

Comparative Evaluation of In Vitro, In Situ and In Vivo Methods Used in Rumen Fermentation Studies

Hacer Kaya ^{1*}

¹ Gümüşhane University, Kelkit Aydın Doğan Vocational School, Veterinary Medicine, 29600, Gümüşhane, Türkiye.

Abstract

Accurate and reliable evaluation of rumen fermentation is essential for improving ruminant nutrition, increasing feed utilization efficiency, understanding microbial processes, and controlling enteric methane production. For this purpose, different experimental methods are used in rumen research, which can be broadly classified as *in vitro*, *in situ*, and *in vivo* approaches. Among *in vitro* methods, batch gas production systems and the Rusitec system are the most widely used approaches, whereas *in situ* methods allow direct assessment of ruminal degradability, and *in vivo* methods enable evaluation of the overall biological response at the animal level. In this study, these three major methodological groups commonly used in rumen fermentation studies were comparatively evaluated. Batch gas production systems are rapid, cost-effective, and suitable for the preliminary screening of a large number of samples. The Rusitec system, on the other hand, offers important advantages for monitoring longer-term fermentation processes and microbial changes under more controlled conditions. *In situ* methods are particularly useful for determining ruminal disappearance and degradability characteristics of feeds, although they provide more limited information on fermentation end products. *In vivo* methods provide the highest level of biological relevance by linking rumen fermentation responses with animal performance, physiological reactions, and practical production conditions. However, they are also more demanding in terms of cost, labor, time, and experimental control. Overall, no single method appears to fully reflect the complexity of the rumen ecosystem on its own. Therefore, *in vitro*, *in situ*, and *in vivo* methods should be regarded not as alternatives that replace one another, but as complementary approaches serving different research objectives. In conclusion, selecting the most appropriate method according to the aim of the study, and combining these methods when necessary, may contribute to obtaining more reliable and interpretable results in rumen fermentation research.

Keywords: Rumen fermentation, *In vitro*, Batch gas production systems, Rusitec, *In situ*, *In vivo*.

Rumen Fermentasyon Çalışmalarında Kullanılan *İn Vitro*, *İn Situ* ve *İn Vivo* Metotların Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

Özet

Rumen fermentasyonunun doğru ve güvenilir biçimde değerlendirilmesi, ruminant beslemenin iyileştirilmesi, yemlerden yararlanma düzeyinin artırılması, mikrobiyal süreçlerin anlaşılması ve enterik metan oluşumunun kontrol altına alınması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla rumen araştırmalarında farklı deneysel metotlar kullanılmakta olup, bunlar temel olarak *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* yaklaşımlar altında ele alınmaktadır. *In vitro* metotlar içerisinde özellikle kesikli (batch) gaz üretim sistemleri ile Rusitec sistemi öne çıkarken, *in situ* metotlar yemlerin rumende parçalanabilirliğinin doğrudan değerlendirilmesine, *in vivo* metotlar ise tüm biyolojik yanıtın hayvan düzeyinde izlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu çalışmada, rumen fermentasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bu üç temel metot grubu karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Kesikli gaz üretim sistemlerinin hızlı, ekonomik ve çok sayıda örneğin ön değerlendirilmesine uygun olduğu; Rusitec sisteminin ise daha kontrollü koşullarda, daha uzun süreli fermentasyon süreçleri ile mikrobiyal değişimleri izleme açısından önemli avantajlar sağladığı görülmektedir. *In situ* metotlar, yemlerin rumendeki kaybolma ve parçalanma özelliklerinin belirlenmesinde güçlü bir araç olmakla birlikte, doğrudan fermentasyon son ürünlerini sınırlı düzeyde yansıtmaktadır. *In vivo* metotlar ise rumen fermentasyonuna ilişkin bulguların hayvan performansı, fizyolojik yanıtlar ve pratik üretim koşulları ile birlikte değerlendirilmesine olanak vererek en yüksek biyolojik gerçekliği sunmaktadır. Ancak bu metotların maliyet, iş gücü, zaman ve deneysel kontrol bakımından daha sınırlayıcı olduğu bilinmektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde, hiçbir metodun tek başına rumen ekosisteminin tüm karmaşıklığını eksiksiz biçimde yansıtamadığı anlaşılmaktadır. Bu nedenle *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* metotlar birbirinin alternatifi değil, farklı araştırma amaçlarına hizmet eden tamamlayıcı yaklaşımlar olarak görülmelidir. Sonuç olarak, rumen fermentasyon çalışmalarında araştırma amacına uygun metodun seçilmesi ve gerektiğinde bu metotların birlikte kullanılması, daha güvenilir ve yorumlanabilir sonuçlara ulaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Rumen fermentasyonu, *İn vitro*, Kesikli gaz üretim sistemi, Rusitec, *İn situ*, *İn vivo*.



Giriş

Rumen fermentasyonu, ruminant hayvanların yemi enerjiye ve mikrobiyal ürüne dönüştürmesinde merkezi bir role sahiptir (Mizrahi vd., 2021; Newbold ve Ramos-Morales, 2020). Bu süreçte oluşan uçucu yağ asitleri, mikrobiyal protein, amonyak ve gazlar, hem hayvanın beslenme fizyolojisini hem de üretim performansını doğrudan etkilemektedir (Mahboubi vd., 2026; Qi vd., 2024; Ungerfeld, 2020). Rumen fermentasyonunun doğru değerlendirilmesi, yalnızca yemlerin besleme değerinin belirlenmesi açısından değil, aynı zamanda besin maddelerinden yararlanma etkinliğinin artırılması, rumen mikrobiyotasının daha iyi anlaşılması ve enterik metan oluşumunun azaltılmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesi bakımından da önem taşımaktadır (Moss vd., 2000; Purba ve Sangsawad, 2025; Qi vd., 2024; Shinkai vd., 2024; Tseten vd., 2022).

