

Ispitivanje uticaja triklosana, hlorheksidin glukonata i benzalkonijum hlorida na formiranje antibiotske rezistentnosti kod bakterija *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus epidermidis*

Ispitivano je da li prekomerna upotreba biocida iz kozmetičkih proizvoda može dovesti do širenja antibiotski rezistentnih bakterijskih sojeva na ljudskoj koži. Wild type kulture *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus epidermidis* izolovane su iz uzorka brisa kože. Sojevi *P. aeruginosa* i *S. epidermidis* rezistentni na biocide triklosan, hlorheksidin glukonat i benzalkonijum hlorid izolovani su iz wild type kultura metodom Gradient Agar Plate. Određivan je udeo biocid rezistentnih bakterija u ispitivanim uzorcima wild type kultura. Najveći udeo u ovim uzorcima ima *P. aeruginosa* rezistentna na triklosan, a najmanji *S. epidermidis* rezistentna na triklosan. Antibioigram testom poređena je antibiotska osetljivost sojeva *P. aeruginosa* i *S. epidermidis* koji su rezistentni na biocide triklosan, hlorheksidin glukonat i benzalkonijum hlorid, i sojeva *P. aeruginosa* i *S. epidermidis* koji su osetljivi na date biocide. Biocid rezistentni sojevi *P. aeruginosa* rezistentni su i na aminoglikozidne antibiotike (amikacin, streptomycin, gentamicin), a osetljivi na antibiotike iz grupe hinolona i tetraciklina. Biocid rezistentni sojevi *S. epidermidis* rezistentni su i na antibiotike eritromicin, vankomicin i gentamicin, a osetljivi na antibiotike iz grupe aminokumarina, hinolona, tetraciklina, hloramfenikola i linkosamida.

Uvod

Triklosan, benzalkonijum hlorid i hlorheksidin glukonat su biocidi koji se koriste kao sredstva za dezinfekciju ili konzerviranje. Nalaze se u mnogim

kozmetičkim proizvodima i često dolaze u kontakt sa ljudskom kožom. Ovi biocidi ubijaju bakterije na sličan način kao i neki antibiotici. Biocidi se od antibiotika razlikuju jedino po tome što bakterijsku ćeliju ubijaju ne putem jednog, već putem više različitih mehanizama (Russell 2002). Zbog njihove prekomerne upotrebe došlo je do širenja bakterijskih sojeva koji su rezistentni na biocide. Najviše slučajeva rezistentnosti uočeno je kod sojeva koji nastanjuju ljudsku kožu, kao što su *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus epidermidis*. U tim sojevima došlo je do razvijanja više rezistencijalnih mehanizama, jer biocid napada bakterijske ćelije na više različitih načina (Beumer 2000). Možemo pretpostaviti da je neki od tih mehanizama identičan mehanizmu odbrane i od pojedinih antibiotika. Potvrđan odgovor bi značio da je bakterija rezistentna na biocid ujedno neosetljiva i na antibiotik, odnosno da dolazi do pojave korezistentnosti. Proizilazi da prekomerna upotreba biocida doprinosi širenju ne samo biocidne, već i antibiotske rezistentnosti.

Da bismo ispitali ovu pretpostavku sproveli smo ovo istraživanje u kome:

- Izolavani su sojevi *P. aeruginosa* i *S. epidermidis* rezistentni na biocide triklosan, benzalkonijum hlorid i hlorheksidin glukonat
- Određivan je udeo biocid rezistentnih bakterija u izolovanoj bakterijskoj populaciji
- Upoređene su osetljivosti biocid senzitivnih i biocid rezistentnih sojeva *P. aeruginosa* i *S. epidermidis* na antibiotike iz grupe aminoglikozida, glikopeptida, linkosamida, makrolida, hinolona, tetraciklina, hloramfenikola i aminokumarina.

