



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Influencia de colonizadores primarios e interacciones microbianas en el desarrollo de biocorrosión marina sobre acero inoxidable.

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en
Genética Molecular y Microbiología.

Director de la Tesis: Dr. Rodrigo De la Iglesia.
Co-Director: Dr. Ignacio Vargas.

LESLIE KEICLYN DAILLE ENRÍQUEZ

Abril, 2019.

Dedicada a todas las mujeres que han hecho posible este momento.

“Life did not take over the world by combat, but by networking.”
— Lynn Margulis

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis fue financiada por la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Proyecto VRI-PUC N°01/2013), el Marine Energy Research & Innovation Center (MERIC) (Project CORFO 14CEI2-28228), la Office Naval Research (Grant NICOPN62909-17-1-2012) y la Beca de Doctorado Nacional CONICYT-PCHA/2014-21140415.

Pero su realización no habría sido posible sin la ayuda de las siguientes personas. Comenzando por mi director de Tesis, el Dr. Rodrigo De la Iglesia. Su constante guía y apoyo fueron fundamentales para completar esta Tesis. Pero ha sido su dedicación al enseñar, la fuerza con la nos incentiva a superar desafíos y su empatía, lo que me ha inspirado los últimos años y me ha llevado por caminos que nunca espere recorrer. Muchísimas gracias por todo esto, por la confianza, por el tiempo invertido, por tus palabras y por acompañarme en este difícil proceso.

Además, quisiera agradecer el apoyo de mi co-director de Tesis, el Dr. Ignacio Vargas, que durante estos años me ha desafiado a ser un mejor científico y una mejor persona. Agradezco todas las oportunidades brindadas para colaborar con el mundo, para aprender de los demás, y en general, para alcanzar mis metas a través del trabajo en equipo.

Así mismo, agradezco al Departamento de Genética Molecular y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas UC, por haberme aceptado en el programa y entregado las herramientas necesarias para lograr este cometido. Muchas gracias a todas las personas que lo componen, su compañía en el día a día estos cinco años han marcado mi vida.

Agradezco a mi comisión de Tesis, compuesta por la Dra. Mónica Vásquez, Dra. Beatriz Díez y el Dr. Nicolás Giuliani, por su tiempo y compromiso por sacar a la luz lo mejor de este trabajo, y de mí.

Agradezco al Laboratorio de Microbiología Marina por abrirme sus puertas y ser mi familia durante estos últimos cinco años. Gracias Soni y Benja, gracias por su amistad y por estar a mi lado en las buenas y en las malas. Coté y Esteban, gracias por su paciencia, por su sacrificio con el sonicador y por su compañía en los intensos terrenos. Clara, gracias por todos tus comentarios, tu cariño y ayuda constante. Cami, muchas gracias por darme tu confianza. Paulita, Kari, Belén, Eve, Isi, Ramón y Carlos, gracias a todos

porque han aportado a esta tesis de una forma u otra, y eso incluye también a todos los que estuvieron y ya no están.

El Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Ambiental UC, ha sido también mi hogar y les agradezco a todos por ayudarme a concretar la parte de mi tesis en la que tenía menos experiencia, especialmente a Diego, Carlos, Luis, Javi, Mauri y Shester. Además, agradezco el apoyo de la Dra. Magdalena Walczak, Dr. Francisco Armijo, Dr. Gonzalo Pizarro y a la gente de nuestro grupo de corrosión, ya que han sido fundamentales para el trabajo interdisciplinario de esta Tesis, para la discusión de resultados y ejecución de mis experimentos. Gracias por la dedicación Javi Aguirre, tus enseñanzas de electroquímica han sido un pilar en el camino de la corrosión. Muchas gracias a Francisca Rubio, por su compañía, risas, y en general, por ser mi incansable compañera y aquella en la que siempre puedo confiar.

Quisiera, además, dedicar unas palabras a todos los que contribuyeron con este trabajo desde otro ángulo. Primero, agradezco todos los momentos compartidos con mis Dostorcitos: Isa, Vale, Gise, Nano, Anibal, Herni, Jorge, Cata, Su, Ire, Pancho. Gracias por haber hecho de mi primer año del doctorado, uno de los mejores años de mi vida y seguir compartiendo alegrías (espero que por muchos años más). Valito, gracias por tu sinceridad y existir en mi vida. Isa, gracias por tantas aventuras, por el vino, los puzzles y tu compañía en los momentos más difíciles.

Gracias a aquellos que se convirtieron en parte de mi vida en el camino y que tendrán siempre un lugar en mi corazón: Tere y Eli, gracias por su tiempo, su ayuda y todo su cariño; Kurt, Nicole y Ger, por inspirarme; John, por mostrarme la naturaleza con otra mirada; Chris, por aceptarme tal como soy y entregarme su amistad. Agradezco, además, a Mario por su amistad, su compañía y porque siempre puedo confiar en su sinceridad. No ha sido fácil también agradecer sus retos, pero sé que solo reflejan su preocupación, por esta hermana adoptiva involuntaria que se le unió en el camino.

Finalmente, agradecer a mis piedras de apoyo: a mis papás, a mis hermanos, a mi familia, a Romero. Por su comprensión, su confianza, su apoyo incondicional a esta soñadora y por todo su amor. Mi camino definitivamente no habría sido el mismo sin la compañía de Rena y Ariel. Gracias la confianza, el amor, el tiempo, las palabras de aliento y los momentos de alegría compartidos, que me han ayudado a superar todos estos desafíos, te amo.

Gracias a todos creer en mí, son todos parte de este trabajo. Un abrazo, LK.

ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
Dedicatoria	3
Agradecimientos	5
Índice de Materias	7
Índice de Figuras	12
Índice de Tablas	16
Lista de Abreviaturas	17
1. Resumen	19
1.1. <i>Abstract</i>	22
2. Introducción	25
2.1. Corrosión Influenciada por Microorganismos.	25
2.2. Desarrollo de biopelículas en ambientes marinos.	28
2.3. Biopelículas microbianas asociadas a biocorrosión.	31
2.4. Hipótesis.	35
2.5. Objetivo General.	35
2.6. Objetivos Específicos.	36

3. Materiales	37
3.1. Materiales.	37
3.2. Reactivos.	38
3.3. Soluciones.	39
3.4. Equipos.	41
3.5. Programas computacionales.	42
3.6. Bases de datos.	42
4. Métodos	43
4.1. Construcción de la unidad experimental.	43
4.2. Montaje del experimento y estrategia de muestreo.	43
4.3. Determinación de las características físico-químicas del agua de mar natural contenida en los acuarios.	46
4.4. Caracterización morfológica de la biopelícula.	47
4.5. Análisis de la composición taxonómica de la comunidad microbiana.	48
4.6. Análisis de co-ocurrencia de especies.	52
4.7. Determinación de pérdida de masa de las placas de acero inoxidable.	53
4.8. Análisis electroquímicos.	53

5. Resultados	54
5.1. Diseñar una unidad y estrategia experimental para el estudio interdisciplinario de biocorrosión marina en ambientes naturales.	54
5.2. Determinar la estructura y composición de la comunidad microbiana que se establece sobre acero inoxidable, con énfasis en las etapas tempranas de la colonización.	56
5.2.1. Caracterización morfológica de la biopelícula marina desarrollada sobre acero inoxidable.	56
5.2.2. Estructura y composición de la biopelícula marina formada sobre acero inoxidable expuesto a agua de mar natural durante 112 días.	68
5.2.2.1. Estructura y composición del componente bacteriano y de arqueas de la biopelícula.	68
5.2.2.2. Composición y estructura del componente eucarionte de la biopelícula.	69
5.2.2.3. Variabilidad de la composición e índices ecológicos de la comunidad microbiana de la biopelícula.	75
5.2.2.4. Distribución de OTUs en los distintos tiempos de exposición.	82
5.3. Determinar las interacciones bióticas y abióticas que tienen lugar durante el desarrollo de una biopelícula microbiana sobre acero inoxidable expuesto continuamente a agua de mar.	88
5.3.1. Interacciones abióticas que se establecen durante la formación de la biopelícula sobre acero inoxidable.	88

5.3.2. Interacciones de co-ocurrencia entre los microorganismos presentes en la biopelícula.	90
5.4. Co-relacionar el desarrollo de corrosión sobre acero inoxidable con interacciones claves establecidas durante el desarrollo de la biopelícula microbiana.	108
5.4.1. Desarrollo de biocorrosión sobre acero inoxidable expuesto a agua de mar natural.	105
5.4.2. Relación entre la presencia de microorganismos específicos y/o sus interacciones con el desarrollo de biocorrosión sobre acero inoxidable expuesto a agua de mar natural.	114
6. Discusión	116
6.1. Nuevo modelo experimental permite la determinación de colonización primaria, sucesión e iniciación de biocorrosión en ambientes naturales costeros.	117
6.2. Colonización primaria de la superficie y su relación con el asentamiento de eucariontes fotosintéticos asociados a corrosión.	119
6.3. Colonización primaria de acero inoxidable expuesto a agua de mar natural.	121
6.4. Escasa detección de bacterias sulfato reductoras durante el tiempo de exposición analizado.	123
6.5. La presencia de bacterias y eucariontes productores de ácido durante la primera semana de exposición favorece el desarrollo de corrosión y explica el posterior cambio en el OCP.	124

6.6. Los cambios comunitarios y electroquímicos durante tiempos tardíos están asociados a la co-ocurrencia entre eucariontes heterótrofos y bacterias.	126
7. Conclusiones	130
8. Apéndices	131
Apéndice A - Procesamiento de datos de Illumina en Mothur	http://bit.do/ApendiceA
Apéndice B - Post-tratamiento de Datos de Secuenciación Masiva	http://bit.do/ApendiceB
Apéndice C - Determinación de OTUs y Taxa Exclusivas	http://bit.do/ApendiceC
Apéndice D - Correlación de Pearson	http://bit.do/ApendiceD
Apéndice E - Co-Ocurrencia de Especies	http://bit.do/Apendice-E
Apéndice F – Material Suplementario	131
9. Bibliografía	135

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Montaje del experimento de flujo continuo.	45
Figura 2. Unidad experimental para la exposición de placas metálicas a un flujo continuo de agua de mar.	55
Figura 3. Diseño para el montaje de placas.	57
Figura 4. Caracterización macroscópica de la biopelícula formada sobre acero inoxidable.	59
Figura 5. Caracterización microscópica de placas de acero inoxidable expuestas a agua de mar natural.	60
Figura 6. Morfología de sustancias depositadas en la superficie del acero inoxidable.	63
Figura 7. Asentamiento inicial de microorganismos en una superficie metálica expuesta a agua de mar natural.	64
Figura 8. Cobertura de la superficie del acero inoxidable expuesto a agua de mar natural.	65
Figura 9. Biopelícula formada luego de 112 días de exposición a agua de mar natural.	66
Figura 10. Identificación de diatomeas presentes en la biopelícula formada sobre acero inoxidable.	67

Figura 11. Composición taxonómica de bacterias y arqueas de la biopelícula durante su formación sobre acero inoxidable.	70
Figura 12. Composición taxonómica de bacterias y arqueas del agua de mar contenida en los acuarios durante el experimento.	71
Figura 13. Composición taxonómica de eucariontes de la biopelícula durante su formación sobre acero inoxidable.	73
Figura 14. Composición taxonómica de eucariontes del agua de mar contenida en los acuarios durante el experimento.	74
Figura 15. Índices ecológicos de la comunidad microbiana que constituye la biopelícula formada sobre acero inoxidable.	77
Figura 16. Similitud de la composición comunitaria microbiana.	78
Figura 17. Distribución de taxa bacterianas y de arqueas presentes en todos los tiempos de exposición en la biopelícula.	83
Figura 18. Distribución de taxa eucariontes presentes en todos los tiempos de exposición en la biopelícula.	84
Figura 19. Efecto de factores ambientales en la composición comunitaria.	89
Figura 20. Métricas de las redes de co-ocurrencia para cada tiempo analizado.	91
Figura 21a. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 0,125 días de exposición.	93
Figura 21b. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 0,25 días de exposición.	94
Figura 21c. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 0,375 días de exposición.	95

Figura 21d. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 0,5 días de exposición.	96
Figura 21e. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 0,75 días de exposición.	97
Figura 21f. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 1 día de exposición.	98
Figura 21g. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 2 días de exposición.	99
Figura 21h. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 3 días de exposición.	100
Figura 21i. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 5 días de exposición.	101
Figura 21j. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 7 días de exposición.	102
Figura 21k. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 21 días de exposición.	103
Figura 21l. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 30 días de exposición.	104
Figura 22. Dinámica de interacciones con eucariontes heterótrofos en la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable.	106
Figura 23. Deterioro del acero inoxidable 316L expuesto a agua de mar natural.	109
Figura 24. Dinámica del potencial a circuito abierto de placas de acero inoxidable expuestas a agua de mar natural.	110

- Figura 25.** Comportamiento electroquímico de placas de acero inoxidable expuestas a agua de mar natural. 112
- Figura 26.** Dinámica de la corriente de corrosión de placas de acero inoxidable expuestas a agua de mar natural. 113
- Figura 27.** Correlación entre factores biológicos y el desarrollo de corrosión. 115
- Figura 28.** Modelo conceptual del desarrollo de una biopelícula corrosiva en la costa central de Chile. 129

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla N°1. Índices ecológicos de la comunidad microbiana.	76
Tabla N°2. Ranking de las diez OTUs con mayor contribución en la similitud de la composición de la comunidad en cada tiempo de exposición.	78
Tabla N°3. Ranking de las diez OTUs con mayor contribución en la disimilitud de la composición de la comunidad entre cada tiempo de exposición.	81
Tabla N°4. Taxa de bacterias y arqueas exclusivas de los distintos tiempos de exposición.	86
Tabla N°5. Taxa eucariontes exclusivas de tiempos tempranos y medios de exposición.	87
Tabla N°6. Principales contribuciones de taxa en las interacciones establecidas con eucariontes heterótrofos durante 30 días.	107

LISTA DE ABREVIATURAS

"	Pulgada
°	Grado
°C	Grado Celsius
µm	Micrómetro
µL	Microlitro
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico
cm	Centímetro
d	Día
ESEM	<i>Environmental Scanning Electron Microscopy</i> – Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental
FE-SEM	<i>Field Emission Scanning Electron Microscopy</i> – Microscopia Electrónica de Barrido con Emisión de Campo
gr	Gramo
HCl	Ácido clorhídrico
HE	Hilo externo
HI	Hilo interno
L	Litro
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar

mm	Milímetro
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i> – Unidad Taxonómica Operacional
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico ribosomal
SDS	Sodio Dodecilsulfato
SO	Extremo para soldar interno
SPP	Soporte para placas
TAE	Tris, Ácido Acético, EDTA
TEE	Conexión en forma de T
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

1. RESUMEN.

La corrosión es un fenómeno electroquímico que afecta toda superficie de metal expuesta a ambientes acuosos o húmedos, produciendo una disolución del metal mediante reacciones de óxido/reducción. Este fenómeno puede verse inducido y/o aumentado por la actividad microbiana, proceso conocido como biocorrosión y es generada por la actividad de microorganismos que se adhieren a la superficie del metal, y que forman una biopelícula cuya actividad metabólica altera las condiciones químicas de la superficie del metal. Se ha establecido que, durante la formación de estas biopelículas, el tipo de microorganismo que coloniza cada superficie está determinado principalmente por el material de la superficie, las características del fluido y los mecanismos de adherencia microbianos. Luego del establecimiento de las primeras especies que colonizan el metal, se produce una sucesión microbiana asociada al desarrollo de interacciones específicas entre los microorganismos y los microambientes de la biopelícula. Esto permite albergar una gran variedad de metabolismos en la biopelícula, como la reducción de sulfato, oxidación de hierro y producción de exopolisacáridos, los que afectan directa o indirectamente la superficie del metal. En ambientes marinos, las condiciones ambientales exacerbaban el desarrollo de corrosión y la influencia de microorganismos en el proceso. A pesar de la importancia de los microorganismos en biocorrosión marina, aun no es claro quiénes se asientan en la superficie, cómo afectan la constitución de la biopelícula sobre superficies metálicas y de qué depende su capacidad corrosiva.

En este proyecto de Tesis, se propone que los colonizadores primarios que se asientan sobre superficies de acero inoxidable en ambientes marinos, y las interacciones que ellos establecen, son determinantes para el desarrollo de biocorrosión. Para confrontarla se propone

determinar la estructura y composición de la comunidad microbiana que se genera durante el desarrollo de una biopelícula corrosiva -con énfasis en las primeras etapas de colonización- y analizar las interacciones bióticas y abióticas que se establecen al ser inducido el proceso de corrosión sobre el acero inoxidable. Para abordar este objetivo, se diseñó un modelo experimental que permite la exposición de placas de acero inoxidable a un flujo continuo de agua de mar natural. El desarrollo de la biopelícula fue evaluado mediante el análisis de una serie de tiempo de 15 puntos contenidos en tiempos tempranos (0,125 días, 0,25 días, 0,375 días, 0,5 días, 0,75 días, 1 días), medios (2 días, 3 días, 5 días, 7 días), y tardíos (21 días, 30 días, 55 días, 85 días y 112 días) de exposición. En cada punto de esta serie de tiempo, se determinó la composición taxonómica de la biopelícula, incluyendo bacterias, arqueas y eucariontes. Para ello, se utilizó secuenciación masiva de los genes de las subunidades ribosomales 16S rRNA y 18S rRNA respectivamente. Esta información se integró analizando patrones de co-ocurrencia e interacciones que se establecen en la biopelícula, durante el proceso de biocorrosión. Se determinó en paralelo el comportamiento electroquímico de las placas y los niveles de deterioro del material establecidos a través de pérdida de peso.

Los resultados obtenidos indican que la colonización primaria de la superficie comenzó por asociación con las imperfecciones del material y que estuvo compuesta no solo por bacterias, sino también por eucariontes fotosintéticos, eucariontes heterótrofos y arqueas. Entre ellos encontramos principalmente Gammaproteobacteria, Bacteroidetes, Archaeplastida y Opisthokonta. Se observó que el asentamiento de microorganismos eucariontes previamente relacionados con corrosión, como diatomeas, se favorece durante la primera semana de exposición a través de la interacción con sectores previamente colonizados por microorganismos. Además, a los 7 días, se determinó un máximo en la conectividad entre el componente eucarionte y bacteriano. Durante tiempos tardíos de exposición, la composición

microbiana presenta cambios, donde se destaca un aumento de Alphaproteobacteria, Firmicutes y Plactomycetes. Finalmente, se produjo una saturación del espacio disponible, la comunidad presentó menor riqueza, mayor equidad, y mayor abundancia de las especies que dominan en las redes de co-ocurrencia inferidas. Por otro lado, los análisis electroquímicos y de deterioro del material mostraron que, durante tiempos tempranos y medios de exposición, se produjo un ennoblecimiento de la superficie de la placa, lo que sugiere susceptibilidad al desarrollo de corrosión por picadura. Posteriormente, durante tiempos tardíos de exposición, se observó un desplazamiento del potencial desde $+200 \text{ mV}_{\text{vs Ag/AgCl}}$ hacia $-200 \text{ mV}_{\text{vs Ag/AgCl}}$, valor en el cual se mantiene hasta el final del experimento. Se determinó mayor deterioro del material luego de este periodo. Los valores de OCP mencionados y un aumento significativo de la corriente de corrosión durante el experimento sugieren, en conjunto, una activación de la superficie dada por un aumento en la transferencia de electrones. Los resultados apoyan parcialmente las hipótesis planteadas, principalmente por la relación entre colonizadores primarios, el asentamiento de diatomeas y las potenciales interacciones ecológicas entre bacterias y eucariontes heterótrofos.

En este trabajo se muestra la importancia del estudio del desarrollo de la sucesión biológica y las interacciones biológicas que tienen lugar, para entender el desarrollo de corrosión en acero inoxidable en ambientes naturales. En conjunto han permitido la propuesta de un modelo conceptual y la formulación de nuevas hipótesis que nos ayuden a entender el fenómeno de biocorrosión marina con miras a nuevas estrategias de prevención y control que sean amigables con el medioambiente.

1.1. ABSTRACT.

Corrosion is an electrochemical phenomenon that affects any metal surface exposed to aqueous or humid environments, producing a dissolution of the metal through oxide/reduction reactions. This phenomenon can be inhibited, induced and/or increased by microbial activity, a process known as biocorrosion, that is generated by the activity of microorganisms that adhere to the surface of the metal, forming a biofilm whose metabolic activity alters the chemical conditions of the surface of metal. It has been established that, during the formation of these biofilms, the type of microorganisms that colonizes each surface is determined mainly by the surface material, the characteristics of the fluid and the microbial adhesion mechanisms. After the establishment of the first species that colonize the metal, a microbial succession is produced, associated with the development of specific interactions between the microorganisms and the microenvironments of the biofilm. This allows to hold a great variety of metabolisms in the biofilm, such as sulfate reduction, iron oxidation and production of exopolysaccharides, which directly or indirectly affect the metal surface. In marine environments, environmental conditions exacerbate the development of corrosion and the influence of microorganisms in the process. Despite the importance of microorganisms in marine biocorrosion, it is still not clear which microorganisms will settle on the surface, how they affect the constitution of the biofilm on metal surfaces and what their corrosive capacity depends on.

In this Thesis project, it is proposed that the primary colonizers that settle on stainless steel surfaces in marine environments, and the interactions they establish, are determinants for the development of biocorrosion. To confront it, it is proposed to determine the structure and composition of the microbial community that is generated during the development of a corrosive

biofilm -with emphasis on the first stages of colonization- and to analyze the biotic and abiotic interactions that are established when the corrosion process is induced. on stainless steel. To address this objective, an experimental model was designed that allows the exposure of stainless steel plates to a continuous flow of natural seawater. The development of the biofilm was evaluated by analyzing a time series of 15 points contained in early (0.125 days, 0.25 days, 0.375 days, 0.5 days, 0.75 days, 1 day), medium (2 days, 3 days, 5 days, 7 days), and late (21 days, 30 days, 55 days, 85 days and 112 days) exposure times. At each point in this time series, the taxonomic composition of the biofilm was determined, including bacteria, archaea and eukaryotes, through massive sequencing of the 16S rRNA and 18S rRNA ribosomal subunit genes respectively. This information was integrated analyzing patterns of co-occurrence and interactions that were established in the biofilm during the biocorrosion process. In parallel, the electrochemical behavior and levels of deterioration of the plates were determined.

The results indicated that primary colonization of the surface began by association with the imperfections of the material and that it was composed not only by bacteria, but also by photosynthetic eukaryotes, heterotrophic eukaryotes and archaea. Among them we find mainly Gammaproteobacteria, Bacteroidetes, Archaeplastida and Opisthokonta. It was observed that the settlement of eukaryotic microorganisms previously related to corrosion, such as diatoms, was favored during the first week of exposure through interaction with sectors previously colonized by microorganisms. In addition, after 7 days, a maximum in the connectivity between the eukaryotic and bacterial component was determined. During late exposure times, the microbial composition change, with an increase in Alphaproteobacteria, Firmicutes and Plactomycetes. Finally, there was a saturation of the available space, the community presented lower richness and diversity, but greater evenness. On the other hand, the electrochemical and deterioration analysis of the material showed that, during early times and means of exposure,

the surface of the plate was ennobled, which suggests susceptibility to the development of pitting corrosion. Subsequently, during late exposure times, a potential shift was observed from +200 mV_{vs Ag/AgCl} to -200 mV_{vs Ag/AgCl}, which was maintained until the end of the experiment. Greater deterioration of the material was determined after this period. The OCP values and a significant increase in the corrosion current during the experiment suggest an activation of the surface given by an increase in electron transfer. The results partially support the hypotheses proposed, mainly by the relationship between primary colonizers, the settlement of diatoms and the potential ecological interactions between bacteria and heterotrophic eukaryotes.

This Thesis project showed the importance of studying the development of biological succession and the biological interactions that take place, to understand the development of corrosion over stainless steel in natural environments. Together they have allowed the proposal of a conceptual model and the formulation of new hypotheses that help us to understand the phenomenon of marine biocorrosion to design new environmental friendly strategies of prevention and control.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. Corrosión Influenciada por Microorganismos.

La corrosión es un fenómeno electroquímico que afecta toda superficie de metal expuesta a ambientes acuosos o húmedos y que consiste en una reacción de óxido/reducción que resulta en la disolución del metal. En un proceso de corrosión, la disolución del metal sucede en sitios anódicos, mientras los electrones son aceptados en una reacción catódica en sitios separados (Hamilton, 1985). Esta reacción puede ser inducida, facilitada o exacerbada por la actividad de microorganismos, fenómeno conocido como corrosión influenciada por microorganismos (MIC, de su sigla en inglés) o biocorrosión.

La biocorrosión es generada por la actividad metabólica de microorganismos que crecen adheridos a la superficie del metal, formando una compleja estructura denominada biopelícula. Si bien muchos tipos de bacterias poseen la capacidad de adherirse y formar biopelículas sobre superficies, las interacciones específicas con la superficie están determinadas principalmente por las propiedades del material, las características del fluido y los mecanismos de adhesión bacterianos (Lichter *et al.*, 2008). El desarrollo de una biopelícula sobre la superficie de un metal puede contribuir al proceso de corrosión, a través de distintos mecanismos que pueden ocurrir simultáneamente, entre los que encontramos: i) generación de zonas anaeróbicas; ii) concentración de iones ferrosos y especies químicas corrosivas en la superficie; iii) creación de zonas de aireación diferencial debido al desarrollo heterogéneo de la biopelícula; iv) conducción de electrones lejos de la superficie; v) retención de promotores de corrosión en su exopolisacárido; y vi) generación de una disrupción de la capa pasiva del metal (King *et al.*, 1973; Beech & Sunner, 2004; Li *et al.*, 2013).

El fenómeno de biocorrosión es una de las principales causas de fallas en estructuras metálicas, principalmente en sistemas expuestos a agua de mar. Además, provoca degradación de materiales, bloqueos mecánicos y una mayor resistencia en los sistemas de transferencia de calor. El reemplazo o reparación de estas estructuras cuestan a la industria de países desarrollados miles de millones de dólares al año y se estima que la biocorrosión provoca el 50% de estos daños (Fang *et al.*, 2002; Hamilton, 2003). Considerando esta estimación, en Reino Unido, Alemania y Japón los costos por biocorrosión podrían superar los 150 mil millones de dólares anuales (El-Meligi, 2010). En Latinoamérica, los costos anuales alcanzan los 84 mil millones de dólares, mientras que, en Chile estos podrían alcanzar aproximadamente 5 mil millones de dólares al año (Lieser & Stek, 2010).

Debido a las dificultades que el deterioro en la infraestructura implica para la industria, ha sido necesaria la utilización de aleaciones con mayor resistencia a la corrosión, entre ellas el acero inoxidable de grado marino. Este tipo de aleaciones presentan mejor rendimiento frente al desarrollo de corrosión generalizada, cuyo deterioro de la superficie es uniforme y permite mejores estimaciones sobre su vida útil. No obstante, se ha observado con mayor frecuencia el desarrollo de corrosión localizada en la superficie del metal (Mollica, 1992; Videla, 1994). Se ha observado que exponiendo acero inoxidable en ambientes marinos el comportamiento electroquímico del metal presenta, además, un efecto de ennoblecimiento luego de varias semanas de exposición a un flujo de agua de mar natural. Este efecto de ennoblecimiento consiste en el desplazamiento del potencial de la superficie (ie. OCP y E_{corr}) hacia valores más positivos (más nobles) luego de embeber las muestras en agua de mar natural (Characklis & Cooksey, 1983; Videla *et al.*, 1989; Feron & Dupont, 1998). Esto no implica que las placas sean más resistentes a la corrosión, por el contrario, involucra que el

potencial se acerca al potencial de picadura y existen mayores probabilidades de que se desarrolle corrosión localizada (Landoulsi *et al.*, 2011).

Los elevados costos y la complejidad asociada al desarrollo de biocorrosión han planteado la necesidad de realizar estudios respecto de las formas en las que se puede controlar o evitar este proceso. Las estrategias actuales de control de biocorrosión involucran el desarrollo de nuevos materiales con mayor resistencia a la corrosión, el uso de recubrimientos orgánicos y metálicos, el desarrollo de polímeros, la protección catódica, y el control de la corrosión a través de métodos químicos (uso de biocidas y antimicrobianos) y biológicos (Lin & Ballim, 2012). Estos últimos son de gran interés, principalmente porque generan menos efectos adversos en el medio ambiente. Entre ellos, los más estudiados son la exclusión por competencia biológica y la utilización de biopelículas bacterianas "artificiales" como barrera mecánica y de producción de antimicrobianos al medio (Jayaraman *et al.*, 1999b; Tabari *et al.*, 2011; Zuo *et al.*, 2014). Aun cuando estas estrategias han sido exitosas en ambientes controlados, al ser utilizadas en presencia de comunidades microbianas complejas, como las presentes en agua de mar, han demostrado resultados más bien contradictorios, dependiendo de los microorganismos presentes y de la superficie utilizada (Juzeliūnas *et al.*, 2006). Estos resultados han resaltado la necesidad de conocer en mayor detalle el proceso de desarrollo de la biopelícula, quiénes la componen y los principales factores que estimulan el desarrollo de biocorrosión en ambientes naturales (Kip & van Veen, 2015).

Dada su estrecha asociación con procesos industriales, uno de los ambientes naturales de mayor interés en el estudio de la biocorrosión es el ambiente marino. En este tipo de ambiente se exagera la biocorrosión, debido a la exposición a un fluido que presenta

constantemente variaciones en sus factores bióticos y abióticos, y que influencia los procesos electroquímicos que se desarrollan en el metal desde que es expuesto al medio acuoso.

2.2. Desarrollo de biopelículas en ambientes marinos.

Los ambientes marinos corresponden a un 71% de la superficie del planeta y presentan una gran relevancia para las poblaciones humanas, debido a que proveen proteína para consumo animal y son una fuente de agua para muchos procesos industriales (Lalli & Parsons, 1997). Las comunidades microbianas marinas son muy diversas y están constituidas por bacterias, arqueas, eucariotas y virus. Ellos son responsables de la mitad de la actividad global asociada a ciclos biogeoquímicos de elementos como el carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y hierro (Falkowski *et al.*, 2008). La abundancia de estos microorganismos en el mar se relaciona fuertemente con las condiciones abióticas de la columna de agua. El agua de mar tiene un pH entre 8-8.3 y una salinidad que fluctúa entre 33-37 g/L, dada por la presencia de componentes salinos como cloruro, sodio, sulfato, magnesio, bicarbonato, calcio y potasio. Además, el agua de mar posee un pequeño porcentaje de nutrientes (como nitrato y fosfato), metales trazas y gases disueltos como O₂, CO₂ entre otros (Wright *et al.*, 1995). El agua de mar está sujeta a variaciones estacionales tanto en sus características físico-químicas (temperatura, salinidad, nutrientes) como biológicas (abundancia celular de microorganismos fotosintéticos, desarrollo de florecimientos primaverales) (Wright *et al.*, 1995). En este contexto, los ambientes costeros son uno de los más variables debido al efecto de vientos, afluentes de ríos y que presentan una mayor influencia por actividades humanas (Lalli & Parsons, 1997). Es por esto que pueden tener gran influencia en el tipo de microorganismos

que coloniza superficies vivas o inertes expuestas a agua de mar y, por lo tanto, en el desarrollo de biopelículas asociadas a corrosión.

Una biopelícula se define como una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie, organizados espacialmente y embebidos en una matriz extracelular tridimensional auto-producida (Costerton *et al.*, 1999). Las variaciones temporales de la composición comunitaria que tienen lugar durante el desarrollo de la biopelícula, se denominan sucesión biológica (SB). Durante la SB existe un orden cronológico en el establecimiento de los diferentes microorganismos que componen la comunidad y está asociada con las cuatro etapas características del desarrollo de la biopelícula: (i) unión reversible de microorganismos, (ii) unión estable y multiplicación, (iii) maduración, y finalmente (iv) desprendimiento de la biopelícula (Stoodley *et al.*, 2002). En el desarrollo de una biopelícula asociada a corrosión se ha descrito que inicialmente los microorganismos planctónicos interactúan con partículas orgánicas e inorgánicas que se han depositado en la superficie del metal (Compère *et al.*, 2001), generando una unión aún reversible, donde los microorganismos no presentan cambios en sus perfiles de expresión genética (Stoodley *et al.*, 2002). Una vez establecidos estos microorganismos colonizadores primarios y a medida que se multiplican, la biopelícula va modificando las características electroestáticas de la superficie del metal, favoreciendo la llegada de colonizadores secundarios (Videla & Herrera, 2005). Además, durante esta etapa los microorganismos establecidos en la superficie comienzan la síntesis y secreción de exopolisacáridos (EPS), prolongando este proceso hasta las últimas etapas del desarrollo de la biopelícula (Stoodley *et al.*, 2002; Jefferson, 2004;). Finalmente, esta comunidad primaria rodeada de exopolisacáridos, se desarrolla hasta la etapa de maduración, a través de interacciones biológicas entre los microorganismos presentes en la biopelícula y, a su vez,

facilitando el asentamiento de nuevos microorganismos (Dang & Lovell, 2000). Esta etapa aún no ha sido estudiada en modelos complejos de biopelículas asociadas a corrosión, pero en modelos clínicos se ha descrito la generación de estructuras complejas, con canales y poros, que van a dar lugar a la formación de microambientes con características distintas a las que presenta el medio acuoso, provocando la redistribución de los microorganismos a través de la biopelícula de acuerdo a sus metabolismos y requerimientos energéticos (Stoodley *et al.*, 2002).

Debido a que las biopelículas asociadas a corrosión son complejas (Lee *et al.*, 2008), aún no se logrado dilucidar cuáles son los factores que determinan la composición de una comunidad con actividad corrosiva. En sistemas similares, pero asociados a enfermedades patógenas humanas, se ha visto que eventos de co-agregación iniciales son determinantes para una sucesión ordenada de eventos de adherencia microbiana que finalmente resulta en la incorporación de bacterias patógenas (Marsh & Bradshaw, 1995; Rickard *et al.*, 2003). Además, se ha determinado en biopelículas microbianas de agua dulce, que la interacción entre colonizadores primarios y tardíos es especie-específica y constituye una etapa fundamental para el ensamblaje de biopelículas multi-especies (Rickard *et al.*, 2002). En investigaciones recientes, se ha descrito que las interacciones bióticas serían determinantes de la estructura de comunidades en ambientes marinos (Lima-Mendez *et al.*, 2015) y si bien, se ha descrito que en ambientes marinos los colonizadores primarios estarían definidos principalmente por las características de la superficie (Lee *et al.*, 2008), se desconoce si estos y sus interacciones durante la conformación de la biopelícula tendrán un rol fundamental en el desarrollo de una biopelícula madura con características corrosivas.

2.3. Biopelículas microbianas asociadas a biocorrosión.

Por muchos años, el estudio de grupos bacterianos específicos ha mejorado nuestro entendimiento del fenómeno de biocorrosion (Videla, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Sheng *et al.*, 2007). Sin embargo, muchos de estos trabajos se han realizado utilizando cultivos puros de microorganismos en medios que difieren de las condiciones naturales (Bermont-Bouis *et al.*, 2007; Boudaud *et al.*, 2010; Enning & Garrelfs, 2014). Si bien se han expuestos superficies metálicas en ambientes marinos naturales para describir su comportamiento electroquímico, en estos casos la composición de la biopelícula asentada en su superficie no ha sido descrita en detalle (Zhang & Dexter, 1995; Féron & Dupont, 1998; Fischer *et al.*, 2016). El análisis de biopelículas microbianas presentes en tuberías y acero corroídos, mediante uso de técnicas independientes de cultivo, han mostrado que estas son mucho más complejas que lo que se había encontrado con métodos de cultivo (Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Rajasekar *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011; Marty *et al.*, 2014), indicando que los estudios con grupos específicos podrían no ser lo suficientemente profundos para el análisis de este fenómeno en ambientes naturales.

