

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

Tea Kavčić

**Fekalni inokulum kao zamjena buražnom soku za *in vitro*
određivanje probavljivosti srne obične (*Capreolus
capreolus*)**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na pokušalištu "Ban Josip Jelačić", državnom otvorenom lovištu III/29 „Prolom“, Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju i laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Kristine Kljak i izv. prof. dr. sc. Nikice Šprema i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020/2021.

Sadržaj

1. UVOD	1
3. MATERIJALI I METODE RADA	6
3.1. Uzorkovanje biljaka	6
3.2. Uzorkovanje buražnog soka i fecesa srna	6
3.3. Određivanje <i>in vitro</i> probavljivosti suhe tvari i NDV	7
3.4. Kemijske analize	10
3.4.1. Određivanje sadržaja suhe tvari	10
3.4.2. Određivanje sadržaja neutralnih detergent vlakana	10
3.5. Statistička obrada podataka	11
4. REZULTATI	12
4.1. Sadržaj NDV u uzorcima sakupljenih biljaka	12
4.2. <i>In vitro</i> buražna probavljivost suhe tvari korištenjem dvaju različitih inokuluma	13
4.3. <i>In vitro</i> buražna probavljivost neutralnih detergent vlakana korištenjem dvaju različitih inokuluma	13
5. RASPRAVA	16
6. ZAKLJUČAK	21
7. ZAHVALE	22
8. Popis literature	23

1. UVOD

Srna obična (*Capreolus capreolus*) je uz divlju svinju najrasprostranjenija krupna divljač u Hrvatskoj. Pripada redu parnoprstaša (*Artiodactyla*), preživača (*Ruminantia*), nadporodicu pravih preživača i porodicu jelena (*Cervidae*) (Janicki i sur., 2008). Osim u Hrvatskoj, rasprostranjena je u svim staništima Europe, uključujući listopadne, crnogorične i mediteranske šume, grmovita područja i močvare (Lechner-Doll i sur., 2001). Iako je glavni način uzimanje hrane brštenje, a zatim pasenje, srne se svrstavaju kao selektori koncentratnih krmiva (Barančeková i sur. 2010) dok noviji radovi navode da su selektori ili brstaši jer konzumiraju i iskorištavaju sirova vlakna poput životinja koje pasu ili su intermedijarnog tipa hranidbe (König i sur., 2020). Srne su preživači prilagođeni razgradnji biljne hrane bogate vlaknima, a karakterizira ih prisutnost mikroorganizama u buragu koji svojim enzimima razgrađuju β -1,4 glikozidne veze koje enzimi životinje ne mogu razgraditi. U dostupnoj literaturi je malo radova koji se bave određivanjem hranidbene vrijednosti biljaka kojima se srne hrane, a u Hrvatskoj podataka o tome nema. Osim kemijskog sastava koji predstavlja potencijal da zadovolji hranidbene potrebe životinje, važan podatak prilikom procjene hranidbene vrijednosti nekog krmiva ili gotovog obroka je probavljivost. Podatak o probavljivosti hranjivih tvari upućuje na sadržaj hranjive tvari koja će životinji biti na raspolaganju za apsorpciju u odnosu na njen sadržaj u krmivu ili gotovom obroku. Poznavanje probavljivosti važno je sa strane poznavanja hranidbenih potreba srna, posebice u uzgoju u zatočeništvu, te zbog poznavanja hranidbene vrijednosti konzumirane hrane za shvaćanje njihovog ponašanja i performansi (Feng i sur., 2018), ali i samog razumijevanja utjecaja srne na ekosustav.

Probavni trakt srna je dinamičan sustav koji se mijenja tijekom godine kako se mijenja i hranidba kao posljedica sezonskih promjena u dostupnosti hrane (Palo i sur., 2012). Dostupne vrste biljaka variraju sezonski i geografski, a tako se može mijenjati i njihov kemijski sastav i probavljivost. Tijekom zimskog perioda je srnama dostupan mali broj biljnih vrsta, a uobičajeno je njihova probavljivost niža zbog smanjene raznolikosti i hranidbene vrijednosti kao posljedice odmaka vegetacijske sezone te pada hranjivosti i probavljivosti s padom udjela proteina, a rastom udjela vlakana (s 26–30% pa i do 38% u određenim mjesecima; Dahl i sur., 2020), a posebice rastom udjela lignina (Grbeša, 2017). Droždž (1979) navodi da je pad probavljivosti suhe tvari (ST) biljaka kojima se hrane srne na području južne Poljske, od proljeća do zime, od 73,5 do 40%.

Kod preživača, najvažniji dio probave hrane se odvija u buragu. Burag sadrži brojnu mikrobnu populaciju koja fermentira hranu, a kao rezultat opskrbljuje domaćina energijom i lako iskoristivim oblicima ugljika te mikrobnim proteinima (Theodoru i France, 2005). Vrsta hrane kontrolira mikrobnu populaciju predželudaca (Choudhury i Prasanta, 2015). U buragu srna odvijaju se anaerobni uvjeti, a čija se temperatura 38-42 °C održava konstantnom. Održavanje pH 6-7 omogućuje stalna proizvodnja sline bogata bikarbonatnim i fosfatnim solima. Od svih prisutnih mikroba u buragu, najveći udio čine bakterije, zatim protozoe (40%) pa gljivice (8%) (Choudhury i Prasanta, 2015). Većina mikroorganizama su obligatorni, a manji dio predstavljaju fakultativni anaerobi. Celolitičke bakterije buraga važne su za probavu vlakana, a neke od najrasprostranjenijih su: *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* i *Eubacterium cellulosolvens* za razgradnju celuloze, zatim *Butyrivibrio fibrisolvens* i *Bacteroides rumenicola* za razgradnju hemiceluloze te *B. fibrisolvens* i *Lachnospira multiparus* za razgradnju pektina. Mikroorganizmi buraga predstavljaju mikrobnii protein koji može zadovoljiti 40 do 80% dnevnih potreba preživača za aminokiselinama što predstavlja prednost kada se životinje hrane krmivima niskog sadržaja proteina (Sniffen i Robinson, 1987). Hlapljive masne kiseline (octena, propionska i maslačna) krajnji su produkt mikrobne fermentacije i predstavljaju glavni izvor energije za domaćina (Dijkstra i sur., 2005).

Zbog važnosti poznavanja probavljivosti, razvijen je cijeli niz metoda koje se mogu svrstati u *in vivo*, *in situ* i *in vitro* metode, a izbor metode ovisi o vrsti životinje i djelu probavnog trakta u kojem se želi odrediti probavljivost. S obzirom na važnost probave u buragu, cijeli niz metoda određivanja probavljivosti je usmjeren na buražnu probavljivost, pri čemu *in vivo* i *in situ* metode zahtijevaju ugradnju buražne kanule fistuliranjem životinje. Fistulacija je invazivan postupak koji je u mnogim zemljama zabranjen zbog etičkih razloga koji se odnose na dobrobit životinja. Zahtjeva kirurški zahvat, a sa sobom nosi rizik od infekcija i visoke troškove održavanja životinja (Posada i sur., 2012). Međutim, i za provedbu *in vitro* metode je potreban buražni sok jer na tržištu ne postoji adekvatna komercijalna zamjena zbog kompleksnosti buražnog soka. Zbog toga se buražni sok uzima iz buraga kanuliranih ili žrtvovanih životinja ili sondama za uzimanje buražnog soka kroz usta što se primjenjuje kod velikih životinja. Fistuliranje je izvedivo na životinjama koje su u kontroliranim uvjetima pa životinje na slobodi moraju biti žrtvovane kako bi se mogao uzeti buražni sadržaj. Zbog navedenih razloga potrebno je pronaći alternativan inokulum koji može zamijeniti buražni sok, a zbog sličnog sastava mikroorganizama kao u buragu, feces predstavlja potencijalnu alternativu.

Feces se pokazao kao odgovarajuća zamjena za buražni sok kod goveda u radu Chiaravalli i sur. (2019). Autori navode da feces može biti alternativnu zamjena u određivanju probavljivosti vlakana, točnije neutralnih detergent vlakana (NDV), ali tek kada inkubacija traje dulje (240 ili 360 h) ili koristeći fibrolitičke enzime tijekom kraće inkubacije budući da je aktivnost mikroorganizama u fecesu slabija nego u buražnom soku. Hughes i sur. (2012), u istraživanju probavljivosti tropskih krmiva u goveda, dokazuju feces kao zamjenu buražnom soku, koristeći Tilley i Terry *in vitro* metodu određivanja. Isto navode i Utomo i sur. (2011) za stoku, no dobili su niži rezultat ($P < 0,005$) probavljivosti organske tvari koristeći feces kao inokulum. Za razlog tome navode, kao i Chiaravalli i sur. (2019), nižu aktivnost mikroba u fecesu. U dostupnoj literaturi nije pronađen niti jedan rad usporedbe i mogućnosti korištenja fecesa kao zamjene za buražni sok u *in vitro* metodama određivanja probavljivosti u srna.

