



ESCOLA DE DOUTORAMENTO  
INTERNACIONAL EN CIENCIAS  
E TECNOLOXÍAS DA USC

Sofía  
Debén García

*Tese de doutoramento*  
*Biomonitoring of water*  
*quality by aquatic*  
*bryophytes: optimization and*  
*methodological harmonization*

Santiago de Compostela, 2018



TESE DE DOUTORAMENTO

**BIOMONITORING OF WATER QUALITY BY  
AQUATIC BRYOPHYTES: OPTIMIZATION AND  
METHODOLOGICAL HARMONIZATION**

SOFÍA DEBÉN GARCÍA

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN MEDIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018



## DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

### **Biomonitoring of water quality by aquatic bryophytes: optimization and methodological harmonization**

D./Dna. Sofía Debén García

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

*En Santiago de Compostela, Xullo de 2018*

Asdo. Sofía Debén García



## AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

Biomonitoring of water quality by aquatic bryophytes: optimization  
and methodological harmonization

**Dr. J. Ángel Fernández Escribano y Dr. Jesús R. Aboal Viñas**

INFORMAN:

*Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por **Dna. Sofía Debén García**, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, Xullo de 2018*

Asdo. Dr. J. Ángel Fernández Escribano

Asdo. Dr. Jesús R. Aboal Viñas



This Doctoral Thesis was partly financed by the Spanish Government (project CTM2016-70578-P) and by the FEDER funding. In addition, Sofía Debén García was supported by a pre-doctoral fellowship from the Ministry of Economy and Competitiveness (BES-2012-052100) (Spanish Government).





A mis padres y herman@s,  
a Carlos, Nora y Elsa

# CONTENTS

**15**

**23**

**27**

**59**

**95**

**117**

**135**

**141**

**147**

**153**

**165**



# GENERAL INTRODUCTION

# GENERAL OBJECTIVES

**CHAPTER I** *Inland water quality monitoring with native bryophytes: a methodological review. Ecological Indicators 53(2015): 115-124*

**CHAPTER II** *Monitoring river water quality with transplanted bryophytes: a methodological review. Ecological Indicators 81 (2017) 461–470*

**CHAPTER III** *Using devitalized moss for active biomonitoring of water pollution. Environmental Pollution 210 (2016) 315-322*

**CHAPTER IV** *Improving active biomonitoring in aquatic environments: the optimal number and position of moss bags. Ecological Indicators 93 (2018) 753–758*

# GENERAL DISCUSSION

# GENERAL CONCLUSIONS

# GENERAL REFERENCES

# SUMMARY (RESUMEN)

# ACKNOWLEDGMENTS



# GENERAL INTRODUCTION





# General Introduction

Fresh water is one of the most important natural resources. It is a basic component of ecosystems, plays a crucial role in climate regulation and is essential for life. Notwithstanding, it has recently been estimated that only 20% of the world's population is free from threat to water security and that more than half of the habitats associated with inland waters are seriously threatened (Vörösmarty et al., 2010). Therefore, balancing the water needs of human populations and ecosystems is essential for sustainable development, and global management of water is fundamental (UNESCO 2009; UNDP, 2006).

Relevant, accurate and reliable information on water quality is essential for the development of scientifically-based policies and integrated strategies for watershed management. Such information, which must be easy to understand and interpret, can be obtained through monitoring programmes (Behmel et al., 2016). The implementation of national and transnational monitoring programmes supported by legislative measures is now a reality worldwide (e.g. US National Water-Quality Assessment Project; the EU Water Framework Directive: 2000/60/EC, hereafter, WFD). However, although many of these programmes include biological and hydromorphological controls for integrated diagnosis of contamination, chemical determination of the levels of pollutants in the water column (e.g. heavy metals and organic compounds) is still the main tool used to monitor water quality.

Ideally, this control should be carried out by a real-time monitoring. Numerous advances have been made in this regard in recent years: for example, Ion-Selective Electrodes (ISEs) are now available for in-situ quantification of  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_3$  and pH; colorimetric methods can be used to quantify  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{PO}_4$  and total phosphorus; optical sensors (UV-VIS spectroscopy) are available for determining a range of parameters including dissolved organic carbon (DOC) and  $\text{NO}_3$ ; and fluorescence sensors can be used to detect molecular compounds such as proteinaceous material and hydrocarbons, as well as to quantify parameters such as chlorophyll a and dissolved oxygen (DO) (Bende-Michl and Hairsine, 2010). However, the use of these techniques remains

limited to a few physicochemical parameters and pollutants. Moreover, treating the information that can be extracted from these techniques is both costly and technically complex, because of the enormous amount of data produced. The control of most priority substances (e.g. heavy metals, PAHs, PCBs) included in the WFD is therefore traditionally done by sporadic sampling of water bodies. However, the data thus obtained reflect the concentrations of pollutants at the time of sampling, but do not detect intermittent or episodic contamination events (Greenwood and Roig, 2006). The use of water autosamplers enables the timing and number of measurements to be increased, but the sampling remains limited by the small volumes obtained, and, moreover, unfiltered samples may degrade if not preserved or processed quickly (Blaen et al., 2016).

To solve this problem, the WFD recommends (in its Guidance document No. 25) the use of biota to monitor contaminants and thus provide a realistic estimate of the impact of bioavailable forms of pollutants in aquatic environments. According to the WFD criteria, fish, macroinvertebrates (mainly mussels, crustaceans and annelids) and bryophytes (mosses and liverworts) are the most suitable organisms for use as biomonitoring agents (Besse et al., 2012). Fish appear to be ideal monitoring organisms for verifying compliance with environmental quality standards, as the WFD objectives are aimed at human health and predators at high trophic levels. Unfortunately, the strong metabolic control that fish exert over certain pollutants (e.g. PAHs) limits their use as reliable bioindicators. In addition, their high mobility enables them to avoid episodes of contamination, which makes it difficult or impossible to obtain bioaccumulation data that refer to specific locations. Moreover, in the absence of native fish, the use of caged specimens of fish is usually of limited success owing to logistic limitations (size, management, feeding) and the response to stress (which may lead to bias in the results). The use of macroinvertebrate species may therefore be preferred as these organisms are an important source of food for fish, they are often found at high densities in freshwater habitats and their small size allows them to be placed in cages at different sites. However, several biotic factors can potentially interfere with the monitoring results, such as growth rate, life stage, reproductive cycle and food availability. Furthermore, analytical problems may arise due to a lack of

sufficient biomass, temporality, etc., and specific models are needed to enable comparison of data. Finally, although bryophytes are very far from humans in food chains, they can act as excellent biomonitors of trace elements and accumulators of metals, PAHs, PCBs, and products related to human health and agriculture (Burton, 1990; Tyler, 1990; Whitton, 2003; Gecheva and Yurukova, 2014). Moreover, the use of bryophytes rather than fish or macroinvertebrates has some important advantages: i) pollutant uptake is mainly passive and almost independent of biotic factors, and the concentration of pollutants accumulated in bryophytes is therefore strongly correlated with the average concentration in the water; ii) bryophytes usually have long life cycles; iii) they are easily collected, identified and transplanted; iv) they are very resistant to pollution and adverse environmental conditions; v) they do not need to be fed; vi) they are not invasive; and, vii) their use does not imply ethical problems.

