

УДК: 57.044

DOI:10.52419/issn2072-2419.2025.4.184

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ 7,8-ДИГИДРОКСИ-4-МЕТИЛКУМАРИНА И ВАНИЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Курилкина М.Я. – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Испытательного центра; Лазебник К.С. * – мл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований в животноводстве; Климова Т.А. – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований в животноводстве; Дускаев Г.К. – д-р биол. наук, глав. науч. сотр. отдела кормления сельскохозяйственных животных и технологии кормов им. С.Г. Леушина

ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН

*christinakondrashova94@yandex.ru

Ключевые слова: бактериальная люминесценция, токсичность, 7,8-дигидрокси-4-метилкумарин, ванилиновая кислота, *Escherichia coli*, *Styloynchia mytilus*.

Key words: bacterial luminescence, toxicity, 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin, vanillic acid, *Escherichia coli*, *Styloynchia mytilus*.

Финансирование: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-26-00251, <https://rscf.ru/project/25-26-00251/>

Поступила: 10.07.2025

Принята к публикации: 05.12.2025

Опубликована онлайн: 26.12.2025



РЕФЕРАТ

Кормовые добавки на основе фитобиотиков являются перспективными в кормлении сельскохозяйственных животных, обеспечивая улучшение здоровья и продуктивности. Данные соединения обладают разнообразными эффектами, включая антиоксидантный, противовоспалительный, антибактериальный и анти-QS. Таким образом, фитобиотики могут представлять потенциальный инструмент для лечения и профилактики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных. Однако значимым побочным эффектом у некоторых из них является гепатотоксичность, поэтому для безопасного использования данных соединений в качестве кормовых добавок необходимы более детальные исследования, включая дозу, биодоступность, метаболические взаимодействия и риски, связанные с длительным воздействием. Целью данного исследования стала оценка токсичности кормовых добавок на основе фитобиотиков 7,8-дигидрокси-4-метилкумарина и ванилиновой кислоты с использованием рекомбинантного люминесцирующего штамма *Escherichia coli* K12 MG1655 *pXen7* и представителя реснитчатых простейших *Styloynchia mytilus*, являющегося стандартным тест-объектом для определения общей токсичности кормов. Оценка токсичности изучаемых соединений с использованием двух тест-объектов показала различия в их активности. В ходе исследований была зафиксирована абсолютная токсичность ванилиновой кислоты. Для бактериального биосенсора наблюдалось полное подавление свечения при максимальных концентрациях (0,0125 и 0,125 М), а для стилонихий – мгновенный лизис клеток во всем диапазоне концентраций уже через 1 ч экспозиции. На этом фоне меньший токсический эффект был характерен для 7,8-дигидрокси-4-метилкумарина, у которого токсический эффект проявлялся при высоких дозах и исче-

зал с уменьшением концентрации тестируемого соединения. Однако для *Styloynchia mytilus* через 3 ч экспозиции было зафиксировано токсическое действие во всех оставшихся экспериментальных точках. Результаты исследования указывают на необходимость строгого контроля использования фитобиотиков в кормлении сельскохозяйственных животных и подчеркивают важность более глубокого изучения данных кормовых добавок.

ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Кормовые добавки играют ключевую роль в современном рационе сельскохозяйственных животных, обеспечивая улучшение здоровья и продуктивности. Данные добавки включают в себя широкий спектр различных соединений. Согласно многочисленным научным исследованиям, высокую перспективу среди них имеют биологически активные вещества растительного происхождения – фитобиотики, а также их аналоги, синтезированные искусственным путем [1, 2]. Такие добавки имеют ряд преимуществ, включая натуральность, высокую усвояемость и недорогую стоимость [3].

