

# EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXUDADOS Y FILTRADOS DE CULTIVO DE *Hirsutella citriformis* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS

Data de submissão: 21/10/2024

Data de aceite: 01/11/2024

### **Maria Guadalupe Maldonado-Blanco**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto  
de Biotecnología  
Nuevo León, Mexico.

### **David Ruiz-Trejo**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto  
de Biotecnología  
Nuevo León, Mexico.

### **Myriam Elías-Santos**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto  
de Biotecnología  
Nuevo León, Mexico.

### **Teresa Pérez-Burgos**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto  
de Biotecnología  
Nuevo León, Mexico.

### **Ma. Guadalupe Maldonado Blanco**

Universidad Autónoma de Nuevo León,  
Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto  
de Biotecnología  
Nuevo León, Mexico.

**RESUMEN:** En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de los exudados producidos por cinco cepas del hongo entomopatógeno *Hirsutella citriformis*, así como por filtrados de cultivo líquido, y se probaron contra siete cepas bacterianas patógenas. Las cepas fúngicas se cultivaron en medio de agar papa dextrosa adicionado con extracto de levadura al 1%. Después de 30 días de incubación a 25°C se recolectaron los exudados con jeringas estériles y se conservaron en congelación hasta su uso. Para la preparación de los filtrados de cultivos, se inocularon las cepas fúngicas en caldo papa dextrosa y se incubaron en agitación a 250 rpm y 25°C durante 7 días, posteriormente se filtraron con gasa y filtros Millipore de 0.22 µm de tamaño de poro para obtener líquido libre de micelio. Por otra parte, se sembraron las especies bacterianas en cajas con agar nutritivo o agar infusión cerebro-corazón, después de los cual se colocaron discos de papel filtro estériles impregnados con 25 microlitros de cada exudado y/o filtrado de cultivo sobre los cultivos bacterianos sembrados y se incubaron a 37°C durante 24 a 72 horas o más. Los resultados obtenidos indicaron que el exudado producido por las seis cepas fúngicas inhibió al menos a una

especie bacteriana probada, con rangos de inhibición desde 0.5 a 2 mm destacando la cepa Quintana Roo que causó 2 mm de inhibición del crecimiento de *Salmonella* sp y la cepa fúngica mutante 53-10 que presentó 1.5 mm de inhibición contra *Klebsiella pneumoniae*. En los resultados de filtrados de cultivo, 4 cepas fúngicas mostraron inhibición del crecimiento de al menos una especie bacteriana, destacando el filtrado de la cepa de Colima que mostró inhibición de más de 10 mm contra *L. monocytogenes* y *B. subtilis*, mientras que la cepa fúngica de Yucatán mostró inhibición de 2 mm contra *B. cereus* y *L. monocytogenes*.

## INTRODUCCION

La mayoría de las sustancias antimicrobianas y en particular los antibióticos, son compuestos químicos producidos especialmente por hongos, bacterias, algas, líquenes y actinomicetos. A principios del siglo XX se descubre el primer antibiótico producido por hongos (penicilina) y posteriormente han seguido descubriéndose gran cantidad de sustancias antibióticas como cefalosporinas, ácido fusídico, anfotericina B, cloranfenicol, kanamicina, eritromicina, neomicina, tetraciclinas, novobiocina, vancomicina, etc. Los hongos no solo producen sustancias antimicrobianas, sino que también son capaces de producir toxinas de gran importancia debido a la posibilidad de su utilización como plaguicidas, los mismos poseen baja toxicidad en humanos, elevada acción insecticida y no necesitan requerimientos especiales para su empleo, en comparación con el uso directo de las cepas sobre los cultivos como ocurre con los hongos entomopatógenos. Además producen una amplia gama de metabolitos secundarios que exhiben una gran variedad de actividades: insecticidas, antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, antioxidantes y antivirales, y se han sugerido como posibles candidatos para el desarrollo de nuevos agentes bioactivos (Isaka *et al.* 2005; Pedras *et al.* 2002; Wang y Xu, 2012).

