

## ИЗМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ФИТНЕСА В ХОДЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АДАПТАЦИИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* К КОЛИСТИНУ

Н. А. Маянский, Е. А. Бржозовская <sup>✉</sup>, Г. А. Скворцов-Игралов, С. В. Чаусова, И. В. Чеботарь

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова

Опportunистический патоген *Pseudomonas aeruginosa* занимает одно из ведущих мест в структуре возбудителей нозокомиальных инфекций, что связано с высоким адаптивным потенциалом и способностью быстро формировать устойчивость к антимикробным препаратам. Целью работы было оценить влияние адаптации *P. aeruginosa* к колистину на бактериальный фитнес. В исследование включили 9 изолятов, полученных в ходе экспериментальной эволюции штамма *P. aeruginosa* (лабораторный номер 1202) в условиях возрастающей концентрации колистина, кинетику роста которых сравнивали с родительским штаммом; у всех изолятов провели полногеномное секвенирование и определили минимальную подавляющую концентрацию колистина. Темпы роста оценивали при помощи многофункционального ридера Varioskan LUX (Thermo Scientific, США) в течение 18 ч при 37 °С, каждые 15 мин измеряя оптическую плотность (ОП) при  $\lambda = 600$  нм. Учитывали максимальную скорость роста ( $CP_{max}$ , т. е. максимальное изменение ОП в течение 1 ч) и время, необходимое для достижения 50% от максимальной ОП, зарегистрированной при росте родительского штамма *Pa\_1202\_0* ( $T_{OP50\%}$ ). Изоляты клона с мутациями в генах *phoQ*, *lptA* и *prs* отличались низкими показателями фитнеса от родительских штаммов. Например,  $CP_{max}$  изолята *Pa\_1202\_43* составила 0,029 ОП/ч против 0,182 ОП/ч у исходного изолята *Pa\_1202\_0*, а  $OP_{50\%}$  он достигал на 4,6 ч позже. Роствые характеристики клона с мутациями в *lpxL* и *lptB*, а также клона, несущего мутированный *pmrB*, в целом были сопоставимы с показателями родительского штамма. Таким образом, модификации генома, наблюдавшиеся в ходе адаптации *P. aeruginosa* к колистину, оказывают неоднозначное влияние на бактериальный фитнес.

**Ключевые слова:** синегнойная палочка, нозокомиальные инфекции, бактериальный фитнес, колистин, гены резистентности

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00235).

**Вклад авторов:** Н. А. Маянский — концептуализация, анализ данных, редактирование рукописи; Е. А. Бржозовская — методология, подготовка и написание рукописи; Г. А. Скворцов-Игралов — формальный анализ экспериментальных данных; С. В. Чаусова — валидация данных; И. В. Чеботарь — методология, концептуализация, валидация данных.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Анатольевна Бржозовская  
Ленинский проспект, д. 117/1, г. Москва, 119571; emmbf@yandex.ru

**Статья получена:** 22.08.2024 **Статья принята к печати:** 29.09.2024 **Опубликована онлайн:** 19.10.2024

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.042

## CHANGES IN BACTERIAL FITNESS DURING THE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EXPERIMENTAL ADAPTATION TO COLISTIN

Mayanskiy NA, Brzhovskaya EA <sup>✉</sup>, Skvortsov-Igralov GA, Chausova SV, Chebotar IV

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

*Pseudomonas aeruginosa*, the opportunistic pathogen, occupies one of the leading places in the structure of pathogens causing nosocomial infections, which is due to high adaptive potential and the ability to quickly develop antimicrobial resistance. The study aimed to assess the influence of the *P. aeruginosa* adaptation to colistin on bacterial fitness. A total of nine isolates obtained during the experimental evolution of the *P. aeruginosa* strain (laboratory number 1202) under conditions of increasing colistin concentrations, the growth kinetics of which was compared to that of wild type strain, were included in the study; the whole genome sequencing of all isolates was performed, and the minimum inhibitory concentration of colistin was determined. Growth rate was estimated using the Varioskan LUX multimodal reader (Thermo Scientific, USA) throughout 18 h at 37 °C; optical density (OD) at  $\lambda = 600$  nm was measured every 15 min. The maximum growth rate ( $GR_{max}$ , i.e. the maximum change in OD within 1h) and the time to reach 50% of the maximum OD reported when growing the wild type *Pa\_1202\_0* strain ( $T_{OD50\%}$ ) were considered. Isolates of the clone carrying mutations of the genes *phoQ*, *lptA*, and *prs* showed low fitness values compared to wild type strains. For example,  $GR_{max}$  of the isolate *Pa\_1202\_43* was 0.029 OD/h vs. 0.182 OD/h reported for the original isolate *Pa\_1202\_0*, and it reached  $OD_{50\%}$  4.6 h later. The growth characteristics of the clone carrying mutations of *lpxL* and *lptB*, as well as the clone carrying mutant *pmrB* were generally comparable with the characteristics of the wild type strain. Thus, the genome modifications observed during the *P. aeruginosa* adaptation to colistin have an ambiguous effect on bacterial fitness.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, nosocomial infections, bacterial fitness, colistin, resistance genes

