

Разработка молекулярно-генетической системы детекции уровня экспрессии генов *Heyndrickxia coagulans*

Е. В. Сульдина✉, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Н. А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

И. С. Раксина, кандидат ветеринарных наук, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

А. В. Мастиленко, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017 г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1

✉e.suldina2006@yandex.ru

Резюме. В работе представлены результаты исследований по разработке молекулярно-генетической системы детекции уровня экспрессии генов, участвующих в синтезе лактата и целлюлазы при культивировании *Heyndrickxia coagulans* на различных питательных средах. Определена структура биохимических путей гликолиза *Heyndrickxia coagulans* и ферменты, участвующие в метаболизме углеводов. В системе NCBI проведено выравнивание генов и поиск консервативных участков – потенциальных кандидатов для разработки молекулярно-генетической системы детекции. Подобраны праймерные системы для генов L-лактатдегидрогеназы (f GAAGCCATGGACCTGAACCA, r ATGACAACAAGATCGGCAGTG) и полигалактуроназы (f GGTACTGGATGGCGACAACA, r AGCCTCGTTGTTCCGCTTA). При проведении ПЦР изоляция РНК была проведена с использованием методики сепарации нуклеиновых кислот на магнитных частицах с последующей обработкой элюента ДНК-азой. Контрольная реакция наличия следовых количеств ДНК была проведена с использованием полученных праймеров с исключением стадии обратной транскрипции. Установлено, что обработка элюента ферментом ДНК-азой в течение 60 минут приводила к отсутствию амплификации в ПЦР и пригодна для определения экспрессированной РНК. Коэффициент экспрессии генов определяли в ПЦР без обратной транскрипции, как соотношение Ct в реакции с РНК к величине Ct в реакции с ДНК. Разработанная молекулярно-генетическая система детекции уровня экспрессии генов, участвующих в синтезе лактата и целлюлазы при культивировании штамма *Heyndrickxia coagulans* В.со.80 позволила подобрать питательную среду (№2), с оптимальным составом, способствующую получению бактериальной массы с максимальным уровнем экспрессии генов L-лактатдегидрогеназы и полигалактуроназы. Штамм *Heyndrickxia coagulans* В.со.80 является производственно-перспективным для включения его в состав пробиотической биокомпозиции.

Ключевые слова: *Heyndrickxia coagulans*, экспрессия, гены, ПЦР, ДНК, РНК, лактатдегидрогеназа, полигалактуроназа.

Для цитирования: Разработка молекулярно-генетической системы детекции уровня экспрессии генов *Heyndrickxia coagulans*/ Е. В. Сульдина, Н. А. Феоктистова, И. С. Раксина и др. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2024. №3 (67). С. 109-116. doi:10.18286/1816-4501-2024-3-109-116

Development of a molecular genetic system for detecting the expression levels of *Heyndrickxia coagulans* genes

E. V. Suldina✉, **N. A. Feoktistova**, **I. S. Raksina**, **A. V. Mastilenko**

Ulyanovsk State Agrarian University, 432017, Ulyanovsk, Novy Venets Boulevard, 1

✉e.suldina2006@yandex.ru

Abstract. This study presents the development of a molecular genetic system for detecting the expression levels of genes involved in lactate and cellulase synthesis during the cultivation of *Heyndrickxia coagulans* on various nutrient media. The biochemical pathways of glycolysis in *Heyndrickxia coagulans* and the enzymes participating in carbohydrate metabolism were identified. Gene alignment and the search for conserved regions—potential candidates for the development of a molecular genetic detection system—were conducted using the NCBI system. Primer systems were designed for the *L-lactate dehydrogenase* gene (f GAAGCCATGGACCTGAACCA, r ATGACAACAAGATCGGCAGTG) and the *polygalacturonase* gene (f GGTACTGGATGGCGACAACA, r AGCCTCGTTGTTCCGCTTA).

During PCR, RNA isolation was performed using a nucleic acid separation method on magnetic particles, followed by DNase treatment of the eluate. A control reaction for the presence of trace amounts of DNA was carried out using the selected primers, excluding the reverse transcription stage. It was established that treating the eluate with DNase enzyme for 60 minutes resulted in no PCR amplification, making the method suitable for detecting expressed RNA. The

gene expression coefficient was determined in PCR without reverse transcription as the ratio of Ct in the RNA reaction to Ct in the DNA reaction. The developed molecular genetic system for detecting the expression levels of genes involved in lactate and cellulase synthesis during the cultivation of *Heyndrickxia coagulans* strain B.co.80 enabled the selection of an optimal nutrient medium (No. 2). This medium supported bacterial biomass production with the highest expression levels of *L-lactate dehydrogenase* and *polygalacturonase* genes. The *Heyndrickxia coagulans* strain B.co.80 is production-oriented and shows potential for inclusion in probiotic biocompositions.