Rumen ekosistemi son derece karmaşık, dinamik ve çok faktörlü bir yapıya sahip olduğu için, bu sistemin tek bir deneysel yaklaşımla bütünüyle açıklanması kolay değildir (Mizrahi vd., 2021; Russell ve Rychlik, 2001). Rasyona, mikrobiyal yapıya, hayvanın fizyolojik durumuna ve çevresel koşullara bağlı olarak değişebilen rumen yanıtları, araştırmacıları farklı metotlar geliştirmeye yöneltmiştir. Bu kapsamda rumen fermentasyon çalışmalarında en yaygın kullanılan yaklaşımlar genel olarak *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* metotlar altında toplanmaktadır (Dijkstra vd., 2005; Foster vd., 2023; Tedeschi vd., 2022).

In vitro metotlar, laboratuvar koşullarında yürütülen ve rumen ortamını belirli ölçüde taklit etmeyi amaçlayan sistemleri kapsamaktadır. Özellikle kesikli gaz üretim sistemleri, çok sayıda yem ve yem katkı maddesinin kısa sürede, görece düşük maliyetle ve uygun standardizasyonla görece tekrarlanabilir biçimde değerlendirilmesine olanak sağladığı için uzun yıllardır yaygın biçimde kullanılmaktadır (Foster vd., 2023; Theodorou vd., 1994). Bunun yanında, Rusitec sistemi gibi daha gelişmiş *in vitro* düzenekler, fermentasyonun daha uzun süreli ve daha kontrollü koşullarda izlenmesine imkân vererek klasik batch sistemlerin önemli bazı sınırlılıklarını aşmaya yardımcı olmaktadır (Czerkawski ve Breckenridge, 1977; Martínez vd., 2010). Buna rağmen *in vitro* metotlar, canlı hayvandaki emilim süreçlerini, sistemik metabolik yanıtları ve konakçı-mikroorganizma etkileşimini tam olarak yansıtamamaktadır (Dijkstra vd., 2005).

In situ metotlar ise genellikle fistüllü hayvanlar kullanılarak yürütülen ve yemlerin rumende kaybolma veya parçalanma özelliklerinin doğrudan değerlendirilmesine imkân veren bir yaklaşım sunmaktadır. Özellikle naylon torba tekniği, yemlerin ruminal parçalanabilirliğinin belirlenmesinde uzun yıllardır temel metotlardan biri olarak kabul edilmektedir (Foster vd., 2023; Nocek, 1988; Ørskov ve McDonald, 1979). Bu metot, yemlerin rumen ortamındaki davranışını doğrudan inceleme açısından güçlü olmakla birlikte, fermentasyon son ürünleri, gaz oluşumu veya tüm mikrobiyal süreçler hakkında sınırlı bilgi sağlamaktadır. Bu yönüyle *in situ* metotlar, özellikle yemlerin rumende parçalanma özelliklerini değerlendirmede değerli olmakla birlikte, rumen fermentasyonunu tüm boyutlarıyla açıklamak için tek başına yeterli değildir.

In vivo metotlar ise rumen fermentasyonuna ilişkin süreçleri canlı hayvan düzeyinde değerlendirdiği için en yüksek biyolojik gerçekliği sunmaktadır. Bu metotlarla elde edilen bulgular, hayvan performansı, yem tüketimi, sindirim, metabolik yanıtlar ve pratik yetiştirme koşulları ile birlikte yorumlanabilmektedir. Bu nedenle *in vivo* çalışmalar biyolojik doğrulama için en güçlü yaklaşımlardan biridir (Hristov vd., 2013; Tedeschi vd., 2022). Bununla birlikte, bu metotların maliyetli, zaman alıcı, daha fazla iş gücü gerektiren ve biyolojik varyasyondan daha fazla etkilenen çalışmalar olduğu bilinmektedir. Ayrıca etik kısıtlamalar da *in vivo* çalışmaların planlanmasında göz önünde bulundurulması gereken önemli bir boyuttur.

Bu noktada açıkça görülmektedir ki, *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* metotların her biri farklı araştırma sorularına yanıt vermekte ve rumen fermentasyonunun farklı yönlerini öne çıkarmaktadır. Başka bir ifadeyle, bu metotları birbirinin alternatifi olarak değil, birbirini tamamlayan araçlar olarak değerlendirmek daha doğru bir yaklaşım olacaktır. *In vitro* metotlar hızlı ön değerlendirme ve kontrollü tarama çalışmaları için; *in situ* metotlar yemlerin ruminal parçalanabilirliğinin belirlenmesi için; *in vivo* metotlar ise biyolojik doğrulama ve uygulama düzeyindeki sonuçların ortaya konulması için daha uygun görünmektedir.

Bu bildiride, rumen fermentasyon çalışmalarında kullanılan *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* metotlar, temel çalışma prensipleri, güçlü ve zayıf yönleri, sağladıkları veri türleri ve araştırma amaçlarına uygunlukları bakımından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

In vitro metot

In vitro metotlar, rumen ortamını laboratuvar koşullarında belirli ölçüde taklit ederek fermentasyon sürecini kontrollü biçimde incelemeye olanak sağlayan yaklaşımlardır. Bu metotların temel avantajı, araştırmacıya deneysel koşullar üzerinde yüksek düzeyde kontrol sağlama ve çok sayıda yem ya da katkı maddesinin görece düşük maliyetle değerlendirilebilmesine imkân vermesidir (Foster vd., 2023; Getachew vd., 1998;). Bu nedenle *in vitro* metotlar, özellikle ön tarama çalışmalarında, katkı maddesi denemelerinde ve fermentasyon dinamiklerinin ilk düzeyde anlaşılmasında yaygın biçimde kullanılmaktadır (Dijkstra vd., 2005; Menke ve Steingass, 1988; Theodorou vd., 1994;).



İn vitro metotlar genel olarak iki ana grupta değerlendirilebilir: kesikli (batch) gaz üretim sistemleri ve yarı-sürekli yapay rumen sistemleri, bunların en bilinen örneği ise Rusitec'tir. Her iki yaklaşım da canlı hayvan dışında yürütülmesi bakımından aynı ana gruba ait olsa da, çalışma prensibi, gözlem süresi, sağladığı veri türü ve araştırma amacı bakımından birbirinden ayrılmaktadır.

