



# **Biomonitoring soil health in agricultural volcanic areas**

**An integrative approach**

Carolina P. F. M. Parelho

PhD Thesis

2016



**Universidade dos Açores**

Faculdade de Ciência e Tecnologia

# **Biomonitoring soil health in agricultural volcanic areas – an integrative approach**

**Carolina Paula Furtado de Medeiros Parelho**

---

**Orientadores:**

Professora Doutora Patrícia Ventura Garcia

Professor Doutor Armindo dos Santos Rodrigues

Ponta Delgada – 2016

### **Copyright Statement**

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without the author's prior consent.

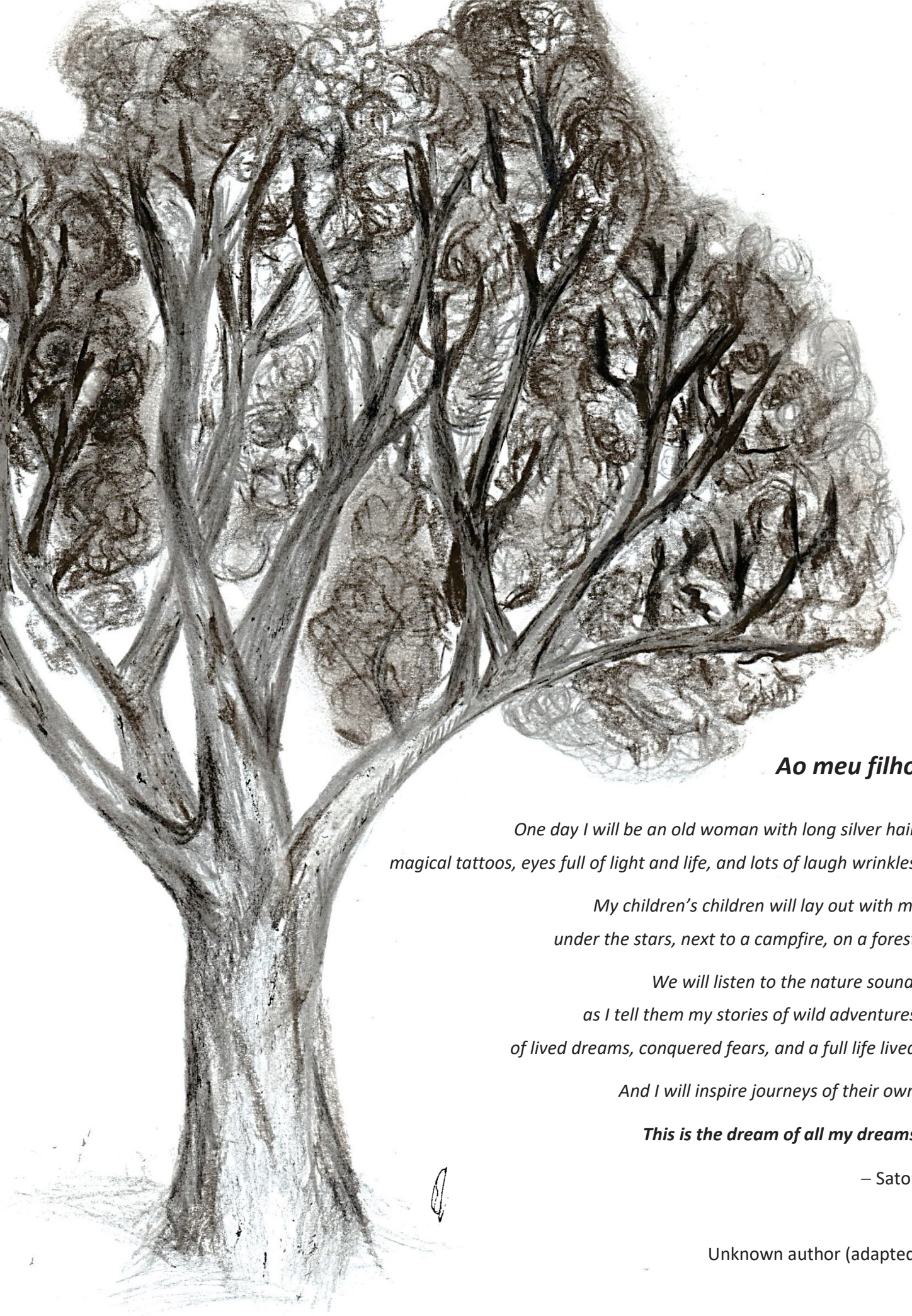
**© Carolina Paula Furtado de Medeiros Parelho, 2016**