Keywords: *Heyndrickxia coagulans*, expression, genes, PCR, DNA, RNA, lactate dehydrogenase, polygalacturonase.

For citation: Development of a molecular genetic system for detecting the expression levels of *Heyndrickxia coagulans* genes / E. V. Suldina, N. A. Feoktistova, I. S. Raksina, et al. // Vestnik of Ulyanovsk State Agrarian University. 2024. No. 3 (67). pp. 109–116. doi:10.18286/1816-4501-2024-3-109-116.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2024 году.

Введение

В связи с прогнозируемым быстрым ростом населения планеты, которое, по оценкам, к 2050 г. достигнет почти 10 миллиардов человек [1], продовольственная безопасность в настоящее время является одной из важных мировых проблем. Помимо удовлетворения базовых потребностей в продуктах питания уязвимых групп населения прогресс в экономическом и городском развитии и связанный с ним рост доходов привели к увеличению спроса на более качественные и полезные для здоровья продукты. Таким образом, к 2050 г. мировой спрос на продовольствие, необходимый для обеспечения растущего населения планеты, увеличится на 56 % [1]. Согласно последним оценкам, к 2050 г. спрос на мясные продукты удвоится [2], а недостаток молочных продуктов на рынке регистрируется уже сейчас [3]. Чтобы обеспечить растущий спрос производителям необходимо внедрять высокоинтенсивные системы ведения сельского хозяйства. Потребность в повышении эффективности животноводства ранее удовлетворялась за счёт использования антибиотиков [4-7], которые способствовали повышению продуктивности при одновременном снижении рисков распространения инфекционных заболеваний в животноводстве. Из-за развивающейся устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам их использование ограничено, что привело к растущей потребности в альтернативах антибиотикам для повышения продовольственной безопасности [8-10]. Пробиотики привлекают внимание как один из потенциальных заменителей антибиотиков в качестве стимуляторов роста [11-12]. Эндоспорообразующие бациллы являются многообещающими кандидатами в качестве пробиотиков благодаря своей стабильности и экономической выгоде. *Heyndrickxia coagulans*, как правило, считаются безопасными для производства кормов, ферментов или использования в качестве пробиотиков. Их способность вырабатывать ферменты, в том числе целлюлазу и лактат [13-17] также является привлекательной особенностью. Споры, образуемые *H. coagulans*, делают пробиотики более устойчивыми к воздействию желудочного сока и кишечной среды [18-19].

Целью экспериментов стала разработка молекулярно-генетической системы детекции уровня экспрессии генов, участвующих в синтезе лактата и целлюлазы

при культивировании *Heyndrickxia coagulans* на различных питательных средах.

Материалы и методы

Штамм Heyndrickxia coagulans (Bacillus coagulans) B.co.80, выделенный авторами из проб почвы, обладает характерными для данного вида бактерий свойствами.

Питательные среды:

1. Состав: пептон - 10,0; дрожжевой экстракт - 5,0; глюкоза - 10,0; агар микробиологический - 15,0; pH 6,8...7,0.

2. Состав: пептон -10,0; дрожжевой экстракт -10,0; глюкоза - 20,0; агар микробиологический - 15,0; твин-80 - 1,0; калия гидрофосфат - 2,0; натрия ацетат - 5,0; триаммония цитрат - 2,0; магния сульфат - 0,2; марганца сульфат - 0,05; pH - 7,2...7,5.

3. Состав: гидролизат казеина - 10,0; дрожжевой экстракт - 1,0; глюкоза - 5,0; калия гидрофосфат - 1,25; агар микробиологический - 15,0; pH 6,8...7,0.

4. Состав: пептон - 10,0, мясной экстракт 11,0 ± 1,0, натрия хлорид - 5,0, агар микробиологический - 15,0; порошок кукурузного экстракта - 7,0; pH 6,8 - 7,0.

Для подбора и оптимизации праймеров использовали ресурсы NCBI: BLAST nucleotide и PRIMER BLAST. Выделение нуклеиновых кислот бактерий проводили при помощи набора РеалБест УниМаг («Вектор Бест», РФ). Для очистки РНК от фрагментов ДНК использовали ДНКазу («Синтол», РФ), для получения очищенной ДНК от РНК применяли РНКазу («Синтол», РФ). Все исследования проводили согласно инструкции производителей. Для изучения экспрессии целевых участков гена был использован «Набор реагентов для проведения ПЦР совмещенной с реакцией обратной транскрипции (ПЦР-ОТ) («Синтол», РФ).

Эксперименты проводили в соответствии с оптимизированным протоколом (табл. 1).

