

Borkekstrakt som middel mot koksidiøse hos lam?

NORSØK RAPPORT | VOL.5 | NR. 8 | 2020



TITTEL**Borkekstrakt som middel mot koksidiøse hos lam****FORFATTERE(E)**

Kristin Marie Sørheim, Juni Rosann E. Johanssen, Berit Blomstrand & Heidi Enemark

DATO: 25.06.2020	RAPORT NO. Vol.5/nr.8/20 20	Åpen/Lukket (til)	PROSJEKT NO.: 282467	
ISBN: 978-82-8202-105-0		ISSN:	ANTALL SIDER: 40	NO. OF APPENDICES: 2 vedlegg

OPPDRAGSGIVER:Regionalt forskningsfond Midt-Norge
Organic PLUS – Horizon 2020 GA 774340.**KONTAKTPERSON:**

Kristin Marie Sørheim

STIKKORD:Antikoksidia, koksidiøse, sau, barkekstrakt,
tanniner, EimeriaCoccidiosis, sheep, bark extract, condensed
tannins, Eimeria**FAGOMRÅDET:**

Dyrehelse, dyrevelferd

Animal health, animal welfare

SAMMENDRAG:

Rapporten bygger på resultat frå fleire finansieringskjelder, først og fremst Regionalt forskningsfond Midt-Norge, EU-prosjektet Organic-PLUS og industripartnarar. Koksidiar er eincella parasittar som kan gje alvorleg sjukdom i tarmen hos pattedyr og fugl. Koksidiøse hos lam er eit stort problem i sauehaldet. Bruk av koksidiostatika (middel som hemmar utviklinga av koksidiar) er svært utbreidd og kan føre til utvikling av resistens, slik at det er av stor betydning å finne alternativ til desse. Internasjonalt er det stor interesse for forskning på bruk av planteekstrakt som førtilsettingsmiddel for å hindre parasittane i utviklinga. Vi har tidlegare vist at kondenserte tanninar frå bork frå norsk sagbruksindustri kan ha effekt mot parasittar i laboratorieforsøk. I dette pilotprosjektet har vi gjennomført ei første utprøving av borkekstrakt som førtilsettingsmiddel mot koksidiøse på levande lam. Bork er elles eit avfallsprodukt for industrien.

I forsøket hadde vi 24 lam fordelt på tre grupper à åtte lam. Ei gruppe vart smitta med koksidiar og fekk inga behandling, ei anna gruppe vart smitta og fekk behandling med borkekstrakt frå same dag

som dei vart smitta og i 14 dagar framover, og den tredje gruppa vart verken smitta eller behandla (kontrollgruppe). Borkekstraktet var framstilt av fersk granbork frå Bøfjorden Sag AS og ekstrahert med vatn og deretter avdampa og tørka hos SINTEF Industri. Av 235 kg fersk granbork fekk vi ca. 6 kg tørt borkekstrakt (92% tørrstoff), med eit innhald av ca. 300 g CT-tørrstoff. Utbyttet av tørt ekstrakt var ca. 11-12% . Prøver frå tre av fem kanner med konsentrat viste alle 49 g CT/kg tørt ekstrakt.

Alle lamma vart slakta tre veker etter smitte. Kontrollgruppa var friske gjennom heile forsøket og hadde best tilvekst. Gruppa som vart smitta , men ikkje fekk behandling, begynte å få diaré og redusert tilvekst frå om lag dag 15 etter behandling, men vart ikkje særleg sjuke i den korte tida vi hadde dei i forsøk. Gruppa som vart smitta og fekk borkekstrakt, fekk litt diaré dei dagane dei fekk ekstraktet, og dei mista matlysta og tilveksten i desse dagane. Så snart behandlinga var over, kom dei seg fort og hadde normal avføring og auka tilvekst i resten av forsøksperioden. Volumet og konsistensen på ekstraktet vi ga dei var tydeleg negativt for matlyst og tilvekst under behandlinga.

Når vi talte parasittar (oocyster) i avføringa frå lamma før smitte og dag 12,14,17 og 21 etter smitte, fann vi langt færre parasittegg hos lamma som hadde fått borkekstrakt ved slutten av forsøket (dag 22) . Hos lamma som ikkje vart behandla, fann vi oocyster frå ca. dag 14 etter smitte og det auka mykje dei neste fem dagane. Hos lamma som fekk borkekstrakt, fann vi oocyster i eit svært lite tal frå dag 17 etter smitte og fram til vi avslutta forsøket. Statistisk vurdering av resultatata ved regresjonsanalyser støttar hypotesa om at borkekstrakt reduserer utskiljinga av koksidiar hos lam for den perioden vi har gjort observasjonar. Det var signifikant effekt av behandling på utskiljinga av parasittar ($P < 0,0005$) og det var ein klar samanheng mellom behandling og tidspunkt for utskiljing av oocyster ($P < 0,0001$).

Mengde ekstrakt som vi kunne gje til lamma utan at dei vart sjuke, viste seg å vere mindre enn vi hadde trudd på førehand på bakgrunn av referansar frå andre forsøk, og måten vi måtte gje det på (sonde) er ikkje foreinleg med praktisk sauehald.

Ut frå dette forsøket ser vi at det er innhaldsstoff i bork som har effekt mot koksidiar av *Eimeria*-arten hos lam, men det er behov for meir forskning, både grunnforskning og anvendt forskning, for å forstå kva stoff dette er, om det er berre tanninar eller om det kanskje er heilt andre plantestoff som også har effekt.

Det er nødvendig å finne ut korleis mekanismane som hemmar utviklinga til parasittane fungerer, mellom anna på kva stadium parasitten blir påverka. For å undersøke dette er det behov for meir langvarige forsøk enn det vi har hatt, slik at ein kan studere effekten både når det gjeld tilvekst, klinisk tilstand og ikkje minst parasittutvikling over ein heil beiteperiode.

Vidare er det behov for eit utviklingsarbeid for å effektivisere ekstraksjonsprosessen og redusere produksjonskostnaden. Dette gjeld heile kjeda frå innsamling av bork, tørking og oppmaling og til slutt sjølve ekstraheringa, val av ekstraksjonsmiddel og konsentrasjonsprosessen.

For å komme i praktisk bruk, må ein utvikle ei form for fôrtilsetjing eller eit medikament som kan gjevast til unge, diande dyr som eingongsbehandling, eller i det minste som kan ha effekt om det

blir tilført nokre få gonger. Til eldre dyr kan det vere aktuelt å sjå om det kan tilsetjast i kraftfôr, eller til mineralnæring eller saltslikkesteinar.

SUMMARY:

This work is carried out with funding from Regional research council Mid Norway and the Organic-PLUS project, as well as industry partners. Organic-PLUS has received funding for the animal experiment from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement no. 774340-OrganicPLUS

Coccidiosis is a serious disease in young lambs in Norway and other countries. The disease leads to decreased animal welfare and has huge economic impact on the farm industry. The common preventive measures in Norway are pasture rotation and anticoccidial chemical. Reduced efficacy against toltrazuril has been demonstrated in sheep farming in Norway. Condensed tannins (CT) from different plants have showed effect against nematodes and coccidia in several trials. Bark is a rich source of CT, and bark from species cultured in Scandinavia has relatively high concentrations of CT.

The aim of this project was to investigate if supplementation of bark extract with CT reduces the burden of coccidia and thereby improves the animal health, production efficiency and profitability in the sheep production.

In this project we have infected 16 young lambs with oocysts from *Eimeria spp.* and tested the effect of extract from fresh winter bark from Norwegian spruce (*Picea abies*) to 8 of these lambs. Performance and oocyst secretion were measured. A control group of 8 lambs was not infected and not given bark extract.

Individually faeces samples were collected before infection and daily at day 9-22 after infection and analysed for faecal score and oocysts. In this trial the bark extract was found to have a significant effect on the development of coccidia of *Eimeria spp.* in the lambs measured by counting oocysts per gram faeces ($p < 0,001$).

Bark extract from *Picea abies* may be a potential useful anticoccidium in young lambs. We need more research to see if this effect is due to CT or other biological components in the bark and to see if the effect is permanent and how this influences the performance of the lambs in a longer perspective. If this should be transferred into practical use for the farmers, we need to find a simple and secure method for application and a practically, technically and economically viable method for extract production.

LAND:	Norge
FYLKE:	Møre og Romsdal
KOMMUNE:	Tingvoll
STED:	Tingvoll gard

GODKJENT

Turid Strøm

NAVN

PROSEKTLEDER

Kristin Marie Sørheim

NAMN

Forord

NORSØK har fått støtte frå Regionalt forskningsfond Midt-Norge til å teste ut ekstrakt av bork frå den lokale sagbruksindustrien mot koksidiar i tarmen hos lam. Arbeidet er også støtta av prosjektet Organic-PLUS, som har fått støtte frå EU sitt rammeprogram for forskning og innovasjon, Horizon 2020, avtalennummer GA774340.

Koksidiar er ein type eincella parasittar som kan gje alvorleg sjukdom på unge lam. I prosjektet har vi samarbeidd med Bøfjorden Sag AS som har levert granbork til forsøket, med SINTEF som har stått for ekstrahering og kjemiske analysar og med Veterinærinstituttet som har fagleg ekspertise innan parasittologi. Prosjektet er basert på eit tidlegare forprosjekt finansiert frå RFF Midt-Norge, der idéen var å undersøke gjennom laboratorie-forsøk om bork kunne innehalde stoff med antiparasittær effekt. Vi har også samarbeidd med eit NORSØK-leia Bionær-prosjekt, der borkekstrakt frå ulike sagbruk hausta til ulike tider og av ulike treslag skal undersøkast for effekt mot rundorm hos sau, både i laboratorieforsøk og på levande dyr. I det prosjektet vart også ekstrakta testa mot koksidiar gjennom ulike laboratoriemetodar, og i vårt prosjekt har vi no testa ekstraktet på levande lam.

Vi takkar for finansieringa som har gjeve ny og nyttig kunnskap, og vi takkar samarbeidspartane for godt arbeid.

Tingvoll, 30.04.21

Kristin Marie Sørheim

Prosjektleder

Innholdsliste

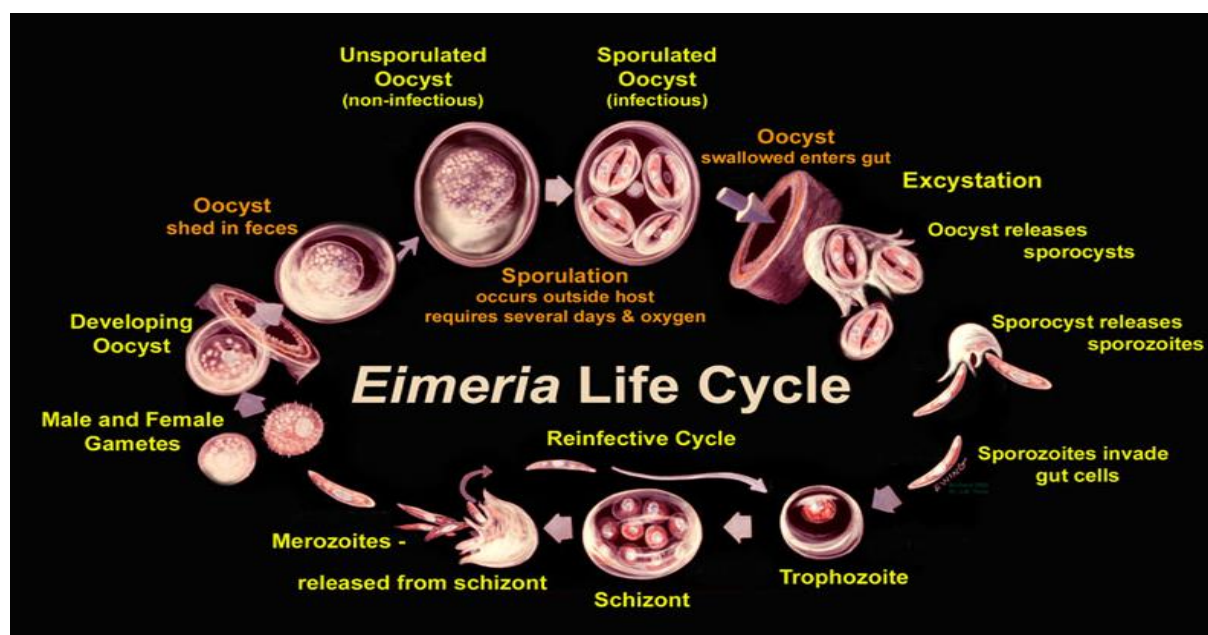
1	Innleiing	8
1.1	Bakgrunn for prosjektet	8
1.2	Hovudmål og delmål	10
2	Materiale og metode	11
2.1	Forsøksoppsett.....	11
2.2	Behandling	13
2.2.1	Smitte og ekstrakt.....	13
2.2.2	Observasjonar og prøvetaking.....	13
2.3	Innsamling av bork og ekstrahering.....	15
2.4	Laborietetesting av ekstrakt	18
2.5	Innsamla data og statistisk analyse.....	18
2.5.1	Statistisk behandling av resultatata.....	18
3	Resultat	19
3.1	Produksjon av borkekstrakt	19
3.2	Parasittbelastning	19
3.3	Konsistens på avføring	21
3.3.1	Evaluering av faecal-score	22
3.4	Tilvekst	22
3.5	Kliniske observasjonar.....	23
4	Diskusjon	24
4.1	Produksjon av ekstrakt – Industrielt	24
4.2	Effekt mot koksidiar	24
4.3	Effekt på tilvekst.....	25
4.4	Som fôrtilsetningsmiddel	25
5	Konklusjonar – Framtidig forskning og utviklingsarbeid	27
6	Litteraturreferansar.....	28

