

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Aleksandra SNEDEC

**VPLIV PROBIOTIKOV NA MASO MIŠI IN  
NJIHOVIH MLADIČEV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Aleksandra SNEDEC

**VPLIV PROBIOTIKOV NA MASO MIŠI IN NJIHOVIH MLADIČEV**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij- 2. stopnja

**THE INFLUENCE OF PROBIOTICS ON WEIGHT OF MICE AND  
THEIR OFFSPRING**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Znanost o živalih. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mlekarstvo in v Centru za laboratorijske živali na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Gregorja Gorjanca in za somentorja asist. dr. Primoža Trevna.

Recenzentka: prof. dr. Irena Rogelj

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Gregor GORJANC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: asist. dr. Primož TREVEN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Irena ROGELJ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačano, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu prek Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Aleksandra Snedec

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Du2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| DK | UDK 579(043.2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| KG | mikrobiologija/prehrana živali/krmni dodatki/probiotiki/ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG)/ <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 (LK7 <sup>R</sup> )/telesna masa                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| AV | SNEDEC, Aleksandra, dipl. inž. kmet. zootehnike (UN)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| SA | GORJANC, Gregor (mentor)/TREVEN, Primož (somentor)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| KZ | SI – 1230 Domžale, Groblje 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| LI | 2015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| IN | VPLIV PROBIOTIKOV NA MASO MIŠI IN NJIHOVIH MLADIČEV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| TD | Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| OP | X, 44 str., 6 pregl., 7 sl., 36 vir, 2 pril.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| JJ | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| AI | Veliko raziskav dokazuje, da probiotiki kot krmni dodatki, blagodejno vplivajo na živali gostiteljice z izboljšanjem črevesnega mikrobnege ravnovesja, preprečujejo prebavne motnje in povečujejo prirejo živali. V naši raziskavi nas je zanimalo ali probiotična seva <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG) in <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 (LK7), vplivata na maso brejih miši in njihovih mladičev. Poskus smo izvedli na miših linije FVB/NHanHsd, v dveh ločenih ponovitvah. V vsaki ponovitvi smo uporabili 30 samic in 15 samcev. Vse živali, ki so bile ves čas poskusa krmljene z zadostno količino ( <i>ad libitum</i> ) peletirane krme in oskrbljene z vodo, smo ustrezno označili in jih po paritvi naključno razdelili v 3 skupine: skupina N (kontrolna skupina), skupina G (dnevna aplikacija $\sim 4 \times 10^8$ KE LGG) in skupina K (dnevna aplikacija $\sim 3,6 \times 10^8$ KE LK7). Živali smo tekom poskusa vsakodnevno tehtali pred aplikacijo probiotičnih sevov. Iz mas brejih miši in števila skotenih mladičev smo ocenili maso mladičev. Rezultate telesnih mas miši in njihovih mladičev smo statistično obdelali in naredili primerjavo med vsemi tremi skupinami. Primerjava skupin je pokazala, da probiotična seva LK7 in LGG nista statistično značilno vplivala na maso brejih miši in ocenjeno maso njihovih mladičev, v primerjavi s kontrolno skupino. |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 579(043.2)

CX microbiology/animal nutrition/feed additives/*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)/*Lactobacillus gasseri* K7 (LK7<sup>R</sup>)/body mass

AU SNEDEC, Aleksandra

AA GORJANC, Gregor (supervisor)/ TREVEN, Primož (co-advisor)

PP SI – 1230 Domžale, Groblje 3

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Animal Science

PY 2015

TI THE INFLUENCE OF PROBIOTICS ON WEIGHT OF MICE AND THEIR OFFSPRING

DT M.Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO X, 44 p., 6 tab., 7 fig., 36 ref, 2 ann.

LA sl

AL sl/en

AB Many studies have established that the use of probiotics as feed additives provides beneficial effects on the host animal. These effects include improved intestinal microbial balance, prevention of indigestion and increase in the growth rate of the animals. The focus of our study was the effect of the *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) and *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) strains on the body mass of pregnant mice and their offspring. The experiment was carried out in two separate repetitions on the FVB/NHanHsd mice. Thirty females and 15 males were used each time. The animals were provided with adequate amount of pelleted food and water (*ad libitum*). They were appropriately marked and after mating, randomly divided into 3 groups: group N (control group), group G (daily application  $\sim 4 \times 10^8$  CFU LGG) and group K (daily application  $\sim 3,6 \times 10^8$  CFU LK7). During the experiment, the mice were weighted daily, prior of application of probiotic strains. The body mass of the offspring was estimated on the basis of the body mass of the pregnant mice and the number of offspring. After statistical analysis of the results of the weighing, a comparison was made between the three groups. A comparison between the control and the experimental groups revealed that the application of LGG and LK7 strains did not have any influence on the body mass of the pregnant mice and the estimated body mass of their offspring.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                                     | str.      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA                                                                 | III       |
| KEY WORDS DOCUMENTATION                                                                             | IV        |
| KAZALO VSEBINE                                                                                      | V         |
| KAZALO PREGLEDNIC                                                                                   | VII       |
| KAZALO SLIK                                                                                         | VIII      |
| KAZALO PRILOG                                                                                       | IX        |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI                                                                                | X         |
| <b>1 UVOD</b>                                                                                       | <b>1</b>  |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>                                                                              | <b>3</b>  |
| 2.1 PROBIOTIKI                                                                                      | 3         |
| 2.1.1 Rod <i>Lactobacillus</i>                                                                      | 4         |
| 2.1.2 Rod <i>Bifidobacterium</i>                                                                    | 5         |
| 2.1.3 Delovanje probiotikov                                                                         | 5         |
| 2.2 PROBIOTIKI V PREHRANI LJUDI IN NJIHOV VPLIV NA ZDRAVJE                                          | 7         |
| 2.2.1 <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 Rif <sup>R</sup> (LK7 <sup>R</sup> )                          | 10        |
| 2.2.2 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (LGG)                                                       | 11        |
| 2.3 PROBIOTIKI KOT KRMNI DODATEK V ŽIVINOREJI                                                       | 11        |
| 2.3.1 Zakonodaja probiotikov pri živalih                                                            | 13        |
| 2.3.2 Uporaba probiotičnih krmnih dodatkov v reji prašičev                                          | 14        |
| 2.3.3 Uporaba probiotičnih dodatkov v reji perutnine                                                | 15        |
| 2.3.4 Uporaba probiotičnih dodatkov v reji prežvekovalcev                                           | 16        |
| 2.3.5 Miš kot model za raziskave                                                                    | 17        |
| 2.3.5.1 Raziskave probiotikov na miših                                                              | 18        |
| <b>3 MATERIALI IN METODE</b>                                                                        | <b>20</b> |
| 3.1 PRIPRAVA FOSFATNEGA PUFRA IN GOJIŠČ                                                             | 20        |
| 3.2 PRIPRAVA PRIPRAVKOV ZA APLIKACIJO Z OROGASTRIČNO SONDO                                          | 21        |
| 3.2.1 Priprava rekonstituiranega mleka v prahu                                                      | 21        |
| 3.2.2 Priprava suspenzije bakterij LK7 <sup>R</sup> in LGG v rekonstituiranem mleku                 | 21        |
| 3.2.3 Preverjanje števila bakterij LGG in LK7 <sup>R</sup> , suspendiranih v rekonstituiranem mleku | 22        |
| 3.3 POTEK IN IZVEDBA POSKUSA NA BREJIH MIŠIH LINIJE FVB/NHANHSD                                     | 22        |
| 3.4 OCENJENA MASA MLADIČEV                                                                          | 26        |
| 3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV                                                                   | 27        |
| <b>4 REZULTATI</b>                                                                                  | <b>28</b> |
| 4.1 PREVERJANJE ŠTEVILA BAKTERIJ LGG IN LK7 <sup>R</sup> , SUSPENDIRANIH V REKONSTITUIRANEM MLEKU   | 28        |
| 4.2 SPREMLJANJE MASE BREJIH MIŠI MED POSKUSOM                                                       | 29        |
| 4.3 OCENA POVPREČNE MASE MLADIČEV PRI KOTITVI                                                       | 32        |
| <b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>                                                                         | <b>35</b> |
| 5.1 RAZPRAVA                                                                                        | 35        |

|          |                      |           |
|----------|----------------------|-----------|
| 5.2      | SKLEPI .....         | 39        |
| <b>6</b> | <b>POVZETEK.....</b> | <b>40</b> |
| <b>7</b> | <b>VIRI.....</b>     | <b>42</b> |
|          | <b>ZAHVALA</b>       |           |
|          | <b>PRILOGE</b>       |           |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                            | str. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Preglednica 1: Mikroorganizmi, ki so najbolj pogosto zastopani med probiotiki (Saad in sod., 2013: 3)                                                      | 4    |
| Preglednica 2: Nekateri probiotiki in njihovi vplivi na zdravje gostitelja (povzeto po Saad in sod., 2013: 4)                                              | 10   |
| Preglednica 3: Taksonomska klasifikacija hišne miši (Kryštufek, 2003: 592)                                                                                 | 17   |
| Preglednica 4: Rezultati preverjanja števila kolonijskih enot (KE) bakterij LGG in LK7 <sup>R</sup> v pripravkih za aplikacijo, z metodo štetja na ploščah | 28   |
| Preglednica 5: Porodne mase miši in ocenjene mase mladičev v poskusu 1                                                                                     | 32   |
| Preglednica 6: Porodne mase miši in ocenjene mase mladičev v poskusu 2                                                                                     | 34   |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                 | str. |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Slika 1: Vpliv probiotičnih bakterij in kvasovk na pregradno funkcijo črevesnega epitela (Ohland in Macnaughton, 2010: 2) ..... | 6    |
| Slika 2: Shematski prikaz poteka dela z živalmi.....                                                                            | 22   |
| Slika 3: Razporeditev kletk v stojalu za individualno prezračevane kletke .....                                                 | 24   |
| Slika 4: Tehtanje miši (foto: A. Snedec, 2013).....                                                                             | 25   |
| Slika 5: Spreminjanje mase posameznih živali med poskusom 1 .....                                                               | 29   |
| Slika 6: Spreminjanje mase posameznih živali med poskusom 2 .....                                                               | 30   |
| Slika 7: Ocenjena povprečja telesnih mas živali s 95% intervalom zaupanja po skupinah in dnevih za oba poskusa skupaj .....     | 31   |

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Telesne mase posameznih miši v poskusu 1  
Priloga B: Telesne mase posameznih miši v poskusu 2

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|                   |                                                                                                |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ARRS              | Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije                                   |
| dH <sub>2</sub> O | Destilirana voda                                                                               |
| EFSA              | Evropska agencija za varnost hrane (angl.: <i>European Food safety Authority</i> )             |
| <i>E. coli</i>    | <i>Escherichia coli</i>                                                                        |
| FDA               | Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (angl.: <i>Food and Drug Administration</i> )     |
| GRAS              | Splošno priznani kot varni (angl.: <i>generally regarded as safe</i> )                         |
| IgA               | Imunoglobulin A                                                                                |
| KE                | Kolonijske enote                                                                               |
| LK7 <sup>R</sup>  | <i>Lactobacillus gasseri</i> K7, odporen proti rifampicinu                                     |
| LGG               | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG                                                              |
| MEANS             | Statistična procedura za obdelavo podatkov                                                     |
| MKB               | Mlečnokislinske bakterije                                                                      |
| MRS               | Gojišče za rast mlečnokislinskih bakterij                                                      |
| MRS <sup>R</sup>  | Gojišče MRS z rifampicinom                                                                     |
| PBS               | Fosfatni pufer (angl.: <i>phosphate buffered saline</i> )                                      |
| RAPD              | Analiza naključno pomnožene polimorfne DNA (angl.: <i>randomly amplified polymorphic DNA</i> ) |
| SPF               | Proste specifičnih patogenov (angl.: <i>specific pathogen free</i> )                           |
| VURS              | Veterinarska uprava Republike Slovenije                                                        |
| QPS               | Priznana domneva o varnosti (PDV) (angl.: <i>qualified presumption of safety</i> )             |

## 1 UVOD

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki zaužiti v zadostni količini pozitivno vplivajo na zdravje gostitelja (Guarner in Shaafsma, 1998 in Zocco in sod., 2006). Na trgu so na voljo v obliki funkcionalnih živil, prehranskih dopolnil in zdravil brez recepta. Ugodno vplivajo na črevesno mikrobioto, aktivnost encimov in na imunski sistem (Gaggia in sod., 2010), kar pomeni, da pripomorejo pri preprečevanju črevesnih bolezni (driska, zaprtje, vnetja) in alergijskih simptomov, posredno pa vplivajo tudi na splošno zdravstveno stanje gostitelja.

Probiotike pa že vrsto let uporabljamo tudi v prehrani živali, predvsem kot alternativne izdelke, ki nadomeščajo uporabo antibiotikov kot pospeševalcev rasti v živinoreji, ki so jih leta 2006 v Evropski uniji prepovedali (Gaggia in sod., 2010). Znanstveniki jih že vrsto let preučujejo na različnih živalskih vrstah in ugotavljajo, da kot krmni dodatki blagodejno vplivajo na žival gostiteljico z izboljšanjem črevesnega mikrobnege ravnovesja. Ravno tako kot pri ljudeh, tudi pri živalih pomagajo preprečevati prebavne motnje in ugodno vplivajo na imunski sistem. Nekatere študije pa so pokazale, da naj bi povečevali prirast (Bernardeau in sod., 2002). Praksa je pokazala, da živali z zdravo mikrobioto bolje priraščajo, porabijo manj krme za enoto prirasta in imajo bistveno manj zdravstvenih težav (Gaggia in sod., 2010).

Preden probiotik pride na tržišče kot krmni dodatek ali prehransko dopolnilo, mora prestati vrsto raziskav glede njegove učinkovitosti in varnosti. Eden od korakov pri testiranju probiotičnih mikroorganizmov so tudi živalski modeli, ki predstavljajo dragoceno orodje za pridobivanje informacij delovanja probiotika v živem organizmu.

Magistrska naloga je del temeljnega projekta J4-3606, »Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka« in sicer v delovnem sklopu z naslovom »Proučevanje možnih mehanizmov endogenega prenosa probiotičnih bakterij«. Projekt je financirala Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS). Celotno študijo je odobrila Komisija za medicinsko etična vprašanja Republike Slovenije (št. soglasja: 32/07/10), dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih pa Veterinarka uprava republike Slovenije (VURS; št. soglasja 34401-17/2011/5). Nalogo sem opravljala na Katedri za

mlekarstvo, v prostorih Centra za laboratorijske živali na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete. Poskus je potekal z uporabo mišjega modela in dveh probiotičnih sevov: *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) in *Lactobacillus gasseri* K7, ki je odporen proti rifampicinu (LK7<sup>R</sup>). Po parjenju smo miši razdelili v tri skupine in jim poleg standardne krme za miši od sedmega dneva brejosti dalje vsakodnevno z orogastrično sondo aplicirali rekonstituirano mleko (skupina N), v rekonstituiranem mleku suspendirane bakterije LGG (skupina G) in v rekonstituiranem mleku suspendirane bakterije LK7<sup>R</sup> (skupina K).

Namen naloge je ugotoviti, ali bosta probiotična seva, ki jih bomo aplicirali mišim, v obdobju od paritve do kotitve, vplivala na njihovo telesno maso ter maso njihovih mladičev.

Hipotezi:

1. Breje miši, ki bodo uživale probiotična seva *Lactobacillus rhamnosus* GG in *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu, bodo imele večji prirast od kontrolne skupine.
2. Breje miši, ki bodo zauživale probiotična seva *Lactobacillus rhamnosus* GG in *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu, bodo imele mladiče z večjo ocenjeno telesno maso.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PROBIOTIKI

Glede na raziskavo Organizacije za prehrano in kmetijstvo (FAO) ter smernic Svetovne zdravstvene organizacije (FAO/WHO, 2002), morajo biti probiotični mikroorganizmi v živilih sposobni preživeti prehod skozi prebavila. To pomeni, da morajo biti odporni proti prebavnim sokovom in žolču. Poleg tega morajo imeti sposobnost vsaj prehodnega naseljevanja prebavnega trakta. Biti morajo varni, učinkoviti, ter stabilni v izdelku med skladiščenjem, vse do roka uporabe izdelka. Zakonodaja na področju ocene varnosti probiotikov je dobro definirana v ZDA, Kanadi in Evropi, čeprav enotnega standarda ni. V ZDA imajo določeni mikroorganizmi (predvsem mlečnokislinske bakterije – MKB) za prehrano ljudi status GRAS (angl. *generally regarded as safe*), kar pomeni, da so splošno spoznani kot varni mikroorganizmi, določi pa jih ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (FDA), ki deluje pod okriljem ameriškega ministrstva za zdravje. V Evropi varnost probiotikov določa Evropska agencija za varnost hrane (EFSA). EFSA določa varnost probiotičnih mikroorganizmov po konceptu QPS (angl. *qualified presumption of safety*) - domneve o varnosti uporabe mikroorganizmov. Glede na raziskave naj bi bila določitev varnosti probiotikov v prehrani boljša v Evropi, saj upoštevamo še dodatna merila za ocenjevanje varnosti probiotičnih dodatkov, kot so zgodovina varne uporabe v živilski industriji, odpornost proti antibiotikom in ugotavljanje dejavnikov virulence (Gaggia in sod., 2010).

S strani EFSA in FDA so določene pričakovane lastnosti in kriteriji varnosti probiotikov (Gaggia in sod., 2010):

- netoksičnost in nepatogenost mikroorganizma;
- točna taksonomska razvrstitev mikroorganizma;
- preživetje, kolonizacija in presnovna aktivnost mikroorganizma (odpornosti proti želodčnemu soku in žolču, preživetje v gastro-intestinalnem traktu, sposobnost pripenjanja na epitelij ali sluznico, tekmovanje za hranila);
- proizvodnja protimikrobnih snovi;
- antagonizem proti patogenim bakterijam;
- modulacija imunskega sistema;

- znanstveno dokazan zdravju koristen učinek;
- genetska stabilnost;
- stabilnost probiotičnih lastnosti mikroorganizma med pripravo in skladiščenjem probiotičnega pripravka / izdelka;
- kadar je probiotičen mikroorganizem vključen v živilo, ne sme vplivati na tehnološke lastnosti in spreminjati organoleptičnih lastnosti živila.

Uredba o izvajanju Uredbe (ES) Evropskega parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih (Uredba..., 2007 in 2010) na trgu določa potrebne postopke izdaje dovoljenj. S tem se zagotovi, da so navedbe na embalaži in v trgovanju z živilom jasne, natančne, ter temeljijo na dokazih, ki jih je znanstvena skupnost sprejela in dokazala. Probiotiki so vse bolj priljubljeni ne samo med potrošniki, temveč tudi med proizvajalci, saj njihove lastnosti, ki ugodno vplivajo na zdravje, bistveno prispevajo k hitri rasti in širitvi njihovega trga prodaje probiotičnih živil.

Mikroorganizmi, ki se pojavljajo kot probiotiki, spadajo v heterogeno skupino mlečnokislinskih bakterij (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, ...) in rodu *Bifidobacterium* (Saad in sod., 2013).

