

УДК 547.772.1:632.4.01/.08

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ 4-АМИНОПИРАЗОЛОВ НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

**Любашкин А.В., Ефимов В.В., Бондарь П.Н., Алаудинова Е.В., Субоч Г.А., Товбис М.С.***ФГБОУ ВО «Сибирский государственный аэрокосмический университет  
имени академика М.Ф. Решетнева», Красноярск, e-mail: lubyashkin@mail.ru*

При многолетнем применении различных бактерицидных и фунгицидных средств для обработки растений наблюдается приспособляемость возбудителей болезней к таким препаратам. Данную проблему невозможно решить без синтеза новых, ранее неизвестных соединений, и изучения их биологической активности. Поэтому поиск новых методов синтеза органических соединений, получение веществ, которые до сих пор не были синтезированы ни в нашей стране, ни за рубежом, доказательство их строения и изучение свойств, в том числе проявления биологической активности, является актуальной задачей. Известен ряд гетероароматических соединений, проявляющих антибактериальную активность. К ним относятся различные производные замещенных пиразолов и аминопиразолов. Все эти соединения обладают достаточно широким спектром биологического действия. В настоящей работе приведены данные по получению ранее не известных 3-алкоксиметил-4-аминопиразолов с фенильным и 2-нафтильным заместителями. Аминопиразолы получали восстановлением соответствующих 4-нитропиразолов гидразингидратом на катализаторе палладий на угле концентрацией 0,7% в дихлорметане. Индивидуальность полученных веществ определяли методом тонкослойной хроматографии. Строение было доказано современными физико-химическими методами анализа. Изучено влияние полученных 4-аминопиразолов на рост бактериальных тест-культур *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus* MSSA, *Staphylococcus aureus* MRSA и грибов рода *Trichoderma asperellum* и *Mucor hiemalis*. Установлена бактерицидная активность 4-аминопиразолов в концентрации 10 мг/мл по отношению к тест-культуре *E. coli*. По отношению к тест-культуре *Pseudomonas* spp 3-алкоксиметил-4-аминопиразолы в концентрации 0,54–35 мг/мл обладают бактериостатическим действием. На рост бактериальных культур *S. aureus* MSSA и *S. aureus* MRSA 4-аминопиразолы с арильными заместителями не оказывают влияния. В то же время 4-аминопиразолы ингибируют рост грибов рода *Mucor hiemalis*, но не оказывают влияния на рост грибов рода *Trichoderma asperellum*.

**Ключевые слова:** защита растений, 4-аминопиразол, алкоксиметилпиразол, биологическая активность, бактерицидные препараты, фунгицидные препараты, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* MSSA, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Pseudomonas* spp., *Mucor hiemalis*, *Trichoderma asperellum*

## STUDY OF 4-AMINOPYRAZOLES INFLUENCE ON THE GROWTH OF PATHOGENS

**Lyubyashkin A.V., Efimov V.V., Bondar P.N., Alaudinova E.V., Suboch G.A., Tovbis M.S.***Reshetnev Siberian State Aerospace University, Krasnoyarsk, e-mail: lubyashkin@mail.ru*

Long-term use of antibacterial and antifungal drugs for treatment plants leads to adaptation of pathogens to such preparates. This problem cannot be solved without the synthesis of new previously unknown compounds and study of their biological activity. Therefore, the search for new methods of organic compounds synthesis and preparation of substances which have not yet been synthesized neither in our country no abroad and the proof of their structure and the study of properties including biological activity is an urgent task. A series of heteroaromatic compounds exhibiting antibacterial activity are known. These include various derivatives of substituted pyrazoles and aminopyrazolones. All of these compounds have a fairly wide spectrum of biological activities. In this paper we present data on the synthesis of previously unknown 3-alkoxymethyl-4-amino pyrazoles with phenyl and 2-naphthyl substituents. Reduction of relevant 4-nitrosopyrazoles containing aromatic substituents by hydrazine-hydrate in dichloromethane on the catalyst Pd \ C 0,7% was allowed to allocate aminopyrazoles. Individuality of synthesized compounds is confirmed by thin layer chromatography. The structure of synthesized compounds was proved by modern physical methods. It was also studied the influence of obtained aminopyrazoles for bacterial culture of *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp, *Staphylococcus aureus* MSSA, *Staphylococcus aureus* MRSA and on the growth of fungi of the genus *Trichoderma asperellum* and *Mucor hiemalis*. Bactericidal activity of 4-aminopyrazole towards test *E. coli* culture at a concentration 10 mg/ml was established. In relation to the test culture *Pseudomonas* spp 3-alkoxymethyl-4-amino-pyrazoles demonstrate bacteriostatic activity at a concentration of 0,54–35 mg/ml. The growth of bacterial cultures of *S. aureus* MSSA and *S. aureus* MRSA 4-aminopyrazoles with aryl substituents has no effect. At the same time, 4-aminopyrazoles inhibit the growth of fungi of the genus *Mucor hiemalis*, but do not effect the growth of fungi of the genus *Trichoderma asperellum*.