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation grant (project No. 20-15-00235).

**Author contribution:** Mayanskiy NA — concept, data analysis, manuscript editing; Brzhovskaya EA — methodology, manuscript preparation and writing; Skvortsov-Igralov GA — formal analysis of experimental data; Chausova SV — data validation; Chebotar IV — methodology, concept, data validation.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Brzhovskaya  
Leninsky prospect, 117/1, Moscow, 119571; emmbf@yandex.ru

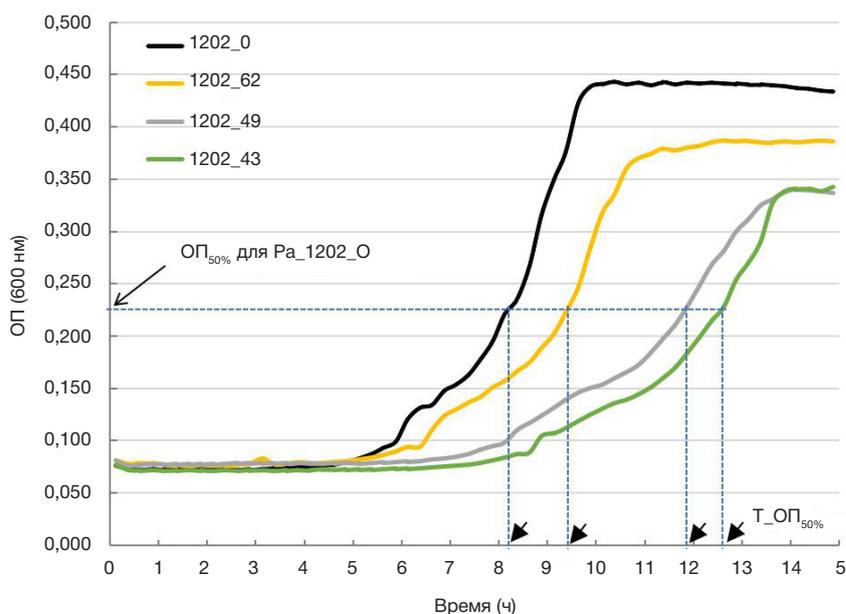
**Received:** 22.08.2024 **Accepted:** 29.09.2024 **Published online:** 19.10.2024

**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.042

*Pseudomonas aeruginosa* является актуальным патогеном-оппортунистом, успех в поддержании жизнедеятельности которого в клинических условиях обусловлен высоким адаптивным потенциалом. Быстрая адаптация к новым экологическим локусам, антимикробным препаратам и эффекторам иммунной системы позволяет *P. aeruginosa* оставаться одной из главных причин нозокомиальной заболеваемости [1]. Инфекции, вызванные полирезистентными штаммами *P. aeruginosa*, трудно поддаются лечению, и лишь

немногие антимикробные препараты сохраняют активность в отношении таких возбудителей. Одним из антибиотиков «последнего шанса» является полимиксиновый антибиотик колистин [2].

