

LOS POLIFOSFATOS Y LA ENZIMA TRIMETAFOSFATASA: INDICADORES BIOGEOQUÍMICOS DE CONTAMINACIÓN DE SUELOS POR METALES PESADOS.

Ahmed Amaury Ruiz Moré¹, <https://orcid.org/0000-0003-1838-4607>, ahmedamaury9@gmail.com

Elena Carvajal Ciomina², <https://orcid.org/0000-0001-7158-2464>, elena.carvajal@nauta.cu

Lidia González Méndez³, <http://orcid.org/0000-0003-0583-1738>, lgmendez@nauta.cu

Universidad de Ciencias Médicas. Santa Clara, Villa Clara. Cuba. Dirección de Ciencia e Innovación Tecnológica, Departamento de Investigaciones Biomédicas.

Autor para la correspondencia: ahmedamaury9@gmail.com

Resumen

La industria es una fuente de recursos para suplir necesidades del hombre. En Cuba hay diseminadas múltiples industrias cuyos efluentes contienen como contaminantes metales y metaloides. Villa Clara no queda resagada en esto; al contrario, muestra altos niveles de contaminación. Partiendo de lo anterior se realiza una revisión bibliográfica sobre el tema con la finalidad de describir los mecanismos toxicológicos a nivel biomolecular y microbiano, sus afectaciones a los suelos, las cosechas y la ganadería. Se profundiza, además, en los polifosfatos y sus funciones remediadoras de los suelos, especialmente los procedentes de las algas marinas. Finalmente se proponen métodos para la síntesis del ciclotrifosfato y el ensayo de la enzima que lo hidroliza, la Trimetafosfatasa. Para ello se analiza y compila información dispersa, incluso escasa, en diversas fuentes bibliográficas digitales. Indudablemente es una temática de gran interés, tentativa para implementar en los entornos contaminados con metales pesados, de modo que se revitalicen los suelos, se favorezcan las cosechas, se generen productos agropecuarios más sanos y las aguas subterráneas sean más limpias. Todo a favor de la salud del hombre y su medio ambiente.

Palabras clave: *contaminación, metales pesados, metaloides, calidad de los suelos, polifosfatos, algas marinas, microalgas, biomasa, enzima trimetafosfatasa.*

Abstract

Industry is a source of resources to supply human needs. In Cuba there are multiple industries whose effluents contain metals and metalloids as contaminants. Villa Clara is not left behind in this regard; on the contrary, it shows high levels of pollution. Based on the above, a bibliographic review on the subject is carried out in order to describe the toxicological mechanisms at the biomolecular and microbial level, their effects on soils, crops and livestock. In addition, polyphosphates and their soil remediation functions, especially those coming from marine algae, are discussed in depth. Finally, methods are proposed for the synthesis of cyclotriphosphate and the assay of the enzyme that hydrolyzes it, Trimetaphosphatase. For this purpose, scattered, even scarce, information is analyzed and compiled in various digital bibliographic sources. Undoubtedly, it is a topic of great interest, an attempt to implement in environments contaminated with heavy metals, so that soils are revitalized, crops are favored, healthier agricultural products are generated and groundwater is cleaner. All in favor of human health and his environment.

Keywords: *pollution, heavy metals, metalloids, soil quality, polyphosphates, seaweed, microalgae, biomass, enzyme trimetaphosphatase.*

1. Introduction

Los metales pesados y los metaloides (metal/oideas) se encuentran altamente concentrados en los suelos donde prevalecen actividades antropogénicas, como la minería. Altos contenidos de meta/oideas se han encontrado en Asia, Australia y muchas otras regiones.^{1,2}

En el área de las Américas destaca México donde existe una gran proximidad entre las industrias contaminantes y las zonas urbanas y agrícolas,³ y suelen depositarse producto del manejo de las aguas residuales ricas en dichos metal/oideas.⁴

En Cuba se ha reportado que las inadecuadas prácticas agrícolas se ejecutan en los agroecosistemas favorecen la entrada de metales pesados contaminando a los suelos, y constituyen un riesgo permanente a la salud humana.⁵

Esta contaminación, debido a fuentes antropogénicas, se debe fundamentalmente:⁶ a) el uso abusivo de fertilizantes, pesticidas inorgánicos, aguas residuales y abonos orgánicos; b) las explotaciones mineras y de procesamiento que incorporan al suelo elementos tóxicos; c) el transporte, a los alrededores de carreteras; d) los procesos industriales, debido a las emisiones y residuos, que pueden depositarse en suelos y la vegetación.

