

UNA AUTÉNTICA CÁPSULA DEL TIEMPO, GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS PROVENIENTES DE BACTERIAS PRESERVADAS EN MUESTRAS DE HIELO

José Emilio Ramírez Piña, Edgardo Ulises Esquivel Naranjo, Fidel Landeros Jaime y José Antonio Cervantes Chávez

Unidad de Microbiología Básica y Aplicada. Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro. Campus Aeropuerto, Carretera a Chichimequillas, Ejido Bolaños,
Querétaro, Qro. C.P. 76140
Anillo Vial Fray Junípero Serra
Jramirez149@alumnos.uaq.mx; jose.antonio.cervantes@uaq.mx

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos presente en bacterias es un problema de gran importancia desde su identificación aunque se le asocia al ámbito de la salud pública porque dificulta el tratamiento de infecciones bacterianas, este es un fenómeno que ha estado presente desde hace millones de años en el planeta. La base genética de la resistencia a los antibióticos son los genes de resistencia, los cuales pueden codificar para distintos mecanismos celulares que impiden la acción del antibiótico hacia su diana terapéutica, por ejemplo, las bombas de eflujo. Estos genes están presentes en bacterias de todo el mundo desde tiempos antiguos, como prueba de esto están bacterias y sus secuencias de ADN las cuales se han encontrado en muestras de hielo como lo son del permafrost, los glaciares o núcleos de hielo en los polos que funcionan como auténticas cápsulas del tiempo. A la fecha algunos genes de resistencia se han encontrado en bacterias congeladas de hace millones de años, en tiempo recientes algunas bacterias y sus genes de resistencia se han diseminado en climas fríos debido a actividades antropogénicas. Un gran problema que puede ocurrir es el asociado a la liberación de esta información genética hasta ahora oculta por siglos y millones de años, esta caja de Pandora puede abrirse abruptamente debido a los deshielos que se observan a causa del cambio climático. Como humanidad, debemos plantearnos una pregunta seria, ¿estamos preparados para hacer frente a la liberación de bacterias que portan genes de resistencia antiguos?, considerando el escaso desarrollo de nuevas moléculas antibióticas.

Palabras clave: genes de resistencia, bacterias psicrófilas, permafrost, núcleos de hielo, bacterias preservadas.

Abstract

Since its identification the antibiotic resistance in bacteria is an important problem, mainly focus in public health because makes difficult the treatment of bacterial infections, this is phenomena present in the planet since millions of years ago. The genetic base of antibiotic resistance is the activity of resistance genes, encoded as a cellular mechanism that prevent the action of antibiotics on their targets, for example and efflux pumps. These genes are present in bacteria all around the world, their DNA sequence found frozen in ice samples like permafrost, glaciers or ice cores from the poles, all of them could be considered as a real time capsule, since this information is fully preserved. Today, some resistance genes were found in frozen bacteria with an estimated age of million years, recently some bacteria and their corresponding resistance genes have been disseminated to cold environment due anthropogenic activities. A gigantic problem that can occurred is related with the release of this genetic material that has been hidden by centuries and even

during millions of years, this Pandora box can be abruptly opened due to the melting due to global warming due to thawing. A serious question must be asked, Is the humanity prepared to cope with the release of bacteria carrying several ancient resistance genes? considering the scarce development of new antibiotic molecules.

1. INTRODUCCIÓN

Los agentes antibacterianos son moléculas con la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias, alterando diversas rutas metabólicas, modificando procesos celulares esenciales como la síntesis de proteínas, la replicación del ADN, detener su división celular o lisando a la célula por diversos mecanismos como lo es la inhibición de la síntesis de la pared celular (Blair et al. 2015). Actualmente, debido al mal manejo que hemos hecho de los antibióticos se ha generado un problema de resistencia a éstos en bacterias, seleccionándose la población con variantes alélicas resistentes a la acción del antibiótico. Este fenómeno de resistencia a antibióticos es multifactorial y varias acciones agravan el problema, como lo son su uso excesivo, prescripción inadecuada y su implementación sin regulación en la industria ganadera y agrícola, en donde muchas veces se usa cuando no se requiere, debido a que las personas consideran que sirve como un medio preventivo o lo usan cantidades inadecuadas; todas estas acciones propician la selección y expresión de genes de resistencia (GRA) (Ventola 2015).