Iva Atanasković (1993), Beograd, Kneza Miloša 64, učenica 2. razreda gimnazije „Sveti Sava” u Beogradu

MENTOR: Jelena Savić, dipl. biolog

Materijal i metode

Izolacija bakterijskih sojeva

Bakterijski sojevi su izolovani iz uzorka brisa masne kože lica i leđa. Uzorak je prvo inkubiran preko noći u LB podlozi (kazein hidrolizat – 1%; ekstrakt kvasca – 0.5%; NaCl – 0.5% i 1000 mL destilovane vode) na temperaturi od $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Za izolaciju *Pseudomonas aeruginosa* korišćena je selektivna podloga Pseudomonas Agar Base (pepton – 1.6%; kazein hidrolizat – 1%; K_2SO_4 – 1%, MgCl_2 – 0.14%; agar – 1.1% u 1000 mL destilovane vode) sa dodatkom Pseudomonas C-N (SR0102) suplementa (Oxoid). Za izolaciju *Staphylococcus epidermidis* korišćena je selektivna podloga Baird Parker Agar Base (tripton – 1%; Lab-Lemko puder – 0.5%; ekstrakt kvasca – 0.1%; $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$ – 1%; glicin – 1.2%; LiCl – 0.5%; agar – 2% u 1000 mL destilovane vode; Oxoid) sa dodatkom teluritne emulzije žumanceta (sterilno žumance – 20%; NaCl – 0.425%; kalijum-telurit – 0.21% u 1000 mL destilovane vode; Knežević i Simić 1997). Izolovane kulture bojene su po Gramu, posmatrane pod mikroskopom i testirane na prisustvo katalaze (Knežević i Simić 1997). Na izolovanoj kulturi *Staphylococcus* sp. je potom izvršen koagulaza test u kome je korišćena diferencijalna podloga Blood Agar Base (Lab-Lemko puder – 1%; pepton – 1%; NaCl – 0.5%; agar – 1.5% u 1000 mL destilovane vode; Oxoid) sa dodatkom defibrilisane sterilne krvi (Knežević i Simić 1997).

Izolacija sojeva rezistentnih na triklosan, hlorheksidin glukonat i benzalkonijum hlorid

Iz wild type kultura *S. epidermidis* i *P. aeruginosa* izolovani su sojevi rezistentni na biocide primenom Gradient Agar Plate metode (Knežević i Simić 1997). Prilikom izolacije rezistentnih sojeva korišćena je NA podloga (ekstrakt kvasca – 0.3%; pepton 0.5%; agar – 1.5 % u 1000 mL destilovane vode; Knežević i Simić 1997) u koju je dodavan biocid u koncentraciji 10 mg/mL. Gradijent koncentracije biocida u podlozi kretao se od 0 do 50 $\mu\text{g/mL}$. Formirane su po četiri ekseperimentalne grupe za svaku ispitivanu bakteriju. Prva grupa bila je na gradijentnoj podlozi sa dodatkom triklosana, druga sa dodatkom hlorheksidin glukonata, treća na podlozi sa dodatkom benzalkonijum hlorida, dok je

četvrta grupa bila kontrolna i u njenu podlogu nije dodavan biocid. U podloge je dodat 1.5% rastvor MMS-a, gde je 0.1 mL rastvora utrljano u svaku podlogu pre zasejavanja (Horn i Ohman 1988). Nakon inkubacionog perioda od 24 h bakterijske kolonije razvijene pri najvišoj koncentraciji biocida presejane su u LB podlogu. Izolovani rezistentni sojevi prečišćeni su metodom iscrpljivanja (Knežević i Simić 1997). Provera rezistentnosti izolovanih sojeva vršena je tretmanom rastvorom biocida koncentracije 10 mg/mL i inkubacijom u LB medijumu. Ukupan broj bakterija u wild type kulturama određen je metodom decimalnih razblaženja i primenom CFU formule (Knežević i Simić 1997). Broj biocid rezistentnih bakterija u populaciji određen je brojanjem kolonija razvijenih na gradijentnim podlogama, na osnovu čega je izračunat njihov udeo u populaciji.

