

009. CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS EN EL ESTERO SALADO DE GUAYAQUIL: EFECTO SOBRE EL MICROBIOMA BACTERIANO.

Autores:

Fernández-Cadena, Juan Carlos. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Espíritu Santo. Guayaquil, Ecuador; Docente Investigador; Doctor en Ciencias Biológicas – Mención Genética Molecular y Microbiología; fernandezjuan@uees.edu.ec

Ruiz-Fernández, Paula. Instituto Milenio de Oceanografía, IMO – Chile; Estudiante de Posgrado; Magister en Ciencias – Mención en Oceanografía; paularuizf@udec.cl

Andrade, Santiago. Centro GEMA- Genómica, Ecología y Medio Ambiente. Facultad de Ciencias. Universidad Mayor. Chile; Investigador; Doctor en Ciencias Biológicas. sandrade@bio.puc.cl

De la Iglesia, Rodrigo. Departamento de Genética Molecular y Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile; Profesor asociado. Doctor en Ciencias Biológicas – Mención Genética Molecular y Microbiología; rdelaiglesia@bio.puc.cl

RESUMEN

Los bosques de manglar son valiosos en términos ecológicos y socioeconómicos, pocos han sido los esfuerzos de conservación en este ecosistema. Esto sumado al crecimiento desproporcionado de las ciudades contribuyen a que, estos bosques sean considerados como uno de los entornos tropicales más amenazados. Las comunidades microbianas que habitan en los sedimentos contribuyen al ciclo biogeoquímico de nutrientes a través de los niveles tróficos del manglar, por ejemplo, el azufre. Este tipo de organismos se ven afectados por la presencia de contaminantes, como el aumento de metales pesados. El presente trabajo se enfocó en determinar la estructura de la comunidad bacteriana y como ésta se ve afectada cuando los niveles de metales pesados aumentan. Se analizaron dos áreas de manglar, el primer sitio se ubicó dentro de la ciudad de Guayaquil y mostró altos niveles de metales tóxicos en sus sedimentos, como Cd, Pb y Ag. El segundo sitio se encuentra localizado en la comuna de Puerto Hondo, al presentar niveles disminuidos de metales en comparación a Guayaquil, este fue considerado como sitio de referencia.

Los miembros de la comunidad bacteriana presentaron cambios drásticos en términos de abundancia y diversidad taxonómica. Esto se correlaciona a cambios que también ocurren a nivel de ciclos biogeoquímicos, por ejemplo, el azufre. En Guayaquil, el azufre es liberado por ellas en forma de gas de manera desproporcionada en la ciudad de Guayaquil, ocasionando un olor nauseabundo en la zona. En cambio, Puerto Hondo las bacterias incorporan y no lo liberan en forma de gas al medio ambiente.

INTRODUCCIÓN

Los manglares son ecosistemas intermareales únicos que cubren hasta el 75% de las costas tropicales y subtropicales. Actualmente, cerca del 35% de este ecosistema está desaparecido, perdiéndose a una tasa anual aproximada del 2% (Spalding et al., 1997; Valiela et al., 2001; Alongi, 2002). Los bosques de manglar aportan con más de 21 servicios ecológicos que benefician directamente a la comunidad humana circundante: materia prima para la construcción, producción de alimento para el consumo humano, protección contra la erosión, mantenimiento de la calidad del agua y además son importantes reservorios de carbono (Barbier et al., 2011; Sandilyan y Kathiseran, 2014). La explotación excesiva de la mayoría de estos recursos por actividades humanas ha causado la destrucción de este ecosistema.

Los metales pesados provenientes de descargas industriales son una de las principales fuentes de contaminación antropogénica en el manglar, en el mundo se han reportado un amplio rango de concentraciones (hasta 5 niveles en orden de magnitud). Se ha demostrado anteriormente que un aumento de los metales pesados en los sedimentos superficiales del manglar causa una variación en la composición de la comunidad de las bacterias que habitan esta área, siendo concomitantes con cambios en los servicios ecosistémicos (Barbier et al., 2011; Lewis et al., 2011; Bayen, 2012; Rezaie-Boroon, 2013; Usman et al., 2013; Fernández-Cadena et al., 2014; Sakthivel & Kathiresan, 2014; Sandilyan y Kathiresan, 2014).