1 Innleiing

1.1 Bakgrunn for prosjektet

Eimeria er eincella parasittar som forårsakar sjukdommen koksidiose hos pattedyr og fugl. I sauehald er koksidiose hos lam generelt eit stort problem (Taylor & Catchpole 1994; Taylor 1995; Odden 2017), og særleg for dei som driv økologisk. I økologisk produksjon vil ein så langt råd unngå å bruke kjemisk-syntetiske middel og antibiotika. Tilbakehaldsfristar før slakting etter bruk av slike er dobbelt så lange som i konvensjonell produksjon (Mattilsynet 2019). Samtidig kan bruk av koksidiostatika (kjemisk-syntetiske middel som hemmar utviklinga av koksidiane) føre til utvikling av resistens (Gjerde et al. 2010; Odden et al. 2018).

Eimeria er artsspesifikke parasittar, og *Eimeria*-artar som går på sau kan t.d. ikkje gje sjukdom hos geit. Koksidiose er i hovudsak ein ungdyrsjukdom. Det utviklast raskt (delvis) immunitet, og seinare infeksjonar er ofte subkliniske. Det vil seie at ein ikkje ser synlege teikn til sjukdom, men dyret kan likevel ha nedsett tilvekst og velferd. Sau har minst elleve ulike *Eimeria*-artar, der to er kjent for å framkalle sjukdom: *E. crandallis* og *E. ovinoidalis*. Dei ulike artane gjev skade i ulike deler av tarmen. Den mest vanlege forma for koksidiose på lam i Norge er sjukdom 2-3 veker etter beiteslepp, men det kan også førekomme på lam som går lenge inne, kanskje særleg på talle. Koksidiane har ein særeigen livssyklus. Lamma tek opp oocyster (koksidie-egg) på beite eller i miljøet. Oocystene er svært hardføre og overvintrar på beitet (Lassen & Seppä-Lassila 2014; Odden 2017). Oocystene vert oppformert i tarmen til verten gjennom fleire stadium og så skilt ut med avføringa etter 2-3 veker. Oppformeringa i tarmen gjev store skader i tarmslimhinna, og alvorlege symptom som diaré, dehydrering og i verste fall død.



Figur 1: Livssyklusen til *Eimeria* (<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3463456>)

Det er vist at kondenserte tanninar (CT) frå ulike planter kan ha antiparasittær effekt mot nematodar (rundorm) hos storfe og sau, og i eit tidlegare kvalifiseringsprosjekt (*RFF Midt-Norge, Bark in feed, 2012*) har vi vist at kondenserte tanninar frå bork i norsk treindustri kan ha effekt i laboratorieforsøk (*in vitro*). Parasittar utviklar ofte over tid resistens mot dei middel vi brukar for å bekjempe dei (Gjerde et al. 2010; Domke et al., 2012, Odden et al. 2018). Dersom vi kan utvikle alternative strategiar til bruk av kjemisk syntetiske midlar mot parasittar, kan vi også redusere risiko for resistensutvikling.

Kjemiske midlar og nedbrytningsstoff frå desse kan ha negativ verknad på ulike jordorganismar og mikroorganismar (Boxall et al. 2003; Serikstad et al. 2012), så redusert bruk av slike er positivt på fleire måtar. Både nasjonalt og internasjonalt er det difor stor merksemd og interesse for forskning på alternative strategiar, som bruk av planteekstrakt som fôrtilsetningsmiddel for å hindre parasittane i utviklinga. I økologisk landbruk har ein ikkje som strategi å utrydde skadelege organismar heilt, men å oppretthalde sunne og robuste dyr og planter, samt ein mangfaldig mikroflora som gjer at skadeorganismar ikkje får overtak. Lett tilgjengelege bioaktive stoff frå planter kan redusere skadeorganismar og oppretthalde eit godt immunforsvar og er difor ein ønska strategi med overføringsverdi til konvensjonell produksjon.

I eit nyleg oppstarta prosjekt finansiert av Bionær-programmet i NFR, «Condensed tannins from Norwegian pine and spruce bark - antiparasitic effects and potential commercial exploitation» (BarkCure), skulle ein ekstrahere tanninar frå avfall frå treindustrien og teste effekt mot nematodar (rundormar) hos sau i *in vitro* og *in vivo* forsøk.

I dette kvalifiseringsstøtteprosjektet har vi fått støtte til å gjennomføre ei første utprøving av borkestrakt frå lokale bartre som fôrtilsetningsmiddel mot koksidiøse på levande lam. Dersom resultatane er lovande, kan det på sikt bidra til produksjon av fôrtilsetningsmiddel av borkestrakt mot parasittar. Vi veit allereie at borkestrakt og kondenserte tanninar verkar mot nematodar hos sau og storfe (Hoste et al. 2006; Hoste et al. 2015) og det har vore gjort nokre få forsøk for å undersøke eventuell effekt mot koksidiar (Saratsis et al. 2016).

I Norge vert lamma oftast smitta når dei kjem ut på beite og blir i så fall sjuke medan dei enda diar mora, men før dei har utvikla full drøvtyggarfunksjon. Vi har ikkje funne referansar på at tanninekstrakt er utprøva på lam (eventuelt kje eller kalv) før dei har vorte 3-4 månader og har ein godt utvikla drøvtyggarfunksjon (Fraquelli et al. 2015; Saratsis et al. 2016). Dersom det skal ha praktisk nytte i norsk driftsopplegg, må middelet ha verknad også hos yngre dyr og det må kunne gjevast før eller straks etter beiteslepp.

Bruksområdet for middelet vert utvida og produksjon kan bli lønsam dersom det viser seg at middelet kan brukast mot både koksidiar og nematodar og både til storfe og sau.

Det var behov for eit kvalifiseringsprosjekt for utprøving i mindre skala før ein eventuelt går vidare med ei meir omfattande testing og utvikling av eit kommersielt produkt.

1.2 Hovudmål og delmål

Hovudmålet med prosjektet var å undersøke om ekstrakt av kondenserte tanninar frå bork (avfall frå sagbruksindustrien) kan hindre utvikling av koksidiøse hos lam.

For å få meir kunnskap om dette hadde prosjektet tre delmål knytt opp mot hypotesar som vi ville teste.

Delmål:

- Velge ut eit ekstrakt med potensiale frå *in vitro*-forsøk
- Gjennomføre eit første forsøk ved å teste ekstraktet på levande lam
- Vurdere potensialet og eventuelle flaskehalsar for utvikling av eit salsprodukt for å sjå om det kunne vere lønsamt

Hypoteser:

- Det er skilnad i tanninkonsentrasjon og biologisk aktivitet av tanninane frå ulike treslag og etter ulike avborkingsmetodar eller årstid der borken vart hausta
- Bork som har høg effekt mot koksidiar i laboratorietestar vil også vise seg å ha god effekt på levande lam
- Det vil gje auka lønsemd for bonden om han kan gje eit slikt ekstrakt til lamma om våren, føresett at prisen er den same som dei midla som er godkjent og i bruk i dag

I forsøket ville vi sjå på om det var skilnad mellom grupper av lam som var smitta med koksidiar, der ei gruppe fekk borkekstrakt og ei anna gruppe ikkje fekk behandling. Vi ville undersøke effekt på tilvekst, på konsistensen av avføringa (faecal-score) og på talet av koksidi-egg i avføringa til lamma på ulike tidspunkt etter smitte.

Vi ville også gjere ei vurdering av metode, arbeid og kostnad med ekstrahering av tanninar frå bork med sikte på om det kunne vere eit forretningspotensiale i utnytting av bioaktive stoff i borken mot parasittar hos husdyr.

2 Materiale og metode

2.1 Forsøksoppsett

Forsøket var godkjent av Mattilsynet (FOTS ID 18555). Det vart utarbeidd protokollar for alle arbeidsoperasjonar i prosjektet også med tanke på eventuell vitskapeleg publisering av resultatata.

Dyremateriale

Lamma vart kjøpt inn frå ei kommersiell sauebesetning i Møre og Romsdal. Til saman 25 nyfødde lam av rasen norsk kvit sau vart tekne ut frå mora under fødselen, utan å vere i kontakt med omgjevnaden utanfor. Lamma var fødd mellom 26. og 29. april 2019. Morsøyene var plukka ut ved at det var teke ultralyd på førehand for å sjå kor mange lam dei hadde, og vi kunne hente trillingar og firlingar eller tvilling frå gimrer. I forsøksgruppa vart det 11 søyelim og 14 vêrlam. Umiddelbart etter fødselen vart lamma vaska grundig i Optima-såpe, tørka, merka og vegd.

Vi valte å gjennomføre forsøket som eit blokkforsøk med tre behandlingar for dermed å redusere behovet for talet på dyr i forsøket. Kvar blokk bestod av mest mogleg like lam og det er da ikkje nødvendigvis slik at observasjonane innan ei blokk må vere ukorrelererte, slik ein elles måtte ha føresett.

Fôring

Lamma fekk 1,5 dl råmjølk med sonde innan ein time etter fødsel. Deretter vart dei transportert direkte til forsøksfjøsset og fordelt i grupper på tre eller fire. Alle lamma fekk råmjølk det første døgnet, til saman 6 måltid à 1,5 dl. Etter første døgnet vart dei fôra individuelt med mjølkeerstatning etter norm, og med fri tilgang til høg og kraftfôr. Mengde mjølkeerstatning til kvart lam vart målt dagleg. Råmjølka var samla inn i 2018, det var målt immunoglobulin med Brix-refraktometer både ved uttak og etter innfrysing. Mjølka var frosen ned til -80 °C i 14 dagar, deretter oppbevart ved -25 °C til den skulle brukast. Høyet som skulle brukast var frose ned til -25 °C i 5 månader. Dette vart gjort for å sikre at fôr til lamma ikkje skulle vere smitta med koksidiar.