En el caso de biocorrosión, se han descrito géneros de bacterias aeróbicas con metabolismo hierro-oxidante, como *Gallionella* y *Leptothrix*, y azufre-oxidantes, como *Thiobacillus*, asociados a corrosión que catalizan la deposición de hidróxido férrico en la superficie del metal y la producción de ácidos, respectivamente (Coetser & Cloete, 2005; McBeth *et al.*, 2011). Algunos géneros de bacterias hierro-oxidantes, además, son capaces de oxidar manganeso y provocar depósitos de óxido de manganeso, como *Metallogenium* y *Pedomicrobium*. Por otro lado, algunas especies de *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Graciollasia* y *Cladosporium* han sido asociadas con

biocorrosión, debido a su capacidad de producir ácidos y a la producción de una capa gelatinosa sobre la superficie del metal, que impide la difusión del oxígeno (Coetser & Cloete, 2005; Rajasekar *et al.*, 2010). Sin embargo, los microorganismos históricamente relacionados al desarrollo de biocorrosión son bacterias con metabolismos anaeróbicos, entre los que se encuentra *Clostridium*, *Geobacter* y principalmente Gammaproteobacteria sulfato-reductoras (SRB). Estos grupos causan biocorrosión por su capacidad fermentativa, por la oxidación de hidrógeno y por la producción de productos de corrosión de sulfuro de hierro, respectivamente (Coetser & Cloete, 2005; Mehanna *et al.*, 2009; Plugge *et al.*, 2011). Además de estos microorganismos, en ambientes anóxicos, el desarrollo de biocorrosión puede también estar asociado a la presencia de bacterias nitrato reductoras (NRB) y metanógenos, que utilizan electrones desde el acero para la reducción de nitrato y CO₂, respectivamente (Uchiyama *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2013). A modo de ejemplo, ha sido reportado que en biopelículas ricas en Proteobacteria y Arqueas, donde predominan *Methanomicrobia*, *Thermoprotei* y *Halobacteria*, su asociación con biocorrosión está dada principalmente por la capacidad metanogénica de la biopelícula (Zhang *et al.*, 2003; Gomez-Alvarez *et al.*, 2012).

Los colonizadores primarios de las superficies artificiales en ambientes marinos han sido principalmente asociados a bacterias (Videla *et al.*, 1994; Dang *et al.*, 2008; Dang & Lovell, 2016; Rampadarath *et al.*, 2017). Sin embargo, en estudios forenses de estructuras afectadas por biocorrosión marina, se ha visto que en la interfase del metal y la biopelícula es posible detectar no solo bacterias, sino también arqueas y eucariontes fotosintéticos (Celikkol-Aydin *et al.*, 2016), cuya presencia en la capa interna de la biopelícula puede generar una redistribución de los microorganismos debido a la producción de oxígeno (Dang & Lovell, 2016). Su participación en la sucesión biológica ha sido anteriormente asociada a los primeros

5 días de desarrollo de la biopelícula (Videla *et al.*, 1994; Qian & Xu, 2012) y se considera que el primer aumento drástico en la acumulación de biomasa de la biopelícula se debe al asentamiento de diatomeas (Landoulsi *et al.*, 2011). Se sugiere que estos microorganismos podrían tener un rol en biocorrosión, por ejemplo, a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (e.g. peróxido de hidrógeno) o incrementando el suministro de oxígeno para especies bacterianas heterotróficas (De Messano *et al.*, 2009; Eashwar *et al.*, 2009; Landoulsi *et al.*, 2011).

Actualmente, la secuenciación masiva y los análisis metagenómicos nos permiten analizar con mejor resolución la composición microbiológica de las biopelículas asociadas a biocorrosión marina, lo cual ha mostrado la complejidad taxonómica y funcional de estas comunidades (Gomez-Alvarez *et al.*, 2012; Fuhrman *et al.*, 2015). Debido a esta complejidad, cambios en la composición taxonómica de la comunidad, no necesariamente desencadenen cambios en la funcionalidad de la biopelícula (Prosser *et al.*, 2007), dificultado el uso y desarrollo de estrategias de control biológico dirigido. Por lo tanto, el desarrollo de técnicas eficientes e inocuas para el medio ambiente que permitan controlar, detectar y monitorear la biocorrosión, depende de una mejor comprensión de las interacciones que se desarrollan entre los microorganismos que la conforman y que le entregan un carácter corrosivo (Faust & Raes, 2012; Kip & van Veen, 2015).

El desarrollo de biocorrosión es complejo y el conocimiento que tenemos sobre los procesos involucrados aún es insuficiente para entender su funcionamiento. Si bien los antecedentes indican que la comunidad microbiana que coloniza la superficie sería clave para el desarrollo de una biopelícula corrosiva, aún no es claro qué aspectos de la sucesión biológica son críticos para el desarrollo de corrosión, y surgen interrogantes como, ¿qué

factores, abióticos y/o bióticos son determinantes en la sucesión biológica de ésta biopelícula?, ¿cuáles son las interacciones que se producen entre los microorganismos que se establecen en la superficie?, ¿están estas interacciones co-relacionadas con los niveles de corrosión del metal?. En este proyecto, se busca caracterizar a los colonizadores primarios del acero inoxidable en agua de mar, las interacciones que se establecen durante la sucesión biológica y su influencia en el ensamblaje de la biopelícula microbiana asociada con el proceso corrosivo.

2.4. Hipótesis de Trabajo.

En base a los antecedentes recopilados, se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis #1:

“Durante el proceso de sucesión biológica desarrollado en superficies de acero inoxidable expuestas de forma continua a agua de mar, los colonizadores primarios de la superficie son determinantes para el establecimiento de especies microbianas previamente relacionadas con corrosión”

Hipótesis #2:

“Durante el proceso de formación de una biopelícula, las interacciones que se establecen entre microorganismos determinan la estructura y composición de la comunidad microbiana asociada a la inducción de corrosión en acero inoxidable expuesto de forma continua a agua de mar”.

Para confrontar estas hipótesis, se han planteado los siguientes objetivos:

2.5. Objetivo General.

Determinar la influencia de las interacciones establecidas con los colonizadores primarios, sobre la estructura y composición de la comunidad que constituye la biopelícula asociada a inducción de la corrosión en superficies de acero inoxidable expuestas continuamente a agua de mar.

2.6. Objetivos Específicos.

Objetivo 1. Diseñar una unidad y estrategia experimental para el estudio interdisciplinario de biocorrosion marina en ambientes naturales.

Objetivo 2. Determinar la estructura y composición de la comunidad microbiana que se establece sobre acero inoxidable, con énfasis en las etapas tempranas de la colonización.

Objetivo 3. Determinar las interacciones bióticas y abióticas que tienen lugar durante el desarrollo de una biopelícula microbiana sobre acero inoxidable expuesto continuamente a agua de mar.

Objetivo 4. Co-relacionar el desarrollo de corrosión sobre acero inoxidable con interacciones claves establecidas durante el desarrollo de la biopelícula microbiana.

3. MATERIALES.

3.1. Materiales.

3.1.1. Materiales de construcción.

- Acero inoxidable AISI 316L (composición elemental: C, 0.012%; Cr, 17.517%; Ni, 10.435%; Mo, 2.277%; Mn, 1.948%; Si, 0.424%; P, 0.0396%; S, 0.0099%; Cu, 0.309%; Al, 0.006%; Co, 0.290%; V, 0.055%; W, 0.120%; Pb, 0.004%; Zr, 0.051%; B, 21 µg/g; balanceado con Fe)
- Tubo PVC 25 mm
- Llaves ¾" HI
- Codos 90° 25 mm SO
- TEE 25 mm SO
- Terminales ¾" 25 mm HE/SO
- Terminales ¾" 25 mm HI/SO
- Llaves de paso de jardín ¾" plástica
- Plancha de Acrílico grosor 5 mm
- Plancha de Acrílico grosor 3 mm
- Amarra cables de plástico ancho 2,5 mm
- Lijas de papel para metal grano 310
- Manguera 1" (Tramontina)
- Abrazaderas metálicas de cremallera
- Discos de corte 420 Dremel®

3.1.2. Materiales de laboratorio.

- Filtros de membrana de Polietersulfona 0,22 μm 25 mm (Merck Millipore)
- Filtros de membrana de Polietersulfona 0,22 μm 47 mm (Merck Millipore)
- Filtros de membrana de Policarbonato 3 μm 25 mm (Merck Millipore)
- Filtros de membrana de Policarbonato 3 μm 47 mm (Merck Millipore)
- Filtros de membrana de Policarbonato 10 μm 25 mm (Merck Millipore)
- Filtros de membrana de Policarbonato 10 μm 47 mm (Merck Millipore)
- Filtros de membrana de Nylon 20 μm 47 mm (Merck Millipore)
- Filtros de membrana para jeringa de 0,22 μm 25 mm (Merck Millipore)
- Porta-filtros Swinnex 20 mm (Merck Millipore)
- Porta-filtros Swinnex 47 mm (Merck Millipore)
- Cinta conductiva adhesiva de carbón
- Cinta conductiva adhesiva de cobre
- Tijeras Iris recta de acero inoxidable de 11 y 14 cm
- Jeringas plásticas de 50 mL (Nipro Syringe)

3.2. Reactivos.

- Glutaraldehído 25% para microscopía electrónica (Merck)
- Sodio Dodecilsulfato (Winkler)
- Lisozima (Merck Sigma-Aldrich)
- Proteinasa K (Merck Sigma-Aldrich)
- Fenol: Cloroformo Básico: Alcohol Isoamílico 25:24:1 (Winkler)
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico 24:1 (Winkler)

- Alcohol Etilico Grado Analítico (Merck)
- Acetona Grado Analítico (Merck)
- Buffer Carga 10X BlueJuice™ (Invitrogen™ Co.)
- Buffer TAE 50X (Thermo Fischer Scientific)
- LE Agarosa de Lonza (SeaKem®)
- GelRed (Biotium Inc.)
- 1 kb DNA Ladder (NewEngland BioLabs® Inc.)
- Ácido clorhídrico fumante 37% (Merck)

3.3. Soluciones.

3.3.1. Solución Tris-HCl pH 8,0 1M.

Tris base	121,1 g
-----------	---------

Disolver en 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH hasta 8,0 agregando HCl concentrado. Aforar con agua destilada hasta 1 L y esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

3.3.2. Buffer de Lisis Alcalina.

La preparación del Buffer de lisis alcalina debe tener las siguientes concentraciones finales de los reactivos:

Glucosa	50 mM
Tris-HCl pH 8.0	25 mM
EDTA	10 mM

Aforar con agua destilada hasta 1 L y esterilizar por autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

3.3.3. Solución de SDS.

SDS 10%

Disolver en agua destilada y esterilizar por filtración (filtro 0,22 μm). Almacenar a temperatura ambiente.

3.3.4. Glutaraldehído.

Glutaraldehído 2%

Disolver en agua de mar filtrada a través de membranas de 0,22 μm . Almacenar a 4°C.

3.3.5. Etanol.

Etanol 70%

Disolver en agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

3.3.6. Enzimas.

Soluciones Stock:

- Lisozima 10 mg/mL
- Proteinasa K 10 mg/mL

Disolver en agua destilada y esterilizar por filtración, con filtros de membrana para jeringa de 0,22 μm . Almacenar a -20°C.

3.3.7. Agua de mar natural filtrada.

Filtrar agua de mar natural utilizando porta-filtros Swinnex de 47 mm de diámetro en serie, con filtros de membrana de nylon de 20 μm de diámetro de poro, policarbonato de 10 μm , policarbonato de 3 μm y polietersulfona de 0,22 μm . Almacenar a 4°C.

3.4. Equipos.

- Centrífuga 5804R (Eppendorf)
- Vortex Maxi Mix II (Thermolyne)
- Calentador de bloque digital SBD110 (Select BioProducts)
- Baño termorregulador (Digital Water Bath LabTech)
- Sonicador Elmasonic S 30H (Elma Schmidbauer GmbH)
- Cámara de electroforesis MultiSUB (Cleaver Scientific Ltd.)
- Fuente de poder BioVolt 300 V (Select Bio Products)
- Transiluminador UV (Vilber Lourmat)
- Celda electroquímica PTC1™ Paint Test Cell (Gamry Instruments Inc.)
- Potenciostato Reference 600™ (Gamry Instruments Inc.)
- Tabletop Microscope TM-1000 (Hitachi)
- Field Emission Scanning Electron Microscope JSM-7000F (JEOL Ltd.)
- Medidor multi-parámetro (HACH Instruments)
- Sonda para medir pH y temperatura para multiparámetro HQ40D (HACH Instruments)
- Sonda para medir Conductividad para multiparámetro HQ40D (HACH Instruments)
- Sonda para medir Oxígeno Disuelto para multiparámetro HQ40D (HACH Instruments)
- Balanza Analítica AUW-320 (Shimadzu Corporation)
- Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™, Life Technologies)
- Herramienta rotativa multifuncional Dremel® 3000 (Dremel®)

3.5. Programas computacionales.

- ImageJ versión 1.51k (<https://imagej.nih.gov/ij/>)
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- Mothur versión 1.35.1 (<https://www.mothur.org/>)
- R versión 3.4.4 (<http://www.r-project.org/>)
- RStudio versión 1.1.442 (<http://www.rstudio.com/>)
- Primer 7 versión 7.0.13 (<http://www.primer-e.com/>)
- Cytoscape versión 3.6.1 (<http://www.cytoscape.org/>)

3.6. Bases de datos.

- Base de datos SILVA v123 (<http://www.arb-silva.de/>)
- Base de datos Protist Ribosomal Reference database (PR², <http://ssu-rna.org/>). Se utilizó la versión actualización a Octubre del 2017.
- Base de datos Nucleotide collection (nr/nt) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se utilizó la versión actualización a Octubre del 2017.

4. MÉTODOS.

4.1. Construcción de la unidad experimental.

La construcción de las unidades experimentales que se utilizaron en esta tesis (N = 4), se realizó de acuerdo al diseño detallado en la sección Resultados 5.1, en el taller de construcción del Departamento de Ingeniería Hidráulica y Ambiental de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se utilizó acrílico de 5 mm de espesor para la estructura principal, y de 3 mm de grosor para las subdivisiones y los SPP. Para controlar el flujo del agua, se agregaron llaves de paso tanto en los ingresos como en las salidas de agua del acuario.

4.2. Montaje del experimento y estrategia de muestreo.

Para la evaluación interdisciplinaria del desarrollo de biocorrosión marina en acero inoxidable, se expusieron placas de ese material a un flujo constante de agua de mar natural, en el laboratorio abierto de la Estación Costera de Investigaciones Marinas (ECIM) de la Pontificia Universidad Católica de Chile, ubicada en Las Cruces, Región de Valparaíso (33° 30' 16" S; 71° 38' 23" O), desde noviembre de 2015 hasta marzo de 2016.

El desarrollo de la biopelícula se evaluó mediante el análisis de una serie de tiempo de 15 puntos elegidos en base a datos de corrosión marina publicados para la zona central de Chile (Fischer *et al.*, 2016), utilizando cuatro unidades experimentales independientes. Durante el experimento se realizaron muestreos en tiempos tempranos (0,125 días, 0,25 días, 0,375 días, 0,5 días, 0,75 días, 1 días), medios (2 días, 3 días, 5 días, 7 días), y tardíos (21 días, 30 días, 55 días, 85 días y 112 días) de exposición. Para ello se utilizaron 360 placas de acero inoxidable

AISI 316L, de dimensiones 2 cm x 10 cm x 0,3 cm. Antes de su exposición, las superficies de las placas fueron homogenizadas utilizando papel de lija grano 310, sonicadas en agua destilada para eliminar restos de partículas, enjuagadas con agua destilada, desengrasadas con acetona y secadas a temperatura ambiente (ASTM, 1999). Luego, fueron montadas en grupos de 6 placas, en 45 soportes para placas, de acuerdo al diseño descrito en la sección 5.1, y mantenidas a temperatura ambiente en tubos cónicos plásticos de 50 mL (Figura 1A-B) hasta su exposición al agua de mar (Figura 1C-D).

En cada uno de los tiempos de muestreo se retiró un SPP de cada acuario, de forma aleatoria. Las seis placas de cada soporte retirado fueron recolectadas de acuerdo al análisis que se realizó con ellas, respectivamente: Placas 1, 2 y 3, se depositaron en tubos cónicos de 50 mL con agua de mar natural filtrada a través de un filtro de 0,22 μm de diámetro de poro para la posterior extracción de material genético; Placas 4 y 5, se depositaron en tubos cónicos de 50 mL con agua de mar natural filtrada para análisis electroquímicos; Placa 6, se depositó en un tubo cónico de 50 mL con solución de Glutaraldehído 2% para microscopía electrónica.

Las muestras fueron nombradas con la siguiente nomenclatura: la estación en la que se inició la exposición de las placas (S, por *summer*), el tamaño del poro de la membrana de la cual se extrajo el material biológico (02, por 0,22 μm), el material utilizado (en este caso C, por su previa denominación en experimentos de laboratorio), seguido por el número del acuario del que se extrajo la muestra (1 al 4), el muestreo (1 al 15) y su respectivo número en el SPP (1 al 6). En el caso de las muestras del agua de mar circundante, se utilizó: la estación en la que se inició la exposición de las placas (S), la fracción de tamaño analizada (02), tipo de muestra (W, por agua), el muestreo (1 al 15) y el número de la réplica (1 al 3).

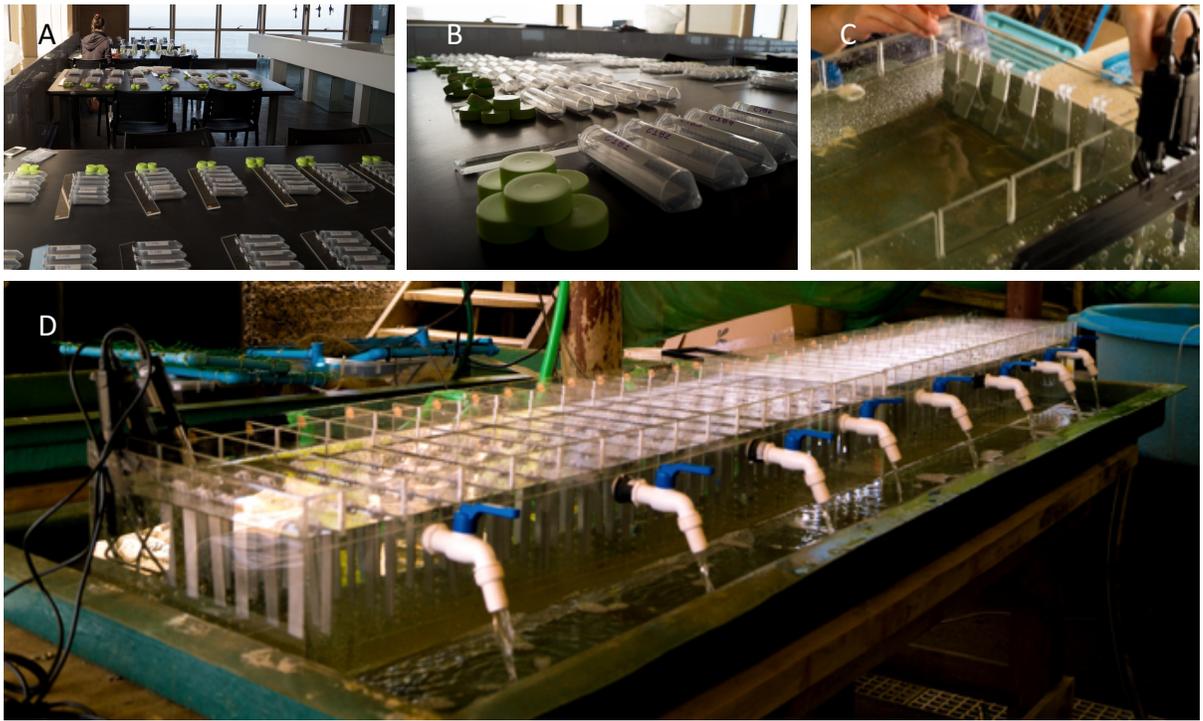


Figura 1. Montaje del experimento de flujo continuo. A-B) Montaje de las placas de acero inoxidable 316L en los soportes para placa (SPP). C) Distribución de los SPP en las unidades experimentales. D) Sistema de exposición a flujo continuo de agua de mar natural al inicio del experimento.

4.3. Determinación de las características físico-químicas del agua de mar natural contenida en los acuarios.

El monitoreo de los parámetros físicos de temperatura, oxígeno disuelto y conductividad, se realizó utilizando sondas HACH Instruments (Loveland, Colorado, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se monitorearon los parámetros químicos de nutrientes principales (nitrito, nitrato, fosfato y silicato) y de 10 elementos (Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Mo, Ni, Pb, V y Zn). Para la cuantificación de nutrientes, en cada tiempo de muestreo se filtraron 15 mL de agua de mar contenida en los acuarios (N = 3) a través de un filtro de membrana de polietersulfona de 0,22 μm de diámetro de poro con un sistema de filtrado con porta-filtros Swinnex de 47 mm de diámetro. El agua filtrada fue almacenada en filtros cónicos de 15 mL, los que fueron congelados y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento, realizado por el laboratorio Season Mediciones Ambientales Ltda. (Concepción, Chile) de acuerdo a la metodología descrita por Hansen & Grasshoff (1983). Para la cuantificación de elementos, en cada tiempo de muestreo fueron filtrados 500 mL de agua de mar contenida en los acuarios a través de un filtro de membrana de polietersulfona de 0,22 μm de diámetro de poro en un sistema de filtrado con porta-filtros Swinnex de 47 mm de diámetro (N = 1, se realizó un *pool* con 3 muestras de agua) y recolectados en un contenedor libre de metales. Las muestras fueron tratadas con 1 mL de ácido nítrico inmediatamente después de ser colectadas y se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento, realizado por el Laboratorio de Metales del Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, utilizando la técnica de espectrometría de masa con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

4.4. Caracterización morfológica de la biopelícula.

4.4.1. Observación macroscópica.

En cada tiempo de muestreo, se fotografiaron las placas apenas fueron retiradas de los acuarios para realizar un análisis visual del desarrollo de la biopelícula en la placa de acero inoxidable.

4.4.2. Microscopia electrónica de barrido.

La placa 6 de los SPP provenientes de dos acuarios fueron utilizadas para la caracterización microscópica de la biopelícula. Para su observación en el microscopio, se cortaron las placas con un disco de corte 420 Dremel®. Se cortaron cupones de 2 cm x 2 cm x 0,3 cm desde la zona inferior de cada placa, realizando cortes en intervalos cortos (< 30 segundos) e intermitentes para evitar la desecación de la muestra. Las muestras cortadas se almacenaron en contenedores independientes con solución de glutaraldehído 2% a 4 °C hasta su utilización. Para su observación, las muestras fueron secadas a temperatura ambiente por 5 min, montadas con cinta conductiva adhesiva de carbón en la plataforma del microscopio y observadas en un microscopio electrónico de barrido ambiental Hitachi 1000 (Tokio, Japón) con aumentos de 100X, 500X, 1000X, 2500X, 5.000X y 8.000X. Se analizaron 3-5 sectores de las placas para determinar la representatividad de las imágenes obtenidas.

Una muestra de 3 días de exposición a agua de mar natural, fue observada adicionalmente utilizando un microscopio electrónico de barrido con emisión de campo JEOL JSM-7000F (Tokio, Japón). Para ello, la muestra se secó, recubrió con una delgada capa de oro y fue montada con cinta conductiva adhesiva de cobre en la plataforma del microscopio para su

observación con un aumento de 40.000X. Se analizaron 3-5 sectores de la placa para determinar la representatividad de las imágenes obtenidas.

4.4.3. Determinación de la cobertura de la superficie.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido ambiental con un aumento de 500X se procesaron con el programa computacional ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) para determinar la cobertura de la superficie debido al asentamiento de microorganismos. Se utilizó la herramienta de *Threshold* para delimitar las zonas donde había microorganismos/biopelícula. Con la herramienta de análisis *Measure* se determinó cual era el porcentaje de cobertura de la superficie.

4.5. Análisis de la composición taxonómica de la comunidad microbiana.

4.5.1. Recolección de biomasa.

La determinación de la composición taxonómica microbiana requiere de la recolección de la biomasa del agua de mar contenida en los acuarios y de la biopelícula desarrollada sobre la superficie de acero inoxidable.

Para el agua de mar de los acuarios, en cada tiempo de muestreo se filtró en serie un volumen de 2 L (N = 3) a través de filtros de membrana de nylon de 20 μm , policarbonato de 10 μm , policarbonato de 3 μm y polietersulfona de 0,22 μm de diámetro de poro en un sistema de filtrado con porta-filtros Swinnex de 47 mm de diámetro. Los filtros de membrana donde se recolectó la biomasa fueron almacenados y congelados en tubos de centrifuga de 2 mL a -20 °C hasta su utilización.

Para la biopelícula desarrollada sobre el acero inoxidable, en cada tiempo de muestreo la biomasa fue obtenida desde las placas 1, 2 y 3 de cada acuario. Para producir el desprendimiento de los microorganismos desde la superficie, las placas (contenidas en los tubos con agua de mar filtrada) fueron sonicadas en un baño sonicador Elmasonic S 30H (Singen, Alemania) por 5 min. El sonicado resultante de este proceso fue filtrado a través de filtros de membrana de policarbonato de 10 μm , policarbonato de 3 μm y polietersulfona de 0,22 μm de diámetro de poro, en un sistema de filtrado con porta-filtros Swinnex de 25 mm de diámetro. Los filtros de membrana donde se recolectó la biomasa fueron almacenados en tubos de centrífuga de 2 mL y congelados a -20°C hasta su utilización.

4.5.2. Extracción de DNA.

La obtención del material genético desde los filtros de membrana con la biomasa recolectada desde el agua de mar del acuario y desde la biopelícula, fue realizada de acuerdo al protocolo de Fenol: Cloroformo para extracción de DNA (Fuhrman *et al.*, 1988). Luego de la extracción, la integridad del DNA fue determinada a través de un gel de electroforesis en agarosa al 0,8% en buffer TAE 1X. Su cuantificación fue realizada con el kit QubitTM dsDNA HS Assay (InvitrogenTM, Life Technologies, CA, USA) y medida en un QubitTM 2.0 Fluorometer de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

4.5.3. Secuenciación de los genes 16S y 18S rRNA.

En este proyecto de tesis se secuenciaron las muestras de la fracción de tamaño entre 0,2-3 μm de diámetro. La determinación de la composición comunitaria de bacterias/arqueas y eucariontes que componen el agua del acuario y la biopelícula, fue realizada a través de

secuenciación masiva por síntesis de los amplicones del gen de la subunidad ribosomal con la plataforma Illumina (Illumina Inc., California, USA). Con este fin, se enviaron 45 muestras de DNA proveniente de agua de mar y 180 muestras de DNA proveniente de biopelícula, para secuenciación de las regiones V4-V5 del gen de 16S rRNA y V4 del gen de 18S rRNA. La construcción de los amplicones fue realizada: i) con los partidores 515FB (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') y 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3') para el gen 16S rRNA; ii) con los partidores E572F (5'-CYGCGGTAATTCCAGCTC-3') y E1009R (5'-AYGGTATCTRATCRTCTTYG-3') para el gen 18S rRNA.

La construcción y secuenciación de las librerías fue realizada con el servicio Integrated Microbiome Resource del Centre for Comparative Genomics and Evolutionary Bioinformatics (CGEB) de Dalhousie University (<http://cgeb-imr.ca/index.html/>).

4.5.4. Procesamiento de datos de secuenciación masiva.

Los datos crudos de secuenciación masiva obtenidos fueron procesados utilizando Mothur (<https://www.mothur.org/>) y la base de datos SILVA v123 (<http://www.arb-silva.de/>) para el alineamiento de las secuencias. La asignación de unidades taxonómicas operacionales (OTU, de su nombre en inglés) del gen 16S rRNA fue realizada con la base de datos SILVA v123 y en el caso del gen 18S rRNA fue realizada con la base de datos Protist Ribosomal Reference database (PR², <http://ssu-rna.org/>) en Octubre de 2017. Se realizó una corroboración de la asignación taxonómica de las OTU de interés contra la base de datos Nucleotide collection (nr/nt) utilizando BLASTn (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) en Octubre de 2017. El flujo completo de trabajo se encuentra detallado en el Apéndice A, disponible en línea en el repositorio GitHub (Apéndice A, <http://bit.do/ApendiceA>). Luego, utilizando el lenguaje y

ambiente de R (<http://www.r-project.org/>), en el programa RStudio (<http://www.rstudio.com/>) se realizaron dos tratamientos posteriores para definir que OTUs se considerarían en el análisis final: i) presencia mínima de OTU en 2 muestras; ii) eliminación de las OTUs que contribuyen con una abundancia relativa $< 0,003\%$ al total del set de datos. La abundancia relativa de OTUs (función `rltv.Otu.Table`) y los análisis de redundancia (RDA) (paquete 'vegan', <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html/>) fueron realizados utilizando R (Apéndice B, <http://bit.do/ApendiceB>).

4.5.5. Análisis estadísticos multivariados y determinación de las propiedades de la comunidad microbiana.

Las matrices obtenidas en R, con lecturas por muestras filtradas, se ingresaron en el programa computacional Primer 7 (<http://www.primer-e.com/>). Las matrices se estandarizaron por el total de muestras y se transformaron por raíz cuadrada (*square root*). Para analizar la similitud entre los patrones comunitarios, se realizaron análisis de similitud de Bray-Curtis junto a un análisis de clúster jerárquico, y luego, para visualizar las diferencias entre muestras, se realizaron mapas de calor y análisis de NMDS multivariado. A partir de estas mismas matrices se determinaron los índices ecológicos de riqueza (S), equidad (Pielou *index*, J') y diversidad (Shannon-Wiener *index*, H') de cada comunidad. Además, se realizaron las pruebas estadísticas de ANOSIM, para determinar si los grupos definidos *a priori* son grupos distintos, y un análisis de SIMPER para determinar la contribución de cada especie a la similitud/disimilitud entre estos grupos respectivamente.

Adicionalmente, se determinaron los taxa exclusivos de los tiempos de muestreo tempranos-medios y tardíos. Primero, se realizó la identificación de las OTUs presentes exclusivamente

en los tiempos tempranos-medios, exclusivamente en los tiempos tardíos y aquellas que se encontraron en todos los tiempos de muestreo utilizando las operaciones *setdiff()* e *intersect()* del paquete ‘dplyr’ de R. Luego, se realizó la asignación taxonómica a cada grupo utilizando la Tabla de Taxonomía (Tax.table) obtenida desde Mothur. Además, se determinaron aquellos taxa exclusivos de tiempos tempranos-medios y tardíos, removiendo de sus respectivos grupos los taxa asignados al grupo de OTUs que estaba presente en todos los tiempos de muestreo (Apéndice C, <http://bit.do/ApendiceC>). Finalmente, se utilizó un análisis de correlación de Pearson para determinar los factores que influyeron en el comportamiento corrosivo de las placas de acero inoxidable (Apéndice D, <http://bit.do/ApendiceD>).

4.6. Análisis de co-ocurrencia de especies.

Para inferir la co-ocurrencia de especies en la biopelícula formada sobre acero inoxidable, se utilizó el paquete *cooccur* de R (<https://cran.r-project.org/web/packages/cooccur/index.html>). Se determinó la co-ocurrencia de especies para cada tiempo de exposición evaluado, utilizando un total de 12 muestras para cada uno, considerando solo las OTUs que se encontraban presentes en al menos el 50% de éstas muestras. Para la representación gráfica de estos resultados, se utilizaron los resultados de co-ocurrencia no aleatorios con probabilidades de co-ocurrencia $> 0,4$. La visualización y determinación de las métricas de redes se realizó utilizando el *software* Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>). Para el análisis del tipo de interacciones cuya co-ocurrencia fue observada en las redes, se obtuvieron listas de las OTUs de interés y se determinó su abundancia en el tiempo, utilizando la metodología descrita en el Apéndice E (<http://bit.do/Apendice-E>).

4.7. Determinación de pérdida de masa de las placas de acero inoxidable.

Para establecer los niveles de deterioro de las placas, se determinó la pérdida de masa durante los tiempos de exposición respectivos. Las placas 1, 2 y 3, se sonicaron (Ver sección 4.4.1.), lavaron, limpiaron con acetona, secaron y finalmente, fueron masadas con balanza analítica de acuerdo a la norma ASTM G1-90 (ASTM, 1999). La diferencia de masa fue determinada utilizando los valores del peso inicial y final de cada placa respectivamente. Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para determinar si hubo diferencias significativas entre los tiempos evaluados ($p < 0,05$).

4.8. Análisis electroquímicos.

Las placas 4 y 5 de cada SPP, fueron utilizadas para determinar el comportamiento electroquímico de la interface metal/biopelícula de las placas en un potencióstato Reference 600™ (Gamry®, Filadelfia, USA). Primero, fue determinado el potencial a circuito abierto (OCP) de las placas hasta su estabilización (< 1 mV) por al menos 100 segundos. Y luego, se realizaron curvas potenciodinámicas a una tasa de 0,5 mV/s (curva catódica y anódica de forma independiente, desde el potencial a circuito abierto determinado para cada placa), de acuerdo a los parámetros descritos por Torres-Bautista *et al.* (2015). Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para determinar si hubo diferencias significativas entre los tiempos evaluados para OCP y la corriente de corrosión ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS.

5.1. Diseñar una unidad y estrategia experimental para el estudio interdisciplinario de biocorrosion marina en ambientes naturales.

Para el estudio de biocorrosión en ambientes naturales, en esta tesis se realizaron modificaciones al sistema descrito por Fischer *et al.* (2016), con el fin de aumentar la representatividad de los datos en condiciones de gran variabilidad ambiental. Para ello, se realizaron modificaciones tanto de la unidad experimental como de la estrategia para la evaluación de biocorrosión.

El nuevo diseño de la unidad experimental tiene dimensiones de 118 cm de largo, 36 cm de ancho y 20 cm de alto. Posee cuatro llaves de paso para el ingreso del agua de mar, separadas de manera equidistantes entre ellas por 27,5 cm. El agua de mar ingresa directamente a una antecámara de homogenización, que está en contacto con una pared con 360 perforaciones, distribuidas de acuerdo a la Figura 2A, que permiten el ingreso del agua a la cámara central del acuario. En la cámara central, las placas son expuestas al agua de mar en soportes montados en las ranuras superiores de esta zona, lo que permite que la orientación de la superficie principal de las placas sea paralela al flujo, homogenizando la exposición de todas las placas al agua de mar. La salida del agua se da a través de cuatro llaves de paso cuya distribución es un reflejo de las llaves de ingreso. Las llaves de ingreso y salida, ayudan en la regulación del flujo durante el experimento (Figura 2A-B). Esta unidad experimental aumenta los muestreos realizables durante el experimento de 6 a 16 muestreos.