La base genética de la resistencia a los antibióticos son los GRA los cuales pueden tener mutaciones puntuales y/o elementos móviles por los cuales se puede contener y propagar esa información genética, la cual se puede propagar horizontalmente por la acción de plásmidos, transposones que contienen otros GRA propagándose entre plásmidos, los integrones que se encuentran en transposones, plásmidos y el cromosoma bacteriano y los fagos que pueden transmitir dicha información como consecuencia de su ciclo de replicación (Figura 1)(Ma, et al., 2016; Zhang, et al., 2018).

Estos GRA pueden codificar para una o más proteínas asociadas a los mecanismos de resistencia, los cuales son muy diversos. Estos elementos genéticos móviles pueden pasar de bacteria a bacteria por transferencia horizontal y una vez recibida esta información genética se puede integrar en el cromosoma bacteriano, al expresarse brinda resistencia a la bacteria que se encuentra expuesta al antibiótico (Ma, et al., 2016; Zhang, et al., 2018). Los mecanismos de resistencia codificados por estos genes pueden ser la disminución de la permeabilidad de la membrana, la activación de bombas de expulsión de drogas, la modificación o protección de la estructura diana, la inactivación de la molécula por modificaciones en su estructura química como lo son la hidrólisis o la transferencia de grupos químicos con su consiguiente inactivación (Blair et al. 2015).

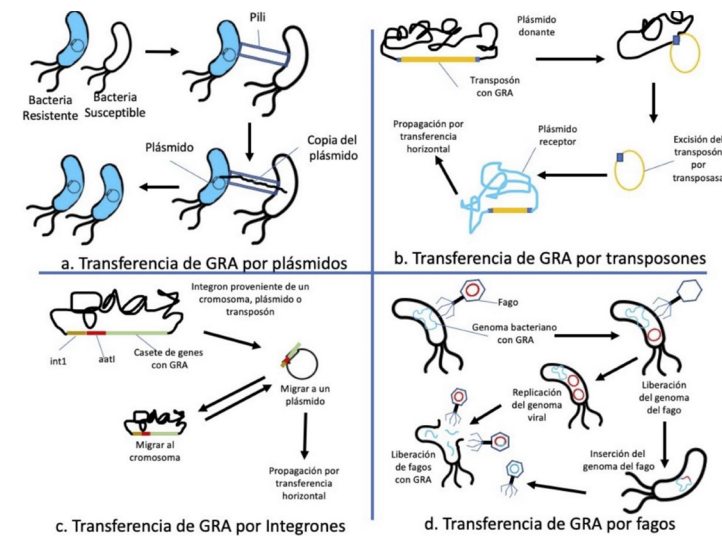


Figura 1. Mecanismos de propagación de GRA. a) las bacterias portadoras de GRA en plásmidos pueden transmitir estos genes por transferencia horizontal a bacterias sin plásmidos por medio del pili sexual se transmite una copia del plásmido. b) Los transposones presentes en plásmidos pueden contener GRA que se transmiten entre plásmidos bacterianos que potencialmente migran a nuevas bacterias debido a los plásmidos que los contienen. c) Los integrones se pueden encontrar en el cromosoma bacteriano, plásmidos y dentro de transposones, estos integrones se propagan horizontalmente y se mueven del plásmido al cromosoma. d) los fagos pueden poseer un ciclo lítico al momento de ensamblar las partículas virales puede incluir parte del material genético bacteriano inespecíficamente o en el caso de un ciclo lisogénico al integrarse al genoma, al salir del genoma puede llevar fragmentos del genoma bacteriano y propagarlo.

Los GRA se encuentran presentes en muchos organismos incluidas las bacterias y estos genes tienen origen en el medio ambiente, en el cual su fin último no es el hacer frente a los fármacos implementados por el hombre para hacer frente a los patógenos, si no que tienen otras funciones que permiten la adaptación en el nicho en el cual se encuentre la bacteria. Por ejemplo, las bacterias que producen antibióticos también poseen los genes de resistencia como un mecanismo de protección contra sus propios antibióticos y para sobrevivir ante los producidos por otras bacterias que compiten por el mismo nicho ecológico incluso los genes de resistencia pueden estar involucrados en modular la señalización entre bacterias o regular la degradación de la pared celular por inhibidores de la síntesis de pared (Davies y Davies 2010). Se tiene evidencia de que los genes de resistencia han estado presentes en bacterias de hace miles de años, en muestras de hielo de 30,000 años de antigüedad provenientes de Alaska, se encontraron secuencias de ADN pertenecientes a bacterias en mamuts y otros animales extintos, las cuales codifican para β -lactamasas con una identidad del 53% al 84% a las producidas por bacterias de la familia Streptomycetes (D'Costa et al., 2011).

