

Bacillus subtilis– võimas salarelv haiguste vastu.

Merli Špitsmeister

Biokeemia ja biotehnoloogia MSc

Probiootikumid on WHO poolt defineeritud kui elus mikroorganismid, mis piisavas koguses manustatuna omistavad peremeesorganismi tervisele positiivset efekti (Cutting, 2011). Lisaks teadatud faktile, et probiootikumid parandavad soole mikrobiootat konkureerides patogeenidega elupaikade pärast, parandavad nad ka soole barjääri funktsiooni ja avaldavad immunomodulatoorset¹ mõju. Uuringud on näidanud, et soole mikrobioota ei mängi rolli ainult seedesüsteemiga seotud infektsioonides ja häiretes, vaid mõjutab kogu organismi tervikuna. (Fujimura et al., 2014, Lin and Zhang, 2017)

Probiootikumidena on siiani peamiselt tuntud ja kasutusel piimhapet tootvad bakterid, *Lactobacillus*´ed ja *Bifidobacterium*´id, ning teised probiootilised bakterid, sh *Bacillus*´ed, on jäänud nende varju. *Bacillus* bakterid on looduses (mullas, vees, õhus) väga laialt levinud ning neid leidub ka toiduainetes, nt teraviljas ja isegi pastöriseeritud ja küpsetatud toodetes. *Bacillus*´te tüvesid on probiootikumidena kasutatud vähemalt 60 aastat, kuid teaduslik huvi *Bacillus*´te kui probiootikumide vastu algas umbes 20 aastat tagasi. Kõige põhjalikumalt uuritud *Bacillus*´te liigid on *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* and *Bacillus licheniformis*. (Cutting, 2011)

Bacillus probiootikumidel on mitmeid eeliseid piimhappebakterite ees. Peamised eelised annab *Bacillus*´te võime moodustada kahjulikes keskkonnatingimustes spoorid². Spoorid on stabiilsed laias pH vahemikus (erinevalt osadest piimhappebakteritest), mistõttu on nad võimelised väga edukalt läbima mao happelise barjääri ja kogu võetud doos jõuab intaktsena soolestikku. Piimhappebakterid on aga tihti tundlikud maohappele ja võivad selle toimele inaktiveeruda. Piimhappebakterid on tundlikud ka temperatuurile, mis tähendab, et nad säilivad külmikus vaid lühikest aega, *Bacillus*´te spoorid sisaldavaid probiootikume võib säilitada aga toatemperatuuril kuivatatud pulbrina pikka aega. (Cutting, 2011, Suva et al., 2016, Lefevre et al., 2017) Lisaks eelnevale on piimhappebakterite kasv aeglane (Suva et al., 2016) ja nad suudavad kasvada vaid aeroobsetes tingimustes. *Bacillus*´ed seevastu on kiire kasvuga ja võimelised kasvama ka hapnikuta, kasutades lämmastikku elektronide aktseptorina (Sorokulova et al., 2013). *Bacillus*´ed on atraktiivsed oma metaboolse aktiivsuse tõttu, mis avaldub nende võimes toota antibiootikume ning erinevaid ensüüme, aminohappeid ja vitamiine (Sorokulova et al., 2013, Olmos and Paniagua-Michel, 2014). Metaboolselt kõige silmapaistvam on *Bacillus subtilis*, kelle genoomist 4-5 % on seotud antibiootikumide tootmisega, tootes 66 erinevat

¹ Immunomodulatoorne – võime muuta või reguleerida immuunfunktsioone.

² Spooride moodustumine sõltub toitainete kättesaadavusest bakteriraku vahetus läheduses. Kui bakter tajub toitainete koguses langust, siseneb ta ümberpööratavasse arengusse, mille tulemusel tekib bakteriaalne spoor. Spoori südames on inaktiivne kondenseerunud kromosoom ning spoori ümbritseb peptidoglükaani rikas kiht ja valgulise materjali kiht, nn spoori mantel.

antibiootikumi. Lisaks sellele toodab *B. subtilis* ka hulgaliselt essentsiaalseid ensüüme (proteolüütilised, lipolüütilised ja tsellulolüütilised). (Sorokulova et al., 2013)

Mil moel *Bacillus*´ed probiootilist toimet omavad, ei ole täielikult selge, kuid arvatakse, et see toimub läbi antimikroobsete ainete tootmise, immuunsüsteemi stimulatsiooni (aidates seeläbi immuunsüsteemil patogeene tõrjuda) ja soole mikrofloora parandamise (konkureeriv kleepumine soole pinnale) (Casula and Cutting, 2002).