Con la presente revisión se pretende identificar los principales metales y metaloides que afectan el medio ambiente, en especial a los suelos. Se hace una profundización en el empleo de polifosfatos como remediadores del mismo y se describen dos métodos: la síntesis del trimetafosfato y el ensayo de la enzima que lo degrada, la Trimetafosfatasa. Aspectos últimos poco referenciados en la literatura y manejados en términos diversos que suelen dificultar su localización. Para ello se revisan diferentes fuentes bibliográficas en sitios virtuales: monografías, artículos originales, patentes y otros.

2. Metales y metaloides: potentes tóxicos ambientales

Los metal/oideas son especialmente tóxicos a los microorganismos debido a que se unen con mayor afinidad a los grupos tiólicos (-SH) y sitios de oxígeno de las proteínas, desplazando los ligandos naturales. Además, elevadas concentraciones de metal/oideas en los suelos alteran la estructura conformacional de ácidos nucleicos y proteínas. y reducen la biomasa microbiana, su diversidad genética y funcional ⁷ y la actividad de las enzimas, lo cual afecta el funcionamiento de los ecosistemas.⁸

Teniendo en cuenta lo anterior, los procedimientos de monitoreo son necesarios para evaluar los impactos medioambientales y el éxito de tecnologías de remediación aplicadas a los suelos contaminados.⁹ Indicadores útiles para el monitoreo de los suelos son las actividades de las enzimas. Estudios recientes han enfocado el efecto de cuatro

metal/oides: Cd, Pb, Cu, and Zn; con otros como el Ni y el Cr estudiados menos frecuentemente; y el V, Co, As, Hg, Ag, Mn, y Se, raramente estudiados.¹⁰

En Cuba existen múltiples industrias que se vinculan al trabajo con metal/oides. Entre ellas: la INPUD de Santa Clara, Villa Clara, en los procesos galvánicos (Ni, Cr, Al, Fe); los derivados de las extracciones en minería de Moa, en la zona oriental (Cr, Ni, Co, Mn, As, Cu, Pb, Zn); en los lodos procedentes de los procesos de producción de la Empresa Electroquímica de Sagua la Grande, Villa Clara, los cuales son dispuestos en nichos de concreto (Hg, Cd, Pb); en la Fundición y la Fábrica de Calderas de Vapor de Sagua la Grande, y en Planta Mecánica de Santa Clara, ambos en Villa Clara (Fe, Cu, Zn, Ni); en la fábrica de bujías en Sagua la Grande, Villa Clara (Cu, Pb, Zn); producto del proceso de cianuración para la extracción de oro en la geominera de Placetas, Villa Clara (Hg); y muchas otras a todo lo largo del país.

2.1. Niveles generales de afectación por presencia de metales pesados.

Elevados contenidos de metal/oides pueden provocar efectos tóxicos a tres niveles: ⁷ nivel genético, nivel celular y nivel bioquímico. Estos transcurren por 5 mecanismos: 1) desnaturalización de proteínas; 2) inhibición de la división celular; 3) ruptura de la membrana celular; 4) inhibición de la actividad de las enzimas; y 5) inhibición de los procesos de transcripción y traducción, como se observa en la Figura 1.

Algunos metal/oides tienen afinidad por los grupos funcionales carboxilo y amina, que son parte de los sitios activos de algunas enzimas. De hecho, la actividad de las mismas, en estos casos, depende últimamente de la composición de aminoácidos del sitio activo de cada enzima y las condiciones del suelo. Por otro lado, las enzimas del suelo no reflejan todos los aspectos de la actividad y función de los microorganismos, por lo cual es necesario buscar otros enfoques tales como: respiración microbiana, biomasa, diversidad funcional, para lograr un mayor entendimiento de los impactos de los metal/oides sobre las comunidades microbianas del suelo.⁸ Todos esos factores contribuyen a la reducción de la biomasa microbiana afectando la diversidad genética y funcional de los suelos.⁷