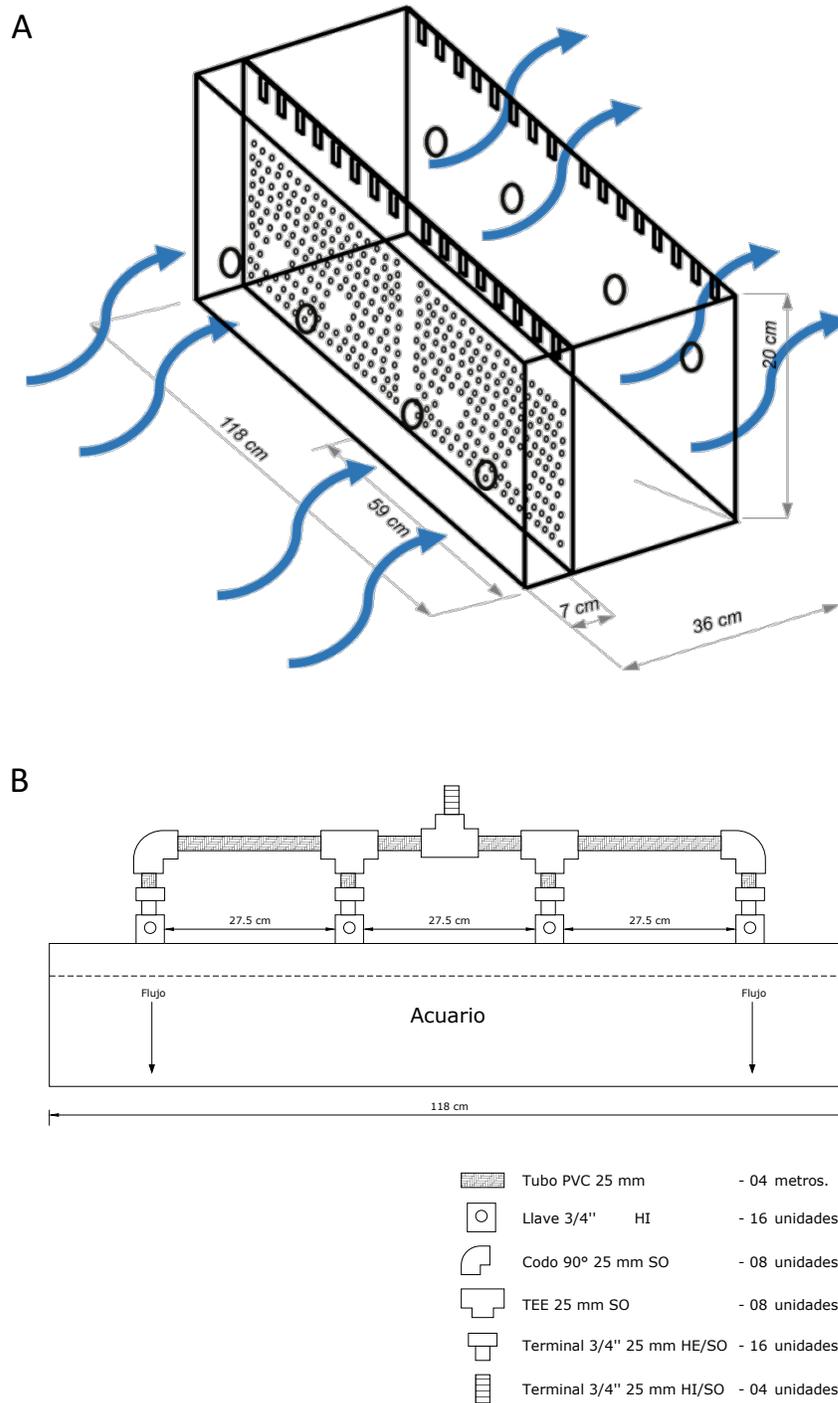


Figura 2. Unidad experimental para la exposición de placas metálicas a un flujo continuo de agua de mar. A) Esquema de la unidad experimental y el flujo de agua en ella indicado en azul. B) Diagrama del sistema de ingreso de agua al acuario.

Cada muestreo involucró la remoción de un SPP (Figura 3C), que permite el montaje de seis placas perforadas utilizando amaracables plásticos de 2,5 mm de ancho (Figura 3A-B).

El diseño de esta estrategia experimental permite el estudio en paralelo de: i) la morfología de la biopelícula asentada en la superficie del metal; ii) la composición comunitaria microbiana de esta biopelícula; iii) la determinación del deterioro del material; iv) el comportamiento electroquímico del material; y v) las características bióticas y abióticas del agua de mar en el sistema. Analizar cada uno de estos aspectos fue logrado optimizando el uso de las muestras, es decir, utilizándolas para varios análisis cuando esto fuese posible.

5.2. Determinar la estructura y composición de la comunidad microbiana que se establece sobre acero inoxidable, con énfasis en las etapas tempranas de la colonización.

5.2.1. Caracterización morfológica de la biopelícula marina desarrollada sobre acero inoxidable.

La biopelícula formada sobre las placas de acero inoxidable fue caracterizada morfológicamente utilizando un análisis visual macro y microscópico (ver sección Métodos 4.4). Se buscó determinar de qué forma se produce la colonización de la superficie (i.e. de forma homogénea o en parches) e identificar taxonómicamente aquellos microorganismos que pudiesen ser caracterizados mediante características morfológicas.

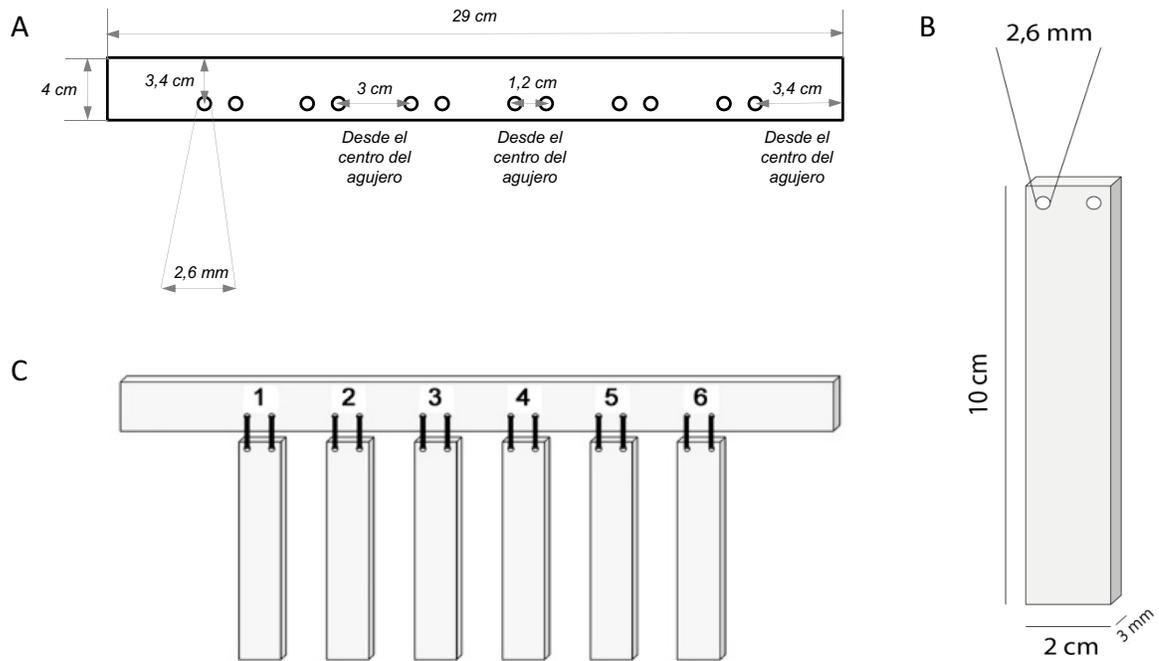


Figura 3. Diseño para el montaje de placas. A) Especificaciones para la construcción de un soporte para placas (SPP). B) Diagrama de las placas de acero inoxidable AISI 316L utilizadas en el experimento de esta tesis. C) Diagrama de las placas montadas en un soporte para placas y la numeración que se le dio a cada una para el proceso de muestreo.

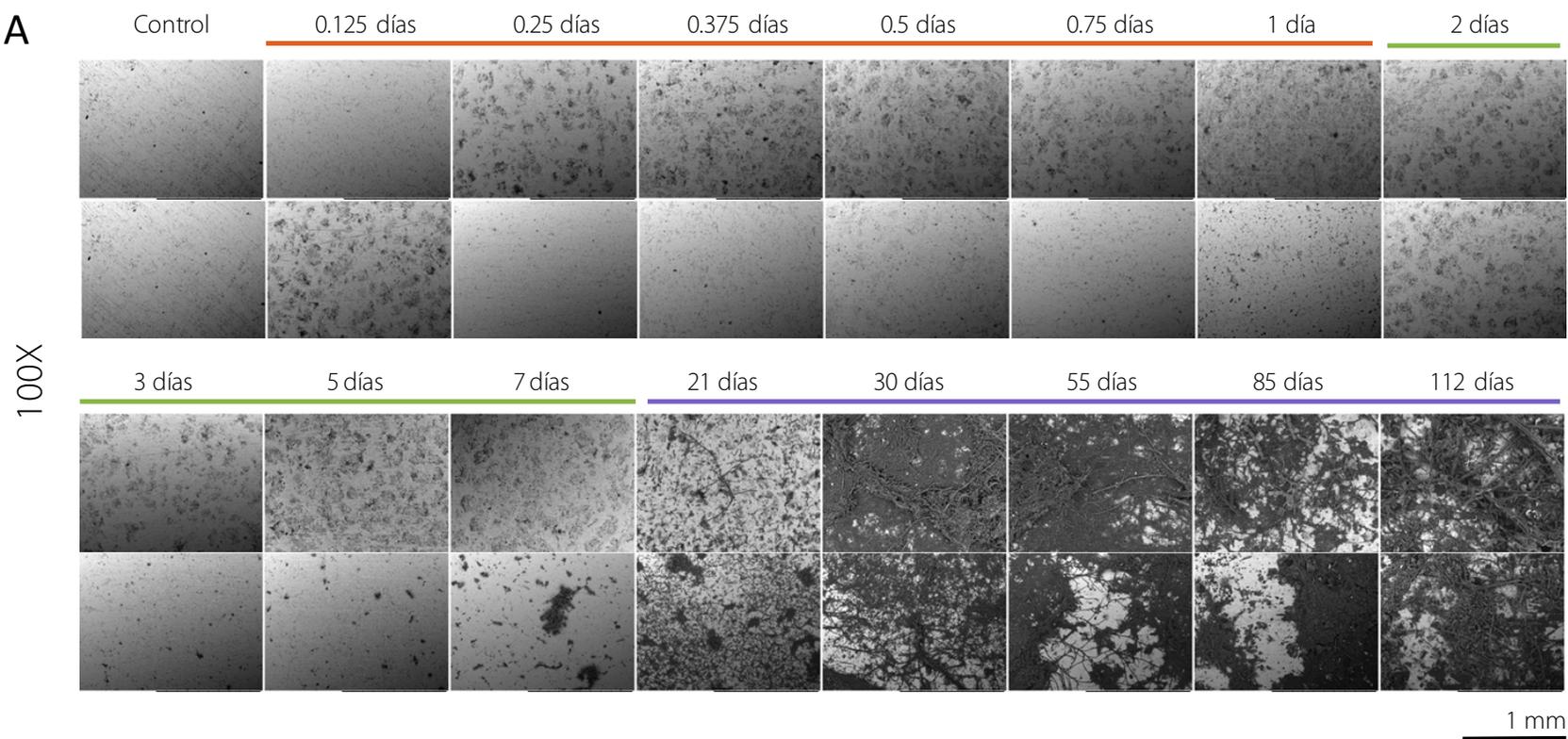
La caracterización morfológica macroscópica fue realizada a través de inspección visual de las placas (ver sección Métodos 4.4.1), y se observó la formación de pequeños cúmulos en la superficie del metal, cuya cobertura y tamaño se volvió notoria durante la primera semana de exposición. Durante el primer mes de exposición a agua de mar, se observó la aparición de macroorganismos con pigmentación marrón rojizo y con pigmentación verde. Luego de 55 a 85 días de exposición, se observó un aumento en la biomasa de la superficie, la intensidad del color de la biopelícula y el crecimiento de macroalgas en etapas de desarrollo temprano. Finalmente, a los 112 días de exposición, se observó la formación de productos de corrosión en las zonas superiores de las placas junto con el desarrollo de macroalgas en la superficie del metal (Figura 4).

La caracterización microscópica de las placas se realizó a través de microscopía electrónica de barrido ambiental y con emisión de campo (ver sección Métodos 4.4.2). La Figura 5 muestra imágenes representativas de la progresión en el tiempo, del asentamiento de microorganismos en la superficie del metal, determinada por ESEM con dos aumentos, 100X y 500X. Con aumento 100X, se observó que la biopelícula se forma inicialmente en parches heterogéneos, cuya biomasa aumenta principalmente después de 30 días de exposición (Figura 5A). No obstante, con un aumento 500X, se observó que la biomasa comienza su incremento con el asentamiento de microorganismos de mayor tamaño a los 21 días (Figura 5B).



Figura 4. Caracterización macroscópica de la biopelícula formada sobre acero inoxidable. Imágenes representativas de la inspección visual realizada a la biopelícula formada sobre acero inoxidable durante su exposición a flujo continuo de agua de mar natural. Cada fotografía fue realizada inmediatamente después de retirar el soporte para placas del acuario.

A



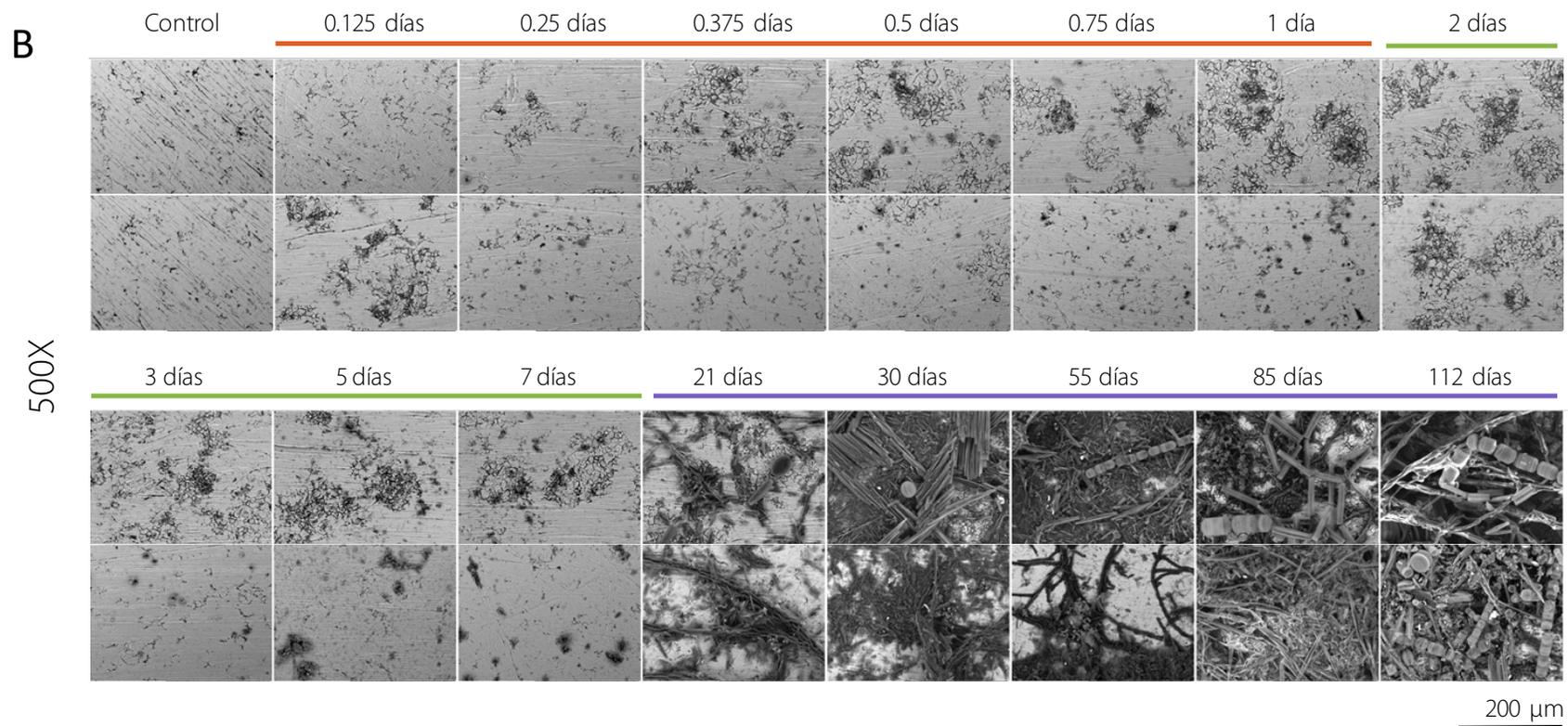


Figura 5. Caracterización microscópica de placas de acero inoxidable expuestas a agua de mar natural. Se muestran micrografías representativas de cada tiempo, tomadas desde muestras obtenidas de dos acuarios independientes. A) Caracterización de la biopelícula con un aumento de 100X. B) Caracterización de la biopelícula realizada con un aumento de 500X. Sobre las imágenes se muestra una barra para indicar los tiempos de exposición de cada muestra (naranja - tempranos; verde - medios; morado - tardíos).

Además, desde la primera semana se determinó la presencia de estructuras tipo sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Figura 6A, zonas más opacas). Su morfología se caracterizó utilizando microscopia de mayor resolución (FE-SEM), con lo que se observó que las sustancias se encontraban en toda la superficie de la placa (Figura 6B) y que correspondían a aglomerados asimétricos de tamaño variable (Figura 6C). Se observó, además, que las zonas de la placa con irregularidades/imperfecciones presentaban mayor acumulación de estas sustancias EPS-like (Figura 7A-B) y que estaban asociadas al asentamiento de diatomeas (Figura 7C-D).

Al analizar la cobertura de la superficie, en base a las micrografías de microscopia electrónica de barrido ambiental (ESEM) (ver sección Métodos 4.4.3), se determinó que hubo un incremento en la cobertura de aprox. 30% durante la primera semana de exposición. Luego de 21 días, se produjo un punto de inflexión en el proceso de colonización de la superficie, con una cobertura promedio de aproximadamente 60%. Finalmente, durante el periodo entre 30 y 112 días de exposición, entre un 80 al 100% de la superficie de las placas fue colonizada (Figura 8). En la biopelícula constituida en estos últimos tiempos de muestreo, se observó una gran diversidad de diatomeas asentadas en la superficie del acero inoxidable (Figura 9), tanto en los casos de gran acumulación de biomasa (Figura 9A-C) como en aquellos de cobertura heterogénea (Figura 9B-D). Entre las diatomeas encontradas, se identificaron los géneros *Navicula*, *Triceratium*, *Melosira*, *Amphora*, *Nitzchia*, *Pleurosigma*, *Actinocyclus*, *Trachyneis*, *Achnanthes*, *Cocconeis*, *Bacillaria* y *Grammatophora* (Figura 10).

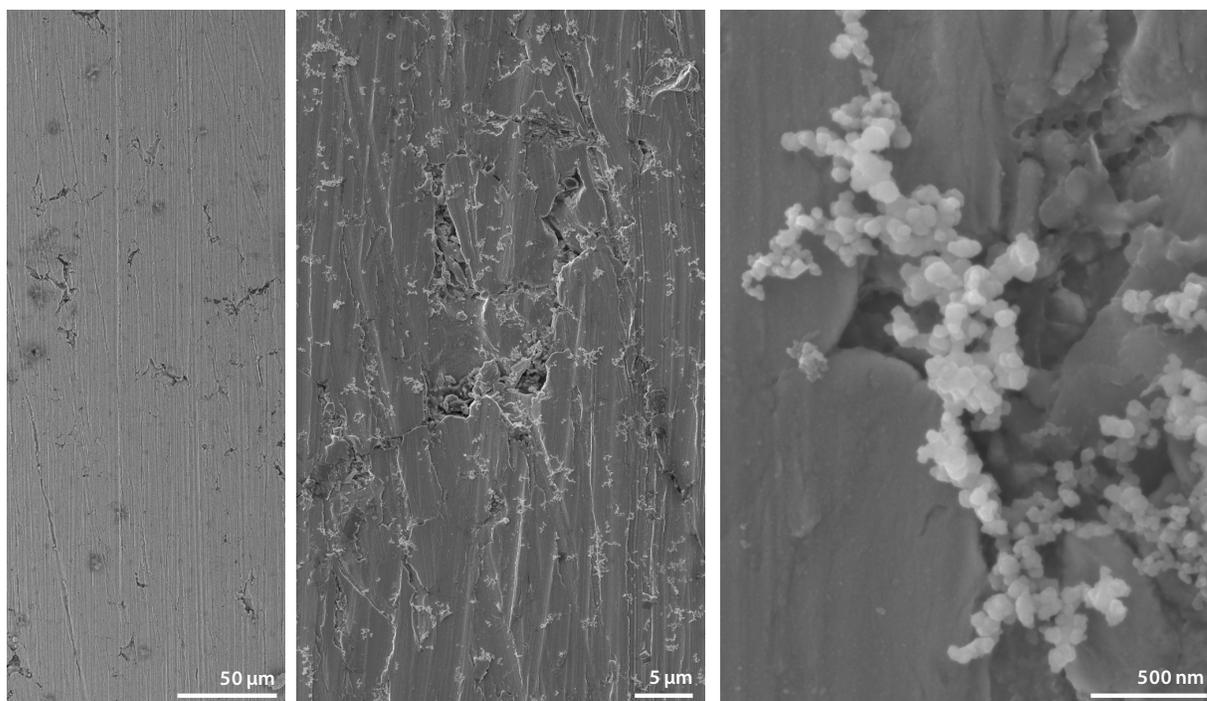


Figura 6. Morfología de sustancias depositadas en la superficie del acero inoxidable. Caracterización morfológica de sustancias acumuladas en la superficie del metal durante 3 días de exposición a agua de mar natural. Utilizando 3 distintos niveles de análisis microscópico: A) Utilizando microscopia electrónica de barrido ambiental. B) Utilizando FE-SEM. C) Observación de alta magnificación de las sustancias depositadas en la superficie utilizando FE-SEM.

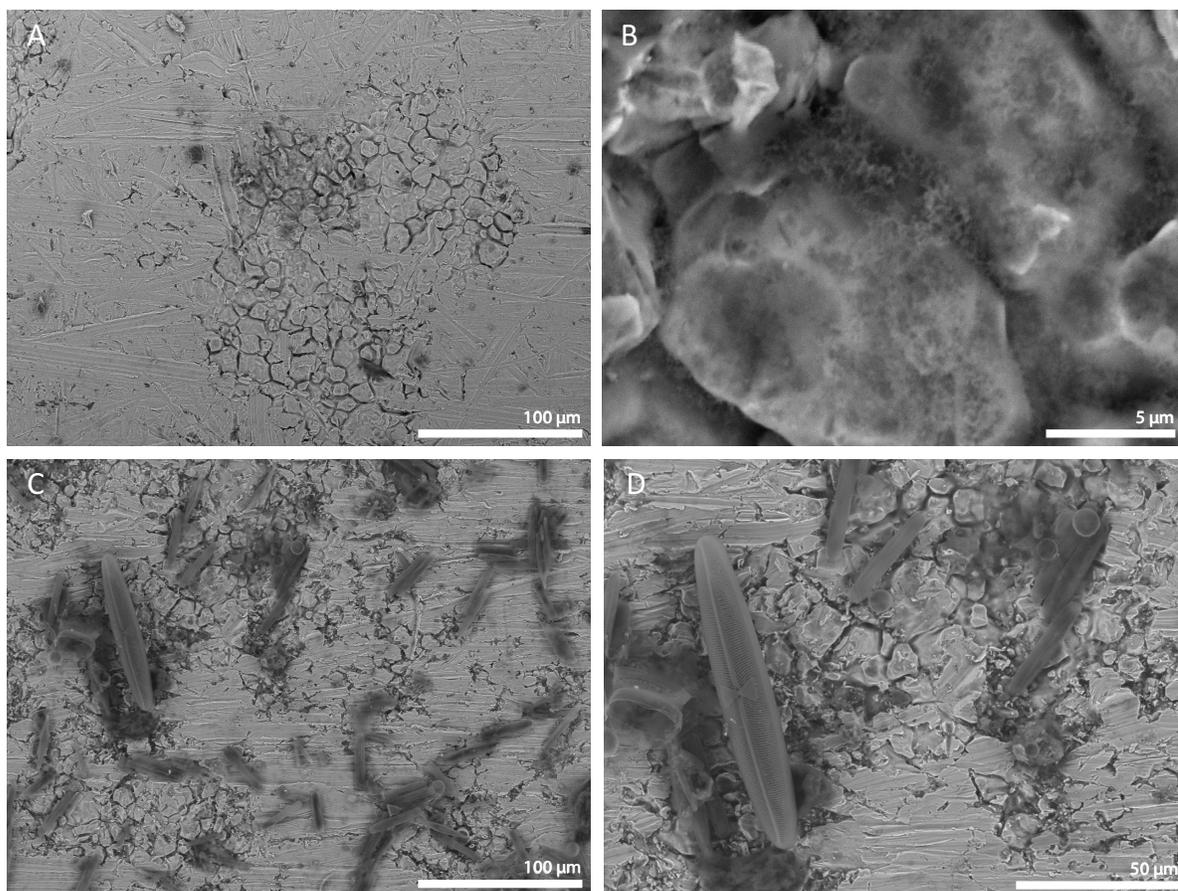


Figura 7. Asentamiento inicial de microorganismos en una superficie metálica expuesta a agua de mar natural. Imágenes representativas de microscopía electrónica de barrido ambiental de la biopelícula formada sobre acero inoxidable. A) Acero inoxidable expuesto por 12 horas a flujo continuo de agua de mar natural. B) Aumento de la micrografía mostrada en el panel A, específicamente a la zona con imperfecciones. C) Acero inoxidable expuesto por 21 días a flujo continuo de agua de mar natural. D) Aumento de la micrografía mostrada en el panel C, específicamente a la zona con imperfecciones.

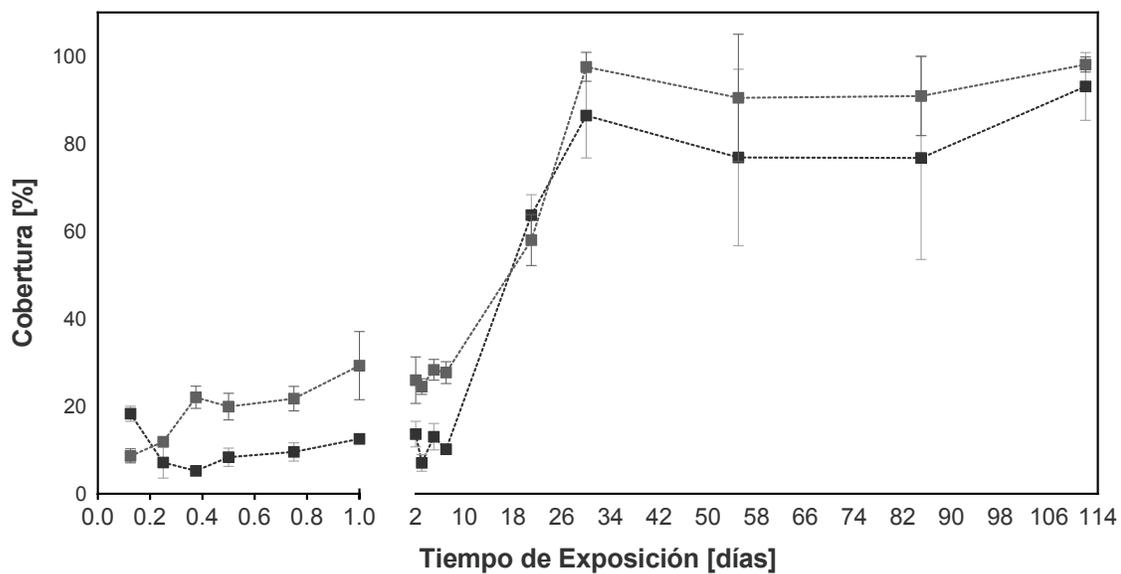


Figura 8. Cobertura de la superficie del acero inoxidable expuesto a agua de mar natural. Porcentaje promedio de cobertura de la superficie debido al crecimiento de la biopelícula microbiana en el tiempo, calculado en base a micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido ambiental con un aumento de 500X.

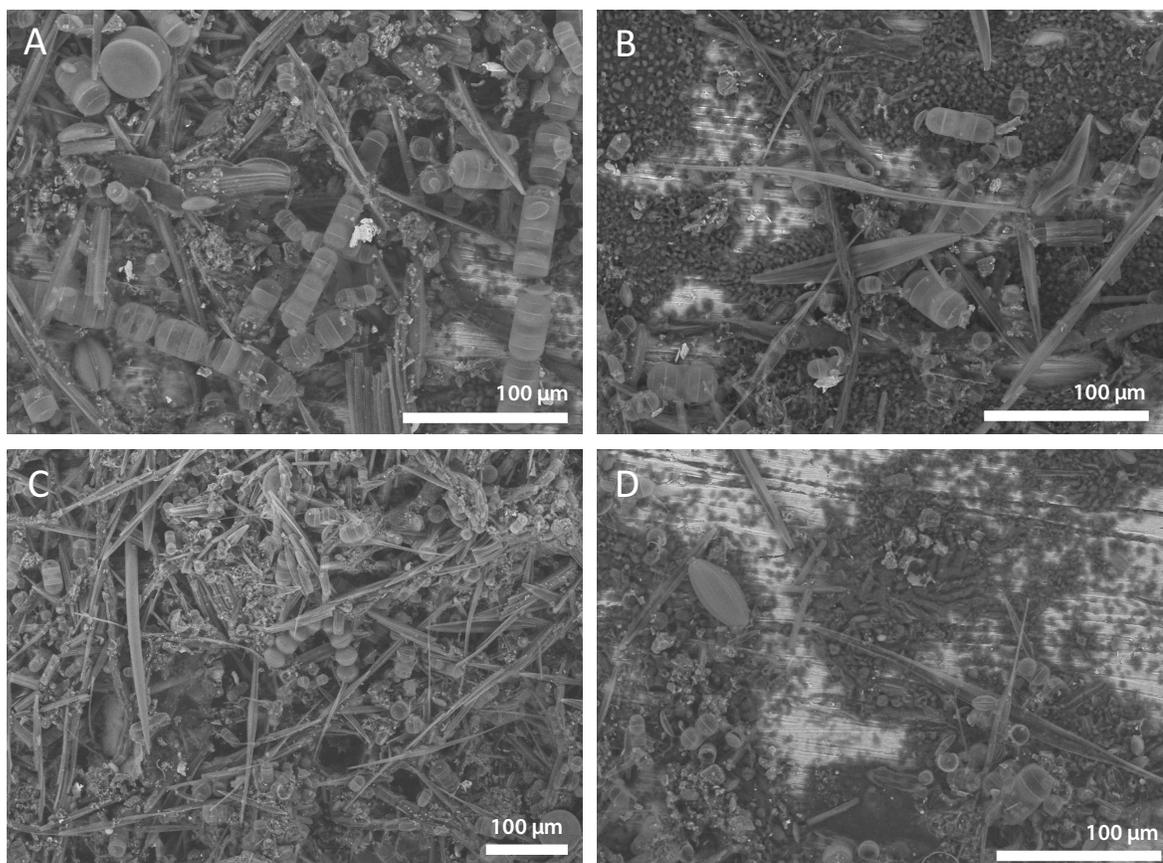


Figura 9. Biopelícula formada luego de 112 días de exposición a agua de mar natural. Imágenes representativas de microscopía electrónica de barrido ambiental de la biopelícula formada sobre acero inoxidable. Se muestran zonas con gran acumulación de biomasa (A, C) y otras en las cuales se aprecian los microorganismos que están interactuando directamente con el metal (B, D).

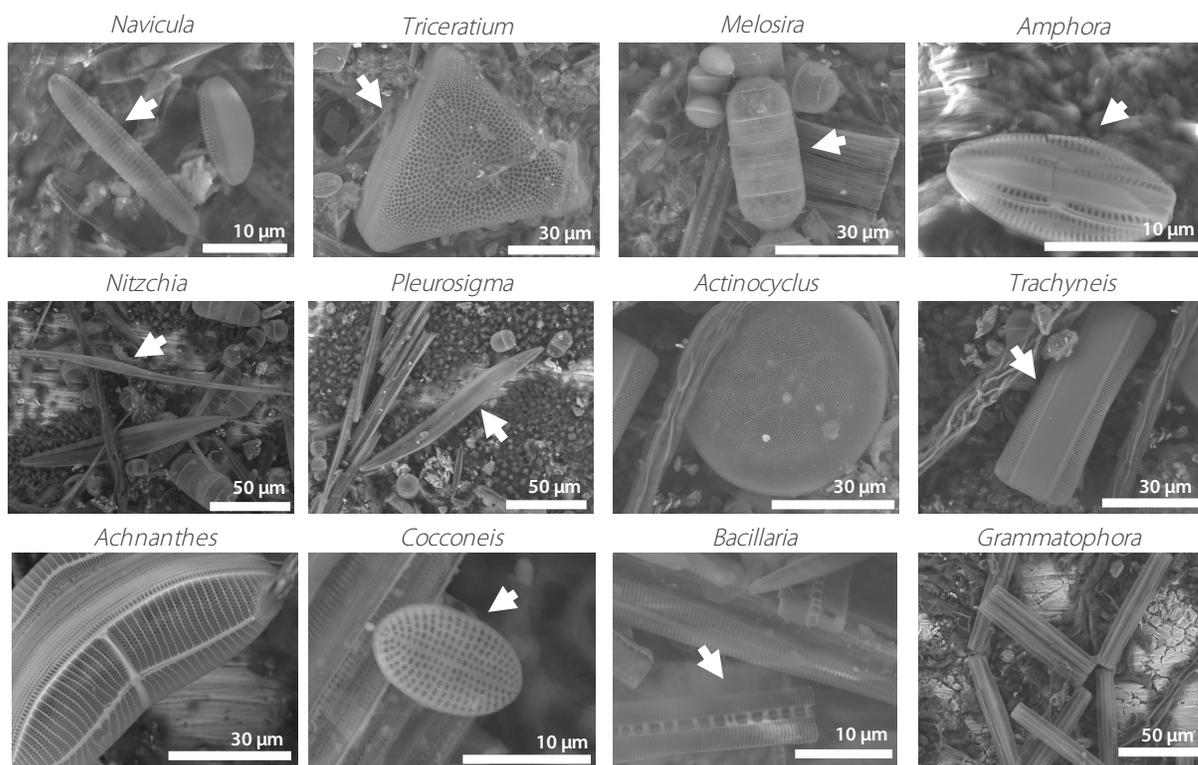


Figura 10. Identificación de diatomeas presentes en la biopelícula formada sobre acero inoxidable. La clasificación taxonómica de las diatomeas fue realizada en base a sus características morfológicas.

5.2.2. Estructura y composición de la biopelícula marina formada sobre acero inoxidable expuesto a agua de mar natural durante 112 días.

Para determinar la dinámica de la composición de microorganismos formando una biopelícula en la superficie de acero inoxidable, y determinar cómo podrían estar influenciando el desarrollo de corrosión, se analizó la composición comunitaria de la fracción pico-planctónica de microorganismos asociados a la superficie del metal (diámetro celular entre 0,2 y 3 μm). Para ello, se realizó la secuenciación masiva de los genes 16S rRNA, para determinar el componente de bacterias y arqueas, y 18S rRNA, para el componente eucarionte (ver sección Métodos 4.5). Los datos de la secuenciación masiva de las muestras se encuentran detallados en el Apéndice F - Tabla S1.

5.2.2.1. Estructura y composición del componente bacteriano y de arqueas de la biopelícula.

Se realizó el análisis de la abundancia relativa de bacterias y arqueas tanto en la biopelícula desarrollada sobre la placa de acero inoxidable como en el agua de los acuarios, mediante la secuenciación de amplicones de la región hipervariable V4-V5 del gen 16S rRNA a través de la plataforma Illumina (ver sección Métodos 4.5.3-4).

