kg FM vertretbar. In einer ersten Bewertung des Validierungsergebnisses kann festgestellt werden, dass die TM-Bereiche des Kalibrations- und des Validationsdatensatzes gut zusammen passten (TM = 140 bis 220 g/kg FM). Die Sicherheit der Vorhersage lässt in diesem Fall allerdings noch zu wünschen übrig.

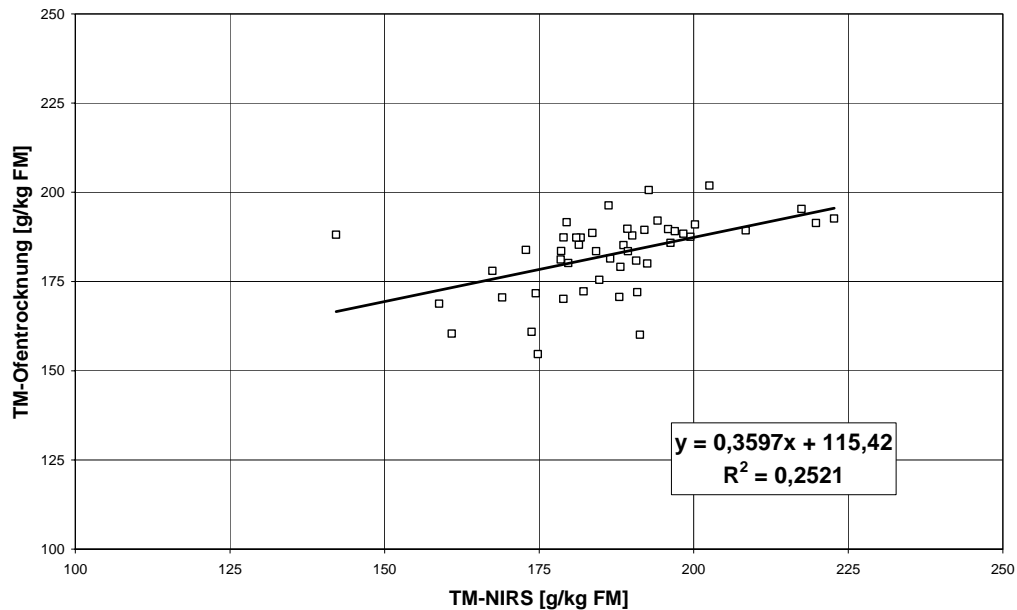


Abbildung 9: Validierung mit PLS-Regression für Trockenmasse

3.5 Erste Erfahrungen in der Kalibrationserstellung mit qualitativen Referenzdaten aus einem Silierversuch der HBLFA Raumberg-Gumpenstein im Jahr 2005

Der Datensatz, der hier zur Verfügung stand, umfasst insgesamt 28 Silageproben eines heterogenen Dauerwiesenbestandes. Das Ausgangsmaterial wurde mit unterschiedlichen Additiven behandelt, um die Milchsäuregärung positiv zu beeinflussen. Neben der unbehandelten Kontrolle wurden insgesamt 7 Silierzusätze verwendet und in 3-facher Wiederholung angelegt. Die Versuchssilos wurden nach 99 Tagen am 5. September 2005 entleert und die Proben mit dem CORONA 45 VISNIR-Spektrometer gemessen.

3.6 Kalibration für Rohprotein (XP)

Die Referenzwerte wiesen eine Streuung von 140 bis 175 g/kg TM auf, was einem sehr guten bis mittleren Gehalt an Rohprotein für ein Dauerwiesenfutter entspricht. Das Kalibrationsmodell zeigte eine sehr gute Korrelation der NIR-Daten zu den Referenzwerten (siehe *Abbildung 10*). Die statistische Auswertung ergab einen mittleren Schätzfehler von 0,4 g/kg TM. Für die Messung von homogenem Probenmaterial wie z.B. aus Sortenversuchen einer Futterpflanzenart, kann bei Teilreferenzierung (25 % aus 100 %) mit hoher Genauigkeit der Gehalt von Rohprotein geschätzt werden. Die Anwendung solcher Kalibrationsmodelle auf andere Spektraldaten muss erst validiert werden, um praxisrelevante Schätzfehler zu ermitteln.

