БИОЛОГИЯ

УДК 547.78:582.2

ВОЗДЕЙСТВИЕ 4-(2-МЕТИЛ-1*H*-БЕНЗИМИДАЗОЛ-1-ИЛМЕТИЛ) ФЕНОЛА НА СКОРОСТЬ И ХАРАКТЕР РОСТА *ASPERGILLUS NIGER*

© 2009 Е.Ю. Атлашова, Н.А. Кленова,[1] З.П. Белоусова[2]

Изучено влияние *4-(2-метил-1H-бензимидазол-1-илметил) фенола* в действующей концентрации 100 мкг на рост и морфологические особенности почвенного штамма *Aspergillus niger*. Обнаружено фунгиостатическое действие на растущую культуру и фунгицидное действие на более молодые организмы. Обработка опытных образцов 4-(2-метил-1H-бензимидазол-1-илметил) фенолом приводит к образованию вздутий на клеточных стенках мицелия грибов, появлению большого количества пустых гиф, нарушению апикальных участков прорастающих гиф, и выходу из них части внутриклеточного содержимого, лизису прорастающих спор.

Ключевые слова: бензимидазол, фунгицидная активность.

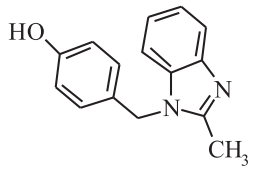
Грибы рода *Aspergillus* могут вызывать заболевания трех типов: микозы (болезни, связанные с развитием патогенных грибов на поверхности кожи или во внутренних органах), микотоксикозы (болезни, которые возникают под влиянием токсинов гриба) и аллергии [1]. Создают проблемы для лечения такие тяжело протекающие инфекции, как системный аспергиллез [2]. Увеличение количества заболеваний и их опасность обусловливают необходимость расширения исследований в области получения новых противогрибковых препаратов и изучения их биологической активности.

Основу большинства антифунгальных препаратов составляют индол и бензимидазол. Это важнейшие на настоящий момент представители синтетических противогрибковых средств широкого спектра действия. Азолы ингибируют активность одного из ферментов биосинтеза эргостерола, а имен-

[1]Атлашова Екатерина Юрьевна (atlashova@rambler.ru), Кленова Наталья Анатольевна (klenova@ssu.samara.ru), кафедра биологической химии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

[2]Белоусова Зоя Петровна (zbelousova@mail.ru), кафедра органической, биоорганической и медицинской химии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

но цитохром P-450 зависимой 14-α-диметилазы [2,3]. Степень сродства азолов к мишени зависит от структуры азотсодержащего гетероцикла, а эффективность действия — от возможности и быстроты поступления в грибные клетки [4]. При этом необходимо учитывать возможные токсические свойства применяемых препаратов. Ранее нами был осуществлен синтез 4-(2-метил-1H-бензимидазол-1-илметил)фенола и показана его малая токсичность по отношению к гемолизу эритроцитов [5].



Целью данной работы стало изучение противогрибковой активности синтезированного нами 4-(2-метил-1H-бензимидазол-1-илметил)фенола по отношению к почвенному штамму *Aspergillus niger.*

Материалы и методы исследования

Синтез 4-(2-метил-1Н-бензимидазол-1-илметил)фенола описан в [5].

*Изучение активности 4-(2-метил-1*Н*-бензимидазол-1-илметил)фенола.* Чистую культуру *Aspergillus niger* получали из почвенной суспензии общепринятым методом предельных разведений Коха. Посевы производили на кислую среду Чапека в чашки Петри по 0,1 мл из разведений 10^5, 10^6, 10^7. Выращивали при 370 °С в течение 12 дней.