For all the above reasons, aquatic bryophytes that grow in certain locations (i.e. native bryophytes) can be used as a reliable, simple and economical tool for biomonitoring the aquatic environment (passive biomonitoring). The specific kinetics of pollutant bioconcentration in mosses (Carballeira and López, 1997) and the anatomical and physiological characteristics of these organisms together make the technique one of the few effective both for precisely locating contamination sources (Mouvet et al., 1986) and for detecting intermittent or sporadic contamination (Say et al., 1981). In addition, analysis of a single sample enables simultaneous monitoring of a large number of contaminants (organic and inorganic) as well as evaluation of water quality at small scales (e.g. close to possible contamination sources) and large scales (e.g. regional).

Moreover, mosses can be collected from unpolluted sites or cultivated in the laboratory and easily transplanted (active biomonitoring, so-called "moss bag technique") to target areas. The moss bag technique resolves various problems related to passive biomonitoring: i) it can be used in sites where native mosses are scarce or absent as a result of unfavourable climatic conditions (Giordano et al., 2009); ii) it eliminates possible genotypic or phenotypic adaptation of native mosses to contaminants in polluted areas (Bargagli, 1998); iii) temporal interpretation of the results is improved by standardization of the exposure

time; and iv) the magnitude of the pollution can be assessed because the initial concentrations of elements in the transplants are known.

A glance at the relevant literature reveals that one of the main impediments to the widespread use of these techniques is the lack of standardized protocols. The different protocols used are almost as numerous and varied as the times that the techniques have been applied, and the scarcity of studies addressing methodological aspects reflects the lack of concern about the effects that these differences may have on the results. Hence, the first task of this doctoral research will be to address this problem in two critical reviews of the methodology used for passive and active biomonitoring (Chapters I and II).

Because of the advantages of the use of transplanted mosses over the use of native mosses, the research efforts then will focus on optimizing some of the key methodological aspects of applying the moss bag technique. Once determined that live mosses must be replaced with devitalized mosses for biomonitoring purposes (Chapter II), as devitalizing treatments can prevent interference due to metabolism and thus improve comparisons between the results of different surveys (Castello, 1996; Adamo et al., 2007, 2008; Giordano et al., 2009; Tretiach et al., 2007), progress in the standardization of the technique could not be made without studying how different devitalization methods influence use of the technique. Thus, in Chapter III, the optimal devitalizing treatment will be selected as a compromise between the loss of material during the exposure period and the uptake of pollutants from water.

In addition to be considered suitable biomonitoring agents, mosses should not only be able to capture elements from the environment, but also represent the local variability in the concentrations of different contaminants at the sampling site during the exposure. Furthermore, the validity of the technique also depends on its capacity to demonstrate significant differences in the concentrations of a pollutant at different sampling sites. All of these factors are directly related to the number and location of the moss bags used in a sampling site. However, until now very variable numbers of moss bags (between 1 and 12) have been used (e.g. Bruns et al., 1995; Yurukova and Gecheva, 2003). Due

to the importance of this aspect of the technique, a first recommendation will be made in Chapter II, based on the option most frequently used to date. Nonetheless, specific study of this aspect will be necessary to optimize the number and position of moss bags that should be used in biomonitoring studies, on the basis of statistical findings (Chapter IV).





# GENERAL OBJECTIVES





# General Objectives

The first objective of this doctoral research was to propose harmonised protocols for using bryophytes as passive and active biomonitors of water quality. For this purpose, the methodology of the studies published between 1979 and 2013 (for native mosses) and between 1989 and 2015 (for transplanted mosses) involving the estimation of water contaminants with aquatic mosses were reviewed. The information this obtained enabled, on the one hand, unification of the available information and proposal of a scientifically-based protocol and, on the other hand, identification of the less well studied methodological aspects that will require further research (Chapters I and II).

The second objective was to optimize various aspects of the moss bag technique. For this purpose, the effects of the devitalization treatments on loss of material during exposure of the transplants and on the accumulation of different heavy metals and metalloids was studied, and the optimal method of devitalizing mosses for use in active biomonitoring of water pollution was selected (Chapter III). Furthermore, the optimal number and position of moss bags for use in biomonitoring studies was determined by statistical analysis of the data obtained from a large number of transplants located in different scenarios and of the local variability in the metal concentrations within sampling sites (Chapter IV).



# CHAPTER I





# Inland water quality monitoring with native bryophytes: a methodological review

**Ecological Indicators 53(2015): 115-124**

S. Debén<sup>a</sup>, J.R. Aboal<sup>a</sup>, A. Carballeira<sup>a</sup>, M. Cesa<sup>b</sup>, C. Real<sup>c</sup>, J.A. Fernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Área de Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, 15782  
Santiago de Compostela, Spain

<sup>b</sup>University of Trieste, Department of Life Sciences, Via Giorgieri 10, I-34127 Italy

<sup>c</sup>Área de Ecología, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Santiago de Compostela,  
27002 Lugo, Spain

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.01.015>





# CHAPTER II





# Monitoring river water quality with transplanted bryophytes: a methodological review

**Ecological Indicators 81 (2017) 461–470**

S. Debén<sup>1</sup>, J.R. Aboal<sup>2</sup>, A. Carballeira<sup>1</sup>, M. Cesa<sup>2</sup>, J.A. Fernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Área de Ecología, Departamento de Biología Funcional, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup>University of Trieste, Department of Life Sciences, Via Giorgieri 10, I-34127 Trieste, Italy

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.014>





# CHAPTER III





# Using devitalized moss for active biomonitoring of water pollution

**Environmental Pollution 210 (2016) 315-322**

S. Debén, J.A. Fernández, A. Carballeira, J.R. Aboal

*Área de Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.009>





# CHAPTER IV



U



# Improving active biomonitoring in aquatic environments: the optimal number and position of moss bags

**Ecological Indicators 93 (2018) 753–758**

S. Debén<sup>a</sup>, J.A. Fernández<sup>a</sup>, A. Carballeira<sup>a</sup>, G. Kosior<sup>b</sup>, J.R. Aboal<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Ecology Unit, Department of Functional Biology, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

<sup>b</sup> *Department of Ecology, Biogeochemistry, and Environmental Protection, University of Wrocław, ul. Kanonia 6/8, 50-328, Wrocław, Poland*

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.05.058>







# GENERAL DISCUSSION



# General Discussion

To develop management strategies for assessing freshwater quality, it is essential to have available monitoring programmes that provide relevant, accurate and reliable information about the water quality. Ideally, monitoring of water quality should be carried out in real time. However, this is a technically complex task, expensive and limited to a few physicochemical parameters and fewer pollutants. Hence, water quality is traditionally monitored by sporadic water sampling, and the chemical analysis of the samples, despite the associated problems (e.g. possible underestimation of contaminants when the source of the pollution is intermittent or sporadic, or overestimation of the contamination when the pollutants are present in the environment mostly in non bioavailable forms). In an attempt to solve these problems, different biomonitoring organisms (e.g. fish, algae, mussels, bryophytes) have been used over the years (Burton and Peterson, 1979; Kelly and Whitton, 1989; Mersch and Johansson, 1993) to monitor water quality. Aquatic bryophytes have proven to be some of most suitable organisms for this purpose.

