

Evaluación antimicrobiana de un extracto metanólico de *Beauveria bassiana* contra bacterias patógenas de importancia nosocomial

Antimicrobial evaluation of a methanol extract of *Beauveria bassiana* against pathogenic bacteria of nosocomial importance

Jesús M. Villegas-Mendoza¹, Ninfa M. Rosas-García¹, Maribel Mireles-Martínez¹, Rubén Santiago-Adame², Guadalupe C. Rodríguez-Castillejos², M. Del Rayo Camacho-Corona³, Pilar Del C. Morales-San Claudio³

¹ Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Blvd del Maestro SN, Narciso Mendoza, 88710 Reynosa, Tamps. México. jmvillegas@ipn.mx

² Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Calle 16 y lago de Chapala colonia Aztlán, CP. 88740. Reynosa, Tamp. México.

³ Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Universidad S/N, Ciudad Universitaria, CP 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

<http://dx.doi.org/10.30827/ars.v60i3.9219>

Artículo Original Original Article

Correspondencia Correspondence

Jesús M. Villegas-Mendoza
jvillegas_24@hotmail.com

Financiamiento

Instituto Politécnico Nacional

Agradecimiento

Secretaría Investigación y Posgrado y al Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías del Instituto Politécnico Nacional.

Received: 06.04.2018
Accepted: 02.08.2019

RESUMEN

Objetivo: Se evaluó la actividad antimicrobiana de un extracto crudo de *B. bassiana* y dos fracciones del mismo contra bacterias de importancia clínica.

Métodos: El micelio de cepa *B. bassiana* se remojó en metanol durante una semana, después se evaporó en un rotovapor a 45°C aplicando vacío. El extracto metanólico se hizo pasar con dos fases móviles para obtener una fracción A y B. Las fracciones A, B y el extracto crudo C se evaluaron contra las cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* con la técnica de microdilución en placa.

Resultados: En la fracción A se observó un efecto antimicrobiano contra *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* el crecimiento bacteriano alcanzó el 70, 60 y 83 % respectivamente. La fracción B causó un efecto antimicrobiano en *Klebsiella pneumoniae*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* con un crecimiento bacteriano del 62, 58, 41 y 7 % respectivamente. Y el extracto crudo no causó inhibición del crecimiento en *A. baumannii*, pero para el resto de las bacterias hubo un crecimiento del 56 al 88 %.

Conclusiones: *Beauveria bassiana* es un hongo entomopatógeno que produce diferentes metabolitos con actividad insecticida, citotóxica, antifúngica, antibiótica y antiviral. Este es el primer estudio de los efectos antimicrobianos de un extracto metanólico del hongo entomopatógeno *B. bassiana* contra cepas bacterianas de importancia clínica.

Palabras clave: Bacterias patógenas; *Beauveria bassiana*; Antimicrobial.

ABSTRACT

Objective: The antimicrobial activity of a crude extract of *B. bassiana* and two fractions thereof against clinically important bacteria was evaluated.

Methods: The mycelium of strain *B. bassiana* was soaked in methanol for a week, then it was evaporated in a rotovap at 45 °C applying a vacuum. The methanolic extract was passed through two mobile phases to obtain a fraction A and B. Fractions A, B and crude extract C were evaluated against the strains *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* with the plate microdilution technique.

Results: In fraction A an antimicrobial effect against *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* was observed, bacterial growth reached 70, 60 and 83% respectively. Fraction B caused an antimicrobial effect in *Klebsiella pneumoniae*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* with a bacterial growth of 62, 58, 41 and 7% respectively. And the crude extract did not cause growth inhibition in *A. baumannii*, but for the rest of the bacteria there was a growth of 56 to 88%.

Conclusions: *Beauveria bassiana* is an entomopathogenic fungus that produces different metabolites with insecticidal, cytotoxic, antifungal, antibiotic and antiviral activity. This is the first study of the antimicrobial effects of a methanolic extract of the entomopathogenic fungus *B. bassiana* against bacterial strains of clinical importance.

Keywords: Pathogenic bacteria; *Beauveria bassiana*; Antimicrobial.

