

اثرات دفعات خوراک‌دهی در اوایل شیردهی بر بازده تولیدی گاوهای شیرده هلشتاین

سید مهدی کریم زاده^{۱*} - حمید امانلو^۲ - اکبر نیکخواه^۳ - محمدعلی سیرجانی^۴ - غلامرضا نوری^۵

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۴

چکیده

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات دفعات خوراک‌دهی بر توان تولیدی گاوهای شیرده تغذیه شده با جیره‌ای کاملاً مخلوط بر پایه یونجه خرد شده انجام گرفت. طی این آزمایش ۸ رأس گاو چند بار زایش کرده هلشتاین (اوایل زایش) که در جایگاه‌های انفرادی (۴ × ۳ متر) نگهداری می‌شدند، یک بار در روز (۱X) در ساعت ۰۷:۰۰ صبح، یا ۴ بار در روز (۴X) در ساعات ۰۷:۰۰، ۱۳:۰۰، ۱۹:۰۰ و ۰۱:۰۰ جیره کاملاً مخلوط دریافت کردند. آزمایش در قالب یک طرح گردان ۲ × ۲ با ۲ دوره ۲۰ روزه انجام شد. هنگامی که ۴X به ۱X تغییر پیدا کرد، مصرف ماده خشک از ۲۰/۰ به ۲۱/۱ کیلوگرم در روز و همچنین انرژی خالص شیردهی نیز از ۳۴/۴ به ۳۶/۴ افزایش پیدا کرد. درصد باقیمانده خوراک به TMR عرضه شده (۷/۶ درصد در مقابل ۱۰ درصد) تولید شیر (۳۱/۵ در مقابل ۳۰/۷ کیلوگرم در روز)، NEL شیر خروجی (۲۱/۷ در مقابل ۲۱/۴ مگاکالری در روز)، درصد چربی (۳/۵ در مقابل ۳/۶ درصد)، درصد پروتئین (۳/۲ در مقابل ۳/۲ درصد)، نسبت NEL شیر به NEL مصرفی (۰/۶۰ در مقابل ۰/۶۲) و pH مدفوع (۶/۶۴ در مقابل ۶/۶۲) به ترتیب بین دو تیمار ۱X و ۴X تفاوت معنی‌داری نداشتند. pH ادرار در ۴X نسبت به ۱X بیشتر بود (۸/۱۲ در مقابل ۸/۰۰) و انسولین سرم تمایل به افزایش داشت (۱۰/۹ در مقابل ۶/۹ میکرو واحد بین المللی در میلی لیتر) اسیدهای چرب آزاد سرم نیز در پاسخ به ۴X افزایش یافت. بنابراین، در شرایط خوراک‌دهی و نگهداری غیر رقابتی افزایش عرضه دفعات خوراک‌دهی در اوایل شیردهی مزیت تولیدی و متابولیکی ندارد.

واژه‌های کلیدی: دفعات خوراک‌دهی، اوایل شیردهی، رفتار، هلشتاین، جویدن

مقدمه

یا دو بار خوراک دادن در روز درصد چربی و تولید شیر به ترتیب به میزان ۷/۳ و ۲/۷ درصد افزایش یافت. دی‌وریس و همکاران (۴)، بررسی کردند که دو بار خوراک‌دهی در برابر یک بار در روز و چهار بار در برابر دو بار در روز موجب افزایش خوراک مصرفی گردید. هارت (۱۱)، و سوتان (۲۸)، نشان دادند که افزایش دفعات خوراک‌دهی می‌تواند باعث حفظ نسبت استات به پرپیونات شده، که این امر افزایش درصد چربی شیر را در پی دارد. همچنین فیلیپس و ریند (۲۴)، بررسی کردند که با کاهش تعداد دفعات خوراک‌دهی درصد چربی شیر افزایش می‌یابد، که این امر به دلیل افزایش هضم فیبر بود. رایبسون و مک نیون (۲۶)، در پژوهشی گزارش کردند که وقتی گاوها با کاه جو و چند بار در روز تغذیه شدند؛ مقادیر شیر، پروتئین و لاکتوز شیر افزایش یافت. طی پژوهش‌هایی که با جیره‌های کاملاً مخلوط شده انجام پذیرفت، افزایش در تعداد خوراک‌دهی از ۱ به ۲ به ۴ تا ماده خشک مصرفی را افزایش داد، اما تأثیری بر تولید شیر نداشت (۱۹ و ۲۰). در پژوهش مانتیساری و همکاران (۲۲)، مشخص گردید که مصرف خوراک افزایش یافته گاوها در نتیجه تغییر دفعات خوراک‌دهی منجر به افزایش تولید شیر نشد. این امکان‌پذیر است که با خوراک‌دهی یک بار در روز، مقدار خوراک مصرفی بیشتر و تغییرات در تخمیر شکمبه‌ای، هضم‌پذیری جیره را تحت تأثیر قرار دهد. افزایش وعده‌های خوراک‌دهی موجب بهبود هضم کربوهیدرات‌های

با توجه به تمایلات اقتصادی در مزارع پرورش گاو شیری، افزایش دفعات خوراک‌دهی می‌تواند به عنوان یکی از مسایل حایز اهمیت مورد بررسی و استفاده قرار گیرد. تغییر دفعات خوراک‌دهی، توان تولیدی گاو را تحت تأثیر قرار می‌دهد. رفتار خوراک خوردن گاوهای پر تولید متفاوت از رفتار خوراک خوردن گاوهای کم تولید می‌باشد (۸). گریتر و همکاران (۹)، نتیجه گرفتند که روش‌های خورانبیدن خوراک مصرف خوراک سوا کردن بخش‌های جیره و رقابت بر سر مصرف خوراک را تحت تأثیر قرار می‌دهد. حسین خانی و همکاران (۱۳)، اعلام کردند مصرف خوراک در گاوهای شیری به اندازه قطعات خوراک بستگی دارد و گاوها با توجه به جیره مصرفی به سوا کردن بخش‌های مورد دلخواه جیره می‌پردازند که نتایج آنها با سایر پژوهشگران مطابقت داشته است (۳). گیبسون (۶)، گزارش کرد، که با افزایش دفعات خوراک‌دهی به ۴ بار یا بیشتر در مقایسه با یک

