https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en

Journal of Microbial Biology
E-ISSN: 3060-7647
13rd Year, Vol. 13, No. 49, 2024 pp. 95-109
Received: 08/12/2023 Accepted: 07/05/2024

(Research Paper)

Expression changes of *van*A and *vanB* genes of *Staphylococcus saprophyticus* treated with secondary metabolites of *Cyanobacterium Anabaena*

Zahra sadat Shobeiri
Department of biology, Faculty of Basic Sciences, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
asal1374shobeiry@gmail.com
Elahe Aliasgari,*
Department of biology, Faculty of Basic Sciences, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
e.asgari@gmail.com
umarss Amini
Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
dr_kumarss_amini@yahoo.com

Abstract

Herein we evaluate the effect of secondary metabolites from the cyanobacteria *Anabaena* sp. on the expression of vancomycin resistance genes in *Staphylococcus Saprophyticus.*. This study is motivated by the growing concerns of multi-drug resistant *S. saprophyticus* strains and the need for alternative antimicrobial agents. of During a two-month period, 120 clinical samples were collected from elderly patients referred to Tehran hospitals. *S. saprophyticus* isolates were identified using both phenotypic and chemical tests. Subsequently, molecular methods were employed to detect the presence of *van* genes. The microbroth dilution method used to determine the sensitivity of the bacterial isolates to the methanolic extract of *Anabaena* sp. . Finally, real-time PCR was employed to measure the expression level of *van* genes compared to the 16S rRNA gene in *S. saprophytic* isolates treated with the cyanobacterial secondary metabolite. Among the 83 bacterial isolates obtained from the clinical samples, only eight were identified as *S. saprophyticus*. One isolate harbored the *vanA* gene, while two isolates possessed the *vanB* gene. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the cyanobacterial secondary metabolite against *S. saprophyticus* was 750 µg/mL, with a sub-MIC of 325 µg/mL. Importantly, the expression level of *vanA* and *vanB* genes in the strains treated with the cyanobacterial secondary metabolite down-regulated compared to the reference gene (16S rRNA). The findings suggest that the secondary metabolites from *Anabaena* sp. possess a potent antimicrobial effect and can potentially reduce the expression of antibiotic resistance genes in *S. saprophyticus.* This paves the way for the development of a new generation of anti-staphylococcal drugs.

Keywords: *Staphylococcus saprophyticus*, *Van* genes, the secondary metabolite of cyanobacteria *Anabaena*, Real Time PCR

* Corresponding Author
3060-7647/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
Shobeiri, Z. S.,Ali asgari, E., & Amini, K. Expression changes of vanA and vanB genes of Staphylococcus saprophyticus treated with secondary metabolites of Cyanobacterium Anabaena. *Journal of Microbial Biology*. 2024; 13 (49): 95-109.
http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140026.1572

Introduction

Staphylococcus saprophyticus, a Gram-positive, coagulase-negative coccus, is a frequent cause of urinary tract infections, particularly in sexually active women. This bacterium is known for its resistance to novobiocin and its ability to harbor multiple plasmids, making treatment selection challenging. The emergence of vancomycin resistance genes (like *vanA*) in Gram-positive *Staphylococcus* strains highlights the urgent need for effective diagnostic and treatment strategies for these infections. . In this context, our study explores the impact of secondary metabolites from cyanobacterium Anabaena sp. on the expression of vancomycin resistance genes in *S. saprophyticus*. The escalating antibiotic resistance crisis underscores the importance of finding novel antimicrobial agents from diverse sources, such as cyanobacteria. These microorganisms offer advantages in biotechnological applications due to their economic viability and have shown promise in producing broad-spectrum antimicrobial compounds. By investigating the potential of cyanobacterial metabolites to modulate antibiotic resistance genes, this research contributes to addressing the pressing issue of resistance in *S. saprophyticus* and other pathogenic bacteria.

Due to growing concerns about the emergence of multi-drug resistant strains of *S. saprophyticus*, there is a heightened interest in exploring alternative antimicrobial agents. This study investigates the impact of secondary metabolites derived from cyanobacteria *Anabaena* sp. on the expression of vancomycin resistance genes in *S. saprophyticus*.

Material and methods

120 clinical samples (blood, urine, nasal swabs, wounds, etc.) were collected from elderly people aged 65 and 80 years old who visited Tehran hospitals. *S. saprophyticus* isolates were identified using phenotypic and chemical tests. Bacterial genomic DNA was extracted using a kit from Pishgaman Company. The concentration and purity of the isolated DNA were quantified using a Nanodrop spectrophotometer. Agarose gel electrophoresis was then performed to assess DNA integrity. Consequently, the presence of *van* genes was confirmed using molecular methods. A standard cyanobacterium isolate was obtained from the National Center for Genetic Resources of Iran and cultured on synthetic BG-11 medium. After initial growth, the culture was transferred to fresh medium for purification. The purified culture was incubated under controlled conditions with light (12 hours of light/12 hours of dark) at 22°C with 2000 lux light. Secondary metabolites were extracted from Cyanobacterium *Anabaena* sp. using ethyl acetate method with BG-11 culture medium. The sensitivity of bacterial isolates to the methanolic extract of cyanobacterium *Anabaena* sp. was determined using the microbroth dilution method. Serial dilutions of the extract, ranging from 4096 µg/mL to 256 µg/mL were prepared. . Subsequently, 100 µl of bacterial suspension was added to each dilution, followed by incubation for 24 hours at 37°C. Growth was monitored by measuring turbidity levels in the microplates to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs). Samples exposed to sub-MIC concentrations of the extract were then cultured for 8 to 12 hours in Mueller Hinton Broth within sterile tubes. Vancomycin-resistant isolates harboring vancomycin resistance genes (*van* genes) and susceptible to the cyanobacterium *Anabaena* sp. secondary metabolite were selected for RNA extraction and subsequent analysis of gene expression levels. The expression level of *van* genes in isolates treated with the cyanobacterium *Anabaena* sp.

http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140026.1572

secondary metabolite were then measured. Statistical analyses were performed using Excel 2009 and SPSS 16 software. One-way ANOVA, chi-square, and Cramer V tests were employed. Data are presented as mean ± standard deviation, with significance set at $p \leq 0.05$. The ΔΔCt method and REST software was used to determine the difference in expression levels of target genes between control and treated samples. .