La habilidad de los hongos filamentosos de crecer en medios simples y económicos así como su capacidad de producir un amplio rango de metabolitos ha llamado el interés para producción en la biotecnología⁽¹⁾. Las moléculas derivadas de estos hongos representan el 25 % de las drogas aprobadas por la FDA (Administración de alimentos y medicamentos de USA) desde los años 1981 al 2014⁽²⁾. Los hongos producen importantes metabolitos secundarios que han impactado a la sociedad, como son los antibióticos (penicilina y pleorumutilina)⁽³⁾, medicamentos para bajar el colesterol (lovastatina y compactina) e inmunosupresores (ácido micofenólico y ciclosporina), así como también moléculas con efectos carcinógenos, toxinas letales, fungicidas industriales, hormonas y psicotrópicos⁽⁴⁾. *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin [Sordariomycetes: Hypocreales] es un hongo entomopatógeno con un rango de más de 700 insectos hospederos por lo que ha sido ampliamente utilizado en todo el mundo para el control de insectos plagas⁽⁵⁻⁶⁾. Diversos estudios han reportado la producción de diferentes moléculas con actividad tóxicas como la bassiacridina que ha demostrado actividad insecticida contra *Locusta migratoria* y *Schistocerca gregaria*⁽⁷⁾, y efecto citotóxico en células de cáncer de mama⁽⁸⁻⁹⁾. La osporeína con actividad antifúngica, antibiótica y antiviral⁽¹⁰⁻¹³⁾. La beauverolida causa alteraciones en el citoesqueleto en larvas de *Galleria mellonella*, muestra actividad contra la calmodulina (proteína ácida intracelular) y proteínas inmunomoduladoras⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. La bauvericina con actividad insecticida, antimicrobial, nematocida y citotóxica, su efecto insecticida ha sido evaluada en larvas de zancudo, moscas y escarabajos⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Tenellin se ha reportado como inhibidor en la actividad ATPasa de la membrana de los eritrocitos de mamíferos⁽²¹⁻²³⁾. La ciclosporina una molécula con actividad inmunopresora, antiinflamatoria, antifúngica, antiparasítica⁽²⁴⁻²⁶⁾. Y por último la basianolida con actividad insecticida, antimicrobial, antiplasmodial y citotóxica⁽²⁷⁻²⁹⁾. En los últimos años se ha dado mucha importancia la resistencia antimicrobiana y de drogas en el área de salud en todo el mundo. El surgimiento de cepas patógenas resistentes despertó el interés de científicos que buscar nuevas alternativas como nuevos agentes antimicrobianos⁽³⁰⁾. Cada año mueren alrededor de 25,000 pacientes en Europa por

infecciones de bacterias resistentes a drogas y un poco más de 63,000 pacientes cada año adquieren una infección por bacterias en hospitales en los Estados Unidos⁽³¹⁾. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos antimicrobianos de un extracto metanólico y dos fracciones del mismo del hongo *Beauveria bassiana* contra 6 cepas patógenas oportunistas de importancias nosocomial: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella tify*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción metanólica de *Beauveria bassiana*.

La cepa ARSEF 1149 de *Beauveria bassiana* fue proporcionada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Ithaca, N.Y.). Las conidias se cultivaron en 10 matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de medio Czapek-Dox a 26°C, 160 rpm durante 14 días. Posteriormente el micelio fue separado del medio utilizando filtros de papel Whatman® del # 1 y 125 mm. El micelio se remojó con 400 mL de metanol en un matraz de 1 L durante una semana, y después se recuperó el metanol mediante filtración y se evaporó en un rotovapor a 45°C aplicando vacío.

Cromatografía en columna de vidrio del extracto metanólico.

El extracto metanólico fue disuelto en Acetato de etilo y colocado en una columna de vidrio de 24mm por 250mm empacada con sílica gel 230-400 de malla y activada con Acetato de etilo. Las fases móviles fueron CH₃OH/CH₂Cl₂ (10:90) para la fracción A, C₄H₈O₂/ C₆H₆ (20:80) para la fracción B y un extracto crudo C sin cromatografía. La fase móvil fue evaporada y los residuos fueron almacenados a 5°C.

Ensayo de actividad antimicrobiana.

Le técnica que se empleó fue la de microdilución en placa. Las cepas que se trabajaron fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) *Salmonella tify* (ATCC 9842), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y *Acinetobacter baumannii* (aislado clínico). A partir de un cultivo bacteriano de 18 h, se ajustaron los inóculos de 100 µl al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland en caldo Mueller-Hilton (MHB). Para las 2 fracciones y el extracto que se evaluaron, se preparó una solución stock de 2000 µg/ml; los extractos se solubilizaron en buffer salino de fosfatos (PBS). Se realizaron diluciones seriadas de los extractos en medio MHB para obtener concentraciones finales de 500, 250, 125 y 62.5 microgramos por mililitros. Quedando concentraciones de DMSO en los renos de 10% a 1.25 %. Los controles empleados fueron medio MHB sin inóculo y medio MHB con antibiótico (ampicilina

8 µg/ml). Las placas de 96 pocillos se incubaron a 37°C por 20 h y se realizó las lecturas de absorbancia a 595nm.

Análisis Estadísticos.

