

## Efeito inibitório de DMSO, Tween 80 e Triton X-100 sobre *Agaricus bisporus* e *Lecanicillium fungicola*

Lundoi Tobias Lee <sup>1</sup>, Lívia Martinez Abreu Soares Costa <sup>1</sup>, Eduardo Alves <sup>2</sup>, Ludwig Heinrich Pfenning <sup>2</sup>, John Andrew Pecchia <sup>3</sup>, Diego Cunha Zied <sup>4</sup>, Eustáquio Souza Dias <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras, MG, Brazil. (\*Autor correspondente: esdiasmicro@gmail.com)

<sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras, MG, Brazil

<sup>3</sup>Department of Plant Pathology and Environmental Microbiology, Penn State University, University Park, 16802, PA, USA

<sup>4</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Dracena, Dracena, SP, Brazil

Histórico do Artigo: Submetido em: 11/01/2023 – Revisado em: 24/03/2023 – Aceito em: 02/04/2023

### RESUMO

Os surfactantes são substâncias muito utilizadas no preparo de suspensões de esporos, em especial, de fungos ascomicetos. Dentre esses estudos, estão aqueles que avaliam o uso de compostos antifúngicos. Entretanto, esses compostos, além de bons dispersantes, podem apresentar também um efeito inibitório sinérgico ou adicional ao efeito dos antifúngicos testados sobre a germinação dos esporos ou sobre o crescimento micelial. Por isso, é vital que se avalie esse tipo de efeito antes da sua utilização neste tipo de ensaio. O fungo *Lecanicillium fungicola* é o agente causador da doença da bolha seca, que acomete o cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus*. Além do preparo da suspensão de esporos, os surfactantes são utilizados na solubilização ou preparo de emulsões de óleos essenciais testados no controle de *L. fungicola*. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência do DMSO (solvente e surfactante fraco) e dois surfactantes (Tween 80 e Triton X-100) nas concentrações de 0,5 e 1%, sobre o crescimento micelial de *L. fungicola* e *A. bisporus*. Para DMSO, não se observou alterações visuais nas colônias para as duas espécies. Tween 80 afetou o crescimento micelial, fazendo com que as colônias crescessem menos, quando comparadas com o controle, além de alterar o aspecto da colônia para ambas as espécies. Triton X-100 apresentou efeito inibitório ainda maior sobre o crescimento das duas espécies fúngicas, afetando consideravelmente tanto o tamanho como a morfologia da colônia. Análises de microscopia eletrônica de varredura permitiram observar que os surfactantes alteraram as estruturas e os aspectos das hifas de ambos os fungos e no caso do *L. fungicola* também afetaram a quantidade e aspecto dos esporos.

**Palavras-Chaves:** DMSO, Triton x-100, Tween 80, doença da bolha seca, champignon, MEV.

## Inhibitory effect of DMSO, Tween 80 and Triton X-100 on *Agaricus bisporus* and *Lecanicillium fungicola*

### ABSTRACT

Surfactants are substances widely used in the preparation of suspensions of spores, especially of ascomycete fungi. Among these studies are those that evaluate the use of antifungal compounds. However, these compounds, in addition to being good dispersants, may also have a synergistic or additional inhibitory effect to the action of the tested antifungals on spore germination or mycelial growth. Therefore, it is vital to evaluate this type of effect before its use in this type of test. The fungus *Lecanicillium fungicola* is the causative agent of dry bubble disease, which affects the cultivation of the button mushrooms (*Agaricus bisporus*). In addition to preparing the spore suspension, surfactants are used in the solubilization or preparation of essential oil emulsions tested in the control of *L. fungicola*. The aim of this study was to evaluate the influence DMSO (solvent and a weak surfactant) and two surfactants: (Tween 80 and Triton X-100) at the concentrations of 0.5 and 1%, on the mycelial growth of *L. fungicola* and *A. bisporus*. For DMSO, no visual changes were observed in the colonies for both species. Tween 80 affected mycelial growth, causing colonies to grow less when compared to control, in addition to changing the morphology of the colony for both species. Triton X-100 showed an even greater inhibitory effect on the growth of the two fungal species, considerably affecting both the size and the morphology of the colony. Scanning electron microscopy analysis showed that surfactants alter the structures and aspects of the hyphae of both fungi and in the case of *L. fungicola* they also affected the quantity and aspect of the spores.

**Keywords:** DMSO, Triton x-100, Tween 80, dry bubble disease, button mushroom, SEM.

Lee, L.T., Costa, L.M.A.S., Alves, E., Pfenning, L.H., Pecchia, J.A., Zied, D.C., Dias, E.S. (2023). Efeito inibitório de DMSO, Tween 80 e Triton X-100 sobre *Agaricus bisporus* e *Lecanicillium fungicola*, **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v.11, n.2, p.99-112.



## 1. Introdução

Um dos maiores problemas econômicos no cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus* no Brasil é a doença da bolha seca, causada pelo fungo *L. fungicola* (Berendsen et al., 2012), cujos sintomas são a formação de massas de tecidos indiferenciados nos cogumelos, comprometendo a sua qualidade (Largeteau & Savoie, 2010; Rokni & Goltapeh, 2019). Dentro dessa problemática, tem-se buscado alternativas para o controle deste e de outros patógenos no cultivo de cogumelos no Brasil. Neste contexto, o uso dos óleos essenciais tem-se mostrado uma alternativa promissora, entretanto, ainda são necessários estudos para entender a interação patógeno-hospedeiro. Para isto, os ensaios com os óleos essenciais requerem a utilização de surfactantes, os quais permitem o preparo de emulsões com as concentrações desejadas de cada tipo de óleo essencial (Diénez et al., 2018; Lee et al., 2020; Regnier & Combrinck, 2010).