Las bacterias, son de los pocos seres vivos que se encuentran distribuidos por todo el planeta, incluido los climas fríos, a estas bacterias se les denomina psicrófilas (Carpenter et al., 2000). Los hongos, los virus, algunas diatomeas y las bacterias tienen la capacidad de sobrevivir al quedar atrapadas en la nieve o en el hielo por miles de años, formando estructuras de resistencia. Algunas de las bacterias que se han encontrado en muestras de hielo son *Aquifex pyrophilus*, *Ffevidobacterium*

icelandicum y *Deinococcus murrayi* por mencionar algunos (Carpenter et al., 2000).

Evidencia de esto es Groenlandia en el polo norte y la Antártida en el polo sur, en estos dos lugares se han encontrado bacterias con genes de resistencia a antibióticos. A una profundidad de 2,131 metros en el Greenland Ice Sheet Project 2 en Groenlandia a 1,593 metros en Byrd y a 157km en Vostok 5G en la Antártida se han aislado bacterias que se encontraban en núcleos de hielo de millones de años de antigüedad, en los cuales se identificó bacterias con distintas morfologías: cocos, bacilos, espiroquetas y algunas de formas inusuales. Se identificaron algunos microorganismos cultivables de estas muestras y con base en sus secuencias de ADN se determinaron como: *Bacillus lichniformis*, *Bacillus thioparans*, *Rhodotorula mucilacinosa*, *Lactobacillus helveticus* y *Davidiella tassiana* por mencionar algunos (Knowlton et al. 2013). Es por ello que la capacidad de las bacterias para sobrevivir en climas extremadamente fríos, los núcleos de hielo, el permafrost o los glaciares sirven como capsulas del tiempo. A continuación, se describirán algunos GRA encontrados en muestras de suelo congeladas de hace miles o millones de años y el potencial peligro que puede representar para el futuro

1. GENES DE RESISTENCIA ANCESTRALES

Los genes de resistencia se han encontrado en microorganismos que están ampliamente distribuidos por el planeta, los cuales en climas fríos pueden llegar a quedar atrapados y preservarse por miles o millones de años la bacteria y sobre todo su material genético. En un núcleo de hielo de un permafrost en Eureka, la isla Ellesmere, Nunavut en Canadá se aislaron bacterias resistentes a antibióticos y sus plásmidos en los que se localizan sus GRA, entre estos se reportaron genes para conferir resistencia a penicilina, tetraciclina, carbenicilina, doxiciclina, aminoglucósidos, sisomicina y amikacina (Perron et al. 2015). Otro sitio donde se han encontrado GRA congelados e incluso bacterias viables es en Lena ubicado en Rusia, donde se recolectaron muestras de permafrost con antigüedad de 3.5 millones de años, en el cual se encontraron cepas que se proponen como ancestrales de *Staphylococcus warneri*, *S. pasteurii*, *S. haemolyticus* y *S. hominis* (Kashuba et al., 2017).

Las bacterias y su material genético pueden permanecer durante millones de años. Hay sitios donde se aislaron bacterias viables con GRA en sedimentos de permafrost con una edad estimada de 15,000 hasta los 3 millones de años, ubicados en la costa del mar Laptev y en el río Khomus-yuriakh, Grand Chukochia, a orillas del lago Grand Oler y en la costa Este del mar de Siberia ubicados en la tierra baja de Kolyma (Mindlin et al. 2008). Además, en muestras de sedimentos con una edad de 220 a 290 mil años se aislaron bacterias con resistencia a estreptomycin y cloranfenicol,

se caracterizaron las cepas resistentes a estreptomocina y se encontró que algunas bacterias tienen resistencia a más de un antibiótico ya que portan más de un gen de resistencia contra la estreptomocina (Mindlin et al. 2008) (Tabla I).