Ispitivanje korezistentnosti

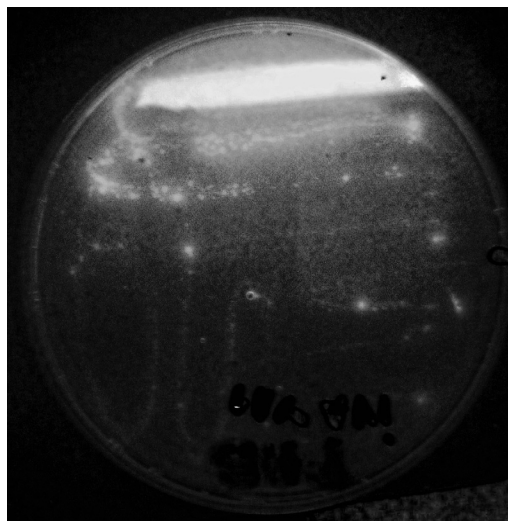
Utvrđivanje bakterijske osetljivosti na testirane antibiotike vršeno je antibiogram testom (Knežević i Simić 1997). Testirana je osetljivost biocid rezistentnih sojeva *P. aeruginosa* na amikacin (30 mcg), ciprofloksacin (5 mcg), gentamicin (10 mcg), neomicin (30 mcg), doksiciklin (30 mcg), streptomycin (10 mcg), kao i senzitivnost biocid rezistentnih sojeva *S. epidermidis* na ciprofloksacin (5 mcg), gentamicin (10 mcg), streptomycin (10 mcg), eritromicin (15 mcg), vankomicin (30 mcg), doksiciklin (30 mcg), klindamicin (2 mcg), hloramfenikol (30 mcg), novobiocin (5 mcg). Testirana je i antibiotska senzitivnost kontrolnih sojeva, koji nisu rezistentni na ispitivane biocide. Potom je izvršeno poređenje antibiotske senzitivnosti biocid rezistentnih i kontrolnih sojeva.

Rezultati i diskusija

Izolacija bakterijskih sojeva

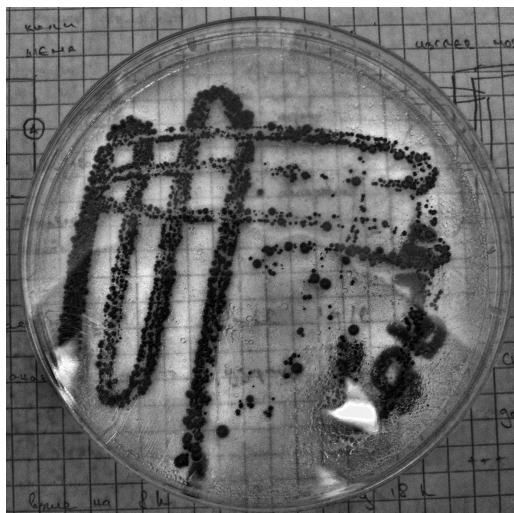
Nakon 24 h inkubacije na selektivnoj podlozi Pseudomonas Agar Base razvile su se okrugle, zeleno-žute kolonije koje fluoresciraju pod UV svetlošću (slika 1). Pod mikroskopom su nakon bojenja po Gramu uočeni gramnegativni bacili (slika 2). Izolovana kultura je katalaza pozitivna i na osnovu ovih karakteristika determinisana kao *Pseudomonas aeruginosa*.

Na Baird Parker agru razvile su se okrugle, ispučene, crne kolonije (slika 3) sačinjene od grampozi-



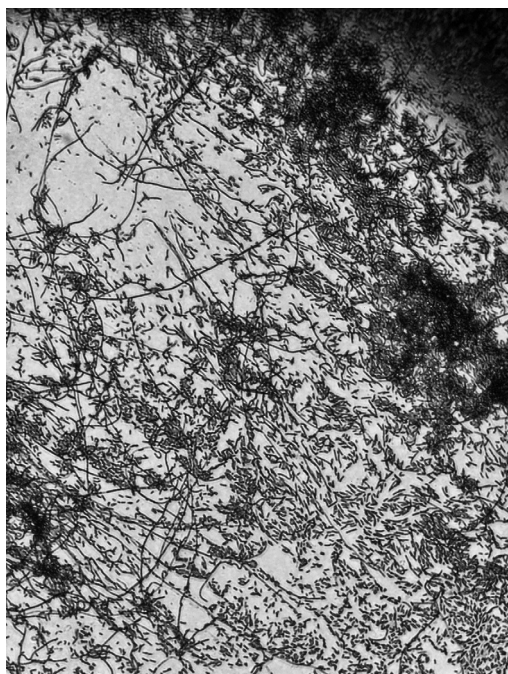
Slika 1. *P. aeruginosa* pod UV svetlošću