Os surfactantes são moléculas com capacidade para reduzir a tensão superficial entre diferentes tipos de líquidos ou entre líquidos e sólidos (Manikantan & Squires, 2020). Surfactantes são compostos caracterizados por duas regiões, sendo uma de natureza polar (hidrofílica) e, outra, de natureza apolar (hidrofóbica). Esta característica torna os surfactantes substâncias anfipáticas, ou seja, possuem a capacidade de interagir em meios com polaridades diferentes (Silva et al., 2015; Nakama, 2017). A nanoemulsão de óleos essenciais pode ter suas propriedades antimicrobianas melhoradas em relação ao óleo puro (Silva et al., 2022). Por isso, os surfactantes são utilizados para homogeneizar soluções com características distintas, como em mistura de soluções aquosas e oleosas.

Devido as características dos surfactantes, esses são muito utilizados no preparo de suspensões de conídios. Tanto esporos como hifas aéreas são conhecidos por apresentarem uma superfície hidrofóbica, conferida por proteínas hidrofobinas (Ball et al., 2020; Deacon & Berry, 2013). Essa característica dificulta a dispersão dos conídios ou outros tipos de esporos em suspensões aquosas, requerendo, por isso, a utilização dos surfactantes. Entretanto, um problema que deve ser considerado é o efeito inibitório que os surfactantes podem apresentar sobre a germinação, o que pode ser influenciado tanto pelo tipo como pela concentração do surfactante utilizado (Hari et al., 2013; Mwamburi et al., 2015). Na verdade, a ação antimicrobiana dos surfactantes já é bem documentada (Silva et al., 2015). E, por isso, deve ser sempre levada em conta para este tipo de trabalho. Neste contexto, o efeito do surfactante pode ocorrer em dois momentos distintos. No primeiro momento, o efeito inibitório ocorre diretamente quando o mesmo é utilizado para o preparo da suspensão de conídios do patógeno. No segundo momento, o efeito inibitório pode ocorrer de forma sinérgica ou adicional, quando utilizado para o preparo da emulsão do óleo essencial utilizado nos ensaios para o controle do patógeno. Devido a isso, é importante conhecer o efeito do surfactante sobre a germinação dos conídios ou sobre o crescimento micelial do patógeno.

Tween 80 é um emulsificante não iônico amplamente utilizado em produtos cosméticos, farmacêuticos e alimentos (Nielsen et al., 2016). É frequentemente incluído em experimentos de laboratório, especialmente em combinação com solução salina para o preparo de suspensões de conídios e endósporos bacterianos (Mwamburi et al., 2015). Proporções de até 3:1 (surfactante: óleo) podem produzir gotículas menores com propriedades antibacterianas mais eficientes ao óleo puro ou compostos isolados. As propriedades aprimoradas das nanoemulsões estão associadas ao tamanho e composição química da gota, uma vez que a proporção do núcleo hidrofóbico (óleo essencial) e da camada externa hidrofílica (Tween 80) influencia diretamente o mecanismo de ação antibacteriano (Silva et al., 2022).

Triton X-100 é um detergente não iônico, sendo um dos agentes mais utilizados para solubilizar biomembranas. Este detergente interage com a camada lipídica da membrana, desencadeando a permeabilização e quebra de tensão da mesma (Mattei et al., 2017). O Triton X-100 é um detergente relativamente suave quando comparado com outros surfactantes. Pelo fato de não ser um detergente desnaturante, pode ser utilizado em várias metodologias para extração de ácidos nucleicos, proteínas e organelas. Entretanto, o fato de ser utilizado para provocar a lise de células ou permeabilizar membranas

(Koley & Bard, 2010), significa também que, quando utilizado na composição da suspensão de esporos, o Triton X-100 pode também ter um efeito adverso.

O DMSO (Dimetilsulfóxido) é um composto orgânico com propriedades solventes, utilizado como crioprotetor em suspensões de esporos de fungos. O DMSO é usado também no preparo de soluções de drogas utilizadas nos ensaios de controle de fungos dermatófitos. Esses estudos permitiram observar que o DMSO pode apresentar um efeito sinérgico com as drogas testadas contra os fungos, em baixas concentrações, ou até mesmo um efeito inibitório acentuado quando utilizado na concentração de 10% (Randhawa, 2006). Trata-se de um composto que penetra facilmente nas membranas celulares, pele e mucosa. Por isso, pode atuar como um intensificador de penetração e aumentar a penetração transmembrana de antifúngicos e outros compostos (Papich, 2016). Como um solvente, o DMSO pode ser utilizado também na aplicação de óleos essenciais como antifúngicos. Entretanto, considerando que este produto apresenta ação antifúngica contra dermatófitos, além de bactérias (Papich, 2016; Randhawa, 2006), é muito importante avaliar o seu efeito também sobre *L. fungicola* e *A. bisporus*.

Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito destas substâncias sobre o crescimento micelial dos fungos *L. fungicola* e *A. bisporus*, além das possíveis ações sinérgicas destes com os óleos essenciais.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Microrganismos utilizados

Os isolados de *L. fungicola* e *A. bisporus* foram obtidos, conforme descrito por Lee et al. (2020). Três isolados de *L. fungicola* foram utilizados (LF-LTL01, LF-LTL02 e LF-LTL03), obtidos de regiões de cultivo diferentes. Duas cepas de *A. bisporus* foram utilizadas, sendo da variedade Champignon (ABI-LTL-01 e ABI-LTL02) e outra da variedade Portobello (PB-LTL01), oriundas de cultivo na cidade de Oliveira – Minas Gerais, Brasil.

### 2.2 Avaliação do efeito dos surfactantes no crescimento micelial dos fungos

Os fungos *L. fungicola* e *A. bisporus* foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA (batata 220g/L, dextrose 150g/L e ágar 150g/L) e por 10 dias a 25±0,5° C e, quando necessário, as culturas foram mantidas em refrigerador a 4° C. Avaliou-se o crescimento micelial das duas espécies em BDA com os surfactantes Tween 80, DMSO (dimetilsulfóxido) e Triton X-100, nas concentrações de 0,5 e 1%. Cada surfactante foi adicionado ao meio BDA nas suas respectivas concentrações e autoclavados a 121° C por 20 minutos. Como controle, foram utilizadas placas que continham apenas meio BDA. A inoculação foi efetuada usando palitos de madeira estéreis por meio de simples picada, transferindo-se esporos e fragmentos de micélio para o ponto central das placas. Após inoculação, as placas foram incubadas em câmara B.O.D a 25±0,5° C, por 10 dias, no escuro. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada com um paquímetro digital, fazendo-se duas medidas do diâmetro das colônias a cada 48 horas, com os dois eixos cruzando-se a 90° e previamente marcados na face externa do fundo da placa de Petri. O diâmetro da colônia de cada tratamento teste foi comparado com o diâmetro dos controles. A porcentagem de inibição (PI) do crescimento micelial causada pelo surfactante foi calculada conforme Billerbeck et al. (2001) (Equação 1):

$$PI = \frac{(A-B)}{A} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

sendo: **A** = diâmetro médio da colônia no controle;  
**B** = diâmetro médio da colônia no tratamento.

