Aislamiento y caracterización molecular y bioquímica de una cianobacteria (*Anabaena* sp.) del río Amazonas, Loreto-Perú

Miguel A. Grandez Mavila¹, Segundo L. Estela Moreno¹, Hicler N. Rodriguez Mashacuri^{1,2}, Carlos G. Castro Cobos^{1,2}, Milagros M. Torres Vásquez¹, Jorge L. Marapara del Águila², Juan C. Castro Gómez², Marianela Cobos Ruiz¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética (LBB) – Universidad Científica del Perú (UCP), Av. José Abelardo Quiñones Km 2.5, San Juan Bautista, Iquitos, Perú

²Unidad Especializada del Laboratorio de Investigación de Biotecnología (UELIB), Centro de Investigación de Recursos Naturales de la UNAP (CIRNA)-Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), Psje. Los Paujiles S/N, San Juan Bautista, Iquitos, Perú

Recibido el 15 de junio del 2021. Aceptado el 29 de junio 2021

DOI: <https://doi.org/10.33017/RevECIPeru2021.0005/>

Resumen

Las cianobacterias son procariotas fotosintéticos con distribución cosmopolita. Debido a los múltiples compuestos bioactivos que producen y las diversas aplicaciones potenciales que pueden tener, han llamado la atención de la comunidad científica. Sin embargo, aún existen vacíos en el conocimiento científico básico de las cianobacterias y por ende tienen limitado uso biotecnológico. Por tanto, para ampliar los conocimientos científicos de estos microorganismos, la presente investigación tuvo como principal objetivo aislar y caracterizar a nivel molecular y bioquímico la cianobacteria *Anabaena* sp. del río Amazonas. Las muestras de agua fueron colectadas del río Amazonas y se enriquecieron con medio ASM1. Luego, se aisló y cultivó con métodos estándares una especie de cianobacteria. Posteriormente, la cianobacteria aislada fue identificada morfológicamente y caracterizada a nivel molecular y bioquímico. Los análisis morfológicos a nivel microscópico y su caracterización molecular indican que se aisló la cianobacteria *Anabaena* sp. El análisis bioquímico muestra que la cianobacteria tiene 28,40% de proteínas, 10,08% de lípidos, 9,34% de carbohidratos y 11,20% de cenizas. En conclusión, se ha aislado y cultivado de manera exitosa la cianobacteria *Anabaena* sp. la misma que puede tener potenciales aplicaciones para la producción biotecnológica de compuestos nutritivos para humanos.

Descriptor: Biodiversidad, biología molecular, cianobacteria, ecosistema amazónico

Abstract

Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotes with a cosmopolitan distribution. Due to the multiple bioactive compounds that produce and their diverse potential applications, these microorganisms have attracted the attention of the scientific community. However, there are still gaps in the basic scientific knowledge of cyanobacteria and thus have limited biotechnological use. Therefore, in order to expand the scientific knowledge of these microorganisms, the main objective of the present research was to isolate and characterize at the molecular and biochemical level the cyanobacteria *Anabaena* sp. from the Amazon River. Water samples were collected from the Amazon river and enriched with ASM1 medium. Then, a cyanobacteria species was isolated and cultured with standard methods. Subsequently, the isolated cyanobacteria was morphologically identified and characterized at the molecular and biochemical levels. The morphological analysis at the microscopic level and its molecular characterization indicate that the cyanobacteria *Anabaena* sp. was isolated. The biochemical analysis shown that the cyanobacteria has 28.40% of proteins, 10.08% of lipids, 9.34% of carbohydrates, and

11.20% of ashes. In conclusion, the cyanobacteria *Anabaena* sp. has been successfully isolated and cultured and may have potential applications for the biotechnological production of human nutritional compounds.

Keywords: Biodiversity, molecular biology, cyanobacteria, Amazonian ecosystem

1. Introducción

Actualmente, los cuerpos de agua dulce constituyen un recurso natural invaluable en diversos aspectos tales como económico, cultural, estético, educativo y científico. Sin embargo, estos ecosistemas están experimentando cambios en su biodiversidad, calidad y cantidad por diversas actividades humanas que ocasionan contaminación, destrucción y degradación de hábitats [1].