Figure 1. *P. aeruginosa* under UV light



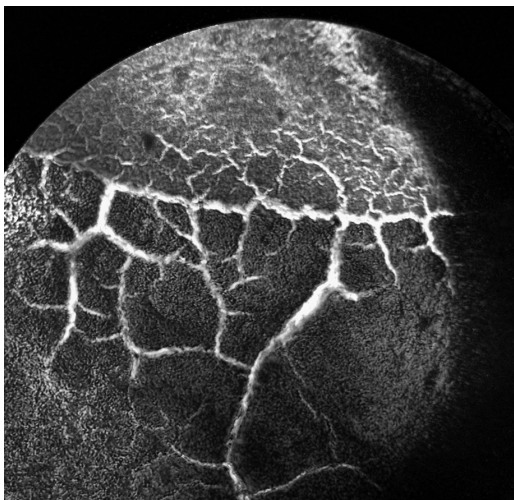
Slika 3. *S. epidermidis* na Baird Parker podlozi

Figure 3. *S. epidermidis* on Baird Parker medium



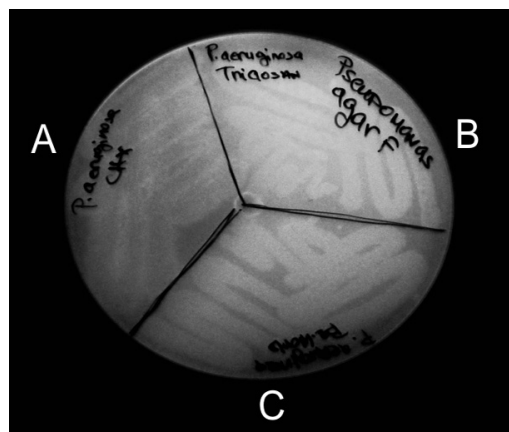
Slika 2. *P. aeruginosa* pod mikroskopom

Figure 2. *P. aeruginosa* under microscope



Slika 4. *S. epidermidis* pod mikroskopom

Figure 4. *S. epidermidis* under microscope



Slika 5. Biocid rezistentni sojevi *P. aeruginosa* pod UV svetlošću (A – glukonat, B – triklosan, C – benzalkonijum hlorid); soj rezistentan na hlorheksidin glukonat fluorescira drugačijom bojom (ovde izraženo tamnijom nijansom).

Figure 5. Chlorhexidine gluconate (A), triclosan (B) and benzalkonium chloride (C) resistant *P. aeruginosa* under UV light; strain resistant on chlorhexidine gluconate is fluorescing with a different color (seen as a darker shade).

tivnih koka (slika 4). Izolovana kultura je katalaza pozitivna, koagulaza negativna i na osnovu ovih karakteristika determinisana kao *Staphylococcus epidermidis*.

Izolacija sojeva rezistentnih na triklosan, hlorheksidin glukonat i benzalkonijum hlorid

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1 najveći broj bakterija rezistentnih na biocid triklosan nalazi se u okviru wild type soja *P. aeruginosa*. Ovaj soj je formirao bakterijski tepih na podlozi sa dodatkom triklosana. Kultura koja je najosteljivija na triklosan je *S. epidermidis* i soj *S. epidermidis* rezistentan na triklosan nije izolovan. *S. epidermidis* je grampozitivna, a *P. aeruginosa* gramnegativna bakterija, te možemo pretpostaviti da je rezistentnost na triklosan povezana sa građom ćelijskog zida bakterije i da se lakše razvija kod gramnegativnih bakterija. Takođe možemo uočiti da *P. aeruginosa* lakše razvija rezistentnost i na druga dva testirana biocida. Pretpostavljamo da je uzrok i ove pojave različita građa ćelijskog zida ovih sojeva. Veća osetljivost na hlorheksidin i na benzalkonijum hlorid kod grampozitivnih nego kod gramnegativnih bakterija uočena je i u drugim istraživanjima (Koljag *et al.* 2002).

