

Антибактериальная и антибиоплёночная активность N-арилпроизводных бензимидазола, бензотриазола и их гибридов

*Р. С. БЕГУНОВ, Д. О. ЕГОРОВ, А. В. ЧЕТВЕРТАКОВА, А. И. ХЛОПОТИНИН,
Л. И. САВИНА, В. А. ВИНОГРАДОВА, А. А. ЗУБИШИНА

Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова, Ярославль, Россия

Резюме

Актуальность. Рост числа штаммов бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, вызывающих трудно излечимые инфекционные заболевания, стал одной из серьёзных проблем XXI века. Поэтому в настоящее время существует острая потребность в новых препаратах, действующих против резистентных микроорганизмов. **Цель.** Сравнение способности ингибировать рост и образование биоплёнок грамположительных *Bacillus subtilis* и грамотрицательных *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* бактерий соединениями, содержащими один или два фармакофорных полиазетероцикла. **Методы.** Антибактериальную активность полиазетероциклов оценивали методом серийных разведений в концентрации 31,25–1000 мкг/мл в отношении планктонных форм и биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* AB1157, *Bacillus subtilis* BKM B-407. Минимальная подавляющая концентрация (МПК₅₀) была определена как концентрация тестируемого соединения, подавляющая рост бактерий после 24 ч инкубации на 50 %. В качестве тестируемых соединений использовали производные трифторметилбензола, содержащие бензимидазольный и/или бензотриазольный циклы. **Результаты.** Изучена антибактериальная и антибиоплёночная активность N-арилпроизводных бензимидазола, бензотриазола и гибридов на их основе. Соединения, содержащие бензимидазольный цикл, обладали большим антибактериальным эффектом по сравнению с аналогами с бензотриазольным фрагментом. Новые гибридные материалы способны ингибировать факторы патогенности бактерий, такие как способность образования биоплёнок (биоплёнокообразование). Наличие метильного и трифторметильного заместителя во втором положении бензимидазола усиливало антибиоплёночную активность гибридной молекулы. **Заключение.** Наличие в соединении бензимидазольного цикла является обязательным условием проявления высокой антимикробной активности. Наблюдался синергизм действия двух азетероциклов — бензимидазольного и бензотриазольного в гибридном соединении на биоплёнокообразование бактерий, являющееся важной детерминантой вирулентности. Полученные гибридные вещества являются перспективными соединениями для разработки новых антибактериальных препаратов в отношении резистентных бактерий.

Ключевые слова: бензимидазол; бензотриазол; линкер; фармакофор; гибрид; антибактериальная и антибиоплёночная активность; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* AB1157, *Bacillus subtilis* BKM B-407

Для цитирования: Бегунов Р. С., Егоров Д. О., Четвертакова А. В., Хлопотинин А. И., Савина Л. И., Виноградова В. А., Зубишина А. А. Антибактериальная и антибиоплёночная активность N-арилпроизводных бензимидазола, бензотриазола и их гибридов. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (1–2): 15–22. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-1-2-15-22>.

Antibacterial and Antibiofilm Activity of N-Aryl Derivatives of Benzimidazole, Benzotriazole and Their Hybrids

*ROMAN S. BEGUNOV, DMITRIY O. EGOROV, ANNA V. CHETVERTAKOVA,
ALEKSANDR I. CHLOPOTININ, LUIZA I. SAVINA,
VERONIKA A. VINOGRADOVA, ALLA A. ZUBISHINA

P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia

Abstract

Background. The growing number of multidrug-resistant bacterial strains causing intractable infectious diseases has become one of the serious problems of the 21st century. Therefore, new drugs that act against resistant microorganisms are urgently needed. **The aim of the study.** Comparison of the ability to inhibit the growth and formation of biofilms of Gram-positive *Bacillus subtilis* and Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* bacteria with compounds containing one or two pharmacophore polyazaheterocycles. **Material and methods.** The antibacterial activity of polyazaheterocycles was evaluated by serial dilution at a concentration of 31.25–1000 µg/ml against planktonic forms and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* AB1157, and *Bacillus subtilis* BKM B-407. The minimum inhibitory concentration (MIC₅₀) was defined as the concentration of the test compound that suppresses bacterial growth by 50% after 24 hours of incubation. Trifluoromethylbenzene derivatives containing benzimidazole and/or benzotriazole cycles were used as test compounds. **Results.** The antibacterial and antibiofilm activity of N-aryl derivatives of benzimidazole, benzotriazole and hybrids based on them were studied. Compounds containing the benzimidazole cycle had a greater antibacterial effect compared to ana-

*Адрес для корреспонденции: ул. Советская, д. 14, ЯГУ им. П. Г. Демидова, г. Ярославль, Россия, 150003. E-mail: begunov@bio.uniyar.ac.ru



EDN: EETRYB

*Correspondence to: 14 Sovetskaya st., P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, 150003 Russia. E-mail: begunov@bio.uniyar.ac.ru



logues with a benzotriazole fragment. New hybrid materials are capable of inhibiting bacterial pathogenicity factors, such as the ability to form biofilms. The presence of a methyl and trifluoromethyl substituent in the second position of benzimidazole enhanced the antibiofilm activity of the hybrid molecule. **Conclusion.** The presence of a benzimidazole cycle in the compound is a prerequisite for the manifestation of high antimicrobial activity. The synergism of the action of two azaheterocycles — benzimidazole and benzotriazole — in a hybrid compound on bacterial biofilm formation, which is an important virulence determinant, was observed. The resulting hybrid substances are promising compounds for the development of new antibacterial drugs against resistant bacteria.

Keywords: benzimidazole; benzotriazole; linker; pharmacophore; hybrid; antibacterial and antibiofilm activity; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* AB1157, *Bacillus subtilis* BKM B-407

For citation: Begunov R. S., Egorov D. O., Chetvertakova A. V., Khlopotin A. I., Savina L. I., Vinogradova V. A., Zubishina A. A. Antibacterial and antibiofilm activity of N-aryl derivatives of benzimidazole, benzotriazole and their hybrids. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (1–2): 15–22. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-1-2-15-22>.