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی ساری

*- نویسنده مسئول: (Email: smehdyk@gmail.com)

۲-۳-۴-۵ به ترتیب دانشیار، استادیار، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

اختصاص داده شدند. این پژوهش به مدت ۴۰ روز در ماه‌های مرداد و شهریور سال ۱۳۸۹ انجام گرفت. طرح آزمایش در قالب یک طرح گردان ۲×۲ با دو دوره ۲۰ روزه بود. هر دوره شامل ۱۴ روز سازگاری و ۶ روز نمونه گیری بود. علوفه مورد استفاده در آزمایش به صورت یکسان در تمام جیره‌ها فقط یونجه بود (NEL یونجه ۱/۲ مگا کالری در کیلوگرم، پروتئین خام یونجه ۱۳/۸ درصد، $PeNDF > 8mm$ (فیبر موثر فیزیکی) ۱۲/۵۵ و $PeNDF > 1.18mm$ ۲۳/۸۹ درصد بود) که به صورت هفتگی در قطعات با طول ۱۲ میلی‌متر خرد شده و به صورت مخلوط با کنسانتره به گاوها خورانیده می‌شد که این امر به منظور تامین فیبر کافی و عدم بروز کاهش pH شکمبه در جیره صورت گرفت. خوراک‌دهی گاوهای ۱x بار در روز در ساعت ۷ صبح انجام گرفت و خوراک‌دهی گاوهای ۴x در ساعات ۷، ۱۳، ۲۰ و ۱ انجام گرفت. میانگین نظری طول علوفه یونجه به طور متوسط حدود ۱۲ سانتی‌متر بود. جیره‌ها در حد اشتها در اختیار گاوها قرار گرفتند به گونه‌ای که حدود ۱۰-۵ درصد از خوراک روز قبل در آخور باقی بماند. گاوها در طول شبانه روز دسترسی آزاد به آب خنک و تمیز داشتند. TMR مورد استفاده حاوی ۸۱ درصد ماده خشک، ۱۷/۶ درصد پروتئین خام و ۲۷/۳ درصد NDF بود. مقدار و اجزای تشکیل دهنده جیره و ترکیبات مواد مغذی جیره گاوها در جدول شماره ۱ و ترکیب شیمیایی علوفه یونجه و جیره کاملاً مخلوط (بر اساس ماده خشک) در جدول شماره ۲ آورده شده است.

غیر نشاسته‌ای (NSC) شده، که این امر موجب افزایش سرعت تخمیر میکروبی و کاهش pH شکمبه‌ای می‌شود (۱۶)، و با افزایش دفعات خوراک‌دهی می‌توان از افت ناگهانی pH شکمبه‌ای جلوگیری نموده و آن را کنترل نمود (۲۷). کاهش در pH شکمبه نیز می‌تواند فعالیت باکتری‌های تجزیه کننده سلولز را کاهش داده، در حالی که رشد باکتری‌های تجزیه کننده نشاسته افزایش می‌یابد (۲۱). این امر می‌تواند منجر به افزایش تولید پروبیونات (۱۲ و ۱۶)، و بنابراین کاهش نسبت استات به پروبیونات گردد. با توجه به بررسی‌هایی که پیش از این صورت گرفتند، هدف کلی از انجام این پژوهش بررسی اثر دفعات خوراک‌دهی در گاوهای تازه زا در دفعات یک و چهار بار در روز می‌باشد. طی مراحل انجام آزمایش نیز مقدار خوراک مصرفی و رفتارهای مصرف خوراک ارزیابی قرار گرفته و نمونه‌های خون جهت بررسی فراسنجه‌های آن تهیه گردید.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این آزمایش تعداد ۸ رأس گاو چند بار زایش کرده هلشتاین با میانگین وزنی 577 ± 45 کیلوگرم و امتیاز نمره بدنی $2/5 \pm 0/17$ و تولید شیر روزانه $33/8 \pm 2/5$ و روزهای شیردهی 15 ± 1 انتخاب شدند. هفته پیش از شروع طرح گاوها از لحاظ سلامت مورد ارزیابی قرار گرفته و پس از آن و پیش از آغاز آزمایش به طور تصادفی به هر یک از دو تیمار دفعات خوراک‌دهی (یک بار خوراک‌دهی و چهار بار خوراک‌دهی در روز) با یک جیره پایه

جدول ۱- اجزاء جیره غذایی گاوها بر اساس ماده خشک

ماده خوراکی	درصد ماده خوراکی
یونجه خشک	۳۶/۷۰
دانه جو آسیاب شده	۱۸/۲۶
دانه ذرت آسیاب شده	۱۴/۷۴
کنجاله سویا	۱۰/۱۲
کنجاله تخم پنبه	۴/۰۴
تخم پنبه کامل با پوسته	۷/۱۴
پودر ماهی	۳/۰۶
پودر صابونی اسید چرب ^۱	۲/۷۵
جوش شیرین	۰/۶۹
کربنات کلسیم	۰/۷۹
دی فسفات کلسیم	۰/۵۳
نمک	۰/۲۷
پیش مخلوط ویتامین و مواد معدنی ^۲	۰/۹۰

۱- شامل ترکیب: میستریک اسید ۱/۵٪، پالمیتیک اسید ۴۴٪، استئاریک اسید ۵٪، اولئیک اسید ۴۰٪ و لینولئیک اسید ۹،۵٪ - ۲- مکمل مینراله در هر کیلوگرم شامل ۱۹۶ گرم کلسیم، ۵۰۰۰۰ IU ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ IU ویتامین D3، ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۹۶ گرم فسفر، ۱۹ گرم منیزیم، ۴۶ گرم سدیم، ۳۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۳۰۰ میلی‌گرم مس، ۲۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۰۰ میلی‌گرم کبالت، ۳۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۱۰۰ میلی‌گرم ید، ۱ میلی‌گرم سلنیوم، ۴۰۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدان.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی علوفه یونجه و جیره کاملاً مخلوط (بر اساس ماده خشک)