Tabla 1. GRA identificados en bacterias recuperadas de muestras de hielo

Lugar	Bacteria	GRA presentes	Referencia
Isla Ellesmere, Canadá	<i>Sporosarcina</i> sp.	SIS_P_2, AMK_P_2	Perron et al., 2015
	<i>Bacillus</i> sp.	TET_P_1, SIS_P_1, AMK_P_1	Perron et al., 2015
	<i>Staphylococcus</i> sp.	PEN_P_1,	Perron et al., 2015
	<i>Paenibacillus</i> sp.	SIS_P_1, AMK_P_1	Perron et al., 2015
	<i>Arthrobacter</i> sp.	TET_AL_1, SIS_AL_2	Perron et al., 2015
	<i>Streptotrophomonas</i> sp.	PEN_AL_1, PEN_AL_2, SIS_AL_2, DOX_AL_1, DOX_AL_2	Perron et al., 2015
Río Lena, Rusia	<i>Staphylococcus warneri</i> SG1	Aph(3`)-III, ant(6)-Ia, blaZ	Kasuba et al., 2017
	<i>Staphylococcus pasteurii</i> sp1	fusB	Kasuba et al., 2017
	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. Haminic c80	fusB, msr(A)	Kasuba et al., 2017
Costa Este de Siberia, Rusia	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCS 1435	blaZ, mecA, fosB, mph(C), erm(C), msr(A), aac(6)/aph(2`)	Kasuba et al., 2017
	<i>Acinetobacter</i> sp.	strA, strB, aadA	Mindlin et al. 2008
	<i>Flavobacterium cytophaga</i>	strA, strB, aadA	Mindlin et al. 2008
	<i>Pseudomonas</i> sp.	aadA	Mindlin et al. 2008
	<i>Paenibacillus amyloliticus</i>	strA, strB	Mindlin et al. 2008
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	strA, strB	Mindlin et al. 2008
	<i>Calcoaceticus psychrophilus</i>	strA, strB	Mindlin et al. 2008
	<i>Psychrobacter psychrophilus</i>	strA, strB	Mindlin et al. 2008

Tabla 1. GRA de bacterias aisladas en muestras de hielo. Se describe el GRA, género y especie de la bacteria y el sitio de aislamiento. AMK_P_1: aminotransferasa clase V, AMK_P_2: transportador, TET_P_1: permeasa, TET_AL_1: transportador Emr/QacA, SIS_P_1: protoporfirinogena oxidasa, SIS_AL_2: transportador ABC, PEN_P_1: penicilina acilasa II, PEN_AL_2: L2 β-lactamasa, DOX_AL_1: glicerol-3-fosfato O-aciltransferasa, DOX_AL_2: acil-CoA tioesterasa I, Aph(3`)-III: aminoglicósido 3-fosfotransferasa, ant(6)-Ia: aminoglucósido 6-adenilintransferasa, aac(6)/aph(2`): aminoglucósido fosfotransferasa, blaZ: betalactamasa, erm(C): proteína de resistencia a eritromicina, msr(A): Bomba de eflujo para macrólidos, mecA: proteína de unión a penicilina, mph(C): familia de macrólidos 2-fosfotransferasa, proteína de resistencia a ácido fusídico, aadA: aminoglucósido adeniltransferasa, strA: aminoglucósido 3-fosfotransferasa, strB: amidinotransferasa.

Por otro lado, en la región de Mackay en el Antártico en 17 sitios del glaciar, se identificaron genes de resistencia los cuales se analizaron para conocer el tipo de proteínas que codifica. Las familias de genes de resistencia encontradas son bombas de eflujo inespecíficas, dihidrofolato reductasa, bomba de eflujo específica para tetraciclina la cual se encuentra presente en bacterias del genero *Vibrio* y *Stenotrophomonas*, aminoglucósido 6-N-acetiltransferasa, adenina transferasa, metiltransferasa y β-lactamasas. De todos los genes encontrados el 71% pertenece a bacterias Gram negativas, el 20% no se pudo identificar y el 9% pertenece a bacterias Gram positivas, específicamente a Firmicutes y Actinobacteria (Van Goethem et al. 2018). Otros sitios más alejados a los polos donde se han encontrado GRA en bacterias es en los glaciares ubicados en Changme Khang y Changme Khangpu al norte de Sikkim en la India. Se identificaron los genes *rosB* con actividad transaminasa y oxidorreductasa, *acrB* y *mdtG* que codifican para bombas de eflujo, *qnrB* resistencia a quinolonas, *bacA* resistencia a bacitracina, *tetC* y *tet4I* para tetraciclina, *blism* para β-lactámicos y *ksgA*, *aph3ia* y *aac6ic* para aminoglucósidos (Sherpa et al. 2020).

