
ПРОБИОТИКИ НА ОСНОВЕ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ И ИХ БЕЗОПАСНОСТЬ

В.Д. Похиленко, В.В. Перелыгин

ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии,
отдел биотехнологий, пос. Оболенск, Московская обл.

О пользе для здоровья пробиотиков свидетельствуют наличие устойчивого рынка разнообразных продуктов, содержащих живые бактерии, а также многочисленные публикации, подтверждающие с научной точки зрения механизмы пробиозиса – выгодного содружества животных организмов с определенными группами автохтонных микроорганизмов. Хотя большинство бактерий, обладающих пробиотическими свойствами, являются представителями семейств *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, все чаще в таком качестве стали использоваться и спорообразующие бактерии, в особенности из рода *Bacillus*. Несмотря на то, что ученые все еще спорят о правомерности принудительного «насаждения нормальной микрофлоры», в продажу выпускается огромное количество лекарственных средств, биологически активных добавок и продуктов функционального питания, которые содержат не только молочнокислые, но и спорообразующие бактерии пробиотического действия. Всемирная организация здравоохранения совместно с Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных наций разработала четкие рекомендации по оценке продуктов пробиотического направления. Так, бактерии, входящие в состав такого рода продуктов, рекомендовано депонировать в международно признанном депозитарии микроорганизмов, идентифицировать валидированными методами, а их пробиотические свойства и безопасность должны быть доказаны экспериментами на лабораторных животных и подтверждены клиническими испытаниями. В этом обзоре представлены данные литературы, посвященные характеристике, эффективности и безопасности различных представителей спорообразующих бактерий, используемых в качестве пробиотиков.

The fact that probiotics are useful for human health is confirmed by stable marketing various products comprising live bacteria, as well as by numerous papers scientifically describing mechanisms underlying the process of probiosis, a beneficial co-existence between animal microorganisms and certain groups of autochthonic microorganisms. Although most bacteria possessing probiotic properties are representatives of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, spore-forming bacteria, in particular of the genus *Bacillus*, are becoming popular as probiotics either. While scientists worldwide are debating the rightfulness of “forcible introduction of normal microbiota”, manufacturers are producing a great body of drugs, biologically active supplements, and products of functional nutrition on the basis of not only lactic acid, but also some spore-forming bacteria, which, as they believe, are producing probiotic effects. The World Health Organization along with the Food and Agriculture Organization has developed clear recommendations for testing products of such kind. For example, bacteria entering any such formulation should be deposited in an internationally recognized depository of microorganisms and identified by validated methods, and their probiotic properties and safety should be confirmed by results from experiments on laboratory animals and clinical trials. The review presents reported data on characterization, efficacy and safety of different representatives of spore-forming bacteria as probiotics.

Традиционные и новые взгляды на качественный состав пробиотиков

Обнаруженный И.И. Мечниковым еще в начале 20-го века положительный эффект от приема простокваши с живыми лактобактериями, состоявший в улучшении здоровья потребителей в процессе модификации кишечной мик-

рофлоры, был обозначен как пробиозис (probiosis). Феномен пробиозиса определяется как «ассоциация двух организмов, которая стимулирует жизненные процессы каждого из них» [1], а «живая микробная кормовая добавка, которая оказывает полезное действие на животное-хозяина путем улучшения его кишечного микробного баланса» [2], получила название про-

биотика. Чтобы быть включенными в группу пробиотиков микроорганизмы должны соответствовать следующим критериям: 1) выживать при пассировании через желудочный тракт, что предполагает их резистентность к кислоте и желчи; 2) адгезироваться на эпителиальных клетках кишечника с последующей колонизацией; 3) стабилизировать кишечную микрофлору; 4) не иметь признаков патогенности; 5) сохранять жизнеспособность как в пищевых продуктах, так и в процессе получения фармакопейных лиофилизированных препаратов; 6) быстро размножаться, колонизируя кишечный тракт, и 7) персистировать с проявлением родовых свойств пробиотиков. Указанным критериям в наибольшей степени соответствует автохтонная группа содружественных микроорганизмов, включающая таких постоянных обитателей кишечной экосистемы, как лакто- и бифидобактерии, кишечная палочка [3, 4].

Как показали практические наблюдения, пробиотические эффекты могут быть вызваны и некоторыми группами аллохтонных микроорганизмов. Примером тому служит пробиотическое использование культуры дрожжей *Saccharomyces boulardii*, которые не являются нормофлорой желудочно-кишечного тракта человека, но вместе с тем способны предотвращают повторение псевдомембранного колита, вызываемого *Clostridium difficile*. Протеаза, секретируемая *S. boulardii*, разрушает токсин *Cl. difficile*, образуемый на поверхности эпителиальных клеток кишечника [5]. Оказалось, что некоторые представители обширной группы спорообразующих бактерий – *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* своим присутствием способны предотвращать кишечные расстройства, и порой даже в большей степени, чем традиционные пробиотики на основе лакто- и бифидобактерий [6–11]. Вместе с тем спорообразующие бактерии в качестве пробиотиков применяются все же реже и с большими ограничениями, чем лакто- и бифидобактерии. Главными сдерживающими факторами является родство спорообразующих бактерий с патогенными и токсигенными видами такими как *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, а также то, что они в большинстве чужеродны микрофлоре кишечного тракта.

Основной целью данной работы является анализ данных, посвященных исследованию свойств и безопасности спорообразующих бактерий как пробиотиков.

Пробиотические препараты на основе спорообразующих бактерий

Способность спорообразующих бактерий оказывать пробиотическое действие привела к разработкам на их основе препаратов, отнесенных к поколению так называемых «самоэлиминирующихся антагонистов» [12]. В итоге на сегодняшний день в мире создано более полусотни таких препаратов, которые полностью или частично составлены на основе спороформирующих бактерий (табл. 1 и 2). В табл. 1 представлены общие сведения по номенклатуре наиболее известных препаратов на основе спорообразующих бактерий, выпускаемых за рубежом. В истории этих препаратов имели место некоторые вольности в названии видов и штаммов микроорганизмов, что вносило путаницу при повторном анализе их составов (см. сноску к табл. 1). В этой связи, чтобы избежать дальнейших ошибок, были разработаны положения о современной номенклатуре (List of Bacterial names with Standing in Nomenclature, LBSN) микроорганизмов, которые можно найти на сайте www.bacterio.net [13].

Российскими учеными на основе представителей рода *Bacillus* и других спорообразующих микробов заявлены на сегодняшний день около 25 наименований препаратов и часть из них производится для нужд медицины и ветеринарии (табл. 2).

Бактиспорин, представляющий собой лиофилизированные живые бактерии *B. subtilis* штамма № 3Н [14], выпускается Государственным институтом кровезаменителей и медпрепаратов (г. Москва) и в ГУП «Иммуннопрепарат» (г. Уфа). Являясь препаратом широкого спектра действия и обладая устойчивостью к ряду антибиотиков, он показан при острых кишечных инфекциях (в том числе дизентерия, сальмонеллез); дисбактериозе кишечника различного генеза (в том числе с аллергодерматозом и пищевой аллергией), бактериальном вагините, а также в профилактике гнойно-септических осложнений в послеоперационном периоде [15, 16].

Таблица 1. Зарубежные биопрепараты на основе спорообразующих бактерий

Название продукта	Производитель	Действующее начало*	Область применения
Бактисубтил (Bactisubtil)	Hoechst Marion Merrell S.A. Bourgoin-Jallieu, France	<i>B. cereus</i> um. IP 5832 (ATCC 14893)	Медицина
Флонивин БС	ICN Galenika, Югославия (ныне Galenika A.D., Serbia)	<i>B. cereus</i> um. IP 5832	То же
Био-вита, Miyarisan Vita, Miyarisan-FG	Nupharm Co., Ltd, Южная Корея	То же, а также <i>B. subtilis</i> и <i>Lb. sporogenes</i> (<i>Bacillus coagulans</i>)	Медицина
БиоПлюс 2Б (С, Б)	Biochem GmbH, Germany ООО «БиоПрогресс», Россия (Воронеж)	<i>B. subtilis</i> DSM 5750(CH201), <i>B. lichemiformis</i> DSM 5749 (CH200)	Ветеринария
Биоспорин, бактерин-СЛ, гинеспорин, эндоспорин, БПС-44	Украина	<i>B. subtilis</i> ВКПМ 2335 (NB 2335), <i>B. lichemiformis</i> ВКПМ 2336 (NB 2336)	Медицина, ветеринария
Biosubtyl «Nha Trang»	Biophar Co. Ltd., Nha Trang, Vietnam	« <i>B. subtilis</i> » (<i>B. pumulis</i>)	То же
Biosubtyl «Dalat»	National Institute of Vaccines and Biological Substances, Da Lat, Vietnam	« <i>B. subtilis</i> » (<i>B. cereus</i>)	То же
Bithree	Cheil Jedang Corp, Южная Корея	<i>B. mesentericus</i> Тоа, <i>Clostridium butyricum</i> Тоа, <i>Strep. faecalis</i> T-110	Медицина
Glogen-8	США	<i>B. subtilis</i> (natto)	Ветеринария
Domuvar	Consorzio Farmaceutico e Biotecnologico Bioprogress a.r.i., Anagni-FR, Italy	« <i>B. subtilis</i> » (<i>B. clausii</i>)	Медицина
Enterogermina	Sanofi Winthrop, Milan, Italy	« <i>B. subtilis</i> » (<i>B. clausii</i>)	То же
Flora-Balance	Flora-Balance, Montana, USA BOD	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Медицина
Lactipan plus	Istituto Biochimico Italiano S.p.A., Milan, Italy	« <i>L. sporogenes</i> » (<i>Bacillus coagulans</i>)	То же
Lacbon, Lacris	Uni-Sankyo, Япония	То же	То же
Lactospore	Sabinsa Corp., Piscataway, NJ, США	« <i>L. sporogenes</i> » (<i>Bacillus coagulans</i>)	То же
Medilac	Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd., Корея и Китай	<i>B. subtilis</i> R0179, <i>Enterococcus faecium</i>	То же
Miyarisan	Miyarisan-pharmaceutical Co, Ltd, Япония	<i>Clostridium butyricum miyari</i> П588	То же
Miyairi S (P)	Handong Co, Южная Корея	То же	То же
Nature's First Food	Nature's First Law, San Diego, CA, США	Смесь из 42 шт. в том числе <i>Br. laterosporus</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumulis</i>	То же
Primalas, Protexin	Netherlands	<i>Bacillus spp</i>	Ветеринария
Subtyl	Pharmaceutical Factory 24, Ho Chi Minh City, Vietnam	« <i>B. subtilis</i> » (<i>B. vietnami</i>)	Медицина
Цереобиоген	Xing Jian, Китай	<i>B. cereus</i> DM-423	То же

* В кавычках – вначале некорректно заявленные микроорганизмы, в скобках – уточненные названия [17, 18].