Los sedimentos de los manglares son principalmente anaeróbicos y experimentan un alto contenido de azufre (Varon-Lopez et al., 2014). El azufre en sus diversas formas está sujeto a varias transformaciones mediadas por microorganismos que incluyen la reducción del sulfato y procesos de oxidación del azufre (Moreau et al., 2013).

Una vez dentro de las células, el sulfato puede ser reducido mediante dos alternativas metabólicas. La vía asimilativa reduce los compuestos azufrados para la conformación final de aminoácidos que contienen dicho elemento, el grupo de bacterias que realizan este proceso son las bacterias que oxidan el azufre (SOB siglas en inglés). Otra ruta metabólica es realizada por aquellas bacterias que estrictamente son anaeróbicas, siendo el azufre la única fuente de respiración o de aceptor final de electrones. Fruto de esto el producto final de esto es la liberación del azufre en forma de gas (SH_2). Estas bacterias son conocidas como las sulfato reductoras o SRB (Muyzer & Stams, 2008).

El efecto de los eventos de perturbación sobre una comunidad bacteriana se puede investigar en términos de parámetros taxonómicos y metabólicos (Kulkarni et al., 2018). Con respecto a rutas metabólicas específicas, sería posible observar diferencias en términos de la abundancia de genes clave implicados en reducción asimilativa o disimilativa del azufre. Se eligió un área de manglar contaminado y esta fue contrastada con otro sitio sin registros elevados de metales pesados. El presente trabajo muestra como la microbiología con el uso de herramientas bioinformática son aporte esencial para demostrar el impacto de contaminación en un ecosistema.

Adicionalmente permitirá establecer estrategias óptimas para la recuperación de este manglar, el cual ha sido demostrado en otros sistemas (Zouch et al., 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo

El proceso de investigación fue realizado en el golfo de Guayaquil (Figura 1), esta área abarca cerca del 81% de los manglares ecuatorianos (Monserate et al., 2011). Se analizaron cinco zonas de muestra en dos áreas de manglar, la primera dentro de la ciudad de Guayaquil (GYE - 2°10'13.80"S, 79°54'50.27"O) cuya principal característica es que durante los últimos 25 años ha sufrido las descargas directas de aguas industriales enriquecidas por metales pesados. La segunda área está dentro de la comuna protegida de Puerto Hondo (PH - 2°11'55.66"S, 80° 0'26.28"O), localizada a 20 kilómetros aproximadamente de la ciudad de Guayaquil, además esta no presenta fuentes visibles de descargas de aguas industriales. Adicionalmente, el aspecto visual de cada zona de estudio es diferente entre sí, como ejemplo se puede considerar la presencia de árboles de mangle en Puerto Hondo abundan mientras que en Guayaquil estos son escasos.

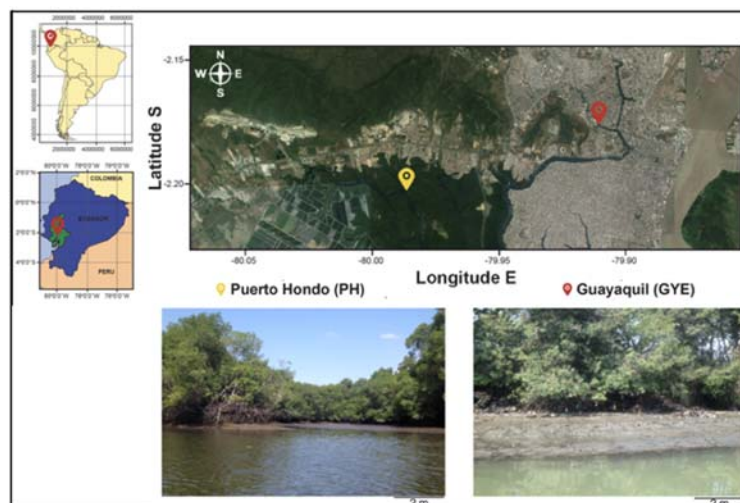


Figura 1. Localización geográfica de los sitios de muestreo en los manglares de Puerto Hondo y Guayaquil.