Discussion of Results & Conclusions

A total of 120 clinical specimens were collected, including 41 urine samples (34%), 33 pus and skin wound secretions (27.5%), 29 blood samples (24%), and 17 nasal swabs (14.5%). The average patient age was 74±3.3 years, with 67 males and 53 females. Only 8 isolates out of 83 from the clinical samples were identified as *S. saprophyticus*. Coagulase, DNase, and mannitol tests were negative, while catalase and glucose tests were positive. Additionally, the isolates displayed resistance to Novobiocin. The colonies manifested as yellow, gray, or white on the culture medium, devoid of any hemolytic characteristics. One isolate possessed the *vanA* gene, and 2 isolates had the *vanB* gene. Electrophoresis confirmed the integrity of the extracted DNA, and its concentration and purity were within acceptable ranges according to nanodrop analysis. The secondary metabolite from cyanobacterium *Anabaena* sp. had a MIC of 750 µg/mL and a sub-MIC of 325 µg/mL against *S. saprophyticus*. The expression levels of *vanA* and *vanB* genes in isolate treated with the secondary metabolite decreased compared to the reference gene (16SrRNA). The *vanA* gene showed a 0.43-fold decrease (fold change = -0.43) and the *vanB* gene showed a 0.25-fold decrease (fold change = -0.25) compared to the untreated group ($p<0.05$). This study demonstrates that secondary metabolites from cyanobacterium *Anabaena* sp. have antimicrobial activity, leading to down-regulation of vancomycin resistance genes in *S. saprophyticus*. These findings suggest a promising approach for developing new anti-staphylococcal drugs. Further exploration and characterization of the active compounds in these metabolites could lead to new methods for combating antibiotic resistance in *Staphylococcus* strains. By delving deeper into the composition and mechanisms of action of these bioactive substances, we can unlock novel strategies for combating antibiotic resistance in *Staphylococcus* strains. Isolating and purifying these bioactive compounds could pave the way for a new generation of anti-staphylococcal drugs with enhanced efficacy and reduced potential for resistance development. This comprehensive approach underscores the importance of exploring natural sources, such as the cyanobacterium *Anabaena* sp. in the quest for innovative solutions to the escalating challenge of antibiotic resistance in pathogenic bacteria.

http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140026.1572

زیست‌شناسی میکروبی
سال سیزدهم، شماره ۴۹، ۱۴۰۳، صفحه ۹۵-۱۰۹
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۱۸

مقاله پژوهشی

تغییرات بیان ژن‌های *vanA* و *vanB* باکتری *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* تحت تیمار با متابولیت‌های ثانویهٔ *سیانوباکتر آنابنا*

زهرا سادات شبیری: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران asal1374shobeiry@gmail.com
الهه علی‌عسگری: * استادیار گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران e.asgari@gmail.com
کیومرث امینی: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران dr_kumarss_amini@yahoo.com

چکیده

با توجه به روند رو به رشد سویه‌های مقاوم به چند داروی *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، جست‌وجو برای شناسایی عوامل ضدمیکروبی جایگزین بیشتر شده است. برای این منظور، در تحقیق حاضر بررسی متابولیت‌های ثانویه *آنابنا سیانوباکتری* بر بیان ژن‌های مقاومت *وانکومایسین استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* جداشده از سالمندان انجام شد. طی دو ماه، ۱۲۰ نمونهٔ بالینی مختلف از سالمندان مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد. ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* با استفاده از تست‌های فنوتیپی و شیمیایی شناسایی شدند. سپس با استفاده از روش‌های مولکولی حضور ژن‌های *Van* شناسایی شد. سپس با استفاده از روش میکروبراث دایلوشن حساسیت ایزوله‌های باکتریایی نسبت به متابولیت ثانویه *سیانوباکتر آنابنا* سنجیده شد. در انتها میزان بیان ژن‌های *Van* نسبت به *16SrRNA* با استفاده از روش Real Time PCR در ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* تیمارشده با متابولیت ثانویه سیانوباکتر اندازه‌گیری شد. در این مطالعه با استفاده از تست‌های فنوتیپی از ۸۳ ایزوله باکتری جداسازی‌شده از نمونه‌های بالینی، تنها ۸ ایزوله به‌عنوان *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* شناسایی شد. از ۸ ایزوله *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* ۱ ایزوله واجد ژن *VanA* و ۲ ایزوله واجد ژن *VanB* بودند. MIC متابولیت ثانویه سیانوباکتر ۷۵۰ میکروگرم / میلی‌لیتر و sub-MIC ۳۲۵ میکروگرم / میلی‌لیتر علیه ایزوله‌های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* بود. میزان بیان ژن *VanA* و *VanB* در سویه‌های تیمارشده با متابولیت ثانویه سیانوباکتر نسبت به ژن مرجع (*16SrRNA*) کاهش یافت. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهند متابولیت ثانویه سیانوباکتر دارای اثر ضدمیکروبی قوی است و سبب کاهش بیان ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک می‌شود که برای توسعه نسل جدید داروهای ضد *استافیلوکوکوس* می‌تواند استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، ژن‌های *van*، متابولیت ثانویه سیانوباکتر، Real Time PCR

---

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

شبیری، زهرا سادات، علی‌عسگری، الهه، امینی، کیومرث. تغییرات بیان ژن‌های vanA و vanB باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس تحت تیمار با متابولیت‌های ثانویه‌ی سیانوباکتر آنابنا. *زیست‌شناسی میکروبی*. ۱۴۰۳، ۱۳ (۴۹): ۹۵-۱۰۹. http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140026.1572