B. subtilis´e spooride võimet soolestikus germineeruda, kasvada ja ajutiselt sool koloniseerida on näidatud nii hiirtes (Casula and Cutting, 2002, Tam et al., 2006) kui inimestes (Hong et al., 2009), mis näitab, et nad on adapteerunud elule soolestikus ja neid ei tuleks käsitleda kui pelgalt mulla mikroorganisme, vaid peremeesorganismiga unikaalset sümbiootilist suhet omavat soole mikrofloora liikmeid (Cutting, 2011). *B. subtilis* esineb seedetraktis (ja ka looduses) peamiselt biokilena³, olles seotud limaskestale või toiduosakestele (Hong et al., 2009).

Esimesi tõendeid *B. subtilis*´e positiivsest mõjust inimesele tervisele võib leida juba 600 aasta tagusest ajast, kui leiutati Jaapani populaarne toit Natto, mis kujutab endast *Bacillus subtilis*´ega fermenteeritud sojaubasid (Shurtleff and Aoyagi, 2012). On leitud, et Natto tarbimine aitab ennetada arterioskleroosi, vähendades lipiidide peroksüdatsiooni (Iwai et al., 2002), tüüp 2 diabeeti (Kwon et al., 2010) ja osteoporoosi postmenopausis naistel (Ikeda et al., 2006). Lisaks sellele võib Natto söömine vähendada allergiate teket, aidata tugevdada immuunsust (Shurtleff and Aoyagi, 2012) ning hoida vererõhku kontrolli all (Hayashi et al., 1976).

Bacillus subtilis´t sisaldavad probiootikumid on Aasias laialt levinud ja nendega on läbi viidud ka hulgaliselt kliinilisi uuringuid, mille tulemused on publitseeritud Hiina ja Korea ajakirjades. Nende uuringute ülesehitus on aga paljuski puudulik, mistõttu on saadud tulemusi raske interpreteerida. Vaatamata sellele on need uuringud väärtuslikud, kuna nende põhjal on selgelt näha *B. subtilis*´e positiivset mõju inimese tervisele, aidates näiteks kroonilise kõhulahtisuse, põletikulise soolehaiguse, haavandilise koliidi ja *Helicobacter pylori* nakkuse puhul. (Tompkins et al., 2009)

B. subtilis´t kasutatakse edukalt nii taime-, looma- kui kalakasvatustes. On näidatud, et *B. subtilis* kaitseb taimi seenhaiguste eest (Marten et al., 2000), tõstab vasikate immuunsust läbi immunoglobuliin G (IgG) ja interferoon gamma (IFN-γ) taseme tõstmise (Sun et al., 2010), suurendab karpkalade elulemust, kaalutõusu, hemoglobiini ja valgu taset (Rajesh et al., 2006). *B. subtilis* soodustab ka krevettide kasvu, hoides krevetikasvatustes patogeensete vibrioone kasvu kontrolli all (Vaseeharan and Ramasamy, 2003) ning tootes proteaasi, mis parandab toidu seeditavust (Liu et al., 2009).

B. subtilis on väga efektiivne inimeste kõhulahtisuse ravis (Mazza, 1994), olles isegi efektiivsem kui *Lactobacillid* (Sorokulova, 2013). Ägedate seedetrakti infektsioonide puhul aitab peatada kõhulahtisuse ja kõhuvalu ning taastab soole mikrofloora tasakaalu (Gracheva et al., 1995). *B. subtilis* omab ka tugevat inhibeerivat aktiivsust *Salmonella enteritidis*´e infektsiooni vastu (Thirabunyanon

³ Biokile ehk biofilm on limakihiga ümbritsetud mikroorganismide kooslus, mis tekib piirpindadele. Mikroobsed rakud kleepuvad üksteisega elus või eluta pinnal isetoodetud maatriksil.

and Thongwittaya, 2012). Ägedate seedehäiretega vastsündinutel läbiviidud kliiniline uuring näitas, et *B.subtilis* omab kõrget profülaktilist ja terapeutilist efekti düsbakterioosile ja kõhulahtisusele (Slabospitskaia et al., 1994).