### 2.3 Análise da ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a obtenção das amostras, foram utilizadas culturas fúngicas crescidas em meio com os surfactantes a 0,5%. As amostras consistiram em discos miceliais (7 mm), os quais foram imersos em solução fixadora (Karnovsky's modificado) pH 7,2 e armazenados a 4° C por 24h. Após este período, seguiu-se o protocolo descrito por Bozzola e Russell (1999), com algumas modificações. As amostras foram lavadas por três vezes em água destilada e em seguida desidratadas em gradiente crescente de acetona (25, 50, 75, 90%), por 10 minutos cada etapa e 100% (por três vezes no mesmo tempo). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico Bal-Tec (Balzers, Liechtenstein) modelo CPD 030, para substituição da acetona por CO<sub>2</sub>. Para completar a secagem, os espécimes obtidos foram montados em *stubs* (suportes de alumínio, cobertos com uma camada de papel alumínio e fixados com fita dupla face de carbono) e cobertos com ouro em evaporador Bal-Tec (Balzers, Liechtenstein) modelo SCD 050, para observação em microscópio eletrônico de varredura, modelo Evo® 40 VP (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

### 2.4 Análise estatística

As variáveis obtidas nos testes foram analisadas por meio do programa estatístico SISVAR®, com análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

## 3. Resultados e Discussão

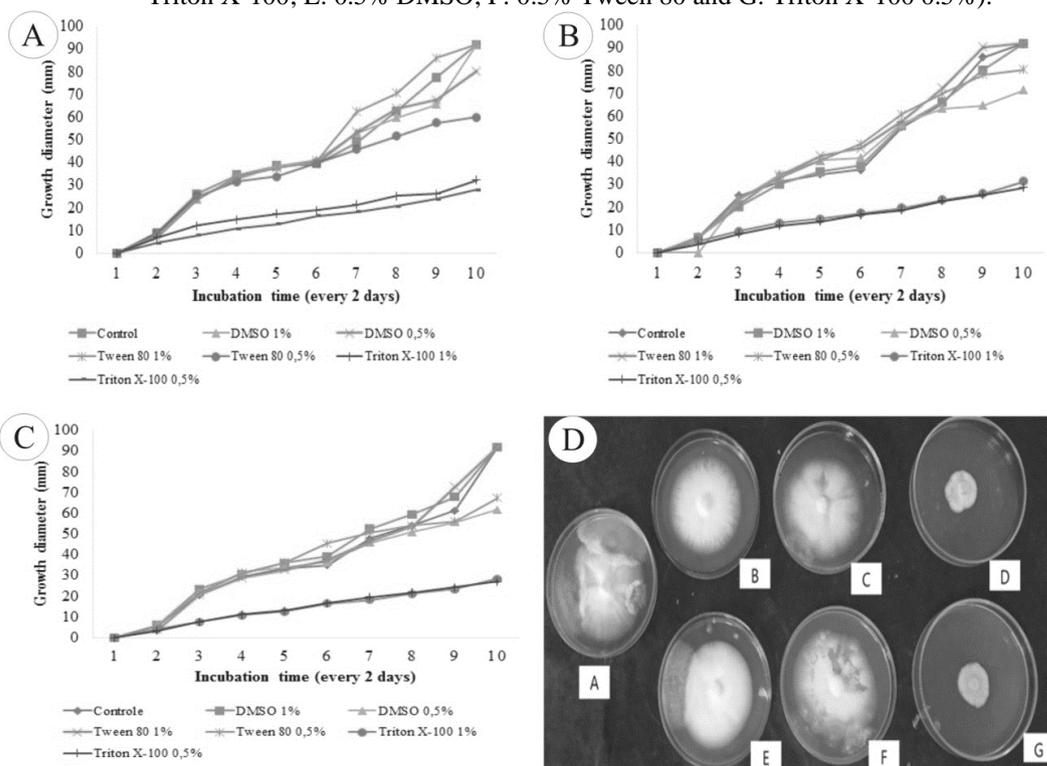
### 3.1 Influência dos surfactantes no crescimento micelial de *Lecanicillium fungicola*

Houve efeito significativo dos diferentes surfactantes, para o tempo de incubação, assim como para a interação (Surfactante x tempo), indicando que o crescimento do fungo *L. fungicola* na presença dos surfactantes, depende da interação entre a concentração aplicada e o tempo de incubação do fungo.

Para os três isolados de *L. fungicola*, DMSO e Tween 80, ambos a 1%, permitiram crescimento micelial idêntico ao controle, enquanto, na presença de Triton X-100, o crescimento micelial de todos os isolados foi intensamente inibido (Tabela 1; Figura 1A). Portanto, Triton X-100 não deve ser usado para o preparo de suspensões de esporos de *L. fungicola*. É importante destacar que, para DMSO e Tween 80, observou-se um crescimento micelial menor quando se utilizou a concentração de 0,5%.

**Figura 1.** Crescimento micelial de *L. fungicola*, cepas: A) (LF-LTL01); B) L (LF-LTL02) e C) (LF-LTL03) sobre a influência de diferentes surfactantes e solvente. D) Fotografia de placas mostrando a influência dos surfactantes em diferentes concentrações no crescimento micelial do fungo *L. fungicola*. (A: Controle; B: DMSO 1%; C: Tween 80 1%; D: Triton X-100 1%; E: DMSO 0,5%; F: Tween 80 0,5% e G: Triton X-100 0,5%).