Таблица 1. Протокол ОТ-ПЦР

Шаг	Температура	Время	Повтор	Флуоресценция
1	50°C	45 мин	1	
2	95°C	5 мин	1	
3	95°C	10 сек	45	v (Syber Green)
	60°C	30 сек		

Результаты

Для разработки системы детекции активности секреции ферментов, участвующих в синтезе лактата *Heyndrickxia coagulans* (*Bacillus coagulans*), необходимы данные о структуре генов, фланкирующих ферменты соответствующих метаболических путей.

Для анализа необходимой информации нами была использована база данных метаболических путей KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.kegg.jp/>).

Был определен путь образования лактата при метаболизме глюкозы:

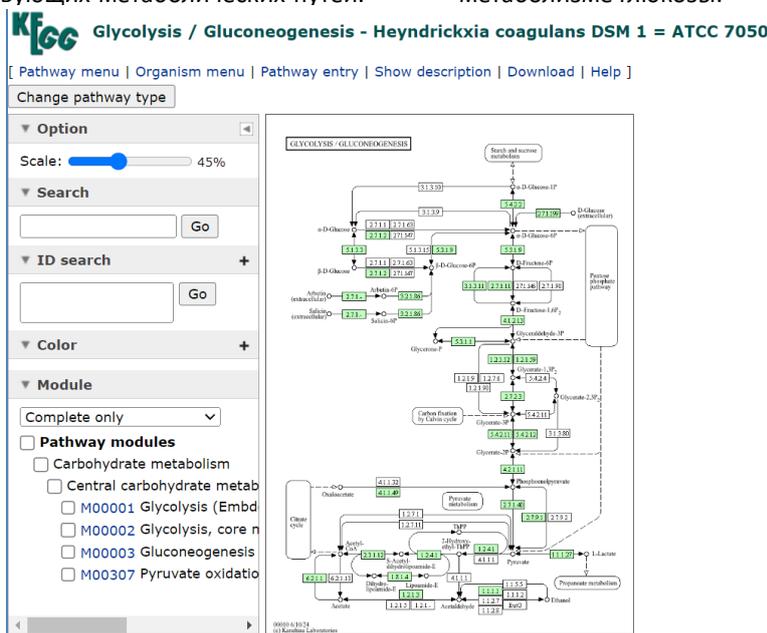


Рис.1. Структура биохимических путей гликолиза *Heyndrickxia coagulans*

Затем были определены ферменты, участвующие в метаболизме.

Heyndrickxia coagulans DSM 1 = ATCC 7050: BF29_3038		Help
Entry	BF29_3038 CDS T03712	All links
Name	(GenBank) L-lactate dehydrogenase K00016 L-lactate dehydrogenase [EC:1.1.1.27]	
Organism	bcoa Heyndrickxia coagulans DSM 1 = ATCC 7050	Ontology (3) KEGG BRTE (3) Pathway (7) KEGG PATHWAY (7) Chemical substance (9) KEGG COMPOUND (9) Chemical reaction (4) KEGG ENZYME (1) KEGG REACTION (3) Genome (1) KEGG GENOME (1) Gene (3) KEGG ORTHOLOGY (1) NCBI-PROTEINID (1) OC (1) Protein sequence (1) UniProt (1) Protein domain (8) Pfam (8) All databases (36) Download RDF
Pathway	bcoa00010 Glycolysis / Gluconeogenesis bcoa00270 Cysteine and methionine metabolism bcoa00620 Pyruvate metabolism bcoa00640 Propanoate metabolism bcoa01100 Metabolic pathways bcoa01110 Biosynthesis of secondary metabolites bcoa01120 Microbial metabolism in diverse environments	
Brite	KEGG Orthology (KO) [BR:bcoa00001] 09100 Metabolism 09101 Carbohydrate metabolism 00010 Glycolysis / Gluconeogenesis BF29_3038 00620 Pyruvate metabolism BF29_3038 00640 Propanoate metabolism BF29_3038 09105 Amino acid metabolism 00270 Cysteine and methionine metabolism BF29_3038 09180 Brite Hierarchies 09183 Protein families: signaling and cellular processes 04147 Exosome [BR:bcoa04147] BF29_3038 Enzymes [BR:bcoa01000] 1. Oxidoreductases 1.1 Acting on the CH-OH group of donors 1.1.1 With NAD+ or NADP+ as acceptor 1.1.1.27 L-lactate dehydrogenase BF29_3038 Exosome [BR:bcoa04147] Exosomal proteins Exosomal proteins of epithelial cells BF29_3038 Exosomal proteins of breast milk BF29_3038 BRITE hierarchy	

Рис. 2. Информация о ферменте лактатдегидрогеназа

Фермент лактатдегидрогеназа участвует в метаболизмах углеводов, одним из конечных продуктов которого является лактат.

Для дизайна молекулярно-генетической системы детекции данного фермента определили сиквенсовую структуру кодирующего гена.

В системе NCBI было проведено выравнивание гена и поиск консервативных участков – потенциальных кандидатов для разработки молекулярно-генетической системы детекции L-лактатдегидрогеназы (рис. 3-4). Информация о подобранных праймерах представлена в таблице 2.