**All rights reserved**

Dissertação apresentada à Universidade dos Açores para a obtenção do grau de Doutor em Biologia, especialidade em Biomedicina, realizada sob a orientação científica da Doutora Patrícia Ventura Garcia, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade dos Açores e do Doutor Armindo dos Santos Rodrigues, Professor Auxiliar com Agregação da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade dos Açores.

O trabalho de investigação apresentado nesta dissertação foi financiado pelo Fundo Regional da Ciência e Tecnologia sob a forma de bolsa de Doutoramento (referência: M3.1.2/F/048/2011), cofinanciada pelo Fundo Social Europeu e desenvolvido no âmbito do projeto de investigação HOLI-BioPest, financiado pela Fundação Luso Americana para o Desenvolvimento (referência: 59/12).





## ***Ao meu filho***

*One day I will be an old woman with long silver hair,  
magical tattoos, eyes full of light and life, and lots of laugh wrinkles.*

*My children's children will lay out with me  
under the stars, next to a campfire, on a forest.*

*We will listen to the nature sounds  
as I tell them my stories of wild adventures,  
of lived dreams, conquered fears, and a full life lived.*

*And I will inspire journeys of their own.*

***This is the dream of all my dreams.***

– Satori

Unknown author (adapted)



# Agradecimentos

Há 4 anos comecei o meu percurso de Doutoramento com um projeto que se dizia *holístico*. Logo de início, o peso da sua dimensão se apoderou de mim, pois tinha a clara noção que só adquirindo a mesma visão e raciocínio *integradores* dos seus objetivos, poderia me igualar ao desafio proposto. Na altura não sabia se seria capaz. Porém, ao longo do processo apercebi-me que o mais importante não são os objetivos nem os metas alcançadas, mas sim o percurso que liga as duas linhas temporais, o início e o fim. São as pessoas com quem partilhamos as pequenas vitórias, a alegria dos bons resultados, o gozo de conseguir executar corretamente uma técnica, quanto mais não seja pela limitação geográfica de uma ilha no meio do Atlântico, e a tristeza e insanidade associada a cada tentativa falhada. Muito foi feito, outro tanto ficou por fazer mas é inevitável este sentimento de realização, a clara noção de contributo. É um trabalho individual mas que foi suportado por um *ecossistema* de pessoas, às quais gostaria de expressar o meu reconhecimento e profundo agradecimento:

- Aos meus orientadores, Professora Doutora Patrícia Garcia e Professor Doutor Armindo Rodrigues, por terem aceite orientar este projeto de Doutoramento e por terem confiado nas minhas capacidades para o executar. Agradeço todo o empenho e entusiasmo que demonstraram desde o primeiro dia, a sabedoria partilhada e, acima de tudo, a exigência. Começaram como orientadores, mas acabam como amigos;

- À Universidade dos Açores, que disponibilizou todas as infraestruturas, laboratórios e equipamentos necessários à execução da componente prática deste estudo. Ao Fundo Regional da Ciência e Tecnologia, pela atribuição de uma bolsa de Doutoramento (referência: M3.1.2/F/048/2011), que permitiu a realização deste estudo. À Fundação Luso Americana para o Desenvolvimento, pelo financiamento e oportunidade de integração no projeto de investigação HOLI-BioPest (referência: 59/12). Ao Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes e ao Azorean Biodiversity Group, sem o apoio dos quais este Doutoramento não teria sido possível;

- Aos agricultores que aceitaram participar voluntariamente neste estudo, sem os quais este projeto não teria chegado a bom porto;