Биоактивный потенциал фитобиотиков связан с содержанием в них таких веществ, как терпеноиды, фенольные соединения и азотсодержащие вещества [4]. Одной из наиболее разнообразных групп являются фенольные соединения, обладающие значительными структурными вариациями [5]. Среди них можно выделить кумарины, которые широко распространены в растительном мире, чаще встречаются в высших растениях, редко в грибах и лишайниках. Они наиболее типичны для семейств Зонтичных (*Apiaceae*), Рутовых (*Rutaceae*), Бобовых (*Fabaceae*), Конскокаштановых (*Hippocastanaceae*). Кумарины накапливаются в различных органах растений, чаще всего в корнях, коре, плодах. В настоящее время из растительных объектов выделено порядка 200 таких соединений [6, 7]. Другим представителем является ароматическая фенольная кислота – ванилиновая кислота, встречающаяся в различных травах, таких как Дудник китайский (*Angelica sinensis*), Базилик душистый (*Ocimum basilicum*), Душица обыкновенная (*Origanum vulgare*), Шалфей розмариновый (*Salvia rosmarinus*) и Тимьян обыкно-

венный (*Thymus vulgaris*), а также в злаках, некоторых овощах и фруктах [8, 9].

Данные соединения обладают разнообразными эффектами, включая антиоксидантный, противовоспалительный, антибактериальный и анти-QS, что позволяет рассматривать их в качестве потенциального инструмента для лечения и профилактики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных [9-13]. Также известны положительные эффекты данных соединений при их добавлении в рацион сельскохозяйственной птицы. Наблюдается увеличение массы тела, положительное влияние на липидный обмен, увеличение биологической ценности мышечной ткани, а именно увеличение ряда незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот и важных макро- и микроэлементов [14-16]. Однако значимым побочным эффектом у некоторых из них является гепатотоксичность, поэтому для безопасного использования данных соединений в качестве кормовых добавок необходимы более детальные исследования, включая дозу, биодоступность, метаболические взаимодействия и риски, связанные с длительным воздействием [17, 18].

Принимая во внимание вышеизложенное, целью данного исследования стала оценка токсичности 7,8-дигидрокси-4-метилкумарина и ванилиновой кислоты с использованием рекомбинантного люминесцирующего штамма *Escherichia coli* K12 MG1655 *pXen7* и представителя реснитчатых простейших *Styloynchia mytilus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Фитобиотики. Объектами изучения в данном исследовании являлись 7,8-дигидрокси-4-метилкумарин и ванилиновая кислота («Мерс», США).

Бактериальные штаммы и проти-

сты. Для оценки токсического действия тестируемых соединений был использован рекомбинантный люминесцирующий биосенсор *Escherichia coli* K12 MG1655, полученный путем трансформации с помощью плазмиды *pXen7*, содержащей кассету люминесцентных генов почвенного микроорганизма *Photorhabdus luminescens* ZM1 [19]. Еще одним тест-организмом для изучения токсичности стал представитель реснитчатых простейших *Stylonychia mytilus*, являющийся стандартным тест-объектом для определения общей токсичности кормов [20]. Эксперимент проводился на базе Центра коллективного пользования ФНЦ БСТ РАН (<https://ckp-rf.ru/ckp/77384/>) (Оренбург, Россия).

Биолюминесцентный тест. Биосенсор *E. coli* K12 MG1655 *pXen7* культивировали в течение суток на LB-агаре (Диаэм, Россия) при 37 °С, при этом в среду добавляли селективный маркер ампициллин (100 мкг/мл). Далее клетки суспендировали в растворе NaCl (0,9 %) и доводили до оптической плотности 0,5 отн. ед. при 450 нм, данные измерения проводили в пластиковых прозрачных лунках с помощью микропланшетного фотометра AMR-100 (Allsheng, КНР). После этого бактериальную суспензию объемом 500 мкл вносили в 1000 мкл LB-бульона без дополнительного подращивания. Аликвоты бактериальных суспензий по 100 мкл вносили в лунки белых непрозрачных планшетов, содержащих предварительно внесенные тестируемые вещества в конечной концентрации от 0,125 М до $0,125 \times 10^{-10}$ М. Далее планшет помещали в измерительный блок люминометра «Infinite 200 Pro» («Tecan», Австрия). Измерение проводили в кинетическом режиме в течение 60 минут при 37°С. Полученные результаты первично обрабатывали с использованием программного обеспечения планшетного люминометра Magellan™, дальнейшую обработку полученных данных осуществляли с помощью компьютерной программы «Excel 2010» (Microsoft Inc.). Первичные значения свечения нормализовали по контро-