Jedna od *in vitro* metoda određivanja probavljivosti kod preživača je korištenjem Daisy^{II} inkubatora (ANKOM Technology, Fairport, NY). Metoda se zasniva na inkubaciji prethodno prosušenih uzoraka i smjese buražnog soka i pufera pri 39 °C u određenom vremenu. Pri tome se uzorci važu u poliesterske vrećice koje se zavarane inkubiraju u staklenim posudama sa smjesom buražnog soka i pufera (ANKOM Technology, 2017) u atmosferi ugljikovog dioksida. Uspoređujući određivanje probavljivosti *in vitro* metodom s Daisy^{II} inkubatorom i *in situ* kod krava, Tagliapietra i sur. (2012) navode da su rezultati probavljivosti proporcionalni i da *in vitro* može biti adekvatna zamjena *in situ* metodi. Trujillo i sur. (2010) dobivaju nešto niže vrijednosti probavljivosti ST i NDV-a u usporedbi s *in situ* metodom kod mliječnih krava, a čije su razlike najuočljivije u ranim fazama inkubacije. Međutim, pronalaze potencijal korištenja Daisy^{II} inkubatora, osobito uzimajući u obzir prednosti brze i jednostavne metode.

Od kemijskog sastava hrane, uobičajeno se kod preživača prati probavljivost suhe ili organske tvari, proteina, škroba i vlakana. Suha tvar (ST) je udio biljne mase koji ne sadrži vodu. Kako suha tvar sadrži minerale koji nemaju energetske vrijednosti, oduzimanjem sadržaja sirovog pepela od sadržaja ST dobije se organska tvar (OT) čije sve sastavnice sadrže energetske vrijednosti pa predstavlja vjerodostojniji prikaz energetske vrijednosti hrane (Vranić, 2021). Vlakna su ugljikohidrati stanične stijenke tj. strukturni ugljikohidrati te predstavljaju fermentirajuće ugljikohidrate za mikroorganizme buraga, a dijele se na topive (pektini, galaktani, β -glukani, arabinoksilani, α -galoktozidaze) i netopive (celuloza, hemiceluloza, lignin) (Grbeša, 2004). Metoda detergent vlakana najbolje odvaja strukturne od nestrukturnih ugljikohidrata u biljkama, a provodi se iskuhavanjem u otopinama različitog detergenta pri čemu se dijele na neutralna detergent vlakna (NDV) koja obuhvaćaju celulozu, hemicelulozu i

lignin, kisela detergent vlakna (KDL) koja obuhvaćaju celulozu i lignin, i kiseli detergent lignin (KDL). Vlakna krme, prvenstveno NDV, utječu na konzumaciju ST po volji (Van Soest i sur. 1991), na volumen hrane i vrijeme preživljanja (Fahey i Merchen 1987., prema Vranić i sur. 2004). Chamberlain i Wilkinson (1996; prema Vranić i sur., 2010) navode da s porastom udjela NDV-a opada konzumacija hrane.

2. HIPOTEZA, OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Temeljem dosadašnjih istraživanja, hipoteza ovog istraživanja je da fekalni inokulum može biti zamjena buražnom soku tijekom *in vitro* određivanja buražne probavljivosti suhe tvari (ST) i neutralnih detergent vlakana (NDV) biljaka sakupljenih tijekom zimskog razdoblja u srna.

Na temelju postavljene hipoteze, opći cilj rada je usporediti buražnu probavljivost ST i NDV biljaka sakupljenih tijekom zimskog razdoblja provedenu s buražnim i fekalnim inokulom srna.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- odrediti sadržaj suhe tvari i neutralnih detergent vlakana biljaka sakupljenih u zimskom razdoblju 2020./2021. godine,
- odrediti probavljivost ST i NDV sakupljenih biljaka *in vitro* metodom koristeći buražni i fekalni inokulum srna u Daisy^{II} inkubatoru,
- usporediti probavljivost ST i NDV određenu korištenjem dvaju različitih inokuluma.

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Uzorkovanje biljaka

Tijekom zimskog perioda 2020./2021. godine, točnije 17. prosinca 2020. te 16. veljače i 9. ožujka 2021. godine sakupljeno je ukupno 27 uzoraka biljaka dostupnih srnama na različitim lokacijama na području pokušališta "Ban Josip Jelačić" Zavoda za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u Buzeti. Državno otvoreno lovište broj: III/29 – „PROLOM“ je brdskog tipa, a proteže se u smjeru sjever – jug, između 45° 08' i 45° 17' sjeverne geografske širine i 16° 01' i 16° 09' istočne geografske dužine od Greenwich-a. Lovište obuhvaća krajnje zapadne obronke i dijelove masiva Zrinske gore. Ukupna površina lovišta opisanog granicom iznosi 7,709 ha. Lovište je smješteno južno od grada Gline, na južnom području Sisačko-moslavačke županije. Jugozapadne granice lovišta nalaze se u neposrednoj blizini državne granice Republike Hrvatske s Republikom Bosnom i Hercegovinom (Prđun i Šprem, 2016).

Vrste kojima se srne hrane sakupljene su na temelju poznavanja hranidbenih navika srna od strane stručnih djelatnika pokušališta, a uzorkovane su na nekoliko različitih lokacija lovišta gdje su srne uočene tijekom zimskog razdoblja. Sakupljene vrste su seoska kupina (*Rubus ulmifolius* Schott), oštrodlaka kupina (*Rubus hirtus* Waldst.et Kit.), pustenasta kupina (*Rubus canescens* DC.), dobričica (*Glechoma hederacea* L.), bršljan (*Hedera helix* L.), šumska šašuljica (*Calamagrostis arundinacea* (L.) Roth), rosopas (*Chelidonium majus* L.) te antropogenizirane kontinentalne livade – mješavina vrsta iz porodice *Poaceae*. Nakon sakupljanja, uzorci biljaka su dostavljeni u laboratorij Zavoda za hranidbu životinja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prosušeni sušenjem na 40 °C 24 sata i samljeveni na mlinu Cyclotec (Tecator, Švedska) sa sitom promjera 1 mm.

3.2. Uzorkovanje buražnog soka i fecesa srna

Odstrijel srna proveden je skladu sa zakonima Republike Hrvatske (NN 70/10; 99/18; 32/19; 37/19; 37/19; 32/20) kao i svi postupci tijekom rukovanja životinjama i uzorkovanja pri čemu su bili u skladu s etičkim načelima o dobrobiti životinja (NN 102/2017). Bioetičko povjerenstvo za dobrobit životinja Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu dalo je pozitivno mišljenje o provođenju istraživanja (KLASA 114-04/21-03/03, URBROJ 251-71-29-02/19-21-1).

Dva odstrjela su provedena 17. prosinca 2020., kada su odstrijeljene tri srne, te 29. siječnja 2021., kada su odstrijeljene četiri srne. Svakoj je životinji *post mortem* odvojen probavni trakt nakon čega je odvojen burag od kapure i knjižavca. Buražni sadržaj je izdvojen iz buraga i procijeđen kroz četiri sloja gaze u posudu ispunjenu s ugljikovim dioksidom. Posude s buražnim sokom su zamrznute na -20 °C do provođenja analize.

Uzorci fecesa sakupljeni su paralelno s buražnim sokom, direktno iz crijeva probavnog sustava srna. Spremljeni su u plastične vrećice i zamrznuti na -20 °C do provođenja analize.

3.3. Određivanje *in vitro* probavljivosti suhe tvari i NDV

Određivanje *in vitro* buražne probavljivosti provedeno je u Daisy^{II} inkubatoru sa četiri staklene posude prema uputama proizvođača (ANKOM Technology, 2017; slika 1).



Slika 1. Daisy^{II} inkubator (vlastiti izvor)

Uzorci su izvagani u F57 vrećice za određivanje probavljivosti (Ankom, SAD), prethodno obezmašćenim kratkotrajnim namakanjem u acetonu i prosušeni na 103 °C kroz 1 sat. Svaki uzorak je izvagan u četiri repeticije – četiri vrećice (jedna vrećica po staklenoj posudi inkubatora), a u svaku vrećicu je izvagano 0,5 g uzorka. U svaku staklenu posudu dodane su po dvije prazne F57 vrećice kao slijepa proba.

Buražni sok priređen je miješanjem buražnog soka sedam odstrijeljenih srna, a fekalni sadržaj miješanjem njihovog fecesa. Buražni inokulum pripremljen je razrjeđenjem 400 mL buražnog soka s 1600 mL pufera po staklenoj posudi (ANKOM Technology, 2017). Zamrznuti buražni sok odmrznut je i temperiran kroz pet sati na dan provođenja analize, a cijeli postupak je proveden pod strujom ugljikovog dioksida (slika 2).



Slika 2. Postupak pripreme buražnog inokuluma (vlastiti izvor)

Za jednu staklenu posudu, fekalni inokulum pripremljen je homogeniziranjem 40 g fecesa s 100 mL vode u blenderu (Guzmán i Sager, 2016), a smjesa je pomiješana s 1600 mL pufera u staklenoj posudi, također pod strujom ugljikovog dioksida (slika 3).