Введение

Бактериальные инфекции представляют серьёзную угрозу для жизни и здоровья населения. Это связано с быстрым формированием у бактерий устойчивости к существующим антибиотикам [1–4]. Другой проблемой, связанной с лечением инфекционных заболеваний, является способность микроорганизмов образовывать биоплёнку [5]. Бактериальная биоплёнка блокирует работу антибиотиков, приводит к высокой заболеваемости и смертности в медицинских учреждениях, наносит значительный экономический ущерб [6, 7]. В настоящее время известно небольшое количество антибиотиков проявляющих антибиоплёночную активность. Поэтому поиск новых веществ, способных уничтожать микроорганизмы, устойчивые к традиционным антибиотикам, а также клетки в биоплёнках, является актуальной задачей медицинской и фармацевтической химии.

В настоящее время перспективной стратегией создания эффективных лекарственных препаратов, в том числе антимикробных, является разработка гибридных молекул, содержащих несколько различных фармакофорных фрагментов [8–11]. Как правило, это азотсодержащие гетероциклы. Это связано с тем, что подобные соединения проявляют сильную антимикробную активность в отношении широкого ряда бактерий [12–14]. Особое место среди них занимают производные бензимидазола [15–19]. Этот гетероцикл входит в топ 10 наиболее часто встречаемых в структуре биологически активных веществ фармакофоров [20]. Отмечается огромный антимикробный потенциал соединений, содержащих бензимидазольный фрагмент [21, 22]. Другим перспективным фармакофором является бензотриазольный цикл [8, 23]. В недавних исследованиях было обнаружено, что бензимидазолы и триазолы способны воздействовать на факторы вирулентности, не угнетая роста бактерий. В частности, эти соединения блокировали Quorum Sensing систему и препятствовали процессу биоплёнокообразования [24–29]. Поэтому можно ожидать, что гибридное вещество, содержащее фармакофорные бензимидазольный и

бензотриазольный циклы, будет проявлять антимикробную и антибиоплёночную активность.

Биологическую активность соединений оценивали *in vitro* в отношении бактерий *Bacillus subtilis* BKM B-407, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* AB1157.

B. subtilis BKM B-407 — вид грамположительных спорообразующих факультативно аэробных почвенных бактерий. Является постоянным членом микробиоценозов почвы, кишечника животных и человека, встречается в воде и в воздухе. Штамм получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов и служит стандартным объектом для лабораторных исследований. *B. subtilis* непатогенная бактерия, которая широко используется в сельскохозяйственной, пищевой, фармацевтической и медицинской промышленности [30]. Однако появляется информация о патогенности отдельных штаммов. Обнаружены резистентные штаммы по отношению к различным группам антибиотиков вплоть до 4-го поколения [31, 32].

Pseudomonas aeruginosa относится к числу наиболее вирулентных условно-патогенных микроорганизмов и является ведущей причиной таких нозокомиальных инфекционных заболеваний, как муковисцидоз, пневмония, синусит, артрит [33, 34]. Помимо этого, *P. aeruginosa* формирует мощную биоплёнку, значительно затрудняющую процесс антибиотикотерапии [35]. Проблему осложняет и то, что *P. aeruginosa* обладает множеством механизмов устойчивости к антибиотикам, такими как система эффлюкса, высокая генетическая пластичность, наличие персистентных клеток и др. [36]. Таким образом, бактерия обладает широким набором факторов вирулентности, которые позволяют ей вызывать острые инфекции, и метаболической универсальностью, способствующей постоянной персистенции в организме эндотермных животных [37]. В качестве объекта исследования был выбран штамм *P. aeruginosa* PAO1, принятый во всём мире в качестве прототипа штамма *P. aeruginosa* для лабораторных исследований [38].

Escherichia coli — грамотрицательная факультативно-анаэробная бактерия. Считается идеальным модельным организмом для различных ис-

следований в области биологической инженерии и промышленной микробиологии [39]. Большинство штаммов *E. coli* обнаружены в кишечнике теплокровных организмов и относятся к нормофлоре. Однако существуют патогенные штаммы *E. coli*, способные вызывать опасные для жизни бактериемии [40]. *E. coli* является наиболее частым патогеном, вызывающим инфекции кровотока человека [41, 42]. Помимо этого некоторые штаммы *E. coli* обладают различными факторами вирулентности, включая токсины, сидерофоры, полисахаридные капсулы и адгезины [43]. В дополнение к этому *E. coli* образует биоплёнку, которая, с одной стороны, значительно затрудняет антибиотикотерапию и элиминацию бактерии в организме человека, а с другой — является фактором вирулентности, способным вызвать мощный иммунный ответ [44, 45]. В данном исследовании использовался штамм *E. coli* AB1157, который не является патогенным для человека, но как модельный организм может применяться для изучения действия различных веществ, в том числе антибиотиков [46].

В связи с вышеизложенным были проведены исследования по изучению перспективности применения новых гибридных материалов для разработки новых антибиотиков.

Цель работы — сравнение способности ингибировать рост и образование биоплёнок грамположительных *Bacillus subtilis* и грамотрицательных *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* бактерий соединениями, содержащими один или два разных фармакофорных полиазагетероцикла.

Материал и методы

Бензимидазол и его производные. Для исследований использовались N-арилпроизводные бензимидазола (1, 3) и бензотриазола (2, 4-6), а также гибриды 7-9, содержащие бензотриазольный и бензимидазольный циклы (рис. 1).

В качестве линкера для формирования гибридного материала использовали 2-нитро-4-(трифторметил)хлорбензол (см. рис. 1). Наличие трифторметильной группы в молекуле способствует увеличению биологической активности веществ [47], в том числе усиливая их липофильность [48].

Синтез соединений 1, 2 проводили в ходе реакции S_NAr 2-нитро-4-(трифторметил)хлорбензола с бензимидазолом (получение 1) или бензотриазолом (получение 2). Восстановление нитропроизводных 1 и 2 до аминосоеди-

нений 3 и 4 осуществляли в кислом водно-спиртовом растворе хлоридом олова (II). Бензотриазольное производное *орто*-нитродифениламина 5 получали при взаимодействии аминосоединения 4 с 2-нитро-4-(трифторметил)хлорбензолом. Синтез *орто*-фенилендиамин 6 проводили в условиях аналогичных восстановлению веществ 1 и 2. Формирование бензимидазольного цикла осуществляли в ходе реакции межмолекулярной гетероциклизации кипячением *орто*-фенилендиамин 6 в муравьиной (получение гибрида 7), уксусной в присутствии HCl (получение 8) и трифторуксусной (получение 9) кислотах.