Moss biomonitoring can be done with native mosses (i.e. passive biomonitoring) or with mosses transplanted from an unpolluted to a target study site (i.e. active biomonitoring). Thus, in the first part of this thesis, the most up-to-date methods of using aquatic mosses to biomonitor water pollution were investigated in order to harmonize the key methodological aspects of both passive and active biomonitoring techniques. The research reported in Chapter I led to definition of a protocol that unifies the available information on the passive monitoring technique, with 13 methodological aspects grouped into 3 key steps (i.e. sampling design, sample collection and sample processing). The research reported in Chapter II enabled definition of a protocol for the active monitoring technique, with 17 methodological aspects grouped into 4 key steps (i.e. selection and preparation of the bryophytes, preparation of the moss bags, exposure of the transplants and post-exposure treatments).

Furthermore, the methodological limits of the techniques were also identified. Both reviews enabled assessment of the consistency between the methods used to date and the proposed recommendations and highlighted the general lack of attention given to developing the methodology, the low degree of standardization of each aspect of the techniques and the importance of developing standardized protocols for applying the techniques. Although many of the recommendations summarized in these protocols are based on the most commonly used option to date (e.g. the number of sampling sites used for passive biomonitoring or the number of moss bags for active biomonitoring) and therefore they are not completely standardized, these protocols will serve as guidelines for the use bryophytes to biomonitor water pollution aimed to improve the quality and the comparability of the results obtained in different studies.

Despite these recommendations, the passive biomonitoring technique has numerous limitations that prevent its widespread use by environmental protection authorities as a tool for routine environmental monitoring. Some of these limitations (e.g. possible absence of native plants, phenotypic or genotypic adaptation to contaminants or problems with the temporal interpretation of the results) can be resolved by using moss transplants (Bargagli, 1998; Giordano et al., 2009).

Two of the most important changes proposed in Chapter II in relation to the use of the moss bag technique are: i) culturing the moss in the laboratory instead of collecting moss in the field, and ii) the use of devitalized moss instead of live moss. Both of these advances help convert the technique into a biotechnological tool capable of producing large amounts of material that can be stored until required for use, thus resolving one of the main limitations to the method (the year-round availability of homogeneous material that is ready to be transplanted in the target locations).

To undertake the task of optimizing the moss bag technique, the second part of this thesis begins with the selection of the optimal devitalizing treatment (Chapter III) considering the effects that the different treatments studied

(i.e. oven-drying at 100°C, oven-drying with a 50-80-100°C temperature ramp and boiling in water) have on the loss of material during exposure of the transplants and on the accumulation of different heavy metals and metalloids. Devitalization by boiling in water appears a priori to be appropriate for aquatic organisms, and indeed it has less effect on the structure of the moss and therefore causes significantly less loss of material ( $p < 0.01$ ) than oven-drying treatments. However, oven-drying by increasing the temperature in stages yielded more stable results regarding both loss of material and accumulation of elements. This was therefore the devitalization method recommended for moss samples.

There are other problems associated with the technique, as until now there was a total lack of knowledge about the representativeness of the results obtained. No previous studies have considered the number of moss bags that should be used and their position within a sampling site: the number of moss bags used is therefore generally very variable (between 1 and 12) (e.g. Bruns et al., 1995; Yurukova and Gecheva, 2003) and information is not usually provided about the position. Therefore, 4 stretches (length 50 m) in 4 different rivers were selected for studying the local variability in element concentrations in 50 moss bags exposed within each sampling site (Chapter IV) in order to determine the optimal number and position of the moss bags, based on statistical evidence. Thus, a greater number of moss bags (at least 6) than generally used to date should be used for biomonitoring water pollution with aquatic bryophytes.

Finally, despite the advances reported here, some aspects still remain to be standardized, especially those related to the preparation of the moss before transplanting (e.g. washing with cellular extractants), preparation of the moss bags (e.g. weight/surface ratio) and exposure of the bags (e.g. depth, effect of current speed). All of these aspects must be addressed in future studies.





# GENERAL CONCLUSIONS



# General conclusions

The lack of harmonization of the passive biomonitoring of inland waters with bryophytes hampers the use of the technique. Taking into account the results of studies carried out during years of application of the technique, especially those studies that focus on the methodology, an optimized protocol for use of the technique is proposed:

Methodological aspects	Recommendations
1. Sampling design	
1.1. Season and frequency of sampling	At least once sampling per season (2-4 samplings per year).
1.2. Number of sampling sites (SS)	2 SS/water body in studies of contamination sources. 1 SS/water body in extensive studies.
1.3. Spatial representativeness of the SS	-
1.4. Selection of monitoring species	<i>Fontinalis</i> spp, <i>F. antipyretica</i> . In the absence of these, <i>Platyhypnidium riparioides</i> or <i>Brachythecium rivulare</i> .
2. Sample collection	
2.1. General precautions	Collection of totally submerged plants. Avoid possible secondary sources of contamination.
2.2. Extent of SS	50 metres.
2.3. Sample characteristics	Composite sample: 30 subsamples, each of 10 g fw.
2.4. In situ cleaning	Cleaning <i>in situ</i> .
Rinsing	Rinsing.
Means of transportation to laboratory	Plastic Zip-lock bags.
Pre-washing storage	Fresh weight (at 4 °C, no longer than 3 days).
3. Sample processing	
3.1. Method of cleaning/ washing	Manual cleaning, without washing.
Number of washes	
Duration	
Shaking	
Type of water	
Weight moss / Volume of water	
3.2. Selection of material for analysis	Green parts.
3.3. Drying	Drying at 40°C for 24 h plus drying an aliquot at 100 °C to constant weight for accurate determination of dry weight of the material.
3.4. Homogenization	Mill components made of titanium, zirconium or corundum.
3.5. Post-cleaning storage	Glass recipients.

The use of transplanted bryophytes resolves most of the problems associated with the use of native specimens. Nevertheless, also for this technique there is a lack of standardization of the methodology that hampers comparison of the results obtained in different studies and the use of the technique by environmental protection authorities as a tool for routine environmental monitoring.