лю. Нормализация позволила «избавиться» от характера кривой в контрольной пробе и оценить непосредственно эффект анализируемого вещества. Расчет проводили по формуле:

$$I_{\text{норм}} = \frac{I_n^{\text{опыт}} \times I_0^{\text{контроль}}}{I_0^{\text{опыт}} \times I_n^{\text{контроль}}$$

где I_0 и I_n – интенсивность люминесценции в начале эксперимента и измеренная в заданное время (n).

Тест на простейших. Для анализа использовали суточную культуру стилонихий, которая находилась в фазе экспоненциального роста [20].—Эксперимент проводили в диапазоне концентраций от 0,009 до 10 мг/мл. Пересадку и подсчет стилонихий проводили с использованием микроскопа биологического Микромед 2 (2-20 inf). Далее автоматической пипеткой отбирали по 20 мкл среды со стилонихиями и помещали в каждую из пяти лунок предметных стекол. Затем туда же автоматической пипеткой вносили по 20 мкл водного раствора исследуемых веществ, подготовленных для биотестирования. Через 2 мин в каждой лунке подсчитывали количество стилонихий. После подсчета в каждую лунку вносили по 200 мкл водного раствора исследуемых веществ и отмечали время начала испытаний. Токсичность исследуемых веществ определяли по выживаемости стилонихий через 1 и 3 ч экспозиции. Если исследуемые вещества токсичны, то стилонихии изменяют свою обычную эллипсоидную форму на округлую, прекращают движение, или подвергаются распаду – лизису.

Выживаемость стилонихий N , %, вычисляли по формуле:

$$N = \frac{N_2}{N_1} \times 100$$

где N_2 – среднееарифметическое (из пяти испытаний) значение количества стилонихий в конце опыта (через 1 и 3 ч экспозиции), шт.; N_1 – среднееарифметическое (из пяти испытаний) значение количества стилонихий в начале опыта, шт.; 100 – коэффициент перевода результата в проценты.

Токсичность исследуемых веществ

определяли из расчета: от 70 % до 100 % выживаемости стилонихий – образец нетоксичный; от 40 % до 69 % выживаемости стилонихий – образец слаботоксичный; от 0 % до 39 % выживаемости стилонихий – образец токсичный.

Все эксперименты выполнены не менее чем в пяти повторностях. Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики в программе Excel для Windows 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Оценка токсичности изучаемых соединений с использованием двух тест-объектов показала различия в их активности. Наиболее интенсивное ингибирование люминесценции было отмечено в присутствии ванилиновой кислоты. Полное подавление свечения наблюдалось в диапазоне максимальных концентраций от 0,0125 до 0,125 М. С увеличением разведения тестируемого вещества до 0,006 М было отмечено уменьшение уровня

токсического действия до 50 %. При дальнейшем разведении исследуемого фитобиотика количество выживших клеток увеличивалось и достигало 71 %.

Другое соединение – 7,8-дигидрокси-4-метилкумарин – показал меньшую токсическую активность, снижая уровень люминесценции на 24 % только при максимальной концентрации 0,125 М. Дальнейшее разведение до $0,125 \times 10^{-10}$ М не вызывало ингибирование свечения, таким образом, уровень биолюминесценции соответствовал контрольному.

Тестирование исследуемых веществ на *S. mytilus* показало, что наибольшим токсическим эффектом, как и в случае со штаммом *E. coli* K12 MG1655 *pXen7*, обладала ванилиновая кислота, токсическое действие которой проявлялось мгновенным лизисом клеток стилонихий во всем диапазоне концентраций уже через 1 ч экспозиции (таблица 1).