Pufer je pripremljen miješanjem dvaju otopina: otopine A (10 g kalijevog hidrogen fosfata, 0,5 g magnezijevog sulfata heptahidrata, 0,5 g natrijevog klorida, 0,1 g kalcijevog klorida dihidrata, i 0,5 g uree u 1 L destilirane vode) i otopine B (15 g natrijevog karbonata i 1 g natrijevog sulfida nanohidrata u 1 L destilirane vode) u omjeru 5:1.



Slika 3. Postupak pripreme fekalnog inokuluma (vlastiti izvor)

Nakon ubacivanja vrećica s uzorcima u staklene posude s inokulom, posude su ispunjene ugljikovim dioksidom kako bi se osigurali anaerobni uvjeti tijekom inkubacije. Inkubacijske posude inkubirane su u Daisy^{II} inkubatoru pri 39 °C tijekom 48 sati, a nakon završetka inkubiranja vrećice s uzorcima su isprane u hladnoj običnoj i destiliranoj vodi kako bi se zaustavila aktivnost mikroorganizama i uklonio sav buražni i fekalni sadržaj. Isprane vrećice su osušene kroz 48 sati na 60 °C nakon čega su izvagane, a taj je podatak korišten za izračun *in vitro* buražne probavljivosti suhe tvari (IVDMD, engl. *In vitro* Dry Matter Digestibility) prema formuli (ANKOM Technology, 2017):

$$IVDMD (\%) = \left[1 - \frac{m_3 - (m_1 \times C)}{m_{ST}} \right] \times 100$$

pri čemu su m_1 – masa odmašćene i prosušene F57 vrećice (g), m_{ST} – masa ST uzorka izvaganog za analizu, izračunata na temelju sadržaja ST uzorka (g) i m_3 – masa neprobavljenog ostatka zajedno s masom vrećice (g). Faktor korekcije za masu zadržanu na vrećici, C , izračunata je prema formuli:

$$C = \frac{m_3 \text{ slijepa proba}}{m_1 \text{ slijepa proba}}$$

pri čemu su m_1 slijepa proba – masa prazne vrećice slijepe probe prije inkubacije (g) i m_3 slijepa proba – masa prazne vrećice slijepe probe nakon inkubacije (g).

Nakon vaganja vrećice su korištene za određivanje sadržaja NDV u neprobavljenom ostatku prema postupku opisanom u 3.4.2. Na temelju sadržaja NDV u uzorku i neprobavljenom ostatku uzorka nakon provođenja *in vitro* analize probavljivosti, *in vitro* buražna probavljivost NDV (IVNDFD, engl. *In vitro* Neutral Detergent Fiber Digestibility) je izračunata prema formuli:

$$IVNDFD (\%) = \left(1 - \frac{m_{neprobavljeni\ NDV}}{m_{NDV\ u\ uzorku}} \right) \times 100$$

Pri čemu su $m_{neprobavljeni\ NDV}$ – masa NDV u neprobavljenom ostatku nakon postupka inkubacije (g) i $m_{NDV\ u\ uzorku}$ – masa NDV u uzorku izvaganom za analizu (g). Masa NDV u uzorku analizu izračunata je na temelju mase uzorka i sadržaja NDV u uzorku, dok je masa NDV u neprobavljenom ostatku izračunata nakon postupka određivanja sadržaja NDV.

3.4. Kemijske analize

3.4.1. Određivanje sadržaja suhe tvari

U samljevenim uzorcima neposredno prije početka kemijskih analiza određen je sadržaj ST sušenjem u sušioniku UFE 400 (Memmert, Njemačka) četiri sata na 105 °C u skladu s normom HRN ISO 6496:2001 (DZNM, 2001). Na temelju razlike masa uzorka prije i poslije sušenja vaganjem na analitičkoj vazi izračunat je sadržaj ST u uzorku.

3.4.2. Određivanje sadržaja neutralnih detergent vlakana

Sadržaj NDV u uzorcima određen je u skladu s normom HRN ISO 16472:2008 (DZNM, 2008) korištenjem Fibertec™ sustava – aparature za iskuhavanje i hladnu ekstrakciju – Fibertec system 2021 Fiber cap (Foss Tecator, Švedska). U proceduri nije korišten postupak s amilazom zbog niskog udjela škroba u uzorcima sakupljenih biljaka. Uzorak (oko 0,4 g) izvagan je u Fiber cap kapsulu dok su vrećice nakon probavljivosti direktno korištene u analizi. Kapsule ili vrećice su kuhane pri vrenju jedan sat u otopini neutralnog detergenta i 10,5 g bezvodnog natrijevog

sulfita. Otopina neutralnog detergenta pripremljena je otapanjem 18,61 g KOMPLEKSON-a III (etilen-diamin-tetraoctena natrijeva sol), 6,81 g natrijeva tetraborata dekahidrata, 30,0 g natrijeva dodecil sulfata (SDS), 10 mL trietilenglikola i 4,56 g bezvodnog natrijeva hidrogen fosfata u 1 l destilirane vode. Kapsula i vrećice su zatim isprane s vrućom destiliranom vodom, dok je kapsula i odmašćena u acetonu. Isprane kapsule i vrećice prosušene su preko noći na 103 °C sušioniku UFE 400. Izvagane kapsule i vrećice su zatim spaljene u mikrovalnoj peći (Pyro 260, Milestone, Italija) na 600 °C. Na temelju masa uzoraka u kapsuli prije i nakon kuhanja u neutralnom detergentu, te masa ostatka pepela i konstanti specifičnih za kapsule u kojima se nalazio uzorak izračunat je sadržaj NDV u uzorcima biljaka. Sadržaj NDV u uzorcima prikazan je pri ST. Na temelju masa vrećica s neprobavljenim ostatkom prije i nakon kuhanja u neutralnom detergentu, te njihovih masa ostatka pepela i masa ostatka pepela vrećica slijepe probe izračunata je masa neprobavljenog NDV.

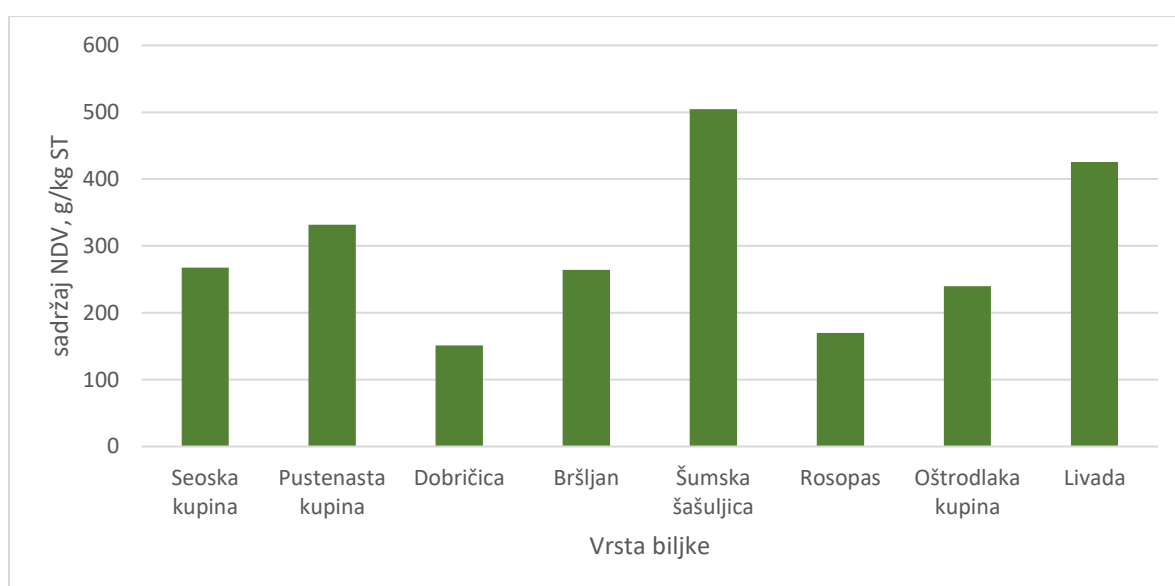
3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena statističkim paketom SAS 9.4 (Statistical Analysis System, 2015). Razlika između sakupljenih biljaka u sadržaju NDV ispitana je primjenom PROC MIXED procedure pri čemu su fiksni utjecaji bili vrsta biljke i datum uzorkovanja te njihova interakcija. Razlika između inokuluma je također ispitana PROC MIXED procedurom, za sve uzorke zajedno te zatim odvojeno za pojedine vrste biljaka. Korelacije između određenih svojstava sakupljenih biljaka ispitane su PROC CORR procedurom. Statistička signifikantnost bila je postignuta ako je $P \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Sadržaj NDV u uzorcima sakupljenih biljaka

Sakupljene vrste biljaka su se razlikovale u sadržaju NDV ($P < 0,01$), a datum uzorkovanja nije utjecao na njegov sadržaj zbog čega je u grafikonu 1 prikazan prosječan sadržaj svih uzorkovanja. Od sakupljenih biljaka, dobričica je imala najmanji sadržaj (151 g/kg ST) dok je šumska šašuljica imala najviši sadržaj (505 g/kg ST).