- À Professora Doutora Maria do Carmo Barreto, pela sua disponibilidade e por me ter iniciado no mundo das atividades enzimáticas. Obrigada pelo conhecimento, conversas e pela amizade;

- Ao Professor Doutor José Virgílio Cruz, por me ensinar que *solo* é bem mais do que *terra* e por me apresentar à Geologia. Ao Rui Mestre, por me auxiliar nas análises físico-químicas do solo;

- Ao Dr. Luís Cunha, o entusiasta das minhocas, por me auxiliar na prospeção e identificação das mesmas. Obrigada pela paciência e apoio imprescindível para realização da análise da componente molecular deste trabalho, mesmo com um oceano Atlântico de distância;

- À Nadiya Ka, que se disponibilizou para realizar a reportagem fotográfica desta tese. Obrigada também pela amizade e pelo bom chocolate;

- À colega de Doutoramento, de gabinete, das viagens e dos projetos vindouros, Diana Linhares. Agradeço a tua sinceridade e (in)sanidade mental, sei que compreendes, obrigada pelas conversas sem tema e pelas gargalhadas só porque sim. Espero que o futuro nos reserve coisas boas, a ambas;

- À Sofia Guilherme, Helena Oliveira e Nerea Velasco, pela ajuda na otimização das técnicas *Comet Assay* e *Neutral Red Uptake* e por estarem sempre disponíveis, mesmo com um oceano e país de distância. Ao Nuno Ferreira, por me iniciar ao *Integrated Biomarker Response*;

- Aos colegas de laboratório: Ana Ferreira, pela amizade e pelo precioso contributo na componente prática da análise molecular deste trabalho; Ricardo Camarinho e Filipe Bernardo, por me auxiliarem na componente dos ratinhos (vocês sabem bem qual) e das minhocas. Ao Paulo Melo, por me acompanhar nas saídas de campo e por se voluntariar para carregar todos os dispositivos pesados;

E como os últimos são os primeiros, agradeço à minha família:

- Aos meus pais, por terem acreditado sempre e por terem feito tudo ao seu alcance para que este percurso fosse suavizado. Sei que para vocês esta tese é pouco compreensível, bem como a maioria das coisas que digo quando me pedem para explicar o que faço no laboratório ... mas ainda assim são os meus maiores fãs e apoiantes, obrigada por tudo nestes últimos 33 anos. Ao meu mano, por estar sempre lá, para o que for preciso sei que posso contar contigo. À minha avó Celina, porque sei que tem um grande orgulho naquilo que a sua neta faz, e isso deu-me forças nas alturas menos boas;

- Ao meu marido, pelo constante apoio e incentivo, pela cumplicidade, carinho e amor. Obrigado por me fazeres acreditar em mim própria e nunca me deixares desistir;

- Ao meu filho Xavier, porque este percurso te roubou tempo da mamã, mas nunca reclamaste por isso. Pelo orgulho que exibis quando falas do que a mamã faz e por queres fazer igual "*Quando for grande quero trabalhar na Universidade, estudar o solo, as minhocas e os ratos ...*". Por isso e por tudo o que é impossível de descrever, esta tese é dedicada a ti meu filho.

# Abstract

Volcanic soils are unique fertile resources, with unusual andic properties that place them as highly suited, as well as vulnerable to agricultural practices. This thesis emerges as a bottom-up study, integrating soil physicochemical properties, biomarkers from belowground biota and small mammals, to assess soil health in volcanic agricultural areas. For this purpose, agricultural and livestock soils from Picos Fissural Volcanic System (São Miguel Island, Azores archipelago, Portugal), subjected to different management practices, were used as study models. The research hypothesis for this study were (1) agricultural volcanic soils exposed to anthropogenic and natural sources of soil contamination and subjected to different management practices, place distinctive pressures on resident organisms, compromising the soil health; (2) resident biota, exposed *in situ/ ex situ* to real agricultural volcanic soils, are sensitive to changes in land use type and management practices, thus can be proposed as biological indicators for soil health assessment in volcanic areas; (3) more intensive agricultural management practices place higher stress conditions to the soil ecosystem.