**Keywords:** plant protection, ethoxymethylpyrazole, 4-aminopyrazole, biological activity, antibacterial drugs, antifungal drugs, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* MSSA, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Pseudomonas* spp., *Mucor hiemalis*, *Trichoderma asperellum*

В лесах Красноярского края сосредоточены продуктивные насаждения хвойных, в том числе и хозяйственноценной породы – сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). В процессе индивидуального развития древесные виды постоянно подвергаются

воздействию абиотических и биотических факторов окружающей среды. Одним из важнейших факторов, определяющих состояние лесов, являются бактериальные и грибковые заболевания, которые могут быть причиной гибели лесных насаждений. Однако основ-

ная проблема связана не столько с поражением многолетних растений, сколько с отпадом семян, в частности хвойных пород, при их выращивании в лесопитомниках, что делает экономически неоправданным получение посадочного материала [5].

Фитопатогенные бактерии и грибы вызывают некрозы и хлорозы хвои, бактериальный ожог хвои и стволиков, сосудистый бактериоз, почернение и усыхание верхушечных почек и оснований хвои и стволиков, образование опухолей у прикорневой шейки, увядание и полегание всходов при поражении корневой системы.

Основным способом защиты семенного и посадочного материала хвойных пород от болезней в лесных питомниках является обработка фунгицидными и бактерицидными препаратами. Одним из отрицательных

*MSSA*, *S. aureus MRSA* и грибов рода *Trichoderma asperellum* и *Mucor hiemalis*, что является не только актуальной научной задачей, но и необходимым условием разработки новых средств защиты растений.

### Цель исследования

Изучение влияния производных 4-аминопиразолов с алкоксиметил и арильными заместителями на рост бактериальных культур – *E. coli*, *Pseudomonas spp.*, *S. aureus MSSA*, *S. aureus MRSA* и грибов рода *Trichoderma asperellum* и *Mucor hiemalis*.

### Материалы и методы исследования

Объектом настоящего исследования стали 4-аминопиразолы, содержащие арильный и метильный или алкоксиметильный заместители. Соединения были синтезированы из нитропиразолов [2] по следующей схеме (рис. 1).

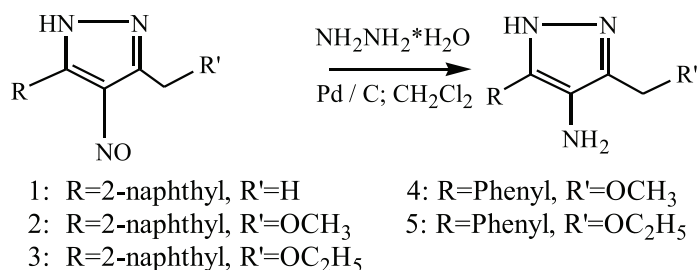


Рис. 1. Схема получения производных 4-аминопиразолов

аспектов этого способа является приспособляемость возбудителей болезней к таким препаратам при многолетнем их применении; кроме этого, в результате мутаций появляются новые, не чувствительные к действующим веществам, но столь же активные виды патогенов. В связи с этим крайне актуальной является задача расширения спектра перспективных малотоксичных фунгицидов и бактерицидов для борьбы с болезнями растений, а также апробация действия новых соединений на широко распространенных в природе возбудителях болезней [4].

В представленной работе приведены данные по синтезу новых 4-амино-3-алкоксиметилпиразолов с фенильным и 2-нафтильным заместителями. Известно, что различные производные аминопиразолов обладают сильным бактерицидным и фунгицидным действием [6, 7]. Это позволяет предполагать наличие бактерицидной и фунгицидной активности и у новых, не синтезированных ранее производных аминопиразолов. Изучено их влияние на рост бактериальных культур – *E. coli* (*Escherichia coli*), *Pseudomonas spp.*, *S. aureus*

Аминопиразолы получали восстановлением нитропиразолов гидразингидратом на катализаторе палладия на угле концентрацией 0,7% в дихлорметане. В результате выделяли белые кристаллические вещества, растворимые в этиловом спирте, диметилсульфоксиде и нерастворимые в воде.

