



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magister en Ciencias mención Microbiología

**DIVERSIDAD DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS
EN MUESTRAS DE AGUA DULCE DE ZONAS CON
DIFERENTE GRADO DE INTERVENCIÓN HUMANA EN
PENÍNSULA FILDES, ISLA REY JORGE, ANTÁRTICA.**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias mención Microbiología
DANIELA ALEJANDRA JARA HENRIQUEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2018

Profesor Guía: Gerardo González Rocha
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dra. Helia Bello Toledo
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Dr. Miguel Martínez Poblete
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Andrea Moreno Switt
Centro de Medicina Veterinaria
Universidad Andrés Bello

Director de Programa

Dr. Víctor Campos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de Magíster ha sido posible gracias al financiamiento del Proyecto INACH RT_06-12 “*Resistoma de Península Fildes: ¿Existe contribución de genes de resistencia desde las aguas de desecho?*”, cuyo Investigador responsable es la Dra. Helia Bello Toledo.

A mi Profesor Guía y a la profesora Helia por aceptarme en su laboratorio y confiar en mi trabajo, por su apoyo constante y paciencia, por sus consejos y ayuda para continuar con la tesis.



A todos los profesores que participan en el Magister por la entrega de sus conocimientos que me motivaron a continuar en esta hermosa área de la ciencia.

A todos los integrantes de LIAA, que me ayudaron de variadas maneras a realizar esta investigación e hicieron más agradables las horas de trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE FIGURAS.....	vii
INDICE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Características Generales de la Antártica.....	1
1.2. Actividades antropogénicas como un riesgo microbiológico en la Antártica.....	6
1.3. Península Fildes, Isla Rey Jorge, Antártica.....	9
1.4. Resistencia a antibióticos en la Antártica.....	12
HIPOTESIS DE TRABAJO.....	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
2. MATERIALES Y METODOS	26
2.1. Selección de muestras.....	26
2.2. Recuento total de bacterias heterotróficas cultivables.....	28
2.3. Recuento de bacterias heterotróficas con susceptibilidad disminuida a antibióticos.....	28
2.4. Análisis estadísticos de los recuentos bacterianos	29
2.5. Almacenamiento de cepas bacterianas y caracterización microscópica de cultivos bacterianos aislados.....	30
2.6. Estudio de susceptibilidad a agentes antibacterianos.....	30

2.7.	Extracción de ADN.....	31
2.8.	Detección genes de resistencia.....	31
2.9	Análisis riqueza y diversidad de genes en las distintas zonas.....	32
2.10.	Identificación cepas bacterianas aisladas.....	33
3.	RESULTADOS	34
3.1.	Recuento de bacterias heterotróficas cultivables totales y con susceptibilidad disminuida a antibióticos en muestras de agua dulce provenientes distintas zonas en estudio.....	34
3.1.1.	Comparación por zonas.....	37
3.1.2.	Comparación por temperaturas.....	38
3.2.	Caracterización fenotípica de bacterias aisladas en muestras de agua dulce.....	39
3.3.	Susceptibilidad a antibióticos de bacterias aisladas de muestras de agua en estudio.....	42
3.3.1.	Frecuencia de halos de inhibición y perfiles de resistencia	42
3.4.	Detección de mecanismos de resistencia.....	50
3.4.1.	<i>Detección de genes de resistencia a antibióticos β-lactámicos.</i>	50
3.4.2.	<i>Detección de genes de resistencia a Quinolonas.</i>	51
	Los genes <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i> y <i>qnrC</i> no fueron detectados en los aislados analizados de ninguna zona.....	51
3.4.3.	<i>Detección de genes de resistencia a Fenicoles.</i>	51
3.4.4.	<i>Detección de genes de inhibidores de la síntesis del ácido fólico.</i> ..	51
3.4.5.	<i>Detección de genes de resistencia a Aminoglicósidos.</i>	51
3.4.6	<i>Riqueza y la diversidad de genes de resistencia</i>	53
3.5.	Identificación de cepas bacterianas	54
4.	DISCUSIÓN	58
5.	CONCLUSIONES	74
6.	PROYECCIONES	76

7.	REFERENCIAS	77
8.	ANEXOS.....	95



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sitios de muestreo en Península Fildes. **Zona A** lugares con influencia humana: M51, M52, M55, M56, M59, M60, M70; **Zona B** lugares sin influencia humana pero con posible influencia animal: M4; y **Zona C** de lugares remotos sin intervención humana ni animal: M15, M71, M74.....27

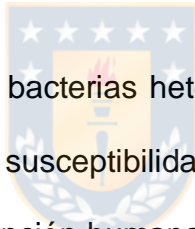


Figura 2. Recuento total de bacterias heterotróficas cultivables y recuento de bacterias heterotróficas con susceptibilidad disminuida a antibióticos a 4°C y 12°C en **Zona A:** con intervención humana (M59 y M60 a 300m de base Rusa, M55 y M56 a 500 m de Villa las Estrellas y M51 y M52 a 600m de Villa las Estrellas).....34

Figura 3. Recuento total de bacterias heterotróficas cultivables y recuento de bacterias heterotróficas con susceptibilidad disminuida a antibióticos a 4°C y 12°C en **Zona B:** zona sin intervención humana con posible influencia animal (M41 Laguna Ripamonti, isla Ardley).....35

Figura 4. Recuento total de bacterias heterotróficas cultivables y recuento de bacterias heterotróficas con susceptibilidad disminuida a antibióticos a 4°C y 12°C en **Zona C:** zona sin intervención humana ni presencia animal permanente (M15 a 6,7 km de Villa las Estrellas).....36

Figura 5: Colonias bacterianas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas de las zonas A (1, 5, 6, 7), B (8) y C (2, 3 y 4) en Península Fildes, Isla Rey Jorge, Antártica.....40

Figura 6: Número de bacterias Gram positivas y Gram negativas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas de las zonas A, B y C en Península Fildes, Isla Rey Jorge, Antártica.....41

Figura 7. Frecuencia de halos de inhibición (según rangos definidos) de 42 bacterias Gram negativas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en Zona A, con intervención humana (M59 y M60, M55 y M56 M51 y M52) a los distintos antibióticos ensayados.....44

Figura 8. Frecuencia de halos de inhibición (según rangos definidos) de 6 bacterias Gram positivas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en Zona A, con intervención humana (M59 y M60, M55 y M56 M51 y M52) a los distintos antibióticos ensayados.....45

Figura 9. Frecuencia de halos de inhibición (según rangos definidos) de 20 bacterias Gram negativas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en Zona **B**: sin intervención humana con posible influencia animal (M41 Laguna Ripamonti, isla Ardley) a los distintos antibióticos ensayados.....46

Figura 10. Frecuencia de halos de inhibición (según rangos definidos) de 23 bacterias Gram negativas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en Zona **C**: zona sin intervención humana ni presencia animal, (M15 a 6,7 km de Villa las Estrellas) a los distintos antibióticos ensayados.....47

Figura 11. Frecuencia de halos de inhibición (según rangos definidos) de 11 bacterias Gram positivas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en Zona **C**: zona sin intervención humana ni presencia animal, (M15 a 6,7 km de Villa las Estrellas) a los distintos antibióticos ensayados.....48

Figura 12: Análisis de Escalamiento Multidimensional no paramétrico (MDS) basado en la detección de genes de resistencia a antibióticos en las Zona A (influencia humana), B (influencia animal) y C (Zona Remota).....54

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Caracterización fenotípica de las bacterias aisladas en las distintas zonas.....	40
Tabla 2: Perfiles de resistencia a antibióticos de cepas aisladas de las distintas zonas estudiadas.....	49
Tabla 3: Número de cepas bacterianas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en distintas zonas en Isla Rey Jorge, Bahía de Fildes, Antártica, portadoras de algún gen de resistencia a antibióticos.....	52
Tabla 4: Índices de Shannon-Wiener y de Simpson para determinar la riqueza de genes en las diferentes zonas de muestreo. Zona A (influencia humana), B (influencia animal) y C (Zona Remota).....	53
Tabla 5: Identificación de aislados de muestras de agua dulce obtenidas en distintas zonas (A, B y C) en Isla Rey Jorge, Bahía de Fildes, Antártica, portadoras de algún gen de resistencia a antibióticos.....	57

Tabla A: Oligonucleótidos utilizados en la detección de genes de resistencia a antibióticos.....95



RESUMEN

La Antártica es considerada un lugar remoto que, debido al aislamiento y las duras condiciones ambientales, ha permitido que muchos de los ecosistemas se hayan mantenido inalterados o tengan una escasa intervención humana. Se sabe que las bacterias poseen una gran capacidad de adaptación a los diferentes ambientes y han desarrollado mecanismos de resistencia a los antibióticos, siendo los de resistencia adquirida y transferible los más importantes por su potencial diseminación. Es importante mencionar que el fenómeno de resistencia no es exclusivo de bacterias de origen clínico, sino que también se ha informado en bacterias aisladas de ambientes naturales, como suelo, ríos y lagos, por lo que el papel de estos microorganismos como posibles reservorios de genes de resistencia a antibióticos (GRA), se ha convertido actualmente en un constante foco de atención. Otro reservorio fundamental de GRA es la microbiota comensal, principalmente del tracto gastrointestinal de humanos y animales. La posible transferencia de determinantes de resistencia a antibióticos entre bacterias de la microbiota humana y bacterias antárticas se ha tornado una preocupación, debido al aumento del turismo y establecimientos de personas por períodos prolongados, las que pudiesen aportar bacterias resistentes a este ambiente. El presente

trabajo tuvo como objetivo evaluar diversidad de GRA presentes en muestras de agua dulce de zonas con diferente grado de intervención humana en Isla Rey Jorge, Antártica. Siendo la Zona A el área de mayor impacto humano, Zona B con presencia animal permanente y la Zona C área remota de difícil acceso por lo tanto considerada sin impacto humano ni presencia permanente animal. Se aislaron en la Zona A, 48 morfotipos y en la Zona B, 20 morfotipos distintos, en donde predominan bacterias Gram negativas oxidasa positiva a diferencia de la Zona C en donde se aislaron 34 morfotipos predominando bacterias Gram negativas oxidasa negativa. Los perfiles de resistencia y el índice de resistencia a antibióticos (IRA) indican que las zonas con impacto humano (Zona A) y con influencia animal (Zona B) son las que presentan mayores índices de resistencia a los antibióticos con un IRA de 0,5 y 0,7; respectivamente, a diferencia de la zona C que presenta un IRA de 0,05. Se observa una mayor diversidad de GRA en zonas con influencia humana, siendo los genes de resistencia (GR) a β -lactámicos, como el *bla_{CTX-M2}* y de resistencia a aminoglicósidos, como el gen *aac6'lb*, los que predomina. Además, estos genes están presentes también en las zonas con influencia animal y zonas remotas. Este estudio permite establecer que existe diferencia en el comportamiento frente a antibióticos de bacterias aisladas de agua dulce desde zonas con o sin influencia humana, así como también determinar que existe mayor en la riqueza y diversidad de GR a antibióticos en la zona con mayor actividad antrópica.

ABSTRACT

Antarctica is considered a remote place that, due to isolation and harsh environmental conditions, has allowed many of the ecosystems to remain unaltered or have little human intervention. It is known that bacteria have a great ability to adapt to different environments and have developed mechanisms of resistance to antibiotics, with those of acquired and transferable resistance being the most important due to their potential dissemination. It is important to mention that the resistance phenomenon is not exclusive of bacteria of clinical origin, but it has also been reported in bacteria isolated from natural environments, such as soil, rivers and lakes, so the role of these microorganisms as possible reservoirs of antibiotic resistance genes (ARG), has now become a constant focus of attention. Another fundamental reservoir of ARG is the commensal microbiota, mainly from the gastrointestinal tract of humans and animals. This reservoir, with the consequent transfer of determinants of resistance to pathogens, is considered a greater threat than the direct selective pressure exerted by antibiotics. The possible transfer of determinants of resistance to antibiotics between bacteria of the human microbiota and Antarctic bacteria has become a concern, due to the increase of tourism and establishments of people for prolonged periods, which could

provide bacteria resistant to this environment. The objective of this work was to evaluate the diversity of ARG present in freshwater samples from areas with different levels of human intervention in King George Island, Antarctica. Zone A being the area of greatest human impact, Zone B with permanent animal presence and Area C remote area of difficult access, therefore considered without human impact or permanent animal presence. In Zone A, 48 morphotypes were isolated and in Area B, 20 different morphotypes, in which positive Gram-negative oxidase bacteria predominated, in contrast to Zone C where 34 morphotypes were isolated, predominating Gram-negative non-producing oxidase bacteria. The antibiotic resistance profiles and the antibiotic resistance index (ARI) indicate that the areas with human impact (Zone A) and with animal influence (Zone B) are those that present higher rates of resistance to antibiotics with an IRA of 0.5 and 0.7, respectively; unlike area C that has an IRA of 0.05. A greater diversity of ARG is observed in areas with human influence, being the β -lactam resistance genes, such as *bla*_{CTX-M2} and resistance to aminoglycosides, such as the *aac(6')-Ib* gene, which predominates. In addition, these genes are also present in areas with animal influence and remote areas. This study allows to establish that there is a difference in the behavior against antibiotics of bacteria isolated from freshwater from areas with or without human influence, as well as to determine that there is greater in the richness and diversity of antibiotic resistance genes in the area with greater anthropogenic activity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características Generales de la Antártica

El continente antártico se define como el territorio ubicado al sur del paralelo 60°, el cual posee un área de 12,3 millones de km², incluyendo las barreras de hielo, representando aproximadamente el 10% del área terrestre mundial. Se encuentra circunscrito por el Círculo Polar Antártico, en el paralelo 66°33' de latitud Sur (Campbell *et al.*, 2009). El 99% de la superficie se encuentra permanentemente cubierta por hielo y representa la mayor reserva de agua dulce del planeta (Elliot, 1985). Las escasas áreas que carecen de hielo permanente se encuentran generalmente en la costa (Peck *et al.*, 2006). Se reconocen 3 zonas biogeográficas que se diferencian tanto del punto de vista biológico como climático: la región sub-antártica, la Antártica marítima y la Antártica continental, en donde principalmente se observan diferencias en las temperaturas medias estivales y anuales, y en las precipitaciones y vientos. Las mayores precipitaciones se registran en la Antártica marítima (400-600mm por año), con temperaturas medias anuales que van desde 1°C hasta -21°C (Cañadas, 2001). Estas condiciones climáticas son desfavorables para la vida animal y vegetal, la temperatura mínima que ha sido registrada es de -89.2 °C, en la base rusa Vostok en 1983 (Tin *et al.*, 2009), las ráfagas de viento

superan los 200 km/h, y la forma predominante de precipitación es la nieve. La capa de hielo que cubre el continente antártico tiene un espesor medio de más de 2000 metros, pudiendo alcanzar casi 5000 metros en algunas zonas. Los análisis llevados a cabo a través de satélites sobre la evolución de los hielos antárticos indican respuestas heterogéneas frente a cambios climáticos recientes. La Antártida Oriental parece experimentar un aumento en el espesor de sus hielos, mientras que en la Antártida Occidental y fundamentalmente en la península Antártica disminuye la cobertura helada, coincidiendo con un aumento de las temperaturas en esta última zona, que parece ser la más afectada por el cambio global (Davis *et al.*, 2005; Newton, 2008; Steig *et al.*, 2009).



La Isla Rey Jorge se ubica en la zona denominada Antártica Marítima y es la más grande del archipiélago de las Islas Shetland del Sur. La Península Fildes, ubicada al suroeste de la isla Rey Jorge, es la región sin cobertura de hielo permanente más extensa de la isla, con suelos erosionados que derivan principalmente de rocas volcánicas y sedimentarias (Zhao *et al.*, 1995). Los suelos antárticos son considerados pobres debido a la escasez de nutrientes; sin embargo, el retroceso de los glaciares provocado por el calentamiento global ha permitido la colonización de especies vegetales con la subsecuente formación de suelo (Bölter, 2011).

En contraposición con su apariencia estéril, el continente antártico y, sobretodo, las aguas que lo rodean están llenos de vida. Los ecosistemas antárticos muestran un gran contraste entre la pobreza y simplicidad de los ecosistemas terrestres y la

riqueza y abundante biomasa de los ecosistemas marinos. La escasa biodisponibilidad de agua líquida junto con el aislamiento biogeográfico y las bajas temperaturas, son los principales factores limitantes en el desarrollo de las comunidades bióticas en el medio terrestre antártico (Bargagli, 2008). Hay por ello pocas especies vegetales que logren sobrevivir en este continente, entre 300-350 especies aproximadamente de las que únicamente dos son fanerógamas (*Deschampsia antarctica* y *Colobanthus quitensis*). La mayoría son líquenes, musgos y hongos que se extienden en las zonas costeras libres de hielo durante el verano (Alberdi *et al.*, 2002). Con respecto a la fauna, la mayoría de los animales de la región están relacionados con el medio marino y de ellos, la mayoría se alimentan directa o indirectamente de krill antártico, *Euphausia superba* (Corsolini, 2011). Este pequeño crustáceo (de hasta 6 cm de longitud) es la base de toda la cadena trófica antártica, ya que representa el eslabón de unión entre los productores primarios y los niveles tróficos superiores de dicha cadena (Loeb *et al.*, 1997). En comparación con otros ecosistemas de regiones cálidas, la red trófica antártica es corta y frágil, y las variaciones en la abundancia de krill afectan considerablemente a las especies que de él dependen (Loeb *et al.*, 1997; Moline *et al.*, 2004). Además del krill, una diversidad de especies de invertebrados habita en el medio marino antártico, como distintas especies de moluscos y equinodermos. También existen diversas especies de peces adaptadas a vivir en las frías aguas antárticas, como *Trematomus bernacchii* o *Notothenia coriiceps*. El grupo de los cetáceos también es numeroso, estando presentes especies como la ballena azul (*Balaenoptera musculus*), la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*), la ballena boba (*Balaenoptera borealis*), la

ballena enana (*Balaenoptera acutorostrata*), la yubarta o ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*), la ballena franca meridional o austral (*Eubalaena australis*), la orca (*Orcinus orca*), el cachalote (*Physeter macrocephalus*) y el calderón (*Globicephalus melas*). Otros mamíferos marinos abundantes en la Antártida son la foca de Weddell (*Leptonychotes weddelli*), la foca cangrejera (*Lobodon carcinophaga*), la foca leopardo (*Hydrurga leptonyx*), el elefante marino (*Mirounga leonina*) y el lobo marino (*Arctocephalus gazella*). En el grupo de las aves marinas, las más abundantes de la Antártida son los pingüinos. De las 17 especies de pingüinos que existen, 6 se distribuyen en la Antártida (*Aptenodytes forsteri* o pingüino emperador, *Aptenodytes patagonicus* o pingüino rey, *Pygoscelis antarctica* o pingüino barbijo, *Pygoscelis papua* o pingüino papúa, *Pygoscelis adeliae* o pingüino de Adelia y *Eudyptes chrysolophus* o pingüino macaroni), aunque sólo el pingüino emperador y el pingüino de Adelia presentan una distribución exclusivamente antártica (Corsolini, 2011).

La Antártica se ha convertido en una región de interés debido a las condiciones extremas que allí se presentan como los son las bajas temperaturas, escasa concentración de nutrientes, reducida disponibilidad de agua, perturbaciones físicas y alta incidencia de la radiación UV (Wynn-Williams, 1990). Al igual que en otros lugares, las comunidades microbianas son típicamente el componente dominante de la biomasa de los ecosistemas antárticos y controlan la mayor parte del flujo biológico de carbono, nutrientes y energía (Wynn-Williams, 1996). Los microorganismos que constituyen estas comunidades se disponen siguiendo un

patrón de estratificación vertical con colores característicos, que se ve reflejado por los distintos pigmentos producidos. Las cianobacterias (productores primarios) se disponen en las capas superiores y las bacterias heterótrofas que se ubican por debajo, utilizan la materia orgánica producida por éstas para su crecimiento (Camacho *et al.*, 2005). Las comunidades microbianas antárticas son a menudo inusual e intrínsecamente interesantes, ya que han sido sujetas a largos períodos de aislamiento con niveles relativamente bajos de perturbación (Warwick & Vincent, 2000).

La Antártica se califica como un continente inhóspito, con condiciones climáticas restrictivas para la mayoría de los seres vivos, pero no así para las bacterias, quienes se han adaptado a este ambiente (Tindall, 2004). Las bacterias que habitan en él deben disponer de adaptaciones fisiológicas que les permitan enfrentar adecuadamente periodos de inanición y fluctuaciones amplias de temperatura, las que pueden ser iguales o inferiores al punto de congelación del agua. Estas condiciones fisicoquímicas más rigurosas, han permitido que en estos ambientes prosperen bacterias con diversas estrategias para afrontar con éxito las exigencias que les impone el ambiente extremo (Livermore *et al.*, 2007). Estas condiciones, también regulan la densidad poblacional de las bacterias presentes en él y pueden haber ejercido fuertes presiones selectivas que pueden haber favorecido la evolución de bacterias con rutas metabólicas únicas capaces de producir enzimas y compuestos de interés biotecnológico (Nichols *et al.*, 2002). Entre las adaptaciones que pueden presentar las bacterias de un ambiente como el antártico, se puede

mencionar la flexibilidad de éstas para utilizar diversos sustratos, acumulación de sustratos endógenos como poli- β -hidroxialcanoato o modificaciones de su morfología y tamaño celular. Un estudio realizado en 1997 reveló que, en muestras de hielo y agua de la Antártica, se aislaron con mayor frecuencia bacterias Gram negativas. Además, se determinó que las bacterias psicrófilas aisladas pertenecían a los géneros *Colwellia*, *Marinobacter*, *Planococcus* y *Shewanella*, mientras que bacterias psicrótrofas pertenecían a los géneros *Arthrobacter*, *Halobacillus* y *Halomonas*. Otras bacterias aisladas en este ambiente fueron principalmente *Pseudomonas* y *Vibrio* (Bowman *et al.*, 1997).

1.2. Actividades antropogénicas como un riesgo microbiológico en la Antártica



El Continente antártico es un importante laboratorio natural de investigación debido a sus características climáticas extremas (zona frío-desértica), cuya geografía, hidrología, suelo, flora y fauna se desarrollaron durante mucho tiempo sin influencia humana, considerándose, por muchos años, uno de los pocos lugares prístinos en el mundo (Choi *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008, Bargagli, 2008); sin embargo, las costas antárticas han sido ocupadas por más de 50 años con bases científicas trayendo consecuencias ambientales insuficientemente estudiadas (Stark *et al.*, 2003). Según Tin *et al.*, (2009) la Antártica ya no debiera ser considerada un lugar prístino por los impactos ambientales provocados por las actividades humanas.

