

## THE EFFECT OF SOME PLANT EXTRACTS ON *Brucella* SURVIVAL IN BOVINE MACROPHAGES

Al-Ashkar, Buthaina \*; A. Al-Mariri\*\* and Ibtissam Hamad\*\*\*

\* Dept. of Plant Biology, Faculty of Science, University of Damascus

\*\* Dept. of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission, Damascus

\*\*\* Dept. of Environmental Science, Faculty of Science, University of Damascus

أثر بعض المستخلصات النباتية على بقاء البروسيلا داخل العائيات الضخمة للأبقار  
بشينة الأشقر<sup>1</sup>، أيمن المريري<sup>2</sup>، ابتسام حمد<sup>3</sup>  
<sup>1</sup> قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق  
<sup>2</sup> قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية- دمشق  
<sup>3</sup> قسم علم البيئة، كلية العلوم، جامعة دمشق

### الملخص

البروسيلا بكتيريا سالبة غرام، داخل خلوية، اختيارية، تسبب أمراض خمجية للأغنام والماعز والأبقار والجمال ذات السنام الواحد، كما أنها تكون المسؤولة عن أهم الأمراض المشتركة التي تصيب الإنسان. تم دراسة نشاط البكتيريا القاتل للعائيات (للبلعات) الضخمة Macrophages البقرية وذلك لتخمين قدرتها على قتل البروسيلا داخل خلوية أثناء المقايضة بوجود ستة مستخلصات نباتية: القرفة - الكزبرة - البرتقال - الليمون - الزعتر - والمردقوش. أستنتجت العائيات الضخمة للأبقار بتركيز  $10^5$  خلية في كل حفرة من صفيحة 24 حفر المعقمة، ثم تم إصابتها بالبروسيلا بنسبة 100 خلية بكتيرية لكل خلية من العائيات الضخمة مع أو بدون 1% من المستخلصات النباتية بعد 2-4-24-48-72-96-144 ساعة من الإصابة، تم غسل العائيات الضخمة وتفجيرها. أستنتجت الخلايا المتفجرة بعد 5 دقائق من الحضان بدرجة حرارة الغرفة، على وسط الـ 2YTA (الخميرة - تريببتون) ثم حُضنت أطباق البتري بدرجة 37°م لمدة 48 ساعة. أظهرت نتائج هذه الدراسة بأنه فقط يمكن استخدام مستخلص للقرفة بتركيز 1% كمثبط فعال للبكتيريا داخل خلوية. **كلمات مفتاحية:** البروسيلا، العائيات الضخمة البقرية، القرفة، الكزبرة، الليمون، البرتقال، المردقوش.

### المقدمة

البروسيلا هي بكتيريا مكورات عصوية معزولة بشكل مفرد أو ثنائي أو سلاسل صغيرة أبعادها (0.5 - 0.7 ميكرومتر عرضاً، ومن 0.6 - 1.5 ميكرومتر طولاً)، غير متحركة لا تملك سياتاً، ولا محفظة خارجية، ولا تُشكل أبواغاً. والبروسيلا بكتيريا سالبة الغرام، هوائية اختيارية بإمكانها إصابة أنواع عديدة من الحيوانات والبشر. تم تمييز ستة سلالات (ذراي) من البروسيلا: البروسيلا المجهضة *Brucella abortus*، البروسيلا الضأنية *B. melitensis*، البروسيلا الخنازيرية *B. suis*، البروسيلا الكلبية *B. canis*، البروسيلا الماعزية *B. ovis*، والـ *B. neotomae*. لقد بينت دراسات تهجين DNA-DNA أنه من المحتمل أن يكون جنس البروسيلا وحيد النوع (Moreno et al., 2002). السلالات الرئيسية الأكثر إمرضية والمنتشرة على نطاق واسع هي: البروسيلا الضأنية والبروسيلا الخنازيرية والبروسيلا المجهضة (Corbel, 1997). إن هذه الأنواع الثلاثة هي سلالات ملساء حاملة لمتعدد السكريد الليبيدي الأملس Smooth-Lipopolysaccharide كمستضد سطحي رئيسي. مايزال داء البروسيلا يُسبب مشكلة صحية هامة في العديد من البلدان النامية وفي مناطق من الدول المتطورة في العالم. إن الأعراض السريرية للحمى المالطية غير نوعية وتتضمن الحمى fever، والتعرق sweat، وقلة الشهية anorexia، والوهن fatigue، والتوعك malaise، ونقص الوزن weight loss، وأحياناً الكآبة (depression) Ergonul (et al., 2004). إن علاج مرض الحمى المالطية هو استخدام مضادات حيوية قادرة على اختراق العائيات الضخمة وعلى تحمل البيئة الحامضية ضمن الخلية.