Preglednica 1: Mikroorganizmi, ki so najbolj pogosto zastopani med probiotiki (Saad in sod., 2013: 3)

| Rod<br><i>Lactobacillus</i> | Rod<br><i>Bifidobacterium</i> | Ostale mlečnokislinske<br>bakterije | Drugi mikroorganizmi                 |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>L. acidophilus</i>       | <i>B. adolescentis</i>        | <i>Enterococcus faecium</i>         | <i>Escherichia coli</i> ; sev Nissle |
| <i>L. casei</i>             | <i>B. animalis</i>            | <i>Lactococcus lactis</i>           | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>      |
| <i>L. curvatus</i>          | <i>B. bifidum</i>             | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>    | <i>Saccharomyces boulardii</i>       |
| <i>L. delbrueckii</i>       | <i>B. breve</i>               | <i>Pediococcus acidilactici</i>     |                                      |
| <i>L. farciminis</i>        | <i>B. infantis</i>            | <i>Streptococcus thermophilus</i>   |                                      |
| <i>L. fermentum</i>         | <i>B. lactis</i>              | <i>Streptococcus diacetylactis</i>  |                                      |
| <i>L. gasseri</i>           | <i>B. longum</i>              | <i>Streptococcus intermedius</i>    |                                      |
| <i>L. johnsonii</i>         | <i>B. thermophilum</i>        |                                     |                                      |
| <i>L. paracasei</i>         |                               |                                     |                                      |
| <i>L. plantarum</i>         |                               |                                     |                                      |
| <i>L. reuteri</i>           |                               |                                     |                                      |
| <i>L. rhamnosus</i>         |                               |                                     |                                      |

### 2.1.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* je velika in heterogena taksonomska enota, ki vsebuje več kot 100 različnih vrst, ki spadajo v skupino mlečnokislinskih bakterij. To je rod po Gramu

pozitivnih, nespороgenih bakterij, ki so prisotne v surovinah živalskega in rastlinskega izvora. Energijo pridobivajo izključno s fermentacijo sladkorjev (Adamič in sod., 2003). Mnoge vrste so pomembne v normalni sestavi črevesne mikrobiote ljudi in živali, njihovo pojavljanje in število pa sta odvisna od gostitelja. Številni probiotični sevi, ki jih dodajajo živilom, prehranskim dopolnilom in krmu, pripadajo vrstam tega rodu. Številne študije so pokazale, da specifični sevi vrst iz rodu *Lactobacillus* velikokrat pripomorejo pri izboljšanju ravnotežja črevesne mikrobiote in dobrega počutja pri ljudeh. Manj je študij, ki bi preučevale vpliv teh bakterij pri živalih (Saad in sod., 2013).

### **2.1.2 Rod *Bifidobacterium***

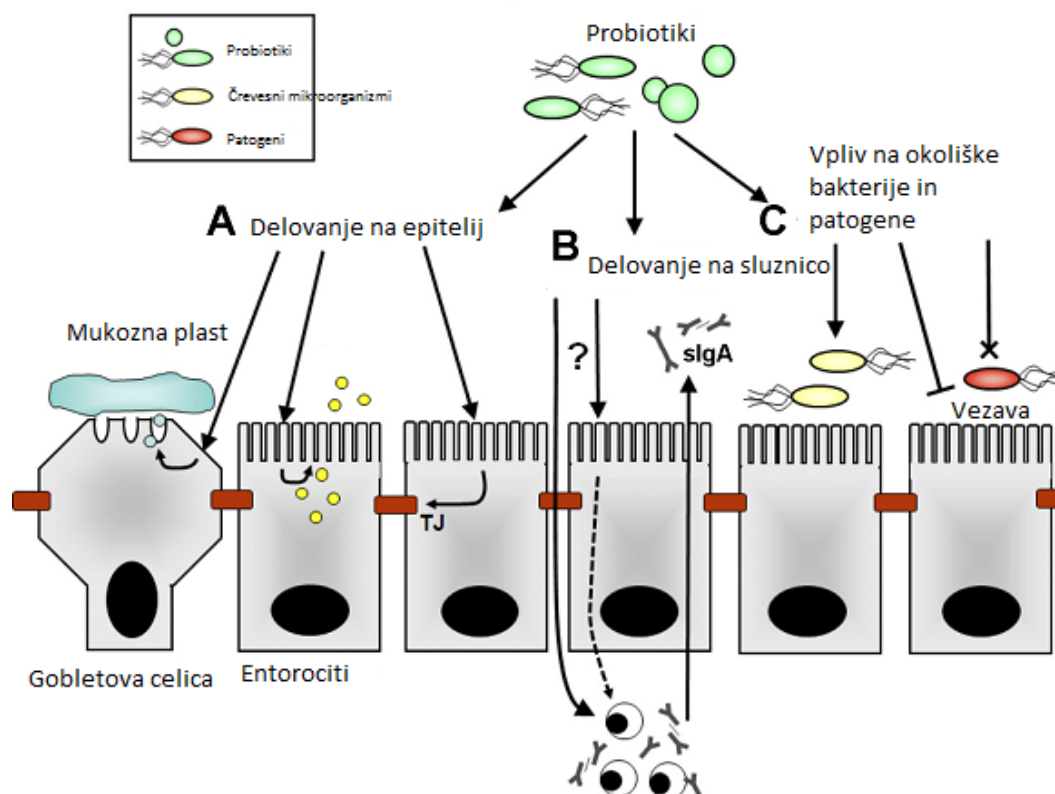
Bakterije iz rodu *Bifidobacterium* so anaerobne in ne tvorijo spor (Adamič in sod., 2003). Veljajo za pomembne bakterije, ki naseljujejo prebavni trakt ljudi in živali. Njihova prisotnost v velikem številu je povezana z dobrim zdravstvenim stanjem gostitelja. Vrste iz rodu *Bifidobacterium* pomagajo pri ohranjanju primerne ravnovesja vseh ostalih mikroorganizmov v prebavnem traktu in zmanjšujejo tveganje za okužbo s patogeni. Pogosto jih uporabljamo v prehrani ljudi in v farmacevtskih preparatih, njihova uporaba v prehrani živali se zadnja leta povečuje (Saad in sod., 2013).

### **2.1.3 Delovanje probiotikov**

Mehanizem delovanja in učinkovitosti posameznega probiotika sta pogosto odvisna od interakcij z mikrobioto gostitelja ali z imunsko-kompetentnimi celicami, ki se nahajajo v črevesni sluznici (Saad in sod., 2013).

Prebavni trakt je raznoliko mikrookolje, kjer uspešno živi in raste več kot 1000 vrst bakterij. Ena plast epitelija je vse, kar ločuje komenzalne in patogene mikroorganizme od imunskih celic, in je tako ključnega pomena za delovanje obrambnih mehanizmov, potrebnih za preprečevanje okužb in vnetja. Epitelij je sestavljen iz goste sluznice, ki vsebuje sekretorne imunoglobuline (Ig) A in protimikrobne peptide. Prepustnost med celicami uravnavajo tesni stiki. Različni mehanizmi preprečujejo razvoj patogenih bakterij na/v epiteliju in tako izbruh vnetij in širjenje mikroorganizmov v okoliška tkiva. Kakršnakoli motnja v epiteliju lahko vodi do izgube imunske tolerance za mikrobioto in

neprimeren vnetni odziv, kar lahko povzroči razvoj različnih bolezni, kot sta na primer, ulcerativni kolitis in Chronova bolezen. Probiotiki lahko prispevajo tudi k izboljšanju obnavljanja epitelijskega tkiva in s tem preprečevanju prehoda patogenih bakterij preko epitelijskega tkiva. To zagotavlja boljšo naravno obrambo organizma in stabilno sluznico, ki predstavlja fizično oviro patogenom, kar vodi do boljše zaščite pred okužbami in kroničnimi vnetji (Ohland in Macnaughton., 2010).



Slika 1: Vpliv probiotičnih bakterij in kvasovk na pregradno funkcijo črevesnega epitela (Ohland in Macnaughton, 2010: 2)

Slika 1 prikazuje, kako lahko probiotiki vplivajo na epitelij preko različnih mehanizmov, kar vodi k izboljšanju črevesne pregradne funkcije in pomaga pri razvoju in vzdrževanju homeostaze. Odvisno od seva bakterije in uporabljenega modela probiotiki delujejo na ciljno pregrado epitelija v treh območjih:

**A: Neposredno na epitelij;**

Probiotiki lahko povečajo izločanje mucina in izražanje gobletovih celic, kar omejuje gibanje bakterij skozi mukozne plasti sluznice in zmanjšuje prepustnost epitelija za patogene in njihove produkte.

**B: Vpliv na imunost sluznice;**

Probiotiki lahko spodbudijo nastanek večjega števila celic, ki proizvajajo IgA v lamini propriji in s tem večje izločanje IgA v sluznici. Protitelesa omejujejo kolonizacijo bakterij, saj vežejo bakterije in njihove antigene, kar prispeva k ohranjanju črevesne homeostaze.

**C: Učinki na druge okoliške ali patogene bakterije;**

Probiotiki lahko spremenijo sestavo mikrobiote in/ali izražanje genov, kar posredno vpliva na izboljšanje neprepustnosti pregrade. Poleg tega lahko nekateri probiotiki neposredno uničujejo ali zavirajo rast patogenih bakterij s protimikrobnimi snovmi, kot so na primer bakterocini. Probiotiki lahko tekmujejo s patogeni za vezavo na epitelne celice, s čimer preprečujejo kolonizacijo škodljivih bakterij na črevesni sluznici in prispevajo k pregradni funkciji.

## 2.2 PROBIOTIKI V PREHRANI LJUDI IN NJIHOV VPLIV NA ZDRAVJE

Veliko študij dokazuje zdravju koristne učinke probiotikov. Med pomembne ugotovitve sodi spoznanje, da je vzpostavitev optimalne mikrobiote temeljnega pomena za zaščito organizma pred infekcijami, pridobivanje ustrezne imunske zaščite, zaščitne funkcije črevesnega sistema ter različnih metabolnih aktivnosti, ki pripomorejo k uspešnemu delovanju prebavnega sistema. Natančni mehanizmi še vedno niso povsem raziskani, vendar dosedanje ugotovitve potrjujejo koncept uravnavanja mikrobiote za izboljšanje zdravja (Saad in sod., 2013).

Klinične raziskave kažejo uspešno uporabo probiotikov pri zdravljenju infekcijskih bolezni, vključno z virusnimi ali bakterijskimi driskami, ter kroničnimi vnetnimi boleznimi, kot je ulcerozni kolitis. Ulcerozni kolitis je vnetna črevesna bolezen, kjer je vnetje prisotno v debelem črevesju in omejeno le na sluznico ter podsluznico. Za pojav te bolezni ni znanega vzroka. Njen nastanek pri ljudeh je genetsko pogojen. Zdravljenje poteka z uporabo protivnetnih sredstev (sulfasalazinom, mesalazinom in kortikosteroidi) (Amara in Shibl, 2013).

Vedno večja je uspešnost uporabe probiotičnih sevov, ki bi lahko nadomestili uporabo protivnetnih sredstev pri zdravljenju ulceroznega kolitisa. Tako so na primer Zocco in sod. (2006) proučevali možnost uporabe probiotičnega seva *E.coli* Nissle 1917. Namesto dodajanja protivnetnega sredstva mesalazina, so pacientom dnevno dali 1,5 g pripravka z *E.coli* Nissle 1917. Dokazali so, da lahko pacienti z ulceroznim kolitisom tudi s tako nizkim odmerkom probiotikov uspešno okrevajo. Vse te ugotovitve govorijo o potencialni terapevtski vlogi probiotikov pri zdravljenju vnetnih črevesnih bolezni (Saad in sod., 2013).

Znanstveniki se čedalje bolj posvečajo proučevanju možnosti uporabe probiotikov v zgodnjem otroštvu. Glavni cilj je podpora pri vzpostavitvi uravnotežene mikrobiote in črevesne homeostaze. Moro in Arslanoglu (2005) sta proučevala kako dopolnjevanje začetnih obrokov z mešanico probiotičnih mikroorganizmov vpliva na mikrobioto novorojenčkov. Ugotovili so, da je učinek dodanih probiotikov v prehrano novorojenčkov odvisen od odmerka le teh, ter da znatno povečujejo število laktobacilov v črevesju in spodbujajo rast bifidobakterij.

V nadaljnjih raziskavah sta se Moro in Arslanoglu (2005) posvetila preučevanju materinega mleka. Pomembna sestavina materinega mleka so številni oligosaharidi, ki jih pogosto imenujemo tudi bifidogeni faktorji in spodbujajo razmnoževanje bifidobakterij v črevesu. Dokazali so, da so odporni proti humanim encimom prebavnega trakta, kar je predpogoj za njihov bifidogeni oziroma probiotični učinek. Oligosaharidi ščitijo sluznico prebavil tako, da z enteropatogenimi bakterijami tekmujejo za pritrditev na črevesne ligande (Moro in Arslanoglu, 2005). Študije mikrobiote materinega mleka se najbolj

osredotočajo na preučevanje mlečnokislinskih bakterij. Martín in sod. (2003) so proučevali mlečnokislinske bakterije, ki so jih izolirali iz črevesja novorojenčkov, njihovega blata in brisov ustne votline. Za pojasnitev izvora teh bakterij so izolirali še mlečnokislinske bakterije iz materinega mleka in iz kože materinih prsi. Od približno 300 izolatov so izbrali 178 mlečnokislinskih bakterij. Naredili so analizo RAPD (naključno pomnožena polimorfna DNA, ena izmed metod odkrivanja in identificiranja mikroorganizmov) in ugotovili enak profil bakterij v mleku in blatu, te so bile različne od bakterij ugotovljenih na drugih mestih. S tem so potrdili, da je mleko pomemben vir bakterij, ki poselijo črevesje dojenčka. Zgodnja vzpostavitev in delovanje črevesne mikrobiote je vedno bolj zanimiva za raziskovanje in deležna čedalje več znanstvenih raziskav.

Mehanizem in delovanje probiotikov sta odvisna od interakcije s črevesno mikrobioto gostitelja in imunskimi celicami, ki naseljujejo njegovo črevesno sluznico. Imunski sistem prebavnega trakta deluje tako, da ščiti telo pred invazijo patogenih mikroorganizmov. Dejstvo je, da ima črevo, oziroma prebavni trakt, največjo maso limfnega tkiva v človeškem telesu. Sestavljeno je iz več vrst limfnega tkiva, ki shranjuje imunske celice, kot so limfociti T in B. Poleg tega da probiotiki pomagajo obrambnim celicam pri obrambi pred patogenimi bakterijami, tudi uspešno uravnavajo črevesno mikrobioto. V preglednici 2 so opisani pozitivni učinki nekaterih probiotičnih sevov na zdravje človeka (Saad in sod., 2013).

Preglednica 2: Nekateri probiotiki in njihovi vplivi na zdravje gostitelja (povzeto po Saad in sod., 2013: 4)

| Probiotični sevi                     | Vpliv na zdravje                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Lactobacillus planatarum</i> 299v | → Lajša sindrom razdražljivega črevesja<br>→ Znižuje LDL- holesterol<br>→ Zmanjšuje pojav bakterije <i>Clostridium difficile</i> , ki povzroča drisko                                                                              |
| <i>L. casei</i> Shirota (LcS)        | → Znižuje izražanje z LPS inducirane IL-6 in INF- $\gamma$                                                                                                                                                                         |
| <i>L. casei</i> DN114001             | → Vpliva na uravnavanje imunskega sistema                                                                                                                                                                                          |
| <i>L. rhamnosus</i> GG               | → Zdravi akutne driske pri okužbi z rotavirusi in driske povzročene z antibiotiki<br>→ Vpliva na uravnavanje imunskega sistema<br>→ Pomaga lajšati simptome vnetega črevesja<br>→ Pomaga preprečevati in zmanjševati pojav alergij |
| <i>L. acidophilus</i> La5            | → Zdravi akutne driske pri okužbi z rotavirusi in driske povzročene z antibiotiki                                                                                                                                                  |
| <i>L. acidophilus</i> M92            | → Aktivira imunski sistem pacientov, ki imajo sindrom razdražljivega črevesja<br>→ Znižuje serumski holesterol                                                                                                                     |
| <i>L. salivarius</i> UCC118          | → Lajša simptome pri kronično vnetem črevesju in uravnava črevesno mikrobioto                                                                                                                                                      |
| <i>L. reuteri</i> DSM 12246          | → Skrajšuje rotavirusno drisko                                                                                                                                                                                                     |
| <i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475      | → Vpliva na uravnavanje in stimulacijo imunskega sistema                                                                                                                                                                           |
| <i>Bifidobacterium breve</i>         | → Vpliva na uravnavanje in stimulacijo imunskega sistema<br>→ Zmanjšuje pojav simptomov razdražljivega črevesja                                                                                                                    |
| <i>B. animalis</i>                   | → Povečuje izločanje IgA                                                                                                                                                                                                           |
| <i>B. longum</i> BB536               | → Pomaga pri zdravljenju alergij                                                                                                                                                                                                   |
| <i>B. lactis</i> Bb12                | → Skrajšuje rotavirusno drisko                                                                                                                                                                                                     |
| <i>E. coli</i> Nissle 1917           | → Vpliva na manjšo pojavnost kroničnega vnetja črevesja<br>→ Vpliva na uravnavanje imunskega sistema<br>→ Pomaga pri hitrejšem okrevanju po ulceroznem kolitisu<br>→ Preprečuje pojav patogene <i>E.coli</i>                       |
| <i>Saccharomyces boulardii</i>       | → Vpliva na manjšo pojavnost kroničnega vnetja črevesja<br>→ Pomaga pri zdravljenju akutne driske povzročene z antibiotiki<br>→ Zmanjšuje pojav bakterije <i>Clostridium difficile</i> , ki povzroča drisko                        |
| <i>Streptococcus thermophilus</i>    | → Izboljšuje zdravstveno stanje pacientov z laktozno intoleranco<br>→ Preprečuje pojav rotavirusne driske                                                                                                                          |

### 2.2.1 *Lactobacillus gasseri* K7 Rif<sup>R</sup> (LK7<sup>R</sup>)

Sev *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7) je izoliran iz dojenčkovega blata starega 1 teden in proizvaja bakteriocine s širokim spektrom protimikrobnega delovanja. Inhibira tudi nekatere kvarljivce in patogene bakterije. Pomembne lastnosti tega seva so odpornost proti nizkim vrednostim pH in žolčnim solem, preživetje v simuliranih intestinalnih pogojih in sposobnost vezave na epitelne celice prebavnega trakta (Bogovič-Matjašić in Rogelj, 2000).

Pri študiji smo uporabljali sev *Lactobacillus gasseri* K7 Rif<sup>f</sup> (LK7<sup>R</sup>). LK7<sup>R</sup> je derivat seva LK7, ki je z zaporednim precepljanjem v gojišča z naraščajočo koncentracijo rifampicina pridobil odpornost proti rifampicinu. Zato ga je lažje odkriti in šteti na selektivnih gojiščih z rifampicinom (Bogovič-Matjašić in sod., 2007). Sev je deponiran v zbirki

mikroorganizmov na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike, Oddelka za Zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani, pod oznako IM 238.

### 2.2.2 *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)

*Lactobacillus rhamnosus* GG sta leta 1983 izolirala Sherwood in Goldvin iz črevesja zdravih odraslih ljudi. Sprva so mislili, da sev, ki sta ga odkrila, pripada vrsti *L. acidophilus*, vendar so kasneje ugotovili, da gre za vrsto *L. rhamnosus*. Sev je odporen proti kislini in žolču, zelo dobro se prijema na steno črevesnega epitelijskega tkiva in proizvaja mlečno kislino. Zaradi številnih pozitivnih lastnosti so ga zelo hitro začeli komercialno uporabljati kot probiotik (Lee in Salminen, 2009).