Штаммы и условия культивирования. Скрининг соединений 1-9 на биологическую активность *in vitro* проводили в отношении бактерий *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* AB1157 и *B. subtilis* BKM B-407. Штаммы выращивали на жидкой среде LB по

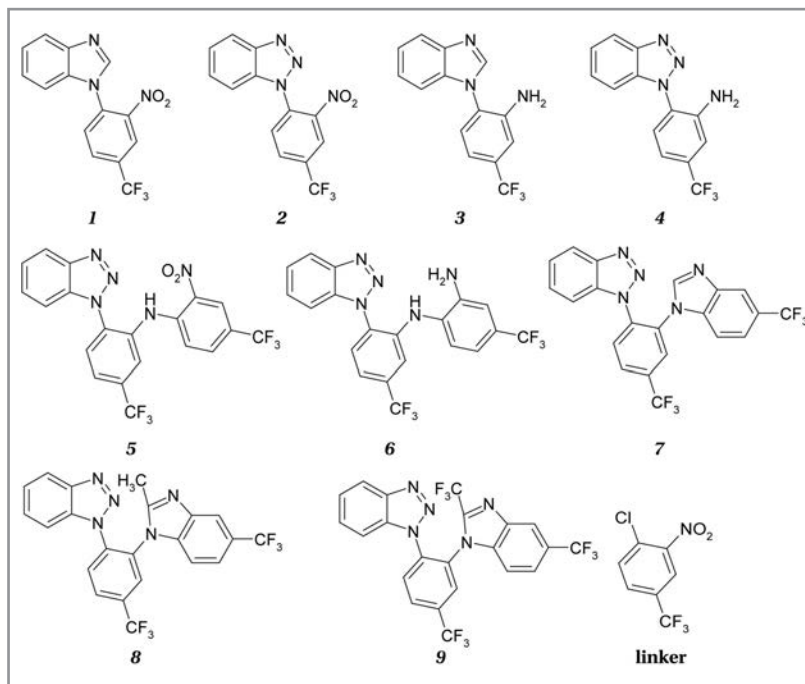


Рис. 1. Структура и систематические названия N-арилпроизводных бензимидазола, бензотриазола и гибридов на их основе, используемых в исследованиях

Примечание. 1 — 1-[2-нитро-(4-трифторметил)фенил]-1H-бензимидазол; 2 — 1-[2-нитро-(4-трифторметил)фенил]-1H-бензотриазол; 3 — 1-[2-амино-(4-трифторметил)фенил]-1H-бензимидазол; 4 — 1-[2-амино-(4-трифторметил)фенил]-1H-бензотриазол; 5 — 1-[2-[2-нитро-4-(трифторметил)анилино]-4-(трифторметил)фенил]-1H-бензотриазол; 6 — 1-[2-[2-амино-4-(трифторметил)анилино]-4-(трифторметил)фенил]-1H-бензотриазол; 7 — 1-[4-(трифторметил)-2-[5-(трифторметил)-1H-бензимидазол-1-ил]фенил]-1H-бензотриазол; 8 — 1-[4-(трифторметил)-2-[2-метил-5-(трифторметил)-1H-бензимидазол-1-ил]фенил]-1H-бензотриазол; 9 — 1-[4-(трифторметил)-2-[2-(трифторметил)-5-(трифторметил)-1H-бензимидазол-1-ил]фенил]-1H-бензотриазол.

Fig. 1. Structure and systematic names of N-aryl derivatives of benzimidazole, benzotriazole and hybrids based on them used in research.

Note. 1 — 1-[2-nitro-(4-trifluoromethyl)phenyl]-1H-benzimidazole; 2 — 1-[2-nitro-(4-trifluoromethyl)phenyl]-1H-benzotriazole; 3 — 1-[2-amino-(4-trifluoromethyl)phenyl]-1H-benzimidazole; 4 — 1-[2-amino-(4-trifluoromethyl)phenyl]-1H-benzotriazole; 5 — 1-[2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)anilino]-4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-benzotriazole; 6 — 1-[2-[2-amino-4-(trifluoromethyl)anilino]-4-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-benzotriazole; 7 — 1-[4-(trifluoromethyl)-2-[5-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazol-1-yl]phenyl]-1H-benzotriazole; 8 — 1-[4-(trifluoromethyl)-2-[2-methyl-5-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazol-1-yl]phenyl]-1H-benzotriazole; 9 — 1-[4-(trifluoromethyl)-2-[2-(trifluoromethyl)-5-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazol-1-yl]phenyl]-1H-benzotriazole.

Таблица 1. Значения МПК₅₀ (мкг/мл) исследуемых веществ 1–9 (антибактериальная активность)
Table 1. MIC₅₀ values (μg/ml) of the test substances 1–9 (antibacterial activity).

Соединение	<i>B. subtilis</i> ВКМ В-407	<i>E. coli</i> AB1157	<i>P. aeruginosa</i> PAO1
1	31,25	31,25	500
2	250	31,25	125
3	500	31,25	31,25
4	1000	—	500
5	250	500	1000
6	—	—	—
7	31,25	31,25	500
8	31,25	31,25	125
9	31,25	31,25	125

Miller («ДиаМ», Россия). *E. coli* AB1157 культивировали при 37°C, *P. aeruginosa* PAO1 и *B. subtilis* ВКМ В-407 — при 28°C.

Исследование антибактериальной активности. Антибактериальную активность производных бензимидазола и бензотриазола и их гибридов оценивали с использованием метода серийных разведений [49] в отношении планктонных форм *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* AB1157, *Bacillus subtilis* ВКМ В-407. Тестирование проводили в стерильных 96-луночных планшетах для иммунологических исследований в объёме 200 мкл при конечной концентрации микроорганизма примерно 10⁶ КОЕ/мл. Исследуемые соединения растворяли в ДМСО, конечная концентрация которого в среде не превышала 10%. Минимальная подавляющая концентрация (МПК₅₀) была определена как концентрация тестируемого соединения, полностью подавляющая рост бактерий после 24 ч инкубации на 50% [50].

Определение плотности бактериальной суспензии производили с использованием планшетного фотометра Microplate Reader Model 2550 (Bio-Rad, США) путём измерения оптической плотности при длине волны 595 нм.

Эксперименты проводились в 5-кратной повторности для каждого разведения потенциального антибактериального препарата. Все эксперименты проводились в 3 повторностях. В контроле была использована суспензия бактерии в той же концентрации, что и для эксперимента, без добавления изучаемого вещества. При расчётах была сделана поправка на оптическую плотность среды и исследуемых соединений.