حددت منظمة الصحة العالمية في العام 1986 الخطط العلاجية لمعالجة الحمى المالطية عند الإنسان والتي تعتمد على أسلوب العلاج المشترك وذلك باستخدام الدوكسي سكلين *doxycycline* لمدة ستة أسابيع مع إما الستربتومييسين *streptomycin* لمدة أسبوعين أو ثلاثة أسابيع، أو الريفامبيسين *rifamycin* لمدة ستة أسابيع (1991). (Solera et al.) من الضروري إتباع هذا الأسلوب من العلاج المشترك، حيث يشهد العلاج بدواء واحد حالات إنتكاس مرتفعة عادةً (Pappas et al., 2005) ولأن استخدام الريفامبيسين في مناطق استيطان الحمى المالطية والسل يؤدي لظهور سلالات بكتيرية مقاومة لهذا المضاد الحيوي من جهة؛ وظهور حالات إنتكاس كثيرة نتيجة لاستخدام هذا النظام من جهة أخرى؛ لذلك كان لا بد من البحث عن علاج بديل؛ قد يكون باستخدام بعض المستخلصات النباتية. ويتقدم العلوم وطرق التحليل الحديثة فقد فصلت المواد الفعالة ذات التأثير الطبي من النباتات وأصبحت تُستخدم بما يتماشى مع راحة المريض، وما زالت البحوث مستمرة لإيجاد المستخلصات المؤثرة على الأمراض الخمجية؛ والتي منها بحثنا هذا حيث يهدف إلى دراسة أثر بعض المستخلصات العطرية النباتية على البكتيريا مثل البروسيللا داخل العاثيات الضخمة للأبقار.

لهذا اخترنا اختباراً في الزجاج *in vitro* يتضمن دراسة أثر بعض هذه المستخلصات على البروسيللا داخل العاثيات الضخمة للأبقار وفي فترات زمنية مختلفة بعد الإصابة لتحديد فعالية المستخلص النباتي إن وجدت.

الزيت العطري هو سائل نباتي مركز بمثابة روح أو جوهر النبات، أو كما يطلق عليه أحياناً هرمون النبات (Zaika, 1988). وهذا الزيت نقرزه غدد خاصة بالنبات قد توجد في الزهور أو الأوراق أو السوق أو الجذور أو قشور الثمار كما توجد كذلك في لحاء بعض الأشجار (Dorman and Deans, 2000). إن لكل نوع من تلك الزيوت تركيب كيميائي طبيعي، معظمها يتطاير، كما تذوب في الكحوليات وبعض الدهون (Burt and Reinders, 2003) وقد استخدمت في هذه الدراسة مستخلصات الزيوت العطرية لبعض النباتات (أوراق الكزبرة، أوراق المردقوش، أوراق الزعتر البري، قشر البرتقال، قشر الليمون، قشور لحاء القرفة).