## 2.3 PROBIOTIKI KOT KRMNI DODATEK V ŽIVINOREJI

Na zdravje in zmogljivost rasti domačih živali vplivajo predvsem prehrana, stres, antibiotiki in sodobna praksa vzreje živali. Cilj živinoreje je zagotoviti varna živila za prehrano ljudi ob upoštevanju načela dobrega počutja živali in varovanja okolje. Probiotiki so alternativni izdelki, ki bi lahko zamenjali pretirano uporabo antibiotikov oziroma ostalih kemičnih snovi. Ne glede na to, ali je probiotik namenjen uporabi v humani ali živalski prehrani, morata biti pred uporabo temeljito proučeni njegova učinkovitost in varnost. Raziskave znanstveniki najprej opravijo z *in vitro* metodami v laboratoriju in *in vivo* na modelnih živalih oziroma organizmih. Modelni organizem je organizem, ki ga znanstveniki obširno raziskujejo, da bi razumeli določene biološke pojave, pri čemer upajo, da bodo na modelnem organizmu pridobljena odkritja omogočila razumevanje delovanja drugih organizmov.

Fuller je leta 1989 definirala probiotike kot žive mikroorganizme, ki kot krmni dodatki blagodejno vplivajo na živali gostiteljice z izboljšanjem črevesnega mikrobnega ravnovesja. Nadaljnje raziskave so pokazale, da naj bi probiotiki preprečevali prebavne motnje in povečevali sposobnost rasti živali. Dokazali so tudi, da naj bi nekateri sevi mlečnokislinskih bakterij, ki so jih dodajali v prvih dneh življenja, imeli ugodne učinke na rast podgan in pujskov. Dober pospeševalec rasti mora povečevati rast, ne da bi pri tem

škodoval organizmu. Dokazali so, da probiotiki, prisotni v fermentiranih živilih ali krmi nimajo neželenih stranskih učinkov (Quan in sod., 1991; Fuller, 1989).

Mikrobioto v prebavnem traktu živali lahko opredelimo kot metabolno aktivni organ, ki s svojim širokim spektrom različnih vrst in številčnostjo celic predstavlja pestro biodiverzitetno aktivnih mikroorganizmov. Znanstveniki se posvečajo predvsem vprašanju, kako prepoznati in določiti različne vrste mikroorganizmov, ki so prisotni v črevesju različnih živali. Nekatere študije so pokazale, da prehrana, fiziologija gostitelja in morfologija črevesja, vplivajo na združbo mikroorganizmov, ki se nahajajo v prebavnem traktu. Uporabo probiotikov v živalski krmi so preučevali s predhodnimi *in vitro* testi, kjer so spremljali: protimikrobno aktivnost, preživetje v prebavnem traktu, sposobnost pripenjanja na celice gostitelja in občutljivost za antibiotike (Gaggia, in sod., 2010). Vse to so lastnosti, ki jih je potrebno analizirati vsakič, ko ocenjujemo funkcionalnost in varnost določenega probiotika. Ugotovili so, da je aktivnost določenega probiotika povezana z vrsto in sevom mikroorganizma. Ravno tako na njegovo učinkovitost in aktivnost vplivajo odmerki, čas in trajanje uživanja probiotikov. Naslednji dejavnik, ki je povezan z delovanjem probiotika je starost živali; mladiči so mnogo bolj dovzetni za vdor patogenov v njihov organizem kot odrasle živali (Gaggia, in sod., 2010), zato so probiotiki običajno učinkovitejši pri mladih živalih.

Bakterije, ki povzročajo zoonoze, lahko povzročijo težko ozdravljive bolezni v velikem obsegu, pa tudi visoko obolevnost in smrtnost v živinoreji, kar povzroči veliko gospodarsko škodo. Poleg tega se patogeni lahko prenesejo iz prebavil živali preko prehranjevalne verige na človeka. Kontaminacija hrane se lahko zgodi v katerikoli fazi proizvodne verige. Ravno proti zoonozam bi se s pomočjo probiotikov lahko učinkovito ubranili, oziroma povečali stopnjo zaščite živali in ljudi proti patogenim bakterijam. Domače živali so poleg patogenov izpostavljene še ostalim okoljskim dejavnikom, ki posredno lahko vodijo v različne bolezni in manjšo prirejo (management čred, prehrana, transport, stres, ...). Vsaka vrsta živali ima svojo kritično točko v proizvodni verigi (Gaggia in sod., 2010).

### 2.3.1 Zakonodaja probiotikov pri živalih

Probiotični pripravki, ki so namenjeni živalim zasedajo pomembno mesto med krmnimi dodatki saj veljajo za alternativne rastne pospeševalce (Vodovnik in Marinšek-Logar, 2008). Zakonodaja, ki se nanaša na probiotike pri živalih je urejena z Uredbo Evropskega parlamenta in Sveta o dodatkih za uporabo v prehrani živali (Uredba..., 2003) in s Pravilnikom o Krmnih dodatkih (Pravilnik..., 2009). Slednji ureja označevanje krmnih dodatkov v krmnih mešanicah, proizvodnjo, skladiščenje, dajanje na trg za namen izvoza in uvoza krmnih dodatkov, predmešanic in krmnih mešanic, ki vsebujejo dodatke ter izjemno uporabo snovi kot krmnega dodatka, ki nima dovoljenja Evropske Skupnosti za namen znanstvenega poskusa. Dovoljeni krmni proizvodi so krmni dodatki, predmešanice in krmne mešanice, ki vsebujejo krmne dodatke, ki imajo dovoljenje Evropske Skupnosti. Na oznaki krmne mešanice, ki vsebuje probiotične mikroorganizme morajo biti naslednje navedbe:

- navedba seva oziroma sevov, ki so bili določeni z dovoljenjem,
- številka seva oziroma sevov,
- število kolonijskih enot,
- E številka,
- datum poteka veljavnosti garancije ali rok skladiščenja,
- navedba pomembnih značilnosti mikroorganizma, ki se nanašajo na proizvodni proces (v skladu z izdanim dovoljenjem).

Krmni dodatek ne sme (Uredba..., 2003) :

- škodljivo vplivati na zdravje živali in ljudi ali na okolje,
- biti predstavljen na način, ki bi lahko uporabnika zavedel,
- škoditi potrošniku z zmanjševanjem razločevalnih lastnosti živalskih proizvodov ali zavajati potrošnika glede razločevalnih lastnosti živalskih proizvodov.

Opredeljeno je tudi, da krmni dodatek mora (Uredba..., 2003) :

- ugodno vplivati na lastnosti krme in lastnosti živalskih proizvodov,
- izpolnjevati prehranske potrebe živali,
- ugodno vplivati na okoljske posledice reje živali,

- ugodno vplivati na rejo, prirejo ali dobro počutje živali, zlasti z vplivom na želodčno-črevesno floro ali prebavljivost krme ali,
- imeti kokcidistatični ali histomonostatični učinek.

Registracija probiotičnih krmnih dodatkov preden pridejo na tržišče je v Evropi pogojena z natančnim testiranjem varnosti in učinkovitosti. Probiotični krmni dodatki, ki so registrirani v Evropski uniji, vsebujejo predvsem Gram-pozitivne bakterije, ki so iz rodov: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* in *Streptococcus* (Vodovnik in Marinšek-Logar, 2008).

### 2.3.2 Uporaba probiotičnih krmnih dodatkov v reji prašičev

V prireji svinjine je najbolj stresno obdobje odstavitve pujskov in obdobje po odstavitvi. Prašiči se naenkrat soočijo z veliko spremembami, ki povzročijo velik stres. Eden prvih stresnih dejavnikov je zagotovo ločitev pujskov od svinje. To pomeni, da se konča tudi sesanje, s katerim se je začel razvijati njegov imunski sistem. Temu sledi še kritičen prehod iz tekoče krme (mleka) na krmila, ki večinoma temeljijo na rastlinskih polisaharidih, in združevanje pujskov v skupinske bokse. Vse to vpliva na zdravstveno stanje pujskov in nadaljnjo prirejo mesa. V preteklosti so pri in po odstavitvi pujskov v krmo preventivno dodajali antibiotike, baker in cink, da bi preprečili nastanek bolezni. Po prepovedi dodajanja antibiotikov, bakra in cinka so znanstveniki začeli iskati druge rešitve, ki bi pripomogle k zaščiti prašičev pred patogeni. Vedno več je raziskav o uporabi probiotikov, ki okrepijo delovanje imunskega sistema in s tem zaščitijo pred patogenimi mikroorganizmi. Poleg študij, ki so se ukvarjale z *in vitro* testi probiotikov so opravili tudi *in vivo* teste s probiotičnimi mikroorganizmi (Gaggia in sod., 2010).

Kot možne kandidate za probiotike veliko proučujejo laktobacile, saj so pogosto prisotni v črevesni mikrobioti prašičev. Takahashi in sod. (2007) so ugotovili, da dodatek bakterije *Lactobacillus plantarum* poveča skupno populacijo *L. plantarum* v črevesju novorojenih pujskov. Zaradi okrepljenega imunskega sistema in uravnavanja izločanja vnetnih citokinov se zmanjša pojav driske in črevesnih bolezni tudi v odrasli dobi. Opazili so tudi izboljššan dnevni prirast pri živalih, ki so dobivale dodatek *L. plantarum*, v primerjavi s kontrolno skupino (Gaggia in sod., 2010).

Vrste rodu *Bifidobacterium* so zelo preučevane kot probiotiki pri ljudeh, ne pa tudi pri živalih. Še posebej slabo je raziskana uporaba bifidobakterij pri prašičih. Pogosto so študije narejene v povezavi z laktobacili. Siggers in sod. (2008) so odkrili, da so določeni laktobacili in bifidobakterije, ki so jih aplicirali pujskom takoj po rojstvu, spodbujali kolonizacijo koristnih mikroorganizmov. Le ti pomagajo preprečiti atrofijo sluznice in naseljevanje patogenov v črevesju, kar lahko povzroči bolezni ali celo smrt novorojenih pujskov. Aplikacija laktobacilov in bifidobakterij je tudi zmanjšala število bakterij iz rodu *Clostridium* ter omejila pritrjevanje bakterij iz rodu *Salmonella* in vrste *E.coli* v prebavnem traktu prašiča (Gaggia in sod., 2010).

Večina študij kaže na učinkovito uporabo probiotičnih mikroorganizmov pri pujskih pred in po odstavitvi. Rezultati študij kažejo, da ima uporaba probiotikov pri pujskih pomembno vlogo pri povečevanju števila koristnih bakterij v črevesju, pri delovanju imunskega sistema in okrepljenem delovanju obrambnih celic. Nasprotno pa nekateri avtorji trdijo, da probiotične bakterije le delno pripomorejo k boljšemu delovanju prebavnega trakta in da se jih večina izloči z blatom (Gaggia in sod., 2010).

### **2.3.3 Uporaba probiotičnih dodatkov v reji perutnine**

V reji pitovnih piščancev so, tako kot pri ostalih domačih živali, velik problem zoonoze, ki lahko prizadenejo celo jato in povzročijo ogromne ekonomske izgube. Perutnina je podvržena velikim spremembam in stresu kot so, sprememba krme, stres pri prevozu in visoka gostota naselitve. Vse to lahko slabi imunski sistem in povečuje nagnjenost k naselitvi patogenih bakterij v prebavnem traktu. Probiotiki lahko pripomorejo k nadzoru naselitve patogenov in k ohranjanju zdrave črevesne mikrobiote (Santini in sod., 2010).

Med povzročitelji bolezni so pri perutnini najbolj raziskane vrste rodu *Salmonella*, ki lahko povzročijo okužbo pri piščancih in odraslih kokoših in se lahko preko prehranjevalne verige prenesejo na človeka. Zato se raziskovalci vse intenzivneje ukvarjajo tudi s preučevanjem probiotičnih mikroorganizmov v povezavi s preprečevanjem okužbe s salmonelami. Raziskave so pokazale, da probiotične bakterije iz rodu *Lactobacillus*

bistveno pripomorejo k hitrejšemu okrevanju dan starih pitovnih piščancev, ki se okužijo z vrstami *Salmonella* takoj po izvalitvi. Higgins in sod. (2007) so se osredotočili predvsem na preučevanje protimikrobne aktivnosti različnih probiotikov. Probiotične pripravke so aplicirali oralno preko pitne vode in preko kloake z aplikatorjem, direktno v črevesje. Ugotovili so, da je povzročila direktna aplikacija probiotikov v črevesje, v primerjavi z oralno aplikacijo preko pitne vode, znatno večje zmanjšanje števila bakterij iz rodu *Salmonella*, že eno uro po aplikaciji v črevesje. Laktobacili so bili uspešni tudi pri zmanjševanju umrljivosti zaradi nekrotičnega enteritisa. To je bolezen, ki jo povzročajo klostridiji in je akutna bakterijska infekcija, ki povzroči nastanek sprememb na sluznici črevesja. Perutnina se z njimi okuži preko iztrebkov, prahu, kontaminirane krme ali stelje. Piščancem so laktobacile dodali peroralno že prvi dan življenja in zmanjšali umrljivost za 30 % (Higgins in sod., 2008).

Uporaba probiotičnih bakterij iz rodu *Bifidobacterium*, je v reji kokoši znatno manjša, v primerjavi z laktobacili. Zelo malo študij je osredotočenih na proučevanje bakterij iz rodu *Bifidobacterium*. Večinoma jim pripisujejo samo pozitivno delovanje na črevesno mikrobioto in uspešnost rasti.

Splošni zaključek je, da lahko uporaba probiotikov pri reji perutnine povečuje parametre uspešnosti reje: povečajo stopnjo rasti, konverzijo krme in posledično prirejo in kakovost mesa. Nekatere raziskave kažejo, da so učinkoviti tudi pri zmanjševanju nalaganja abdominalne maščobe.

Veliko študij v zvezi s probiotiki pa je bilo narejenih tudi pri prireji jajc. Raziskave kažejo, da mešane kulture probiotičnih mikroorganizmov vplivajo na velikost jajc in posledično zmanjšujejo stroške krme pri kokoših nesnicah. Poleg tega naj bi povečevali prirejo in kakovost jajc (Gaggia in sod., 2010).

### **2.3.4 Uporaba probiotičnih dodatkov v reji prežvekovalcev**

Študije, ki se ukvarjajo z uporabo probiotikov pri prežvekovalcih, izvajajo tako pri mladičih kot odraslih prežvekovalcih, ob upoštevanju zdravstvenega stanja živali in

gospodarskih parametrov. Večinoma so raziskave usmerjene v proučevanje uporabe probiotikov pri kravah in teletih, le malo se jih nanaša na drobnico.

Veliko raziskav je bilo v preteklosti usmerjenih v aplikacijo probiotikov za preprečevanje driske pri novorojenih teletih, ki jo povzroča *E. coli* in je pomemben vzrok visoke obolevnosti in smrtnosti pri teletih. Rodriguez-Palacios in sod. (2004) so zmanjšali pojavnost driske tako, da so teletom v mlečne nadomestke dodajali mlečnokislinske bakterije. Dokazali so uspešnost probiotičnih mikroorganizmov pri zmanjševanju pojavnosti driske in smrtnosti pri teletih. Ugotovili so tudi, da probiotični dodatki lahko izboljšajo proizvodnost živali, povečajo telesno maso in pospešijo razvoj vampa pri teletih.

Pri govejih pitancih si znanstveniki niso enotni. Nekateri poročajo o tem, da dodatek probiotikov v končni fazi rasti pozitivno vpliva na parametre rasti, zopet drugi trdijo, da nimajo nobenega značilnega vpliva (Gaggia in sod., 2010).

### 2.3.5 Miš kot model za raziskave

Največkrat preučevana žival v poskusih na živalih je miš (*Mus musculus*). V zadnjem stoletju se laboratorijska miš velikokrat pojavlja kot primarni modelni organizem za genetske raziskave in raziskave na področju probiotikov.

Preglednica 3: Taksonomska klasifikacija hišne miši (Kryštufek, 2003: 592)

| Taksonomska kategorija | Latinsko ime    | Slovensko ime             |
|------------------------|-----------------|---------------------------|
| Kraljestvo             | <i>Animalia</i> | živali                    |
| Deblo                  | <i>Chordata</i> | strunarji                 |
| Razred                 | <i>Mammalia</i> | sesalci                   |
| Red                    | <i>Rodentia</i> | glodalci                  |
| Naddružina             | <i>Muroidea</i> | miši in sorodniki         |
| Družina                | <i>Muridae</i>  | miši, voluharice in hrčki |
| Poddružina             | <i>Murinae</i>  | miši                      |
| Rod                    | <i>Mus</i>      | miš                       |

Raziskovalci na različnih biomedicinskih področjih uporabljajo miš zaradi njene precejšnje genetske in fiziološke podobnosti ljudem in dobrega poznavanja njenega genoma. To omogoča relativno enostavno manipulacijo in analizo. Čeprav so kvasovke, črvi in muhe odlični modeli za študije celičnega cikla in številnih razvojnih procesov, so miši veliko boljše orodje za raziskovanje imunskih, endokrinih, živčnih, kardiovaskularnih, skeletnih

in ostalih kompleksnih fizioloških sistemov, ki so skupni vsem sesalcem. Tako kot ljudje in mnogi drugi sesalci, miši naravno razvijejo bolezni, ki vplivajo na zgoraj našteje sisteme, vključno z razvojem rakavih obolenj, ateroskleroze, visokega krvnega tlaka, sladkorne bolezni, osteoporoze in glavkoma. Poleg tega je miš žival, ki zahteva relativno nizke stroške vzdrževanja, malo prostora in ima odlično sposobnost reprodukcije (vsakih devet tednov). Trenutno je na voljo za genetske raziskave veliko edinstvenih sevov miši (Beck in sod., 2000).

V začetkih biomedicinskih raziskav so znanstveniki, s pomočjo selekcije in vzreje miši za pridobivanje potomcev z želenimi lastnostmi, razvili različne mišje modele. Razvoj novih tehnologij in napredek farmacevtske industrije je omogočil raziskovalcem razvoj uporabnih, novih modelov za genetske bolezni z izpostavitvijo mišje DNK škodljivim kemikalijam. Ta proces imenujemo kemijska mutageneza. Eden najpomembnejših napredkov je sposobnost ustvarjanja transgenih miši, v katerih je novi gen vstavljen v zarodne celice (vsebujejo genetski material, ki se prenese na potomce) živali.

Znanstveniki so razvili še učinkovitejše pristope, ki temeljijo na homologni rekombinaciji. Mednje sodi razvoj orodij za izločanje genov (»knock out« živali), oziroma nadomeščanje obstoječih genov s spremenjenimi različicami (Beck in sod., 2000).