Исследование антибиоплёночной активности. Свежую культуру *B. subtilis* ВКМ В-407, *E. coli* AB1157 и *P. aeruginosa* PAO1 высевали в среду LB и инкубировали при аэрации в течение 24 ч. *E. coli* AB1157 культивировали при температуре 37°C, *P. aeruginosa* PAO1 и *B. subtilis* ВКМ В-407 выращивали при 28°C. Затем исследуемые штаммы бактерий разбавляли в 300 раз в среде LB. Для измерения уровня образования биоплёнок культуры выращивали в 96-луночных планшетах с добавлением исследуемых соединений (не более 10% от общего объёма) при постоянном перемешивании в шейкере-инкубаторе BiosanES-20 при температуре 37°C для *E. coli* AB1157 и 28°C — для *P. aeruginosa* PAO1 и *B. subtilis* ВКМ В-407. Временной отрезок в 24 ч является оптимальным для формирования биоплёнки; после этого периода уровень их образования не изменялся. Количественные показатели формирования биоплёнок оценивали после удаления среды, трёхкратной промывки ячеек водой и окрашивания прикреплённых клеток красителем «кристаллический фиолетовый» (в течение 40 мин). После окрашивания жидкость удаляли, ячейки три раза промывали дистиллированной водой. Краситель из биоплёнок экстрагировали 96% этанолом (в течение 40 мин), оптическую плотность раствора измеряли при 595 нм. Для измерения использовали Microplate Reader Model 2550 (Bio-Rad, США).

Влияние исследуемых веществ на биоплёнки оценивалось в пятикратной повторности. В качестве контроля принималась культура без добавления исследуемых соединений. При оценке учитывалась поправка на оптическую плотность исследуемых соединений.

Математическая обработка данных. Статистическая обработка полученных в ходе эксперимента данных включала вычисление описательных статистик. Средние значения указаны со стандартными ошибками. Математическая обработка данных осуществлена с помощью программы Microsoft Office Excel (Microsoft Corp., США).

Результаты и обсуждение

Антимикробную активность соединений 1–9 изучали по отношению к двум грамотрицательным (*E. coli* AB1157, *P. aeruginosa* PAO1) и одной грамположительной бактериям (*B. subtilis* ВКМ В-407). Наибольший антибактериальный эффект, определяемый по МПК₅₀, проявили производные бензимидазола 1, 3 и бензотриазола 2, а также гибридные соединения 7, 8, 9. Наименьшую активность демонстрировали производные бензотриазола 4, 5, 6 (табл. 1).

В отношении грамположительной *Bacillus subtilis* ВКМ В-407 более эффективными (МПК₅₀ 31,25 мкг/мл) были нитропроизводное бензимидазола (1) и гибридные соединения (7, 8, 9) (рис. 2). Остальные соединения обладали низкой или умеренной активностью.

Из всех использованных бактерий грамотрицательная *E. coli* AB1157 оказалась наименее устойчивой к исследуемой группе производных бензимидазола и бензотриазола. По отношению к ней все вещества, кроме 6, оказали достаточно сильное ингибирующее действие. Значение МПК₅₀ 31,25 мкг/л имели соединения 1, 2, 3 и 7, 8, 9 (рис. 3).

Большей устойчивостью к действию исследуемых соединений обладала *P. aeruginosa* PAO1. Данные вещества оказывали ингибирующий эффект при действии средних и высоких доз. Только для аминопроизводного бензимидазола 3 значение МПК₅₀ составило 31,25 мкг/мл (рис. 4). Производные триазола 4, 5, 6 обнаружили стимулирующий эффект на планктонную форму бактерии в концентрациях от 250 мкг/мл и ниже.

Таким образом, наиболее чувствительными к действию исследуемых соединений оказались штаммы *B. subtilis* ВКМ В-407 и *E. coli* AB1157. *P. aeruginosa* PAO1 обладала значительно большей устойчивостью. Это хорошо согласуется с дан-

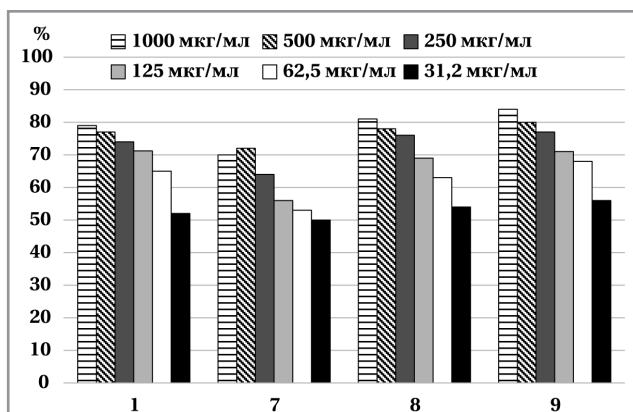


Рис. 2. Влияние различных концентраций веществ 1, 7, 8, 9 на рост бактерии *B. subtilis* BKM B-407.

Примечание. Здесь и далее на рисунках показано подавление роста бактерий в процентах относительно положительного контроля.

Fig. 2. The effect of various concentrations of test substances 1, 7, 8, 9 on the growth of the bacterium *B. subtilis* BKM B-407.

Note. Here and below, the figures show the suppression of bacterial growth as a percentage relative to the positive control.

ными литературы. Известно, что *P. aeruginosa* обладает низкой восприимчивостью к антибиотикам, и, вследствие этого, множественной лекарственной устойчивостью. Этому способствует первичная резистентность, включающая эффлюксные насосы и низкую проницаемость бактериальных клеточных оболочек [51]. В дополнение к этому у *P. aeruginosa* легко развивается вторичная резистентность, заключающаяся в индуцированных мутациях и горизонтальном переносе генов устойчивости к антибиотикам. Гипермутация способствует отбору устойчивых к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa*, вызывающих хронические инфекции. Кластеризация же нескольких различных генов устойчивости к антибиотикам в интегронах способствует согласованному приобретению детерминант устойчивости к антибиотикам [52].

Рассматривая влияние структуры используемых веществ на антимикробную активность, можно отметить следующее.

Из двух N-арилпроизводных бензимидазола 1 и 2 нитросоединение 1 демонстрировало большую эффективность в отношении *B. subtilis* BKM B-407 и *E. coli* AB1157, тогда как аминокислотное соединение 2 было более активно в отношении обеих грамотрицательных тестируемых культур бактерий.