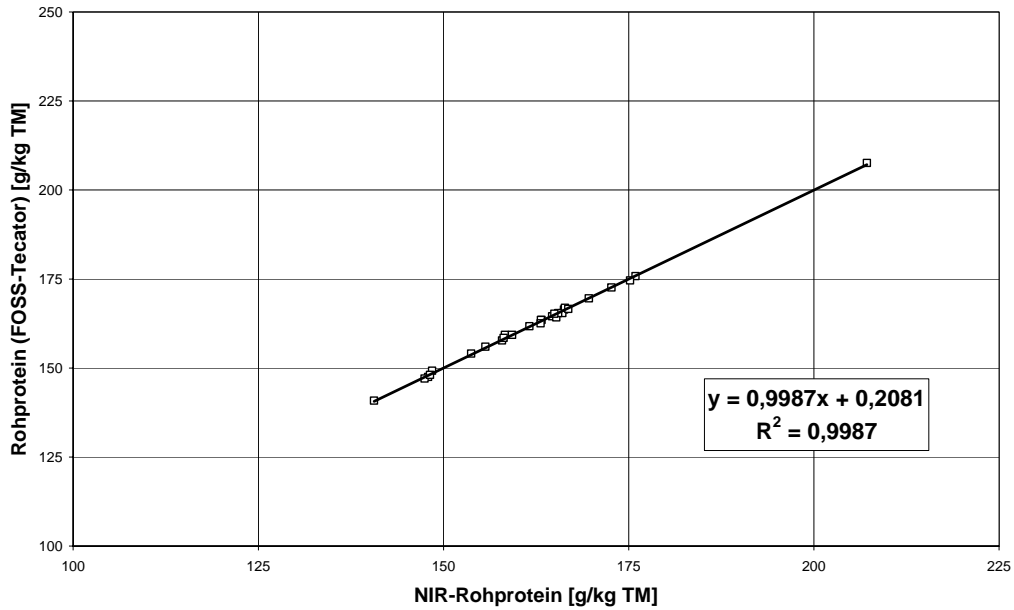


Abbildung 10: Kalibrierung mit PLS-Regression für Rohprotein (XP)

3.7 Kalibration für Rohfaser (XF)

Die Werteverteilung der 28 Silageproben ergab für die Rohfaser eine Streuung von 180 bis 285 g/kg TM, also eine breite Basis für ein Kalibrationsmodell. Die PLS-Regression zeigte eine sehr gute Erklärung der Varianz (siehe *Abbildung 11*) der NIR-Daten zu den Referenzwerten ($r^2 = 0,9925$) bei einem mittleren Schätzfehler von 2,1 g/kg TM auf. Die Vorhersagequalität in dieser ersten Tastkalibration war exzellent. Zur Zeit liegen noch keine Validierungsanalysen vor, deswegen ist es noch nicht abschätzbar wie hoch die Unsicherheit bei einer Validierung mit unabhängigen Proben ausfallen wird.

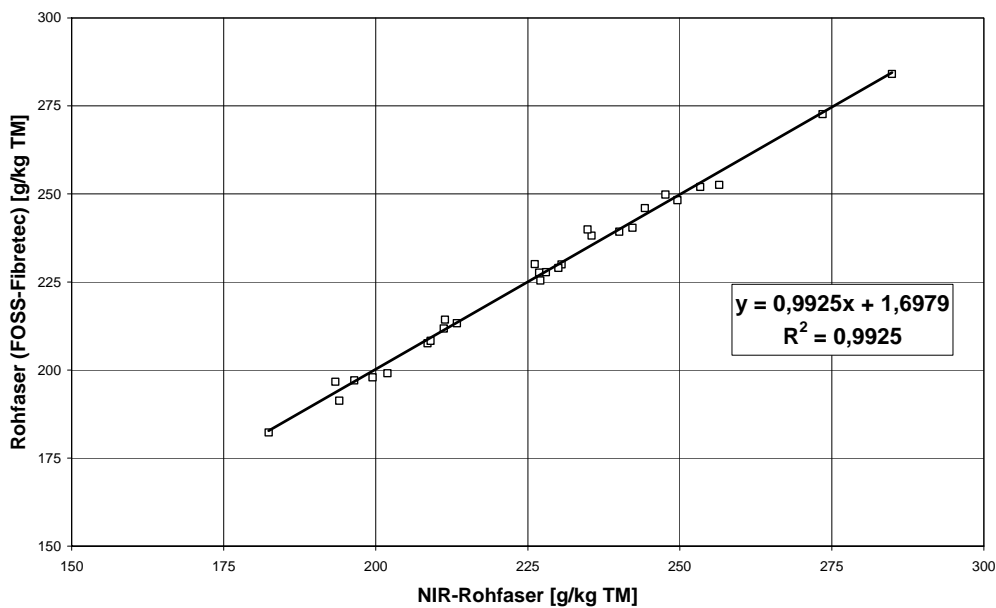


Abbildung 11: Kalibrierung mit PLS-Regression für Rohfaser (XF)