Análisis de metales pesados

El sedimento fue recolectado en tubos de polipropileno previamente lavado en una solución al 10% de HNO₃. Las muestras fueron secadas a 37 °C durante tres días y almacenadas a 4 °C hasta futuro análisis. Previo al análisis de metales, las muestras tuvieron que ser digeridas (500 mg) en una mezcla concentrada de ácido nítrico bi-distilado y peróxido de hidrógeno (7:1) en un microondas (ETHOS ONE, Milestone). La pureza de los reactivos, muestras y curvas de calibración fue chequeada a través

del sedimento de referencia (sedimento marino, MESS-3) obtenido por el Consejo Canadiense de Investigación (NRC-CNRC) para todos los metales, excepto B y Ba. Se realizó la determinación de 18 elementos (Li, Be, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Ag, Cd, Sn an Pb), utilizando la Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado de manera inductiva (ICP-MS).

Extracción de ADN

El ADN comunitario del sedimento fue extraído mediante el kit de aislamiento Power-Soil (MOBIO), se siguieron los pasos del fabricante para dicho proceso. El ADN extraído fue almacenado a -20 °C hasta posteriores análisis

Amplificación del material genómico

Amplificación taxonómica

Para determinar la presencia y abundancia de los principales grupos bacterianos, se amplificó la región hipervariable V4 del ARN ribosomal. Se utilizó los iniciadores 515F y 806R obtenidos a partir del Earth Microbiome Project (Caporaso et al., 2011). Cada muestra fue amplificado por triplicado, cada reacción contenía las siguientes condiciones, 1X reacción de la solución tampón, 2mM de MgCl, 0.3 mM de cada dNTPs, 0.3 μ M de cada iniciador, 2.5 unidades de Kapa Taq DNA Polimerasa (Kapa Biosystems) y entre 1 a 5 ng de ADN con agua estéril hasta un volumen final de 35 μ l.

Amplificación metabólica

El ADN extraído fue remitido al Instituto Genómico de Beijing (BGI) en donde se realizó el proceso de secuenciación del material genómico, la amplificación masiva de ADN fue realiza en la plataforma HiSeq4000 de Illumina. El total de la información obtenida tuvo un total de 68.81Gb de tamaño.

Después de la secuenciación, los datos fueron sometidos al servidor de análisis MG-RAST: Metagenomics RAST Server, versión 3.6 (Meyer et al., 2008) (<http://metagenomics.anl.gov>).

Análisis de metales pesados

Las variables ambientales, de manera específica los metales pesados generalmente no siguen una distribución logarítmica normal, esto ocasiona problemas serio en el momento de normalización (Zhang & McGrath, 2004). Se utilizó la transformación Box-Cox mediante el uso *caret* R (Kuhn, 2014) para poder normalizar la frecuencia de distribución y reducir este problema.

Después de esta transformación, se realizó un análisis de agrupamiento y prueba de hipótesis por análisis de similitud (SIMPROF) para determinar los diversos patrones entre sitios de muestreo basados en distancia euclidiana (Whitaker & Christman). El cluster se muestra a manera de dendograma en donde esta se encuentra representada de manera visual.

Análisis de secuencias metagenómicas

Todas las secuencias fueron comparadas contra la base de datos Best Hit Classification (Fuente de anotación: SEED; e -value $<1 \times 10^{-5}$; tamaño mínimo de alineamiento de 60 pb; identidad mínima de secuencias nucleotídicas del 60%) disponibles en MG-RAST. Los resultados fueron exportados al formato Phyloseq para ser procesados en R (R-Phyloseq software; McMurdie & Holmes, 2015). Se escogieron los genes relacionados al nivel 1= Metabolismo del azufre.

Las anotaciones funcionales obtenidas en el set metagenómicos fueron correlacionadas con los niveles de metales pesados mediante un análisis canónico de correspondencia utilizando el programa *vegan* en R (Oksanen 2013).

RESULTADOS

Niveles de metales pesados en el sedimento superficial del Estero Salado

Los metales pesados dentro de la ciudad de Guayaquil se encuentran en concentraciones muy elevadas, en la actualidad es considerada como uno de los ecosistemas de manglar mas contaminados del planeta (Fernández-Cadena et al., 2014). El análisis de agrupamiento muestra la conformación de dos grupos entre sitios de muestreo, claramente asociada en cada localidad (Figura 2).