Таблица 2. Пробиотики, биодобавки, биомази на основе бацилл, разработанные в России

Препараты	Действующее начало	Область применения
Бактиспорин	<i>Bacillus subtilis</i> , ум. 3Н	Медицина: профилактика и лечение кишечных инфекций, бактериальных вагинозов, послеоперационных осложнений
Биоспорин*	<i>Bacillus subtilis</i> , ум. ВКПМ-В2335 <i>B. licheniformis</i> , ум. ВКПМ В2336	
Ветом 1.1	<i>Bacillus subtilis</i> , ум. ВКПМ-7092	Ветеринария: лечение и профилактика острых кишечных инфекций, стимуляция роста развития молодняка сельскохозяйственных животных и птицы
Ветом 1.29	<i>B. subtilis</i> , ум. ВКПМ-7092, канамицин	
Ветом 2	<i>B. subtilis</i> , ум. ВКПМ В 7048 и <i>B. licheniformis</i> , ум. ВКПМ В 7038	
Ветом 3	<i>B. subtilis</i> , ум. ВКПМ В 7048	
Ветом 4	<i>B. licheniformis</i> , ум. ВКПМ В 7038	
Ветоцил	<i>B. subtilis</i> , ум. ВКПМ-7092, цеолит	
Коредон (ВетКор**)	<i>B. subtilis</i> , ум. ВКПМ-7092	
Витаспорин	<i>Bacillus subtilis</i> 11В ВКМ В-2218Д	
Биосептин (мазь)	<i>B. licheniformis</i> , ВКПМ В-7038, <i>B. subtilis</i> , ВКПМ В-7048, <i>B. subtilis</i> , ВКПМ В-7092	Ветеринария
Интестевит С	Смесь <i>Bacillus spp.</i> , <i>Bifidum globosum</i> , <i>Str. faecium</i>	
Биокорм Пионер	<i>B. subtilis</i>	
Бацилоспорин	<i>Bacillus sp.</i> ВКПМ В-4401	
Ветбактерин	<i>Bacillus pulvifaciens</i> ум. В-4348	
РАС	<i>B. subtilis</i> ум. 534 РАС	
Споробактерин	<i>B. subtilis</i> ум. 534	
Споровит	<i>B. subtilis</i> 12В	Звероводство, домашние животные
Субалин*	<i>B. subtilis</i> , ум. ВКПМ-В 4759 (2335/105)	Ветеринария
Субтилис	<i>B. subtilis</i> и <i>B. licheniformis</i>	Ветеринария, рыбное хозяйство
Сахабактисубтил	<i>B. subtilis</i> ТНП-3	Ветеринария
Целлобактерин	<i>Clostridium thermocellulociticus</i> , <i>Ruminococcus olbus</i> , <i>Clostridium lochheadii</i>	Ветеринария
Эндобактерин	<i>Bacillus pulvifaciens</i> ум. 535	Ветеринария

* Разработка НИИ микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, штаммы зарегистрированы во Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ, ныне – Всероссийская КПМ).

** Переименован из-за подделок.

*** Совместная разработка ГНЦВБ «Вектор» – НИИ микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины (аналог Ветом 1.1).

Споробактерин жидкий и лиофилизированный разрешен для клинического применения приказом № 353 МЗ РФ с теми же показателями, что и Бактиспорин [19]. В 1 мл жидкой формы препарата содержится 10 млрд. живых микробных тел (споры и палочки) штамма

B. subtilis 534, а его производит ООО «Бакорен» из г. Оренбурга [20].

Научно-производственная фирма «Исследовательский центр» и ООО «Соджи» (г. Кольцово, Новосибирск) с 1997 г. выпускает пробиотики серии Ветом, а также Субалин и Коредон

(табл. 2). Отличительной особенностью этих препаратов является использование рекомбинантного штамма ВКПМ В-7092 культуры *B. subtilis* с плазмидой рВМВ 105, способного продуцировать человеческий лейкоцитарный альфа-2-интерферон [21]. Препараты указанной серии успешно применяются для профилактики и лечения диарей, бактериальных, вирусных и паразитарных болезней, для коррекции иммунодефицитных состояний и улучшения функционирования желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных, домашних и диких животных (в том числе птицы и пушных зверей), а также для стимуляции роста и развития молодняка, получения дополнительных привесов животных и т. д. [22].

Препарат медицинского назначения Биоспорин создан в Киевском НИИ микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного (Украина) на основе природных штаммов *B. subtilis* и *B. licheniformis* и производится в Днепропетровском АОА «Днепрофарм» [23, 24]. Биоспорин предназначен для лечения детей и взрослых, страдающих острыми кишечными инфекциями (ОКИ) различных форм тяжести, вызванными патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, для лиц, перенесших ОКИ, для коррекции микрофлоры кишечника при дисбактериозах, возникших в результате антибиотикотерапии и пр. [25].

ГУДП «Биофаг» и ГУП «Иммунопрепарат» (г. Уфа) выпускают лечебные препараты Вита-спорин и Споровит на основе штаммов *B. subtilis* 11В ВКМ В-2218Д и *B. subtilis* 12В, соответственно [26]. Первый из них используется в медицине, второй – для домашних животных, пушных зверей. Для лечения неинфицированных ран, гнойно-некротических процессов, ожогов и дерматитов у животных изготавливается мазь Биосептин, которая содержит споры *B. subtilis* и *B. licheniformis* [27].

Центром медико-ветеринарных экологических исследований (ЦМВЭИ) совместно с Всероссийским Государственным НИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов (ВГНКИ) Минсельхоза РФ разработаны пробиотические добавки Интестевит [28] и Биокорм Пионер [29]. Первый препарат содержит сухие культуры *Bifidobacterium globosum*, *Enterococcus faecium* и *Bacillus subtilis*, второй –

два штамма *B. subtilis*. Они предназначены для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний у молодняка животных, птиц, для коррекции микробного пейзажа после антибиотико- и химиотерапии, а также для повышения сохранности животных и птицы [30].

Для лечения и профилактики дисбактериозов и аллергий у животных на основе штамма *Bacillus spp.* № ВКПМ В-4401 разработан препарат Бацилоспорин [31]. С такой же целью на основе генетически измененного штамма *B. subtilis* Волгоградским научно-исследовательским противочумным институтом создан лечебно-профилактический препарат РАС [16].

Фирмой «НИИ Пробиотиков» (г. Москва) на основе *B. subtilis* и *B. licheniformis* (штаммы депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов Федерального Биологического Центра РАН) разработан и выпускается препарат Субтилис. Он предназначен для профилактики и лечения дисбактериоза у животных, птиц и рыб, диареи, легочных инфекций, эндометритов, острых маститов у крупного рогатого скота, санации мест содержания животных [32].

На основе штаммов *B. subtilis* в Республике Саха (Якутия) был разработан и применяется для коррекции микробиоценоза гениталий у коров пробиотик Сахабактисубтил [33].

Целлобактерин – препарат, сочетающий свойства мощного кормового фермента (способен расщеплять подсолнечный шрот, повышать питательную ценность злаков) и пробиотика, стал продуктом совместной разработки ООО «Биотроф» (г. Санкт-Петербург) и НИИ сельскохозяйственной микробиологии [34].

Препарат Эндобактерин, созданный на основе штамма 535 *Bacillus pulvifaciens*, показан для профилактики и лечения бактериальных и грибковых инфекций у свиней, крупного рогатого скота, овец, коз, пушных зверей, домашних животных и птиц [35], а также мастита у коров [36]. Еще ранее на основе этого вида бацилл был запатентован препарат Ветбактерин, который рекомендовался для профилактики и лечения пневмоний, диспепсий, отежной болезни, маститов у животных [37]. Менее известны комплексные препараты, в состав которых помимо представителей рода *Bacillus* входили другие микроорганизмы. Так, С.Р. Резник и др. [38] описали синергидный эффект препарата

Споролакт, полученного ими из смеси двух ранее известных – Бактерина-СЛ (*B. subtilis* 2335, *B. licheniformis* 2336) и Лактобактерина (*Lb. fermentum*). Бактоцеллолактин и Субтикол созданы на основе трех родов бактерий – *B. subtilis*, *Lb. plantarum*, *Ruminococcus albus* и *B. subtilis* 3, *E. coli* M-17, *B. licheniformis* 31, соответственно [16].

Краткая характеристика спорообразующих бактерий

Род *Bacillus*. Этот род, насчитывающий 77 видов [13], объединяет обширную группу строго аэробных или факультативно анаэробных грамположительных хемоорганотрофных микроорганизмов палочковидной формы, образующих термоустойчивые эндоспоры. Типовой вид – *B. subtilis* (Ehremberg) Cohn 1872, 174 [39]. Примечательно, что *B. subtilis* и *B. cereus* стали известны как микроорганизмы, с помощью которых создавали анаэробные условия роста [40]. Особенностью этой группы бактерий является широкий диапазон G+C пар оснований – от 32 до 69 мольн. % [41].

Род *Bacillus* обычно связан с почвой, но его представители также выделяется из воды, пыли и воздуха. Эти бактерии могут вызывать порчу продуктов питания – картошки, хлеба, молока. Терморезистентные споры бацилл создают проблемы в производстве сухого молока, которые не погибают в процессе обезвоживания и попадают в готовые продукты. Представители *Bacillus* отличаются высоким и разнообразным спектром биологической активности. Часто обладая явным антагонизмом к патогенным микроорганизмам, они продуцируют целый ряд ферментов, лизирующих крахмал, пектины, целлюлозу, жиры, белки, производят различные аминокислоты и антибиотики [42–44]. На Востоке вошло в традицию использование бацилл при ферментации некоторых продуктов питания. Например, при помощи штамма *Bacillus natto* (*subtilis*) готовят национальное японское блюдо «Натто» – специальным образом ферментированные бобы [45]. В отношении кишечного тракта человека виды *Bacillus* являются аллохтонными микроорганизмами, которые попадают туда в результате либо случайного поедания, либо осознанного употребления в пищу ферментированных продуктов питания.

Несмотря на то, что представители *Bacillus* в норме не колонизируют кишечный тракт у человека и не являются его обитателями, тем не менее, существует более двух десятков пробиотических препаратов, полученных на основе таких видов как *coagulans*, *subtilis*, *clausii*, *cereus*, *toyoi*, *licheniformis*, *mesentericus*, *polymyx* и др. ([46] и табл. 1). К сожалению, не всегда точно в них указывались названия использованных штаммов. Так, в препарате якобы на основе «*Lactobacillus sporogenes*» фактически находилась культура *Bacillus coagulans* [47]. Такое название спорообразующей бактерии, ошибочно отнесенной к виду *Lactobacillus*, прослеживается с публикации от 1932 г. (цитируется по [6]). Проверка семи препаратов споровых пробиотиков на идентичность названий показала, что только один из них соответствовал заявленному составу [17, 18]. Дело в том, что идентификация представителей рода *Bacillus*, изначально основанная на фенотипичных признаках, всегда была недостаточно точна. Но и более прогрессивный генетический подход к идентификации на основе последовательности 16 рРНК также оказался перед проблемой неразличимости некоторых видов [48].

Род *Brevibacillus*. Этот род аэробных спорообразующих бактерий возник после повторной генетической классификации штаммов, ранее входивших в группу *Bacillus brevis* [49]. В настоящее время все 10 видов (*brevis*, *agri*, *centrosporus*, *choshinensis*, *parabrevis*, *reuszeri*, *formosus*, *borstelensis*, *laterosporus*, *thermoruber*) официально признаны как представители рода *Brevibacillus*.

Пробиотические свойства представителей рода *Brevibacillus* исследованы мало. Тем не менее, на основе бревибацилл уже созданы два пробиотика (см. табл. 1). Было обнаружено, что культура *Br. laterosporus* обладает ларвицидной активностью, а штаммы *Br. agri*, *Br. brevis* и *Br. laterosporus* даже опасны для человека. Показано, что штаммы *Br. laterosporus* отличаются значительным генетическим разнообразием – у 29 из них были выделены 14 отдельных фрагментов на хромосоме [50].

Род *Clostridium*. Спорозоносные бактерии, клетки которых при спорообразовании раздуваются в центре и приобретают форму веретена (*Clostridium*; от греч. kloster – веретено). В

большинстве – анаэробы и хемоорганотрофы с бродильным типом метаболизма. Одни виды сахаролитические, другие – протеолитические, третьим свойственны в разной степени те и другие качества. Некоторые виды фиксируют азот, сульфаты не восстанавливают, каталазы обычно не образуют. Встречаются в почве, осадках водоемов и в пищеварительном тракте человека и животных. Типовой вид – *Clostridium butyricum* Prazmowski, 1880, 24 [39]. В настоящее время описаны около 60 видов.