Entre los hongos entomopatógenos se encuentra el género *Hirsutella* del cual se tiene reportes de que produce sustancias de interés microbiológico. Entre las sustancias reportadas para este género se encuentran las hirsutelinas producidas por *Hirsutella thompsonii* (Mazet, 1992) las cuales cuentan con actividad contra insectos ocasionando la muerte de los mismos; los hirsutelones producidos por *H. nívea* cuya actividad inhibe a *Mycobacterium tuberculosis* (Isaka *et al.* 2005); las oosporinas reportadas por Rosas-Acevedo *et al.* (2003) que disminuyen la ovoposición de ácaros como *Tetranychus urticae*; también se encuentran los exopolisacáridos reportados por Li *et al.* (2010) que son producidos por cepas de *Hirsutella* sp. con capacidad inhibitoria contra diversas bacterias Gram positivas y negativas pero sobre todo inhiben a *Bacillus subtilis*.

*Hirsutella citrififormis* es un hongo que al igual que las otras especies de este género produce gran variedad de exudados cuando se le cultiva en diferentes medios de agar (Pérez-González 2015) y de los cuales solo se conoce que algunos son proteínas (exudados café rojizo y amarillo claro) y uno de ellos es un exopolisacárido (exudado cristalino) por lo cual en este trabajo se tiene como objetivo determinar la actividad antimicrobiana que

podrían presentar algunos exudados y filtrados de cultivo líquido de cepas mexicanas de *H. citrifomis* contra algunas bacterias Gram positivas y negativas de importancia médica, como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* sp.

## ANTECEDENTES

Se ha encontrado que la prevalencia de organismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, pero el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos que controlen estos microorganismos es mucho más lento. La resistencia bacteriana es uno de los retos clínicos más grandes que hoy prevalecen porque va limitando la prescripción de antibióticos que hasta hace poco eran eficaces. La importancia del reto radica en dos variables, la primera es que cada vez más microorganismos patógenos establecen elementos de adaptación a los antibióticos que incrementan las tasas de resistencia en todo el mundo. La segunda es que en las últimas dos décadas el desarrollo de nuevos antimicrobianos ha sido muy limitado debido a que muchas compañías farmacéuticas priorizaron su campo de investigación en el desarrollo de medicamentos para la atención de enfermedades crónico-degenerativas. En la actualidad persisten las enfermedades infecciosas, así como la resistencia bacteriana ante los antibióticos. Por eso se considera un reto clínico la búsqueda de nuevos fármacos semisintéticos y sintéticos que tengan efecto sobre microorganismos resistentes, inhibiendo su crecimiento o que eviten los mecanismos de resistencia.

Con el descubrimiento del hecho de que los hongos mataban insectos, siempre se creyó que se debía a que producían sustancias cuya efectividad dependía de su toxicidad y a pesar de que se ha reportado un elevado número de metabolitos secundarios producidos por los hongos entomopatógenos, en solo una pequeña fracción de las especies y géneros conocidos, éstos han sido examinados y caracterizados. Los mismos son generalmente más pequeños que el tamaño promedio de las macromoléculas biológicas. Algunos pueden ser de estructura orgánica simple, pero con frecuencia son compuestos de estructura un poco más compleja, muchos de ellos son toxinas peptídicas cíclicas y lineales, las que se derivan de otros metabolitos primarios, en algunos casos con estructuras inusuales y acompañadas ocasionalmente de procesos de biosíntesis específicos (Díaz *et al.* 2006).

Se ha reportado la presencia de sustancias antibióticas de naturaleza peptídica excretadas por diferentes hongos entomopatógenos como es el caso de *Paecilomyces lilacinus* el cual excreta en condiciones alcalinas una sustancia tóxica denominada paecilotoxina (Isogai *et al.* 1992). De igual manera, se ha reportado la producción de antibióticos en diferentes especies del género *Verticillium* (López-Llorca, 1993).