Таблица 1 – Биотестирование исследуемых веществ на *S. mytilus*

Концентрация мг/мл	Время экспозиции, ч			
	1	3	1	3
	7,8-дигидрокси-4-метилкумарин		Ванилиновая кислота	
10,0	Tox	Tox	Tox	Tox
5,0	Tox	Tox	Tox	Tox
2,5	Tox	Tox	Tox	Tox
1,25	LOEC	Tox	Tox	Tox
0,625	LOEC	Tox	Tox	Tox
0,313	LOEC	Tox	Tox	Tox
0,156	NOEC	Tox	Tox	Tox
0,078	NOEC	Tox	Tox	Tox
0,039	NOEC	Tox	Tox	Tox
0,019	NOEC	Tox	Tox	Tox
0,009	NOEC	Tox	Tox	Tox

Примечание: Tox – 0-39 % выживаемость тест-объекта; LOEC – 40-69 % выживаемость тест-объекта; NOEC – 70-100 % выживаемость тест-объекта [21].

Схожие результаты были описаны для кумарина и ванилина [22], которые оказывали токсическое действие, снижая уровень люминесценции бактериального биосенсора *E. coli* K12 MG1655 *pXen7* на 50 % при 2,70 мМ и 2,40 мМ соответственно, а также снижая выживаемость *Styloynchia mytilus*, так при 1,56 мМ выживаемость

простейших составляла 40-69 %, дальнейшее увеличение концентраций приводило к еще большему снижению выживаемости, которое проявилось в прекращении движения стилонихий.

Токсическое действие исследуемых молекул возможно связано с наличием ОН-группы в их структуре [5]. Известно, что

данные группы могут взаимодействовать с мембраной клетки, разрушая ее и приводя к утечке клеточных компонентов, а также с активным центром ферментов, изменяя клеточный метаболизм микроорганизмов [23, 24]. Помимо этого, гидроксильные группы способны делокализовать электроны, приводя к разрушению протонной движущей силы, что в конечном итоге приводит к гибели клетки [25]. Также возможно, что лизис клеток стилоновых связан с игольчатой структурой кристаллов кумарина и ванилиновой кислоты [26].

ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Анализ воздействия исследуемых фитобиотиков в отношении используемых тест-объектов выявил высокую токсичность ванилиновой кислоты и на этом фоне меньший токсический эффект 7,8-дигидрокси-4-метилкумарина. Результаты исследования указывают на необходимость строгого контроля использования фитобиотиков в кормлении сельскохозяйственных животных и подчеркивают важность более глубокого изучения данных кормовых добавок на многоклеточных организмах, поскольку данные, полученные на одноклеточных тест-объектах, не гарантируют безопасность их применения в животноводстве.

TOXICITY ASSESSMENT OF 7,8-DIHYDROXY-4-METHYLCOUMARIN AND VANILLIC ACID

Kurilkina M.Ya. – Candidate of Biological Sciences, Senior researcher; **Lazebnik K.S.*** – Junior researcher; **Klimova T.A.** – Candidate of Biological Sciences, Researcher; **Duskaev G.K.** – Doctor of Biological Sciences, Chief researcher

Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences

*christinakondrashova94@yandex.ru

Financing: The research was carried out within the framework of the Russian Science Foundation grant number 25-26-00251, <https://rscf.ru/project/25-26-00251/>

ABSTRACT

Phytobiotic feed additives have promising potential in the feeding of farm animals, providing improved health and productivity. These compounds have a variety of effects, including antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial, and anti-QS. Thus, phytobiotics may represent a potential tool for the treatment and prevention of infectious diseases of farm animals. However, hepatotoxicity is a significant side effect of some of them, so more detailed studies are needed to safely use these compounds as feed additives, including dose, bioavailability, metabolic interactions, and risks associated with long-term exposure. The purpose of this research was to evaluate the toxicity of two phytobiotic compounds, 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin and vanillic acid, using a recombinant luminescent strain of *Escherichia coli* K12 MG1655 *pXen7* and a representative ciliated protozoon, *Stylonychia mytilus*. These two test organisms are commonly used to assess the overall toxicity of feeds. The results of the study showed differences in the toxicity levels of the two compounds when tested using both organisms. Vanillic acid exhibited higher toxicity than 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin. For the bacterial biosensor, complete suppression of luminescence was observed at maximum concentrations (0,0125 and 0,125 M). For *Stylonychia*, instant cell lysis was observed across the entire concentration range after one hour of exposure. In contrast, 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin showed a lower toxic effect, with the toxic effect only manifesting itself at high doses and disappearing with a decrease in concentration. However, after three hours of exposure for *Stylonychia mytilus*, a toxic effect was still recorded at all remaining experimental sites. These results emphasize the need for careful monitoring of phytobiotic use in animal feed and highlight the importance of further research on these feed additives.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Рязанов В.А. Фитобиотики как альтернатива антибиотикам в животноводстве / В.А. Рязанов, М.Я. Курилкина, Г.К. Дус-