مواد غذایی	یونجه	جیره کاملاً مخلوط (TMR)
ماده خشک (درصد)	۰/۹۳	۰/۸۱
پروتئین خام (درصد)	۱۲/۸	۱۷/۶
%NDF	۴۵	۲۷/۳
^۱ peNDF>8	۵۳/۱	۱۹/۷
^۲ peNDF>1.18	۲۷/۹	۸/۱
^۳ NEL, Mcal/kg	۱/۲	۱/۷۲
DCAD (میلی اکی والان بر کیلوگرم)	۳۴۰	۲۱۸

۱- درصد NDF، TMR یا علوفه مجموع توسط Pef یا بخش ذرات باقیمانده در الک‌های با منافذ ۱۹ میلی متر و ۸ میلی متر از الک (۱۳)، ۲- محتوای NDF، TMR یا علوفه، مجموع عوامل فیزیکی موثر آن یا بخش ذرات باقیمانده در الک‌هایی با منافذ ۱۹ میلی متر، ۸ میلی متر، ۱/۱۸ میلی متر از الک (۱۳). ۳- براساس تخمین NRC ۲۰۰۱

منتقل شده و به مدت یک شب در دمای ۴۵۰ درجه سانتی‌گراد خاکستری شد. بوته و محتویات آن در دستگاه دسیکاتور خشک گشته و وزن شدند (WF). بوته چینی دوباره بعد از خالی شدن وزن شد (WE). فرمول محاسبه به صورت زیر است:

$$AIA = \frac{WF - WE}{WS} \times 100$$

پس از تعیین خاکستر نامحلول در اسید نمونه‌های جیره و مدفوع، قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام، محاسبه شده است. جیره‌ها از طریق فرمول ذیل محاسبه گردید.

= قابلیت هضم ظاهری ماده مغذی

$$\left[\frac{\text{درصد ماده مغذی در مدفوع}}{\text{درصد ماده مغذی در خوراک}} \times \frac{\text{درصد AIA در مدفوع}}{\text{درصد AIA در خوراک}} \right]$$

در این آزمایش گاوها در جایگاه‌هایی با ابعاد ۳×۴ نگهداری شده و آب نیز به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داشت؛ همچنین به منظور جلوگیری از بروز مشکلات پا و لنگش، گاوها روزانه ۱ ساعت پیش از شیردوشی صبح، ظهر و شب در بهار بند آزاد می‌شدند. جایگاه روزانه ۳ بار در روز تمیز و ضدعفونی می‌شد. شیردوشی ۳ بار در روز در ساعات ۶، ۱۴ و ۲۰ انجام می‌گرفت.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های خوراک مصرفی

خوراک مصرفی به طور روزانه در تمام طول دوره‌های آزمایشی برای تمام گاوها ثبت شد. باقیمانده خوراک در اول صبح روز بعد، وزن شده و جهت تعیین ماده خشک مصرفی روزانه گاوها از خوراک ارائه شده روز پیش کسر گردید. پس از وزن کشی باقیمانده خوراک برای تعیین میزان ماده خشک مصرفی در پایان هر روز از باقیمانده خوراک‌ها نمونه‌برداری شده و به صورت تصادفی نمونه‌گیری شده و برای تعیین ماده خشک در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد

ماده خشک جیره‌ها از طریق خشک کردن در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در آون به مدت ۲۴ ساعت تعیین شد. مقدار مواد آلی از طریق محاسبه تفاوت بین مقدار ماده خشک و خاکستر تعیین شد. مقدار دیواره سلولی نیز به روش ون‌سست و همکاران (۲۹)، تعیین شد. محاسبه میزان سایر مواد مغذی به وسیله روش تجزیه تقریبی صورت گرفت و مقادیر کربوهیدرات‌های غیرالیافی به وسیله تفاوت محاسبه گردید. به منظور نمونه‌برداری از مدفوع جهت آزمایش‌های تغذیه‌ای، تعیین قابلیت هضم و تعیین pH، پس از شروع طرح در آغاز هفته سوم طی ۲ روز در ساعت ۱۲ نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌گیری از طریق برداشت مستقیم مدفوع از راست‌روده در حدود ۱۰۰ گرم انجام گرفت. برای اندازه‌گیری pH، مدفوع به نسبت ۱:۱ با آب مقطر مخلوط گشت (۱۰). تا با همگنی قابل قبول بلافاصله pH آن تعیین شود. دستگاه pH متر (CG 824) پیش از استفاده، pH متر با محلول بافری با pH=4 و pH=7 براساس دمای محیط تنظیم شد. همچنین مقدار ۵۰ گرم مدفوع برای تعیین قابلیت هضم نمونه‌گیری در دمای ۲۱- درجه سانتی‌گراد در یخچال ذخیره شد. جهت تعیین قابلیت هضم جیره آزمایشی از روش خاکستر نامحلول در اسید (AIA) به عنوان معرف داخلی استفاده شد. نمونه‌های مدفوع جمع‌آوری شده، با هم مخلوط گشته و به منظور تعیین قابلیت هضم تا زمان تعیین AIA در آون، در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در ۳ روز خشک و نکه داری شدند. پس از آسیاب کردن ۵ گرم نمونه خشک شده در آون (WS)، در دمای ۴۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خاکستری شد. خاکستر به داخل بشری انتقال یافت و ۱۰۰ میلی لیتر اسید کلردریک ۲ نرمال به آن اضافه گردید. مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دستگاه تعیین ایاف خام جوشانده شد و سپس توسط کاغذ صافی بدون خاکستر، صاف شده و با آب مقطر داغ (۸۵ تا ۱۰۰) جهت اسیدزدایی شسته شد. خاکستر و کاغذ صافی دوباره به بوته چینی

کل پروتئین، کلسترول، تری گلیسرید و اوره به آزمایشگاه منتقل شده و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (35 perkin-elmer) مورد ارزیابی قرار گرفتند. سطوح هورمون انسولین سرم با روش الایزا (ELISA)، NEFA، BHBA و گلوکز با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت، آنالیز NEFA در نمونه‌های پلاسماي خون گاوها با استفاده از روش رنگ سنجی و کیت مربوطه (شرکت Randox به شماره کاتالوگ FA115) انجام شد. هم چنین آنالیز BHBA در نمونه‌های پلاسماي خون گاوها با استفاده از روش فراینفش (UV) و کیت (شرکت Randox به شماره کاتالوگ RB 1007) انجام شد.