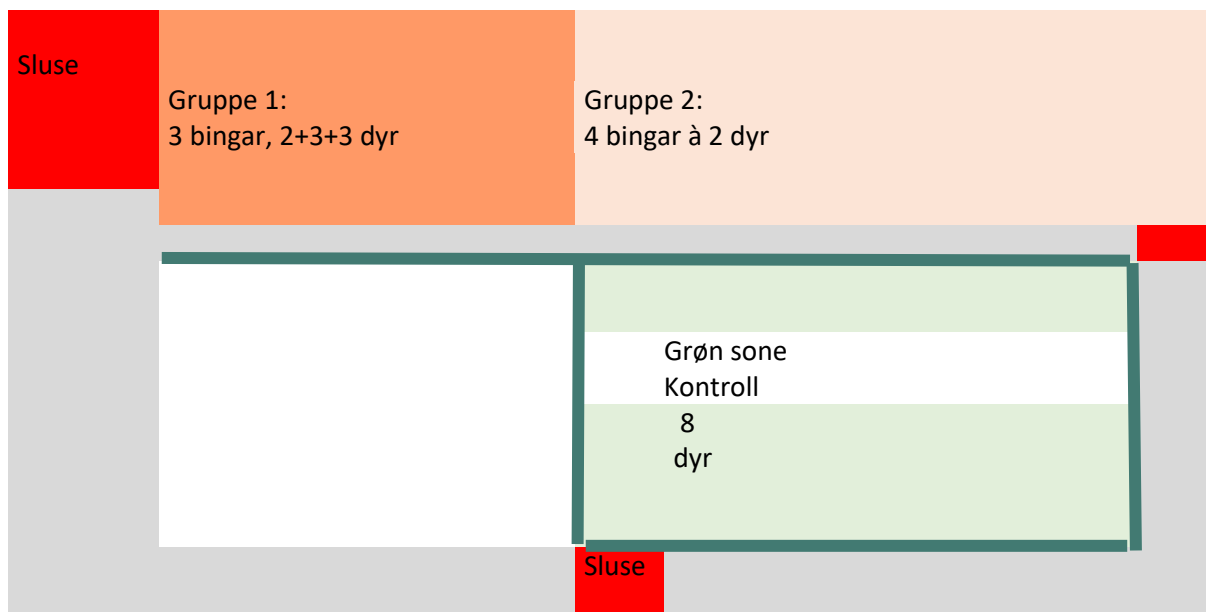
Gruppering av forsøkslamma

Tre veker etter innsett i forsøksfjøsset vart lamma delt i tre like store grupper etter ei randomisert blokk-fordeling der fødselsvekt og kjønn var utvalskriteria:

- Gruppe 1 vart smitta med koksidiar og fekk inga behandling
- Gruppe 2 vart smitta med koksidiar og blei behandla med borkekstrakt
- Gruppe 3 vart kontrollgruppe, dei blei ikkje smitta og fekk ikkje behandling

Forsøksfasilitetar

Forsøksrommet hadde ikkje vore brukt til sau og heller ikkje til andre dyr på 9 år. Rommet var reingjort, desinfisert med Virkon S og innreia med nye hardplast kalvehytter (Agriplastic) med areal til inntil 7 lam i kvar hytte. Det vart etablert to smittesluser, ei eiga smittesluse inn til kontrollgruppa og ei sluse inn til dei to forsøksgruppene. Det vart montert varmelampe i hyttene og til golv vart det lagt nye syntetiske grasmatter og deretter brukt avisopapir og papp til "strø" for å sikre at forsøkslamma ikkje skulle bli smitta av koksidiar frå miljøet. . Kvar hytte hadde ei lita fôrkrybbe til høg og kraftfôr, og ei bøtte med smokkar til å ha vatn i.



Figur 2: Skisse av forsøksrom.



Bilde 1: Forsøkshyttene. Foto: Juni Rosann E. Johansen

2.2 Behandling

2.2.1 Smitte og ekstrakt

Lamma vart fordelt i grupper 16. mai 2019, og dei vart smitta 22. mai 2019 (dag 0 i forsøket). Parasittane som vart brukt var eit feltisolat av *Eimeria* spp. innsamla ved NMBU Sandnes i 2018. Oocystene vart oppkonsentrert og sett til sporulering under kontinuerleg lufting ved hjelp av ei akvariumpumpe i 10 dagar. Oocystene vart telt og grad av sporulering fastslått. På Dag 0 og i ytterlegare to dagar vart lam i gruppe 1 og 2 smitta via sonde med 100 000 oocyster per dag.

Gruppe 2 fekk i tillegg til smitte borkekstrakt via sonde. Vi prøvde å gje ekstraktet med flaske og smokk, men dette viste seg å vere svært vanskeleg. Difor vart sonde nytta ved alle behandlingane. Vi hadde da god kontroll på inntaket av borkekstrakt. Samtidig var lamma som blei sondeføra utsett for meir stress samanlikna med lamma som ikkje fekk behandling men blei flaskeføra med vatn.

Doseringa av ekstrakt vart først fastsett til 0,1% av MBW (metabolsk kroppsvekt=vekt^{0,75}), og dette vart dosert den første dagen med sonde.

Vi såg allereie etter ein dag at dei lamma som hadde fått borkekstrakt mista matlysta og ville ikkje drikke noko særleg mjølk. Somme slutta heilt å drikke. Det kunne sjå ut som nokre av lamma hadde forstopping. Mengda ekstrakt som vi ga med sonde var også høg, ca. 250 ml og med 28% tørrstoff. Vi gjekk difor over til å gje halv dose, som blei 0,05% av BMW dagleg, fordelt på morgon og kveld og med 14% tørrstoff. Til saman fekk lamma borkekstrakt i 12 dagar fordelt på 19 gonger i tidsrommet 22. mai til 2. juni (dag 0-11).

Eitt lam døydde på dag 3 på grunn av feilføring med sonden, og vart erstatta av eit lam frå kontrollgruppa.

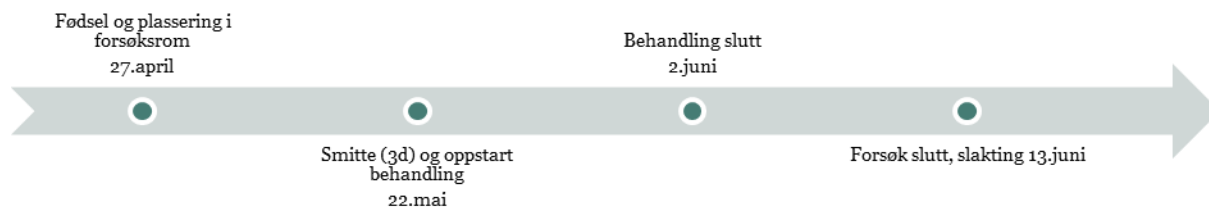
Etter planen skulle vi ha to ulike konsentrasjonar av borkekstrakt for å studere om konsentrasjonen hadde betydning for effekten mot koksidane, men på grunn av problem med å skaffe nok ekstrakt, valde vi å køyre forsøket med ein konsentrasjon og i ei mengde som vi ut frå referansar med forsøk på kje og litt større lam meinte burde ha effekt (Fraquelli et al. 2015; Saratsis et al. 2016).

2.2.2 Observasjonar og prøvetaking

Vi voga lamma ved fødsel, ved deling i grupper (16. mai), ved oppstart av smitteforsøket og behandlinga (22. mai), midtvegs i behandlinga (29. mai) og ved forsøksslutt og slakting (12. juni). Dei vart observert klinisk to gonger dagleg i heile forsøksperioden, og konsistensen på avføringa vart notert og gradert i ein skala frå 1-5 (Gradwell 2000).

Det vart teke avføringsprøver for teljing av oocyster frå lamma før dei vart smitta (22. mai) og kvar dag frå 3. juni til 12. juni av gruppe 1 og 2. Lamma i gruppe 3 (kontrollgruppa) vart det teke avføringsprøver av ved oppstart av forsøket (22. mai) og ved slakting (13. juni). Parasittbelastninga vart estimert ved å telje oocyster av *Eimeria* spp. (modifisert McMaster-metode, dansk tellekammer) og rekne ut oocyster per gram avføring.

Dag 22 vart alle dyra slakta ved Øre Vilt AS. Ved slakting vart det teke tarmbiopsiar av alle lamma. For å sjå etter kvar i tarmen skade eventuelt oppstod og om det var skilnad på behandla og ubehandla gruppe og kontrollgruppe, tok vi vevsprøvar frå sju ulike stader i mage-tarm-kanalen. Tarmbiopsiane vil seinare undersøkast for om ekstraktet i seg sjølv kan ha positiv verknad på tarmslimhinna.



Figur 3: Tidslinje for forsøket.



Bilde 2 & 3 viser borkekstraktet og fôring av lam med borkekstrakt frå sonde. Foto: Juni Rosann E. Johanssen



Bilde 4 & 5: Lam ved høykrybba i ei kalvehytte og veping av lam. Foto: Juni Rosann E. Johanssen

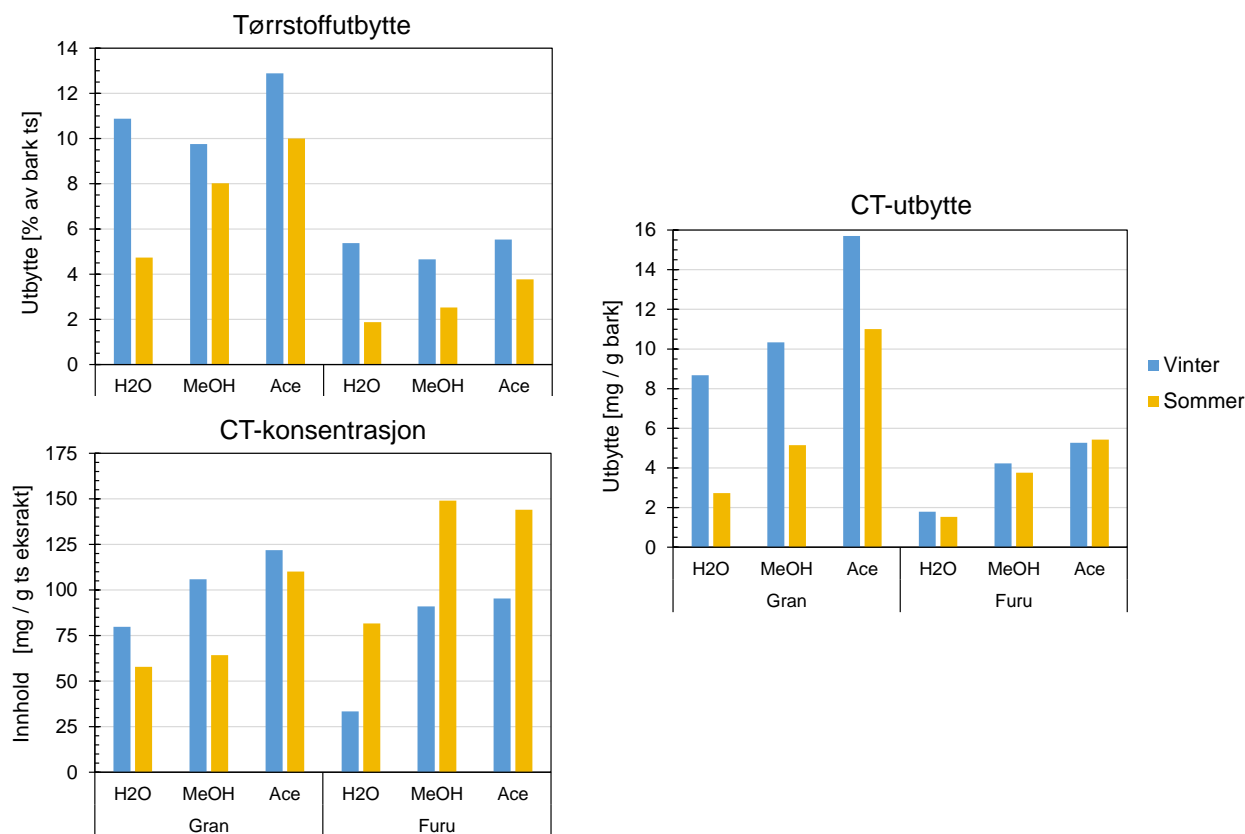
2.3 Innsamling av bork og ekstrahering

Vi valde å samle inn bork frå norsk gran (*Picea abies*) på bakgrunn av resultat frå BarkCure, som har vist at vinterbork frå gran har det høgaste innhaldet av kondenserte tanninar (sjå figur 4, 5 & 6). Granbork vart henta frå Bøfjorden Sag AS. Avborkinga vart gjort med trommel. Grana vart borka den 28.-29. mars 2019, og ca. 230-240 kg bork vart henta dagen etter og lagt til fortørking i eit tynt lag på sementgolv i eit uisolert rom med stor vindaugsflate og bra solinnstråling. Borken vart fortørka frå ein tørrstoffprosent på 28% til ca. 40%. Borken vart knust og oppmalen til ein diameter på ca. 2 cm for at den skulle vere betre eigna for vidare behandling hos SINTEF. Til dette brukte vi ein liten flishoggar til hagebruk og ei eplekvern.