En 1992 los Estados Parte del Tratado Antártico ratificaron su compromiso con la conservación del medio ambiente antártico, a través del Protocolo de Madrid, comprometiéndose a la protección global del ambiente antártico y de los ecosistemas dependientes y asociados, designando a la Antártica como reserva natural, consagrada a la paz y a la ciencia. Con el propósito de preservar las áreas de interés científico también se crearon Áreas Antárticas Especialmente Administradas (ASMA), Áreas Antárticas Especialmente Protegidas (ASPA) y el Comité Científico para la Investigación Antártica (SCAR), para la obtención de acceso y toma de muestras. En la última década parte de los estudios desarrollados en la Antártica se han realizado con el propósito de investigar cambios por influencia humana de carácter local y global; en este último aspecto cabe mencionar la reducción de la concentración de ozono estratosférico y el cambio climático (Ugolini y Bockheim, 2008; Malandrino *et al.*, 2009; Stastna, 2010). La Antártica contiene el 90% del hielo del mundo y debido a su ubicación geográfica y altitud ejerce una influencia predominante en la atmósfera global y en las corrientes oceánicas (Ugolini y Bockheim, 2008). Los problemas locales de contaminación en la Antártica han sido asociados principalmente a actividades humanas, incluidas la investigación (Stark *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2007; Ugolini y Bockheim, 2008), el turismo (Choi *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2007; Liggett *et al.*, 2010) y la pesca (Tin *et al.*, 2009). De acuerdo con las estadísticas de la Asociación Internacional de Operadores Turísticos en la Antártica, sólo por concepto de turismo, el número de visitas a la Antártica ha aumentado de 8.210 a 37.858 personas entre el periodo 1994-1995 y el de 2008-2009. Distintas investigaciones han señalado que uno de los principales impactos

negativos descritos en el continente antártico, se produciría por el uso de combustibles fósiles para transporte, calefacción y generación de electricidad necesarios para la supervivencia de los asentamientos humanos en latitudes altas (Stark *et al.*, 2003; Hughes *et al.*, 2007; *et al.*, 2008; Chong *et al.*, 2010). En 1997 ocurrió un derrame de 20.000 L de diesel en la isla Crozet, cerca de la base científica francesa Alfred Faure; según Delille *et al.*, (2007) al año 2002, 5 años después de ocurrido el derrame, los residuos de diesel aún eran detectados en la zona. El problema de contaminación por hidrocarburos en el suelo se ve incrementado potencialmente por la baja temperatura y la baja actividad microbiana (Nedwell, 1999). Deprez *et al.*, (1999) y Stark *et al.*, (2003) han detectado una amplia distribución de contaminación en sedimentos terrestres y marinos por metales pesados e hidrocarburos en torno a dos vertederos abandonados en la costa este Antártica (Estación Casey, Australia). Poblet *et al.*, (1997) investigaron la concentración de metales pesados en líquenes antárticos cerca de la base científica Argentina Jubany, en la Isla Rey Jorge, señalando que existe una circulación atmosférica de metales traza relacionada a las actividades humanas desarrolladas en las bases científicas. Por otra parte, los asentamientos humanos de la Antártica también representan una amenaza para el ecosistema, ya que estas instalaciones podrían diseminar microorganismos que son propios del ser humano hacia el entorno (Bonnedahl *et al.*, 2005; Sellin *et al.*, 2000), debido a que la actual normativa de protección ambiental, contemplada en el Tratado Antártico, aun permite la descarga de residuos líquidos y alimenticios hacia el mar (González, *et al.*, 2013), los cuales son comúnmente consumidos por las aves locales (Bonnedahl *et al.*, 2005). Distintas

especies de pingüinos, que habitan en las cercanías de estos asentamientos, han presentado anticuerpos contra enfermedades que afectan a aves domésticas (Sellin *et al.*, 2000). También se han hallado microorganismos que infectan humanos alrededor de estas instalaciones (Bonnedahl *et al.*, 2005), en sus vertederos y en sus residuos líquidos (Sellin *et al.*, 2000). Además, se ha evidenciado que los asentamientos humanos son capaces de influir sobre los niveles de resistencia a antibióticos de los microorganismos acuáticos que se encuentran en sus alrededores, como también, de microorganismo que han sido aislados a partir de animales que habitan en las cercanías de estos lugares (Miller *et al.*, 2009). Bonnedahl *et al.* (2005) indican que los asentamientos humanos en la Antártica podrían significar un riesgo mayor que la presencia de turistas, ya que los turistas, por la normativa vigente en el Tratado Antártico, no pueden tener interacción directa con los animales, mientras que en las estaciones antárticas existe una permanente posibilidad de que los pingüinos estén expuestos al efecto de la actividad humana.

1.3. Península Fildes, Isla Rey Jorge, Antártica

Entre las islas ubicadas en la península Antártica destaca la isla Rey Jorge, donde se encuentra la península Fildes con aproximadamente 29 km² de superficie; funciona como centro logístico del continente antártico y en ella se concentra el mayor número de instalaciones como bases científicas y refugios (Tin *et al.*, 2009), además del tráfico aéreo y marítimo para el transporte de personas y el

abastecimiento de insumos para las operaciones de las bases científicas. La isla Rey Jorge es considerada un punto de desarrollo turístico y “hot spot” por la presencia de instalaciones de bases científicas y un aeródromo, que permite el arribo de aeronaves desde la ciudad de Punta Arenas, Chile, principalmente por ser una zona libre de hielo durante el verano (Bastmeijer *et al.*, 2008). En la península Fildes se encuentran las bases chilenas Presidente Eduardo Frei Montalva, Profesor Julio Escudero y Julio Ripamonti, además de la base Gran Muralla de China, Bellinghausen de Rusia y Artigas de Uruguay.

La presencia humana ha traído una serie de consecuencias al medio ambiente antártico, como por ejemplo el derrame de petróleo del Bahía Paraíso ocurrido en enero de 1989 cerca de la estación Palmer, Isla Anvers, donde se derramaron 600.000 L de combustible diesel, afectando en distintos grados diversos componentes del ecosistema, como por ejemplo aves, peces, almejas, macroalgas y sedimentos (Kennicutt *et al.*, 1991). Según Bargagli *et al.*, (2008) en el caso de los ecosistemas marinos antárticos con cadenas alimentarias extensas, se puede incrementar la biomagnificación de contaminantes como el metil mercurio (MeHg) y compuestos orgánicos persistentes; sin embargo, las relaciones tróficas y la biología de algunas especies aún no están adecuadamente estudiadas. La biota terrestre Antártica en general, no es de gran riqueza en especies (Convey y Stevens 2007); las comunidades de fauna consisten principalmente de invertebrados como por ejemplo Diptera, Acari, Collembola, Nematoda, Rotíferos, Tardigrada y Protista, y de las comunidades vegetales gran parte son criptógamas como musgos, hepáticas y

líquenes (Tin et al, 2009); de acuerdo a Peter *et al.*, (2008) se identificaron en la península Fildes 175 especies de líquenes y 40 especies de musgos, además de la existencia de dos plantas florales; el pasto antártico (*Deschampsia antarctica*) y el clavel antártico (*Colobanthus quitensis*). Por el contrario, el ecosistema marino antártico posee una riqueza de especies; noventa y dos especies de ballenas de barbas y dentadas migran a las áreas de alimentación cada año entre noviembre y mayo, al igual que una serie de especies de pingüinos y otras aves marinas (Bargagli, 2008). En términos generales, según Pörtner (2006) los organismos marinos de la Antártica se caracterizan por altos niveles de endemismo, gigantismo, longevidad y tasas de crecimiento lento, donde la cadena trófica pelágica en la zona se basa principalmente en el krill (Cornejo-Donoso & Antezana, 2008). Las actividades humanas pueden afectar a la flora y fauna en diferentes niveles de organización biológica; hábitats, comunidades, poblaciones e individuos, donde los impactos pueden ir desde leves a severos y de transitorios a largo plazo (Convey & Stevens, 2007). El ruido y la intrusión visual derivados de operaciones de las aeronaves también puede perturbar la fauna Antártica (Hughes *et al.*, 2007); de acuerdo con De Villiers (2008), los impactos de operaciones de aeronaves pueden tener desde un rango despreciable, es decir, no observable, a menor, como por ejemplo de cambios de conducta o incluso considerables, como por ejemplo aumentos en la frecuencia cardíaca y deserciones temporales del nido, señalando que un ave puede presentar cambios de comportamiento y en su fisiología como respuesta al estrés, que si se mantiene, podría tener un impacto negativo sobre la reproducción y la supervivencia. Además, se debe tener presente que se supone

generalmente una mayor vulnerabilidad de las especies locales que estuvieron aisladas y evolucionaron sin intervención humana (Bargagli, 2008). Algunos de los problemas que se han asociado a los asentamientos humanos en la Antártica (Bargagli, 2008; Tin *et al.*, 2009) son: derrames de combustibles, abandono y acumulación de residuos, contaminación por aguas residuales, destrucción física de la flora (por construcción de infraestructura y caminos), perturbación de la fauna (por ruido y luz), introducción de especies foráneas y extracción de recursos marinos. Estos estudios concluyen que las medidas de gestión adoptadas en la isla Rey Jorge son inadecuadas para los problemas ambientales existentes.



1.4. Resistencia a antibióticos en la Antártica

La presencia de sustancias antibióticas en la naturaleza se explica como un mecanismo de competencia y defensa entre los microorganismos; así, mientras unos sintetizan antibióticos, otros desarrollan mecanismos de resistencia, estableciéndose un equilibrio dinámico en la población. La Antártica, uno de los pocos lugares con escasa intervención humana, es una zona ideal para la búsqueda de bacterias que resistan la acción de sustancias antibacterianas (Domínguez, 2008). Se sabe que las bacterias poseen capacidad de adaptación a los diferentes ambientes y han desarrollado mecanismos de resistencia a los antibióticos, siendo los mecanismos de resistencia adquirida y transferible los más importantes por su potencial de diseminación (Thomas *et. al*, 2005). La resistencia intrínseca es consecuencia de

genes inherentes a los microorganismos, que se encuentran de forma natural en el cromosoma bacteriano y que determinan características estructurales o fisiológicas que confieren resistencia a los antimicrobianos, como sería el caso de la resistencia a algunos β -lactámicos por producción de la β -lactamasa *AmpC* en enterobacterias u otras bacterias Gram negativas o de multiresistencia por presencia de bombas de expulsión. Este tipo de resistencia es menos preocupante desde el punto de vista clínico por ser predecible. La resistencia adquirida que se observa en microorganismos que originalmente eran susceptibles a un antimicrobiano y que han sido capaces de desarrollar resistencia por mutaciones espontáneas o bien por adquisición de GR a partir de otros microorganismos, es la que se considera mayor problema. Todos los microorganismos pueden sufrir mutaciones durante el proceso de replicación de ADN, proceso que no está exento de errores, o por interacción con el medio ambiente, siendo la tasa de mutación en un gen concreto de 10^{-9} . Por azar algunas de estas mutaciones pueden generar alteraciones funcionales o fisiológicas que tengan como consecuencia resistencia a algunos antimicrobianos. En algunos casos, como en la resistencia a quinolonas por modificaciones de las topoisomerasas, una sola mutación puede ser suficiente para que se exprese un cierto grado de resistencia (Livermore, 2003). Se ha demostrado también que existen bacterias con un fenotipo mutador que son defectivas en el sistema MMR o *methyl directed mismatch repair* (sistema necesario para controlar la fidelidad en la replicación del ADN, que es capaz de reconocer errores en la transcripción del ADN y evitar la recombinación entre ADN no idénticos) en las que las mutaciones espontáneas son hasta 10^4 veces más frecuentes que en las bacterias normales. Se

ha observado que en bacterias sometidas a situaciones de estrés por déficit nutricional, exposición a antibióticos bacteriostáticos o concentraciones subinhibitorias de antibióticos, se activa la respuesta SOS y se incrementa la frecuencia de mutaciones (Martínez & Baquero, 2002). El mecanismo implicado es la expresión de una ADN polimerasa alternativa que copia el ADN con menor fidelidad. Se ha descrito que las quinolonas también pueden actuar del mismo modo y activan la respuesta SOS, con lo que pueden favorecer la aparición de mutantes resistentes no sólo a quinolonas sino también a otros antimicrobianos (Martínez & Baquero, 2002). Pero en la mayoría de los microorganismos la adquisición de resistencia no deriva de mutaciones espontáneas sino que es principalmente causada por adquisición de nuevos genes a partir de otros microorganismos.



Es importante mencionar que el fenómeno de resistencia no es exclusivo de bacterias de origen clínico, sino que también se ha informado en bacterias aisladas de ambientes naturales, como ríos y lagos (Lima-Bittencourt et al., 2007). El papel de estos organismos como posibles reservorios de GR ahora se ha convertido en un foco de atención (Canton et al., 2009; Martínez et al., 2009; Allen et al., 2010). Si se tiene en cuenta que la mayor parte de antibióticos son productos naturales, sintetizados por microorganismos medio ambientales o telúricos como *Streptomyces*, no es extraño que los genes que codifican resistencia a estas moléculas estén presente en muchas de las bacterias que los producen o en bacterias que comparten nicho ecológico, y que sea ésta la fuente de la cual los microorganismos sensibles que ocasionen infección en humanos adquieran determinantes de resistencia,

como estrategia para eludir la acción del tratamiento. En 1940 Waksman, el descubridor de la estreptomicina, sugirió que el verdadero papel ecológico de los antibióticos podría ser impedir el crecimiento de otros competidores en su mismo nicho ecológico. Los microorganismos productores de antibióticos deben dotarse de mecanismos de autodefensa y los que coexisten con ellos deben desarrollar mecanismos de protección, que en ambos casos suponen la aparición de GR, como sería el caso de las β -lactamasas que ya estaban presentes mucho antes de la introducción de los antibióticos β -lactámicos en la clínica. Se ha demostrado que los mecanismos de resistencia descritos en bacterias patógenas también están presentes en bacterias ambientales no productoras de antibióticos, los genes implicados en estos mecanismos muchas veces no presentaban expresión fenotípica de la resistencia pero probablemente desempeñarían una función biológica (Jayaraman, 2009). Un ejemplo de esto es el caso de las bombas de expulsión activa, cuya función sería la detoxificación de metabolitos tóxicos, biocidas, conservantes. Otro ejemplo sería el de los determinantes *qnr* que codifican resistencia transferible a quinolonas por protección de la ADN girasa y cuyos progenitores se encuentran en el cromosoma de numerosas bacterias acuáticas (*Shewanella algae*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*) (Strahilevitz *et al.*, 2009). Se ha sugerido que las proteínas Qnr pueden ser resultado de la evolución de otra proteína, McbG, producida por algunos microorganismos que necesitan proteger la ADN girasa de la acción de péptidos naturales como la microcina, la cual es sintetizada por ellos mismos (Strahilevitz *et al.*, 2009).

La identificación de la diversidad de genes que codifican para la resistencia a antibióticos β -lactámicos, tetraciclina y glicopéptidos, provenientes de sedimentos de *permafrost* con una antigüedad de 30.000 años, pone en evidencia que la resistencia antibiótica es un fenómeno natural, ampliamente distribuido en ambientes naturales (D'Costa *et al.*, 2011). Ejemplo de la evolución de genes ancestrales se observa en las β -lactamasas. Los genes que codifican para estas enzimas están presentes en plásmidos y se originaron hace más de dos millones de años, antes de la era antibiótica (D'Costa *et al.*, 2011). Investigaciones enfocadas en la historia evolutiva de los genes que codifican para el grupo OXY β -lactamasas en *Klebsiella oxytoca*, sugiere que la diversificación de los grupos OXY ocurrió mucho tiempo antes del uso extendido de antibióticos en la clínica (Fevre *et al.*, 2005). Por lo tanto, se podría hablar de dos “eras” en la evolución de la resistencia antibiótica. En la primera, las bacterias evolucionaron bajo diferentes presiones selectivas impuestas por el ambiente, las cuales incluyen la presencia de antibióticos naturales u otros tipos de compuestos tóxicos que, como resultado final, confirieron un fenotipo resistente intrínseco a las especies bacterianas (Baquero *et al.*, 2009). Y una segunda “era” que comprende la “era antibiótica”, cuando los antibióticos de origen sintético comenzaron a ser usados en concentraciones mucho más altas de aquellas comúnmente encontradas en el ambiente. Ésta se caracteriza por una rápida diseminación de determinantes de resistencia que han estado circulando en el pangenoma microbiano durante años y por lo tanto generando una evolución acelerada hacia la resistencia por parte de bacterias previamente susceptibles (resistencia adquirida) (Baquero *et al.*, 2009, D'Costa *et al.*, 2011).

Otro reservorio fundamental de GR es la microbiota comensal, principalmente del tracto gastrointestinal de humanos y animales, como se observa en un estudio realizado en Barcelona en el que se detectaron enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido en un 6,6% de las muestras de heces de humanos sanos y un elevado número de animales de granja (Mesa *et al.*, 2006). Este reservorio, con la consiguiente transferencia de determinantes de resistencia a patógenos, se considera una mayor amenaza que la presión selectiva directa de antibióticos. Es así como ya se ha extendido el concepto resistoma que introdujo Gerard Wright (McMaster University) para referirse al conjunto de GRA de todos los microorganismos, independientemente de su patogenicidad y su procedencia, y que son un reservorio potencial. Estos genes pueden ser incorporados en elementos móviles por tanto se hace más fácil su transferencia entre microorganismos (D'Costa *et al.*, 2006, Jayaraman *et al.*, 2009; Canton, 2009).

Aunque en la Antártica ha habido estaciones de investigación desde 1904, nuestro conocimiento de la diversidad en este medio ambiente frío es aún limitada (Tindall, 2004). Precisamente el aislamiento y las duras condiciones ambientales de la Antártica han permitido que muchos de los ecosistemas se hayan mantenido inalterados o tengan una escasa intervención humana (Camacho *et al.*, 2005). Aun así se sabe que numerosos tipos de actividades antropogénicas, incluyendo el uso de antibióticos en la ganadería y la acuicultura u otras aplicaciones no humanas y la eliminación de residuos, crean grandes reservas ambientales de bacterias resistentes y GRA (Doyle, 2006; Moura, 2010).

El papel predominante de las actividades humanas en la generación de reservorios ambientales de resistencia a los antibióticos, no puede negarse (Davies, 2010). El desarrollo de generaciones de bacterias resistentes a los antibióticos y su distribución en las poblaciones microbianas en toda la biosfera, son el resultado de la presión selectiva provocada por variadas aplicaciones humanas, en las cuales existe un excesivo y mal uso de antibióticos (Davies, 2010). Se conoce que el entorno alberga una importante diversidad de bacterias no cultivables y una potencial fuente de GR que pueden recombinarse con bacterias clínicamente importantes, difundidas en los reservorios ambientales. En un estudio realizado para establecer el impacto de una planta de tratamiento de aguas residuales, se observó que la eliminación de aguas residuales aumenta el depósito de mecanismos de resistencia en el medio ambiente, ya sea mediante la adición de GR o por la entrada de agentes selectivos para los fenotipos resistentes (Amos, 2014). Así también se han realizado estudios en hielo y nieve del Ártico, la Antártica, Asia Central, del Norte y del Sur y África, para evaluar la frecuencia de estos genes en entornos supuestamente no afectados por factores antropogénicos, y se ha podido observar una amplia distribución de los GR a antibióticos en muestras de diversos glaciares en Asia Central, Norte y Sur América, Groenlandia y África (Segawa *et. al*, 2013). Los GRA detectados fueron genes que se encuentran en bacterias de origen clínico (*aac(3)*, *bla_{IMP}*) y bacterias de origen agrícola (*strA* y *tetW*). Por el contrario, en los glaciares de la Antártica se observaba una escasa presencia de estos genes, estos resultados muestran distribución geográfica regional de los GRA, en donde se sugiere que éstos puedan estar asociados a una transmisión a través bacterias que son transportadas por partículas

en el aire y la migración aves (Segawa *et. al*, 2013). Cabe mencionar que las aves pueden ser vectores biológicos debido a que éstas presentan períodos migratorios en los cuales pueden adquirir bacterias resistentes a los antibióticos, ya sea de ambientes que están bajo la influencia humana o de otras aves con las que establecen contacto, recorriendo grandes distancias geográficas con estos GRA asociados con la presión selectiva producida por actividades antropogénicas (Allen, 2010). Estudios realizados en el Ártico lograron aislar una cepa de *Escherichia coli* multiresistente a antibióticos de uso clínico, en este trabajo se atribuyó esta diseminación de GRA a aves migratorias, las que viajaban desde zonas con influencia antropogénica hacia el territorio Ártico. Así también es importante mencionar que mamíferos marinos también se desplazan extensos trayectos para alimentarse, con lo cual existe alta posibilidad de diseminar GRA. Se ha informado que en mamíferos marinos y tiburones, en la costa norte de Estados Unidos, se aíslan bacterias resistentes y se observó que el 58% presentaba resistencia a al menos un antibiótico y el 43 % a más de un antibiótico (Rosenblatt-Farrell, 2009). A pesar de que el rol de los animales como vectores biológicos de bacterias resistentes a antibióticos no está bien estudiado existen reportes en donde se observa que tanto aves como mamíferos marinos son portadores de microorganismos asociados al hombre. En la literatura hay estudios que han aislado *Salmonella enteritidis* asociada a brotes de salmonelosis humana en pingüinos Papúa (*Pygoscelis papua*) y en pingüinos Adelia (*Pygoscelis adeliae*) muertos (Aronson *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha reportado *Pasteurella multocida*, agente etiológico de cólera aviar, en pingüinos penacho amarillo (Rockhopper en inglés) (*Eudyptes chrysocome*) (De

Lisle *et al.*, 1990), *Clostridium cadaveris*, *Clostridium sporogenes* y *Staphylococcus* en tejido subcutáneo y muscular de pingüinos Adelia, los cuales provocaron infecciones subcutáneas (Nievas *et al.*, 2007). En territorio Antártico se encuentran aves migratorias como skúas (*Catharacta skuas*) y gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*), las cuales se han asociado a la transmisión *Campylobacter jejuni* y *Yersinia* spp. debido a la intervención antropogénica en zonas pobladas por estas aves (Tuemmers *et al.*, 2011).