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных (биологические науки)

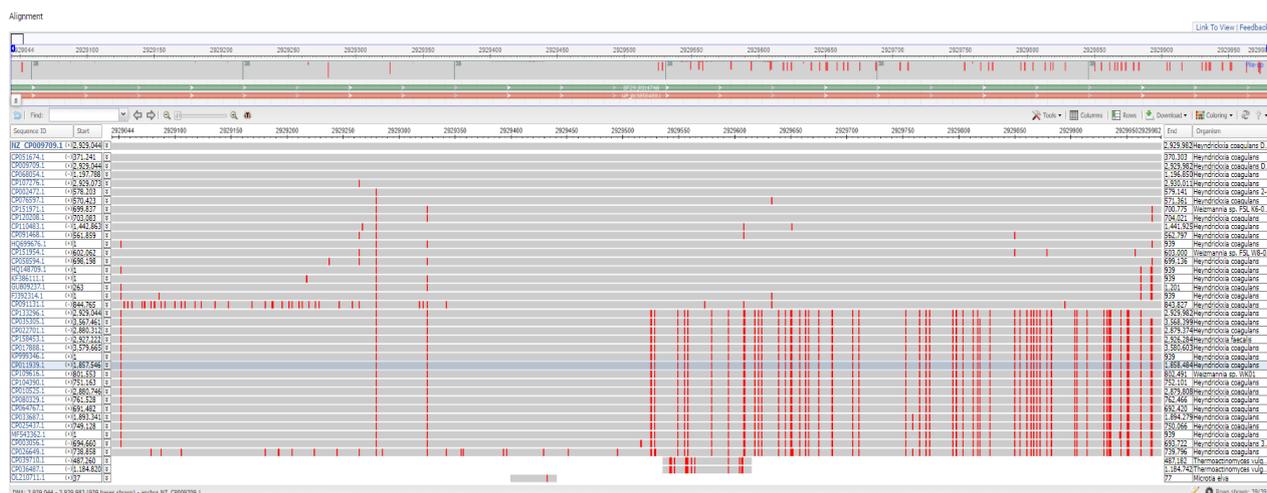


Рис. 3. Структура консервативных участков гена L-лактатдегидрогеназы

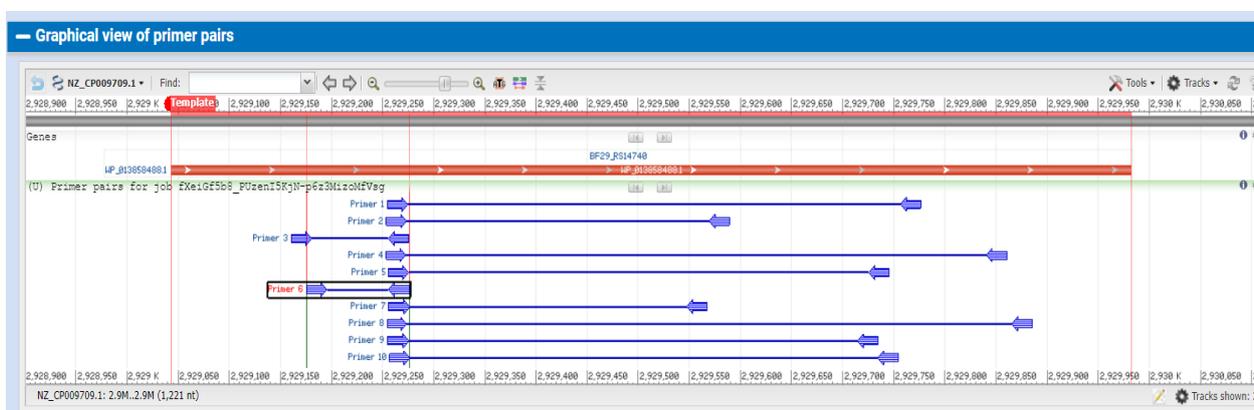


Рис. 4. Праймерные системы для гена L-лактатдегидрогеназы

Таблица 2. Праймерные системы гена L-лактатдегидрогеназы

Последовательность (5'→3')	Прямой праймер GAAGCATGGACCTGAACCA	Обратный праймер ATGACAACAAGATCGGCAGTG
Длина праймера	20	21
Начало	2929176	2929276
Конец	2929195	2929256
Температура плавления	59.96	58.92
%GC	55.00	47.62
Длина продукта	101	

После синтеза олигонуклеотидов были проведены эксперименты по определению экспрессии L-лактатдегидрогеназы для штамма *Heuynrickxia coagulans* B.co.80 при различных условиях культивирования. При проведении ПЦР изоляция РНК была проведена с использованием методики сепарации нуклеиновых кислот на магнитных частицах с последующей обработкой элюента ДНК-азой. Контрольная реакция наличия следовых количеств ДНК была проведена с использованием полученных праймеров с исключением стадии обратной транскрипции (фермент MMLV и случайные праймеры также были исключены). В результате экспериментов по оптимизации контрольной реакции было определено, что обработка элюента ферментом ДНК-азой в течение 60 минут приводила к отсутствию

амплификации в ПЦР, т.е. приводила к полному разрушению ДНК и была пригодна для дальнейшего использования в экспериментах по определению экспрессированной РНК.