Los resultados fueron analizados con un ANOVA y prueba de comparación múltiples de Tukey, con el paquete estadístico SPSS 24.

RESULTADOS

Los efectos causado por las fracciones A, B y el extracto crudo C contra la cepa *S. aureus* muestra que existe diferencias significativas en los tratamientos (F: 21.126. gl: 14 y P≤ 0.05).

Donde el extracto C con la dosis de 500 y 250 µg/ml muestra un % de crecimiento bacteriano del 72 y 56 % respectivamente según el análisis de comparación múltiple, mientras que los demás tratamientos no muestran disminución de crecimiento. Ver Figura 1.

Para el caso de la cepa *E. coli* muestra que existe diferencias significativas en los tratamientos (F: 292.96 gl: 14 y P≤ 0.05). Donde el extracto C con todas sus dosis muestra un % de crecimiento bacteriano de un 89 % según el análisis de comparación múltiple, mientras que las fracciones A y B no muestran disminución en el % de crecimiento bacteriano. Ver Figura 2.

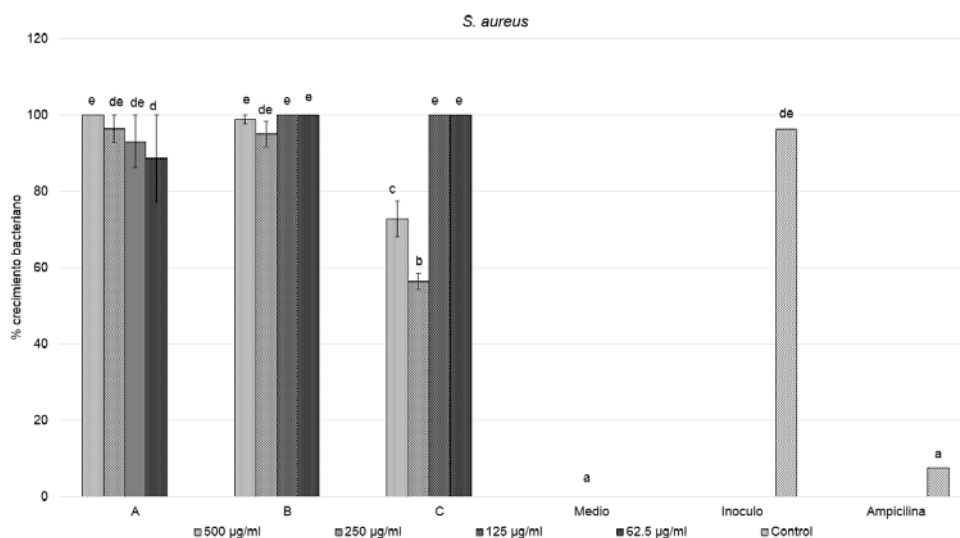


Figura 1: ANOVA del % de Crecimiento bacteriano y prueba Tukey de la cepa *S. aureus*. Letras diferentes tiene diferencias significativas.

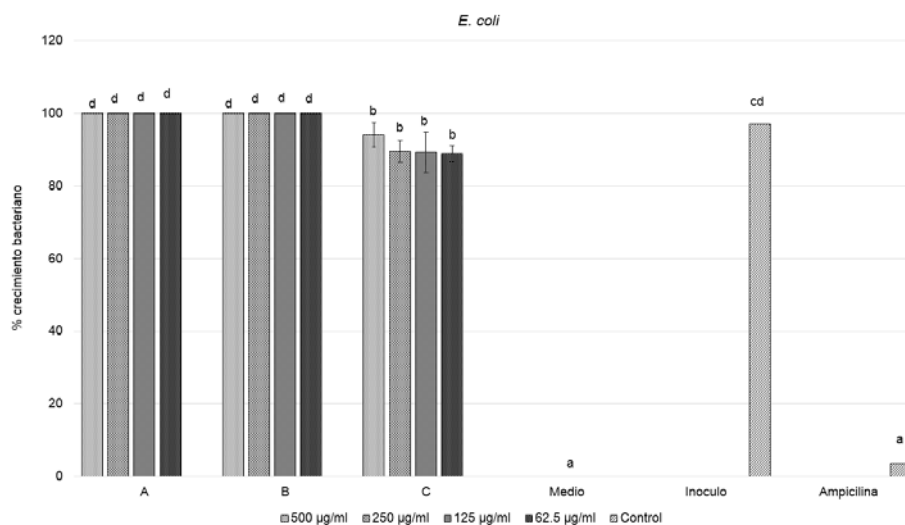


Figura 2: ANOVA del % de Crecimiento bacteriano y prueba Tukey de la cepa *E. coli*. Letras diferentes tiene diferencias significativas.