Расширение клинического использования колистина неизбежно приводит к появлению колистинрезистентности. Устойчивость к колистину обусловлена изменением структуры его мишени — липополисахарида (ЛПС), что снижает связывание антибиотика с клеточной стенкой



**Рис.** Кривые роста родительского штамма *Pa\_1202\_0* и его дочерних изолятов клона *Pa\_phoQ/lptA/prs*. Бактерии инкубировали в 96-луночном планшете при 37 °С, каждые 15 мин измеряя оптическую плотность (ОП),  $\lambda = 600$  нм. Открытая длинная стрелка указывает на значение ОП, соответствующее 50% от максимальной ОП, зарегистрированной при росте родительского штамма *Pa\_1202\_0* (ОП<sub>50%</sub>). Закрытые короткие стрелки указывают на время достижения ОП<sub>50%</sub> (Т<sub>ОП50%</sub>) исследованными изолятами. Характеристики изолятов представлены в табл. Репрезентативный результат одного из трех повторов эксперимента

бактерии [3]. Модификация ЛПС и резистентность к колистину у *P. aeruginosa* обычно связаны с повреждением двухкомпонентных систем *PhoP-PhoQ* и *PmrA-PmrB* в результате мутаций соответствующих генов, хотя и не ограничивается этими механизмами [3, 4]. Мутации, формирующие устойчивость, дают преимущество их носителям при наличии антибиотика, однако эти же мутации могут снижать уровень жизнеспособности микроорганизма в целом, который в отсутствие антибиотика становится неконкурентоспособным. Компенсировать биологические затраты, связанные с резистентностью, могут мутации, которые запускают альтернативные пути метаболизма в клетке и замещают выпадающие звенья обмена веществ [5–7]. В связи с этим исследование бактериального фитнеса, т. е. уровня поддержания жизнедеятельности, который может быть выражен, в частности, в изменении темпов роста бактериальной популяции [8], служит важным дополнением к генетическому анализу механизмов резистентности.

В недавно проведенном исследовании, посвященном экспериментальной адаптации *P. aeruginosa* к колистину, мы показали, что при формировании колистинрезистентности геном эволюционировал альтернативными путями не только у разных штаммов, но и в пределах одного штамма бактерий [9]. Изоляты одного из экспериментальных штаммов *P. aeruginosa*, полученные на различных этапах адаптации к колистину и проанализированные при помощи полногеномного секвенирования, мы использовали в настоящей работе. Для исследования были отобраны изоляты с разными мутациями, у которых исследовали кинетику роста и сравнили ее с родительским штаммом. Цель работы — исследовать взаимосвязь генотипических и фенотипических характеристик в экспериментальных моделях, что подчеркивает важность исходного генетического фона в развитии устойчивости к антимикробным препаратам, позволяет вскрыть новые знания о механизмах антибиотикорезистентности и наметить новые пути преодоления лекарственной устойчивости бактерий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали штамм *P. aeruginosa* (лабораторный номер 1202, геном депонирован в GenBank), выделенный из окружающей среды в 2016 г., чувствительный ко всем антибиотикам, и его дочерние изоляты, полученные в ходе экспериментальной адаптации к колистину, методика которой была подробно описана ранее [9].

Для оценки бактериального фитнеса сравнивали темпы роста родительского и дочерних штаммов *Pa\_1202*, полученных в ходе адаптационного эксперимента. Из единичной колонии суточной культуры каждого изолята готовили бактериальную суспензию, стандартизировали ее по оптической плотности до 0,5 ед. McFarland, инокулировали 10 мкл полученной взвеси в 10 мл бульона Луриа–Бертани, после чего отбирали 200 мкл и переносили в лунку 96-луночного плоскодонного планшета. Планшет заклеивали прозрачной пленкой и инкубировали в многофункциональном ридере Varioskan LUX (Thermo Scientific, США) в течение 18 ч при 37 °С, каждые 15 мин измеряя оптическую плотность (ОП) при  $\lambda = 600$  нм. Кривые роста анализировали при помощи программы SkanIt версии 7.0 (Thermo Scientific; США). Темпы роста оценивали при помощи двух следующих показателей: 1) максимальная скорость роста (СР<sub>max</sub>; соответствует максимальному изменению ОП в течение 1 ч, единица измерения ОП/ч); 2) время, необходимое для достижения 50% от максимальной ОП, зарегистрированной при росте родительского штамма *Pa\_1202\_0* (Т<sub>ОП50%</sub>) (рис.). Уменьшение СР<sub>max</sub> и увеличение Т<sub>ОП50%</sub> расценивали как снижение фитнеса. Эксперимент проводили в трех повторах.