Ha sido reportado que diferentes especies del género *Hirsutella* al ser cultivadas en fermentaciones sumergidas producen metabolitos que incluyen una variedad de proteínas

de bajo peso molecular los cuales presentan actividad contra insectos y ácaros. La toxina mejor caracterizada es producida por *H. thompsonii* la cual es una proteína, la hirsutelina A (HtA), la cual se ha aislado y secuenciado (Liu *et al.* 1995; Boucias *et al.* 1998).

Rosas-Acevedo *et al.* (2003) encontraron que *H. thompsonii* secretó metabolitos que eran acaricidas contra *Tetranychus urticae*. Prepararon proteínas de exudados derivados del cultivo sólido y filtrados derivados de caldo, los precipitaron con el mismo volumen de amonio para conservarlos en temperatura subzero. Los precipitados los sometieron a una centrifugación mientras que los pellets los disolvieron en un buffer para desnaturalizarlos con ebullición. En la cromatografía de columna no encontraron niveles detectables de HtA; sin embargo, en los bioensayos descubrieron que a mayor concentración de los exudados, mayor inhibición en la ovoposición de los ácaros.

También se ha reportado la producción de sustancias llamadas hirsutelones en *H. nivea* (Madla *et al.* 2008) con actividad sobre *Mycobacterium tuberculosis*, y en diversas cepas de *Hirsutella* sp. se reporta la producción de exopolisacáridos con actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas como son *Bacillus subtilis* y *Micrococcus tetragenus* (Li *et al.* 2010). Estos metabolitos se obtienen del cultivo del hongo en medios líquidos pero también se ha observado que se producen gotas denominadas exudados cuando se les cultiva en medios de agar (Cabrera y López, 1977; Samson *et al.*, 1980).

En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana presentada por los exudados y filtrados de cultivo libres de micelio producidos por seis cepas mexicanas de *Hirsutella citriformis* Speare contra siete cepas bacterianas patógenas.

## MATERIAL Y METODOS

1.-Conservación y cultivo de las cepas bacterianas y fúngicas. Las cepas de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. y *Staphylococcus aureus* se conservaron en tubos con agar nutritivo inclinado en refrigeración a 4°C y se hicieron resiembras mensuales en el mismo medio.

Por otra parte, se utilizaron tres cepas de *H. citriformis*, INIFAP-Hir-5 (Quintana Roo), INIFAP-Hir-2(Yucatán), IB-Hir-2 (Colima) y dos cepas mutantes, denominadas 53-10 y 103, obtenidas de la cepa silvestre INIFAP-Hir-2 originaria de Yucatán, mutadas de acuerdo al procedimiento reportado por Cruz-Juárez *et al.* (2018) las cuales se mantuvieron en el medio agar papa dextrosa (PDA) adicionada con 1% de extracto de levadura y Agar Sabouraud con 0.5% de extracto de levadura.

2. Colecta de los exudados. Cada una de las diferentes cepas fúngicas se sembraron en suficientes cajas Petri para poder obtener una cantidad apreciable de exudados. Para colectar los exudados se observaron los cultivos sólidos en el estereoscopio, y se colectaron con mucho cuidado los exudados producidos mediante jeringas de insulina los cuales se depositaron en tubos cónicos de 1.5 ml y se guardaron en congelación hasta su utilización

en las pruebas de inhibición.

3. Pruebas preliminares de los exudados. Se hizo una mezcla de todos los exudados producidos por cada cepa fúngica, homogeneizándolos con 1 ml de agua destilada estéril para recogerlos de la placa, después se impregnaron discos de papel filtro estériles de 1 cm de diámetro, con 10 µl de la mezcla de exudados. Posteriormente se sembraron los cultivos de las diferentes cepas bacterianas en cajas Petri con agar nutritivo o agar infusión cerebro-corazón, mediante extensión con asa de vidrio, se colocaron cuatro discos de papel filtro en cada caja y se incubaron por 24 horas a 37°C. Cada experimento se hizo por cuatuplicado. Posteriormente se observaron las placas para determinar las zonas de inhibición producidas.