О клостридиях больше известно как о вредных микроорганизмах. Например, клинически значимые виды клостридий – *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens* в вегетативном состоянии секретируют мощные экзотоксины, вызывая такие очень тяжелые заболевания человека и животных, как столбняк, ботулизм, газовая гангрена. Еще один вид – *C. difficile* опасен тем, что он, часто обитая в толстом кишечнике, при лечении антибиотиками может вызывать серьезную инфекцию – псевдомембранный колит [51]. Вместе с тем, другие виды клостридий входят в состав нормальной микрофлоры кишечника человека и животных, достигая уровня численности $8,1 \log \text{КОЕ/г}$ [52, 53]. Пока только три вида *Clostridium* – *C. thermocellulocitricus*, *C. lochheadii* [9] и *C. butyricum* [7, 54], являются компонентами пробиотиков. Последний из них был найден доктором Miyaigi еще в 1938 г. и поныне популярен в Японии и Корее [10, 11].

Род *Sporolactobacillus*. Клетки прямые, подвижные, грамположительные, образуют эндоспоры. Хемоорганотрофы. Метаболизм бродильный. Гексозы расщепляют по типичному гомоферментативному пути с образованием одной лишь молочной кислоты. Каталазу не образует. Факультативно анаэробные или микроаэрофильные бактерии с температурой роста 35°C. Типовой вид – *Sporolactobacillus inulinus* [55, 56]. К настоящему времени известны 5 видов *Sporolactobacillus* – *Sp. inulinus*, *Sp. kofuensis*, *Sp. lactosus*, *Sp. nakayamae* subsp. *nakayamae*, *Sp. nakayamae* subsp. *racemicus*, *Sp. terrae*. Для этого рода мольное содержание G+C пар составляет 38–40%. Первоначально представителей *Sporolactobacillus* относили к роду *Lactobacillus*, но впоследствии их повысили до статуса рода, но уже в семействе *Bacillaceae* [57]. Различие *Sporolactobacillus* от рода *Lactobacillus*

было выявлено по исследованию ДНК-ДНК гибридизации [58]. Кроме того, жирнокислотная конфигурация и изопреноид-хиноновые компоненты клеток *Sporolactobacillus* оказались общими с группой *Bacillus* и отличались от таковых у *Lactobacillus* [59–61]. Нам не удалось встретить работ, посвященных использованию *Sporolactobacillus* как пробиотиков.

Аспекты влияния спорообразующих бактерий на макроорганизмы

Физиологические аспекты. Hyronimus и др. [62] в модельных экспериментах изучили устойчивость к кислоте и желчи вегетативных клеток 13 штаммов *Sporolactobacillus*, *Bacillus laevolacticus*, *B. racemilacticus* и *B. coagulans*. Они показали, что ни один из исследованных штаммов не выживал в течение 3 ч при pH = 2,0, тогда как pH = 3,0 в течение этого же времени переносили лишь штаммы *B. laevolacticus* и *Sporolactobacillus*. К 0,3% бычьей желчи были устойчивыми только *B. racemilacticus* и *B. coagulans*. Однако 3-часовая инкубация, использованная в данных опытах, была явно больше, чем требуется для прохождения желудка (обычно не более 1 ч). Следовательно, выводы этих исследователей не могут быть перенесены в реальные условия *in vivo*. В этом плане более убедительными были опыты Spinosa и др. [63], в которых авторы изучали судьбу спор *B. subtilis* и *B. clausii* после прохождения через желудок мышей. Показано, что споры двух видов бацилл выживали после прохождения желудочно-кишечного тракта, но их количество менее чем за неделю существенно снижалось. На этом основании авторы приходят к выводу, что спорообразующие представители рода *Bacillus* вряд ли обладают пробиотическим действием. К иным выводам пришли Casula и Cutting [64], показавшие способность спор *B. subtilis* к прорастанию в кишечном тракте у мышей, следовательно, и к осуществлению пробиотического эффекта. Они это доказали с помощью генно-инженерного химерного гена *ftsH-lacZ*, экспрессируемого только в растущих клетках. Судьбу спор *B. subtilis* после введения в желудок мышей также изучили Ноа и др. [65]. Они установили, что в некоторых экспериментах количество спор этого вида после 4 суток превышало ожидаемую

величину. Эти результаты также указывают на возможность прорастания спор в вегетативные формы, хоть и в ограниченном количестве. Jadamus и др. [66] наблюдали прорастание спор *B. cereus* var. *toyoi* в кишечных образцах от бройлерных цыплят и поросят-сосунков. И.Г. Осипова и др. [67] после проведения доклинических испытаний двух новых препаратов – Витаспорина и Ирилиса, показали, что длительность персистенции в кишечнике *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, являющихся их основой, составляет от 7 до 24 суток в зависимости от вида и штамма бацилл. По утверждению этих исследователей процесс прорастания спор сопровождается интенсивной продукцией ряда физиологически активных веществ – антибиотиков, лизоцима, аминокислот, витаминов, протеолитических ферментов [68]. Некоторые из них играют существенную роль в пищеварении. Авторы также отмечают весьма высокую антагонистическую активность споровых пробиотиков в отношении стафилококков, энтерококков и дрожжей – качество, отличающее их от пробиотиков на основе лакто- и бифидобактерий.

Действие на фекальную микрофлору. Adami и Cavazzoni [69] показали, что у поросят после применения с кормом *Bacillus coagulans* (около 10^{11} КОЕ/кг корма) на фоне увеличения в фекалиях количества аэробных и анаэробных спорообразующих бактерий снизилось содержание лактококков, энтерококков и колиформных микроорганизмов. Hosoï и др. [45, 70] показали выборочное воздействие *B. subtilis* (*natto*) на фекальную микрофлору мышей. Этот микроорганизм независимо от диет не влиял на количество *Enterobacteriaceae* и *Enterococcus* spp., но зато подавлял представителей *Bacteroidaceae* и *Lactobacillus*. При введении убитых автоклавированием спор подобных изменений не наблюдалось. Как показали Guo и др. [71], в фекалиях свиней, которых кормили штаммом *B. subtilis* MA 139, наблюдалось на фоне существенного увеличения количества лактобацилл снижение кишечной палочки.

Продукция бактерицидных веществ. Бактерии рода *Bacillus* проявляют разнообразную антимикробную активность, связанную, в первую очередь, с продукцией почти 200 антибиотиков [68]. Наиболее известными их продуцен-

тами являются *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. polymyxa*, *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. cereus*, *B. brevis* и др. Продуцируемые антибиотики – это полимиксины, бацитрацин, тиротрициновый комплекс, грамицидин С, субтилин, эдеин, микробациллин и др. В связи с токсичностью лишь часть из них допущена к применению в клинике. Вторую обширную группу антагонистически активных веществ составляют бактериоцины. Lee и др. [72] описали полифермитицин как термолабильный, чувствительный к протеиназе К пептид, который продуцирует штамм *B. polyfermenticus*, и ингибирующий другие виды *Bacillus*. Pinchuk и др. [73] выделили из штамма *B. subtilis* два бактерицидных вещества, отличающихся устойчивостью к нагреву, резистентных к протеазе и активных *in vitro* против *Helicobacter pylori*. Нугонимус и др. [74] открыли у *B. coagulans* бактериоциноподобный пептид коагулин, синтез которого был связан с плазмидой. Коагулин стабилен к нагреву, чувствителен к протеазе и обладает бактериоцидным действием в отношении *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Listeria*, *Pediococcus* и *Enterococcus*. Le Marrec и др. [75] охарактеризовали коагулин как 44-аминокислотный пептид с N-терминальной последовательностью, который был подобен педиоцину, полученному из *Pediococcus acidilactici*. Из молока и молочных продуктов Godic Torcar и др. [76] выделили штаммы *Bacillus cereus*, которые продуцируют бактериоцины с молекулярным весом от 1,0 до 8,0 кДа. К сожалению, авторы ограничились лишь изучением границ стабильности найденных бактериоцинов и спектром бактерицидной активности, обещая в дальнейшем продолжить свои исследования.

Несмотря на имеющиеся работы, демонстрирующие активность бациллярных бактериоцинов в опытах *in vitro*, исследований *in vivo* пока еще мало. Исключение составляют работы Е.А. Svetoch и др. [77, 78], в которых из *Bacillus* и *Paenobacillus* spp. были выделены и охарактеризованы 5 бактериоцинов (37, 114, 119, 592 и 602) класса 2. Они представляли собой пептиды с молекулярным весом около 3,5 кДа, активные против широкого спектра микроорганизмов, включая *Campylobacter jejuni*. После проверки их эффективности в опытах *in vivo* были сделаны выводы о реальной возможности применения бациллоцинов на бройлерных цыплятах с

целью снижения колонизации их кишечника *C. jejuni* [78, 79].

Доказательства эффективности на животных. Важным шагом в оценке пробиотической эффективности препаратов является изучение их физиологической пользы на модельных животных. И.Б. Сорокулова и др. [80] исследовали эффективность против *Campylobacter* препаратов на основе *Bacillus* – биоспорина, субалина, бактисубтила, цереобиогена. В опытах *in vitro* только два препарата – биоспорин, содержащий *B. subtilis* и *B. licheniformis*, а также субалин на основе *B. subtilis*, ингибировали некоторые штаммы *C. jejuni* и *C. coli*. По результатам опытов на мышах, инфицированных кампилобактериями, авторы пришли к выводу об эффективности этих препаратов при пероральном применении. Nattori и др. [81] показали, что *Bacillus coagulans* P-22 ингибировал изменения, вызываемые *Vibrio* в кишечной ткани кроликов. И.Г. Осиповой и др. [67] были установлены весьма существенные различия адгезивной активности штаммов бацилл к эпителиальным клеткам кишечника мышей в зависимости от происхождения штаммов. При этом, как справедливо замечают авторы, высокая адгезивность к энтероцитам, равно как наличие гемолитической, гиалуронидазной и лецитиназной активности, следует расценивать как нежелательное явление для пробиотических бактерий.

Пробиотик Споровит, как было представлено в работе [82], наделяют уникальным сочетанием таких качеств, как избирательное подавление роста бактериальной, вирусной и грибковой флоры (кандидозы, трихофития, микроспория и др.), высокая ферментативная и биосинтетическая активности, безвредность для макроорганизма и его микрофлоры, высокая устойчивость к неблагоприятным условиям внешней среды.

Сравнительно часто в исследованиях по выяснению пользы пробиотиков для животных встречаются работы, в которых спорообразующие бактерии применяются как кормовая добавка. К примеру, Cavazzoni и др. [83] оценили эффективность *Bacillus coagulans* в качестве стимулятора роста и компонента, улучшающего качество корма для птиц. В их экспериментах три группы цыплят в течение 49 дней кормили равным количеством корма и вместе с ним одной группе давали культуру *B. coagulans*, вто-

рой – антибиотик *virginiamycin*, а третьей контрольной – только корм. В результате первая опытная группа, которой давали *B. coagulans*, превосходила контрольную и была эквивалентна или лучше группы, которой давали антибиотик. Stamati и др. [84] продемонстрировали, что добавка *Bacillus toyoi* в количестве $0,5 \times 10^9$ спор/г корма для свиней, начиная с последней стадии их беременности и в течение периода лактации, улучшила некоторые параметры крови и молока, привесы и здоровье поросят-сосунков.

Протеолитические, пектинолитические, липолитические и целлюлолитические способности бактерий рода *Bacillus*, затрагивая процессы пищеварения, могут приводить к нормализации внутренних процессов и функций макроорганизма – разрушать тромбы и гепарин, токсические продукты и аллергены, уменьшать образование холестериновых мицелл [68].