Kesikli (Batch) gaz üretim sistemleri

Kesikli gaz üretim sistemleri, *in vitro* metotlar arasında en yaygın kullanılan yaklaşımlardan biridir. Bu sistemde belirli miktardaki yem örneği, rumen sıvısı ve tampon çözelti ile birlikte anaerobik koşullarda inkübasyona bırakılır ve inkübasyon sırasında oluşan gaz miktarı belirli zaman aralıklarında ölçülür. Ölçülen gaz hacmi, yemin fermentasyon derecesi ve kinetiği hakkında dolaylı ancak değerli bilgiler sağlar (Menke ve Steingass, 1988; Theodorou vd., 1994). Kesikli gaz üretim sisteminin temel çalışma basamakları ve başlıca değerlendirme alanları Şekil 1'de şematik olarak gösterilmiştir. Bu metodun en dikkat çekici yönü, çok sayıda örneğin kısa sürede analiz edilebilmesidir. Bu nedenle kesikli gaz üretim sistemleri, yem hammaddelerinin karşılaştırılması, bitkisel ekstraktların değerlendirilmesi, organik asitlerin veya enzimlerin etkisinin araştırılması ve metan azaltıcı katkı maddelerinin ön taramasında oldukça kullanışlıdır (Getachew vd., 1998; Goel ve Makkar, 2012; Tseten vd., 2022). Ayrıca gaz üretim verileri yalnızca toplam fermentasyonu değil, aynı zamanda fermentasyon hızını ve substratın mikrobiyal kullanım biçimini de yansıtabilmektedir. Bu yönüyle sistem, yemlerin sindirilebilirliği ve potansiyel enerji değeri hakkında da önemli ipuçları sunmaktadır (Dijkstra vd., 2005; Menke ve Steingass, 1988). Bununla birlikte, bu sistemlerin önemli sınırlılıkları da vardır. Öncelikle kesikli olmaları nedeniyle, rumende doğal olarak bulunan sürekli yem girişi, sıvı akışı, fermentasyon ürünlerinin uzaklaştırılması ve mikrobiyal adaptasyon gibi süreçler tam olarak taklit edilemez. Bu durum, özellikle uzun süreli katkı etkilerinin ve mikrobiyal denge değişimlerinin değerlendirilmesinde bir zayıflık yaratmaktadır (Dijkstra vd., 2005; Foster vd., 2023). Başka bir ifadeyle, kesikli gaz üretim sistemleri hızlı ve pratik sonuçlar sunar; ancak gerçek rumen ekosisteminin zaman içindeki karmaşık davranışını sınırlı düzeyde temsil eder. Yine de bu metot, araştırmanın ilk aşamasında hangi yemin ya da katkı maddesinin daha umut verici olduğunu belirlemek açısından son derece değerlidir. Bu nedenle çoğu durumda kesikli gaz üretim sistemi, daha ayrıntılı sistemlere veya *in vivo* doğrulamaya geçmeden önce kullanılan etkili bir başlangıç basamağı olarak görülmektedir (Dijkstra vd., 2005; Getachew vd., 1998; Theodorou vd., 1994).

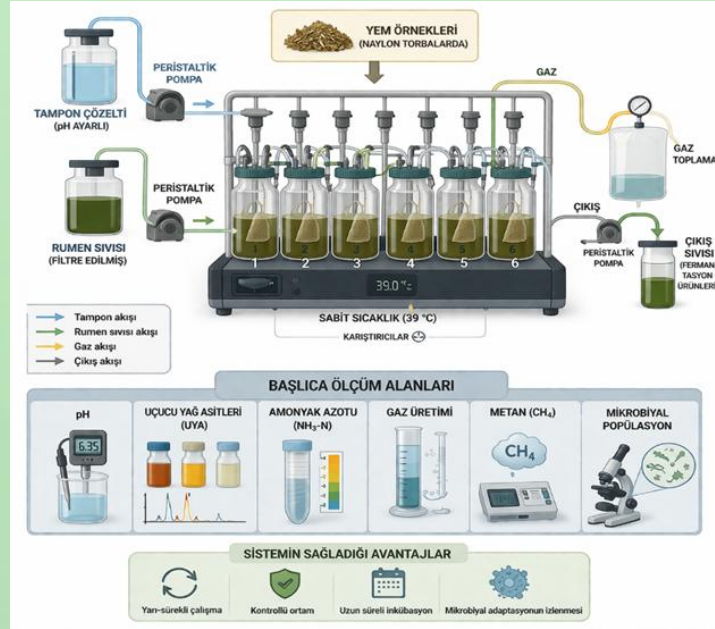


Şekil 1. Kesikli gaz üretim sisteminin şematik gösterimi.



Rusitec sistemi

Rusitec sistemi, klasik kesikli *in vitro* metotların sınırlılıklarını azaltmak amacıyla geliştirilmiş yarı-sürekli bir yapay rumen sistemidir. İlk olarak Czerkawski ve Breckenridge (1977) tarafından tanımlanan bu sistem, rumen sıvısı, tampon akışı ve yem torbalarının birlikte kullanıldığı, daha uzun süreli ve daha kontrollü bir fermentasyon ortamı sunmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle Rusitec, batch sistemlere göre rumen ekosistemine daha yakın bir *in vitro* yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Rusitec sisteminin temel çalışma prensibi ve başlıca ölçüm alanları Şekil 2’de şematik olarak sunulmuştur. Rusitec’in en önemli üstünlüklerinden biri, fermentasyon sürecinin zamana yayılarak izlenebilmesidir. Sistemde günlük yem değişimi yapılabilmekte, tampon çözelti düzenli şekilde sisteme verilebilmekte ve fermentasyon ürünleri belirli bir akış düzeni içinde uzaklaştırılabilmektedir (Czerkawski ve Breckenridge, 1977). Bu sayede yalnızca pH, amonyak azotu ve uçucu yağ asitleri gibi temel fermentasyon parametreleri değil, aynı zamanda gaz ve metan oluşumu ile mikrobiyal popülasyonlardaki değişimler de daha dengeli koşullarda değerlendirilebilmektedir (Deitmers vd., 2022; Musa vd., 2026). Bu yönüyle Rusitec sistemi, özellikle katkı maddelerinin etki mekanizmalarını anlamaya yönelik çalışmalarda önemli bir araçtır. Kesikli sistemlerde kısa süreli inkübasyon sonucu gözlenen etkiler, Rusitec’te daha uzun süreli fermentasyon boyunca test edilebilmekte ve mikrobiyal adaptasyonun olası etkileri daha net görülebilmektedir (Deitmers vd., 2022). Bu durum, özellikle metan azaltıcı katkılar, enzimler, bitkisel bileşikler ve organik asitlerin değerlendirilmesinde Rusitec’i değerli kılmaktadır (Musa vd., 2026; Öztürk vd., 2015). Ancak Rusitec sistemi de tüm yönleriyle gerçek rumeni temsil etmez. Canlı hayvandaki emilim süreçleri, sistemik metabolik yanıtlar, davranışsal düzenlemeler ve konakçı-fizyoloji etkileşimleri bu sistemde doğrudan yer almaz. Bu nedenle Rusitec, batch sistemlere göre daha gelişmiş ve daha güçlü bir *in vitro* yaklaşım olmakla birlikte, yine de *in vivo* doğrulamaya ihtiyaç duyan bir metot olarak değerlendirilmelidir (Deitmers vd., 2024; Dijkstra vd., 2005; Klevenhusen vd., 2026).