#### 2.3.5.1 Raziskave probiotikov na miših

Največ raziskav na laboratorijskih miših je bilo opravljenih s probiotičnimi bakterijami iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Kot je bilo že omenjeno, se raziskave probiotičnih mikroorganizmov začnejo najprej v laboratoriju. Tako so na primer Bernardeu in sod. (2002) najprej *in vitro* dokazali probiotične lastnosti izbranih laktobacilov, nadaljnje študije pa so opravili na miših. Ugotovili so, da so sposobni preživeti procese priprave krme in pogojev v prebavnem traktu, nimajo plazmidov z geni za odpornosti proti antibiotikom in imajo širok spekter protimikrobnega delovanja. Proučevali so varnost probiotičnih bakterij in spremljali zdravje ter rast miši, ki so prejemale probiotično suspenzijo dnevno, na dva ali na štiri tedne. Pogoje izboljšanja rasti so preučevali tako, da so miši krmili z obroki različnih energetskih vrednosti in proučevali preživetje sevov ter

zaužitje potrebnega odmerka bakterij. Dokazali so, da so bile opazne razlike v lesku dlake med živalmi, ki so prejemale suspenzijo z laktobacili in kontrolno skupino živali. Niso pa poročali o statistično značilnih razlikah v teži organov (vranice in jeter). Bistveno razliko so ugotovili le pri pridobivanju telesnih mas. Živali, ki so bile tretirane s probiotično suspenzijo, so imele višjo telesno maso in so priraščale hitreje kot živali v kontrolni skupini. Ravno tako kot pri drugih živalskih vrstah si tudi pri miših strokovnjaki niso enotni glede učinkov probiotičnih bakterij. Mnogo študij namreč trdi, da nimajo nobenega bistvenega vpliva na telesno maso. Zhou in sod. (2000) so opravili raziskavo, v kateri so štiri tedne mišim neprekinjeno oralno aplicirali probiotika *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in *Bifidobacterium lactis* HN019. Ugotovili so, da razlike v stopnji rasti in povečanju telesne mase med skupino, ki je prejemale probiotične bakterije in kontrolno skupino niso statistično značilne. Dokazali so, da probiotične bakterije, ki so jih testirali, ne vplivajo toksično ali patogeno na živali (Zhou in sod., 2000).

### 3 MATERIALI IN METODE

Zastavljeni hipotezi, da bodo imele breje miši, ki bodo uživale probiotične pripravke, večji prirast od kontrolne skupine in da bo uživanje probiotikov vplivalo na maso njihovih mladičev, smo preučevali v dveh ločenih poskusih, ki sta potekala pod enakimi pogoji in po enakem postopku.

V mikrobiološkem laboratoriju, na Katedri za mlekarstvo, smo pripravili pripravke (rekonstituirano mleko in suspenzije bakterij LK7<sup>R</sup> in LGG v rekonstituiranem mleku) katere smo do uporabe pri poskusu na brejih miših, hranili v hladilniku pri 4 °C. Prvi in sedmi dan hranjenja pripravka v hladilniku, smo suspenzijo nacepljali na gojišče MRS, da smo preverjali število kolonijskih enot (KE)/ml.

Sam poskus na brejih miših linije FVB/NHanHsd je potekal v prostorih Centra za laboratorijske živali na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete. Veterinarska uprava Republike Slovenije (VURS) je dne 27.5.2011 izdala dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih, številka 34401-17/2011/5, z veljavnostjo treh let.

#### 3.1 PRIPRAVA FOSFATNEGA PUFRA IN GOJIŠČ

Fosfatni pufer (PBS) je vodna raztopina, ki vsebuje natrijev klorid, natrijev fosfat, kalijev klorid ali kalijev fosfat. PBS pomaga ohranjati konstantno vrednost pH. PBS smo pripravili tako, da smo v 850 ml destilirane vode (dH<sub>2</sub>O) raztopili 8 g NaCl (Merck, 1.06404), 0,2 g KCl (Sigma, 31248) 1,80 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O (Merck, 1.06580), 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, 1.05104). Ko smo uravnali pH na 7,4 smo dodali dH<sub>2</sub>O do enega litra ter avtoklavirali 15 minut pri 121°C.

Pri delu smo uporabljali tekoče in trdno gojišče MRS. MRS je selektivni medij za uspešno rast mlečnokislinskih bakterij, predvsem laktobacilov. Tekoče gojišče MRS (Merck, 1.10661) smo pripravili po navodilih proizvajalca in sicer smo 52,2 g gojišča raztopili v enem litru dH<sub>2</sub>O, razdelili v epruvete po 10 ml in avtoklavirali 15 minut pri 118 °C.

MRS agar (Merck, 1.10660) smo pripravili po navodilih proizvajalca in sicer smo 13,64 g gojišča v prahu raztopili v 200 ml dH<sub>2</sub>O in avtoklavirali 15 minut pri 118 °C. Še tekoč agar smo uporabili za prelivanje ustrezno redčenega vzorca.

Za gojenje LK7<sup>R</sup> smo gojišču dodali antibiotik rifampicin. Tekoče in trdno gojišče MRS z dodatkom rifampicina (MRS<sup>R</sup>) smo pripravili tako, da smo pred uporabo oziroma razlitjem na petrijevko, gojišču dodali založno raztopino rifampicina v metanolu (12,5 mg/ml; Sigma, R3501) do končne koncentracije 125 µg/ml.

### 3.2 PRIPRAVA PRIPRAVKOV ZA APLIKACIJO Z OROGASTRIČNO SONDO:

#### 3.2.1 Priprava rekonstituiranega mleka v prahu

Mleko v prahu (6 g; Merck, 1.15363) smo raztopili v 60 ml dH<sub>2</sub>O in avtoklavirali 15 minut pri 110 °C. Za kontrolno skupino (N) smo po 500 µl rekonstituiranega mleka razdelili v posamezne mikrocentrifugirke. Za negativno kontrolo smo mleko razdelili po 1 ml v mikrocentrifugirke. Mikrocentrifugirke z mlekom smo hranili na 4 °C.

#### 3.2.2 Priprava suspenzije bakterij LK7<sup>R</sup> in LGG v rekonstituiranem mleku

LK7<sup>R</sup> in LGG, ki smo ju hranili pri -80 °C, smo najprej odmrznili na sobni temperaturi in nato odpipetirali 100 µl LK7<sup>R</sup> v 10 ml tekočega MRS<sup>R</sup>, 100 µl LGG pa v 10 ml tekočega MRS. Po 18-ih urah inkubacije pri 37 °C, smo po 100 µl sveže kulture precepili v šest steklenih centrifugirk z 10 ml tekočega gojišča MRS (pri obeh sevih brez antibiotika). Po 18-ih urah inkubacije pri 37 °C, smo kulturo 6 minut centrifugirali pri 3500 x g, odlili gojišče in resuspendirali v 2 ml PBS ter postopek ponovili. Po naslednjem centrifugiranju pri istih pogojih smo bakterije resuspendirali v 2 ml rekonstituiranega mleka, premešali ter shranili v hladilnik pri 4 °C za največ šest dni.

### 3.2.3 Preverjanje števila bakterij LGG in LK7<sup>R</sup>, suspendiranih v rekonstituiranem mleku

Prvi in šesti (zadnji) dan hranjenja suspenzije v hladilniku smo 100 µl suspenzije LGG in LK7<sup>R</sup> redčili v PBS do ustrezne redčitve ( $10^{-7}$  in  $10^{-8}$ ). V prazne petrijevke smo odpipetirali po 1 ml ustrezno redčenega vzorca (dve paralelki za vsako redčitev) ter prelili z MRS agarjem (MRS<sup>R</sup> pri LK7<sup>R</sup>), ohlajenim na 45 °C, premešali in pustili pri sobni temperaturi, dokler se gojišče ni strdilo. Petrijevke smo nato inkubirali 48 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo prešteli bakterije, ki so zrasle na ploščah.

### 3.3 POTEK IN IZVEDBA POSKUSA NA BREJIH MIŠIH LINIJE FVB/NHANHSD

Zastavljeni hipotezi smo preverjali na brejih miših linije FVB/NHanHsd, ki smo jih krmili s sevoma LGG in LK7<sup>R</sup>. Potek dela z živalmi je prikazan na Sliki 2.



Slika 2: Shematski prikaz poteka dela z živalmi

Živalski poizkus smo izvajali v dveh ločenih ponovitvah. V vsaki ponovitvi smo uporabili 30 samic in 15 samcev. V poskusih smo uporabljali miši specifičnih patogenov proste (SPF; angl. *specific pathogen free*), inbridirane linije FVB/NHanHsd, ki smo jih naročali v vzrejemnem centru Harlan (Italija). Vsako žival smo ustrezno označili z ušesno ščipalko, da

smo lahko tekom poskusa identificirali posamezno žival. Živali smo gojili v kletkah, ki so vsebovale mešanico lesene in peletirane stelje, na katero smo položili gnezditveno mrežo, ki se običajno uporablja za privajanje živali na metabolne kletke in mišjo hiško. Dno mišje hiške smo zaprli z rdečim plastificiranim kartonom in s ščipalko za perilo pričvrstili na gnezditveno mrežo. Vanjo smo položili bombažno blazinico, ki mišim omogoča izdelavo gnezda. Dnevno smo živali pregledali in poskrbeli, da so imele na voljo zadostno količino (*ad libitum*) peletirane krme (Altromin, #1324) v krmilniku in vode v napajalniku. V karanteni in koloniji smo imeli 12-urni svetlobni cikel, 21 do 22 °C in 50 do 70 % relativno zračno vlago. Enkrat tedensko smo opravili čiščenje kletk.

Živali smo parili po sistemu dve samici in en samec. Na dan pojava čepa smo samico nastanili v svežo kletko in ji pripisali poskusno številko. Čep je strdek, ki nastane v samičkini vagini potem, ko se je parila s samcem. Pregledovanje čepov uporabljamo kot diagnostični pregled, da je prišlo do paritve. Pri prvi ponovitvi smo pridobili 22 brejih samic, pri drugi pa 23. Po enem tednu po paritvi smo živali s čepom razporedili v tri skupine. Vse podatke smo beležili v preglednico (v prilogi).

Živali smo naključno razdelili v tri skupine, in sicer:

1. SKUPINA N= kontrolna skupina, kateri smo od sedmega dneva brejosti dalje vsakodnevno z orogastrično sondo aplicirali 200 µl rekonstituiranega mleka.
2. SKUPINA G= skupina kateri smo od sedmega dneva brejosti dalje, vsakodnevno z orogastrično sondo aplicirali 200 µl suspenzije bakterij LGG v rekonstituiranem mleku, ki je vsebovala  $4,0 \pm 0,8 \times 10^8$  KE bakterij LGG.
3. SKUPINA K= skupina, kateri smo od sedmega dneva brejosti dalje, vsakodnevno z orogastrično sondo aplicirali 200 µl suspenzije bakterij LK7<sup>R</sup> v rekonstituiranem mleku, ki je vsebovala  $3,6 \pm 1,4 \times 10^8$  KE bakterij LK7<sup>R</sup>.

Miši so bile med potekanjem poskusa v posamičnih kletkah, ki so bile označene s številkami od 1 do 30. Vsaka miš je dobila tudi svojo ušesno številko in je pripadala eni od treh skupin, ki so prejemale ustrezen pripravek mleka v prahu s probiotičnima dodatkom LGG ali LK7<sup>R</sup>. Živali smo označili po enačbi  $XN_1/N_2-Y$ , pri čemer:

- X predstavlja oznako skupine (N, G ali K),
- $N_1$  predstavlja dan žrtvovanja (1 do 15 dan po paritvi, drugi dan po kotitvi, tretji dan po kotitvi, 4 do 8 dan po kotitvi),
- $N_2$  predstavlja število paralelke (ker smo imeli več živali za isto skupino in isti čas žrtvovanja, smo označili število paralelke),
- Y predstavlja ušesno oznako posamezne živali.

Tako je bil na primer vzorec z oznako K3/4-A3 odvzet četrti živali iz skupine K3, z ušesno oznako A3, ki je od sedmega dneva brejosti dalje vsakodnevno prejela LK7<sup>R</sup> in je bila žrtvovana tretji dan po kotitvi.

Da bi zmanjšali možnost napačne aplikacije probiotika, smo kletke v stojalu za individualno prezračevane kletke razporedili glede na pripisano skupino tako, da so bile v vsakem stolpcu kletke iz ene skupine (Slika 3).



Slika 3: Razporeditev kletk v stojalu za individualno prezračevane kletke

V vsakem stolpcu je po ena skupina mišk. V prvem stolpcu z leve je skupina K, v drugem skupina G in v tretjem kontrolna skupina N. V ostalih stolpcih so živali iz drugih poskusov.

Rekonstituirano mleko in suspenzije bakterij v rekonstituiranem mleku smo aplicirali z orogastrično sondo Eickemeyer FNS20 (ravna, dolžine 1 1/2", G= 20, velikost kroglice je 1,4 mm). Za vsako skupino miši smo imeli po dve sondi, ki smo ju pred in po krmljenju sprali z etanolom, sterilizirali v suhem sterilizatorju na steklene kroglice (Germinator) in pod UV lučjo ter jih ustrezno označili.

Miši smo dvanajsti dan po paritvi depilirali po predelih seskov, saj je bilo potrebno odvzeti vzorce mleka čim bolj sterilno. Telesno maso miši smo beležili od prvega tedna pred paritvijo do prvega tedna po kotitvi. Podatke o telesnih masah, ki smo jih pridobili smo kasneje uporabili v statistični obdelavi podatkov. Tehtali smo jih vsak dan (Slika 4) ob istem času, pred krmljenjem z orogastrično sondo. Pult, kjer smo tehtali in krmili miši, ter odlagali opremo smo vsakič predhodno razkužili in dobro očistili. Enako smo storili po končanem delu z mišmi. Z živalmi smo ravnali previdno, umirjeno in počasi.



Slika 4: Tehtanje miši (foto: A. Snedec, 2013)

### 3.4 OCENJENA MASA MLADIČEV

Ocenjeno maso mladičev smo pridobili na podlagi podatkov o telesnih masah miši. Najprej smo iz podatkov o telesnih masah miši pridobili porodno maso miši po enačbi:

$$PM = m_{\text{pred}} - m_{\text{po}} \quad \dots (1)$$

pri čemer je PM – porodna masa miši,  $m_{\text{pred}}$  – masa pred kotitvijo [g],  $m_{\text{po}}$  – masa po kotitvi [g].

Nato smo izračunali še ocenjene mase mladičev po enačbi:

$$OM = PM / \check{S}T_M \quad \dots (2)$$

pri čemer je OM – ocenjena masa mladičev [g], PM – porodna masa miši [g],  $\check{S}T_M$  – število mladičev pri posamezni miši.

### 3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Pridobljene podatke o telesnih masah miši smo statistično obdelali. Statistični model za telesno maso živali (1) je vključeval sistematski vpliv poizkusa in interakcijo med skupinami (G, K in N) ter dnevom opazovanja. Slednji vpliv predstavlja učinek različnih vrst krme na telesno maso živali ločeno za vsak dan poskusa. Statistični model je vključeval še naključni vpliv živali, saj so bile zbrane ponovljene meritve telesne mase na istih živalih. Vso analizo podatkov smo opravili s statističnim programom SAS (SAS, 2011) in R (R..., 2013) ter po navodilih za uporabo paketa lme4 (Bates in sod., 2014).

$$y_{ijklm} = \mu + P_i + SDj_k + a_{ijkl} + e_{ijklm} \quad \dots (3)$$

kjer je:

$y_{ijklm}$  = telesna masa živali,

$\mu$  = srednja vrednost,

$P_i$  = vplivi  $i$ -tega poskusa ( $i= 1, 2$ ),

$S_j$  = vpliv  $j$ -te skupine ( $j= G, K$  in  $N$ ),

$D_k$  = vpliv  $k$ -tega dneva pred in po obrejitvi ( $k= -29, -28, \dots, \text{in } +27$ ),

$a_{ijkl}$  = vpliv živali ( $l=1, 2, \dots, 45$ ) in

$e_{ijklm}$  = ostanek.

## 4 REZULTATI

### 4.1 PREVERJANJE ŠTEVILA BAKTERIJ LGG IN LK7<sup>R</sup>, SUSPENDIRANIH V REKONSTITUIRANEM MLEKU

Ker smo želeli preveriti, kakšno koncentracijo bakterij so miši prejemale med poskusom, smo število bakterij LGG in LK7<sup>R</sup> v rekonstituiranem mleku, ki smo ga aplicirali mišim, preverjali z metodo štetja na ploščah. Koncentracija bakterij (št. KE) v pripravku za aplikacijo, na določen dan, je prikazana v preglednici 4.

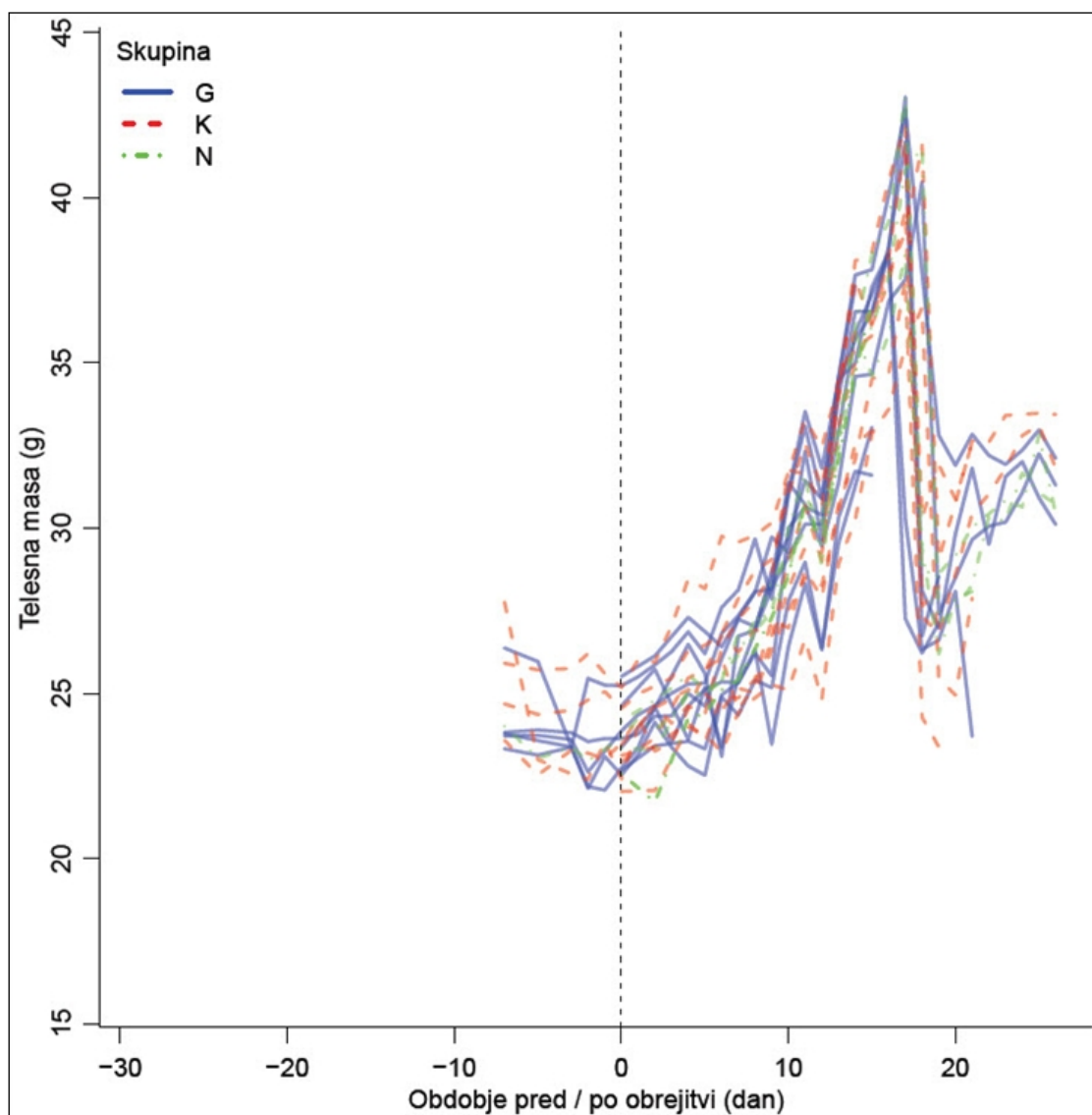
Preglednica 4: Rezultati preverjanja števila kolonijskih enot (KE) bakterij LGG in LK7<sup>R</sup> v pripravkih za aplikacijo, z metodo štetja na ploščah

| Dan hrambe pripravka v hladilniku | LGG [št. KE x 10 <sup>8</sup> /aplikacijo] | LK7 <sup>R</sup> [št. KE x 10 <sup>8</sup> /aplikacijo] |
|-----------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| 0                                 | 5,5                                        | 4,6                                                     |
| 6                                 | 5,3                                        | 1,8                                                     |
| 0                                 | 3,9                                        | 4,3                                                     |
| 6                                 | 3,8                                        | 1,8                                                     |
| 0                                 | 4,3                                        | 4,2                                                     |
| 6                                 | 3,5                                        | 2,8                                                     |
| 1                                 | 3,7                                        | 4,9                                                     |
| 6                                 | 3,7                                        | 2,8                                                     |
| 0                                 | 3,3                                        | 6,1                                                     |
| 5                                 | 3,3                                        | 4,0                                                     |
| 0                                 | 3,4                                        | 4,9                                                     |
| 6                                 | 3,3                                        | 4,0                                                     |
| 0                                 | 3,5                                        | 3,4                                                     |
| 0                                 | 5,0                                        | 5,1                                                     |
| 5                                 | 5,8                                        | 2,4                                                     |
| 6                                 | 3,3                                        | 1,5                                                     |
| Povprečje                         | 4,0                                        | 3,6                                                     |
| Standardni odklon                 | 0,8                                        | 1,4                                                     |

Živalim smo vsakodnevno aplicirali  $4,0 \pm 0,8 \times 10^8$  KE bakterij LGG ali  $3,6 \pm 1,4 \times 10^8$  KE bakterij LK7<sup>R</sup>. V povprečju je bil padec števila KE bakterij LGG v pripravku, med prvim in šestim dnevom hranjenja v hladilniku manjši (iz 4,1 na  $4,0 \times 10^8$  KE/aplikacijo), v primerjavi z LK7<sup>R</sup> (iz 4,7 na  $2,6 \times 10^8$  KE/aplikacijo), vendar so bile v obeh primerih razlike tako majhne, da niso vplivale na rezultate eksperimenta.