One of the main advances proposed in this thesis is the use of devitalized material. Devitalization treatment brings the technique closer to biotechnology than to classical biomonitoring, improving the applicability of the technique as it enables the preparation of ready-to-use and easily stored kits of material. For use of mosses to biomonitor contamination of aquatic environments, devitalization of the moss *F. antipyretica* by oven-drying with a temperature ramp is recommended. While the terrestrial moss *S. denticulatum*, commonly used in atmospheric biomonitoring, is not suitable for use in aquatic environments.

Moreover, for a correct application of the technique, it is important to establish the representativeness of the sampling site. In this respect, the evidences provided in this thesis allow to conclude that at least 6 moss bags should be used in biomonitoring studies and that the position of the moss bags along the width and length of stream (within a 50 m long homogeneous stretch) did not affect the results obtained (always avoiding the edges of the stream and rinsing as thoroughly as possible *in situ* after the exposition).

Considering the results of previous studies involving the application of the technique, especially those studies that focus on the methodology and those carried out for this doctoral research, an optimized protocol for use of moss transplants is proposed:

Methodological aspects	Recommendations
1. Selection and preparation of the bryophytes	
1.1. Selection of monitoring species	<i>F. antipyretica</i> or <i>P. riparioides</i>
1.2. Sample collection	
Selection of the reference site	Laboratory culture
1.3. Selection of material for transplant	Green parts of the shoot or apical segments (2-3cm)
1.4. Pre-exposure treatment	
1.4.1. Washing with cellular extractants	
Number of washes	1 wash with EDTA (10 mM)
Duration	20 min
Shaking	Wash with shaking
Weight moss / Volume of extractant	1 L per 12 g dw
1.4.2. Washing with water	
Number of washes	Once before washing with EDTA and twice after
Duration	20 min
Shaking	Wash with shaking
Type of water	Distilled water
Weight moss / Volume of water	1 L per 10 g dw
1.4.3. Vital status	Oven drying with a 50-80-100° C temperature ramp
2. Preparation of the transplants	
2.1. Type of transplant	Flat Bags
2.1.1. Mesh size	16 mm <sup>2</sup>
2.1.2. Mesh net material	Glass fibre, nylon or high density plastic
2.1.3. Size of transplant	3.5 mg cm <sup>-2</sup>
2.2. Pre-exposure storage	At -20° C in individual sealed plastic bags
3. Exposure of the transplants	
3.1. Location and support	River bottom, midstream zone
3.2. Duration of exposure	2 weeks
3.3. Number of bags per site	6 at least
3.4. Initial concentrations and controls	3 controls and 3 initial times
4. Post-exposure treatments	
4.1. Selection of material for analysis	Selection of material before transplant
4.2. Method of cleaning/ washing	Rinsing <i>in situ</i>
4.3. Drying	Drying at 40°C for 24 h plus drying an aliquot at 100 °C to constant weight for accurate determination of dry weight of the material.
4.4. Homogenization	Mill components made of titanium, zirconium or corundum
4.5. Post-exposure storage	Glass recipients





# GENERAL REFERENCES



# General References

Adamo P., Bargagli R., Giordano S., Modenesi P., Monaci F., Pittao E., 2008. Natural and pretreatments induced variability in the chemical composition and morphology of lichens and mosses selected for active monitoring of airborne elements. *Environ Pollut* 152: 11–19.

Adamo P., Crisafulli P., Giordano S., Minganti V., Modenesi P., Monaci F., 2007. Lichen and moss bags as monitoring devices in urban areas. Part II: trace element content in living and dead biomonitors and comparison with synthetic materials. *Environ Pollut* 146: 392–399.

Bargagli R., 1998. *Trace Elements in Terrestrial Plants: an Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery*. Springer, Berlin.

Behmel S., Damour M., Ludwig R., Rodriguez M.J., 2016. Water quality monitoring strategies — A review and future perspectives. *Sci. Total Environ.* 571: 1312-1329

Bende-Michl U. and Hairsine P.B., 2010. A systematic approach to choosing an automated nutrient analyser for river monitoring. *J. Environ. Monit.* 12: 127-134

Blaen P.J., Khamis K., Lloyd C.E.M., Bradley C., Hannah D., Krause S., 2016. Real-time monitoring of nutrients and dissolved organic matter in rivers: Capturing event dynamics, technological opportunities and future directions. *Sci. Total Environ.* 569-570: 647-660.

Besse, J.P., Geffard, O., Coquery, M., 2012. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *Trends Anal Chem* 36: 113-127.

Bruns I., Siebert A., Baumbach R., Miersch J., Günther D., Markert B., Krauß G.J., 1995. Analysis of heavy metals and sulphur-rich compounds in the water moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. *Fresenius J. Anal. Chem.* 353, 101-104.

Burton, M.A.S., 1990. Terrestrial and aquatic bryophytes as monitors of environmental contaminants in urban and industrial habitats. *Bot J Linn Soc* 104: 267-280.

Burton M.A.S., Peterson P.J., 1979. Metal accumulation by aquatic bryophytes from polluted mine streams. *Environ Pollut* 19(1):39-46.

Carballeira A., López J., 1997. Physiological and statistical methods to identify background levels of metals in aquatic bryophytes: Dependence on lithology. *J Environ Qual* 26:980-988.

Castello M., 1996. Monitoring of airborne metal pollution by moss bags: a methodological study. *Stud. Geobotanica* 15:91-103.

European Parliament and of the Council, 2000. Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal L327 of 22.12.2000.

European Parliament and of the Council, 2010. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC): Guidance Document No.25. Guidance on chemical monitoring of sediments and biota under Water Framework Directive. Office for the Official Publications in the European Communities (Ed.), Luxembourg.

Gecheva G., Yurukova L., 2014. Water pollutant monitoring with aquatic bryophytes: a review. *Environ Chem Lett* 12(1):49-61.

Giordano S., Adamo P., Monaci F., Pittao E., Tretiach M., Bargagli R., 2009. Bags with oven-dried moss for the active monitoring of airborne trace elements in urban areas. *Environ. Pollut.* 157, 2798-2805.

Greenwood R., Roig B., 2006. Directory of 'Screening tools' e a toolbox of existing and emerging methods for chemical and ecological status monitoring under the WFD, in: Roig B., Allan I.J., Greenwood R. (Eds.), *Screening Methods for Water Data Information in Support of the Implementation of the Water Framework Directive*. SWIFT-WFD, Armines, France/Portsmouth, United Kingdom.

Kelly M.G., Whitton B.A., 1989. Interspecific differences in Zn, Cd and Pb accumulation by freshwater algae and bryophytes. *Hydrobiologia* 175:1-11.

Mersch J., Johansson L., 1993. Transplanted aquatic mosses and freshwater mussels to investigate the trace metal contamination in the rivers Meurthe and Plaine, France. *Environ Technol* 14:1027-1036.