Para la cepa *k. pneumoniae* muestra que existe diferencias significativas en los tratamientos (F: 357.15 gl: 14 y $P \leq 0.05$). Donde el extracto C en la dosis 62.5, 125 y 250 $\mu\text{g/ml}$ muestra un % de crecimiento bacteriano hasta del 85% según el análisis de comparación múltiple. Ver Figura 3.

Para el caso de la cepa *Salmonella tiphy* muestra que existe diferencias significativas en los tratamientos (F: 422.33 gl: 14 y $P \leq 0.05$). La fracción A y B con dosis 500 $\mu\text{g/ml}$ tiene un % de crecimiento bacteriano del 70 y 58 %, y el extracto C en todas sus dosis hasta un 89%. Ver Figura 4.

Para la cepa *P. aeruginosa* existen diferencias significativas en los tratamientos (F: 18.94 gl: 14 y $P \leq 0.05$). Donde la

fracción A en dosis 500 $\mu\text{g/ml}$ muestra un % de crecimiento bacteriano del 60 %, la fracción B de 500 y 250 $\mu\text{g/ml}$ del 41 y 72 %, y el extracto crudo C en las dosis 500 y 250 $\mu\text{g/ml}$ del 79 % según el análisis de comparación múltiple. Ver Figura 5.

Y por último la cepa *A. baumannii* muestra que existe diferencias significativas en los tratamientos (F: 19.91 gl: 14 $P \leq 0.05$). Donde la fracción A en todas sus dosis muestra un % de crecimiento bacteriano hasta un 85 % y la fracción B en la dosis 500 $\mu\text{g/ml}$ casi nula del 7 %. Ver Figura 6.

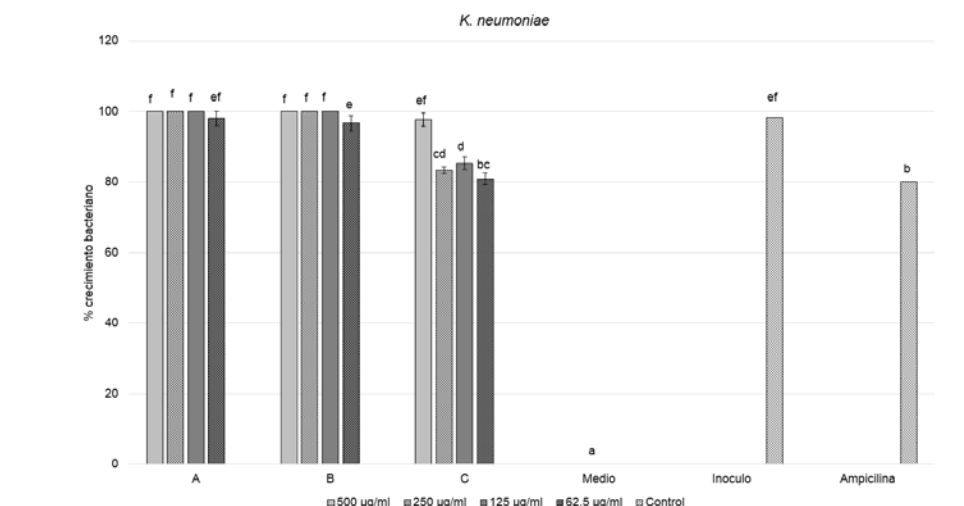


Figura 3: ANOVA del % de Crecimiento bacteriano y prueba Tukey de la cepa *k. pneumoniae*. Letras diferentes tiene diferencias significativas.

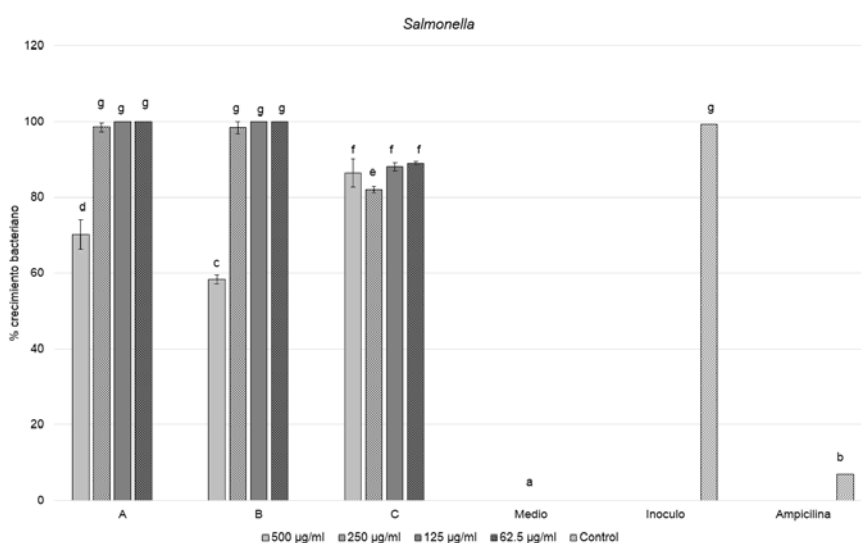


Figura 4: ANOVA del % de Crecimiento bacteriano y prueba Tukey de la cepa *Salmonella tiphy*. Letras diferentes tiene diferencias significativas.