Şekil 2. Rusitec sisteminin şematik gösterimi.

Pratik açıdan bakıldığında Rusitec, kesikli sistemlere göre daha fazla ekipman, daha fazla iş gücü ve daha dikkatli teknik takip gerektirir. Bu nedenle her araştırma sorusu için ilk tercih olmayabilir. Ancak mekanizmaya yönelik çalışmalar, uzun süreli fermentasyon yanıtlarının izlenmesi ve mikrobiyal düzeyde daha ayrıntılı değerlendirme yapılması gereken durumlarda önemli avantaj sağlar (Deitmers vd., 2024).

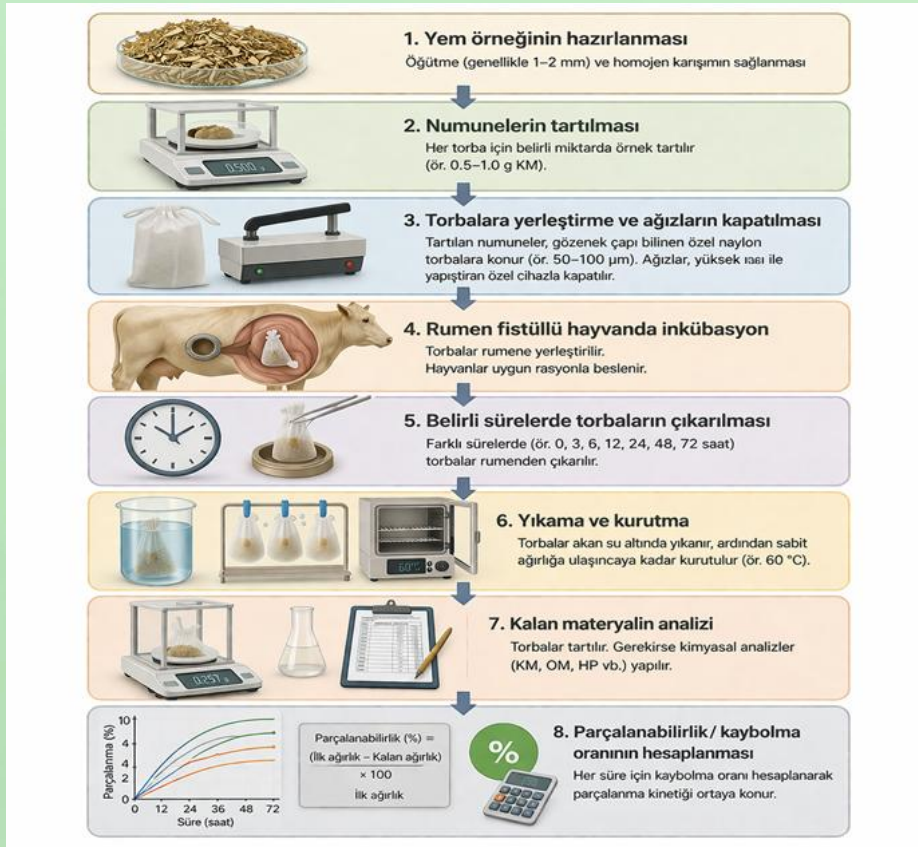
In vitro metotların genel değerlendirmesi

Genel olarak değerlendirildiğinde, *in vitro* metotlar rumen fermentasyon çalışmalarında hız, kontrol edilebilirlik ve ekonomik uygulanabilirlik açısından önemli avantajlar sunmaktadır. Kesikli gaz üretim sistemleri daha çok hızlı ön tarama ve başlangıç değerlendirmesi için uygunken, Rusitec sistemi daha kontrollü ve uzun süreli çalışmalar için öne çıkmaktadır. Bununla birlikte her iki yaklaşım da canlı hayvandaki tüm biyolojik süreçleri yansıtmadığı için, elde edilen bulguların araştırma amacına göre dikkatli yorumlanması gerekir. Bu nedenle *in vitro* metotlar, çoğu zaman tek başına son karar verdiren yöntemler olarak değil, daha ileri değerlendirmelere yön veren güçlü araştırma araçları olarak ele alınmalıdır. Araştırmanın hedefi hızlı karşılaştırma yapmaksa kesikli gaz üretim sistemleri; daha ayrıntılı fermentasyon ve mikrobiyal mekanizmaları incelemekse Rusitec sistemi daha uygun görünmektedir.