Для определения коэффициента экспрессии гена L-лактатдегидрогеназы также была проведена ПЦР без обратной транскрипции с такими же аликвотами элюента нуклеиновых кислот. Для исключения влияния РНК на ПЦР одна из частей аликвот была обработана ферментом РНК-азой в течение 30 минут.

Таким образом, коэффициент экспрессии определялся как соотношение Ct в реакции с РНК к величине Ct в реакции с ДНК данной пробы. Результаты представлены на рисунках 5-6 и в таблице 3.

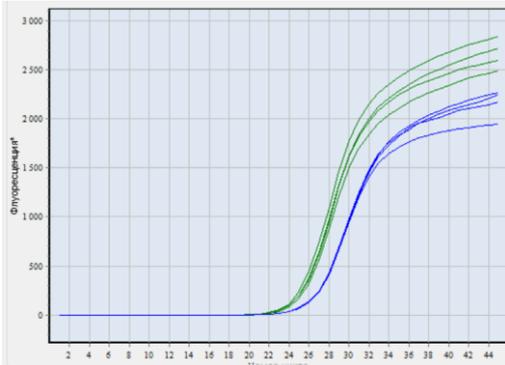


Рис. 5. Результаты амплификации ОТ-ПЦР

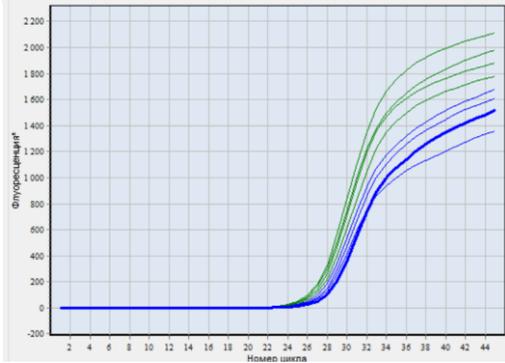


Рис. 6. Результаты амплификации ПЦР

Таблица 3. Данные экспрессии гена L-лактатдегидрогеназы *Heyndrickxia coagulans* B.co.80 при культивировании на разных питательных средах

Среда культивирования	Ct, РНК	Ct, ДНК	ΔCt
1	25,1	27,1	-2,0
1	25,0	26,9	-1,9
2	25,2	26,8	-1,6
2	24,8	27,1	-2,3
3	26,6	27,6	-1,0
3	26,3	27,5	-1,2
4	26,4	27,4	-1,0
4	26,5	28,1	-1,6

По результатам экспериментов максимальный уровень экспрессии гена L-лактатдегидрогеназы был достигнут при использовании 1 и 2 питательных сред для культивирования.

Аналогичная работа была проведена для определения экспрессии гена, кодирующего фермент целлюлазы (полигалактуроназы) (рис.7-8). Информация о подобранных праймерах представлена в таблице 4.



Рис. 7. Выравнивание гена полигалактуроназы *Heyndrickxia coagulans*

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных (биологические науки)

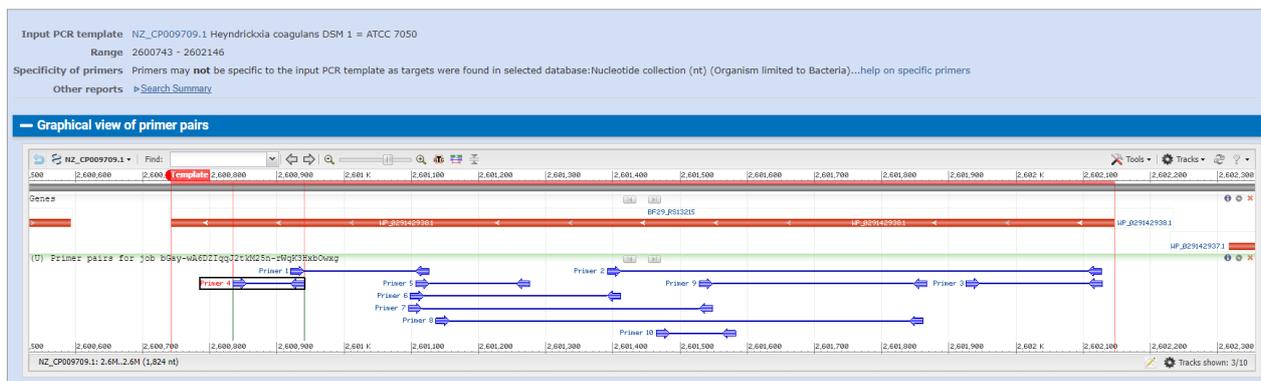


Рис. 8. Праймерные системы для гена полигалактуроназы

Таблица 4. Праймерные системы гена полигалактуроназы

Последовательность (5'->3')	Прямой праймер GGTACTGGATGGCGACAACA	Обратный праймер AGCCTCGTTGTTCCGCTTA
Длина праймера	20	20
Начало	2600835	2600940
Конец	2600854	2600921
Температура плавления %GC	60.04 55.00	59.97 50.00
Длина продукта	106	