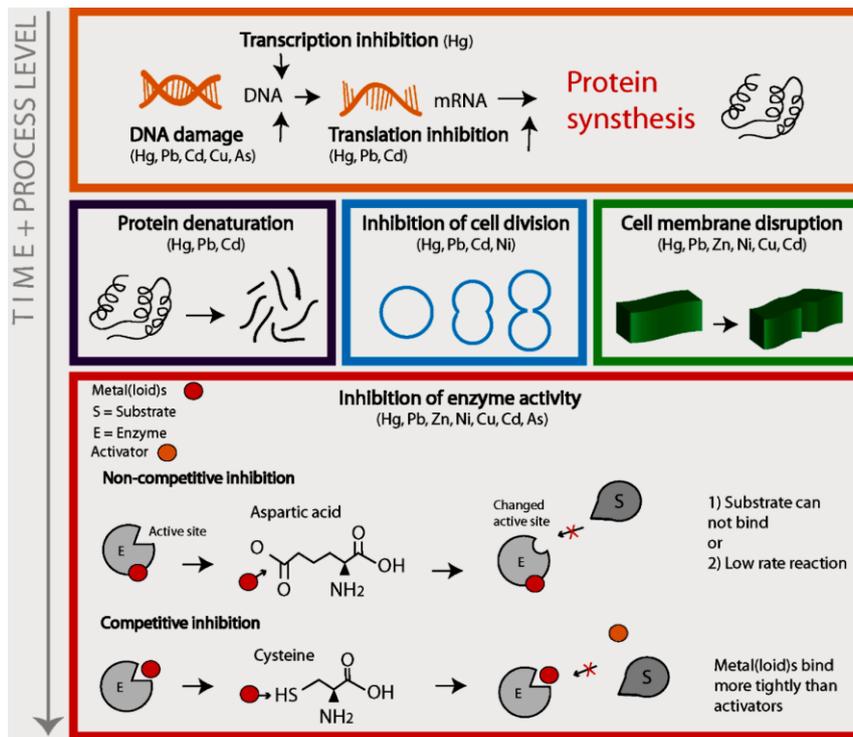


Figura 1. Principales efectos tóxicos de los metal/oides sobre los microorganismos, enfocado a la actividad de las enzimas. Tomado de: Aponte (2020).⁸

3. Calidad de los suelos

La calidad de los suelos fue definida por la Sociedad Americana de las Ciencias del Suelo¹¹ como “la capacidad de un suelo específico para funcionar en los ecosistemas naturales, capaz de sostener la vegetación y la productividad animal, conservar o mejorar la calidad del aire y el agua, y mantener la salud y vida de los humanos”.

En los últimos años existe una tendencia a emplear las propiedades biológicas, para medir la calidad de los suelos,¹² sin embargo, el empleo tradicional del concepto “calidad del suelo” para la contaminación por metal/oides es una perspectiva relativamente novedosa,¹³ donde se han validado varios índices^{12,14} que incluyen las actividades de las enzimas, y puede estar fuertemente influenciado por las propiedades biológicas del suelo.¹⁵

Por otro lado, las sustancias orgánicas pueden reaccionar con los metal/oides formando complejos e inmovilizándolos, lo cual promueve su estabilización y más baja toxicidad.¹⁶

En microorganismos como las bacterias estos iones metálicos se pueden reducir y transformarse en nanopartículas no tóxicas después de la interacción con proteínas intracelulares y moléculas orgánicas o por interacción con la pared celular.¹⁷

La respuesta de las enzimas a la contaminación por metal/oides en los suelos es variable. Un meta-análisis realizado por Aponte (2020)⁸ mostró que las enzimas Arilsulfatasa y la Deshidrogenasa como los indicadores más sensibles a la contaminación por metal/oides que otras enzimas, como la Fosfatasa Alcalina y la Catalasa.

Es válido resaltar el grupo inNOVAcEnz, acudiendo a la esfera de la Enzimología Aplicada a la industria y la biorremediación del medio ambiente, promueve la implementación de enzimas como la Trimetafosfatasa, la Rodanasa, la Polifenol oxidasa y la Lacasa, además de la Catalasa y la Peroxidasa; referidas por Aponte (2020)⁸ como enzimas del suelo relacionadas con los ciclos biogeoquímicos del P, S y C. Sumado el hecho que estas dos últimas y la Superóxido Dismutasa se emplean en el estudio de la respuesta de las plantas al estrés metálico y se recomiendan como indicadores para la caracterización agroecológica de un área afectada, directa o indirectamente, por los residuales de una industria, como marcadores de estrés oxidativo de los microorganismos.⁶