Mouvet C., Pattee E., Cordebar P., 1986. Utilisation des mousses aquatiques pour l'identification et la localisation precise de sources de pollution metallique multiforme. *Acta Oecol-Oec Appl* 7: 77–91.

Say P.J., Harding P.C., Whitton B.A., 1981. Aquatic mosses as monitors of heavy metal contamination in the River Etherow, Great Britain. *Environ Pollut Ser B Chem Phys* 2:295–307.

Tretiach M., Adamo P., Bargagli R., Baruffo L., Carletti L., Crisafulli P., 2007. Lichen and moss bags as monitoring devices in urban areas. Part I: influence of exposure on sample vitality. *Environ Pollut* 146:380–91.

Tyler G., 1990. Bryophytes and heavy metals: a literature review. *Bot J Linn Soc* 104:231-253.

US National Water-Quality Assessment Project. (<https://water.usgs.gov/nawqa/> accessed 2 on March 2018)

United Nations Development Programme, 2006. Human Development Report 2006 – Beyond Scarcity: Power, Poverty and the Global Water Crisis. (<http://www.undp.org/> accessed on 21 Feb 2018).

United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, 2009. United Nations World Water Development Report – Third Edition: "Water in a Changing World". (<http://www.unesco.org/> accessed on 21 Feb 2018).

Vörösmarty C.J., McIntyre P.B., Gessner M.O., Dudgeon D., Prusevich A., Green P., Glidden S., Bunn S.E., Sullivan C.A., Reidy Liermann C., Davies P.M., 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467, 555-561.

Whitton, B.A., 2003. Use of plants for monitoring heavy metals in freshwaters. In: Ambasht, R.S., Ambasht, N.K. eds. *Modern trends in applied aquatic ecology*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York

Yurukova L., Gecheva G., 2003. Active and pasive biomonitoring using *Fontinalis antipyretica* in Maritsa River, Bulgaria. *J. Balkan Ecol.* 6, 390-397.





# SUMMARY (RESUMEN)



# Summary (Resumen)

## 1. Introducción

El agua dulce es uno de los recursos naturales más importantes. Es un componente básico de los ecosistemas, desempeña un papel crucial en la regulación del clima y es esencial para la vida. No obstante, se estima que solo el 20% de la población mundial está libre de amenazas a la seguridad hídrica y que más de la mitad de los hábitats asociados con las aguas continentales están seriamente amenazados (Vörösmarty et al., 2010). Por lo tanto, resulta esencial gestionar el agua de una manera global y equilibrar las necesidades de agua de las poblaciones humanas y de los ecosistemas en aras de un desarrollo sostenible (UNESCO 2009, PNUD, 2006).

Para desarrollar políticas y estrategias integradas de gestión del agua basadas en evidencias científicas es fundamental que los programas de monitoreo proporcionen información relevante, precisa, fiable y fácil de entender e interpretar (Behmel et al., 2016). La implementación de programas de monitoreo nacionales y transnacionales respaldados por medidas legislativas es ya una realidad mundial (e.g. "US National Water-Quality Assessment Project"; Directiva Marco del Agua de la UE: 2000/60/EC, en adelante DMA) pero, aunque muchos de estos programas incluyen controles biológicos e hidromorfológicos para el diagnóstico integral de la contaminación, la monitorización química (i.e. determinación de los niveles de contaminantes en la columna de agua) sigue siendo la principal herramienta utilizada para controlar la contaminación del agua.

Idealmente, este control debería llevarse a cabo mediante un monitoreo en tiempo real. A pesar de que los avances logrados en los últimos años a este respecto son numerosos, y actualmente hay disponibles por ejemplo, Electroodos Selectivos de Iones (ISEs) para la cuantificación *in situ* de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y pH; métodos colorimétricos para cuantificar  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y fósforo total; sensores ópticos (Espectroscopía UV-VIS) para determinar distintos parámetros, incluidos el carbono orgánico disuelto (DOC) y  $\text{NO}_3^-$ ; sensores

de fluorescencia para detectar compuestos moleculares tales como material proteínico e hidrocarburos, así como para cuantificar parámetros como la clorofila a y el oxígeno disuelto (DO) (Bende-Michl and Hairsine, 2010); el uso de estas técnicas sigue estando limitado a unos pocos parámetros fisicoquímicos y contaminantes y tratar la información que se puede extraer de ellas es costoso y técnicamente complejo, debido a la enorme cantidad de datos producidos. Por lo tanto, el control de la mayoría de las sustancias prioritarias (e.g. metales pesados, PAHs, PCBs) incluidas en la DMA se realiza tradicionalmente mediante muestreo esporádico de las masas de agua a pesar de que los datos así obtenidos reflejan únicamente las concentraciones de contaminantes en el momento de la toma de la muestra y no son efectivos a la hora de detectar eventos de contaminación esporádica o intermitente (Greenwood and Roig, 2006). El uso de muestreadores automáticos de agua permite aumentar el tiempo y el número de mediciones, pero el muestreo permanece limitado por los pequeños volúmenes obtenidos y, además, las muestras sin filtrar pueden degradarse si no se conservan o procesan rápidamente (Blaen et al., 2016).

Para resolver este problema, la DMA recomienda (en su Documento Guía No. 25) el uso de la biota para la monitorización de contaminantes, como la mejor manera de estimar de forma realista el impacto de las formas biodisponibles de los contaminantes en los ambientes acuáticos. De acuerdo con los criterios de la DMA, los peces, los macroinvertebrados (principalmente mejillones, crustáceos y anélidos) y los briófitos (musgos y hepáticas) son los organismos más adecuados para su uso como biomonitores (Besse et al., 2012). Los peces son *a priori* organismos ideales para verificar el cumplimiento de los estándares de calidad ambiental, ya que los objetivos de la DMA están dirigidos a la salud humana y a los depredadores de los niveles tróficos altos. Desafortunadamente, el fuerte control metabólico que ejercen los peces sobre ciertos contaminantes (e.g. PAHs) limita su uso como bioindicadores fiables. Además, su alta movilidad les permite evitar episodios de contaminación, lo que hace que sea difícil o imposible obtener datos de bioacumulación que se refieran a ubicaciones específicas. Además, en ausencia de peces nativos, el uso de especímenes enjaulados de peces suele tener un éxito limitado debido a las limitaciones logísticas (tamaño, manejo, alimentación) y la respuesta