Grafikon 1. Sadržaj NDV u uzorcima sakupljenih biljaka

4.2. *In vitro* buražna probavljivost suhe tvari korištenjem dvaju različitih inokuluma

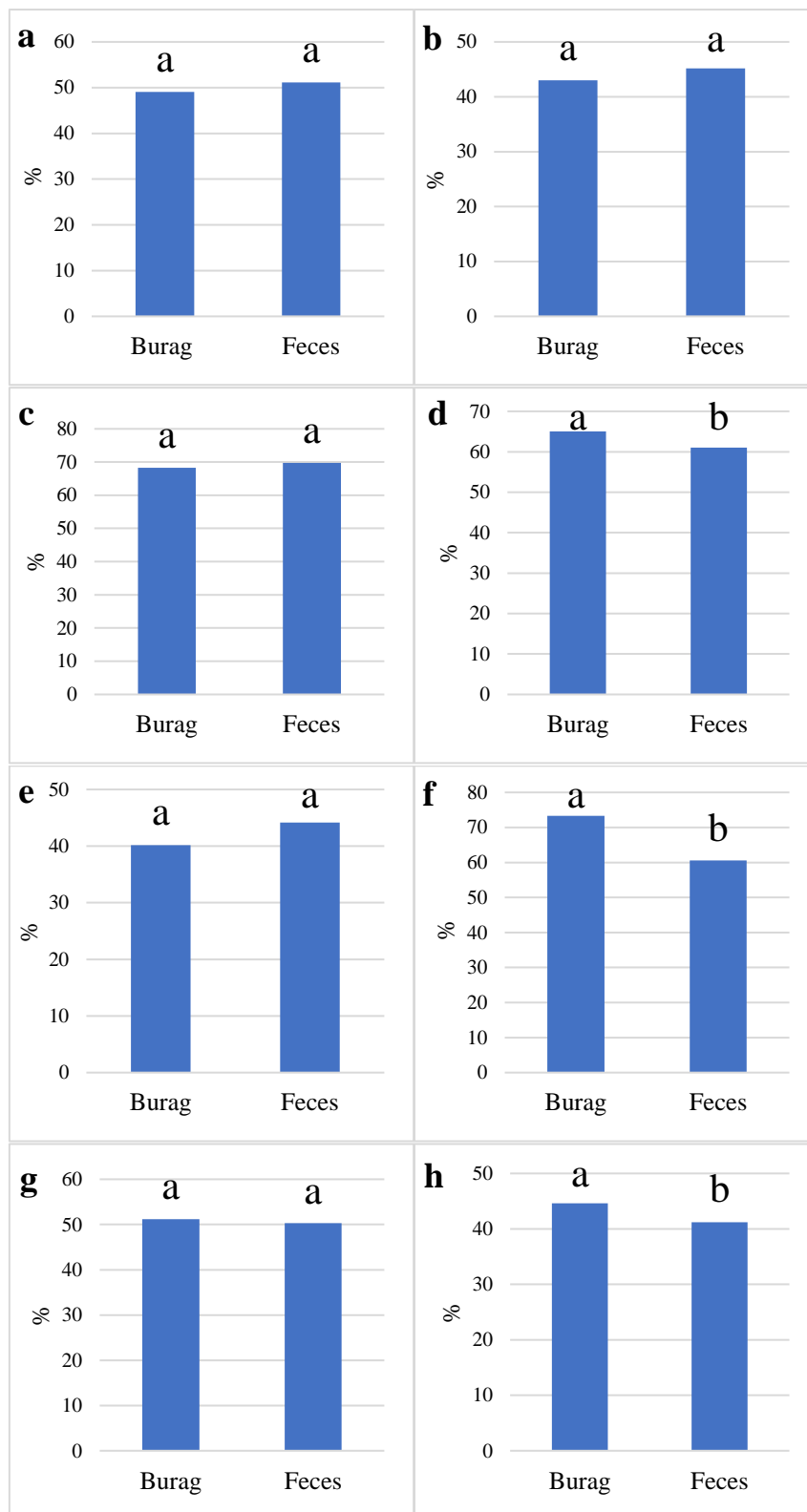
Prosječna *in vitro* buražna probavljivost ST svih uzoraka korištenjem buražnog soka kao inokuluma je iznosila 53,7% dok je korištenjem fecesa kao inokuluma iznosila 52,6% te između dvaju inokuluma nije utvrđena razlika u probavljivosti ST svih uzoraka ($P = 0,502$). Prosječne vrijednosti *in vitro* buražne probavljivosti sakupljenih vrsta biljaka su bile u rasponu od 40,2% (šumska šašuljica) do 69,0% (dobričica), ujedno biljke s najvišim i najnižim sadržajem NDV-a. Vrijednosti kod ostalih biljaka su se kretale prema redoslijedu: antropogenizirana kontinentalna livada (43,0%) < pustenasta kupina (44,3%) < seoska kupina (50,2%) < oštrodlaka kupina (50,5%) < bršljan (53,6%) < rosopas (67,0%).

Zatim je detaljnije ispitana razlika u *in vitro* buražnoj probavljivosti pojedinih biljaka (grafikon 2). Od osam istraživanih biljaka, razlika između buražnog i fekalnog inokuluma utvrđena je za bršljan, rosopas i antropogenizirane kontinentalne livade ($P < 0,001$), čije su vrijednosti *in vitro* buražne probavljivosti ST bile više korištenjem buražnog inokuluma, redom 65,0 vs. 62,2% za bršljan, 73,3 vs. 60,6% za rosopas i 44,9 vs. 41,2% za antropogenizirane kontinentalne livade.

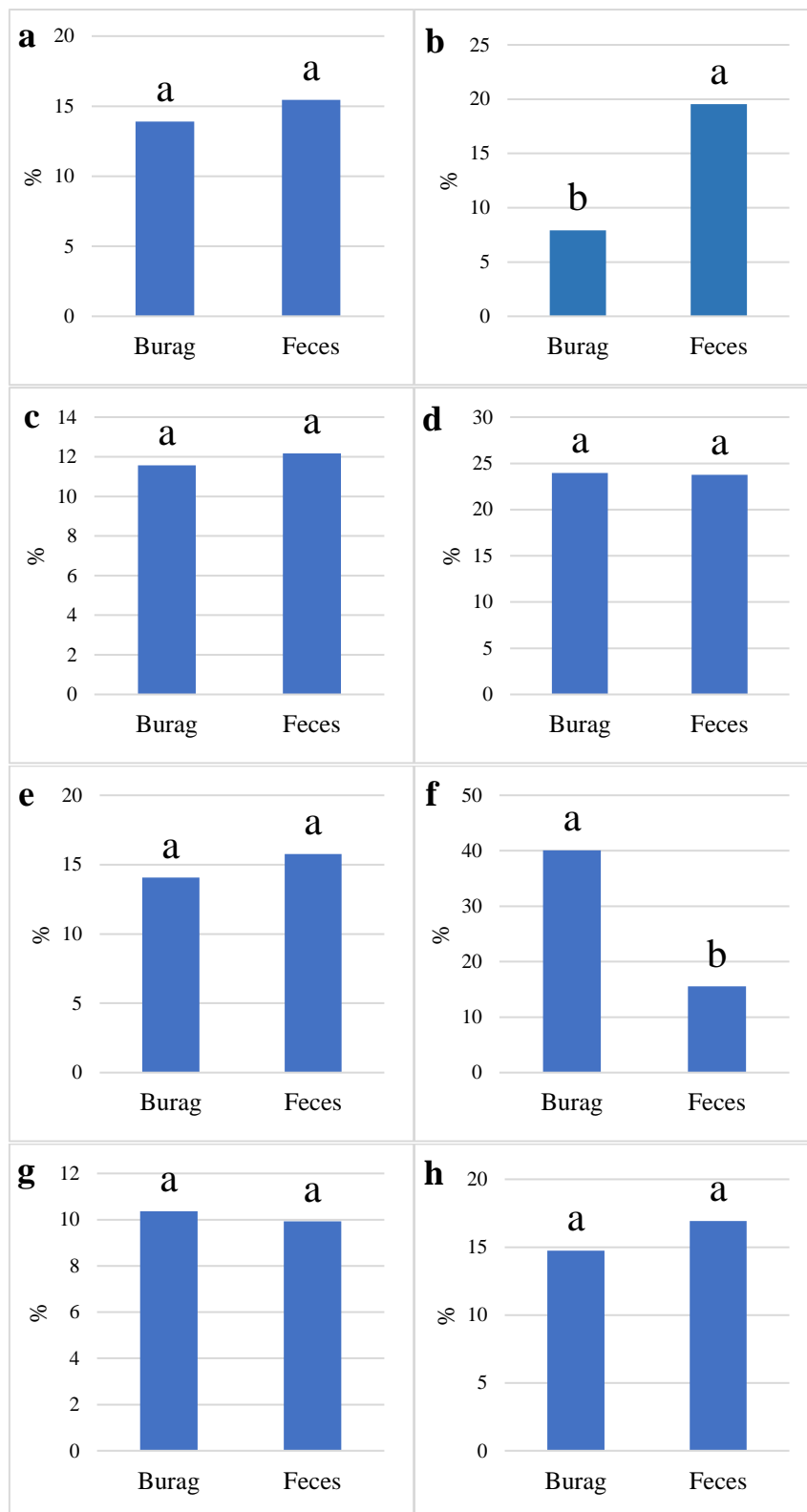
4.3. *In vitro* buražna probavljivost neutralnih detergent vlakana korištenjem dvaju različitih inokuluma