#### 4.2 SPREMLJANJE MASE BREJIH MIŠI MED POSKUSOM

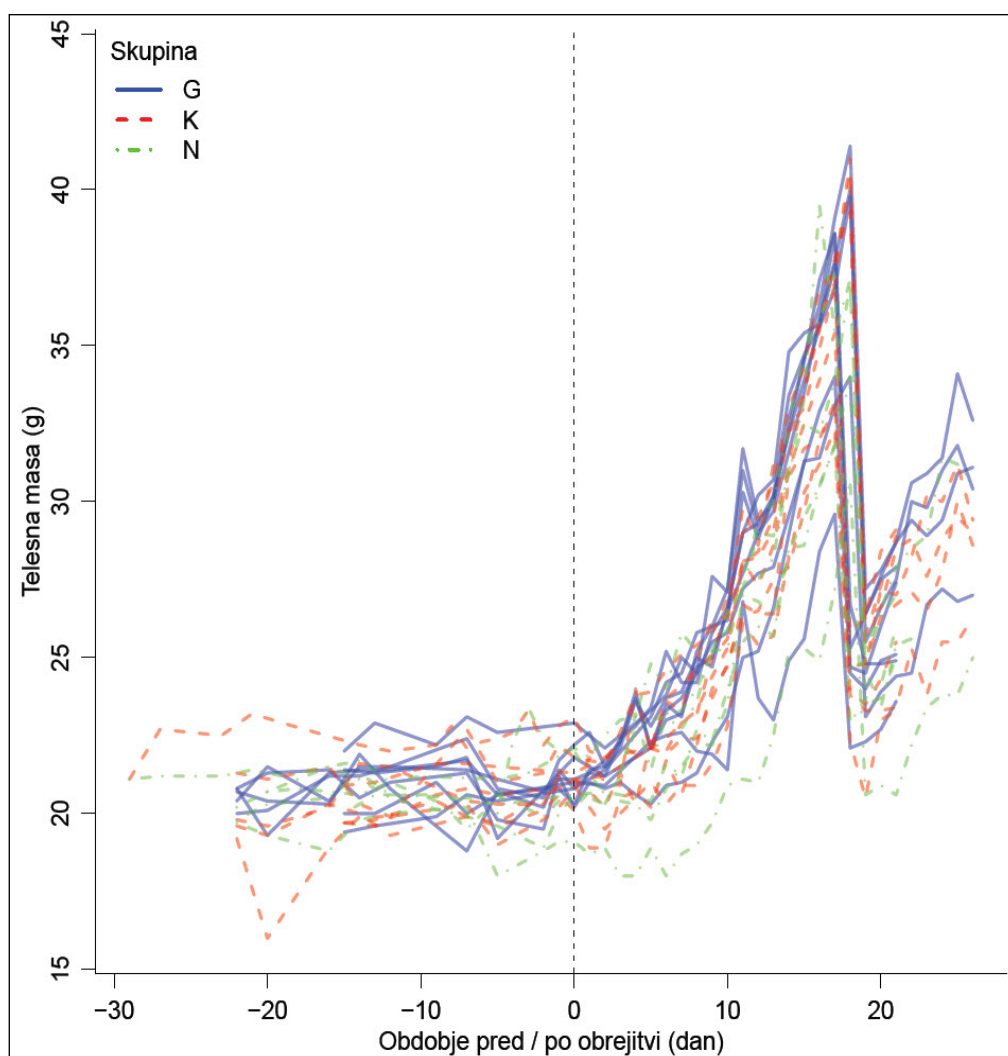
Spreminjanje telesne mase živali med prvim in drugim poskusom je prikazano na sliki 5 in sliki 6. Telesna masa živali je po obrejitvi naraščala do kotitve nato pa strmo padla (Slika 5), kar je v skladu s pričakovanji. Najmanjša telesna masa ene živali je v obdobju pred obrejitvijo znašala 22,8 g, največja pa 44 g in sicer tik pred kotitvijo. Najvišjo telesno maso je dosegla miška iz skupine G. Opazimo tudi, da je variabilnost v telesni masi bistveno večja med posameznimi živalmi kot med primerjanimi skupinami. Povprečna telesna masa v skupini G in K je bila 28,4 g, v skupini N pa 28,1 g.



Slika 5: Spreminjanje mase posameznih živali med poskusom 1

N- kontrolna skupina, G- skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K- skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu.

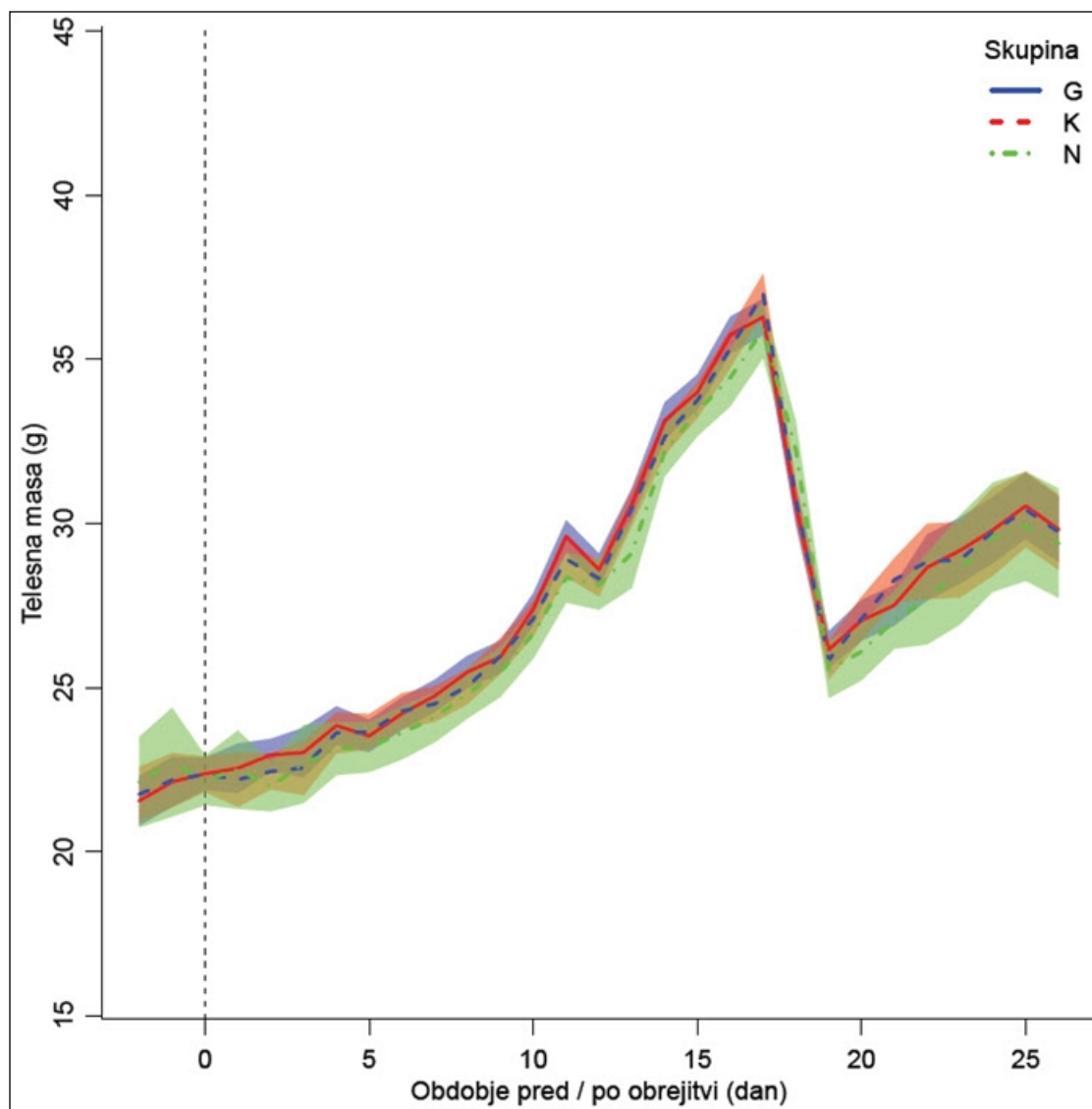
Pri poskusu 2 smo tako kot pri poskusu 1 merili telesno maso posameznih živali v vseh treh skupinah v obdobju pred in po obrejitvi. Podobno kot pri poskusu 1 so rezultati, pokazali strmo naraščanje telesne mase v obdobju po obrejitvi in nato nagel padec po kotitvi. Najnižja telesna masa živali je bila v obdobju pred obrejitvijo 18,7 g, kar je manj kot v prvem poskusu. Najvišjo telesno maso pa smo zabeležili pri živali iz skupine G tik pred kotitvijo, in sicer 41,4 g. Povprečna telesna masa čez celotno trajanje poskusa je bila v skupini G 25,08 g, v skupini K 23,91 g in v skupini N 22,58 g. Tudi pri poskusu 2 smo zaznali večjo variabilnost znotraj skupin v primerjavi z variabilnostjo med skupinami (Slika 6).



Slika 6: Spreminjanje mase posameznih živali med poskusom 2

N- kontrolna skupina, G- skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K- skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu.

Slika 7 prikazuje ocenjena povprečja mas živali s 95 % intervalom zaupanja po skupinah in dnevih. Zajema podatke iz poskusa 1 in poskusa 2. Osemnajsti dan po paritvi smo opazili padec mase, ki je trajal dva dni in je bil posledica poroda (mas mladičev in posteljic). Med skupinami ni bilo značilnih razlik v telesni masi v nobeni fazi brejosti ali laktacije, saj so se intervali zaupanja ocenjenih povprečij med skupinami prekrivali čez celotni poskus.



Slika 7: Ocenjena povprečja telesnih mas živali s 95% intervalom zaupanja po skupinah in dnevih za oba poskusa skupaj

N- kontrolna skupina, G- skupina hranjena z *Lactobacillus rhamnosus* GG, K- skupina hranjena z *Lactobacillus gasseri* K7, odpornim proti rifampicinu.

#### 4.3 OCENA POVPREČNE MASE MLADIČEV PRI KOTITVI

Preglednica 5 prikazuje izračunane porodne mase brejih miši in ocenjene mase njihovih mladičev v poskusu 1.

Preglednica 5: Porodne mase miši in ocenjene mase mladičev v poskusu 1

| SKUPINA K<br>OZNAKA MIŠI    | PORODNA<br>MASA (masa<br>pred kotitvijo-<br>masa po kotitvi)<br>[g] | ŠTEVILO<br>MLADIČEV | OCENJENA<br>MASA<br>MLADIČEV<br>(porodna masa/<br>število mladičev)<br>[g] |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| K2/1-11                     | 14,14                                                               | 8                   | 1,77                                                                       |
| K31-10                      | 11,72                                                               | 6                   | 1,95                                                                       |
| K4/1-10                     | 12,79                                                               | 10                  | 1,28                                                                       |
| K4/2-13                     | 10,83                                                               | 7                   | 1,55                                                                       |
| K2/2-4                      | 13,47                                                               | 9                   | 1,50                                                                       |
| K3/2-10                     | 10,25                                                               | 11                  | 0,93                                                                       |
| POVPREČJE ( $\bar{x}$ )     | 12,2                                                                | 8,5                 | 1,50                                                                       |
| STANDARDNA<br>DEVIACIJA [g] | $\pm 1,53$                                                          | $\pm 1,71$          | $\pm 0,36$                                                                 |
| SKUPINA G<br>OZNAKA MIŠI    |                                                                     |                     |                                                                            |
| G2/1-30                     | 12,09                                                               | 10                  | 1,21                                                                       |
| G4/1-1                      | 16,08                                                               | 10                  | 1,61                                                                       |
| G3/1-33                     | 11,95                                                               | 12                  | 0,99                                                                       |
| G3/2-30                     | 11,5                                                                | 9                   | 1,28                                                                       |
| G4/2-33                     | 10,76                                                               | 11                  | 0,98                                                                       |
| G2/2-40                     | 13,15                                                               | 15                  | 0,88                                                                       |
| G4/3-30                     | 11,98                                                               | 6                   | 1,99                                                                       |
| POVPREČJE ( $\bar{x}$ )     | 12,5                                                                | 10,4                | 1,28                                                                       |
| STANDARDNA<br>DEVIACIJA [g] | $\pm 1,73$                                                          | $\pm 2,56$          | $\pm 0,40$                                                                 |
| SKUPINA N<br>OZNAKA MIŠI    |                                                                     |                     |                                                                            |
| N2/2-1                      | 11,49                                                               | 7                   | 1,64                                                                       |
| N4/1-13                     | 13,98                                                               | 9                   | 1,55                                                                       |
| N3/1-11                     | 16,88                                                               | 14                  | 1,21                                                                       |
| N4/2-1                      | 9,68                                                                | 8                   | 1,21                                                                       |
| POVPREČJE ( $\bar{x}$ )     | 13,0                                                                | 9,5                 | 1,40                                                                       |
| STANDARDNA<br>DEVIACIJA [g] | $\pm 3,13$                                                          | $\pm 2,69$          | $\pm 0,23$                                                                 |

Živali so označene po enačbi  $XN_1/N_2-Y$ : X je oznaka skupine (N, G ali K);  $N_1$  je dan žrtvovanja (1 do 15 dan po paritvi, drugi dan po kotitvi, tretji dan po kotitvi, 4 do 8 dan po kotitvi);  $N_2$  je številka paralelke (žival znotraj iste skupine ob istem času žrtvovanja); Y je ušesna oznaka posamezne živali

Porodno maso miši smo izračunali tako, da smo masi pred kotitvijo odšteli maso po kotitvi.

Najvišjo povprečno porodno maso (13 g) so imele miši iz skupine N (kontrolna skupina),

razlika z ostalima skupinama je samo naključna, saj se je zaradi manjšega števila zapisov povečala standardna deviacija. Za potrebe projekta smo pri prvem poskusu pet živali žrtvovali, petnajsti dan po paritvi, zato zanje nismo pridobili podatkov o porodni masi. Povprečna porodna masa miši skupine K je znašala 12,2 g in skupine G 12,5 g. Ocenjeno maso mladičev smo dobili tako, da smo porodno maso miši delili s številom mladičev. Najvišjo ocenjeno maso so imeli mladiči iz skupine K, in sicer 1,49 g. Najnižjo ocenjeno maso mladičev so imeli mladiči iz skupine G, in sicer 1,27 g.

Porodne mase bregjih miši in ocenjene mase njihovih mladičev iz poskusa 2 so podane v Preglednici 6. Najvišjo povprečno porodno maso 11,7 g so imele miši iz skupine G, ki so dnevno dobivale  $4,0 \pm 0,8 \times 10^8$  KE bakterij LGG. Povprečna porodna masa miši skupine K je znašala 11,3 g, skupine N pa 10,8 g. Tudi povprečna ocenjena masa mladičev je bila največja v skupini G (1,5 g), medtem ko so mladiči skupin K in N povprečno tehtali 1,4 g.