Al realizar la comparación con otros manglares de Brasil, Colombia, Panamá, Costa Rica e India, son similares a esos de Colombia, India y China en donde las actividades antropogénicas a través de las industrias han sido extensamente reportadas (Perdomo et al., 1999; Monserrate et al., 2011; Sakthivel & Kathiresan, 2014; Wu et al., 2014). Las muestras tomadas en Puerto Hondo se agrupan de manera alejada a los de Guayaquil, contrastando la diferencia en niveles de metales pesados entre estos sitios (Figura 3).

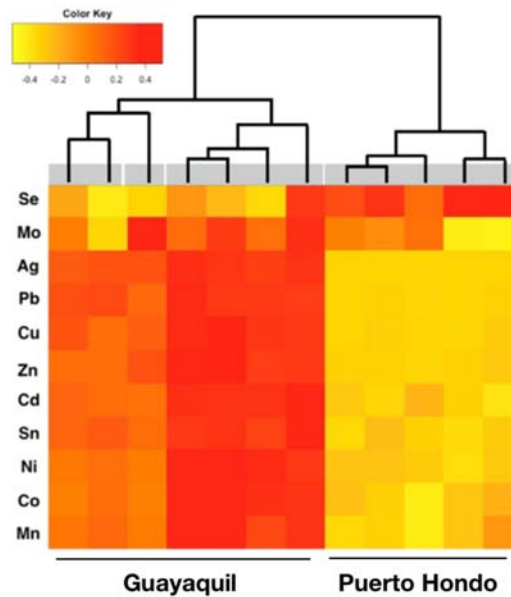


Figura 2. Distribución de metales pesados entre los sitios de muestreo en el Estero Salado. Mapa de calor que muestra los niveles de los metales pesado (Transformación Box-Cox) distribuidos en la superficie del sedimento de Guayaquil y Puerto, análisis mediante distancia euclidiana; las cajas grises representan grupos real ($p= 0.01$ a 999 iteraciones, SIMPROF)

Composición taxonómica del manglar en Ecuador

El núcleo bacteriano muestra que en el manglar existe un total de 8,586 identidades taxonómicas diferentes (OTUs), el 51.3% de estas fueron comunes en Guayaquil y Puerto Hondo. El análisis multivariado (NMDS) basado en similitud de Bray-Curtis muestra una separación marcada entre los OTUs encontrados en GYE y PH (Figura 4). La determinación taxonómica de los grupos bacterianos dominantes en el sedimento superficial, corresponde a los phyla Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes tanto en el sitio contaminado y en el manglar libre de metales. Sin embargo, se observó a que a en término de abundancia estas fueron diferentes entre los manglares. Esta característica ha sido observada en otros manglares contaminados ya sea por hidrocarburos y/o metales pesados analizados previamente en Brasil, India y China (Ravikumar et al., 2007; Dos Santos et al., 2011; Pereira et al., 2015; Basak et al., 2016; Cabral et al., 2016; Liu et al., 2016).