Prosječna *in vitro* buražna probavljivost NDV-a sakupljenih uzoraka iznosila je 16,3%, a isto je iznosila i probavljivost koristeći feces kao inokulum te nije utvrđena razlika u probavljivosti NDV-a sakupljenih uzoraka ($P = 0,304$). Raspon prosječnih vrijednosti buražne probavljivosti NDV-a iznosio je od 6,6% (pustenasta kupina) do 36,3% (rosopas). Probavljivost kod ostalih biljaka iznosila je redom: dobričica (9,1%) < oštrodlaka kupina (9,2%) < seoska kupina (12,7%) < antropogenizirana kontinentalna livada (13,4%) < šumska šašuljica (13,5%) < bršljan (22,06%).

U grafikonu 3. prikazane su detaljnije razlike *in vitro* buražne probavljivosti sakupljenih biljaka. Od osam sakupljenih biljaka, dvije biljke su se razlikovale u probavljivosti ($P < 0,001$) koristeći buražni i fekalni inokulum, a to su pustenasta kupina i rosopas. Rosopas je imao veće vrijednosti *in vitro* probavljivosti NDV-a koristeći buražni sok kao inokulum (40,2% vs. 15,57%), dok pustenasta kupina imala veću vrijednost *in vitro* probavljivosti NDV-a u fekalnom inokulumu (19,55% vs. 7,92%).



Grafikon 2. *In vitro* buražna probavljivost ST s buražnim i fekalnim inokulumom sakupljenih uzoraka biljaka (a, seoska kupina; b, pustenasta kupina; c, dobričica; d, bršljan; e, šumska šašuljica; f, rosopas; g, oštrodlaka kupina; h, antropogenizirane kontinentalne livade). Stupci označeni različitim slovima za svaku biljku statistički se razlikuju ($P < 0,05\%$).



Grafikon 3. *In vitro* buražna probavljivost NDV s buražnim i fekalnim inokulumom sakupljenih uzoraka biljaka (a, seoska kupina; b, pustenasta kupina; c, dobičica; d, bršljan; e, šumska šašuljica; f, rosopas; g, oštrodlaka kupina; h, antropogenizirane kontinentalne livade).

Stupci označeni različitim slovima za svaku biljku statistički se razlikuju ($P < 0,05\%$).

5. RASPRAVA

Biljke koju se bile dostupne srnama tijekom zimskog razdoblja su seoska kupina (*Rubus ulmifolius* Schott), oštrodlaka kupina (*Rubus hirtus* Waldst.et Kit.), pustenasta kupina (*Rubus canescens* DC.), dobričica (*Glechoma hederacea* L.), bršljan (*Hedera helix* L.), šumska šašuljica (*Calamagrostis arundinacea* (L.) Roth), rosopas (*Chelidonium majus* L.) te antropogenizirane kontinentalne livade – mješavina vrsta iz porodice *Poaceae*. Sakupljene biljke razlikovale su se u sadržaju NDV koji je bio sličan u tri datuma uzorkovanja tijekom zimskog razdoblja kada je utvrđen najviši sadržaj vlakana u istraživanjima koja su pratila sezonske promjene u kemijskom sastavu biljaka kojima se hrane ostali Cervidi (González-Hernández i Silva-Pando, 1999; Parlak i sur., 2011; Tixier i sur., 1997). Barančeková (2010) navodi, u istraživanju provedenom u Češkoj, da se najveći udio hranidbe srna sastoji od zeljanica (32%), zatim trava (17%), crnogoričnog drveća (13%) i lišća (11%).

Rezultati sadržaja NDV biljaka sakupljenih u ovom istraživanju su manji ili slični rezultatima sadržaja NDV u biljkama sakupljenima u drugim istraživanjima s Cervidima na različitim područjima. Istraživanje González-Hernández i Silva-Pando (1999) provedeno je na području Galicije (sjeverozapadna Španjolska) na biljkama kojima se hrane jeleni. Sadržaj vlakana grmlja u šumskoj kozjoj krvi (*Lonicera periclymenum*) iznosio je 492 ± 66 g/kg, a u trušljici (*Frangula alnus*) 496 ± 82 g/kg što su više vrijednosti od uzorkovanih biljaka u ovom radu koje pripadaju porodici grmlja (seoska, pustenasta i oštrodlaka kupina; prosječno 279,8 g/kg). U navedenom istraživanju sakupljen je uzorak bršljana koji je imao veći udio NDV-a nego u ovom radu (440 ± 74 vs. 264,3 g/kg). Kao i prethodno istraživanje, tako su Parlak i sur. (2011) odredili sastav biljaka kojima se hrane koze hrane na mediteranskom području tijekom zimskog razdoblja. Udio NDV iznosio je kod hrasta oštika (*Quercus coccifera* L.) 591,1 - 649.2 g/kg, tankolisne majčine dušice (*Thymus longicaulis* C.Presl.) 570 - 627 g/kg, širokolisne zelenice (*Phillyrea latifolia* L.) 595 - 606.6 g/kg i sarkopoteriuma (*Sarcopoterium spinosum* (L.) Spach) 595.1 - 706.6 g/kg, a to su sve više vrijednosti od sadržaja kod svih uzorkovanih biljaka u ovom radu. Slične vrijednosti sadržaja NDV-a biljaka u ovome radu sadržavao je ružičasti bušin (*Cistus creticus* L.) čiji se raspon kretao od 407.9 - 517.1 g/kg što je blizu sadržaja kod antropogenizirane kontinentalne livade (425, 7 g/kg) i šumske šašuljice (504,7 g/kg) ovog rada. Sadržaj NDV-a u biljkama kojima se hrane jeleni tijekom zimskog perioda na šumskom području sjeverozapadne Kine u istraživanju Feng i sur. (2018) je iznosio 647 ± 59 g/kg pri čemu je *Saussurea manshurica* imala sadržaj od čak 718 g/kg a slijede ju bradavičasta kurika

(*Euonymus verrucosus*) sa 717 g/kg i *Acer ukurunduense* sa 704 g/kg. U istraživanju provedenom na ovcama, Trulio i sur. (2010) su dobili vrijednosti sadržaja NDV-a u biljkama bijele djeteline (*Trifolium repens* sp.) od 305,3 g/kg, svinđuše (*Lotus corniculatus* va. San Gabriel) od 386,8 g/kg, engleskog ljulja (*Lolium* sp.) od 529,3 g/kg i zobi (*Avena sativa* sp.) od 484,2 g/kg što je raspon vrijednosti usporediv s vrijednostima biljaka u ovom radu.

Sakupljene biljke su dale veliki raspon *in vitro* buražne probavljivosti ST. Prema McDonald i sur. (1995) biljke čija je probavljivost ST viša od 50% se smatraju hrana visoke kvalitete za preživače. Prema tome, tijekom zimskog razdoblja, dobričica, bršljan, rosopas, seoska i oštrodlaka kupina su bile visokokvalitetni izvor hrane za srne. Nadalje, Droždž (1979) zaključuje da je srnama potrebna hrana minimalne probavljivosti ST u cijelom traktu od 58% kako bi zadovoljile energetske potrebe. Prema Zweifel-Schielly i sur. (2012), životinje porodice jelena tijekom zimskog razdoblja biraju hranu višeg sadržaja organske tvari i manjeg sadržaja vlage i proteina te nižeg omjera proteina i vlakana. Nadalje, u provedenom istraživanju, *in vitro* buražna probavljivost ST je opadala sa sadržajem NDV-a u biljkama ($r = -0,78$).