Antibiootikumide tarbimisega seotud kõhulahtisus (AAD) on kõige levinum antibiootikumide tarbimise kõrvalmõju, mis tuleneb soole miklofoora koostise ja koguse muutustest. *B.subtilis*'e tarbimine antibiootikumiravi ajal vähendas märgatavalt AAD esinemist (25,6% ja 7,8%) ja ka teiste antibiootikumide kasutamisega seotud kõrvalmõjusid nagu oksendamine, iiveldus, kõhupuhitus, kõhuvalu. (Horosheva et al., 2014) *B.subtilis*'e positiivset mõju antibiootikumiravi saavatele alla 2 aastastele lastele on nähtud ka juba aastakümneid tagasi (Benoni et al., 1984).

Põletikuline soolehaigus (Inflammatory bowel disease - IBD) on krooniline soolestiku häire, mille tüüpilisteks sümptomiteks on alakõhuvalud, kõhulahtisus, palavik, kaalulangus, aneemia jt. Ravimid, mida põletikulise soole raviks kasutatakse, on küll efektiivsed, kuid kallid ja pikaajalisel kasutamisel kõrvaltoimetega. Seetõttu on hakatud otsima soodsamaid ja turvalisemaid vahendeid IBD leevendamiseks. Kuna soolestiku miklofloora mängib rolli IBD tekkes, on üheks potentsiaalseks abivahendiks probiootikumid. Inimese IBD uurimisel kasutatakse peamiselt rottidel põhinevat mudelit, mille puhul rottides kutsutakse koliit esile trinitrobenseensulfoonhappega (TNBS). Indias läbiviidud uuringus võrreldi *B.subtilis*'e ja konventsionaalse IBD ravimi Mesacoli mõju TNBS-indutseeritud koliidiga rottidele. Leiti, et *B.subtilis* leevendas kõhulahtisust ja aitas ka kaalulanguse peatada, kusjuures Mesacol kaalulangusele ei mõjunud. *B.subtilis*'e tarbimine alandas ka põletikku tekitavate (proinflammatory) tsütokiinide taset, mida Mesacol samuti ei teinud. Põletikuvastaste tsütokiinide taset tõstsid aga mõlemad. (Selvam et al., 2009)

B.subtilis'e võimet alandada põletikku tekitavate tsütokiinide taset on nähtud ka teises uuringus (Zhang et al., 2016). Zhang et al poolt leiti lisaks, et *B.subtilis* muutis soole mikrofloora koostist, vähendades *Acinetobacter sp.*, *Ruminococcus sp.*, *Clostridium spp.* ja *Veillonella sp.* taset (IBD patsientidel on nende bakterite osakaal kõrge) ning tõstes *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, ja *Butyricoccus sp* taset. *B.subtilis*'e võimet suurendada *Lactobacillus*'te arvu ja vähendada *E.coli* hulka on nähtud ka sigade (Guo et al., 2006, Hu et al., 2014) ja kanade (Wu et al., 2011) soolestikus. *Lactobacilli*'de kasvu edendamise põhjuseks võib olla *B.subtilis*'e võime toota katalaasi⁴ ja subtilisiini (valku lagundav ensüüm) (Hosoi et al., 2000). *B.subtilis*'e tarbimine suurendab ka lühikese ahelaga rasvhapete (SCFA) taset, millel on samuti põletikuvastane funktsioon. *B.subtilis*'e positiivne mõju IBD puhul hõlmab seega *B.subtilis*'e võimet mõjutada kasulike ja kahjulike bakterite tasakaalu ning põletikku tekitavate ja põletikuvastaste ainete tasakaalu. (Zhang et al., 2016)

Lisaks eelnevale parandab *B.subtilis* IBD puhul soole epiteeli (füüsiline barjäär soole mikroobide ja soole kudede vahel) funktsiooni ja soole kudede kahjustusi, ülesreguleerides TJ⁵ valkude

⁴ Katalaas – ensüüm, mis kaitseb rakku reaktiivsete hapniku osakeste eest, katalüüsib vesinikperoksiidi lagundamist veeks ja hapnikuks

⁵ Soole epiteeli rakud on omavahel ühendatud transmembraansete TJ (tight junction) valkudega, see on soole esmane barjäär patogeenide ja toksiinide vastu. Muutused TJ valkudes põhjustavad soole barjääri halvenemist, mis viib põletiku ja soolestiku häireteni (Gu et al., 2014).

ekspressiooni ja vähendades TJ komplekside läbitavust (Gu et al., 2014, Gong et al., 2016) ning suurendades mutsiinide⁶ ekspressiooni (Zhang et al., 2016).