2322-5181/ © 2024 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

مقدمه

استافیلوکوکوس سا پروفیتیکوس، کوکوسی گرم مثبت و کواگولاز منفی در سردهٔ *استافیلوکوکوس* است که ازنظر تست فسفاتاز، منفی و ازنظر اوره‌آز و لیپاز مثبت است. این باکتری، یکی از عوامل شایع عفونت‌های مجرای ادراری است (۱). تخمین زده می‌شود ۱۰ تا ۲۰ درصد از عفونت‌های UTI توسط *استافیلوکوکوس سا پروفیتیکوس* ایجاد می‌شود. عفونت در زنان فعال ازنظر جنسی بیشتر دیده شده است (۲). این باکتری به دیسک تشخیصی نوبیوسین، مقاوم است (۳) و همچنین حامل پلاسمیدهای متعددی هستند که موجب مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها می‌شود و انتخاب آنتی‌بیوتیک برای آنها مشکل است (۴). در زمان حاضر مقاومت دارویی بین باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس* باعث بروز مشکلات زیادی در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری شده است. مقاومت به گلیکوپپتیدها در *استافیلوکوکوس*‌ها به‌وسیلهٔ خوشه ژنی شامل ژن‌های *vanA*، *vanB*، *vanC*، *vanD*، *vanE* و *vanG* است که ژنوتایپ *vanA* از بقیه مهم‌تر است. ژنوتایپ *vanA* نوع غالبی از ژنوتایپ مقاومت در اروپا گزارش شده است. سویه‌هایی با ژنوتایپ *vanA* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین و تیکوپلانین مقاوم‌اند و این ژن‌ها را ازطریق پلاسمیدهای کانژوگیتیو به دیگر سویه‌های پاتوژن مانند *استافیلوکوکوس سا پروفیتیکوس* انتقال می‌دهند (۵). وانکومایسین یک آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی است که برای درمان عفونت‌های باکتریایی گرم مثبت استفاده می‌شود. به‌دلیل افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها روش‌های قابل اطمینان برای مقاومت باکتری‌ها و ارزیابی عفونت با این باکتری وجود دارد. آزمایش‌های سریع و قابل اعتماد در آزمایشگاه‌های پژوهشی به‌منظور تشخیص *استافیلوکوکوس سا پروفیتیکوس* و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در آنها مهم و ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به گسترش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی بین سویه‌های بیماری‌زای باکتریایی و همچنین محدودبودن داروهای ضدقارچی، جست‌وجو برای یافتن ترکیبات جدید ضدمیکروبی هنوز هم به‌عنوان یکی از راهکارهای درخور توجه برای حل این معضل مطرح است (۶). یکی از روش‌های دستیابی به ترکیبات جدید، غربالگری و جداسازی میکروارگانیسم‌های جدید است (۷). سیانوباکتری‌ها گروه بسیار بزرگی از میکروارگانیسم‌ها هستند که در زیستگاه‌های مختلف وجود دارند. فتوتروف‌بودن و عدم نیاز به مواد آلی در کشت سیانوباکتری‌ها، ازنظر بیوتکنولوژی یک مزیت اقتصادی محسوب می‌شود که آنها را نسبت به میکروارگانیسم‌های دیگر برتری می‌بخشد (۸)؛ ازاین‌رو، سیانوباکتری‌ها امروزه به‌طور گسترده‌ای برای تولید ترکیبات جدید غربالگری می‌شوند و ترکیبات بسیاری با قابلیت‌های بیولوژیکی مؤثر توسط این سویه‌ها تولید می‌شوند که ترکیبات ضدمیکروبی از آن جمله‌اند که طیف اثر متنوعی روی باکتری‌ها و قارچ‌ها دارند. با توجه به اینکه روش‌های متداول جداسازی *استافیلوکوکوس* امری پرزحمت است و حداقل به ۳ روز وقت نیاز دارد، امروزه سعی بر این است که از روش‌های سریع (مانند تکنیک‌های بر پایه PCR) استفاده شود که حساس و دقیق‌اند (۹). هدف از تحقیق حاضر، بررسی تأثیر متابولیت‌های ثانویه *سیانوباکتر آنابنا* بر بیان ژن‌های مقاومت *وانکومایسین استافیلوکوکوس سا پروفیتیکوس* جداشده از سالمندان است.

http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140026.1572

نمونه‌ها و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

طی دو ماه، ۱۲۰ نمونهٔ بالینی مختلف (خون، ادرار، سواب بینی، زخم و ...) از سالمندان بین ۶۵ تا ۸۰ سال مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شد. فرم رضایت آگاهانه از بیماران دریافت شد و تمام فرایند پژوهش، تحت نظارت کمیتهٔ اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق با کد IR.IAU.ET.REC.1401.008 انجام گرفت. به‌منظور محاسبهٔ حجم نمونه از فرمول آماری کوکران استفاده شد (۱۰).

کشت، جداسازی و تأیید بیوشیمیایی جدایه‌های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*

برای احیا، خالص‌سازی و تشخیص *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، محیط‌های کشت مولر هینتون آگار، نوترینت آگار، بلاد آگار، مانیتول سالت آگار و DNAse آگار استفاده شدند. تأیید بیوشیمیایی جدایه‌های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* به کمک روش رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های کواگولاز، DNase، مانیتول، کاتالاز و گلوکز، سنجش مقاومت به نوبیوسین و ارزیابی خاصیت همولیتیک انجام شد (۱۱). نمونه به همراه ۲۰ درصد گلیسرول و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در محیط لوریا برتانی براث ذخیره شد.

M-PCR

برای استخراج DNA باکتری از کیت تولیدشده در شرکت پیشگامان استفاده شد (http://irgtp.com). غلظت DNA استخراج‌شده، توسط دستگاه نانودراپ سنجیده شد و از عدم آلودگی فنول و پروتئین در DNA استخراج‌شده اطمینان حاصل شد. سپس حفظ تمامیت DNA توسط ژل الکتروفورز روی آگارز ۱ درصد ارزیابی شد.

طراحی پرایمرها با نرم‌افزارهای آنلاین NCBI و Primer3 انجام شد. ویژگی پرایمر با نرم‌افزار BLAST آنالیز شد. همچنین، سایر مشخصات پرایمر مانند ساختارهای ثانویه و دمای annealing آن با نرم‌افزار Generunner ارزیابی شد. پرایمر طراحی‌شده برای سنتز به شرکت ژن‌فناوران (https://genfanavaran.com) ارسال شد. توالی پرایمرهای ساخته‌شده شامل F(Forward): 5'-GGGAAAACGACAATTGC-3' و R(Reverse): 5'-GTACAATGCGGCCGTTA-3' برای ژن *vanA* F(Forward): 5'- ACGGAATGGGAAGCCGA -3' و R(Reverse): 5'- TGCACCCGATTTCGTTC– 3' برای ژن *vanB* بود. فرایند *M-PCR* در برنامهٔ دمایی Pre denaturation به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ سیکل شامل Denaturation به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، Annealing به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و Extention به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و درنهایت Post extention به مدت ۵ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. سپس الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد انجام شد. باندهای مورد انتظار 732bp برای ژن *vanA* و 647bp برای ژن *vanB* بود.

تهیهٔ *سیانوباکتر آنابنا* و استخراج متابولیت‌های ثانویه

ایزوله استاندارد *سیانوباکتر* از کلکسیون مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شد. نمونه‌های تهیه‌شده روی محیط کشت سنتتیک BG-11 کشت داده شدند. پس از رشد اولیه، نمونه‌ها در محیط جدید کشت و

http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140026.1572

خالص‌سازی شدند. نمونه‌های خالص در محیط مایع در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد با نور ۲۰۰۰ لوکس، به مدت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی گرماگذاری شد (۱۲). استخراج متابولیت‌های ثانویه از *سیانوباکتر آنابنا* به روش اتیل استات با استفاده از محیط کشت‌های BG-11 و BG-11 براث انجام شد (۱۳).