Concomitantemente, se recomienda evaluar más actividades enzimáticas para cada ciclo biogeoquímico, lo cual puede relacionarse estequiométricamente con los elementos C, N, P y S, para predecir las limitaciones de nutrientes para las plantas y microorganismos.⁸ Igualmente se recomienda realizar un abordaje multidisciplinario en campo, donde la fitorremediación sea aplicado como una tecnología verde sostenible, basado en el potencial económico de esas áreas agrícolas, la protección a la salud animal y humana, según lo expresado por Jakovljevic y cols. (2016).¹⁸

De igual manera, es pertinente se aplique un sistema de bajo costo, que no requiera de infraestructura sofisticada, de asequible implementación sostenible y compatible con el medio ambiente.¹⁹

Partiendo de lo anterior se propone implementar la determinación de la enzima Trimetafosfatasa, que juega un rol fundamental en el ciclo biogeoquímico del fósforo en los suelos. Esta enzima hidroliza el anillo del trimetafosfato, un polifosfato cíclico, en cuya forma no contribuye a la fertilización de los suelos y no es absorbido por las plantas.²⁰ De ahí que pueda emplearse para regular la degradación de los trimetafosfatos, tanto en los suelos, como en los almacenados en la biomasa de los microorganismos.

Más adelante se refieren dos métodos: uno, para la síntesis del trimetafosfato y el otro para la determinación de la actividad de la enzima Trimetafosfatasa.

Para abordar la síntesis de dicho sustrato heterocíclico, es pertinente conocer la diversidad estructural de dichos polifosfatos, pues según las condiciones de temperatura se favorece la formación de un producto u otro. Además, para comprender la dinámica biogeoquímica que involucra a la enzima Trimetafosfatasa se hace oportuno iniciar con un breve estudio de los polifosfatos.

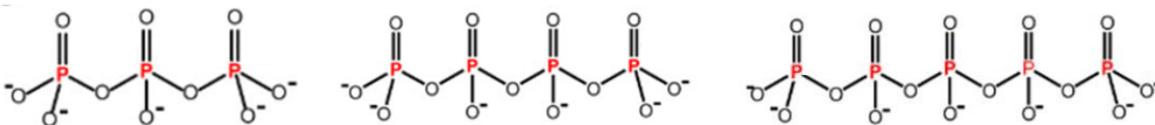
4. Los polifosfatos: estructura y participación en procesos biogeoquímicos.

Los polifosfatos son polímeros de ortofosfatos unidos por enlaces anhídrido fosfórico. Son encontrados en un amplio rango de organismos incluyendo bacterias, algas, hongos,

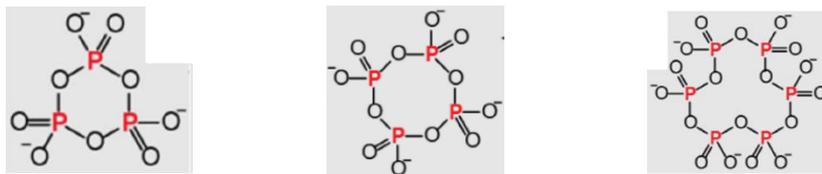
tripanosomas, plantas, y mamíferos. Sus funciones biológicas incluyen el almacenamiento de energía, quelación de metales, regulación de la presión osmótica, tamponamiento alcalino, remoción de fosfato biológico y respuesta al estrés, además de ser transferidos a las proteínas, como una modificación post-traduccional que regula el plegamiento de las mismas en las células.²¹ También se acumulan en los microorganismos como una forma de eliminación del fosfato inorgánico de su ambiente.²²

Los polifosfatos pueden aparecer como largas cadenas lineales o cíclicas (también llamados metafosfatos). Se ha reportado la coexistencia de ambos tipos en las células. Algunos de estos compuestos son: ²⁰

(a) Polifosfatos lineales con 3, 4 y 5 grupos fosfatos:



(b) Metafosfatos o fosfatos cíclicos con 3, 4 y 6 grupos fosfato:



Se sabe que los polifosfatos de alto peso molecular pueden degradarse a trimetafosfatos (TMP, $[P_3O_9]^{3-}$) bajo catálisis por iones metálicos, particularmente Mg^{2+} .²³

De particular interés es la posible producción biológica del trimetafosfato (TMP),²³ pues se sabe de la existencia de enzimas que catalizan la apertura catalítica del anillo para producir trifosfato lineal, como la Trimetafosfatasa.