Overall the results clearly reveal that agricultural management practices in volcanic soils, leads to stressful conditions to the resident biota, compromising the local soil health status and provision of soil-based ecosystem services. All the biological endpoints measured in the selected biological indicators were sensitive to anthropogenic activities (land use type and soil management) and/or stressors (agrochemicals) present in soils, validating their applicability as tools to assess soil health status in volcanic areas.

Results from this study, demonstrate that present-day agricultural volcanic soils have a unique chemical heritage, set by the nature of the parent material (geogenic origin) and modulated by agricultural land use history (anthropogenic origin). Through a multivariate approach, the observed V, Ba and Hg soil loads were associated to the volcanic nature of the parent material; while, Li, P, K, Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, As, Mo, Cd and Pb were associated to the agrochemicals use. Globally, different soil management practices triggered negative effects in the local soil microbial communities, by decreasing soil microbial biomass, microbial respiration (decreased soil basal respiration) and their catabolic activities (i.e. decrease of acid phosphatase and dehydrogenase activities). Meanwhile, the most severe effects were observed in soil microbial communities under conventional management practices, suggesting that

local soil-based ecosystem services can be compromised in these agroecosystems. Moreover, the use of the Integrated Biomarker Response index (IBR), as a measurement of the combined effect of soil management practices and trace metal soil contamination on soil microbial functionality, allowed the discrimination of soil health status in agricultural volcanic soils as follow: organic > traditional > conventional. Results from the analysis of the testicular damage biomarkers in wild mice populations (*Mus musculus*) indicate that chronic exposure to conventional farming environments entails higher risks to male fertility. Mice chronically exposed to conventional management practices displayed higher Pb hepatic accumulation, further associated with disruption in seminiferous tubules, increased interstitial tissue, lack of sperm cells in luminal space and higher amount of germinal cells undergoing apoptosis. Applying the IBR, the pool of testicular damage biomarkers was summarized into a single stress value, ranked as: conventional > organic. Furthermore, the pattern of biological responses, observed in earthworms (*Amyntas gracilis*) exposed to soils from livestock production systems, reveal that relevant doses of livestock pollutants trigger sub-lethal toxicity to soil organisms encompassing key processes, such as neurotransmission, oxidative stress, cytotoxicity and DNA damage. Thus, soil health and ecosystem services delivery can be also compromised in these agroecosystems.

At the regional level, the implications of this thesis outcomes go far beyond the warning about the impact of agricultural practices in soil biology, by setting the scientific foundations upon on which should be erected management risk actions, as well as defined agricultural and land use policies adjusted to volcanic soils particularities. This thesis is the first scientific attempt to open the soil black box in agricultural volcanic areas, highlighting the soil functionality and its wider concept of health, critical for agricultural productivity and environmental sustainability. Although with a regional focus, the integrative approach of the research results represent a major advance in the international arena and a great contribute to soil science, in general.

**Keywords:** Soil health; Biological indicators; Biomarkers; Soil organisms; Integrated Biomarker Response.

# Resumo

Os solos vulcânicos são recursos naturais de reconhecida fertilidade com propriedades ândicas incomuns que os torna adequados à exploração agrícola, bem como suscetíveis às práticas agrícolas. Esta tese surge como um estudo holístico, integrando propriedades físico-químicas dos solos, biomarcadores de organismos dos solos e pequenos mamíferos, para a determinação do estado de saúde dos solos agrícolas em áreas vulcânicas. Para este objetivo, solos de sistemas agrícolas e de produção animal localizados no Sistema Vulcânico Fissural dos Picos (São Miguel, Açores, Portugal), sujeitos a diferentes práticas agrícolas, foram utilizados como modelos de estudo. As hipóteses científicas deste estudo foram (1) solos agrícolas vulcânicos expostos a fontes antropogénicas e naturais de contaminação do solo e sujeitos a diferentes práticas agrícolas, exercem diferentes pressões nos organismos residentes, comprometendo o estado de saúde do solo; (2) organismos residentes, expostos *in situ/ex situ* a solos agrícolas vulcânicos, são sensíveis a mudanças de tipo do uso dos solos e práticas agrícolas, logo podem ser propostos como indicadores biológicos do estado de saúde dos mesmos; (3) práticas agrícolas mais intensivas colocam maiores condições de stress ao ecossistema do solo.