**Figure 1.** Mycelial growth of *L. fungicola*, strains: A) (LF-LTL01); B) L (LF-LTL02) and C) (LF-LTL03) on the influence of different surfactants and solvent. D) Photograph of plates showing the influence of surfactants at different concentrations on the mycelial growth of the fungus *L. fungicola*. (A: Control; B: 1% DMSO; C: 1% Tween 80; D: 1% Triton X-100; E: 0.5% DMSO; F: 0.5% Tween 80 and G: Triton X-100 0.5%).



Para Triton X-100 não se observou o mesmo efeito, uma vez que as diferenças entre as duas concentrações não foram significativas. Esses resultados podem indicar, portanto, um efeito de estímulo do crescimento na concentração de 1%, entretanto, é algo difícil de explicar, o que requer a confirmação dos resultados. Além do crescimento micelial, observou-se uma alteração na morfologia da colônia de *L. fungicola* na presença de Tween 80 0,5% (Figura 1D). Efeito semelhante foi observado por Hamzah et al. (2018), sobre *Aspergillus brasiliensis*, porém, com Triton X-100, de acordo com os autores, as alterações das características físico-químicas dos fungos filamentosos por surfactantes são comumente medidas pelo método do ângulo de contato, esse método está intimamente relacionado com a tensão superficial das superfícies sólidas. A tensão superficial de qualquer superfície é modificada pela adição de agentes tensoativos (surfactantes) através da adsorção das moléculas. Os surfactantes são moléculas anfifílicas que consistem em porções hidrofílicas e hidrofóbicas dependendo do tipo de surfactantes. As superfícies são alteradas de hidrofóbicas para hidrofílicas e vice-versa através das interações físico-químicas. Este é, portanto, um importante aspecto que merece ser mais bem estudado.

Na Tabela 1 está apresentado o resultado da análise estatística, demonstrando o efeito no crescimento micelial das diferentes cepas de *L. fungicola*.

**Tabela 1.** Crescimento micelial (mm) das diferentes cepas de *L. fungicola* sob diferentes concentrações dos surfactantes e solvente testados após 10 dias de avaliação.**Table 1.** Mycelial growth (mm) of different strains of *L. fungicola* under different concentrations of surfactants and solvent tested after 10 days of evaluation.

Cepa	Surfactantes e solvente						
	Controle	DMSO 0,5%	DMSO 1%	Tween 80 0,5%	Tween 80 1%	Triton X- 100 0,5%	Triton X- 100 1%
<b>LF-LTL01</b>	92Aa	80,2Bb	92Aa	59,9Dc	92Aa	32,3Ed	28Ed
<b>LF-LTL02</b>	92Aa	71,5Cc	92Aa	80,5Bb	92Aa	28,7Ed	31,2Ed
<b>LF-LTL03</b>	92Aa	61,7Db	92Aa	67,3Cb	92Aa	26,9Ec	28,3Ec

**CV: 4,91%**

\*Letras maiúsculas iguais nas colunas indicam médias estatisticamente semelhantes entre as diferentes cepas. Letras minúsculas nas linhas indicam médias estatisticamente semelhantes entre os diferentes surfactantes (Scott-Knott 5%)

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto considerado simples, mas considerado adequado para solubilizar agentes terapêuticos ou outros que não são solúveis em água pura. Além disso, o DMSO apresenta características consideradas particularmente importantes como penetração rápida e, conseqüentemente, maior penetração de outras substâncias nas membranas biológicas; eliminação de radicais livres; efeitos na coagulação; etc. A toxicidade sistêmica do DMSO é considerada baixa. Combinações de DMSO com outros agentes tóxicos provavelmente constituem seu maior potencial tóxico (Brayton, 1986). Além de ser um solvente importante, o DMSO também apresenta propriedades terapêuticas e é amplamente utilizado para tratar injúrias, desde manifestações cutâneas a infecções como as do trato urinário (Swanson, 1985).

No estudo desenvolvido por Reese e Maguire (1969), utilizando surfactantes como estimulantes de produção de enzimas, todos os diferentes sistemas enzimáticos responderam de forma favorável ao Tween 80. Segundo os autores, o surfactante altera a permeabilidade da célula, indicando que eles promovem a entrada e saída de compostos. Animais, anfíbios e larvas apresentam maior resposta aos anestésicos na presença de surfactantes. E os surfactantes também podem alterar as características fenotípicas de fungos.

No estudo desenvolvido por Zeng et al. (2006), que avaliaram os efeitos de Tween 80 em enzimas extracelulares de *Penicillium simplicissimum*, os autores observaram maior atividade de algumas enzimas, além de um aumento da biomassa fúngica. Por outro lado, Garon et al. (2002), observaram que o Triton X-100 é mais tóxico que o Tween 80, apesar de terem encontrado que ambos são bem tolerados por fungos. Os autores ainda propõem que a baixa tolerância a surfactantes esteja relacionada, provavelmente, às interações físico-químicas entre as estruturas fúngicas, como a membrana plasmática e parede celular, com o surfactante. A toxicidade dos surfactantes em meio sólido foi testada para diversos fungos, entre eles o *Verticillium lecanii* [sinônimo: *Lecanicillium lecanii*], e observaram um crescimento superior na presença de Triton X-100, quando comparado com o crescimento na presença de Tween 80. Esses resultados demonstram, portanto, que o efeito do surfactante pode variar de espécie para espécie, até mesmo dentro do mesmo gênero. Para o presente estudo foi utilizada espécie do mesmo gênero (*Lecanicillium*) e, para as três cepas testadas de *L. fungicola*, o Triton X-100 apresentou o maior efeito inibitório sobre o crescimento fúngico, com um diâmetro de colônia inferior a 50% quando comparado com o controle.

Tawfik et al., (2015), sintetizaram surfactante iônicos e não iônicos e testaram no crescimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos, os resultados relataram que a porcentagem de inibição do crescimento micelial aumenta com o aumento das concentrações do surfactante para todas as espécies de fungos utilizadas. Esses resultados indicaram que o surfactante inibiu o crescimento micelial de todas as espécies fúngicas de maneira dose-dependente. Os surfactantes associados têm potencial efeito antifúngico para o controle de alguns fungos fitopatogênicos.