تجزیه آماری داده‌ها

داده های حاصل از آزمایش توسط نرم افزار آماری (SAS Institute) و مدل‌های مخلوط آماری (MIXED MODELS) زیر آنالیز شد.

رویه آماری داده‌ها: با رویه MIXED با مدل آماری زیر آنالیز شد.

$$y = \mu + Ti + Pj + Cowk (trt)i \times Pj + Ti \times Pj + eijk(i)$$

Ti = اثر ثابت تیمار

Pj = اثر ثابت دوره

Cowk (trt)i = اثر تصادفی گاو در تیمار

eijk(i) = اثر تصادفی باقیمانده‌ها و اشتباهات آزمایشی

Pj × Cowk (trt)i = اثر گاو در دوره

داده‌های رفتار شناسی: با رویه T-Test آنالیز شد.

نتایج و بحث

اثر دفعات خوراک دهی بر خوراک مصرفی و بازده مصرف

خوراک

مقدار ماده خشک مصرفی در طول دوره آزمایش برای یک بار خوراک دهی ۲۱/۱ کیلوگرم و برای چهار بار خوراک دهی ۲۰/۰ کیلوگرم (جدول ۳) و از لحاظ آماری متفاوت بود (P = ۰/۰۵). انرژی و الیاف مصرفی روزانه برای ۱x بیشتر بود (P = ۰/۰۵) که این یافته با دستاورد فلیپس و ریند (۲۴)، که گزارش کردند، با کاهش دفعات خوراک دهی گاوها، ماده خشک مصرفی تمایل به افزایش دارد، همسو می‌باشد. همچنین این امر را می‌توان به مدت زمانی که گاوها برای خوردن صرف کرده‌اند مربوط دانست که در این پژوهش طول زمان خوردن در دام‌هایی که یک و یا چهار بار خوراک دریافت کرده بودند به ترتیب ۳۲۲/۵ و ۲۸۳/۵ دقیقه در طول یک روز بود. از سوی دیگر بر اساس مطالعه بوچمن و همکاران (۱)، در سال ۲۰۰۸ هنگامی که دفعات خوراک دهی در دام‌ها افزایش پیدا می‌کند میزان ماده خشک مصرفی در هر دقیقه و به عبارتی سرعت مصرف خوراک کاهش پیدا

نگهداری می‌شد. در پایان هر هفته مقداری از هر خوراک در آون با ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد و ماده خشک آن تعیین شد. از جیره مصرفی و باقیمانده آن در طول آزمایش به صورت هفتگی و در طول نمونه‌برداری به صورت روزانه نمونه‌برداری صورت گرفت و تا زمان آنالیزهای CP و NDF، در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های مربوط به نمونه‌های ادراری و مدفوعی

نمونه‌گیری از طریق برداشت مستقیم مدفوع از راست روده در حدود ۱۰۰ گرم انجام گرفت و برای بررسی مقادیر قابلیت هضم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌های ادراری نیز در ساعات ابتدایی صبح و پیش از رقتن گاوها به سالن شیردوشی در لحظه تخلیه ادرار، نمونه‌ای ۵۰ میلی لیتری از ادرار آن‌ها گرفته شد تا بلافاصله pH آن‌ها تعیین شود.

رفتارهای مصرف خوراک

به منظور اندازه‌گیری زمان جویدن، طی ۴۸ ساعت پی در پی، فعالیت خوردن، دراز کشیدن، نشخوار کردن و ایستادن تک تک گاوها ثبت شد. به طور چشمی هر ۵ دقیقه یک بار فعالیت حیوان اعم از خوردن، نشخوار کردن، ایستادن، نشستن و یا سرآخور ایستادن و نخوردن، ثبت شد. چگونگی محاسبه طول مدت وعده مصرف اول پس از عرضه خوراک به این صورت بود که پس از عرضه خوراک اگر گاوی شروع به خوردن می‌کرد برای آن زمان خوردن را لحاظ کردیم تا موقعی که گاو به مدت ۲۰ دقیقه پشت سر هم خوراک مصرف نکند. در مورد گاوهای ۱x تنها اولین وعده مصرف خوراک محاسبه شد و در مورد گاوهای ۴x مجموع ۴ زمان طول مدت اولین وعده مصرف خوراک محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی

جهت تعیین ترکیبات خون، در دوره نمونه‌گیری در طی ۲ روز در وعده صبح قبل از خوراک دهی، بعد از شیردوشی و ۴ ساعت پس از خوراک دهی صبح به وسیله لوله‌های تحت خلاء مقدار ۱۰ میلی لیتر خون از محل سیاهرگ پستانی نمونه‌گیری شد. نمونه‌ها سپس به مدت ۱۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴+ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سرم به دست آمده با نمونه‌گیر برداشته شده و درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آنالیز آزمایشگاهی در دمای ۲۱- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌های خونی تهیه شده برای اندازه‌گیری فراسنجه‌های آلبومین،

ایستادن و نشستن مدت روزانه فعالیت خوردن در گروه ۱x در مقایسه با ۴x در روز از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P=0/49$). هر چند به طور عددی در تیمار ۱x در مقایسه با ۴x زمان بیشتری از روز را صرف خوردن کردند (۳۲۲/۵ و ۲۸۳/۸ دقیقه در روز). زمان خوردن به ازای هر کیلوگرم ماده خشک مصرفی و NDF مصرفی نیز متفاوت نبود ($P=0/94$). این مقدار نیز در تیمار ۱x در مقایسه با ۴x از لحاظ عددی بیشتر بود (۱۵/۶ و ۱۳/۶ دقیقه بر کیلوگرم و ۵۱/۸ و ۴۵/۱ دقیقه بر کیلوگرم). مدت زمان نشخوار بین تیمارها از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P=0/62$). زمان نشخوار به ازای هر کیلوگرم ماده خشک مصرفی و NDF مصرفی در بین دو تیمار از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P=0/93$). زمان ماده خشک مصرفی در تیمار ۴ بار خوراک‌دهی در مقایسه با یک بار خوراک‌دهی از لحاظ عددی بیشتر بود (۱۴/۲ و ۱۵/۶ دقیقه بر کیلوگرم).