تعیین MIC باکتری

به کمک روش میکروبراث دایلوشن، MIC باکتری انجام شد. رقت‌های ۲۰۴۸، ۱۰۲۸، ۵۱۴ و ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از غلظت اولیهٔ استوک تهیه شد که برابر ۴۰۹۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و به هریک ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری، اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و کدورت یا عدم کدورت در میکروپلیت‌ها و میزان حداقل غلظت بازدارندگی MICs تعیین شد. نمونه‌ها با غلظت subMIC به مدت ۸ تا ۱۲ ساعت در محیط مولر هینتون براث در لوله استریل کشت داده شدند. از نمونه‌های مقاوم به وانکومایسین واجد ژن‌های *van* و حساس به متابولیت ثانویه *سیانوباکتر آنابنا* برای استخراج RNA و میزان بیان ژن‌ها استفاده شد (۱۳).

سنجش بیان ژن‌های *van*

استخراج RNA از سلول *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* تیمارشده با غلظت subMIC متابولیت ثانویه *سیانوباکتر* توسط محلول DEPC شرکت sigma (https://www.sigmaaldrich.com) و محلول RNA شرکت سیناژن (https://www.cinnagen.com) و ایزوپروپانول انجام شد. برای ساخت cDNA از روی RNA استخراج‌شده، کیت Revert AidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1621) استفاده شد. Real-Time PCR به روش SYBER green با استفاده از ژن *16SrRNA* به‌عنوان کنترل داخلی برای بررسی بیان ژن‌های *van* در باکتری‌های تیمارشده با متابولیت ثانویه *سیانوباکتر* انجام شد. بدین منظور، پرایمرهای *F: 5-ACTCTGTTATTAGGGAAGAA-3* و *R: 5-AACGCTTGCCACCTACGTAT-3* برای ژن *16SrRNA* (۱۴)، پرایمرهای *F: 5′-ATCAACCATGTTGATGTAGC-3* و *R: 5′-AAGGGATACCGGACAATTCA– 3* برای ژن *vanA* و پرایمرهای *F: 5′-ACCCTGTCTTTGTGAAG-3′* و *R: 5′-GAAATCGCTTGCTCAAT– 3′* برای ژن‌های *vanB* و نیز Master mix Ampliqon به کار گرفته شدند. فرایند Real-Time PCR در برنامه دمایی دناتوراسیون به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۴۰ سیکل شامل دناتوراسیون به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و گسترش به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار Excel 2009 (https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/excel) و SPSS 16 (https://www.ibm.com/products/spss-statistics) انجام شد و تست‌های آماری واریانس یک‌طرفه، کای اسکور و Cramer V test استفاده شدند. اطلاعات به‌صورت mean±standard deviation نمایش داده شده‌اند و p-value≤0.05 به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر

http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140026.1572

گرفته شد. تفاوت بیان ژن‌های هدف، بین نمونه‌های کنترل و تیمارشده با روش آماری ΔΔCt test و توسط نرم‌افزار REST (https://www.gene-quantification.de/rest.html) محاسبه شد.

نتایج

مشخصات نمونه‌های جمع‌آوری‌شده

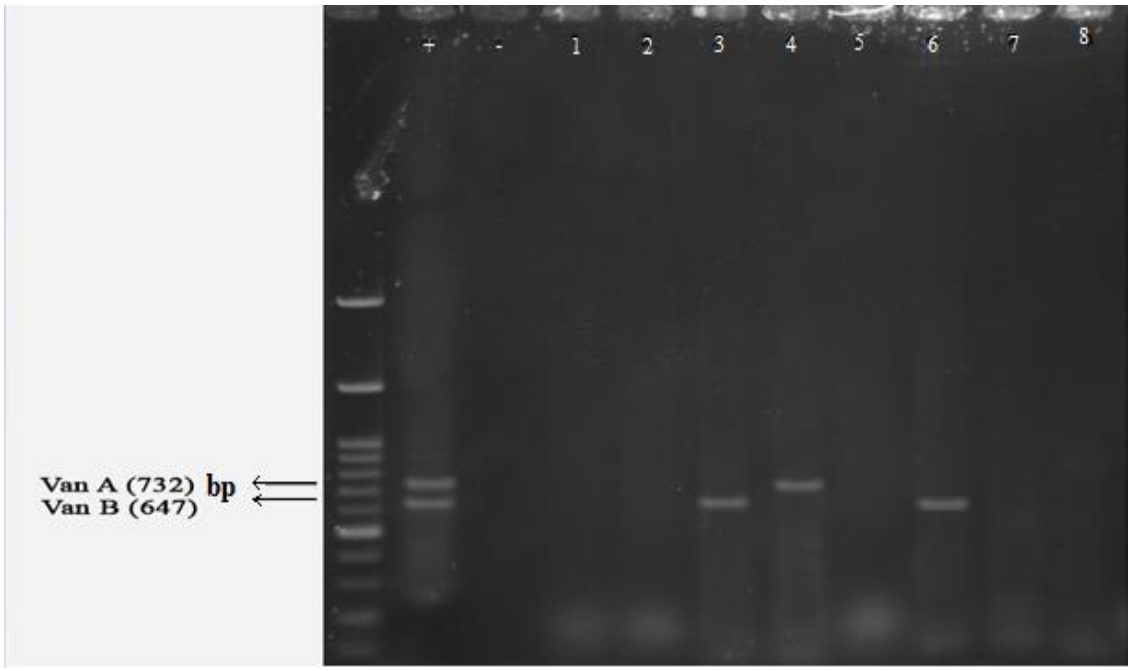
۱۲۰ نمونهٔ بالینی شامل ۴۱ مورد (۳۴ درصد) نمونه ادرار، ۳۳ مورد (۲۷/۵ درصد) نمونه چرک و ترشحات زخم پوست، ۲۹ مورد (۲۴ درصد) نمونه خون و ۱۷ مورد (۱۴/۵درصد) سواب بینی جمع‌آوری شد. میانگین سنی بیماران ۳/۳±۷۴ سال بوده است و ۶۷ مورد مرد و ۵۳ مورد زن بودند.

جدایه‌های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*

از ۸۳ ایزوله باکتری (۷۰ درصد) جداسازی‌شده از نمونه‌های بالینی تنها ۸ ایزوله (۹/۶ درصد) به‌عنوان *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* شناسایی شدند. نتایج تست‌های کواگولاز، DNase و مانیتول، منفی و نتایج تست‌های کاتالاز و گلوکز مثبت بودند. همچنین، سلول‌ها نسبت به نووبیوسین مقاوم بوده، کلنی‌ها در محیط کشت زرد، خاکستری یا سفید بوده‌اند و خاصیت همولیتیک مشاهده نشد.

نتایج M-PCR

محصول استخراج DNA ازلحاظ کیفیت توسط ژن الکتروفورز تأیید شد و غلظت و خلوص آن در نانودراپ پذیرفتنی بود. از ۸ ایزوله *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، ۲ ایزوله واجد ژن *VanB* و ۱ ایزوله واجد ژن *VanA* بودند (شکل ۱).