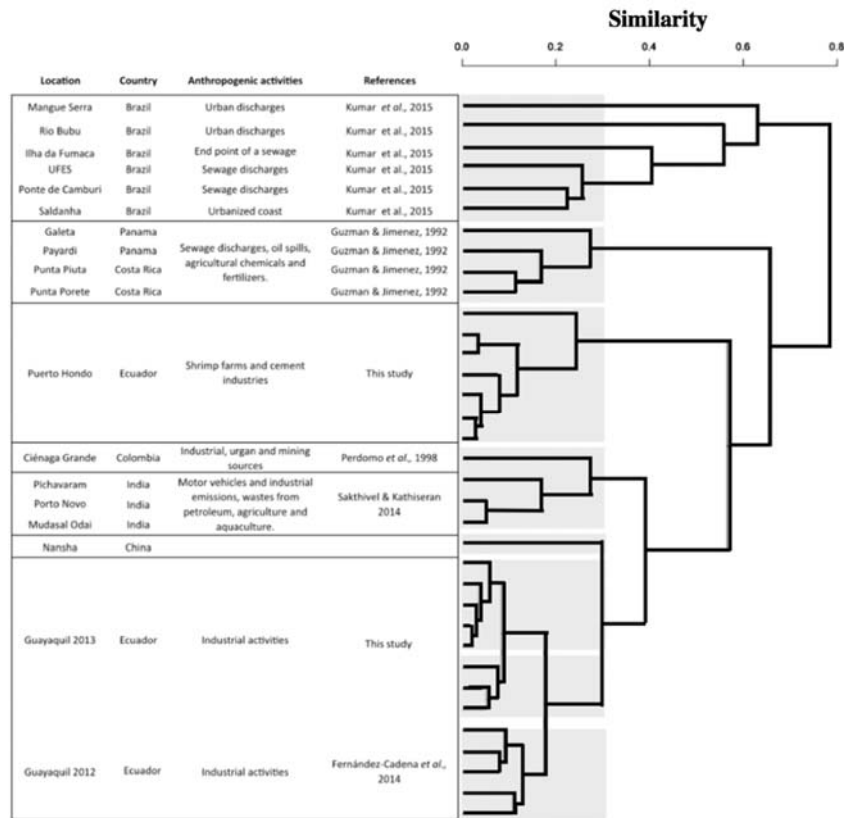


Figura 3. Comparación entre concentración de metales en manglares del mundo. La figura representa los niveles de metales pesados (datos transformados mediante Box-Cox) distribuidos en los sedimentos superficiales de manglar en diferentes países. El agrupamiento fue generado mediante perfiles de similitud (SIMPROF) mediante distancias euclidianas; los rectángulos grises representan grupos reales ($p = 0.01$ a 999 iteraciones).

Los grupos bacterianos que se encuentran relacionados al proceso de reducción del azufre (SRB y SOB) también muestran diferencias en términos de abundancia. Mientras que las SRB son más frecuentes en el manglar contaminado de Guayaquil, las SOB son abundantes en Puerto Hondo.

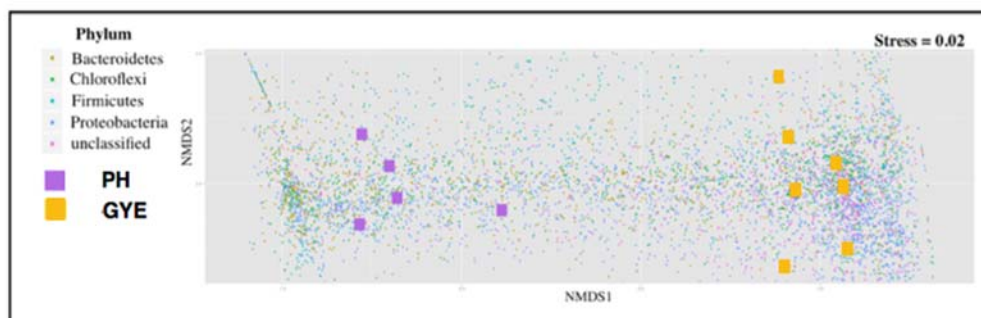


Figura 4. Distribución de las taxa bacterianas en el sedimento superficial del manglar. NMDS basado en distribución de las OTUs por phylum.

Caracterización funcional de los genes del azufre

Los genes relacionados al metabolismo de la reducción asimilativa del azufre – SOB, se encuentran separados en comparación a los de la reducción disimilativa – SRB. Los genes *cys* son abundantes en la localidad de Puerto Hondo mientras que los genes *apr* y *dsr* están enriquecidos dentro de la ciudad de Guayaquil (Figura 5).