Zapaženo je i da bakterijski soj *P. aeruginosa* rezistentan na hlorheksidin fluorescira drugačije od sojeva rezistentnih na triklosan i benzalkonijum hlorid (slika 5). Pretpostavljamo da postoji veza između gena zaduženih za sintezu fluorescirajućih pigmenta i gena biocidne rezistentnosti u hromozomu bakterije *P. aeruginosa*. Verovatno je drugačije fluorescirajuća struktura u vanćelijskom matriksu bakterije ujedno i činilac njenih mehanizama rezistentnosti na hlorheksidin.

Tabela 1. Udeo bakterija rezistentnih na najviše koncentracije biocida u uzorku

Bakterijski soj	Broj razvijenih kolonija	Udeo rezistentnih bakterija u ukupnom uzorku
<i>P. aeruginosa</i> rezistentna na benzalkonijum hlorid	5	5.0×10^{-8}
<i>P. aeruginosa</i> rezistentna na triklosan	razvio se bakterijski tepih	
<i>P. aeruginosa</i> rezistentna na hlorheksidin	14	1.40×10^{-7}
<i>S. epidermidis</i> rezistentna na benzalkonijum hlorid	3	3.0×10^{-8}
<i>S. epidermidis</i> rezistentna na triklosan	0	0
<i>S. epidermidis</i> rezistentna na hlorheksidin	12	1.20×10^{-7}

Tabela 2. Antibiotiska osetljivost sojeva *P. aeruginosa* rezistentnih i osetljivih na biocide. Osetljivost na antibiotike izražena je kao prečnik zone inhibicije (mm)

Soj	Antibiotik				
	Ciprofloksacin	Amikacin	Neomicin	Gentamicin	Doksiciklin
<i>P. aeruginosa</i> nerezistentan soj	25.0	23.5	18.5	21.5	15.0
<i>P. aeruginosa</i> rezistentna na triklosan	23.5	rezistentna	19.0	rezistentna	13.0
<i>P. aeruginosa</i> rezistentna na hlorheksidin	13.0	rezistentna	20	rezistentna	25.5
<i>P. aeruginosa</i> rezistentna na benzalkonijum hlorid	22.5	19.5	16.5	rezistentna	16.5

Ispitivanje korezistentnosti

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 2, bakterija *P. aeruginosa* koja je rezistentna na biocide rezistentna je i na ispitivane antibiotike iz grupe aminoglikozida (amikacin, gentamicin, streptomycin). Iako u ovom istraživanju nije utvrđivano kako dolazi do razvijanja korezistentnosti, odnosno koji su se odbrambeni mehanizmi u bakterijskoj ćeliji razvili, možemo napraviti nekoliko pretpostavki:

- Izolovan je soj *P. aeruginosa* neosetljiv na triklosan, gde je u rezistentnoj bakterijskoj ćeliji detektovano prisustvo više različitih efluks sistema (Schweizer 1998). To su proteinski sistemi koji aktivnim transportom izbacuju toksične materije van ćelije. Jedan od efluksa pronađenih u ovom rezistentnom soju bio je i MexXY-OprM sistem. Ovaj efluks kao supstrat može koristiti i antibiotike iz grupe aminoglikozida (Lambert 2002). Zato pretpostavljamo da je izolovani soj rezistentan na triklosan i na aminoglikozidne antibiotike upravo zbog prisustva MexXY-OprM efluks sistema.

- Kod sojeva *P. aeruginosa* rezistentnih na aminoglikozide uočena je i smanjena propustljivost ćelijske membrane kao i prisustvo sloja molekula alginata u vanćelijskoj sredini (Nichols *et al.* 1988). Dokazano je da alginat vezuje molekule aminoglikozida i sprečava njihovu interakciju sa ćelijskom membranom. S obzirom da hlorheksidin i benzalkonijum hlorid lizom citoplazmine membrane izazivaju smrt ćelije i da svoje baktericidno dejstvo ne mogu ostvariti bez interakcije sa membranom, možemo pretpostaviti da je do razvijanja korezistentnosti moglo doći formiranjem alginatnog sloja.