Ход реакций и чистоту соединений контролировали методами тонкослойной хроматографии на пластинках Sorbfil марки ПТСХ-АФ-В (Россия) в системе «этилацетат-толуол» (1:3); пятна детектировали в ультрафиолетовом свете. Строение всех синтезированных соединений было доказано современными физико-химическими методами анализа [1, 3].

Исследования антибактериальной активности на тест-культурах *E. coli*, штамм ATCC 25822, чувствительный к антибиотикам, *S. aureus MSSA* (*Staphylococcus aureus*, штамм 209 P, чувствительный золотистый стафилококк) и *Staphylococcus aureus MRSA* (Метициллин – резистентный стафилококк) для соединений 1–5 (см. рис. 1) проводились в лаборатории на кафедре микробиологии (Красноярский государственный медицинский университет им. профессора Войно-Ясенецкого) методом серийных разведений. Двукратное разведение соединений в объеме 1 мл готовили на дистиллированной воде. В каждую пробирку с растворенным 4-аминопиразолом вносили по 0,1 мл взвеси испытуемых тест-культур, приготовленных из 18-часовых агаровых культур по стандарту мутности 0,5 макфарланда. Пробирки инкубировали при 37°C. Высев производили через 24 часа на сектора

штрихом в чашки с мясопептонным агаром. Учет результатов производили по наличию и характеру роста культур на питательной среде. Концентрация 4-аминопиразолов составляла 10–12 мг/мл ( $5 \cdot 10^{-2}$  моль/л).

Определение антибактериальной активности на тест-культуре *Pseudomonas spp.* для 3-метил-4-амино-5-(2-нафтил)-1-Н-пиразола проводили в микробиологической лаборатории кафедры химической технологии древесины и биотехнологии (Сибирский государственный аэрокосмический университет им. академика М.Ф. Решетнева). Двукратное разведение соединений в объеме 4 мл готовили в диметилформамиде (ДМФА) и дистиллированной воде. В каждую пробирку с растворенным 4-аминопиразолом вносили по 0,1 мл взвеси испытуемой тест-культуры, приготовленной из 18-часовых агаровых культур по стандарту мутности 0,5 макфарланда. Пробирки инкубировали при 33 °С в течение 24 часов. Концентрация изучаемого 4-аминопиразола составляла 35 мг/мл ( $16 \cdot 10^{-2}$  моль/л).

Исследование антифунгальной активности соединений 1–5 проводили на грибах рода *Trichoderma asperellum* и *Mucor hiemalis* методом лунок в лаборатории микробиологии кафедры химической технологии древесины и биотехнологии (Сибирский государственный аэрокосмический университет им. академика М.Ф. Решетнева). В стерильные чашки Петри разливалась стерильная питательная среда «сусло-агар». После застывания на твердую агаровую пластинку делался посев тест-организма газоном. Чашки подсушивались в термостате при 37 °С в течение 15–20 минут. Далее в толще агаровой пластинки стерильным пробочным сверлом диаметром 10 мм делались лунки, вырезая агаровые блоки и удаляя из чашки с помощью стерильного скальпеля. В лунки пипеткой вносились различные концентрации раствора (7–150 мг/мл) аминопиразолов в диметилсульфоксиде (ДМСО) в количестве 0,2 мл. В качестве контроля использовался чистый ДМСО. Посевы инкубировали в термостате при температуре 30 °С в течение 7 суток с тремя повторениями. Степень антибиотической активности учитывали по диаметру зоны подавления роста тест-культуры в мм.

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования влияния новых производных 4-аминопиразолов на рост бактерий приведены в табл. 1.

Было установлено, что синтезированные соединения 1–5 обладают выраженным бактерицидным действием по отношению к тест-культуре *E. coli*, полностью подавляя её рост в пробирках с растворенным аминопиразолом. Высев тестируемых образцов из пробирок на питательную среду также подтвердил отсутствие роста тест-культуры.