Hos SINTEF var oppgåva å lage eit ekstrakt av kondenserte tanninar av borken. Arbeidet vart basert på resultat frå BarkCure-prosjektet, men modifisert for å kunne produsere ekstrakt i større mengder. Til ekstraksjon av tanninar kan ein nytte aceton og metanol som gjev bra utbytte, eller vatn som krev 2-2,5 gonger så stort ekstraksjonsvolum. På grunn av mangel på utstyr til å handtere aceton eller metanol, vart det bruka vatn i dette forsøket. Ekstraksjonen vart gjort med SINTEF Ocean sitt mobile pilotanlegg, som nyttar tappevatn på 80 °C i ein tank på 1 m³. I vårt forsøk vart det brukt 65 °C. Borken vart delt i to porsjonar og kvar porsjon vart ekstrahert to gonger i 1-1,5 time. Ekstraktet vart tappa frå toppen av tanken med pumpe, og overført til ein oppsamlingstank. Resten av borken som var att i tanken vart fjerna med slamsugar. Ekstraktet vart deretter oppkonsentrert i ein mekanisk avdampar med resirkulering (Epcon, Epcovap MVR 4). Omlag 1300 l ekstrakt vart konsentrert til 82 l gjennom denne prosessen. Konsentratet vart frysetørka, ca. 80% av konsentratet ved Vitenskapsmuseet ved NTNU, Trondheim og resten ved SINTEF Industri.

I BarkCure-prosjektet vart ekstraksjon med ulike løsemiddel utprøvd i laboratorieforsøk. Borken vart her finmalen med kaffikvern før ekstraksjonen. Etter ekstraksjon vart borken fjerna ved

sentrifugering og innholdet av kondenserte tanninar var bestemt ved ein kolorimetrisk metode. Metoden er basert på syrekatalysert depolymerisering av tanninane ved oppvarming med butanol og saltsyre ("butanolyse"). Den dominerande monomeren (anthocyanidin) detekterast spektrofotometrisk (Grabber et al. 2013). Som vist i figur 5, var CT-innholdet høgast i aceton- og metanol-ekstrakt frå furubork samla om sommaren, men det totale utbyttet var høgast frå gran, og høgare frå vinter- enn frå sommarbork. Det vart difor bestemt å nytte vinter-bork frå gran.



Figur 4, 5 & 6: Innhold av CT i ulike barkekstrakt, ekstrahert med vatn (H₂O), metanol (MeOH) eller aceton (Ace) (frå BarkCure-prosjektet).



Bilde 6 & 7: Frå ekstraksjon av tanninar på SINTEF. Foto: Inga M. Aasen



Bilde 8 & 9: Frå ekstraksjon av tanninar på SINTEF. Foto: Inga M. Aasen

2.4 Laboratorietesting av ekstrakt

Det var planlagt å nytte borkekstrakt som var testa *in vitro* mot *Eimeria spp.* i BarkCure-prosjektet, men i BarkCure vart det valt å gjennomføre testing mot ein annan parasitt, *Cryptosporidium parvum*. Difor var ikkje resultatane frå det forsøket like relevant for vårt forsøk, og vi valte å bruke det ekstraktet vi hadde frå bork frå Bøfjorden Sag AS i forsøket vårt.

2.5 Innsamla data og statistisk analyse

Materiale og data til vidare analyse og drøfting er:

- 1) Vekt ved ulike tidspunkt for forsøksdyra
- 2) Mengde mjølkeerstatning gitt per dyr og dag
- 3) Avføringsprøver for teljing av koksidiar ved ulike tidspunkt i forsøket
- 4) Tarmprøvar til vidare histologisk undersøking frå alle dyra
- 5) Kliniske observasjonar inklusive faecal-score i heile forsøksperioden
- 6) Prøver av ekstraktet som vart gitt for kvar dag, for eventuelle seinare kjemiske analyser

2.5.1 Statistisk behandling av resultatane

Vi rekna ut tilvekst i g/dag for ulike tidsperiodar i prosjektperioden for dei tre gruppene behandla, ubehandla og kontroll, og korrigererte for alder og kjønn på lamma. For tilvekst analyserte vi data med ein ein-sidig og to-sidig t-test i Minitab med testnivå 0,05.

For oocyster var hypotesa som skulle testast: «Borkekstrakt gitt til lam reduserer utskiljinga av koksidiar». Vi vurderte ulike statistiske modellar for å evaluere resultatane. Vi køyrde først ein ein-sidig og to-sidig t-test på Minitab med testnivå 0,05 for å samanlikne oocyster per gram avføring (OPG) ved ulike tidspunkt. Sjølv om det ikkje var gitt ei normalfordeling i gruppene og resultatane for kvart lam på ulike tidspunkt ikkje var uavhengige av kvarandre, ville t-test kunne gje ein god indikasjon. Vi køyrde deretter ein blanda modell der behandling og tid var faste og kategoriske effektar, boks var tilfeldig effekt og gjentekne observasjonar på same individ var avhengig av kvarandre.

Utviklinga av koksidiar følgjer ei eksponensiell vekstkurve til den flatar ut og til slutt går nedover når dyret utviklar immunitet og smittetrykket blir redusert, t.d. ved sending på fjellbeite (Chapman 1974; Gregory & Catchpole 1989). Vi valte difor til slutt å køyre ein blanda modell for regresjonsanalyse i SAS, der boks var tilfeldig faktor, tid var ein kontinuerleg variabel, behandling (bork eller ikkje bork) var fast variabel og OPG var effekt, og der vi undersøkte samspelet mellom behandling og tid. I og med at vi ikkje kunne køyre ln-funksjon for 0, blei den lineære funksjonen:

$$\ln \text{OPG}+1 = \ln \text{alfa}$$

Når vi køyrde denne analysen, så vi at «boks» hadde ein varianskomponent på 0 og vi kunne ta den ut av framstillinga. Det same gjaldt gjentekne observasjonar av same individ, der det i denne modellen ikkje ga utslag og blei fjerna for å forenkle framstillinga.

3 Resultat

3.1 Produksjon av borkekstrakt

Av 235 kg fersk granbork fekk vi ca. 6 kg tørt borkekstrakt (92% tørrstoff), med eit innhald av ca. 300 g CT (tabell 1 og 2). Utbyttet av tørt ekstrakt var ca. 7,8 kg, eller 11-12% (tabell 2). CT-innhaldet vart målt separat frå dei fire rundane og varierte mellom 46 og 51 g/kg tørka ekstrakt. Prøver frå tre av fem kanner med konsentrat viste alle 49 g/kg tørt ekstrakt. Tørrstoffutbyttet var det same som det som tidlegare var oppnådd frå vinter-bork i laboratorieskala i BarkCure-prosjektet, medan CT-utbyttet var lågare (75 g/kg i laboratorieforsøk). Ein viktig skilnad var at borken i laboratorieforsøket var finmala til partiklar mindre enn 1-2 mm, medan denne borken var ca. 2 cm, noko som ga redusert utbytte.

Tabell 1: Borkmengde og ekstrahert volum, SINTEF.

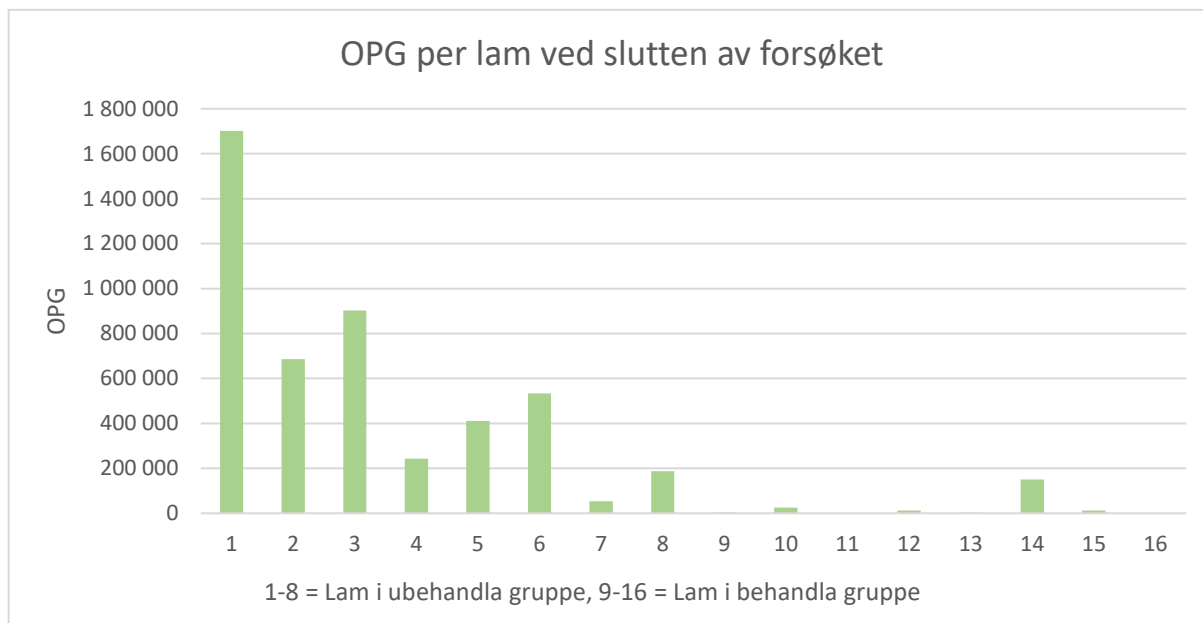
	Fersk bork, kg våtvekt	Fortørka bork, kg våtvekt	Bork, kg tørrvekt	Tilsett vatn, kg	Ekstrakt, kg våtvekt
Ekstraksjon 1	140	90	39	600 + 400	700
Ekstraksjon 2	95	67	27	550 + 300	600
SUM	235	157	66	1850	1300

Tabell 2: Tørrvekt og CT-innhald, SINTEF.

	Mengde kg våtvekt	Mengde kg tørrvekt	CT g/kg	CT g
Bork	235	66	Ikkje målt	298
Ekstrakt	1300	7,8	46-51	
Konsentrat	82	5,6	49	
Tørka produkt	6,1	5,2	Ikkje målt	

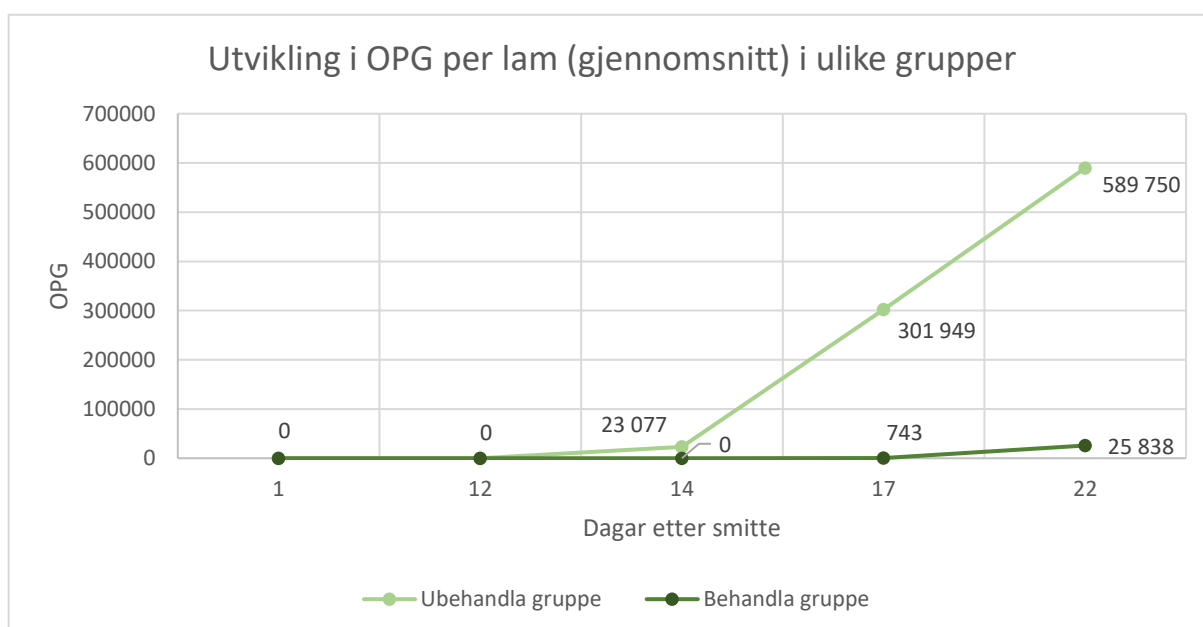
3.2 Parasittbelastning

Figur 7 viser resultatane av den første statistiske analysa med t-test, der vi samanlikna OPG ved avslutning av forsøket for den behandla gruppe og den ikkje behandla gruppa. Det var signifikant lågare OPG i den behandla gruppa med et gjennomsnitt på ca. 26 000 OPG per lam, mot et gjennomsnitt på ca. 590 000 OPG per lam i den ubehandla gruppa (t-test tosidig P=0,019, t-test einssidig P=0,0096).