La región nororiental del Perú, particularmente la región de Loreto, contiene una gran variedad de ambientes acuáticos de agua dulce (es decir, ríos, lagunas, etc.) que albergan una rica biodiversidad. Las investigaciones enfocadas en la identificación y caracterización de las microalgas y cianobacterias deben ser un esfuerzo continuo, debido a que solo unos pocos miles (~ 50,000) se conservan en colecciones de cultivos de microalgas en todo el mundo y de ellos, solo unos pocos cientos (<10%) han sido investigados por su composición bioquímica [2].

En la Amazonia peruana existen algunos estudios de identificación taxonómica y molecular de microalgas [2] y sólo un reporte sobre el aislamiento y caracterización bioquímica de dos cianobacterias [3]. Consecuentemente, es necesario continuar realizando investigaciones básicas y conocer los posibles usos biotecnológicos de estos microorganismos [4]. Por tanto, el objetivo principal de esta investigación fue aislar y caracterizar a nivel molecular y bioquímico la cianobacteria *Anabaena* sp. del río Amazonas.

2. Metodología

2.1. Colecta de muestras biológicas y enriquecimiento inicial

La muestra de agua superficial (hasta ~20 cm profundidad) se obtuvo del río Amazonas (03°30'31,2" S, 73°03'29,4" O). Estas fueron concentradas (~500 mL) mediante filtración por arrastre con una red fitoplanctónica de 20 µm de diámetro de poro [5] y transportadas protegidas de la luz y en refrigeración al LBB-UCP.

Luego, para enriquecer los cultivos, 500 µL de la muestra se transfirió a microtubos de 2 mL y se agregó 500 µL del medio de cultivo ASM1 y cultivó bajo las siguientes condiciones: fotoperiodo de 12h:12h (luz:oscuridad), temperatura de 25 ± 1 °C, intensidad de luz de 80 µEm⁻².s⁻¹ con luz blanca fluorescente y agitación continua a 100 rpm por 4 semanas.

2.2. Aislamiento, cultivo y cosecha de las cianobacterias

Después del cultivo inicial, las cianobacterias fueron aisladas utilizando las técnicas de lavado celular y de dilución en placas con agar [6]. A medida que la biomasa de los cultivos cianobacterianos aumentaron se transfirieron a matraces de Erlenmeyer y los cultivos cianobacterianos se mantuvieron bajo las condiciones de cultivo indicadas por varias semanas [2].

Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación (4500 rpm a 4°C por 10 min). Una fracción de la biomasa fresca (100 mg) se empleó para purificar el ADN genómico para su caracterización molecular y el resto de la biomasa se secó en una estufa a 70°C por 72 h para realizar la caracterización bioquímica.

2.3. Caracterización molecular

El ADN genómico fue purificado de acuerdo a Cobos *et al.* [2] con algunas modificaciones. Luego, la calidad y cantidad del ADN genómico purificado se realizó mediante análisis espectrofotométrico empleando un espectrofotómetro UV/Vis NanoDrop 2000 y análisis electroforético en gel de agarosa al 1% [5]. Luego el ADN genómico fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) según Valerio *et al.* [7], usando cebadores específicos para cianobacterias que hibridan en el gen ribosomal 16S (CYA738F: 5'-ATACCCCWGTAGTCCTAGC-3', CYAN1281R: 5'-GCAATTACTAGCGATTCTCC-3'). Las condiciones de la RCP se llevaron a cabo de acuerdo a Boute *et al.* [8] con algunas modificaciones en las temperaturas de hibridación (55°C) y elongación (72°C) por 35 ciclos.

Los amplicones fueron resueltos en gel de agarosa al 2% y visualizados con un transiluminador de luz UV y registrados fotográficamente.

2.4. Prueba de la axenicidad de los cultivos

Para demostrar que los cultivos de la cianobacteria eran axénicos (ausencia de contaminación con microalgas) se procedió a amplificar el ADN genómico purificado siguiendo el protocolo de Cobos et al. [2] usando cebadores que hibridan en sitios flanqueantes de la región ITS2 (ITS2F: 5'-GAGCATGTCTGCCTCAGC-3', ITS2R: 5'-GGTAGCCTTGCCTGAGC-3') y permiten amplificar una región de ~300 pb siempre que exista ADN genómico de microalgas, (p.ej., clorofitas), protozoos y/o de hongos. Se empleó como controles positivos de amplificación el ADN genómico purificado de las microalgas *Ankistrodesmus falcatus* y *Chlamydomonas reinhardtii*. Los amplicones obtenidos fueron resueltos en gel de agarosa al 2% y visualizados en un transiluminador de luz UV y registrados fotográficamente.