При изучении влияния 3-этоксиметил-4-амино-5-(2-нафтил)-1-Н-пиразола (соединение 3) и 3-этоксиметил-4-амино-5-фенил-1-Н-пиразола (соединение 5) на рост тест-культуры *Pseudomonas spp.* выявлено, что через 24 ч инкубирования рост бактерий в пробирках с растворенным пиразолом концентрацией 0,54 мг/мл и выше ви-

зуально не наблюдался. С целью выяснения наличия бактерицидного действия синтезированных пиразолов из пробирок, содержащих исследуемое вещество с концентрациями более 0,54 мг/мл (от 0,54 до 35 мг/мл) производили высев на сектора штрихом в чашки с мясопептонным агаром. Результаты учитывали по наличию и характеру роста культур. Как показал эксперимент, при всех используемых концентрациях в чашках наблюдался рост тест-культуры. Следовательно, 3-этоксиметил-4-аминопиразолы с 2-нафтильным и фенильным заместителями в отношении тест-культуры *Pseudomonas spp.* обладает только бактериостатическим действием.

Влияние 4-аминопиразолов с арильными и алкоксиметильными заместителями (соединения 1–5) на рост бактериальных культур *S. aureus* MSSA и *S. aureus* MRSA обнаружено не было.

Результаты эксперимента на антифунгальную активность 3-метил-4-амино-5-(2-нафтил)-1-Н-пиразола (соединение 1) и 3-этоксиметил-4-амино-5-(2-нафтил)-1-Н-пиразола (соединения 3) показали, что грибы рода *Trichoderma asperellum* резистентны к данным соединениям, поскольку зоны подавления роста гриба в чашках отсутствовали (рис. 2).



Рис. 2. Влияние аминопиразолов 1, 3 на рост грибов рода *Trichoderma asperellum*

В свою очередь, все новые 4-аминопиразолы в различных концентрациях оказали ярко выраженное ингибирующее действие на рост грибов рода *Mucor hiemalis* (рис. 3). Данные по исследованию антифунгальной активности синтезированных аминопиразолов сведены в табл. 2.

Таблица 1

Влияние 4-аминопиразолов на рост бактерий

| Соединение | R         | R'  | Концентрация, мг/мл | E. coli | S. aureus MSSA | S. aureus MRSA | Pseudomonas spp |
|------------|-----------|-----|---------------------|---------|----------------|----------------|-----------------|
| 1          | 2-naphtyl | Me  | 40                  | +       | —              | —              |                 |
|            |           |     | 20                  | +       | —              | —              |                 |
|            |           |     | 10                  | +       | —              | —              |                 |
| 2          | 2-naphtyl | OMe | 40                  | +       | —              | —              |                 |
|            |           |     | 20                  | +       | —              | —              |                 |
|            |           |     | 10                  | +       | —              | —              |                 |
| 3          | 2-naphtyl | OEt | 40                  | +       | —              | —              | +/-             |
|            |           |     | 20                  | +       | —              | —              | +/-             |
|            |           |     | 10                  | +       | —              | —              | +/-             |
|            |           |     | 0.5                 |         |                |                | +/-             |
| 4          | Ph        | OMe | 40                  | +       | —              | —              |                 |
|            |           |     | 20                  | +       | —              | —              |                 |
|            |           |     | 10                  | +       | —              | —              |                 |
| 5          | Ph        | OEt | 40                  | +       | —              | —              | +/-             |
|            |           |     | 20                  | +       | —              | —              | +/-             |
|            |           |     | 10                  | +       | —              | —              | +/-             |
|            |           |     | 0,5                 |         |                |                | +/-             |

Таблица 2

Влияние 4-аминопиразолов на рост грибов

| Соединение | R         | R'  | Концентрация, мг/мл | Подавление роста <i>Mucor hiemalis</i> , % | Подавление роста <i>Trichoderma asperellum</i> , % |
|------------|-----------|-----|---------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1          | 2-naphtyl | Me  | 250                 | 51                                         | 0                                                  |
|            |           |     | 125                 | 34                                         | 0                                                  |
|            |           |     | 62                  | 32                                         |                                                    |
|            |           |     | 31                  | 23                                         | 0                                                  |
| 2          | 2-naphtyl | OMe | 30                  | 85                                         |                                                    |
|            |           |     | 15                  | 66                                         |                                                    |
|            |           |     | 7                   | 60                                         |                                                    |
| 3          | 2-naphtyl | OEt | 30                  | 88                                         | 0                                                  |
|            |           |     | 15                  | 71                                         | 0                                                  |
|            |           |     | 7                   | 64                                         | 0                                                  |
| 4          | Ph        | OMe | 80                  | 65                                         |                                                    |
|            |           |     | 40                  | 50                                         |                                                    |
|            |           |     | 20                  | 42                                         |                                                    |
| 5          | Ph        | OEt | 80                  | 100                                        |                                                    |
|            |           |     | 40                  | 76                                         |                                                    |
|            |           |     | 20                  | 63                                         |                                                    |

### Выводы

В результате проведенных исследований была выявлена отчетливо выраженная бактерицидная активность новых производных 4-аминопиразолов с арильными и алкоксиметильными заместителями по отношению к тест-культуре *Escherichia coli*.