4.1. Los polifosfatos de las microalgas en la remediación de aguas residuales: utilidad para los suelos y cosechas.

El cultivo de biomasa de microalgas a pequeña escala se ha empleado tradicionalmente para el consumo humano, hasta grandes cosechas de ~30,000 toneladas de peso seco por año, fundamentalmente como suplemento dietético.²⁴

Las microalgas también se han aplicado en el tratamiento de aguas residuales buscando su sostenibilidad ²⁵ con la ventaja adicional de acumular gránulos de polifosfato en sus citoplasmas. De ahí que se pensara en la posibilidad de devolver a los suelos los fosfatos y contribuir con ello a cerrar el ciclo del fósforo, ²⁶ de hecho se han utilizado varias especies de microalgas con estos fines.²⁵

Las microalgas se han empleado extensamente, desde hace más de una centuria, para el tratamiento de los efluentes domésticos, particularmente en estanques donde las bacterias

lo hacen de manera natural, ²⁷ inclusive a gran escala, con iguales fines y combinado a la generación de biogás.²⁸

Así, las microalgas se han identificado como una opción viable tanto para la producción de biomasa, de biogás y como un fertilizante de lenta liberación.²⁹

Además de las *Chlamydomonas* y la *Chlorella*; la *Euglena* y el *Scenedesmus spp.* son las especies de microalgas más empleadas en los tratamientos de aguas residuales en estanques a gran escala,^{30,31} con la ventaja que pueden almacenar más del 1% de su peso seco como polifosfatos, los cuales preservan por varios días mientras las bacterias los degradan de sus almacenes rápidamente, de ahí que su empleo como fertilizadores es mucho más dificultoso.²⁵

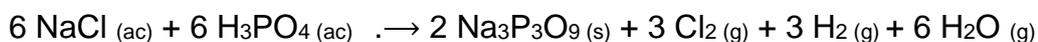
Los polifosfatos suelen acumularse como grandes polímeros (entre decenas y centenas de unidades) de fosfato inorgánico, en las vacuolas o como gránulos denominados acidocalcisosomas,³² pero no existen fuertes evidencias de la presencia de polifosfatos en las plantas superiores, lo cual constituye un campo reciente y extenso de investigación.³³ No obstante puede haber un vínculo ecológico donde la biomasa de algas sea aplicada a los suelos y a la vez favorezca las plantas.²⁶ También existen evidencias de la asimilación de los polifosfatos algales en líneas celulares de intestino de mamíferos, lo cual podría ser utilizado como biomasa para la alimentación.³⁴

4.2. Secuestación de metales pesados por los polifosfatos.

Aunque los polifosfatos de los acidocalcisosomas constituyen almacenes para el Ca^{2+} , se ha demostrado su capacidad de secuestrar otros cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}), cofactores de muchas enzimas, y metales tóxicos (Al^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} etc.).⁴⁸ Partiendo de ello Slocombe y cols. (2020)³⁵ plantean que el empleo de microalgas para la recuperación del fósforo para la agricultura, junto a la remoción de metales pesados, podría requerir procesos separados y en dependencia de la especie de microalga empleada en cada caso. En ciertos casos se han manejado los factores de transcripción relacionados con la biosíntesis de polifosfatos de las especies algales según el tipo de agua residual.^{25,36}

4.3. Métodos para la obtención del trimetafosfato de sodio (TMS).

El TMS es sintetizado siguiendo el procedimiento de Minh y cols. (2012)³⁷, quienes evaluaron diferentes condiciones para la síntesis térmica en el laboratorio, a partir del cloruro de sodio y el ácido ortofosfórico como reactantes iniciadores. Estos reactivos son ventajosos por su buena disponibilidad y bajo costo



Dichos investigadores analizaron el tamaño de partícula del cloruro de sodio y diferentes temperaturas, arribando a la conclusión de que ambos parámetros tienen importantes influencias sobre la eliminación de cloruro y la selectividad en el anión trimetafosfato.

La mayor temperatura de reacción contribuyó a la mayor velocidad de eliminación de cloruro y la selectividad por el anión trimetafosfato. Sin embargo, la temperatura de reacción fue limitada a 600 °C pues una temperatura mayor podría conducir a la transformación del TMS en la sal de Graham por fundir cerca de 627 °C.³⁸

No obstante, en dependencia de las condiciones de tamaño de partícula del cloruro de sodio y la temperatura del proceso prevalecerá una u otra de las especies del fósforo: los aniones ortofosfato (PO_4^{3-}), pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), y trimetafosfato ($\text{P}_3\text{O}_9^{3-}$).