Los datos obtenidos indicaron que la biopelícula formada sobre las placas de acero inoxidable estaba dominada por un grupo reducido de clases bacterianas (~5 de un total de 29 clases). Los grupos bacterianos que dominaron durante los tiempos tempranos de exposición fueron Gammaproteobacteria ($63 \pm 33\%$), Cytophagia ($19 \pm 26\%$) y Alphaproteobacteria ($12 \pm 26\%$); durante los tiempos medios de exposición, la biopelícula estuvo principalmente compuesta por Gammaproteobacteria ($83 \pm 9\%$), Flavobacteria ($6 \pm 4\%$) y Alphaproteobacteria ($5 \pm 4\%$); y

finalmente, durante los tiempos tardíos de exposición estuvo principalmente compuesta por Gammaproteobacteria ($33 \pm 26\%$), Alphaproteobacteria ($22 \pm 14\%$), Flavobacteria ($20 \pm 16\%$), Cytophagia ($5 \pm 9\%$) y Planctomycetacia ($4 \pm 5\%$) (Figura 11). Cabe destacar que uno de los principales grupos bacterianos previamente asociados al desarrollo de biocorrosión son Deltaproteobacteria, cuya abundancia relativa promedio en la biopelícula desarrollada en este experimento fue de $0,03 \pm 0,05\%$, $0,33 \pm 0,29\%$ y $0,31 \pm 0,63\%$ para los tiempos tempranos, medios y tardíos de exposición, respectivamente.

La composición bacteriana del agua circundante durante los tiempos tempranos, medios y tardíos de exposición estuvo dominada por los grupos Flavobacteria ($41 \pm 3\%$, $35 \pm 11\%$ y $39 \pm 18\%$, respectivamente), Alphaproteobacteria ($27 \pm 5\%$, $15 \pm 6\%$ y $29 \pm 19\%$, respectivamente) y Gammaproteobacteria ($11 \pm 2\%$, $32 \pm 16\%$ y $19 \pm 13\%$, respectivamente) (Figura 12). Además, se determinó que la composición de bacteriana y arqueas del agua del acuario se mantiene relativamente estable en el tiempo, con un valor de R de 0,371 (*p value* de 0,001) en un ANOSIM de similitud global entre las muestras de distintos tiempos.

5.2.2.2. Composición y estructura del componente eucarionte de la biopelícula.

Se realizó el análisis de la abundancia relativa de eucariontes tanto en la biopelícula desarrollada sobre la placa de acero inoxidable como del agua de los acuarios, mediante la secuenciación de amplicones de la región hipervariable V4 del gen 18S rRNA a través de la plataforma Illumina (ver sección Métodos 4.5.3-4).

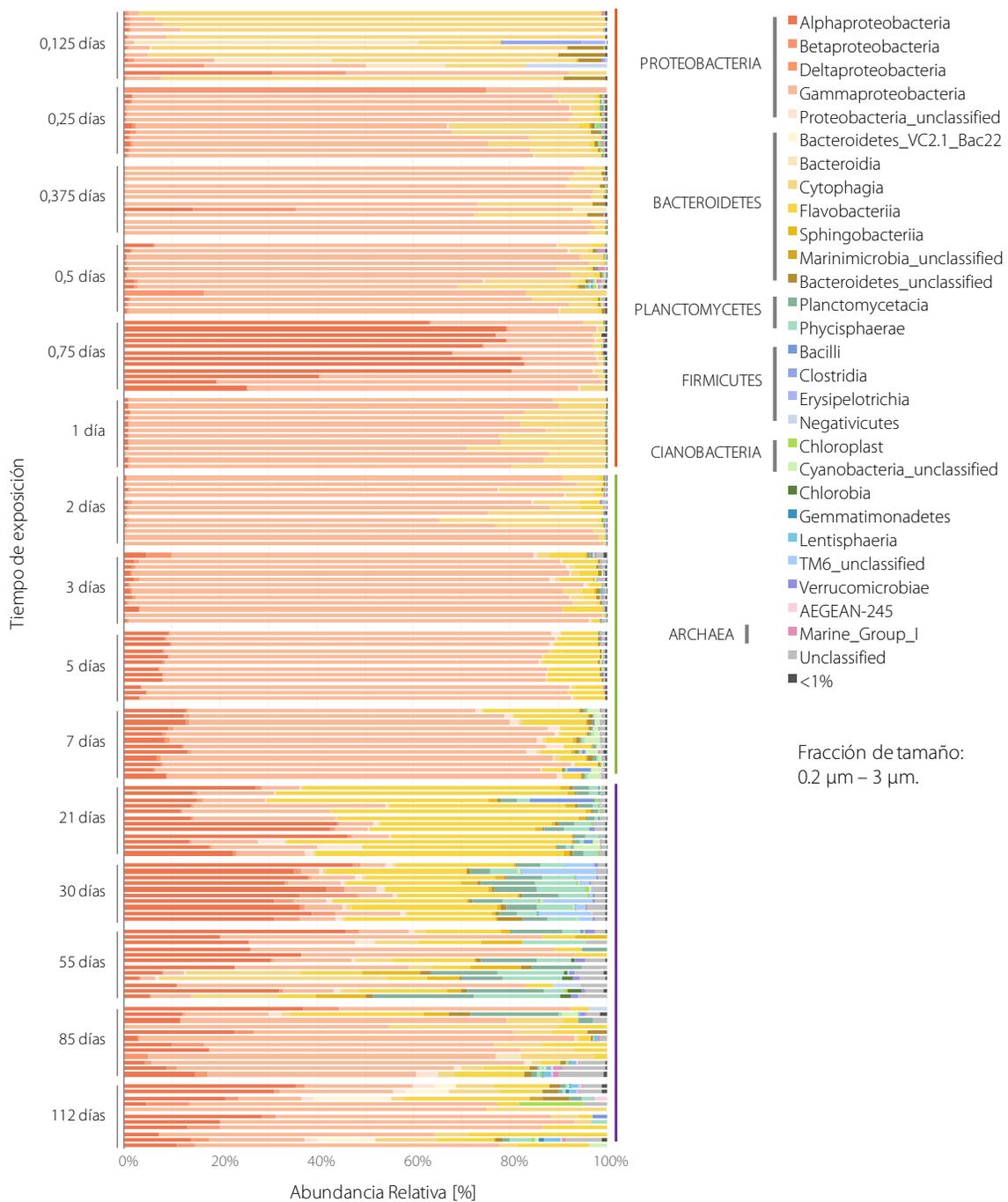
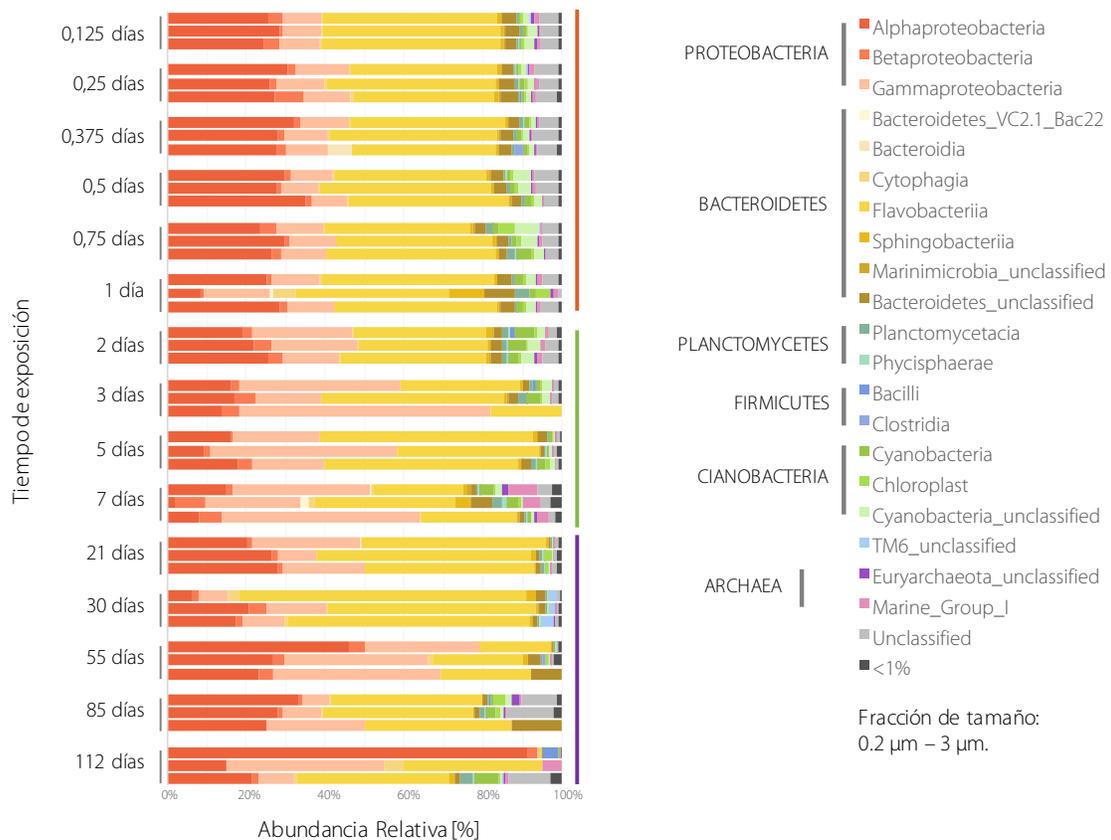


Figura 11. Composición taxonómica de bacterias y arqueas de la biopelícula durante su formación sobre acero inoxidable. Distribución temporal de la abundancia relativa de las clases de bacterias y arqueas detectadas en la biopelícula, de acuerdo a la asignación taxonómica dada a OTUs obtenidas del análisis metagenómico del gen 16S rRNA. Las muestras secuenciadas corresponden a la fracción de tamaño entre 0.2 μm -3 μm de diámetro celular. Los taxa cuya contribución máxima al total de las muestras no superó el 1% fueron agrupados y rotulados en el gráfico como <1%. Las barras laterales indican: izquierda, la agrupación de muestras correspondiente a cada tiempo de exposición; derecha, a los tiempos de exposición al que están asociado las muestras (naranja - tempranos; verde - medios; morado - tardíos). En la leyenda adicionalmente se indica la categoría taxonómica superior al que pertenece cada taxón.



Los datos obtenidos indicaron que la sucesión biológica que ocurre para formar la biopelícula sobre placas de acero inoxidable, involucra la participación de colonizadores primarios picoeucariontes (considerando 0,125 días de exposición) compuestos por 7 de los 8 supergrupos taxonómicos asignados (Figura 13). Adicionalmente, se encontró que la composición picoeucarionte de la biopelícula durante los tiempos tempranos de exposición estuvo principalmente compuesta por Opisthokonta ($58 \pm 19\%$), Archaeplastida ($19 \pm 16\%$) y Rhizaria ($7 \pm 10\%$); durante los tiempos medios de exposición estuvo principalmente compuesta por Opisthokonta ($35 \pm 21\%$), Rhizaria ($18 \pm 10\%$) y un grupo de secuencias asociadas a microorganismos eucariontes sin clasificar ($12 \pm 5\%$); y finalmente, durante los tiempos tardíos de exposición estuvo compuesta principalmente por Rhizaria ($29 \pm 29\%$), Opisthokonta ($23 \pm 32\%$), y Archaeplastida ($20 \pm 30\%$) (Figura 13).

La composición picoeucarionte del agua de mar circundante durante los tiempos tempranos de exposición estuvo principalmente compuesta por Hacrobia ($29 \pm 13\%$), Opisthokonta ($25 \pm 12\%$), Alveolata ($22 \pm 8\%$) y Archaeplastida ($12 \pm 4\%$). Durante los tiempos medios y tardíos esta principalmente compuesta por Opisthokonta ($37 \pm 18\%$ y $56 \pm 28\%$, respectivamente), Archaeplastida ($33 \pm 22\%$ y $16 \pm 21\%$, respectivamente) y Alveolata ($17 \pm 9\%$ y $10 \pm 15\%$, respectivamente) (Figura 14). Se observa que el componente eucarionte del agua tiene más variabilidad que la comunidad de bacterias y arqueas durante el mismo periodo de tiempo, con un valor de R de 0,428 (*p value* de 0,001) en un ANOSIM de similitud global entre las muestras de distintos tiempos.



Figura 13. Composición taxonómica de eucariontes de la biopelícula durante su formación sobre acero inoxidable. Distribución temporal de la abundancia relativa de los supergrupos de eucariontes detectados en la biopelícula, de acuerdo a la asignación taxonómica dada a OTUs obtenidas del análisis metagenómico del gen 18S rRNA. Las muestras secuenciadas corresponden a la fracción de tamaño entre 0,2 μm - 3 μm de diámetro celular. Las barras laterales indican: izquierda, la agrupación de muestras correspondiente a cada tiempo de exposición; derecha, a los tiempos de exposición al que están asociado las muestras (naranja - tempranos; verde - medios; morado - tardíos).

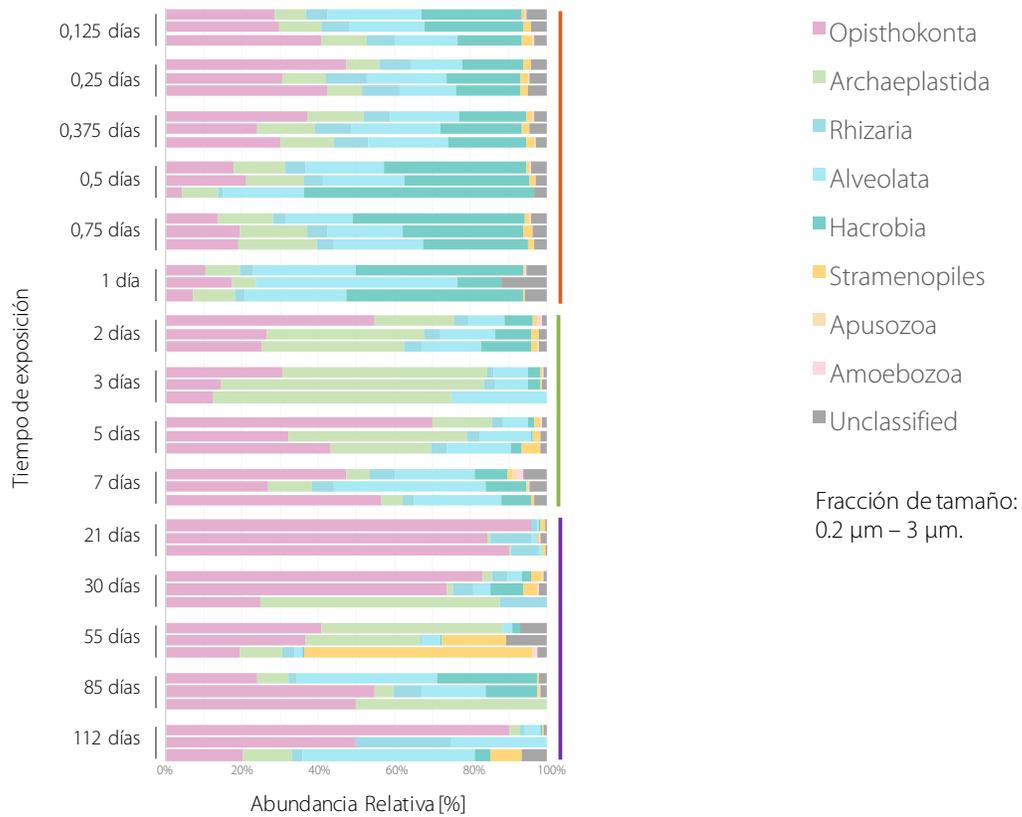


Figura 14. Composición taxonómica de eucariontes del agua de mar contenida en los acuarios durante el experimento. Distribución temporal de la abundancia relativa de los supergrupos de eucariontes detectados en el agua de mar, de acuerdo a la asignación taxonómica dada a OTUs obtenidas del análisis metagenómico del gen 18S rRNA. Las muestras secuenciadas corresponden a la fracción de tamaño entre 0,2 μm -3 μm de diámetro celular. Las barras laterales indican: izquierda, la agrupación de muestras correspondiente a cada tiempo de exposición; derecha, a los tiempos de exposición al que están asociado las muestras (naranja - tempranos; verde - medios; morado - tardíos).

5.2.2.3. Variabilidad de la composición e índices ecológicos de la comunidad microbiana de la biopelícula.

Con el objetivo de analizar la variabilidad de la composición comunitaria, se integraron los datos obtenidos para el componente bacteriano y de arqueas con el componente de eucariontes microbianos, en una matriz única (ver sección Métodos 4.5.5). Para estos análisis, las muestras fueron agrupadas de acuerdo a los tiempos de exposición a la que pertenecen: 0-1 día, tiempos tempranos; 2-7 días, tiempos medios; 21-112 días, tiempos tardíos; provenientes del agua de mar circundante del acuario durante el experimento, agua).

Se determinaron los índices ecológicos de riqueza (S), diversidad (H') y equidad (J') tanto para las comunidades microbianas provenientes del agua del acuario como para las que constituían la biopelícula desarrollada sobre la placa de acero inoxidable (Tabla N°1). Se evaluó la dinámica de la comunidad de la biopelícula y se observó que, durante la primera semana de exposición, hubo un incremento de la riqueza, la diversidad y la equidad de las comunidades. Este comportamiento varía en los tiempos de exposición tardíos, donde se observan una tendencia de la riqueza y la diversidad a disminuir, mientras la equidad tiende a aumentar (Figura 15).

Además, a través de un escalamiento multidimensional no paramétrico (NMDS) basado en un análisis de similitud de Bray-Curtis (Figura 16) y con una prueba estadística de ANOSIM entre los grupos pre-definidos, se determinó que la composición de las comunidades de tiempos tempranos de exposición tiene mayor similitud con las comunidades de tiempos medios ($R = 0,347$, p value de 0,001) que con las de tiempos tardíos ($R = 0,590$, p value de 0,001) o las del agua circundante ($R = 0,763$, p value de 0,001).

Tabla N°1. Índices ecológicos de la comunidad microbiana.

	Tiempo de exposición	Riqueza		Diversidad		Equidad	
		S	ds[S]	H'(loge)	ds[H']	J'	ds[J']
Biopelícula	0.125 días	308.67	188.53	3.88	0.42	0.70	0.07
	0.25 días	728.58	263.35	4.90	0.56	0.76	0.04
	0.375 días	776.25	305.14	4.62	0.52	0.72	0.06
	0.5 días	515.67	305.73	4.81	0.66	0.81	0.06
	0.75 días	680.75	233.41	4.12	0.53	0.64	0.07
	1 día	537.42	145.35	3.55	0.37	0.57	0.04
	2 días	1322.58	143.65	5.05	0.53	0.70	0.07
	3 días	1649.08	289.54	5.60	0.40	0.76	0.04
	5 días	1951.00	282.45	5.57	0.25	0.74	0.03
	7 días	2397.00	298.82	6.21	0.18	0.80	0.01
	21 días	1508.92	188.45	5.60	0.35	0.77	0.05
	30 días	1369.90	150.77	5.69	0.38	0.79	0.05
	55 días	487.70	603.32	4.38	1.35	0.88	0.10
	85 días	262.00	348.34	3.88	1.05	0.88	0.13
	112 días	189.09	294.01	3.58	1.19	0.93	0.08
Agua del Acuario	0.125 días	2240.00	130.79	6.34	0.11	0.82	0.02
	0.25 días	2640.33	98.65	6.43	0.08	0.82	0.01
	0.375 días	2444.00	146.60	6.38	0.08	0.82	0.00
	0.5 días	2005.67	589.67	6.11	0.16	0.81	0.01
	0.75 días	1945.00	380.20	6.30	0.04	0.83	0.02
	1 día	1095.67	881.56	5.61	1.08	0.89	0.07
	2 días	2268.00	241.11	5.95	0.07	0.77	0.01
	3 días	1156.67	994.34	4.62	1.44	0.81	0.14
	5 días	1941.33	69.04	5.56	0.24	0.73	0.03
	7 días	1924.33	734.08	5.83	0.39	0.78	0.06
	21 días	1698.00	96.60	3.75	0.15	0.50	0.02
	30 días	1101.00	299.01	5.23	0.38	0.75	0.06
	55 días	686.00	604.77	4.34	1.30	0.72	0.08
	85 días	1053.33	933.87	4.57	1.97	0.85	0.13
	112 días	674.67	621.43	4.17	1.63	0.78	0.26

S = Riqueza, número de especies.

J' = Índice equidad de Pielou.

H' = Índice de diversidad de Shannon-Wiener.

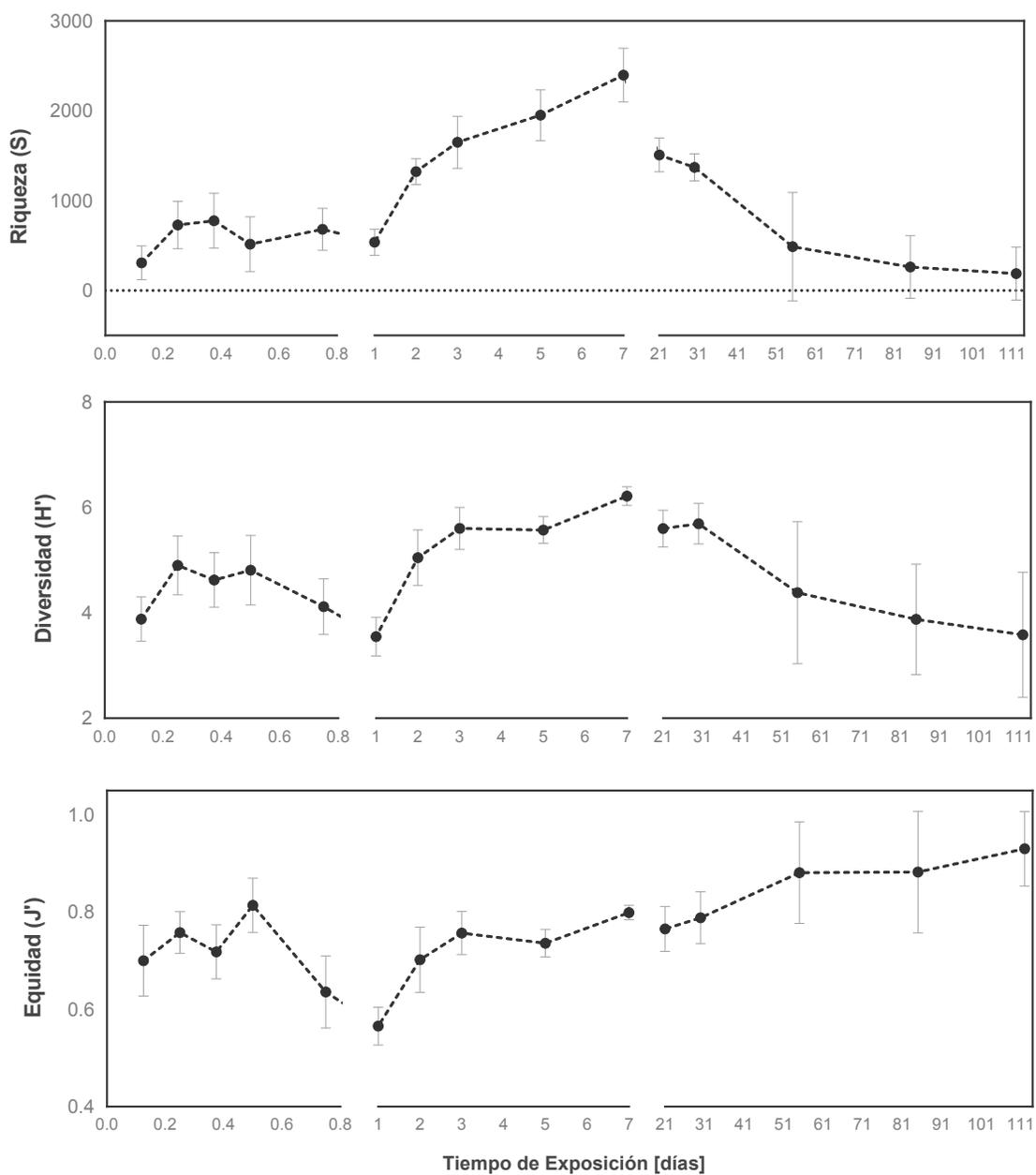


Figura 15. Índices ecológicos de la comunidad microbiana que constituye la biopelícula formada sobre acero inoxidable. Valores promedio de los indicadores de Riqueza, Equidad y Diversidad para las muestras obtenidas para cada tiempo y sus respectivas desviaciones estándar.

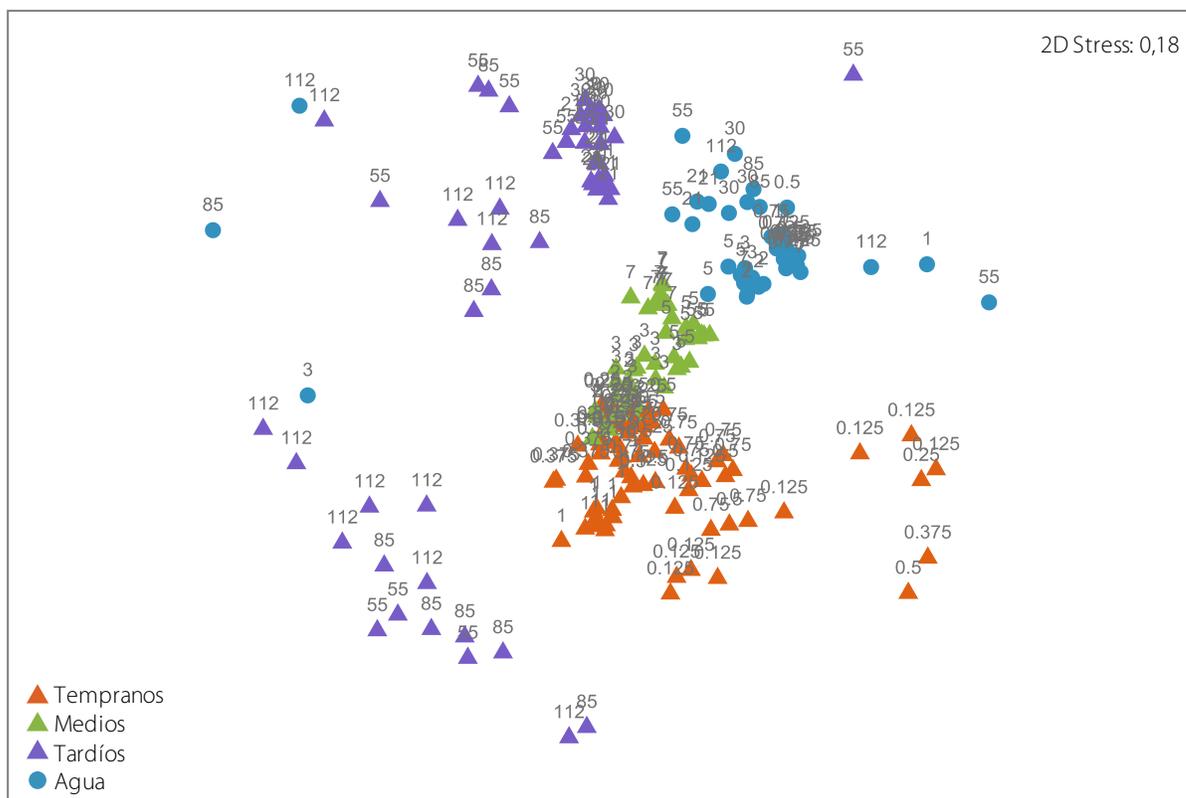


Figura 16. Similitud de la composición comunitaria microbiana. Análisis de escalado multidimensional no-paramétrico (NMDS) de similitud (Bray-Curtis) de la composición comunitaria (bacteria, arqueas y eucariontes) de las muestras provenientes de: tiempos tempranos (▲), medios (▲), tardíos (▲) de exposición provenientes de la biopelícula formada sobre acero inoxidable; y de aquellas obtenidas del agua de mar circundante del acuario (●). Los números en cada símbolo indican el tiempo de exposición de esa muestra a agua de mar natural expresada en días.

La composición de las comunidades de tiempos medios se presentó como transitoria, siendo medianamente similares a las de tiempos tardíos ($R = 0,441$, p value de 0,001) y manteniendo una menor similitud con las comunidades del agua ($R = 0,777$, p value de 0,001). La composición de la biopelícula de tiempos tardíos resultó tener mayor similitud con la composición de la comunidad del agua del acuario ($R = 0,361$, p value de 0,001) que las de tiempos previos de exposición.

Para determinar cuáles fueron las OTUs que contribuyeron en la similitud/disimilitud de la composición comunitaria en los tiempos tempranos, medios y tardíos, se realizó un análisis de similitud porcentual (SIMPER). La Tabla N°2 muestra el ranking de las diez OTUs con mayor contribución en la similitud de la composición comunitaria para las muestras de tiempos tempranos (Gammaproteobacteria y Cytophagia), medios (Gammaproteobacteria y Opisthokonta) y tardíos (Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Flavobacteria y Rhizaria) de exposición. A continuación, en la Tabla N°3, se muestra el ranking de las diez OTUs cuyas variaciones tienen una mayor contribución en la disimilitud entre la composición comunitaria de los tiempos de exposición. Destaca la variación de OTUs asociadas al género *Spongiispira* (Gammaproteobacteria), dado su aporte en la disimilitud entre todos los tiempos analizados.

Tabla N°2. Ranking de las diez OTUs con mayor contribución en la similitud de la composición de la comunidad en cada tiempo de exposición.

Tiempos Tempranos			
OTUs	Contrib%	Asignación Taxonómica	
		Clase	Género
b_Otu000012	1.49	Cytophagia	<i>Balneola</i>
b_Otu000001	1.32	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000034	1.05	Cytophagia	<i>Balneola</i>
b_Otu000002	1.05	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000049	0.94	Cytophagia	<i>Balneola</i>
b_Otu000057	0.90	Cytophagia	<i>Balneola</i>
b_Otu000005	0.87	Gammaproteobacteria	<i>Vibrionaceae_unclassified</i>
b_Otu000007	0.85	Gammaproteobacteria	<i>Oleispira</i>
b_Otu000072	0.85	Cytophagia	<i>Balneola</i>
b_Otu000068	0.83	Cytophagia	<i>Balneola</i>

Tiempos Medios			
OTUs	Contrib%	Asignación Taxonómica	
		Clase	Género
b_Otu000001	0.84	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000024	0.64	Gammaproteobacteria	<i>Marinomonas</i>
b_Otu000023	0.62	Gammaproteobacteria	<i>Marinomonas</i>
b_Otu000002	0.60	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000042	0.52	Gammaproteobacteria	<i>Marinomonas</i>
b_Otu000006	0.46	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000016	0.45	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
e_Otu000008	0.45	Opisthokonta	<i>Clathrina</i>
b_Otu000011	0.44	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000009	0.44	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>

Tiempos Tardíos			
OTUs	Contrib%	Asignación Taxonómica	
		Clase	Género
e_Otu000006	1.00	Rhizaria	<i>Phagomixa</i>
b_Otu000003	0.84	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>
e_Otu000009	0.77	Rhizaria	<i>Phagomixa</i>
e_Otu000010	0.76	Rhizaria	<i>Phagomixa</i>
b_Otu000001	0.51	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000083	0.46	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio</i>
e_Otu000021	0.46	Rhizaria	<i>Phagomixa</i>
b_Otu0000125	0.46	Flavobacteria	<i>Dokdonia</i>
b_Otu000073	0.45	Flavobacteria	<i>Dokdonia</i>
b_Otu0000117	0.44	Alphaproteobacteria	<i>Sulfitobacter</i>

Tabla N°3. Ranking de las diez OTUs con mayor contribución en la disimilitud de la composición de la comunidad entre cada tiempo de exposición.

Tiempos Tempranos vs Medios (Disimilitud promedio = 79.35%)					
OTUs	Abundancia Promedio en T. Tempranos	Abundancia Promedio en T. Medios	Contrib%	Asignación Taxonómica	
				Clase	Género
b_Otu000001	1.12	1.44	0.40	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000002	0.87	1.09	0.31	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000012	1.03	0.43	0.30	Cytophagia	<i>Balneola</i>
b_Otu000006	0.73	0.86	0.26	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000011	0.59	0.85	0.25	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000009	0.71	0.83	0.25	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000005	0.60	0.83	0.25	Gammaproteobacteria	<i>Vibrionaceae_unclassified</i>
b_Otu000013	0.60	0.78	0.24	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
e_Otu000008	0.44	0.75	0.24	Opisthokonta	<i>Clathrina</i>
b_Otu000007	0.83	0.64	0.24	Gammaproteobacteria	<i>Oleispira</i>

Tiempos Tempranos vs Tardíos (Disimilitud promedio = 95.42%)					
OTUs	Abundancia Promedio en T. Tempranos	Abundancia Promedio en T. Tardíos	Contrib%	Asignación Taxonómica	
				Clase	Género
b_Otu000001	1.12	0.38	0.45	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000012	1.03	0.16	0.42	Cytophagia	<i>Balneola</i>
b_Otu000003	0.54	0.44	0.38	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>
b_Otu000002	0.87	0.29	0.37	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000013	0.6	0.28	0.30	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
e_Otu000006	0.09	0.89	0.29	Rhizaria	<i>Phagomixa</i>
b_Otu000004	0.5	0.20	0.29	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>
b_Otu000009	0.71	0.18	0.29	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000034	0.76	0.08	0.29	Cytophagia	<i>Balneola</i>
b_Otu000007	0.83	0.05	0.29	Gammaproteobacteria	<i>Oleispira</i>

Tiempos Medios vs Tardíos (Disimilitud promedio = 92.79%)					
OTUs	Abundancia Promedio en T. Medios	Abundancia Promedio en T. Tardíos	Contrib%	Asignación Taxonómica	
				Clase	Género
b_Otu000001	1.44	0.38	0.39	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000002	1.09	0.29	0.32	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000013	0.78	0.28	0.25	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000023	0.89	0.25	0.25	Gammaproteobacteria	<i>Marinomonas</i>
b_Otu000011	0.85	0.23	0.25	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000006	0.86	0.07	0.24	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000024	0.92	0.14	0.24	Gammaproteobacteria	<i>Marinomonas</i>
b_Otu000009	0.83	0.18	0.24	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000016	0.76	0.12	0.22	Gammaproteobacteria	<i>Spongiispira</i>
b_Otu000005	0.83	0.09	0.21	Gammaproteobacteria	<i>Vibrionaceae_unclassified</i>

5.2.2.4. Distribución de OTUs en los distintos tiempos de exposición.

Para analizar como la composición taxonómica de cada etapa influye en el desarrollo de corrosión marina, se realizó la identificación de las OTUs que se encontraron en todos los tiempos de exposición, y aquellas presentes exclusivamente en los tiempos tempranos-medios y en los tiempos tardíos de exposición, de acuerdo a la metodología descrita en la sección Métodos 4.5.5. Dada la similitud encontrada entre los tiempos de exposición tempranos y medios (Figura 16), se decidió analizarlas juntas.

Se realizó la asignación taxonómica de aquellas OTUs de bacterias y arqueas presentes en todos los tiempos de exposición y se analizaron los cambios en su abundancia durante el experimento (Figura 17). Estos resultados mostraron que los tiempos tempranos y medios de exposición estuvieron principalmente dominados por miembros de Gammaproteobacteria y que presentaron un aumento en la abundancia de miembros de Flavobacteria hacia al final de los tiempos medios de exposición. Durante los tiempos tardíos de exposición se observó una dominancia de miembros de Flavobacteria y abundancias variables entre los miembros de Gammaproteobacteria, donde algunos presentaron una disminución y posterior aumento en los muestreos finales o viceversa.

Se utilizó la misma estrategia para analizar los cambios de abundancia de OTUs de eucariontes presentes en todos los tiempos de exposición (Figura 18). En este caso, durante tiempos tempranos y medios de exposición dominaron principalmente hongos del supergrupo Opisthokonta y algunos miembros de los supergrupos Archaeplastida, Hacrobia y Alveolata. Durante los tiempos tardíos de exposición se determinó una disminución en la abundancia de la mayoría de las taxa analizadas, no obstante, se observaron aumentos en la abundancia de algunos miembros de Opisthokonta, Alveolata y Stramenopiles.