In situ metot

In situ metot, yemlerin rumen ortamındaki kaybolma ve parçalanma özelliklerinin doğrudan değerlendirilmesine olanak sağlayan önemli bir yaklaşımdır. Bu metotta yem örnekleri belirli gözenek çapına sahip torbalar içine yerleştirilir ve rumen fistülü bulunan hayvanların rumenine belirli sürelerle inkübe edilir. Daha sonra torbalar rumenden çıkarılır, yıkanır ve geriye kalan materyal analiz edilerek yemin ruminal kaybolma ya da parçalanma düzeyi hesaplanır. Bu yaklaşım özellikle kuru madde, organik madde ve protein parçalanabilirliğinin belirlenmesinde uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır (Foster vd., 2023; Nocek, 1988; Ørskov ve McDonald, 1979). *In situ* metodun temel uygulama basamakları ve değerlendirme mantığı Şekil 3'te şematik olarak gösterilmiştir. *In situ* metodun en önemli avantajı, yem materyalinin doğrudan rumen ortamında değerlendirilmesidir. Bu sayede yem, gerçek rumen sıvısı, doğal mikrobiyota ve rumen motilitesi ile temas eder. Bu özellik, özellikle yemlerin rumendeki parçalanma hızını ve potansiyel parçalanabilirliğini belirlemede önemli bir üstünlük sağlar. Bu nedenle *in situ* metot, ruminant rasyonlarının formülasyonunda ve özellikle protein kaynaklarının rumende yıkılabilirlik özelliklerinin değerlendirilmesinde değerli bir araç olarak kabul edilmektedir (Foster vd., 2023; Ørskov ve McDonald, 1979; van Soest, 1994).



Şekil 3. *In situ* metodun şematik gösterimi.

Bununla birlikte, *in situ* metot yalnızca güçlü yönleri olan bir yaklaşım değildir; bazı önemli sınırlılıkları da vardır. Öncelikle, bu metot rumende meydana gelen fermentasyon son ürünlerini doğrudan ölçmez. Başka bir ifadeyle, uçucu yağ asitleri, amonyak azotu, metan üretimi ya da gaz oluşumu gibi parametreler hakkında doğrudan bilgi sağlamaz. Bu nedenle *in situ* metot, rumen fermentasyonunun bütüncül değerlendirilmesinden çok, yemlerin ruminal parçalanabilirlik özelliklerinin belirlenmesi açısından daha anlamlıdır (Foster vd., 2023; Nocek, 1988; Vanzant vd., 1998). Bir diğer önemli nokta, sonuçların torba materyali, gözenek büyüklüğü, örnek öğütme derecesi, inkübasyon süresi, yıkama işlemi ve hayvana bağlı farklılıklardan etkilenebilmesidir. Bu nedenle *in situ* metodun güvenilir sonuçlar vermesi için standart uygulamaların dikkatle korunması gerekir. Aksi takdirde aynı yeme ait sonuçlar farklı çalışmalar arasında önemli ölçüde değişebilir. Özellikle torba içindeki örnek miktarı ile torba yüzey alanı arasındaki oran ve yıkama prosedürü, sonuçlar üzerinde belirgin etkiye sahip olabilmektedir (Foster vd., 2023; Nocek, 1988; Vanzant vd., 1998).

In situ metot, *in vitro* metotlarla karşılaştırıldığında daha yüksek biyolojik gerçeklik sunar; çünkü değerlendirme doğrudan rumen içinde yapılır. Buna karşılık, *in vivo* çalışmalara göre daha dar bir bilgi alanı sağlar; çünkü hayvan performansı, metabolik yanıtlar veya ürün kalitesi gibi sonuçları doğrudan yansıtmaz. Bu yönüyle *in situ* metot, özellikle yemlerin rumendeki davranışını anlamada güçlü, fakat fermentasyonun tüm çıktıları hakkında sınırlı bilgi veren bir ara yaklaşım olarak değerlendirilebilir. Uygulama alanı bakımından bakıldığında,



in situ metot özellikle ruminant yemlerinde kuru madde, organik madde ve protein parçalanabilirliği çalışmalarında öne çıkmaktadır. Bunun yanında, farklı yem işleme tekniklerinin, katkı maddelerinin veya protein koruma yöntemlerinin ruminal yıkılabilirlik üzerine etkilerinin incelenmesinde de yararlı sonuçlar vermektedir. Ancak metan oluşumu, mikrobiyal popülasyon yapısı ya da uzun süreli fermentasyon dinamikleri gibi konular söz konusu olduğunda, bu metot tek başına yeterli değildir ve çoğu zaman *in vitro* veya *in vivo* yaklaşımlarla birlikte değerlendirilmesi gerekir.

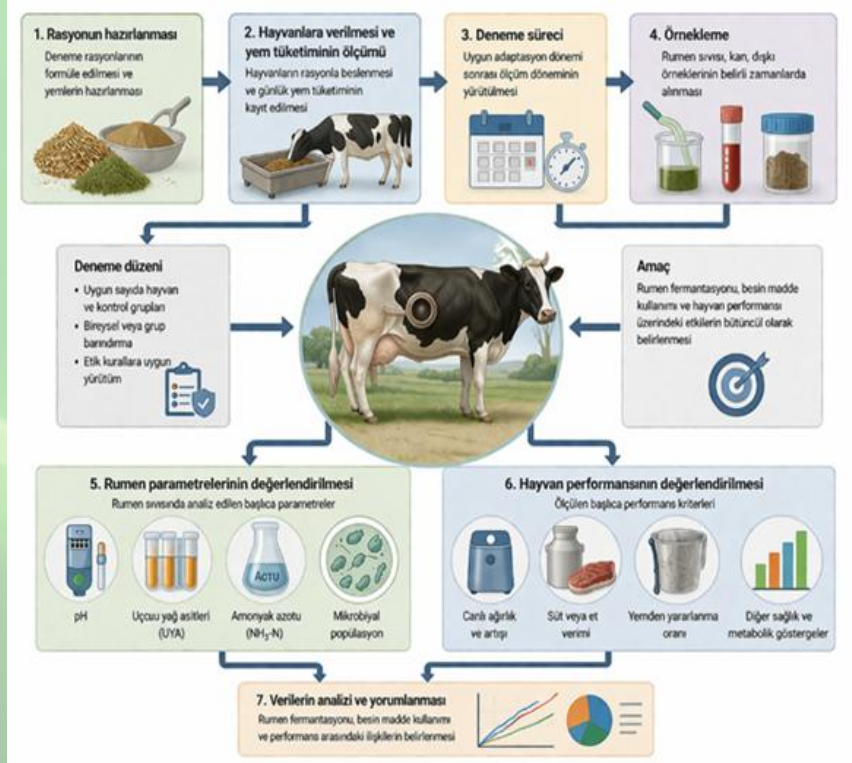
Genel olarak değerlendirildiğinde, *in situ* metot rumen fermentasyon çalışmalarında özellikle yemlerin ruminal parçalanabilirliğini ortaya koymak için güçlü ve yerleşik bir araçtır. Ancak sağladığı bilgi daha çok substrat kaybolması ve parçalanma düzeyi ile sınırlı olduğu için, rumen ekosisteminin tamamını açıklayan bir metot olarak değil, belirli araştırma sorularına yönelik özel bir yaklaşım olarak ele alınmalıdır.