al estrés (que puede generar sesgos en los resultados). Por lo tanto, puede preferirse el uso de especies de macroinvertebrados, ya que estos organismos son una fuente importante de alimento para peces, a menudo se encuentran a altas densidades en hábitats de agua dulce y su pequeño tamaño les permite colocarse en jaulas en diferentes sitios. Sin embargo, varios factores bióticos pueden interferir con los resultados, como la tasa de crecimiento, la etapa de la vida, el ciclo reproductivo y la disponibilidad de alimentos. Además, pueden surgir problemas analíticos debido a la falta de suficiente biomasa, temporalidad, etc., y se necesitan modelos específicos para permitir la comparación de los datos. Finalmente, aunque los briófitos están muy lejos de los humanos en las cadenas alimenticias, pueden actuar como excelentes biomonitores de oligoelementos y acumuladores de metales, PAHs, PCBs y productos relacionados con la salud humana y la agricultura (Burton, 1990; Tyler, 1990; Whitton, 2003; Gecheva and Yurukova, 2014). El uso de briofitos en lugar de peces o macroinvertebrados tiene algunas ventajas importantes: i) la absorción de contaminantes es principalmente pasiva y casi independiente de factores bióticos y, por lo tanto, la concentración de contaminantes acumulados en los briófitos está fuertemente correlacionada con la concentración promedio en el agua; ii) los briófitos tienen generalmente ciclos de vida largos; iii) se recolectan, identifican y trasplantan fácilmente; iv) son muy resistentes a la contaminación y a las condiciones ambientales adversas; v) no necesitan ser alimentados; vi) no son invasivos; y, vii) su uso no implica problemas éticos.

Por todo ello, los briofitos acuáticos que crecen en un determinado lugar (es decir, briófitos nativos) se pueden usar como una herramienta fiable, simple y económica para biomonitorizar el ambiente acuático (biomonitorización pasiva). Las cinéticas específicas de bioconcentración de contaminantes en los musgos (Carballeira and López, 1997) así como las características anatómicas y fisiológicas de estos organismos hacen que la técnica sea una de las pocas eficaces tanto para localizar con precisión focos de contaminación (Mouvet et al., 1986) como para detectar contaminación intermitente o esporádica (Say et al., 1981). Además, el análisis de una sola muestra permite la monitorización

simultánea de una gran cantidad de contaminantes (orgánicos e inorgánicos) así como la evaluación de la calidad del agua tanto a pequeña escala (e.g. cerca de posibles fuentes de contaminación) como a gran escala (e.g. regional).

Los musgos también pueden recolectarse en sitios no contaminados o cultivarse en el laboratorio y pueden trasplantarse fácilmente (biomonitorización activa, también denominada técnica de las "moss bags") a las zonas de estudio. La técnica de las "moss bags" resuelve varios problemas relacionados con la biomonitorización pasiva: i) puede usarse en sitios donde las condiciones climáticas no favorecen la presencia de musgos nativos y, por lo tanto, son escasos o están ausentes (Giordano et al., 2009); ii) elimina la posible adaptación genotípica o fenotípica de los musgos nativos a los contaminantes en las áreas contaminadas (Bargagli, 1998); iii) mejora la interpretación temporal de los resultados ya que se puede estandarizar el tiempo de exposición; y, iv) permite evaluar la magnitud de la contaminación porque se conocen las concentraciones elementales iniciales de los trasplantes.

Uno de los principales impedimentos para el uso generalizado de estas técnicas es la falta de protocolos estandarizados. Los protocolos empleados hasta ahora son casi tan numerosos y variados como las veces que se han aplicado las técnicas, y la escasez de estudios que aborden aspectos metodológicos refleja la falta de preocupación sobre los efectos que estas diferencias pueden tener en los resultados. Por lo tanto, el primer objetivo de esta tesis será abordar este problema en dos revisiones críticas de la metodología utilizada para la biomonitorización pasiva y activa (capítulos I y II).

Debido a las ventajas del uso de musgos trasplantados sobre el uso de musgos nativos, los esfuerzos de investigación se centrarán a continuación en la optimización de algunos de los aspectos metodológicos clave de la aplicación de la técnica de las "moss bags". Una vez determinado que los musgos vivos deben ser reemplazados con musgos desvitalizados para su uso como biomonitores (Capítulo II), ya que los tratamientos desvitalizantes pueden prevenir la interferencia debida al metabolismo y así mejorar las comparaciones entre los resultados de diferentes estudios (Castello, 1996; Adamo et al.,

2007, 2008; Giordano et al., 2009; Tretiach et al., 2007), no se pudo avanzar en la estandarización de la técnica sin estudiar cómo los diferentes métodos de desvitalización influyen en los resultados. Por lo tanto, en el Capítulo III, se seleccionará el tratamiento de desvitalización óptimo como un compromiso entre la pérdida de material durante el período de exposición y la absorción de contaminantes del agua.

Además, para ser considerados buenos biomonitores, los musgos no solo deben ser capaces de capturar elementos del medio ambiente, sino que también deben representar la variabilidad local en las concentraciones de diferentes contaminantes en el sitio de muestreo durante el periodo de exposición. La validez de la técnica también depende de su capacidad para demostrar diferencias significativas en las concentraciones de un contaminante en diferentes sitios de muestreo. Todos estos factores están directamente relacionados con el número y la ubicación de los trasplantes en el sitio de muestreo. Sin embargo, hasta ahora el número de trasplantes empleado ha sido muy variable (entre 1 y 12) (por ejemplo, Bruns et al., 1995; Yurukova y Gecheva, 2003). Debido a la importancia de este aspecto de la técnica, se hará una primera recomendación en el Capítulo II, basada en la opción más utilizada hasta la fecha. No obstante, será necesario realizar un estudio específico de este aspecto para optimizar el número y la posición de las "moss bags" que deberían utilizarse, con certeza estadística, en los estudios de biomonitorización (Capítulo IV).

## **2. Objetivos, resultados y conclusiones específicos**

### *2.1. Monitorización de la calidad de las aguas continentales mediante briofitos nativos: Una revisión metodológica.*

Esta revisión bibliográfica, que incluye 73 artículos publicados entre 1979 y 2013, pretende conocer el estado actual de la técnica y evaluar el grado de armonización de cada uno de los aspectos implicados en la metodología. El uso de esta herramienta se limita en gran parte a Europa (80% de los trabajos revisados) y la principal finalidad es la biomonitorización de contaminantes inorgánicos (97%) y/u orgánicos (5%), siendo sólo un 15% los artículos que estudian algún aspecto metodológico. Además, el 81% de los autores han

publicado un único artículo sobre el tema y se han empleado una gran variedad de protocolos. Como consecuencia, se ha encontrado un bajo grado de armonización de la técnica que dificulta la comparación de resultados entre diferentes estudios. Finalmente se propone un protocolo que facilite el uso habitual de esta herramienta de vigilancia ambiental de la calidad de las aguas continentales.