ينتمي نبات المردقوش *Origanum majorana* إلى الفصيلة الشفوية *Lamiaceae*، ويحتوي على زيت عطري مستخرج من الأوراق فيه مادة فعالة تسمى *Monoterpenes* تشكل 20-30% من الزيت الطيار. كما يُعتبر الزعتر البري *Thymus serpyllum* من الفصيلة الشفوية *Lamiaceae*، يحتوي على زيت عطري يُستخرج من الأوراق ومادته الفعالة هي *Thymol*. ينتمي نبات الكزبرة *Corhanderum sativum* إلى الفصيلة الخيمية *Umbelleferae*، ويحتوي على زيت عطري مستخرج من الأوراق فيه مادة فعالة تسمى *Linalol* تشكل 80% تقريباً من الزيت العطري. ينتمي نبات القرفة *Cinnamomum zeylanicum* إلى الفصيلة الزنجبيلية *Zingiberaceae* ويحتوي على زيت عطري يستخرج من قشور اللحاء ومادته الفعالة هي ألدهيد القرفة *Cinnamaldehyde* حيث تشكل 36% تقريباً من الزيت العطري. أما الليمون *Citrus Lemon* والبرتقال *Citrus sinensis* فهما من الفصيلة السدابية *Rutaceae* حيث توجد المادة الفعالة في قشورهما وهي الليمونين *Lis-Balchin Lemonene* (Lis-Balchin et al., 1997; et al., 1996).

## المواد والطرق

### 1 استنبات البروسيللا الضأنية:

تم الحصول على البروسيللا الضأنية التي أُستخدمت في هذه الدراسة من دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية. حيث تمت تنمية البروسيللا في وسط الـ 2YT (في كل ليتر: 10 غ من خلاصة الخميرة، 16 غ تريبتون، و 5 غ كلور الصوديوم) بدرجة حرارة 37°م (Al-Mariri et al., 2001).

### 2 المقايسة الخلوية:

بما أن البروسيللا بكتيريا داخل خلوية اختيارية وهي تُفضل الوحيدات والعاثيات الضخمة في الجسم؛ فقد عُزلت الكريات البيضاء للأبقار، وذلك لإصابتها بالبروسيللا الضأنية (في الزجاج) حيث تمت دراسة أثر المستخلصات النباتية في تثبيط البكتيريا الداخل خلوية. أُستنبتت الخلايا المعزولة في فلاسكات *Flasks* ذات سعة 7 مل أو 25 مل مستخدمين وسط الاستنبات الخلوي *RPMI 1640* المضاف إليه مصل جنين البقر 10%. بعد يومين أو ثلاثة أيام من الاستنبات، تم الحصول على الخلايا مستخدمين التريبتون، ومن

ثم أُستنبتت  $10^5$  خلية في كل حفر من الصفيحة 96 (Tissue culture test plate)، وحُضنت الصفيحة في حاضنة الـ  $CO_2$  (10%) بدرجة  $37^\circ C$  لليوم التالي حيث تم إصابتها بإضافة البروسيلا المجهضة للخلايا وحُضنت لمدة ساعة بالشروط نفسها، ثم تم غسيل الأبار ثلاث مرات ومن ثم إضافة الوسط المغذي إليها مع تركيزات من المستخلصات النباتية المراد اختبارها (أربع أبار لكل مستخلص نباتي)، ولفترات زمنية محددة. حُلت الخلايا المدروسة بواسطة التريبتون Triton، وتمت زراعة السائل المُعلق على أطباق بتري تحوي وسط الاستنبات البكتيري الصلب وحُضنت لمدة 2-3 يوم في الحاضنة بدرجة  $37^\circ C$  ومن ثم تم التعداد البكتيري.

### 3 استخلاص الزيوت العطرية:

استخلص الزيت الأساسي من العينة المدروسة (أوراق المردقوش والزعرير البري، بذور الكزبرة ولحاء القرفة وقشر البرتقال والليمون) بعد طحنها إلى أجزاء صغيرة (حتى يتعرض أكبر جزء في خلاياها العطرية للتسخين ومن ثم التطاير مع البخار) حيث وُضعت داخل حوالة جهاز الاستخلاص وعُمرت بالماء المقطر وتم التسخين لدرجة الغليان باستخدام مصدر حراري. تصاعد بخار الماء محملاً ببخار الزيت العطري إلى الأعلى وتكاثف في الجزء الخاص بالتكثيف من الجهاز (المكثفة) ثم تم جرف هذا الزيت مع بخار الماء الواصل إلى درجة الغليان ومن ثم فصل الزيت عن الماء في أنبوب جمع جانبي الذي يعتمد مبدأ الاختلاف بالكثافة بين الماء والزيت حيث يطفو على السطح. استمرت عملية التقطير لمدة ساعتين حتى التأكد من استخلاص كامل الزيت من العينة. تم التخلص من الماء العالق في الزيت عن طريق إضافة قليل من سلفات الصوديوم اللامائية Sodium sulfate anhydrous، ثم حُزن الناتج في عبوات زجاجية محكمة الإغلاق بدرجة حرارة  $4^\circ C$  (Hammer et al., 1999).