4.- Pruebas de Inhibición antibacteriana de cada exudado producido. De acuerdo a los resultados de inhibición preliminar, aquellos que presentaron resultado positivo se analizaron por separado para cada uno de los exudados producidos y se confrontaron con las diferentes cepas bacterianas, midiendo las diferentes zonas de inhibición presentadas.

5.-Producción de cultivos líquidos y filtrado de cultivos. Las diferentes cepas fúngicas se cultivaron en medio líquido de papa dextrosa durante un periodo de 7 días a temperatura de 25°C y 250 rpm de agitación. Después del tiempo de incubación se filtraron a través de gasa, para separar el micelio, posteriormente se tomaron 10 ml del líquido restante y se filtraron a través de membrana Millipore de 0. 22 µm de tamaño de poro. El líquido resultante se guardó en congelación hasta la realización de las pruebas de inhibición.

6.- Pruebas de Inhibición del crecimiento bacteriano por los filtrados fúngicos. Se tomaron 10 µl de los filtrados de cada cepa y se impregnaron discos de papel filtro estériles de 1 cm de diámetro, los cuales se colocaron sobre cada uno de los cultivos bacterianos inoculados por extensión. Se incubaron por 24 -72 h o en algunos casos hasta 6 días a 37°C. Posteriormente se observaron las placas para determinar y medir las zonas de inhibición producidas. Cada experimento se realizó por cuatuplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las pruebas preliminares al menos un exudado producido por cada una de las tres cepas silvestres y dos mutadas de *Hirsutella citriformis* produjeron inhibición bacteriana de al menos una cepa patógena con rangos de inhibición de 0.5 a 2 mm, con excepción de la cepa mutante 103, cuyos exudados no causaron ninguna inhibición contra las cepas probadas. Como se muestra en la Tabla 1, el exudado producido por la cepa *H. citriformis* de Quintana Roo produjo la mayor inhibición contra *Salmonella* sp de 2 mm, seguida de la cepa *H. citriformis* mutante 53-10 que causó 1.5 mm de inhibición contra *K. pneumoniae*. Los exudados producidos por las restantes cepas probadas produjeron 0.5 mm de inhibición contra las cepas bacterianas probadas, excepto los exudados producidos por la cepa mutante 103, que no produjo ninguna inhibición; mientras que el exudado producido por la

cepa de Yucatán ocasionó la inhibición de la cepa de *E. coli* solamente.

Cepa fúngica	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>K pneumoniae</i>	Tiempo
Colima	0.5	-	0.5	0.5	0.5	-	48 h
Yucatán	-			0.5	-	-	48 h
Mutante 53-10	0.5	0.5	-	0.5	0.5	1.5	48 h
Q. Roo	0.5	-	-	-	2	-	48 h

Tabla 1. Inhibición antibacteriana (mm) presentada por exudados obtenidos en cultivo sólido de varias cepas de *Hirsutella citriformis* mexicanas.

En las pruebas de inhibición contra diversas cepas de bacterias patógenas, mostradas en la Tabla 2, los filtrados de cultivo líquido libres de micelio mostraron resultados diversos donde la mayor inhibición que se registró fue con el filtrado de la cepa de *H. citriformis* de Colima, de 10-15 mm contra *L. monocytogenes*, después de 6 días de incubación, mostrando inhibición desde las 48 h y aumentando progresivamente con el paso del tiempo.

Cepa fúngica	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella sp</i>	<i>E. coli</i>	<i>K pneumoniae</i>	Tiempo
Colima	2	4	1.5	1	1	1	48 h
Yucatán	2	2	2	0			48 h
Mutante 53-10	-	1	4	1	-	-	48 h
Mutante 103	1	1.5	1.5	0	-	-	48 h
Colima	5-10	5-7	2	1	1	1	72
Yucatán	2-3	2	2		1	-	72
Mutante 53-10	-	1	1	1	-	-	72
Mutante 103	3	1.5	2	0	-	-	72
Colima	10-15	10	2	1	1	-	6 d
Yucatán	2-3	2	2	0	1	-	6 d
Mutante 53-10	-	1	4	1	-	-	6 d
Mutante 103	4-5	2	2	0	-	-	6 d

Tabla 2. Inhibición antibacteriana (mm) presentada por filtrados de cultivos de varias cepas mexicanas de *Hirsutella citriformis*.