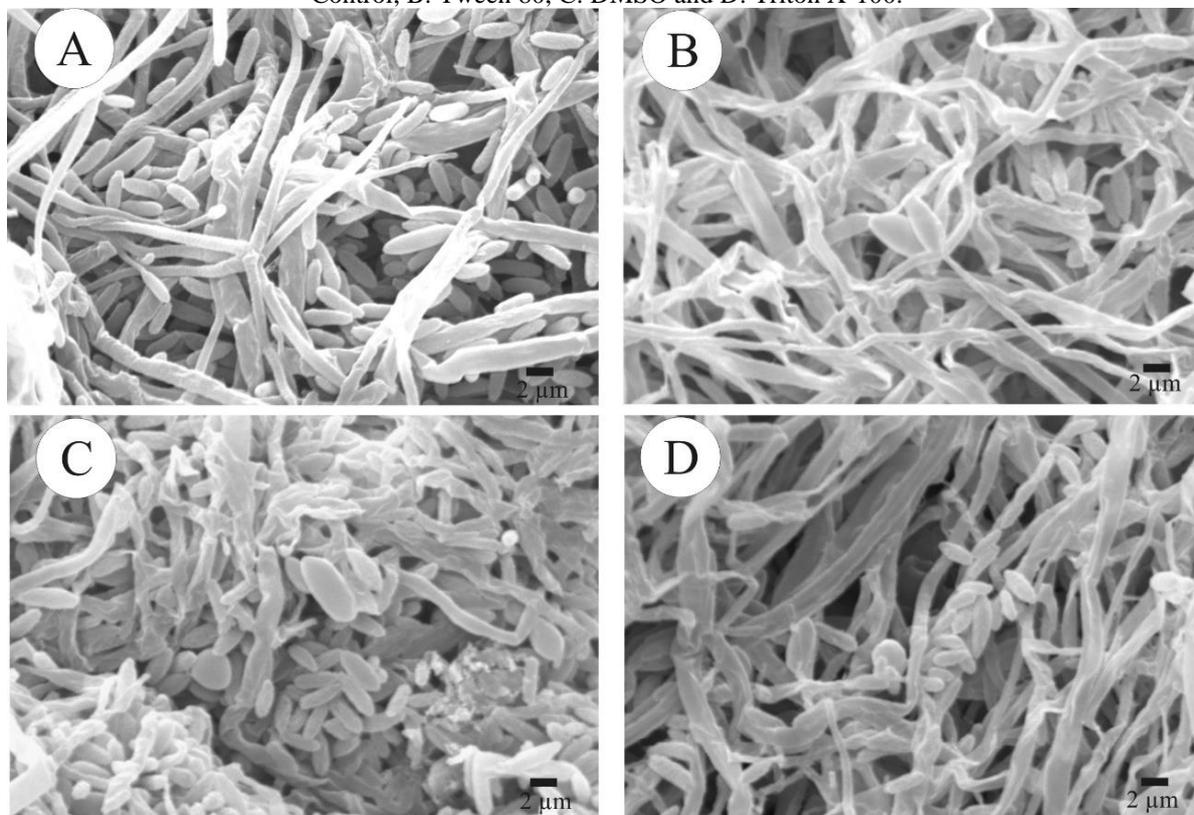
Em outros estudos, o efeito negativo tem sido observado para outros surfactantes, tais como Tween 80

(Nielsen et al., 2016), evidenciando que não há uma regra geral para espécies de fungos ou tipos de surfactantes. Isto torna necessário fazer novos ensaios sempre que se trabalha com novas espécies de fungos ou novos surfactantes.

Amostras de *L. fungicola* cultivadas em meio com surfactante na concentração de 0,5% foram submetidas à análise em microscópio eletrônico de varredura (Figura 2). As imagens obtidas mostram as diferenças causadas pelos surfactantes na morfologia das hifas de *L. fungicola*, quando comparadas ao controle.

**Figura 2.** Eletromicrografias de varredura das hifas de *L. fungicola* após cultivo na presença dos surfactantes. A: Controle, B: Tween 80, C: DMSO e D: Triton X-100.

**Figure 2.** Scanning electron micrographs of *L. fungicola* hyphae after cultivation in the presence of surfactants. A: Control, B: Tween 80, C: DMSO and D: Triton X-100.



As imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura mostram uma clara diferença entre as hifas do controle (Figura 2A), em relação aos tratamentos com Tween 80 (Figura 2B), DMSO (Figura 2C) e Triton X-100 (Figura 2D). As hifas do controle (micélio cultivado apenas em BDA) parecem ser cilíndricas e de forma regular, contrastando com as hifas tratadas com Tween 80, DMSO e Triton X-100, que aparecem irregulares, arredondadas e deformadas. Isso indica que as hifas de *L. fungicola* sofrem alterações quando estão na presença dessas substâncias.

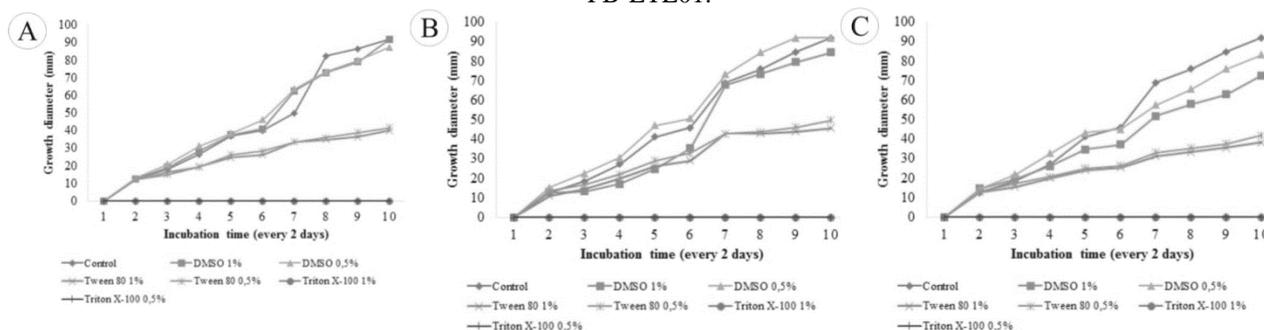
De modo geral, observa-se no controle, hifas mais homogêneas, com textura lisa e diâmetro uniforme, enquanto nos tratamentos com surfactantes observa-se hifas deformadas, com rugosidade e se organizando de forma mais indefinida e emaranhada. Também é possível observar a alteração na quantidade de esporos encontrado nas amostras, nos tratamentos que contém Tween 80 e Triton X-100 ocorre uma drástica redução dos mesmos. Na presença de DMSO a quantidade de esporos visíveis é próxima à do controle.