Preglednica 6: Porodne mase miši in ocenjene mase mladičev v poskusu 2

| SKUPINA K<br>OZNAKA MIŠI    | PORODNA<br>MASA (masa<br>pred kotitvijo-<br>masa po kotitvi)<br>[g] | ŠTEVILO<br>MLADIČEV | OCENJENA<br>MASA<br>MLADIČEV<br>(porodna masa/<br>število mladičev)<br>[g] |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| K3/4-A3                     | 9,5                                                                 | 6                   | 1,58                                                                       |
| K3/3-D3                     | 11,8                                                                | 8                   | 1,48                                                                       |
| K4/3-J11                    | 12,1                                                                | 11                  | 1,10                                                                       |
| K4/4-G1                     | 10,7                                                                | 8                   | 1,34                                                                       |
| K4/5-N34                    | 9,9                                                                 | 6                   | 1,65                                                                       |
| K4/6-A44                    | 10,6                                                                | 8                   | 1,33                                                                       |
| K3/5-E11                    | 12,6                                                                | 9                   | 1,40                                                                       |
| K3/6-C30                    | 13,2                                                                | 10                  | 1,32                                                                       |
| POVPREČJE ( $\bar{x}$ )     | 11,3                                                                | 8,3                 | 1,4                                                                        |
| STANDARDNA<br>DEVIACIJA [g] | $\pm 1,32$                                                          | $\pm 1,64$          | $\pm 0,17$                                                                 |
| SKUPINA G<br>OZNAKA MIŠI    |                                                                     |                     |                                                                            |
| G3/4-I10                    | 7,3                                                                 | 4                   | 1,83                                                                       |
| G3/3-J30                    | 12,2                                                                | 10                  | 1,22                                                                       |
| G4/5-L13                    | 13,6                                                                | 7                   | 1,94                                                                       |
| G4/4-H4                     | 12,2                                                                | 9                   | 1,36                                                                       |
| G3/5-G31                    | 13,8                                                                | 8                   | 1,73                                                                       |
| G3/6-F41                    | 13,1                                                                | 8                   | 1,64                                                                       |
| G4/6-B13                    | 10,1                                                                | 8                   | 1,26                                                                       |
| G3/7-M14                    | 10                                                                  | 7                   | 1,43                                                                       |
| G4/7-M1                     | 13,4                                                                | 9                   | 1,49                                                                       |
| POVPREČJE ( $\bar{x}$ )     | 11,7                                                                | 7,8                 | 1,5                                                                        |
| STANDARDNA<br>DEVIACIJA [g] | $\pm 2,18$                                                          | $\pm 1,62$          | $\pm 0,25$                                                                 |
| SKUPINA N<br>OZNAKA MIŠI    |                                                                     |                     |                                                                            |
| N3/2-C40                    | 8,1                                                                 | 7                   | 1,16                                                                       |
| N3/3-030                    | 13,7                                                                | 8                   | 1,71                                                                       |
| N3/4-H41                    | 12,4                                                                | 8                   | 1,55                                                                       |
| N4/3-K44                    | 9,8                                                                 | 8                   | 1,23                                                                       |
| N4/4-F1                     | 10,5                                                                | 7                   | 1,50                                                                       |
| N3/5-I31                    | 10,3                                                                | 7                   | 1,47                                                                       |
| POVPREČJE ( $\bar{x}$ )     | 10,8                                                                | 7,5                 | 1,4                                                                        |
| STANDARDNA<br>DEVIACIJA [g] | $\pm 1,98$                                                          | $\pm 0,50$          | $\pm 0,21$                                                                 |

Živali so označene po enačbi  $XN_1/N_2-Y$  kot v preglednici 5.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Probiotični mikroorganizmi postajajo vse bolj zanimivi kot sestavina funkcionalnih živil, prehranskih dopolnil, zdravil in tudi krmnih dodatkov za živali. Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki zaužiti v zadostni količini, pozitivno vplivajo na zdravje gostitelja (Guarner in Shaafsma, 1998 in Zocco in sod., 2006). Pripisujejo jim številne zdravju ugodne učinke kot na primer blagodejen vpliv na črevesno mikrobioto, črevesne epiteljske celice in imunski sistem, pri rejnih živalih pa tudi boljši prirast. Preden mikroorganizem označimo kot probiotični, pa ga je treba temeljito okarakterizirati, ugotoviti njegove učinke, proučiti mehanizme delovanja, določiti učinkovito dozo in varnost (Rogelj in Perko, 2003). Karakterizacija in proučevanje probiotičnega seva poteka najprej v laboratorijskih eksperimentih in se nadaljuje na laboratorijskih živalskih modelih. Zaključni se v kliničnih študijah pri probiotikih, namenjenih ljudem in študijah na živalih, če so namenjeni njim. Na Katedri za mlekarstvo, Biotehniške fakultete že vrsto let proučujejo probiotični sev *Lactobacillus gasseri* K7 (LK7). V poskusu smo uporabljali sev LK7 odporen proti rifampicinu (LK7<sup>R</sup>), saj je magistrska naloga potekala v okviru temeljnega projekta J4-3606, »Vloga humanega mleka v razvoju črevesne mikrobiote dojenčka«, in sicer v delovnem sklopu z naslovom »Proučevanje možnih mehanizmov endogenega prenosa probiotičnih bakterij«, kjer so ugotavljali prisotnost seva v različnih tkivih. Treven (2014) je v svoji raziskavi, ki je ravno tako potekala v okviru tega projekta, ugotavljal vpliv probiotikov na mikrobioto miši in potrdil, da krmljenje probiotičnih sevov LK7 in LGG v času brejosti in laktacije vpliva na sestavo mikrobiote mlečne žleze pri miših. Odpornost seva proti rifampicinu je predstavljala dodatno selekcijo pri ugotavljanju morebitne prisotnosti seva v odvzetih vzorcih (Treven, 2014). Ker so za določene probiotike dokazali, da izboljšujejo tudi prirast rejnih živali (Million in sod., 2012) nas je zanimalo ali seva LK7 in LGG, ki je v raziskavah služil kot primerjalni sev (saj je eden od najbolj raziskanih), vplivata na prirast telesne mase brejih miši in maso njihovih mladičev.

Za poskus smo izbrali inbridirano linijo miši FVB/NHanHsd. Miši te linije imajo dobro plodnost, velika gnezda in posledično dobro mlečnost (Treven, 2014). Prav tako pomembne lastnosti, ki so pripomogle k temu, da smo za živalski model izbrali miši, pa so

še: relativno nizki stroški vzdrževanja, potrebujejo malo prostora in imajo odlično sposobnost reprodukcije (Beck in sod., 2000). Zaradi vseh teh lastnosti smo za poskus lahko uporabili manjše število živali. Miši so imele ves čas poskusa na voljo peletirano krmo in vodo v napajalniku. Probiotična seva, suspendirana v rekonstituiranem mleku smo aplicirali mišim vsakodnevno od sedmega dneva brejosti pa vse do kotitve. Ker je pri proučevanju učinkov probiotičnih bakterij pomembno število živih probiotičnih bakterij, ki jih žival zaužije, smo najprej preverjali koncentracijo živih probiotičnih bakterij v pripravkih rekonstituiranega mleka in njihovo preživetje med šest dnevnim shranjevanjem pripravkov v hladilniku pri 4 °C. Število živih bakterij LGG in LK7<sup>R</sup>, suspendiranih v rekonstituiranem mleku, smo z metodo štetja na ploščah preverjali na začetku (dan 0) in ob koncu hrambe v hladilniku (dan 6). Padec števila KE bakterij LGG v pripravku je bil v povprečju v času hranjenja v hladilniku manjši v primerjavi z LK7<sup>R</sup>. Živali so z 200 µL pripravka dnevno prejele povprečno  $4,0 \pm 0,8 \times 10^8$  KE bakterij LGG ali  $3,6 \pm 1,4 \times 10^8$  KE bakterij LK7<sup>R</sup>, medtem ko je kontrolna skupina miši prejela dnevno samo 200 µL rekonstituiranega mleka. Razlog za večji padec števila KE bakterij LK7<sup>R</sup> je najverjetneje to, da mleko ni najprimernejši medij za LK7<sup>R</sup>. Avonts in sod. (2004) so primerjali obseg rasti sedmih probiotičnih sevov laktobacilov: *L. acidophilus* IBB 801, *L. casei* Imunitas, *L. casei* YIT 9029, *L. gasseri* K7, *L. johnsonii* La1 in *L. rhamnosus* GG v različnih medijih. Spremljali so njihovo rast po nacepljanju v medij MRS, rekonstituirano mleko in rekonstituirano mleko obogateno z ekstraktom kvasa. Vzorce so jemali pred inokulacijo, po inokulaciji in po 12, 24 in 48 urah pri 37 °C. Ugotovili so, da sevi vrst *L. casei* dosežejo rast v večjem številu v MRS mediju kot sevi vrst *L. acidophilus*. Tudi v mleku so dosegli sevi vrst bakterij *L. casei* večji obseg rasti kot ostali sevi, zelo slabo rast pa so potrdili za sev *L. gasseri* K7 (Avonts in sod., 2004). Iz tega lahko sklepamo, da probiotični laktobacili, ki so naseljeni v prebavnem traktu, niso prilagojeni za rast v mleku, kar nakazuje na najverjetnejši vzrok temu, da je bil padec števila KE bakterij LK7<sup>R</sup> med hladnim shranjevanjem večji kot seva LGG.

Glavni namen naloge je bil ugotoviti ali bo uživanje probiotičnih sevov vplivalo na maso brejih miši in njihovih mladičev. Million in sod. (2012) so v svoji študiji predpostavili, da vesplošno razširjeno uživanje probiotičnih sevov vrst iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* lahko spodbuja naraščanje telesne mase s spreminjanjem črevesne

mikrobiote. Kot krmni dodatki za živali se od laktobacilov najpogosteje uporabljajo probiotični sevi vrst *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum* in *L. reuteri*. V študiji so izvedli meta analizo kliničnih študij o vplivih uživanja probiotikov na prirast živali. Meta-analiza je statistična analiza, v kateri se združujejo rezultati več že izvedenih in med seboj primerljivih znanstvenih raziskav. Iz različnih študij so pridobili podatke o spremembi mase živali v poskusu od izhodiščne vrednosti do mase živali na koncu študije, dnevni masi, razmerju med maso in starostjo in pa indeksu telesne mase. Ugotovili so, da na povečevanje telesne mase vplivajo določeni sevi bakterijskih vrst *L. acidophilus* in *L. fermentum*, k izgubi telesne mase pa prispevajo določeni sevi bakterijskih vrst *L. gasseri* in *L. plantarum*. Študija je potrdila, da dodatek seva *L. plantarum* DSM 15313 v visoko-kalorično dieto pri podganah bistveno zmanjša vnos kalorij v telo. (Million in sod., 2012).

V naši študiji smo miši tehtali vsakodnevno, njihova telesna masa je v obeh poskusih po obrejitvi strmo naraščala do kotitve. Tako je bila izmerjena povprečna masa v poskusu 1 pri skupini G in K 28,4 g, pri skupini N (kontrolna skupina) pa 28,1 g. V poskusu 2 je bila povprečna telesna masa živali v skupini G 25,08 g, skupini K 23,91 g in pri kontrolni skupini N 22,58 g. Na podlagi izmerjenih mas in izračunanih povprečnih mas med potekom poskusa smo sklepali, da med poskusom 1 in 2 ne bi smelo biti statistično značilnih razlik, ravno tako jih ne bi smelo biti med posameznimi skupinami v poskusu. Bernardeo in sod. (2002) so v svoji raziskavi primerjali telesne mase med petimi skupinami, v vsaki je bilo pet mladih samčkov ali samic. Kontrolna skupina je prejela samo popolno krmno mešanico, ostale štiri skupine pa fermentirano mleko, ječmen, skuto ali vodo obogateno z dvema različnima probiotičnima sevoma *L. rhamnosus* MA27/6B in *L. acidophilus* MA27/6R. Miši so tekom 17- dnevnega poskusa tehtali, merili vnos hrane in vode ter ostalih pripravkov. Rezultati raziskave so pokazali, da se je skupinam, ki so dnevno prejemale  $10^8$  kolonijskih enot sevov *L. rhamnosus* MA27/6B in *L. acidophilus* MA27/6R / miš povečala telesna masa v primerjavi s kontrolno skupino. Na drugi strani pa nekateri avtorji, kot npr. Zhou in sod. 2000, ne opažajo nobenega značilnega vpliva probiotičnih sevov na telesno maso, zato predpostavljajo, da naj bi na učinek oz. vpliv probiotika na telesno maso živali vplival stres. Zaključujejo, da naj bi negativen stres lahko pripomogel k upadanju telesne mase, ki pa ponovno počasi naraste, če živali dodajamo probiotične pripravke, saj jim s tem pomagamo do uravnovešene črevesne mikrobiote. V

našem primeru smo živalim ustvarili, kar se da ustrezno in umirjeno okolje, vendar kljub temu bi mišim lahko stres povzročalo vsakodnevno tehtanje in aplikacija probiotičnih sevov z orogastrično sondo, tako da tudi tu ne smemo zanemariti stresnih dejavnikov. Telesno maso brejih miši smo spremljali ves čas poskusa in kot posledica kotitve, smo devetnajsti dan po paritvi opazili strm padec mase pri vseh izmerjenih skupinah. Strmo padanje mase zaradi kotitve je trajalo 2 dni. Povprečna porodna masa miši je bila v poskusu 1 v skupini G 12,5 g, skupini K 12,2 g in skupini N 13,0 g. Pri poskusu 2 je bila povprečna porodna masa miši v skupini G 11,7 g, skupini K 11,3 g in skupini N 10,8 g.

Poleg merjenja mas brejih miši smo izračunali še ocenjene mase mladičev. Zaradi obsežnosti samega poskusa smo namesto tehtanja mladičev, maso mladičev ocenili na podlagi porodne mase. Povprečna ocenjena masa mladičev pri poskus 1 je bila v skupini G 1,28 g, skupini K 1,50g in skupini N 1,40 g. V poskusu 2 so bile povprečne ocenjene mase mladičev za skupino G 1,50 g, skupino K 1,40 g in skupino N 1,40 g. Tudi pri ocenjenih masah mladičev nismo ugotovili nobenih bistvenih razlik med skupinami. Na podlagi vseh izmerjenih telesnih mas miši smo naredili celotno statistično analizo za oba poskusa s statističnim programom SAS. V obeh poskusih je bil rezultat analize podoben, saj nismo ugotovili statistično značilnih razlik v telesnih masah med skupinama, ki sta bili hranjeni s probiotičnima dodatkom in kontrolno skupino ter nobenega vpliva na ocenjeno maso mladičev. Ugotovili smo bistveno večjo variabilnost med posameznimi živalmi kot med primerjanimi skupinami. Na večjo variabilnost med posameznimi živalmi so vplivali dejavniki kot na primer: starost miši ob obrejitvi (7 do 10 tednov), majhno število miši vključenih v poskus in s tem majhno število miši v skupinah, število mladičev in individualna odstopanja.

Rezultati torej nakazujejo, da aplikacija probiotikov mišim v času brejosti ni vplivala na maso samic, porodno maso in ocenjeno maso njihovih mladičev. Vendar moramo biti pri interpretaciji rezultatov previdni, saj je bila variabilnost med posameznimi živalmi znotraj posamezne skupine zelo velika. To nakazuje na možnost, da je bilo število živali, vključenih v poskus, premajhno, da bi lahko bili statistični rezultati zanesljivi.

## 5.2 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov, ki smo jih dobili z raziskavo, lahko sklepamo:

- Da breje miši, ki so uživale probiotična seva *Lactobacillus rhamnosus* GG in *Lactobacillus gasseri* K7<sup>R</sup> niso imele večjega prirasta kot miši, ki dodatka niso uživale.
- Da uživanje probiotičnih dodatkov ni vplivalo na ocenjeno maso mišjih mladičev.

Hipotezi, ki smo si jih torej zastavili pred izvajanjem poskusa lahko v tem primeru ovržemo.

## 6 POVZETEK

Probiotiki so po definiciji živi mikroorganizmi, ki zaužiti v zadostni količini, vplivajo na zdravje gostitelja. Ugodno vplivajo na splošno zdravstveno stanje gostitelja, še posebej pa jih povezujejo s pozitivnimi učinki na delovanje črevesne mikrobiote. Ravno zaradi njihovega učinka na črevesno mikrobioto, jih že vrsto let uporabljajo tudi v živalih pri preprečevanju prebavnih motenj živali, omenjeni pa so tudi kot pospeševalci zmogljivosti rasti. Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali probiotiki lahko vplivajo na večji prirast telesne mase brejih miši FVB/NHanHsd in posledično na njihove mladiče.

Vpliv probiotikov na telesno maso miši in njihovih mladičev smo proučevali s pomočjo mišjega modela in dveh probiotičnih sevov *Lactobacillus gasseri* K7, odporen proti rifampicinu (LK7<sup>R</sup>) in *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). Pripravke probiotičnih sevov in rekonstituiranega mleka, katere smo kasneje aplicirali mišim, smo pripravili v mikrobiološkem laboratoriju, kjer smo preverjali tudi koncentracijo omenjenih sevov s klasično metodo cepljenja na hranljivo trdno gojišče MRS. Probiotična seva, ki smo jih uporabili za aplikacijo mišim, sta zelo dobro raziskana. Sev LGG je zaradi številnih pozitivnih lastnosti največkrat uporabljen tudi kot komercialni probiotik. Poskus smo izvajali v dveh ločenih ponovitvah (skupno 45 živali). Miši smo naključno razdelili v tri skupine (skupina N, skupina G, skupina K), vsem smo od sedmega dneva brejosti aplicirali rekonstituirano mleko ali rekonstituirano mleko z dodatkom enega od probiotičnih sevov. Živali smo vsakodnevno tehtali in beležili njihove telesne mase. S pomočjo telesnih mas miši pred kotitvijo in po kotitvi, smo pridobili porodne mase miši, na podlagi katerih smo lahko ocenili tudi mase njihovih mladičev. Pridobljene podatke smo nato statistično obdelali.

Rezultati statistične analize so pri obeh ponovitvah poskusa pokazali, da med primerjanimi skupinami ni bilo statističnih razlik v telesnih masah živali ter da je variabilnost med telesnimi masami bistveno večja med posameznimi živalmi. Prav tako se rezultati ocenjenih mas mladičev med skupinami niso razlikovali. Na osnovi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da uživanje probiotičnih sevov *Lactobacillus gasseri* K7<sup>R</sup> in *Lactobacillus*

*rhamnosus* GG, ne vpliva na povečan prirast telesnih mas brejih miši FVB/NHanHsd in njihovih mladičev v primerjavi s kontrolno skupino.

## 7 VIRI

- Adamič J., Smole-Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-45
- Amara A. A., Shibl A. 2013. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. Saudi Pharmaceutical Journal (v tisku)  
doi: 10.1016/j.jsps.2013.07.001 (15. jan. 2015)
- Avonts L., Van Uvten E., De Vuyst L. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. International Dairy Journal, 14: 947-955
- Bates D., Mächler M., Bolker B., Walker S. 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. Cornell University Library: 51 str.  
<http://arxiv.org/pdf/1406.5823v1.pdf> (30. jan. 2015)
- Beck, J. A., Lloyd S., Hefezparast M., Lennon-Pierce M., Eppig J. T., Festing, F. W., Fisher M. C. 2000. Genealogies of mouse inbred strains. Nature America Inc.  
[http://www.nature.com/ng/journal/v24/n1/full/ng0100\\_23.html](http://www.nature.com/ng/journal/v24/n1/full/ng0100_23.html) (21. jan. 2015)
- Bernardeau M., Vernoux J. P., Gueguen M. 2002. Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. International Journal of Food Microbiology, 77: 19-27
- Bogovič-Matjašić B., Koman Rajšp M., Perko B., Rogelj I. 2007. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. International Dairy Journal, 17, 2: 157-166
- Bogovič-Matjašić B., Rogelj I. 2000. *Lactobacillus* K7- a new candidate for probiotic strain. Food technology and Biotechnology, 38: 113-119
- FAO/WHO. 2002. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada: 11 str.  
<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> (30. jan. 2015)
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-378
- Gaggia F., Mattarelli P., Biavati B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. International Journal of Food Microbiology, 141: 15-28
- Guarner, F., Schaafsma, G. J. 1998. Short communication Probiotics. International Journal of Food Microbiology, 39: 237-238
- Higgins, J.P., Higgins, S.E., Vicente, J.L., Wolfenden, A.D., Tellez, G., Hargis, B.M. 2007. Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on *Salmonella* in neonatal broilers. Poultry Science 86: 1662- 1666

- Higgins, S.E., Higgins, J.P., Wolfenden, A.D., Henderson, S.N., Torres- Rodriguez, A., Tellez, G., Hargis, B. 2008. Evaluation of *Lactobacillus*- based probiotic culture for the reduction of *Salmonella enteritidis* in neonatal broiler chicks. *Poultry Science* 87: 27- 31
- Kryštufek B. 2003. Sesalci - Mammalia. V: Živalstvo Slovenije. Sket B., Gogala M., Kuštor V. (ur.). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 575-603
- Lee Y.K, Salminen S. 2009. Handbook of Probiotics and Prebiotics. Hoboken, John Wiley & Sons: 596 str.
- Martín R., Langa S., Reviriego C., Jimenez E, Marín M.L., Xaus J., Fernandez L., Rodríguez J.M.. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*, 143, 6: 754-758
- Million M., Angelakis E., Paul M., Armougom F., Leibovici L., Raoult D. 2012. Comparative meta- analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microbial Pathogenesis*: 53: 100- 108
- Moro E. G., Arslanoglu S. 2005. Reproducing the bifidogenic effect of human milk in formula-fed infants: Why and how? *Acta Paediatrica* 94, (Suppl. 449): 14-17
- Ohland C. L., Macnaughton W K. 2010. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology*, 298: 807-819.  
<http://ajpgi.physiology.org/content/298/6/G807> (30. jan. 2015)
- Quan S., Zhou J. S., Rutherford K. J., Birtles M. J., Prasad J., Gopal P. K., Gill H. S. 1991. Probiotic lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus* HN017, *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019) have no adverse effects on the health of mice. *International Dairy Journal*, 9: 831-836
- Pravilnik o krmnih dodatkih. Ur. l. RS, št. 110/2009
- R. 2015. The R project for statistical computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/> (30. jan. 2015)
- Rodriguez- Palacios A., Weese J.S., Duffield T., Staempfli H.R. 2004. Effect of oral probiotics on calf diarrhoea. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18: 395- 396
- Rogelj I., Perko B. 2003. Mlečni izdelki. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole-Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 541-577
- Saad, N. Delattre, C. Urdaci, M. Shmitter, J. M. Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT- Food Science and Technology*, 50: 1-16
- Santini C., Baffoni L., Gaggia F. Granata M., Gasbarri R., Di Gioia D., Biavati B. 2010. Characterization of probiotic strains: An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, 141: 98-108

SAS System for Windows, Release 9.3. 2011. Cary, SAS Institute.