También la mutante 103 mostró inhibición de 4-5 mm después de 6 días de incubación, aumentando paulatinamente desde las 48 horas. De hecho, casi todos los filtrados de cultivos mostraron inhibición, contra *L. monocytogenes*, excepto los filtrados de la cepa mutante 53-10. En las pruebas contra *B. subtilis*, de igual manera, el filtrado de la cepa de *H. citriformis* de Colima mostró la mayor inhibición de 10 mm después de 6 días de incubación, también aumentando con el paso del tiempo de incubación. En segundo

lugar, los filtrados de la cepa de Yucatán mostraron inhibición de 2 mm contra *B. subtilis* sin embargo, la zona de inhibición no aumentó al transcurso del tiempo. Contra la misma bacteria, los filtrados de cultivos de las cepas mutantes mostraron mínima inhibición de 1-2 mm después de 6 días de incubación. Los resultados de inhibición contra *B. cereus* fueron variables para los distintos filtrados donde se mostró la mayor inhibición de 4 mm presentada por la cepa mutante 53-10, a los 6 días de incubación, los restantes filtrados presentaron de 1-2 mm de inhibición. Las pruebas contra *Salmonella* sp presentaron bajos niveles de inhibición de 1 mm solamente con los filtrados de las cepas de Colima y la mutante 53-10, a cualquier tiempo de incubación, los restantes filtrados de cultivos no mostraron inhibición. En las pruebas contra *E. coli*, solamente los filtrados de las cepas de Colima y de Yucatán presentaron una leve inhibición de 1 mm en 48 horas o más de incubación. Por último, contra *K. pneumoniae*, solo el filtrado de la cepa de Colima presentó mínima inhibición de 1 mm después de 48-72 h de incubación.

Se han reportado diversos metabolitos producidos por cepas de *Hirsutella* sp en cultivos líquidos, tales como la hirsutelina A (HtA), la cual se ha aislado y secuenciado por Liu *et al.* (1995) y Boucias *et al.* (1998). Del mismo modo han sido caracterizadas varias sustancias de tipo exopolisacáridos con actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas como son *Bacillus subtilis* y *Micrococcus tetragenus* (Li *et al.* 2010). Estos metabolitos se obtienen del cultivo del hongo en medios líquidos, como fue nuestro caso, solo que a diferencia de este último autor, los filtrados de cultivos presentaron inhibición, aunque mínima, contra bacterias Gram negativas como *E. coli* o *Salmonella* sp, mientras que las mayores inhibiciones obtenidas de filtrados de cultivos de cepas de *Hirsutella citriformis* mexicanas fueron contra *L. monocytogenes* y *B. subtilis* que son bacterias Gram positivas y en esto concuerdan con resultados de Liu *et al.* (2010) contra este tipo de bacterias.

En nuestro caso sería interesante caracterizar el tipo de sustancias que ejercen esta inhibición por lo cual, en un trabajo posterior esto podría realizarse con el fin de encontrar nuevas sustancias antibióticas que pudieran utilizarse en el control de diferentes especies patógenas causantes de enfermedades en humanos y animales debido a que existe una resistencia incrementada hacia los antibióticos usualmente utilizados. Por eso se considera muy importante la búsqueda de nuevos fármacos semisintéticos y sintéticos, o que deriven de plantas o microorganismos que tengan efecto sobre bacterias resistentes, inhibiendo su crecimiento o que eviten los mecanismos de resistencia.