2.5. Caracterización bioquímica

Se determinó el contenido de lípidos, carbohidratos, proteínas y cenizas. La extracción de lípidos totales se realizó según Yu et al. [9], la determinación de proteínas se realizó por triplicado de acuerdo al protocolo descrito por Hartree et al. [10], para la cuantificación de carbohidratos se aplicó el método de Dubois et al. [11] previa hidrólisis ácida con HCl 2N y el contenido de cenizas se determinó de acuerdo a Leenin et al. [12]

3. Resultados y discusión de los resultados

3.1. Aislamiento y cultivo de *Anabaena* sp.

En el presente trabajo de investigación se logró aislar y cultivar en condiciones de laboratorio la cianobacteria *Anabaena* sp. de la Amazonia peruana (Figura 1). El éxito en este proceso lo podemos atribuir a los métodos de aislamiento de cianobacterias implementados en base a los protocolos descritos previamente por Rippka, Allen y Castenholz [13]–[15]. Con estas aproximaciones metodológicas ha sido posible aislar la cianobacteria filamentososa, tal como ha sido reportado previamente [16]–[18]. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación corrobora que los métodos de aislamiento publicados son efectivos para el aislamiento de cianobacterias nativas de la Amazonía peruana.

Interesantemente, con las aproximaciones metodológicas empleadas se logró obtener cultivos uniales de *Anabaena* sp. y fueron axénicos, es decir libre de contaminación con microorganismos eucariotas (p.ej., microalgas, protozoos, hongos, etc.). Para lograr esta condición, no fue necesario el uso de antibióticos o inhibidores del crecimiento de microorganismos eucariotas (p.ej., cicloheximida, imipenem, etc.) empleados por otros investigadores [19], [20]. Consecuentemente, la cianobacteria aisladas es apropiada para futuros estudios ómicos (p.ej., genómico, transcriptómico, proteómico, metabolómico, lipidómica, alimentómica, etc.) tal como ha sido reportado para otras cianobacterias alrededor del mundo [21]–[24].

Figura 1. Microfotografía que muestran las características morfológicas de *Anabaena* sp.

3.2. Caracterización molecular

Con el protocolo estandarizado se ha logrado purificar el ADN genómico de *Anabaena* sp. El ADN purificado se caracterizó por su elevada calidad con ratios A_{260}/A_{230} de 2,1 y de A_{260}/A_{280} 1,9.

En base a las características morfológicas evidenciadas en las observaciones microscópicas se pudo reconocer que la cianobacteria aislada correspondía al género *Anabaena* (Figura 2). Sin embargo, para corroborar estas observaciones se emplearon herramientas moleculares, primero para purificar el ADN genómico y luego amplificar una región específica del gen 16 S presente en las cianobacterias. El ADN purificado se caracterizó por su alta calidad y cantidad apropiadas para los análisis moleculares (Figura 3). De acuerdo a Green et al. [25] los ratios de calidad obtenidos sugieren ausencia de contaminantes que son comunes en las

muestras de ADN genómico, tales como proteínas, polisacáridos y otros metabolitos. Adicionalmente, la amplificación exitosa del gen ribosomal 16S nos indica claramente que se aisló una cianobacteria, toda vez que el operón del ARNr y en particular el gen ribosomal 16S está presente en las cianobacterias y otros procariotas tal como lo indican otros autores [26], [27].

Figura 2. Caracterización molecular (a) análisis electroforético y espectrofotométrico del ADN genómico purificado de *Anabaena* sp. (b) análisis electroforético de los productos de RCP con cebadores específicos de cianobacterias.

Consecuentemente, la amplificación y por ende la identificación de esta región es empleada frecuentemente para identificar estos microorganismos [28], [29]. Sin embargo, para una identificación taxonómica a nivel de especie será necesario, en una siguiente etapa de nuestra investigación, secuenciar estas regiones amplificadas.