Globalmente, os resultados revelam que práticas agrícolas em solos vulcânicos, conduzem a condições de stress para os organismos residentes, comprometendo o estado de saúde do solo e provisão dos serviços ecossistémicos por eles gerados. Todos os biomarcadores analisados nos indicadores biológicos selecionados, demonstraram-se sensíveis às atividades antropogénicas (tipo do uso dos solos e práticas agrícolas), bem como à presença de stressores (agroquímicos) no solo, validando a sua aplicabilidade como ferramentas para a biomonitorização do estado de saúde dos solos agrícolas em regiões vulcânicas.

Os resultados deste estudo demonstram que os solos agrícolas vulcânicos possuem uma herança química singular, definida pela natureza do material parental (origem geogénica) e modelada pelo historial agrícola (origem antropogénica). Através de uma abordagem multivariada, as concentrações de V, Ba e Hg observadas nos solos foram associadas à natureza vulcânica do material parental; enquanto que as concentrações de Li, P, K, Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, As, Mo, Cd e Pb foram associadas ao uso de agroquímicos. Em geral, diferentes práticas agrícolas desencadearam efeitos negativos sobre as comunidades microbianas do solo locais, diminuindo a biomassa

microbiana, respiração (diminuição da respiração basal do solo) e suas atividades catabólicas (i.e. diminuição da atividades das enzimas fosfatase ácida e desidrogenase). No entanto, os efeitos mais severos foram observados nas comunidades microbianas de solos sob práticas agrícolas convencionais, sugerindo que os serviços ecossistêmicos por elas gerados, poderão estar comprometidos nestes agroecossistemas. Ademais, o uso do índice Integrated Biomarker Response (IBR), como medida do efeito combinado das práticas agrícolas e contaminação dos solos com metais-traço na funcionalidade dos microrganismos do solo, permitiu a discriminação do estado de saúde dos solos como: orgânico > tradicional > convencional. Os resultados da análise dos biomarcadores de dano testicular em populações de ratinhos selvagens (*Mus musculus*), indicam que a exposição crônica a ambientes agrícolas convencionais, desencadeia maior risco para a fertilidade masculina. Ratinhos cronicamente expostos a práticas agrícolas convencionais apresentaram maior acumulação hepática de Pb, posteriormente associada à disfunção dos túbulos seminíferos, aumento do espaço intersticial, ausência de células espermiáticas no espaço luminal e maior número de células germinativas em apoptose. Através da aplicação do IBR, o conjunto inicial de biomarcadores de dano testicular foi integrado e sumarizado num único valor de stress, classificado como: convencional > orgânico. O padrão de respostas biológicas observado em minhocas (*Amyntas gracilis*) expostas a solos provenientes de sistemas de produção animal, revelam a presença de doses relevantes de poluentes nestes agroecossistemas, associada a toxicidade subletal para os organismos do solo, englobando processos biológicos como neurotransmissão, stress oxidativo, citotoxicidade e dano genético. Assim, o estado de saúde do solo e provisionamento de serviços ecossistêmicos poderá estar comprometido neste tipo de agroecossistemas.

A nível regional, as implicações dos resultados desta tese vão para além do alerta do impacto das práticas agrícolas sobre a biologia dos solos. Nela são definidos os fundamentos científicos a partir dos quais deverão erguidos medidas de gestão de risco, assim como, definidas medidas de uso do solo e políticas agrícolas ajustadas às particularidades dos solos vulcânicos. Esta tese é a primeira tentativa de abertura da “caixa negra” dos solos agrícolas em regiões vulcânicas, na qual é atribuído um especial realce à funcionalidade do solo como um conceito mais abrangente do seu estado de saúde, elementar para a produtividade agrícola e sustentabilidade ambiental. Apesar do foco regional, a abordagem integradora aplicada aos resultados

da investigação, constituem um grande avanço na arena internacional e um grande contributo para a ciência do solo, em geral.