Kuna inimese vananedes muutub immuunsüsteem nõrgemaks, on vanemad inimesed vastuvõtlikumad viiruslikele hingamisteede ja sooltepõletikele, mis sageli põhjustavad ka suremust. Hiljutises vanematel inimestel, keskmise vanusega 63,3, läbiviidud uuringus leiti, et *B.subtilis* suurendas oluliselt (45% võrreldes kontrollgrupiga) sekretoorse immunoglobuliin A (SIgA) taset väljaheites ja süljes (Lefevre et al., 2015). SIgA on võtmeelement soole mikrobiota homeostaasi säilitamises ning soolestiku ja hingamisteede kaitses patogeende eest (Mantis and Forbes, 2010, Suva, 2016). Võrreldes platseeboga vähenes *B.subtilis*'t saavatel patsientidel hingamisteede nakkustesse haigestumise sagedus (Lefevre et al., 2015). *B.subtilis* suurendas ka interferoon-gamma (IFN-gamma) taset seerumis (Lefevre et al., 2015). IFN-gamma taseme tõusu *Bacillus*'te poolt on näidatud ka hiirtes (Xu et al., 2012) ja vasikates (Sun et al., 2010). IFN-gamma kaitseb erinevate nakkushaiguste eest, sh viirusinfektsioonid, stimuleerides makrofaagide ja naturaalsete killerrakkude produktsiooni (Suva et al., 2016).

B. subtilis'e võimet toota antibiootikume on märgatud juba üle 60 aasta. Tänapäevaks on teada, et 4-5 % *B. subtilis*'e genoomist on seotud antibiootikumide tootmisega, võimaldades toota 66 erinevat antibiootikumi. (Sorokulova et al., 2013) Peamise osa antimikroobsetest ainetest moodustavad peptiidid, kuid esinevad ka mõned polüketiidid, aminosuhkur, fosfolipiid (Stein, 2005). Peptiidide antimikroobse toime täpne mehhanism pole teada, kuid arvatakse, et nad tekitavad kanaleid ja/või lõhuvad bakterite rakukesta (Sumi et al., 2014). Mõningaid antibiootikume (nt. subtilosin, surfactin, bacilysin) on võimalised tootma paljud *B.subtilis*'e tüved, kuid osad on vaid tüvespetsiifilised (nt. subtilin, ericin ja mersacidin) (Stein, 2005).

B.subtilis'e poolt toodetud lipopeptiidid on madala molekulmassiga pindaktiivsed ained, mis on võimelised muutma piirpindade füüsikalisi ja/või keemilisi omadusi. Kõige tuntum ja enimuuritud *B.subtilis*'e poolt toodetud lipopeptiidne antibiootikum on Surfactin. Arvatakse, et need mõjutavad *B.subtilis*'e ellujäämist oma loomulikus keskkonnas, aidates *B.subtilis*'e rakkudel konkurente samadelt elupaikadelt tõrjuda. Näiteks suudab Surfactin inhibeerida teiste bakterite, sh inimese patogeeni *Salmonella enterica*, biokile moodustumist. (Stein, 2005)

Surfactin toimib hävitavalt mükoplasmale, lagundades viimase membraani. Madalatel kontsentratsioonidel tekitab membraani lekke, kõrgematel lagundab membraani täielikult, mille tagajärjel mükoplasma rakk lõhkeb. Erinevalt nt tetratsükliinist (antibiootikum), mis siseneb mükoplasma rakku ja inhibeerib selle metabolismi, tapab Surfactin mükoplasma koheselt, mistõttu ei ole ohtu resistentsuse tekkeks. Surfactin seondub rakumembraanidele selektiivselt, sõltuvalt membraani lipiidsest koostisest. Surfactin'i rasvhappeline osa eelistab membraaniga seondumiseks kõrge kolesterooli ja fosfolipiidide kontsentratsiooniga kohti. Kuna mükoplasmas on fosfolipiidide osakaal membraanis kõrgem kui eukarüootide rakkudel, on need rakud Surfactin'ile vastuvõtlikumad. (Vollenbroich, et al., 1997)

⁶ Mutsiinid on suured valgud, mis katavad ja kaitsevad epiteeli.

Surfaktin inaktiveerib efektiivselt ka herpes- ja retroviirused ning teised ümbrisega viirused (Vollenbroich, et al., 1997). *B.subtilis*'e viirusevastast toimet on näidatud ka gripiviirusele (Sorokulova et al., 2013). Lisaks eelnevale on leitud, et Surfactin inhibeerib ka inimese rinnavähi rakkude kasvu. (Lee et al., 2012).