За исключением нитропроизводного бензотриазола 2, все остальные соединения бензотриазола (4, 5, 6) оказывали слабое антибиотическое действие на микроорганизмы и имели показатели МПК₅₀ в диапазоне 500–1000 мкг/мл. Бензотриазольное производное орто-аминодифениламина 6 обладало самой низкой активностью и не

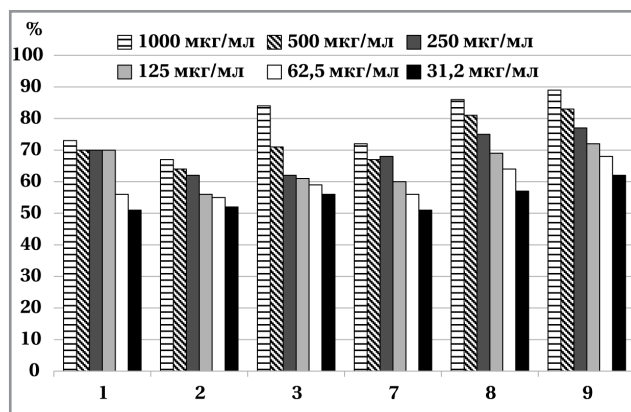


Рис. 3. Влияние различных концентраций веществ 1, 2, 3, 7, 8, 9 на рост бактерии *E. coli* AB1157.

Fig. 3. The effect of various concentrations of test substances 1, 2, 3, 7, 8, 9 on the growth of the bacterium *E. coli* AB1157.

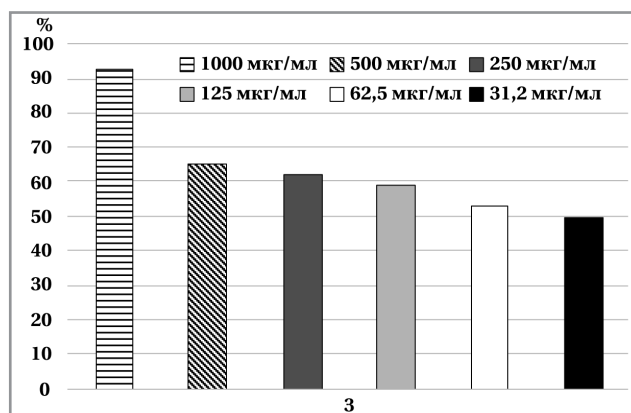


Рис. 4. Влияние различных концентраций вещества 3 на рост бактерии *P. aeruginosa* PAO1.

Fig. 4. The effect of different concentrations of substance number 3 on the growth of the bacterium *P. aeruginosa* PAO1.

вызывало 50% ингибирование тест-объектов даже при концентрации 1000 мкг/мл.

Гибридные соединения 7, 8 и 9, содержащие бензимидазольный и бензотриазольный циклы, достаточно эффективно, аналогично веществу 1, подавляли рост бактерий. Наблюдалось 70–89% ингибирование роста всех бактерий при высоких концентрациях веществ. Значение МПК₅₀ для *B. subtilis* BKM B-407 и *Escherichia coli* AB1157 составило 31,25 мг/мл. Наличие метильного и трифторметильного заместителя во втором положении бензимидазольного цикла соответствующих гибридных соединений 8 и 9 увеличивало антимикробную активность по сравнению с веществом 7.

Таким образом, бензимидазольные производные были более активны в отношении используемых культур бактерий, чем бензотриазольные. Нитросоединения проявляли больший ингибирующий эффект по сравнению с аналогичными аминокислотными производными. Наличие двух азогетероциклов в структуре приводило к синергизму антимикробного действия. Увеличение

Таблица 2. Значения МПК₅₀ (мкг/мл) исследуемых веществ (антибиоплёночная активность)
Table 2. MIC₅₀ values (μg/ml) of the test substances (anti-biofilm activity)

Соединение	<i>B. subtilis</i> BKM B-407	<i>E. coli</i> AB1157 (–)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 (–)
1	—	500	—
2	—	1000	—
3	—	1000	—
4	1000	—	—
5	—	—	1000
6	—	—	—
7	—	500	—
8	1000	250	1000
9	500	125	500

количества атомов фтора в гибридной молекуле усиливало биологическую активность вещества.

Хорошо известно, что биоплёнокообразование является мощным фактором вирулентности бактерий. Поэтому синтезированные соединения 1–9 были исследованы на способность ингибировать образование внеклеточного матрикса используемыми в качестве тест-объектов микроорганизмами. Влияние данных соединений на формирование биоплёнок оказалось существенно ниже, чем на рост и развитие планктонных форм бактерий. Кроме того, при низких концентрациях соединения 4–6 вызывали стимулирующий эффект, проявлявшийся в усилении процесса биоплёнокообразования относительно контроля. Наибольшую антивирулентную активность в отношении биоплёнок исследуемых штаммов бактерий демонстрировали гибридные соединения 8 и 9 (табл. 2). Соединение 6 не обладало биологической активностью как в отношении планктонных клеток бактерий, так и формируемой ими биоплёнки.

Ингибирование способности формировать биоплёнку грамположительной бактерией *B. subtilis* BKM B-407 было обнаружено только у 3 веществ (4, 8, 9). Из них гибрид 9, содержащий наибольшее количество трифторметильных заместителей, показал лучшую эффективность (МПК₅₀ — 500 мкг/мл) (см. табл. 2).

Наиболее выраженный антибиоплёночный эффект исследуемые соединения проявляли в отношении *Escherichia coli* AB1157. В больших концентрациях (500–1000 мкг/мл) способность подавлять образование биоплёнки обнаруживали соединения 1, 2, 3 и 7. Более сильное ингибирование процесса биоплёнокообразования отмечено для гибридов 8 и 9. Содержащий трифторметильную группу во втором положении бензимидазола гибрид 9 имел наименьшее значение МПК₅₀ (125 мкг/мл) (см. табл. 2).

Ингибирующее влияние соединений 1–9 на образование биоплёнки грамотрицательной *P. aeruginosa* PAO1 было таким же незначительным, как и для *Bacillus subtilis* BKM B-407. Как и в отношении других микроорганизмов больший антибиоплёночный эффект проявили гибриды 8, 9, из которых последний был более активным (МПК₅₀ 500 мкг/мл) (см. табл. 2).

Таким образом, новые гибридные материалы, содержащие бензимидазольный и бензотриазольный циклы, демонстрировали высокую антимикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также обладали способностью ингибировать образование биоплёнок используемыми в качестве тест-объектов микроорганизмами. Возможность широкого варьирования структуры гибридной молекулы делает их перспективными кандидатами для разработки на их основе новых эффективных антимикробных препаратов.