- каев, В.М. Габидулин // Животноводство и кормопроизводство. – 2021. – Т. 104. – № 4. – С. 108-123. doi: 10.33284/2658-3135-104-4-108.
2. Djuragic O. Feed Additives, Their Role, and Technological Properties / O. Djuragic, I. Ćabarkapa, M.M. Šeremešić, S.Rakita, Z. Tomičić // Sustainable Use of Feed Additives in Livestock. Springer, Cham. – 2023. doi: 10.1007/978-3-031-42855-5_2.
3. Пронина В.И. Потенциал растений-фитобиотиков для развития отечественного животноводства и птицеводства (обзор) / В.И. Пронина, И.А. Сазонова, А.В. Ерохина, С.Н. Чемоданкин // Агро-ЭкоИнфо. – 2023. – № 1. – doi: 10.51419/202131109.
4. Li Y. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants / Y. Li, D. Kong, Y. Fu, M.R. Sussman, H. Wu // Plant Physiol Biochem. – 2020. – V. 148. – pp. 80–89. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
5. Gyawali R. Natural products as antimicrobial agents / R. Gyawali, S.A. Ibrahim // Food Control. – 2014. – V. 46. – pp. 412–429. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047.
6. Головкин Б. Биологически активные вещества растительного происхождения / Б. Головкин, Р. Руденская, И. Трофимова, А. Шретер // Российская Академия наук. – М.: Наука, 2001. – С. 337.
7. Matos M.J. Coumarins-An Important Class of Phytochemicals / M.J. Matos, L. Santana, E. Uriarte, O.A. Abreu, E. Molina, E.G. Yordi // Phytochemicals-Isolation, Characterization and Role in Human Health. – 2015. doi: 10.5772/59982.
8. Kaur J. Discovering multifaceted role of vanillic acid beyond flavours: nutraceutical and therapeutic potential / J. Kaur, M. Gulati, S.K. Singh, et al. // Trends Food Scien. Technol. – 2022. – V. 122. – pp. 187-200. doi: 10.1016/j.tifs.2022.02.023.
9. Matejczyk M. Biological effects of vanillic acid, iso-vanillic acid, and orto-vanillic acid as environmental pollutants / M. Matejczyk, P. Ofman, E. Juszczyk-Kubiak, R. Świsłocka, W.L. Shing, K.K. Kesari, B. Prakash, W. Lewandowski // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2024. – V. 227. – p. 116383. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.116383.
10. Reen F.J. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition / F.J. Reen, J.A. Gutiérrez-Barranquero, M.L. Parages, F. O’Gara // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2018. – V. 102. – №. 5. – pp. 2063-2073. doi: 10.1007/s00253-018-8787-x.
11. Todorov L. Antioxidant Activity of Coumarins and Their Metal Complexes / L. Todorov, L. Saso, I. Kostova // Pharmaceuticals. – 2023. – V. 16. – no. 5. – p. 651. doi: 10.3390/ph16050651.
12. Deryabin D. Coumarin’s anti-quorum sensing activity can be enhanced when combined with other plant-derived small molecules / D. Deryabin, K. Inchagova, E. Ruskova, G. Duskaev // Molecules. - 2021 - V. 26 - No 1 - p. 208 doi: 10.3390/molecules26010208.
13. Tanaka T. Anti-osteoporotic effects of syringic acid and vanillic acid in the extracts of waste beds after mushroom cultivation / T. Tanaka, H. Onuma, T. Shigihara, E. Kimura, Y. Fukuta // J. Biosci. Bioeng. – 2019. – V. 128. – pp. 622-629. doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.04.021.
14. Дускаев Г.К. Продуктивность птицы, биохимические значения крови: эффект *Vacillus cereus* и кумарин / Г.К. Дускаев, Ш.Г. Рахматуллин, О.В. Кван // Животноводство и кормопроизводство. – 2020. – Т. 103. – № 4. – С. 197-209. doi: 10.33284/2658-3135-103-4-197.
15. Duskaev G. Growth-stimulating and antioxidant effects of vanillic acid on healthy broiler chickens / G. Duskaev, M. Kurilkina, O. Zavyalov // Veterinary World. – 2023. – V. 16. – pp. 518-525. doi: 10.14202/vetworld.2023.518-525.
16. Дускаев Г.К. Влияние фитовеществ на биохимический состав мышечной ткани цыплят-бройлеров / Г.К. Дускаев, М.Я. Курилкина // Аграрный вестник Урала. Специальный выпуск «Биология и биотехнологии» – 2022. – С. 9–20. doi: 10.32417/1997-4868-2022-229-14-9-20.
17. Heghes S.C. Safety Profile of Nutraceuticals Rich in Coumarins: An Update / S.C. Heghes, O. Vostinaru, C. Mogosan, D. Mie-