### 3.2 Efeito dos surfactantes sobre o crescimento micelial de *Agaricus bisporus*

Os surfactantes apresentaram um efeito mais acentuado sobre as cepas de *A. bisporus*, quando comparado a *L. fungicola* (Tabela 2, Figura 3). O aspecto mais importante foi que, além do Triton X-100, o qual inibiu completamente o crescimento do fungo, observou-se também que Tween 80 apresentou um forte efeito inibitório, reduzindo em mais de 50% o diâmetro da colônia. Portanto, o único surfactante que permitiu um crescimento micelial próximo ao controle foi o DMSO. O segundo aspecto importante observado foi que não houve diferença significativa entre as concentrações dos surfactantes, inclusive DMSO. E, por fim, também não se observou diferenças significativas entre as cepas de *A. bisporus*, ao contrário do que se observou para *L. fungicola*.

**Figura 3.** Efeito dos diferentes surfactantes sobre o crescimento micelial de *A. bisporus*: A) ABI-LTL01; B) ABI-LTL02 e C) PB-LTL01.

**Figure 3.** Effect of different surfactants on the mycelial growth of *A. Bisporus*: A) ABI-LTL01; B) ABI-LTL02 and C) PB-LTL01.



**Tabela 2.** Crescimento micelial (mm) das diferentes cepas de *Agaricus bisporus* sob diferentes concentrações dos surfactantes e solvente testados, após 10 dias de incubação.

**Table 2.** Mycelial growth (mm) of different strains of *Agaricus bisporus* under different concentrations of surfactants and solvent tested, after 10 days of incubation.

Cepa	Surfactantes e solvente						
	Controle	DMSO 0,5%	DMSO 1%	Tween 80 0,5%	Tween 80 1%	Triton X-100 0,5%	Triton X-100 1%
<b>ABI-LTL01</b>	92Aa	92Aa	87,4Ba	40Eb	41,7Eb	0Fc	0Fc
<b>ABI-LTL02</b>	92Aa	84,5Bb	92Aa	43,7Ed	49,7Dc	0Fe	0Fe
<b>PB-LTL01</b>	92Aa	72Cc	83,2Ba	38,3Ed	41,9Ed	0Fe	0Fe

CV: 5,82%

\*Letras iguais maiúsculas nas colunas indicam médias estatisticamente semelhantes entre as diferentes cepas. Letras minúsculas nas linhas indicam médias estatisticamente iguais entre diferentes surfactantes (Scott-Knott 5%).

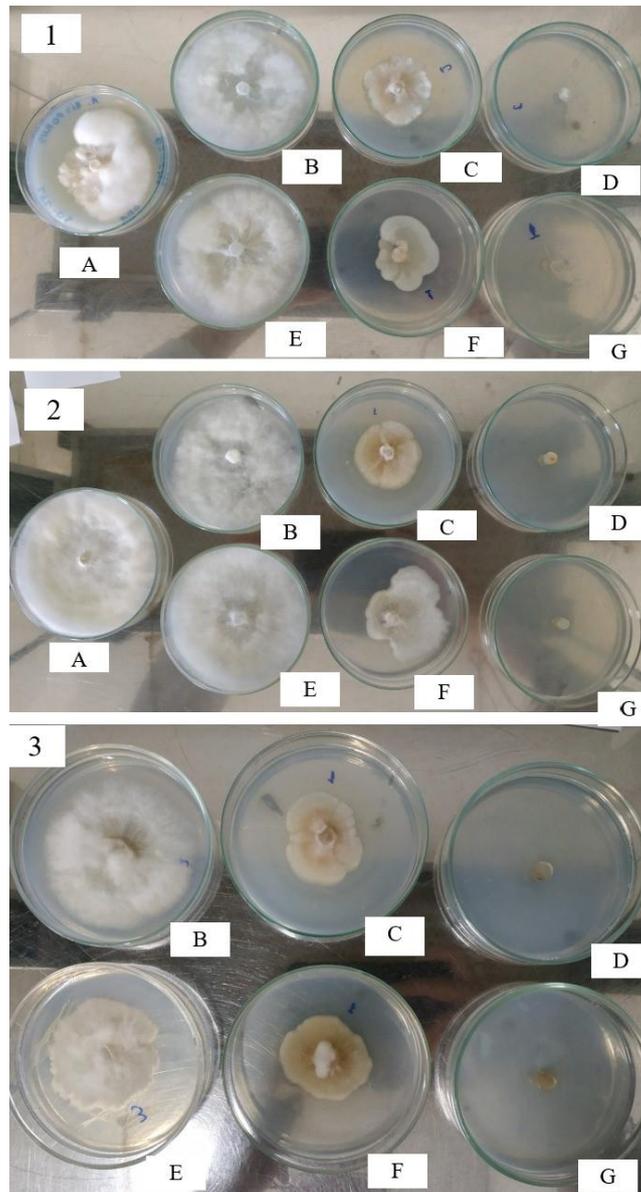
Com base no exposto acima, pode-se dizer que, para os experimentos com *A. bisporus*, dentre os surfactantes testados, o único que pode ser utilizado para o preparo das emulsões de óleos essenciais é o DMSO, uma vez que os demais apresentaram efeito inibitório evidente sobre o fungo. Dentro deste contexto, isto é extremamente importante neste tipo de ensaio, uma vez que o interesse seria avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais sobre o patógeno *L. fungicola*. Para isto, é vital que nem o óleo essencial e nem o surfactante utilizado para o seu preparo, apresentem qualquer efeito negativo sobre o cogumelo cultivado.