2. GRA diseminados actualmente

El aumento en el uso de los antibióticos se ha convertido en un nuevo tipo de contaminante ambiental, las bacterias resistentes a antibióticos y por ende los genes que codifican para esta resistencia pueden propagarse fácilmente entre las bacterias del ambiente y transferir de manera horizontal estos genes a bacterias de diferentes géneros. Se han analizado núcleos de hielo y superficies de glaciares en China, Kyrgyzstan, Tajikistan, Alaska, Chile, Nepal, Buthan y Groenlandia y se han encontrado bacterias con GRA (Segawa et al. 2013). Los genes más abundantes fueron el *aac*, *strA*, *bla* que codifican para una aminoglucósido acetiltransferasa, aminoglucósido fosfotransferasa para resistencia a kanamicina y para una β-lactamasa respectivamente. Algunos de estos genes pueden provenir de un origen antropogénico como lo es el caso del *aac* que codifica para un aminoglucósido acetil transferasa, la cual genera la resistencia a los aminoglucósidos que fueron desarrollados en 1950. Otra evidencia de la introducción de genes de resistencia por el humano es el gen *mefA/E* que se encontró en muestras de Patriot Hill, el cual es un sitio con flujo constante de personas para fines de investigación (Segawa et al. 2013).

La Antártida es uno de los principales lugares que han sido afectados por el calentamiento global y por otras actividades humanas que contaminan los mares, como lo puede ser el turismo y la investigación. En la Antártida, en la Isla King George como consecuencia del turismo y la actividad de estaciones científicas, se identificó la presencia de antibióticos y de bacterias (*E. coli*) resistentes a antibióticos en el periodo 2015-2017. Se encontraron trazas de azitromicina, ceftriaxona, ciprofoxacina, clindamicina, claritromicina, cloxacilina, eritromicina, metranidazol, norfloxecina y trimetropim y el 21.7% de las cepas de *E. coli* mostraron resistencia a trimetropim y el 4.3% a quinolonas (Hernández et al. 2019). Estos datos revelan que las actividades humanas no solo ayudan en diseminación de bacterias con GRA al ambiente, lo cual puede afectar de manera indirecta a la fauna silvestre, un ejemplo de esto son los pingüinos, en los cuales se les han encontrado cepas de *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* resistentes a antibióticos comerciales. En los pingüinos *Pygoscelis papua*, *P. antartica* y *P. adeliae* que habitan en los alrededores de la Base Bernardo O`Higgins se encontraron los GRA que confieren resistencia a tetraciclina, β-lactámicos y aminoglucósidos (Retamal et al. 2017). Otro ejemplo son muestras de sedimentos marinos que están fuertemente influenciados por actividades humanas en Qilihai Wetland, Río Haihe y en Tianjin Water Park en el norte del mar de Bering, donde se encontraron una gran cantidad de bacterias con resistencia a tetraciclina, quinolonas y aminoglucósidos (Tan et al. 2017).

3. UNA CAJA DE PANDORA

Las bacterias no solo poseen una increíble capacidad de sobrevivir a temperaturas extremadamente bajas y adaptarse a ellas, también pueden desarrollarse fuera de ese clima de frío extremo, como se ha observado el aislamiento de *Staphylococcus* presentes en el permafrost ubicado en el Río Lena en Rusia o el aislamiento de *Caulobacter crescentus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquifaciens* presentes en núcleo de hielo provenientes de la Antártida y Groenlandia, lo cual implica una potencial capacidad para ocupar otros nichos (Kahuba et al., 2017; Knowilton et al., 2013). Como se ha mencionado a lo largo de este escrito, existe una gran cantidad de bacterias viables presentes en el hielo, incluidas algunas bacterias potencialmente patógenas para humanos, como lo son algunos coliformes con la capacidad de resistir a la ampicilina y que están presentes en un glaciar de 2000 años de antigüedad ubicado en el archipiélago ártico de Canadá. Como muestra de esto existen algunos casos de contagios por *Bacillus anthracis* procedentes de muestras de hielo en Rusia durante 1897 y 1925, estas bacterias permanecieron en animales infectados que se congelaron y que recientemente, en el 2016 causaron contagios en Yamal-Nenets, Rusia (Sajjad et al., 2020).