Asimismo, en base a las características morfológicas y la amplificación exitosa mediante la técnica de RCP del gen ARNr 16S de la muestra de ADN genómico de *Anabaena* sp. aisladas corresponden al grupo de las cianobacterias

3.3. Axenicidad del cultivo de *Anabaena* sp.

La axenicidad del cultivo de la cianobacteria se corroboró mediante la técnica de la RCP empleando cebadores específicos para la región ITS2, propia de microorganismos eucariotas que podrían contaminar los cultivos (p.ej., microalgas, hongos, u otros microorganismos eucariotas). Los resultados muestran que el cultivo es axénico, toda vez que no mostraron amplicones correspondientes a la región ITS2, que sí se observa en los controles positivos, constituidos por ADN genómico de dos especies de microalgas (*Ankistrodesmus falcatus* y *Chlamydomonas reinhardtii*).

Figura 3. Análisis electroforético de los amplicones obtenidos después de amplificar las muestras de ADN genómico mediante la RCP empleando los cebadores ITS2F y ITS2R.

3.4. Caracterización bioquímica

Estos resultados están respaldados por otras investigaciones a nivel bioquímico de otras especies de cianobacterias como *Anabaena* spp., *Arthrospira* spp., *Oscillatoria* spp., *Synechocystis* spp., etc. [30]–[32]. Cabe resaltar, *Anabaena* sp. sobresalió por el alto contenido de proteínas, en comparación con otros componentes bioquímicos analizados. Probablemente, una importante fracción de estas proteínas cianobacterianas están constituidas por las ficocianinas, proteínas comúnmente presentes en estos microorganismos [33]–[35] y que cumplen roles fundamentales en la fotosíntesis y la eliminación de radicales libres por su potente actividad antioxidante [35]–[38]. En las siguientes etapas de análisis bioquímicos y moleculares de este género de cianobacteria aislada se deberá identificar estas proteínas y otros compuestos bioactivos con potencial nutracéutico y biotecnológico aplicables en los distintos campos tales como, farmacéutica, nutracéutica, acuicultura, agronomía, biorremediación, etc.

4. Conclusiones.

Se ha logrado aislar con éxito y cultivar en condiciones de laboratorio a la cianobacteria *Anabaena* sp. proveniente del río Amazonas. Esta cianobacteria fue identificada morfológicamente y molecularmente. Asimismo, su caracterización bioquímica indica que puede ser una importante fuente de nutrientes para humanos, particularmente por su alto contenido de proteínas, que podría aprovecharse como suplemento alimenticio. Es necesario continuar realizando investigaciones

Figura 4. Contenido de Lípidos totales, carbohidratos, proteínas y cenizas de *Anabaena sp.*

ómicas, como el metaboloma de esta especie, debido a que las cianobacterias en general están catalogadas como biofábricas de metabolitos primarios y secundarios y así nos puede revelar las múltiples aplicaciones biotecnológicas que pueden tener estos microorganismos.

Agradecimientos

Al proyecto Adquisición de un Sistema de Secuenciamiento masivo Next Seq 550 como soporte para estudios genómicos y metagenómicos de la biodiversidad de la Amazonía Peruana. Convenio 018-2018-FONDECYT-BM-INV-INC

Referencias

- [1] H. Ortega, L. Chocano, C. Palma, y I. Samanez, «Biota acuática en la Amazonía Peruana: diversidad y usos como indicadores ambientales en el Bajo Urubamba (Cusco - Ucayali)», *Rev. Peru. Biol.*, vol. 17, n.º 1, may 2011, doi: 10.15381/rpb.v17i1.47.
- [2] M. Cobos *et al.*, «Isolation and Characterization of Native Microalgae from the Peruvian Amazon with Potential for Biodiesel Production», *Energies*, vol. 10, p. 224, feb. 2017, doi: 10.3390/en10020224.
- [3] L. V. Diaz Calampa y M. A. Urcia Saboya, «Aislamiento e Identificación de Microalgas Oleaginosas en las Cuencas de los Rios Amazonas, Itaya y Nanay-2013», Universidad Científica del Perú, Iquitos-Perú, 2014.