En la actualidad el estudio de microorganismos aislados de zonas extremas como son glaciares de Antártica y Ártico son de interés en todo el mundo por una serie de razones, incluyendo su estilo de vida psicrófila, su utilidad en biotecnología y también el comportamiento frente a antibióticos. Un estudio realizado en un glaciar pequeño situado en Parque Nacional de Sierra Nevada, estado Mérida, Venezuela, reveló un elevado porcentaje de cepas resistentes a altas dosis (100 µg/ml) de diferentes antibióticos, incluyendo ampicilina, penicilina, ácido nalidíxico, estreptomina, cloranfenicol, kanamicina y tetraciclina, en donde además se observó multiresistencia del 22,22 % de las cepas resistentes hasta cinco de los antibióticos ensayados (Ball, 2014). Estos hallazgos inesperados de cepas resistentes a los antibióticos en seres humanos y animales salvajes que viven en lugares remotos con mínima exposición a antibióticos (Ball, 2014; Bartoloni, 2009) demuestran que es necesario un mayor estudio para tener una mejor comprensión de este fenómeno, pudiendo ser de interés para controlar las estrategias asociadas a resistencia a los antibióticos.

En el año 2012 estudios enfocados en detectar determinantes de resistencia en el ecosistema antártico reportaron enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), particularmente cepas de *Escherichia coli* portadoras de genes *bla*_{CTX-M}, en muestras de agua colectadas en las proximidades de las Bases chilenas Bernardo O'Higgins (Isla Rey Jorge) y Arturo Prat (Isla Greenwich) (Hernández *et al.*, 2012). Por otra parte, estudios también han reportado bacterias multiresistentes (AMP, KAN, NAL, TET, STR) provenientes de fecas de pingüino colectadas en la Isla Torgensen (Miller *et al.*, 2009). Por otra parte, cerca de la Estación Palmer, que está situada en el extremo sur del Archipiélago Palmer (64°10'S, 61°50'W) se realizó un estudio en donde se tomó muestras en 4 sitios establecidos de acuerdo a su diferencia en posible contaminación humana, para ello definieron que las bacterias psicrófilas (crecimiento a 6 °C) eran nativos de las aguas antárticas, mientras que se supusieron que los mesófilos (crecimiento a 20 °C, pero no a 6°C) representaban organismos introducidos. La relación de bacterias (UFC/mL) aisladas en el rango de 20°C – 6°C se utilizó como una medida del impacto relativo al ecosistema de los microorganismos presuntamente introducidos. Esta relación fue más alta en el sitio más cercano a la estación de Palmer y disminuyó con la distancia de la misma, lo que sugiere que la presencia humana ha afectado a la microbiota natural del sitio. En relación a la resistencia a los antibióticos se observó que fue mayor entre los mesófilos que los psicrófilos y que ésta aumentaba con la proximidad a la estación de Palmer. Además, se observó mayor resistencia e incluso multiresistencia en los microorganismos mesófilos que en la población psicrófila. Con este estudio se concluyó que al parecer la resistencia a antibióticos es baja entre las

bacterias nativas de la Antártica, pero es aumentada por la intervención humana (Miller, 2009). Antelo (2013), en un estudio realizado en muestras terrestres de la Isla Rey Jorge obtuvo una colección de 250 aislamientos bacterianos capaces de crecer a 5 °C y 25 °C, de los cuales 70 de ellos exhibieron resistencia a aminoglicósidos, β -lactámicos y trimetoprim. En este estudio se pretendía detectar genes que codifican para integrasas clase 1, detectándose integrones clase 1 asociados a determinantes de resistencia a antibióticos y localizados en plásmidos conjugativos en enterobacterias psicrotolerantes, con una organización genética similar a la encontrada en cepas de origen clínico (Antelo, 2013). Otra investigación de importancia en donde se trabajó con 45 cepas bacterianas del lago Estrellas de Isla Rey Jorge y del lago Cráter de la Isla Decepción, éstas fueron expuestas a 30 antibióticos diferentes con el fin de examinar la prevalencia de cepas resistentes a los antibióticos en las bacterias antárticas. Entre las bacterias, 43 cepas fueron resistentes a al menos tres antibióticos, y 26 cepas fueron resistentes a 10 o más antibióticos diferentes y sólo dos bacterias eran susceptibles a todos los antibióticos, lo que sugiere que las bacterias antárticas son probablemente los reservorios para los GRA (Tam, 2015). Otros estudios en *E. coli* aisladas desde bahía con alta actividad antrópica muestran resistencia a estreptomicina y tetraciclina (Rabbia, 2016).

Teniendo en cuenta la importancia que puede llegar a tener la influencia humana en la resistencia bacteriana a antibióticos, es de suma importancia conocer y entender los ecosistemas microbianos antárticos antes de que puedan ser irreversiblemente

dañados por las actividades antropópicas. El aumento de la presencia humana en la Antártica ha acelerado la tasa de transferencia de la microbiota en la región del Polo Sur hacia el resto del mundo (Warwick, 2000). La mayoría de los visitantes de la Antártica son turistas comerciales, cuyas actividades se ven facilitadas por una industria turística sólida. En las últimas décadas, el turismo se ha consolidado como una actividad predominante en la Antártica, medida por el número de embarcaciones, las personas y los lugares donde se realizan (Antarctic and Southern Ocean Coalition, 2001, 2005, 2006, 2008; Naveen *et. al.*, 2001; Lamers *et. al.*, 2008; Lynch *et. al.*, 2010; Hall *et. al.*, 2010; Roura *et. al.*, 2010). Además, la industria del turismo se ha convertido en un actor influyente en el Sistema del Tratado Antártico (Haase *et. al.*, 2009). Entre 2007 y 2010 más de 150.000 turistas visitaron la Antártica, por lo tanto, la preocupación por su impacto sobre los ecosistemas antárticos ha aumentado (Tin, 2009).



Es por lo anteriormente mencionado y la importancia que ha adquirido la resistencia a antibióticos y transferencia de estos genes en ambientes naturales actualmente, que se hace interesante preguntarse si realmente la intervención humana puede aportar en esta resistencia a antibióticos de bacterias que son parte de la microbiota de la Antártica.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Las bacterias aisladas desde muestras de agua dulce obtenida en zonas cercanas a actividades antrópicas desarrolladas en Isla Rey Jorge, Antártica, presentan mayor diversidad de genes de resistencia a antibióticos que las bacterias aisladas en zonas sin influencia humana.



Evaluar la diversidad de genes de resistencia a antibióticos presentes en bacterias aisladas de muestras de agua dulce en zonas con distinto grado de intervención humana en Isla Rey Jorge, Antártica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el número de bacterias heterotróficas cultivables totales y con susceptibilidad disminuida a antibióticos en muestras de agua dulce provenientes de zonas con distinto grado de intervención humana.
2. Caracterizar fenotípicamente bacterias aisladas en muestras de agua dulce.
3. Evaluar la susceptibilidad a antibióticos de bacterias aisladas de muestras de agua dulce.
4. Identificar genes de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de muestras de agua dulce.



2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Selección de muestras

Las muestras de agua fueron recolectadas en la 49 Expedición Científica Antártica entre el 12 y 18 de enero de 2013, en Isla Rey Jorge, Bahía de Fildes, Antártica. Las muestras analizadas corresponden a muestras de agua obtenidas en lagunas de Península Fildes, Isla Rey Jorge. Las muestras (n=102) de agua se obtuvieron en 11 localizaciones y para el análisis se agruparon en 3 zonas distintas según grado de intervención humana que presentaban. Se designó como Zona A (n=48) al sitio de toma de muestras con influencia humana: M51 Río Langer (62°12'25.0"S, 58°57'49.0"W), M52 Laguna Langer (62°12'20.5"S, 58°57'51.0"W), M55 Laguna Las Estrellas (62°12'05.1"S, 58°58'19.3"W), M56 Laguna Las Estrellas-2 (62°12'03.4"S, 58°58'23.2"W), M59 Lago Kitiesh (62°11'42.1"S, 58°57'56"W), M60 Río desagüe Lago Kitiesh (62°11'42.1"S, 58°57'57.7"W), M70 Laguna pequeña camino a estanques rusos (62°11'41.1"S, 58°56'53.2"W). Como Zona B (n=20), al sitio de toma de muestras sin influencia humana pero con posible influencia animal: M41 Laguna Ripamonti (62°12'47.0"S, 58°56'25.8"W), Isla Ardley, y por último Zona C (n=34), al sitio de toma de muestras de lugar remoto sin intervención humana ni presencia animal permanente: M15 hielo glacial Collins (62°09'59.4"S, 58°51'15.8"W), M71

Laguna Jurásico ($62^{\circ}13'27.3''S$, $58^{\circ}59'54.7''W$), M74 Río Jurásico ($62^{\circ}13'47.5''S$, $58^{\circ}59'04.3''W$). Todos los puntos de toma de muestras se muestran en la Figura 1.

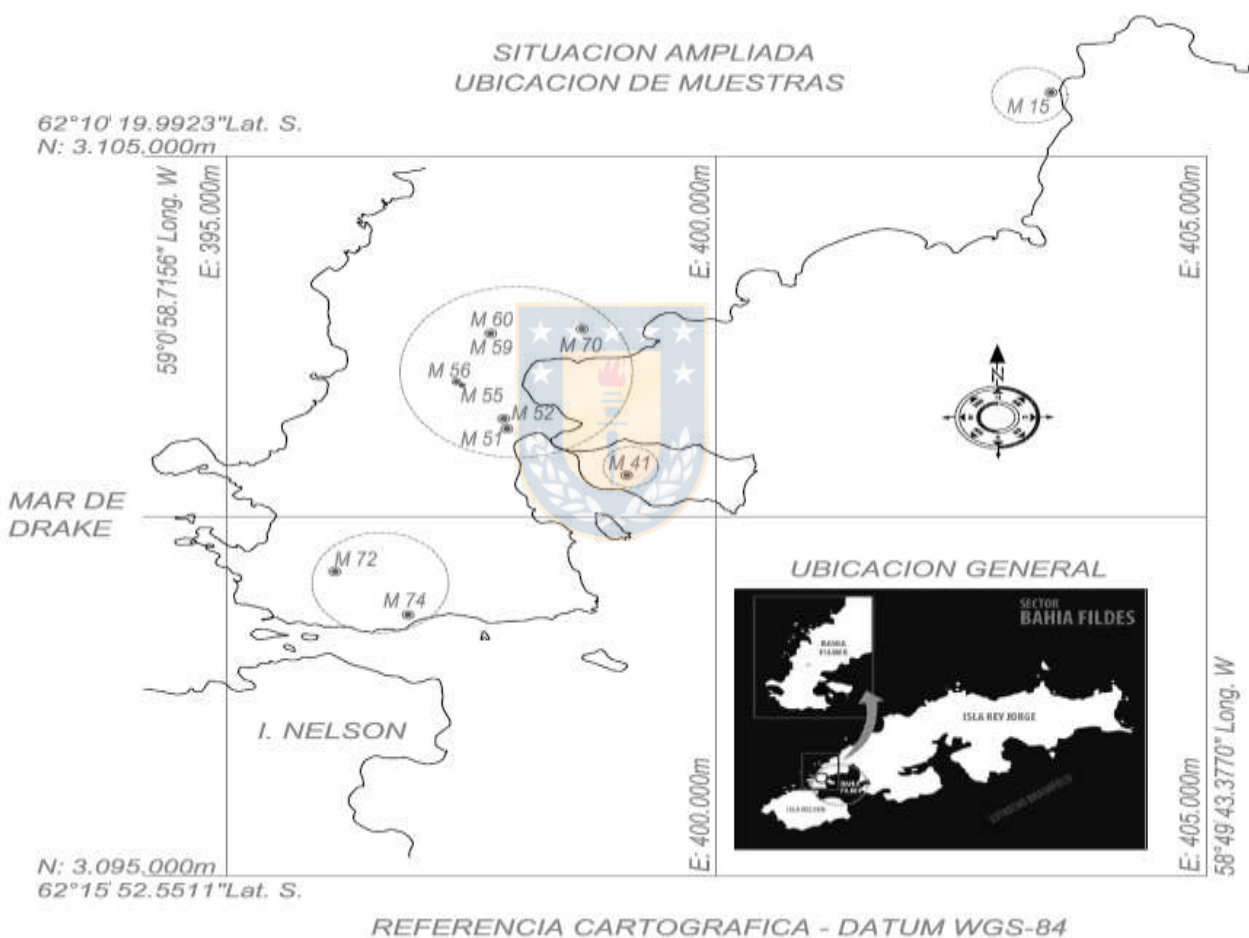


Figura 1: Sitios de muestreo en Península Fildes. **Zona A** lugares con influencia humana: M51, M52, M55, M56, M59, M60, M70; **Zona B** lugares sin influencia humana pero con posible influencia animal: M4; y **Zona C** de lugares remotos sin intervención humana ni animal: M15, M71, M74. Fuente: Samuel Vera- Ingeniero en Geomesura, 2017.

2.2. Recuento total de bacterias heterotróficas cultivables.

El recuento total de bacterias heterótrofas cultivables (RTBHC) se realizó por el método de diseminación en superficie de placas de agar R₂A (Difco) (Clesceri, 1998, Wayne, 2012) con adición de cicloheximida (50 µg/ml) a partir de muestra directa de agua. Las placas fueron sembradas en duplicado y un set se incubó a 4 °C por 15 días y otro set fue incubado a 15 °C por 7 días. La siembra se realizó en duplicado para cada set verificando el crecimiento bacteriano diariamente.



2.3. Recuento de bacterias heterotróficas con susceptibilidad disminuida a antibióticos.

El recuento de bacterias heterótrofas con susceptibilidad disminuida (RBHSD) se realizó por el método de diseminación en superficie en placas de agar R₂A (Difco) (Clesceri, 1998, Wayne, 2012) con adición de cicloheximida (50 µg) y cada uno de los siguientes antibióticos: tetraciclina (TET) (4 µg/mL), cefotaxima (CTX) (0,5 µg/mL), estreptomina (STR) (0,5 µg/mL), eritromicina (ERY) (4 µg/mL), sulfametoxazol (SUL) (128 µg/mL), kanamicina (KAN) (8 µg/mL), ciprofloxacina (CIP) (0,5 µg/mL) y trimetoprim (TMP) (4 µg/mL). Las placas fueron incubadas a 4 °C por

15 días y otro set de placas fue incubado a 15 °C por 7 días. Todo se hizo en duplicado y verificando el crecimiento bacteriano diariamente.

2.4 Análisis estadísticos de los recuentos bacterianos

Para el análisis de recuentos se calculó la media de los puntos de muestreo para la zona A y la Zona C. La Zona B sólo tenía un punto de muestreo por lo cual se trabajó con este valor.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software de IBM SPSS Statistics (v23.0, SPSS Inc®, Chicago, IL, Estados Unidos). La prueba t-Student para muestras independientes se utilizó para comparación de los promedios de las variables medidas en las diferentes temperaturas. Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y test de Tukey para pruebas de rangos múltiples con el fin de comparar los promedios de los parámetros analizados para los diferentes sitios de muestreo. Se estableció el valor $p < 0,05$ para la significación estadística.

2.5. Almacenamiento de cepas bacterianas y caracterización microscópica de cultivos bacterianos aislados.

A partir de las placas de recuento bacteriano (RTBHC y RBHSD) se seleccionaron colonias que presentaban diferentes morfotipos. Los cultivos puros obtenidos a partir de estas muestras fueron traspasados a caldo R₂A (Difco) para creación de un cepario, cuyo almacenamiento se realizó -80 °C en una mezcla conteniendo 350 µL de glicerol estéril (50% v/v) y 700 µL de un cultivo de toda la noche.

Los distintos morfotipos fueron caracterizados mediante Tinción de Gram según método modificado por Hucker y Conn (1923). Para los aislados Gram positivos se realizó prueba de catalasa y para los Gram negativos se les realizó la prueba de oxidasa y se evaluó la capacidad de fermentar glucosa.

2.6. Estudio de susceptibilidad a agentes antibacterianos

Se realizó mediante el método de difusión en agar de acuerdo a recomendaciones de *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2012), pero modificado, ya que se utilizó agar R₂A (Oxoid) en vez de Müller-Hinton y se incubó a 15 °C. Se emplearon discos comerciales de Ampicilina (AMP 10 µg, Oxoid), Cefalotina (CEF 30 µg, Oxoid),

Cefuroxima (CXM 30 µg, Oxoid), Cefotaxima (CTX 30µg, Oxoid), Ceftazidima (CAZ 30 µg, Oxoid), Cefepima (FEP 30 µg, Oxoid), Estreptomicina (STR 10µg, Oxoid), Kanamicina (KAN 30µg, Oxoid), Amikacina (AMK 30 µg, Oxoid), Gentamicina (GEN 10 µg, Oxoid), Ciprofloxacina (CIP 5µg, Oxoid), Tetraciclina (TET 30µg, Oxoid), Cloranfenicol (CHL 30 µg, Oxoid), Trimetoprim (TMP 5 µg, Oxoid) y Sulfonamida (SUL 3 µg, Oxoid). Como cepas controles se usó *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La presencia de halos de inhibición ≤ 14 mm de diámetro fue considerado como resistencia. El índice de resistencia antibiótica (IRA) fue calculado empleando la ecuación de Krumperman (1983).



2.7. Extracción de ADN.

La extracción de ADN a partir de cultivos bacterianos puros se realizó mediante una resina comercial InstaGene™ Matrix (Bio Rad) según las indicaciones del fabricante.

2.8. Detección genes de resistencia.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR convencional) en la cual se utilizaron partidores específicos para los GR pesquisados, de acuerdo al grupo de antibiótico al que los aislados presentaban resistencia (anexo 1). La mezcla de

reacción para el PCR se preparó en un volumen final de 10 μ l, en donde se utilizó 5 μ l KapaTaq PCR kit (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, MA, USA), 2 μ L de templado (50-200 ng/ μ L), 0,1 μ l de partidores a una concentración de 25 μ M y 3 μ l agua libre de nucleasas. La amplificación fue realizada en un termociclador modelo Veriti (Applied Biosystem®). La visualización de los productos de PCR se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1 % en búfer TAE 0,5x (40 mM TRIS, 20 mM NaAcO, 2 mM EDTA, pH 8) a 100 V por 35-45 min. Luego se tiñeron los geles por 10 min en bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) y se visualizaron por exposición en transiluminador de luz UV (Vilbert-Loumart TFP-M/WL).



2.9 Análisis riqueza y diversidad de genes en las distintas zonas.

Para comparar las diferentes zonas de muestreos, se construyó una matriz binaria en base al número de genes, para cada zona de estudio. Los análisis de escalado multidimensional (en inglés, multidimensional scaling MDS) fueron realizados mediante Primer 6 software package (Mellado *et al.*, 2011). Se determinó la riqueza y la diversidad de GR de las cepas bacterianas presentes en las 3 zonas de muestreo mediante los índices de Shannon-Wiener y de Simpson. La similitud genética de las cepas bacterianas se determinó mediante escalamiento dimensional paramétrico, basado en el coeficiente de similitud de Bray-Curtis.

2.10. Identificación cepas bacterianas aisladas

Se seleccionó 54 cepas de interés debido a la presencia de GR para identificarlas. Se realizó la identificación mediante el sistema de identificación Biolog (Biolog Inc.) según las indicaciones del fabricante, usando el software Microlog 1. Este sistema identifica sobre la base de la oxidación/fermentación de diversos compuestos y permite mediante comparación en una base de datos la identificación. Para considerar la identificación confiable se considera una probabilidad sobre el 95%, un SIM 0,5 y DIST 6,5.

A las cepas que no se logró identificar por el sistema de Biolog, se le realizó identificación molecular. Para ello se extrajo el ADN genómico mediante un kit comercial InstaGene™ Matrix (Bio Rad) según las indicaciones del fabricante. El ADN extraído se usó como templado para la amplificación por PCR con los partidores universales P0 y P6 (Weisburg, 1991; Di Cello, 1997-), específicos para fragmento intragénico del gen ARNr 16S del Dominio Bacteria. El producto de PCR de 1.400 pb fue secuenciado por Macrogen Corp. (Rockville, Maryland, USA). La secuencia obtenida se ingresó en el programa de alineamiento de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3. RESULTADOS

3.1. Recuento de bacterias heterotróficas cultivables totales y con susceptibilidad disminuida a antibióticos en muestras de agua dulce provenientes distintas zonas en estudio.

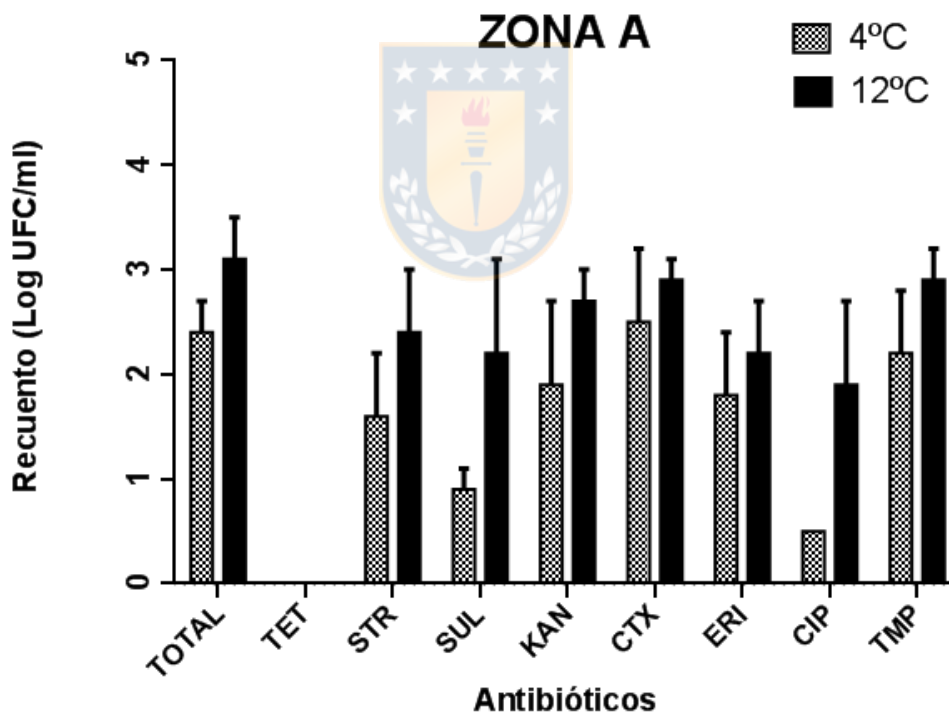


Figura 2. Recuento total de bacterias heterotróficas cultivables y recuento de bacterias heterotróficas con susceptibilidad disminuida a antibióticos a 4°C y 12°C en **Zona A**: con intervención humana (M59 y M60 a 300m de base Rusa, M55 y M56 a

500 m de Villa las Estrellas y M51 y M52 a 600 m de Villa las Estrellas). Fuente: Elaboración propia.