شکل ۱: M-PCR برای ژن‌های van. M: مارکر ۱۰۰ bp، (+): کنترل مثبت واجد ژن‌های *vanA* و *vanB*. (–):کنترل منفی، ایزوله‌های ۱، ۲، ۵، ۷ و ۸: فاقد هر دو ژن *vanA* و *vanB*، ایزوله‌های ۳ و ۶: واجد ژن *vanB* و ایزوله ۴: واجد ژن *vanA*.

Figure 1: M-PCR for *van* genes. M: 100 bp marker, (+): positive control containing *vanA* and *vanB* genes. (-): negative control, isolates 1, 2, 5, 7 and 8: lacking both *vanA* and *vanB* genes, isolates 3 and 6: possessing the *vanB* gene and isolate 4: possessing the *vanA* gene.

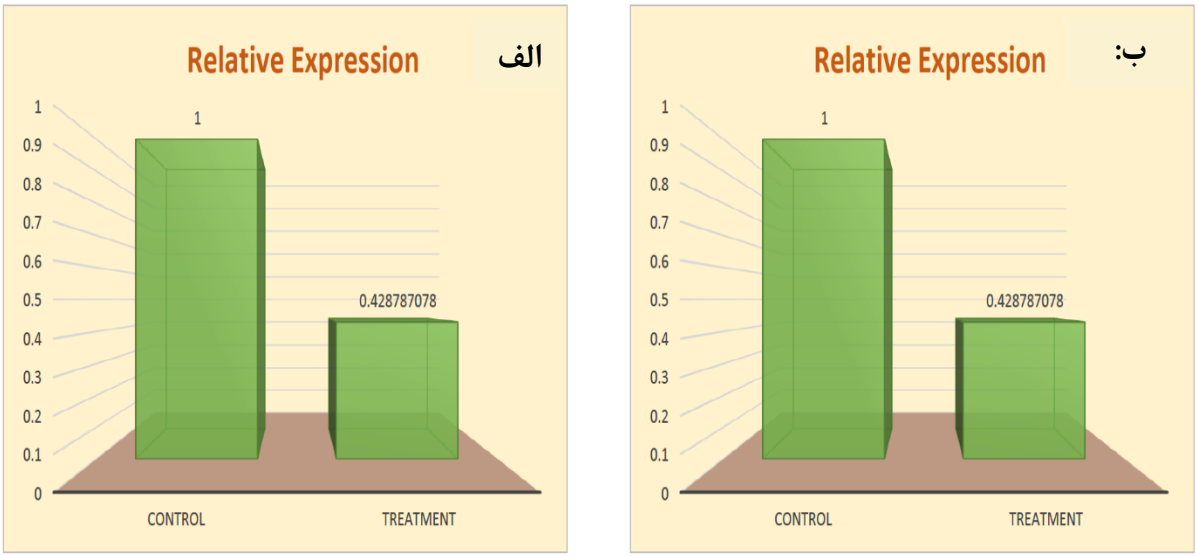
http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140026.1572

نتایج تعیین MIC باکتری

براساس نتایج به‌دست‌آمده، MIC متابولیت ثانویه به‌دست‌آمده از *سیانوباکتر آنابنا* ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و sub-MIC، ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است.

میزان بیان ژن‌های *van*

نتایج مطالعه نشان دادند میزان بیان ژن *VanA* و *VanB* در ایزوله تیمارشده با متابولیت ثانویه سیانوباکتر نسبت به ژن مرجع (*16SrRNA*) کاهش یافته است. میزان Fold Change برای ژن *VanA* برابر ۰/۴۳- و برای ژن *VanB* برابر ۰/۲۵- بود؛ بدین معنا که بیان ژن *VanA* در گروه تیمار نسبت به گروه غیرتیمار ۰/۴۳ برابر و بیان ژن *VanB* در گروه تیمار نسبت به گروه غیرتیمار ۰/۲۵ برابر کاهش یافته است. تمامی این نتایج ازلحاظ آماری معنی‌دار بودند ($p<0.05$). نمودار بیان مقایسه‌ای دو ژن مدنظر در شکل ۲ ارائه شده است.



شکل ۲: الف) میزان بیان ژن *vanA* در سویه *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* در حالت کنترل و تیمار با *سیانوباکتر* ب) میزان بیان ژن *vanB* در سویه *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* در حالت کنترل و تیمار با *سیانوباکتر*

Figure 2: a) expression level of *vanA* gene in *Staphylococcus saprophyticus* strain under both control conditions and treatment with cyanobacteria. b) expression level of *vanB* gene in *Staphylococcus saprophyticus* strain under both control conditions and treatment with cyanobacteria.

بحث

استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس یکی از علل شایع عفونت‌های مجاری ادراری بدون عارضه است. این باکتری یک اوروپاتوژن عامل ۱۰ تا ۲۰ درصد عفونت دستگاه ادراری در زنان جوان فعال جنسی در سراسر جهان است (۱۵). *استافیلوکوکوس*های کواگولاز منفی قبل از دهه ۱۹۶۰ به‌عنوان آلاینده‌های ادراری در نظر گرفته می‌شدند. تورس پریرا جداسازی *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی دارای آنتی‌ژن ۵۱ را از ادرار زنان مبتلا به عفونت حاد گزارش داد (۱۶). برخی از سویه‌های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* دارای توانایی ایجاد بیوفیلم و افزایش حدت به‌ویژه در بیماران دارای کاتتر

http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140026.1572

هستند. پس از تولید بیوفیلم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی تشدید می‌شود (۱۷). در این موارد، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* ممکن است به وانکومایسین مقاوم باشد و فقط ازطریق لینزولید به‌طور مؤثر درمان شود (۱۸). وانکومایسین یک آنتی‌بیوتیک شناخته‌شده قبلی به‌عنوان داروی خط اول برای عفونت *استافیلوکوکوس* بود؛ اما افزایش میزان مقاومت ConNS به این آنتی‌بیوتیک در چندین رویکرد درمانی به یک نگرانی جدی تبدیل شده است (۱۹). مقاومت نوع *VanA* که اولین موردی بود که تشخیص داده شد و رایج‌ترین است، با سطوح بالایی از مقاومت به گلیکوپپتیدها، وانکومایسین و تیکوپلانین مشخص می‌شود و توسط ترانسپوزون *Tn1546* یا عناصر نزدیک به هم واسطه می‌شود که در کروموزومی یا پلاسمید قرار دارند. این عنصر ژنتیکی متحرک ۱۱ کیلوبایتی که به خانواده ترانسپوزون‌های *Tn3* تعلق دارد، ۹ پلی پپتید را کد می‌کند و مسئول جابه‌جایی (محصولات *ORF1* و *ORF2*)، تنظیم بیان مقاومت (*VanR* و *VanS*)، سنتز پایانه‌های پیش‌سازهای پپتیدوگلیکان اصلاح‌شده در d-Lac (*VanH* و *VanA*)، هیدرولیز پیش‌سازهای طبیعی (*VanX* و *VanY*) و نقش آن به‌صورت ناشناخته است (۲۰).