زمان نشخوارکردن NDF مصرفی در بین دو تیمار یک و ۴ بار خوراک‌دهی در روز از لحاظ عددی معنی‌دار نشد ($P=0/93$). زمان نشخوار به ازای هر کیلوگرم NDF مصرفی در تیمار ۴ بار خوراک‌دهی در روز در مقایسه با یک بار در روز بیشتر بود (۴۷/۲ و ۵۲/۰ دقیقه بر کیلوگرم). کاهش زمان جویدن با افزایش دفعات خوراک‌دهی امری قابل پیش بینی بود زیرا مصرف روزانه خوراک تعیین کننده تولید اسید در شکمبه است حال آنکه جویدن تعیین کننده میزان ترشح اسید و در نتیجه تولید بافر است، بنابراین این دو جزء و رفتار مصرف خوراک (یعنی مصرف خوراک و فعالیت جویدن) در طول یک روز با pH محیط شکمبه و همچنین توازن اسید و باز ارتباط دارد (۷). مطالعات نشان می‌دهند که عرضه خوراک تازه، فعالیت خوردن گاوها را تحریک می‌کند (۴). در پژوهش مانتیساری و همکاران (۲۲)، کل زمان خوردن هنگامی که خوراک ۵ بار در روز در مقایسه با یک بار در روز عرضه می‌شد بیشتر بود. بنابراین با افزایش دفعات خوراک‌دهی، خوراک مصرفی بیشتری را می‌توان انتظار داشت. هرچه وعده‌های خوراک‌دهی برای گاوهای شیری بیشتر شود، حجم کمتری از غذا در هر وعده غذایی وارد شکمبه شده در نتیجه گاو زمان بیشتری را کنار آخور سپری کرده، و رغبت بیشتری به مصرف خوراک نشان می‌دهد. در مروری که توسط گونزالس و همکاران (۷)، صورت گرفت ثابت گردید که زمان جویدن و اندازه هر وعده غذایی و دفعات خوراک‌دهی نقش مهمی را توازن اسیدی شکمبه ایفا می‌کند.

افزایش دفعات خوراک‌دهی منجر به همزمانی بهتر بین تولید اسید در شکمبه و ترشح بزاق می‌شود و در نتیجه موجب جذب و عبور اسیدهای آلی تولید شده در شکمبه (شامل پروبیونات، استات، بوتیرات، و اسید لاکتیک) می‌گردد به ویژه اگر نشخوارکردن در فاصله بین دفعات مصرف خوراک صورت بگیرد تاثیر بهتری خواهد داشت. به علاوه در فاصله زمانی بین خوراک دادن متابولیسم اسیدهای جذب شده در کبد صورت گرفته و همچنین فرصت لازم برای دفع

می‌یابد. نتایج این پژوهش با نتایج روبلز و همکاران (۲۷)، مخالف بود چرا که آنها در پژوهش خود نبود تفاوت معنی داری در ماده خشک مصرفی گاوهایی که ۲ یا ۴ بار در روز با جیره‌های پرکنسانتره تغذیه شده بودند را گزارش نمودند که دلیل این امر را عدم تاثیر دفعات مصرف خوراک بر روی تغییر غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه و یا عدم تغییر در نسبت اسیدهای چرب فرار گزارش نمودند.

اثر دفعات خوراک‌دهی بر تولید شیر

شیر تولیدی بین تیمارها تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشت ($P=0/16$). انرژی شیر و بازده تولید شیر بین تیمارها ($P=0/63$) نیز یکسان بود (جدول ۳). درصد چربی و تولید چربی شیر نیز بین تیمارها یکسان بود ($P=0/66$) و ($P=0/99$). اختلاف درصد پروتئین شیر بین تیمارها معنی‌دار نبوده ($P=0/81$) و مقدار پروتئین شیر نیز در بین تیمارها متفاوت نبود ($P=0/18$). نسبت درصد چربی شیر به درصد پروتئین شیر در بین تیمارهای اعمال شده در این آزمایش یکسان بود ($P=0/58$). بر طبق گزارش فیلیپس و ریند (۲۴)، مصرف خوراک بالاتر گاوهای یک‌بار در مقایسه با ۴ بار تغذیه شده باعث افزایش تولید شیر شد. در پژوهش مانتیساری و همکاران (۲۲)، همچون آزمایش حاضر مصرف خوراک بیشتر منجر به افزایش تولید شیر نشد. ممکن است با خوراک‌دهی یک‌بار در روز، مقدار خوراک مصرفی بیشتر و در نتیجه نوسانات تخمیر شکمبه‌ای و سوخت و ساز حاصل از آن نیز بیشتر باشد. افزایش دفعات خوراک‌دهی ممکن است باعث ثبات بیشتر نسبت استات به پروبیونات شود که در برگشت ممکن است باعث افزایش غلظت چربی شیر شود (۲۸). افزایش دفعات خوراک‌دهی ممکن است اثرات زیان بار تخمیر نامطلوب سریع کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی (NSC) در شکمبه را کاهش دهد. کاهش نوسانات اسیدهای چرب فرار شکمبه (VFA)، pH و آمونیاک به وسیله افزایش دفعات خوراک‌دهی، سنتز پروتئین میکروبی در شکمبه را در پی خواهد داشت، مقدار شیر و ترکیبات شیر را بهبود می‌بخشد (۳۰). یانگ و دارگا (۳۰)، گزارش کردند که با افزایش دفعات خوراک‌دهی از یک‌بار به ۴ بار در روز غلظت‌های آمونیاک شکمبه ثبات بیشتری پیدا می‌کند. کاهش pH شکمبه می‌تواند فعالیت باکتری تجزیه کننده سلولز را کاهش دهد، در حالی که رشد باکتری تجزیه کننده نشاسته افزایش می‌یابد. این تغییرات می‌تواند منجر به افزایش تولید پروبیونات (۱۲ و ۱۶)، و بنابراین کاهش نسبت استات به پروبیونات شود که ممکن است درصد چربی شیر را کاهش دهد. تاثیر دفعات خوراک‌دهی بر رفتار مصرف خوراک، نشخوار،

افزایش دفعات مصرف تغییر می‌دهند که این امر برای پیشگیری از تاثیرات زیان‌آور مصرف مقادیر زیاد خوراک در یک وعده خوراک‌دهی می‌باشد.