3.8 Kalibration für OM-Verdaulichkeit (dOM)

Eine weitere Untersuchung sollte zeigen, wie Referenzdaten von Futterqualitäten insbesondere die Verdaulichkeit der organischen Masse nach der in vitro-Methode TILLEY & TERRY (1963), modifiziert nach RESCH (2004) mit den NIR-Spektren korrelieren. Der Wertebereich der Referenzdaten lag zwischen 71 und 81 %, was einer sehr guten bis ausgezeichneten OM-Verdaulichkeit für Dauerwiesenfutter entspricht.

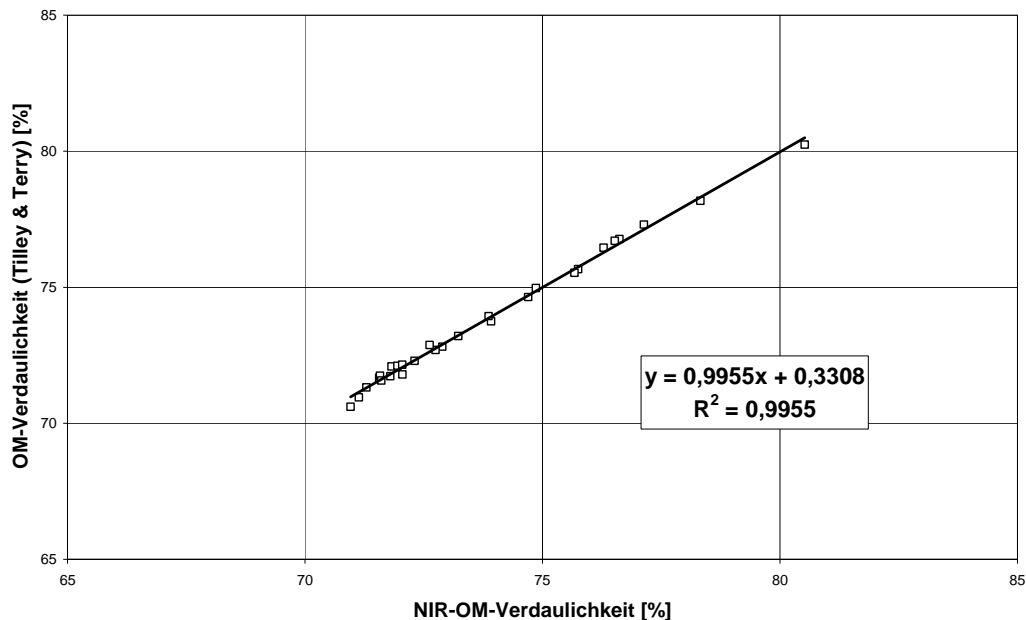


Abbildung 12: Kalibrierung OM-Verdaulichkeit

Das Ergebnis der PLS-Regression weist eine sehr gute Korrelation mit einem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,998$ auf (siehe *Abbildung 12*), der mittlere Schätzfehler von 0,16 % in der OM-Verdaulichkeit war äußerst niedrig. Dieses sehr gute Schätzergebnis lässt sich klarerweise bei einer Validierung nicht erreichen. Die Qualität eines Kalibrationsmodells wäre beim Parameter OM-Verdaulichkeit gut, wenn der mittlere Schätzfehler zwischen 1,0 und 1,5 % liegen würde.

4. Zusammenfassung und Ausblick

An der HBLFA Raumberg-Gumpenstein wurden seit 2005 Erfahrungen in der Anwendung mit einem DA-Spektrometer der Bauart ZEISS CORONA 45 VISNIR gemacht. Für die ersten Untersuchungen im Jahr 2005 wurde das Spektrometer auf einem Grünfutterparzellen-Vollernter des Typs HEGE 212 aufgebaut. Die mobile NIR-Messung auf dem Vollernter war mit arbeitstechnischen Schwierigkeiten, vor allem aber mit sehr großen Schwankungen bei Temperatur und Bewölkung verbunden.