B.subtilis'e toodetud antibiootikumid on efektiivsed ka *Helicobacter pylori* vastu. *Helicobacter pylori* nakkus on peamine kroonilise gastriidi ja haavandilise soole põhjustaja ning sooltevähi riskifaktor. Raviks sobivaid antibiootikume on vähe ja resistentsuse tekke oht suur, mistõttu püütakse leida alternatiivseid ravivahendeid. Prantsusmaal läbiviidud uuring näitas, et *B.subtilis* inhibeerib *pylori* kasvu *in vitro*. Samas uuringus isoleeriti ka kaks *B.subtilis*'e poolt toodetud antimikroobset ainet, millest üks identifitseeriti kui amicoumacin A. Identifitseeritud antibiootikum oli väga aktiivne ka *Enterococcus faecium*'i, *Shigella flexneri* ja *C. jejuni* suhtes, kuid ei omanud erilist aktiivsust piimhappebakterite, *E.coli* ega *B.fragilis*'e suhtes. (Pinchuk et al., 2001) *B.subtilis* parandab ka *Helicobacter pylori* raviks kasutatavate tavaravimite toimet ja vähendab nende kõrvalmõjusid (Park et al., 2006.)

Lisaks antibiootikumidele toodab *B.subtilis* ka baktereid hävitavaid ensüüme (Lee and Lee, 2011).

B.subtilis'est võib olla abi kõhukinnisuse puhul. On leitud, et *B.subtilis*'e tarbimine toetab regulaarset sooletegevust (Labellarte, 2014) ning koos laktuloosiga tarbituna on efektiivsem kõhukinnisuse leevendaja kui laktuloos üksi (Liu et al., 2012).

B.subtilis võib aidata ka ülekaalulisuse puhul. Katsed ülekaalulistel hiirtel on näidanud, *B.subtilis* leevendab oksüdatiivset stressi ja lipiidide metabolismi homeostaasi (Lei et al., 2015). *B.subtilis*'est võib abi olla ka atoopilise dermatiidi (Iwasawa et al., 2011) ja igemepõletiku puhul (Tsubura et al., 2009). Lisaks on leitud, et *B.subtilis* toodab DNA-d kaitsvaid aineid ja antioksidante (Prazdnova et al., 2015).

B.subtilis on tunnistanud ohutuks FDA (Food and Drug Administration) poolt (Suva et al., 2016). Toidu koostisosana kasutatavate mikroorganismide puhul on kohustuslik testida nende tundlikkust teatud antibiootikumide suhtes, hindamaks, kas esineb ohtu resistentsuse tekkeks. *B.subtilis* on tundlik kõigile antibiootikumidele, mis on välja toodud Euroopa Toiduohutusameti poolt (vancomycin, gentamycin, anamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol) (Sorokulova et al., 2008, Lefevre et al., 2017). Uuringud on näidanud, et *B.subtilis* on mittepatoogeenne ja inimesele ohutu. *B.subtilis* ei ole tsütotoksiline, ei mõjuta maksa- ja neerufuktsioone, vererõhku ega südame löögisagedust (Lefevre et al., 2017), ei kutsu esile muutusi kudedes (Sorokulova et al., 2008), ega oma hemolüütilist efekti (Sorokulova et al., 2008, Lefevre et al., 2017). Suukaudselt tarbitud *B.subtilis*'e spoorid ei läbi soole limaskesta ja väljutatakse väljaheidetega (Lefevre et al., 2017). *B.subtilis*'e head talutavust on nähtud paljudes kliinilistes uuringutes (Gracheva et al., 1995, Selvam et al., 2009, Horosheva et al., 2014, Lefevre et al., 2015). *B.subtilis*'e ohutuse kasuks räägib ka pikk ajalugu *B.subtilis*'t sisaldavate toitude (natto, ogiri, ugba jt) ohutul tarbimisel Aafrika ja Aasia maades (Lefevre et al., 2017).