### *2.2. Monitorización de la calidad de las aguas fluviales mediante briofitos trasplantados: Una revisión metodológica.*

El objetivo de esta revisión bibliográfica, que considera 47 artículos publicados entre 1989 y 2015, es determinar el estado actual de la técnica de biomonitorización activa y evaluar el grado de estandarización de cada aspecto del método. El uso de esta herramienta se limitó, como en el caso de la biomonitorización pasiva, al ámbito europeo (83% de los artículos revisados), y se ha utilizado principalmente para la biomonitorización inorgánica (en el 96% de los artículos) y en menor medida para la detección de contaminantes orgánicos (en el 4% de los artículos, tenga en cuenta que la suma es mayor al 100% porque se estudiaron contaminantes orgánicos e inorgánicos en algunos estudios). Los aspectos metodológicos solo se consideraron en el 25% de los artículos. Además, el 78% de los autores solo han publicado un artículo sobre el tema y se han utilizado muchos protocolos diferentes. Como resultado, la técnica no está estandarizada, lo que dificulta la comparación de los resultados de diferentes estudios. Finalmente, se propuso un protocolo armonizado que facilite el uso de la técnica como una herramienta de rutina para monitorear la calidad de las aguas continentales.

### *2.3. Uso de musgo desvitalizado para la biomonitorización activa de la contaminación del agua*

Este artículo presenta los resultados de un experimento llevado a cabo por primera vez *in situ* para seleccionar un tratamiento de desvitalización de los musgos para emplear en la biomonitorización activa de la contaminación de las aguas. Se probaron tres tratamientos desvitalizantes para el musgo acuático *Fontinalis antipyretica* (i.e., secado al horno a 100°C, secado al horno

con una rampa de temperatura de 50-80-100°C y ebullición en agua), y se determinaron los efectos de estos tratamientos sobre la pérdida de material durante la exposición de los trasplantes y sobre la acumulación de diferentes metales pesados y metaloides. También se probó la idoneidad de usar muestras desvitalizadas del musgo terrestre *Sphagnum denticulatum* para biomonitorizar ambientes acuáticos. La estructura de los musgos fue alterada de diferentes maneras por los tratamientos desvitalizantes. La desvitalización mediante agua hirviendo provocó una pérdida de material significativamente menor ( $p < 0,01$ ) que los tratamientos de secado en horno. Sin embargo, la desvitalización mediante secado en horno con una rampa de temperatura produjo resultados más estables en relación con la pérdida de material y la acumulación de elementos. Con el objetivo de estandarizar la técnica de las "moss bags" se recomienda el uso de *F. antipyretica* desvitalizado por secado en horno con una rampa de temperatura, en lugar de otros tratamientos de desvitalización o del uso de *S. denticulatum*.

#### 2.4. Mejora de la biomonitorización activa en ambientes acuáticos: cantidad y posición óptima de las "moss bags"

El presente estudio se llevó a cabo para determinar el número óptimo de "moss bags" de *Fontinalis antipyretica* necesarias para la biomonitorización activa de la contaminación del agua. Con este objetivo, se estudió la variabilidad en las concentraciones de Al, Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en 50 "moss bags" expuestas en 4 sitios de muestreo (SM) diferentes. En general, no hubo diferencias significativas en las concentraciones de elementos entre los grupos de "moss bags" ( $n = 5$ ), ya sea a lo largo de los 50 m de longitud del SM, o entre los diferentes lados del río. Considerando errores de 10, 15 y 20%, el número máximo de "moss bags" requeridas para estimar las concentraciones medias en el SM fue, respectivamente, 26, 11 y 6. Para la mayoría de los pares de SM y elementos estudiados, 5 o menos "moss bags" fueron suficientes para diferenciar entre las concentraciones medias. Estos hallazgos nos permiten concluir que se debe utilizar un mayor número de "moss bags" (al menos 6) que las usadas hasta ahora para la biomonitorización de la contaminación de las aguas mediante briofitos acuáticos.

### 3. Conclusiones generales

En la primera parte de esta tesis, se investigó el estado del arte del uso de musgos acuáticos como biomonitores de la contaminación del agua para armonizar los aspectos metodológicos clave de las técnicas de biomonitorización pasiva y activa. El Capítulo I ha permitido definir un protocolo que unifica la información disponible sobre la técnica de biomonitorización pasiva, con 13 aspectos metodológicos que se pueden agrupar en 3 pasos clave (i.e. diseño de muestreo, recolección de muestras y procesado de muestras). Por su parte, el Capítulo II ha permitido definir un protocolo para la técnica de biomonitorización activa, con 17 aspectos metodológicos que se pueden agrupar en 4 pasos clave (i.e. selección y preparación de los briófitos, preparación de las "moss bags", exposición de los trasplantes y tratamientos post-exposición). Ambos protocolos servirán como guías para el uso de briófitos como biomonitores de la contaminación del agua con la intención de mejorar la calidad y la comparabilidad de los resultados obtenidos en diferentes estudios.

Además, también se identificaron los límites metodológicos de las técnicas. A este respecto, ambas revisiones han permitido evaluar la coherencia entre los métodos utilizados hasta la fecha y las recomendaciones propuestas y resaltan la falta general de atención que se presta al desarrollo de la metodología, el bajo grado de estandarización de cada uno de los aspectos de las técnicas y la importancia de disponer de protocolos armonizados.

Dos de los cambios más significativos en cuanto a la aplicación de la técnica de las "moss bag", de entre los propuestos en el Capítulo II, son: i) el cultivo de musgo en el laboratorio, en vez de la recolección de material en campo, y ii) el uso de musgo desvitalizado en lugar de musgo vivo. Ambos, convierten la técnica en una herramienta biotecnológica capaz de producir grandes cantidades de material y almacenarlo el tiempo que sea necesario hasta su uso, solucionando así una de las principales limitaciones existentes hasta ahora

(i.e. disponer de material de partida homogéneo, en cuanto a su composición elemental, en cualquier época del año sin importar las condiciones climáticas y listo para trasplantar).

Por lo tanto, con el objetivo avanzar en la optimización de la técnica de las "moss bags" la segunda parte de esta tesis comenzó con la selección, en el Capítulo III del método óptimo para desvitalizar musgos para biomonitorización activa de la contaminación del agua (i.e. secado en horno con una rampa de temperatura). Además, para una correcta aplicación de la técnica, es importante establecer la representatividad del sitio de muestreo. En este sentido, las evidencias proporcionadas en esta tesis permiten concluir que al menos 6 bolsas de musgo deberían usarse en estudios de biomonitorización y que la posición de las "moss bags" a lo largo y ancho del sitio de muestreo (dentro de un tramo homogéneo de 50 m de largo) no afecta los resultados obtenidos (siempre evitando los bordes de la corriente y enjuagando lo más exhaustivamente posible *in situ* después de la exposición).

Finalmente, a pesar de los avances propuestos, algunos aspectos aún no se han estandarizado, especialmente los relacionados con la preparación del musgo antes del trasplante (e.g. lavado con extractantes celulares), preparación de las "moss bags" (e.g. Relación peso/superficie) y exposición de los trasplantes (e.g. profundidad, efecto de la velocidad de la corriente) y deberán ser abordados en futuros estudios.