**Palavras-chave:** Saúde do solo; Indicadores biológicos; Biomarcadores; Organismos do solo; Integrated Biomarker Response.



# Preface

Volcanic soils are unique naturally fertile resources, mainly due to their particular andic properties. However, some unusual properties of these soils place them as vulnerable to anthropogenic activities. The particular physicochemical properties of volcanic soils (i.e. high organic matter content, low bulk density, high phosphorus retention and great water retention capacity), coupled with a natural enrichment with a high range of trace metals (volcanic heritage), places them as highly suited for agricultural purposes. Nevertheless, these soils also enclose a more unknown aspect, the presence of nanominerals derived from the weathering of the tephra material, providing distinctive features to these resources, namely greater binding properties to metal cations. Therefore, the long-term use of agrochemicals (anthropogenic input) in agricultural volcanic soils can led to the silent increase of the natural trace metals background up to critical loads, triggering undesirable effects to the resident biota, compromising the soil associated ecosystem goods and services, and thus the well-being. Herein lays a deeper and undisclosed aspect of volcanic soils, simultaneously acting as ecosystem sink and source of toxic substances, an unusual soil feature that can assume particular relevance in areas were agriculture is the primary sector of economic activity and income, such as in islands systems.

This thesis is the first regional effort in Azores archipelago towards bringing together agroecosystem bottom-up soil health data, an integrative approach to provide advanced knowledge about the health of volcanic soils, a necessary tool to design and implement strategies to the sustainable use of volcanic soils, for agricultural purposes.

Carolina Parelho



*“The nation that destroys its soil, destroys itself.”*

- Franklin D. Roosevelt, Letter to all State Governors on a Uniform Soil Conservation Law, 1937.

# Contents

	<b>Page</b>
Agradecimientos _____	vii
Abstract _____	ix
Resumo _____	xi
Preface _____	xv
List of figures _____	xix
List of tables _____	xx
List of appendix figures _____	xxi
List of appendix tables _____	xxi
<b>Chapter 1</b>	
<b>General introduction</b> _____	1
Hypotheses, main objective and thesis outline _____	22
References _____	25
<b>Chapter 2</b>	
<b>Linking trace metals and agricultural land use in volcanic soils</b>	
<b>– A multivariate approach</b>	
Abstract _____	35
Introduction _____	37
Material and methods _____	38
Results and discussion _____	43
Conclusion _____	53
Acknowledgments _____	54
References _____	55
<b>Chapter 3</b>	
<b>Assessing microbial activities in metal contaminated agricultural</b>	
<b>volcanic soils – An integrative approach</b>	
Abstract _____	61
Introduction _____	63
Material and methods _____	64
Results _____	71
Discussion _____	74

	Conclusion	79
	Acknowledgments	80
	References	81
<b>Chapter 4</b>	<b>Testicular damage and farming environments – An integrative ecotoxicological link</b>	
	Abstract	89
	Introduction	91
	Material and methods	93
	Results	99
	Discussion	104
	Conclusion	107
	Acknowledgments	108
	References	109
<b>Chapter 5</b>	<b>Earthworms (<i>Amyntas gracilis</i>) as biological tools for soil ecotoxicity assessment in livestock production systems</b>	
	Abstract	115
	Introduction	117
	Material and methods	119
	Results	126
	Discussion	131
	Conclusion	136
	Acknowledgments	136
	References	137
<b>Chapter 6</b>	<b>Conclusion and final considerations</b>	
	Conclusion	143
	Final considerations	149
	References	152
Appendix		153