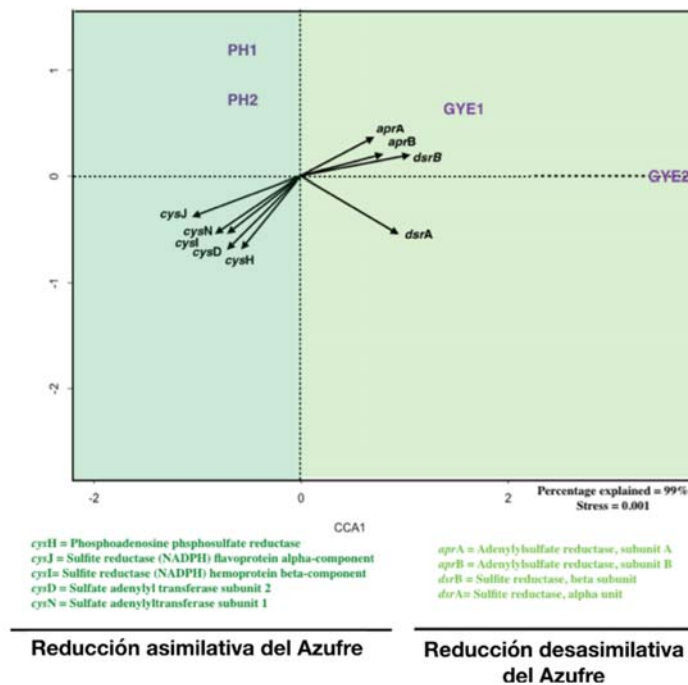


Figura 5. Metabolismo del azufre en el Estero Salado de Guayaquil. Análisis Canónico de Correspondencia de los genes obtenidos en la base de datos metagenómica de los patrones de reducción del sulfato específico asimilativo y desasimilativo.

La selección que presentan las rutas metabólicas de la reducción del sulfato para Guayaquil y Puerto Hondo fueron correlacionadas con los niveles de metales pesados del sedimento. En la figura 6 se puede observar que existe una correlación positiva significativa entre los genes del ciclo disimilativo y los metales pesados en la ciudad de Guayaquil. Mientras que, para Puerto Hondo, los genes del ciclo asimilativo poseen una correlación negativa significativa con los niveles de metales pesados.

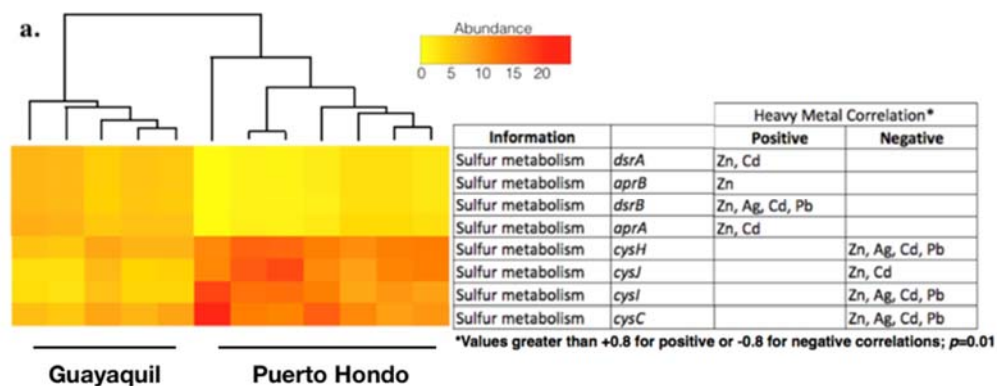


Figura 6. Correlación entre el metabolismo del azufre y metales pesados. El mapa de calor muestra la abundancia de los genes encontrados para cada metabolismo del azufre con una correlación positiva o negativa hacia los niveles de metales pesados.

Discusión y conclusiones

Los bosques de manglares se consideran el único ecosistema forestal en un entorno marino; por lo tanto, la comunidad microbiana es única y juega un papel clave en el mantenimiento de la productividad, que comprende una de las mayores reservas de vías metabólicas en la tierra con posibles aplicaciones biotecnológicas y ambientales (Gomes et al., 2011). También se estipula que la biomasa microbiana de los sedimentos de los manglares consiste en ~ 91% de bacterias (Azman et al., 2015). En consecuencia, la calidad de este ecosistema está fuertemente influenciada por procesos microbianos que, a su vez, están influenciados por la diversidad del microbioma (Peixoto et al., 2011).

Los principales grupos responsables de mantener el equilibrio entre la oxidación del sulfuro y la reducción del sulfato son las SOB y las SRB, respectivamente. En relación con la reducción del sulfato en las vías metabólicas, los genes *dsr* y *apr* relacionados con la reducción del sulfato disimilativo se enriquecen en sedimentos contaminados, especialmente con hidrocarburos (Varon-Lopez et al., 2014; Pokorna & Zabranska, 2015;). El producto de esta reacción de reducción es el gas sulfuro (SH_2), que posteriormente se liberará al medio ambiente. El exceso de gas es dañino para la fertilidad del suelo y emite un olor que es perjudicial para las poblaciones adyacentes. La vía asimilatoria de reducción de sulfato que está regulada por el complejo del gen *cys*, en este caso, sulfuro en lugar de liberarse como gas se incorpora en el metabolismo celular. El gas sulfuro como producto de la reducción del sulfato por la vía disimilativa es un factor clave que, junto con los altos niveles de metales pesados, afecta el desarrollo adecuado del ecosistema y causa la infertilidad del suelo por la toxicidad del sulfuro.