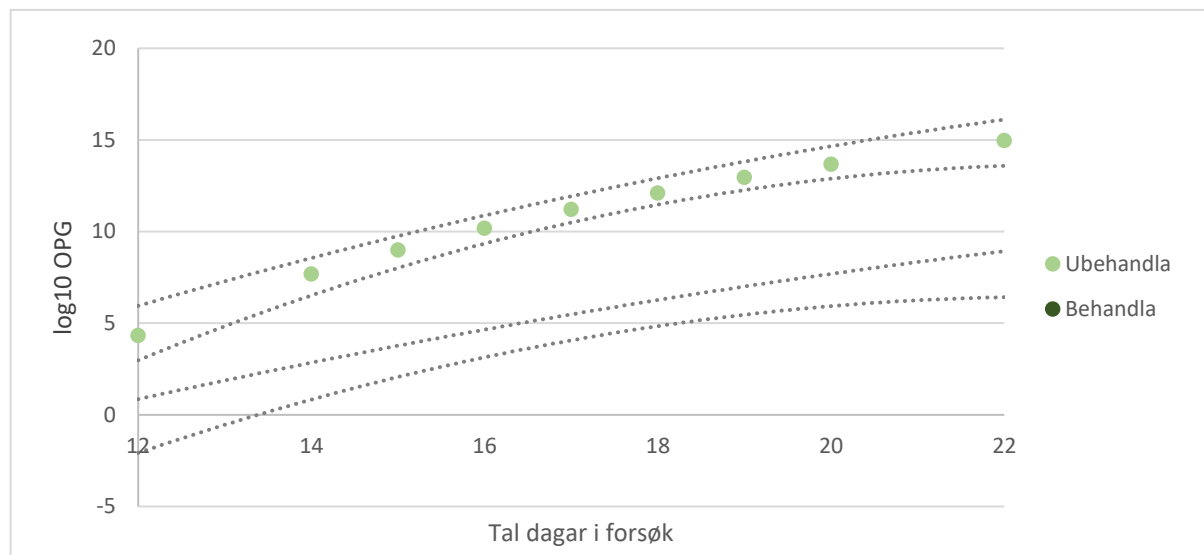
Figur 7: OPG per lam 21 dagar etter smitte for ubehandla gruppe (1-8) og behandla gruppe (9-16).

Vi reknar eit koksidietalet på meir enn 50 000 OPG som sterk smitte. 100 000 OPG er venta å gje kliniske symptom på koksidiose, men talet kan ofte vere over 1 million OPG ved alvorleg infeksjon. Utskiljing av oocyster startar 1-2 veker etter smitte. Dag 21 var 10 dagar etter avslutta borkbehandlinga. OPG for den behandla gruppa var dag 21 på det same nivået som ubehandla gruppe låg på dag 14 (figur 8).

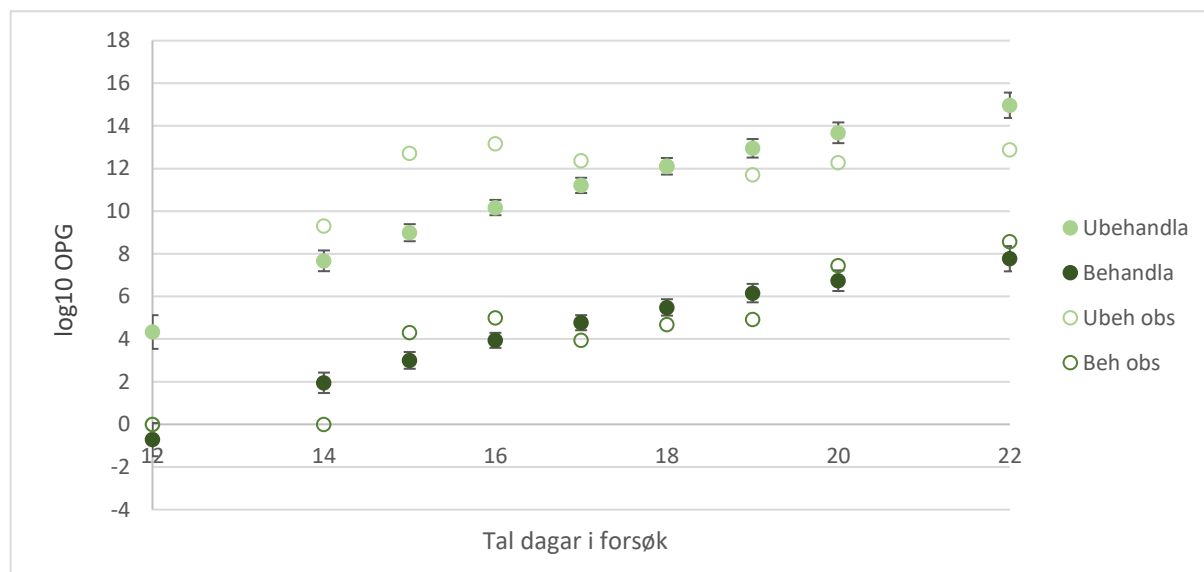


Figur 8: Gjennomsnittleg OPG for ubehandla og behandla gruppe over tid.

Regresjonsanalysane støttar hypotesa om at borkekstrakt reduserer utskiljinga av koksidiar hos lam for den perioden vi har gjort observasjonar (forsøk på tre veker) (figur 9 og 10). Det er signifikant effekt av behandling på utskiljinga av koksidi-egg ($P < 0,0005$) og det er ein klar samanheng mellom behandling og tid ($P < 0,0001$).



Figur 9: Regresjonsanalyse i SAS, alle variablar.



Figur 10: Regresjonsanalyse i SAS – variablar utan effekt utelate (tabell frå SAS i vedlegg 1). «Ubeh obs» og «Beh obs» er observert og «Ubehandla» og «Behandla» er estimat.

3.3 Konsistens på avføring

Konsistens på avføringa vart målt som faecal-score (FS) på ein skala frå 1-5, der 1 er normal avføring og 5 er blodig diaré.

Før smitte og behandling med bork dag 0, hadde alle lamma normal avføring (FS 1) (tabell 3).

Dag 10 var gjennomsnittleg FS i den usmitta kontrollgruppa 1,125 (variasjon frå 1 til 2), i behandla gruppe 2,125 (variasjon frå 1 til 3) og i ubehandla gruppe 1,125 (variasjon 1 til 2).

På dag 17 var gjennomsnittleg FS i behandla gruppe 1,375 (variasjon frå 1 til 2) og i ubehandla gruppe 2,571 (variasjon frå 1 til 4). Ubehandla gruppe hadde signifikant høgare FS enn behandla gruppe ($P=0,03$). I kontrollgruppa var det ikkje teke FS på enkeltdyr den dagen, men det var ikkje observert anna enn normal avføring i bingen (FS 1).

På forsøket sine siste dag, dag 22, var gjennomsnittleg FS i den usmitta kontrollgruppa 1,40 (variasjon frå 1 til 2), i behandla gruppe 1,750 (variasjon frå 1 til 3) og i ubehandla gruppe 3,000 (variasjon frå 2 til 4).

Tabell 3: Faecal-score i ulike grupper på ulike tidspunkt.

	Dag 0	Dag 10	Dag 17	Dag 22
Kontrollgruppe	1,000	1,125 (1-2)		1,400 (1-2)
Behandla gruppe	1,000	2,125 (1-3)	1,375 (1-2)	1,750 (1-3)
Ubehandla gruppe	1,000	1,125 (1-2)	2,571 (1-4)	3,000 (2-4)

3.3.1 Evaluering av faecal-score

Med students t-test i Minitab fekk vi følgjande resultat:

- Dag 10 hadde ubehandla gruppe signifikant lågare FS enn behandla gruppe ($P=0,01$), og kontrollgruppa hadde lågare FS enn behandla gruppe ($P=0,03$), berekna med ein-sidig t-test.
- Dag 17 hadde ubehandla gruppe signifikant høgare FS enn behandla gruppe ($P=0,03$).
- Dag 22 hadde behandla gruppe og kontrollgruppe signifikant lågare FS enn ubehandla gruppe ($P=0,01$), og det var ikkje skilnad på behandla gruppe og kontrollgruppe ($P=0,2$).

3.4 Tilvekst

Gjennomsnittleg tilvekst frå fødsel til slakting var 390 g/dag i kontrollgruppa, 373 g/dag i den ubehandla gruppa, og 322 g/dag i den behandla gruppa (tabell 4). Det var signifikant skilnad mellom gruppene frå smittetidspunktet og ut forsøksperioden, der behandla gruppe hadde lågare tilvekst ($P=0,01$), og det same når vi rekna frå fødsel til slakting ($P=0,02$).

Tabell 4: Gjennomsnittleg tilvekst g/dag for dei ulike gruppene.

Tilvekst	Fødsel-smitte (g/dag)	Fødsel-10 dagar etter smitte (g/dag)	Under behandling (g/dag)	Smitte-slakting (g/dag)	Slutt behandling-slakting (g/dag)	Fødsel-slakting (g/dag)
Kontrollgruppe	339	382	375	413	442	390
Behandla gruppe	324	314	268	290	301	322
Ubehandla gruppe	331	345	348	386	393	373

3.5 Kliniske observasjonar

Første dagen vi ga smitte og borkekstrakt til lamma (dag 0 kl.12.00) såg vi allereie om ettermiddagen (kl.16.00) at dei lamma som hadde fått bork ikkje drakk eller tok til seg høy og kraftfôr. Om kvelden dag 1 (23. mai kl. 22.00), same dag som vi hadde begynt å gi kvart dose av estimert dagsdose av ekstrakt frå morgonen, hadde eitt lam kolikksymptom som gjekk over etter få minutt. Generelt var alle lamma som hadde fått ekstrakt fylte i magen, dei var unormalt rolege og drakk ikkje mjølkeerstatning. Alle ubehandla lam var i fin form. Vi ga ikkje meir ekstrakt 23.mai. Om morgonen den 24. mai hadde det lammet som viste kolikksymptom dagen før, mykje svart og litt flytande avføring, og det var varierende matlyst på alle lamma som hadde fått ekstrakt. Vi starta opp igjen med kvart dagsdose om ettermiddagen den 24. mai og fortsette med å gje kvart dose av opprinneleg planlagt dagsdosering morgon og kveld, ut forsøksperioden.

Alle lamma i gruppa som vart behandla med ekstrakt, hadde nedsatt matlyst så lenge behandlinga varte. Dei fleste hadde litt diaré, fleire verka rolege eller litt slappe og eitt lam fekk elektrolytt-behandling (med flaske og smokk) fordi vi frykta dehydrering. Allereie dagen etter at behandlinga var slutt, verka lamma kvikkare, drakk mjølk og begynte å ta litt høy og kraftfôr igjen.

Dag 15, ei veke før prosjektslutt, vart eitt av dei behandla lamma observert å vere litt slapp, men utan andre kliniske symptom. Dagen etter var tilstanden normal igjen.

Dag 21, dagen før slakting, vart det same lammet som fekk kolikksymptom første behandlingsdag observert halt på to bein og med tydeleg teikn på leddbetennelse. Lammet vart avliva same dag som dei andre vart sendt til slakteriet.