U dostupnoj literaturi gotovo da i nema istraživanja koja se bave buražnom probavljivosti srna te je rezultate *in vitro* buražne probavljivosti ST dobivene u ovom radu potrebno usporediti s istraživanjima na ostalim Cervidima. Pri tome, metode korištene u tim radovima obuhvaćaju *in vitro* metodu probavljivosti ali i kalkulativnu procjenu na temelju kemijskog sastava. Grmovite biljke u istraživanju Hervás i sur. (2004), u kojem je probavljivost određivana istom metodom kao i u ovom radu ali s buražnim sokom jelena, imale su *in vitro* buražnu probavljivost ST u rasponu od 35,1% (*Erica australis*) do 82,7% (*Genista occidentalis*) pri čemu su *E. australis* i *Calluna vulgaris* (48,0%) imale vrijednosti slične većini biljaka sakupljenih u ovom radu. Također, koristeći istu metodu, u istraživanju Lavrenčić i Veternik (2018) s buražnim sokom jelena, svježa trava je imala probavljivost ST od 45,4 do 64,6% te je niža vrijednost slična onoj dobivenoj za antropogenizirane kontinentalne livade u ovom radu (43,0%). Od istraživanja u kojima se probavljivost ST procijenila kalkulativno, Feng i sur. (2018) navode vrijednosti u rasponu od 38,7% za bradavičastu kuriku (*E. verrucosus*) do 54,6% za *S. manshurica*. Od 15 uzorkovanih biljaka samo su tri biljke, zimska preslica (*Equisetum hyemale*), suručica (*Spiraea salicifolia*) i šaš (*Aralia elata*), imale probavljivost višu od 50%. Suprotno radu Feng i sur. (2018), u ovom radu biljke imaju širi raspon i višu buražnu probavljivost ST. Seoska i pustenasta kupina koje ujedno pripadaju istoj porodici kao i suručica, imale su buražnu probavljivost ST sličnu onoj u spomenutom istraživanju (prosječno 50,5% vs. 49%). Širi raspon probavljivosti ST od Feng i sur. (2018), u hranidbi koza na sjeverozapadnom području Turske

tijekom zimskog perioda prikazuju Parlak i sur. (2011) gdje se probavljivost kretala od 33,69% do 59,80%. Najsličnije probavljivosti ST biljaka u ovom i navedenom radu imaju šumska šašuljica (40,2%) i sarkopterium (*Sarcopoterium spinosum* (L.) Spach) ($40 \pm 0,32\%$). Droždž (1979) je odredio probavljivost biljaka kod srna tijekom zimskog perioda na području južne Poljske prema jednadžbi na temelju sadržaja sirovog proteina (Droždž i Osiecki, 1973), a dobivene vrijednosti su se kretale od 24,7% za lišće hrasta, 26,6% za lišće johe, 27,7% za lišće breze, 48% za sedmolist (*Aegopodium podagraria*), 48,1% za oštricu (*Carex brizoides*) i 55,2% za šumski kopitnjak (*Asarum europaeum*) pri čemu su jedino lišće hrasta, breze i johe imali niže probavljivosti od buražne probavljivosti ST biljaka u ovom radu. U navedenom radu sakupljene su dvije biljke iste kao i u ovom; travnjaci (*Craminae*) i lišće kupine (*Rubus sp.*). U ovom radu travnjaci su imali nižu buražnu probavljivost za 5,3%, pustenasta kupina za 3,95%, a seoska i oštrodlaka veću za 2%.

Vrsta inokuluma i hranidbena konzumacija čimbenici su koji određuju konačnu probavljivost krme (Guzmán i Sager, 2016). U provedenom istraživanju, nije utvrđena razlika između buražnog soka i fecesa srna kao inokuluma u buražnoj probavljivosti ST što se slaže s prijašnjim istraživanjima koja su pokazala da se feces može koristiti kao inokulum u određivanju *in vitro* buražne probavljivosti ST krme te da feces može biti zamjena buražnom soku jer daje slične rezultate kao i buražni sok (Akhter i sur. 1999, Whittall i sur. 1998, Laudadio i sur. 2009) kod goveda, magarca i deva. Međutim, kod nekih biljaka, fekalni inokulum može dati niže rezultate *in vitro* buražne probavljivosti ST, kao što je u ovom istraživanju utvrđeno za bršljan, rosopas i antropogenizirane kontinentalne livade.

Guzmán i Sager (2016) navode da u istraživanju korištenja fecesa kao inokuluma u *in vitro* metodama, fekalni sadržaj ima nižu fermentaciju u odnosu na buražni sadržaj, bez obzira na hranidbu životinja. Tome može biti pripisan utjecaj većeg broja mikrobne populacije u buragu u usporedbi s onim u crijevima. Međutim, Ørskov i sur. (1970, 1972) pokazali su da konzumacija različitih vrsta ugljikohidrata u buragu ne mijenja vrstu mikroorganizama u crijevima, ali utječe na njihov broj što objašnjava slične rezultate dobivene korištenjem oba inokuluma kod većine biljaka u ovom istraživanju. Prema Mauricio i sur. (2001), niža fermentacija u slijepom crijevu može biti posljedica brojnih čimbenika kao što je dolazak supstrata niže hranjive vrijednosti u rektum, manja naseljenost populacijama bakterija ili nedostatak protozoa ili pak kraće vrijeme zadržavanja u odnosu na burag. Dobivena niža *in vitro* buražna probavljivost ST kod nekih biljaka korištenjem fekalnog inokuluma u ovom

istraživanju u skladu je s rezultatima El Shaer i sur. (1987) koji su također dobili niže vrijednosti koristeći feces kao inokulum u *in vitro* metodi određivanja probavljivosti hrane kod ovaca.

Vlakna čine najveći udio u hranidbi srna. Feng i sur. (2018) navode da biljke koje sadrže niži udio NDV-a imaju višu probavljivosti ST poput zimske preslice (*E. hyemale*) 52,1%, suručice (*S. salicifolia*) 59%, šaša (*A. elata*) 53,2% i japanske tise (*Taxus cuspidate*) 49,2%. Navedeni autori su osim razlika u probavljivosti utvrdili i negativnu korelaciju ($r = -0,343$) sadržaja NDV i bruto energije. Rezultati se poklapaju s ovim radim u kojem najviši udio NDV sadrže šumska šašuljica, antropogenizirane kontinentalne livade i pustenasta kupina, a koje imaju najniže vrijednosti buražne probavljivosti ST. Nižu probavljivost biljaka zbog većeg udjela stanične stjenke navode i Parlak i sur. (2011), a dobiveni rasponi probavljivosti ST tijekom cijele godine iznose za hrast oštrika (*Quercus coccifera* L.) 43,6 - 48,7%, tankolisnu majčinu dušicu (*T. longicaulis* C.Presl.) 33,69 - 40,53%, širokolisnu zeleniu (*P. latifolia* L.) 44,63 - 49,95%, sarkopterium (*S. spinosum* (L.) Spach) 36,11 - 45,64% i bušin (*C. creticus* L.) 50,68 - 59,85%.

Što se tiče probavljivosti NDV-a, u dostupnoj literaturi se najčešće koristio buražni sok jelena. Sve biljke u ovom istraživanju su imale nižu buražnu probavljivost NDV-a od grmovitih biljka u istraživanju Hervás i sur. (2004). Vrijednosti su se kretale od 30,7% (*G. occidentalis*) do 49,1% (*C. vulgaris*). Također, niže vrijednosti antropogenizirane kontinentalne livade u ovom radu su bile i u usporedbi sa svježim travama u radu Lavrenčić i Veternik (2018) u čijem radu su vrijednosti bile u rasponu od 45,4 do 59,0%. Mogući razlog ovako niskih rezultata u ovom radu je niska celulolitička aktivnost mikroorganizama srna.

Procjena probavljivosti vlakana nužna je za formuliranje obroka preživača, pa se u tu svrhu pokušava utvrditi različitost procjene probavljivosti NDV-a koristeći feces umjesto buražnog soka kao manje invazivan način *in vitro* metode probavljivosti (Chiaravalli i sur., 2019). Sakupljene biljke međusobno pokazuju mala odstupanja u vrijednostima *in vitro* buražne probavljivosti NDV-a koristeći fekalni i buražni inokulum, a razlike između inokuluma utvrđene se samo za dvije biljke ($P < 0,05$), a to su pustenasta kupina i rosopas. Buražna probavljivost NDV-a kod pustenaste kupine bila je veća u fekalnom inokulumu što se može usporediti s istraživanjem Laudadio i sur. (2009). U navedenom istraživanju na devama, autori su odredili višu buražnu probavljivost NDV-a kod nekih uzoraka biljaka koristeći fekalni inokulum, a objašnjavaju dobivene rezultate većim sadržajem stanične stjenke (NDV-a) odnosno kemijskog sastava biljke. Za razliku od pustenaste kupine, rosopas pokazuje veću probavljivost koristeći buražni sok kao u radu Chiaravalli i sur. (2019). U istraživanju navode da je u kratkom vremenu inkubacije (48 sati u odnosu na 240 i 360 sati) probavljivost vlakana

u buražnom inokulumu uvijek bila veća od one dobivene inkubacijom u fekalnom inokulumu, što upućuje na potencijalno nižu celulitičku aktivnost fekalnog inokuluma u usporedbi s buražnim. U ovom radu, buražna probavljivost NDV-a se razlikovala samo za dvije biljke, što upućuje da sličnost inkubacije s fekalnim i buražnim inokulom kod srna ovisi od biljke.

