J. of Agricultural Chemistry and Biotechnology, Vol. 1 (1): 53 - 59, 2010

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 العاثيات الضخمة للأبقار

بثينة الأشقر[1]، أيمن المريري[2]، ابتسام حمد[3]

[1] قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق

[2] قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية- دمشق

[3] 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 للعاثيات (للبالعات) الضخمة Macrophages البقرية وذلك لتخمين قدرتها على قتل البروسيلا داخل خلوية أثناء المقايسة بوجود ستة مستخلصات نباتية: القرفة – الكزبرة - البرتقال – الليمون – الزعتر- والمردقوش. أُستنبتت العاثيات 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 العاثيات الضخمة مع أو بدون 1% من المستخلصات النباتية بعد 2-4-24-48-72-96-144 ساعة من الإصابة، تم غسيل العاثيات الضخمة وتفجيرها. أُستنبتت الخلايا المتفجرة بعد 5 دقائق من الحضن بدرجة حرارة الغرفة، على وسط الـ 2YTA (الخميرة ـ تريبتون) 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، العاثيات 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 سياطاً، ولا محفظة خارجية، ولا تُشكل أبواغاً. والبروسيلا بكتيريا سالبة الغرام، هوائية اختيارية بإمكانها إصابة أنواع عديدة من الحيوانات والبشر. تم تمييز ستة سلالات (ذراري) من البروسيلا: البروسيلا المجهضة *Brcella 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 أنّه من المحتمل أن يكون جنس البروسيلا وحيد النوع (Moreno *et al.*, 2002). السلالات الرئيسية الأكثر إمراضية والمنتشرة على نطاق واسع هي: البروسيلا الضأنية و البروسيلا الخنازيرية والبروسيلا المجهضة (Corbel, 1997). إن هذه الأنواع الثلاثة هي سلالات ملساء حاملة لمتعدد السكاريد الليبيدي الأملس Smooth-Lipopolysaccharide كمستضد سطحي رئيسي. مايزال داء البروسيلا يُسبِّب 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 العاثيات 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 الستربتومايسين 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 لابد من البحث عن علاج بديل؛ قد يكون باستخدام بعض المستخلصات النباتية. وبتقدم العلوم وطرق التحليل الحديثة فقد فُصلت المواد الفعالة ذات التأثير الطبي من النباتات وأصبحت تُستخدم بما يتماشى مع راحة المريض، ومازالت البحوث مستمرة لإيجاد المستخلصات المؤثرة على الأمراض الخمجية؛ والتي منها بحثنا هذا حيث يهدف إلى دراسة أثر بعض المستخلصات العطرية النباتية على البكتيريا مثل البروسيلا داخل العاثيات الضخمة للأبقار.

لهذا اخترنا اختباراً في الزجاج *in vitro* يتضمن دراسة أثر بعض هذه المستخلصات على البروسيلا 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 تُفرزه 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 الشفويةLamiaceae، 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 تيمول Thymol. .ينتمي نبات الكزبرة Corhanderum sativumإلى الفصيلة الخيمية Umbelleferae، ويحتوي على زيت عطري مستخرج من الأوراق فيه مادة فعالة تسمى Linalol تشكل 80% تقريبا من الزيت العطري. ينتمي نبات القرفة Cinnamomum zeylanicum إلى الفصيلة الزنجبيلية Zingibiraceae ويحتوي على زيت عطري يستخرج من قشور اللحاء ومادته الفعالة هي ألدهيد القرفةCinnamaldehyde حيث تشكل36% تقريباً من الزيت العطري. أما الليمون Citrus Lemon والبرتقال Citrus sinensis فهما من الفصيلة السذابية Rutaceae حيث توجد المادة الفعالة في قشورهما وهي الليمونين Lis-Balchin Lemonene (Lis-Balchin *et al*., 1997; *et al*., 1996).

المواد والطرق

1 استنبات البروسيلا الضأنية:

تم الحصول على البروسيلا الضأنية التي أُستخدمت في هذه الدراسة من دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية. حيث تمت تنمية البروسيلا في وسط الـ 2YT (في كل ليتر: 10غ من خلاصة الخميرة، 16غ تريبتون، و 5 غ كلور الصوديوم) بدرجة حرارة37 ْم(Al-Mariri *et al*., 2001).