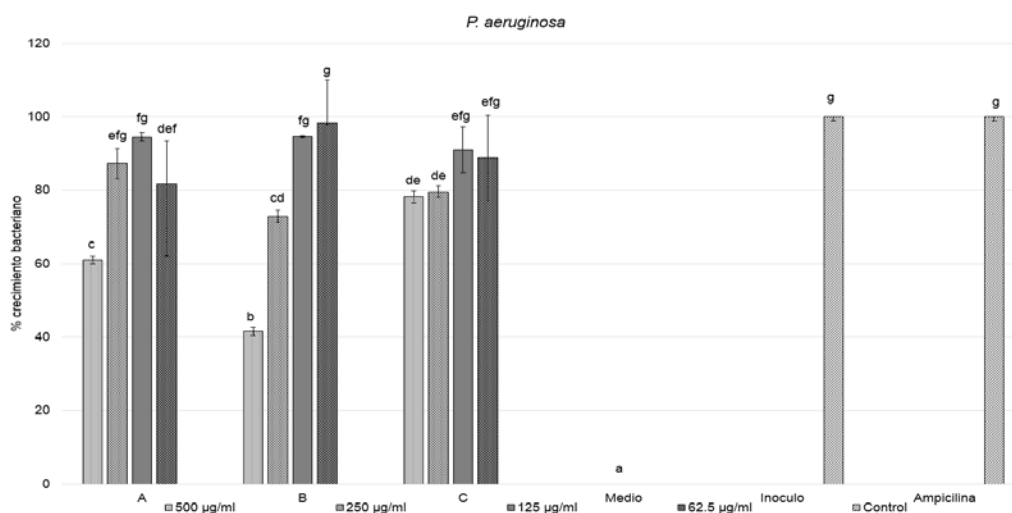


Figura 5: ANOVA del % de Crecimiento bacteriano y prueba Tukey de la cepa *P. aeruginosa*. Letras diferentes tiene diferencias significativas.

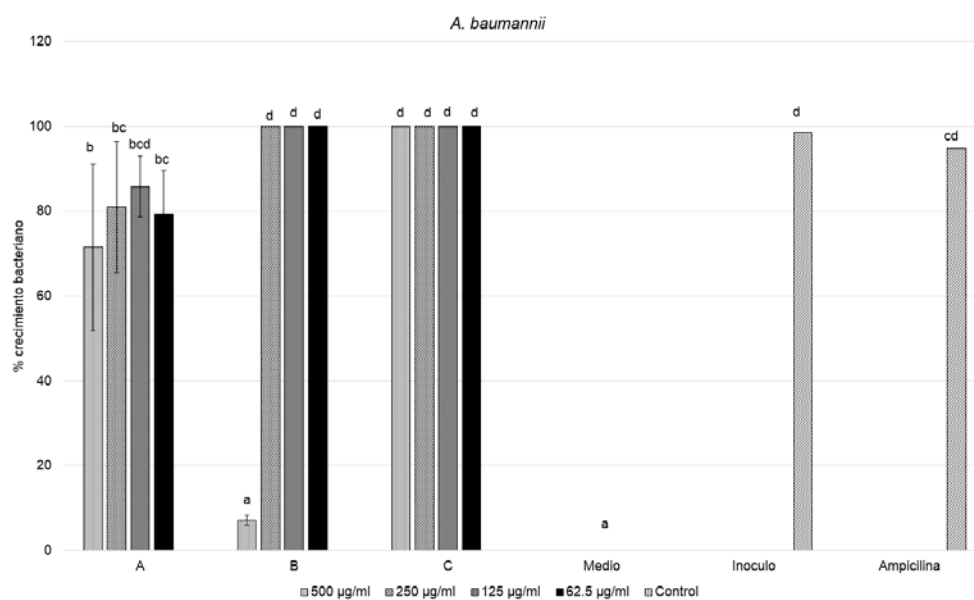


Figura 6: ANOVA del % de Crecimiento bacteriano y prueba Tukey de la cepa *A. baumannii*. Letras diferentes tiene diferencias significativas.

Los resultados de la concentración Mínima inhibitoria indicaron que la fracción B mostro actividad contra *A. baumannii* a una concentración de 500 µg/ml.