امروزه متابولیت‌های ثانویه منبع مهمی از داروهای جدید و ترکیبات دارویی مؤثر هستند. فرآورده‌های طبیعی از طیف گسترده‌ای از گونه‌های متنوع، جداسازی و برای فعالیت‌های مختلف زیستی آزمایش شده‌اند. سیانوباکتری‌ها می‌توانند منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه باشند. متابولیت‌های سیانوباکتری‌ها طیف درخور توجه و باورنکردنی از فعالیت‌های زیستی مانند فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضدسرطان، ضدویروس، مهارکننده سیستم ایمنی، حشره‌کشی و ضدالتهابی را نشان می‌دهند (۲۱).

هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر متابولیت‌های ثانویه *سیانوباکتری آنابنا* بر بیان ژن‌های مقاومت *وانکومایسین استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* جداشده از سالمندان بود. در مطالعه حاضر از ۸۳ ایزوله باکتری (۷۰ درصد) جداسازی‌شده از نمونه‌های بالینی تنها ۸ ایزوله (۹/۶ درصد) به‌عنوان *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* شناسایی شدند. از این تعداد ۵ ایزوله از ترشحات چرکی پوست و ۲ ایزوله از نمونه ادرار و ۱ ایزوله از سواب بینی جداسازی شدند. در مطالعه طهماسبی و همکاران از ۱۰۰ جدایه *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی جداشده از نمونه‌های بالینی مختلف، ۵ جدایه *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* (۵ درصد) و ۵۵ جدایه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (۵۵ درصد) بودند (۲۲). عربستانی و همکاران، فراوانی سویه‌ها را به‌ترتیب *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ۵۵ درصد، *استافیلوکوکوس همولتیکوس* ۴۰ درصد و *استافیلوکوکوس ساپروفتیکوس* ۵ درصد گزارش کردند (۲۳).

میزان مقاومت به وانکومایسین در مطالعه حاضر در ۳ ایزوله از کل ایزوله‌ها مشاهده شد. در مطالعه‌ای که عبدلی و همکاران، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حداقل غلظت مهاری وانکومایسین در *استافیلوکوکوس‌های اورئوس* و کواگولاز منفی جداشده از نمونه‌های بالینی کودکان در تبریز را تعیین کرده بودند، با توجه به میزان MIC وانکومایسین به‌ترتیب ۱۳/۲ درصد و ۳/۳ درصد ایزوله‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی دارای مقاومت حدواسط به وانکومایسین بودند؛ اما هیچ ایزوله مقاوم به وانکومایسین در این تحقیق شناسایی نشد (۲۴). همچنین در مطالعه حاضر، مقاومت به وانکومایسین در *استافیلوکوکوس‌های ساپروفیتیکوس*

http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140026.1572

شناسایی شد؛ درحالی‌که در سایر مطالعات در *استافیلوکوکوس همولیتیکوس* ایزوله مقاوم به وانکومایسین گزارش شد (۲۵-۳۲).

براساس نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه ما، غلظت متابولیت ثانویه *سیانوباکتر آنابنا* استفاده‌شده در روش براث دایلوشن ۴ تا ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شده بود. براساس نتایج به‌دست‌آمده، میزان MIC ایزوله‌ها نسبت به متابولیت ثانویه بررسی شد. MIC متابولیت ثانویه به‌دست‌آمده، ۵۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و sub-MIC، ۲۵۶ میکروگرم بر لیتر بوده است. در مطالعه مارتین و همکاران ۹ سویه سیانوباکتریا با فعالیت آنتی‌بیوتیکی علیه باکتری گرم مثبت به نام‌های *Clavibacter michiganensis* subsp *insidiosum* و *Cellulomonas* uda گزارش شدند (۲۱). در مطالعه الشیخ و همکاران، متابولیت ثانویه سیانوباکتر در برابر گونه‌های مختلف باکتری‌های گرم مثبت (Lactobacillus sp. and Bacillus firmus) و گرم منفی (Aeromonas hydrophila، Pseudomonas fluorescens و Pseudomonas anguilliseptica) فعالیت ضدمیکروبی نشان داد (۳۳). همچنین در انطباق با مطالعه حاضر، چوهان و همکاران خواص آنتی‌باکتریال *Anabaena* sp. را در برابر چندین میکرو فلور مهم بالینی به روش HPTLC ارزیابی کردند. نتایج حاکی از آن بود که MIC برای مهار *استافیلوکوکوس اورئوس*، حدود ۲۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر است (۳۴).

با توجه به اینکه امروزه مقاومت دارویی به‌خصوص مقاومت به وانکومایسین افزایش یافته است، یافتن ترکیبات مؤثر بر کاهش بیان ژن‌های مقاومت دارویی درحال افزایش است. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند میزان بیان ژن *VanA* و *VanB* در سویه‌های تیمارشده با متابولیت ثانویه *سیانوباکتر آنابنا* نسبت به ژن مرجع (*16SrRNA*) کاهش یافته است. در این راستا مطالعات متعددی به‌منظور ارزیابی تأثیر متابولیت‌های زیستی مختلف بر ژن‌های متفاوت دخیل در پاتوژنز باکتری‌های متفاوت انجام شده‌اند. نتایج مطالعه کاناپان و همکاران نشان دادند عصاره ثانویه ریشه *Vetiveria zizanioides* باعث اختلال بیوفیلم بالغ و کاهش تنظیم ژن‌های چسبنده مسئول در اتصال اولیه باکتری به سلول هدف در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود (۳۵). محکمی و همکاران نیز نشان دادند که متابولیت ثانویه *سارگاسوم آنگوستیفولیوم* رشد باکتری را به روشی وابسته به دوز مهار می‌کند؛ به‌طوری‌که رشد باکتری در پایان آزمایش به‌طور کامل متوقف شد. اثر ضدباکتریایی با افزایش غلظت استخراج *سارگاسوم آنگوستیفولیوم* افزایش یافت (۳۶). همچنین محمدپور و همکاران، تأثیر عصاره ثانویه گیاه شوید کوهی بر بیان ژن پمپ افلاکس oqxA در سویه‌های بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلبسیلا پنومونیه را بررسی کردند. نتایج نشان دادند بیان ژن oqxA در سویه‌های تیمارشده با عصاره ثانویه کاهش بیان معنی‌داری داشتند (۳۷). در مطالعه قرایی و همکاران از ۱۰۰ نمونه بالینی، ۱۲ سویه استنتوباکتربومانی جداسازی شدند که به تمامی آنتی‌بیوتیک‌ها به‌جز کلیستین مقاوم بودند. نتایج PCR نشان دادند تمامی ۱۲ سویه دارای ژن تشکیل بیوفیلم Bap بودند. به‌دنبال تیمار سویه‌ها با غلظت SubMIC نانوذرات نقره، تمامی سویه‌ها دارای کاهش بیان معناداری در ژن Bap ($P < 0.05$) نسبت به ژن کنترل بودند (۳۸). Pratt و همکاران، کلروفرم و عصاره ثانویه بنزن کلرلا ولگاریس را برای توقف رشد باکتری‌های گرم مثبت (*باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس*