Os resultados obtidos neste estudo tornam evidentes as alterações na morfologia das colônias de *A.*

*bisporus* cultivadas *in vitro* nas presenças de Tween 80, além da inibição parcial do crescimento micelial. Para o Triton X-100, sequer houve formação de colônia (Figura 4).

**Figura 4.** Morfologia de colônias de *A. bisporus* cultivadas na presença de diferentes surfactantes e solvente. (1: ABI-LTL01; 2: ABI-LTL02 e 3: PB-LTL01 onde se lê A: controle; B: DMSO 1%; C: Tween 80 1%; D: Triton X-100 1%; E: DMSO 0,5%; F: Tween 80 0,5% e G: Triton X-100 0,5%).

**Figure 4.** Morphology of *A. Bisporus* colonies grown in the presence of different surfactants and solvent. (1: ABI-LTL01; 2: ABI-LTL02 and 3: PB-LTL01 where it reads A: control; B: 1% DMSO; C: 1% Tween 80; D: 1% Triton X-100; E: DMSO 0.5%, F: 0.5% Tween 80 and G: 0.5% Triton X-100).



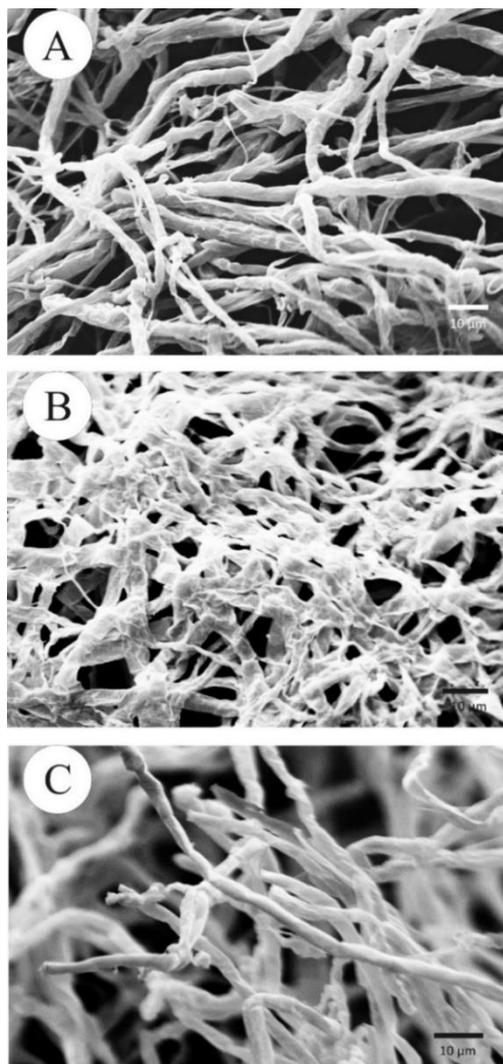
Além do menor crescimento micelial observado na presença do surfactante Tween 80, verificou-se uma alteração intensa da morfologia de colônia de *A. bisporus* na presença deste surfactante. Na verdade, este efeito

foi muito mais acentuado em *A. bisporus* do que aquele observado em *L. fungicola*. Para *A. bisporus*, observou-se uma profunda alteração morfológica da colônia, que passou do aspecto cotonoso, típico dos fungos filamentosos, para um aspecto cremoso. Este efeito foi observado para as duas concentrações testadas de Tween 80. Para o DMSO, esse efeito não foi observado, uma vez que não formação das colônias, em função do seu elevado grau de toxidez para o fungo.

As análises de microscopia eletrônica permitiram observar que o DMSO apresentou também um efeito negativo sobre a fisiologia do fungo, ainda que isto não tenha sido suficiente para alterar a morfologia da colônia (Figura 5).

**Figura 5.** Eletromicografia das hifas de *Agaricus bisporus* ABI-LTL01 após cultivo na presença dos surfactantes e solvente. A: controle, B: DMSO 0,5% e C: Tween 80 0,5%.

**Figure 5.** Electromycography of *Agaricus bisporus* ABI-LTL01 hyphae after cultivation in the presence of surfactants and solvent. A: control, B: 0.5% DMSO and C: 0.5% Tween 80.



As imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura mostram uma clara diferença entre as hifas retiradas do controle (Figura 5A), daquelas retiradas dos tratamentos com DMSO (Figura 5B) e Tween 80 (Figura 5C) ambos em concentração de 0,5%. Não foi possível analisar amostras de *A. bisporus* tratadas com Triton X-100, em função da completa inibição do crescimento micelial do fungo na presença deste surfactante. As hifas do controle (crescimento em BDA apenas) parecem ser cilíndricas e de forma regular. Contrastando com as hifas tratadas com Tween 80 e DMSO, que aparecem irregulares, achatadas e deformadas, sendo visível maiores danos na amostra tratada com o DMSO. Isso indica que as hifas de *A. bisporus* sofrem alterações quando existem a presença dessas substâncias. De modo geral, observa-se no controle hifas mais homogêneas, com textura lisa e diâmetro uniforme, enquanto nos tratamentos com surfactantes observa-se hifas deformadas, com rugosidade e se organizando de forma mais indefinida e emaranhada. Curiosamente, a deformação das hifas pareceu mais evidente na presença de DMSO do que em Tween 90, sendo que a alteração na morfologia das colônias ocorreu de forma intensa neste último surfactante e imperceptível no primeiro.

#### 4. Conclusão

Para estudos *in vitro*, DMSO e Tween 80, ambos a 1%, são os indicados para o preparo de suspensões de esporos de *L. fungicola*, uma vez que não inibiram o crescimento deste fungo.

Mas, para o preparo de emulsões de óleos essenciais visando o controle de *L. fungicola* durante o cultivo de *A. bisporus*, é indicado o uso de DMSO 1%, uma vez que apenas este composto não inibiu o crescimento micelial de *A. bisporus*. Neste caso, o DMSO deve ser utilizado tanto para o preparo das suspensões de conídios de *L. fungicola*, bem como para o preparo das emulsões de óleos essenciais.