Пробы на противогрибковую активность 4-(2-метил-1H-бензимидазол-1-илметил) фенола оценивали по размеру зоны ингибирования роста, возникающей на газоне вокруг тест-диска диаметром 6 мм, пропитанного водным раствором в концентрации 10 мг/мл этого вещества. На каждый диск наносили 10 мкл раствора соединения. Таким образом, действующая концентрация составила 100 мкг. Тест-диски предварительно стерилизовали с помощью бактерицидных ламп. На чашку общей площадью 63,6 см^2 наносили по четыре диска на расстоянии 2,5 см друг от друга. Каждая проба имела 8 повторов. Контролем служили тест-диски, пропитанные 10 мкл дистиллированной водой. Замеры зон задержки роста вокруг дисков проводили ежесуточно начиная с 5 суток инкубации.

О влиянии 4-(2-метил-1H-бензимидазол-1-илметил)фенола на рост *Aspergillus niger* судили также по общему количеству колоний, выросших в контрольных и опытных пробах.

Морфологические особенности анализировали микроскопически (увеличение 1350 раз, окраска водным фуксином, масляная иммерсия), учитывая форму, расположение и размер клеток из контрольных и опытных проб.

Результаты и их обсуждение

Исследование на противогрибковую активность 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил) фенола в действующей концентрации 100 мкг показало, что соединение обладает выраженной активностью. Это обнаруживается по достоверному увеличению диаметра зон задержки роста *Aspergillus niger* (табл. 1). Диаметр зон зависел от начальной концентрации суспензии культуры гриба. Уменьшение числа организмов при посеве из разведения 10^7, по-видимому, снижает уровень конкуренции и способствует увеличению скорости размножения, что делает большую часть грибов более чувствительной к действию данного соединения.

Таблица 1

Диаметр зон задержки роста *Aspergillus niger* вокруг тест-дисков, пропитанных 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенолом (10 мг/мл)

Сутки культивирования	Диаметры зон отсутствия роста, мм				
	Опыт 10^5	Контроль 10^6	Опыт 10^6	Контроль 10^7	Опыт 10^7
5	8,75±0,30*	6,32±0,82	10,58±0,92*	6,67±0,46	13,67±0,71*
6	8,25±0,35*	6,08±0,36	9,17±0,75*	6,54±0,37	9,75±0,76*
7	6,92±0,43*	6,00±0,00	7,17±0,66*	6,33±0,23	7,92±0,73*
8	6,18±0,51	6,00±0,00	6,17±0,64	6,00±0,00	6,33±0,67
9	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,22±0,59
10	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,10±0,68
11	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00
12	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00	6,00±0,00

* $P \leqslant 0{,}05$.

Действие соединения при пропитке им тест-дисков обнаруживается только до 7-х суток роста, затем рост грибов в опытных и контрольных чашках не отличается. Это может быть обусловлено постепенным высыханием дисков и переходом 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенола в твердое состояние, что делает его неактивным.

Было обнаружено, что суточное действие 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил) фенола при добавлении его в жидкую среду сопровождалось достоверным снижением количества грибных пропагул при высеве на плотную среду на 36 % (разведение 10^5), 47 % (разведение 10^6) и 69 % (разведение 10^7) (табл. 2).

В отличие от действия тест-дисков, предварительная инкубация в присутствии соединения сопровождается снижением количества грибных пропагул при посеве на твердую среду и до 12 суток роста.

Таблица 2

Общее количество грибных пропагул *Aspergillus niger* на плотной среде при высеве после суточной инкубации в присутствии 4-(2-метил-1Н-бензимидазол-1-илметил)фенола (10 мг/мл)

Сутки роста	Контроль 10^5	Опыт 10^5	Контроль 10^6	Опыт 10^6	Контроль 10^7	Опыт 10^7
5	29,61±2,03	21,67±3,18	31,34±6,33	14,33±4,56*	29,67±2,04	10,67±3,18*
6	31,66±2,31	23,67±2,52	31,67±3,18	15,32±5,19*	32,25±2,39	10,68±2,52*
7	35,33±2,32	23,69±2,73	34,33±2,21	18,34±5,21	34,65±2,32	11,67±2,73*
8	37,67±2,31	24,33±2,33	36,33±2,60	19,33±4,93*	36,31±2,31	12,69±2,33*
9	39,33±2,32	25,66±2,31*	38,33±2,61	20,67±4,63*	37,24±2,32	13,65±2,39*
10	40,33±2,33	26,33±2,87*	40,32±2,61	22,66±4,64*	38,68±2,33	16,62±2,89*
11	42,43±2,34	27,67±2,89*	42,66±2,62	23,31±4,91*	40,65±2,34	18,63±2,91*
12	45,33±2,65	30,34±2,65*	45,31±2,89	27,34±4,92*	44,26±2,65	20,68±2,65*