# List of figures

	<b>Page</b>
<b>1.1</b> Relationships between the activities of the soil biota and a range of ecosystem goods and services that society might expect from agricultural soils _____	6
<b>1.2</b> Draft framework for ecosystem services provision from soils natural capital _____	8
<b>1.3</b> Diagram of the organization of the thesis and the workflows between chapters _____	24
<b>2.1</b> São Miguel island location in the Azores archipelago and sample locations _____	40
<b>2.2</b> Factorial Discriminant Analysis plot (with 2 discriminant functions) for the studied agricultural farming systems _____	53
<b>3.1</b> Location of the Azores archipelago in the North-Atlantic Ocean. Inset: São Miguel Island with farms location (conventional, traditional and organic farming systems) and reference site _____	65
<b>3.2</b> Biological response score star plot and Integrated Biomarker Response in conventional, traditional and organic farming systems and reference site _____	74
<b>4.1</b> Location of the Azores archipelago in the North-Atlantic Ocean. Inset: São Miguel Island with farms location (conventional and organic farming systems) and reference site _____	94
<b>4.2</b> Histology of the seminiferous tubules, TUNEL assay for apoptotic DNA fragmentation and Integrative biomarker response for testicular damage biomarkers _____	101
<b>5.1</b> Location of the Azores archipelago in the North-Atlantic Ocean. Inset: São Miguel Island with study sites location _____	120

# List of tables

	<b>Page</b>
<b>2.1</b> Mean ( $\pm$ SD) values of soil physicochemical properties from conventional, traditional and organic farming systems and reference site _____	45
<b>2.2</b> Mean ( $\pm$ SD) concentration of trace metals ( $\text{mg kg}^{-1}$ , d.w.) in topsoil samples (0-20 cm) from conventional, traditional and organic farming systems _____	46
<b>2.3</b> Enrichment factor of trace metals in soils from different farming systems _____	50
<b>2.4</b> Principal component matrix with loadings, eigenvalues, variability and cumulative spatial variations of variables and factors _____	51
<b>3.1</b> Mean ( $\pm$ SD) concentration of trace metals ( $\text{mg kg}^{-1}$ , d.w.) and soil physicochemical properties in topsoil samples (0-20 cm) from conventional, traditional and organic farming systems and reference site _____	67
<b>3.2</b> Mean values ( $\pm$ SD) of soil microbial activities in topsoil samples (0-20 cm) from conventional, traditional and organic farming systems and reference site _____	72
<b>4.1</b> Mean ( $\pm$ SD) concentration of trace metals ( $\text{mg kg}^{-1}$ , d.w.) in mice liver _____	99
<b>4.2</b> Mean values ( $\pm$ SD) for the biomarkers of testicular damage _____	102
<b>4.3</b> Principal component matrix with loadings, eigenvalues, variability and cumulative spatial variations of variables and factors _____	103
<b>5.1</b> Mean values ( $\pm$ SD) of soil physicochemical properties and concentration of trace metals in topsoil samples (0-20 cm) from the livestock production system and reference site _____	127
<b>5.2</b> Biochemical responses of earthworm <i>Amyntas gracilis</i> exposed (T0, T1, T7 and T14 days) to the experimental soils _____	129
<b>5.3</b> Mean frequency (%) ( $\pm$ SD), of each DNA damage class measured by the comet assay, in coelomocytes of <i>Amyntas gracilis</i> exposed to the experimental soils _____	130

## List of appendix figures

	<b>Page</b>
<b>A.1</b> Description of the soil sampling and design schemes to assess the microbial activities in the studied farming systems and reference site _____	155
<b>A.2</b> Mesocosm experimental setup using <i>Amyntas gracilis</i> as tools for the ecotoxicity assessment of soils from livestock production systems _____	156

## List of appendix tables

	<b>Page</b>
<b>A.1</b> Characterization of each studied farm system and reference soil, regarding the years of exploitation under the corresponding farming system and use of agrochemicals _____	157
<b>A.2</b> Factorial Discriminant Analysis Wilks' Lambda for testing discriminant function validity _____	158
<b>A.3</b> Structure matrix of the discriminant functions in Factorial Discriminant Analysis with loadings, eigenvalues, variability, cumulative spatial variations and canonical correlation of variables _____	159
<b>A.4</b> Age normalized bioaccumulation factor for each trace metal in mice group from the reference site, organic and conventional farming sites _____	160