O Triton X-100, apesar de ser um surfactante consagrado, não dever ser usado para o preparo de suspensões de conídios e nem para o preparo das emulsões de óleos essenciais para ensaios de controle da doença da bolha seca no cultivo do champignon.

#### 5. Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural- LME na Universidade Federal de Lavras, a FAPEMIG e CAPES.

#### 6. Referências

- Ball, S. R., Kwan, A. H., & Sunde, M. (2020). Hydrophobin rodlets on the fungal cell wall. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 425, 29–51. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. [https://doi.org/10.1007/82\\_2019\\_186](https://doi.org/10.1007/82_2019_186)
- Berendsen, R. L., Kalkhove, S. I. C., Lugones, L. G., Baars, J. J. P., Wösten, H. A. B., & Bakker, P. A. H. M. (2012). Effects of fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from mushroom cultures on *Lecanicillium fungicola*. *Biological Control*, 63(2), 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.07.012>
- Bozzola, J. J., & Russell, L. D. (1999). **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. Jones & Bartlett Learning.
- Brayton, C. F. (1986). Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *In The Cornell veterinarian* 76 (1), 61–90.
- Silva, B. D., Rosario, D. K. A. D., & Conte-Junior, C. A. (2022). Can droplet size influence antibacterial activity in ultrasound-prepared essential oil nanoemulsions?. **Critical Reviews in Food Science and**

**Nutrition**, 1-11. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2103089>

- Silva, J. D. F., Da Silva, Y. P., Piatnicki, C. M. S., Böckel, W. J., & Mendonça, C. R. B. (2015). Microemulsões: Componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. In **Química Nova** 38 (9), 1196–1206. Sociedade Brasileira de Química. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150135>
- de Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L., & Dargent, R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, 47(1), 9–17. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-1-9>
- Deacon, J. W., & Berry, L. A. (2013). pathogens and the ecological factors that influence their activities. Sev-eral themes have begun to emerge from these studies, and they show parallels. **Biological Control of Plant Diseases: Progress and Challenges for the Future**, 230, 157.
- Diánez, F., Santos, M., Parra, C., Navarro, M. J., Blanco, R., & Gea, F. J. (2018). Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. **Letters in Applied Microbiology**, 67(4), 400–410. <https://doi.org/10.1111/lam.13053>
- Garon, D., Krivobok, S., Wouessidjewe, D., & Seigle-Murandi, F. (2002). Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorene. **Chemosphere**, 47(3), 303–309. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00299-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00299-5)
- Hamzah, N., Singhal, N., Padhye, L., & Swift, S. (2018). Effect of surfactants on *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 physicochemical properties. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 6(2), 3392–3398. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.068>
- Hari, M., Joseph, S. A., Mathew, S., Nithyaja, B., Nampoore, V. P. N., & Radhakrishnan, P. (2013). Thermal diffusivity of nanofluids composed of rod-shaped silver nanoparticles. **International Journal of Thermal Sciences**, 64, 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.ijthermalsci.2012.08.011>
- Koley, D., & Bard, A. J. (2010). Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 107(39), 16783–16787. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011614107>
- Largeteau, M. L., & Savoie, J. M. (2010). Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: Biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 86(1), 63–73. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2445-2>
- Lee, L. T., Costa, L. M. A. S., Moraes, T. S. J. de, Castro, C. P. de, Souza, L. de C., Piccoli, R. H., & Dias, E. S. (2020). Screening de óleos essenciais contra *Lecanicillium fungicola*. **Research, Society and Development**, 9(9), e269997098. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7098>
- Manikantan, H., & Squires, T. M. (2020). Surfactant dynamics : hidden variables controlling fluid flows. **Journal of Fluid Mechanics**, 892, 1–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/jfm.2020.170>
- Mattei, B., Lira, R. B., Perez, K. R., & Riske, K. A. (2017). Membrane permeabilization induced by Triton X-100: The role of membrane phase state and edge tension. **Chemistry and Physics of Lipids**, 202, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.11.009>
- Mwamburi, L. A., Laing, M. D., & Miller, R. M. (2015). Effect of surfactants and temperature on

germination and vegetative growth of *beauveria bassiana*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 46(1), 67–74. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131077>

Nakama, Y. (2017). Surfactants. In **Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications** (pp. 231–244). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X>

Nielsen, C. K., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., & Meyer, R. L. (2016). Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media. **Frontiers in Microbiology**, 7(12), 1878. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01878>

Papich, M. G. (2016). Dimethyl Sulfoxide (DMSO). In **Saunders Handbook of Veterinary Drugs** (pp. 248–249). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00215-1>

Randhawa, M. A. (2006). The Effect of Dimethyl Sulfoxide DMSO on the Growth of Dermatophytes. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, 47, 313–318. <https://doi.org/https://doi.org/10.3314/jjmm.47.313>

Reese, E. T., & Maguire, A. (1969). Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. **Applied Microbiology**, 17(2), 242–245.

Regnier, T., & Combrinck, S. (2010). In vitro and in vivo screening of essential oils for the control of wet bubble disease of *Agaricus bisporus*. **South African Journal of Botany**, 76(4), 681–685. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.07.018>

Rokni, N., & Goltapeh, E. M. (2019). Tolerance to dry bubble disease (*Lecanicillium fungicola*) in Iranian wild germplasm of button mushroom (*Agaricus bisporus*). **Mycoscience**, 60(2), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.10.001>

Swanson, B. N. (1985). Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). In **Reviews in Clinical and Basic Pharmacology**, 5 (1–2), 1–33.

Tawfik, S. M., Zaky, M. F., Mohammad, T. G., & Attia, H. A. (2015). Synthesis, characterization, and in vitro antifungal activity of anionic and nonionic surfactants against crop pathogenic fungi. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 29, 163–171.

Zeng, G. M., Shi, J. G., Yuan, X. Z., Liu, J., Zhang, Z. B., Huang, G. H., Li, J. B., Xi, B. D., & Liu, H. L. (2006). Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. **Enzyme and Microbial Technology**, 39(7), 1451–1456. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.035>