Omed i sur. (2000), u pokusu zamjene buražnog inokuluma s fekalnim, navode da slična i ponekad viša standardna devijacija povezana s fekalnim sadržajem ukazuje da bi zamjena inokuluma rezultirala manje preciznim rezultatom. I Váradyová i sur. (2005) navode da feces ne može zamjeniti buražni sok. Međutim, dobiveni rezultati u ovom radu pokazuju da razlike kod srna nema i da se buražni sok može zamjeniti fekalnim. Upotrebu fecesa kao zamjenu buražnom soku navode i Zicarelli i sur. (2011) u istraživanju *in vitro* probavljivosti korištenjem buražnog i fekalnog inokuluma u ovaca. Iako u radu koriste Tilley i Terry metodu (Tilley i Terry, 1963), Jones i Barnes (1966) također dokazuju u pokusima s govedima da se feces može koristiti kao inokulum u zamjenu za buražni sok.

Rezultati koji su dobiveni u ovom istraživanju pokazuju razlike između buražne probavljivosti ST i NDV-a biljaka koristeći feces i buražni sok kao inokulum kod samo dvije biljke što dokazuje da feces može poslužiti kao izvor inokuluma za određivanje *in vitro* buražne probavljivosti u srna. S obzirom na problem sakupljanja buražnog soka u odnosu na feces, rezultati ovog istraživanja mogu se iskoristiti za prikupljanje više podataka o hranidbenoj vrijednosti hrane kojima se srne hrane. Feces kao adekvatna zamjena buražnom soku ujedno izbjegava odstrelu srna čime se pridonosi dobrobiti životinja.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja na sedam srna i 27 uzoraka različitih biljaka doneseni su sljedeći zaključci:

- Probavljivost ST koristeći feces kao inokulum umjesto buražnog soka se nije razlikovala osim kod tri biljke ($P < 0,001$); bršljana (*Hedera helix* L.), rosopasa (*Chelidonium majus* L.) i antropogeniziranih kontinentalnih livada (*Poaceae*).
- Probavljivost NDV-a koristeći feces kao inokulum umjesto buražnog soka se nije razlikovala osim kod dvije biljke ($P < 0,001$); pustenaste kupine (*R. canescens* DC.) i rosopsa (*C. majus* L.).
- Feces kao inokulum može biti alternativna zamjena buražnom soku u *in vitro* metodi određivanja probavljivosti ST i NDV kod srna.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Kristini Kljak na pruženoj prilici, strpljenju, podršci, pomoći i uloženom vremenu za izradu ovog rada.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Nikici Špremu na organizaciji istraživanja na pokušalištu "Ban Josip Jelačić" kao i tehničkom suradniku Štefanu Penteku, na uloženom vremenu, savjetima o biljkama kojima se srne hrane i sakupljanju uzoraka.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Ivani Vitasović Kosić na prepoznavanju vrsta sakupljenih uzoraka biljaka.

Zahvaljujem se svim članicama laboratorija Zavoda za hranidbu životinja Agronomskog fakulteta u Zagrebu koje su mi pomogle u provođenju svih kemijskih analiza i analiza određivanja probavljivosti.

8. Popis literature

1. Akhter S., Owen E., Theodorou M. K., Butler E. A., Minson D. J. (1999). Bovine faeces as a source of micro-organisms for the *in vitro* digestibility assay of forages. *Grass Forage Science*. 54: 219–226.
2. Akhter S., Owen E., Theodorou M. K., Butler E. A., Minson D. J. (1999). Bovine faeces as a source of micro-organisms for the *in vitro* digestibility assay of forages. *Grass and Forage Science*. 54(3): 219-226.
3. ANKOM Technology. (2017). In Vitro True Digestibility using the Daisy^{II} Incubator. https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_3_Invitro_D200_D200I.pdf - pristup 22.06.2021.
4. Barančeková M., Krojerová-Prokešová J., Šustr P., Heurich M. (2010). Annual changes in roe deer (*Capreolus capreolus* L.) diet in the Bohemian Forest, Czech Republic/Germany. *European Journal of Wildlife Research*. 56(3): 327-333
5. Chiaravalli M., Rapetti L., Rota Graziosi A., Galassi G., Crovetto G. M., Colombini S. (2019). Comparison of faecal versus rumen inocula for the estimation of NDF digestibility. *Animals* 9(11): 928.
6. Choudhury P. K., Abdelfattah Zeidan M. S., Rajashree J., Sanjeev K., Rameshwar S., Anil Kumar P. (2015). Rumen microbiology: An overview. U: Rumen microbiology: from evolution to revolution (ur. Puniya, A. K., Rameshwar, S. i Kamra, D. N.). New Delhi. Springer. Str. 3-16.
7. Dahl S. A., Hudler M., Windisch W., Bolduan C., Brugger D., König A. (2020). High fibre selection by roe deer (*Capreolus capreolus*): evidence of ruminal microbiome adaption to seasonal and geographical differences in nutrient composition. *Animal Production Science*. 60(10): 1303-1314.
8. Dijkstra J., Forbes J. M., France J. (2005). Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Cambridge. CABI Pub.
9. Drożdż A. (1979). Seasonal intake and digestibility of natural foods by roe-deer. *Acta Theriologica*. 24(13): 137-170.
10. Drożdż A., Osiecki A. (1973). Intake and digestibility of natural feeds by roe-deer. *Acta theriologica* 18(3): 81-91
11. DZNM. (2001). HRN ISO 6496:2001. Stočna hrana - Određivanje vode i udjela drugih hlapljivih tvari.

12. DZNM. (2008). HRN ISO 16472:2006 – Određivanje sadržaja amilazom obrađenog neutralnog detergenta vlakana (aNDF).
13. El Shaer H. M., Omed H. M., Chamberlain A. G., Axford R. F. E. (1987). Use of faecal organisms from sheep for the *in vitro* determination of digestibility. The Journal of Agricultural Science. 109(2): 257-259.
14. Feng Y., Yu Y., Zhong L., Zhang W., Zhang M. (2018). The nutritional composition and digestion of plants foraged by red deer (*Cervus elaphus xanthopygus*) in northeast China. Journal of Forestry Research. 29(1): 851-858.
15. González-Hernández M. P., Silva-Pando F. J. (1999). Nutritional attributes of understory plants known as components of deer diets. Journal of Range Management. 52(2): 132-138.
16. Grbeša D. (2004). Metode procjene i tablice kemijskog sastava i hranjive vrijednosti krepkih krmiva. Hrvatsko agronomsko društvo. Zagreb.
17. Grbeša D. (2017): Opća hranidba, Interna skripta, Zagreb.
18. Guzmán M. L., Sager R. (2016). Ruminant Fecal Inoculum for *In vitro* Feed Digestibility Analysis. https://www.researchgate.net/profile/Ricardo-Sager/publication/311741934_Ruminant_Fecal_Inoculum_for_In_Vitro_Feed_Digestibility_Analysis/links/5859249508ae3852d2557bcf/Ruminant-Fecal-Inoculum-for-In-Vitro-Feed-Digestibility-Analysis.pdf - pristup 17. lipnja 2021.
19. Hervás, G., Ranilla M. J., Mantecón, A.R., Bodas, R., Frutos, P. (2004). Comparison of *in vitro* digestibility of feedstuffs using rumen inoculum from sheep or red deer. Journal of Animal and Feed Sciences. 13: 91-94.
20. Hughes M., Mlambo V., Lallo C. H. O., Jennings P. G. A. (2012). Potency of microbial inocula from bovine faeces and rumen fluid for *in vitro* digestion of different tropical forage substrates. Grass and Forage Science. 67(2): 263-273.
21. Janicki Z., Slavica A., Konjević D., Severin K. (2008). Zoologija divljači. Zavod za biologiju, patologiju i uzgoj divljači Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
22. Jones R. J., Barnes P. (1996). *In vitro* digestibility assessment of tropical shrub legumes using rumen fluid or fecal fluid as the inoculum source. Trop Grasslands. 30: 374-377.
23. König, A., Hudler, M., Dahl, S. A., Bolduan, C., Brugger, D., Windisch, W. (2020). Response of roe deer (*Capreolus capreolus*) to seasonal and local changes in dietary energy content and quality. Animal Production Science. 60(10): 1315-1325.