Una vez obtenido el trimetafosfato se hace fundamental contar con una concentración que constituya una concentración de sustrato saturante, de modo que pueda emplearse para la medición de la actividad de la enzima Metafosfatasa. Para su obtención no se requiere de un alto grado de pureza, aunque si el conocimiento de los subproductos para evitar interferencias con el método enzimático.

Para la preparación del polímero cíclico trimetafosfato a nivel de laboratorio se acude a un diseño de experimento 3x3.³⁹ Para ello se preparan soluciones de cloruro de sodio de tres firmas comerciales diferentes y ácido ortofosfórico, los cuales se mezclan en recipientes adecuados a temperatura ambiente. Cada mezcla de reacción se introduce en un horno a temperaturas de 350, 500 y 600 °C por 120 minutos. Después se enfría a la temperatura ambiente. El gas liberado es atrapado en una botella con agua o una solución acuosa de hidróxido de potasio, para el análisis del cloruro eliminado.

Se debe contar con procedimientos analíticos para la determinación de los aniones cloruro (Cl^-)⁴⁰ y el contenido de los diferentes aniones derivados del fosfato (ortofosfato, pirofosfato y trimetafosfato); en caso de ser posible emplear un método instrumental, como la Cromatografía de Intercambio Iónico, que permita diferenciar entre los aniones ortofosfato (PO_4^{3-}), pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), y trimetafosfato ($\text{P}_3\text{O}_9^{3-}$).

De cada uno de los nueve precipitados obtenidos por calcinación, se prepara una solución stock tamponada de metafosfato, a una concentración de 10 mg/mL en buffer acetato-veronal, pH 6.0. Se realizan cuatro diluciones (1:2, 1:3, 1:5, 1:10) de cada una, las cuales aportan el metafosfato como sustrato de la enzima.

La muestra conteniendo la enzima será aportada de cualquier fuente disponible: microbiana, vegetal, animal e incluso de suelos. Así, partiendo de dilución de cada precipitado en el buffer de reacción se realiza el procedimiento para medir la actividad de la enzima Trimetafosfatasa.⁴¹

Cada precipitado es evaluado como sustrato. Para ello se procede al ploteo de las curvas de Michaelis-Menten y los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, para calcular la concentración saturante y los parámetros cinéticos de la enzima K_m y V_{max} ; además de evaluar la eficacia de cada proceso de calcinación.

Conclusiones

La contaminación por metales y metaloides en nuestro entorno local es una realidad que debemos modificar aplicando métodos amigables con el medio ambiente. Un medio seriamente afectado es el suelo, donde se cosechan la mayor parte de los cultivos vegetales, además de drenar hacia las aguas subterráneas, lo cual afecta animales y humanos. En los suelos existen microorganismos y enzimas que son afectados por los metales y metaloides, de ahí que puedan emplearse como bioindicadores de calidad de los mismos. Una enzima de interés es la Trimetafosfatasa, fácil y eficaz de cuantificar en los suelos. Esta enzima puede contribuir a la liberación lenta y controlada de trimetafosfatos a los suelos y favorecer su fertilización. Junto a ello pueden emplearse polifosfatos aislados de microorganismos, especialmente de biomasa de micro y macroalgas marinas. El diseño y la implementación de los procedimientos anteriores contribuirán a la remediación de los suelos contaminados por metales pesados en nuestra localidad.

Referencias bibliográficas.

1. Yewale P, Rahman A, Nahar N, Saha A. Sources of metal pollution, global status, and conventional bioremediation practices, en: Das S, Dash H. (editores.), Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation: Florida: CRC Press, 2017; p. 25–40.
2. Mahar A, Wang P, Ali A, Awasthi M, Lahori A, Wang Q, et al. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicol Environm Safety* 2016; 126:111–121.
3. Ramesh K, Anbazhagan V. Analysis and assessment of heavy metals in soils around the industrial areas in Mettur, Tamilnadu, India. *Environm Monit Assessm* 2018; 190: 519.
4. Oves M, Saghir M, Huda A, Nadeen M, Almeelbi T. Heavy Metals: Biological Importance and Detoxification Strategies. *J Bioremed Biodegrad* 2016; 07.
5. García D, Lima L, Ruiz L, Santana J, Calderón P. Agroecosistemas con probables riesgos a la salud por contaminación con metales pesados. *Rev Cub Quím* 2016; 28(1):328.
6. Valdés R, Cruz O, Balbín M, Guridi F, Guzmán A, Mesa M, et al. Fitogestión (FITOG-MP): tecnología para recuperar áreas contaminadas con metales pesados. Monografía. *Ciencia en la Universidad*. Vol 15 No 1 (enero-diciembre); 2017.