- re, C.A. Iuga, L. Filip // *Front Pharmacol* – 2022. – V. 13. – p. 803338. doi: 10.3389/fphar.2022.803338.
18. Karthikeyan M. Safety, Dosage, and Regulatory Aspects in the Use of Phytochemicals. M. Karthikeyan, A. Mehta, S.S. Kumar, H. Mohan, B. Usha Medicinal Plants and Their Bioactives in Human Diseases. Springer, Cham. – 2025. doi: 10.1007/978-3-032-01356-9_10.
19. Manukhov I.V. Cloning and expression of the lux-operon *Photobacterium luminescens* zml strain: the nucleotide sequence of lux-AB genes and the main characteristics of luciferase / I.V. Manukhov, S.M. Rastorguev, G.E. Eroshnikov, A.P. Zarubina, G.B. Zavlilgelsky // *Genetics*. – 2000. – Vol. 36. – No. 3. – pp. 322–330.
20. ГОСТ 31674-2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности / Стандартинформ, 2014.
21. Jackson P. Bioaccumulation Ecotoxicity and nanotubes chemistry / P. Jackson, N.R. Jacobsen, A. Baun, R. Deev, D. Kühnel, K.A. Jensen, U. Vogel, H. Wallin // *Central AUD carbon*. – 2013. – V. 7. – No. 1. – p. 154. doi: 10.1186/1752-153X-7-154.
22. Vlasenko L. Assessment (in vitro) toxicity of small molecules of plant origin / L. Vlasenko, K. Atlanderova // *E3S Web of Conf.* – 2023. – p. 07022. doi: e3sconf/202339007022.
23. Xue J. Thymol nanoemulsified by whey protein maltodextrin conjugates: The enhanced emulsifying capacity and anti-listerial properties in milk by propylene glycol / J. Xue, P.M. Davidson, Q. Zhong // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2013. – V. 61. – pp. 12720–12726. doi: 10.1021/jf4043437.
24. Farag R. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils / R. Farag, Z. Daw, F. Hewedi, G. El-Baroty // *Journal of Food Protection*. – 1989. – V. 52. – pp. 665–667. doi: 10.4315/0362-028X-52.9.665.
25. Ultee A. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus* / A. Ultee, M.H.J. Bennik, R. Moezelaar // *Applied and environmental microbiology*. – 2002. – V. 68. – No. 4. – pp. 1561–1568. doi: 10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002.
26. Kondrashova K. Impact of developed ruminant feed products on the surrounding ecosystem / K. Kondrashova, K. Inchagova, V. Ryazanov, G. Duskaev // *BIO Web of Conferences*. – 2022. – V. 52. – p. 00034. – doi: 10.1051/bioconf/20225200034.