Результаты амплификации представлены на рисунках 9-10 и в таблице 5.

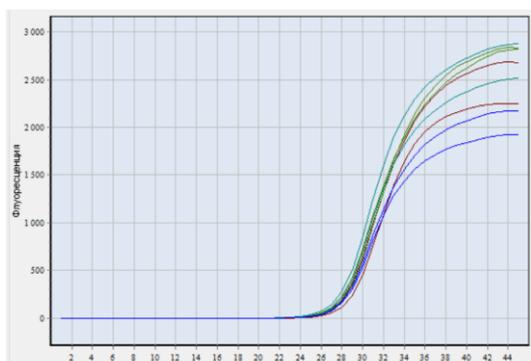


Рис. 9. Результаты амплификации ОТ-ПЦР

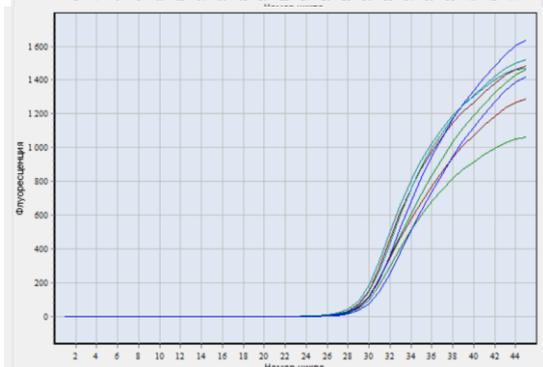


Рис. 10. Результаты амплификации ПЦР

Таблица 5. Данные экспрессии гена полигалактуроназы *Heyndrickxia coagulans B.co.80* при культивировании на разных питательных средах

Среда культивирования	Ct, РНК	Ct, ДНК	ΔCt
1	28,1	29,6	-1,5
1	28,6	29,7	-1,1
2	27,7	29,7	-2,0
2	27,9	29,4	-1,5
3	27,8	28,5	-0,7
3	28,2	28,5	-0,3
4	27,9	29,4	-1,5
4	27,9	29,4	-1,5

По результатам экспериментов максимальный уровень экспрессии гена полигалактуроназы был достигнут при использовании 2 и 4 питательных сред для культивирования.

Обсуждение

В основе определения прогнозируемого проявления пробиотических свойств бактерий лежит применение молекулярно-генетического метода определения экспрессии генов изучаемых свойств при изменении условий их культивирования. Применение метода ПЦР по сравнению с классическими методами культивирования при определении метаболической бактериальной активности имеет преимущество по времени получения результатов, усиления сигнала экспрессируемых генов, ограниченного периодом действия стимулятора, временем наибольшей экспрессии генов активных метаболитов и составляет не более 4 часов. Для установления

уровня экспрессии в качестве нормирования было использовано определение ДНК указанных генов. На основании проведенных экспериментов были получены данные по оптимизации протоколов проведения молекулярно-генетических исследований генов активных метаболитов, кодирующих выработку целлюлазы и лактата на различных питательных средах.

Заключение

Разработанная молекулярно-генетическая система детекции уровня экспрессии генов, участвующих в синтезе лактата и целлюлазы при культивировании штамма *Heyndrickxia coagulans* B.co.80, позволила подобрать питательную среду (состав №2) с оптимальным составом, способствующую получению бактериальной массы с максимальным уровнем экспрессии генов L-лактатдегидрогеназы и полигалактуроназы.