7. Abdu N, Abdullahi A, Abdulkadir A. Heavy metals and soil microbes. *Environmental Chemistry Letters* 2017; 15:65–84. Disponible en: <http://doi:10.1007/s10311-016-0587-x>.
8. Aponte H. Development of soil quality indices based on biological indicators to assess chemical soil degradation by metal(loid)s in soils near to a copper smelter [Tesis Doctoral]. Temuco, Chile: Universidad de la Frontera; 2020.
9. Korkina I, Vorobeichik E. The humus index: A promising tool for environmental monitoring. *Russian Journal of Ecology* 2016; 47:526–531.
10. Stazi S, Marabottini R, Papp R, Moscatelli M. Arsenic in Soil: Availability and Interactions with Soil Microorganisms, en: Sherameti I, Varma A, (editores). *Heavy Metal Contamination of Soils*. Dinamarca: Cham Springer, 2015; p.113–126.
11. Soil Science Society of America, 1995. Statement on soil quality. Disponible en: <http://www.soils.org>
12. Paz J, Fu S. Biological Indices for Soil Quality Evaluation: Perspectives and Limitations. *Land Degradation & Development* 2016; 27: 14–25. doi:10.1002/ldr.2262.
13. Aponte H, Medina J, Butler B, Meier S, Cornejo P, Kuzyakov Y. Soil quality indices for metal(loid) contamination: An enzymatic perspective. *Land Degradation and Development*, 2020; 31(17):2700-2719.
14. Mukhopadhyay S, Masto R, Yadav A, George J, Ram L, Shukla S. Soil quality index for evaluation of reclaimed coal mine spoil. *Science of The Total Environment* 2016;542:540–550. Disponible en: <http://doi:10.1016/j.scitotenv.2015.10.035>.
15. Aponte H, Meli P, Butler B, Paolini J, Matus F, Merino C, et al. Meta-analysis of heavy metal effects on soil enzyme activities. *Science Total Environm* 2020; 737, 139744.
16. Medina J, Monreal C, Chabot D, Meier S, González M, Morales E, et al. Microscopic and spectroscopic characterization of humic substances from a compost amended copper contaminated soil: main features and their potential effects on Cu immobilization. *Environmental Science and Pollution Research* 2017; 24:14104–14116.
17. Iravani S, Varma R. Bacteria in Heavy Metal Remediation and Nanoparticle Biosynthesis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2020; 8:5395–5409.
18. Jakovljevic T, Radojicic I, Laslo A. Phytoremediation of heavy metals. Applications and experiences in Croatia. *Zestita Materijala* 2016; 57(3):496-501.
19. Rodríguez P, Poveda C. Diseño de un modelo costo-beneficio en la implementación de un sistema de fitorremediación de aguas residuales con cromo en las curtiembres de san Benito sur de Bogotá [Tesis de Grado]. Bogotá, Colombia: Fundación Universitaria los Libertadores; 2016.