Für die Schätzung der Trockenmasse konnte festgestellt werden, dass die versuchsinterne Kalibrierung sehr gute Korrelationen (r^2 größer 0,95) zwischen den NIR-Ergebnissen und den Ergebnissen der Referenzmethoden lieferte. Der Schätzfehler für Trockenmasse lag meistens in einer Größenordnung von 1 bis 3 g TM/kg Frischmasse. Bei der Anwendung von Kalibrationsmodellen zur Validierung mit unabhängigen Proben, kam es zu einer schlechteren Vorhersage, das Bestimmtheitsmaß als Indikator sank manchmal drastisch ab und der Schätzfehler stieg auf 5 bis 18 g TM/kg FM. Vorab können die ersten Erfahrungen im Bereich Schätzung des TM-Gehaltes von Frischfutterproben mit der Nahinfrarotspektroskopie durchaus positiv gesehen werden.

Für die Prädiktion von organischen Inhaltsstoffen wie z.B. Rohprotein, Rohfaser und OM-Verdaulichkeit wurde an der HBLFA Raumberg-Gumpenstein ein erster Tastversuch durchgeführt. Ein Sample von 28 Silagen, welche mit verschiedenen Silierzusätzen behandelt wurden, diente als Testbasis. Die erstellten Kalibrationsmodelle lieferten überraschend gute Ergebnisse. Die erste Schlussfolgerung aus diesem Tastversuch ist, dass eine versuchsinterne Kalibration für homogenes

Probenmaterial sinnvoll erscheint. Bisher wurde allerdings noch keine Validierung der Kalibrationsmodelle durchgeführt, sodass die praktische Vorhersagegenauigkeit der Modelle noch unbekannt ist.

Ab dem Versuchsjahr 2006 wurde an der HBLFA Raumberg-Gumpenstein die NIR-Messung in ein Laboratorium verlagert, wo standardisierte Umweltbedingungen herrschen. Mit diesem Schritt kann der systematische Fehler nochmals minimiert werden und es gibt gleichzeitig die Möglichkeit Proben zu messen, welche nicht mit dem Parzellenvollernter erfasst werden können.

Für organische Parameter gilt die gleiche Strategie wie für die Trockenmasse. Präzise Feldarbeit, optimale und standardisierte Probenvorbereitung für die NIRS-Messung gefolgt von der Analyse der Futterproben mit Referenzmethoden sowie die sorgfältige Erarbeitung von Kalibrationsmodellen und deren Validierung.

Die Zielsetzung der HBLFA Raumberg-Gumpenstein ist es, noch einige Jahre an gewissenhaften Anstrengungen einzusetzen, bis die NIR-Technologie für unterschiedliche Futterpflanzen optimal eingesetzt werden kann.

5. Literatur

DIETERLE, P., P. ENGLING, H. HORST, C. PAUL, D. ROBOWSKY und P. TILLMANN (2003): Die Anwendung der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) bei der Untersuchung von Futtermitteln und pflanzlichen Produkten. VDLUFA (Verband Deutscher Untersuchungs- und Forschungsanstalten) Standpunkt, Bonn 2003

HÄUSLER, RODE und PAUL (2001): In Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference, Davies, A.M.C.; Cho, R.K. eds., NIR Publications: Chischester, 2002, p.345.

RESCH, R. (2004): Die Bestimmung der in vitro-Verdaulichkeit mit der modifizierten Zweistufenmethode nach Tilley & Terry (1968) an der Bundesanstalt für Alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein. Vervielfältigtes Manuskript für das Vorlesungsseminar Grünlandwirtschaft II, Irdning / HBLFA Raumberg-Gumpenstein 19.05.2004

TILLEY, J.M.A and R.A. TERRY (1963): A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. J. Brit. Grassl. Soc. 18, 104 - 111

6. Danksagung

Im Rahmen des bilateralen Kooperationsprojektes "Ausnützung der infrarotdioden Spektrometer, die auf den Erntemaschinen angebracht sind, zur operativen Auswertung des Grünlandfutters" (Nr. 12/2006) findet durch die Zusammenarbeit von österreichischen und tschechischen Fachexperten ein sehr reger und wertvoller Erfahrungsaustausch über die NIR-Technologie statt. Für die Genehmigung dieses wichtigen Projektes und die perfekte Administration möchte ich dem Österreichischen Austauschdienst (ÖAD), insbesondere Frau Mag. Agnieszka Molozej herzlich danken. Dem Projektleiter aus der Tschechischen Republik, Herrn Ing. Pavel Nerušil und seinem Kollegen Dr. Alois Kohoutek möchte ich für die optimale Organisation von diversen Workshops, Tagungen und Exkursionen meinen aufrichtigen und herzlichen Dank aussprechen. Es war mir stets eine große Freude mit den Kollegen aus der Tschechischen Republik auf wissenschaftlicher und kollegialer Ebene erfolgreich zusammenzuarbeiten.