### 4 تحضير العينة للمجهز الإلكتروني:

تم الحصول على الراسب البكتيري للبروسيلا الضائنية (المستنبتت 18 ساعة) ثم غسلها ثلاث مرات بواسطة موقى الـ PBS ثم تم تثبيتها بمحلول 2% غليتر ألدهيد بموقى الـ PBS. تُغسل العينة ثلاث مرات بموقى الـ PBS، ثم يُثبت بواسطة 1% رباعي أكسيد الأوزميوم لمدة ساعة؛ ثم تُغسل ثلاث مرات بموقى الـ PBS. تُوضع العينة على شريحة زجاجية ثم تُجفف بواسطة حاضنة بدرجة  $37^\circ C$  ثم تلي العينة بالذهب باستخدام sputter coater ثم فحصت العينة باستخدام المجهز الماسح الإلكتروني JEOL JSM 5400 LV (Dimezzo et al., 2009).

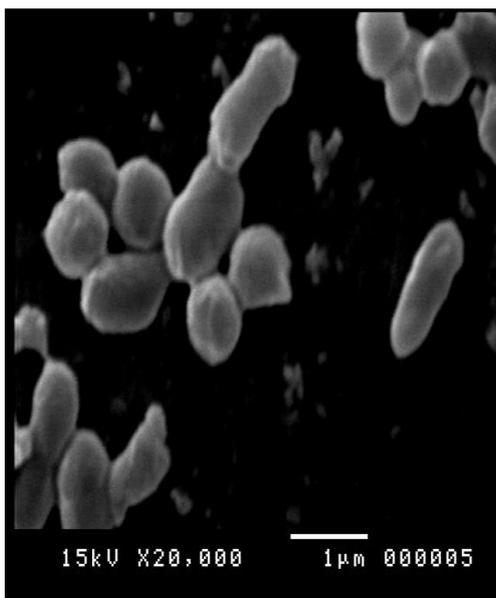
### 5 التحليل الإحصائي:

تم إدخال كل النتائج إلى الحاسوب حيث أُستخدم برنامج Exel في تجميع وتنظيم النتائج. وأُعمد اختبار ستيودنت (Test's Stuent) لتحليل النتائج إحصائياً. واعتبرت الـ  $p < 0.05$  ذات مغزى إحصائي (Al-Mariri et al., 2001).

## النتائج والمناقشة

### 1 نتائج المجهز الإلكتروني:

تم أخذ صور للبروسيلا الضائنية المعزولة من الحليب الخام من ريف مدينة دمشق، باستخدام المجهز الإلكتروني الماسح؛ ويُلاحظ من الشكل 1 أن البروسيلا الضائنية السورية هي مكورات عصوية ذات حواف ملساء.



الشكل 1. صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح تظهر البروسيليا الضانئية السورية بشكل مكورات عصوية (وحدة القياس = 1µm)