Показано, что по отношению к тест-культуре *Pseudomonas spp* новые производные 4-аминопиразолов в концентрации 0,54 мг/мл и выше обладают лишь бактериостатическим действием, а на рост бактерий *S. aureus MSSA* *S. aureus MRSA* влияния не оказывают.

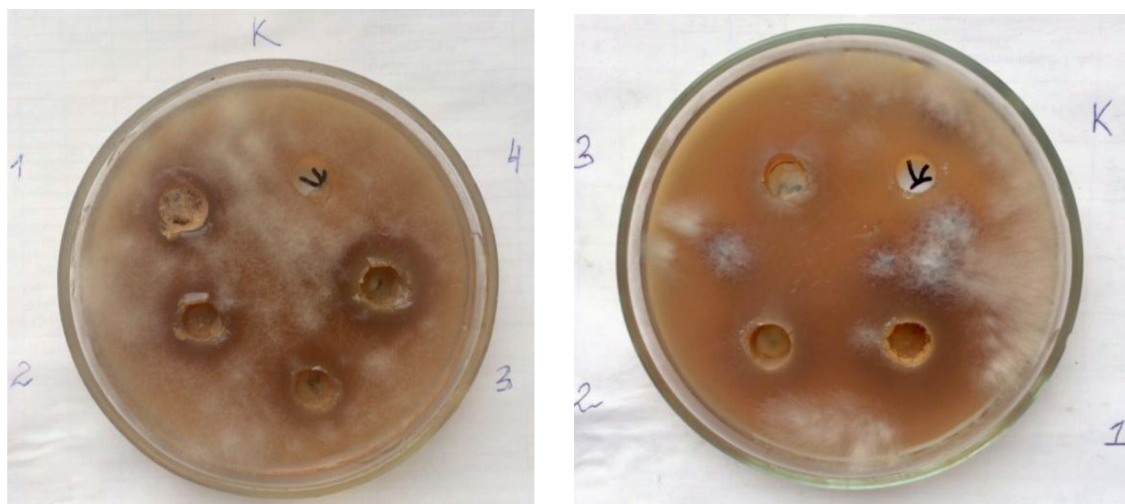


Рис. 3. Влияние аминопиразолов 1 (слева) и 2 (справа) на рост грибов рода *Mucor hiemalis*

Установлено, что все новые синтезированные производные 4-аминопиразолов не оказывают ингибирующего действия на грибы рода *Trichoderma asperellum*, но в то же время подавляют рост грибов рода *Mucor hiemalis*, причем наличие в молекуле алкоксигруппы увеличивает данное биологическое действие.

#### Список литературы

1. Ефимов В.В. Получение 4-амино-3-метил-5-(2-нафтил)-1H-пиразола и его ацильных производных // Вестник Казанского технологического университета. – 2016. – Т. 19, № 15. – С. 15–16.
2. Любяшкин А.В. Синтез этоксиметилнитропиразолов // ЖОрХ. – 2015. – Т. 51, № 4. – С. 607–608.
3. Любяшкин А.В. Синтез новых алкоксиметилзамещенных 4-амино-1H-пиразолов и их ацилирование // ЖОрХ. – 2016. – Т. 52, Вып. 10. – С. 1531–1532.
4. Панина Н.Б. Применение комплекса средств защиты растений для профилактики грибных болезней посадочного материала хвойных пород в лесных питомниках // Актуальные проблемы лесного комплекса. – 2005. – № 10. – С. 119–121.
5. Погорельский И.П. Фитопатогенные псевдомонады как этиологический агент бактериозов семян хвойных: выделение и характеристика биологических свойств // Современные проблемы природопользования, охотоведения и звероводства. – 2007. – № 1. – С. 344–345.
6. Alka Chauhan. Pyrazole: A Versatile Moiety // International Journal of ChemTechResearch. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 11–17.
7. Bondock S. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazole, thiophene and pyrazole derivatives containing benzothiazole moiety // Eur. J. Med. Chem. – 2010. – № 10. – P. 3692–3701.