# ACKNOWLEDGMENTS



# Acknowledgments

Todo empezó hace 11 años con una salida a la playa (de muestreo), luego un TAD, una Tesina y sin esperarlo, una cosa llevó a la otra. Con el paso de los años pasé de ser la "*chica plumas*" que imprimía etiquetas en el ordenador del pasillo a la "*Srta. Fontinalis*" que firma esta tesis, y como es inevitable los agradecimientos se fueron acumulando, mis disculpas por adelantado por si se me despista alguno.

El primer GRACIAS es sin duda para **Jesús y Ángel / Ángel y Jesús**. Además de darme la oportunidad de trabajar a vuestro lado y de empezar esta tesis, me habéis dado todas las facilidades del mundo para terminarla. Gracias por vuestra generosidad, dedicación y esfuerzo, por guiarme en este camino, por cuidarme tanto y apoyarme siempre tanto profesional como personalmente. Jesús, gracias por transmitirme ese entusiasmo por la ciencia, salir al campo contigo es un placer completamente inspirador, gracias por esos momentos en tu despacho en los que en 5 minutos consigues hacer planes para los próximos 5 años, espero poder seguir teniéndolos en el futuro. Ángel, gracias por tu paciencia infinita y tu actitud positiva, porque no importa cuántas veces al día entre en tu despacho a preguntar dudas (o chorradas) que tú siempre respondes y siempre con una sonrisa. Porque siempre estáis ahí cuando no puedo más y necesito ir a "llorarles a los jefes" y porque podría rellenar hojas con la cantidad de buenos momentos que me habéis hecho pasar, por las comilonas en Oca y las masters class de cocina en casa de Jesús, por haberme hecho sentir una más de vuestras familias, gracias de corazón.

A **Alejo Carballeira**, porque aunque parezca mentira, el examen de la carrera para el que me puse más nerviosa fue el de bioclimatología (había que quedar bien delante del Jefe) y en la mitad, cuando más apurada estaba porque veía que no me iba a dar tiempo a escribir todo lo que sabía, te paraste a mi lado y te me pusiste a hablar de lo mucho que me parecía a mi tía. Gracias porque, como aquella vez, cada vez que acudí a ti con un problema me hiciste verlo mucho más sencillo.

A **Rubén Retuerto**, porque que cada vez que he necesitado tu ayuda me has recibido con la puerta abierta, pero también por la visita a Salvora aprovechando que había que montar las cámaras o por el zafarrancho en el invernadero, que fue de lo más divertido, a pesar de que no hubo churrascada de inauguración.

A **Carlos Real**, porque siempre estás al otro lado del teléfono o del email dispuesto a debatir, comentar, resolver dudas o problemas, ha sido un placer trabajar contigo.

A **Ángela, Tere y Zule**, mil gracias por acogerme cuando llegué de "última" e incluirme en todo, como una más. Por vuestra paciencia para aguantar todas mis dudas de novata y todas las posteriores, porque fuisteis y sois mi ejemplo a seguir, pero sobre todo por todas las risas, las confianzas, los abrazos, los cotilleos (que sin Zule no sabríamos)... y porque compartir cuartucho con vosotras ha sido de lo mejor de esta tesis. Chicas, el depar sin vosotras no es lo mismo!

A **Marga**, porque entre muchísimas otras cosas, sin ti los chipirones de los jueves no me hubieran sabido tan ricos ni el aquagym hubiera sido tan divertido.

A **Marta**, porque sabes tan bien como yo lo que es limpiar *Fontinalis* de milímetros, porque has estado a mi lado para todo, esta tesis es un trocito tuya; a **Vero**, por el mimo y el cuidado que le pones a todo tu trabajo, que también es el mío, porque sin ti cultivar *Fontinalis* no sería lo mismo; a **María**, por escucharme y aconsejarme todas las veces que al Río Artificial, o a la Cámara se les daba por tolear, que no fueron pocas veces; a **Rita**, porque cuando todos se fueron nos quedamos las dos, a compartir silencios en el cuartucho, y por aguantarme este último año de locura; a **Carlos**, porque me enseñaste a "preguntarles a los sabios" y siempre que necesité una mano con el taladro, el ilustrator, o cualquier "carallada" estabas ahí; a **Antonella** por los tiramisús más ricos que probé en mi vida y porque salir al campo contigo eran risas aseguradas; a **Adrián Chiclana**, porque te peleaste con uñas y dientes para que el Río Artificial funcionase mientras estuve de baja; a las doctorandas de Ecofísio, **Pepa y Cris**; a los que ya no están y que se echan de menos, **Cris, Merche, Ana, Rai y Xabi**; y a los futuros fichajes **Pablo y Antón**.

A **Sergio**, por los 20 minutos llenos de sabios consejos que compartimos a menudo en el tren.

I would also like to thank **Grzegorz Kosior**, for the interest and the time dedicated during my stay in Poland; and especially to **Mattia Cesa** for being a fantastic collaborator and friend, many thanks Mattia!

A **Marta** "Edafo", porque ha sido todo un placer disfrutar y sufrir juntas cada paso, de tu tesis y de la mía, espero que sigamos haciéndolo igual el resto de nuestras carreras.

A **Paula**, por todas las veces que me acompañaste hasta la puerta y me dijiste "no seas boba, si siempre sales encantada" pero sobre todo por tu amistad de todos estos años.

A l@s "Castelao" (**Mariajo, Marisol, Iria, Jose y Anita**) y a **Marta Cascallar**, Santiago sin vosotr@s no hubiera sido lo mismo, gracias por compartir penas y alegrías y por todos los momentos de desconexión, que no han sido pocos.

A **Carlos**, porque me aguantas más que nadie y aun así... y como es imposible escribir más sin ponerme ñoña, mejor lo dejo en un enorme "gracias cari, sin ti no hubiera sido capaz". Por cierto, al final terminé escribiendo una "historia que no es una historia" ;)

A **Nora** y a **Elsa**, que me han cambiado la vida de una forma completamente inesperada.

A mis herman@s (**Catuxa, Andrea y José**), a vuestro lado me he convertido en lo que soy, gracias por estar siempre ahí.

Y por supuesto, a **mis padres**, por creer en mí e incitarme siempre a seguir adelante. Esto es para vosotros, esto es por vosotros.



Aquatic bryophytes, native or transplanted, can be used as reliable, simple and economical tools for biomonitoring the aquatic environment but one of the main impediments to the widespread use of these techniques is the lack of standardized protocols. Hence, the first task of this doctoral research was to address this problem in two critical reviews of the methodology used for passive and active biomonitoring (Chapters I and II).

Because of the advantages of the use of transplanted mosses over the use of native mosses, the research efforts then focused on optimizing some of the key methodological aspects of applying the moss bag technique. In Chapter III, the optimal devitalizing treatment of moss samples was selected, while in Chapter IV the optimal number and position of moss bags for use in biomonitoring studies were determined.