DISCUSIÓN

Extractos de hongos como especies de *Aspergillus* y *Penicillium* producen metabolitos con efecto de actividades antimicrobial hacia bacterias patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurion y *Pseudomonas aeruginosa*⁽³²⁾. Yogabaanu y colaboradores⁽³³⁾, 2017 muestran efectos antimicrobiales de extractos crudos de 3 hongos *Atradiymella sp.*, *Pseudogymnoascus sp.*, y *Pe-*

nicillium flavigenum contra *Pseudomonas aeruginosa* determinando los efectos por metabolitos secundarios. Géneros como *Penicillium sp.*, con extractos metanólicos logran aislar metabolitos antimicrobiales contra *P. aeruginosa*⁽³⁴⁾. En otros estudios con diferentes hongos como *Cephalotrichum microsporium* y *Fusarium solani* también con extractos y separación por cromatografía logran aislar metabolitos con efectos antimicrobiales contra cepas patógenas⁽³⁵⁻³⁶⁾. Así también se han extraído compuestos de hongos endófitos como es el caso del metabolitos lasiodiplodin extraído de *Botryosphaeria rhodina* con actividad antimicrobiana⁽³⁷⁾. Y recientemente hongos de ambientes marinos con una gran variedad de metabolitos con actividad biológicas⁽³⁸⁾.

Para nuestro estudio del extracto metanólico de *Beauveria bassiana* muestra efectos antimicrobiales en la fracción A contra *Salmonella tify*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* de un % de crecimiento bacteriano de 70, 60 y 83 %. Para la fracción B en *k. pneumoniae*, *Salmonella tify*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* con un % de crecimiento bacteriano del 62, 58, 41 y 7 %. Y por último el extracto crudo C no causa inhibición *A. baumannii*, sin embargo en las demás bacterias hay un % de crecimiento bacteriano de un 88 a un 56 %. Para la fracción B se calculó una CMI de 500 µg/ml hacia *A. baumannii*. Estas dosis muy por debajo de las reportadas por Shin *et al*, 2016⁽³⁹⁾ que analizan sustancias antimicrobiales extraídas de 342 hongos entomopatógenos, donde *Beauveria bassiana* muestra actividad antifúngica alta contra *Botrytis cinerea* y actividad antibacteriana contra *Bacillus cereus* a concentraciones del 1 %. Mientras en otro estudio con purificaciones parciales de *Beauveria bassiana* muestran actividad antimicrobiana hacia microorganismos patógenos pero de plantas *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma*⁽⁴⁰⁾.

Sin embargo no hay antecedentes sobre extracciones metanólicas de *Beauveria bassiana* con efectos en estos organismos patógenos de humanos. Solo un metabolito de *Beauveria* es reportado con actividad antimicrobiana, oosporeína con efectos antibióticos hacia bacterias Gram (+), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Proteus vulgaris*^(11,41).

CONCLUSIONES

Varias especies de hongos entomopatógenos han mostrado múltiples roles en la naturaleza como endófitos, antagonistas y promotores en el crecimiento de plantas y es de importancia el estudio más a fondo de cada uno de los metabolitos que pudieran intervenir y sus efectos biológicos. Para el caso de extracciones metanólicas de *Beauveria bassiana* este es un primer estudio de los efectos antimicrobianos contra las cepas patógenas oportunistas lo que permite abrir nuevas investigaciones sobre este tipo de extractos y los metabolitos que los componen. Se sugiere que realicen un estudio biodirigido para aislar los componentes bioactivos de las fracciones y extracto crudo. La muestra B muestra selectividad solo a una bacteria.