- [4] J. Roset, S. Aguayo, y M. Muñoz, «Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión», *Rev. Toxicol.*, vol. 18, pp. 65-71, 2001.
- [5] M. Cobos, J. Castro, y G. Vargas, *Protocolos para el aislamiento, caracterización bioquímica y molecular de microalgas oleaginosas*. Iquitos-Perú, 2016.
- [6] A. Richmond, *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, 2004. Accedido: oct. 05, 2018. [En línea]. Disponible en: <http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=9e074d250deaae72b8c04aeb8cb9a559>
- [7] E. Valério, L. Chambel, S. Paulino, N. Faria, P. Pereira, y R. 2009 Tenreiro, «Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs», *Microbiology*, vol. 155, n.º 2, pp. 642-656, doi: 10.1099/mic.0.022848-0.
- [8] C. Boutte, S. Grubisic, P. Balthasart, y A. Wilmotte, «Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE», *J. Microbiol. Methods*, vol. 65, n.º 3, pp. 542-550, jun. 2006, doi: 10.1016/j.mimet.2005.09.017.
- [9] X. Yu *et al.*, «Isolation of a novel strain of Monoraphidium sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock», *Bioresour. Technol.*, vol. 121, pp. 256-262, oct. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.07.002.
- [10] E. F. Hartree, «Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response», *Anal. Biochem.*, vol. 48, n.º 2, pp. 422-427, ago. 1972, doi: 10.1016/0003-2697(72)90094-2.
- [11] Michel. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, y Fred. Smith, «Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances», *Anal. Chem.*, vol. 28, n.º 3, pp. 350-356, mar. 1956, doi: 10.1021/ac60111a017.
- [12] L. Flores, A. Ruiz, y A. Oscanoa, «Protocolo para determinación de cenizas en microalgas liofilizadas», vol. 48, n.º 1, p. 3, 2021.
- [13] Rippka R., «Isolation and purification of cyanobacteria.», *Methods Enzymol*, vol. 167, pp. 3-27., 1988.
- [14] M. M. Allen, «Simple Conditions for Growth of Unicellular Blue-Green Algae on Plates1, 2», *J. Phycol.*, vol. 4, n.º 1, pp. 1-4, 1968, doi: 10.1111/j.1529-8817.1968.tb04667.x.
- [15] R. W. Castenholz, «[3] Culturing methods for cyanobacteria», en *Methods in Enzymology*, vol. 167, Academic Press, 1988, pp. 68-93. doi: 10.1016/0076-6879(88)67006-6.