Debido a esta increíble capacidad de adaptación a los climas fríos y permanecer viables, las bacterias patógenas actuales que portan GRA pueden potencialmente diseminarse por el planeta y quedar congeladas, o que su material genético quede atrapado en el permafrost o glaciares y en un futuro representar un problema. Actualmente hay un posible problema de resistencia a antibióticos si los glaciares o el permafrost de miles o millones de años de antigüedad se derriten y liberan al medio ambiente bacterias con GRA, bien solamente el material genético con el GRA preservado, esto debido al calentamiento global. Existe una posibilidad de que ocurra un intercambio de información genética, debido a que muchos de los genes de resistencia presentes en bacterias de importancia clínica tienen su origen en bacterias del ambiente, aunque por similitud de secuencias sabemos que se tratan de genes de resistencia no sabemos con certeza como funcionarán esas proteínas codificadas por los genes en cuestión (Rogers et al., 2004; Sajjad et al., 2020). Recientemente Sajjad y colaboradores (2020) plantean dos hipótesis del posible escenario que se puede originar si se llegaran a liberar estas bacterias congeladas. La primera posibilidad es que los microorganismos se reactivarán e interaccionarán con los microorganismos no psicrófilos llevándose a cabo una transferencia horizontal de GRA, lo cual otorgará una ventaja ante los antibióticos actuales. La segunda posibilidad radica en que debido al estrés que puede implicar el que las bacterias estén congeladas por años, éstas se lisen liberando todo su material genético, éste puede mezclarse en el agua debido a un derretimiento, permitiendo la adquisición de ese

material genético con GRA para las bacterias circundantes en el ambiente. La tercer y última posibilidad puede ser que los microorganismos congelados una vez reactivados sean capaces de adquirir GRA y genes de virulencia de los microorganismos actuales, convirtiéndose potencialmente en patógenos para los humanos. La posibilidad de que las bacterias actuales adquieran GRA provenientes de muestras de hielo es factible debido a que tienen diversas vías por las cuales pueden recibir material genético, siendo la principal por medio de plásmidos. Los plásmidos pueden tener transpones acarreadores de estos genes moviéndose libremente entre plásmidos y por otro lado los integrones que pueden migrar entre plásmidos y entre el cromosoma bacteriano (Figura 1). Además de que por medio de la intervención de fagos pueden servir como acarreadores de GRA. Aunque aún no se ha descrito la transmisión de GRA entre bacterias provenientes de muestras de hielo y bacterias del ambiente o bacterias patógenas, no es algo imposible, porque algunas bacterias provenientes de estas muestras siguen permaneciendo viables, además de que no es necesario la transmisión de los GRA bacteria-bacteria porque se pueden adquirir por la internalización del material genético exógeno.

CONCLUSIÓN

La base molecular de la resistencia a los antibióticos son los GRA que están en microorganismos que están ampliamente distribuidos por todo el mundo, éstos GRA han estado presente en las bacterias desde hace millones de años como un mecanismo indispensable para resistir los antibióticos producidos por otros organismos o como regulador de funciones celulares. Una de las principales evidencias de estos genes antiguos son los genes aislados de microorganismos provenientes de las profundidades de grandes masas de hielo, las cuales están completamente aisladas de cualquier actividad humana, por lo que son consideradas como auténticas cápsulas del tiempo, lo que nos indica que los genes de resistencia estaban presentes hace millones de años. Actualmente con diversas actividades humanas como el turismo, la agricultura, crianza de animales, etc. se han diseminado antibióticos y bacterias resistentes a antibióticos al medio ambiente, que potencialmente pueden quedarse atrapadas en el hielo y volverse a liberar en un futuro. Además de que existe un futuro más próximo en el cual se abra la caja de Pandora que son el permafrost o los glaciares que debido al cambio climático pueden descongelarse liberando así bacterias que no conocemos con resistencia a antibióticos para cuyo tratamiento no nos encontremos preparados.