Siggers R. H., Boye J., Thymann M., Mølbak T., Leser L., Jensen T., Sangild B. B. 2008. Early administration of probiotics alters bacterial colonization and limits diet- induced gut dysfunction and severity of necrotizing, enterocolitis in preterm pigs. *Journal of Nutrition* 138: 1437- 1444

Takahashi S., Egawa Y., Simojo N., Tsukahara T., Ushida K. 2007. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain Lq80 to weaning piglets stimulates the growth of indigenous lactobacilli to modify the lactobacillal population. *Journal of General and Applied Microbiology* 53: 325- 332

Treven P. 2014. Vpliv probiotikov na mikrobioto mlečne žleze in mleka. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 161 str.

Uredba o izvajanju Uredbe (ES) Evropskega parlamenta in Sveta o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih. Ur. l. RS, št. 80/2007 in 38/2010

Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 1831/2003 z dne 22. septembra 2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali. Ur. l. Evropske unije, L 268/29, 238-249  
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&from=EN>  
(4. feb. 2015)

Vodovnik M., Marinšek-Logar R. 2008. Načini delovanja in učinki probiotikov v prehrani živali, *Acta agriculturae Slovenica*, 92, 1: 5-17

Zocco MA., dal Verme L.Z., Cremonini F., Piscaglia A.C., Nista E.C., Candelli M., Novi M., Rigante D., Cazzato I.A., Ojetti V., Armuzzi A., Gasbarrini G., Gasbarrini A. 2006. Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of Ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics Journal*; 23, 11: 1567-74

Zhou J.S., Shu, Q. Rutherford, K.J. Prasad, J. Birtels, M.J. Gopal, P.K. Gill H.S. 2000. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. Acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/ c mice. *International Journal of Food Microbiology*, 56: 87–96

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Gregorju Gorjancu, še posebej pa somentorju asist. dr. Primožu Trevnu, ki je vložil ogromno svojega časa in potrpljenja, da smo nalogo pripeljali do konca.

Posebna zahvala gre tudi recenzentki prof. dr. Ireni Rogelj za vso strokovno pomoč in nasvete pri nastajanju magistrskega dela.

Zahvaljujem se predsedniku komisije doc. dr. Silvestru Žgurju ter Jerneji Bogataj univ. dipl. inž. zoot. za tehnični pregled magistrskega dela.

## Priloga A: Telesne mase posameznih miši v poskusu 1

Se nadaljuje...

Se nadaljuje...

# Nadaljevanje... Priloga A: Telesne mase posameznih miši v poskusu 1

| 2. VRSTA                      |          |          |          |          |          |       |          |          |          |          |            |
|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|----------|------------|
| Kletka                        | 11       | 12       | 13       | 14       | 15       | 16    | 17       | 18       | 19       | 20       |            |
| Skupina                       | G1/1     | G1/1     | G2/1     | G4/1     | G3/1     | G3/2  | G1/2     | G4/2     | G2/2     | G4/3     |            |
| Ušesna št.                    | 3        | 3        | 30       | 1        | 33       | 30    | 10       | 33       | 40       | 30       |            |
| Čep                           | 22.11.11 | 22.11.11 | 22.11.11 | 23.11.11 | 22.11.11 | /     | 29.11.11 | 30.11.11 | 29.11.11 | 30.11.11 |            |
| sreda, 23. november 2011      | 25,05    | 22,67    | 25,51    | 23,37    | 24,62    | 23,71 | 23,32    | 26,37    | 23,78    | 23,82    |            |
| petek, 25. november 2011      | 25,05    | 23,41    | 26,13    | 24,55    | 25,73    | 23,73 | 23,13    | 25,96    | 23,57    | 23,89    |            |
| nedelja, 27. november 2011    | 25,58    | 23,55    | 27,3     | 26,48    | 23,6     | 23,6  | 23,37    | 23,38    | 23,38    | 23,81    |            |
| ponedeljek, 28. november 2011 | 25,21    | 23,32    | 26,87    | 25,6     | 25,18    | 22,62 | 22,12    | 25,45    | 22,18    | 23,54    |            |
| torek, 29. november 2011      | 24,63    | 24,95    | 26,41    | 23,09    | 23,36    | 23,25 | 23,09    | 25,25    | 22,07    | 23,63    |            |
| sreda, 30. november 2011      | 23,84    | 25,32    | 27,27    | 26,73    | 25,53    | 23,86 | 22,53    | 25,23    | 22,74    | 23,63    | parjenje 2 |
| četrtek, 1. december 2011     | 24,72    | 26,31    | 28,06    | 26,91    | 26,89    | 24,35 | 23,14    | 25,5     | 23,35    | 23,77    |            |
| petek, 2. december 2011       | 25,14    | 23,46    | 29,73    | 28,71    | 28,19    | 24,63 | 24,12    | 25,86    | 24,59    | 24,3     |            |
| sobota, 3. december 2011      | 25,14    | 26,42    | 29,26    | 29,73    | 29,14    | 25    | 23,37    | 26,26    | 23,54    | 24,32    |            |
| nedelja, 4. december 2011     | 25,58    | 28,32    | 32,33    | 31,44    | 30,12    | 25,28 | 22,8     | 26,86    | 24,62    | 25       |            |
| ponedeljek, 5. december 2011  |          | 26,31    | 29,65    | 30,89    | 30,12    | 25,31 | 22,52    | 26,2     | 25,12    | 24,61    | depilacija |
| torek, 6. december 2011       | 25,86    | 30,32    | 34,33    | 34,5     | 32,95    | 26,81 | 24,89    | 27,6     | 25,35    | 26,04    |            |
| sreda, 7. december 2011       |          | 31,72    | 35,73    | 35       | 35,9     | 27,35 | 24,34    | 28,13    | 25,33    | 27,24    |            |
| četrtek, 8. december 2011     |          | 31,6     | 36,48    | 37,3     | 37,08    | 28,08 | 25,4     | 29,67    | 26,21    | 27,02    |            |
| petek, 9. december 2011       |          |          | 38,31    | 38,35    | 38,28    | 28,15 | 25,17    | 27,85    | 25,53    | 28,43    |            |
| sobota, 10. december 2011     |          |          | 27,26    | 43,05    | 30,28    | 31,12 | 27,8     | 31       | 30       | 31,38    |            |
| nedelja, 11. december 2011    |          |          | 26,22    | 28,11    | 26,33    | 33,53 | 28,97    | 33,08    | 30,64    | 30,71    |            |
| ponedeljek, 12. december 2011 |          |          | 27,13    | 26,97    | 26,61    | 31,81 | 26,38    | 30,88    | 30,4     | 29,45    | depilacija |
| torek, 13. december 2011      |          |          |          | 29,83    | 28,09    | 34,52 | 29,54    | 34,57    | 33,99    | 31,37    |            |
| sreda, 14. december 2011      |          |          |          | 31,82    | 23,7     | 37,33 | 31,27    | 37,66    | 36,55    | 34,59    |            |
| četrtek, 15. december 2011    |          |          |          | 29,51    |          | 38,51 | 33,05    | 37,82    | 36,56    | 34,66    |            |
| petek, 16. december 2011      |          |          |          | 31,56    |          | 39,74 |          | 40,08    | 38,52    | 36,86    |            |
| sobota, 17. december 2011     |          |          |          | 32,01    |          | 41,31 |          | 42,66    | 41,69    | 37,52    |            |
| nedelja, 18. december 2011    |          |          |          | 30,92    |          | 28,15 |          |          | 26,73    | 40,48    |            |
| ponedeljek, 19. december 2011 |          |          |          | 30,11    |          | 29,81 |          | 32,81    | 28,54    | 27,4     |            |
| torek, 20. december 2011      |          |          |          |          |          | 31,6  |          | 31,9     |          | 28,5     |            |
| sreda, 21. december 2011      |          |          |          |          |          | 32,18 |          | 32,84    |          | 29,65    |            |
| četrtek, 22. december 2011    |          |          |          |          |          |       |          | 32,2     |          | 30,06    |            |
| petek, 23. december 2011      |          |          |          |          |          |       |          | 31,93    |          | 30,18    |            |
| sobota, 24. december 2011     |          |          |          |          |          |       |          | 32,36    |          | 31,07    |            |
| nedelja, 25. december 2011    |          |          |          |          |          |       |          | 32,97    |          | 32,25    |            |
| ponedeljek, 26. december 2011 |          |          |          |          |          |       |          | 32,11    |          | 31,3     |            |
| Mladiči (živi/mrtvi)          | izločena | 0/6      | 9/1      | 10       | 11/1     | 9     | 0/9      | 11       | 11/4     | 6        |            |

Se nadaljuje...

# Nadaljevanje... Priloga A: Telesne mase posameznih miši v poskusu 1

|                               |          |          |          |          |          |       |       |       |          |       |            |
|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|-------|----------|-------|------------|
| 3. VRSTA                      |          |          |          |          |          |       |       |       |          |       |            |
| Kletka                        | 21       | 22       | 23       | 24       | 25       | 26    | 27    | 28    | 29       | 30    |            |
| Skupina                       | N1/1     | N2/1     | N4/1     | N3/1     | N        | N     | N     | N4/2  | N        | N     |            |
| Ušesna št.                    | 30       | 1        | 13       | 11       | 10       | 30    | 31    | 1     | 1        | 10    |            |
| Čep                           | 22.11.11 | 22.11.11 | 23.11.11 | 23.11.11 | /        | /     | /     | /     | /        | /     |            |
| sreda, 23. november 2011      | 22,57    | 24,12    | 23,34    | 24,16    | 24,74    | 24,67 | 25,08 | 24,01 | 24,47    | 24,39 |            |
| petek, 25. november 2011      | 21,71    | 24,84    | 23,29    | 24,78    | 24,78    | 24,79 | 25,06 | 23,03 | 24,12    | 23,57 |            |
| nedelja, 27. november 2011    | 24,25    | 25,61    | 25       | 25,55    | 24,66    | 24,11 | 24,55 | 23,38 | 23,53    | 22,83 |            |
| ponedeljek, 28. november 2011 | 24,38    | 25,04    | 25,03    | 25,15    | 24,54    | 23,7  | 24,34 | 22,95 | 24,02    | 22,9  |            |
| torek, 29. november 2011      | 25,1     | 25,17    | 25,35    | 25,38    | 23,92    | 23,98 | 24,25 | /     | 24,95    | 24,95 |            |
| sreda, 30. november 2011      | 25,4     | 25,73    | 25,38    | 26,8     | 24,14    | 22,7  | 24,54 | 23,65 | 23,47    | 23,35 | parjenje 2 |
| četrtek, 1. december 2011     | 26,35    | 26,64    | 26,97    | 26,89    | 24,55    | 23,41 | 24,36 | 24,24 | 23,41    | 23,61 |            |
| petek, 2. december 2011       | 27,29    | 26,64    | 28,43    | 27,46    | 24,6     | 22,4  | 24,34 | 23,89 | 23,36    | 23,71 |            |
| sobota, 3. december 2011      | 28,55    | 27,95    | 29,08    | 28,62    | 24,54    | 23,64 | 25    | 24,29 | 23,57    | 23,83 |            |
| nedelja, 4. december 2011     | 30,79    | 29,61    | 29,96    | 30,95    | 24,18    | 24    | 25,11 | 25,05 | 23,46    | 23,79 |            |
| ponedeljek, 5. december 2011  | 29,48    | 27,81    | 29,95    | 30,15    | 23,49    | 24,07 | 25,3  | 24,89 | 22,8     | 23,72 | depilacija |
| sreda, 7. december 2011       | 34,7     | 33,1     | 34,91    | 36,04    | 23,19    | 23,18 | 25,61 | 26,17 | 22,06    | 23,82 |            |
| četrtek, 8. december 2011     | 36,86    | 34,84    | 36,11    | 38,26    | 23,43    | 25,38 | 25,03 | 27,22 |          | 22,48 |            |
| petek, 9. december 2011       |          | 34,82    | 37,61    | 39,27    | 23,08    | 23,8  | 24,65 | 27,43 |          | 23,59 |            |
| sobota, 10. december 2011     |          | 36,93    | 40,84    | 43,07    | 24,21    | 25,24 | 25,88 | 30    |          | 23,89 |            |
| nedelja, 11. december 2011    |          | 24,8     | 41,5     | 29,38    |          |       |       | 31,63 |          |       |            |
| ponedeljek, 12. december 2011 |          | 25,44    | 27,13    | 26,19    |          |       |       | 28,85 |          |       | depilacija |
| torek, 13. december 2011      |          |          | 27,52    | 27,88    |          |       |       | 32,53 |          |       |            |
| sreda, 14. december 2011      |          |          | 28,29    | 28,08    |          |       |       | 35,95 |          |       |            |
| četrtek, 15. december 2011    |          |          | 30,34    |          |          |       |       | 34,6  |          |       |            |
| petek, 16. december 2011      |          |          | 30,21    |          |          |       |       | 35,84 |          |       |            |
| sobota, 17. december 2011     |          |          | 31,67    |          |          |       |       | 38,31 |          |       |            |
| nedelja, 18. december 2011    |          |          | 31,07    |          |          |       |       | 28,69 |          |       |            |
| ponedeljek, 19. december 2011 |          |          | 30,72    |          |          |       |       | 28,63 |          |       |            |
| torek, 20. december 2011      |          |          |          |          |          |       |       | 29,17 |          |       |            |
| sreda, 21. december 2011      |          |          |          |          |          |       |       | 30,03 |          |       |            |
| četrtek, 22. december 2011    |          |          |          |          |          |       |       | 30,43 |          |       |            |
| petek, 23. december 2011      |          |          |          |          |          |       |       | 30,84 |          |       |            |
| sobota, 24. december 2011     |          |          |          |          |          |       |       | 30,64 |          |       |            |
| nedelja, 25. december 2011    |          |          |          |          |          |       |       | 32,82 |          |       |            |
| ponedeljek, 26. december 2011 |          |          |          |          |          |       |       | 30,43 |          |       |            |
| Mladiči (živi/mrtvi)          | 0/11     | 7        | 9        | 13/1     | izložena |       |       | 8     | izložena |       |            |

## Priloga B: Telesne mase posameznih miši v poskusu 2

|                              |         |         |         |         |         |         |         |        |          |          |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|----------|----------|----------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 1. VRSTA - Skupina LK7       |         |         |         |         |         |         |         |        |          |          |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Kletka                       | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | 7       | 8      | 9        | 10       |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Skupina                      | K3/4    | K3/3    | K4/3    | K4/4    | K4/5    | K4/6    | K3/5    | K3/6   |          |          |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Ušesna št.                   | A3      | D3      | J11     | G1      | N34     | A44     | E11     | C30    | L10      | D40      |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Čep                          | 19.2.13 | 19.2.13 | 20.2.13 | 26.2.13 | 26.2.13 | 26.2.13 | 27.2.13 | 4.3.13 |          |          |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| torek, 5. februar 2013       | 20,9    | 19,7    | 19,7    | 19,2    | 19,6    | 19,8    | 21,3    | 21,1   | 18,7     | 19,5     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| četrtek, 7. februar 2013     | 21,0    | 19,6    | 19,8    | 16,0    | 19,3    | 19,6    | 21,1    | 22,7   | 18,6     | 19,8     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ponedeljek, 11. februar 2013 | 21,6    | 20,6    | 20,4    | 18,9    | 20,3    | 20,2    | 21,5    | 22,5   | 18,3     | 20,0     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| sreda, 13. februar 2013      | 21,6    | 20,8    | 19,9    | 19,9    | 20,0    | 21,6    | 20,3    | 23,2   | 18,7     | 21,0     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| petek, 15. februar 2013      | 21,5    | 20,6    | 19,7    | 19,9    | 19,3    | 21,5    | 19,9    | 22,9   | 18,3     | 20,5     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| sreda, 20. februar 2013      | 21,3    | 20,9    | 21,1    | 20,3    | 19,9    | 20,4    | 22,7    | 22,2   | 18,8     | 20,3     | Paritev I      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| petek, 22. februar 2013      | 21,8    | 19,5    | 21,2    | 19,0    | 19,6    | 20,3    | 21,0    | 22,0   | 17,3     | 19,8     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ponedeljek, 25. februar 2013 | 22,1    | 21,0    | 22,1    | 19,8    | 20,1    | 20,3    | 21,3    | 22,2   | 18,3     | 20,9     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| torek, 26. februar 2013      | 21,9    | 20,3    | 23,7    | 20,2    | 20,6    | 21,2    | 22,2    | 22,8   | 17,3     | 20,6     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| sreda, 27. februar 2013      | 22,4    | 20,9    | 24,1    | 20,8    | 20,1    | 21,1    | 21,8    | 22,1   | 17,0     | 21,7     | Paritev II     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| četrtek, 28. februar 2013    | 22,4    | 20,9    | 24,6    | 21,8    | 18,9    | 20,7    | 21,7    | 22,3   | 18,0     | 20,5     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| petek, 1. marec 2013         | 23,7    | 21,6    | 25,1    | 21,0    | 18,9    | 20,2    | 21,6    | 22,4   | 17,4     | 20,4     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| sobota, 2. marec 2013        | 24,8    | 22,8    | 26,5    | 20,9    | 20,5    | 21,3    | 22,6    | 22,6   | 16,9     | 20,8     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| nedelja, 3. marec 2013       | 26,3    | 26,1    | 29,8    | 24,0    | 20,7    | 20,3    | 23,8    | 23,3   | 19,3     | 21,8     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ponedeljek, 4. marec 2013    | 26,5    | 25,4    | 28,6    | 21,9    | 20,2    | 22,3    | 23,9    | 22,2   | 18,6     | 21,3     | Depilacija I   |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| torek, 5. marec 2013         | 27,5    | 25,7    | 31,2    | 23,6    | 21,7    | 22,0    | 24,6    | 22,8   | 20,3     | 20,4     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| sreda, 6. marec 2013         | 27,9    | 28,2    | 32,1    | 23,3    | 20,6    | 22,9    | 25,1    | 23,1   | 19,1     | 21,9     | Paritev III    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| četrtek, 7. marec 2013       | 29,7    | 30,3    | 33,6    | 25,0    | 22,2    | 23,2    | 25,4    | 22,0   | 18,3     | 22,0     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| petek, 8. marec 2013         | 32,0    | 31,2    | 35,5    | 26,2    | 24,0    | 25,0    | 25,8    | 21,8   | 17,5     | 21,4     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| sobota, 9. marec 2013        | 33,0    | 32,3    | 37,8    | 26,3    | 24,7    | 25,6    | 26,9    | 22,2   | 17,1     | 20,6     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| nedelja, 10. marec 2013      | 23,9    | 22,3    | 39,3    | 28,0    | 26,7    | 28,1    | 29,0    | 21,9   | 17,2     | 21,2     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ponedeljek, 11. marec 2013   | 23,5    | 20,5    | 24,7    | 28,4    | 26,4    | 27,3    | 29,5    | 22,1   | 16,8     | 20,6     | Depilacija II  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| torek, 12. marec 2013        | 24,3    | 23,0    | 27,2    | 29,5    | 26,4    | 28,6    | 30,6    | 22,4   | 17,1     | 21,0     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| sreda, 13. marec 2013        | 25,5    | 23,3    | 27,0    | 32,4    | 30,8    | 31,0    | 33,0    | 22,9   | 18,5     | 21,7     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| četrtek, 14. marec 2013      | x       | x       | 28,2    | 33,0    | 31,7    | 32,5    | 34,3    | 23,3   | 17,7     | 21,1     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| petek, 15. marec 2013        | x       | x       | 30,2    | 34,9    | 32,0    | 33,9    | 36,9    | 24,4   | 17,6     | 21,4     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| sobota, 16. marec 2013       | x       | x       | 30,0    | 37,0    | 33,2    | 35,4    | 37,3    | 25,3   | 18,2     | 21,1     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| nedelja, 17. marec 2013      | x       | x       | 31,2    | 25,8    | 23,8    | 24,7    | 41,0    | 28,1   | 17,6     | 22,4     |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ponedeljek, 18. marec 2013   | x       | x       | 29,4    | 26,3    | 23,3    | 24,8    | 26,3    | 28,2   | x        | x        | Depilacija III |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| torek, 19. marec 2013        | x       | x       | x       | 26,6    | 23,3    | 26,3    | 28,4    | 29,1   | x        | x        |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| sreda, 20. marec 2013        | x       | x       | x       | 28,5    | 23,4    | 26,7    | 29,1    | 31,3   | x        | x        |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| četrtek, 21. marec 2013      | x       | x       | x       | 28,8    | 25,3    | 27,1    | x       | 33,4   | x        | x        |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| petek, 22. marec 2013        | x       | x       | x       | 27,6    | 23,8    | 26,5    | x       | 35,9   | x        | x        |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| sobota, 23. marec 2013       | x       | x       | x       | 28,8    | 25,5    | 27,8    | x       | 37,0   | x        | x        |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| nedelja, 24. marec 2013      | x       | x       | x       | 29,5    | 25,5    | 30,0    | x       | 40,5   | x        | x        |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ponedeljek, 25. marec 2013   | x       | x       | x       | 29,0    | 26,3    | 28,6    | x       | 25,7   | x        | x        |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| torek, 26. marec 2013        | x       | x       | x       | x       | x       | x       | x       | 27,3   | x        | x        |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| sreda, 27. marec 2013        | x       | x       | x       | x       | x       | x       | x       | 28,9   | x        | x        |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Mladiči (živi/mrtvi)         | 6       | 8       | 11      | 8       | 6       | 8       | 9       | 10     | izločena | izločena |                |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Se nadaljuje...