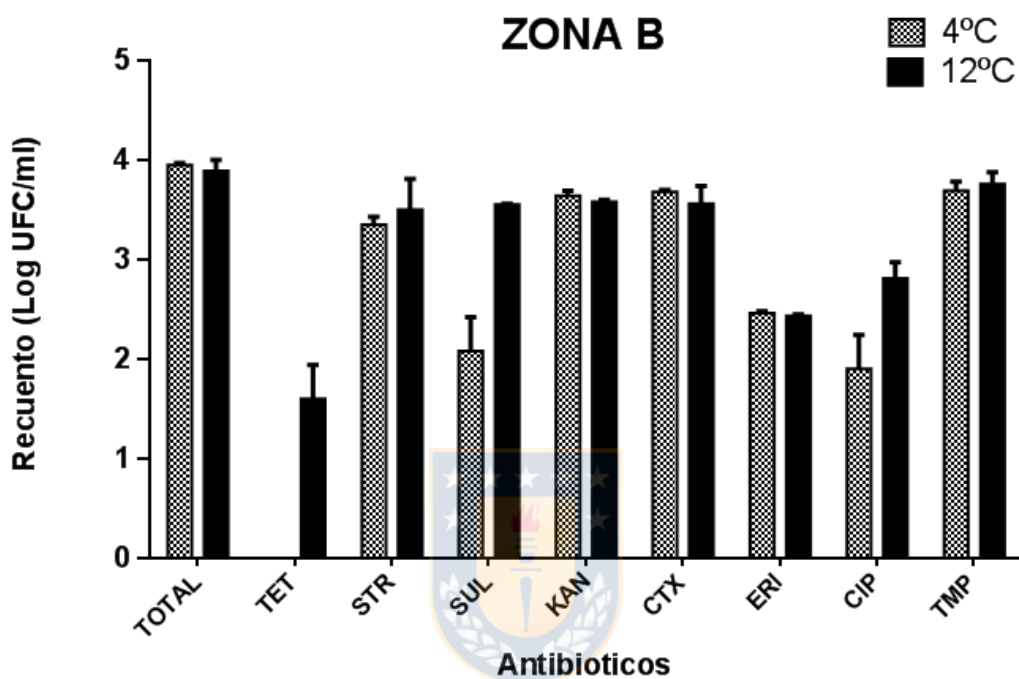


Figura 3. Recuento total de bacterias heterotróficas cultivables y recuento de bacterias heterotróficas con susceptibilidad disminuida a antibióticos a 4°C y 12°C en **Zona B**: zona sin intervención humana con posible influencia animal (M41 Laguna Ripamonti, isla Ardley). Fuente: Elaboración propia.

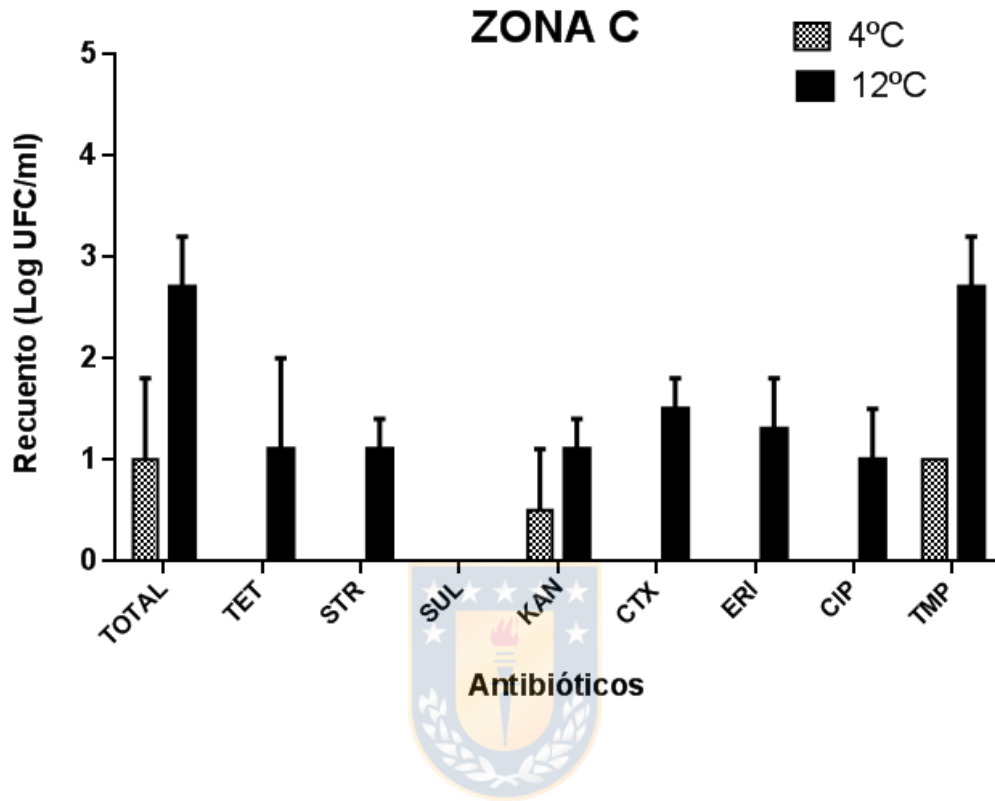


Figura 4. Recuento total de bacterias heterotróficas cultivables y recuento de bacterias heterotróficas con susceptibilidad disminuida a antibióticos a 4°C y 12°C en **Zona C**: zona sin intervención humana ni presencia animal permanente (M15 a 6,7 km de Villa las Estrellas). Fuente: Elaboración propia.

3.1.1. Comparación por zonas.

La comparación de las zonas se llevó a cabo mediante la prueba de ANOVA de 1 vía, la cual permitió comparar simultáneamente la media de los 3 grupos analizados, para verificar la hipótesis nula de igualdad de éstos, o en caso contrario, contrastar la hipótesis buscando las diferencias entre ellos. Para todos los recuentos, se asume la siguiente hipótesis, utilizando un intervalo de confianza de 95 % y un p -significativo de 0,05. Las hipótesis a contrastar fueron: $H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3$ y $H_1: \mu_1\neq \mu_2\neq \mu_3$, o al menos 2 medias poblacionales son distintas. Con μ_1 : media de Zona A, μ_2 : media de Zona B, μ_3 : media de Zona C.



Debido a que los datos no presentaban una distribución normal, éstos se ajustaron transformando su valor a una función logarítmica. Como primer análisis se llevó a cabo Test de Shapiro–Wilk, como test de normalidad. El supuesto de normalidad se cumple para los valores analizados. La prueba de homogeneidad de las varianzas poblacionales nos entrega un valor de $p > 0,05$, para todos los valores, lo cual permite aceptar la hipótesis de la igualdad de varianzas y proceder con la prueba ANOVA. La Tabla ANOVA muestra un nivel de significación >0.05 en SUL ($p=0.068$), ERI ($p=0,105$), CIP ($p=0,324$), TMP ($p=0,069$), por lo que se acepta la igualdad de las medias, es decir, no existen diferencias significativas entre los grupos; con lo cual se acepta la hipótesis H_0 , de igualdad de medias. Por otra parte, se observó un nivel de

significación $< 0,05$ para las muestras de RECuento TOTAL ($p=0.007$), KAN ($P=0,026$), CTX ($p=0,004$) y STR ($p=0,008$) por lo que se rechaza la hipótesis H_0 , de igualdad de medias, y se acepta la hipótesis H_1 , de diferencia de medias en estos grupos. Para identificar las diferencias entre los grupos, se realizó una prueba post-hoc como el Test HDS Tukey, el cual entregó los valores en una Tabla comparativa, con sus respectivos niveles de significancia. De acuerdo con la Tabla del Test HDS Tukey, se obtuvieron diferencias significativas del recuento total entre la zona A y B; B y C con una significancia estadística $< 0,05$; con un valor $p=0,019$ y $0,005$ respectivamente, así también, ocurre para los recuentos con STR $p=0,017$ y $0,008$ y diferencias entre medias entre Zona B y C para el recuento con KAN con un valor de $p=0,021$; y finalmente diferencias entre los grupos de recuento con CTX entre zonas A y C; B y C con un valor $p=0,036$ y $0,003$.



3.1.2. Comparación por temperaturas.

Para todos los recuentos, se asume la siguiente hipótesis, utilizando un intervalo de confianza de 95 % y un p -significativo del 0,05. En donde, H_0 : Recuentos a $4^{\circ}\text{C} = \text{Recuentos a } 12^{\circ}\text{C}$ y H_1 : Recuentos a $4^{\circ}\text{C} \neq \text{Recuentos a } 12^{\circ}\text{C}$. En la prueba de muestras independientes se observa que la probabilidad asociada al estadístico de la prueba de Levene es >0.05 , en Recuento total ($p=0,519$), SUL ($p=0,575$), STR ($p=0,630$), KAN($P=0,116$), CTX($P=0,586$), ERI ($p=0,879$), CIP ($p=0,270$), TMP ($p=0,029$), lo que indica homocedasticidad u homogeneidad de varianza, requisito

fundamental para el uso de la Prueba de T o t-Student. Este test nos entregó un valor de significancia bilateral >0.05 para RECLOG ($p=0,100$) STR ($p=0,627$), KAN ($p=0,208$), CTX ($p=0,662$), ERI ($p=0,951$) y CIP ($p=0,351$), lo que nos permite asumir la compatibilidad de la hipótesis, por lo tanto, la igualdad de las varianzas poblacionales observadas. Por otra parte se encuentran valores $<0,05$ para Recuento con SUL ($p=0,041$) y TMP ($p=0,044$), con lo cual rechazamos la H_0 de igualdad y aceptamos la H_1 de diferencias entre los 2 grupos (Figura 2, 3 y 4).

3.2. Caracterización fenotípica de bacterias aisladas en muestras de agua dulce.



De acuerdo a las características macroscópicas de las colonias bacterianas se seleccionaron 102 aislados. En la Zona A, 48 morfotipos; en la Zona B, 20 morfotipos y en la Zona C, 34 morfotipos. En la zona A, B y C se observaron colonias de color blanco, beige, naranja, rosadas, rojas y amarillas. Además, se logró aislar en la zona A una colonia con pigmento violeta (Figura 5). En relación a la fermentación de glucosa se observó que todas las bacterias aisladas de las distintas zonas eran no fermentadoras. De acuerdo a la tinción Gram (Figura 6), se obtuvo que en las 3 zonas la mayoría de los aislados corresponden a Gram negativos y un número menor de aislados Gram positivos. No encontrándose aislados Gram positivos en la zona B.

Tabla 1: Caracterización fenotípica de las bacterias aisladas en las distintas zonas. Fuente: Elaboración propia.

ZONA	Gram (-), oxidasa positiva	Gram (-), oxidasa negativa	Gram (+), catalasa positiva	Gram (+), catalasa negativa
A	27	15	5	1
B	16	4	-	-
C	11	12	7	4

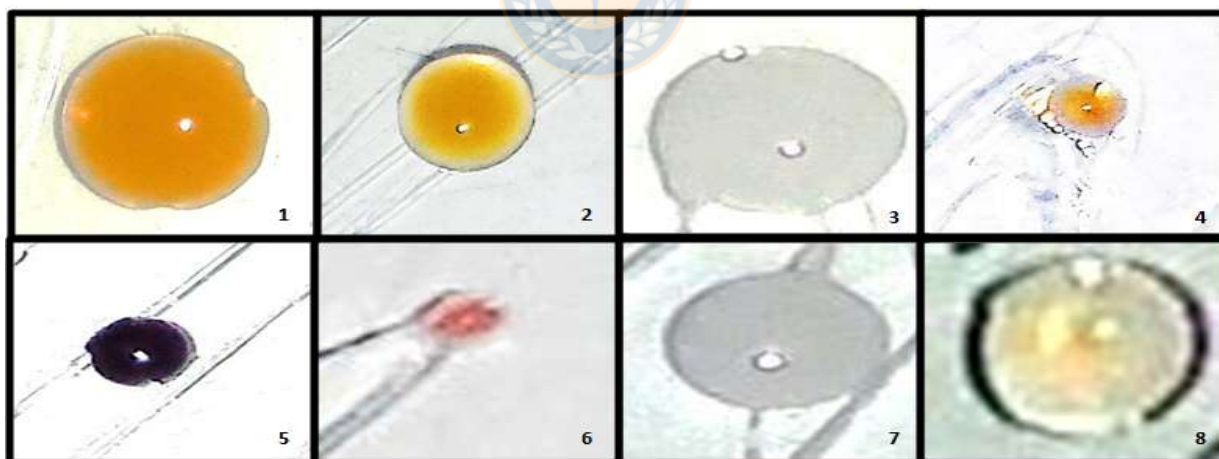


Figura 5: Colonias bacterianas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas de las zonas A (1, 5, 6, 7), B (8) y C (2, 3 y 4) en Península Fildes, Isla Rey Jorge, Antártica. Fuente: Elaboración propia.

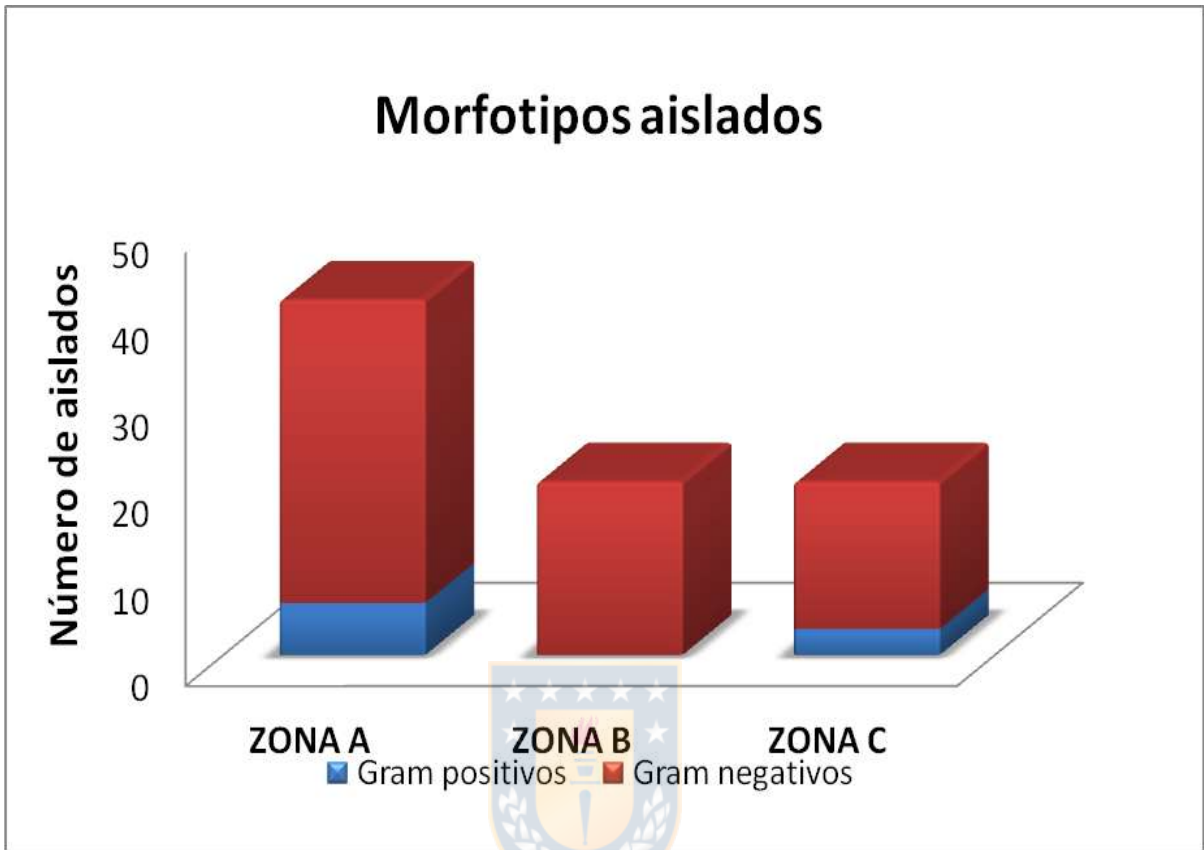


Figura 6: Número de bacterias Gram positivas y Gram negativas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas de las zonas A, B y C en Península Fildes, Isla Rey Jorge, Antártica. Fuente: Elaboración propia.

3.3. Susceptibilidad a antibióticos de bacterias aisladas de muestras de agua en estudio.

3.3.1. Frecuencia de halos de inhibición y perfiles de resistencia

A los 102 aislados se les determinó la actividad antibacteriana de 15 antibióticos. Los resultados revelaron que en la zona A las bacterias Gram negativas (N=42) se distribuyeron en, 18 aislados presentaron resistencia entre 1 y 5 antibióticos, 15 aislados entre 6 y 10 antibióticos y 6 aislados presentan resistencia a más de 10 antibióticos y sólo 3 aislados fueron susceptible a todos los antibióticos, (Figura 7). En relación a las bacterias Gram positivas (N=6) se observó que 4 aislados son resistentes entre 1 y 5 antibióticos, y 1 aislado resistente a 6 antibióticos y sólo 1 aislado presenta susceptibilidad a todos los antibióticos (Figura 8). Se observa, además, que 44/48 aislados de la zona A presentan resistencia a antibióticos β -lactámicos y aminoglicósidos, principalmente (Tabla 1). En la zona A se presenta un índice IRA de 0,05.

En la Zona B, zona que está habitada permanentemente por animales, los 20 aislados Gram negativos presentaron resistencia a lo menos a 2 antibióticos. Se identificó 4 aislados con resistencia a 2 y 5 antibióticos, 13 aislados con resistencia entre 6 y 10 antibióticos y 3 aislados presentaron resistencia a más de

10 antibióticos (Figura 9). Se observa que en la zona B de los 20 aislados, 17 presentan resistencia a antibióticos β -lactámicos y aminoglicósidos (Tabla 1). También se observó 14 aislados con resistencia a cloranfenicol. El índice IRA en la zona B es 0,07.

En la Zona C, la cual se considera una zona remota debido a que no existe presencia permanente de humanos y animales se estudió 34 aislados. Se identificó 27 aislados Gram negativos, de los cuales 16 fueron susceptibles a los 15 antibióticos ensayados, 10 aislados con resistencia 2 y 5 antibióticos y 1 aislado presentó resistencia a 9 antibióticos (Figura 10). En cuanto a las 7 aislados Gram positivos se observó que 3 eran susceptibles a todos los antibióticos y 4 eran resistentes a menos de 6 antibióticos (Figura 11). En la zona C predomina la resistencia antibióticos β -lactámicos (Tabla 2). El índice IRA en la zona C es 0.

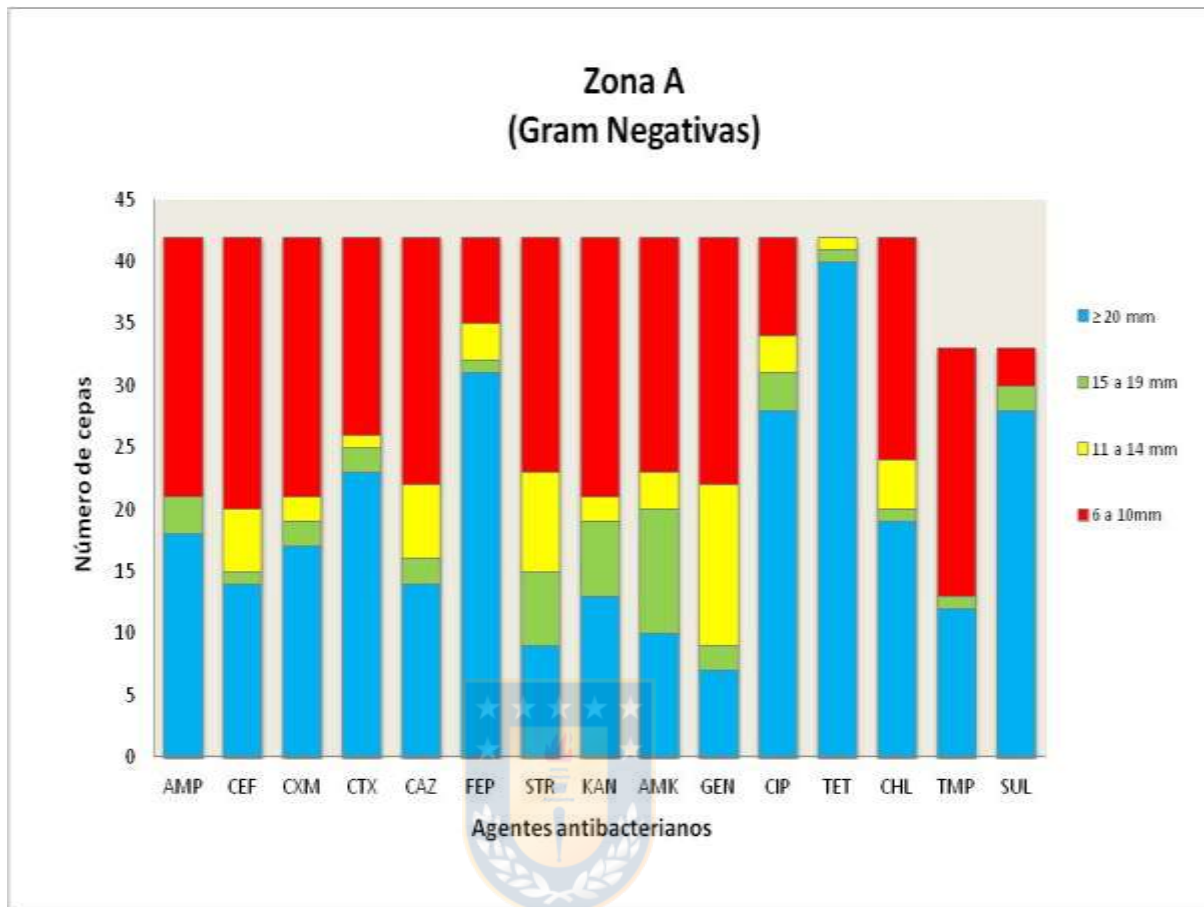


Figura 7. Frecuencia de halos de inhibición (según rangos definidos) de 42 bacterias Gram negativas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en Zona A, con intervención humana (M59 y M60, M55 y M56 M51 y M52) a los distintos antibióticos ensayados. Fuente: Elaboración propia.