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) колистина в диапазоне 0,25–16 мг/л определяли наборами ComASP Colistin 0,25-16 (Liofilchem srl., Италия), а более высокие МПК (до 64 мг/л) оценивали при помощи метода микроразведений в бульоне. Значения МПК интерпретировали, исходя из их экспериментальной динамики, но не клинической значимости.

Таблица. Фенотип и генотип изолятов, полученных в ходе экспериментальной адаптации к колистину

Изолят	День	МПК колистина (мг/л)	CP <sub>max</sub> (ОП/ч)	T_ОП <sub>50%</sub> (ч)	<i>phoQ</i>	<i>pmrB</i>	<i>lpxL</i>	<i>lptA</i>	<i>lptB</i>	<i>prs</i>	<i>speE</i>	<i>hp/PA2117</i>	<i>tetC</i>	<i>oprH</i>
			Среднее (СО)											
1202_0	0	1	0,182 (0,018)	8,8 (0,1)										
Клон <i>Pa_phoQ/lptA/prs</i>														
1202_43	11	32	0,029 (0,001) *	13,4 (0,2) *										
1202_49	13	1	0,038 (0,009) *	12,7 (0,2) *										
1202_62	16	2	0,140 (0,012)	10,0 (0,1) *										
Клон <i>Pa_phoQ/lpxL/lptB</i>														
1202_63	16	16	0,285 (0,015) *	8,9 (0,0)										
1202_80	20	2	0,268 (0,059)	9,0 (0,1)										
1202_95	28	16	0,163 (0,016) *	9,2 (0,1)										
Клон <i>Pa_pmrB</i>														
1202_37	9	1	0,155 (0,016)	8,9 (0,0)										
1202_44	11	2	0,219 (0,029)	9,0 (0,1)										
1202_88	24	16	0,198 (0,026)	7,9 (0,1) *										

**Примечание:** десять изолятов *Pa\_1202* получили в указанные дни эксперимента [9]. Определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) колистина, а также оценивали фитнес путем анализа кривых роста с измерением максимальной скорости роста (CP<sub>max</sub>) и времени достижения 50% от максимальной оптической плотности (ОП), зарегистрированной при росте родительского штамма *Pa\_1202\_0* (T\_ОП<sub>50%</sub>) (см. рис.). Гены кор-генома исследовали при помощи полногеномного секвенирования. Зеленые ячейки соответствуют последовательности генов, идентичных *Pa\_1202\_0*, мутации отмечены красным цветом. Оранжевым цветом выделены названия генов, участвующих в синтезе липополисахарида и связанных с устойчивостью к колистину; неокрашены названия генов общего метаболизма, напрямую не связанных с устойчивостью к колистину. СО — стандартное отклонение. \* —  $p < 0,05$  по сравнению с *Pa\_1202\_0*.

Полногеномное секвенирование проводили с использованием бактериальной ДНК, выделенной из суточных культур экспериментальных изолятов *Pa\_1202*, выращенных из замороженных образцов (см. выше) на агаре Мюллера–Хинтона. Процедура полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа подробно описана ранее [9].

Статистическую обработку проводили в программе IBM SPSS Statistics, v 27.0. (США). Количественные результаты в тексте и таблице представлены в виде среднего (стандартное отклонение). Для сравнения показателей CP<sub>max</sub> и T\_ОП<sub>50%</sub> использовали тест Манна–Уитни, различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Темпы роста проанализировали у родительского штамма *Pa\_1202\_0* и у 9 изолятов *Pa\_1202*, которые представляли три основные клональные линии, полученные в ходе экспериментальной адаптации к колистину и описанные нами ранее [9] (см. таблицу). Два клона носили идентичную мутацию в *phoQ* (ins-ATCGCCT-1086), но различались по мутациям в других генах. В одном случае дополнительные повреждения были обнаружены в генах *lptA* (ins-CCGCGC-490) и *prs* (T143→C), клон назвали *Pa\_phoQ/lptA/prs*. В другом случае были изменены гены *lpxL* (ins-C-335) и *lptB* (ins-GCG-27), клон назвали *Pa\_phoQ/lpxL/lptB*. Третий клон характеризовался мутацией в гене *pmrB* (T92→G) (клон назвали *Pa\_pmrB*) в сочетании с повреждением гена *hp/PA2117* (G326→A).