Fig. 1. Cultivos de *L. monocytogenes* mostrando la inhibición causada por filtrados de cultivo de *H. citriformis* IB-Hir 2 (Colima), así como *B. subtilis* también con filtrado de cultivo de *H. citriformis* de Colima y por último cultivo de *L. monocytogenes* con filtrado de la cepa mutante 103 de *H. citriformis*.

## AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por el financiamiento parcial del Proyecto Paicyt CN 924-19

## REFERENCIAS

- Boucias DG, Farmerie WG. and Pendland JC. 1998. Cloning and Sequencing of cDNA of the Insecticidal Toxin Hirsutellin A. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72:258–261.
- Cabrera RI. and López A. 1977. Estudio sobre la conservación de la flora micológica de los cítricos en Cuba. *Cien. Tec. Agric. Serie Cítricos y Otros Frutales* 1: 97–112 (In spanish).
- Cruz-Juarez G., Maldonado-Blanco M.G., Rodríguez-Guerra R., De la Torre-Zavala S., Avilés Arnaut H., Flores-González M.S. 2018. Mutation to Increase Sporulation of a Strain of *Hirsutella citriformis* from Mexico and Evaluation against *Diaphorina citri*. *Southwestern Entomologist* 43: 891-904.
- Díaz MP, Macías AF, Navarro SR. y De la Torre M, 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 31: 856-860. (In spanish).
- Isaka M, Rugseree N, Maithip P, Kongsaree P, Prabpai S. and Thebtaranonth Y, 2005. Hirsutellones A–E, antimicrobial alkaloids from the insect pathogenic fungus *Hirsutella nivea* BCC 2594, 2005. *Tetrahedron*, 61:5577–5583.
- Isogai A, Nakayama I, Takayama S, Kusai A. and Susuki A, 1992. Structural elucidation of minor components of peptidyl antibiotic P168s (leucinostatins) by tandem mass spectrometry. *Bioscience*, 57:1079-1085
- Li R, Jiang X and Guan H. 2010. Optimization of mycelium biomass and exopolysaccharides production by *Hirsutella* sp. In submerged fermentation and evaluation of exopolysaccharides antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*, 9:195-202.
- Liu WZ, Boucias DG. and McCoy CW. 1995. Extraction and characterization of the insecticidal toxin Hirsutellin A produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. *Experimental Mycology*, 19:254-262.

López-Llorca L.V. and Boag B, 1993. Biological properties of a red pigment produced by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. *Mediterranean Nematology* 21:143-149.

Madla S, Isaka M. and Wongsa P, 2008. Modification of culture conditions for production of the anti-tubercular hirsutellones by the insect pathogenic fungus *Hirsutella nivea* BCC 2594. *Letters in Applied Microbiology*, 47:74-78.

Mazet I, 1992. Recherches sur les hirsutellines, toxines protéiques produites par *Hirsutella thompsonii* Fisher, champignon pathogène d'acariens phytophages. Université de Montpellier, Le discipline: Microbiologie, 146

Pedras M.S.C, Zaharia L.I. and Ward D.E, 2002. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 59:579-596.

Pérez-González O. 2015. Aislamiento, producción y evaluación de la patogenicidad de cepas de *Hirsutella citriformis* Speare para el control de *Diaphorina citri* Kuwayama, vector de la enfermedad Huanglongbing de los cítricos. Tesis inédita de Doctorado Facultad de Ciencias Biológicas UANL.Mexico.

Rosas-Acevedo J, Boucias D.G, Lezama R, Sims K. and Pescador A. 2003. Exudate from sporulating cultures of *Hirsutella thompsonii* inhibit oviposition by the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Experimental and Applied Acarology* 29:213-225.

Samson R.A, McCoy C.W. and O'Donnell K.L, 1980. Taxonomy of the acarine parasite *Hirsutella thompsonii*. *Micologia*, 72:359–377

Wang B, Wu W. and Liu X, 2007. Purification and characterization of a neutral serine protease with nematocidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*. *Mycopathologia* 163:169–176.