Влияние на иммунитет реципиента. Prokešova и др. [85] в экспериментах *in vitro* обнаружили, что споры *Bacillus firmus*, инактивированные теплом или формальдегидом, проявляют иммунную активность на моноядерных лимфоцитах человека. Muscettola и др. [86] показали, что препарат Enterogermina увеличивал продукцию интерферона *ex vivo*, стимулируя перитонеальные клетки брюшины и селезенки. Ciprandi и др. [87] изучали действие спор и вегетативных клеток *Bacillus clausii* на пролиферацию Т-клеток и выработку лимфокина моноклональными клетками, взятых от здоровых добровольцев. Было показано, что лишь вегетативные клетки стимулировали индуцированную митогеном пролиферацию моноядерных клеток. Ни споры, ни вегетативные клетки не изменили продукцию интерлейкина-2 или γ -интерферона. Васса и др. [88] исследовали иммуномодулирующее действие спор из препарата Enterogermina на 11 пациентах с множественной миеломой. Препарат наносили трижды в день в дозе 6×10^9 спор в течение 21-дневного периода. Было обнаружено, что после обработки спорами у пациентов улучшились иммунные параметры и хемотаксис моноцитов. Кроме того, у 4 пациентов уменьшились проявления дыхательных инфекций, имевших место до иммуномодуляции, и ни о каких побочных эффектах не сообщалось. Fiorini и др. [89] показали повышение активно-

сти секретируемого клетками IgA в ответ на пероральное введение спор *B. subtilis*. le Duc и др. [90] установили, что при оральном применении на мышах в виде спор все используемые штаммы – *B. cereus* IP 5832, *B. clausii*, *B. pumilus*, *B. cereus* var. *vietnami*, стимулировали выработку IgG. Генерируя гуморальные ответы, антигены споры могли взаимодействовать с лимфоидной тканью кишечника. При этом споры *B. subtilis* входят в бляшки Пейера и лимфоузлы брыжейки. По утверждению авторов величина иммунного ответа на споры может почти в 10 раз отличаться в зависимости от штамма.

В.В. Подберезный и Н.И. Полянец [91] показали эффективность перорального применения живой культуры *B. pulvifaciens* – основы эндобактерина, при лечении мастита у коров и в повышении их иммунного статуса. С.Р. Резник и др. [92] наблюдали у мышей, которым вначале пропаивали *B. subtilis* и *B. licheniformis* в дозе $2,5 \times 10^7$ КОЕ, существенное повышение уровня серологического ответа на последующее введение сальмонелл. При изучении влияния пробиотиков биоспорина и субалина на функциональную активность макрофагов И.Б. Сорокулова [93] показала их стимулирующее действие на клетки мононуклеарной фагоцитарной системы животных. Стимуляция макрофагов происходила и в опытах на обезьянах при пероральном введении биоспоринов [94]. В более ранней работе этого автора [95] показано, что пероральное применение субалина обеспечивает защиту 73% животных при гриппозной инфекции и 65% – при экспериментальном герпетическом менингоэнцефалите. Реаферон – рекомбинантный человеческий α_2 -интерферон при таком же применении не оказывал столь высокого защитного действия на животных. Далее, чтобы оценить иммунологическую активность этого штамма, работы были продолжены на добровольцах. В результате их проведения В.М. Бондаренко и В.А. Белявская подтвердили антивирусное действие штамма *B. subtilis* 2335/pBMB-105 [96].

Эксперименты на добровольцах. По клиническому применению спорообразующих бактерий на людях опубликовано лишь несколько работ. В одной из них сообщалось о снижении липидов в крови под действием спор *Bacillus coagulans* [97]. Пациенты (17 человек) с диагнозом гиперлипидемии получали по 6 таблеток в

день (2 на один прием 3 раза в день) в течение 12 недель из расчета величины ежедневной дозы $3,6 \times 10^8$ спор. После окончания курса было зарегистрировано сокращение общего холестерина (с 330 до 226 мг%) и LDL (с 267 до 173 мг%) и ни о каких неблагоприятных последствиях не сообщалось. В другой работе исследовали эффективность *Bacillus subtilis* на пациентах с медленным или статическим мочеиспусканием [98]. Для этого 80 пожилым пациентам (средний возраст более 75 лет) в течение 6 месяцев давали ежедневно выпивать по 2 объема споровой суспензии *B. subtilis* ATCC 9799 (число спор на объем не указано) с использованием плацебо-контроля. К 5–6-му месяцу наблюдали существенное сокращение числа пациентов с инфицированием мочевого тракта. М. Грачева и др. [99] исследовали клиническую эффективность биоспорина в отношении больных с острыми кишечными инфекциями (ОКИ). В клинических испытаниях были использованы два варианта препарата; 1-й вариант – 2×10^9 живых микробных клеток *B. subtilis* и *B. licheniformis*, 2-й вариант – 2×10^6 этих же клеток. В качестве препарата сравнения использовали коммерческий лактобактерин. Группы больных – 66 человек, формировались методом случайной выборки и были сопоставимы по полу, возрасту, тяжести заболевания и нозологическим единицам. Среди больных преобладали мужчины в основном молодого и среднего возраста (до 20 лет и от 21 до 40 лет). При наблюдении за больными ОКИ были диагностированы: сальмонеллез, пищевая токсикоинфекция, дизентерия. Биоспорин назначался по 1 дозе за 30 мин до еды 2 раза в день в течение 4–10 дней. Курс применения лактобактерина был таким же. Во время применения пробиотиков антибиотикотерапия не проводилась. Эффективность лечения определяли по срокам исчезновения симптомов интоксикации (тошнота, рвота, головная боль, температура, головокружение), ликвидации болевого синдрома, исчезновения диареи. Одновременно с клиническими наблюдениями у больных проводили изучение микробиоценоза кишечника. Результаты проведенного исследования показали выраженное лечебное действие препарата, заключающееся в ускоренной нормализации стула, исчезновении болей в животе и уменьшении дисбиоза кишечника. Наилучшие

показатели отмечены при приеме препарата биоспорина, содержащего 2×10^9 микробных клеток.

Представленные результаты исследований свидетельствуют об эффективности штаммов спорообразующих бактерий в качестве биологических средств нормализации микробиоценоза кишечника, а также о стимулировании клеток иммунной системы организма-реципиента. Систематизация имеющихся данных позволила также подойти к пониманию некоторых механизмов пробиотического действия спорообразующих бактерий.

Механизмы пробиотического действия.

Nosoi и др. [100] в экспериментах на мышах показали, то пробиотическая эффективность спор может быть обусловлена усилением местного метаболизма или ферментативной активности. Благодаря протеазной активности спор *Bacillus* активизируются процессы пищеварения, происходит выработка витамина K_2 и снижается аллергия на пищу [45], а каталаза и субтилизин бацилл стимулировали рост *Lactobacillus* [101]. Jadamus и др. [102] показали, что дипиколиновая кислота, присутствующая в спорах пробиотических штаммов *Bacillus* spp., ингибирует *in vitro* рост большинства лактобацилл и энтеробактерий, не влияя на энтерококки. Следовательно, ингибирующее действие дипиколиновой кислоты в сочетании с усилением местного метаболизма являются новыми элементами специфического механизма пробиозиса споровых пробиотиков. При этом началом их пробиотического действия следует считать контакт препарата с эпителиальными клетками желудочно-кишечного тракта организма-реципиента с последующей диффузией на слизистые протеолитических ферментов, каталазы и дипиколиновой кислоты. Последние активируют пищеварительные и обменные процессы, а также ингибируют некоторые микроорганизмы. Далее в течение 2 ч около 90% спор переходят в вегетативные формы с интенсивной продукцией физиологически активных веществ, которые воздействуют на процессы пищеварения и на патогенные микроорганизмы [68]. В опытах на цыплятах, которых в течение 28 дней кормили *B. subtilis natto*, при исследовании гистологии кишечных клеток (высота ворсинок, клеточные зоны и клеточный митоз) были обнаружены их

отличия от контроля, а также снижение концентрации аммиака в крови [103]. Усиление физиологической активности, обусловленное *Bacillus*, проявлялось и в инаktivации химического мутагена – 4-нитрохинолин-1-оксида (4NQO) [104]. Вегетативные клетки и споры, проходя в нижние отделы кишечника, стимулируют иммуннокомпетентные клетки кишечника и макрофаги, которые отвечают повышением продукции интерферонов и цитокинов [68, 85, 86, 88–94].

На примере анализа действия на организм препарата Споровит отмечается следующее [82]. Адаптация спорообразующих бактерий к условиям существования в кишечнике зависит от индивидуальных особенностей макроорганизма. После окончания курса приема препарата в большинстве наблюдений бактерии не обнаруживались в организме уже через месяц. За это время активизируются механизмы иммуномодуляции, которые приводят к восстановлению нарушенного патологией иммунного статуса, увеличению продукции эндогенного интерферона, усилению функциональной активности макрофагальных клеток, повышению фагоцитарной активности лейкоцитов крови – моноцитов и нейтрофилов. Наблюдается также антитоксическое и противоаллергическое действие этого препарата.

В.И. Никитенко и др. [105] в экспериментах на белых крысах и кроликах, показали, что примерно 1 из 1000 бактерий сенной и кишечной палочки, золотистого стафилококка, предварительно меченных ^3H -тимидином, при введении их в желудок могут проникать в кровь, лимфу и накапливаться в селезенке, лимфатических узлах, печени, области очагов воспаления или повреждений. В тканях в зависимости от вида бактерий и места их нахождения бактерии сохраняют жизнеспособность от часа до нескольких суток. В очаге повреждения бактерии сенной палочки выделяют биологически активные вещества и могут оказывать выраженное лечебное действие. Разрушаясь, бактерии служат источником антигенов для поддержания нормального уровня антител. Важно, что сенная палочка не оказывает повреждающего действия на ткани, напротив, стимулирует регенераторные процессы. В.И. Никитенко и др. [105], а также В.В. Смирнов [19, 106] считают, что транслока-

ция может быть естественным защитным механизмом, который целесообразно использовать в клинической практике, применяя пробиотики не только для профилактики и лечения дисбактериозов, но и хирургической инфекции. В то же время транслокацию бактерий расценивают как патологический процесс, развивающийся вследствие стресса, иммунодефицита, интоксикации, гематологических заболеваний [107].

Таким образом, при различных острых и хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта человека и животных пробиотические эффекты спорообразующих бактерий в одних случаях могут достигаться преимущественно за счет их антагонистических свойств – действия дипиколиновой кислоты спор, продукции вегетативными клетками антибиотиков, ферментов,

в других – за счет стимуляции иммунокомпетентных клеток, активации выработки интерферонов, в третьих, – в одновременном сочетании вышеназванных и других факторов (в том числе транслокации), увеличивающих защитные реакции организма в целом (табл. 3). В то же время некоторые вопросы требуют большего понимания. Остаются неизвестными, в частности, отдаленные последствия ответа иммунной системы на случайные микроорганизмы, каковыми для человека являются спорообразующие бактерии, в особенности при лечении больных с ослабленным иммунитетом, а также детей и пожилых людей. Необходимы, конечно же, дальнейшие исследования по уточнению механизмов пробиотического действия спорообразующих микроорганизмов.