## 2 المقايسة الخلوية:

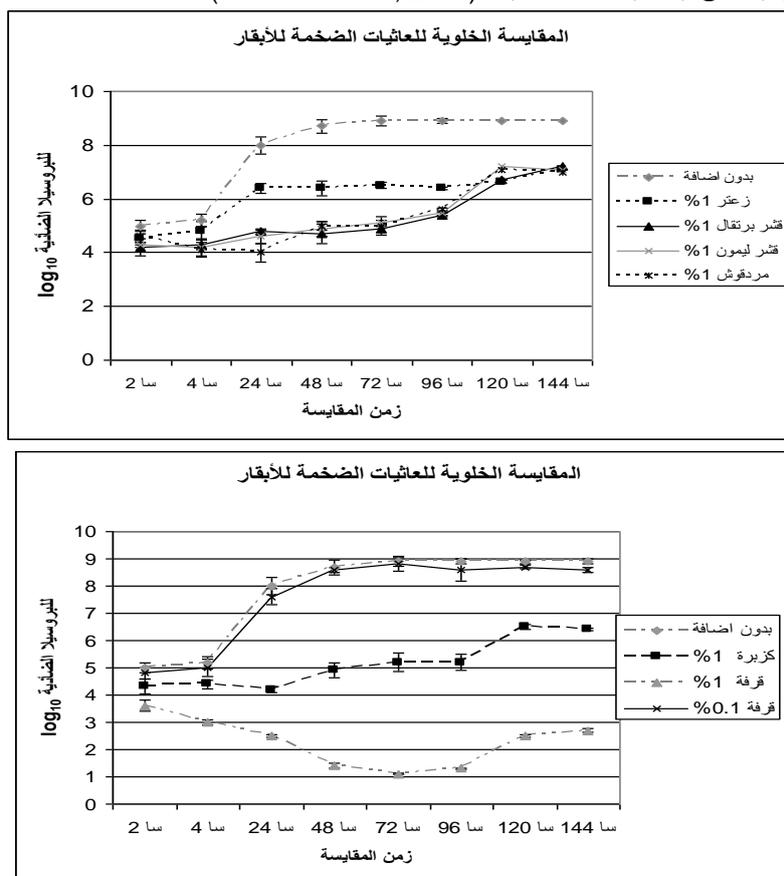
يُلاحظ من الشكل 2 أن اللوغاريتم العشري لتعداد البروسيليا الضانئية (عندما لم يُصَف أي مستخلص زيتي نباتي) بدأ من CFU 5.0 في الميليلتر بعد ساعتين من الإصابة، ليرتفع إلى CFU 8.9 بعد 96 و 144 ساعة.

كما يُلاحظ من الشكل السابق، أنه لا يوجد أي تأثير للمستخلصات الزيتية للزعر البري (بنسبة 1%)، أو القرفة عندما أُضيفت بنسبة 0.1% ( $p < 0.05$ )، حيث تراوح اللوغاريتم العشري للتعداد البكتيري بين 6.4 و 7.6 CFU بعد 24 ساعة من الإصابة و 7.1 و 8.6 CFU على التوالي، في نهاية المقايسة. بينما لوحظ تأثير مثبت للمستخلص الزيتي للقرفة بتركيز 1% ( $p < 0.05$ )، فقد كان اللوغاريتم العشري لتعداد البروسيليا الضانئية 2.5 CFU بعد 24 ساعة من الإصابة وانخفض حتى 1.1 CFU بعد 72 ساعة، ثم عاد ليرتفع ارتفاعاً طفيفاً بعد 144 ساعة من الإصابة ليصبح 2.7 CFU.

بينما لوحظ تأثيراً مثبتاً أقل للمستخلصات الزيتية لكل من المردقوش، قشر البرتقال، قشر الليمون، أو الكزبرة عندما أُضيفت بنسبة 1% ( $p < 0.05$ ) فبعد إضافة الكزبرة، تراوح اللوغاريتم العشري لتعداد البروسيليا الضانئية من 4.4 CFU بعد أربع ساعات من الإصابة (بينما كان 5.2 CFU بدون إضافة أي مُستخلص زيتي)، ليصبح 4 CFU بعد 24 ساعة من المقايسة إذا أُضيف مستخلص المردقوش؛ ليرتفع بعد 48 ساعة ليصبح 4.7 CFU إذا أُضيف مستخلص قشر البرتقال؛ كما يصبح 5.2 CFU بعد إضافة مستخلص الكزبرة بعد 72 ساعة؛ ليستمر اللوغاريتم العشري لتعداد البروسيليا بالارتفاع فيصبح 5.2 و 6.5 و 6.4 CFU بعد 96 و 120 و 144 ساعة على التوالي.