Изоляты клона *Pa\_phoQ/lptA/prs* отличались низкими показателями фитнеса по сравнению с родительским штаммом *Pa\_1202\_0* (см. рис. и табл.). Например, CP<sub>max</sub> изолята 1202\_43 составила 0,029 (0,001) ОП/ч против 0,182 (0,018) ОП/ч у исходного изолята *Pa\_1202\_0*, а ОП<sub>50%</sub> он достигал на 4,6 ч позже.

Ростовые характеристики клонов *Pa\_lpxL/lptB* и *Pa\_pmrB* в целом были сопоставимы с показателями родительского штамма *Pa\_1202\_0* (см. таблицу). У двух изолятов отмечены

значимое повышение CP<sub>max</sub> (1202\_63) и значимое снижение T\_ОП<sub>50%</sub> (1202\_88), что указывало на лучшие темпы роста по сравнению с родительским штаммом, несмотря на 16-кратное увеличение МПК колистина (табл. 1). У изолята 1202\_95 из клона *Pa\_pmrB* была значимо снижена CP<sub>max</sub>, однако T\_ОП<sub>50%</sub> отличалась незначимо от исходного штамма.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы показали, как экспериментальная адаптация *P. aeruginosa* к колистину влияла на бактериальный фитнес, оценив кинетику роста изолятов с различными генотипами. Различия фитнес-способностей между представителями трех изученных клонов логичнее всего объяснить, анализируя профили геномных альтераций, характерных для каждого клона. Геномы изолятов клона *Pa\_phoQ/lptA/prs* включали два типа изменений: 1) мутации в генах *phoQ* и *lptA*, которые непосредственно контролируют биосинтез главной мишени полимиксинов — ЛПС [10, 11]; 2) мутации в гене рибозофосфатпирофосфокиназы *prs*, который напрямую не связан с синтезом ЛПС и контролирует синтез и метаболизм нуклеотидов. *PhoP*, компонент регуляторной системы *PhoPQ*, непосредственно участвует в регуляции синтеза ЛПС, его поломки считают частой причиной колистинрезистентности [10]. Продукт гена *lptA* обеспечивает сборку ЛПС и его транслокацию в наружную мембрану [11]. Комплексные изменения генома в клоне *Pa\_phoQ/lptA/prs* сочетались с наиболее выраженным понижением бактериального фитнеса.

У клона *Pa\_phoQ/lpxL/lptB* были обнаружены мутации только в генах синтеза ЛПС, включая уже упоминавшийся *phoQ*, *lpxL* (ген лауроилацилтрансферазы, осуществляющей биосинтез липида А) и *lptB* (ген транспортера *LptB2FG*, перемещающего ЛПС в наружную мембрану) [12, 13].

Клон *Pa\_pmrB* сочетал мутации в генах сенсор-киназы *pmrB* и гипотетического протеина *hp/PA2117*. Киназа *PmrB* является элементом двухкомпонентной системы, которая регулирует множество функций, включая

экспрессию генов ЛПС-оперона; ранее было доказано, что повреждения гена *pmrB* снижают чувствительность *P. aeruginosa* к полимиксинам [14, 15]. Продукт гена *hp/PA2117* до настоящего времени не верифицирован.

## ВЫВОДЫ

Модификации генома, наблюдавшиеся в ходе адаптации *P. aeruginosa* к колистину, оказывают неоднозначное влияние на бактериальный фитнес. Очевидно, что

наиболее тяжелые последствия для приспособленности бактерий несет сочетание мутаций в генах ЛПС-синтеза и генах общего метаболизма, как наблюдалось в клоне *Pa\_phoQ/ptA/prs*. Дальнейшее изучение взаимоотношений генотипа и фенотипа при помощи экспериментального моделирования позволит улучшить понимание механизмов бактериальной адаптации к факторам внешней среды, в том числе формирования антибиотикорезистентности, и наметить новые пути преодоления лекарственной устойчивости бактерий.