پروتون‌های اضافی از مسیر ادرار صورت می‌گیرد. با توجه به مطالب بیان شده حتی در صورت ارائه خوراک با دفعات کمتر گاوها رفتار مصرف خوراک خود را به سوی کاهش وعده های مصرف خوراک و

جدول ۳- اثر دفعات خوراک‌دهی بر تولید شیر و بازده خوراک

دفعات خوراک‌دهی				
P-value	خطای معیار	۴x	۱x	
۰/۰۵	۰/۴۸	۲۰/۰	۲۱/۱	ماده خشک مصرفی (کیلوگرم در روز)
۰/۲۵	۱/۸۹	۱۰/۰	۷/۶	درصد باقیمانده خوراک به TMR عرضه شده
۰/۰۵	۰/۱۳	۵/۵	۵/۸	NDF مصرفی (کیلوگرم در روز)
۰/۰۵	۰/۰۴	۱/۶	۱/۷	مصرفی (کیلوگرم در روز) peNDF>8
۰/۰۵	۰/۱۰	۳/۹	۴/۲	مصرفی (کیلوگرم در روز) peNDF>1.18
۰/۰۵	۰/۸۳	۳۴/۴	۳۶/۴	مصرف انرژی خالص شیردهی (مگا کالری در روز)
۰/۱۶	۰/۵۱	۳۰/۷	۳۱/۵	شیر تولیدی (کیلوگرم در روز)
۰/۶۳	۰/۰۳	۰/۷	۰/۶۹	تراکم انرژی شیر (مگا کالری در کیلوگرم) ^a
۰/۷۲	۰/۸۱	۲۱/۴	۲۱/۷	میزان انرژی شیر منترشحه (مگا کالری در روز)
۰/۳۵	۰/۰۳	۰/۶۲	۰/۶۰	خروجی انرژی شیر تولیدی به ماده خشک مصرفی
۰/۶۶	۰/۲۷	۳/۶۴	۳/۵	چربی شیر درصد
۰/۹۹	۰/۰۸	۱/۱۲	۱/۱	چربی شیر تولیدی (کیلوگرم در روز)
۰/۸۱	۰/۰۴	۳/۱۸	۳/۱۸	پروتئین شیر درصد
۰/۱۸	۰/۰۲	۰/۹۷	۱/۰	پروتئین شیر تولیدی (کیلوگرم در روز)
۰/۵۸	۰/۱۱	۱/۱	۱/۱	درصد چربی شیر به درصد پروتئین شیر

a- $0.192 + (0.93 / \text{پروتئین حقیقی شیر} \times 0.547) + (\text{درصد چربی شیر} \times 0.929) = \text{تراکم انرژی شیر}$

1- Feeding frequency

جدول ۴- آثار دفعات خوراک‌دهی بر رفتار مصرف خوراک، نشخوار، ایستادن و نشستن

دفعات خوراک‌دهی				
P-value	خطای معیار	۴x	۱x	
۰/۴۹	۳۶/۸۴	۲۸۲/۸	۳۲۲/۵	طول زمان خوردن (دقیقه در روز)
۰/۹۴	۲/۰۵	۱۳/۶	۱۵/۶	طول زمان خوردن / هر کیلوگرم ماده خشک مصرفی (دقیقه)
۰/۹۴	۶/۸۱	۴۵/۱	۵۱/۸	طول زمان خوردن / NDF مصرفی (دقیقه)
۰/۶۲	۳۳/۵۶	۳۲۵/۶	۳۰۱/۹	طول زمان نشخوار کردن (دقیقه در روز)
۰/۹۳	۲/۰۲	۱۵/۶	۱۴/۲	طول زمان نشخوار / هر کیلوگرم ماده خشک مصرفی (دقیقه)
۰/۹۳	۶/۷۲	۵۲/۰	۴۷/۲	طول زمان نشخوار / NDF مصرفی (دقیقه / کیلوگرم)
۰/۳۷	۵۵/۴۸	۶۰۹/۴	۶۲۴/۴	طول زمان جویدن ^۱ (دقیقه در کیلوگرم)
۰/۱۶	۲/۶۷	۲۹/۲	۲۹/۸	طول زمان جویدن / ماده خشک مصرفی (دقیقه / کیلوگرم)
۰/۱۶	۸/۸۶	۹۷/۱	۹۹/۰	طول زمان جویدن / NDF مصرفی (دقیقه / کیلوگرم)
۰/۵۰	۴۹/۴۴	۶۴۰/۶	۶۹۰/۶	طول زمان ایستادن (دقیقه در روز)
۰/۵۰	۵۶/۹۵	۵۸۶/۳	۵۳۶/۹	طول زمان خوابیدن (دقیقه در روز)
۰/۰۰۷	۱۱/۲۴	۳/۱	۳۸/۸	طول زمان سر آخور بودن و نخوردن (دقیقه در روز)
۰/۰۴	۳۴/۰۰	۱۹۶/۴	۱۰۵/۸	طول مدت اولین وعده مصرفی (دقیقه)
۰/۰۴	۲۱/۵۰	۴۹/۱۰	۱۰۵/۸	طول مدت اولین وعده مصرفی تصحیح شده ^۲ (دقیقه)

۱- مجموع زمان خوردن و نشخوار کردن، ۲- طول مدت اولین وعده مصرفی تقسیم بر ۴ برای گروه ۴x

اثر دفعات خوراک‌دهی بر غلظت متابولیت‌های سرم خون، pH مدفوع و ادرار، و قابلیت هضم ظاهری خوراک در کل دستگاه گوارش