Figura 8. Frecuencia de halos de inhibición (según rangos definidos) de 6 bacterias Gram positivas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en Zona A, con intervención humana (M59 y M60, M55 y M56 M51 y M52) a los distintos antibióticos ensayados. Fuente: Elaboración propia.

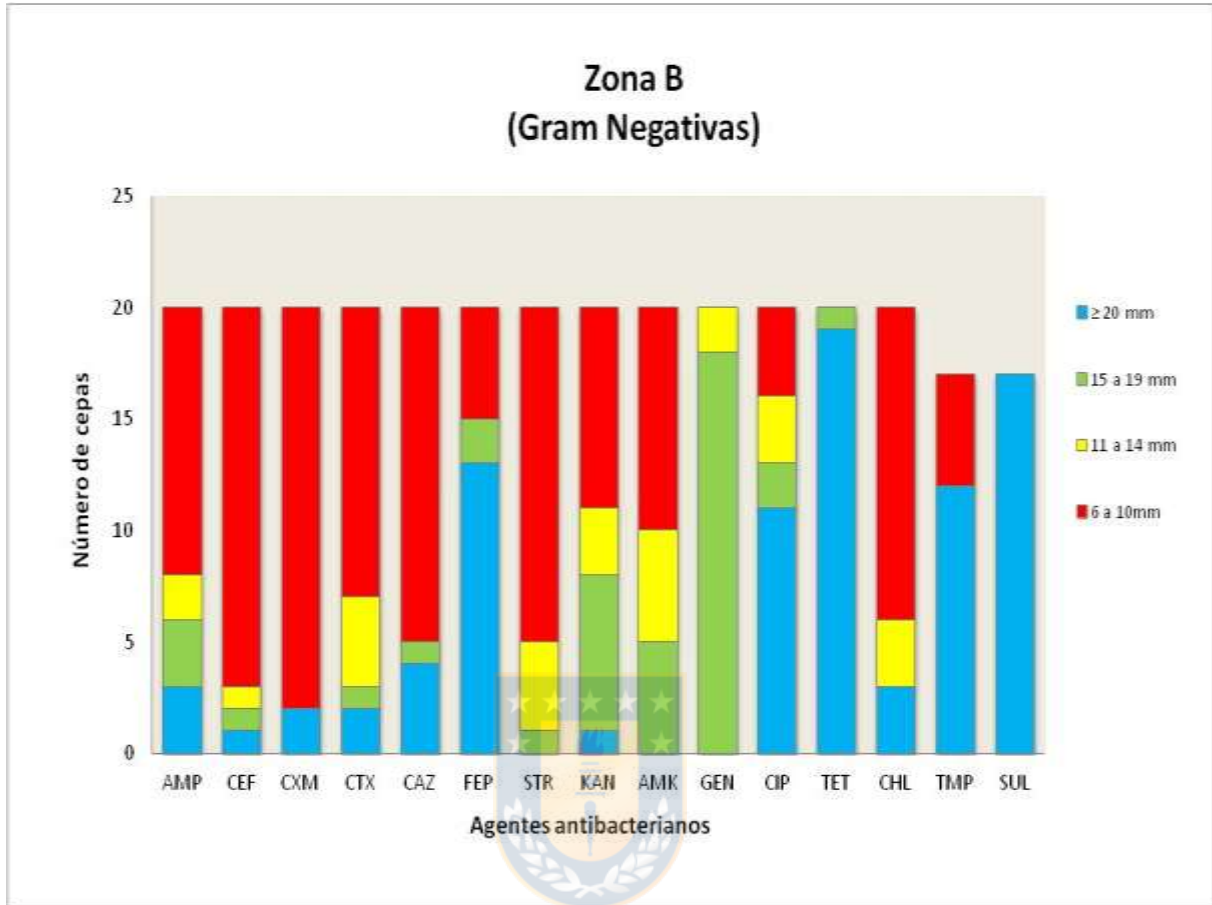


Figura 9. Frecuencia de halos de inhibición (según rangos definidos) de 20 bacterias Gram negativas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en Zona B: sin intervención humana con posible influencia animal (M41 Laguna Ripamonti, isla Ardley) a los distintos antibióticos ensayados. Fuente: Elaboración propia.

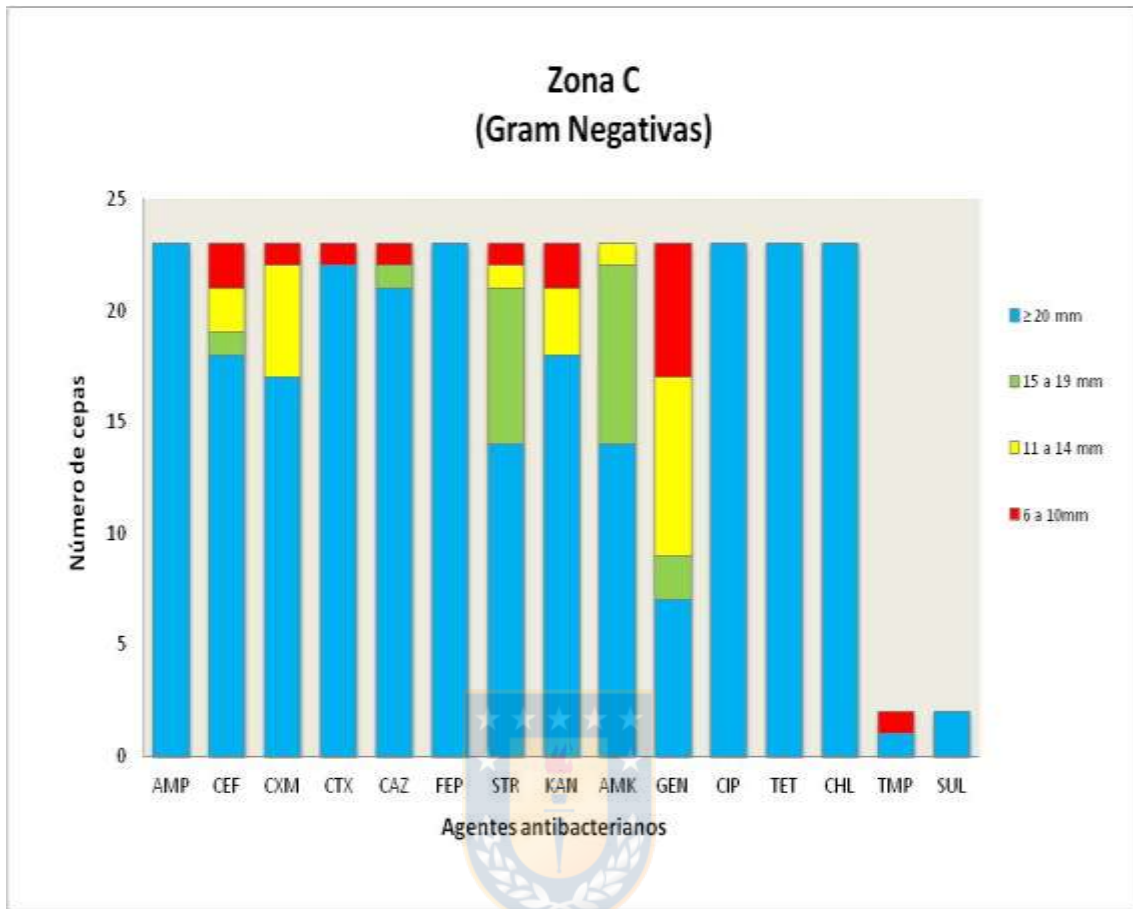


Figura 10. Frecuencia de halos de inhibición (según rangos definidos) de 23 bacterias Gram negativas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en Zona C: zona sin intervención humana ni presencia animal, (M15 a 6,7 km de Villa las Estrellas) a los distintos antibióticos ensayados. Fuente: Elaboración propia.

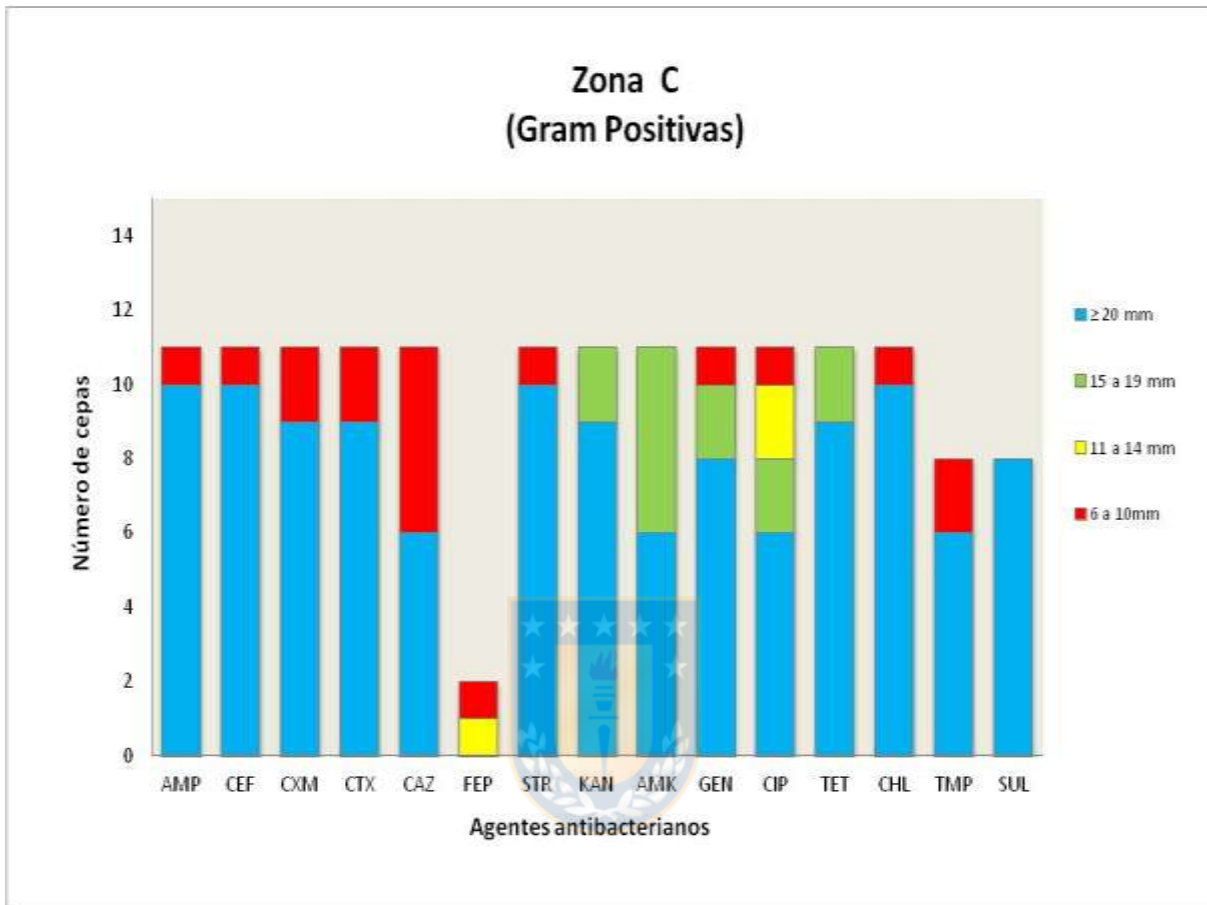


Figura 11. Frecuencia de halos de inhibición (según rangos definidos) de 11 bacterias Gram positivas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en Zona C: zona sin intervención humana ni presencia animal, (M15 a 6,7km de Villa las Estrellas) a los distintos antibióticos ensayados. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2: Perfiles de resistencia a antibióticos de cepas aisladas de las distintas zonas estudiadas. Fuente: Elaboración propia.


Perfiles resistencia a antibióticos												N°aislados		
												Zona A N=48	Zona B N=20	Zona C N=34
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	STR	KAN	AMK	GEN	CIP	CHL	TMP	1	0	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	FEP	STR	KAN	AMK	GEN	CIP	CHL	0	1	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	FEP	STR	KAN	AMK	GEN	CHL		2	1	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	FEP	STR	KAN	AMK	GEN	CIP		0	1	0
AMP	CEF	CXM	CTX	STR	KAN	AMK	GEN	CHL	TMP	SUL		1	0	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	STR	KAN	AMK	GEN	CIP	TMP		1	0	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	STR	KAN	AMK	CIP	CHL	TMP		1	0	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	FEP	STR	KAN	AMK	GEN			1	1	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	FEP	STR	KAN	AMK	CHL	TMP		1	0	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	STR	KAN	AMK	GEN	TMP			0	1	0
CEF	CTX	CAZ	STR	KAN	AMK	GEN	CHL	TMP				1	0	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	FEP	STR	KAN	AMK	GEN			0	1	0
AMP	CEF	CXM	CTX	STR	AMK	GEN	CHL	TMP				0	1	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	FEP	STR	CHL	TMP				0	0	1
AMP	CXM	CAZ	FEP	STR	KAN	AMK	GEN	CIP				1	0	0
AMP	CXM	CAZ	STR	KAN	AMK	GEN	CIP					0	2	0
STR	KAN	AMK	GEN		CHL	TMP	SUL					1	0	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	FEP	CHL	TMP					2	0	0
AMP	CEF	CXM	CTX	STR	GEN	CHL	TMP					1	2	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	STR	GEN	CHL					0	1	0
CEF	CXM	CTX	CAZ	STR	GEN	CIP	CHL					0	1	0
CEF	CXM	CTX	CAZ	KAN	GEN	CHL						0	1	0
CEF	CXM	CTX	CAZ	STR	GEN	CHL						0	1	0
AMP	CEF	CXM	CTX	GEN	CHL	TMP						1	0	0
AMP	CXM	STR	KAN	AMK	GEN	CIP						1	0	0
AMP	CEF	CXM	CAZ	FEP	CHL							1	0	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CHL	TMP							1	1	0
AMP	CEF	CXM	CTX	CAZ	TMP							1	0	0
CEF	CXM	CTX	CAZ	GEN	TMP							1	0	0
AMP	CEF	CXM	AMK	CHL	TMP							1	0	0
CEF	CXM	CAZ	STR	GEN	CHL							0	1	0
STR	KAN	AMK	GEN	TMP	SUL							1	0	0
CEF	CXM	CAZ	AMK	CHL								0	1	0
CEF	CAZ	STR	KAN	AMK								1	0	1
CEF	CXM	CAZ	GEN	CHL								0	1	0
CAZ	STR	KAN	AMK	GEN								1	1	0
CXM	CAZ	KAN	TMP									1	0	0
STR	KAN	AMK	GEN									1	0	0
CXM	CTX	CAZ	CIP									0	0	1
CAZ	KAN	GEN	CIP									1	0	0
KAN	AMK	GEN	CIP									1	0	0
CEF	CXM	CAZ	CHL									1	0	0
AMP	CEF	CXM	TMP									1	0	0
AMP	CEF	CXM	KAN									1	0	0
AMP	CEF	CTX	FEP									1	0	0
AMP	CAZ	CHL										1	0	0
AMP	CEF	CHL										1	0	0
KAN	AMK	CIP										1	0	0
CAZ	TMP											0	0	1
CAZ	GEN											2	0	1
CAZ	KAN											0	0	1
AMK	TMP											1	0	0
KAN	TMP											1	0	0
GEN	CHL											0	1	0
AMP	CEF											1	0	0
STR	GEN											0	0	1
CEF	GEN											0	0	1
CEF	KAN											0	0	1
CXM	CTX											0	0	1
STR												2	0	0
CAZ												1	0	1
GEN												0	0	4
SIN RESISTENCIA												4	0	19



3.4. Detección de mecanismos de resistencia.

La pesquisa de GRA se realizó a todas las cepas que presentaban resistencia a algunos de los antibióticos (≤ 14 mm de diámetro). Con este criterio se seleccionaron 38 aislados de la Zona A, 15 de la Zona B y 7 de la Zona C. En total se investigaron 30 GRA.

3.4.1. Detección de genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos.



En la zona A, de 15 GR a antibióticos β -lactámicos investigados, se detectaron 4 GR, los cuales fueron *bla*_{PER2} (15,8 %), *bla*_{CTX-M2} (21,1 %), *bla*_{DHA(pAmpC)} (7,9 %), *bla*_{FOX(pAmpC)} (2,6 %). En cambio, en la zona B se detectaron 2 GRA, *bla*_{CTX-M2} y *bla*_{DHA}, en 6,7 % y 26,7 %, respectivamente. En la zona C, sólo se detectó *bla*_{CTX-M2} en 14,3 % de los aislados estudiados (Tabla 3). Los genes *bla*_{GES}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMIR-1/EBC}, *bla*_{AmpC} cromosomal, *bla*(*Chy-1*), *bla*(*Chy-2*), *bla*_{PER2}, *bla*_{CTX-M8}, *bla*_{CTX-M9}, *bla*_{CTX-M25} no fueron detectados en las cepas analizadas de ninguna zona.

3.4.2. Detección de genes de resistencia a Quinolonas.

Los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* y *qnrC* no fueron detectados en los aislados analizados de ninguna zona.

3.4.3. Detección de genes de resistencia a Fenicoles

Los genes *floR*, *cmIA*, *catIII* no fueron detectados en los aislados analizados de ninguna zona.

3.4.4. Detección de genes de inhibidores de la síntesis del ácido fólico.



Los genes *drfA1*, *drfA6*, *drfA1* y *sul1*, *sul 2* y *sul3* no fueron detectados en los aislados analizados de ninguna zona.

3.4.5. Detección de genes de resistencia a Aminoglicósidos.

El gen *aac(C2)* no fue detectado en los aislados analizados de ninguna zona, mientras que el gen *aac 6'lb* se detectó en 100_% de los aislados analizados en todas las zonas (Tabla 3).

Tabla 3: Número de cepas bacterianas aisladas de muestras de agua dulce obtenidas en distintas zonas en Isla Rey Jorge, Bahía de Fildes, Antártica, portadoras de algún gen de resistencia a antibióticos. Fuente: Elaboración propia.

ZONA	GEN	CEPAS POSITIVAS / CEPAS
		ANALIZADAS
Zona A	<i>bla_{CTX-M2}</i>	7/38
	<i>bla_{DHA}</i> (pAmpC)	4/38
	<i>bla_{FOX}</i> (pAmpC)	1/38
	<i>bla_{PER-2}</i>	6/38
	<i>aac 6'lb</i>	38/38
Zona B	<i>bla_{CTX-M2}</i>	1/15
	<i>bla_{DHA}</i> (pAmpC)	4/15
	<i>aac 6'lb.</i>	15/15
Zona C	<i>bla_{CTX-M2}</i>	1/7
	<i>aac 6'lb</i>	7/7

3.4.6. Riqueza y la diversidad de genes de resistencia.

De acuerdo los análisis estadísticos detallados en metodología se observa que la zona A posee una mayor riqueza, diversidad y menor dominancia, por sobre las zonas B y C (Tabla 3). En la figura 12 se muestra los 3 puntos correspondientes a los 3 grupos de muestreos por separado, éstos presentan diversos niveles de similitud entre sí, siendo el más disímil el punto A con el punto C, lo cual se podría explicar por la presencia o intervención antrópica en la zona A. La zona B muestra una similitud de 73 % y 74 %, con la zona C y A, respectivamente. Esto podría estar indicando un gradiente de distribución de GR desde las zonas con mayor actividad antrópica hacia las menos intervenidas.



Tabla 4: Índices de Shannon-Wiener y de Simpson para determinar la riqueza de genes en las diferentes zonas de muestreo. Zona A (influencia humana), B (influencia animal) y C (Zona Remota). Fuente: Elaboración propia.

ZONAS	RIQUEZA	I. SHANNON	I. SIMPSON (D)	I. SIMPSON (D)
A	7	0,458	0,525	0,475
B	4	0,222	0,765	0,235
C	2	0,039	0,964	0,036

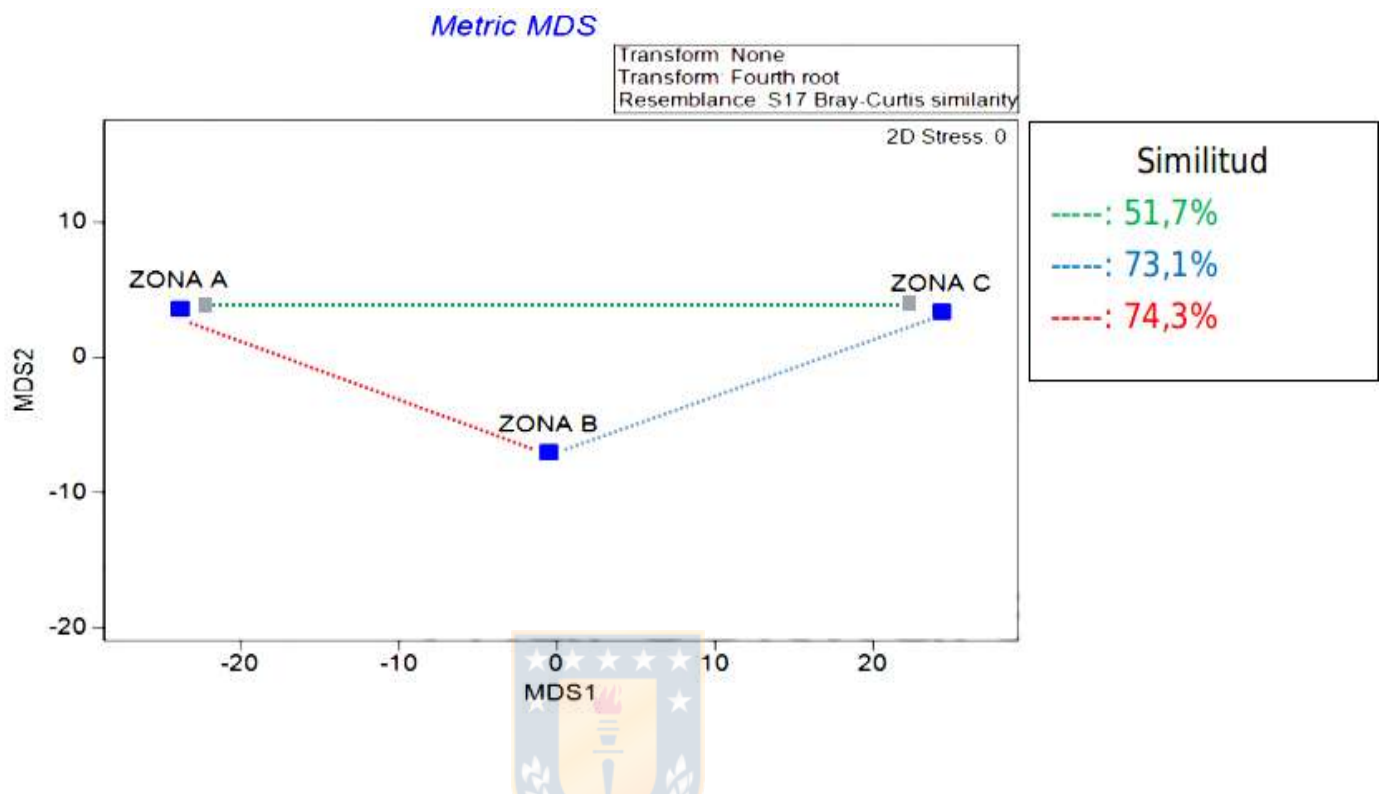


Figura 12: Análisis de Escalamiento Multidimensional no paramétrico (MDS) basado en la detección de genes de resistencia a antibióticos en las Zona A (influencia humana), B (influencia animal) y C (Zona Remota). Fuente: Elaboración propia.