Pojava korezistentnosti *P. aeruginosa* na biocid i neomicin nije uočena, dok je na sve ostale aminoglikozide rezistentnost razvijena. Zaključujemo da su razvijeni mehanizmi biocidne rezistentnosti različiti za neomicin nego za ostale aminoglikozide.

Od svih ispitivanih aminoglikozida jedino je gentamicin antibiotik na koji je razvijena korezistentnost kod sva tri biocid rezistentna soja *P. aeruginosa*. Možemo zaključiti da su rezistencioni mehanizmi za sva tri ispitivana biocida ujedno efikasni i protiv ovog antibiotika.

Soj *P. aeruginosa* rezistentan na triklosan otporan je na sva tri ispitivana aminoglikozida (amikacin, gentamicin, streptomycin). Soj otporan na hlorheksidin osetljiv je na streptomycin. Soj otporan na benzalkonijum hlorid osetljiv je na streptomycin i amikacin. Iako su sva tri antibiotika aminoglikozidi, sa istim antibakterijskim mehanizmima, ne ispoljavaju istu aktivnost kod sojeva otpornih na različite biocide. Ova činjenica ukazuje da su razvijeni mehanizmi različito efikasni protiv antibiotika iz iste grupe.

Soj *P. aeruginosa* rezistentan na hlorheksidin rezistentniji je na ciprofloksacin u odnosu na kontrolni soj. Moguće objašnjenje ove pojave je da ciprofloksacin i hlorheksidin imaju antagonističko dejstvo. Potpuna rezistentnost na ciprofloksacin mogla bi se ostvariti pri manjim koncentracijama antibiotika. Još jedan mogući uzrok ove pojave jeste jednolinijsko nasleđivanje gena rezistentnosti u izolovanoj kulturi. Ovaj tip nasleđivanja uočen je kod mnogih pripadnika roda *Pseudomonas*. Ovakavim vidom nasleđivanja dati gen se gubi u delu potomstva i uzgojena kultura ispoljava samo delimičnu rezistentnost na ispitivani antibiotik (Jemcev i Đukić 2000). Ovaj soj

Tabela 3. Poređenje antibiotske osetljivosti sojeva *S. epidermidis* rezistentnih i osetljivih na biocide. Osetljivost na antibiotike izražena je kao prečnik zone inhibicije (mm)

Soj	Antibiotik								
	Ciprof- loksacin	Genta- micin	Strepto- micin	Eritro- micin	Vanko- micin	Doksi- ciklin	Klinda- micin	Hloram- fenikol	Novo- biocin
<i>S. epidermidis</i> nerezistentan soj	23.5	20.5	23	23.5	11	22	19	21	16.5
<i>S. epidermidis</i> rezistentna na hlorheksidin	22.5	rez.	28	rez.	rez.	25	13.5	22	19
<i>S. epidermidis</i> rezistentna na benzalkonijum hlorid	19.5	rez.	12	rez.	rez.	23	17	24.5	16.5

pokazao je i povećanu osetljivost na doksiciklin, pa pretpostavljamo da hlorheksidin glukonat i doksiciklin imaju sinergističko dejstvo.

Sojevi *P. aeruginosa* rezistentni na biocide osetljivi su na hinolone i tetracikline kao i kontrolni soj. Ovi antibiotici bi mogli koristiti u suzbijanju biocid rezistentnih sojeva *P. aeruginosa*.

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 3, soj *S. epidermidis* rezistentan na benzalkonijum hlorid i soj ove bakterije rezistentan na hlorheksidin rezistentni su i na antibiotike vankomicin, gentamicin i eritromicin. Ova tri antibiotika pripadaju različitim grupama i imaju različite mehanizme delovanja. Možemo zaključiti da se u izolovanim sojevima razvilo više rezistencionih mehanizama, ili da se razvio samo jedan mehanizam pomoću kojeg se ćelija mogla odbraniti od sva tri antibiotika.