Oppsummert er observasjonane at:

- I kontrollgruppa viste ingen lam teikn til sjukdom
- I den ubehandla gruppa var allmenntilstanden til alle lamma god, men alle lamma utvikla varierende grad av lett diaré mot slutten av forsøket, som forventa ut frå smitte og inkubasjonstid.
- I gruppa som fekk behandling med borkekstrakt observerte vi at tilførsel av ekstrakt ga fordøyingsproblem med symptom på kolikk, etterfølgd av lav grad av diaré, opphøyrte matlyst og litt nedsett allmenntilstand. Det lammet som viste sterkast symptom fekk også leddbetennelse mot slutten av forsøket. Etter ti dagar med behandling og nedsett matlyst vart tilveksten redusert, og den rakk heller ikkje å ta seg opp i løpet av den korte forsøksperioden. Etter at behandlinga med borkekstrakt vart avslutta, kom matlysta raskt tilbake og fordøyingssystemet fungerte normalt og med normal avføring ut forsøksperioden.

4 Diskusjon

4.1 Produksjon av ekstrakt – Industrielt

Både på grunn av produksjon av ekstrakt for vårt forsøk og for BarkCure-prosjektet, vart det undersøkt om det finst industrielt utstyr som kunne ta hand om dei mengdene bork vi hadde behov for, og ekstrahere med aceton eller methanol, noko som krev særskilt utstyr og godkjenning. Vi har ikkje funne aktørar som kunne påta seg dette oppdraget i Norden, og SINTEF Industri gjorde da ein jobb med det utstyret dei kunne skaffe, men som ikkje er optimalt for ein slik prosess.

Initielle småskala forsøk av umala eller grovmala bork har vist at tørrstoff-utbyttet ikkje nødvendigvis korrelerer med totalt CT-utbytte. I denne prosessen med fleire steg, var CT-innhaldet per ekstrahert tørrvekt eining lågast i den første ekstraheringa, noko som indikerer at det er andre komponentar enn CT som lettare blir ekstrahert. Det lågare utbyttet av CT i denne storskala produksjonen kan dermed skuldast borken sjølv (anna lokasjon) eller storleiken på partiklane. Den høgare temperaturen som vart nytta (80 °C i småskala mot 65 °C i vårt forsøk), kan også ha verka inn, men sidan det ikkje var noko tap under avdampinga, er dette lite sannsynleg. Tapet av tørrvekt frå ekstraksjon til ferdig tørka produkt er fysisk tap. I full-skala-prosessen let ein borken sedimentere og ekstraktet vart pumpa frå toppen av tanken, medan det i laboratorieskala vart nytta sentrifugering. Dette ga mindre utbytte i vårt tilfelle etter som meir væske vart etterlate med innhald av tanninar i tanken.

Fleire andre erfaringar vart også gjort, noko som er med å gje anbefalingar til ein eventuell industriell oppskaleringssprosess for ekstrahering. Slik arbeidet no vart gjennomført, gjekk det svært mykje tid og det vart nytta kostbart og lite eigna utstyr. Resultatet var at kostnaden med produksjon av 300 g CT vart formidabel, og kan ikkje nyttast til å vurdere ein eventuell framtidig produksjonskostnad og produktpris.

Oppvarminga av ekstraktet for å dampe vekk vatnet gjekk mykje seinare enn det gjer ved fordamping av reint vatn, noko som indikerer at ekstraktet har ein slags isolerende effekt. Frysetørkinga tok også lengre tid enn venta. Dette kan skuldast eigenskapar ved ekstraktet som bind vatn og at det tørka ekstraktet dannar eit isolerende lag som dekkjer isen under frysetørkinga.

Ekstraksjon med løysemidlar (metanol, etanol, aceton) betyr ikkje berre at volumet løysemiddel som trengst for å ekstrahere ei gitt mengde CT vert redusert, men det gir også eit ekstrakt med høgare CT-innhald per gram tørrstoff. Det betyr at vi kan bruke ei mindre mengde ekstrakt i fôret.

Erfaringane frå denne prosesseringa vil bli brukt som grunnlag for ein rapport frå SINTEF om anbefalingar for ein framtidig industriell prosess.

4.2 Effekt mot koksidiar

Borkekstraktet viste seg å ha signifikant effekt på utviklinga av koksidiar av *Eimeria spp.* i tarmen på lamma i vårt forsøk, målt både ved konsistens på avføringa og ved teljing av koksidiegg (OPG). I dette forsøket vart ekstraktet gitt samtidig med at dyra vart smitta og i 12 dagar framover, om lag det vi reknar som gjennomsnittleg inkubasjonstid for dei to mest vanlege *Eimeria*-artane hos sau, *E.*

crandallis og *E. ovinoidalis*. I inkubasjonstida, tida frå smitte til vi ser utskiljing av egg i avføringa og/eller kliniske symptom, er livssyklusen slik at lamma tek opp sporulerte oocyster (koksidié-egg) frå miljøet. Desse oppformerer seg og går gjennom fleire utviklingstrinn i tarmen til dyret før dei vert skilt ut som oocyster igjen. Parasitten går inn i tarmcellene og formerer seg der i fleire rundar. Under denne prosessen vert tarmcellene øydelagt slik at det blir lekkasje av væske og salt, blødningar og tarmcellene tek ikkje opp næring. Heile syklusen i tarmen til dyret tek 2-4 veker, avhengig av *Eimeria*-arten.

Lamma fekk altså tilført borkekstrakt i om lag heile inkubasjonstida for parasitten, da dei parasittane skulle vandre inn i tarmcellene og formere seg. Vi såg at dei lamma som ikkje fekk behandling begynte å skilje ut oocyster etter ca. 14 dagar, medan vi framleis ikkje kunne påvise oocyster i avføringa til dei behandla lamma. Ti dagar deretter, ved slakting, hadde dei ubehandla lamma store mengder oocyster i avføringa, medan dei som hadde fått behandling hadde null eller svært lågt oocystetal. Spørsmålet er da om vi med behandlinga berre har forsinka syklusen for parasitten; at den har overlevd i tarmen/tarmcellene og vil starte oppforminga så snart verknaden av ekstraktet er borte, eller om ekstraktet har svekka livskrafta og mengda av parasittar så mykje at ein ikkje vil få ei utvikling til store parasittmengder på dei behandla dyra. For å finne ut kva stadium ekstraktet verkar på parasittane og kor langvarig effekt det kan ha, måtte vi ha køyrt forsøket 2-3 veker til. Da hadde vi truleg fått meir alvorlege symptom på ubehandla lam og fått meir kunnskap om verkemåte, verkningsgrad og verketid for ekstraktet.

4.3 Effekt på tilvekst

I dette forsøket fann vi signifikant lågare tilvekst på dei lamma som fekk borkekstrakt, både i forhold til kontrollgruppa og den smitta og ubehandla gruppa. Vi har analysert tilveksten i ulike periodar av forsøket, og ser at frå fødsel til oppstart av forsøket med smitte og behandling har vi ingen skilnad i tilvekst. I forsøket mista lamma i den behandla gruppa 10-12 dagar med tilvekst, og dette greidde dei ikkje å ta igjen i den korte tida dette forsøket varte etter at behandlinga var avslutta, sjølv om dei i perioden etter behandlinga var friske og med normal avføring i motsetning til dei smitta dyra som begynte å få diaré. Vegingane viser at tilveksten auka igjen etter behandlingsslutt for dei lamma som fekk ekstrakt.

4.4 Som fôrtilsetningsmiddel

I andre forsøk som er gjort med bork som fôrtilsetningsmiddel mot parasittar, er midla prøvd ut på eldre dyr enn i vårt forsøk (Fraquelli et al. 2015; Cervantes-Valencia et al. 2016). Anten det er lam eller kje, er det stort sett dyr over tre månader og som da har utvikla drøvtyggarfunksjon og der tilførsel av borkekstrakt eller bork utgjer ein minimal del av dagleg fôrrasjon og ikkje fyller opp i fordøyingssystemet slik at matlysta blir hemma. Tørrstoffinnhaldet i den dosen av ekstrakt vi ga var ca. 13% og mengde tørrstoff frå behandlinga ca. 65 g/dag. Lamma i forsøket hadde fri tilgang på kraftfôr og høyr frå oppstart av forsøket. Lamma var oppstalla i grupper på to og tre, så vi kunne ikkje rekne ut eller verifisere fôropptaket av høyr og kraftfôr til kvart enkelt dyr. Ut frå dei daglege observasjonane og notata som blei gjort under fôring morgon og kveld, så vi at lamma som vart behandla nesten ikkje smakte på verken kraftfôr eller høyr i behandlingsperioden, medan dei andre, både kontrollgruppa og ubehandla gruppe, tok opp både høyr og kraftfôr. Lamma fekk tildelt same

volum væske, både behandla, ubehandla og kontrollgruppe, i den perioden vi behandla med ekstrakt, slik at det ikkje skulle vere sjølv volumet på ekstraktet som ga nedsett matlyst. Det kan ha vore innholdsstoff eller konsistens som verka hemmande på fôropptaket. Ekstraktet vart gitt med sonde, noko som også er ein stressfaktor som kanskje kan sette ned trivsel og matlyst.

I Norge er det størst risiko for at lamma blir smitta den første tida dei er ute på beite om våren, og dersom det skal ha noko nytte å gje borkekstrakt som førebyggjande tiltak mot koksidiøse, må det kunne gjevast helst som ei eingongsbehandling før beiteslepp. Det må ikkje hemme tilveksten på lam som enno diar og det må ha effekt så lenge som trengst for at ikkje koksidiøse skal overleve og blomstre opp etter at effekten av ekstraktet har opphøyr. Det betyr at ekstraktet må kunne gjevast i ei mykje meir konsentrert form enn det vi klarte å framstille til dette forsøket, og det må kunne gjevast i ei form der det blir frigjort over noko tid, minst eit tidsrom som svarer til inkubasjonstida til den arten som har lengst inkubasjonstid. Furubork har høgare CT-innhald enn granborken, og ekstraksjon med metanol eller aceton som løysmiddel gjev høgare CT-konsentrasjon.

I dag blir det bruka kjemiske middel mot koksidiøse hos lam, og det blir gitt ein eingongsdose 7-8 dagar etter beiteslepp (Gradwell 2000; Gjerde et al. 2009; Enemark et al. 2015). Prisen på dette middelet er ca. 20,- kr/lam, med tillegg av veterinærkostnader og arbeidskostnader. For at det skal vere konkurransedyktig å behandle koksidiøse med biologisk aktive stoff frå planteekstrakt, må kostnaden ned mot dette. Fordelen med at det ikkje utviklast og spreist resistens er vanskeleg å prissette, men er av stor verdi.