3.5. Identificación de cepas bacterianas

Para identificar las cepas bacterianas, se seleccionó 39 aislados de acuerdo a la diversidad de genes que estos presentaban y a las características morfológicas de las colonias. En la identificación de cepas se observó que el sistema de Biolog no

permitió llegar a la identificación de la gran mayoría de las cepas, siendo posible identificar en forma confiable (>95% PROB) sólo 1 aislado en la Zona A, 3 aislados de la Zona B y ninguno de la Zona C. En cuanto a la identificación molecular se logró amplificar y obtener una secuencia de aproximadamente 1400 pb sólo para 10 aislados, pudiéndose identificar por secuenciación del gen ARNr 16S sólo 7 aislados en la Zona A, 1 en la Zona B y 2 en la Zona C (Tabla 4).

En la zona A mediante el sistema Biolog se logró identificar *Pseudomonas fluorescens* (100 %). Así también se observa que con porcentajes menores (< 90%), por lo tanto no confiable, se observan principalmente bacterias del género *Pseudomonas* y *Flavobacterium*. Mediante secuenciación del gen 16S ARNr y el uso del programa de búsqueda de secuencias BLAST nt (que utiliza la base de datos pública de nucleótidos GenBank), se observó un alto porcentaje (>96%) y score de identidad (>98%) en la identificación de géneros *Flavobacterium* sp. y *Pseudomonas* spp. Cabe mencionar que en el caso del aislado 51R412-3 mediante Biolog se identificó como *Flavobacterium johnsoniae*, pero no se obtuvo un porcentaje confiable, es por ello que se hizo secuenciación del gen 16S ARNr y se obtuvo como resultado 100 % y score de identidad 99% con *Flavobacterium* sp. Esto por tanto nos indica que el sistema de Biolog no es totalmente favorable para realizar identificación de cepas ambientales y mucho menos de zonas extremas, ya que la base de datos que ésta utiliza no tiene integradas las cepas antárticas.

En la zona B mediante Biolog se identificó a *P. fluorescens* (96 %), *Sphingobacterium thalpophilum* (100 %) y *Pseudomonas tolaasii* (100 %). Así también, se observa que con porcentajes menores (< 90 %) por lo tanto no confiable se observan bacterias del género *Brevundimonas* sp., *Janthinobacterium* y *Pseudomonas* sp. Mediante secuenciación del gen 16S ARNr se identificó un aislado con 90 % y score de identidad de 98 % correspondiente a *Pseudomonas* sp.

En la zona C se identificó mediante secuenciación del gen 16S ARNr 2 aislados correspondientes a *Janthinobacterium* sp. y *Hymenobacter* sp.



Tabla 5: Identificación de aislados de muestras de agua dulce obtenidas en distintas zonas (A, B y C) en Isla Rey Jorge, Bahía de Fildes, Antártica, portadoras de algún gen de resistencia a antibióticos. Fuente: Elaboración propia.

	BIOLOG				BLAST (16S)			
	GEN	Identificación	PROB	SIM	DIST	QUERY COVER	IDENT	E VALUE
Zona A	51R112-3	aac 6'Ib	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	0.213	13.93	s/t	s/t	s/t
	51R912-10	aac 6'Ib	<i>Flavobacterium sp.</i>	s/t	s/t	92%	97%	0
	51R912-3	aac 6'Ib	<i>Flavobacterium sp.</i>	s/t	s/t	96%	96%	0
	51R912-8	aac 6'Ib	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.199	13.73	s/t	s/t	s/t
	51R912-9	aac 6'Ib	<i>Sphingomonas sanguinis</i>	0.112	17.92	s/t	s/t	s/t
	51R412-3	aac 6'Ib	<i>Flavobacterium johnsoniae / Flavobacterium sp.</i>	0.451	6.62	100%	99%	0
	52R012-5	aac 6'I, bla _{PER-2} , pAmpC DHA	<i>Pseudomonas marginalis</i>	0.445	6.51	s/t	s/t	s/t
	52R112-1	aac 6'Ib	<i>Flavobacterium mizutaii</i>	0.242	13.86	s/t	s/t	s/t
	52R112-2	aac 6'Ib	s/i	-	-	-	-	-
	52R512-2	aac 6'I, bla _{PER-2} , pAmpC DHA	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	0.157	12.51	s/t	s/t	s/t
	52R812-1	aac 6'I, bla _{PER-2} , FOX	<i>Pseudomonas veronii</i>	-	-	100%	99%	0
	55R212-1	aac 6'Ib, bla _{CTX-M2} , bla _{PER-2} , AmpC DHA	<i>Pseudomonas synxantha</i>	0.251	11.68	s/t	s/t	s/t
	55R212-2	aac 6'Ib	s/i	-	-	-	-	-
	55R212-3	aac 6'Ib, bla _{CTX-M2}	<i>Pseudomonas fluorescens*</i>	0.588	6.41	s/t	s/t	s/t
	56R812-3	aac 6'Ib	<i>Pseudomonas sp.</i>	s/t	s/t	60%	99%	0
	56R812-1	aac 6'Ib, pAmpC DHA	<i>Pseudomonas sp.</i>	0.304	12.12	s/t	s/t	s/t
	56R812-2	aac 6'Ib, bla _{CTX-M2}	<i>Pseudomonas fragi</i>	0.465	8.46	s/t	s/t	s/t
	59R212-3	aac 6'I, bla _{PER-2}	<i>Pseudomonas fragi</i>	s/t	s/t	94%	99%	0
	59R712-3	aac 6'Ib, bla _{PER-2}	<i>Pseudomonas sp.</i>	s/t	s/t	100%	99%	0
	60R812-3	aac 6'Ib, bla _{CTX-M2}	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.147	16.50	s/t	s/t	s/t
60R512-1	aac 6'Ib	<i>Pseudomonas putida</i>	0.107	15.77	s/t	s/t	s/t	
60R512-2	aac 6'Ib, bla _{CTX-M2}	<i>Flavobacterium mizutaii</i>	-	-	-	-	-	
60R712-4	aac 6'Ib, bla _{CTX-M2}	<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i>	0.262	13.29	s/t	s/t	s/t	
ZONA B	41R212-1	aac 6'Ib	<i>Pseudomonas fluorescens*</i>	0.522	7.17	s/t	s/t	s/t
	41R212-2	aac 6'Ib	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	0.372	10.57	s/t	s/t	s/t
	41R24-1	aac 6'Ib	<i>Janthinobacterium lividum</i>	0.174	15.53	s/t	s/t	s/t
	41R812-1	aac 6'Ib	<i>Janthinobacterium lividum</i>	0.446	8.96	s/t	s/t	s/t
	41R812-2	aac 6'Ib, bla _{CTX-M2}	<i>Sphingobacterium thalpophilum*</i>	0.735	4.02	s/t	s/t	s/t
	41R812-3	aac 6'Ib	<i>Pseudomonas mephitica</i>	0.269	7.97	s/t	s/t	s/t
	41R812-4	aac 6'Ib, pAmpC DHA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.141	14.16	s/t	s/t	s/t
	41R812-5	aac 6'Ib, pAmpC DHA	<i>Pseudomonas sp.</i>	s/t	s/t	90%	98%	0
	41R54-1	aac 6'Ib	<i>Pseudomonas tolaasii*</i>	0.512	7.74	s/t	s/t	s/t
	41R712-1	aac 6'Ib, pAmpC DHA	<i>Janthinobacterium lividum</i>	0.289	12.58	s/t	s/t	s/t
ZONA C	41R74-2	aac 6'Ib, pAmpC DHA	s/i	-	-	-	-	-
	15R012-3	aac 6'Ib, bla _{CTX-M2}	s/i	-	-	-	-	-
	15R412-1	aac 6'Ib	<i>Janthinobacterium sp.</i>	s/t	s/t	100%	99%	0
	71R A12-1	aac 6'Ib	s/i	-	-	-	-	-
71R 912-6	aac 6'Ib	<i>Hymenobacter sp.</i>	s/t	s/t	92%	95%	0	

* Cuple con las condiciones para identificar por Biolog: (----)% inferior a 90%; s/t: sin testear; s/i: sin identificar

4. DISCUSIÓN

El Continente antártico es un importante laboratorio natural de investigación debido a sus características climáticas extremas (zona frío-desértica), cuya geografía, hidrología, suelo, flora y fauna se desarrollaron durante mucho tiempo sin influencia humana, considerándose, por muchos años, uno de los pocos lugares prístinos en el mundo (Hughes *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008, Bargagli, 2008); sin embargo, las costas antárticas han sido ocupadas por más de 50 años con bases científicas generando consecuencias ambientales insuficientemente estudiadas (Stark *et al.*, 2003). Según Tin *et al.*, (2009) la Antártica ya no debiera ser considerada un lugar prístino por los impactos ambientales provocados por las actividades humanas.

En la última década parte de los estudios desarrollados en la Antártica se han realizado con el propósito de investigar cambios por influencia humana de carácter local y global. En este último aspecto, cabe mencionar la reducción de la concentración de ozono estratosférico y el cambio climático (Ugolini y Bockheim, 2008; Malandrino *et al.*, 2009; Stastna, 2010). Los problemas locales de contaminación en la Antártica han sido asociados principalmente a actividades humanas, incluidas la investigación (Stark *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2007; Ugolini y Bockheim, 2008), el turismo (Choi *et al.*, 2007; Hughes *et al.*,

2007; Liggett *et al.*, 2010) y la pesca (Tin *et al.*, 2009). Dentro de las problemáticas a considerar esta la introducción y diseminación de GRA en la comunidad bacteriana antártica pudiendo así cambiar el resistoma original de la microbiota nativa, provocando la homogenización genética (Cowan *et al.*, 2011).

Debido a esto es que este trabajo tuvo como objetivo de estudio las comunidades bacterianas de agua dulce de la Península Fildes, Isla Rey Jorge, Antártica. Para el aislamiento de bacterias heterotróficas se utilizó el medio R₂A, el cual es considerado un medio oligotrófico (Reasoner, 1985) que es favorable para aislar bacterias antárticas (Peeters y Willems, 2011). Utilizando este medio fue posible aislar y seleccionar de acuerdo a la morfología de la colonia 102 bacterias, en la Zona A 48 morfotipos; en la Zona B, 20 morfotipos y en la Zona C, 34 morfotipos. La mayoría de los aislados produjeron colonias que exhibieron un color intenso debido a la producción de pigmento. Esta característica en bacterias de esta zona son de vital importancia pues le proporciona protección contra el estrés oxidativo el cual es causado debido a los altos niveles de radiación UVB en la Antártida (Correa-Llantén *et al.*, 2012; Dieser *et al.*, 2010). Así también estudios recientes han sugerido que los pigmentos tales como los carotenoides pueden desempeñar un papel en la modulación de la fluidez de la membrana en bacterias (Jagannadham *et al.*, 2000). Jagannadham *et al.* (2000) postularon que cuando las células crecen a bajas temperaturas (5 °C), los ácidos grasos insaturados y de cadena ramificada aumentan la fluidez de la membrana, mientras que los carotenoides polares compensan este efecto estabilizando la membrana. Estos hallazgos sugieren

fuertemente que los carotenoides pueden actuar en la modulación de la fluidez de la membrana y contribuir a la estabilidad de la membrana, una adaptación necesaria para estrés fisiológico bajo temperaturas bajas o de congelación (Dieser *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que el vivir en un ambiente oligotrófico como lo son los ambientes acuáticos de la antártica en donde existe una baja oferta de nutrientes en los cuales la disponibilidad de carbono puede fluctuar entre 1 a 15 mg/L de agua (Cavicchioli *et al.*, 2003; Roszak y Colwell, 1987) deben desarrollar estrategias funcionales y estructurales que les permitan responder a los cambios en la disponibilidad de nutrientes (Harder y Dijkhuizen, 1983). Entre las estrategias desarrolladas por las bacterias se encuentra formación de endosporas (Piggot y Hilbert, 2004), dormancia metabólica (Kaprelyants *et al.*, 1993), disminución del tamaño celular (ultramicrobacterias) (Torrella y Morita, 1981) y producción de poli- β -hidroxialcanoato (PHA) (Pavez *et al.*, 2009). Así, como también el intercambio de ADN, entre organismos de diferentes especies lo cual contribuye a mejorar la sobrevivencia de las bacterias (Jain *et al.*, 2002).

La identificación de los aislados nos permitieron observar la presencia del género *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp, *Sphingobacterium* sp., *Brevundimonas* sp., *Janthinobacterium* y *Hymenobacter* sp. lo cual concuerda con las características fenotípicas analizadas en este estudio y con varios estudios de caracterización en de bacterias de la antártica (McCammon, 1998; González-Rocha *et al.*, 2017).

En relación a los recuentos de bacterias heterotróficas cultivables no se observan diferencias significativas entre los recuentos realizados a 4 °C y 12 °C, en los recuentos totales ni en los recuentos con susceptibilidad disminuida, lo que podría sugerir un comportamiento psicrófilico no estricto o más bien psicrotolerantes de las bacterias recuperadas en el agar R₂A. Los recuentos en las muestras de agua analizadas se encuentran entre 10² y 10³ UFC/ml en la Zona A y 10¹ UFC/ml en zona C, lo cual concuerda con estudios realizados anteriormente obteniéndose recuentos más bajos en zonas más remotas de la Isla Rey Jorge (González-Rocha et. al, 2017). Por otra parte, se observa que existen diferencias significativas en cuanto al crecimiento de bacterias heterotróficas en los recuentos con sulfonamida y trimetoprim a 12 °C lo cual podría explicarse a que se presenta mayor cantidad de bacterias resistentes a éstos antibióticos en la Zona A y B. La identificación realizada indicó que son principalmente *Flavobacterium* sp. la cual tienen como temperatura óptima de crecimiento 12-15 °C (Bernardet et al., 2006) y *Pseudomonas* sp. que a pesar de tener crecimiento óptimo a temperaturas superiores (28-37 °C) de igual manera pueden tener un crecimiento a 12 °C pero algunas especies no crecen a 4 °C (Silva, 2015).

Se presentan diferencias significativas en los recuentos promedios de las distintas zonas A, B y C, existiendo mayores recuentos en la zona B, zona designada con influencia animal, ya que es agua extraída de la Laguna Ripamonti e Isla Ardley. La Isla Ardley (62°13'S; 58°54'O) está ubicada en la costa sudoeste de la isla Rey Jorge (isla 25 de mayo), casi a 500 m al este de la costa de la península Fildes, bahía

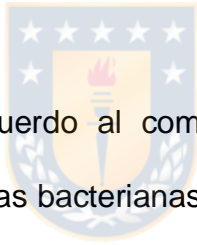
Maxwell (bahía Fildes), la cual en 1991 Chile propuso que fuera protegida al Sistema del Tratado Antártico, en vista de que el sitio tiene interés biológico por la diversidad de aves marinas que es posible encontrar en el lugar, ya sea reproduciéndose (11 especies) o cambiando el plumaje. Se distinguen las colonias reproductoras de pingüinos pigoscélidos y es uno de los pocos lugares donde las tres especies se reproducen simpátricamente. Se pueden encontrar parejas reproductoras de pingüinos de pico rojo (*Pygoscelis papua*), pingüinos Adelia (*P. adeliae*) y pingüinos de barbijo (*P. antarctica*). Además de los pingüinos, en esta zona se reproducen aves voladoras, como petreles gigantes (*Macronectes giganteus*), petreles de Wilson (*Oceanites oceanicus*), gaviotines antárticos (*Sterna vittata*) y skúas pardas (*Catharacta antarctica lonnbergi*). Dentro de los mamíferos se ha visto que durante diciembre y marzo, algunos elefantes marinos (*Mirounga leonina*), focas de Weddell y lobos marinos antárticos (*Arctocephalus gazella*) visitan la Zona para descansar o mudar de piel. Así también las últimas temporadas, investigadores chilenos han notificado la presencia de focas leopardo (*Hydrurga leptonyx*) en las inmediaciones de la isla Ardley, posiblemente depredando pingüinos (Humeniuk *et al.*, 2000).

Es importante mencionar que en la actualidad se ha informado la presencia de bacterias patógenas en fauna silvestre, como por ejemplo en el lobo fino antártico *Arctocephalus gazella* en que se ha descrito la presencia de bacterias entéricas, específicamente *E. coli* (Hernández *et al.*, 2007) y *Brucella pinnipedialis* (Abalos *et al.*, 2009). La presencia de estas bacterias se ha asociado a la actividad antrópica, que si bien es escasa, puede servir como agente transmisor de enfermedades ya

sea directamente a los mamíferos antárticos, o por intermedio de aves marinas migratorias (Leotta *et al.*, 2009). Sobre la presencia de patógenos en aves migratorias, la literatura (Leotta *et al.*, 2001; 2006) indica que *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *Salmonella gallinarum* y *S. pullorum* podrían encontrarse potencialmente en aves marinas tales como el pingüino Adelia (*P. adeliae*), el petrel gigante (*M. giganteu*), y las skúas (*C. antárctica*) y *C. maccormicki*. De igual modo, se ha reportado la presencia de *Campylobacter lari* en aves acuáticas como skúas (*C. skua*), gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) y pingüinos de Adelia, lo que ha sido vinculado a la transmisión por humanos en algunas zonas con poblaciones de estas aves (Tuemmers, 2011). En casos aislados de *P. adeliae* (Nievas *et al.*, 2007) también se ha reportado la presencia de *Clostridium cadaveris*, *C. sporogenes*, *E. coli* y *Staphylococcus* spp., en tejido subcutáneo y musculatura. A pesar que nuestros resultados no nos permiten identificar los microorganismos patógenos que se han reportado, éstos podrían ser quienes estén diseminando los GRA a las bacterias nativas de las zonas estudiadas.

Así también, no de menor relevancia, son los resultados obtenidos en la Zona A donde se observó 10^2 - 10^3 UFC/ml en la mayoría de los recuentos con susceptibilidad disminuida a antibióticos, variados perfiles de resistencia y una mayor diversidad de GRA que las otras zonas lo que confirma que las bacterias aisladas aquí son multiresistentes y con ello un peligro para la microbiota nativa del lugar ya sea porque sean susceptibles a la adquisición de GRA desde la microbiota humana que pueda ser introducida o bien por ser portadores de GRA los cuales

puedan diseminar al ambiente. Se ha visto que el creciente aumento del turismo antártico ha estado asociado al incremento de bacterias propias del ser humano, específicamente *C. jejuni*, *Salmonella* spp., y *Yersinia* spp., las que pueden ser encontradas potencialmente en algunas aves marinas antárticas (Bonnedahl *et al.*, 2005), con la consecuente transmisión potencial de enfermedades bacterianas antrópicas. Esto generaría un escenario complejo en el que podría haber consecuencias inesperadas para la fauna silvestre, ya que podrían desarrollarse cepas patógenas resistentes y agresivas las que podrían afectar negativamente las poblaciones de aves y mamíferos silvestres (Cabello & Cabello 2008), pudiendo generar mortalidades masivas en algunas poblaciones (Cooper *et al.*, 2009).



Los resultados obtenidos de acuerdo al comportamiento frente a los diferentes antibióticos ensayados en las cepas bacterianas aisladas de muestras de agua dulce muestran diferencias entre las bacterias aisladas en zonas de alto impacto humano (Zona A) y la zona con influencia animal (Zona B), observándose mayores índices de resistencia a los antibióticos en estas zonas en comparación con la zona remota (ZonaC), presentándose índice IRA 0,5 en Zona A y 0,7 en la Zona B. En Zona A se observa que 44 de los 48 aislados presentan resistencia a antibióticos β -lactámicos y aminoglicósidos. Así también se observa en la Zona B con presencia animal permanente en donde los 20 aislados presentan resistencia a β -lactámicos y aminoglicósidos. Cabe destacar que además de presentarse mayor número de bacterias resistentes, no sólo presentan resistencia a un sólo antibiótico sino que multiresistencia en ambos casos. Por el contrario, morfotipos bacterianos

seleccionados de la Zona C, que se ubica aproximadamente a 6,7 Km de Villa Las Estrellas, ubicación considerada sin contaminación ni impacto humano debido al difícil acceso, se observó que para la mayoría de los aislados son susceptibles a los antibióticos ensayados, obteniéndose un IRA de 0,05; resultados concordantes con estudios previos. Así, el año 2012 se realizó un estudio enfocado a detectar GRA en el ecosistema antártico reportaron enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), particularmente cepas de *E. coli* portadoras de genes *bla*_{CTX-M}, en muestras de agua colectadas en las proximidades de las bases chilenas Bernardo O'Higgins (Isla Rey Jorge) y Arturo Prat (Isla Greenwich) (Hernández *et al.* 2012). Por otra parte, otros estudios también han reportado bacterias multiresistentes a AMP, KAN, NAL, TET, STR provenientes de fecas de pingüino colectadas en la Isla Torgensen y en muestras de agua cerca de la Estación Estadounidense Palmer (Isla Anvers) (Miller, 2009). Otros estudios, realizados en nuestro grupo de investigación, informa que en cepas de *E. coli* aisladas desde Bahía Fildes, que tiene alta actividad antrópica, muestran resistencia a STR y TET (Rabbia, 2016), comportamiento que fue apreciado también en las muestras de agua analizadas en Zona A y B. Adicionalmente, Antelo (2013) en un estudio realizado en muestras terrestres de la Isla Rey Jorge obtuvo una colección de 250 aislamientos bacterianos capaces de crecer a 5 °C y 25 °C, de los cuales 70 de ellos exhibieron altos niveles de resistencia a aminoglicósidos, β -lactámicos y trimetoprim información que coincide con nuestros resultados. Además en zonas cercanas a las actividades antropogénicas se encontró un mayor número de aislados resistentes a antibióticos sintéticos o semisintéticos como los son sulfonamidas y trimetoprim, lo que podría relacionarse con el impacto

de la actividad humana en el área estudiada. Esto podría ser evidencia de que la influencia humana afecta el ambiente antártico. Aun cuando no se tienen evidencia en agua dulce, si existen estudios realizados en la cercanía de la Estación Davis en donde se observó la presencia de enterococos multirresistentes alrededor de la estación, lo que sugeriría que la descarga de aguas residuales no tratadas desde esta estación ha introducido potenciales patógenos humanos que portan múltiples GRA al ambiente marino antártico (Spence, 2014). Lo que no está claro es si estos potenciales patógenos o sus GRA persisten en el medio ambiente. Sin embargo, hay evidencia de que los GRA están presentes en muchos entornos y han sido diseminados entre bacterias (Davison, 1999). Más aún, es importante señalar que las bacterias antárticas son capaces de mantener y potencialmente difundir GRA, aunque también es posible que la microbiota nativa antártica pueda portar naturalmente GRA similares a los encontrados en patógenos del ambiente clínico (Vaz-Moreira, 2014).