U drugim radovima izolovani su sojevi *S. epidermidis* rezistentni na vankomicin. Kod ovih sojeva kao rezistencioni mehanizam uočeno je stvaranje posebnog vanćelijskog omotača. Različite proteinske strukture ovog omotača sprečavale su kontakt antibiotika i membrane bakterije (Chang *et al.* 2003). Sličan mehanizam odbrane mogao se razviti i protiv hlorheksidina i benzalkonijum hlorida, jer su i oni, kao vankomicin, membranski aktivni.

Oba biocid rezistentna soja *S. epidermidis* ispoljavaju neosetljivost na iste antibiotike. To znači da *S. epidermidis* ima isti ili sličan mehanizam rezistentnosti za benzalkonijum hlorid i za hlorheksidin. Ta pretpostavka opravdana je i sličnim načinom delovanja ova dva biocida (Russell i Path 1986; Singh *et al.* 2008).

Soj *S. epidermidis* rezistentan na benzalkonijum hlorid pokazao je veću otpornost na streptomycin nego kontrolni soj. Možemo pretpostaviti da je posledica ove pojave antagonističko dejstvo streptomicina i benzalkonijum hlorida, i da bi se potpuna rezistentnost ostvarila pri manjim koncentracijama streptomicina.

Sojevi *S. epidermidis* rezistentni na biocide pokazali su istu osetljivost na aminokumarine, hinolone, tetracikline, hloramfenikole i linkosamide kao i kontrolni soj, te bi se ovi antibiotici mogli koristiti u suzbijanju biocid rezistentnih sojeva *S. epidermidis*.

Zaključak

Poređenjem antibiotske osetljivosti biocid rezistentnih i biocid osetljivih sojeva *P. aeruginosa* uočena je pojava korezistentnosti na gentamicin, amikacin i streptomycin. Pretpostavljamo da bi prekomerna upotreba ispitivanih biocida mogla dovesti do širenja sojeva *P. aeruginosa* koji su rezistentni na ove antibiotike. Biocid rezistentni sojevi *P. aeruginosa* osetljivi su na antibiotike iz grupe hinolona i tetraciklina. Ovi antibiotici bi se mogli koristiti za suzbijanje biocid rezistentnih sojeva *P. aeruginosa*.

Na isti način kod soja *S. epidermidis* uočena je pojava korezistentnosti na gentamicin, eritromicin i vankomicin. Pretpostavljamo da prekomerna upotreba ispitivanih biocida može dovesti do širenja sojeva *S. epidermidis* koji su rezistentni na ove antibiotike. Biocid rezistentni sojevi *S. epidermidis* osetljivi su na antibiotike iz grupe aminokumarina, hinolona,

tetraciklina, hloramfenikola i linkosamida. Ovi antibiotici bi se mogli koristiti u suzbijanju biocid rezistentnih sojeva *P. aeruginosa*.

Da bi problem antibiotsko-biocidne korezistentnosti bio što efikasnije kontrolisan potrebno je ispitati mehanizme putem kojih se ovaj oblik korezistentnosti ostvaruje. Moguće teme tih istraživanja su MexXY-OprM efluks sistemi i alginatni vančelijski omotači kao potencijalni mehanizmi korezistentnosti kod *P. aeruginosa*. U daljim ispitivanjima moglo bi se utvrditi i zašto je gentamicin aminoglikozid na koji su svi biocid rezistentni sojevi *P. aeruginosa* neosetljiv, kao i zašto isti ti sojevi ne ispoljavaju rezistentnost na još jedan testirani aminoglikozid – neomicin. Soj *P. aeruginosa* rezistentan na hlorheksidin fluoreskira drugačije od ostalih izolovanih sojeva. Objašnjavanje ove pojave moglo bi doprineti razumevanju rezistencijonih mehanizama na hlorheksidin kod *P. aeruginosa*. Imajući u vidu da je biocid rezistentan soj *S. epidermidis* ujedno neosetljiv na antibiotike sa različitim mehanizmima delovanja, možemo zaključiti da je u izolovanim sojevima razvijeno više rezistencijonih mehanizama. Ispitivanje ovih mehanizama otvara vrata uspešnoj kontroli i suzbijanju biocid rezistentnih sojeva *S. epidermidis*.