Bilde 10: Tre små lam i ein bingje i lag med mor si. Foto. Juni Rosann E. Johanssen

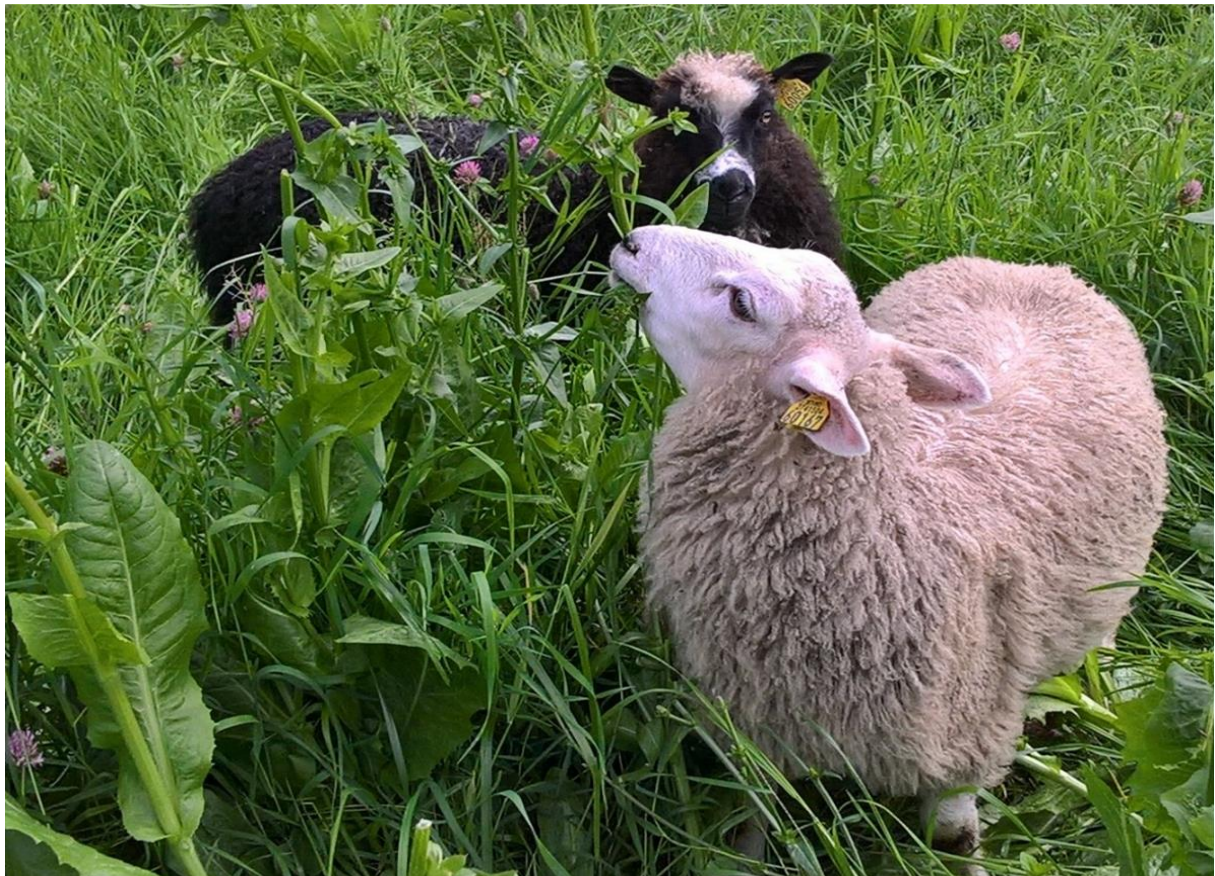
5 Konklusjonar – Framtidig forskning og utviklingsarbeid

Ut frå dette forsøket ser vi at det er innhaldsstoff i bork som har effekt mot koksidiar av *Eimeria*-arten hos lam, men det er behov for meir forskning, både grunnforskning og anvendt forskning, for å forstå kva stoff dette er; om det er berre tanninar eller om det kanskje er heilt andre plantestoff som også har effekt.

Det er nødvendig å finne ut korleis mekanismane som hemmar utviklinga til parasittane fungerer, mellom anna på kva stadium parasitten blir påverka. For å undersøke dette er det behov for meir langvarige forsøk enn det vi har hatt, slik at ein kan studere effekten både når det gjeld tilvekst, klinikk og ikkje minst parasittutvikling over ein heil beiteperiode.

Vidare er det behov for eit utviklingsarbeid for å effektivisere ekstraksjonsprosessen og redusere produksjonskostnaden. Dette gjeld heile kjeda frå innsamling av bork, tørking og oppmaling og til slutt sjølve ekstraheringa, val av ekstraksjonsmiddel og konsentrasjonsprosessen.

For å komme i praktisk bruk må ein utvikle ei form for fôrtilsetjing eller eit medikament som kan gjevast til unge, diande dyr som eingongsbehandling, eller i det minste som kan ha effekt om det blir tilført nokre få gonger. Til eldre dyr kan det vere aktuelt å sjå om det kan tilsetjast i kraftfôr, eller til mineralnæring eller saltslikkesteinar.



Bilde 11: Lam som eter sikori, også en plante med antiparasittær effekt. Foto: Kristin Sørheim

6 Litteraturreferansar

- Boxall AB, Kolpin DW, Halling-Sørensen B, Tolls J. 2003. Peer Reviewed: Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks? *Environ Sci Technol.* 37:286–294.
- Cervantes-Valencia ME, Alcalá-Canto Y, Sumano-Lopez H, Ducoing-Watty AM, Gutierrez-Olvera L. 2016. Effects of Curcuma longa dietary inclusion against Eimeria spp. in naturally-infected lambs. *Small Rumin Res.* 136:27–35.
- Chapman HD. 1974. The Effects of Natural and Artificially Acquired Infections of Coccidia in Lambs. *Res Vet Sci.* 16:1–6.
- Domke et al. 2012. : Benzimidazole resistance of sheep nematodes in Norway confirmed through controlled efficacy test. *Acta Vet Scandv.* 54(1); 2012PMC3511810
- Enemark HL, Dahl J, Enemark JMD. 2015. Significance of Timing on Effect of Metaphylactic Toltrazuril Treatment against Eimeriosis in Calves. *Parasitol Res.* 114:201–212.
- Fraquelli C, Zanzani SA, Gazzonis AL, Rizzi R, Manfredi MT. 2015. Effects of condensed tannin on natural coccidian infection in goat kids. *Small Rumin Res.* 126:19–24.
- Gjerde B, Enemark JMD, Apeland MJ, Dahl J. 2010. Redusert effekt av diclazuril og toltrazuril mot Eimeria-infeksjoner hos lam i en besetning i Rogaland. *Nor veterinærtidsskrift.* 155:301–304.
- Gjerde B, Vatn S, Nielsen B, Dahl J. 2009. Forebyggende effect av toltrazuril (Baycox Sheep vet.®) og diclazuril (Vecoxan vet.®) mot koksidiøse hos lam på beite. *Nor veterinærtidsskrift.* 3:259–266.
- Grabber JH, Zeller WE, Mueller-Harvey I. 2013. Acetone enhances the direct analysis of procyanidin- and prodelphinidin-based condensed tannins in lotus species by the butanol-HCl-iron assay. *J Agric Food Chem.* 61:2669–2678.
- Gradwell D. 2000. Scouring in lambs following treatment with Vecoxan. *Vet Rec.* 146:591.
- Gregory MW, Catchpole J. 1989. Ovine coccidiosis: heavy infection in young lambs increases resistance without causing disease. *Vet Rec.* 124:458–461.
- Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin S. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22:253–261.
- Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Mueller-Harvey I, Sotiraki S, Louvandini H, Thamsborg SM, Terrill TH. 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Vet Parasitol.* 212:5–17.
- Lassen B, Seppä-Lassila L. 2014. Recovery and sporulation of bovine Eimeria oocysts after exposure to sub-zero temperature. *Vet ir Zootech.* 66:35–39.
- Mattilsynet. 2019. Regelverksveileder - Økologisk landbruk - Utfyllende informasjon om regelverket for økologisk landbruksproduksjon. :1–73.
- Odden A. 2017. Koksidiøse hos lam. :1–6.
- Odden A, Enemark HL, Ruiz A, Robertson LJ, Ersdal C, Nes SK, Tømmerberg V, Stuen S. 2018. Controlled efficacy trial confirming toltrazuril resistance in a field isolate of ovine Eimeria spp. *Parasites and Vectors.* 11:1–11.
- Saratsis A, Voutzourakis N, Theodosiou T, Stefanakis A, Sotiraki S. 2016. The effect of sainfoin (Onobrychis viciifolia) and carob pods (Ceratonia siliqua) feeding regimes on the control of lamb coccidiosis. *Parasitol Res.* 115:2233–2242.
- Serikstad GL, McKinnon K, Eggen T. 2012. Uønskete stoffer i husdyrgjødsel. Konvensjonell husdyrgjødsel brukt i økologisk drift – er det problematisk ? Tingvoll, Norway.
- Taylor MA. 1995. Diagnosis and control of coccidiosis in sheep. *Pract.* 17:172–177.
- Taylor MA, Catchpole J. 1994. Review article: coccidiosis of domestic ruminants. *Appl Parasitol.* 35:73–86.

Vedlegg 1



Memo

Extraction of condensed tannins from spruce bark (Draft)

SINTEF ~~Industry~~
SINTEF Industry
Address:
~~Postboks 4760 Torshov~~
NO-7465 Trondheim
NORWAY
Switchboard: +47 73593000

info@sintef.no

Enterprise /VAT No:
NO 948 007 029 MVA

PERSON RESPONSIBLE / AUTHOR

Inga Marie Aasen

FOR YOUR ATTENTION
COMMENTS ARE
INVITED
FOR YOUR
INFORMATION
AS AGREED

DISTRIBUTION

Kristin Sørheim, NORSØK

X X

PROJECT NO / FILE CODE

102020487

DATE

2019-06-25

CLASSIFICATION

~~Restricted~~

SUMMARY

The aim of the present work has been to prepare an extract of condensed tannins (CT) from bark, to be used by NORSØK as a feed additive against sheep nematodes in feeding trials with lambs. The extraction process was based on results from the ~~BarkCure~~ project, with modifications for adaption to the available large-scale equipment and equipment capacities.

Extraction was carried out using 230-240 kg fresh bark. The process involved extraction with hot water, evaporation and freeze-drying. Approximately 6 kg dried extract was produced, containing ~300 grams CTs.

This memo contains project information and preliminary results as a basis for final report(s).
SINTEF accepts no responsibility of this memo and no part of it may be copied.

1 of 7

1 INTRODUCTION

The aim of the present work has been to prepare an extract of condensed tannins (CT) from bark, to be used by NORSØK as a feed additive against sheep nematodes in feeding trials with lambs.

In the BarkCure project, funded by The Research Council of Norway, pine and spruce bark, and extraction with water or mild, organic solvents, have been compared. The CT-yields were highest from spruce bark, and by using acetone or methanol as extraction solvents. Spruce bark was therefore chosen as CT-source. Due to lack of suitable equipment for handling large volumes of flammable solvents, water was used for extraction. This implied need for 2-2.5 times higher extraction volumes than by use of acetone.

2 PROCESS DESCRIPTION

2.1 Bark

Spruce bark from Bøfjorden Sag AS was received from NORSØK. The original quantity of bark was 230-240 kg wet weigh (ww), with 28 % dry weight (dw). The bark had been partly dried and milled by NORSØK. The received bark had approximately 40 % dw.



Figure 1: Bark, as received from NORSØK

2.2 Processing

The extraction of CTs was carried out using SINTEF Ocean's mobile pilot plant (Figure 2). The main part of this is a container including a process line with A grinder, heat-exchanger, process tank (1 m³) and centrifuges. An evaporator and a steam generator are placed in two separate, smaller containers. For the bark extraction, the tank, evaporator and steam-generator were used. Research scientist Bendik Toldnes was responsible for the processing.

Extraction

Extraction was carried out with tap water in a stirred tank (1 m³) at 80°C. The bark was divided in two batches, and each batch was extracted twice (two steps) for 1-1.5 h, see volumes in Results, Table 1. After extraction, stirring was turned off, and the bark sedimented. The extract was collected from the top opening of the tank by pumping and transferred to a holding tank. Residual bark in the tank was removed by a rented vacuum truck.

The bark was added to the tank using buckets (Figure 3).



Figure 2: Containers with process line (left), evaporator (right) and steam generator (blue container behind the evaporator)



Figure 3: Transfer of bark to the tank using buckets (a 'platform' was constructed to omit spills)

Evaporation and drying

The extract was evaporated in a mechanical vapor recompression ("MVR") evaporator with forced recirculation (Epcon, Epcovap MVR 4). Approx. 1300 l extract was concentrated to 82 l.

The concentrate was freeze-dried, about 80% of the volume at Vitenskapsmuseet (Department of Archaeology and Cultural History) at NTNU, Trondheim, the rest at SINTEF Industry. Freeze-dryers with respective capacities of xx and yy kg ice condensate, rate xx kg/day.



Figure 4: Freeze-dryer at Department of Archaeology and Cultural History, NTNU (left) and SINTEF (right) (not bark extract in the SINTEF-dryer)

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Material balances and yields

The yield of dry extract was ~7.8 kg, or 11-12 % (Table 2). The CT-content was measured in samples collected during extraction, from each of the four extracts (two for each batch) and varied between 46 and 51 g/kg dried extract. Samples from three of five cans with concentrate all showed 49 g/kg dried extract.