Es preocupante que patógenos como enterococos resistentes a la vancomicina hayan sido introducidos en el medio marino antártico en las inmediaciones de la Estación de Davis y así también encontrar un alto nivel de resistencia en bacterias antárticas. Los riesgos de la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en este ambiente, tanto para los seres humanos como la vida silvestre aún no se puede cuantificar debido a la falta de información sobre la prevalencia y la mantención de GRA (Kummerer, 2009).

Para evaluar la resistencia a los aminoglucósidos se detectó genes de enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA) las cuales catalizan la modificación covalente de los grupos aminos e hidroxilos del compuesto, generando cambios químicos que llevan al antimicrobiano a unirse débilmente a los ribosomas bacterianos. Existen más de 50 tipos de EMA reportadas y entre las más frecuentemente detectadas en enterobacterias se encuentran acetiltransferasas (AAC), adeniltransferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH). Su acción se evidencia fenotípicamente en una resistencia de alto nivel de expresión en las cepas; el nivel de resistencia resultante depende de varios factores entre los cuales se pueden mencionar: la producción de la enzima, la eficacia catalítica y el tipo de aminoglucósido (Vakulenko, 2003; Mella, 2004). En este trabajo se analizó las enzimas AAC por ser las que mayormente se reportan en estudios de resistencia a aminoglucósidos en el ambiente. Las EMA son usualmente codificadas por genes localizados en plásmidos, transposones e integrones, elementos genéticos fundamentales en la transferencia y diseminación de GR a cepas susceptibles, los cuales pueden complicar los problemas epidemiológicos de la resistencia bacteriana, motivado, a que por lo general, también portan otros genes que confieren resistencia a diversos compuestos (Guzmán, 2016). Los posibles mecanismos enzimáticos que se pueden inferir según los resultados que refleje en el antibiograma. La presencia de *aac(6)-Ib* se sugiere cuando se encuentra resistencia de alto nivel a kanamicina, tobramicina y amikacina. Resistencia de alto nivel a kanamicina y sensibilidad a tobramicina y gentamicina es indicativo de APH(3)-Ia. Resistencia a kanamicina, gentamicina y tobramicina, son producidas por la enzima

AAC(3)-IIa, así como ANT(2)-I. Resistencia a estreptomicina y espectinomicina son producidas por ANT(3)-IIa (Vakulenko, 2003; Mella, 2004). Es por ello que en este caso se optó por detectar el gen *aac(6')-Ib* y *aac2*. Otros mecanismos de resistencia a los aminoglicósidos reportados son: impermeabilidad de la membrana externa, disminución de la concentración intracelular del antimicrobiano y metilación postranscripcional del ARNr, mecanismo en el cual se involucran los genes *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE* y *npmA* (Navarro,2011; Shaw,1993). Estos genes no fueron estudiados durante esta investigación pero para futuro sería interesante observar si estos mecanismos están presentes también en las cepas resistentes aisladas en las distintas zonas. Los resultados obtenidos en este estudio muestra resistencia a estreptomicina, kanamicina y amikacina en la zonas A y B y en la Zona C resistencia a estreptomicina y amikacina en la Zona C, siendo posible detectar el gen *aac(6')-Ib* en todas las zonas analizadas. La importancia de esta detección es que este gen ha sido detectado principalmente en bacterias gram negativas de origen humano como lo son *E. coli* y *P. aeruginosa* (Chow, 2001; Galimand,1993) los cuales podrían ser microorganismos que debido al aumento en la población en la Antártica puedan estar introduciendo GR a la microbiota nativa.

En cuanto a la resistencia a antibióticos β -lactámicos se conoce que en las bacterias Gram negativas la resistencia está originada por varios mecanismos, pero el más importante, por su frecuencia y eficacia, es la producción de β -lactamasas. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos y se producen de manera constitutiva o inducible. De todas las β -

lactamasas descritas hasta el momento, cabe destacar, por su interés e implicaciones clínicas, las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), las cefalosporinas tipo AmpC y las carbapenemasas (Calvo, 2011). Las β -lactamasas AmpC pertenecen al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby- Medeiros y a la clase C de la clasificación estructural de Ambler. Se caracterizan por ser activas frente penicilinas y cefalosporinas, pudiendo hidrolizar cefamicinas (cefotina y cefotetan), oximinocefaloporias (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona) y monobactams (aztreonam) con la excepción de cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpiroma) y carbapenémicos. Estas enzimas se caracterizan por ser resistentes a la combinación de β -lactámico con inhibidores de β -lactamasas con la posible excepción de piperacilina-tazobactam (Philippon, 2002). Este espectro de hidrólisis puede verse ampliado (subgrupo 1e) y afectar a las cefalosporinas de cuarta generación como resultado de sustituciones, inserciones o deleciones aminoacídicas en seis regiones de la enzima, son las llamadas AmpC de espectro extendido, ESAC (Bush, 2010; Navarro, 2010). Se ha reportado que ciertas enterobacterias poseen de manera natural β -lactamasas tipo AmpC, tal es el caso de *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* y *Hafnia alvei* (Navarro, 2010; Suárez, 2011); al igual que bacilos Gram negativos no fermentadores de importancia clínica como *P. aeruginosa* (Vila, 2010). En cuanto las AmpC plasmídicas inducibles y AmpC plasmídicas constitutivas existe evidencia molecular que sugiere que los genes que codifican a estas enzimas, derivan de los genes *ampC* cromosómicos que naturalmente poseen las enterobacterias arriba mencionadas. Estos genes han sido integrados en elementos

genéticos transferibles facilitando la diseminación a diferentes microorganismos (Philippon, 2002). Los genes *ampC* mediados por plásmidos han sido encontrados en *Salmonella* spp., *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, que naturalmente no poseen estos genes (Schmidtke, 2006; Pérez-Pérez, 2002). Hasta el presente se han descrito más de 20 familias de AmpC plasmídicas entre las cuales se destacan: ACC, FOX, MOX (incluyen tipo CMY), DHA, CIT y EBC. De estas, 5 son de expresión inducible: DHA-1, DHA-2, ACT-1, CMY-13 y CFE-1 (Schmidtke, 2006). Al igual que las β -lactamasas AmpC cromosómicas hiperproducidas, las enzimas AmpC plasmídicas confieren resistencia a un amplio espectro de β -lactámicos incluyendo penicilinas, oxyminocefalosporinas, cefamicinas y, de manera variable, al aztreonam.



Otros tipos de ESBL que han adquirido mayor importancia son las enzimas CTX-M (Canton, 2006; Livermore, 2007; Paterson, 2005; Rossolini, 2008). Los genes *bla*_{CTX-M} probablemente surgieron a través de varios eventos de movilización de sus homólogos naturales en el género *Kluyvera* (Bonnet, 2004; Humeniuk, 2002; Oliver, 2001; Olson, 2005; Poirel, 2002; Rodríguez, 2004) y han evolucionado desde ese tiempo. Tienen actividad ESBL intrínseca y se agrupan en 5 subgrupos, designados CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 y CTX-M25 (Bonnet, 2004). Dentro de este estudio se logró detectar en la Zona A los genes *bla*_{CTX-M2}, *pAmpC*_{DHA}, *pAmpC*_{FOX} y *bla*_{PER-2}, en la Zona B los genes *bla*_{CTX-M2} y *pAmpC*_{DHA} a diferencia de la Zona C en donde el mayor porcentaje de cepas fue susceptible a antibióticos β -láctamicos y no se detectó ninguno de los genes estudiados que proporcionan resistencia a estos antibióticos. De acuerdo a lo analizado se observa que los genes detectados han sido

mayormente reportados en aislados clínicos y que se encuentran en elementos móviles (Rojas, 2009; Alfaro, 2005). Es así como un estudio realizado en Argentina reportó que fue posible detectar en especies de *Shewanella*, que son habitantes del medio ambiente, en casi todos los aislamientos integrones y otros factores determinantes de relevancia de la resistencia como la carbapenemasa *bla_{OXA-48}*, por lo general asociado a la transferencia horizontal de genes, siendo sugerido este género no solo como un reservorio potencial, sino también un vector de los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos entre los hospitales y el medio ambiente (Centrón, 2011). Es por lo anterior expuesto que la presencia de estos genes detectados en la antártica nos podría indicar que pudiesen ser transmitidos desde zonas de alto impacto humano hacia zonas más remotas o mediante vectores como los son los mamíferos y aves migratorias que son posible encontrar en las zonas de estudio que considero este trabajo.

Estudios realizados por Hernández *et al.* (2016) apoyan la noción de que las bacterias asociadas a humanos se han propagado principalmente a través de la presencia humana y las actividades antropogénicas en las regiones polares. Esto se ha observado pues al estudiar la misma área de la antártica y las mismas especies de aves se ha visto un aumento notorio en pocos años en la frecuencia de bacterias con GRAs, específicamente genes BLEEs. El trabajo de Hernández *et al.* (2016) corrobora nuestros resultados, los que muestra que las bacterias resistentes a los antibióticos que llevan genes BLEEs fueron documentadas principalmente en lugares cercanos a las bases científicas en la Antártida y que las bacterias aisladas en zonas

remotas y consideradas nativas mostraron ausencia de resistencia a los antibióticos y así también a los genes BLEEs.

De acuerdo a lo esperado, los análisis de diversidad de genes nos indica un gradiente riqueza y diversidad que es inversamente proporcional a las zonas menos remotas hacia las más remotas, con un índice máximo de 7 y 0,475 en riqueza y diversidad de genes, respectivamente, para la zona A; reafirmando que la facilidad de acceso conlleva a una mayor actividad e intervención antropogénica, en ambientes que hasta hace poco se consideran prístinos. Esto también se evidencia en estudios realizados por Berglund *et. al* (2015) en donde han logrado correlacionar las concentraciones ambientales de GRAs e integrones a lugares afectados por actividades humanas. Mencionan que uno de los posibles contaminantes se deba a la descarga de antibióticos, GRAs y bacterias a ambientes acuáticos, p.ej. a través de aguas residuales, siendo estos contaminantes antrópicos un verdadero *hot spot* para la diseminación de la resistencia a los antibióticos ya que se mezclan entre sí y con la microbiota nativa del lugar. Aun cuando no está claro cómo las bajas concentraciones de antibióticos afectan a las comunidades microbianas en estos entornos, se requiere de precaución ya que los estudios han demostrado la capacidad *in vitro* de inducir resistencia y facilitar HGT ante concentraciones sutiles de antibióticos (Berglund *et. al* 2015).

Este análisis multidimensional por tanto nos permite aceptar nuestra hipótesis inicialmente planteada en el trabajo pues evidencia que entre los distintos puntos

muestras existe diferencia tanto a nivel de bacterias resistentes a antibióticos como mucho más interesante en relación a riqueza y diversidad de los genes que proporcionan estos mecanismos de resistencia en bacterias aisladas en la Isla Rey Jorge, Antártica. Por lo ende, es importante señalar el aporte que entrega este estudio, pues permitió evidenciar que existen diferencias en cuanto al comportamiento frente a los antibióticos y la portación de GRAs, observándose mayor número de cepas resistentes en las zonas de alto impacto humano y animal en comparación con las zonas más remotas. Además, es importante señalar que la descarga de aguas residuales humanas no es la única fuente potencial de bacterias resistentes también lo pueden ser las heces de las aves migratorias (Sellin *et al.*, 2000) lo que podría estar influenciando en los perfiles de resistencia a antibióticos de las bacterias antárticas.



5. CONCLUSIONES

1. Existe diferencia en el comportamiento frente a distintos grupos de antibióticos en bacterias aisladas de agua dulce, obtenida desde zonas con o sin influencia humana. Siendo las bacterias provenientes de zonas con influencia animal y las con impacto antrópico las que presentan mayor resistencia a antibióticos.
2. Resistencia a aminoglicósidos se detectó en las 3 zonas de estudio (A, B y C) y estaría mediada por la presencia de EMAs del tipo acetiltransferasas, así el principal gen de resistencia pesquisado es *aac(6')-Ib*.
3. La resistencia a β -lactámicos en la Zona A y B se debería por la presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), evidenciándose con la presencia de los genes *bla_{CTX-M2}*, *pAmpC_{DHA}*, *pAmpC_{FOX}* y *bla_{PER-2}* en la Zona A y *bla_{CTX-M2}* y *pAmpC_{DHA}* en la Zona B.
4. Existe mayor número de cepas bacterianas resistentes a antibióticos considerados sintéticos o semisintéticos en zonas con mayor impacto antrópico, por lo que se sugiere que la presencia de estas cepas resistentes agentes antibacterianos semi-sintéticos podría estar relacionado el impacto que produce la actividad humana en esa zona.

5. Se evidencia una mayor riqueza y diversidad de genes en la Zona con mayor impacto antrópico que en la zona con influencia animal y aun menor en las zonas remotas lo cual nos podría estar indicando un gradiente de distribución de GR desde las zonas con mayor actividad antropogénica hacia las menos intervenidas.



6. PROYECCIONES

Se espera que este trabajo proporcione la base para futuras investigaciones que aporten mas evidencia acerca la influencia antrópica que puede existir en ambientes remotos como la antártica. De acuerdo a los resultados obtenidos se espera que puedan ser estudiados una mayor variedad de GR, y, en especial, la detección de elementos genéticos móviles pues son a través de éstos que los GR pueden ser diseminados a la microbiota nativa de la antártica.



7. REFERENCIAS

Abalos P, Retamal P, Blank O, Torres D & Valdenegro V. (2000). Brucella infection in marine mammals in Antarctica. *Veterinary Records* 164: 250

Alberdi, M., Bravo, L.A., Gutiérrez, A., Gidekel, M., Corcuera, L.J., 2002. Ecophysiology of Antarctic vascular plants. *Physiologia Plantarum* 115, 479-486

Alfaro Rojas, C. (2005). Revisión de la bibliografía sobre AmpC: Una importante β -lactamasa. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 40(2), 59-67.

Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol*, 8(4), 251-259.

Amos, G. C., Zhang, L., Hawkey, P. M., Gaze, W. H., & Wellington, E. M. (2014). Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. *Vet Microbiol*, 171(3-4), 441-447.

Antelo, V. & Batista, S. (2013). Presencia de integrones clase I en comunidades bacterianas terrestres de la Isla Rey Jorge. *Avances en ciencia Antártica latinoamericana*. (Vol. Libro de resúmenes VII congreso latinoamericano de ciencia Antártica, pp. p. 59-62.).

Aronson, R. B., Thatje, S., McClintock, J. B., & Hughes, K. A. (2011). Anthropogenic impacts on marine ecosystems in Antarctica. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1223(1), 82-107.

ASOC (Antarctic and Southern Ocean Coalition) & UNEP (United Nations Environment Programme). 2005. Antarctic tourism graphics: an overview of tourism activities in the Antarctic treaty area. Information Paper 119. XXVIII Antarctic Treaty.

ASOC (Antarctic and Southern Ocean Coalition). 2001. Antarctic tourism. Information Paper 40. XXIV Antarctic Treaty Consultative Meeting. 9-20 July 200, St. Petersburg.

ASOC (Antarctic and Southern Ocean Coalition). 2006. Strategic issues posed by commercial tourism in the Antarctic Treaty Area. Information Paper 120. XXIX Antarctic 564 Treaty Consultative Meeting. 12-23 June, Edinburgh.

ASOC (Antarctic and Southern Ocean Coalition). 2008. A decade of Antarctic tourism: status, change, and actions needed. Information Paper 41. XXXI Antarctic Treaty Consultative Meeting. 2-13 June 2008.

Ball, M. M., Gomez, W., Magallanes, X., Rosales, R., Melfo, A., & Yarzabal, L. A. (2014). Bacteria recovered from a high-altitude, tropical glacier in Venezuelan Andes. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(3), 931-941.

Baquero, F., Alvarez-Ortega, C., & Martinez, J. L. (2009). Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environmental microbiology reports*, 1(6), 469-476.

Bargagli R. 2008. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Science of the Total Environment*. 400: 212-226.

Bartoloni, A., Pallecchi, L., Rodriguez, H., Fernandez, C., Mantella, A., Bartalesi, F., Rossolini, G. M. (2009). Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *Int J Antimicrob Agents*, 33(2), 125-129.

Bastmeijer K. Lamers M., Harcha J. 2008. Permanent land-based facilities for tourism in Antarctica: the need for regulation. *Review of European Community & International Environmental Law*. 17 (1): 84-99.

Berglund, B. (2015). Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infection ecology & epidemiology*, 5(1), 28564.

Bernardet, Jean-François & Bowman, John. (2006). The Genus *Flavobacterium*. *Prokaryotes*. 7. 481-531.

Bölter M. (2011). Soil development and soil biology on King George Island, Maritime Antarctic. *Polish Polar Research* 32 (2): 105-116.

Bonnedahl J., Broan, J., Waldeström, H., Palmgren, T., Niskanen & B Olsen (2005) In search of human-associated bacterial pathogens in Antarctic wildlife: Report for six penguin colonies regularly visited by tourists. *Ambio* 34: 430-432.

Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(1), 1-14.

Bowman, J.; McCammon, S.; Brown, M.; Nichols, D. & McMeekin, T. (1997). Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microb.* p. 3068-3078.

Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969-976.

Cabello C. & F Cabello (2008) Zoonosis con reservorios silvestres: Amenazas a la salud pública y a la economía. *Revista Médica de Chile*.136: 385-393.

Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38.

Camacho, A. & Fernández-Valiente, E. (2005). Un mundo dominado por los microorganismos. Ecología Microbiana de los lagos antárticos. *Ecosistemas Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente.*, 13pp.

Campbell, I. B., & Claridge, G. G. (2009). Antarctic permafrost soils. In *Permafrost soils* (pp. 17-31).

Canton, R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin Microbiol Infect*, 15 Suppl 1, 20-25.

Canton, R., and T. M. Coque. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:466–475.

Cañadas, E. S. (2001). Espacios protegidos y política territorial en las islas Shetland del sur (antártida). *Boletín de la A.G.E.*, pp 5-21.

Cavicchioli R., Ostrowski M., Fegatella F., Goodchild A., Guixa-Boixereu N. 2003. Life under Nutrient Limitation in Oligotrophic Marine Environments: An Eco/Physiological Perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (Formerly *Sphingomonas alaskensis*). *Microbiol. Ecol.* 45 (3): 203–217.

Cello F Di, Bevivino A., Chiarini L., Fani R., Paffetti D., Tabacchioni S., Dalmastrì C., (1997). Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages . *Appl Environ Microbiol* 63 : 4485-4493.

Centrón, D., Ramírez, M. S., Merquier, A. K., Almuzara, M., & Vay, C. (2011). Analizan la diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos del género *Shewanella* en el ambiente hospitalario. *Salud (i) ciencia (Impresa)*, 18(7), 651-652.

Choi H., Ji J., Chung K., Y I. Ahn. 2007. Cadmium bioaccumulation and detoxification in the gill and digestive gland of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 145:227–235.

Chong CH., Pearce D., Convey P., Tan G., Wong R., Y I. Tan. 2010. High levels of spatial heterogeneity in the biodiversity of soil prokaryotes on Signy Island, Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry* 42: 601-610.

Chow, J. W., Kak, V., You, I., Kao, S. J., Petrin, J., Clewell, D. B., ... & Shaw, K. J. 2001. Aminoglycoside Resistance Genes *aac*(2)-Ib and *aac*(6)-IIm Detected Together in Strains of both *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(10), 2691-2694.

Clesceri, L., Greenberg, A., & Eaton, A. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. *Part 9000*. Washington, D.C. American Public Health Association.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Tenth Edition *CLSI documents M02-A10 (ISBN:1-56238-688-3)*. Clinical Laboratory standards Institute 940, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

Convey, P., Stevens, M.. 2007. Antarctic biodiversity. *Science*, 317, 1877–1878.

Cooper J., Crawford M.S., De Villiers B.M. Dyer G., Hofmeyr & Jonker A. (2009). Disease outbreaks among penguins at sub-Antarctic Marion Island: A conservation concern. *Marine Ornithology* 37: 193-196.

Cornejo-Donoso J., Antezana, T.. 2008. Preliminary trophic model of the Antarctic Peninsula Ecosystem (Sub-area CCAMLR 48.1). *Ecological Modelling* 218: 1– 17.

Correa-Llantén, D. N., Amenábar, M. J., & Blamey, J. M. (2012). Antioxidant capacity of novel pigments from an Antarctic bacterium. *Journal of Microbiology*, 50(3), 374-379.

Corsolini, S., 2011. Contamination profile and temporal trend of POPs in Antarctic biota, en: Loganathan. B.G., Lam, P.K-S. (Eds.). *Global Contamination Trends of Persistent Organic Chemicals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 571-591.

Cowan Don A., Chown S.L., Convey P., Tuffin M., Hughes K., Pointing S. & Warwick V.F. 2011. Non-indigenous microorganisms in the Antarctic: assessing the risks. *Trends in Microbiology* 19, 540-548

D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C. & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457-461.

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(3), 417-433.

Davis, C.H., Li, Y., McConnell, J.R., Frey, M.M., Hanna, E., 2005. Snowfall-driven growth in East Antarctic ice sheet mitigates recent sea-level rise. *Science* 308; 1898-1901.

Davison, J. 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 42, 73-91.

D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311(5759), 374-377.

De Lisle, G. W., Stanislawek, W. L., & Moors, P. J. (1990). *Pasteurella multocida* infections in rockhopper penguins (*Eudyptes chrysocome*) from Campbell Island, New Zealand. *Journal of Wildlife Diseases*, 26(2), 283-285.