***In vivo* metot**

In vivo metotlar, rumen fermentasyonu ve besin maddelerinin değerlendirilmesini doğrudan canlı hayvan üzerinde inceleyen yaklaşımlardır. Bu metotlar, ruminant besleme araştırmalarında en yüksek biyolojik gerçekliği sunması nedeniyle çoğu uygulamada referans yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Hristov vd., 2013; Tedeschi vd., 2022). Çünkü elde edilen veriler yalnızca rumen düzeyindeki fermentatif süreçleri değil, aynı zamanda sindirim, emilim, metabolizma ve hayvan performansı gibi bütüncül yanıtları da kapsamaktadır (Van Soest, 1994; Hristov vd., 2013; Foster vd., 2023). *In vivo* metodda yem tüketiminden performans ve rumen parametrelerinin değerlendirilmesine kadar olan temel süreçler Şekil 4'te şematik olarak gösterilmiştir.

Bu metodun en önemli avantajı, elde edilen sonuçların doğrudan pratik hayvancılık koşullarına uygulanabilir olmasıdır. *In vitro* ve *in situ* metotlarda gözlenen etkiler her zaman hayvan performansına aynı şekilde yansımayaabilirken, *in vivo* çalışmalar bu boşluğu doldurarak sonuçların gerçek üretim sistemleri açısından anlamını ortaya koyar. Bu nedenle özellikle yem katkı maddelerinin etkinliği, metan azaltım stratejileri ve rasyon optimizasyonu gibi konularda çoğu uygulamada *in vivo* doğrulama ile güçlendirilir (Hristov vd., 2013; Tedeschi vd., 2022).

Bununla birlikte, *in vivo* metotların bazı önemli sınırlılıkları da bulunmaktadır. Öncelikle bu çalışmalar yüksek maliyet, uzun deneme süresi ve yoğun iş gücü gerektirir. Ayrıca hayvanlar arası biyolojik varyasyonun yüksek olması, deneysel hassasiyeti azaltabilir ve daha fazla tekrar gerektirebilir. Etik kurallar ve hayvan refahı gereklilikleri de bu çalışmaların planlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle *in vivo* metotlar, genellikle daha önce *in vitro* veya *in situ* metotlarla ön değerlendirmesi yapılmış araştırma konularını doğrulama amacıyla kullanılabilir (Foster vd., 2023; Percie du Sert vd., 2020; Tedeschi vd., 2022).



Şekil 4. *In vivo* metodun şematik gösterimi.

In vivo metotlar, sağladıkları kapsamlı veri yapısı sayesinde yalnızca rumen fermentasyonunu değil, aynı zamanda bu fermentasyonun hayvan performansına ve ürün kalitesine olan etkilerini de ortaya koymaktadır. Örneğin, bir yem katkısının rumende metan üretimini azaltması tek başına yeterli bir sonuç değildir; bu etkinin



hayvanın verim performansını nasıl etkilediği de önemlidir. Bu tür bütüncül değerlendirmeler yalnızca *in vivo* çalışmalarla mümkün olmaktadır (Hristov vd., 2013; Tedeschi vd., 2022). Genel olarak değerlendirildiğinde, *in vivo* metotlar yüksek doğruluk ve uygulama değeri sunmakla birlikte, maliyet ve zaman açısından sınırlayıcıdır. Bu nedenle rumen fermentasyon çalışmalarında genellikle *in vitro* → *in situ* → *in vivo* şeklinde ilerleyen kademeli bir araştırma yaklaşımı benimsenmektedir. Bu yaklaşım, hem kaynakların etkin kullanımını sağlar hem de elde edilen sonuçların bilimsel güvenilirliğini artırır. Tablo 1’de görüldüğü üzere, rumen fermentasyon çalışmalarında kullanılan metotlar birbirinin alternatifi olmaktan çok, farklı araştırma amaçlarına hizmet eden tamamlayıcı yaklaşımlar olarak değerlendirilmelidir. Araştırma sorusuna göre uygun metodun seçilmesi, elde edilen sonuçların güvenilirliği ve yorumlanabilirliği açısından belirleyici öneme sahiptir.

Rumen fermentasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan metotlar, sağladıkları veri türü, biyolojik gerçeklik düzeyi ve uygulama alanları bakımından önemli farklılıklar göstermektedir. Özellikle *in vitro* metotların kesikli (batch) ve yarı-sürekli (Rusitec) sistemler olarak ayrılması, metot seçiminin araştırma amacına bağlı olarak değiştiğini açıkça ortaya koymaktadır. Bu kapsamda, söz konusu metotların temel özellikleri ile avantaj ve sınırlılıkları Tablo 1’de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Tablo 1. Rumen fermentasyon çalışmalarında kullanılan *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* metotların karşılaştırmalı değerlendirilmesi