BIBLIOGRAFÍA

- Meyer, V. Genetic engineering of filamentous fungi-Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*. 2007. 26, 177-185. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.001.
- Skellam, E. Strategies for engineering natural product biosynthesis in fungi. *Trends in Biotechnology*. 2018. 1704, 112. DOI:10.1016/j.tibtech.2018.09.003.
- Fox, E. M. & Howlett, B. J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*. 2008. 11, 481-487. DOI: 10.1016/j.mib.2008.10.007.
- Deng, H. Gao, R. & Cai, Y. CRISPR system in filamentous fungi: Current achievements and future directions. *Gene*. 2017. 627, 212-221. DOI: 10.1016/j.gene.2017.06.019.
- Dhawan, M. & Joshi, N. Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017. 48, 522-529. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.08.004.
- Rondot, Y. & Reineke, A. Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biological Control*. 2016.1-8. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2016.10.006.
- Quesada-Moraga, E. & Vey, A. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*. 2004. 108(4), 441-452. DOI: 10.1017/S0953756204009724
- Molnar, I. Gibson, D. M. & Krasnoff, S. B. Secondary metabolites from entomopathogenic Hypocrealean fungi. *Natural Product Reports*. 2010. 27, 1241-1275. DOI: 10.1039/c001459c.
- Ozgor, E. Sevim, H. Gurpinar, O. A. & Keskin, N. Cytotoxic effect of fungal-sourced bassiatin on breast cancer cell lines. *Journal of Biotechnology*. 2017. 256,17-43.
- Jeffs, L.L. B. & Khachatourians, G. Toxic properties of *Beauveria* pigments on erythrocyte membranes. *Toxicon*. 1997. 35(8), 1351-1356. DOI: 10.1016/S0041-0101(97)00025-1.
- Love, B. E. Bonner-Stewart, J. Forrest, L. A. An efficient synthesis of oosperein. *Tetrahedron Letters*. 2009. 50, 5050-5052. DOI: 10.1016/j.tetlet.2009.06.103.
- Favilla, M. M. Gallo, A. & Altomare, C. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food and Chemical Toxicology*. 2006. 44, 1922-1931. DOI: 10.1016/j.fct.2006.06.024.
- Kouvelis, V. N., C. Wang, A. Skrobek, K. M. Pappas, M. A. Typas, and T.M. Butt. Assessing the cytotoxic and mutagenic effects of secondary metabolites produced by several fungal biological control agents with the Ames assay and the VITOTOX test. *Mutat. Res.*2011. 722: 1-6. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.01.004.
- Elsworth, J. F. & Grove, J. F. Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana* Bals. Part 1. Beauverolides H and I. *South African Journal of Science*. 1970. 70, 270-272. DOI: 10.1039/P19770000270.
- Hegedus, D. D. & Khachatourians, G. G. The impact of Biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances*. 1995. 13, 455-490. DOI:10.1016/0734-9750(95)02006-0.
- Vilcinskas, A. Jegorov, A. Landa, Z. Gotz, P. & Matha, V. Effects of beauverolide L and Cyclosporin A on humoral and cellular immune response of the greater wax moth, *Galleria*