Kokkuvõte

Arvukad teadusuuringud on tõestanud, et inimese tervislik seisund sõltub väga suures osas soole mikrobiotast, mistõttu on selle tasakaalus hoidmine hea tervise tagamiseks ülioluline. Soole mikrofloorat aitavad tasakaalustada probiootikumid. Kuni tänaseni on probiootikumidena peamiselt käsitletud piimhappebaktereid, kuid aina rohkem on hakanud tuntust koguma ka teised bakterid, nt *Bacillus*'ed. Viimaste silmapaistvaim esindaja on *B.subtilis*, kelle potentsiaali probiootikumina on viimastel aastakümnetel laialdaselt uuritud. Lisaks kasulike ja kahjulike bakterite tasakaalu mõjutamisele omistab *B.subtilis* positiivset efekti inimese tervisele veel mitmel muul moel:

- Tootes antimikroobseid aineid (antibiootikumid ja ensüümid), mis on otseselt haigustekitajaid hävitava toimega.
- Tootes ensüüme, mis aitavad kaasa seedesüsteemi tööle.
- Stimuleerides immuunsüsteemi haigustekitajatega võitlema.
- Parandades soole barjääri füüsilist seisundit, tõkestades seeläbi patogeenide pääsu vereringesse.
- Mõjutades põletikku tekitavate ja põletikuvastaste ainete tasakaalu.

Arvukad teaduslikud ja kliinilised uuringud on näidanud, et *B.subtilis* on väga mitmekülgne ja atraktiivne probiootikum, kellest võib abi olla paljude erinevate tervisehädade puhul:

- Leevendab põletikulise soolehaiguse sümptomeid.
 - Inhibeerib *Helicobacter pylori* kasvu ning parandab *H.pylori* raviks kasutatavate tavaravimite toimet ja vähendab nende kõrvalmõjusid.
 - Tõstab vanematel inimestel immuunsust, vähendades haigestumist hingamisteede ja seedesüsteemi nakkustesse.
 - Vähendab antibiootikumidega seotud kõhulahtisust ja teisi antibiootikumide kasutamisega seotud kõrvalmõjusid.
 - On efektiivne ägedate seedetrakti infektsioonide puhul, sh Salmonella.
 - On efektiivne kroonilise kõhulahtisuse puhul.
 - On viirusevastase toimega.
 - On mükoplasma vastase toimega.
 - Toetab regulaarset sooletegevust, leevendades kõhukinnisust.
 - Võib aidata ka atoopilise dermatiidi, ülekaalu ja diabeedi puhul.
-

B.subtilis’e ohutust ja mittepatogeensust on kinnitatud mitmete uuringutega ning *B.subtilis* on tunnustatud ohutuks ka FDA poolt. *B.subtilis*’e multifunktsionaalsus ja korduvalt tõestatud efektiivsus näitavad, et *B.subtilis*’el on potentsiaali tõusta ohutuks, efektiivseks ja soodsaks alternatiiviks antibiootikumide jt ravimite kasutamisele erinevate haigusseisundite puhul.

Kasutatud kirjandus

Benoni, G., Marcer, V., Cuzzolin, L., & Raimo, F. (1984). Antibiotic administration and oral bacterial therapy in infants. *Chemioterapia: international journal of the Mediterranean Society of Chemotherapy*, 3(5), 291-294.

Casula, G., & Cutting, S. M. (2002). Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2344-2352.

Cutting, S. M. (2011). Bacillus probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220.

Fujimura, K. E., Slusher, N. A., Cabana, M. D., & Lynch, S. V. (2010). Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert review of anti-infective therapy*, 8(4), 435-454.

Gong, Y., Li, H., & Li, Y. (2016). Effects of Bacillus subtilis on epithelial tight junctions of mice with inflammatory bowel disease. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 36(2), 75-85.

Gracheva, N. M., Gavrilov, A. F., Solov'eva, A. I., Smirnov, V. V., Sorokulova, I. B., Reznik, S. R., & Chudnovskaia, N. V. (1995). The efficacy of the new bacterial preparation biosporin in treating acute

Gu, M. J., Song, S. K., Park, S. M., Lee, I. K., & Yun, C.-H. (2014). *Bacillus subtilis* Protects Porcine Intestinal Barrier from Deoxynivalenol via Improved Zonula Occludens-1 Expression. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(4), 580–586. <http://doi.org/10.5713/ajas.2013.13744>

Guo, X., Li, D., Lu, W., Piao, X., & Chen, X. (2006). Screening of Bacillus strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of Bacillus subtilis MA139 in pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90(2), 139-146.

Hayashi, U., Nagao, K., Tosa, Y. & Yoshioka, Y. (1976). Relationship between food containing "Natto"(fermented soybeans) and the blood pressure of SHR. *Japanese heart journal*, 17(3), 343-344.

Hong, H. A., Khaneja, R., Tam, N. M., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M., ... & Cutting, S. M. (2009). Bacillus subtilis isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in microbiology*, 160(2), 134-143.