Таблица 3. Механизмы лечебно-профилактического действия споровых пробиотиков по результатам анализа литературы [6, 19, 23, 64–68, 82, 86, 88–95, 101, 102, 106]

Стадии транслокации бацилл	Действия бацилл и их метаболитов		Последствия для макроорганизма
	Адаптивные	Антагонистические	
Прохождение желудка и кишечника с частичной фиксацией на их слизистых	Активация и прорастание части спор с выживанием вегетативных форм в кишечнике. Участие	Ингибирование болезнетворных микроорганизмов за счет дипиколиновой кислоты спор, продукции	Улучшение пищеварения, предупреждение накопления продуктов метаболизма патогенных микробов
Перманентная транслокация в кровь, лимфу и внутренние органы	в пищеварении за счет продукции протеаз, амилаз, липаз, целлюлаз, а также синтеза аминокислот и витаминов	вегетативными клетками лизоцима, антибиотиков, бактериоцинов и других метаболитов	Защита и укрепление микробиотиоза, индукция синтеза интерферона, иммуноглобулинов, стимуляция иммунокомпетентных клеток
Выведение из организма			Расщепление аллергенов, очищение воспалительных очагов, удаление токсинов, тяжелых металлов

Аспекты безопасного применения спорообразующих бактерий

Питание ферментированными продуктами. Популярный в Японии пищевой продукт «Натто» получают ферментацией целых соевых бобов культурой *Bacillus natto* при температуре 40°C в течение 14–18 ч [45, 108]. После окончания ферментации темно-коричневые бобы покрываются вязким, липким веществом, которое образует длинные (до 24 см) серебристые нити в

виде паутины – чем длиннее нити, тем лучше качество этого продукта. В 8-м издании Берджи *B. natto* отмечен как синоним *B. subtilis*, с чем так и не согласились японские исследователи [108]. В доказательство этому они неоднократно показывали, что сою могут ферментировать и многие другие виды *Bacillus* – *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides* и т. д., но ни один из них не в состоянии был произвести продукт с характерными для «Натто» липкими нитями и своеобразным ароматом. Кроме того,

B. natto, в отличие от *B. subtilis*, не может расти без биотина; а бактериофаг, лизирующий *B. natto*, не действует на *B. subtilis*. Эти примеры убеждают, с одной стороны, в безопасности некоторых видов *Bacillus* и, с другой, – в существовании номенклатурных разногласий на востребованные штаммы. Это особенно актуально при использовании высоких концентраций клеток *Bacillus* в составе пробиотиков. Действительно, различия между приемом ферментированной *Bacillus* пищи и приемом *Bacillus* как биотерапевтических препаратов являются существенными по концентрациям клеток, что предполагает и разные уровни безопасности этих форм.

За исключением *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus* виды *Bacillus* вообще не считали патогенными. Действительно, споры *Bacillus* регулярно попадают в пищу животных и человека как неумышленно, так и специально с ферментированными продуктами. В составе ферментированных сои и бобов, к примеру, были обнаружены 11 видов *Bacillus* (*subtilis*, *licheniformis*, *cereus*, *circulans*, *thuringiensis*, *sphaericus*, *badius*, *firmus*, *megaterium*, *mycoides*, *sphaericus*) и *Brevibacillus laterosporus* [109].

Риски пищевых отравлений, связанные с бациллами. При оценке безопасности спорообразующих бактерий как пробиотиков важен анализ фактов пищевых отравлений, связанных с некоторыми представителями *Bacillus*. Например, причиной картофельной болезни хлеба является *Bacillus mesentericus* (в других источниках: www.npo.lit.ru/pdf/instruction-baking_of_bred.pdf – *B. subtilis*) – микроорганизм, споры которого обычно присутствуют в муке и прорастают в хлебопродуктах при нарушении технологического режима их получения [110]. Сообщалось о системных инфекциях и абортах, обусловленных *Bacillus* [6, 111], о существенном количестве токсигенных штаммов среди *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus laterosporus* и разработке эффективного способа обнаружения токсина у спорообразующих пробиотических бактерий [112]. В работе le Duc и др. [90] были подробно охарактеризованы пробиотические штаммы *Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus pumilus*, по способностям колонизироваться, стимулировать иммунитет и по антагонистической активности. Три штамма *B. cereus* после

перорального введения сохранялись в кишечнике мышей в течение 18 дней, но, вместе с тем, эти штаммы продуцировали Hbl (гемолитические) и Nhe (негемолитические) энтеротоксины, а также рвотный токсин (emetic toxin – cereulide). Известно, что каждый из энтеротоксинов состоит из трех белков – B, L1, L2 и NheA, NheB, NheC, соответственно [113], тогда как рвотный – всего лишь 1,2 кДа пептид [90]. Продукция этих токсинов – ключевой фактор в пищевых токсикоинфекциях, вызываемых представителями группы *Bacillus cereus*, что делает их опасными для медицинского использования. Пищевые отравления иногда вызывали и *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, которые не принадлежат к указанной группе, давая иммунологические перекрестные реакции с энтеротоксином *B. cereus* [114]. Ouhib и др. [115] показали, что продукция энтеротоксинов в значительной степени определяется углеводным составом пищи. Это наблюдение является достаточно важным в плане регламентации условий безопасного применения споровых пробиотиков.

Приведенные факты свидетельствуют о том, что пробиотики на основе спорообразующих бактерий перед выпуском на рынок должны подвергаться более строгой оценке на безопасность. Sanders и др. [6] обратили внимание на то, что у массового потребителя благодаря рекламе сложилось неточное представление о присвоении некоторым видам *Bacillus* статуса «В целом безопасные» (Generally Recognized as Safe, GRAS). Фактически же статус GRAS Управление контроля за продуктами питания и лекарствами (FDA) США присвоило только тем видам *Bacillus*, которые являются продуцентами ферментов, и он не распространяется на применение их в качестве пробиотиков [116]. Напротив, экспертиза бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* на острую и хроническую токсичность показала их безопасность в качестве пробиотиков [117, 118]. Однако даже безопасность молочнокислых бактерий в последние годы ставится под сомнение [119].

Риски развития инфекций от применения бацилл. Адгезия к кишечному эпителию – качество, свойственное пробиотическим бактериям, но применительно к видам *Bacillus* может относиться к механизмам их вирулентности

[120, 121]. В обзоре [122] анализировались публикации по инфекционности *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, не связанные с их пищевым применением. Был сделан вывод о том, что инфекции бациллярного происхождения наиболее часто появлялись среди больных с эндокардитом, имевших ослабленный иммунитет или недавно перенесших операции. Все же на этот счет высказывались сомнения относительно точности и надежности методов обнаружения бациллярных возбудителей инфекций – не все больницы способны дифференцировать *Bacillus* как источников пищевых отравлений или внутрибольничной бактериемии [123]. Oggioni и др. [124] сообщили о септицимии, вызванной штаммом *B. subtilis*, который давали пациентам с ослабленным иммунитетом в составе пробиотика. Spinosa и др. [125] проверили два случая инфекций от пробиотических штаммов *Bacillus*. В первом случае инфицирующий агент был обнаружен во Франции (1996 г.) при воспалении желчного пузыря, во втором – в Италии (1998 г.) при септицимии. Оба агента не отличались от штамма *Bacillus clausii*, составляющего основу итальянского пробиотика Enterogermina. Проведенный анализ не подтвердил, что именно этот пробиотик стал причиной инфекций, поскольку французский больной подвергся почечной пересадке, а итальянский – проходил химиотерапию. Не найдя доказательств причастности бациллярного пробиотика к инфицированию пациентов, авторы рекомендовали, вместе с тем, развитие доступной для клинического использования базы данных по пищевому и пробиотическому использованию штаммов, что было бы важно для проведения их идентификации и типирования в случае необходимости.

Устойчивость к антибиотикам и генетическая модификация штаммов. Ciffo [126] и Mazza с соавт. [127] исследовали устойчивость к антибиотикам 4 штаммов *B. clausii* в составе Enterogermina, а также передачу антибиотикорезистентных свойств. Была выявлена стабильная устойчивость штаммов к цефалоспорином, макролидам и хинолинам, но передачи этих фенотипов устойчивости другим бактериям обнаружено не было.

В.А. Белявская и др. [128] провели экспериментальную оценку биобезопасности генетически модифицированных бактерий (ГМБ), вхо-

дящих в состав пробиотика субалина. Субалин был получен на основе рекомбинантного штамма *B. subtilis* 2335/105, способного продуцировать человеческий интерферон типа α -2, и разрешен для применения в ветеринарии в качестве средства профилактики и лечения заболеваний бактериальной и вирусной этиологии. Пероральное введение ГМБ телятам, цыплятам и белым мышам не нарушает, как было показано, микробную экологию желудочно-кишечного тракта теплокровных животных и не приводит к появлению спонтанных трансформантов. Кроме того, используемый штамм проявлял способность к восстановлению нормофлоры, нарушенной в результате патологических сдвигов. Полученные данные, вместе с тем, свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения биобезопасности этих ГМБ с одновременным совершенствованием молекулярных методов мониторинга.

Неточное указание состава препарата. К одному из важных аспектов в безопасности пробиотических препаратов следует отнести и достоверное таксономическое указание штаммов бактерий, входящих в их состав. Так, Green и др. [129] по результатам проверки препаратов Enterogermina и Biosubtyl показали, что ни в один из них не входил штамм *B. subtilis*, как заявляли производители. Их вывод был сделан на основе изучения ключевых фенотипических характеристик, а также данных определения полной последовательности 16 S субъединиц у рДНК. При этом штаммы из Enterogermina оказались наиболее близкими к группе *Sporolactobacillus* (подгруппа *Bacillus alcalophilus*), а штаммы из Biosubtyl – к *Bacillus pumilis*.

Положения о безопасном использовании спорообразующих бактерий

В условиях все увеличивающегося разнообразия продуктов питания возникла потребность в стандартах на продовольствие и на их безопасность. С этой целью в 1963 г. под эгидой двух Всемирных организаций – Здравоохранения (World Health Organization – WHO) и Продовольственной сельскохозяйственной (Food Agricultural Organization – FAO) был разработан «Кодекс алиментарий», или «Продовольственный кодекс» [130]. Комиссия «Кодекс алимен-

тариус» обеспечивает координацию действий правительств стран-членов ВТО (Всемирная торговая организация) при подготовке стандартов и норм на продовольственные товары, содействуя справедливому применению этих правил в торговле различным продовольствием.

В настоящее время все микробные кормовые добавки, в соответствии с Директивой № 70/254/ЕЕС Европейского союза и руководящими принципами Научного комитета по питанию животных (Scientific Committee on Animal Nutrition – SCAN), подвергаются детальной оценке на безопасность с целью получения гарантий на предмет их безвредности как для самих животных, так и для потребителей животной продукции [111, 116]. Вся концепция безопасности пищи SCAN – в емкой формуле: «от фермы к вилке» (from the Farm to the Fork) [131]. Особое внимание уделяется тестированию микроорганизмов на присутствие передающихся маркеров устойчивости к антибиотикам и продукции вредных метаболитов. Недавно SCAN выступил с инициативой о внедрении концепции «Квалифицированного восприятия безопасности» (Qualified Perception of Safety – QPS), которая позволила бы штаммам с установленным безопасным статусом входить в рынок без обширных испытаний. Вероятно и далее Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов (European Food Safety Authority, EFSA) будет играть центральную роль в регулировании пробиотиков как для людей, так и для животных. В настоящее время действуют положения о безопасном использовании спорообразующих микроорганизмов – результат коллективного творчества ведущих специалистов [117, 132, 133] и всемирных организации в области питания – SCAN, FAO/WHO [111, 116, 134].

Основные положения руководства по безопасности для компаний, занимающихся производством и продажей спорообразующих бактерий в качестве пробиотиков, включают следующие 6 пунктов.

1. Каждый бактериальный штамм, используемый в препарате, должно быть выделен, назван и таксономически идентифицирован до вида с применением самой современной и валидированной методологии. При характеристике микроорганизмов применяются генетические и фенотипические методы, позволяющие сравни-

вать последовательности генов 16 рРНК с музейными штаммами таких всемирных коллекций микроорганизмов, как американская – ATCC, европейские – DSMZ, LMG, CIP, NCIMB, японская – JAM, и выявлять их молекулярно-генетический полиморфизм. Для этого должны быть исследованы специфические для штамма пробы, полученные либо из общей хромосомальной, либо только из рДНК. Если идентичность штамма(ов) бактерий в препарате вызывает вопросы, то под сомнения ставятся выводы по его(их) безопасности.

2. Следует придерживаться научно признанных названий бактерий. Не приемлемо использование на ярлыках с готовой продукцией устаревших или вводящих в заблуждение названий. Важно знать, что названия бактерий, исходя из официально существующих законов по регулированию их номенклатуры, становятся действующими только после их публикации либо в специально утвержденных списках, в валидационных листах, либо в *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Название бактерий, опубликованное в другом месте, утверждается после его объявления в листе валидации [135], где указываются условия подачи сведений и принятия новых названий. Для этого авторы новых названий культур посылают три копии документа в редакционный комитет указанного журнала. В этом документе содержится документальное подтверждение, что новые виды, подвиды и т. д. были депонированы признанными коллекциями культур двух стран с указаниями дат. После рассмотрения присланных документов утверждаются новые названия с таксономической привязкой относительно существующей бактериологической спецификации, которые становятся доступными после публикации списка новых названий.