Zahvalnost. Zahvaljujem se rukovodiocu seminara biologije Vladimiru Jovanoviću na pomoći pri izolaciji rezistentnih bakterijskih sojeva. Zahvaljujem se i mentorki Jeleni Savić i Marjanu Biočaninu, na svim savetima i pomoći bez koje ovaj projekat ne bi bio realizovan. Zahvaljujemo se preduzećima Esensa d.o.o. i Zavon d.o.o. na doniranim uzorcima biocida.

Literatura

Beumer R. 2000. Microbial resistance and biocides. A review by the International Scientific Forum on Home Hygiene (IFH). Laboratory of Food Microbiology, The Netherlands

Chang S., Sievert D., Hageman J., Boulton M., Tenover F., Downes F., Shah S., Rudrik J., Pupp G., Brown W., Cardo D., Fridkin S. 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *NEJM*, **348**: 1342.

Horn J., Ohman D. 1988. Autogenous regulation and kinetics of induction of *Pseudomonas aeruginosa* recA transcription as analyzed with

operon fusions. *Journal of Bacteriology*, **170** (10): 4699.

Jemcević V., Đukić D. 2000. *Mikrobiologija*. Beograd: Vojna knjiga

Knežević V. J., Simić D. 1997. *Metode u mikrobiologiji – prvi deo*. Beograd: Biološki fakultet

Koljag S., Naaber P., Mikelsaar M. 2002. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. *The Journal of Hospital Infections*, **51** (2): 106.

Lambert P. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of The Royal Society of Medicine*, **95** (41): 22.

Nichols W. W., Dorrington S. M., Slack M. P., Walmsley H. L. 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial Agents in Chemotherapy*, **32** (4): 518.

Oxoid-Dehydrated Culture Media, *Pseudomonas* Agar Base:
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0559&c=UK&lang=EN

Oxoid-Dehydrated Culture Media, Baird Parker Agar Base:
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0275&org=153&c=UK&lang=EN

Oxoid-Dehydrated Culture Media, Blood Agar Base:
http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0271&org=153&c=UK&lang=EN

Russell U. D. 2002. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **46** (4): 597.

Russell A. D., Path R. C. 1986. Chlorhexidine: Antibacterial action and bacterial resistance. *Infection*, **14** (5): 212.

Schweizer H. P. 1998. Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41** (2): 394.

Singh P., Arya N., Tiwari P., Suman A., Rai R. K., Shrivastva A. K., Solomon S. 2008. Use of glutaraldehyde and benzalkonium chloride for minimizing post-harvest physio-chemical and microbial changes responsible for sucrose losses in sugar cane. *Agriculture of Food Chemistry*, **56** (16): 7176.

Effect of Triclosan, Bensalconium Chloride and Chlorhexidine Gluconate on Development of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*

The antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* strains resistant to cosmetic biocides triclosan, chlorhexidine gluconate and bensalconium chloride and isolates sensitive to these biocides was compared. The aim was to determine if excessive use of these cosmetic biocides can affect the expansion of antibiotic resistant strains on human skin. Tested strains were isolated from human skin and isolation of biocide

resistant strains was performed by Gradient Agar Plate method. The antibiotic susceptibility of isolated strains was determined by the antibiogram method. It was concluded that the excessive use of tested biocides can induce expansion of *P. aeruginosa* strains resistant to aminoglycosides (amikacin, gentamicin, streptomycin). These biocide resistant strains remained susceptible to quinolones and tetracyclines. These antibiotics can be used for the repression of *P. aeruginosa* biocide resistant strains. It was also concluded that the excessive use of the tested biocides can induce expansion of *S. epidermidis* strains resistant to erythromycin, vankomicyn and streptomycin. These biocide resistant strains remained susceptible to aminocumarines, quinolones, tetracyclines, chloramphenicoles and linkosamides. These antibiotics can be used for the repression of biocide resistant *S. epidermidis* strains.