Karşılaştırma ölçütü	<i>İn vitro</i> metot*		<i>İn situ</i> metot	<i>İn vivo</i> metot
	Batch (<i>in vitro</i> gaz üretim sistemi)	Rusitec (yarı-sürekli <i>in vitro</i> sistem)		
Temel prensip	Yem örneklerinin rumen sıvısı ve tampon ile kesikli anaerobik inkübasyonu sonucu gaz üretiminin ölçülmesine dayanır	Rumen ortamının yarı-sürekli akış sistemi ile simüle edilerek uzun süreli fermentasyonun izlenmesine dayanır	Yem örneklerinin gözenekli torbalarda doğrudan rumende inkübasyonu ile parçalanabilirliğinin belirlenmesine dayanır	Rumen fermentasyonu ve hayvan yanıtlarının doğrudan canlı hayvan üzerinde değerlendirilmesine dayanır
Alt uygulamalar	Basınç sensörlü gaz üretim sistemleri, şırınga veya şişe inkübasyonları	Çok odacıklı fermentör sistemleri (Rusitec)	Naylon torba tekniği	Besleme denemeleri, rumen örnekleme, emisyon ölçümleri
Başlıca avantajı	Hızlı, ekonomik ve çok sayıda örneğin ön taranmasına uygun olması	Daha stabil ve gerçekçi fermentasyon ortamı ile mekanizma çalışmalarına uygun olması	Yemlerin gerçek rumen ortamında parçalanabilirliğini göstermesi	En yüksek biyolojik gerçekliği ve uygulama değerini sağlaması
Başlıca sınırlılığı	Süreklilik ve mikrobiyal adaptasyonun sınırlı olması	Kurulum ve işletim zorluğu, yüksek maliyet	Fermentasyon ürünleri ve mikrobiyal süreçler hakkında sınırlı bilgi	Maliyetli, zaman alıcı ve biyolojik varyasyona açık olması
En uygun kullanım alanı	Ön tarama, katkı maddesi değerlendirmesi, fermentasyon kinetiği	Mekanizma çalışmaları, mikrobiyal etkileşimler, metan araştırmaları	Yemlerin ruminal parçalanabilirliğinin belirlenmesi	Nihai doğrulama, performans ve saha uygulamaları
Biyolojik gerçeklik, maliyet, işgücü ve etik gereksinimi	Düşük	Orta-yüksek	Orta	Yüksek
DeneySEL kontrol düzeyi	Çok yüksek	Yüksek	Orta	Düşük-orta
Tekrarlanabilirlik	Yüksek	Orta-yüksek	Orta	Daha düşük
Deneme süresi	Kısa	Orta-uzun	Orta	Uzun
Çok sayıda örneğin taranması	Çok uygun	Sınırlı	Sınırlı	Uygun değil
Fermentasyon son ürünleri (pH, UYA, NH ₃ -N)	Uygun	Çok uygun	Sınırlı	Uygun
Gaz ve metan ölçümü	Uygun	Çok uygun	Uygun değil / çok sınırlı	En uygun
Mikrobiyal popülasyonların değerlendirilmesi	Sınırlı-uygun	Çok uygun	Sınırlı	Uygun
Yem parçalanabilirliğinin değerlendirilmesi	Dolaylı	Dolaylı-gelişmiş	En uygun	Uygun ancak zahmetli
Uzun süreli fermentasyon dinamikleri	Sınırlı	Çok uygun	Sınırlı	Uygun
Hayvan performansı ile ilişki kurulması	Kurulamaz	Kurulamaz	Sınırlı	Doğrudan kurulabilir

**In vitro* metotlar, kesikli (batch) ve yarı-sürekli (Rusitec) sistemler olarak farklı özellikler göstermekte olup, araştırma amacına bağlı olarak farklı avantajlar sunmaktadır.



Sonuç

Rumen fermentasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan *in vitro*, *in situ* ve *in vivo* metotlar, farklı düzeylerde bilgi sağlayan ve birbirini tamamlayan yaklaşımlar olarak öne çıkmaktadır. Bu çalışmada ele alınan metotlar arasında özellikle *in vitro* sistemlerin kendi içinde kesikli (batch) ve yarı-sürekli (Rusitec) olarak ayrılması, metot seçiminin araştırma amacına bağlı olarak ne kadar kritik olduğunu ortaya koymaktadır. Batch sistemler hızlı, ekonomik ve çok sayıda örneğin ön değerlendirilmesine olanak sağlarken, Rusitec sistemi daha stabil ve uzun süreli fermentasyon süreçlerini inceleme imkânı sunarak mikrobiyal etkileşimlerin ve mekanizmaların anlaşılmasında önemli avantajlar sağlamaktadır.

In situ metot, yemlerin rumende gerçek ortamda parçalanabilirliğini ortaya koyması bakımından güçlü bir araç olmakla birlikte, fermentasyon son ürünleri ve mikrobiyal dinamikler hakkında sınırlı bilgi sağlamaktadır. Buna karşılık, *in vivo* metotlar yalnızca rumen fermentasyonunu değil, aynı zamanda hayvan performansı ve ürün kalitesi gibi bütüncül yanıtları değerlendirebilmesi nedeniyle en yüksek biyolojik gerçekliği sunmaktadır. Ancak bu metotların yüksek maliyet, uzun deneme süresi ve etik gereklilikler gibi önemli kısıtları bulunmaktadır.

Bu bağlamda, hiçbir metot tek başına rumen fermentasyon süreçlerini tam olarak açıklayabilecek yeterlilikte değildir. En güvenilir ve anlamlı sonuçlara ulaşabilmek için metotların birbirinin alternatifi olarak değil, tamamlayıcı olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Özellikle *in vitro* metotlarla elde edilen ön bulguların *in situ* ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi, hem bilimsel doğruluğu artırmakta hem de elde edilen sonuçların pratik hayvancılık uygulamalarına aktarılabilirliğini güçlendirmektedir.

Sonuç olarak, rumen fermentasyon çalışmalarında metot seçimi, araştırma sorusunun niteliğine, beklenen çıktı türüne ve mevcut kaynaklara bağlı olarak dikkatle planlanmalıdır. Gelecekte yapılacak çalışmaların, farklı metotları entegre eden bütüncül yaklaşımlar üzerine odaklanması, rumen ekosisteminin daha doğru anlaşılmasına ve sürdürülebilir ve verimli hayvansal üretim stratejilerinin geliştirilmesine bilimsel bir temel oluşturacaktır.