مقدار انسولین خون در تیمار ۱x در مقایسه با ۴x از لحاظ آماری متفاوت نبود اما تمایل به معنی داری داشت ($P = 0/07$). مقدار گلوکز خون در بین تیمارها از لحاظ عددی معنی‌دار نبود ($P = 0/97$). نیتروژن اوره‌ای خون نیز بین دو تیمار یکسان بود ($P = 0/60$). مقدار BUN بدست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد که عدم تغییر BUN نشانگر عدم تأثیر منفی یک‌بار خوراک‌دهی بر سوخت و ساز نیتروژن است. تراکم BHBA سرم بین تیمارها از لحاظ آماری متفاوت نبود ($P = 0/64$). مقدار BHBA در تیمار یک بار خوراک‌دهی در روز در مقایسه با ۴ بار در روز به لحاظ عددی تا اندازه‌ای بیشتر بود ($498/1$ و $467/1$ میکرو مول در لیتر). مقدار کل پروتئین خون، آلبومین و گلوبولین نیز تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت ($P = 0/83$). مقدار اسیدهای چرب آزاد تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P = 0/05$). مقدار اسیدهای آزاد در تیمار ۱x در مقایسه با ۴x کمتر بود ($0/45$ و $0/56$). pH ادرار تحت تأثیر دفعات خوراک‌دهی قرار

گرفت ($P = 0/008$). pH ادرار گاوهای ۴x در مقایسه با ۱x از لحاظ عددی بیشتر بود ($8/12$ و $8/00$) تغییرات وزن بدن و قابلیت هضم DM و CP تحت تأثیر دفعات خوراک‌دهی قرار نگرفت. مطالعه حاضر در حقیقت پدید آورنده نمایی جدید در بررسی اثرات دفعات خوراک‌دهی بر پاسخ‌های تولیدی، متابولیکی و رفتاری گاوهایی بوده که به صورت انفرادی جیره‌هایی بر پایه TMR را که حاوی یونجه و مخلوطی از دانه‌های جو و ذرت بوده را مصرف نموده‌اند. با توجه به مطالعه کوسر و همکاران (۱۸)، استفاده از یونجه خرد شده برای تغذیه گاوهای شیری موجب تغییر تخمیر شکمبه‌ای و احتیاجات peNDF می‌گردد. افزایش مصرف DM، NEL و peNDF در برابر عدم تغییر در مقدار شیر تولیدی نشانگر این امر بود که افزایش دفعات خوراک‌دهی در گاوهای تازه زا از لحاظ اقتصادی به صرفه نبوده و ممکن است برای دامدار ضررهای مالی را به همراه داشته باشد. طی پژوهشی که توسط دیمن و همکاران (۵)، انجام گرفت، افزایش دفعات خوراک‌دهی تأثیری بر ماده خشک مصرفی گاوهای شیری نداشت، اما قابلیت هضم NDF در شرایطی که دفعات خوراک‌دهی گاوها از ۱x به ۴x افزایش یافت، ۱۹ درصد بهبود یافت.

جدول ۵- اثر دفعات خوراک‌دهی بر غلظت متابولیت‌ها و انسولین سرم خون، pH مدفوع و ادرار، و قابلیت هضم ظاهری خوراک در کل دستگاه گوارش

P-value	خطای معیار	دفعات خوراک‌دهی		عوامل
		۴ x	۱ x	
0/07	1/83	6/9	10/9	انسولین (میکرو واحد بین المللی بر میلی لیتر)
0/97	3/02	58/0	57/9	گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر)
0/60	0/61	16/5	16/2	نیتروژن اوره‌ای (میلی گرم بر دسی لیتر)
0/64	62/7	467/1	498/1	بتا هیدروکسی بوتیریک اسید (میلی مول بر لیتر)
0/50	0/05	6/89	6/92	کل پروتئین (گرم بر دسی لیتر)
0/87	0/07	3/40	3/41	آلبومین (گرم بر دسی لیتر)
0/83	0/11	3/48	3/51	گلوبولین (گرم بر دسی لیتر)
0/70	19/9	289/5	297/7	کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر)
0/43	3/50	21/3	24/1	تری‌گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)
0/05	0/06	0/56	0/45	اسیدهای چرب آزاد (میکرو واحد بین المللی بر میلی لیتر)
0/65	0/05	6/61	6/64	pH مدفوع
0/008	0/03	8/12	8/00	pH ادرار
0/53	0/38	-0/07	0/18	تغییرات وزن بدن (کیلوگرم در روز)
				قابلیت هضم ظاهری کل دستگاه گوارش
0/73	2/48	63/2	62/3	% ماده خشک
0/52	1/48	71/4	70/4	% پروتئین خام

1- Non esterified fatty acids

نتیجه گیری

در این آزمایش استفاده از جیره‌ای که حاوی یونجه و دانه غلات بر پایه TMR بود در ۴ بار خوراک‌دهی نسبت به یک بار موجب افزایش مقدار DM، NEL و peNDF مصرفی شد. در گاوهایی که یک‌بار در روز تغذیه شدند وعده مصرف خوراک طولانی‌تر و همچنین مقادیر انسولین سرم نیز در ۴ ساعت پس از مصرف خوراک بیش از گروهی بود که ۴ بار در روز تغذیه شده بودند. در مطالعه حاضر دفعات خوراک‌دهی تأثیری بر مدت زمان روزانه مصرف خوراک، نشخوارکردن، جویدن و مقدار شیر تولیدی و همچنین چربی و پروتئین شیر نداشت، ولی pH ادراری در گاوهایی که ۴ بار در روز تغذیه شده بودند، بالاتر بود. در کل تحت شرایط برابر تغذیه و عدم وجود رقابت بین گاوها افزایش دفعات خوراک‌دهی در گاوهای تازه‌زا موجب افزایش تولید نشده و از جنبه اقتصادی بازدهی در بر نداشت.

مقدار بالای چربی و پروتئین شیر و نسبت این دو و انرژی شیر در گاوهای گروه اول نشان دهنده این امر بود که با توجه به افزایش ماده خشک مصرفی و طولانی شدن نخستین وعده مصرف خوراک، تغییری در الگوی تخمیر شکمبه‌ای ایجاد نشده است. افزایش تخمیرپذیری جیره نیز سبب افزایش ترشح انسولین می‌شود (۲). انسولین بالا در خون سبب کاهش آزاد شدن ذخایر چربی بدن شده که در نتیجه آن غلظت NEFA و BHBA پلاسما کاهش می‌یابد (۱۴). چنانچه در نتایج آزمایش حاضر بررسی شد، NEFA در خون گاوهای ۱x کمتر بود که با افزایش انسولین این گاوها مطابقت دارد. pH ادرار شاخص مناسبی برای مایعات خارج سلولی و فعالیت سامانه‌های هورمونی تنظیم کننده کلسیم خون می‌باشد. عوامل دیگری از جمله لاکتات خون می‌تواند عامل مهمی در کاهش pH خون باشد. پس افزایش pH ادرار با افزایش دفعات خوراک‌دهی می‌تواند اشاره‌ای به کاهش قلیایی مایع خارج سلولی در دامهایی باشد که خوراک تازه را تنها یک‌بار در روز دریافت می‌کنند.