20. Mandala V, Loh D, Shepard S, Geeson M, Sergeev I, Nocera D, et al. Bacterial phosphate granules contain cyclic polyphosphates: evidence from ^{31}P solid-state NMR. *J Am Chem Soc* 2020; 142(43): 18407–18421.
21. Azevedo C, Desfougeres Y, Jiramongkol Y, Partington H, Trakansuebkul S, Singh J, et al. Development of a yeast model to study the contribution of vacuolar polyphosphate metabolism to lysine polyphosphorylation. *J Biol Chem* 2020; 295:1439–1451.
22. Ohtake H, Tsuneda S. (eds.) *Phosphorus Recovery and Recycling*. Springer, Singapore: 2019. Disponible en: <http://doi.org/10.1007/978-981-10-8031-9>
23. Bezold D, Durr T, Singh J, Jessen H. Cyclotriphosphate: a brief history, recent developments, and perspectives in synthesis. *Chem Eur J* 2020; 26:2298–2308.
24. Slocombe S, Benemann J. Introduction en microalgal production for biomass and high-value products. En: Slocombe S, Benemann J, (editores). Florida: CRC Press, 2016; p. 27-40. Disponible en: <http://www.crcnetbase.com/isbn/978-1-4822-1970-8>
25. Li K, Liu Q, Fang F, Luo R, Lu Q, Zhou W, et al. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresour Technol* 2019; 291:121934.
26. Siebers N, Hofmann D, Schiedung H, Landsrath A, Ackermann B, Gao L, et al. Towards phosphorus recycling for agriculture by algae: Soil incubation and rhizotron studies using ^{33}P -labeled microalgal biomass. *Algal Res* 2019; 43:101634.
27. Tarayre C, De Clercq L, Charlier R, Michels E, Meers E, Camargo M, et al. New perspectives for the design of sustainable bioprocesses for phosphorus recovery from waste. *Bioresour Technol* 2016; 206:264–274.
28. Ación F, Fernández J, Grima E. Supply of CO_2 to closed and open photobioreactors. En: Slocombe S, Benemann J, (editores). *Microalgal production for biomass and high-value products*. Florida: Taylor & Francis Group, 2016; p. 225–252.
29. Schreiber C, Schiedung H, Harrison L, Briese C, Ackermann B, Kant J, et al. Evaluating potential of green alga *Chlorella vulgaris* to accumulate phosphorus and to fertilize nutrient-poor soil substrates for crop plants. *J Appl Phycol* 2018; 30:2827–2836.
30. Crimp A, Brown N, Shilton A. Microalgal luxury uptake of phosphorus in waste stabilization ponds - frequency of occurrence and high performing genera. *Water Sci Technol* 2018; 78:165–173. Disponible en: <http://doi:10.2166/wst.2017.632>
31. Florentino A, Costa M, Nascimento J, Abdala E, Mota C, Santos A. Identification of microalgae from waste stabilization ponds and evaluation of electroflotation by alternate current for simultaneous biomass separation and cell disruption. *Engenharia Sanitaria Ambiental* 2019; 24:177–186. Disponible en: <http://doi:10.1590/s1413-41522019193972>

32. Albi T, Serrano A. Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer. *World J Microbiol Biotechnol* 2016; 32:1–12.
33. Zhu J, Loubéry S, Broger L, Lorenzo L, Utz A, Young C, et al. A genetically validated approach to detect inorganic polyphosphates in plants. *Plant J* 2020; 102:507–516.
34. Gao F, Wu H, Zeng M, Huang M, Feng G. Overproduction, purification, and characterization of nanosized polyphosphate bodies from *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Microb Cell Fact* 2018; 17:27. Disponible en: <http://doi:10.1186/s12934-018-0870-6>.
35. Slocombe S, Zuñiga T, Chu L, Wood N, Camargo M, Baker A. Fixing the Broken Phosphorus Cycle: Wastewater Remediation by Microalgal Polyphosphates. *Front Plant Sci* 2020; 11:982. Disponible en: <http://doi:10.3389/fpls.2020.00982>
36. Kube M, Jefferson B, Fan L, Roddick F. The impact of wastewater characteristics, algal species selection and immobilisation on simultaneous nitrogen and phosphorus removal. *Algal Res* 2018; 31:478-488. Disponible en: <http://doi:10.1016/j.algal.2018.01.009>
37. Minh D, Ramarosan J, Nzihou A, Sharrock P. One-Step Synthesis of Sodium Trimetaphosphate. *Ind Eng Chem Res* 2012; 51(10):3851-3854.
38. Bastide J, Azzouz L, Germain P. Etude de la cristallisation du trimetaphosphate de sodium vitreux. *Mater Res Bull* 1994; 29: 351.
39. Melo O, López L, Melo S. Diseño de Experimentos. Métodos y Aplicaciones. Bogotá D.C.: Centro Editorial Universidad Nacional de Colombia, 2020.
40. Florence T, Farrar J. Spectrophotometric determination of Chloride at the parts per-billion level by the mercury (II) thiocyanate method. *Anal Chim Acta* 1971;54: 373-377.
41. *Methods in Enzymology*. Vol II. Colowick S, Kaplan N. (editores). Nueva York: Academic Press Inc; 1955: 577-580.