تحدث الإصابات المزمنة بالبروسيليا بسبب قدرة هذه البكتيريا على المحافظة على حياتها داخل الخلايا البلعمية التي تُقيها في مآمن من الآليات الدفاعية خارج الخلوية لدى المضيف مثل بروتينات المتممة والأضداد (Gorvel and Moreno, 2002). يوجد علاقة ما بين فوعة سلالة strain وما بين قدرتها على النكاثر داخل الخلايا البلعمية. وهكذا فقد تبين أن سلالة البروسيليا الضانئية تقاوم بشكل أفضل الهدم الذي تقوم به الكريات البيض للمضيف من السلالة الموهنة 1 Rev. (Aballay et al., 2000). وكذلك تقاوم السلالات الملساء للبروسيليا الضانئية التفكيك الذي تقوم به الكريات البيضاء المعتدلة والعاثيات الضخمة الموجودة في الغدد النديبية بشكل أكبر من السلالات اللقاحية الموهنة الخشنة (20/45 أو RB51) أو الملساء (S19) ولازالت آلية المرور داخل الخلوية للبروسيليا إلى قلب الخلايا البلعمية غير معروفة (Liautrad et

بقاء البروسيلا الضخمة على قيد الحياة داخل البلعميات (Reichow et al., 2006) ومع ذلك فقد تبين أن الدال الهيدروجيني (pH) الحامضي للجسيم البلعمي الحال مهم من أجل



الشكل 2. إصابة العاثيات الضخمة للأبقار بواسطة البروسيلا الضخمة السورية، ومعالجتها ببعض المستخلصات النباتية

لقد طورت البروسيلا آليات لتستطيع التأقلم والتكاثر داخل العاثيات الضخمة، وأي علاج فعال ضد هذه البكتيريا يجب أن يستطيع النقاء للخلايا ومثبطاً للبروسيلا ضمن البلعميات (Pappas et al., 2005) لهذا فقد تم دراسة أثر ستة مستخلصات نباتية على تثبيطها داخل العاثيات الضخمة للأبقار. وتبين لنا كما أوضحنا أعلاه (ضمن شروط دراستنا) أن المستخلص الزيتي للقرفة (Eugenol و Cinnamaldehyde) يملك تأثيراً مثبطاً على البروسيلا داخل العاثيات الضخمة للأبقار، بينما كان للمستخلصات الزيتية المردقوش (Monoterpenes) والليمون (الليمونين) والبرتقال (borneol and linalool و linolol)، تأثير متوسط مثبط على البكتيريا داخل الخلوية. يمكن القول أن سبب التأثير المتوسط أو الطفيف على البروسيلا داخل خلوية هو انخفاض فعالية هذه المواد في البيئة الحامضية داخل الجسيم الحال في العاثيات الضخمة. وفي مرحلة قادمة سيتم دراسة أثر المستخلص الزيتي للقرفة في الجسم الحي *in vivo*، على الأبقار المصابة تجريبياً بالبروسيلا لتحديد فعاليته وقدرته على علاج المضيف وحمايته من الاجهاض.