2 المقايسة الخلوية:

بما أن البروسيلا بكتيريا داخل خلوية اختيارية وهي تُفضل الوحيدات والعاثيات الضخمة في الجسم؛ فقد عُزلت الكريات البيضاء للأبقار، وذلك لإصابتها بالبروسيلا 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 التربسين، ومن

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

3 استخلاص الزيوت العطرية:

استخلص الزيت الأساسي من العينة المدروسة (أوراق المردقوش والزعتر البري، بذور الكزبرة ولحاء القرفة وقشر البرتقال والليمون) بعد طحنها إلى أجزاء صغيرة (حتى يتعرض أكبر جزء في خلاياه العطرية للتسخين ومن ثم التطاير مع البخار) حيث وُضعت داخل حوجلة جهاز الاستخلاص وغُمرت 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 solfate anhydrous، ثم خُزن الناتج في عبوات زجاجية محكمة الإغلاق بدرجة حرارة 4°م (Hammer *et al*., 1999) .

4 تحضير العينة للمجهر الالكتروني:

تم الحصول على الراسب البكتيري للبروسيلا الضأنية (المستنبت18 ساعة) ثم غسلها ثلاث مرات بواسطة موقي الـ PBS ثم تم تثبيتها بمحلول 2% غليتر ألدهيد بموقي الـ PBS. تُغسل العينة ثلاث مرات بموقي الـ PBS، ثم يُثبت بواسطة 1% رباعي أكسيد الأوزميوم لمدة ساعة؛ ثم تُغسل ثلاث مرات بموقي الـ PBS. تُوضع العينة على شريحة زجاجية ثم تُجفف بواسطة حاضنة بدرجة 37°م ثم تم طلي العينة بالذهب باستخدام sputter coater ثم فحصت العينة باستخدام المجهر الماسح الالكتروني JEOL JSM 5400 LV (Dimezzo *et al*., 2009) .

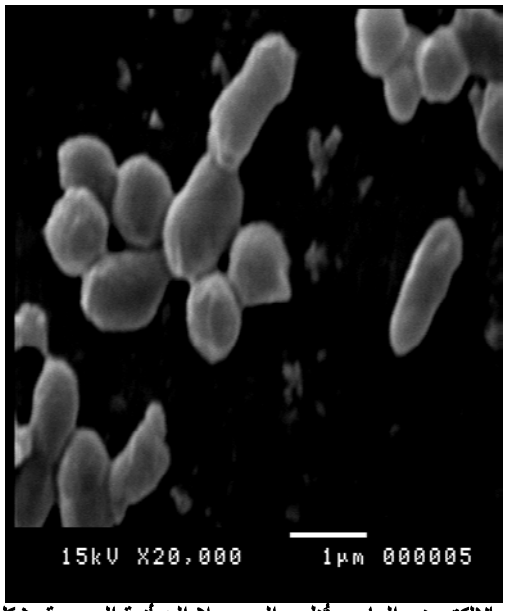
5 التحليل الاحصائي:

تم إدخال كل النتائج إلى الحاسوب حيث أُستخدم برنامج Exel في تجميع وتنظيم النتائج. وأُعتمد 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 المجهر الالكتروني:

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



الشكل1. صورة بالمجهر الالكتروني الماسح تُظهر البروسيلا الضأنية السورية بشكل مكورات عصوية (وحدة القياس = 1µm)

2 المقايسة الخلوية:

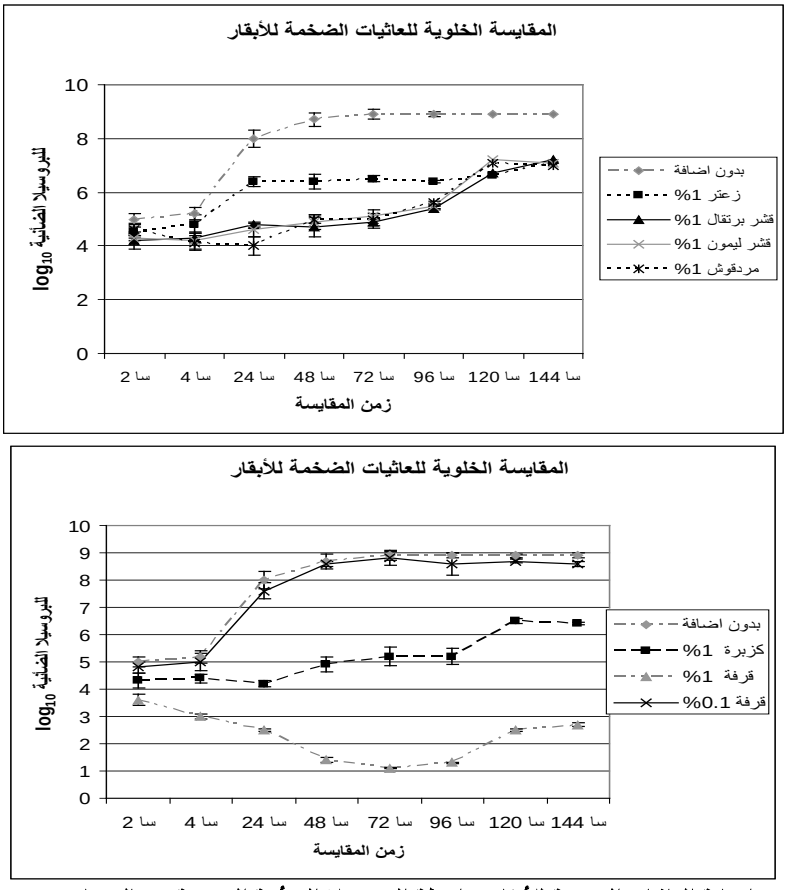
يُلاحظ من الشكل 2 أن اللوغاريتم العشري لتعداد البروسيلا الضأنية (عندما لم يُضَفْ أي مستخلص زيتي نباتي) بدأ من 5.0 CFU في الميليليتر بعد ساعتين من الإصابة، ليرتفع إلى 8.9 CFU بعد 96 و 144 ساعة.

كما يُلاحظ من الشكل السابق، أنه لا يوجد أي تأثير للمستخلصات الزيتية للزعتر البري (بنسبة1%)، 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 مثبط للمستخلص الزيتي للقرفة بتركيز 1% ($p < 0.05$)، فقد كان اللوغاريتم العشري لتعداد البروسيلا الضأنية 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 مثبطاً 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 البروسيلا الضأنية 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 البروسيلا بالارتفاع فيصبح5.2 و 6.5 و 6.4 CFU بعد 96 و120 و 144 ساعة على التوالي.

تحدث الإصابات المزمنة بالبروسيلا بسبب قدرة هذه البكتيريا على المحافظة على حياتها داخل الخلايا البلعمية التي تُبقيها في مأمن 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 التكاثر داخل الخلايا البلعمية. وهكذا فقد تبين أن سلالة البروسيلا الضأنية تقاوم بشكل أفضل الهدم الذي تقوم به الكريات البيض للمضيف من السلالة الموهنة Rev.1 (*al.*, 2000 Aballay *et*). وكذلك تقاوم السلالات الملساء للبروسيلا الضأنية التفكيك الذي تقوم به الكريات البيضاء المعتدلة والعاثيات الضخمة الموجودة في الغدد الثديية بشكل أكبر من السلالات اللقاحية الموهنة الخشنة (20/45 أو RB51) أو الملساء (S19) ولازالت آلية المرور داخل الخلوية للبروسيلا إلى قلب الخلايا البلعمية غير معروفة (Liautrad *et*

al.,1996) ومع ذلك فقد تبين أن الدال الهيدروجيني (pH) الحامضي للجسيم البلعمي الحال مهم من أجل بقاء البروسيلا على قيد الحياة داخل البلعميات (Reichow *et al*., 2006)



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

لقد طورت البروسيلا آليات لتستطيع التأقلم والتكاثر داخل العاثيات الضخمة، وأي علاج فعال ضد هذه البكتيريا يجب أناً يستطيع النقاء للخلايا ومثبطاً للبروسيلا ضمن البلعميات (Pappas *et al*., 2005) لهذا فقد تم دراسة أثر ستة مستخلصات نباتية على تثبيطها داخل العاثيات الضحمة للأبقار. و تبين لنا كما أوضحنا أعلاه (ضمن شروط دراستنا) أن المستخلص الزيتي للقرفة (Cinnamaldehyde و Eugenol) يملك تأثيراً مثبطاً على البروسيلا داخل العاثيات الضخمة للأبقار، بينما كان للمستخلصات الزيتية المردقوش (Monoterpenes) والليمون (الليمونين) والبرتقال
(oil of purtugat) والكزبرة (linolol وborneol and linaloo)، 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. Cloeckaert 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. Tezeaen 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 rifamyicin 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., Iley (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 كلية الزراعة – جامعة المنصورة

أ. د/ حسين عبد الله محمد الفضالي كلية زراعة دميلط – جامعة المنصورة