Литература

1. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050 / M. van Dijk, T.Morley, M. Luise, M. van Dijk, T.Morley, M. Luise // Nature Food. 2021. Vol. 2. No. 7. P. 494-501. doi: 10.1038/s43016-021-00322-9
2. Smith D. Internet of animal health things (IoAHT) opportunities and challenges // University of Cambridge: Cambridge, UK. 2015. URL: https://cambridgeservicealliance.eng.cam.ac.uk/system/files/documents/2015JulyCaseStudy-IoAHT_HQP.pdf
3. Rozhkova A. V., Olentsova J. A. Development of the dairy industry in the region // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2020. T. 421. No. 2. P. 022035. doi: 10.1088/1755-1315/421/2/022035
4. Antibiotic residues in milk and dairy products in China: occurrence and human health concerns / C. Niu, M. Yan, Z. Yao, et al. // Environmental Science and Pollution Research. 2023. Vol. 30. No. 53. P. 113138-113150. doi: 10.1007/s11356-023-30312-2
5. Advanced upcycling of agro-industrial co-products of corn via different microorganisms / W. Fan, X. Huang, K. Liu, et al. // Biomass and Bioenergy. 2023. Vol. 168. P. 106669. doi: 10.1016/j.biombioe.2022.106669
6. Antibiotic stewardship in food-producing animals: challenges, progress, and opportunities / S. J. Patel, M. Wellington, R.M. Shah, et al. // Clinical therapeutics. 2020. Vol. 42. No. 9. P. 1649-1658. doi: 10.1016/j.clinthera.2020.07.004
7. The use of antibiotics in food technology: The case study of products from Moscow stores / V. Erofeeva, et al. // E3S Web of Conferences. EDP Sciences, 2021. Vol. 311. P. 10005. doi: 10.1051/e3sconf/202131110005
8. Khattak F., Galgano S. Role of Pre, Pro and Synbiotics in Reducing Zoonotic Pathogen Abundance, Lowering Antimicrobial Resistance and Improving Food Safety: Old Concepts with a New Perspective // Pre and Probiotics for Poultry Gut Health. GB : CABI, 2023. P. 66-84.
9. Bisht V., Das B., Navani N. K. Bacteriocins sourced from traditional fermented foods for ensuring food safety: the microbial guards // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2024. doi: 10.1002/jsfa.13783
10. El Jeni R. et al. Invited review: “Probiotic” approaches to improving dairy production: Reassessing “magic foo-foo dust” // Journal of Dairy Science. 2024. Vol. 107. No. 4. P. 1832-1856. doi: 10.3168/jds.2023-23831
11. The role of probiotics in improving food safety; detoxification of heavy metals and chemicals / F. Ansari, C. Lee, A. Rashidimehr, et al. // Toxin Reviews. 2024. Vol. 43. No. 1. P. 63-91. doi: 10.1080/15569543.2023.2283768
12. Aghamohammad S., Rohani M. Antibiotic resistance and the alternatives to conventional antibiotics: The role of probiotics and microbiota in combating antimicrobial resistance // Microbiological Research. 2023. Vol. 267. P. 127275. doi: 10.1016/j.micres.2022.127275
13. Odeniyi O. A., Onilude A. A., Ayodele M. A. Production characteristics and properties of cellulase/polygalacturonase by a *Bacillus coagulans* strain from a fermenting palm-fruit industrial residue // African Journal of Microbiology Research. 2009. Vol. 3. No. 8. P. 407-417. URL: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/5E6040313637>
14. Production of lactic acid from hemicellulose extracts by *Bacillus coagulans* MXL-9 / S. L Walton, K. M. Bischoff, A. R P van Heiningen, et al. // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2010. Vol. 37. No. 8. P. 823-830. doi: 10.1007/s10295-010-0727-4
15. Fermentative L-lactic acid production using *Bacillus coagulans* from corn stalk deconstructed by an anaerobic microbial community / X. Yang et al. // Fermentation. 2023. Vol. 9. No. 7. P. 611. doi: 10.3390/fermentation9070611

16. Effect of dietary *Bacillus coagulans* on the performance and intestinal microbiota of weaned piglets / T. Sun, H. Miao, Ch. Zhang, et al. // *Animal*. 2022. Vol. 16. No. 7. P. 100561. doi: 10.1016/j.animal.2022.100561
17. Wang Y. Elucidating the role and regulation of a lactate permease as lactate transporter in *Bacillus coagulans* DSM1 // *Applied and Environmental Microbiology*. 2019. Vol. 85. No. 14. P. e00672-19. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108445
18. *Bacillus coagulans* and its spore as potential probiotics in the production of novel shelf-stable foods / A. Poshadri1, H. W. U. M. Deshpande Khodke, et al. // *Current Research in Nutrition & Food Science*. 2022. Vol. 10. No. 3. doi: 10.12944/CRNFSJ.10.3.4
19. A review on *Bacillus coagulans* as a Spore-Forming Probiotic / N. Adibpour, M. Hosseini-zhad, A. Pahlevanlo, et al. // *Applied Food Biotechnology*. 2019. Vol. 6. No. 2. P. 91-100. doi: 10.22037/afb.v6i2.23958