http://dx.doi.org/10.22108/BJM.2024.140026.1572

اپیدرمیدیس) و گرم منفی (*اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا*) استفاده کردند (۳۹, ۴۰). همان‌طور که بحث شد، نتایج مطالعه حاضر در انطباق با بسیاری دیگر از مطالعات است. در مواردی که عدم انطباق در یافته‌ها مشاهده می‌شود، علت را می‌توان به تفاوت نوع باکتری، نوع متابولیت استفاده‌شده، نوع گونه سیانوباکتر، روش بررسی و منطقه جغرافیایی مرتبط دانست.

برای نتیجه‌گیری می‌توان بیان داشت متابولیت‌های ثانویه *سیانوباکتر آنابنا* دارای تأثیر آنتی‌میکروبیال بوده‌اند و سبب کاهش بیان ژن‌های مقاومت وانکومایسین در *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* می‌شوند. با تأیید و تکمیل اطلاعات حاصل از پژوهش حاضر و شناسایی مواد مؤثر موجود در متابولیت‌های ثانویه استخراج‌شده از عصاره *سیانوباکتر آنابنا* و تفکیک و جداسازی این مواد، می‌توان به توسعه نسل جدیدی از داروهای ضداستافیلوکوک امیدوار بود.

References

(1) Kazem Sharifi Yazdi M., Soltan Dallal MM. Prevalence study of enterococus and staphylococci resistance to vancomycin isolated from urinary tract infections. *Tehran University Medical Journal*, 2013; 71(4): 250-8. http://tumj.tums.ac.ir/article-1-5268-en.html [In Persian].

(2) Rahimi, mk., falsafi, s., tayebi, z., msoumi, m., ferasat pour, mr., mirzaie, a. antimicrobial susceptibility pattern of human pathogenic bacteria isolated from patients with urinary tract infection. *New cellular & molecular biotechnology journal*, 2014; 5(15):89-83. http://ncmbjpiau.ir/article-1-558-en.html [In Persian].

(3) Shariaty, L., Shojapour, M., Validi, M., Farrokhi, E., Tabatabaiefar, MA., Karimi, A., et al. The investigation of prevalence of methicillin and vancomycin resistance in coagulase negative Staphylococci isolated from clinical samples of Shahrekord university hospitals, 2009. *Iranian South Medical Journal*, 2011; 14(3): 165-72. http://ismj.bpums.ac.ir/article-1-270-fa.html [In Persian].

(4) Izanloo, a., bahreini, m., sharifmoghadam, mr., safamanesh, s., azimian, a. evaluation of vancomycin resistance by phenotypic and genotypic methods among *s. aureus* strains isolated from patients. *Journal of north khorasan university of medical sciences*, 2016; 8(2):224-215. https://doi.org/10.18869/acadpub.jnkums.8.2.215 [In Persian].

(5) Zarrini, G., Rasooli, E., Abazari, M., Ghasemi, y. Investigation of Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Urmia Lake Catchment Area. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*, 2011; 11(4): 329-36. http://jarums.arums.ac.ir/article-1-160-en.html [In Pers ian].

(6) Saadat, S., Solhjoo, K., Norooz-Nejad, M-J., Kazemi, A. *VanA* and *vanB* positive vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* among clinical isolates in Shiraz, South of Iran. *Oman medical journal*, 2014; 29(5): 335. https://doi.org/10.5001/omj.2014.90

(7) Brakhage, A.A., Schroeckh, V. Fungal secondary metabolites-strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 2011; 48(1): 15-22. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.04.004

(8) Whitton, B.A., Potts, M. *Introduction to the cyanobacteria*. Ecology of cyanobacteria II: Springer; 2012. p. 1-13. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_1

(9) Yousefi, M., Fallah, F., Arshadi, M., Pourmand, M., Hashemi, A., Pourmand, G. Identification of tigecycline-and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among patients with urinary tract infection in Iran. *New Microbes and New Infections*, 2017; 19: 8-12. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.05.009

(10) Chaokromthong, K., Sintao, N. Sample size estimation using Yamane and Cochran and Krejcie and Morgan and green formulas and Cohen statistical power analysis by G* Power and comparisions. *Apheit International Journal*, 2021; 10(2): 76-86. https://so04.tci-thaijo.org/index.php/ATI/article/view/254253