## المراجع

- Moreno, E.; A. Cloeckert and I. Moriyon (2002) *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.*, 90(1-4), 209-227.
- Corbel, J.,M.(1997). Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases*, 3(2), 213-221.
- Ergonul A.; O. Celikbas D. Tezeaeen E. Guyener and B. Dokuzoguz (2004) Analysis of risk factors for laboratory-acquired brucella infections. *J Hosp Infect.*, 56(3), 223-227.
- Solera J.; F. Medranoe M. Rodnguez P. Geijo and J. Paulino (1991). A comparative therapeutic and multicenter trial of rifamycin and doxycycline versus streptomycin and doxycycline in human brucellosis. *Med. Clin. (Barc)*, 4;96(17), 649-53.
- Pappas G.; N. Akirtidis and E. Tsianos (2005). Effective treatments in the management of brucellosis. *Expert Opin Pharmacother*, 6(2), 201-209.
- Zaika L.L., (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and determination. *J Food Saf.*, 9(2), 997–118.
- Dorman H..J.D.; and S.G.Deans (2000). Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88(2), 308–316.
- Burt S.A.;and R.D. Reinders (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36(3), 162–167.
- Lis-Balchin M.; S. S.G.Hart Deans; and E. Eaglesham(1996). Comparison of the pharmacological and antimicrobial action of commercial plant essential oils. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 4, 69–86.
- Lis-Balchin W.; S.G.; Denas and S. Hart (1997). A study of the variability of commercial peppermint oils using antimicrobial and pharmacological parameters. *Medical Science Research*, 25(3), 151– 152.
- Al-Mariri A.; A. Tibor P. Mertens X. Debolle P. J. Michel Godefrod K. Walravens and J-J. Letesson (2001). Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant Proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect. and Immun.*, 69(8), 4816-4822.
- Hammer K.A.; C.F. Carson andT.V., lley (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*, 86(6), 985–990.
- Dimezzo T.L.; G. Ruthel E.E. Brueggemann W.J. Hineshb Ribot C.E.; Chapman B.S. Powell.; S.L., Welkos (2009). In vitro intracellular trafficking of virulence antigen during infection by *Yersinia Pestis*. *PLOS ONE*, 17;4(7), e6281.
- Gorvel J.P.; E. Moreno (2002). *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.*, 20;90(1-4), 281-297.
- Aballay A.; L.S. Mayorga GN. Arenas; Staskevich, (2000) Intracellular trafficking of *brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect. Immun.*, 68(7), 4255-4263.

- Liautrad J.P.; A. Gross; J. Dornand; S. Kohler, (1996). Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. *Microbiologia*, 12(2), 197-206.
- Reichow H.E.Y.S.; S. Ramamoorthy X. Ding R. Lathilgra S.M. Craig J.C. Sobra BW. Schurig G.G. Sriranganathan and N. Boyle (2006). *Brucella melitensis* triggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages. *Infect Immun.*,74(9), 5035-5046.
- Pappas G.; N. Akrtidis M. Bosilkovski and E.Tsianos (2005). *Brucellosis. The new Eng. J. of Med.*, 2;352(22), 2325-2336.

## THE EFFECT OF SOME plant EXTRACTS ON *Brucella* SURVIVAL IN BOVINE MACROPHAGES

Al-Ashkar, Buthaina \*; A. Al-Mariri\*\* and Ibtissam Hamad\*\*\*

\* Dept. of Plant Biology, Faculty of Science, University of Damascus

\*\* Dept. of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission, Damascus

\*\*\* Dept. of Environmental Science, Faculty of Science, University of Damascus

### ABSTRACT

*Brucella* sp. is Gram-negative, facultative anaerobic intracellular bacteria that can cause a highly contagious disease in sheep, goats, cattle and one-humped camels, and it is responsible for the most important zoonosis in man. To evaluate the bovine macrophagial bactericidal activity, their killing ability of internalized *Brucella* were studied during assays with the six plant extracts, included cinnamon, coriander, orange, lemon, thymus vulgaris and marjoram. Bovine cells were cultured at a density of  $10^5$  cells per well in sterile 24-well micro plates, then they infected with *Brucella* sp at a multiplicity of infection of 100 bacterial cells per cell; of bovine macrophages with and without plant extract (1%). Two, 4, 24, 48, 72, 96 and 144 h after infection, macrophages were washed and lysed. Five min after incubation at room temperature, the lysates were plated on 2YTA and incubated at 37°C for 48h. The results of study indicated that cinnamon extracts could be used as an effective antimicrobial agent against intracellular bacteria as *Brucella* sp.

**Keywords:** *Brucella*, Bovine Sp., macrophages, Cinnamon, Coriander Orange, Lemon, Thymus vulgaris and Marjoram.

قام بتحكيم البحث

أ. د/ محمد منصور قاسم  
أ. د/ حسين عبد الله محمد الفضالي

كلية الزراعة - جامعة المنصورة  
كلية زراعة دمياط - جامعة المنصورة