The dry weight yield was the same as the yield obtained for winter- bark in laboratory-scale, while the CT-yield was lower (75 g/kg in laboratory scale). An important difference is that the bark used for laboratory scale analyses were fine milled, to particle sizes of less than 1-2 mm (coffee grinder), while the bark used in the current work was 1-3 cm. Initial small scale tests of coarsely milled, or un- milled bark, showed that the dry weight yields do not necessarily correlate with the CT-yields. In multiple step-extractions, the CT-content per extracted dry was lowest in the first extraction, indicating that other components were more easily extracted than the CTs. The lower CT-yield in large scale may therefore be due to the bark itself (from another geographical location) or the larger size of the bark chips. The higher temperature (80 vs 65°C) may also have affected the yields, but since there were no loss during the evaporation (comparing extract and concentrate, Table 2), this is less likely.

The loss of dry weight from extraction to dried product, is physical loss (spill, and extract

volume due to more remaining liquid in the bark than after separation by filtration or centrifugation, as used in the lab.

Table 1: Bark quantities and extraction volumes

	Bark (fresh) ¹⁾ [kg ww]	Bark (partly dried) ²⁾ [kg ww]	Bark [kg dw]	Added water ³⁾ [kg]	Extract [kg]
Extraction 1	140	98	39	600 + 400	700
Extraction 2	95	67	27	550 + 300	600
Sum	235	165	66	1850	1300

Table 2: Dry weight and CT-yields

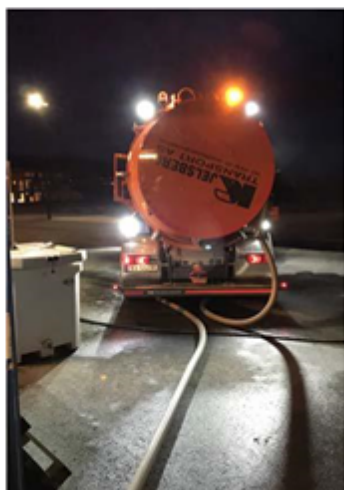
	Quantity [kg ww]	Quantity [kg dw]	CT [g/kg]	CT [g]
Bark	235	66	n.a.	
Extract	1300	7.8	46-51	
Concentrate	82	5.6	49	298
Dried product	6.1	5.2	n.a.	

3.2 Some additional comments to the process and practical experiences

In the original plan, 120 kg bark from Bergene Holm should have been included. This bark had not been milled and contained pieces of more than 10- 15 cm and a high fraction of wood. The bark pieces were too large for removal by suction after extraction, and it was decided not to use this bark.

In laboratory scale, the extract was isolated by removal of the bark by sieving and/or centrifugation. In large scale, the extract had to be pumped out from the top opening of the tank. This implied lower yields, since more liquid was left with the residual bark.

To remove the residual bark from the tank, vacuum suction was used (rented car, picture).



The heating of the extract during evaporation was much slower than for pure water, indicating 'insulating' properties of the extract. A similar observation was made for the drying, which was very slow. This may be due to the water-binding properties and to the dried extract forming a layer which covered and insulated the ice core.

The experiences from this processing will be used as basis for a report on recommendations for a future industrial process, as part of the BarkCure-project.



Vedlegg 2

Statistikkutskrift:

```

proc mixed data=b plots=residualpanel method=reml COVTEST;
class ID beh box tid ;
model LN_opg= BEh beh*tid1 /ddfm=sat solution;
random box(beh) ;* ID*treatm;
*repeated tid/subject=id;* type=AR(1);*type=cs ;
*ods output FitStatistics=FitAR1(rename=(value=AR1))
      Dimensions=ParmAR1(rename=(value=NumAR1));
lsmeans beh /at tid1=0.0833 adjust=tukey;
lsmeans beh /at tid1=0.0714 adjust=tukey;
lsmeans beh /at tid1=0.0667 adjust=tukey;
lsmeans beh /at tid1=0.0625 adjust=tukey;
lsmeans beh /at tid1=0.0588 adjust=tukey;
lsmeans beh /at tid1=0.0556 adjust=tukey;
lsmeans beh /at tid1=0.0526 adjust=tukey;
lsmeans beh /at tid1=0.0500 adjust=tukey;
lsmeans beh /at tid1=0.0454 adjust=tukey;
run;

```

The SAS System

The Mixed Procedure

Model Information	
Data Set	WORK.B
Dependent Variable	ln_OPG
Covariance Structure	Diagonal
Estimation Method	REML
Residual Variance Method	Profile
Fixed Effects SE Method	Model-Based
Degrees of Freedom Method	Residual

Class Level Information			
Class	Levels	Values	
ID	16	1 2 3 5 6 9 10 12 13 14 15 18 19 22 23 24	
Beh	2	1 2	
Box	7	1 2 3 4 5 6 7	
Tid	9	12 14 15 16 17 18 19 20 22	

Dimensions

Covariance Parameters	1
Columns in X	5
Columns in Z	0
Subjects	1
Max Obs per Subject	138

Number of Observations

Number of Observations Read	144
Number of Observations Used	138
Number of Observations Not Used	6

Covariance Parameter Estimates

Cov Parm	Estimate	Standard Error	Z Value	Pr > Z
Residual	8,5093	1,0396	8,19	<.0001

Fit Statistics

-2 Res Log Likelihood	666.2
AIC (Smaller is Better)	668,2
AICC (Smaller is Better)	668,2
BIC (Smaller is Better)	671,1

Solution for Fixed Effects

Effect	Beh	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept		17,9306	1,9192	134	9,34	<.0001
Beh	1	9,7781	2,7209	134	3,59	0,0005
Beh	2	0				
tid1*Beh	1	-280,64	31,2436	134	-8,98	<.0001
tid1*Beh	2	-223,84	31,0346	134	-7,21	<.0001

Type 3 Tests of Fixed Effects

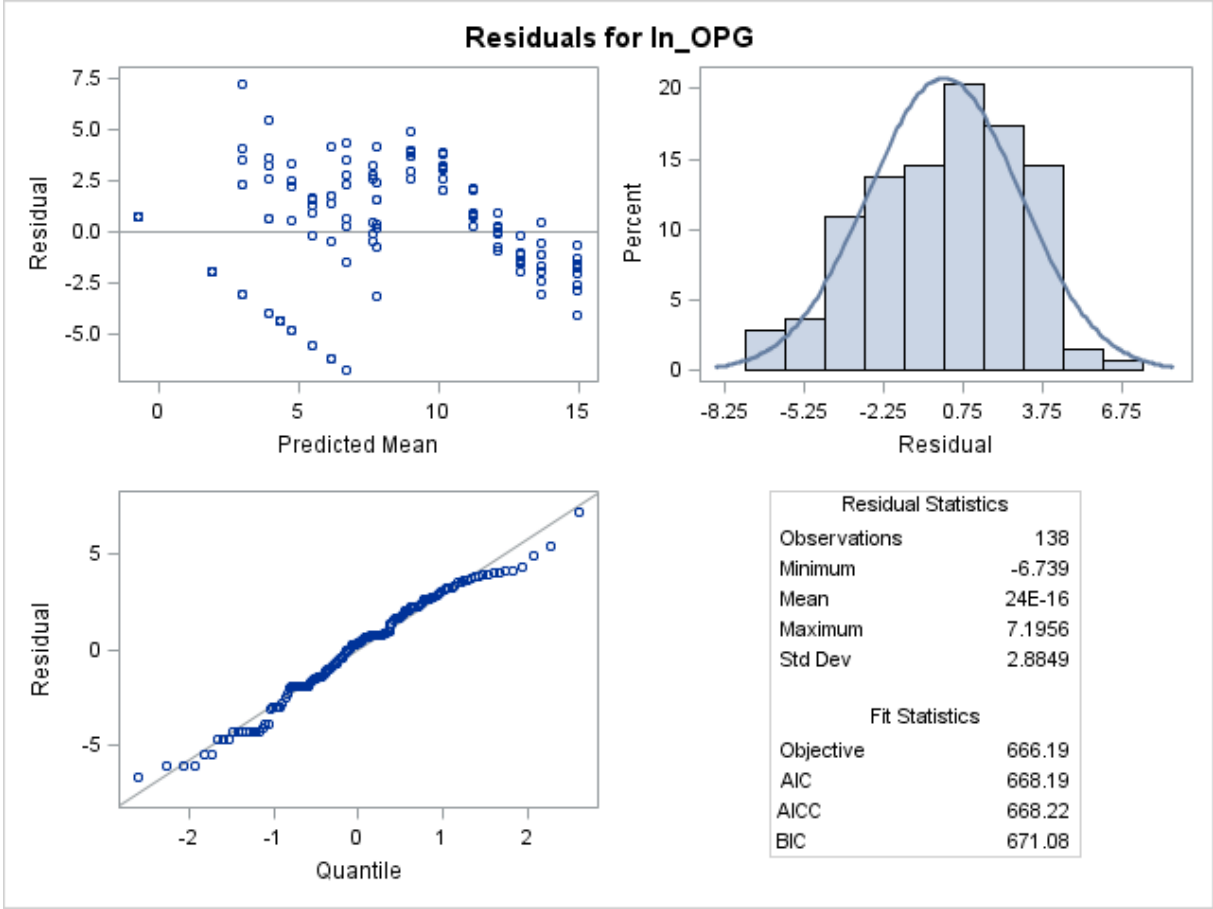
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
Beh	1	134	12,91	0,0005
tid1*Beh	2	134	66,35	<.0001

Least Squares Means

Effect	Beh	tid1	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Beh	1	0,08	4,3311	0,7902	134	5,48	<.0001
Beh	2	0,08	-0,7152	0,7802	134	-0,92	0,3609
Beh	1	0,07	7,6708	0,4871	134	15,75	<.0001
Beh	2	0,07	1,9485	0,4791	134	4,07	<.0001
Beh	1	0,07	8,9898	0,4006	134	22,44	<.0001
Beh	2	0,07	3,0005	0,3937	134	7,62	<.0001

Beh	1	0,06	10,1685	0,3583	134	28,38	<.0001
Beh	2	0,06	3,9406	0,3526	134	11,18	<.0001
Beh	1	0,06	11,2069	0,3586	134	31,25	<.0001
Beh	2	0,06	4,7688	0,3542	134	13,46	<.0001
Beh	1	0,06	12,1049	0,3878	134	31,22	<.0001
Beh	2	0,06	5,4851	0,3843	134	14,27	<.0001
Beh	1	0,05	12,9469	0,4347	134	29,79	<.0001
Beh	2	0,05	6,1567	0,4319	134	14,26	<.0001
Beh	1	0,05	13,6765	0,4864	134	28,12	<.0001
Beh	2	0,05	6,7386	0,4839	134	13,93	<.0001
Beh	1	0,05	14,9675	0,5943	134	25,19	<.0001
Beh	2	0,05	7,7683	0,5919	134	13,13	<.0001

Differences of Least Squares Means										
Effect	Beh	_Beh	tid1	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t	Adjustment	Adj P
Beh	1	2	0,08	5,0463	1,1105	134	4,54	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
Beh	1	2	0,07	5,7223	0,6832	134	8,38	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
Beh	1	2	0,07	5,9893	0,5616	134	10,66	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
Beh	1	2	0,06	6,2278	0,5027	134	12,39	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
Beh	1	2	0,06	6,438	0,504	134	12,77	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
Beh	1	2	0,06	6,6198	0,546	134	12,12	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
Beh	1	2	0,05	6,7902	0,6127	134	11,08	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
Beh	1	2	0,05	6,9379	0,6861	134	10,11	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001
Beh	1	2	0,05	7,1992	0,8387	134	8,58	<.0001	Tukey-Kramer	<.0001





Norsk senter for økologisk landbruk, NORSØK er ei privat, sjølvstendig stifting.

Stiftinga er eit nasjonalt senter for tverrfagleg forskning og kunnskapsformidling for å utvikle økologisk landbruk. NORSØK skal bidra med kunnskap for eit meir berekraftig landbruk og samfunn. Fagområda er økologisk landbruk og matproduksjon, miljø og fornybar energi.

**Norsk senter for økologisk landbruk, NORSØK / Gunnars veg 6 / NO-6630 TINGVOLL/
Telefon: +47 930 09 884 / E-post: post@norsok.no / www.norsok.no**