## Литература

1. Algammal A, Hetta HF, Mabrok M, Behzadi P. Editorial: Emerging multidrug-resistant bacterial pathogens "superbugs": A rising public health threat. *Front Microbiol.* 2023; 14: 1135614. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1135614. PMID: 36819057; PMCID: PMC9930894.
2. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms.* 2020; 8 (11): 1716. DOI: 10.3390/microorganisms8111716. PMID: 33147701; PMCID: PMC7692639.
3. Shahzad S, Willcox MDP, Rayamajhee B. A Review of Resistance to Polymyxins and Evolving Mobile Colistin Resistance Gene *mcr* among Pathogens of Clinical Significance. *Antibiotics (Basel).* 2023; 12 (11): 1597. DOI: 10.3390/antibiotics12111597. PMID: 37998799; PMCID: PMC10668746.
4. Yang B, Liu C, Pan X, Fu W, Fan Z, Jin Y, et al. Identification of Novel PhoP-PhoQ Regulated Genes That Contribute to Polymyxin B Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms.* 2021; 9 (2): 344. DOI: 10.3390/microorganisms9020344. PMID: 33572426; PMCID: PMC7916210.
5. Чеботарь И. В., Кулешов К. В. Между антибиотикорезистентностью и вирулентностью: диалектика бактериального фитнеса. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2024; 26 (1): 59-66. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2024.1.59-66>.
6. Olivares Pacheco J, Alvarez-Ortega C, Alcalde Rico M, Martínez JL. Metabolic Compensation of Fitness Costs Is a General Outcome for Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mutants Overexpressing Efflux Pumps. *mBio.* 2017; 8 (4): e00500-17. DOI: 10.1128/mBio.00500-17. PMID: 28743808; PMCID: PMC5527304.
7. Sendra E, Fernández-Muñoz A, Zamorano L, Oliver A, Horcajada JP, Juan C, Gómez-Zorrilla S. Impact of multidrug resistance on the virulence and fitness of *Pseudomonas aeruginosa*: a microbiological and clinical perspective. *Infection.* 2024. DOI: 10.1007/s15010-024-02313-x. Epub ahead of print. PMID:38954392.
8. Шамина О. В., Крыжановская О. А., Лазарева А. В., Алябьева Н. М., Маянский Н. А. Устойчивость карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* к колистину: молекулярные механизмы и бактериальный фитнес. *Вестник РГМУ.* 2020; 3: 11–18. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.032.
9. Chebotar I, Savinova T, Bocharova J, Korostin D, Evseev P, Mayanskiy N. Genetic Alternatives for Experimental Adaptation to Colistin in Three *Pseudomonas aeruginosa* Lineages. *Antibiotics.* 2024; 13: 452. Available from: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050452>.
10. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55 (12): 5761–9. DOI: 10.1128/AAC.05391-11. Epub 2011 Oct 3. PMID: 21968359; PMCID: PMC3232818.
11. Shapiro AB, Gu RF, Gao N. Dimerization of isolated *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide transporter component LptA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 450 (4): 1327–32. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.138. Epub 2014 Jul 5. PMID: 25003324.
12. Dovala D, Rath CM, Hu Q, Sawyer WS, Shia S, Elling RA, et al. Structure-guided enzymology of the lipid A acyltransferase LpxM reveals a dual activity mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113 (41): E6064–E6071. DOI: 10.1073/pnas.1610746113. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27681620; PMCID: PMC5068295.
13. Luo Q, Yang X, Yu S, Shi H, Wang K, Xiao L, et al. Structural basis for lipopolysaccharide extraction by ABC transporter LptB<sub>2</sub>-FG. *Nat Struct Mol Biol.* 2017; 24 (5): 469–474. DOI: 10.1038/nsmb.3399.
14. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56 (2): 1019–30. DOI: 10.1128/AAC.05829-11. Epub 2011 Nov 21. PMID: 22106224; PMCID: PMC3264203.
15. Disney-McKeethen S, Seo S, Mehta H, Ghosh K, Shamoo Y. Experimental evolution of *Pseudomonas aeruginosa* to colistin in spatially confined microdroplets identifies evolutionary trajectories consistent with adaptation in microaerobic lung environments. *mBio.* 2023; 14 (6): e0150623. DOI: 10.1128/mBio.01506-23.