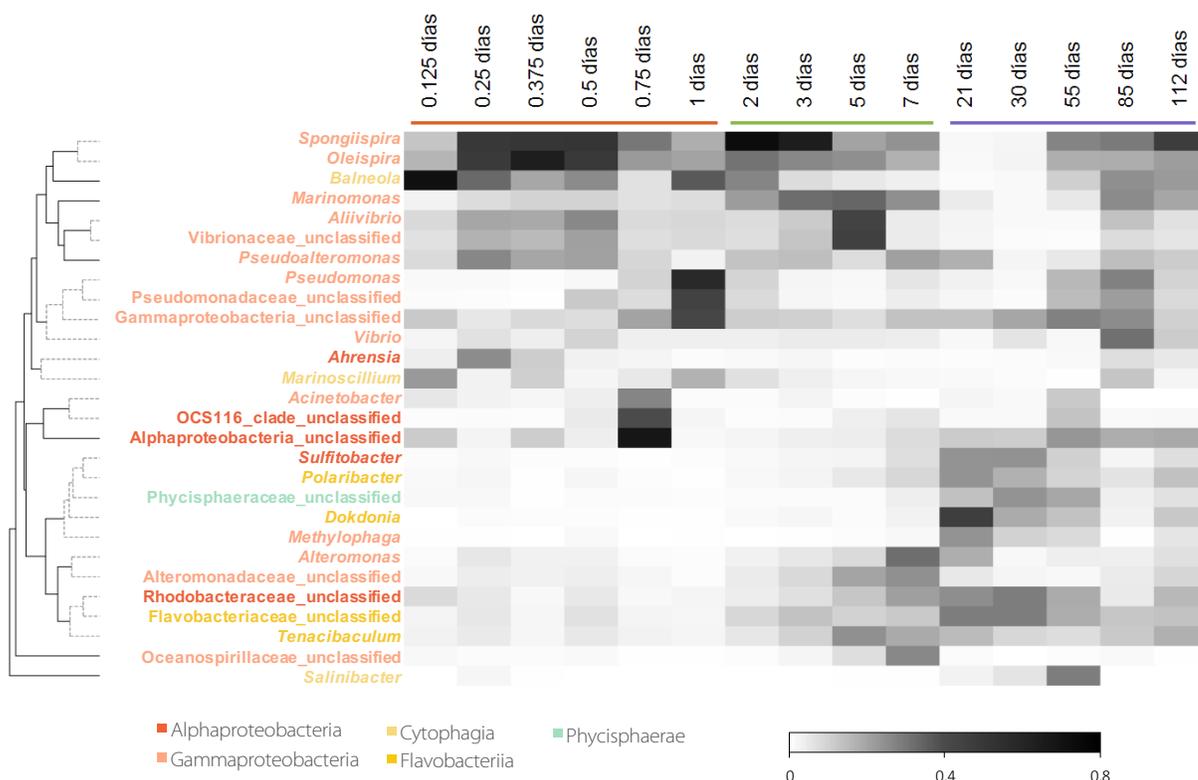


Figura 17. Distribución de taxa bacterianas y de arqueas presentes en todos los tiempos de exposición en la biopelícula. Mapa de calor representando la distribución de abundancia de los taxa bacterianos y de arqueas de la biopelícula y su similitud con la distribución del resto de las variables (costado izquierdo). La escala indica el color asociado a los valores de la raíz cuadrada de la abundancia relativa de cada taxón. El color de cada taxón está asociado a la categoría taxonómica superior al que pertenece. Las barras superiores indican los tiempos de exposición al que están asociado las muestras (naranja - tempranos; verde - medios; morado - tardíos).

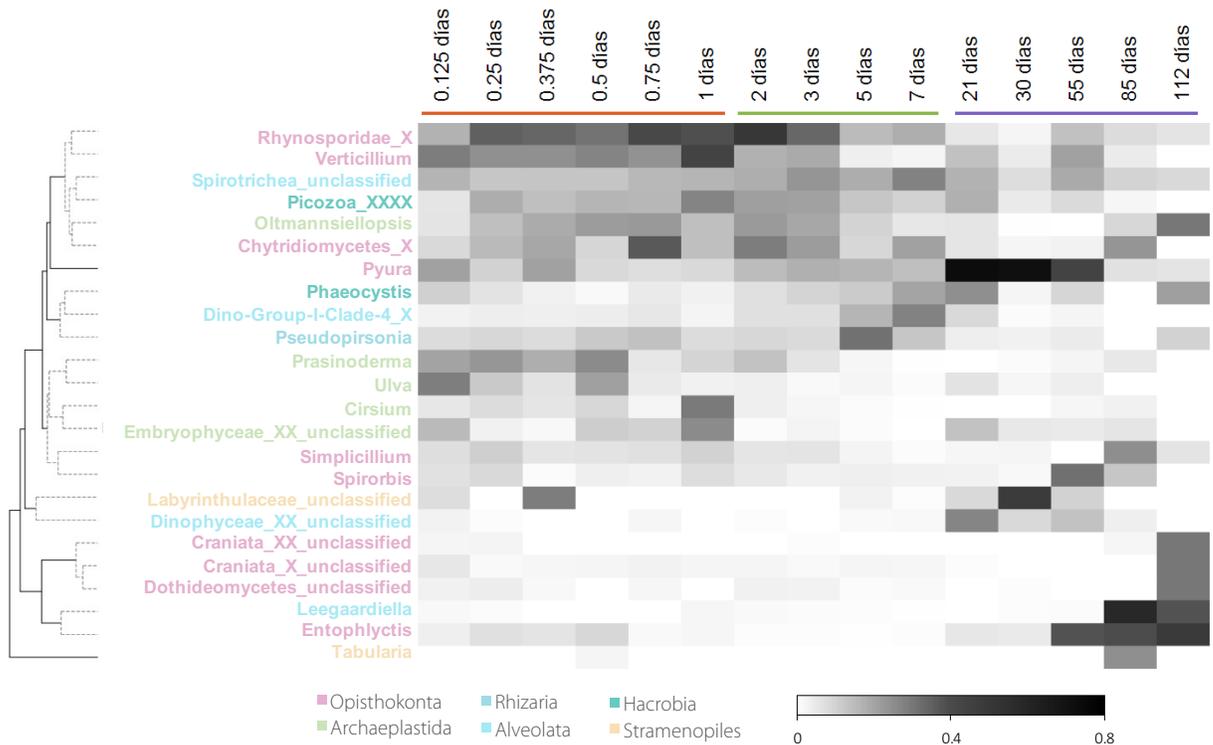


Figura 18. Distribución de taxa eucariontes presentes en todos los tiempos de exposición en la biopelícula. Mapa de calor representando la distribución de abundancia de los taxa eucariontes de la biopelícula a nivel de género y su similitud con la distribución del resto de las variables (costado izquierdo). La escala indica el color asociado a los valores de la raíz cuadrada de la abundancia relativa de cada taxón. El color de cada taxón está asociado a la categoría taxonómica superior al que pertenece. Las barras superiores indican los tiempos de exposición al que están asociado las muestras (naranja - tempranos; verde - medios; morado - tardíos).

Los taxa encontrados exclusivamente en tiempos tempranos-medios y tardíos de exposición en la composición de bacterias y arqueas (Tabla N°4) mostraron que: i) durante los tiempos tempranos-medios de exposición contienen 61 géneros exclusivos (representados por un total de 105 OTUs), que estuvieron principalmente dominados por géneros pertenecientes a las clases Bacteroidia (*Parabacteroides*), Gammaproteobacteria (Cellvibrionales_unclassified y *Dasania*) y Clostridia (Lachnospiraceae_unclassified; *Ruminiclostridium_5*); ii) durante los tiempos tardíos de exposición contienen 15 géneros exclusivos (representados por un total de 25 OTUs), que estuvieron principalmente dominados por géneros pertenecientes a las clases Alphaproteobacteria (SM2D12_unclassified), Chitinophagia (*Taibaiella*), Gammaproteobacteria (Solimonadaceae_unclassified) y Flavobacteria (*Flagellimonas*).

Los taxa encontrados exclusivamente en tiempos tempranos-medios y tardíos de exposición en la composición de eucariontes (Tabla N°5) mostraron que: i) durante los tiempos tempranos-medios contienen 32 taxa exclusivos (representados por un total de 178 OTUs), que estuvieron principalmente dominados por taxa pertenecientes a los grupos de Apusozoa (Planomonadida), Stramenopila (MAST, Stramenopiles_X_unclassified), Hacrobia (Katablepharidaceae, Centroheliozoa), Alveolata (Colpodea), Amoebozoa (Tubulinea) y Opisthokonta (Metazoa_unclassified); ii) no se hubo grupos taxonómicos eucariontes cuya presencia fuese exclusiva de los tiempos tardíos de exposición.

Tabla N°4. Taxa de bacterias y arqueas exclusivas de los distintos tiempos de exposición.

Taxa bacterianas y de arqueas exclusivas tiempos tempranos y medios		
Taxonomia	#OTUs (Total = 105)	Abundancia Relativa Promedio [%]
<i>Parabacteroides</i>	12	0.05
Cellvibrionales_unclassified	7	0.03
<i>Dasania</i>	4	0.02
Lachnospiraceae_unclassified	4	0.02
<i>Ruminiclostridium_5</i>	4	0.02
<i>Alistipes</i>	3	0.02
Bacteroidales_unclassified	3	0.02
<i>Legionella</i>	3	0.02
<i>Aureispira</i>	2	0.01
BD7-11_unclassified	2	0.01
<i>Cetobacterium</i>	2	0.01
<i>Flammeovirga</i>	2	0.01
<i>Mycobacterium</i>	2	0.01
<i>Pseudoflavonifractor</i>	2	0.01
<i>Reinekea</i>	2	0.01
Rhizobiaceae_unclassified	2	0.01
Ruminococcaceae_UCG-002	2	0.01
<i>Sediminibacterium</i>	2	0.01
<i>Sphingopyxis</i>	2	0.01
<i>Streptococcus</i>	2	0.01
Taxa con 1 OTU	41	0.31
Taxa bacterianas y de arqueas exclusivas tiempos tardios		
Taxonomia	#OTUs (Total = 25)	Abundancia Relativa Promedio [%]
SM2D12_unclassified	5	0.02
<i>Taibaiella</i>	4	0.02
Solimonadaceae_unclassified	3	0.01
<i>Flagellimonas</i>	2	0.01
Taxa con 1 OTU	11	0.03

Tabla N°5. Taxa eucariontes exclusivas de tiempos tempranos y medios de exposición.

Taxa exclusivas tiempos tempranos y medios		
Taxonomia	#OTUs (Total = 178)	Abundancia Relativa Promedio [%]
Planomonadida	38	0.38
MAST	26	0.27
Katablepharidaceae	19	0.19
Stramenopiles_X_unclassified	10	0.11
Centrohelioczoa_X	10	0.11
Colpodea	8	0.08
Tubulinea	7	0.08
Metazoa_unclassified	6	0.05
Prostomatea	4	0.05
Bolidophyceae	4	0.05
Cercozoa_X	4	0.05
Ciliophora_unclassified	4	0.05
Gastrotricha	4	0.05
Litostomatea	3	0.03
Bicoecea	3	0.03
Nemertea	3	0.03
Discosea-Longamoebia	3	0.03
Platyhelminthes	3	0.03
Heterotrichea	3	0.03
Bryozoa	2	0.03
Ochrophyta_unclassified	2	0.03
Bigyromonadea	2	0.03
Taxa con 1 OTU	10	0.11

5.3. Determinar las interacciones bióticas y abióticas que tienen lugar durante el desarrollo de una biopelícula microbiana sobre acero inoxidable expuesto continuamente a agua de mar.

5.3.1. Interacciones abióticas que se establecen durante la formación de la biopelícula sobre acero inoxidable.

Para determinar si los factores abióticos medidos en este estudio (temperatura, oxígeno disuelto, conductividad, nutrientes principales y elementos traza) explican la varianza observada en la composición taxonómica de la biopelícula, se realizó un análisis multivariado de redundancia (RDA). Los valores obtenidos para los parámetros ambientales, la concentración de nutrientes y elementos traza se encuentran detallados en el Apéndice F - Tabla S2, S3 y S4, respectivamente.

Los valores obtenidos indican que la varianza de la comunidad en la biopelícula no estuvo condicionada por las variables ambientales medidas, sin embargo, éstas explicaron una mayor proporción de la varianza observada en el agua de mar circundante en el acuario (Figura 19). Se observa una asociación entre la composición durante los tiempos tempranos de exposición, y la conductividad y concentración de hierro del agua. Mientras que la composición durante tiempos medios y tardíos de exposición estuvo condicionada por la concentración de nutrientes principales (fosfato y nitrito), oxígeno disuelto y la concentración de metales traza (cadmio, níquel, vanadio, molibdeno y zinc) en el agua.

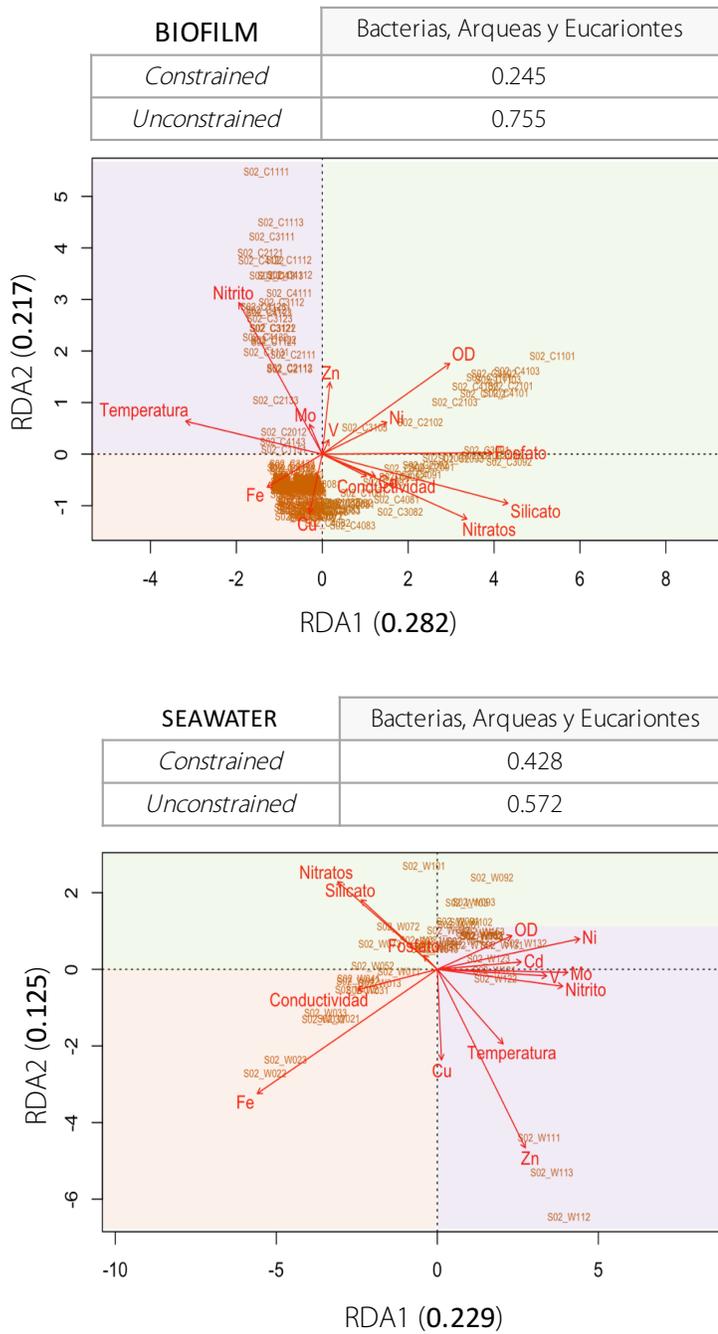


Figura 19. Efecto de factores ambientales en la composición comunitaria. La tabla superior indica la proporción condicionada (*constrained*) y no condicionada (*unconstrained*) explicada por las variables ambientales medidas. En paréntesis junto a cada eje se indica la proporción en la que aportan los factores principales. En café, se encuentran indicadas las muestras analizadas rotuladas de acuerdo a su nombre. El área interior de la gráfica se encuentra coloreada de acuerdo al tiempo de exposición al que pertenece la mayoría de las muestras en ese sector (naranja - tempranos; verde - medios; morado - tardíos).

5.3.2. Interacciones de co-ocurrencia entre los microorganismos presentes en la biopelícula.

Por otro lado, para explicar la varianza de las muestras de biopelícula no explicada por las variables ambientales, se exploraron los patrones de co-ocurrencia que tienen lugar durante el desarrollo de la biopelícula entre OTUs de bacterias, arqueas y eucariontes, utilizando el análisis probabilístico de co-ocurrencia de especies (ver sección Métodos 4.6). Después de 30 días, las interacciones de co-ocurrencia inferidas no fueron significativas (*i.e.* se consideran aleatorias), por lo cual no fueron incluidas en este análisis.

Las métricas de las redes de co-ocurrencia obtenidas fueron diagramadas por separado en gráficos de dispersión en el tiempo (Figura 20). Se determinó que el número de nodos de las redes, así como la vía más corta (*Shortest path*) aumentaron hasta alcanzar un máximo a los 7 días de exposición (Figura 20A-B). La dinámica del número promedio de vecinos apoya esta observación, dado que la disminución de las conexiones establecidas con cada nodo indicó una mayor distribución de las interacciones de co-ocurrencia en la biopelícula en tiempos medios y tardíos de exposición (Figura 20C). En concordancia, el diámetro de la red y el largo de la vía característica (*Characteristic Path Length*) mostraron un aumento del tamaño de la red que se estabilizó durante los tiempos tardíos de exposición (Figura 20E-F). Los cambios en el coeficiente de agrupación (*Clustering Coefficient*) mostraron que existe mayor probabilidad de que los vecinos de un nodo co-ocurran entre ellos durante los 7 y los 30 días de exposición, sugiriendo mayor conectividad en la red al final de este periodo (Figura 20D).

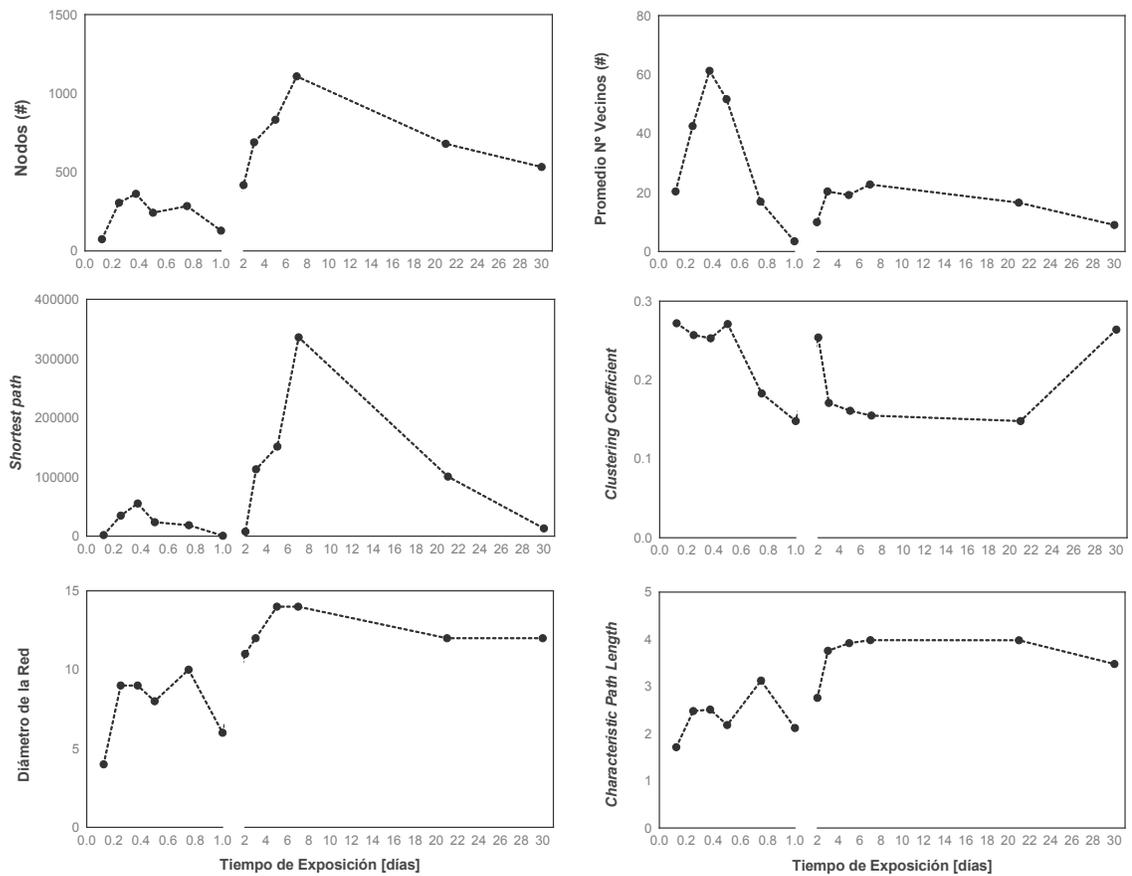


Figura 20. Métricas de las redes de co-ocurrencia para cada tiempo analizado. Se muestran las métricas principales de las redes obtenidas del análisis probabilístico de co-ocurrencia de especies.

La visualización de las redes (Figura 21a-21l), mostró que las bacterias son los miembros más abundantes dentro de la red, en todos los tiempos de exposición analizados, pero la distribución de las interacciones cambia a lo largo del desarrollo de la biopelícula. Además, se determinó que su presencia en la red no depende directamente/exclusivamente de la abundancia relativa de los microorganismos en la biopelícula. Durante los tiempos tempranos de exposición (Figura 21a-f), la red está dominada por Cytophagia y Gammaproteobacteria. En los tiempos medios de exposición (Figura 21g-j), se observa un cambio en aumento de Flavobacteria, cuya dominancia en el grupo de los Bacteroidetes en la red perdura hasta los 30 días de exposición. En el caso de Proteobacteria, desde el tercer día de exposición, se observó un progresivo cambio en la dominancia de clase hacia Alphaproteobacteria, que se exacerbó después de 7 días de exposición (Figura 21k-l).

Durante la primera semana, se observó una alta conectividad con microorganismos de metabolismo heterótrofo del componente eucarionte. Para entender cómo estas interacciones biológicas podrían haber influenciado los cambios comunitarios asociados al desarrollo de biocorrosión marina, se determinaron los cambios de abundancia en el tiempo de los grupos eucariontes heterótrofos asociados al proceso de colonización primaria de las placas de acero inoxidable durante los tiempos tempranos de exposición de este experimento: miembros de los grupos Alveolata, Apusozoa, Hacrobia, Rhizaria y Stramenopiles. Respectivamente, se determinaron los cambios de abundancia de todas las OTUs que interactuaron con estos microorganismos durante los 30 días que se obtuvieron interacciones de co-ocurrencia significativas.

0,125 días de exposición

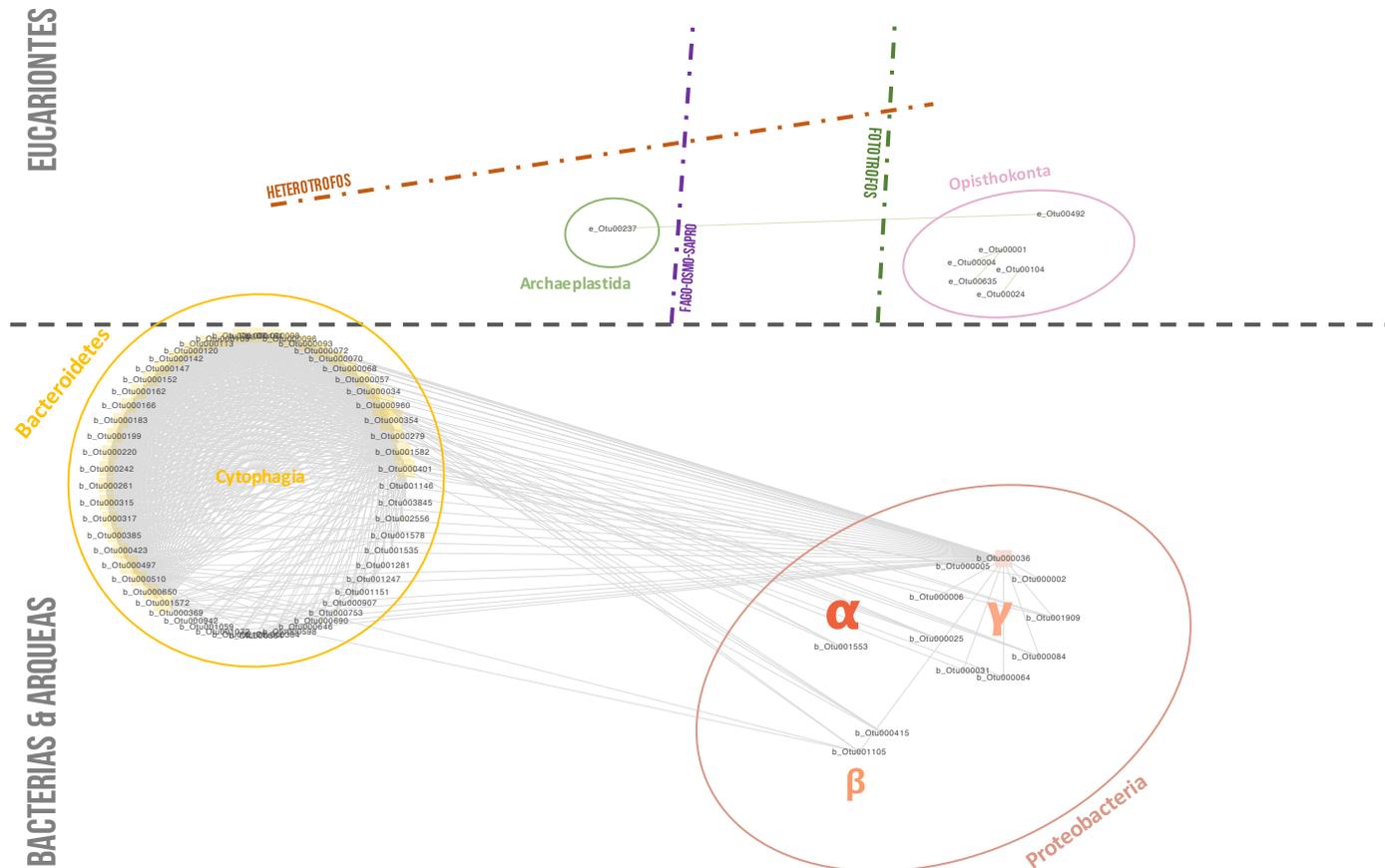


Figura 21a. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 0,125 días de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

0,25 días de exposición

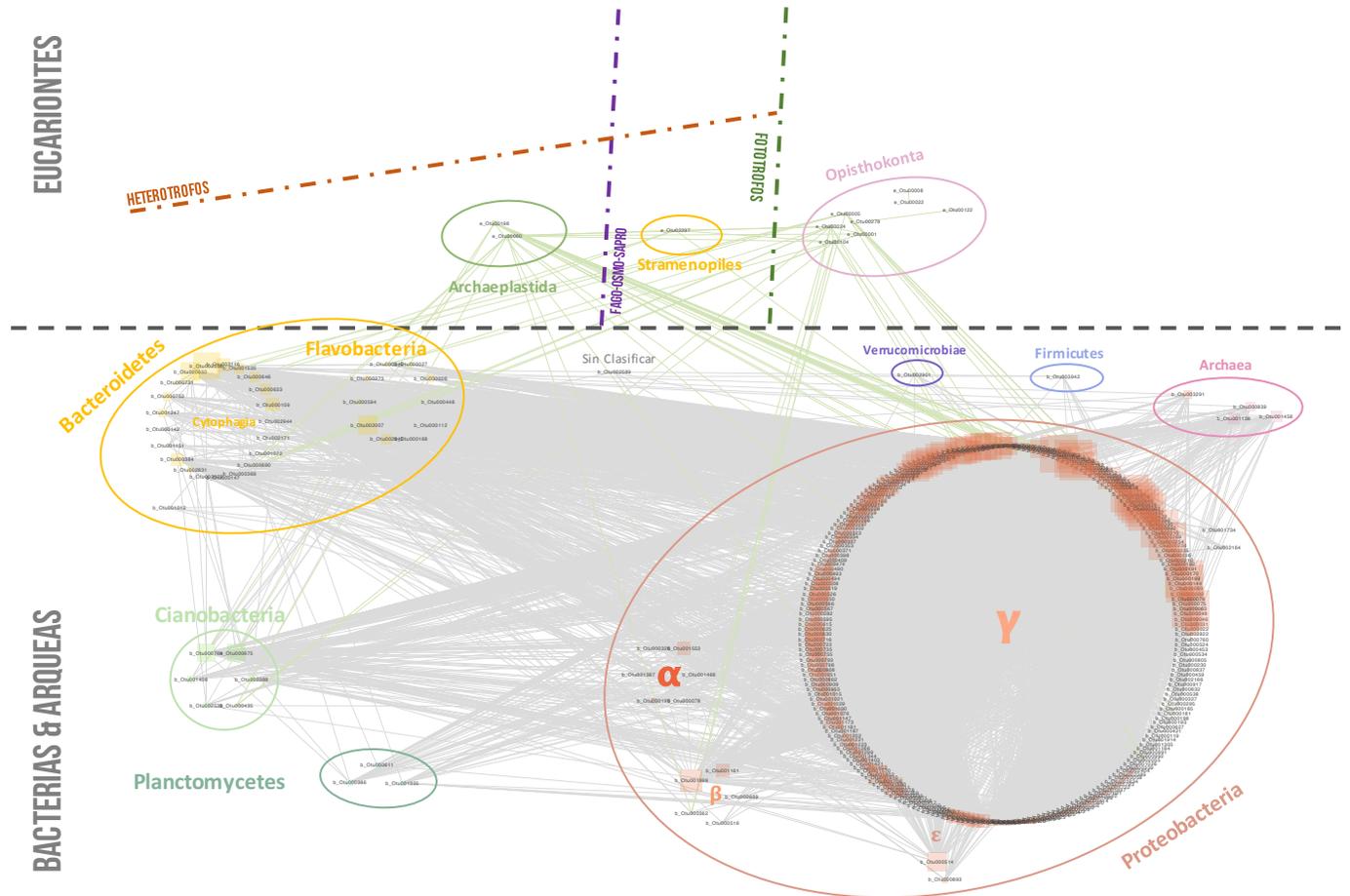


Figura 21b. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 0,25 días de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

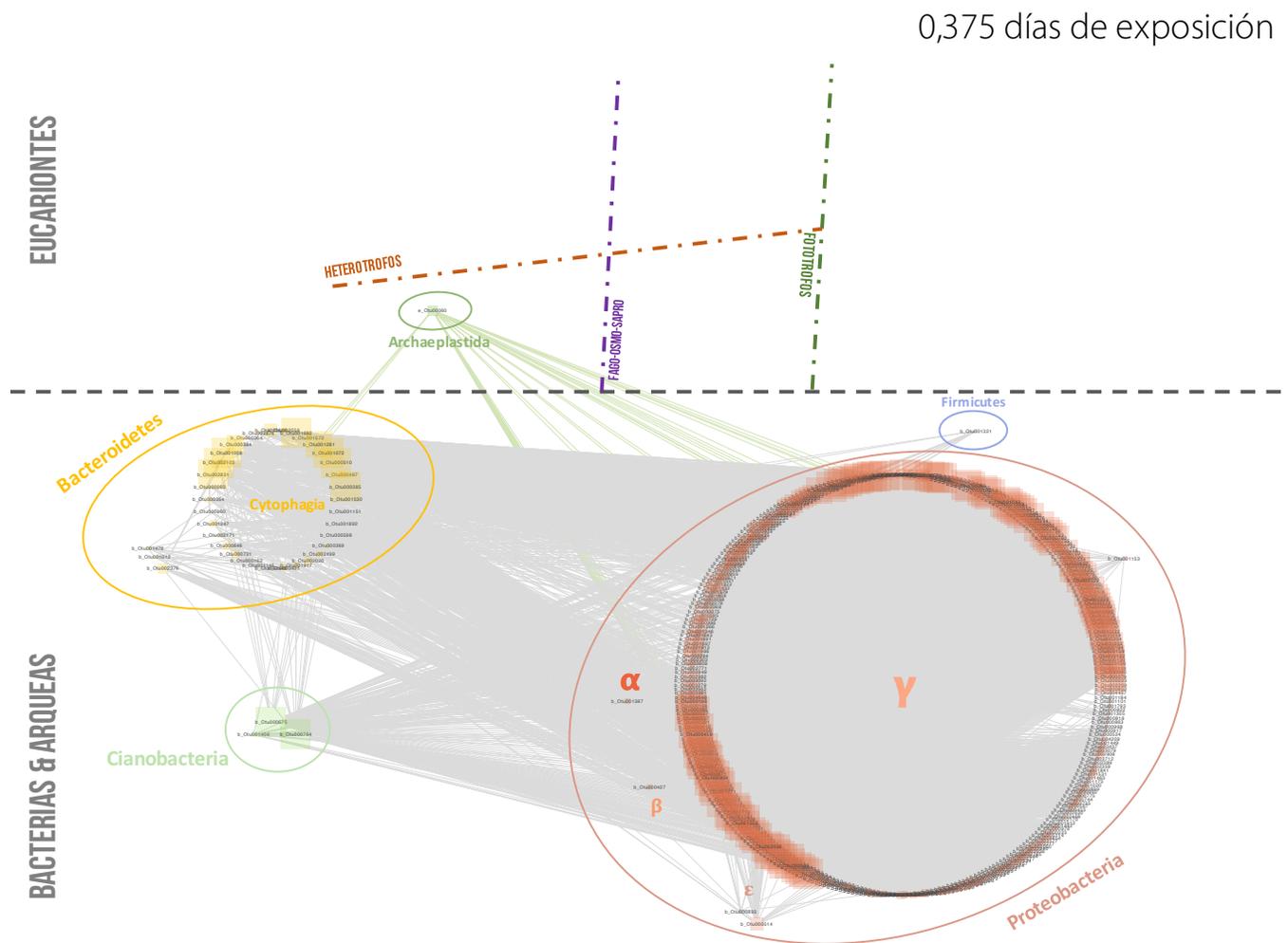


Figura 21c. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 0,375 días de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