Al existir una relación significativa entre metales pesados y la actividad metabólica de la comunidad bacteriana, muestra la importancia de las herramientas moleculares y

bioinformáticas para el correcto diagnóstico ambiental de un ecosistema perturbado. Asimismo, se podrán idear planes de restauración ecológica que garanticen el correcto saneamiento del área intervenida.

Referencias bibliográficas

Alongi, D. M. (2002). Present state and future of the world's mangrove forests. *Environmental conservation*, 29, 331-349.

Azman, A. S., Othman, I., Velu, S. S., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). Mangrove rare Actinobacteria: Taxonomy, natural compound, and discovery of bioactivity. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–15.

Barbier, Edward B.; Hacker, Sally D.; Kennedy, Chris; Kock, Evamaria W.; Stier, A. C. and B. R. S. (2011). The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological Monographs*, 81, 169–193.

Basak, P., Pramanik, A., Sengupta, S., Nag, S., Bhattacharyya, A., Roy, D., ... Bhattacharyya, M. (2016). Bacterial diversity assessment of pristine mangrove microbial community from Dhulibhashani, Sundarbans using 16S rRNA gene tag sequencing. *Genomics Data*, 7, 76–78.

Bayen, S. (2012). Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: a review. *Environment International*, 48, 84–101.

Cabral, L., Júnior, G. V. L., Pereira de Sousa, S. T., Dias, A. C. F., Lira Cadete, L., Andreote, F. D., ... de Oliveira, V. M. (2016). Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial communities. *Environmental Pollution*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.078>

Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4516–4522.

Dos Santos, H. F., Cury, J. C., Do Carmo, F. L., Dos Santos, A. L., Tiedje, J., Van Elsas, J. D., ... & Peixoto, R. S. (2011). Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. *PLoS One*, 6, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016943>.

Fernández-Cadena, J. C., Andrade, S., Silva-Coello, C. L., & De la Iglesia, R. (2014). Heavy metal concentration in mangrove surface sediments from the north-west coast of South America. *Marine Pollution Bulletin*, 82, 221–226.

Fernández-Cadena, J. C., Andrade, S., Silva-Coello, C. L., & De la Iglesia, R. (2018). Sentinel bacteria in mangrove sediments polluted with heavy metals in the Northwest Coast of South America. *Water Research, in rev.*

Gomes, N. C., Cleary, D. F., Calado, R., & Costa, R. (2011). Mangrove bacterial richness. *Communicative & integrative biology*, 4, 419-423.

Kuhn, M., Wing, J., Wetson, S., Williams, A., Keeler, C., Engelhardt, A., ... & Lescarbeau, R. (2014). caret: classification and regression training. R package version 6.0-24

Kulkarni, R., Deobagkar, D., & Zinjarde, S. (2018). Metals in mangrove ecosystems and associated biota: A global perspective. *Ecotoxicology and environmental safety*, 153, 215-228.

Liu, H. X., Rocha, C. S., Dandekar, S., & Wan, Y. J. Y. (2016). Functional analysis of the relationship between intestinal microbiota and the expression of hepatic genes and pathways during the course of liver regeneration. *Journal of hepatology*, 64, 641-650.

Lewis, M., Pryor, R., & Wilking, L. (2011). Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: a review. *Environmental*, 159, 2328–2346.

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2015). Shiny-phyloseq: Web application for interactive microbiome analysis with provenance tracking. *Bioinformatics*, 31, 282-283.

Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., & Etal. (2008). The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, 9, 386-394.

Monserrate, L., Medina, J. F., Calle, P., Marítima, F. D. I., Biológicas, C., Naturales, R., ... Guayaquil-Ecuador, A. (2011). Estudio de Condiciones Físicas, Químicas y Biológicas en la Zona Intermareal de Dos Sectores del Estero Salado con Diferente Desarrollo Urbano, Thesis presented at the Escuela Superior Politécnica del Litoral ESPO for obtaining the biologist degree.