REFERENCES

1. Ryazanov V.A. Phytobiotics as an alternative to antibiotics in animal husbandry / V.A. Ryazanov, M.Ya. Kurilkina, G.K. Duskaev, V.M. Gabidulin // *Animal husbandry and Fodder production*. – 2021. – Vol. 104. – No. 4. – pp. 108–123. doi: 10.33284/2658-3135-104-4-108.
2. Djuragic O. Feed Additives, Their Role, and Technological Properties / I. Čabarkapa, M.M. Šeremešić, S. Rakita, Z. Tomičić // In: G. Arsenos, I. Giannenas, (eds). *Sustainable Use of Feed Additives in Livestock*. Springer, Cham. 2023. doi: 10.1007/978-3-031-42855-5_2.
3. Pronina V.I. The potential of phytobiotic plants for the development of domestic livestock and poultry farming (review) / V.I. Pronina, I.A. Sazonova, A.V. Erokhina, S.N. Chemodankin // *AgroEcoInfo*. – 2023. – No. 1. – doi: 10.51419/202131109.
4. Li Y. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants / Y. Li, D. Kong, Y. Fu, M.R. Sussman, H. Wu // *Plant Physiol Biochem*. – 2020. – V. 148. – pp. 80–89. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
5. Gyawali R. Natural products as antimicrobial agents / R. Gyawali, S.A. Ibrahim // *Food Control*. – 2014. – V. 46. – pp. 412–429. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047.
6. Golovkin B. Biologically active substances of plant origin / B. Golovkin, R. Rudenskaya, I. Trofimova, A. Schroeter // *Russian Academy of Sciences*. – M.: Nauka, 2001. – p. 337.
7. Matos M.J. Coumarins-An Important Class of Phytochemicals / M.J. Matos, L. Santana, E. Uriarte, O.A. Abreu, E. Molina, E.G. Yordi // *Phytochemicals-Isolation, Characterization and Role in Human Health*. – 2015. doi: 10.5772/59982.