0,5 días de exposición

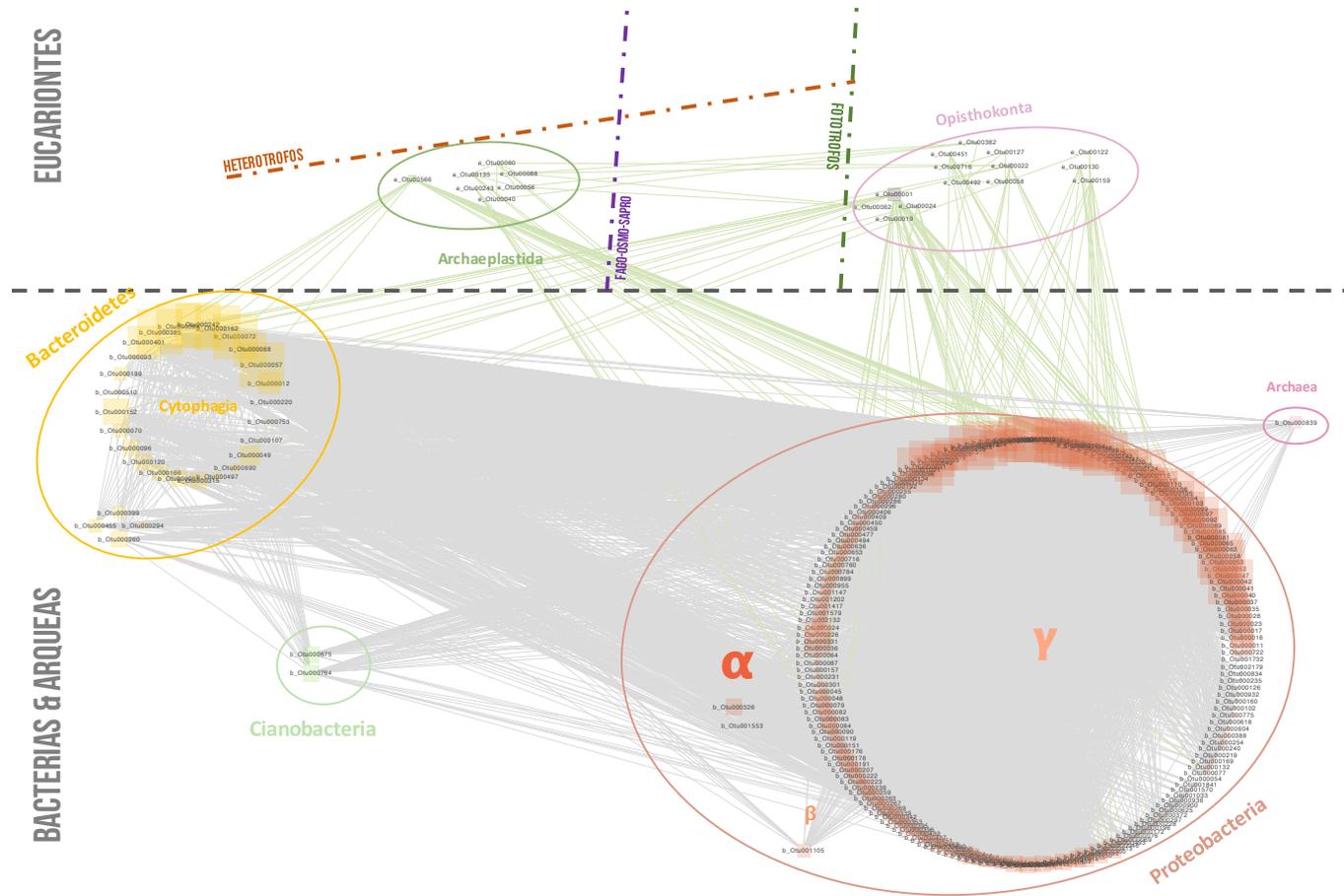


Figura 21d. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 0,5 días de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

0,75 días de exposición

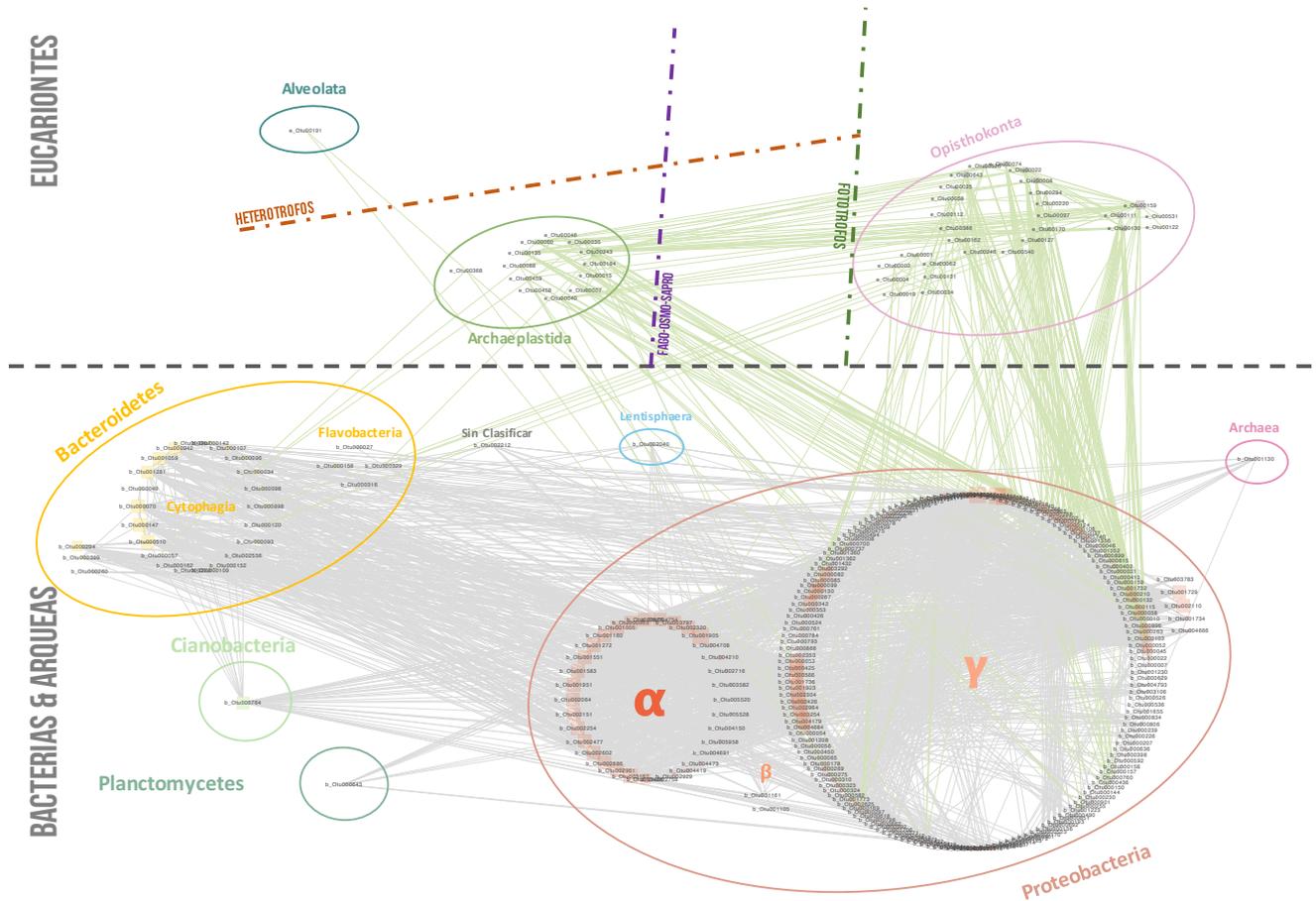


Figura 21e. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 0,75 días de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

1 día de exposición

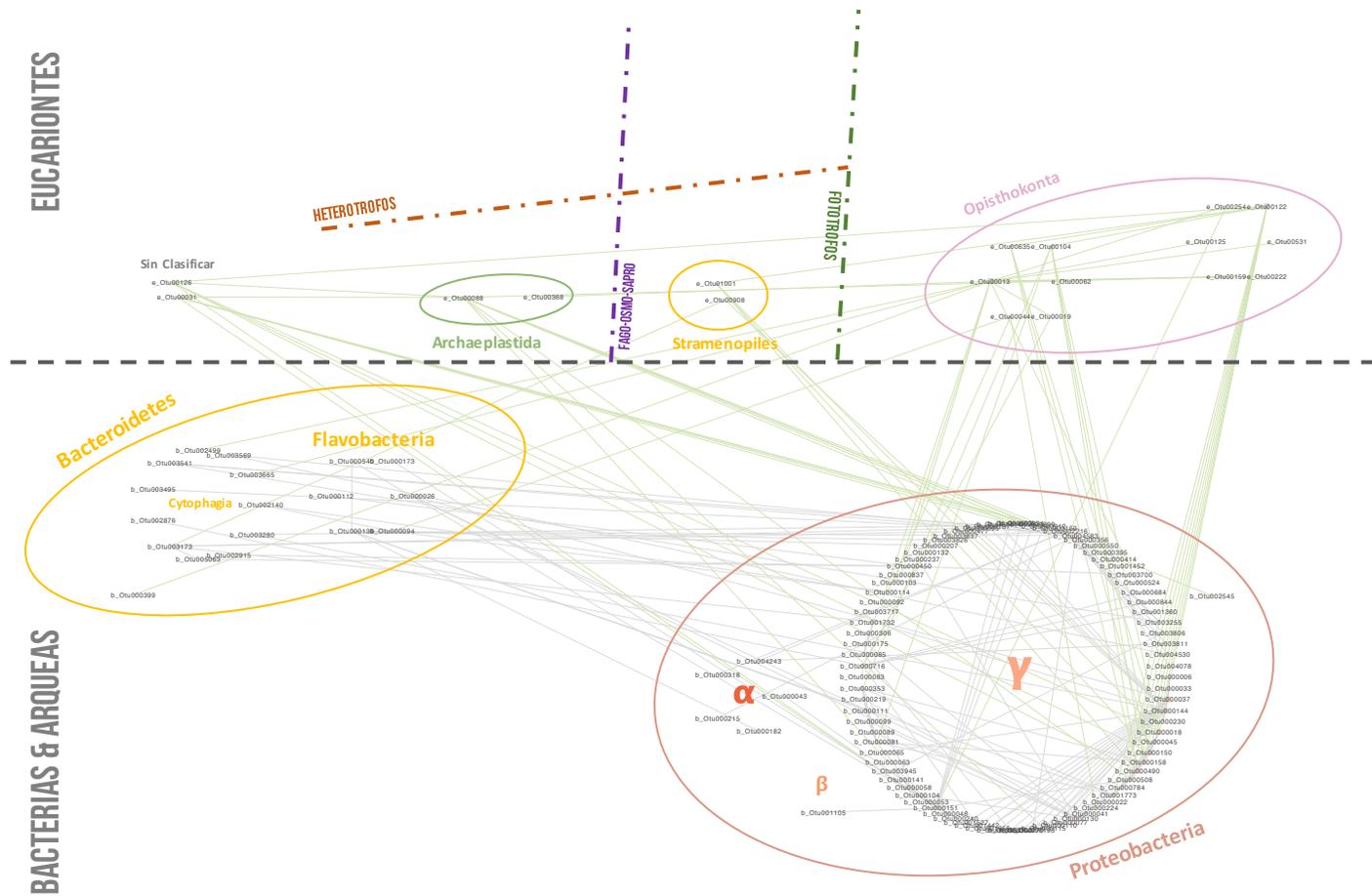


Figura 21f. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 1 día de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

2 días de exposición

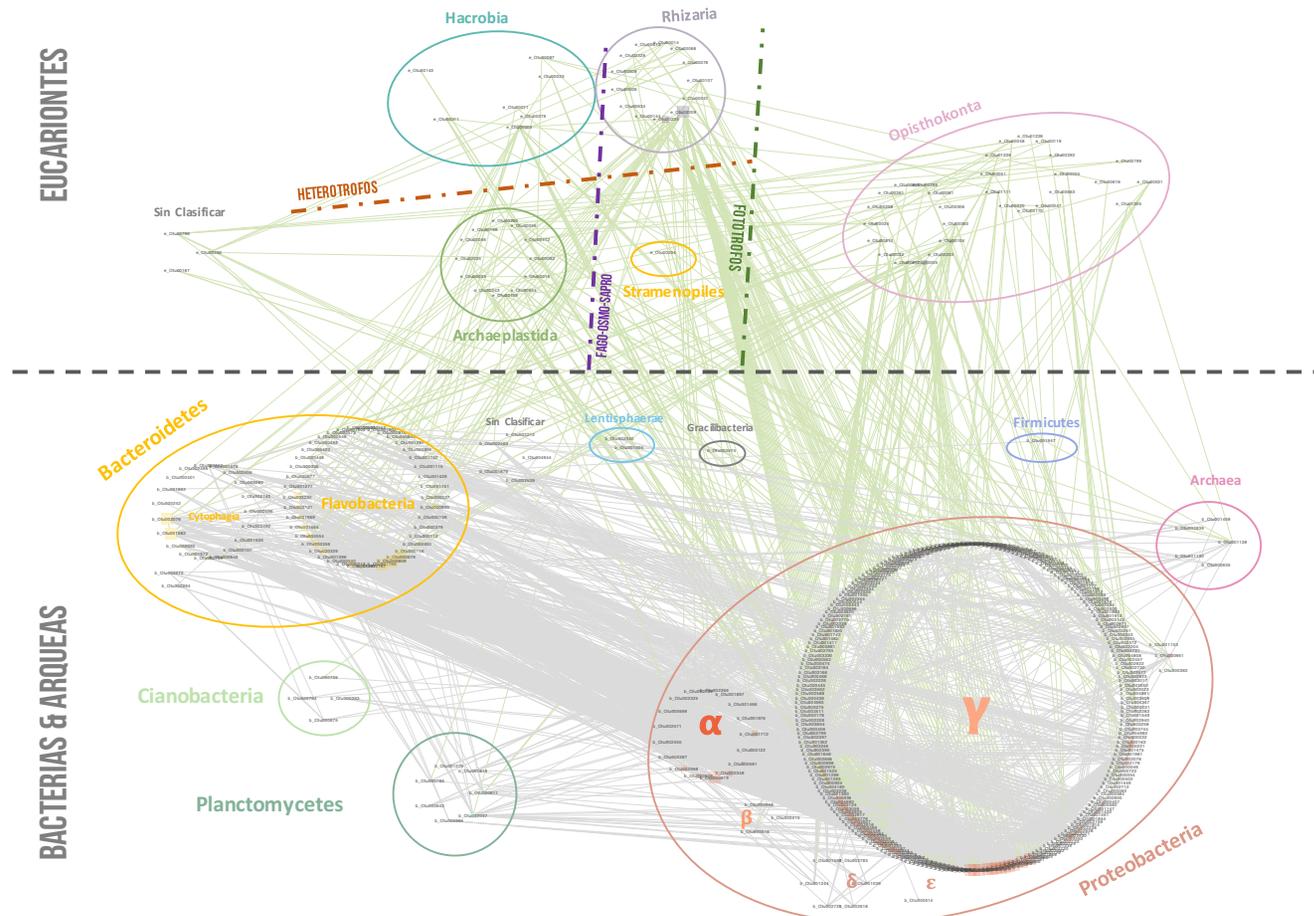


Figura 21g. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 2 días de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

3 días de exposición

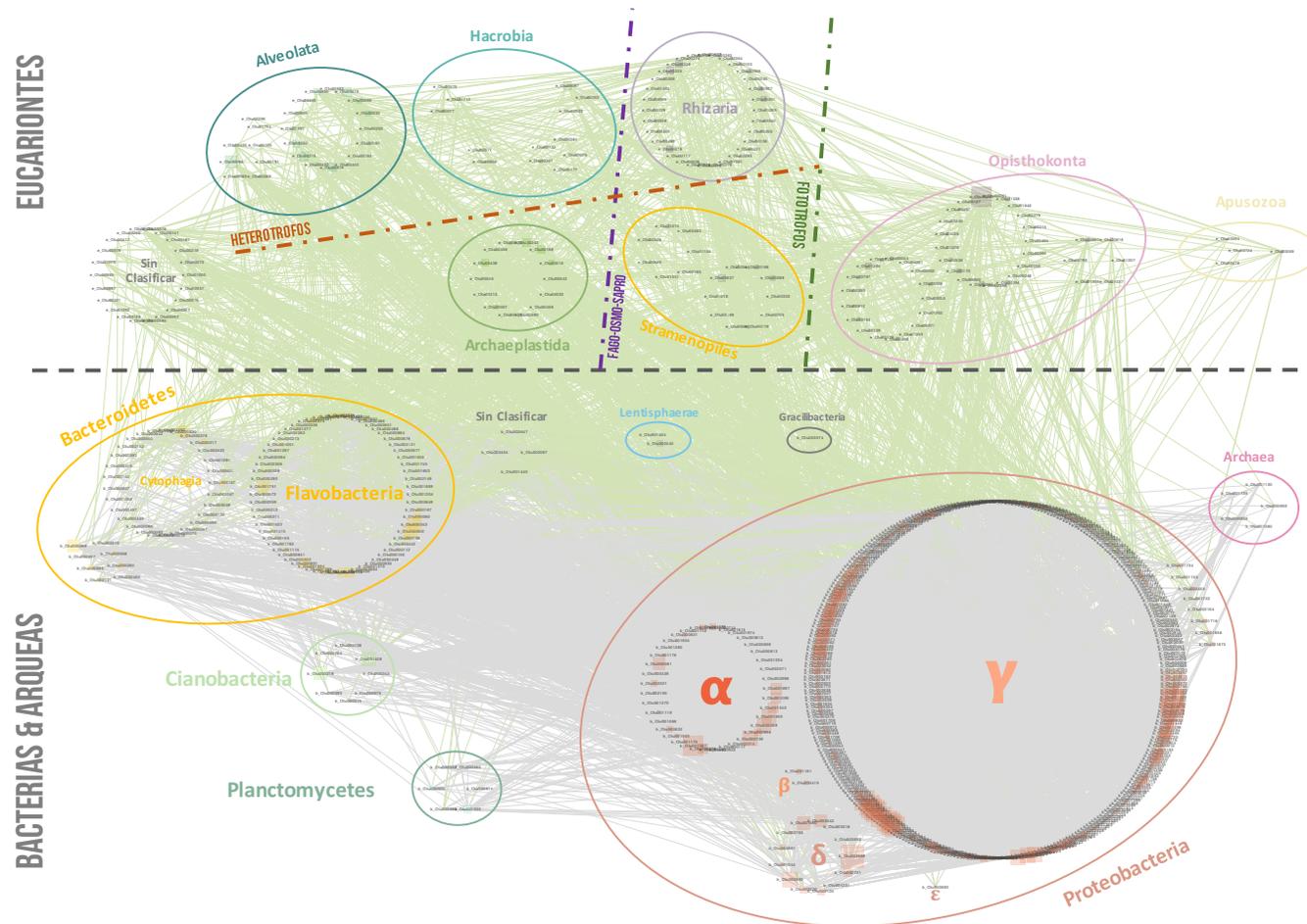


Figura 21h. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 3 días de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

5 días de exposición

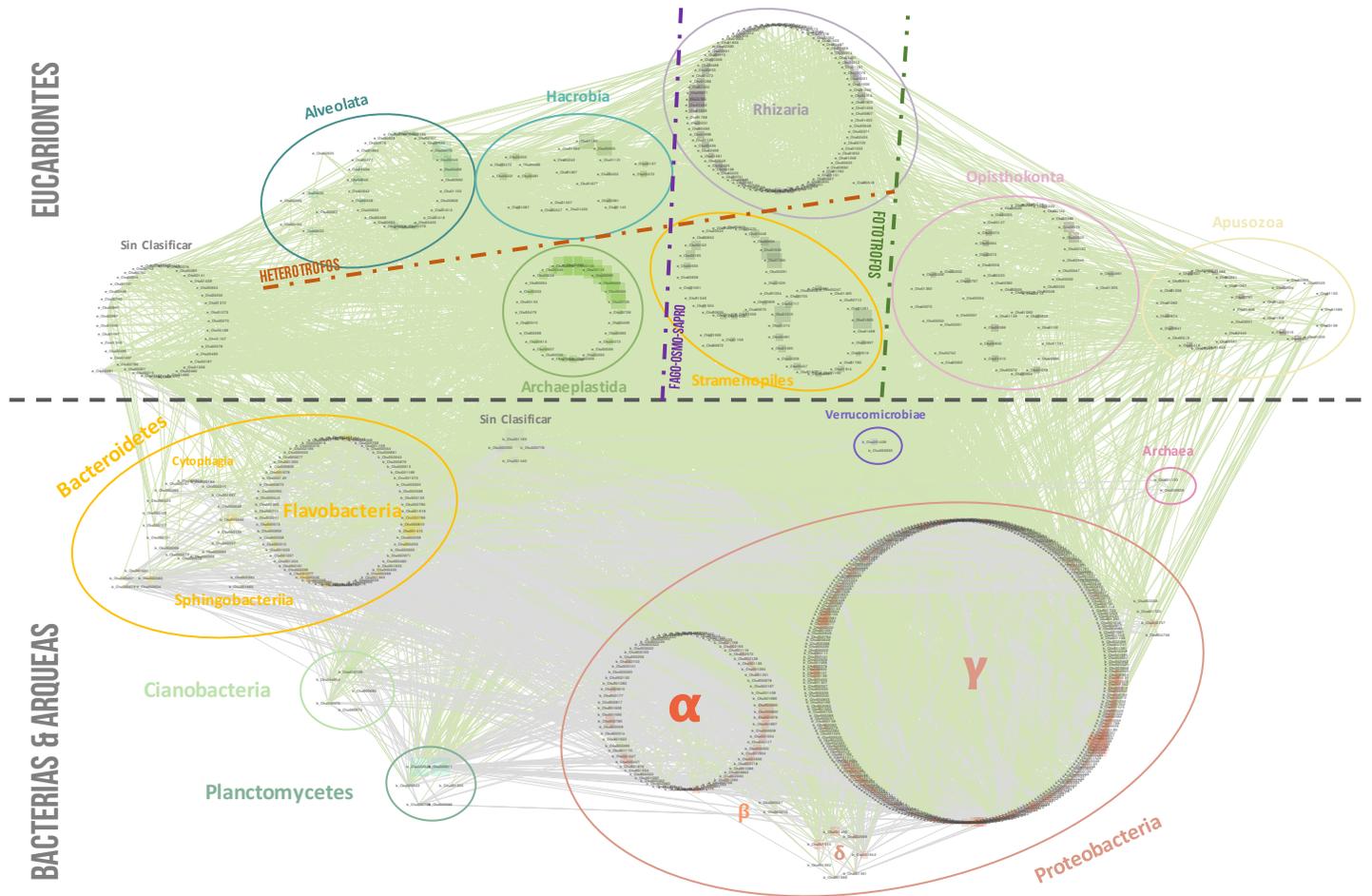


Figura 21i. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 5 días de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

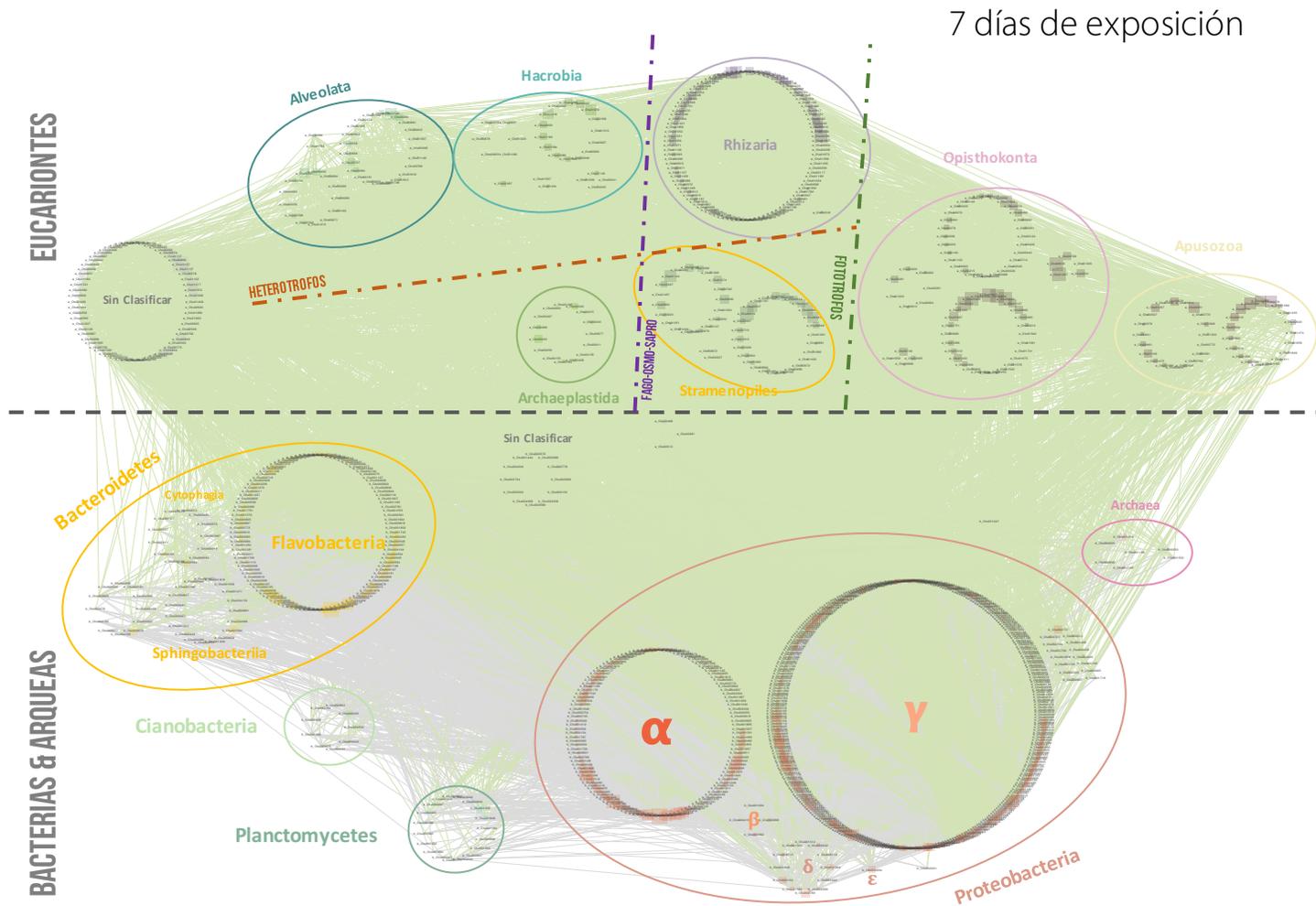


Figura 21j. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 7 días de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

21 días de exposición

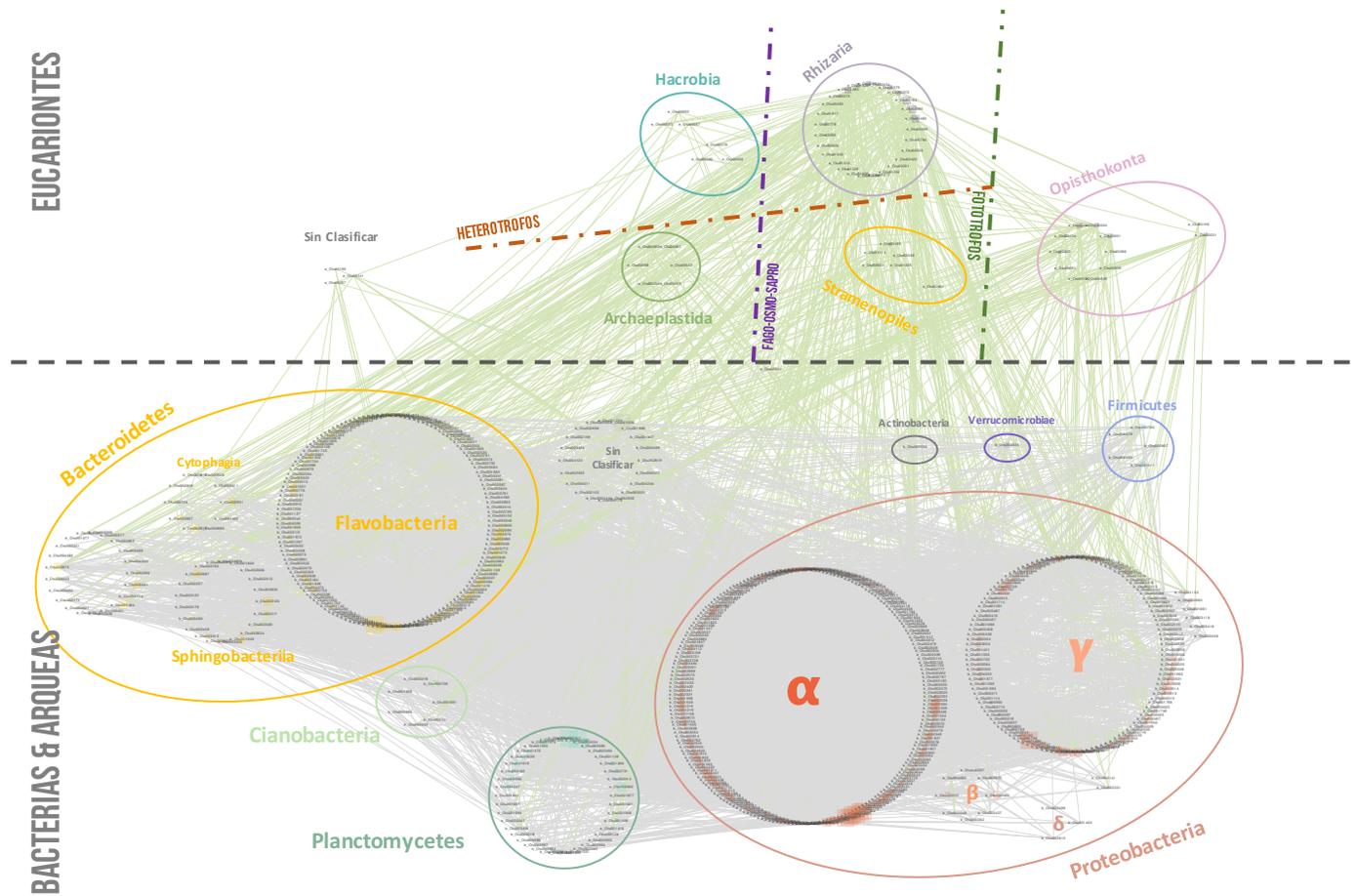


Figura 21k. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 21 días de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

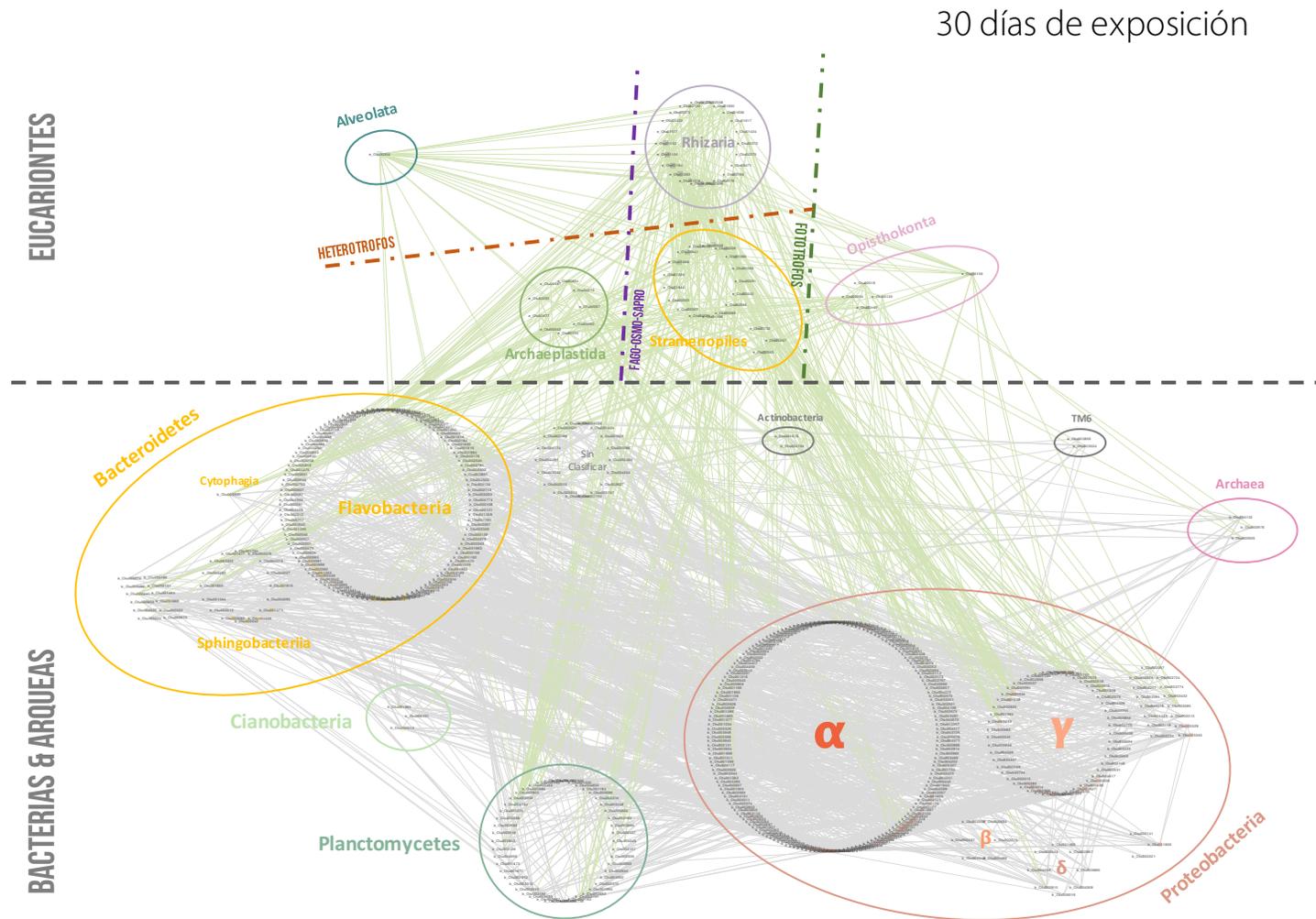


Figura 211. Red de co-ocurrencia de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable luego de 30 días de exposición. Representación visual de las interacciones bióticas de co-ocurrencia inferidas *in-silico*. La visualización fue realizada en base a la asignación taxonómica de clase de cada OTU y de acuerdo al componente microbiano al que representan (bacterias & arqueas o eucariontes). Las líneas en verde indican interacciones con microorganismos eucariontes.

Los resultados obtenidos mostraron que las interacciones de co-ocurrencia entre Alveolata, Apusozoa y miembros del grupo Hacrobia (Cryptophyta y Telonemia) con OTUs bacterianas, presentaron un comportamiento similar al observado en dinámicas de depredación (Figura 22). Las interacciones dadas con miembros del grupo Rhizaria (Cercozoa) también presentaron similitud con dinámicas de depredación, sin embargo, los cambios en su abundancia sugieren un comportamiento dependiente de la densidad de su presa. Los cambios observados en miembros del grupo Stramenopiles (Labyrinthulea y MAST) sugieren interacciones del tipo neutral (Figura 22).

Para determinar específicamente qué microorganismos pueden haber tenido cambios de abundancia relacionados con estas interacciones, se obtuvieron las principales contribuciones de taxa entre las OTUs que co-ocurrieron con estos colonizadores primarios eucariontes y se asignaron taxonómicamente. Entre ellos destacan principalmente miembros del grupo de Gammaproteobacteria (*Spongiispira*, *Pseudoalteromonas*, *Oleispira*, *Colwellia*), Flavobacteria (Flavobacteriaceae_unclassified) y Alphaproteobacteria (Rhodobacteraceae_unclassified) (Tabla N°6).