- mellonella*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1999. 122, 83-92. DOI: 10.1016/S0742-8413(98)10082-8.
17. Kuzma, M. Jegerov, A. Kacer, O. & Havlicek, V. Sequencing of new beauverilodes by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 2001. 36, 1108-1115. DOI: 10.1002/jms.213.
 18. Roberts, D. W. Gupta, S. & Leger, R. J. ST. Metabolite production by entomopathogenic fungi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 1992. 27, 325-347.
 19. Ganassi, S. Moretti, A. & Pagliai, A. M. B. Effects of beauvericin on *Schizaphis graminum* (Aphididae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2002. 80, 90-96. DOI: 10.1016/S0022-2011(02)00125-8.
 20. Luz, C. Saladino, F. Luciano, F. B. Mañes, J. & Meca, G. Occurrence, toxicology, bioaccessibility and mitigation strategies of beauvericin, a minor *Fusarium* mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*. 2017. 107, 430-439. DOI: 10.1016/j.fct.2017.07.032.
 21. Cox, R. J. & Ohagan, D. Synthesis of Isotopically labelled 3-Amino-2-phenylpropionic acid its role as a precursor in the biosynthesis of tenellin and tropic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin*. 1991. 2537-2540. DOI: 10.1039/P19910002537.
 22. Vega, F. E. Meyling, N. V. Luangsa-ard. & Blackwell, M. Fungal Entomopathogens. *Insect Pathology*. 2012. 171-206. DOI: 10.1016/j.jip.2008.01.008.
 23. Liu, X. Xiang, M. & Che, Y. The living strategy of nematophagous fungi. *Mycoscience*. 2009. 50, 20-25. DOI: 10.1007/S10267-008-0451-3.
 24. Vilcinskis, A., P. Kopacek, A. Jegerov, A. Vey, and V. Matha. Detection of lipophorin as the major cyclosporin-binding protein in the hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997. 117: 41- 45. DOI: 10.1016/S0742-8413(96)00235-6.
 25. Survase, S. A. Kagliwal, L. D. Annapure, U. S. & Singhal, R. S. Cyclosporin A- A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. *Biotechnology Advances*. 2011. 29, 418-435. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.03.004.
 26. Makrlik, E., S. Bohm, and P. Vanura. Experimental and DFT study on complexation of the strontium cation with cyclosporine. *A. J. Mol. Struct.* 2015. 1100: 184-187. DOI: 10.1016/j.molstruc.2015.06.086.
 27. Gindin, G. Barash, I. Harari, N. & Raccach, B. Effect of endotoxic compounds isolated from *Verticillium lecanii* in the sweetpotato whitefly, *Bemisia Tabaci*. *Phytoparasitica*. 1994. 22(3): 189-196. DOI: 10.1007/BF02980318.
 28. Xu, Y. Orozco, R. Wijeratne, E. M. K. Espinosa-Artiles, P. Gunatilaka, A. A. L. Stock, S. P. & Molnar I. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide bassianolide, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genetics and Biology*. 2009. 46, 353-364. DOI: 10.1016/j.fgb.2009.03.001
 29. Mun, B. Park, Y. J. Sung, G. H. Lee, Y. & Kim K. H. Synthesis and antitumor activity of (-) - Bassianolide in MDA-MB 231 breast cancer cells through cell cycle arrest. *Bioorganic Chemistry*. 2016. 69, 64-70. DOI: 10.1016/j.bioorg.2016.09.008
 30. Bilal, M. Rasheed, T. Iqbal, H. M. N. Hu, H. Wang, W. & Zhang, X. Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017.103, 554-574. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.071
 31. Devi, S. I. Lotjem, H. Devi, E. J. Potshangbam, M. Nhashangva, Ng. Bora, J. Sahoo, D. & Sharma C. Bio-mining the forest ecosystem of north east India for identification of antimicrobial metabolites from fungi through submerged fermentation. *Bioresource Technology*. 2017. 241, 1168-1172. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.130.
 32. Lima, M. T. N. S. Dos Santos, L. S. Bastos, R. W. Nicoli, J. R. & Takahashi J. A. Antimicrobial activity and acetylcholinesterase inhibition by extracts from chromatin modulated fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018. 49, 169-176. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.06.004.
 33. Yogabaanu, U. Faizal Weber, J. F. Convey, P. Rizman-Idid, M y Alias, S. A. Antimicrobial properties and the influence of temperature on secondary metabolite production in cold environment soil fungi. *Polar Science*. 2017. 14: 60-67. DOI: /10.1016/j.polar.2017.09.005 1873-96.
 34. Yang, M. H. Li, T. X. Wang, Y. Liu, R. H. Luo, J. & Kong, L. Y. Antimicrobial metabolites from the plant endophytic fungus *Penicillium sp.* *Fitoterapia*. 2017. 116, 72-76. DOI: 10.1016/j.fitote.2016.11.008.
 35. Khan, N. Afroz, F. Begum, M. N. Rony, R. S. Sharmin, S. Moni, F. Hasan, C. M. Shaha, K. & Sohrab Md. H. Endophytic *Fusarium solani*: A rich source of cytotoxic and antimicrobial naphthaquinone and aza-anthraquinone derivatives. *Toxicology Reports*. 2018. 5, 970-976.
 36. Zhu, H. Yan, Q. An, Y. Hou, X. Zhang, T. Zhang, M. Wang, C. Xia, M. Ma, X. & Zhang, Y. Alfa-Pyrone, secondary metabolites from fungus *Cephalotrichum microsporum* and their bioactivities. *Bioorganic Chemistry*. 2019. 83, 129-134. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.10.022.
 37. Rukachaisirikul, V. Arunpanichlert, J. Sukpondma, Y. Phonpaichit, S. & Sakayaroj, J. Metabolites from the endophytic fungi *Botryosphaeria rhodina* PSU-M35 and PSU-M114. *Tetrahedron*. 2009. 65, 10590-10595. DOI: 10.1016/j.tet.2009.10.084
 38. Swathi, J. Sowjanya, K. M. Narendra, K. Reddy, K. V. N. R. & Satya, A. K. Isolation, identification and production of bioactive metabolites from marine fungi collected from coastal area of

- Andhra Pradesh, India. Journal of Pharmacy Research. 2013. 6, 663-666. DOI: 10.1016/j.jopr.2013.04.052.
39. Shin, Y. T. Bae, S. M. & Woo, S. D. Screening and characterization of antimicrobial substances originated from entomopathogenic fungi. Journal of Asia-Pacific Entomology. 2016. 19, 1053-1059. DOI: 10.1016/j.aspen.2016.09.008.
40. Lozano-Tovar, M. D. Garrido-Jurado, Quesada-Moraga, E. Raya-Ortega. M. C. y Trapero-Casas, A. *Metarhizium brunneum* and *Beauveria bassiana* release secondary metabolites with antagonistic activity against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora megasperma* olive pathogens. Crop Protection. 2017. 100 186-195. DOI: 10.1016/j.cropro.2017.06.026.
41. Strasser H., Abendstein D., Stuppner H., y Butt T. M. Monitoring the distribution of secondary and metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* with particular reference to oosporein. Mycological Research. 2000. 104: 1227-1233. DOI: 10.1017/S0953756200002963.