Moreau, J. W., Fournelle, J. H., & Banfield, J. F. (2013). Quantifying heavy metals sequestration by sulfate-reducing bacteria in an acid mine drainage-contaminated natural wetland. *Frontiers in microbiology*, 4, 20-44.

Muyzer, G., & Stams, A. J. M. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews - Microbiology*, 6, 441–454.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R. B., ... & Oksanen, M. J. (2013). Package “vegan”, *Community ecology package, version, 2.*

Peixoto, R., Chaer, G. M., Carmo, F. L., Araújo, F. V., Paes, J. E., Volpon, A., ... Rosado, A. S. (2011). Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99, 341–354.

Perdomo, L., Ensminger, I., Espinosa, L. F., Elster, C., Wallner-kersanach, M., & Schnetter, M.-L. (1999). The Mangrove Ecosystem of the Ciénaga Grande de Santa Marta (Colombia): Observations on Regeneration and Trace Metals in Sediment. *Marine Pollution Bulletin*, 37, 393–403.

Pereira, T. D. S., Moreira, Í. T., de Oliveira, O. M., Rios, M. C., Wilton Filho, A. C. S., de Almeida, M., & de Carvalho, G. C. (2015). Distribution and ecotoxicology of bioavailable metals and As in surface sediments of Paraguaçu estuary, Todos os Santos Bay, Brazil. *Marine pollution bulletin*, 99, 166-177.

Pokorna, D., & Zabranska, J. (2015). Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. *Biotechnology Advances*, 33, 1246–1259.

Ravikumar, S., Prakash Williams, G., Shanthy, S., Anitha Anantha Gracelin, N., Babu, S., & Parimala, P. S. (2007). Effect of heavy metals (Hg and Zn) on the growth and phosphate solubilizing activity in halophilic phosphobacteria isolated from Manakudi mangrove. *Journal of Environmental Biology*, 28, 109–114.

Rezaie-Boroon, M. H. (2013). The Geochemistry of eavy Metals in the Mudflat of Salinas de San Pedro Lagoon, California, USA. *Journal of Environmental Protection*, 4, 12–25.

Sakthivel, K., & Kathiresan, K. (2014). Mangrove Sediment Heavy Metals from Southeast Coast of India. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution*, 11, 89-96.

Sandilyan, S., & Kathiresan, K. (2014). Decline of mangroves e A threat of heavy metal poisoning in Asia. *Ocean and Coastal Management*, 102, 161–168.

Spalding, M. D., Mclvor, A. L., Beck, M. W., Koch, E. W., Möller, I., Reed, D. J., ... & Wesenbeeck, B. K. (2014). Coastal ecosystems: a critical element of risk reduction. *Conservation Letters*, 7, 293-301.

Usman, A. R. A., Alkredaa, R. S., & Al-wabel, M. I. (2013). Ecotoxicology and Environmental Safety Heavy metal contamination in sediments and mangroves from the coast of Red Sea: *Avicennia marina* as potential metal bioaccumulator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97, 263–270.

Valiela, I., Bowen, J. L., & York, J. K. (2001). Mangrove Forests: One of the World's Threatened Major Tropical Environments. *BioScience*, 51, 807-815.

Varon-Lopez, M., Dias, A. C. F., Fasanella, C. C., Durrer, A., Melo, I. S., Kuramae, E. E., & Andreote, F. D. (2014). Sulphur-oxidizing and sulphate-reducing communities in Brazilian mangrove sediments. *Environmental Microbiology*, 16, 845–855.

Wu, Q., Tam, N. F. Y., Leung, J. Y. S., Zhou, X., Fu, J., Yao, B., ... Xia, L. (2014). Ecological risk and pollution history of heavy metals in Nansha mangrove, South China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 143–151.

Zhang, C., & McGrath, D. (2004). Geostatistical and GIS analyses on soil organic carbon concentrations in grassland of southeastern Ireland from two different periods. *Geoderma*, 119, 261–275.

Zouch, H., Karray, F., Armougom, F., Chifflet, S., Hirschler-Réa, A., Kharrat, H., ... & Quéméneur, M. (2017). Microbial diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment cultures associated with anaerobic biotransformation of coastal stockpiled phosphogypsum (Sfax, Tunisia). *Frontiers in Microbiology*, 8, 1583.