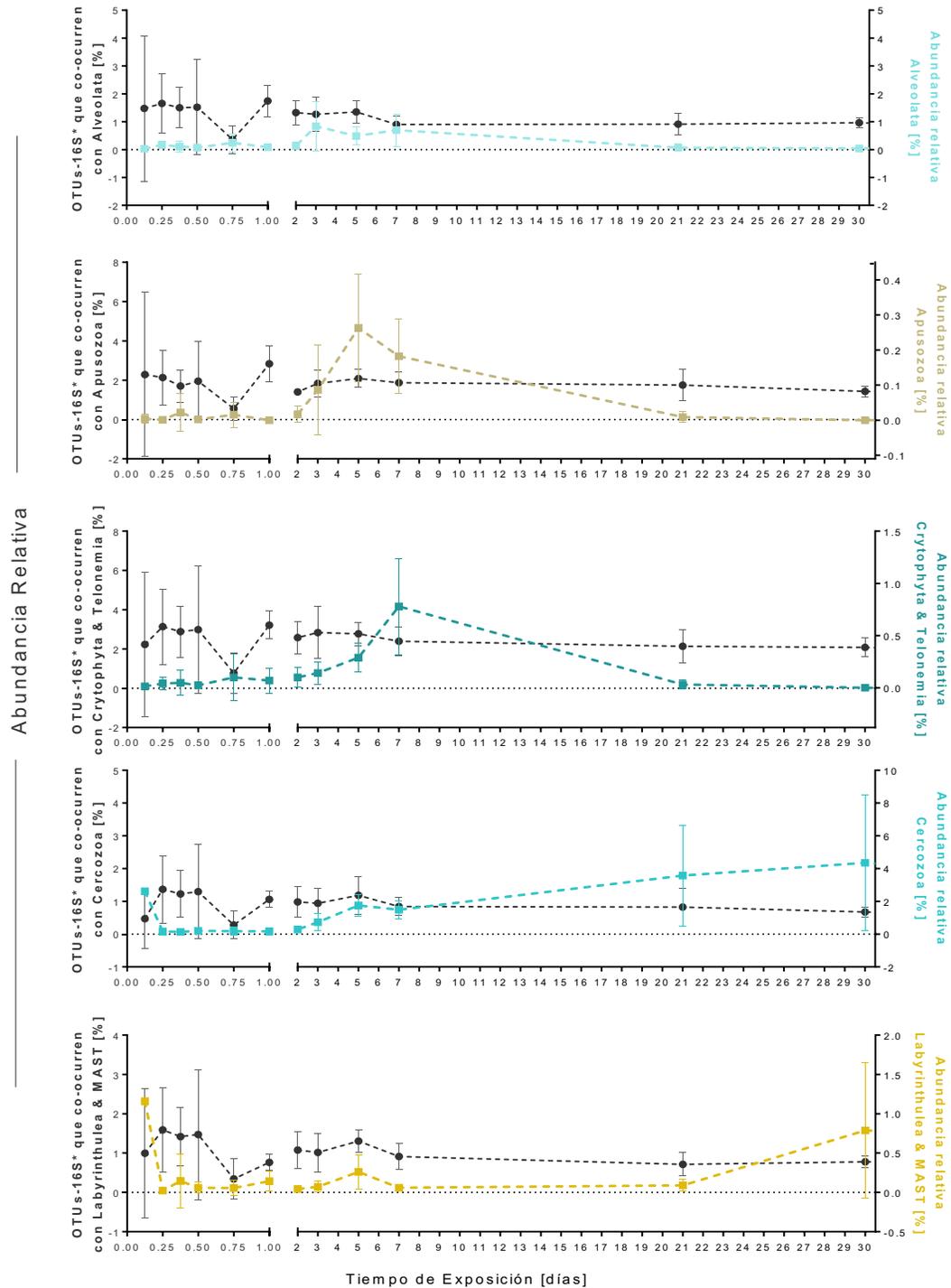


Figura 22. Dinámica de interacciones con eucariontes heterótrofos en la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable. En cada gráfico se muestra la abundancia relativa promedio de OTUs que co-ocurrieron con un grupo específico de eucariontes heterótrofos (eje vertical izquierdo), junto a la abundancia relativa del respectivo grupo eucarionte con el que interactuó (eje vertical derecho). (*) OTUs definidas en base a secuencias obtenidas del gen 16S rRNA. Se indica la desviación estándar de cada punto, excepto para el primer punto de la dinámica de Labyrinthulea y MAST, debido a que impedía la visualización de los cambios en su abundancia ($\pm 3.99\%$).

Tabla N°6. Principales contribuciones de taxa en las interacciones establecidas con eucariontes heterótrofos durante 30 días.

Asignación de OTU Taxonomía - Género	Alveolata		Apusozoa		Cryptophyta & Telonemia		Cercozoa		Labyrinthylea & MAST	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Spongiispira</i>	59	9.5	24	6.9	37	13.4	71	8.2	16	4.7
Flavobacteriaceae_unclassified	37	6	28	8.1	19	6.9	64	7.4	26	7.6
Rhodobacteraceae_unclassified	38	6.1	24	6.9	18	6.5	53	6.1	25	7.3
<i>Pseudoalteromonas</i>	30	4.8	15	4.3	12	4.3	34	3.9	13	3.8
<i>Cobwellia</i>	27	4.4	17	4.9	2	0.7	34	3.9	6	1.7
<i>Oleispira</i>	25	4	8	2.3	12	4.3	30	3.5	10	2.9
Gammaproteobacteria_unclassified	21	3.4	15	4.3	6	2.2	32	3.7	12	3.5
<i>Oleiphilus</i>	23	3.7	11	3.2	8	2.9	28	3.2	12	3.5
Alteromonadaceae_unclassified	11	1.8	9	2.6	8	2.9	14	1.6	8	2.3
<i>Thalassotalea</i>	15	2.4	4	1.2	4	1.4	12	1.4	6	1.7
<i>Alteromonas</i>	14	2.3	5	1.4	4	1.4	18	2.1	9	2.6
<i>Tenacibaculum</i>	14	2.3	7	2	6	2.2	21	2.4	10	2.9
<i>Aliivibrio</i>	12	1.9	5	1.4	3	1.1	13	1.5	7	2
<i>Vibrio</i>	7	1.1	6	1.7	7	2.5	10	1.2	3	0.9
Proteobacteria_unclassified	12	1.9	5	1.4	2	0.7	13	1.5	7	2
Bacteroidetes_unclassified	6	1	7	2	3	1.1	22	2.5	3	0.9
<i>Amylibacter</i>	11	1.8	4	1.2	4	1.4	12	1.4	5	1.5
<i>Marinomonas</i>	10	1.6	5	1.4	6	2.2	14	1.6	2	0.6
<i>Balneola</i>	8	1.3	5	1.4	3	1.1	13	1.5	6	1.7
Unclassified	10	1.6	4	1.2	4	1.4	17	2	6	1.7
<i>Polaribacter</i>	9	1.5	4	1.2	5	1.8	8	0.9	7	2
Alphaproteobacteria_unclassified	8	1.3	5	1.4	3	1.1	16	1.8	7	2
Cellvibrionaceae_unclassified	8	1.3	7	2	4	1.4	10	1.2	5	1.5
<i>Litoribacillus</i>	8	1.3	3	0.9	4	1.4	12	1.4	2	0.6
<i>Sulfotobacter</i>	5	0.8	5	1.4	1	0.4	8	0.9	6	1.7
<i>Pseudomaricurvus</i>	7	1.1	3	0.9	4	1.4	7	0.8	4	1.2
Cyanobacteria_unclassified	4	0.6	2	0.6	6	2.2	8	0.9	4	1.2
Saprosiraceae_unclassified	4	0.6	3	0.9	3	1.1	16	1.8	3	0.9
<i>Blastopirellula</i>	4	0.6	2	0.6	1	0.4	4	0.5	5	1.5
<i>Planktomarina</i>	7	1.1	2	0.6	3	1.1	9	1	4	1.2

n: número de OTUs que interactúa con el eucarionte heterótrofo analizado asociado a ese género.

%: contribución del género al total de las interacciones de co-ocurrencia inferidas para el eucarionte heterótrofo.

5.4. Co-relacionar el desarrollo de corrosión sobre acero inoxidable con interacciones claves establecidas durante el desarrollo de la biopelícula microbiana.

5.4.1. Desarrollo de biocorrosión sobre acero inoxidable expuesto a agua de mar natural.

Para establecer el nivel de deterioro de las placas de acero inoxidable expuestas a agua de mar, se evaluó su pérdida de masa a lo largo del tiempo de exposición (ver sección Métodos 4.7).

Los valores promedio de pérdida de masa fluctuaron entre la pérdida mínima de $39,29 \pm 45,89$ mg cm⁻² (a los 2 días de exposición) y la pérdida máxima de $243,94 \pm 138,07$ mg cm⁻² (a los 30 días de exposición). La pérdida de masa presentó principalmente diferencias significativas entre las muestras de tiempos tempranos-medios y las de 30 y 112 días de exposición al comparar cada tiempo con una prueba de ANOVA de una vía (Figura 23). Estos resultados sugieren que el deterioro del acero inoxidable estuvo principalmente asociado a largos periodos de exposición.

Adicionalmente, se analizó el comportamiento electroquímico de la interface metal/biopelícula de las placas, a través de mediciones de potencial a circuito abierto (OCP) y curvas de polarización catódica y anódica. Se utilizó como referencia una placa de acero inoxidable 316L sin exponer a agua de mar (ver sección Métodos 4.8).

Los valores de OCP mostraron un desplazamiento en el potencial promedio de la superficie, respecto al potencial de la placa sin tratamiento, y alcanzó $228,5 \pm 27,7$ mV (vs Ag/AgCl) a los 7 días de exposición. No obstante, desde los 21 días se observó un desplazamiento progresivo hacia potenciales más negativos que se estabilizaron luego de 30 días de exposición. El período entre 30 y 112 días de exposición tuvo un potencial a circuito abierto promedio de $-224,5 \pm 12,4$ mV (vs Ag/AgCl) (Figura 24).

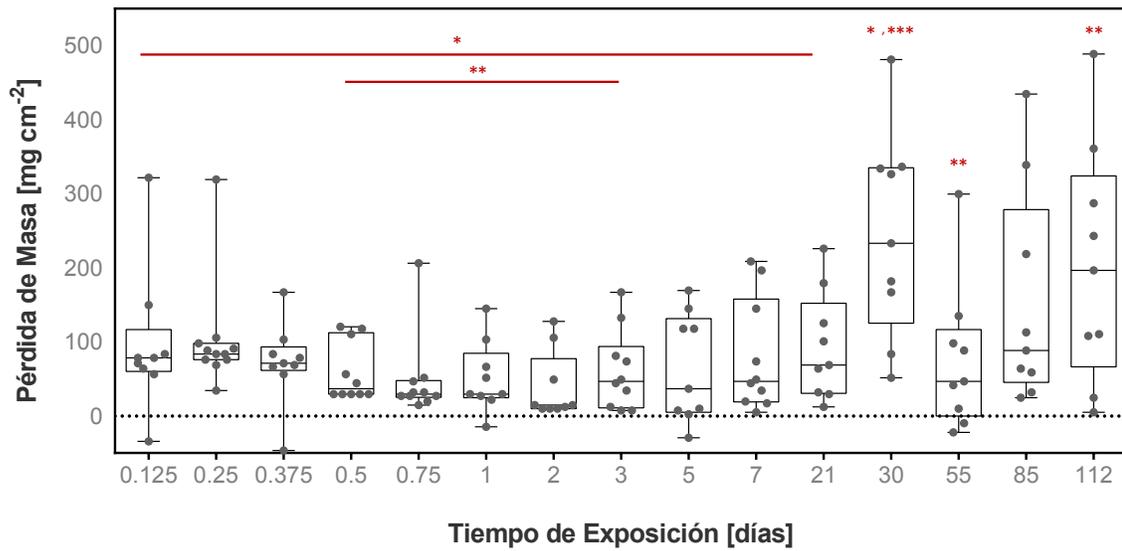


Figura 23. Deterioro del acero inoxidable 316L expuesto a agua de mar natural. Se muestra el promedio y la distribución de las mediciones realizadas por cada tiempo de exposición en círculos sólidos (●). Los valores de diferencia de masa fueron normalizados por la superficie expuesta de cada placa de acero inoxidable. Las parejas de asteriscos indican diferencia significativa entre esas muestras, de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía, $p < 0,05$.

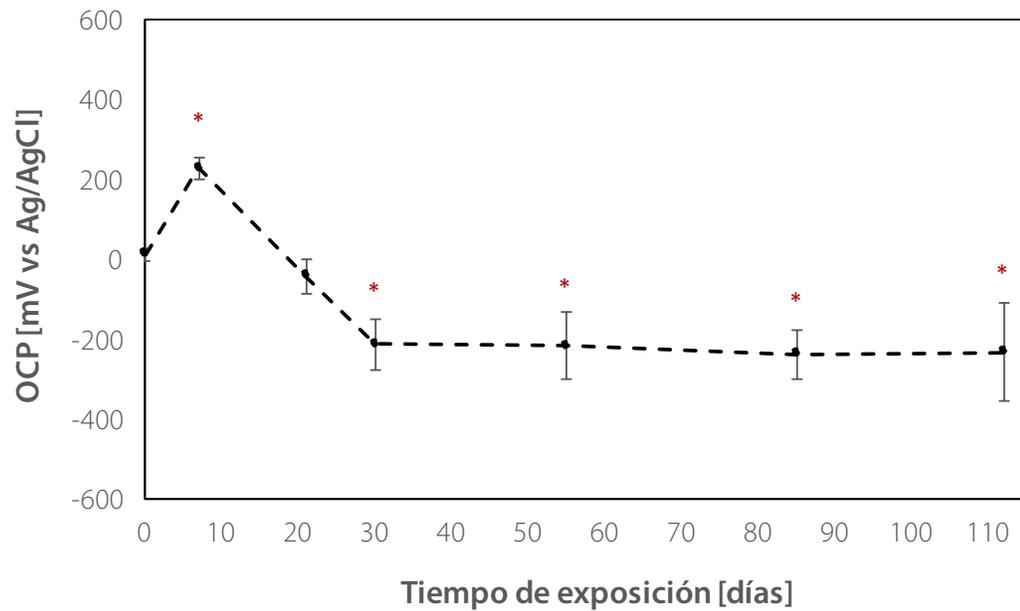


Figura 24. Dinámica del potencial a circuito abierto de placas de acero inoxidable expuestas a agua de mar natural. Valor promedio y desviación estándar de mediciones realizadas para cada tiempo de exposición. Los asteriscos indican diferencia significativa de esas muestras respecto al OCP de la placa sin exposición a agua de mar natural, de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía, $p < 0,05$.

A partir de las curvas de polarización potenciodinámicas, se analizó el comportamiento electroquímico de la placa durante el tiempo de exposición y se determinaron los valores de la corriente de corrosión. Los resultados obtenidos indican que durante la primera semana de exposición las placas fueron más susceptibles a corrosión por picadura, debido a que el potencial de su superficie ($0,23 \pm 0,03$ V vs Ag/AgCl) fue similar al potencial de picadura determinado en el acero inoxidable sin exponer ($\sim 0,22$ V vs Ag/AgCl). Sin embargo, luego de 30 días de exposición se observa un desplazamiento del potencial de corrosión (i.e. potencial en el cual se intersectan las curva anódica y catódica) hacia potenciales menos nobles, con un promedio de $-0,21 \pm 0,10$ V vs Ag/AgCl (Figura 25).

Adicionalmente, la corriente de corrosión a los 7 días de exposición fue de $102,68 \pm 24,07$ nA y mostró un aumento significativo de hasta dos órdenes de magnitud cuando se compara con la corriente de corrosión obtenida luego de 112 días de exposición que fue de $6911 \pm 4502,65$ nA. Estos datos, en conjunto, indican una activación de la superficie, asociada a un aumento en la transferencia de electrones (Figura 26).

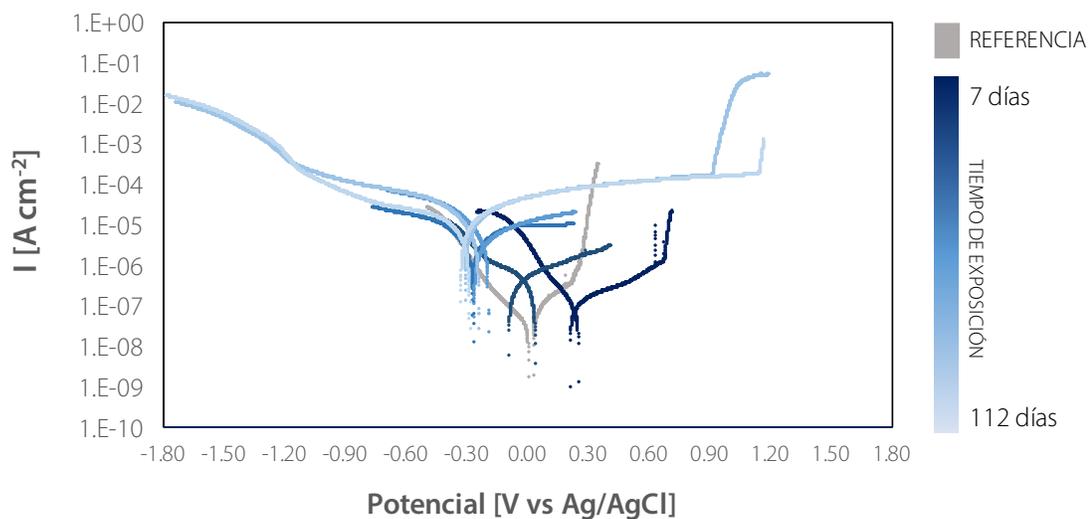


Figura 25. Comportamiento electroquímico de placas de acero inoxidable expuestas a agua de mar natural. Curvas de polarización potenciodinámicas representativas de cada tiempo de exposición. Las curvas fueron realizadas a una tasa de 0,5 mV/s comenzando desde el OCP, con mediciones independientes de la curva anódica y catódica. En gris, se muestra la referencia sin exponer a agua de mar natural. Las curvas de placas expuestas por distintos tiempos se muestran en una escala secuencial de color azul: donde el azul más intenso representa la curva de 7 días de exposición, y a medida que disminuye su intensidad aumenta el tiempo de exposición que representa cada curva, finalmente, la curva de azul más tenue representa la curva de 112 días.

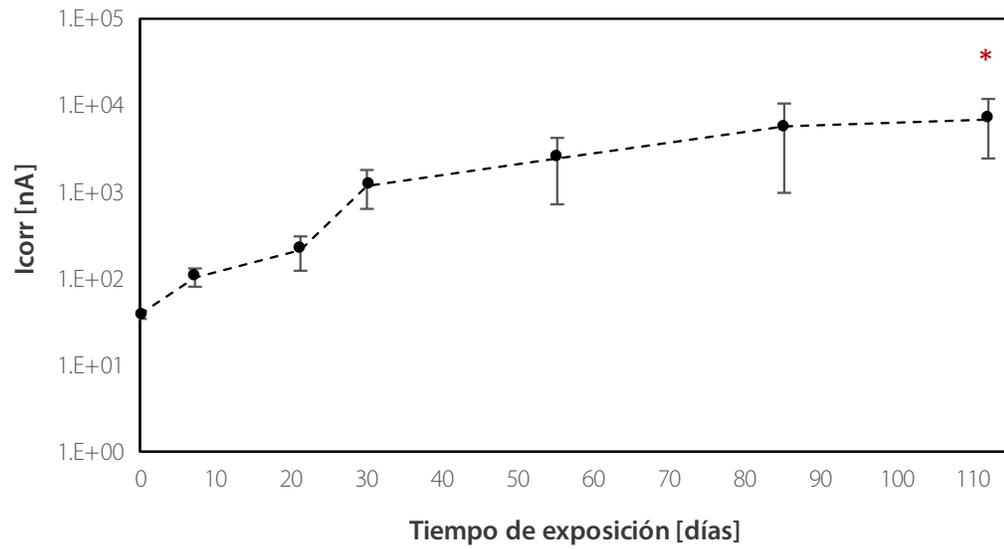


Figura 26. Dinámica de la corriente de corrosión de placas de acero inoxidable expuestas a agua de mar natural. Valor promedio y desviación estándar obtenidas a partir de las curvas potenciodinámicas realizadas para cada tiempo de exposición. El asterisco indica diferencia significativa de la muestra respecto a la placa sin exposición a agua de mar, de acuerdo a la prueba de ANOVA de una vía, $p < 0,05$.

5.4.2. Relación entre la presencia de microorganismos específicos y/o sus interacciones con el desarrollo de biocorrosión sobre acero inoxidable expuesto a agua de mar natural.

Para determinar la relación que hubo entre los cambios de la composición comunitaria y las interacciones de co-ocurrencia con el desarrollo de corrosión, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre ambas (ver sección Métodos 4.5.5). Se realizó una representación gráfica de las correlaciones significativas ($p \text{ value} < 0,5$), tanto positivas (entre 0 y 1) como negativas (entre 0 y -1) (Figura 27).

En el caso del OCP, se determinó una fuerte correlación negativa con la cobertura de la superficie y los cambios en la abundancia de Archaeplastida. Mientras que se encontró que su evolución en el tiempo presenta una correlación positiva con algunas propiedades de la red, la riqueza de la comunidad y la abundancia de los grupos microbianos Clostridia, Cyanobacteria, Apusozoa y Eukaryotes_unclassified.

La corriente de corrosión, por otro lado, mostró correlaciones significativas con un mayor número de los parámetros analizados. Dentro de ellos, destaca la correlación negativa con varios parámetros de las redes de co-ocurrencia (Largo de la vía característica, diámetro de la red, radio de la red, promedio de vecinos, entre otros), con indicadores ecológicos (diversidad y riqueza) y con los cambios de abundancia relativa de Rhizaria. Además, destaca la correlación positiva de la corriente de corrosión con la Equidad y con los grupos microbianos, Lentisphaeria y Archaeplastida.

Finalmente, para pérdida de peso, el análisis indicó que solo existe una correlación positiva significativa con la abundancia de Betaproteobacteria y Bacteroidetes_unclassified.

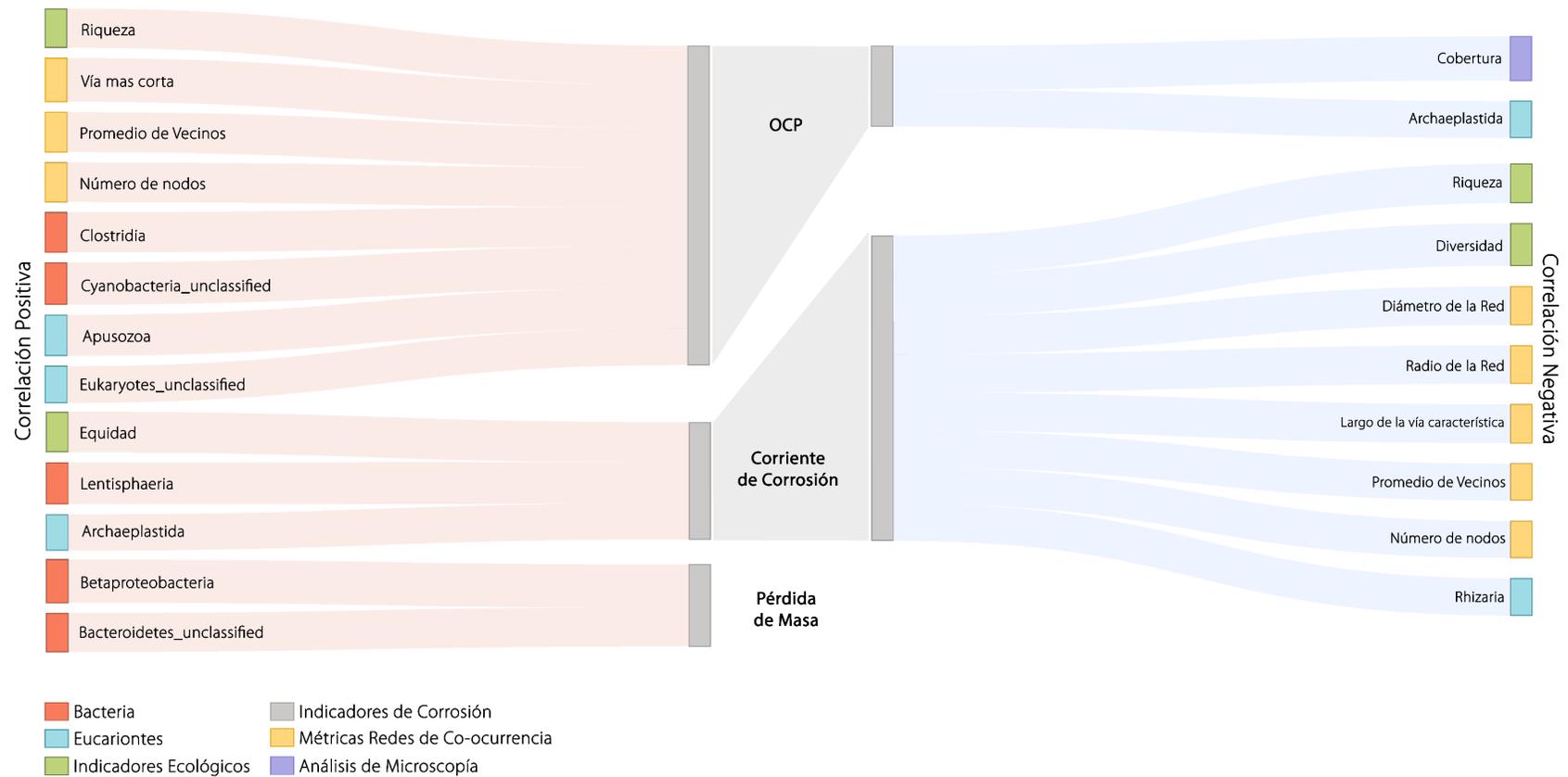


Figura 27. Correlación entre factores biológicos y el desarrollo de corrosión. Representación gráfica de los coeficientes de correlación de Pearson calculados entre la dinámica de bacterias, eucariontes, arqueas, indicadores ecológicos, métricas de las redes de co-ocurrencia, análisis microscópicos y los indicadores de corrosión, utilizando los datos de muestreos desde el día 7 a los 112 días de exposición. Se graficaron exclusivamente las correlaciones significativas ($p < 0,5$). Para cada factor biológico, el alto del recuadro está asociado al valor de su coeficiente de correlación.

6. DISCUSIÓN.

La biocorrosión marina es un fenómeno complejo asociado a una gran cantidad de reacciones simultáneas, tanto bióticas como abióticas (Coetser & Cloete, 2005). Entender cómo y cuándo ocurren estas reacciones ayudaría al desarrollo de técnicas eficientes de control y monitoreo de biocorrosión que sean inocuas para el medio ambiente (Kip & van Veen, 2015). Su estudio en esta tesis requirió de un trabajo interdisciplinario, que incorporó metodologías moleculares, electroquímicas, de microscopía e ingeniería, para el análisis de la ecología microbiana durante el desarrollo de biocorrosión en la superficie de acero inoxidable expuesto a agua de mar natural. En este trabajo, además, se caracterizó la comunidad microbiana incorporando de forma pionera a arqueas y piceucariontes en el estudio de biocorrosión, se infirió la co-ocurrencia de especies durante el ensamblaje de la biopelícula y se relacionó las potenciales interacciones ecológicas en la biopelícula (e.g. mutualismo, competencia, depredación) (Faust & Raes, 2012) con la presencia de microorganismos previamente relacionados con corrosión y el desarrollo de corrosión en el tiempo. Los resultados obtenidos sugieren que para entender el fenómeno de biocorrosión en ambientes naturales, es necesario analizar la biopelícula como una unidad biológica con potencial corrosivo, que depende de las interacciones ecológicas que se establezcan durante su ensamblaje, más que como el resultado de un grupo particular de microorganismos. Estos resultados sustentan las hipótesis planteadas en este trabajo, pero, además promueven la generación de nuevas interrogantes e hipótesis para ser abordadas en futuras investigaciones.

6.1. Nuevo modelo experimental permite la determinación de colonización primaria, sucesión e iniciación de biocorrosión en ambientes naturales costeros.

El estudio de la influencia de los colonizadores primarios e interacciones ecológicas sobre la estructura y composición de la biopelícula asociada a biocorrosión marina, requirió la caracterización de la colonización primaria de la superficie, de la posterior sucesión biológica y del desarrollo de corrosión en el tiempo. Estos fueron evaluados en un periodo de tiempo que permitiese el desarrollo de corrosión (Fischer *et al.*, 2016), que comprendió 112 días, divididos *a priori* para su análisis en tiempos de exposición tempranos (0-1 día), medios (2-7 días) y tardíos (21-112 días). Aun cuando esta parece una tarea sencilla, el estudio de biocorrosión en ambientes naturales presenta complicaciones imponderables, como, por ejemplo: pérdida de cupones en el mar por la corrosión desarrollada o incluso, pérdida total de los sistemas de exposición debido a marejadas o fuerte flujo de corrientes (Celikkol-Aydin *et al.*, 2016). Para lidiar con estas dificultades se han desarrollado modelos para su estudio en laboratorio utilizando agua de mar natural (Marty *et al.*, 2014; Fischer *et al.*, 2016). No obstante, los modelos publicados siguen presentando limitaciones, ya que no permiten realizar un experimento con el esfuerzo muestral necesario para hacerse cargo de la variabilidad de las comunidades microbianas ambientales. Es el caso de las sucesiones biológicas, ya que el número de placas necesarios para su análisis no tenía cabida en estos diseños. En esta tesis, la exposición simultánea de 96 placas metálicas a un flujo constante de agua de mar natural en cuatro acuarios en paralelo, permitió la caracterización de la biopelícula con una alta reproducibilidad. El nuevo diseño incluyó, además, el uso de flujo de agua paralelo a las placas, evitando el impacto directamente en su superficie principal. Por otro lado, si bien el nuevo modelo permitió minimizar la manipulación de las placas durante el muestreo, no fue diseñado para realizar muestreos dentro del agua del acuario. Por esta razón, la acumulación de bacterias de la interface

aire-agua (Vaccari *et al.*, 2017) puede haber sido recuperada como parte de la biopelícula formada sobre el metal. Sin embargo, si fue así, su abundancia no fue suficiente para interferir en los resultados, ya que los análisis comunitarios de similitud mostraron que la comunidad microbiana asociada a las placas fue distinta a la encontrada en el agua del acuario durante todo el transcurso del experimento (Figura 16).

Las placas obtenidas en cada muestreo permitieron la caracterización integral de la biopelícula, utilizando algunas de las técnicas previamente descritas para el estudio de su relación con corrosión (Beech, 2004). Además, permitió determinar la distribución espacial de los microorganismos en la superficie de la placa y su composición microbiana, a través de la incorporación de sus características macroscópicas (Figura 4), microscópicas (Figura 5) y la identificación de los microorganismos que la constituyen a través de análisis moleculares (Figura 11 & 13). Este tipo de análisis resulta difícil de acoplar con análisis de deterioro y corrosión de las superficies metálicas sin aumentar mucho el número de placas necesarias, debido a que algunos de los análisis realizados para determinar corrosión son de carácter destructivo (Yang, 2008). Por ello, una vez removida la biopelícula para análisis moleculares, las placas se re-utilizaron para determinar su pérdida de peso, permitiendo destinar suficientes placas exclusivamente a análisis de corrosión. Se realizaron dos tipos de mediciones electroquímicas para determinar corrosión, OCP y curvas de polarización potenciodinámicas, cuyos resultados permitieron asociar el inicio de corrosión por picadura a la primera semana de exposición en las placas, período en el cual los potenciales de corrosión fueron similares a los reportados en otros sistemas con agua de mar natural (Dexter & Gao, 1988; Matilla *et al.*, 1997; Little *et al.*, 2008). Además, el modelo experimental permitió el análisis de los cambios que tuvo el comportamiento electroquímico durante tiempos tardíos (Figura 24), cuya dinámica si bien se condice con la variabilidad del OCP en agua de mar natural para este tipo de acero

(Videla, 1994), no fue el típico descrito para acero inoxidable expuesto a ambientes marinos, donde regularmente se presenta ennoblecimiento de la superficie (Féron & Dupont, 1998). No obstante, todas las mediciones fueron realizadas post-muestreo y esto genera una subestimación de la variabilidad del OCP, ya que se tienen solo puntos acotados. En consideración de esto, es que la incorporación de una medición constante in situ de los cambios electroquímicos serían un excelente complemento para el monitoreo del desarrollo de corrosión de este modelo.

6.2. Colonización primaria de la superficie y su relación con el asentamiento de eucariontes fotosintéticos asociados a corrosión.

La caracterización de la distribución espacial de los microorganismos en la superficie de la placa durante la sucesión biológica, pero principalmente durante los tiempos tempranos y medios de exposición, mostró que el asentamiento de los colonizadores primarios se produjo en las zonas del metal con mayor irregularidad e imperfecciones (Figura 5-7). Es común encontrar bacterias asociadas a superficies colonizando depresiones/imperfecciones en la superficie de partículas en ambientes naturales (Geesey & Costerton, 1979). Pero, además, este fenómeno ha sido descrito en acero inoxidable 304L y 316L (sin pulir) al ser expuesto a medio de cultivo y bacterias aisladas, donde su localización resultó estar alineada con los límites de los granos de la aleación del metal en la superficie de la capa de óxido, sugiriendo que la colonización inicial no es azarosa y que además habría una selectividad por estas áreas del grano (Geesey *et al.*, 1996; Sreekumari *et al.*, 2001). Este tipo de localización se observó al exponer acero inoxidable 316L, aun cuando se encontraba lijado (ver sección Métodos 4.2). El tipo de tratamiento utilizado mantuvo estas zonas de imperfecciones, y los resultados indican que el proceso de colonización selectiva también tendría lugar al exponer este material a agua de mar natural (Figura 7B). Se observó, además, que el asentamiento inicial de diatomeas, en este experimento

tuvo una distribución en parches similar a la descrita por Acuña *et al.* (2006) y estuvo principalmente asociada a las zonas precolonizadas del material con mayor deposición de sustancias EPS-*like* (Figura 7C). Esta asociación es particularmente de interés, ya que se han propuesto mecanismos a través de los cuales las diatomeas podrían participar en el desarrollo de corrosión en ambientes marinos. Uno de los mecanismos propone que la producción de oxígeno originaría un aumento en su disponibilidad como aceptor final de electrones, por ejemplo, durante la oxidación de moléculas orgánicas por otros microorganismos. La reducción del oxígeno conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las que han sido asociados con biocorrosión debido a que su reactividad es mayor a la del oxígeno por sí solo (Landoulsi *et al.*, 2011). En particular, se ha visto que, en biopelículas nativas marinas, el H_2O_2 en presencia de bacterias manganeso oxidantes puede ser aprovechado como agente oxidante que favorece la oxidación de manganeso (Nealson, 2006; Andeer *et al.*, 2015) y, por otro lado, que puede tener un rol directo en el ennoblecimiento del OCP de acero inoxidable expuesto a agua de mar (Dupont *et al.*, 1998; Geiser *et al.*, 2002; Washizu *et al.*, 2003). Los datos obtenidos en esta tesis muestran que la producción de oxígeno podría haber contribuido al ennoblecimiento inicial del material, a través de la presencia de cianobacterias que favorecieran la producción indirecta de especies reactivas de oxígeno durante la primera semana de exposición. Pero, además, se determinó que existe una correlación negativa entre el cambio del potencial a circuito abierto y otros dos factores asociados a la producción de oxígeno: la presencia de Archaeplastida (eucariontes fotosintéticos) y la cobertura del metal, asociada principalmente a la biomasa de diatomeas en la superficie (Figura 27); sugiriendo que a su vez podría estar contribuyendo a la activación del metal.

Esto apoya una de las hipótesis de esta tesis, en la cual se planteó que “[...] los colonizadores primarios de la superficie son determinantes para el establecimiento de especies microbianas

previamente relacionadas con corrosión”. No obstante, los mecanismos involucrados en este proceso requieren ser evaluados en futuros trabajos de investigación y es una de las aristas que abre este proyecto de tesis al incorporar a los picoeucariontes en el análisis de biocorrosión.