Заключение

Исследование антибактериальной активности N-арилпроизводных бензимидазола, бензотриазола и гибридов на их основе показало, что соединения, содержащие бензимидазольный цикл, обладали большим антибактериальным эффектом по сравнению с аналогами с бензотриазольным фрагментом. Наблюдался синергизм действия двух азагетероциклов в гибридном соединении. Новые гибридные материалы способны ингибировать факторы патогенности бактерий, такие как образование биоплёнок. Наличие метильного (соединение 8) и трифторметильного (соединение 9) заместителя во втором положении бензимидазола усиливало антибиоплёночную активность гибридной молекулы. Полученные гибридные вещества являются перспективными соединениями для разработки новых антибактериальных препаратов в отношении резистентных бактерий. В дальнейшем планируется расширение структурного ряда производных 1-[2-(1H-бензимидазол-1-ил)фенил]-1H-бензотриазола и проведение исследований по установлению молекулярных механизмов их антибактериального действия.

Дополнительная информация

Финансирование. Исследование выполнено за счёт средств Программы развития ЯрГУ до 2030 года, проект № GM-2023-1 «Разработка новых гибридных материалов, обладающих высокой противомикробной, анти-Quorum Sensing и антибиоплёночной активностью»

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов. Бегунов Р. С. — разработка концепции исследования, поиск и анализ литературных источников, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи статьи; Егоров Д. О. — проведение микробиологических исследований, поиск литературных источников; Четвертакова А. В. —

синтез производных бензимидазола и бензотриазола, подготовка образцов для проведения микробиологических исследований; Хлопотинин А. И. — синтез гибридных молекул; Савина Л. И. — синтез производных бензимидазола, редактирование рукописи статьи; Виноградова В. А. — синтез производных бензотриазола; Зубишина А. А. — математическая обработка данных, интерпретация данных микробиологического исследования, подготовка рукописи статьи.