3. Каждый штамм бактерий должен быть достаточно полно охарактеризован *in vitro*, включая: профиль антибиотикорезистентности, продукцию рвотного (emetic) фактора, энтеротоксинов, устойчивость к сокам желудка, кишечника и к желчи. Детальная схема проверки продукции токсина отработана SCAN [111]. Запрещено в качестве пробиотиков использовать штаммы, продуцирующие токсин(ы) и способные к передаче устойчивости к антибиотикам.

4. Проверка безопасности должна проводиться независимой трехсторонней группой квалифицированных экспертов. В зависимости от рода и штамма бактерий, а также величины дозы приема, их безопасность может быть охарактеризована следующим образом. На соответствующих линиях клеток человека оценивается способность бактериальных штаммов к адгезии, к транслокации и к модуляции иммунной системы. При этом штаммы с сильно выраженными адгезивными, либо инвазивными свойствами не должны использоваться как пробиотики. В оценке безопасности важны также исследования на острую и эмбриональную токсичность. Рекомендовано, по крайней мере, на одной виде млекопитающего провести испытания штамма в разбавленном и в концентрированном виде. Повторные исследования хронической токсичности должны быть проведены на каждом штамме в вегетативном и споровом состоянии в течение не менее 9 месяцев в концентрированном виде и в составе готового препарата, используя мелкое и более крупное животное (например, мышь и свинку, кролика).

5. На этикетке и в сопроводительной документации должны быть сведения по противопоказаниям для спорообразующих штаммов бактерий, включая специфические условия их применения для пациентов с ослабленным иммунитетом после перенесения ВИЧ-инфекции, химиотерапии или аллотрансплантации.

6. На этикетке на препарат и в сопроводительной документации должны быть четко указаны: а) показания к использованию с данными клинических испытаний, б) род, вид и название штамма(ов), точные количества бактерий, в) возможные неблагоприятные реакции, о которых необходимо сообщать по указанным телефонам.

Целесообразно, на наш взгляд, дополнить руководство по безопасности штаммов-пробионтов на основе спорообразующих бактерий такими пунктами, как: а) толерантность в отношении представителей нормофлоры, б) отсутствие генов, связанных с продукцией токсинов и факторов вирулентности, либо их инактивация, в) природа и механизм пробиотического эффекта и как они соотносятся с известными представлениями.

Заключение

Во всем мире наблюдается рост производства пробиотиков, поскольку они все больше интересуют людей, поддерживающих свое здоровье при помощи натуральных средств. Продукция, содержащая пробиотические бактерии, востребована в качестве полезного функционального питания, а также в лечебно-профилактических целях. Лечебно-профилактические препараты из живых коли-, лакто-, бифидобактерий уже почти 80 лет применяются в практическом здравоохранении. Однако их недостаточный антагонизм в отношении некоторых патогенных бактерий и грибов, а также неблагоприятная экологическая обстановка, повлекшая за собой снижение их лечебного действия, подтолкнули ученых к поиску новых, более эффективных микроорганизмов. Привлекательной оказалась группа спорообразующих бактерий в составе родов *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium* и *Sporolactobacillus* [6, 8, 10, 11, 16, 136]. Это наиболее древние и широко распространенные в природе сапрофитные микроорганизмы, с которыми на протяжении всей истории своего существования сталкивался человек. Несмотря на то, что пробиотические штаммы бацилл являются аллохтонными по отношению к микрофлоре кишечника человека и животных, некоторые полезные свойства делают их важным арсеналом пополнения полезных для здоровья биопрепаратов. Антагонизм в отношении широкого круга патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и самостоятельная элиминация из желудочно-кишечного тракта представляют конструирование лечебно-профилактических препаратов из пробиотических бацилл особенно перспективным. Привлекает также их стимулирующее влияние на пищеварение, противоаллергенное, антитоксическое, saniрующее и общеукрепляющее воздействие на организм [6, 19, 23, 67, 68, 77, 78, 82, 90, 92, 93, 100, 102, 105, 128, 137].

В то же время нет еще четких положений относительно пригодности различных бактерий в качестве компонентов пищевых продуктов, либо самостоятельных препаратов. Для большинства стран продукция из категории фармацевтических средств должна удовлетворять всем критериям по эффективности и безопасно-

сти. Такой подход направлен на обеспечение потребителей качественной продукцией. Обычно для использования пробиотиков как компонентов диетических добавок или продуктов питания не требуются специальные разрешения, что не дает оснований для доступа на рынок продукции без детальной сертификации ее безопасности. Во всех случаях изготовитель независимо от сфер продаж должен руководствоваться стандартом безопасности на продукт. Для категории фармацевтических средств это вполне оправдано, тогда как для продуктов функционального питания или биодобавок, включающих пробиотические штаммы в незначительных концентрациях, такая оценка безопасности покажется слишком строгой. Многие компании заинтересованы в терапевтическом использовании *Bacillus* и других спорообразующих бактерий, что предполагает применение этих микроорганизмов в концентрированных дозах. Для получения заключения о безвредности спорообразующих бактерий необходимы в обязательном порядке полноценные испытания всей номенклатуры препаратов.

Потребителей привлекают к своей продукции порой не самыми важными ее свойствами. Так, некоторые производители, включают в аннотацию на споросодержащий препарат такое качество как «стойкий в хранении» и рекламируют его при продаже. Однако это свойство никогда не станет решающим в выборе препарата, если будут хоть какие-то сомнения относительно его эффективности и безопасности. Даже если на продукте будет точно указан штамм, это не всегда может гарантировать его безопасность. Так, кормовая добавка Paciflog по результатам оценки SCAN ЕС была недавно снята с производства, поскольку в ней присутствовали Hbl и Nhe энтеротоксины. Заключение о риске Paciflog для здоровья человека было сделано из-за возможности инфицирования людей при забое скота [138]. Интересно, что основой Paciflog был штамм IP 5832 *B. cereus*. Этот же штамм указывается и в пробиотике Vactisubtil для медицинского применения (табл. 1). В этом препарате le Duc и др. [90] обнаружили лишь Hbl энтеротоксин. Штамм с идентичным обозначением, как предположили авторы, мог представлять производные общего предка и потеря Nhe энте-

ротоксина может быть связана с преднамеренной инактивацией гена *nheA*.

В безопасности и эффективности пробиотиков на основе лактобацилл и бифидобактерий убеждает достаточное количество публикаций [139, 140], но даже и среди них имеются небезопасные штаммы [119, 141]. По безопасности для препаратов на основе спорообразующих бактерий – *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium* и *Sporolactobacillus*, еще много вопросов, хотя они весьма широко внедрены не только в ветеринарную практику [9, 16, 21, 22, 27–30, 33–37, 71, 77, 142, 143], но и в медицину [8, 12, 14–16, 19, 23–26, 67, 68, 84, 95, 136]. Поэтому своего продолжения требуют исследования, направленные на развитие доказательной базы безопасности перспективных представителей спорообразующих бактерий с целью их дальнейшего использования в качестве пробиотиков.

Список литературы

1. Biology-Online.org <http://www.biology-online.org/dictionary/probiosis>
2. Fuller, R. Probiotics in man and animals. A review // J. Appl. Bacteriol. – 1989. – Vol. 66, N 5. – P. 365–378.
3. Fuller, R., Gibson, G.R. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health // Clin. Microbiol. and Infect. – 1998. – Vol. 4. – P. 477–480.
4. Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics // J. Nutr. – 1995. – Vol. 125. – P. 1401–1412.
5. Czerucka, D., Rampal, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens // Microb. and Infect. – 2002. – Vol. 4. – P. 733–739.
6. Sanders, M.E., Morelli, L., Tompkins T.A. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus* // Compr. Rev. Food Sci. and Food Safety. – 2003. – Vol. 2. – P. 101–110.
7. Ohkawara, S., Furuya, H., Nagashima, K., Asanuma, N., Hino, T. Oral Administration of *Butyrivibrio fibrisolvens*, a Butyrate-Producing Bacterium, Decreases the Formation of Aberrant Crypt Foci in the Colon and Rectum of Mice // J. Nutr. – 2005. – Vol. 135. – P. 2878–2883.
8. Hong, H.A., Duc L.H., Cutting S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics // FEMS Microbiol. Rev. – 2005. – Vol. 29, N 4. – P. 813–835.
9. Тараканов, Б.В. Использование пробиотиков в животноводстве. – Калуга: ВНИИ ФБ и П с/х животных, 1998. – С. 5–6.

10. Probiotics *Clostridium butyricum* MIYAIRI strain. <http://www.miyarisan/>
11. Nupharm Co. www.nupharm.co.kr/elactic03.html
12. Мазанкова, Л.Н., Лыкова, Е.А. Пробиотики: характеристика препаратов и выбор в педиатрической практике // Дет. инфекции. – 2004. – № 1. – С. 18–23.
13. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature (LBSN). www.bacterio.net
14. Тарасова, Т.А., Хамадеева, Л.Р. Комплексное лечение трихомонадных вагинитов во время беременности с использованием препарата Бактиспорин // Актуал. вопр. акушерства и гинекол. – 2001–2002. – Т. 1, № 1.
15. ФАРМ-индекс: оперативная и профессиональная информация о рынке лекарственных средств и парафармации. www.pharmindex.ru
16. Бакулина, Л.Ф., Перминова, Н.Г., Тимофеев, И.В. и др. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии // Биотехнология. – 2001. – № 2. – С. 48–56.
17. Green, D.H., Wakeley, P.R., Page, A., et al. Characterization of two *Bacillus* probiotics // Appl. and Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65. – P. 4288–4291.
18. Ноа, Т.Т., Vaccigalupi, L., Huxham, A., et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders // Appl. and Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66. – P. 5241–5247.
19. Медицинская картотека. <http://www.medka.ru.ru>
20. Алешкин, А.В., Афанасьев, С.С., Давыдкин, В.Ю., Манько, Т.Н., Давыдкин, И.Ю. Бактерийный препарат нового поколения «Споробактерин» // Мед. картотека. – 2003. – № 4.
21. Белявская, В.А., Кашперова, Т.А., Бондаренко, В.М. и др. Экспериментальная оценка биобезопасности генно-инженерных бактерий на модели штамма *Bacillus subtilis*, продуцирующего интерферон // Ж. микробиол. – 2001. – № 2. – С. 16–20.
22. ООО «ИнПроМ». <http://www.vetomin.ru>
23. Смирнов, В.В., Резник, С.Р., Вьюницкая, В.А., Сорокулова, И.Б., Самгородская, Н.В., Тофан, А.В. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* // Микробиол. ж. – 1993. – Т. 55, № 4. – С. 92–112.
24. Сорокулова, И.Б. Влияние пробиотиков из бацилл на функциональную активность макрофагов // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 2. – С. 20–23.
25. Сорокулова, И.Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых био-препаратов // Антибиотики и химиотерапия. – 1996. – Т. 41, № 10. – С. 13–15.
26. Пат. 2181596 Российская Федерация, МПК С1, А61К35/74. Лекарственный препарат из бактерий рода *Bacillus* / Байгузина Ф.А., Алсынбаев М.М., Штроман Г.А., Кулагин В.Ф., Осипова И.Г., Байгузина С.Н.. – Заявл. 05.04.01; опубл. 27.04.02, БИПМ, № 12.
27. Мазь Биосептин (Unguentum Bioseptin). <http://webmvc.com/vet/leki/13/biosept.php>
28. Пробиотическая добавка Интестевит. http://www.promspravka.ru/catalog/vet/vetpre/vetpre_7454.html?template=39
29. Пробиотическая добавка Биокорм Пионер. http://www.promspravka.ru/catalog/vet/vetpre/vetpre_7453.html?template=39
30. Елфимова, И.А., Ясников, С.В., Перов, А.Н. Интестевит и биокорм «Пионер» для повышения сохранности молодняка // Ветеринария. – 2006. – № 7. – С. 16–17.
31. А. с. 4465884/13 СССР, МПК 1710575 А1, С12N1/20, А61 К 35/74. Штамм бактерий *Bacillus sp.* – компонент лечебно-профилактического препарата против дисбактериозов и аллергий. – Оpubл. 07.02.92, Бюл. № 5.
32. Спорообразующие пробиотики – продукт будущего // УралАгроПресс, 2006. www.uralagro.ru
33. Неустроев, М.П., Татаринова, С.С. Применение пробиотика «Сахабактисубтил» стельным коровам // Зоотехния. – 2006. – № 12. – С. 21–23.
34. Компания БИОТРОФ – микробиология для животных. <http://www.biotroph.ru/>
35. Эндобактерин. http://vets.al.ru/doc/sh_q_ref/4005.html
36. Подберезный, В.В., Полянцев, Н.И. Влияние эндобактерина на иммунный статус организма и паренхиматозные органы коров при мастите // С.-х. биол. – 1994. – № 6. – С. 106–111.
37. Пат. 1723117 СССР, МПК С12 N 1/20. Штамм бактерий *Bacillus pulvifaciens*, используемый для изготовления лечебно-профилактического препарата против бактериальных инфекций у животных. – БИ, 1992, № 12.
38. Пат. 2035186 Российская Федерация, МПК С1, А61К 35/66. Профилактический био-препарат споролакт / Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Вьюницкая В.А., Литвин В.П., Смирнов В.В. – Заявл. 09.07.92; опубл. 20.05.95, БИ, № 14.
39. Краткий определитель бактерий Берги. – М.: Мир, 1980. – 495 с.
40. Nakano, M.M., Zuber, P. Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*) // Annu. Rev. Microbiol. – 1998. – Vol. 52. – P. 165–190.
41. Sneath, P.H.A. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. – Baltimore, Md.: William & Wilkins Co., 1986. – P. 1104.
42. Смирнов, В.В., Резник, С.Р., Вьюницкая, В.А., Сорокулова, И.Б., Литвин, В.П. Влияние комплексного пробиотика споролакта на микробиоценоз кишеч-