Kaynaklar

- Czerkawski, J. W., & Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 38(3), 371-384. <https://doi.org/10.1079/BJN19770102>
- Dijkstra, J., Kebreab, E., Bannink, A., France, J., & López, S. (2005). Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124, 561-578. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.048>
- Foster, J. L., Smith, W. B., Rouquette, F. M., & Tedeschi, L. O. (2023). Forages and pastures symposium: an update on in vitro and in situ experimental techniques for approximation of ruminal fiber degradation. *Journal of Animal Science*, 101, skad097. <https://doi.org/10.1093/jas/skad097>
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1998). In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3-4), 261-281. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00189-2)
- Goel, G., & Makkar, H. P. S. (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical Animal Health and Production*, 44, 729-739. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9966-2>
- Hristov, A. N., Oh, J., Firkins, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H. P. S., Adesogan, A. T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P. J., Henderson, B., & Tricarico, J. M. (2013). Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*, 91(11), 5045-5069. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6583>
- Mahboubi, A., Holmström, K., Parchami, M., Uwineza, C., Agnihotri, S., Jomnonkhaow, U., ... & Taherzadeh, M. J. (2026). Volatile fatty acids in ruminants and their role as feed additives: a review. *Journal of Applied Animal Research*, 54(1), 2630934. <https://doi.org/10.1080/09712119.2026.2630934>
- Martínez, M. E., Ranilla, M. J., Tejido, M. L., Ramos, S., & Carro, M. D. (2010). Comparison of fermentation of diets of variable composition and microbial populations in the rumen of sheep and Rusitec fermenters. I. Digestibility, fermentation parameters, and microbial growth. *Journal of dairy science*, 93(8), 3684-3698. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2933>
- Menke, K. H., & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
- Moss, A. R., Jouany, J. P., & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*, 49(3), 231-253. <https://doi.org/10.1051/animres:2000119>
- Nocek, J. E. (1988). In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. *Journal of Dairy Science*, 71(8), 2051-2069. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79781-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79781-7)
- Ørskov, E. R., & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92(2), 499-503. <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>
- Purba, R. A. P., & Sangsawad, P. (2025). Meta-analysis of dietary interventions for enteric methane mitigation in ruminants through methodological advancements and implementation pathways. *Veterinary Sciences*, 12(4), 372. <https://doi.org/10.3390/vetsci12040372>





- Qi, W., Xue, M. Y., Jia, M. H., Zhang, S., Yan, Q., & Sun, H. Z. (2024). Understanding the functionality of the rumen microbiota: searching for better opportunities for rumen microbial manipulation. *Animal Bioscience*, 37(2), 370-384. <https://doi.org/10.5713/ab.23.0308>
- Russell, J. B., & Rychlik, J. L. (2001). Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*, 292(5519), 1119-1122. <https://doi.org/10.1126/science.1058830>
- Shinkai, T., Takizawa, S., Fujimori, M., & Mitsumori, M. (2024). The role of rumen microbiota in enteric methane mitigation for sustainable ruminant production. *Animal bioscience*, 37(2), 360. <https://doi.org/10.5713/ab.23.0301>
- Tedeschi, L. O., Abdalla, A. L., Alvarez, C., Anuga, S. W., Arango, J., Beauchemin, K. A., ... & Kebreab, E. (2022). Quantification of methane emitted by ruminants: a review of methods. *Journal of Animal Science*, 100(7), skac197. <https://doi.org/10.1093/jas/skac197>
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3-4), 185-197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Tseten, T., Sanjorjo, R. A., Kwon, M., & Kim, S. W. (2022). Strategies to mitigate enteric methane emissions from ruminant animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 269-277. <https://doi.org/10.4014/jmb.2202.02019>
- Ungerfeld, E. M. (2020). Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. *Frontiers in microbiology*, 11, 589. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00589>
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell university press.
- Vanzant, E. S., Cochran, R. C., & Titgemeyer, E. C. (1998). Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of Animal Science*, 76(10), 2717-2729. <https://doi.org/10.2527/1998.76102717x>
- Öztürk, H., Demirbaş, Y. S., Aydın, F. G., Pişkin, İ., Ünler, F. M., & Emre, M. B. (2015). Effects of hydrolyzed and live yeasts on rumen microbial fermentation in a semicontinuous culture system (Rusitec). *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 39(5), 556-559. <https://doi.org/10.3906/vet-1506-16>
- Musa, S. A. A., Demirtaş, A., & Öztürk, H. (2026). Impact of lysozyme on ruminal fermentation and microbial population in Rusitec fermenters. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 73(2), 145-153. <https://doi.org/10.33988/auvfd.1725307>
- Deitmers, J. H., Gresner, N., & Südekum, K. H. (2022). Opportunities and limitations of a standardisation of the rumen simulation technique (RUSITEC) for analyses of ruminal nutrient degradation and fermentation and on microbial community characteristics. *Animal Feed Science and Technology*, 289, 115325. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115325>
- Mizrahi, I., Wallace, R. J., & Moraïs, S. (2021). The rumen microbiome: balancing food security and environmental impacts. *Nature Reviews Microbiology*, 19(9), 553-566. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00543-6>
- Newbold, C. J., & Ramos-Morales, E. (2020). Ruminal microbiome and microbial metabolome: effects of diet and ruminant host. *Animal*, 14(S1), s78-s86. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003252>
- Deitmers, J. H., Hartinger, T., Gresner, N., & Südekum, K. H. (2024). Comparison of ruminal fermentation characteristics of two common forages using a coupled in vivo-in situ approach and the in vitro rumen simulation technique RUSITEC. *Animal Feed Science and Technology*, 309, 115900. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.115900>
- Klevenhusen, F., Weiss, M., Kehraus, S., Amelchanka, S., Hünnerberg, M., von Soosten, D., ... & Breves, G. (2026). Quantifying the degree of variance of the rumen simulation technique (RUSITEC): An interlaboratory study. *Livestock Science*, 105957. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2026.105957>
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., ... & Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 40(9), 1769-1777. <https://doi.org/10.1177/0271678X20943823>