منابع

- 1- Beauchemin, K. A., L. Eriksen, P. Nørgaard, and L. M. Rode. 2008. Salivary secretion during meals in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 91:2077-2081.
- 2- Dann, H. M., G. A. Varga, and D. E. Putnam. 1999. Improving energy supply to late gestation and early postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:1765-1778.
- 3- DeVries, T. J., K. A. Beauchemin, and M. A. G. Von Keyserlingk. 2007. Dietary forage concentration affects the feed sorting behavior of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:5572-5579.
- 4- DeVries, T. J., M. A. G. Von Keyserlingk, and K. A. Beauchemin. 2005. Frequency of feed delivery affects the behavior of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:3553-3562.
- 5- Dhiman, T. R., M. S. Zaman, I. S. Macqueen, and R. L. Boman. 2002. Influence of corn processing and frequency of feeding on cow performance. *J Dairy Sci* 85(1): 217-226.
- 6- Gibson, J. P. 1984. The effects of frequency of feeding on milk production of dairy cattle: An analysis of published results. *Anim. Prod.* 38:181-189.
- 7- González. L. A., X. Manteca, S. Calsamiglia, K. S. Schwartzkopf-Genswein, and A. Ferret. 2012. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior: a review. *J. Anim Feed Sci and Tech.* 172 : 66- 79.
- 8- Grant, R. J., and J. L. Albright. 1995. Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2791-2803.
- 9- Greter. M., K. E. Leslie, G. J. Mason, B. W. McBride, and T. J. DeVries. 2010. Effect of feed delivery method on the behavior and growth of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 93:1668-1676.
- 10- Harmison, B., M. L. Eastridge, and J. L. Firkins. 1997. Effect of percentage of dietary forage neutral detergent fiber and source of starch on performance of lactating Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 80: 905-911.
- 11- Hart, I. C. 1983. Endocrine control of nutrient partitioning in lactating ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 42:181.
- 12- Hoover, W. H., C. R. Kincaid, G. A. Varga, W. V. Thayne, and L. L. Junkins, Jr. 1984. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous cultures. IV. pH and dilution rate. *J. Anim. Sci.* 58:692.
- 13- Hosseinkhani, A., T. J. De Vries, K. L. Proudfoot, R. Valizadeh, D. M. Veira, and M. A. G. Von Keyserlingk. 2008. The effects of feed bunk competition on the feed sorting behavior of close-up dry cows. *J. Dairy Sci.* 91:1115-1121.

- 14- Ingvarlsen, K. L., and J. B. Anderson. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing in the dry period and early lactation on feed intake and lactational performance in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 71: 207-221.
- 15- Jensen, K., and Y. Walstrup. 1977. Effect of feeding frequency on fermentation pattern and microbial activity in the bovine rumen. *Acta Vet. Scand.* 18:108.
- 16- Kaufmann, W. 1976. Influence of the composition of the ration and the feeding frequency on pH - regulation in the rumen and on feed intake in ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 3:103.
- 17- Kononoff, P. J., A. J. Heinrichs, and D. R. Buckmaster. 2003. Modification of the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. *J. Dairy Sci.* 86:1858-1863.
- 18- Kowsar, R., G. R. Ghorbani, M. Alikhani, M. Khorvash, and A. Nikkhah. 2008. Corn silage partially replacing short alfalfa hay to optimize forage use in total mixed rations for lactating cows *J. Dairy Sci.* 91:4755-4764.
- 19- Kudrna, V., P. Lang., and P. Mlázovska. 2001. Frequency of feeding with TMR in dairy cows in summer season. *Czech. J. Anim. Sci.* 46:313-319.
- 20- Le Liboux, S., and J. L. Peyraud. 1999. Effect of forage particle size and feeding frequency on fermentation patterns and sites and extent of digestion in dairy cows fed mixed diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76:297-319.
- 21- Mackie, R. I., F. M. C. Gilchrist, A. M. Robberts, P. E. Hannah, and H. M. Schwartz. 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high-concentrate diets. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 90:241-254.
- 22- Mantysaari, P., H. Khalili, and J. Sariola. 2006. Effect of feeding frequency of a total mixed ration on the performance of high yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:4312-4320.
- 23- 22. Mantysaari, P., H. Khalili, and J. Sariola. 2006. Effect of Feeding Frequency of a Total Mixed Ration on the Performance Microbial and chemical changes in the rumen during stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *J. Agric. Sci.* 90: 241.
- 24- Phillips, C. J. C., and M. I. Rind. 2001. The effects of frequency of feeding a total mixed ration on the production and behavior of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:1979-1987.
- 25- Pulido, R. G., R. Muñoz, P. Lemarie, F. Wittwer, P. Orellana, and G. C. Waghorn. 2009. Impact of increasing grain feeding frequency on production of dairy cows grazing pasture. *Livestock Science* 125: 109-114.
- 26- Robinson, P. H., and M. A. McNiven. 1994. Influence of flame roasting and feeding frequency of barley on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:3631-3643.
- 27- Robles, V., L. A. Gonzalez, A. Ferret, X. Manteca, and S. Calsamiglia. 2007. Effects of feeding frequency on intake, ruminal fermentation, and feeding behavior in heifers fed high-concentrate diet. *J. Anim Sci.* 85:2538-2547.
- 28- Sutton, J. D., W. H. Broster, D. J. Napper, and J. W. Siviter. 1985. Feeding frequency for lactating cows: effects on digestion, milk production and energy utilization. *Br. J. Nutr.* 53:117.
- 29- Van Soest, P. J. J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- 30- Yang, C. M., and G. A. Varga. 1989. Effect of three concentration feeding frequencies on rumen protozoa, rumen digesta, and milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:950-957.