References

1. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050 / M. van Dijk, T. Morley, M. Luise, M. van Dijk, T. Morley, M. Luise // *Nature Food*. 2021. Vol. 2. No. 7. P. 494-501. doi: 10.1038/s43016-021-00322-9
2. Smith D. Internet of animal health things (IoAHT) opportunities and challenges // University of Cambridge: Cambridge, UK. 2015. URL: https://cambridgeservicealliance.eng.cam.ac.uk/system/files/documents/2015JulyCaseStudy-IoAHT_HQP.pdf
3. Rozhkova A. V., Olentsova J. A. Development of the dairy industry in the region // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2020. T. 421. No. 2. P. 022035. doi: 10.1088/1755-1315/421/2/022035
4. Antibiotic residues in milk and dairy products in China: occurrence and human health concerns / C. Niu, M. Yan, Z. Yao, et al. // *Environmental Science and Pollution Research*. 2023. Vol. 30. No. 53. P. 113138-113150. doi: 10.1007/s11356-023-30312-2
5. Advanced upcycling of agro-industrial co-products of corn via different microorganisms / W. Fan, X. Huang, K. Liu, et al. // *Biomass and Bioenergy*. 2023. Vol. 168. P. 106669. doi: 10.1016/j.biombioe.2022.106669
6. Antibiotic stewardship in food-producing animals: challenges, progress, and opportunities / S. J. Patel, M. Wellington, R.M. Shah, et al. // *Clinical therapeutics*. 2020. Vol. 42. No. 9. P. 1649-1658. doi: 10.1016/j.clinthera.2020.07.004
7. The use of antibiotics in food technology: The case study of products from Moscow stores / V. Erofeeva, et al. // E3S Web of Conferences. EDP Sciences, 2021. Vol. 311. P. 10005. doi: 10.1051/e3sconf/202131110005
8. Khattak F., Galgano S. Role of Pre, Pro and Synbiotics in Reducing Zoonotic Pathogen Abundance, Lowering Antimicrobial Resistance and Improving Food Safety: Old Concepts with a New Perspective // *Pre and Probiotics for Poultry Gut Health*. GB : CABI, 2023. P. 66-84.
9. Bisht V., Das B., Navani N. K. Bacteriocins sourced from traditional fermented foods for ensuring food safety: the microbial guards // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2024. doi: 10.1002/jsfa.13783
10. El Jeni R. et al. Invited review: “Probiotic” approaches to improving dairy production: Reassessing “magic food dust” // *Journal of Dairy Science*. 2024. Vol. 107. No. 4. P. 1832-1856. doi: 10.3168/jds.2023-23831
11. The role of probiotics in improving food safety; detoxification of heavy metals and chemicals / F. Ansari, C. Lee, A. Rashidimehr, et al. // *Toxin Reviews*. 2024. Vol. 43. No. 1. P. 63-91. doi: 10.1080/15569543.2023.2283768
12. Aghamohammad S., Rohani M. Antibiotic resistance and the alternatives to conventional antibiotics: The role of probiotics and microbiota in combating antimicrobial resistance // *Microbiological Research*. 2023. Vol. 267. P. 127275. doi: 10.1016/j.micres.2022.127275
13. Odeniyi O. A., Onilude A. A., Ayodele M. A. Production characteristics and properties of cellulase/polygalacturonase by a *Bacillus coagulans* strain from a fermenting palm-fruit industrial residue // *African Journal of Microbiology Research*. 2009. Vol. 3. No. 8. P. 407-417. URL: <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/5E6040313637>
14. Production of lactic acid from hemicellulose extracts by *Bacillus coagulans* MXL-9 / S. L. Walton, K. M. Bischoff, A. R. P. van Heiningen, et al. // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2010. Vol. 37. No. 8. P. 823-830. doi: 10.1007/s10295-010-0727-4
15. Fermentative L-lactic acid production using *Bacillus coagulans* from corn stalk deconstructed by an anaerobic microbial community / X. Yang et al. // *Fermentation*. 2023. Vol. 9. No. 7. P. 611. doi: 10.3390/fermentation9070611
16. Effect of dietary *Bacillus coagulans* on the performance and intestinal microbiota of weaned piglets / T. Sun, H. Miao, Ch. Zhang, et al. // *Animal*. 2022. Vol. 16. No. 7. P. 100561. doi: 10.1016/j.animal.2022.100561
17. Wang Y. Elucidating the role and regulation of a lactate permease as lactate transporter in *Bacillus coagulans* DSM1 // *Applied and Environmental Microbiology*. 2019. Vol. 85. No. 14. P. e00672-19. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108445
18. *Bacillus coagulans* and its spore as potential probiotics in the production of novel shelf-stable foods / A. Poshadri1, H. W. U. M. Deshpande Khodke, et al. // *Current Research in Nutrition & Food Science*. 2022. Vol. 10. No. 3. doi: 10.12944/CRNFSJ.10.3.4
19. A review on *Bacillus coagulans* as a Spore-Forming Probiotic / N. Adibpour, M. Hosseini-zhad, A. Pahlevanlo, et al. // *Applied Food Biotechnology*. 2019. Vol. 6. No. 2. P. 91-100. doi: 10.22037/afb.v6i2.23958