- [16] V. S. Uma, D. Gnanasekaran, U. Lakshmanan, y P. Dharmar, «Survey and isolation of marine cyanobacteria from eastern coast of India as a biodiesel feedstock», *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 24, p. 101541, mar. 2020, doi: 10.1016/j.bcab.2020.101541.
- [17] T. S. Thilak, P. V. Madhusoodanan, N. S. Pradeep, y R. Prakashkumar, «Isolation and taxonomy of the blue-green algae (Cyanobacteria), Nostoc and Anabaena in Kerala State, India», *Acta Bot. Hung.*, vol. 62, n.º 1-2, pp. 163-174, mar. 2020, doi: 10.1556/034.62.2020.1-2.10.
- [18] N. B. Prihantini, «Morphological identification, isolation, and culturing of cyanobacteria derived from hot spring of Cisolok and Galunggung Mountain based on enrichment method», *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1442, p. 012069, ene. 2020, doi: 10.1088/1742-6596/1442/1/012069.
- [19] L. Sena, D. Rojas, E. Montiel, H. González, J. Moret, y L. Naranjo, «A strategy to obtain axenic cultures of *Arthrospira* spp. cyanobacteria», *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 27, n.º 5, pp. 1045-1053, may 2011, doi: 10.1007/s11274-010-0549-6.
- [20] T. Vaara, M. Vaara, y S. Niemelä, «Two Improved Methods for Obtaining Axenic Cultures of Cyanobacteria», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 38, n.º 5, pp. 1011-1014, nov. 1979.
- [21] D. Schwarz, I. Orf, J. Kopka, y M. Hagemann, «Recent Applications of Metabolomics Toward Cyanobacteria», *Metabolites*, vol. 3, n.º 1, Art. n.º 1, mar. 2013, doi: 10.3390/metabo3010072.
- [22] T. Nakajima *et al.*, «Integrated metabolic flux and omics analysis of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under mixotrophic and photoheterotrophic conditions», *Plant Cell Physiol.*, vol. 55, n.º 9, pp. 1605-1612, sep. 2014, doi: 10.1093/pcp/pcu091.
- [23] W.-R. Lin, S.-I. Tan, C.-C. Hsiang, P.-K. Sung, y I.-S. Ng, «Challenges and opportunity of recent genome editing and multi-omics in cyanobacteria and microalgae for biorefinery», *Bioresour. Technol.*, vol. 291, p. 121932, nov. 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.121932.
- [24] Y. Yang, J. Feng, T. Li, F. Ge, y J. Zhao, «CyanOmics: an integrated database of omics for the model cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002», *Database*, vol. 2015, n.º bau127, ene. 2015, doi: 10.1093/database/bau127.
- [25] M. R. Green, J. Sambrook, y J. Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [26] B. A. Neilan, B. P. Burns, D. A. Relman, y D. R. Lowe, «Molecular Identification of Cyanobacteria Associated with Stromatolites from Distinct Geographical Locations», *Astrobiology*, vol. 2, n.º 3, pp. 271-280, ago. 2002, doi: 10.1089/153110702762027853.
- [27] F. Pomati *et al.*, «The Freshwater Cyanobacterium *Planktothrix* Sp. Fp1: Molecular Identification and Detection of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins», *J. Phycol.*, vol. 36, n.º 3, pp. 553-562, 2000, doi: 10.1046/j.1529-8817.2000.99181.x.
- [28] C. Lyra *et al.*, «Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera», *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 51, pp. 513-526, 2001.
- [29] J. Komárek, «Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches», *Algae*, vol. 4, n.º 21, pp. 349-375, 2006.
- [30] T. Kawaguchi y A. W. Decho, «Biochemical Characterization of Cyanobacterial Extracellular Polymers (EPS) from Modern Marine Stromatolites (Bahamas)», *Prep. Biochem. Biotechnol.*, vol. 30, n.º 4, pp. 321-330, ene. 2000, doi: 10.1080/10826060008544971.
- [31] K. Okajima *et al.*, «Biochemical and Functional Characterization of BLUF-Type Flavin-Binding Proteins of Two Species of Cyanobacteria», *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 137, n.º 6, pp. 741-750, jun. 2005, doi: 10.1093/jb/mvi089.
- [32] M. Cobos *et al.*, «Nutritional evaluation and human health-promoting potential of compounds biosynthesized by native microalgae from the Peruvian Amazon», *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 36, n.º 8, p. 121, jul. 2020, doi: 10.1007/s11274-020-02896-1.
- [33] A. Patel, S. Mishra, R. Pawar, y P. K. Ghosh, «Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat», *Protein Expr. Purif.*, vol. 40, n.º 2, pp. 248-255, abr. 2005, doi: 10.1016/j.pep.2004.10.028.
- [34] H. H. A. El-Baky y G. S. El-Baroty, «Characterization and bioactivity of phycocyanin isolated from *Spirulina maxima* grown under salt stress», *Food Funct.*, vol. 3, n.º 4, pp. 381-388, mar. 2012, doi: 10.1039/C2FO10194G.

- [35] V. B. Bhat y K. M. Madyastha, «Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against Oxidative Damage to DNA», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 285, n.º 2, pp. 262-266, jul. 2001, doi: 10.1006/bbrc.2001.5195.
- [36] V. B. Bhat y K. M. Madyastha, «C-Phycocyanin: A Potent Peroxyl Radical Scavenger in Vivo and in Vitro», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 275, n.º 1, pp. 20-25, ago. 2000, doi: 10.1006/bbrc.2000.3270.
- [37] M. R. Edwards, R. MacColl, y L. E. Eisele, «Some physical properties of an unusual C-phycocyanin isolated from a photosynthetic thermophile», *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, vol. 1276, n.º 1, pp. 64-70, ago. 1996, doi: 10.1016/0005-2728(96)00032-1.
- [38] M. Gantar, D. Simović, S. Djilas, W. W. Gonzalez, y J. Miksovská, «Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnithrix* sp. strain 37-2-1», *J. Biotechnol.*, vol. 159, n.º 1, pp. 21-26, may 2012, doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.02.004.

agrandez@ucp.edu.pe
sestelam@ucp.edu.pe
hiclernm177unap@unapiquitos.edu.pe
gilberto_castrocobos@yahoo.com
mimatova_16@outlook.com
jorge.marapara@unapiquitos.edu.pe
juan.castro@unapiquitos.edu.pe
mcobos@ucp.edu.pe