(11) Murray, P.R., Rosenthal, K., Pfaller, M.A. Medical Microbiology: Medical Microbiology E-Book. *Elsevier Health Sciences*, 2020; 9: 426-33.
(12) Berberoğlu, H., Jay, J., Pilon, L. Effect of nutrient media on photobiological hydrogen production by Anabaena variabilis ATCC 29413. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008; 33(4): 1172-84. https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.12.036
(13) Manjunath, M., Prasanna, R., Nain, L., Dureja, P., Singh, R., Kumar, A., et al. Biocontrol potential of cyanobacterial metabolites against damping off disease caused by Pythium aphanidermatum in solanaceous vegetables. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2010; 43(7): 666-77. https://doi.org/10.1080/03235400802075815
(14) Mahdavi, S., Isazadeh, A. Lactobacillus casei suppresses hfq gene expression in *Escherichia coli* O157: H7. *British Journal of Biomedical Science*, 2019; 76(2): 92-4. https://doi.org/10.1080/09674845.2019.1567903
(15) Raz, R., Colodner, R., Kunin, C.M. Who are you-*Staphylococcus saprophyticus*? *Clinical Infectious Diseases*, 2005; 40(6): 896-8. https://doi.org/10.1086/428353
(16) Ehlers, S., Merrill, S.A. *Staphylococcus saprophyticus*. 2018.
(17) Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., et al. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005; 102(37): 13272-https://doi.org/10.1073/pnas.0502950102
(18) Solway, D.R., Consalter, M., Levinson, D.J. Microbial cellulose wound dressing in the treatment of skin tears in the frail elderly. *Wounds*, 2010; 22(1): 17. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25901459/
(19) Lawal, O.U., Barata, M., Fraqueza, M.J., Worning, P., Bartels, M.D., Goncalves, L., et al. *Staphylococcus saprophyticus* from clinical and environmental origins have distinct biofilm composition. *Frontiers in Microbiology*, 2021; 12: 1255. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663768
(20) Périchon, B., Courvalin, P. *VanA*-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009; 53(11): 4580-7. https://doi.org/10.1128/AAC.00346-09
(21) Martins, R.F., Ramos, M.F., Herfindal, L., Sousa, J.A., Skaerven, K., Vasconcelos, V.M. Antimicrobial and cytotoxic assessment of marine cyanobacteria - Synechocystis and Synechococcus. *Mar Drugs*, 2008; 6(1): 1-11. https://doi.org/10.3390/md6010001
(22) Tahmasebi, H., Dehbashi, S., Arabestani, M.R. Determination of antimicrobial resistance pattern in methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus* and Staphylococcus epidermidis and detection of resistance genes to clindamycin and erythromycin. *Iranian Journal of Medical Microbiology*. 2018; 12(3): 169-78. https://doi.org/10.30699/ijmm.12.3.169 [In Persia n].
(23) Arabestani, M.R., Alikhani, M.Y., Karami, M., Ghale, E. Prevalence of coagulase-negative staphylococci and determination of antimicrobial resistance in accompany with types of SCCmec in isolated of nosocomial infections. *Tehran University Medical Journal*, 2016; 73(12): 888-94. http://tumj.tums.ac.ir/article-1-7254-en.html [In Persian].
(24) Abdoli Oskouie, S., Ahangarzadeh Rezaee, M., Ajhangh, A., Abdinia, B. Antimicrobial Resistance Pattern and Minimum Inhibitory Concentration of Vancomycin among *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Clinical Specimens of Children in Tabriz. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*, 2013; 13(1): 24-34. http://jarums.arums.ac.ir/article-1-124-en.html [In Persian].
(25) Henwood, C., Livermore, D., Johnson, A., James, D., Warner, M., Gardiner, A., et al. Susceptibility of Gram-positive cocci from 25 UK hospitals to antimicrobial agents including linezolid. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2000; 46(6): 931-40. https://doi.org/10.1093/jac/46.6.931

(26) Sanches, I.S., Mato, R., De Lencastre, H., Tomasz, A., Collaborators, C.N., Collaborators, I. Patterns of multidrug resistance among methicillin-resistant hospital isolates of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci collected in the international multicenter study RESIST in 1997 and 1998. *Microbial Drug Resistance*, 2000; 6(3): 199-211. https://doi.org/10.1089/mdr.2000.6.199

(27) Luh, K.T., Hsueh, P.R., Teng, L.J., Pan, H.J., Chen, Y.C., Lu, J.J., et al. Quinupristin-dalfopristin resistance among gram-positive bacteria in Taiwan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2000; 44(12): 3374-80. https://doi.org/10.1128/AAC.44.12.3374-3380.2000

(28) De Neeling, A., Van Leeuwen, W., Schouls, L., Schot, C., van Veen-Rutgers, A., Beunders, A., et al. Resistance of staphylococci in The Netherlands: surveillance by an electronic network during 1989-1995. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 1998; 41(1): 93-101 https doi.org/10.1093/jac/41.1.93

(29) Felmingham, D., Brown, D., Soussy, C., Group EGRSS. European Glycopeptide Susceptibility Survey of gram-positive bacteria for 1995. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 1998; 31(4): 563-71. https://doi.org/10.1016/S0732-8893(98)00053-4

(30) Herwaldt, L., Boyken, L., Pfaller, M. In vitro selection of resistance to vancomycin in bloodstream isolates of *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus epidermidis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1991; 10(12): 1007-12. https://doi.org/10.1007/BF01984921

(31) Goldstein, F., Coutrot, A., Sieffer, A., Acar, J. Percentages and distributions of teicoplanin-and vancomycin-resistant strains among coagulase-negative staphylococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1990; 34(5): 899-900. https://doi.org/10.1128/AAC.34.5.899

(32) Froggatt, J., Johnston, J., Galetto, D., Archer, G. Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of Staphylococcus haemolyticus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1989; 33(4): 460-6. https://doi.org/10.1128/AAC.33.4.460

(33) El-Sheekh, M.M., Dawah, A.M., Abd El-Rahman, A.M., El-Adel, H.M., Abd El-Hay, R.A. Antimicrobial activity of the cyanobacteria *Anabaena* wisconsinense and Oscillatoria curviceps against pathogens of fish in aquaculture. *Annals of Microbiology*, 2008; 58(3): 527. https://doi.org/10.1007/BF03175553

(34) Chauhan, A., Chauhan, G., Gupta, P.C., Goyal, P., Kaushik, P. In vitro antibacterial evaluation of Anabaena sp. against several clinically significant microflora and HPTLC analysis of its active crude extracts. *Indian J Pharmacol*, 2010; 42(2): 105-7. https://doi.org/10.4103/0253-7613.64490

(35) Kannappan, A., Gowrishankar, S., Srinivasan, R., Pandian, S.K., Ravi, A.V. Antibiofilm activity of Vetiveria zizanioides root extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis*, 2017; 110: 313-24. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.016

(36) Mohkami, A., Habibi-Pirkoohi, M. Inhibitory Effect of the Brown Seaweed Sargassum angustifolium Extraction on Growth and Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Phycological Research*, 2019; 3(2): 421-31. https://doi.org/10.29252/JPR.3.1.301 [In Persian].

(37) Mohammadpour Bishak, F., Ashrafi, F., Moradi Bidhendi, S., Mirzaie, A., Noorbazargan, H. The impact of Grammosciadium platycarpum Boiss. & Hausskn. extract on oqxA efflux pump gene expression in antibiotic resistant clinical isolates of Klebsiella pneumoniae using real

time PCR. *Journal of Medicinal Plants*, 2020; 19(75): 291-304. https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.291 [In Persian].

(38) Piri Gharaghie, T., Sadat Shandiz, S.A., Beiranvand, S. Evaluation of silver nanoparticles effects on bla-per1 gene expression for biofilm formation in isolates of antibiotic-resistant *Acientobacter Bumanni* by real time PCR method. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 2022; 35(2): 349-66. https://cell.ijbio.ir/article_1924.html [In Persian].

(39) Pratt, R., Daniels, T., Eiler, J.J., Gunnison, J., Kumler, W., Oneto, J.F., et al. Chlorellin, an antibacterial substance from Chlorella. *Science*, 1944; 99(2574): 351-2 https://doi.org/10.1126/science.99.2574.351

(40) Falaise, C., François, C., Travers, M.A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., et al. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine drugs*, 2016; 14(9): 159. https://doi.org/10.3390/md14090159