24. Laudadio V., Lacalandra G. M., Monaco D., Khorchani T., Hammadi M., Tufarelli V. (2009). Faecal liquor as alternative microbial inoculum source for *in vitro* (Daisy^{II}) technique to estimate the digestibility of feeds for camels. *Journal of Camelid Science* 2: 1-7.
25. Lavrenčić, A., Veternik, D. (2018). Differences between sheep and red deer in *in vitro* apparent and true digestibility of commonly used red deer feeds. *Acta Agriculturae Slovenica*. 112(1): 5-9.
26. Lechner-Doll, M., Lason, K., Lang, D., Behrend, A. (2001). Evolutionary aspects of dietary selection and digestion in the European roe deer (*Capreolus capreolus*) with special reference to seasonality. *Zoosystematics and Evolution*. 77(2): 223-227.
27. Mauricio R. M., Owen E. R., Mould F. L., Givens I., Theodorou M. K., France J. (2001). Comparison of bovine rumen fluid and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology*. 89(1-2): 33–48.
28. McDonald P., Edwards R. A., Greenhalgh J. F. D., Morgan C.A. (1995). *Animal nutrition*, 5th edition. Harlow. Longman Press. Str. 607.
29. Oddy V. H., Robards G. E., Low S. G. (1983). Prediction of *in vivo* dry matter digestibility from the fiber nitrogen content of a feed. U: *Information and Animal Production* (ur. Robards G.E. i Packham R.G.). Farnham Royal UK. Feed Commonwealth Agricultural Bureaux. Str. 395- 398.
30. Omed H. M., Lovett D. K., Axford R. F. E. (2000). Faeces as a source of microbial enzymes for estimating digestibility. U: *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition* (ur. Givens, D.I., Owen, E., Omed, H.M., Axford, R.F.E.). CABI Publishing. Wallingford. Str. 135-154.
31. Ørskov E. R., Fraser C., Mason V. C., Mann S. O. (1970). Influence of starch digestion in the large intestine of sheep on caecal fermentation, caecal microflora and faecal nitrogen excretion. *British Journal of Nutrition*. 24(3): 671-682.
32. Ørskov E. R., Mayes R. W., Mann, S. O. (1972). Post-ruminal digestion of sucrose in sheep. *British Journal of Nutrition*. 28(3): 425-432.
33. Palo T. R., Jordan P. A., Pehrson Å., Staaland H. (2012). Seasonal variation of phenols, nitrogen, fiber, and *in vitro* digestibility in Swedish moose. *Alces*. 48: 7-15.
34. Parlak O. A., Gokkus A., Hakyemez B. H., Baytekin H. (2011). Shrub yield and forage quality in Mediterranean shrublands of west Turkey for a period of one year. *African Journal of Agricultural Research*. 6(7): 1726-1734.

35. Posada S. L., Noguera R. R., Segura J. A. (2012). Ruminant feces used as inoculum for the *in vitro* gas production technique. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 25(4): 592-602.
36. Prđun S., Šprem N. (2016). Lovnogospodarska osnova za državno otvoreno lovište broj: III/29 – „Prolom“. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
37. Sniffen, C. J., Robinson, P. H. (1987). Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. *Journal of Dairy Science*. 70(2): 425-441.
38. Tagliapietra F., Cattani M., Hindrichsen I. K., Hansen H. H., Colombini S., Bailoni L., Schiavon S. (2012). True dry matter digestibility of feeds evaluated *in situ* with different bags and *in vitro* using rumen fluid collected from intact donor cows. *Animal production science*. 52(5): 338-346.
39. Theodoru M. K., France J. (2005). Rumen Microorganisms and their Interactions. U: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism (ur. Dijkstra, J., Forbes J.M. i France J). Cambridge. CABI Pub. Str. 207-228.
40. Tilley J. M., Terry R. A. (1963). A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *The Journal of the British Grassland Society*. 18(2): 104-111.
41. Tixier H., Duncan P., Scehovic J., Yant A., Gleizes M., Lila M. (1997). Food selection by European roe deer (*Capreolus capreolus*): effects of plant chemistry, and consequences for the nutritional value of their diets. *Journal of Zoology*. 242(2): 229-245.
42. Trujillo A. I., Marichal M. D. J., Carriquiry M. (2010). Comparison of dry matter and neutral detergent fibre degradation of fibrous feedstuffs as determined with *in situ* and *in vitro* gravimetric procedures. *Animal feed science and technology*. 161(1-2): 49-57.
43. Utomo R., Soedjono M., i Widyobroto B. P. (2011). Determination of *in vitro* digestibility of tropical feeds using cattle faeces as rumen fluid alternative. *Media Peternakan*. 34(3): 207-211.
44. Van Soest P. J., Robertson J. B., Lewis B. A. (1991). Method for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74(10): 3583-3597.
45. Váradyová Z., Baran M., Zelenak I. (2005). Comparison of two *in vitro* fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124(1): 81-94.
46. Vranić M. (2021): Hranjivost voluminozne krme, Interna skripta, Zagreb

47. Vranić M., Knežević M., Bošnjak K., Perčulija G., Leto J., Kutnjak H., Lujanac M. (2010). Feeding value of grass silages based on dry matter concentration. *Poljoprivreda* 16(2): 42-46.
48. Vranić M., Knežević M., Perčulija G., Leto J., Bošnjak K., Rupić I. (2004). Kvaliteta sijena na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima. *Mljekarstvo*. 54(3): 187-194.
49. Whittall H., Mtengeti E. J., Mtenga L. A., Romney D. L., Owen E. (1998). Bovine or equine faeces sources of micro-organisms instead of rumen liquor in the Tilley and Terry *in vitro* digestibility technique for evaluating forages in Tanzania. *Proceedings of the British Society of Animal Science*. 1998: 172.
50. Zicarelli F., Calabro S., Cutrignelli M. I., Infascelli F., Tudisco R., Bovera F., Piccolo V. (2011). *In vitro* fermentation characteristics of diets with different forage/concentrate ratios: comparison of rumen and faecal inocula. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91(7): 1213-1221.
51. Zweifel-Schielly B., Leuenberger Y., Kreuzer M., Suter W. (2012). A herbivore's food landscape: seasonal dynamics and nutritional implications of diet selection by a red deer population in contrasting Alpine habitats. *Journal of Zoology*. 286(1): 68-80.

SAŽETAK

Tea Kavčič

Fekalni inokulum kao zamjena buražnom soku za *in vitro* određivanje probavljivosti u srna (*Capreolus capreolus*)

In vitro metoda određivanja buražne probavljivosti zahtjeva korištenje buražnog soka. S obzirom na zahtjevnost postupka uzorkovanja buražnog soka i kod domaćih i divljih životinja, traži se zamjena buražnom soku poput fecesa. Cilj ovog rada bio je usporediti i utvrditi može li feces zamijeniti buražni sok prilikom *in vitro* određivanja buražne probavljivosti suhe tvari (ST) i neutralnih detergent vlakana (NDV) u srna. Buražni i fekalni sadržaj 7 srna te 27 uzoraka 8 vrsta biljaka sakupljeno je tijekom zimskog perioda 2020./2021. godine na području pokušališta „Ban Josip Jelačić“. U uzorcima biljaka određen je sadržaj ST i NDV-a, a njihova buražna probavljivost je određena *in vitro* metodom koristeći Daisy^{II} inkubator s buražnim sokom i fecesom kao inokulom. Sadržaj NDV-a sakupljenih biljaka kretao se u rasponu od 151 do 505 g/kg ST, dok se probavljivost ST i NDV-a kretala u rasponima 40.2 – 69.0% i 6,6 – 36,3%. Uspoređujući korištenje fecesa kao inokuluma u zamjenu za buražni sok za sve sakupljene vrste, nije utvrđena razlika između inokuluma u probavljivosti ST i NDV-a. Međutim, usporedbom inokuluma pojedinačno kod svake vrste, tri vrste su imale niže vrijednosti buražne probavljivosti ST, dok je kod buražne probavljivosti NDV-a jedna vrsta imala višu a druga nižu vrijednost s fekalnim inokulom. Osim kod jedne vrste, razlike su bile manje od 3,6% za ST i od 10% za NDV, što ukazuje da se feces može koristiti kao alternativa buražnom soku prilikom određivanja *in vitro* buražne probavljivosti.

Ključne riječi: srna, buražna probavljivost, buražni sok, feces, suha tvar, vlakna

ABSTRACT

Tea Kavčič

Fecal inoculum as an alternative for ruminal liquid for *in vitro* determination of digestibility in female roe deer (*Capreolus capreolus*)

The *in vitro* method for determining ruminal digestibility requires the use of ruminal fluid. Given the complexity of the rumen sampling procedure in both domestic and wild animals, alternatives to ruminal fluid, such as feces, are being sought. The aim of this study was to compare and determine if feces can replace ruminal fluid in the *in vitro* determination of rumen digestibility of dry matter (DM) and neutral detergent fiber (NDF) in female roe deer. The rumen and fecal contents of 7 animals and 27 samples of 8 plant species were collected during the winter period 2020/2021 in the area of the experimental site "Ban Josip Jelačić". The content of DM and NDF was determined in the plant samples and their ruminal digestibility was determined *in vitro* using a Daisy^{II} incubator with ruminal fluid and feces as inoculum. The NDF content of the collected plants ranged from 151 to 505 g/kg DM, while DM and NDF digestibility ranged from 40.2 - 69.0% and 6.6 - 36.3%, respectively. When comparing the use of feces as an alternative for ruminal fluid, no difference was found between inoculums in DM and NDF digestibility for all species collected. However, comparing inoculums individually in each species, the three species had lower DM digestibility, while in NDF digestibility, one species had higher and the other lower value with fecal inoculum. With the exception of one species, the differences were less than 3.6% for DM and 10% for NDF, indicating that fecal matter can be used as an alternative to rumen juice in determining *in vitro* rumen digestibility.

Key words: female roe deer, ruminal digestibility, ruminal liquid, feces, dry matter, fiber