Литература/References

1. Durand G.A., Raoult D., Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int J Antimicrob Agents*. 2019; 53 (4): 371–382. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010.
2. Bloom D.E., Cadarette D. Infectious Disease threats in the twenty-first century: strengthening the global response. *Front Immunol*. 2019; 10: doi: 10.3389/fimmu.2019.00549.
3. de Oliveira Santos J.V., da Costa Júnior S.D., de Fátima Ramos dos Santos Medeiros S.M., Cavalcanti I.D.L., de Souza J.B., Coriolano D.L. et al. Panorama of bacterial infections caused by epidemic resistant strains. *Curr Microbiol*. 2022; 79 (6): 175. doi.org/10.1007/s00284-022-02875-9.
4. Тевяшова А.Н., Олсуфьева Е.Н., Преображенская М.Н. Создание антибиотиков двойного действия как путь поиска новых перспективных лекарственных препаратов. *Успехи химии*. 2015; 84 (1): 61–97. doi: https://doi.org/10.1070/RCR4448. [Tevyashova A.N., Olsufyeva E.N., Preobrazhenskaya M.N. Design of dual action antibiotics as an approach to search for new promising drugs. *Russian Chemical Reviews*. 2015; 84 (1): 61–97 doi: https://doi.org/10.1070/RCR4448. (in Russian)]
5. Yin W., Wang Y., Liu L., He J. Biofilms: The microbial «Protective Clothing» in extreme environments. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 12; 20 (14): 3423. doi: 10.3390/ijms20143423.
6. Gupta P., Sarkar S., Das B., Bhattacharjee S., Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention — a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol*. 2016; 198: 1–15. doi: 10.1007/s00203-015-1148-6.
7. Del Pozo J.L. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018; 16 (1): 51–65. doi: 10.1080/14787210.2018.1417036.
8. Tangadanchu V.K.R., Sui Y.F., Zhou C.H. Isatin-derived azoles as new potential antimicrobial agents: Design, synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*. 2021; 41: 128030. doi: 10.1016/j.bmcl.2021.128030.
9. Malasala S., Ahmad M.N., Akunuri R., Shukla M., Kaul G., Dasgupta A. et al. Synthesis and evaluation of new quinazoline-benzimidazole hybrids as potent anti-microbial agents against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Med Chem*. 2021; 212: 112996. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112996. Epub 2020 Nov 6.
10. Karaca Gençer H., Acar Çevik U., Levent S., Sağlık B., Korkut B., Özkay Y. et al. New benzimidazole-1,2,4-triazole hybrid compounds: synthesis, anticandidal activity and cytotoxicity evaluation. *Molecules*. 2017 Mar 27; 22 (4): 507. doi: 10.3390/molecules22040507.
11. Aitha S., Thumma V., Ambala S., Matta R., Panga S., Pochampally J. Bis 1, 2, 3-triazoles linked deoxybenzoin hybrids as antimicrobial agents: synthesis, *in vitro* and *in silico* screening. *ChemistrySelect*. 2023; 8 (13). doi: https://doi.org/10.1002/slct.202300405.
12. Nidhi Jangir, Poonam, Surbhi Dhadda, Dinesh K. Jangid. Recent advances in the synthesis of five- and six-membered heterocycles as bioactive skeleton: A concise overview. *ChemistrySelect*. 2022; 7 (6). doi: https://doi.org/10.1002/slct.202103139.
13. Tarasenko M.V., Sidneva V.V., Belova A.S., Romanycheva A., Sharonova T., Baykov S.V. et al. An efficient synthesis and antimicrobial evaluation of 5-alkenyl- and 5-styryl-1,2,4-oxadiazoles. *Arkivoc*. 2018; 2018 (7): 458–470. doi: https://doi.org/10.24820/ark.5550190.p010.760.
14. Бегунов Р.С., Егоров Д.О., Четвертакова А.В., Савина Л.И., Зубишина А.А. Антибактериальная активность галоген- и нитропроизводных бензимидазола в отношении *Bacillus subtilis*. *Антибиотики и химиотер*. 2023; 68 (3-4): 19–24. doi: https://doi.org/10.1010.37489/0235-2990-2023-68-3-4-19-24. [Begunov R.S., Egorov D.O., Chetvertakova A.V., Savina L.I., Zubishina A.A. Antibacterial activity of the halogen- and nitro derivatives of benzimidazole against *Bacillus subtilis*. *Antibiot Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68 (3–4): 19–24. doi: https://doi.org/10.1010.37489/0235-2990-2023-68-3-4-19-24. (in Russian)]
15. Shah K., Chhabra S., Shrivastava S.K., Mishra P. Benzimidazole: a promising pharmacophore. *Med Chem Res*. 2013; 22 (11): 5077–104. doi: 10.1007/s00044-013-0476-9.
16. Mahurkar N.D., Gawhale N.D., Lokhande M.N., Uke S.J., Kodape M.M. Benzimidazole: A versatile scaffold for drug discovery and beyond — a comprehensive review of synthetic approaches and recent advancements in medicinal chemistry. *Results in Chemistry*. 2023; 6: 101139. doi: https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101139.
17. Champa R., Vishnumurthy K.A., Bodke Y.D., Bhojya Naik H.S., Pushpavathi L., Meghana P. et al. Synthesis, characterization, and biological investigations of potentially bioactive heterocyclic compounds containing benzimidazole nucleus. *Results in Chemistry*. 2023; 6: 101018. doi: https://doi.org/10.1016/j.rechem.2023.101018.
18. Sivakumar R., Pradeepchandran R., Jayaveera K.N., Kumarnallasivan P., Vijayanand P.R., Venkatmarayanan R. Benzimidazole: an attractive pharmacophore in medicinal chemistry. *Int. J. Pharm. Res*. 2011; 3 (3): 19–31. doi: https://doi.org/10.5772/intechopen.101942.
19. Pullagura M Krishna Prasad, Avdhut Kanvinde S., Raja S. Potent biological agent benzimidazole—a review. *J Pharm Pharm Sci*. 2016; 8 (12): 22. doi: 10.22159/ijpps.2016v8i12.14949.
20. Vitaku E., Smith D.T., Njardarson J.T. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals. *J Med Chem*. 2014; 57 (24): 10257–74. doi: 10.1021/jm501100b.
21. Ates-Alagoz Z. Antimicrobial Activities of 1-H-benzimidazole-based molecules. *Curr. Top. Med. Chem*. 2016; 16 (26): 2953–2962. doi: 10.2174/1568026616666160506130226.
22. Bansal Y., Kaur M., Bansal G. Antimicrobial potential of benzimidazole derived molecules. *Mini Rev Med Chem*. 2019; 19 (8): 624–646. doi: 10.2174/1389557517666171101104024.
23. Milošević N.P., Dimova V.B., Perišić-Janjić N.U. RP TLC data in correlation studies with *in silico* pharmacokinetic properties of benzimidazole and benzotriazole derivatives. *Eur J Pharm Sci*. 2013; 49 (1): 10–17. doi: 10.1016/j.ejps.2013.01.018.
24. Czerwonka G., Gmiter D., Guzy A., Rogala P., Jabłońska-Wawrzyńska A., Borkowski A. et al. A benzimidazole-based ruthenium (IV) complex inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by interacting with siderophores and the cell envelope, and inducing oxidative stress. *Biofouling*. 2019; 35 (1): 59–74. doi: 10.1080/08927014.2018.1564818.
25. Sambanthamoorthy K., Gokhale A.A., Lao W., Parashar V., Neiditch M.B., Semmelhack M.F. et al. Identification of a novel benzimidazole that inhibits bacterial biofilm formation in a broad-spectrum manner. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (9): 4369–78. doi: 10.1128/aac.00583-11.
26. Srinivasarao S., Nandikolla A., Nizalapur S., Yu T.T., Pulya S., Ghosh B. et al. Design, synthesis and biological evaluation of 1,2,3-triazole based 2-aminobenzimidazoles as novel inhibitors of LasR dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Advances*. 2019; 9 (50): 29273–92. doi: 10.1039/c9ra05059k.
27. Starkey M., Lepine F., Mauria D., Bandyopadhyaya A., Lesic B., He J. et al. Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. *PLoS pathogens*. 2014; 10 (8). doi: 10.1371/journal.ppat.1004321.
28. Зайцева Ю.В., Егоров Д.О., Бегунов Р.С., Хлопотинин А.И. Антибактериальная и антибиопленочная активность полифункциональных производных бензимидазола. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7 (3): 134–141. doi: https://doi.org/10.29413/ABS.2022-7.3.14. [Zaitseva Yu.V., Egorov D.O., Begunov R.S., Khlopotinin A.I. Antibacterial and antibiofilm activity of polyfunctional benzimidazole derivatives. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7 (3): 134–141. doi: https://doi.org/10.29413/ABS.2022-7.3.14. (in Russian)]
29. Mendogralo E.Y., Nesterova L.Y., Nasibullina E.R., Shcherbakov R.O., Myasnikov D.A., Tkachenko A.G. et al. Synthesis, antimicrobial and antibiofilm activities, and molecular docking investigations of 2-(1H-Indol-3-yl)-1H-benzo[d]imidazole derivatives. *Molecules*. 2023; 28 (20): 7095. doi: 10.3390/molecules28207095.
30. Earl A.M., Losick R., Kolter R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*. 2008; 16 (6): 269–275. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.004.
31. Сизенцов А.Н., Бляжкина Д.К., Галактионова Л.В., Сальникова Е.В. Оценка резистентности штаммов *Bacillus subtilis* в отношении антибактериальных препаратов на примере амоксициллина и цеф-