Horosheva, T. V., Vodyanoy, V., & Sorokulova, I. (2014). Efficacy of Bacillus probiotics in prevention of antibiotic-associated diarrhoea: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *JMM Case Reports*, 1(3).

- Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K., & Kaminogawa, S. (2000). Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(10), 892-897.
- Hu, Y., Dun, Y., Li, S., Zhao, S., Peng, N., & Liang, Y. (2014). Effects of *Bacillus subtilis* KN-42 on growth performance, diarrhea and faecal bacterial flora of weaned piglets. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(8), 1131-1140.
- Ikeda, Y., Iki, M., Morita, A., Kajita, E., Kagamimori, S., Kagawa, Y., & Yoneshima, H. (2006). Intake of fermented soybeans, natto, is associated with reduced bone loss in postmenopausal women: Japanese Population-Based Osteoporosis (JPOS) Study. *The journal of nutrition*, 136(5), 1323-1328.
- Iwai, K., Nakaya, N., Kawasaki, Y., & Matsue, H. (2002). Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(12), 3597-3601.
- Iwasawa, D., Kamimura, Y., Yasuda, M., Matsumura, M. & Shimada, T. (2011). Clinical and histopathological evaluation of *Dermatophagoides farinae*-induced dermatitis in NC/Nga mice orally administered *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(5), 649-654.
- Kwon, D. Y., Daily, J. W., Kim, H. J., & Park, S. (2010). Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. *Nutrition Research*, 30(1), 1-13.
- Labellarte, G. M. (2014). *Tolerance and Efficacy of a Probiotic Supplement Delivered in Capsule Form* (Doctoral dissertation, University of Wisconsin-La Crosse).
- Lee, H. S., & Lee, H. (2011). Purification and biochemical characterization of bacteriolytic enzyme from *Bacillus subtilis* YU-1432 active against *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(4), 600-605.
- Lee, J. H., Nam, S. H., Seo, W. T., Yun, H. D., Hong, S. Y., Kim, M. K., & Cho, K. M. (2012). The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chemistry*, 131(4), 1347-1354.
- Lefevre, M., Racedo, S. M., Ripert, G., Housez, B., Cazaubiel, M., Maudet, C., ... & Urdaci, M. C. (2015). Probiotic strain *Bacillus subtilis* CU1 stimulates immune system of elderly during common infectious disease period: a randomized, double-blind placebo-controlled study. *Immunity & Ageing*, 12(1), 24.
- Lefevre, M., Racedo, S. M., Denayrolles, M., Ripert, G., Desfougères, T., Lobach, A. R., ... & Urdaci, M. C. (2017). Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 83, 54-65.
- Lei, K., Li, Y. L., Wang, Y., Wen, J., Wu, H. Z., Yu, D. Y., & Li, W. F. (2015). Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* B10 on biochemical and molecular parameters in the serum and liver of high-fat diet-induced obese mice. *Journal of Zhejiang University Science B*, 16(6), 487-495.
- Lin, L., & Zhang, J. (2017). Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC immunology*, 18(1), 2.
- Liu, C. H., Chiu, C. S., Ho, P. L., & Wang, S. W. (2009). Improvement in the growth performance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by a protease-producing probiotic, *Bacillus subtilis* E20, from natto. *Journal of applied microbiology*, 107(3), 1031-1041.
-