* *$P \leq 0,05$.*

Механизм действия 4-(2-метил-1H-бензимидазол-1-илметил)фенола можно объяснить подавлением активности комплекса ферментов синтеза эргостерола и снижением скорости построения клеточной мембраны [2, 4, 5, 6].

Это подтверждается более высокой чувствительностью быстрорастущей культуры к действию данного соединения.

Изучение морфологических особенностей показало, что обработка опытных образцов 4-(2-метил-1H-бензимидазол-1-илметил)фенолом приводит к образованию вздутий на клеточных стенках мицелия, появлению большого количества пустых гиф, нарушению апикальных участков прорастающих гиф и выходу из них части внутриклеточного содержимого, лизису прорастающих спор. Вероятно, это свидетельствует о нарушении процессов деления клеток, торможении образования клеточной стенки, что и обусловливает фунгиостатическое и фунгицидное действие на более чувствительные молодые культуры.

Литература

[1] Воробьева А.А. Медицинская микробиология и вирусология. М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2006. 636 с.

[2] Навашин С.П. Антифунгальная химиотерапия. Успехи и проблемы // Антибиотики и химиотерапия, 1998. № 8. С. 3–6.

[3] Нифонтов В.И., Бельская Н.П. Производные имидазола. Синтез и противоопухолевая активность имидазола и родственных веществ // Хим.-фарм. журнал, 1986. Т. 20. № 3. С. 277–281.

[4] Borgers M. Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives // Rev. Infect. Dis. 1980. V. 2. P. 520–534.

[5] Белоусова З.П., Осянин В.А., Кленова Н.А. Гемолитическая активность 4-(1Н-бензимидазол-1-илметил)- и 4-(2-метил-1Н-бензимидазол-1-илметил) фенолов и их гликозидов // Хим.-фарм. журнал. 2007. Т. 41. № 12. С. 16–17.

[6] Мысякина И.С., Фунтикова Н.С. Роль стеринов в морфогенетических процессах и диморфизме грибов // Микробиология. 2007. Т. 76. № 1. С. 5–18.

Поступила в редакцию 13/IV/2009;
в окончательном варианте — 13/IV/2009.

ACTION OF 4-(2-METIL-1H-BENZOL-1-YLMETIL)PHENOL ON SPEED AND NATURE OF GROWTH OF *ASPERGILLUS NIGER*

© 2009 E.U. Atlaschova, N.A. Klenova[3] Z.P. Belousova[4]

Influence of 4-(2-methyl-1H-benzimidazol-1-ylmethyl) phenole in functional concentration of 100 mkg/l on growth and morphological features of soil strain *Aspergillus niger* is investigated. Fungiostatis on growing culture and fungicidal action on more young organisms is revealed. Processing of prototypes by 4-(2-methyl-1H-benzimidazol-1-ylmethyl) phenole results in the formation of blistenings on cell walls of mycelium of fungi, appearance of plenty of empty hyphae, disturbance of apical fields germinating hyphae and escaping from them parts of intracellular contents, lysis of germinating spores.

Key words: benzimidazol, fungicidal activity.

Paper received 13/*IV*/2009.
Paper accepted 13/*IV*/2009.

[3]Atlaschova Ekaterina Urievna (atlashova@rambler.ru), Klenova Nataliya Analolievna (klenova@ssu.samara.ru), Dept. of Biological Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

[4]Belousova Zoya Petrovna (zbelousova@mail.ru), Dept. of Organic, Bioorganic and Medical Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.