- риаксона. Аграрная наука. 2022; 1 (7–8): 74–79. doi: <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-361-7-8-74-79>. [Sizentsov A.N., Blyalkina D.K., Galaktionova L.V., Salnikova E.V. Evaluation of resistance of isolated soil strains of *Bacillus subtilis* to antibacterial drugs on the example of amoxicillin and ceftriaxone. Agrarian Science. 2022; 1 (7–8): 74–79. doi: <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-361-7-8-74-79>. (in Russian)]
32. Еникеев Р.Р., Татарникова Н.Ю., Захарчук Л.М. Механизмы устойчивости к клинически значимым антибиотикам штаммов бактерий рода *Bacillus*, выделенных из образцов, доставленных с международной космической станции. Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2020; 75 (4): 265–272. <https://vestnik-bio-msu.elpub.ru/jour/article/view/937>. [Yenikeev R.R., Tatarinova N.Y., Zakharchuk L.M. Mechanisms of resistance to clinically significant antibiotics of strains of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from samples delivered from the International Space Station. Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 16. Biologiya. 2020; 75 (4): 265–272. <https://vestnik-bio-msu.elpub.ru/jour/article/view/937>. (in Russian)].
 33. Li D., Zhang L., Liang J., Deng W., Wei Q., Wang K. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* in a novel septic arthritis model. Front Cell Infect Microbiol. 2021; 11: 724113. doi: 10.3389/fcimb.2021.724113.
 34. Pang Z., Raudonis R., Glick B.R., Lin T.J., Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 2019; 37 (1): 177–192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
 35. Moser C., Jensen P.O., Thomsen K., Kolpen M., Rybtke M., Lauand A.S., et al. Immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. Front Immunol. 2021; 12: 625597. doi: 10.3389/fimmu.2021.625597.
 36. Rensing C. *Pseudomonas*: Genomics and Molecular Biology. Microbe Magazine. 2008; 3 (9): 437–438. doi: 10.1128/microbe.3.437.2.
 37. Grimwood K., Kyd J.M., Owen S.J., Massa H.M., Cripps A.W. Vaccination against respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection. Hum Vaccin Immunother. 2015; 11 (1): 14–20. doi: 10.4161/hv.34296.
 38. LoVullo E.D., Schweizer H.P. *Pseudomonas aeruginosa* mexT is an indicator of PAO1 strain integrity. J Med Microbiol. 2020; 69 (1): 139–145. doi: 10.1099/jmm.0.001128.
 39. Lee S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. Trends Biotechnol. 1996; 14 (3): 98–105. doi: 10.1016/0167-7799(96)80930-9.
 40. Kobayashi T., Ikeda M., Okada Y., Higurashi Y., Okugawa S., Moriya K. Clinical and microbiological characteristics of recurrent *Escherichia coli* bacteremia. Microbiol Spectr. 2021; 9 (3): e0139921. doi: 10.1128/Spectrum.01399-21.
 41. Uslan D.Z., Crane S.J., Steckelberg J.M., Cockerill F.R. 3rd, St Sauver J.L., Wilson W.R. et al. Age- and sex-associated trends in bloodstream infection: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. Arch Intern Med. 2007; 167 (8): 834–839. doi: 10.1001/archinte.167.8.834.
 42. Skogberg K., Lyytikäinen O., Ruutu P., Ollgren J., Nuorti J.P. Increase in bloodstream infections in Finland, 1995–2002. Epidemiol Infect. 2008; 136 (1): 108–114. doi: 10.1017/S0950268807008138.
 43. Köhler C.D., Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? Int J Med Microbiol. 2011; 301: 642–647. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.09.006.
 44. Sharma G., Sharma S., Sharma P., Chandola D., Dang S., Gupta S., Gabrani R. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. J Appl Microbiol. 2016; 121: 309–319. doi: 10.1111/jam.13078.
 45. Poirer L., Madec J.Y., Lupo A., Schink A.K., Kieffer N., Nordmann P., Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. Microbiol Spectr. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA0026-2017.
 46. Souza R.S.S., Almeida M.C., Manoel C.V., Santos-Filho S.D., Fonseca A.S., Filho M.B. Biological effects of an aqueous extract of *Salix alba* on the survival of *Escherichia coli* AB1157 cultures submitted to the action of stannous chloride. Biol Res. 2009; 42 (2): 199–203. doi: 10.4067/s0716-97602009000200008.
 47. Betageri R., Zhang Y., Zindell R., Kuzmich D., Kirrane T.M., Jörg Bentzien, et al. Trifluoromethyl group as a pharmacophore: Effect of replacing a CF₃ group on binding and agonist activity of a glucocorticoid receptor ligand. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2005; 15 (21): 4761–4769. doi: 10.1016/j.bmcl.2005.07.025.
 48. Apraku J., Okoro C.O. Design, synthesis and anticonvulsant evaluation of fluorinated benzyl amino enaminones. Bioorg. Med. Chem. 2019; 27 (1): 161–166. doi: 10.1016/j.bmc.2018.11.033.
 49. Cindrić M., Perić M., Kralj M., Martin-Kleiner I., David-Cordonnier M.-H., Paljetak H.C. et al. Antibacterial and antiproliferative activity of novel 2-benzimidazolyl- and 2-benzothiazolyl-substituted benzo[b]thieno-2-carboxamides. Mol Divers. 2018; 22 (3): 637–646. doi: 10.1007/s11030-018-9822-7.
 50. Kahlmeter G., Brown D. F. J., Goldstein F. W., MacGowan A. P., Mouton R. W. et al. European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. Clinical Microbiology and Infections. 2006; 12 (6): 501–503. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01454.x.
 51. Terzi H.A., Kulah C., Ciftci I.H. The effects of active efflux pumps on antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. World J Microbiol Biotechnol. 2014; 30 (10): 2681–2687. doi: 10.1007/s11274-014-1692-2.
 52. Berrazeg M., Jeannot K., Ntsogo Enguéné V.Y., Broutin L., Loeffert S., Fournier D. et al. Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59 (10): 6248–6255. doi: 10.1128/aac.00825-15.

Поступила / Received 16.12.2023

Принята в печать / Accepted 20.01.2024

Информация об авторах

Бегунов Роман Сергеевич — к. х. н., доцент; доцент Факультета биологии и экологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия. ORCID ID: 0000-0002-4610-9744

Егоров Дмитрий Олегович — аспирант, Факультет биологии и экологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9109-023X

Четвертакова Анна Васильевна — студент, Факультет биологии и экологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия

Хлопотинин Александр Игоревич — аспирант, Факультет биологии и экологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия

Савина Луиза Ильинична — студент, Факультет биологии и экологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия

Виноградова Вероника Алексеевна — студент, Факультет биологии и экологии ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия

Зубишина Алла Александровна — к. б. н., доцент Факультета биологии и экологии, ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова», Ярославль, Россия. eLIBRARY SPIN-код: 3578-4588. AuthorID: 91911

About the authors

Roman S. Begunov — Ph. D. in Chemistry, Associate Professor; Associate Professor of the Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia. ORCID ID: 0000-0002-4610-9744

Dmitry O. Egorov — Laboratory assistant, Postgraduate student, Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9109-023X

Anna V. Chetvertakova — Student, Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia

Alexander I. Khlopotin — Laboratory assistant, Postgraduate student, Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia

Luisa I. Savina — Student, Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia

Veronika A. Vinogradova — Student, Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia

Alla A. Zubishina — Ph. D. in Biology, Associate Professor, Faculty of Biology and Ecology, P. G. Demidov Yaroslavl State University, Yaroslavl, Russia. eLIBRARY SPIN code: 3578-4588. AuthorID: 91911