AGRADECIMIENTOS

A la licenciatura en Microbiología por la formación del pasante en Licenciado en Microbiología José Emilio Piña Ramírez.

2. GRA diseminados actualmente

Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV (2015) Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nature Reviews Microbiology* 13(1):42–51.

Carpenter EJ, Lin S, Capone DG (2000) Bacterial activity in South Pole snow. *Appl Environ Microbiol*, 66:4514–4517.

Davies J, Davies D (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(3): 417–33.

D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>.

Hernández F, Calisto-Ulloa N, Gómez-Fuentes C, Gómez M, Ferrer J, Gonzáles-Rocha G, Bello-Toledo H, Botero-Coy AM, Boux C, Ibáñez M, Montory M (2019) Occurrence of Antibiotics and Bacterial Resistance in Wastewater and Sea Water from the Antarctic. *Journal of Hazardous Materials* 363: 447–56.

Knowlton C, Ram V, D'Elia T, Rogers S (2013) Microbial Analyses of Ancient Ice Core Sections from Greenland and Antarctica. *Biology* 2(1): 206–32.

Kushaba E, Dmitriev AA, Kamal SM, Melefors O, Griva G, Römling U, Ernberg I, Kashuba V, Brouchkov A (2017) Ancient permafrost staphylococci carry antibiotic resistance genes. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 28, 1-8.

Ma L, Li AD, Yin XL, Zhang T (2016) The Prevalence of Integrons as the Carrier of Antibiotic Resistance Genes in Natural and Man-Made Environments. *Environmental Science & Technology*, 51, 5721-5728.

Mindlin SZ, Soina VS, Petrova MA, Gorlenko ZM (2008) Isolation of Antibiotic Resistance Bacterial Strains from Eastern Siberia Permafrost Sediments. *Russian Journal of Genetics* 44(1): 27–34.

Perron GG, Whyte L, Turnbaught PJ, Goordial J, Hanage WP, Dantas G, Desai MM (2015) Functional Characterization of Bacteria Isolated from Ancient Arctic Soil Exposes Diverse Resistance Mechanisms to Modern Antibiotics. *PLOS ONE* 10(3): 19.

Retamal P, Llanos-Soto S, Salas LM, López J, Vianna J, Hernández J, Medina-Vogel G, Castañeda F, Fresno M, González-Acuña D (2017) Isolation of drug-resistant *Salmonella enterica* serovar enteritidis strains in gentoo penguins from Antarctica. *Polar Biology* 40, 2531–2536.

Rogers SO, Starmer WT, Castello JD (2004) Recycling of pathogenic microbes through survival in ice. *Medical*

Hypotheses, 63(5), 773–777.

Sajjad W, Rafiq M, Din G, Hasan F, Iqbal A, Zada S, Ali B, Hayat M, Irfan M, Kang S (2020) Resurrection of inactive microbes and resistome present in the natural frozen world: Reality or myth?. *Science of the total environment*, 735.

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

Sherpa MT, Najar IN, Das S, Thakur N (2020) Distribution of antibiotic and metal resistance genes in two glaciers of North Sikkim, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 1-11.

Tan L, Li L, Ashbolt N, Wang X, Cui Y, Zhu X, Xu Y, Yang Y, Mao D, Luo Y (2017) Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. *Science of Total Environment*, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.110>.

Van Goethem MW, Pierneef R, Bezuidt OKI, De Peer YV, Cowan DA, Makhalyane TP (2018) A Reservoir of 'Historical' Antibiotic Resistance Genes in Remote Pristine Antarctic Soils. *Microbiome* 6(1): 40.

Ventola CL (2015) The antibiotic Resistance Crisis Part I: Causes and Threats. *P&T: a peer-reviewed journal for formulary management*, 40:277-283.

Zhang AN, Li LG, Ma L, Gillings MR, Tiedje JM, Zhang T (2018) Conserved phylogenetic distribution and limited antibiotic resistance of class I integrons revealed by assessing the bacterial genome and plasmid collection. *Microbiome* 6, 130.