- ника теплокровных // Микробиол. ж. – 1995. – Т. 57, № 4. – С. 42–49.
43. Godic Torcar, K., Matijašic, B.B. Partial Characterisation of Bacteriocins Produced by *Bacillus cereus* Isolates from Milk and Milk Products // Food Technol. and Biotechnol. – 2003. – Vol. 41, N 2. – P. 121–129.
 44. Sharp, R.J., Scawen, M.D., Atkinson, T. Fermentation and downstream processing of *Bacillus* // Biotechnology Handbook: *Bacillus* / Harwood C.R. (editor). – New York: Plenum Press, 1989. – P. 255–292.
 45. Hosoi, T., Kiuchi, K. Natto – A food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (natto) // Handbook of Fermented Functional Foods / Farnworth E.R. (editor). – Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2003. – P. 227–245.
 46. Urdaci, M.C., Bressollier, Ph., Pinchuk, I. *Bacillus clausii* Probiotic Strains: Antimicrobial and Immunomodulatory Activities // J. Clin. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 38, N 2. – P. 86–90.
 47. Sanders, M.E., Morelli, L., Bush, S. “*Lactobacillus sporogenes*” is not a *Lactobacillus* probiotic // ASM News. – 2001. – Vol. 67. – P. 385–386.
 48. Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit ribosomal RNA sequence // Lett. Appl. Microbiol. – 1991. – Vol. 13. – P. 202–206.
 49. Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Komagata, K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus gen. nov.* and *Aneurinibacillus gen. nov.* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1996. – Vol. 46. – P. 939–946.
 50. Zahner, V., Rabinovitch, L., Suffys, P., Momen, H. Genotypic diversity among *Brevibacillus laterosporus* strains // Appl. and Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65. – P. 5182–5185.
 51. Loo, V.G., Poirier, L., Miller, M.A., et al. A Predominantly Clonal Multi-Institutional Outbreak of *Clostridium difficile* –Associated Diarrhea with High Morbidity and Mortality // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 353, N 23 (8). – P. 2442–2449.
 52. Коршунов, В.М., Поташник, Л. В., Ефимов, Б.А., Володин, Н.Н., Коршунова, О.В., Гуг, К., Frei, R., Reber, H., Иэрэндорж, Д. Микрофлора кишечника у детей Монголии, России и Швейцарии // Ж. микробиол. – 2001. – № 2. – С. 61–64.
 53. Коршунов, В.М., Поташник, Л. В., Ефимов, Б.А., Коршунова, О.В., Смеянов, В.В., Гуг, К., Frei, R. Качественный состав нормальной микрофлоры кишечника у лиц разных возрастных групп // Ж. микробиол. – 2001. – № 2. – С. 57–62.
 54. Tariq, Mahmood, Anjum, M.S., Hussain, I., Perveen, R. Effect of probiotic and growth promoters on chemical composition of broiler carcass // Int. J. Agr. Biol. – 2005. – Vol. 7, N 7. – P. 1036–1037.
 55. Kitahara, K., Suzuki, J. *Sporolactobacillus* Nov. Subgen // J. Appl. Bacteriol. – 1963. – Vol. 9. – P. 59–71.
 56. Kitahara, K., Lai, C.L. On the spore formation of *Sporolactobacillus inulinus* // J. Gen. and Appl. Microbiol. – 1967. – Vol. 13. – P. 97–203.
 57. Kitahara, K., Toyota, T. Auto-spheroplastization in *Sporolactobacillus* // J. Gen. and Appl. Microbiol. – 1972. – Vol. 18. – P. 99–107.
 58. Dellaglio, F., Bottazzi, V., Vescovo, M. Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1975. – Vol. 25. – P. 160–172.
 59. Uchida, K., Mogi, K. Cellular fatty acid spectra of *Sporolactobacillus* and some other *Bacillus-Lactobacillus* intermediates as a guide to their taxonomy // Vaccine. – 1973. – Vol. 18. – P. 1730–1737.
 60. Collins, M.D., Jones, D. Isoprenoid quinone composition as a guide to the classification of *Sporolactobacillus* and possibly related bacteria // J. Appl. Bacteriol. – 1979. – Vol. 47. – P. 356–360.
 61. Hess, A., Hollander, R., Mannheim, W. Lipoquinone of spore-forming rods, lactic acid and actinomycetes // J. Gen. Microbiol. – 1979. – Vol. 115. – P. 247–252.
 62. Hyronimus, B., Le Marrec, C., Hadj Sassi, A., Deschamps, A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria // Int. J. Food Microbiol. – 2000. – Vol. 61. – P. 193–197.
 63. Spinosa, M.R., Braccini, T., Ricca, E., De Felice, M., Morelli, L., Pozzi, G., Oggioni, M.R. On the fate of ingested *Bacillus* spores // Res. Microbiol. – 2000. – Vol. 151. – P. 361–368.
 64. Casula, G., Cutting, S.M. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract // Appl. and Environ. Microbiol. – 2002. – Vol. 68. – P. 2344–2352.
 65. Hoa, T.T., Duc, L.H., Isticato, R., Baccigalupi, L., Ricca, E., Van, P.H., Cutting, S.M. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model // Appl. and Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67. – P. 3819–3823.
 66. Jadamus, A., Vahjen, W., Simon, O. Growth behaviour of a spore-forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets // Arch. Tierernahr. – 2001. – Vol. 54. – P. 1–17.
 67. Осипова, И.Г., Сорокулова, И.Б., Васильева, Е.А., Буданова, Е.В. Доклинические испытания новых споровых пробиотиков // Вестн. РАМН. – 2005. – № 12. – С. 36–40.
 68. Осипова, И.Г., Михайлова, Н.А., Сорокулова, И.Б., Васильева, Е.А., Гайдеров, А.А. Споровые пробиотики // Ж. микробиол. – 2003. – № 3. – С. 113–119.
 69. Adami, A., Cavazzoni, V. Occurrence of selected bacterial groups in the feces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic // J. Basic Microbiol. – 1999. – Vol. 39. – P. 3–9.
 70. Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K., Kaminogawa, S. Changes in fecal microflora induced by intubation of mice with *Bacillus subtilis* (natto) spores are dependent upon dietary components // Can. J. Microbiol. – 1999. – Vol. 45. – P. 59–66.

71. Guo, X., Li, D., Lu, W., Piao, X., Chen, X. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2006. – Vol. 90, N 2. – P. 139–146.
72. Lee, K.H., Jun, K.D., Kim, W.S., Paik, H.D. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus* // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2001. – Vol. 32. – P. 146–151.
73. Pinchuk, I.V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I.B., Megraud, F., Urdaci, M.C. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics // *Antimicrob. Agents and Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – P. 3156–3161.
74. Hyronimus, B., Le Marrec, C., Urdaci, M.C. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4 // *J. Appl. Microbiol.* – 1998. – Vol. 85. – P. 42–50.
75. Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., Urdaci, M.C. Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4 // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – P. 5213–5120.
76. Godic Torkar, Karmen, Bogovic Matijaši, Bojana. Partial Characterisation of Bacteriocins Produced by *Bacillus cereus* Isolates from Milk and Milk Products. Bacteriocins Produced by *B. cereus* from Milk // *Food Technol. and Biotechnol.* – 2003. – Vol. 41, N 2. – P. 121–129.
77. Svetoch, E.A., Stern, N., Eruslanov, B.V., Kovalev, Y.N., Volodina, L.I., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Borzenkov, V.N., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E., Kudriavtseva, T.Y. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* Strains Inhibitory to *Campylobacter jejuni* and Characterization of Associated Bacteriocins // *J. Food Prot.* – 2005. – Vol. 68, N 1. – P. 11–17.
78. US Patent 6,989,370. January 24, 2006. Bacteriocins and novel bacterial strains / Stern N.J., Svetoch E.A., Urakov N.N., Eruslanov B.V., Volodina L.I., Kovalev Y.N., Kudriavtseva T.Y., Perelygin V.V., Pokhilenko V.D., Levchuk V.P., Borzenkov V.N., Svetoch O.E., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P.
79. Ерусланов, Б.В., Светоч, Э.А. Стерн, Н. и др. Выделение штаммов *Bacillus circulans* и *Paenibacillus polymyxa*, ингибирующих *Campylobacter jejuni*, и характеристика продуцируемых ими бактериоцинов // II Московский международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития»: Материалы конгресса, ч. 1. – М., 2003. – С. 92.
80. Сорокулова, И.Б. Сравнительное изучение биологических свойств биоспорина и других коммерческих препаратов на основе бацилл // *Микробиол. ж.* – 1997. – Т. 59, № 6. – С. 43–49.
81. Hattori, Z., Misawa, H., Igarashi, I., Sugiyama, Y. Effects of lactic acid-forming bacteria on *Vibrio comma* inoculated into intestinal segments of rabbits // *J. Bacteriol.* – 1965. – Vol. 90. – P. 541–545.
82. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* и препарата Споровит. <http://www.echohimtech.ru/spets2.php>
83. Cavazzoni, B., Adami, A., Castrovilli, C. Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic // *Brit. Poult. Sci.* – 1998. – Vol. 39. – P. 526–529.
84. Stamati, S., Alexopoulos, C., Siochu, A., Saoulidis, K., Kyriakis, S.C. Probiosis in sows by administration of *Bacillus toyoi* spores during late pregnancy and lactation: effect on their status/performance and on litter characteristics // *Int. J. Probiotics and Prebiotics*. – 2006. – Vol. 1, N 1. – P. 33–40.
85. Prokešova, L., Novakova, M., Julak, J., Mara, M. Effect of *Bacillus firmus* and other sporulating aerobic microorganisms on in vitro stimulation of human lymphocytes: a comparative study // *Folia microbiol.* – 1994. – Vol. 39. – P. 501–504.
86. Muscettola, M., Grasso, G., Blach-Olszewska, Z., Migliaccio, P., Borghesi-Nicoletti, C., Giarrantana, M., Gallo, V.C. Effects of *Bacillus subtilis* spores on interferon production // *Pharmacol. Res.* – 1992. – Vol. 26, Suppl. 2. – P. 176–177.
87. Ciprandi, G., Scordamaglia, A., Venuti, D., Caria, M., Canonica, G.W. In vitro effects of *Bacillus subtilis* on the immune response // *Chemioterapia*. – 1986. – V(6). – P. 404–407.
88. Vacca, A., Pantaleo, G., Ronco, M., Dammacco, F. Chemoimmunotherapy for multiple myeloma using an intermittent combination drug schedule (Melphalan + Prednisone) and alternating courses of *Bacillus subtilis* spores // *Chemioterapia*. – 1983. – II(5). – P. 300–306.
89. Fiorini, G., Cimminello, C., Chianese, R., et al. *Bacillus subtilis* selectively stimulates the synthesis of membrane bound and secreted IgA // *Chemioterapia*. – 1985. – Vol. 4. – P. 310–315.
90. Duc le, H., Hong, H.A., Barbosa, T.M., Henriques, A.O., Cutting, S.M. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, N 4. – P. 2161–2171.
91. Подберезный, В.В., Полянец, Н.И. Влияние эндобактерина на иммунный статус организма и паренхиматозные органы коров при мастите // *С.-х. биол.* – 1994. – № 6. – С. 106–111.
92. Резник, С.Р., Вьюницкая, В.А., Афонская, С.В., Смирнов, В.В. Серологический ответ макроорганизма на патогенные бактерии под влиянием пробиотика из бацилл // *Микробиол. ж.* – 1993. – Т. 55, № 5. – С. 81–83.
93. Сорокулова, И.Б. Влияние пробиотиков из бацилл на функциональную активность макрофагов // Ан-

- тибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 2. – С. 20–23.
94. Осипова, И.Г., Сорокулова, И.Б., Терешкина, Н.В., Григорьева, Л.В. Изучение безопасности бактерий рода *Bacillus*, составляющих основу некоторых пробиотиков // Ж. микробиол. – 1998. – № 6. – С. 68–70.
 95. Сорокулова, И.Б. Перспективы применения бактерий рода *Bacillus* для конструирования новых био-препаратов // Антибиотики и химиотерапия – 1996. – Т. 41, № 10. – С. 13–15.
 96. Бондаренко, В.М., Белявская, В.А. Конструирование генно-инженерных препаратов – пробиотиков и их безопасность. <http://www.gastroportal.ru/php/content.php?id=1340&pr=print>
 97. Mohan, J.C., Arora, R., Khalilullah, M. Preliminary observations on effect of *Lactobacillus sporogenes* on serum lipid levels in hypercholesterolemic patients // Indian J. Med. Res. – 1990. – Vol. 92. – P. 431–432.
 98. Meroni, P.L., Palmieri, R., Barcellini, W., de Bartolo, G., Zanussi C. Effect of long-term treatment with *Bacillus subtilis* on the frequency of urinary tract infections in older patients // Chemioterapia – 1983. – II(2). – P. 142–144.
 99. Грачева, М., Гаврилов, А.Ф., Соловьева, А.И., Смирнов, В.В., Сорокулова, И.Б., Резник, С.Р., Чудновская, Н.В. Эффективность нового бактериального препарата биоспорина при лечении острых кишечных инфекций // Ж. микробиол. – 1996. – № 1. – С. 75–77.
 100. Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K., Kaminogawa, S. Changes in fecal microflora induced by intubation of mice with *Bacillus subtilis* (*natto*) spores are dependent upon dietary components // Can. J. Microbiol. – 1999. – Vol. 45. – P. 59–66.
 101. Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K., Kaminogawa, S. Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (*natto*), catalase, or subtilisin // Can. J. Microbiol. – 2000. – Vol. 46. – P. 892–897.
 102. Jadamus, A., Vahjen, W., Simon, O. Studies on the mode of action of probiotics: effects of the spore-specific dipicolinic acid on selected intestinal bacteria // J. Agr. Sci. – 2005. – Vol. 143. – P. 529–535.
 103. Samanya, M., Yamauchi, K.E. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto* // Compar. Biochem. and Physiol. Ser. A. Mol. and Integr. Physiol. – 2002. – Vol. 133. – P. 95–104.
 104. Caldini, G., Trotta, F., Cenci, G. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide genotoxicity by *Bacillus* strains // Res. Microbiol. – 2002. – Vol. 153. – P. 165–171.
 105. Никитенко, В.И., Бородин, А.В., Никитенко, М.В. Некоторые новые данные о механизме действия спорообразующих пробиотиков // Актуальные вопросы военной и практической медицины: Сб. трудов научно-практической конференции врачей При-волжского военного округа. – Оренбург, 2000. <http://esculapus.h1.ru>
 106. Смирнов, В.В. Антибиотики и/или пробиотики: размышления и факты // Мед. картотека. – 1998. – № 8.
 107. Dervenis, C., Smailis, D., Hatzitheoklitos, E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis // J. Hepato-Biliary-Pancreat. Surg. – 2003. – Vol. 10. – P. 415–418.
 108. History of Natto and Its Relatives / Soyfoods Center, Lafayette, California, 2004. www.thesoydaily.com/SFC/Fsoyfoods453.asp
 109. Sarkar, P.K., Hasenack, B., Nout, M.J. Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (Indian *nema*) and locust beans (African *Soumbala*) // Int. J. Food Microbiol. – 2002. – Vol. 25. – P. 175–186.
 110. Зайченко, А.А. Разработка новых методов борьбы с картофельной болезнью хлеба // Научный потенциал студенчества – будущему России: Материалы Всероссийской научной студенческой конференции. – Ставрополь: СевКавГТУ, 2006. – 1 с.
 111. [SCAN] Scientific Committee on Animal Nutrition. 2002b. Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition, Opinion of the SCAN on the criteria for assessing the safety of microorganisms resistant to antibiotics of human, clinical, and veterinary importance. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out64_en.pdf. Accessed 1 July 2003.
 112. Beattie, S.H., Williams, A.G. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay // Lett. Appl. Microbiol. – 1999. – Vol. 28. – P. 221–225.
 113. Guinebretière, M.-H., Broussolle, V., Nguyen-The, Ch. Enterotoxigenic Profiles of Food-Poisoning and Food-Borne *Bacillus cereus* Strains // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40, N 8. – P. 3053–3056.
 114. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the safety of the product “Kemzyme W Dry” regarding the ability of *Bacillus* strains involved in the manufacture to produce toxins // EFSA Journal. – 2004. – Vol. 118. – P. 1–4.
 115. Ouhib, O., Clavel, Th., Schmitt, Ph. The Production of *Bacillus cereus* Enterotoxins Is Influenced by Carbohydrate and Growth Rate // Curr. Microbiol. – 2006. – Vol. 53, N 3. – P. 222–226.
 116. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the use of certain enzymes in animal feeding stuffs European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. Adopted 4 June 1998, updated 16 October 2002. – 15 p.
 117. Donohue, D.C., Salminen, S. Safety of probiotic bacteria // Asia Pacif. J. Clin. Nutr. – 1996. – Vol. 5. – P. 25–28.

118. Adams, M.R., Marteau, P. On the safety of lactic acid bacteria from food // *Int. J. Food Microbiol.* – 1995. – Vol. 27. – P. 263–264.
119. Ishibashi, N., Yamazaki, S. Probiotics and safety // *Amer. J. Clin. Nutr.* – 2001. – Vol. 73, suppl. – P. 465–470.
120. Andersson, A., Granum, P.E., Ronner, U. The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism // *Int. J. Food Microbiol.* – 1998. – Vol. 39. – P. 93–99.
121. Rowan, N.J., Deans, K., Anderson, J.G., Gemmell, C.G., Hunter, I.S., Chaithong, T. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67. – P. 3873–3881.
122. de Boer, A.S., Diderichsen, B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* – 1991. – Vol. 36. – P. 1–4.
123. Richard, V., Auwera, P., Snoeck, R., Daneau, D., Meunier, F. Nosocomial bacteremia caused by *Bacillus* species // *Eur. J. Clin. Microbiol. and Infec. Diseases.* – 1988. – Vol. 7. – P. 783–785.
124. Oggioni, M.R., Pozzi, G., Balensin, P.E., Galieni, P., Bigazzi, C. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis* // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36. – P. 325–326.
125. Spinosa, M.R., Wallet, F., Courcol, R.J., Oggioni, M.R. The trouble in tracing opportunistic pathogens: cholangitis due to *Bacillus* in a French hospital caused by a strain related to an Italian probiotic? // *Microb. Ecol. Health and Disease.* – 2000. – Vol. 12. – P. 99–101.
126. Ciffo, F. Determination of the spectrum of antibiotic resistance of the *Bacillus subtilis* strains of Enterogermina // *Chemioterapia.* – 1984. – III(1). – P. 45–51.
127. Mazza, P., Zani, F., Martelli, P. Studies on the antibiotic resistance of *Bacillus subtilis* strains used in oral bacteriotherapy // *Boll. chim. farm.* – 1992. – Vol. 131. – P. 401–408.
128. Белявская, В.А., Кашперова, Т.А., Бондаренко, В.М., Ильичев, А.А., Сорокулова, И.Б., Малик, Н.И. Экспериментальная оценка биобезопасности генно-инженерных бактерий на модели штамма *Bacillus subtilis*, продуцирующего интерферон // *Ж. микробиол.* – 2001. – № 2. – С. 16–20.
129. Green, D.H., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Vaccigalupi, L., Ricca, E., Cutting, S.M. Characterization of two *Bacillus* probiotics // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol. 65. – P. 4288–4291.
130. Codex Alimentarius FAO/WHO Food Standards. <http://www.codexalimentarius.net>
131. http://ec.europa.eu/food/index_en.htm
132. von Wright, A. Regulating the safety of probiotics – the European approach // *Curr. Pharm. Des.* – 2005. – Vol. 11. – P. 17–23.
133. Przyrembel, H. Consideration of possible legislation within existing regulatory frameworks // *Amer. J. Clin. Nutr.* – 2001. – Vol. 73, suppl. – P. 471–475.
134. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001. Available from: http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm. Accessed 1 July 2003.
135. Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM // *Int. J. Syst. and Evol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 53, Pt. 6. – P. 1701–1702.
136. Seki, H., Shiohara, M., Matsumura, T., Miyagawa, N., Tanaka, M., Komiyama, A., et al. Prevention of antibiotic-associated diarrhea in children by *Clostridium butyricum* MIYAIRI // *Pediat. Int.* – 2003. – Vol. 45. – P. 86–90.
137. Oggioni, M., Ciabattini, A., Cuppone, A.M., Pozzi, G. *Bacillus* spores for vaccine delivery // *Vaccine.* – 2003. – Vol. 21, Suppl. 2. – P. 96–101.
138. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/index_en.html
139. Borriello, S.P., Hammes, W.P., Holzapfel, W., et al. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria // *Clin. Infec. Diseases.* – 2003. – Vol. 36. – P. 775–780.
140. Guarner, F., Malagelada, J.R. Gut flora in health and disease // *Lancet.* – 2003. – Vol. 361. – P. 512–519.
141. Probiotics Microbes: The Scientific Basis / R.J. Collier, et al. // A Report from American Academy of Microbiology. – Washington, 2006. – 28 p.
142. Бакулина, Л.Ф., Перминова, Н.Г., Тимофеев, И.В. и др. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии // *Биотехнология.* – 2001. – № 2. – С. 48–56.
143. Малик, Н.И., Панин, А.Н. Ветеринарные пробиотические препараты // *Ветеринария.* – 2001. – № 1. – С. 46–51.