- Liu, Y. P., Liu, X., & Dong, L. (2012). Lactulose plus live binary *Bacillus subtilis* in the treatment of elders with functional constipation. *Zhonghua yi xue za zhi*, 92(42), 2961-2964.
- Mantis, N. J., & Forbes, S. J. (2010). Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders. *Immunological investigations*, 39(4-5), 383-406.
- Marten, P., Smalla, K., & Berg, G. (2000). Genotypic and phenotypic differentiation of an antifungal biocontrol strain belonging to *Bacillus subtilis*. *Journal of applied microbiology*, 89(3), 463-471.
- Mazza, P. (1994). The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. *Bollettino chimico farmaceutico*, 133(1), 3-18.
- Olmos, J., & Paniagua-Michel, J. P. (2014). *Bacillus subtilis* a potential probiotic Bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *Microb & Biochem Technol*, 6(7), 361-365.
- Park, S. K., Park, D. I., Choi, J. S., Kang, M. S., Park, J. H., Kim, H. J., ... & Kim, B. I. (2006). The effect of probiotics on *Helicobacter pylori* eradication. *Hepato-gastroenterology*, 54(79), 2032-2036.
- Pinchuk, I. V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I. B., Mégraud, F., & Urdaci, M. C. (2001). In Vitro Anti-*Helicobacter pylori* Activity of the Probiotic Strain *Bacillus subtilis* 3 Is Due to Secretion of Antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(11), 3156-3161.
- Prazdnova, E. V., Chistyakov, V. A., Churilov, M. N., Mazanko, M. S., Bren, A. B., Volski, A., & Chikindas, M. L. (2015). DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933. *Letters in applied microbiology*, 61(6), 549-554.
- Rajesh, K., Mukherjee, S. C., Prasad, K. P., & Pal, A. K. (2006). Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp, *Labeo rohita*. *Aquaculture Research*, 37, 1215-1221.
- Selvam, R., Maheswari, P., Kavitha, P., Ravichandran, M., Sas, B., & Ramchand, C. N. (2009). Effect of *Bacillus subtilis* PB6, a natural probiotic on colon mucosal inflammation and plasma cytokines levels in inflammatory bowel disease. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 46(1), 79-85.
- Shurtleff, W., & Aoyagi, A. (2012). *History of Natto and Its Relatives (1405-2012)*. Soyinfo Center.
- Slabospitskaia, A. T., Vinogradov, V. P., Krymovskaia, S. S., Reznik, S. R., & Smirnov, V. V. (1994). A new preparation of biosporin and its effect on the intestinal microflora in dysbacterioses in newborn infants. *Mikrobiolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993)*, 57(1), 71-76.
- Sorokulova, I. B., Pinchuk, I. V., Denayrolles, M., Osipova, I. G., Huang, J. M., Cutting, S. M., & Urdaci, M. C. (2008). The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Digestive diseases and sciences*, 53(4), 954-963.
- Sorokulova, I. (2013). Modern status and perspectives of *Bacillus* bacteria as probiotics. *J. Prob. Health*, 1(4).
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4), 845-857.
- Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I. C., & Hahm, Y. T. (2014). Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian journal of microbiology*, 61(2), 93-103.

- Sun, P., Wang, J. Q., & Zhang, H. T. (2010). Effects of *Bacillus subtilis* natto on performance and immune function of preweaning calves. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5851-5855.
- Suva, M. A., Sureja, V. P., & Kheni, D. B. (2016). Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: Mechanism of action and clinical applications. *Journal of Current Research in Scientific Medicine*, 2(2), 65.
- Zhang, H. L., Li, W. S., Xu, D. N., Zheng, W. W., Liu, Y., Chen, J., ... & Liu, J. (2016). Mucosa-repairing and microbiota-balancing therapeutic effect of *Bacillus subtilis* alleviates dextrate sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(4), 2554-2562.
- Tam, N. K., Uyen, N. Q., Hong, H. A., Duc, L. H., Hoa, T. T., Serra, C. R., ... & Cutting, S. M. (2006). The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of bacteriology*, 188(7), 2692-2700.
- Thirabunyanon, M., & Thongwittaya, N. (2012). Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella* Enteritidis infection. *Research in veterinary science*, 93(1), 74-81.
- Tompkins, T., Xu, X., & Ahmarani, J. (2009). A comprehensive review of post-market clinical studies performed in adults with an Asian probiotic formulation. *Beneficial microbes*, 1(1), 93-106.
- Tsubura, S., Mizunuma, H., Ishikawa, S., Oyake, I., Okabayashi, M., Katoh, K., ... & Toda, T. (2009). The effect of *Bacillus subtilis* mouth rinsing in patients with periodontitis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 28(11), 1353.
- Vaseeharan, B. A. R. P., & Ramasamy, P. (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in applied microbiology*, 36(2), 83-87.
- Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M., & Vater, J. (1997). Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1), 44-49.
- Vollenbroich, D., Özel, M., Vater, J., Kamp, R. M., & Pauli, G. (1997). Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 25(3), 289-297.
- Wu, B. Q., Zhang, T., Guo, L. Q., & Lin, J. F. (2011). Effects of *Bacillus subtilis* KD1 on broiler intestinal flora. *Poultry science*, 90(11), 2493-2499.
- Xu, X., Huang, Q., Mao, Y., Cui, Z., Li, Y., Huang, Y., ... & Li, W. (2012). Immunomodulatory effects of *Bacillus subtilis* (natto) B4 spores on murine macrophages. *Microbiology and immunology*, 56(12), 817-824.