## Nadaljevanje... Priloga B: Telesne mase posameznih miši v poskusu 2

|                              |         |         |         |         |         |         |         |         |         |          |               |  |  |
|------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------------|--|--|
| 2. VRSTA - Skupina LGG       |         |         |         |         |         |         |         |         |         |          |               |  |  |
| Kletka                       | 11      | 12      | 13      | 14      | 15      | 16      | 17      | 18      | 19      | 20       |               |  |  |
| Skupina                      | G3/4    | G3/3    | G4/5    | G4/4    | G3/5    | G3/6    | G4/6    | G3/7    | G4/7    |          |               |  |  |
| Ušesna št.                   | I10     | I30     | I13     | H4      | G31     | F41     | B13     | M14     | M1      | O14      |               |  |  |
| Čep                          | 19.2.13 | 19.2.13 | 20.2.13 | 20.2.13 | 27.2.13 | 26.2.13 | 27.2.13 | 27.2.13 | 27.2.13 |          |               |  |  |
| torek, 5. februar 2013       | 20,0    | 21,4    | 22,0    | 19,4    | 20,4    | 20,8    | 20,8    | 20,0    | 20,7    | 20,6     |               |  |  |
| četrtek, 7. februar 2013     | 20,0    | 21,3    | 22,9    | 19,6    | 21,5    | 19,3    | 21,3    | 20,1    | 20,4    | 20,6     |               |  |  |
| ponedeljek, 11. februar 2013 | 21,0    | 21,5    | 22,2    | 19,9    | 20,4    | 21,3    | 21,4    | 21,2    | 20,3    | 20,8     |               |  |  |
| sreda, 13. februar 2013      | 20,0    | 21,8    | 23,1    | 20,6    | 21,5    | 21,4    | 20,5    | 21,2    | 21,9    | 20,7     |               |  |  |
| petek, 15. februar 2013      | 20,6    | 19,2    | 22,6    | 20,4    | 21,5    | 21,4    | 21,0    | 21,5    | 20,8    | 21,0     |               |  |  |
| sreda, 20. februar 2013      | 21,0    | 21,8    | 22,9    | 20,8    | 22,4    | 21,7    | 21,3    | 21,4    | 18,8    | 21,0     | Paritev I     |  |  |
| petek, 22. februar 2013      | 20,9    | 21,2    | 22,1    | 21,4    | 20,8    | 20,6    | 19,8    | 21,1    | 20,7    | 21,5     |               |  |  |
| ponedeljek, 25. februar 2013 | 22,3    | 22,1    | 23,3    | 23,1    | 20,5    | 20,8    | 19,5    | 20,7    | 20,2    | 21,6     |               |  |  |
| torek, 26. februar 2013      | 22,5    | 23,5    | 23,8    | 24,2    | 21,7    | 20,8    | 21,2    | 21,1    | 21,4    | 22,0     |               |  |  |
| sreda, 27. februar 2013      | 22,6    | 23,1    | 25,0    | 24,5    | 22,2    | 20,3    | 20,2    | 21,1    | 20,8    | 22,3     | Paritev II    |  |  |
| četrtek, 28. februar 2013    | 22,0    | 25,2    | 24,5    | 25,8    | 22,6    | 21,4    | 21,0    | 21,3    | 21,3    | 22,2     |               |  |  |
| petek, 1. marec 2013         | 21,9    | 26,0    | 27,6    | 26,0    | 21,5    | 21,5    | 20,8    | 21,7    | 21,2    | 21,7     |               |  |  |
| sobota, 2. marec 2013        | 21,4    | 27,2    | 27,1    | 26,2    | 22,4    | 22,1    | 21,0    | 22,3    | 22,3    | 22,0     |               |  |  |
| nedelja, 3. marec 2013       | 26,8    | 31,0    | 31,7    | 30,3    | 22,8    | 23,6    | 20,6    | 23,9    | 23,7    | 22,3     | Depilacija I  |  |  |
| ponedeljek, 4. marec 2013    | 23,7    | 29,1    | 29,4    | 28,8    | 23,4    | 22,8    | 20,3    | 22,1    | 22,1    | 22,1     |               |  |  |
| torek, 5. marec 2013         | 23,0    | 30,0    | 30,0    | 30,2    | 25,2    | 23,7    | 20,9    | 23,3    | 23,0    | 22,7     |               |  |  |
| sreda, 6. marec 2013         | 24,9    | 32,7    | 32,3    | 32,2    | 24,2    | 23,9    | 21,0    | 23,7    | 23,2    | 22,8     | Paritev III   |  |  |
| četrtek, 7. marec 2013       | 25,6    | 34,5    | 34,6    | 33,9    | 24,2    | 25,0    | 21,3    | 24,5    | 24,7    | 21,3     |               |  |  |
| petek, 8. marec 2013         | 28,4    | 37,1    | 36,3    | 35,6    | 25,8    | 24,7    | 22,3    | 25,5    | 25,0    | 21,6     |               |  |  |
| sobota, 9. marec 2013        | 29,6    | 38,6    | 39,1    | 36,8    | 26,6    | 26,6    | 23,1    | 25,8    | 26,5    | 21,2     |               |  |  |
| nedelja, 10. marec 2013      | 22,1    | 25,3    | 41,4    | 39,8    | 29,0    | 29,0    | 25,0    | 27,2    | 27,7    | 21,3     |               |  |  |
| ponedeljek, 11. marec 2013   | 22,3    | 26,4    | 27,2    | 26,4    | 30,2    | 29,3    | 25,2    | 27,7    | 29,0    | 21,1     | Depilacija II |  |  |
| torek, 12. marec 2013        | 22,7    | 27,5    | 27,8    | 27,6    | 30,7    | 30,2    | 26,6    | 27,9    | 29,7    | 21,4     |               |  |  |
| sreda, 13. marec 2013        | 23,6    | 27,9    | 28,7    | 28,7    | 34,8    | 33,4    | 28,3    | 30,7    | 31,8    | 21       |               |  |  |
| četrtek, 14. marec 2013      | x       | x       | 30,6    | 29,4    | 35,4    | 34,7    | 31,3    | 31,2    | 33,5    | 21,4     |               |  |  |
| petek, 15. marec 2013        | x       | x       | 30,9    | 28,9    | 35,7    | 35,6    | 31,4    | 32,9    | 35,9    | 21,0     |               |  |  |
| sobota, 16. marec 2013       | x       | x       | 31,4    | 29,4    | 38,6    | 37,6    | 33,1    | 34,0    | 37,7    | 21,2     |               |  |  |
| nedelja, 17. marec 2013      | x       | x       | 34,1    | 30,9    | 26,7    | 24,7    | 34,0    | 24,5    | 40,0    | 21,5     |               |  |  |
| ponedeljek, 18. marec 2013   | x       | x       | 32,6    | 31,1    | 24,8    | 24,5    | 23,1    | 24,0    | 25,5    | x        |               |  |  |
| torek, 19. marec 2013        | x       | x       | x       | x       | 24,8    | 26,0    | 23,9    | 24,9    | 26,6    | x        |               |  |  |
| sreda, 20. marec 2013        | x       | x       | x       | x       | 24,9    | 27,4    | 24,4    | 25,1    | 27,5    | x        |               |  |  |
| četrtek, 21. marec 2013      | x       | x       | x       | x       | x       | x       | 24,5    | x       | 30,0    | x        |               |  |  |
| petek, 22. marec 2013        | x       | x       | x       | x       | x       | x       | 26,7    | x       | 29,8    | x        |               |  |  |
| sobota, 23. marec 2013       | x       | x       | x       | x       | x       | x       | 27,2    | x       | 31,0    | x        |               |  |  |
| nedelja, 24. marec 2013      | x       | x       | x       | x       | x       | x       | 26,8    | x       | 31,8    | x        |               |  |  |
| ponedeljek, 25. marec 2013   | x       | x       | x       | x       | x       | x       | 27,0    | x       | 30,4    | x        |               |  |  |
| torek, 26. marec 2013        | x       | x       | x       | x       | x       | x       | x       | x       | x       | x        |               |  |  |
| sreda, 27. marec 2013        | x       | x       | x       | x       | x       | x       | x       | x       | x       | x        |               |  |  |
| Mladiči (živi/mrtvi)         | 4       | 8/2     | 7       | 8/1     | 7/1     | 6/2     | 6/2     | 7       | 9       | izločena |               |  |  |

Se nadaljuje...

## Nadaljevanje... Priloga B: Telesne mase posameznih miši v poskusu 2

|                              |         |          |         |         |         |          |         |        |          |          |               |  |  |
|------------------------------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|---------|--------|----------|----------|---------------|--|--|
| 3. VRSTA - Skupina mleko     |         |          |         |         |         |          |         |        |          |          |               |  |  |
| Kletka                       | 21      | 22       | 23      | 24      | 25      | 26       | 27      | 28     | 29       | 30       |               |  |  |
| Skupina                      | N3/2    |          | N3/3    | N3/4    | N4/3    |          | N4/4    | N3/5   |          |          |               |  |  |
| Ušesna št.                   | C40     | N10      | O30     | H41     | K44     | E4       | F1      | I31    | B33      | K40      |               |  |  |
| Čep                          | 19.2.13 | 19.2.13  | 27.2.13 | 26.2.13 | 27.2.13 | 27.2.13  | 27.2.13 | 6.3.13 |          |          |               |  |  |
| torek, 5. februar 2013       | 20,0    | 19,1     | 20,7    | 19,8    | 19,7    | 21,0     | 20,2    | 21,1   | 20,2     | 18,6     |               |  |  |
| četrtek, 7. februar 2013     | 20,6    | 19,5     | 20,8    | 20,3    | 19,3    | 21,5     | 20,7    | 21,2   | 20,6     | 18,3     |               |  |  |
| ponedeljek, 11. februar 2013 | 20,6    | 19,8     | 20,6    | 20,5    | 18,8    | 21,8     | 21,5    | 21,2   | 21,0     | 19,2     |               |  |  |
| sreda, 13. februar 2013      | 20,4    | 19,8     | 21,0    | 21,3    | 19,8    | 21,2     | 21,1    | 21,4   | 21,1     | 18,8     |               |  |  |
| petek, 15. februar 2013      | 20,3    | 20,0     | 21,2    | 20,6    | 20,0    | 21,3     | 20,5    | 21,2   | 21,2     | 21,2     |               |  |  |
| sreda, 20. februar 2013      | 20,6    | 19,8     |         | 20,5    | 20,2    | 21,3     | 19,9    | 21,7   | 20,7     | 19,5     | Paritev I     |  |  |
| petek, 22. februar 2013      | 20,7    | 20,0     | 21,1    | 20,6    | 18,0    | 20,0     | 19,6    | 21,0   | 19,7     | 18,7     |               |  |  |
| ponedeljek, 25. februar 2013 | 20,4    | 20,3     | 21,3    | 19,9    | 18,8    | 19,4     | 18,9    | 20,4   | 19,5     | 18,5     |               |  |  |
| torek, 26. februar 2013      | 21,6    | 21,8     | 22,1    | 20,4    | 19,1    | 20,4     | 20,0    | 20,0   | 18,8     | 19,0     |               |  |  |
| sreda, 27. februar 2013      | 21,2    | 21,0     | 21,8    | 20,2    | 19,1    | 21,0     | 20,6    | 19,5   | 20,6     | 19,2     | Paritev II    |  |  |
| četrtek, 28. februar 2013    | 22,7    | 22,1     | 22,5    | 20,7    | 18,7    | 20,5     | 20,5    | 20,0   | 20,3     | 18,9     |               |  |  |
| petek, 1. marec 2013         | 22,3    | 21,4     | 23,0    | 20,3    | 18,9    | 20,1     | 20,3    | 20,0   | 20,7     | 19,0     |               |  |  |
| sobota, 2. marec 2013        | 24,0    | 21,7     | 23,1    | 21,3    | 18,0    | 19,3     | 21,2    | 22,3   | 21,4     | 19,1     |               |  |  |
| nedelja, 3. marec 2013       | 25,5    | 24,4     | 24,8    | 22,7    | 18,0    | 20,0     | 23,2    | 23,4   | 20,8     | 19,6     |               |  |  |
| ponedeljek, 4. marec 2013    | 26,0    | 23,0     | 24,0    | 23,0    | 18,9    | 19,6     | 21,4    | 22,4   | 21,2     | 18,8     | Depilacija I  |  |  |
| torek, 5. marec 2013         | 25,7    | 22,7     | 25,8    | 23,1    | 18,0    | 19,7     | 23,2    | 22,0   | 21,6     | 20,3     |               |  |  |
| sreda, 6. marec 2013         | 28,5    | 23,5     | 25,2    | 22,7    | 18,7    | 19,5     | 23,3    | 22,0   | 21,9     | 19,2     | Paritev III   |  |  |
| četrtek, 7. marec 2013       | 28,6    | 24,6     | 25,2    | 23,6    | 19,0    | 20,3     | 24,0    | 21,2   | 20,4     | 18,9     |               |  |  |
| petek, 8. marec 2013         | 30,5    | 25,6     | 26,5    | 25,3    | 19,7    | 20,2     | 25,2    | 20,7   | 19,2     | 18,9     |               |  |  |
| sobota, 9. marec 2013        | 31,8    | 25,4     | 27,2    | 25,9    | 20,9    | 18,5     | 25,3    | 20,4   | 19,8     | 18,4     |               |  |  |
| nedelja, 10. marec 2013      | 22,9    | 26,3     | 29,0    | 27,6    | 21,1    | 20,6     | 27,4    | 20,3   | 19,3     | 18,0     |               |  |  |
| ponedeljek, 11. marec 2013   | 23,7    | 21,4     | 28,9    | 29,3    | 21,0    | 20,4     | 27,5    | 19,8   | 18,9     | 17,7     | Depilacija II |  |  |
| torek, 12. marec 2013        | 24,1    | 21,3     | 31,0    | 30,0    | 22,5    | 21,0     | 28,2    | 20,8   | 19,1     | 18,3     |               |  |  |
| sreda, 13. marec 2013        | 26,0    | x        | 33,3    | 32,5    | 25,2    | 20,8     | 31,0    | 21,5   | 18,9     | 18,4     |               |  |  |
| četrtek, 14. marec 2013      | x       | x        | 39,5    | 34,8    | 25,3    | 20,7     | 32,5    | 22,2   | 19,1     | 17,8     |               |  |  |
| petek, 15. marec 2013        | x       | x        | 35,4    | 35,8    | 24,9    | 20,3     | 32,2    | 22,2   | 19,9     | 18,0     |               |  |  |
| sobota, 16. marec 2013       | x       | x        | 37,1    | 37,3    | 27,2    | 21,0     | 33,9    | 23,5   | 18,8     | 18,1     |               |  |  |
| nedelja, 17. marec 2013      | x       | x        | 24,6    | 24,6    | 30,7    | 21,3     | 37,0    | 27,0   | 19,0     | 17,3     |               |  |  |
| ponedeljek, 18. marec 2013   | x       | x        | 23,4    | 24,9    | 20,6    | x        | 25,2    | 26,8   | x        | x        |               |  |  |
| torek, 19. marec 2013        | x       | x        | 25,4    | 26,3    | 20,9    | x        | 26,5    | 26,3   | x        | x        |               |  |  |
| sreda, 20. marec 2013        | x       | x        | 25,6    | 27,0    | 20,6    | x        | 27,9    | 28,4   | x        | x        |               |  |  |
| četrtek, 21. marec 2013      | x       | x        | x       | x       | 22,2    | x        | 28,5    | 29,5   | x        | x        |               |  |  |
| petek, 22. marec 2013        | x       | x        | x       | x       | 23,4    | x        | 28,9    | 30,5   | x        | x        |               |  |  |
| sobota, 23. marec 2013       | x       | x        | x       | x       | 23,8    | x        | 31,4    | 31,8   | x        | x        |               |  |  |
| nedelja, 24. marec 2013      | x       | x        | x       | x       | 23,8    | x        | 31,2    | 34,0   | x        | x        |               |  |  |
| ponedeljek, 25. marec 2013   | x       | x        | x       | x       | 25,0    | x        | 30,6    | 23,5   | x        | x        |               |  |  |
| torek, 26. marec 2013        | x       | x        | x       | x       | x       | x        | x       | 23,7   | x        | x        |               |  |  |
| sreda, 27. marec 2013        | x       | x        | x       | x       | x       | x        | x       | 25,0   | x        | x        |               |  |  |
| Mladiči (živi/mrtvi)         | 7       | izločena | 4/4     | 8       | 6/2     | izločena | 7       | 7      | izločena | izločena |               |  |  |