## References

1. Algammal A, Hetta HF, Mabrok M, Behzadi P. Editorial: Emerging multidrug-resistant bacterial pathogens "superbugs": A rising public health threat. *Front Microbiol.* 2023; 14: 1135614. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1135614. PMID: 36819057; PMCID: PMC9930894.
2. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms.* 2020; 8 (11): 1716. DOI: 10.3390/microorganisms8111716. PMID: 33147701; PMCID: PMC7692639.
3. Shahzad S, Willcox MDP, Rayamajhee B. A Review of Resistance to Polymyxins and Evolving Mobile Colistin Resistance Gene *mcr* among Pathogens of Clinical Significance. *Antibiotics (Basel).* 2023; 12 (11): 1597. DOI: 10.3390/antibiotics12111597. PMID: 37998799; PMCID: PMC10668746.
4. Yang B, Liu C, Pan X, Fu W, Fan Z, Jin Y, et al. Identification of Novel PhoP-PhoQ Regulated Genes That Contribute to Polymyxin B Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms.* 2021; 9 (2): 344. DOI: 10.3390/microorganisms9020344. PMID: 33572426; PMCID: PMC7916210.
5. Chebotar IV, Kuleshov KV. Mezhdud antibiotikorezistentnost'ju i virulentnost'ju: dialektika bakterial'nogo fitnessa. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2024; 26 (1): 59-66. <https://doi.org/10.36488/cmasc.2024.1.59-66>. Russian.
6. Olivares Pacheco J, Alvarez-Ortega C, Alcalde Rico M, Martínez JL. Metabolic Compensation of Fitness Costs Is a General Outcome for Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mutants Overexpressing Efflux Pumps. *mBio.* 2017; 8 (4): e00500-17. DOI: 10.1128/mBio.00500-17. PMID: 28743808; PMCID: PMC5527304.

- PMC5527304.
7. Sendra E, Fernández-Muñoz A, Zamorano L, Oliver A, Horcajada JP, Juan C, Gómez-Zorrilla S. Impact of multidrug resistance on the virulence and fitness of *Pseudomonas aeruginosa*: a microbiological and clinical perspective. *Infection*. 2024. DOI: 10.1007/s15010-024-02313-x. Epub ahead of print. PMID:38954392.
  8. Shamina OV, Kryzhanovskaja OA, Lazareva AV, Aljabeva NM, Mayanskiy NA. Uстойчивost' karbapenemrezistentnyh shtammov *Klebsiella pneumoniae* k kolistinu: molekulyarnye mehanizmy i bakterial'nyj fitnes. *Vestnik RGMU*. 2020; 3: 11–18. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.032. Russian.
  9. Chebotar I, Savinova T, Bocharova J, Korostin D, Evseev P, Mayanskiy N. Genetic Alternatives for Experimental Adaptation to Colistin in Three *Pseudomonas aeruginosa* Lineages. *Antibiotics*. 2024; 13: 452. Available from: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050452>.
  10. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, et al. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (12): 5761–9. DOI: 10.1128/AAC.05391-11. Epub 2011 Oct 3. PMID: 21968359; PMCID: PMC3232818.
  11. Shapiro AB, Gu RF, Gao N. Dimerization of isolated *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide transporter component LptA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 450 (4): 1327–32. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.06.138. Epub 2014 Jul 5. PMID: 25003324.
  12. Dovala D, Rath CM, Hu Q, Sawyer WS, Shia S, Elling RA, et al. Structure-guided enzymology of the lipid A acyltransferase LpxM reveals a dual activity mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113 (41): E6064–E6071. DOI: 10.1073/pnas.1610746113. Epub 2016 Sep 28. PMID: 27681620; PMCID: PMC5068295.
  13. Luo Q, Yang X, Yu S, Shi H, Wang K, Xiao L, et al. Structural basis for lipopolysaccharide extraction by ABC transporter LptB<sub>2</sub>. *Nat Struct Mol Biol*. 2017; 24 (5): 469–474. DOI: 10.1038/nsmb.3399.
  14. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, et al. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56 (2): 1019–30. DOI: 10.1128/AAC.05829-11. Epub 2011 Nov 21. PMID: 22106224; PMCID: PMC3264203.
  15. Disney-McKeethen S, Seo S, Mehta H, Ghosh K, Shamoo Y. Experimental evolution of *Pseudomonas aeruginosa* to colistin in spatially confined microdroplets identifies evolutionary trajectories consistent with adaptation in microaerobic lung environments. *mBio*. 2023; 14 (6): e0150623. DOI: 10.1128/mbio.01506-23.