- 8.Kaur J. Discovering multifaceted role of vanillic acid beyond flavours: nutraceutical and therapeutic potential / J. Kaur, M. Gulati, S.K. Singh, et al. // Trends Food Scien. Technol. – 2022. – V. 122. – pp. 187-200. doi: 10.1016/j.tifs.2022.02.023.
- 9.Matejczyk M. Biological effects of vanillic acid, iso-vanillic acid, and orto-vanillic acid as environmental pollutants / M. Matejczyk, P. Ofman, E. Juszczuk-Kubiak, R. Świsłocka, W.L. Shing, K.K. Kesari, B. Prakash, W. Lewandowski // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2024. – V. 227. – p. 116383. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.116383.
- 10.Reen F.J. Coumarin: a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition / F.J. Reen, J.A. Gutiérrez-Barranquero, M.L. Parages, F. O’Gara // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2018. – V. 102. – №. 5. – pp. 2063-2073. doi: 10.1007/s00253-018-8787-x.
- 11.Todorov L. Antioxidant Activity of Coumarins and Their Metal Complexes / L. Todorov, L. Saso, I. Kostova // Pharmaceuticals. – 2023. – V. 16. – no. 5. – p. 651. doi: 10.3390/ph16050651.
- 12.Deryabin D. Coumarin’s anti-quorum sensing activity can be enhanced when combined with other plant-derived small molecules / D. Deryabin, K. Inchagova, E. Ruskova, G. Duskaev // Molecules. - 2021 - V. 26 - No 1 - p. 208 doi: 10.3390/molecules26010208.
- 13.Tanaka T. Anti-osteoporotic effects of syringic acid and vanillic acid in the extracts of waste beds after mushroom cultivation / T. Tanaka, H. Onuma, T. Shigihara, E. Kimura, Y. Fukuta // J. Biosci. Bioeng. – 2019. – V. 128. – pp. 622-629. doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.04.021.
- 14.Duskaev G.K. Poultry productivity, biochemical values of blood: the effect of *Bacillus cereus* and coumarin / G. K. Duskaev, Sh.G. Rakhmatullin, O.V. Kvan // Animal husbandry and feed production. – 2020. – Vol. 103. – No. 4. – pp. 197-209. doi: 10.33284/2658-3135-103-4-197.
- 15.Duskaev G. Growth-stimulating and antioxidant effects of vanillic acid on healthy broiler chickens / G. Duskaev, M. Kurilkina, O. Zavyalov // Veterinary World. – 2023. – V. 16. – pp. 518-525. doi: 10.14202/vetworld.2023.518-525.
16. Duskaev G.K. Influence of phytomaterials on the biochemical composition of muscle tissue of broiler chickens / G.K. Duskaev, M.Ya. Kurilkina // Agrarian Bulletin of the Urals. Special issue "Biology and Biotechnology" – 2022. – Pp. 9-20. doi: 10.32417/1997-4868-2022-229-14-9-20.
- 17.Heghes S.C. Safety Profile of Nutraceuticals Rich in Coumarins: An Update / S.C. Heghes, O. Vostinaru, C. Mogosan, D. Miere, C.A. Iuga, L. Filip // Front Pharmacol – 2022. – V. 13. – p. 803338. doi: 10.3389/fphar.2022.803338.
- 18.Karthikeyan M. Safety, Dosage, and Regulatory Aspects in the Use of Phytochemicals. M. Karthikeyan, A. Mehta, S.S. Kumar, H. Mohan, B. Usha Medicinal Plants and Their Bioactives in Human Diseases. Springer, Cham. – 2025. doi: 10.1007/978-3-032-01356-9_10.
- 19.Manukhov I.V. Cloning and expression of the lux-operon *Photobacterium luminescens* zml strain: the nucleotide sequence of lux-AB genes and the main characteristics of luciferase / I.V.Manukhov, S.M. Rastorguev, G.E. Eroshnikov, A.P. Zarubina, G.B. Zavgelsky // Genetics. – 2000. – Vol. 36. – No. 3. – pp. 322–330.
20. GOST 31674-2012. Feed, mixed feed, feed raw materials. Methods for determining total toxicity / Standartinform, 2014.
- 21.Jackson P. Bioaccumulation Ecotoxicity and nanotubes chemistry / P. Jackson, N.R. Jacobsen, A. Baun, R. Deev, D. Kühnel, K.A. Jensen, U. Vogel, H. Wallin // Central AUD carbon. – 2013. – V. 7. – No. 1. – p. 154. doi: 10.1186/1752-153X-7-154.
- 22.Vlasenko L. Assessment (in vitro) toxicity of small molecules of plant origin / L. Vlasenko, K. Atlanderova // E3S Web of Conf. – 2023. – p. 07022. doi: e3sconf/202339007022.
- 23.Xue J. Thymol nanoemulsified by whey protein maltodextrin conjugates: The enhanced emulsifying capacity and anti-listerial properties in milk by propylene glycol / J. Xue, P.M. Davidson, Q. Zhong // Journal of agricultural and food chemistry. – 2013. – V. 61. – pp. 12720–12726. doi:

10.1021/jf4043437.

24. Farag R. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils / R. Farag, Z. Daw, F. Hewedi, G. El-Baroty // *Journal of Food Protection*. – 1989. – V. 52. – pp. 665-667. doi: 10.4315/0362-028X-52.9.665.

25. Ultee A. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus* / A. Ultee, M.H.J. Bennik, R. Moezelaar // *Ap-*

plied and environmental microbiology. – 2002. – V. 68. – No. 4. – pp. 1561-1568. doi: 10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002.

26. Kondrashova K. Impact of developed ruminant feed products on the surrounding ecosystem / K. Kondrashova, K. Inchagova, V. Ryazanov, G. Duskaev // *BIO Web of Conferences*. – 2022. – V. 52. – p. 00034. – doi: 10.1051/bioconf/20225200034.