De Villiers M. 2008. Review of recent research into the effects of human disturbance on wildlife in the Antarctic and sub-Antarctic region. In Human disturbance to wildlife in the broader Antarctic region: a review of findings. Appendix 1. Working Paper 12 for XXXI Antarctic Treaty Consultative Meeting, Kiev, Ukraine. 2–13.

Delille D., Pelletier E., Coulon F. 2007. The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated subAntarctic soil. *Cold Regions Science and Technology* 48 :74– 83.

Deprez P., Arens P., Locher H. 1999. Identification and preliminary assessment of contaminated sites at Casey Station. Wilkes Land, Antarctica. *Polar Record* 35: 299–316.

Dieser, M., Greenwood, M., & Foreman, C. M. (2010). Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 42(4), 396-405.

Dominguez, M. (2008). Bacterias antárticas y agentes antibacterianos *Boletín Antártico Chileno*. (Vol. 27, pp. 4-5).

Doyle, M. P. (2006). Antimicrobial resistance: implications for the food system. . *Compr. Review Food Science. Food Saf*, 5:71-137.

Elliot D.H (1985). Geological evolution. *In: Key Environments, Antarctica. Ed. Bonner W.N, Walton W.H, Pergamon Press, Oxford* 39-61.

Fevre, C., Jbel, M., Passet, V., Weill, F. X., Grimont, P. A., & Brisse, S. (2005). Six groups of the OXY β -lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3453-3462.

Galimand, M, Lambert, T., Gerbaud, G., & Courvalin, P. (1993). Characterization of the aac (6')-Ib gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase in *Pseudomonas aeruginosa* BM2656. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(7), 1456-1462.

González-Rocha, G., Muñoz-Cartes, G., Canales-Aguirre, C. B., Lima, C. A., Domínguez-Yévenes, M., Bello-Toledo, H., & Hernández, C. E. (2017). Diversity structure of culturable bacteria isolated from the Fildes Peninsula (King George Island, Antarctica): A phylogenetic analysis perspective. *PloS one*, 12(6), e0179390.

Guzmán, M., Guzmán, F., Salazar, E., Albarado, L., Rodulfo, H., & de Donato, M. (2016). Identificación de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos en cepas intrahospitalarias de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 36(1).

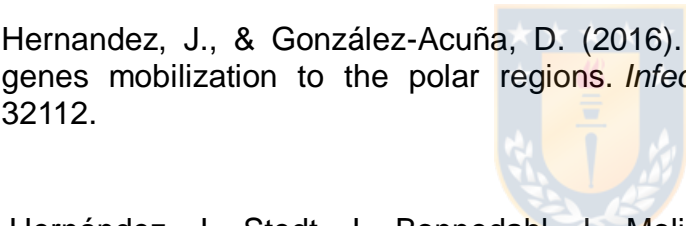
Haase, D., Lamers, M., & Amelung, B. (2009). Self-regulation of tourism in Antarctica: exploring the conditions for success and failure. *J Sustain Tour*, 613(17), 411-430.

Hall, C. & Saarinen, J. (2010). Tourism in the Arctic and Antarctic regions. Introduction, definitions, locations, places and dimensions *In C.M. Hall & J. Saarinen (eds.): Tourism and change in the polar regions: climate, environment and experiences*. Pp. 617 1-43. London: Routledge.

Harder W., Dijkhuizen L. 1983. Physiological responses to nutrient limitation. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 1-23

Hernández J., Prado V., Torres D., Waldenstrom, Haeming P.D. & Olsen B. (2007) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Antarctic fur seals *Arctocephalus gazella*. *Polar Biology* 30: 1227-1229.

Hernandez, J., & González-Acuña, D. (2016). Anthropogenic antibiotic resistance genes mobilization to the polar regions. *Infection ecology & epidemiology*, 6(1), 32112.



Hernández, J., Stedt, J., Bonnedahl, J., Molin, Y., Drobni, M., Calisto-Ulloa, N., Gomez-Fuentes, C., Astorga-Espana, M. S., Gonzalez-Acuna, D., Waldenstrom, J., Blomqvist, M., Olsen, B. 2012. Human-associated extended-spectrum β -Lactamase in the Antarctic. *App and Environ Microb.* 78(6), 2056-2058.

Hucker, G. J., and H. J. Conn. 1923. Methods of Gram staining. N.Y. *State Agric. Exp. Stn. Geneva Tech. Bull.* Pp.129.

Hughes K., Bridge P., Y Clark M. 2007. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of the Total Environment* 372: 539–548.

Humeniuk, C., Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., & Philippon, A. 2002. β -Lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(9), 3045-3049.

Humeniuk, C., G. Arlet, V. Gautier, P. Grimont, R. Labia, and A. Philippon. Izaguirre, I., & Mataloni, G. 2000. *Antártida, descubriendo el continente blanco*. Editorial Del Nuevo Extremo.

Jagannadham, M. V., Chattopadhyay, M. K., Subbalakshmi, C., Vairamani, M., Narayanan, K., Rao, C. M., & Shivaji, S. 2000. Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus*, and a mesophilic bacterium, *Sphingobacterium multivorum*. *Archives of microbiology*, 173(5-6), 418-424.

Jain R., Rivera M.C., Moore J.E., Lake J.A. 2002. Horizontal Gene Transfer in Microbial Genome Evolution. *Theor. Popul. Biol.* 61 (4): 489–495.

Jayaraman, R. (2009). Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift. *Curr Sci*, 96(11), 1475-1484.

Kaprelyants A.S., Gottschal J.C., Kell D.B. 1993. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 104 (3-4): 271-286

Kennicutt M., Sweet S., Fraser W., Stockton W., Culvert M. 1991. Grounding of the Bahia Paraiso at Arthur Harbor, Antarctica. 1. Distribution and Fate of Oil Spill Related Hydrocarbons. *Environmenta Science and Technology.* 25: 509-518.

Krumperman 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods, *Applied and Environmental Microbiology* 46.165-170

Kümmerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. *Chemosphere*, 75, 435-441.

Lamers, M., Haase, D., & Amelung, B. (2008). Facing the elements: analysing trends in Antarctic tourism *Tourism Review* (Vol. 63, pp. 15-27).

Leotta G., Cerda R., Coria N.R. & Montalti D. (2001) Preliminary studies on some avian diseases in Antarctic birds. *Polish Polar Research* 22: 227-231.

Leotta G., Chinen I., Vigo G.B., Pecoraro M. & Rivas M. (2006) Outbreaks of avian cholera in Hope Bay Antarctica. *Journal of Wildlife Diseases* 42: 259-270.

Leotta G.A., Piñeyro P., Serena S. & Vigo G.B. (2009) Prevalence of *Edwardsiella tarda* in Antarctic wildlife. *Polar Biology* 32: 809-812.

Liggett D., Mcintosh A., Thompson A., Gilbert N., Storey B. 2010. From frozen continent to tourism hotspot? Five decades of Antarctic tourism development and management, and a glimpse into the future. *Tourism Management* 30: 1-10.

Lima-Bittencourt, C. I., Cursino, L., Goncalves-Dornelas, H., Pontes, D. S., Nardi, R. M., Callisto, M., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. M. (2007). Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater. *Genet Mol Res*, 6(3), 510-521.

Livermore, D. M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical infectious diseases*, 36(Supplement 1), S11-S23.

Livermore, D. M., R. Canton, M. Gniadkowski, P. Nordmann, G. M. Rossolini, Lo Giudice, A., Bruni, V., & Michaud, L. (2007). Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms. *J Basic Microbiol*, 47(6), 496-505.

Loeb, V., Siegel, V., Holm-Hansen, O., Hewitt, R., Fraserk, W., Trivelpiecek, W., Trivelpiecek, S., 1997. Effects of sea-ice extent and krill or salp dominance on the Antarctic food web. *Nature* 387, 897-900.

Lynchet, H. J., Crosby, K., Fagan, W. F., & Naveen, R. (2010). Spatial patterns of tour ship traffic in the Antarctic Peninsula region. *Antarct. Sci*(22), 123-130.

Malandrino M., Abollino O., Buoso S., Casalino C., Gasparon M., Giacomino A., LA Gioia C., Y Mentasti E. 2009. Geochemical characterisation of Antarctic soils and lacustrine sediments from Terra Nova Bay. *Microchemical Journal* 92: 21–31.

Martínez, J. L., & Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 647-679.

Martínez, J.L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci.*, 276:2521-2530.

McCammon, S. A., Innes, B. H., Bowman, J. P., Franzmann, P. D., Dobson, S. J., Holloway, P. E., ... & Rankin, L. M. (1998). *Flavobacterium hibernum* sp. nov., a lactose-utilizing bacterium from a freshwater Antarctic lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(4), 1405-1412.

Mella, M., Sepúlveda, A., González, R., Domínguez, Y., Zemelman, Z., & Ramírez, G. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista chilena de infectología*, 21(4), 330-338.

Mellado, C., Campos, V., & Mondaca, M. A. (2011). Distribución de genes de resistencia a arsénico en bacterias aisladas de sedimentos con concentraciones variables del metaloide. *Gayana (Concepción)*, 75(2), 131-137.

Mesa, R. J., Blanc, V., Blanch, A. R., Cortés, P., González, J. J., Lavilla, S. & Navarro, F. (2006). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial chemotherapy*, 58(1), 211-215.

Miller, R. V., Gammon, K., & Day, M. J. (2009). Antibiotic resistance among bacteria isolated from seawater and penguin fecal samples collected near Palmer Station, Antarctica This article is one of a selection of papers in the Special Issue on Polar and Alpine Microbiology. *Canadian journal of microbiology*, 55(1), 37-45.

Moline, M.A., Claustre, H., Frazer, T.K., Schofield, O., Vernet, M., 2004. Alteration of the food web along the Antarctic Peninsula in response to a regional warming trend. *Global Change Biology* 10, 1973-1980.

Moura, A., Henriques, I., Smalla, K., & Correia, A. (2010). Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res Microbiol*, 161(1), 58-66.

Navarro, F., Calvo, R., Canton, R., Fernandez, F., & Mirellis, B. (2011). Phenotypic detection of resistance mechanisms in microorganisms. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(7), 524-534.

Navarro, F., Miró, E., & Mirelis, B. (2010). Interpretive reading of enterobacteria antibiograms. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 28(9), 638-645.

Naveen, R., Forrest, S. C., Dagit, R. G., Blight, L. K., Trivelpiece, W. Z., & Trivelpiece, S. G. (2001). Zodiac landings by tourist ships in the Antarctic Peninsula region. *Polar Record*(37), 121-132.

Nedwell D. 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology* (30) 2:101–111.

Newton, A., 2008. Overheating Antarctica. *Geophysical Research Letters* 35, L07502.

Nichols, D.S., Sanderson, K., Buia, A.D., Van de Kamp, J.L., Holloway, P.E., Bowman, J.P., Smith, M., Mancuso-nichols, C.A., Nichols, P.D. & McMeekin, T.A. (2002). Bioprospecting and biotechnology in Antarctica, Conference Proceedings - The Antarctic: Past, Present and Future, 22 June 2001, University of Tasmania, Hobart, Tasmania, pp. 85-105.

Nievas V.F., Leotta G.A. & Vigo G.B. (2007). Subcutaneous clostridial infection in Adelie penguins in Hope Bay, Antarctica. *Polar Biology*. 30: 249-252.

Oliver, A., J. C. Perez-Diaz, T. M. Coque, F. Baquero, and R. Canton. 2001. Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:616–620.

Olson, A. B., M. Silverman, D. A. Boyd, A. McGeer, B. M. Willey, V. Pong-Porter, N. Daneman, and M. R. Mulvey. 2005. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum β -lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:2112–2115.

Paterson, D. L., and R. A. Bonomo. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:657–686.

Pavez P., Castillo J.L., González C., Martínez M. 2009. Poly- β Hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Curr. Microbiol.* 59 (6): 636–640.

Peck, L. S., Convey, P., & Barnes, D. K. (2006). Environmental constraints on life histories in Antarctic ecosystems: tempos, timings and predictability. *Biological reviews*, 81(1), 75-109.

Peeters K., & Willems A. (2011). The gyrB gene is a useful phylogenetic marker for exploring the diversity of Flavobacterium strains isolated from terrestrial and aquatic habitats in Antarctica. *FEMS microbiology letters*, 321(2), 130-140.

Pérez-Pérez F. J., & Hanson N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 2153-2162.

Peter H., Peter U., Buesser C., Mustafa O., Pfeiffer S. 2008. Risk assessment for the Fildes Peninsula and Ardley Island, and development of management plans for their designation as Specially Protected or Specially Managed Areas. Dessau: German Environmental Agency. Federal Environment Agency (Umweltbundesamt). 508 pp.

Phandanouvong V., B-ncourt L., & Rodriguez F. (2010). Determinación y cuantificación de bacterias acidolácticas por PCR en tiempo real. *Revista MVZ Córdoba*, 15(1).

Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(1), 1-11.

Piggot P.J., Hilbert D.W. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 579–586

Poblet A., Andrade S., Scagliola M., Vodopivec C., Pucci A., Marcovecchio J. 1997. The use of epilithic Antarctic lichens (*Usnea aurantiacoatra* and *U. antarctica*) to determine deposition patterns of heavy metals in the Shetland Islands, Antarctica. *Science of the Total Environment* 207: 187-194.

Poirel, L., P. Kampfer, and P. Nordmann. 2002. Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:4038–4040.

Pörtner H. 2006. Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: An integrative analysis. *Deep-Sea Research II* 53: 1071–1104.

Rabbia V., Bello-Toledo H., Jiménez S., Quezada M., Domínguez M., Vergara, L., González-Rocha G. 2016. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from Antarctic bird feces, water from inside a wastewater treatment plant, and seawater samples collected in the Antarctic Treaty area. *Polar Science*, 10(2), 123-131.

Reasoner, D. J., & Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and environmental microbiology*, 49(1), 1-7.

Rodríguez M. M., P. Power M. Radice C. Vay A. Famiglietti M. Galleni . A. Ayala and G. Gutkind. 2004. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a

possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4895–4897.

Rojas M., & Del Valle D. (2009). B-lactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2).

Rosenblatt-Farrell N. (2009). The landscape of antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*, 117(6), A244-A250.

Rossolini G. M., M. M. D'Andrea, and C. Mugnaioli. 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(Suppl. 1):33–41.

Rozzak D.B., Colwell R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51 (3): 365-379.

Roura R. M. (2010). Cultural heritage tourism in Antarctica and Svalbard: Patterns, impacts & policies. In C.M. Hall & J. Saarinen (eds.): *Tourism and change in the polar regions: climate, environment and experiences*, Pp. 180-203.

Schmidtke A. J., & Hanson N. D. (2006). Model system to evaluate the effect of ampD mutations on AmpC-mediated β -lactam resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(6), 2030-2037.

Segawa, T., Takeuchi, N., Rivera, A., Yamada, A., Yoshimura, Y., Barcaza, G., Shinbori, K., Motoyama, H., Kohshima, S., Ushida, K. (2013). Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments. *Environ Microbiol Rep*, 5(1), 127-134.

Sellin, M., Palmgren, H., Broman, T., Bergstrom, S. & Olsen, B. 2000. Involving ornithologists in the surveillance of vancomycin-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases*, 6, 87-88.

Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., & Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological reviews*, 57(1), 138-163.

Silva, Francisco. (2015). *Pseudomonas* (Flavimonas) oryzihabitans. *Revista chilena de infectología*, 32(4), 445-446.

Smith R., Martinson D., Stammerjohn S.H., Iannuzzi R., Y Ireson K. 2008. Bellingshausen and western Antarctic Peninsula region: Pigment biomass and sea-ice spatial/temporal distributions and interannual variability. *Deep-Sea Research II* 55: 1949– 1963.

Spence, R. J. (2014). Distribution and taxonomy of Enterococci from the Davis Station wastewater discharge, Antarctica.

Stark J., Riddle M., Snape I., Scouller R. 2003. Human impacts in Antarctic marine soft-sediment assemblages: correlations between multivariate biological patterns and environmental variables at Casey Station. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56:717–734.

StastnA V. 2010. Spatio-temporal changes in surface air temperature in the region of the northern Antarctic Peninsula and south Shetland islands during 1950-2003. *Polar Science*. 4: 18-33

Steig, E.J., Schneider, D.P., Rutherford, S.D., Mann, M.E., Comiso, J.C., Shindell, D.T., 2009. Warming of the Antarctic ice-sheet surface since the 1957 International Geophysical Year. *Nature* 457, 459-462.

Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, D. C., & Robicsek, A. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 664-689.

Suárez, C. J., Kattán, J. N., Guzmán, A. M., & Villegas, M. V. (2011). Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infectio*, 10(2).

Tam, H. K., Wong, C. M. V. L., Yong, S. T., Blamey, J., & González, M. (2015). Multiple-antibiotic-resistant bacteria from the maritime Antarctic. *Polar Biology*, 38(8), 1129-1141.

Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol.*, 3(9), 711-721.

Tin, T., Fleming, Z., Hughes, K., Ainley, D., Convey, P., Moreno, C., Pfeiffer, S., Scott, J., Snape, I. (2009). Impacts of local human activities on the Antarctic environment: a review. *Antarc Sci* (21), 3-33.

Tindall, B. J. (2004). Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. *Microb Ecol.*, 47(3), 271-283.

Torrella F., Morita R.Y. 1981. Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(2): 518- 527.

Tuemmers, C., Torres, D. E., & De Los Ríos Escalante, P. (2011). Presencia de patógenos antropogénicos en la fauna antártica: El rol potencial de especies de aves migratorias. *Revista chilena de historia natural*, 84(2), 301-302.

Ugolini F., Bockheim Y.J. 2008. Antarctic soils and soil formation in a changing environment: A review. *Geoderma* 144: 1-8.

Vakulenko, S. B., & Mobashery, S. (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical microbiology reviews*, 16(3), 430-450.

Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2014). Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. *FEMS microbiology reviews*, 38(4), 761-778.

Vila, J., & Marco, F. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, 28(10), 726-736.

Warwick, F. & Vincent. (2000). Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarct Sci.* 12 (3): 374-385.

Wayne, P. (2012). National Committee for Clinical Laboratory Standards: 2012. Referente a solventes y diluyentes de soluciones de agentes antimicrobianos. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M100-S22: 150-152.*

Weisburg WG., Barns SM., Pelletier DA., Lane DJ. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Bacteriol* 173 : 697-703.

Woodford, N. (2010). Rapid characterization of β -lactamases by multiplex PCR. In *Antibiotic Resistance Protocols* (pp. 181-192). Humana Press.

Wynn-Williams, D. D. (1990). Ecological aspects of Antarctic microbiology. In: *Marshall KC (Ed.). Adv Microb Ecol*, 2, 71–146.

Wynn-Williams, D. D. (1996). Response of pioneer soil microalgal colonists to environmental change in Antarctica. *Microb Ecol.*, 31(2), 177-188.

Zhao Y., Tianjie L. (1995). The pedogenic groups and diagnostic characteristics in the Fildes Peninsula of King George Island, Antarctica. *Antarctic Research* 7(1): 70-78.

ANEXOS

Tabla A: Oligonucleótidos utilizados en la detección de genes de resistencia a antibióticos. Fuente: Elaboración propia.

Gen	Partidores	Secuencia nucleotídica 5' 3'	Tamaño amplión (pb)	Referencias
16S	P0(16s) P6(16s)	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG CTACGGCTACCTTGTACG	1400	Weisburg, 1991; Di Cello, 1997
bla _{TEM}	TEMR TEMF	TGGGTGCACGAGTGGGTAC TTATCCGCCTCCATCCAGTC	526	Tenover <i>et.</i> <i>al</i> , 1994
bla _{SHV}	SHVR SHVF	CTGGGGAAACGGAAGTAAATG GGGTATCCCGCAGATAAAT	389	Bello, 2005
bla _{CTX-M1}	m-CTX-MG1R m-CTX-MG1F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC AGCTTATTCATCGCCACGTT	551	Woodford, 2010
bla _{CTX-M2}	m-CTX-MG2R m-CTX-MG2F	CGACGCTACCCCTGCTATT CCAGCGTCAGATTTTCAGG		Woodford, 2010
bla _{CTX-M8}	m-CTX-MG8R m-CTX-MG8F	TCGCGTTAAGCGGATGATGC AACCCACGATGTGGGTAGC	923	Woodford, 2010
bla _{CTX-M9}	m-CTX-MG9R m-CTX-MG9F	CAAAGAGAGTGCAACGGATG ATTGGAAAGCGTTACTCACC	803	Woodford, 2010
bla _{CTX-M25}	m-CTX- MG25R m-CTX- MG25F	GCACGATGACATTCGGG AACCCACGATGTGGGTAGC		Woodford, 2010
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8 to CMY-11	MOXMR MOXMF	CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT	520	Pérez-Pérez, 2002

LAT-1 to LAT-4, CMY-2 to CMY-7, BIL-1	CITMF CITR	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	462	Pérez-Pérez, 2002
DHA-1, DHA-2	DHAMF DHAMR	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	405	Pérez-Pérez, 2002
ACC	ACCMF ACCMR	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	346	Pérez-Pérez, 2002
MIR-1T ACT-1	EBCMF EBCMR	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	302	Pérez-Pérez, 2002
FOX-1 to FOX-5b	FOXMR FOXMF	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	190	Pérez-Pérez, 2002
bla _{PER2}	PER-2 F PER-2REV	GTAGTATCAGCCCAATCCCC CCAATAAAGGCCGTCCATCA	738	Iran, 2013
floR	FloF FloR	AATCACGGGCCACGCTGTATC CGCCGTCAATTCTTCACCTTC	215	Bolton et al., 1999
<i>sul1</i>	Sul1F Sul1R	GTATTGCGCCGCTCTTAGAC CCGACTTCAGCTTTTGAAGG	408	Rosser y Young, 1999
<i>sul2</i>	Sul2F Sul2R	GAATAAATCGETCATCATTTTCGG CGAATTCTTGCGGTTTCTTTCAGC	810	Grape et al., 2003
<i>sul3</i>	Sul3F Sul3R	GAGCAAGATTTTTGGAATCG CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	790	Perreten y Boerlin, 2003
<i>drfA6</i>	dfrIb	GAGCAGCTICTITTIAAAGC TTAGCCCTTTIICCAATTTT	393	Navia et al., 2003
<i>drfA1</i>	D1 D2	ACGGATCCTGGCTGTTGGTTGGACGC CGGAATTCACCTCCGGCTCGATGTC	257	Lee et al., 2001