6.3. Colonización primaria de acero inoxidable expuesto a agua de mar natural.

La composición comunitaria de la biopelícula formada sobre las placas de acero inoxidable 316L durante los tiempos tempranos de muestreo, es decir, durante el primer día de colonización de la placa, fue dominada por Gammaproteobacteria (Figura 11). Este tipo de bacterias han sido descritos anteriormente como uno de los principales colonizadores primarios de superficies de acero en ambientes marinos, junto con miembros de Alphaproteobacteria (Lee *et al.*, 2008; Rampadarath *et al.*, 2017; Pollet *et al.*, 2018). No obstante, se han descrito diferencias en la temporalidad de su dominancia a medida que se desarrolla la sucesión biológica. En el caso de Lee *et al.* (2008), observaron que Gammaproteobacteria domina en la biopelícula formada sobre acero en ambientes marinos durante las primeras 0-9 horas de exposición. Mientras que Pollet *et al.* (2018), determinaron que la prevalencia de Gammaproteobacteria como grupo dominante podría extenderse más allá de las primeras 24 horas de exposición y plantean que estas diferencias temporales podrían estar asociada a las características del material artificial expuesto. Este es el caso de la biopelícula desarrollada sobre acero inoxidable en la costa central de Chile, donde observamos que este grupo bacteriano sería dominante no solo en abundancia (Figura 11), sino también en conectividad en las redes de co-ocurrencia inferidas *in silico* (Figura 21).

Por otro lado, observamos que la colonización primaria de la superficie de acero inoxidable no fue exclusivamente realizada por bacterias, sino que hubo una contribución del componente eucarionte y de arqueas desde el primer día de exposición (Figura 11 & 13). Tradicionalmente

se ha descrito que el proceso de colonización primaria de una superficie está dominado principalmente por bacterias durante el primer día de exposición, y es seguido por hongos, diatomeas, otras microalgas y larvas de invertebrados durante el transcurso de la primera semana y en adelante (Lappin-Scott & Costerton, 1989; Scotto & Lai, 1998; Qian *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos autores sugieren ser cuidadosos con la generalización de esta relación, ya que no siempre esta debe ser secuencial (Cooksey, 1981; Dang & Lovell, 2000; Landoulsi *et al.*, 2011; Qian & Xu, 2012). Estudios realizados en el mar Báltico, sobre la biopelícula asociada al ennoblecimiento del acero inoxidable 316L, mostraron que la biopelícula estaba constituida principalmente por bacterias, y algunas veces observaron también restos de diatomeas. Sin embargo, no observaron presencia de hongos ni eucariontes heterótrofos durante el primer día de exposición (Mattila *et al.*, 1997). La exposición inicial de este mismo material en la costa central de Chile, resultó en una comunidad cuyo componente eucarionte estuvo dominado por miembros de los grupos Opisthokonta y Archaeplastida (Figura 13). Entre ellos, la presencia de algunos eucariontes productores de ácido (*Verticillium*, *Rhynosporidae* y *Chytridiomycetes*), fotosintéticos (Prasinoderma, Oltmannsiellopsis) y heterótrofos (Picozoa, Spirotrichea) (Figura 18), podría influenciar de forma directa el asentamiento de bacterias previamente relacionadas con corrosión como se plantea en la Hipótesis #1 de este trabajo, a través de la modificación del microambiente de la biopelícula por producción de ácido (Marshall & Bowden, 2000; Magnuson & Lasure, 2004; Akintokun *et al.*, 2007; Liaud *et al.*, 2014) y/o de su composición a través de interacciones ecológicas que influyen la permanencia de especies corrosivas en la biopelícula. Investigaciones focalizadas en estos aspectos podrían ser un gran aporte para entender el rol de distintos tipos de eucariontes microbianos como colonizadores primarios, en el asentamiento de bacterias asociadas a corrosión, en el ensamblaje de la comunidad y en las

interacciones ecológicas que puedan influenciar la composición comunitaria con repercusiones en el desarrollo de corrosión en el tiempo.

6.4. Escasa detección de bacterias sulfato reductoras durante el tiempo de exposición analizado.

La presencia de Deltaproteobacteria, grupo al que se asocian la mayoría de las bacterias sulfato reductoras (SRB) descritas, fue escasamente detectado en la biopelícula, con un máximo durante los tiempos tardíos de exposición (abundancia relativa de $0,31 \pm 0,63\%$). Estos resultados son similares a lo descrito en biopelículas formadas sobre acero al carbón en ambientes marinos costeros, donde se determinó una abundancia relativa SRB que no sobrepasó el 0,4% durante 35 días (Celikkol-Aydin *et al.*, 2016) y su presencia fue indetectable incluso en análisis realizados a una biopelícula formada por ~84 días (López *et al.*, 2006). No obstante, se ha descrito que luego de 8 meses de exposición, SRB domina en una biopelícula corrosiva formada sobre este material (44%) (Bermont-Bouis *et al.*, 2007). Al analizar depósitos de corrosión de mayor antigüedad se ha observado que su dominancia se mantiene y puede llegar a alcanzar el 98% de la abundancia relativa bacteriana en capas interiores de superficies corroídas (Païssé *et al.*, 2013). Dependiendo del tiempo evaluado, la biopelícula tendrá distintos niveles de grosor y, por lo tanto, la formación de microambientes anóxicos que permitan el crecimiento de SRB podría ser mas probable en biopelículas con mayor biomasa. Esta disminución en la difusión del oxígeno ha sido descrita para casos como el de colonias bacterianas (Peters *et al.*, 1987). No obstante, el desarrollo de un ambiente anóxico no aseguraría un aumento de su abundancia en sistemas naturales, debido a la presencia de posibles antagonistas de SRB. Entre ellos encontramos a taxa descritas como bacterias nitrato reductoras – sulfuro oxidantes (so-NRB), presentes exclusivamente durante los tiempos de exposición tempranos y medios

(*Parabacteroides* sp., *Dasania* sp.) (Tabla 4), que pueden provocar una exclusión competitiva a través de la producción de nitrito, inhibiendo la enzima *Dsr*, resultando letal para SRB (Sandbeck & Hitzman, 1995). Durante tiempos tardíos, además, se observó un aumento en la abundancia de otros posibles competidores. La presencia de Bacilli, Clostridia y Chlorobia durante esos tiempos (Figura 11), pudo haber contrarrestado los dos mecanismos asociados a biocorrosión descritos para SRB (Cord-Ruwisch *et al.*, 1987; Boopathy & Daniels, 1991; Little *et al.*, 1992): *Clostridium* reduce la utilización catódica de hidrógeno de las SRB mientras *Chlorobium* remueve el sulfuro de hidrógeno del ánodo (Zhang & Fang, 2001). A pesar de la exclusión de SRB, sus competidores NRB también podrían contribuir al deterioro del material (Ornek *et al.*, 2002; Zuo & Wood, 2004; Xu *et al.*, 2013). Esto sugiere que la competencia entre estas especies en la biopelícula limitó la abundancia de SRB y permitió la proliferación de NRB durante el periodo evaluado, apoyando una de las hipótesis de este trabajo (ver Hipótesis #2), que plantea que las interacciones ecológicas que se establecen entre microorganismos determinan la estructura y composición de la comunidad microbiana asociada a la inducción de corrosión.

6.5. La presencia de bacterias y eucariontes productores de ácido durante la primera semana de exposición favorece el desarrollo de corrosión y explica el posterior cambio en el OCP.

Durante la primera semana de exposición a agua de mar natural, la superficie de las placas presentó un aumento en el potencial de corrosión (+200 mV respecto al OCP inicial, ennoblecimiento), que luego disminuyó progresivamente hasta estabilizarse alrededor de -200 mV vs Ag/AgCl durante los 30 y 112 días de exposición (Figura 24-25). Para explicar el ennoblecimiento, y la mayor susceptibilidad a corrosión por picadura en las placas que éste

provoca, se presentó anteriormente como hipótesis que el aumento de potencial estaría asociado a la presencia de bacterias y eucariontes fotosintéticos en la superficie de la placa durante los tiempos tempranos de exposición. No obstante, esto no explica los cambios electroquímicos que se producen después de la primera semana de exposición. Little *et al.* (1991), describieron que ante circunstancias de acidez localizada el potencial de corrosión se desplaza hacia valores negativos, como en este caso. Además, se observó que la dinámica de la abundancia, tanto de bacterias como eucariontes productores de ácido (i.e. Clostridia, Opisthokonta, respectivamente) se correlaciona con la del comportamiento electroquímico de la placa (Figura 27) e indica que podrían haber contribuido a una producción y subsecuente acumulación de ácido durante periodos tempranos y medios de formación de la biopelícula. El desarrollo de un microambiente con pH más ácido puede estar asociado al desplazamiento de grupos en el componente bacteriano, ya que estas condiciones favorecen el crecimiento de Alphaproteobacteria por sobre Gammaproteobacteria (Figura 11) (Ray *et al.*, 2012; Siu, 2013). Tanto en el caso del pH como del oxígeno disuelto, la presencia de grupos bacterianos acidófilos o anaerobios es de utilidad como posible proxy de ambientes acídicos o anóxicos respectivamente, dada la falta de mediciones en la interfase biopelícula-metal. De acuerdo con estos antecedentes y basados en los resultados obtenidos, formulamos una nueva hipótesis donde se plantea que la modificación del microambiente, a través de la producción biológica de ácido, provoca cambios en la composición comunitaria y en el comportamiento electroquímico que experimenta la superficie durante tiempos tardíos de exposición. Futuras exploraciones *in vitro* con microorganismos aislados podrían ayudar a dilucidar si este es uno de los mecanismos de biocorrosión que favorece la activación de la superficie (i.e. potencial negativo en conjunto con aumentos en la corriente de corrosión) al ser expuesta en ambientes marinos.

6.6. Los cambios comunitarios y electroquímicos durante tiempos tardíos están asociados a la co-ocurrencia entre eucariontes heterótrofos y bacterias.

Durante el proceso de formación de la biopelícula, hubo OTUs que estuvieron presente en todos los tiempos de exposición. Al analizar la distribución de su abundancia se observaron variaciones drásticas en el tiempo de uno de los clústeres encontrados luego de 7 días de exposición. Se observó una disminución en la abundancia de los grupos bacterianos *Spongiispira*, *Oleispira* y *Marinomonas*, pero además en la abundancia de eucariontes heterótrofos de los grupos Alveolata y Hacrobia (Figura 17-18). Estos eventos simultáneos, en conjunto con la correlación positiva observada entre las métricas de las redes de co-ocurrencia y los cambios electroquímicos, sugieren que los cambios comunitarios y electroquímicos que tienen lugar luego de 7 días de exposición, podrían ser resultado del máximo de conectividad alcanzado en ese tiempo con el componente eucarionte (Figura 21j, en verde). Entre estos eucariontes, se encuentra un gran número de OTUs asociadas a taxa eucariontes heterótrofos. Este grupo no es una población definida de eucariontes sino más bien un gremio de microorganismos que podrían estar compitiendo por el mismo recurso, en este caso bacterias. Al analizar sus dinámicas de abundancia y la de las respectivas OTUs con las que co-ocurren (Figura 22), se observó una similitud con las descritas para interacciones del tipo depredador-presa intragremial (Holt & Polis, 1997), sugiriendo que este tipo de interacción ecológica podría estar asociada a los cambios composicionales debido a que estuvieron mayoritariamente asociadas a la co-ocurrencia de todos los grupos eucariontes analizados con *Spongiispira* (Tabla N°6), género del grupo de Gammaproteobacteria, descrito como aerobio y quimioheterótrofo (Satomi & Fujii, 2014), pero cuya disminución en abundancia fue uno de los principales contribuidores a la disimilitud de la comunidad de los tiempos con mayor susceptibilidad a corrosión por picadura (tiempos medios) y los que presentan una corrosión uniforme (tiempos

tardíos) en este estudio. Este tipo de regulación de abundancia ha sido observado antes, donde los depredadores actúan como niveladores de los miembros de la biopelícula a través de su continua alimentación basada en bacterias, algas y otras partículas orgánicas (Scotto & Lai, 1998). Si bien esto sugiere que *Spongiispira* podría haber tenido un rol clave en el ennoblecimiento observado durante la primera semana, no hay estudios previos que lo vinculen directamente con el desarrollo de biocorrosión ni con su inhibición. Futuros estudios utilizando cultivos puros podrían esclarecer su rol en la formación de la biopelícula y la corrosión del acero inoxidable. Los grupos eucariontes cuyos cambios en abundancia tuvieron similitudes con dinámicas depredador-presa también se encontraron asociadas a la co-ocurrencia con bacterias nitrato reductoras del grupo Gammaproteobacteria: *Oleispira*, *Colwellia* y *Oleiphilus* (Tabla N°6). Se ha descrito una vinculación directa de este tipo de microorganismos con la degradación del acero inoxidable (Xu *et al.*, 2013), por lo cual una disminución en su abundancia durante los tiempos tardíos de exposición, puede haber enlentecido el desarrollo de picadura.

La posible influencia de las interacciones ecológicas en el desarrollo de biocorrosión es uno de los aspectos que destaca en los resultados de esta tesis, y que hasta ahora había sido pasado por alto. Las redes de co-ocurrencia inferidas se asocian con cambios composicionales de la biopelícula y se correlacionan con los cambios en el desarrollo de corrosión, por lo que se propone incorporar el análisis de interacciones ecológicas en los nuevos estudios de este fenómeno y estudiar su relación con la activación de la superficie y disminución en la tasa de corrosión en ambientes naturales.

Como ha quedado patente, una biopelícula marina formada sobre acero inoxidable es una comunidad mixta y compleja, donde los fenómenos electroquímicos observados pueden estar

ligados a distintos mecanismos trabajando de forma paralela. Si bien se han realizado grandes avances en torno a cómo los factores abióticos influyen el desarrollo de corrosión, este trabajo es uno de los pioneros en incorporar series de tiempo y el estudio conjunto de bacterias, arqueas y eucariontes microbianos para entender la influencia de los factores bióticos en el desarrollo de biocorrosión marina en ambientes naturales. Se identificaron microorganismos clave en el desarrollo de la sucesión biológica, el efecto de potenciales interacciones ecológicas, y se discutieron sus implicancias para la corrosión del acero inoxidable. Estos resultados mostraron que el estudio del fenómeno de biocorrosión marina necesita ser abordado de manera holística, dado que las interacciones ecológicas que estén teniendo lugar nos permitirán establecer una correlación con el potencial corrosivo de la biopelícula y en definitiva, mejorar las predicciones sobre la viabilidad y vida útil del acero inoxidable en ambientes naturales. Finalmente, los resultados han confluído en un modelo conceptual (Figura 28), y en la formulación de nuevas hipótesis, que se espera nos ayuden en el futuro a dilucidar el acoplamiento de los distintos mecanismos durante el desarrollo de biocorrosión marina en la costa central de Chile.

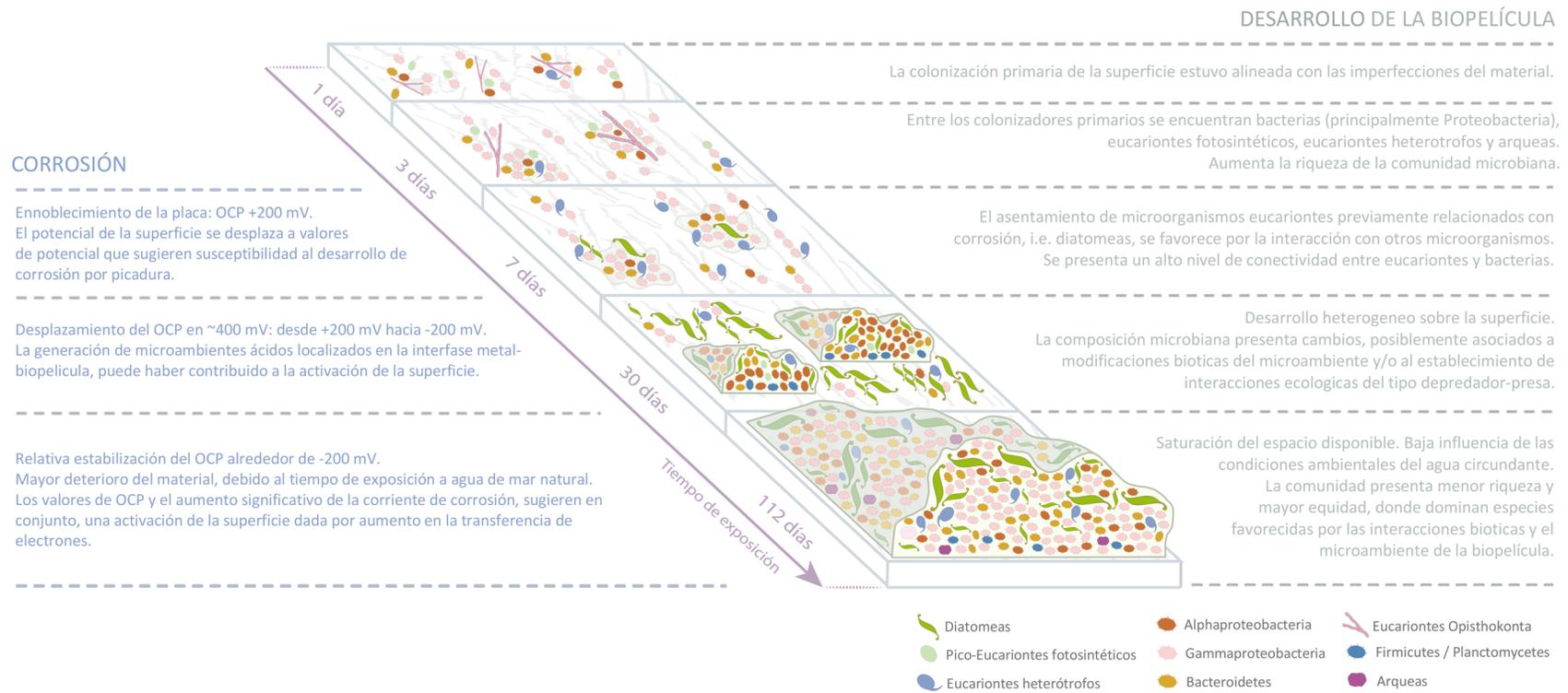


Figura 28. Modelo conceptual del desarrollo de una biopelícula corrosiva en la costa central de Chile. Representación visual del modelo conceptual de la colonización de la superficie de acero inoxidable 316L y los principales resultados obtenidos en torno al desarrollo de la biopelícula y corrosión durante los distintos tiempos de exposición a agua de mar natural.

7. CONCLUSIONES.

En este trabajo se determinaron procesos claves en el ensamblaje de una biopelícula sobre acero inoxidable en ambientes marinos, y a partir de los resultados obtenidos se concluye que:

- ☞ El modelo experimental utilizado permite la caracterización integral de la colonización primaria, la sucesión microbiológica y, la iniciación y desarrollo de biocorrosión durante su exposición a agua de mar natural.
- ☞ La colonización primaria del acero inoxidable no está constituida exclusivamente por bacterias, sino que también cuenta con la participación de arqueas y eucariontes fotosintéticos y heterótrofos.
- ☞ La asociación con colonizadores primarios favorece el asentamiento de eucariontes fotosintéticos previamente relacionados con corrosión, i.e. diatomeas.
- ☞ La baja abundancia de bacterias sulfato reductoras, se produce en un microambiente que permite el crecimiento de bacterias anaeróbicas que pueden actuar como antagonistas durante el desarrollo de la biopelícula en sistemas naturales.
- ☞ Los cambios composicionales de la biopelícula, asociados al desarrollo de corrosión uniforme de la superficie del metal podrían ser explicados por potenciales interacciones ecológicas del tipo depredador-presa entre eucariontes heterótrofos y bacterias.

Finalmente, se concluye que los colonizadores primarios y las interacciones ecológicas establecidas en la biopelícula microbiana formada sobre acero inoxidable expuesto a agua de mar natural, tienen una influencia indirecta en el desarrollo de corrosión a través de la facilitación, remoción y/o inhibición de especies previamente relacionadas con corrosión.

APÉNDICE F

Tabla S1. Cuadro resumen de datos de secuenciación masiva por Illumina.

Gen 16S rRNA - V4-V5: Bacterias/Arqueas	
Muestras Secuenciadas	225 (180 Biopelícula + 45 Agua de Mar)
Buen Profundidad de Secuenciación	170 (131 Biopelícula + 39 Agua de Mar)
Largo del Amplicon	301 pb
Número de OTUs Total / Filtradas	29.555 / 6.101
Total <i>reads Raw</i> / Filtrada Tabla OTUs	3.850.003 / 3.778.334
Gen 18S rRNA – V4: Eucariontes	
Muestras Secuenciadas	225 (180 Biopelícula + 45 Agua de Mar)
Buena Profundidad de Secuenciación	117 (84 Biopelícula + 33 Agua de Mar)
Largo del Amplicon	301 pb
Número de OTUs Total / Filtradas	8.197 / 4.438
Total <i>reads Raw</i> / Filtrada Tabla OTUs	1.533.831 / 1.520.752

Tabla S2. Parámetros ambientales del agua de mar natural de los acuarios durante los 112 días de exposición.

Parámetros Ambientales del Agua del Acuario						
Fecha	Tiempo de Exposición [días]	Muestreo	pH	OD [mg/L]	Conductividad [mS/cm]	Temperatura [°C]
11/11/2015 00:00	0	0	-	9.57	56.4	15.15
11/11/2015 15:00	0.125	1	-	9.83	55.3	15.4
11/11/2015 18:00	0.25	2	-	9.65	55.2	15.9
11/11/2015 21:00	0.375	3	-	9.43	55	16
12/11/2015 00:00	0.5	4	8.18	9.59	54.8	15.2
12/11/2015 06:00	0.75	5	8.21	9.69	55.6	14.3
12/11/2015 11:17	1	6	8.25	9.89	55.8	15.3
13/11/2015 12:00	2	7	8.14	9.69	57.6	15.0
14/11/2015 12:15	3	8	8	10.1	55.3	14.3
16/11/2015 12:00	5	9	8.16	9.74	55.5	15.1
18/11/2015 12:00	7	10	8.09	10.69	55.3	13.5
02/12/2015 16:00	21	11	8.13	10	55.0	16.1
11/12/2015 13:00	30	12	8.28	9.9	54.1	16.2
05/01/2016 12:50	55	13	8.46	9.165	54.9	17.1
03/02/2016 13:00	85	14	8.07	9.35	47.1	18.6
01/03/2016 13:00	112	15	-	10.174	52.8	16.3

Tabla S3. Concentración de los nutrientes principales del agua de mar natural de los acuarios durante los 112 días de exposición.

Concentración de Nutrientes Principales [μmol/L]						
Fecha	Tiempo de Exposición [días]	Muestreo	Nitrito	Fosfato	Silicato	Nitratos
11/11/2015 15:00	0.125	1	0.650	1.682	9.453	19.647
11/11/2015 18:00	0.25	2	0.797	1.552	9.900	18.724
11/11/2015 21:00	0.375	3	0.950	1.312	10.140	18.322
12/11/2015 00:00	0.5	4	0.996	1.696	12.823	23.485
12/11/2015 06:00	0.75	5	1.068	1.707	11.963	22.915
12/11/2015 11:17	1	6	0.733	1.678	10.497	20.268
13/11/2015 12:00	2	7	0.770	1.768	12.241	21.870
14/11/2015 12:15	3	8	0.708	1.768	13.526	22.471
16/11/2015 12:00	5	9	0.642	2.241	17.164	26.647
18/11/2015 12:00	7	10	0.521	2.178	18.035	25.707
02/12/2015 16:00	21	11	2.180	1.876	9.432	15.487
11/12/2015 13:00	30	12	10.656	1.031	3.944	16.173
05/01/2016 12:50	55	13	2.811	1.017	3.008	5.881
03/02/2016 13:00	85	14	1.296	1.001	5.186	9.954
01/03/2016 13:00	112	15	4.400	1.334	4.547	18.104

Tabla S4. Concentración de metales en el agua de mar natural de los acuarios durante los 112 días de exposición.

Concentración de Metales [µg / L (PPB)]												
Fecha	Tiempo de Exposición [días]	Muestreo	Ag	Cd	Co	Cu	Fe	Mo	Ni	Pb	V	Zn
11/11/2015 15:00	0.125	1	< 0.1	< 0.05	< 0.1	0.25000	1.01458	4.00900	0.12220	< 0.1	0.96390	0.81000
11/11/2015 18:00	0.25	2	< 0.1	< 0.05	< 0.1	0.39779	11.20347	9.18009	0.37794	< 0.1	1.64605	3.79722
11/11/2015 21:00	0.375	3	< 0.1	< 0.05	< 0.1	0.40553	4.46736	9.74382	0.34063	< 0.1	1.81430	3.02161
12/11/2015 00:00	0.5	4	< 0.1	< 0.05	< 0.1	0.42076	3.97235	8.89814	0.29420	< 0.1	1.65908	0.99854
12/11/2015 06:00	0.75	5	< 0.1	0.05433	< 0.1	0.32865	2.29996	9.20067	0.40935	< 0.1	1.66736	0.28457
12/11/2015 11:17	1	6	< 0.1	0.05179	< 0.1	0.35068	1.34136	10.28268	0.37601	< 0.1	1.86382	1.93598
13/11/2015 12:00	2	7	< 0.1	0.05890	< 0.1	0.36879	0.95950	10.42426	0.35204	< 0.1	1.97334	0.67200
14/11/2015 12:15	3	8	< 0.1	0.05564	< 0.1	0.52220	2.82005	10.54214	0.41016	< 0.1	1.94748	6.78042
16/11/2015 12:00	5	9	< 0.1	0.07180	< 0.1	0.46181	1.94892	10.20380	0.84904	< 0.1	1.78169	3.10214
18/11/2015 12:00	7	10	< 0.1	< 0.05	< 0.1	0.14377	1.09289	8.12190	0.27772	< 0.1	1.61775	1.30371
02/12/2015 16:00	21	11	< 0.1	0.05069	< 0.1	0.53236	2.39162	10.45510	0.49038	< 0.1	1.89918	7.29280
11/12/2015 13:00	30	12	< 0.1	< 0.05	< 0.1	< 0.1	3.39283	10.27547	0.37539	< 0.1	1.71787	0.72130
05/01/2016 12:50	55	13	< 0.1	< 0.05	< 0.1	0.57442	1.65927	10.28865	0.67386	< 0.1	1.80785	2.84046
03/02/2016 13:00	85	14	< 0.1	< 0.05	< 0.1	0.10689	4.37750	10.36115	0.51260	< 0.1	1.80373	0.91007
01/03/2016 13:00	112	15	< 0.1	< 0.05	< 0.1	0.33901	2.14416	9.91875	0.28198	< 0.1	1.68943	1.91218

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Acuña N, Ortega-Morales BO, Valadez-Gonzalez A.** (2006). Biofilm colonization dynamics and its influence on the corrosion resistance of austenitic UNS S31603 stainless steel exposed to Gulf of Mexico seawater. *Mar Biotech.* 8(1): 62-70.
- Akintokun AK, Akande GA, Akintokun PO, Popoola TOS, Babalola AO.** (2007). Solubilization of Insoluble Phosphate by Organic Acid-Producing Fungi Isolated from Nigerian Soil. *Geoderma.* 2: 301-307.
- Andeer PF, Learman DR, McIlvin M, Dunn JA, Hansel CM.** (2015). Extracellular haem peroxidases mediate Mn(II) oxidation in a marine *Roseobacter* bacterium via superoxide production. *Environ Microbiol.* 17(10): 3925–3936.
- ASTM International.** (1999). Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens. 90: 1–9.
- Beech IB.** (2004). Corrosion of technical materials in the presence of biofilms—current understanding and state-of-the art methods of study. *Int Biodeterior Biodegr.* 53(3): 177–183.
- Beech IB, Sunner J.** (2004). Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr Opin Biotechnol.* 15: 181–186.
- Bermont-Bouis D, Janvier M, Grimont PAD, Dupont I, Vallaeyts T.** (2007). Both sulfate-reducing bacteria and *Enterobacteriaceae* take part in marine biocorrosion of carbon steel. *J Appl Microbiol.* 102:161–168.
- Boopathy R, Daniels MD.** (1991). Effect of pH on anaerobic mild steel corrosion by methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 57: 2104–2108.
- Boudaud N, Coton M, Coton E, Pineau S, Travert J, Amiel C.** (2010). Biodiversity analysis by polyphasic study of marine bacteria associated with biocorrosion phenomena. *J Appl Microbiol.* 109(1):166-79.
- Characklis WG, Cooksey KE.** (1983). Biofilms and microbial fouling. *Adv Appl Microbiol.* 29: 93-138.
- Coetser SE, Cloete TE.** (2005). Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. *Crit Rev Microbiol.* 31(4):213-32.
- Cooksey KE.** (1981). Requirement for calcium in adhesion of a fouling diatom to glass. *Appl Environ Microbiol.* 4:1378–1382.

Compère C, Bellon-Fontaine M-N, Bertrand P, Costa D, Marcus P, Poleunis C, Pradier C-M, Rondot B, Walls WG. (2001). Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling*. 17:129–145.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284(5418):1318-22.

Cord-Ruwisch R, Kleinitz W, Widdels F. (1987). Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. *J Petroleum Technol*. 3: 97–106.

Celikkol-Aydin S, Gaylarde CC, Lee T, Melchers RE, Witt DL, Beech IB. (2016). 16S rRNA gene profiling of planktonic and biofilm microbial populations in the Gulf of Guinea using Illumina NGS. *Mar Environ Res*. 122:105-112.

Dang H, Lovell CR. (2000). Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*. 66(2):467-75.

Dang HY, Li TG, Chen MN, Huang GQ. (2008). Cross-ocean distribution of Rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl Environ Microbiol*. 74:52–60.

De Messano LVR, Sathler L, Reznik LY, Coutinho R. (2009). The effect of biofouling on localized corrosion of the stainless steels N08904 and UNS S32760. *Int Biodeterior Biodegr*. 63:607–614.

Dexter SC, Gao GY. (1988). Effect of Seawater Biofilms on Corrosion Potential and Oxygen Reduction of Stainless Steel. *CORROSION*. 44(10): 717–723.

Dupont I, Féron D, Novel G. (1998). Effect of glucose oxidase activity on corrosion potential of stainless steels in seawater. *Int Biodeterior Biodegr*. 41(1): 13–18.

Eashwar M, Subramanian G, Palanichamy S, Rajagopal G, Madhu S, Kamaraj P. (2009). Cathodic behaviour of stainless steel in coastal Indian seawater: calcareous deposits overwhelm biofilms. *Biofouling*. 25:191–201.

El-Meligi AA. (2010). Corrosion Preventive Strategies as a Crucial Need for Decreasing Environmental Pollution and Saving Economics. *Recent Patents on Corrosion Science*. 2: 22-33.

Enning D, Garrelfs J. (2014). Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: new views of an old problem. *Appl Environ Microbiol*. 80(4):1226-36.

Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*. 320(5879):1034-9.

- Fang HH, Xu LC, Chan KY.** (2002). Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Res.* 36:4709-16.
- Faust K, Raes J.** (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nature Rev Microbiol.* 10:538–550.
- Féron D, Dupont, I.** (1998). Marine Biofilms on Stainless Steels: Effects on the Corrosion Behaviour. *Dev Mar Corros.* 89–102.
- Fischer DA, Daille L, Aguirre J, Galarce C, Armijo F, De la Iglesia R, Pizarro G, Vargas I, Walczak M.** (2016). Corrosion of Stainless Steel in Simulated Tide of Fresh Natural Seawater of South East Pacific. *Int J Electrochem Sci.* 11: 6873–6885.
- Fuhrman JA, Comeau DE, Hagström A, Chan AM.** (1988). Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies. *Appl Environ Microbiol.* 54: 1426–9.
- Fuhrman JA, Cram JA, Needham DM.** (2015). Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. *Nat Rev Microbiol.* 13(3): 133-46.
- Geesey GG, Costerton JW.** (1979). Microbiology of a northern river: bacterial distribution and relationship to suspended sediment and organic carbon. *Can J Microbiol.* 25(9): 1058–1062.
- Geesey GG, Gillis RJ, Avci R, Daly D, Hamilton M, Shope P, Harkin G.** (1996). The influence of surface features on bacterial colonization and subsequent substratum chemical changes of 316L stainless steel. *Corros Sci.* 38(1): 73–95.
- Geiser M, Avci R, Lewandowski Z.** (2002). Microbially initiated pitting on 316L stainless steel. *Int Biodeterior Biodegr.* 49(4): 235–243.
- Gomez-Alvarez V, Revetta RP, Santo Domingo JW.** (2012). Metagenome analyses of corroded concrete wastewater pipe biofilms reveal a complex microbial system. *BMC Microbiol.* 12: 122.
- Hamilton WA.** (1985). Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Annu Rev Microbiol.* 39: 195–217.
- Hamilton WA.** (2003). Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis. *Biofouling.* 19:65-76.
- Hansen HP, Grasshoff K.** (1983). Automated Chemical Analysis. Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 347–70.
- Holt RD, Polis GA.** (1997). A theoretical framework for intraguild predation, *Am Nat.* 149: 745-764.

Jayaraman A, Hallock PJ, Carson RM, Lee CC, Mansfeld FB, Wood TK. (1999b). Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated *in situ*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 52(2): 267-75.

Jefferson KK. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS Microbiol Lett.* 236(2): 163-73.

Juzeliūnas E, Ramanauskas R, Lugauskas A, Leinartas K, Samulevičienė M, Sudavičius A. (2006). Influence of wild strain *Bacillus mycoides* on metals: From corrosion acceleration to environmentally friendly protection. *Electrochim Acta.* 51(27): 6085-6090.

King R, Miller J, Wakerley D. (1973). Corrosion of mild steel in cultures of sulphate-reducing bacteria: effect of changing the soluble iron concentration during growth. *Br Corros J.* 8: 89–93.

Kip N, van Veen JA. (2015). The dual role of microbes in corrosion. *ISME J.* 9(3):542-51.

Lalli CM, Parsons TR. (1997). *Biological Oceanography: An Introduction*. Second Edition. Open University Oceanography Series. Elsevier Butterworth-Heinemann, United Kingdom.

Lappin-Scott HM, Costerton JM. (1989). Bacterial biofilms and surface fouling. *Biofouling.* 1: 323–342.

Landoulsi J, Cooksey KE, Dupres V. (2011). Review - Interactions between diatoms and stainless steel: focus on biofouling and biocorrosion. *Biofouling.* 27(10): 1109-24.

Lee JW, Nam JH, Kim YH, Lee KH, Lee DH. (2008). Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J Microbiol.* 46(2): 174-82.

Lee YK, Kwon KK, Cho KH, Kim HW, Park JH, Lee HK. (2003). Culture and identification of bacteria from marine biofilms. *J Microbiol.* 41(3): 183- 188.

Li K, Whitfield M, Van Vliet KJ. (2013). Beating the bugs: roles of microbial biofilms in corrosion. *Corrosion Reviews.* 31(3-6).

Liaud N, Giniés C, Navarro D, Fabre N, Crapart S, Gimbert IH-, Levasseur A, Raouche S, Sigoillot J-C. (2014). Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biol Biotechnol.* 1(1).

Lichter JA, Thompson MT, Delgadillo M, Nishikawa T, Rubner MF, Van Vliet KJ. (2008). Substrata mechanical stiffness can regulate adhesion of viable bacteria. *Biomacromolecules.* 9: 1571–1578.

Lieser MJ, Stek C. (2010). Composites and the Future of Society: Preventing a Legacy of Costly Corrosion with Modern Materials. *Owning Corning Report.* 4-5.

Lima-Mendez G, Faust K, Henry N, Decelle J, Colin S, Carcillo F, Chaffron S, Ignacio-Espinosa JC, Roux S, Vincent F, Bittner L, Darzi Y, Wang J, Audic S, Berline L, Bontempi G, Cabello AM, Coppola L, Cornejo-Castillo FM, d'Ovidio F, De Meester L, Ferrera I, Garet-Delmas MJ, Guidi L, Lara E, Pesant S, Royo-Llonch M, Salazar G, Sánchez P, Sebastian M, Souffreau C, Dimier C, Picheral M, Searson S, Kandels-Lewis S; Tara Oceans coordinators, Gorsky G, Not F, Ogata H, Speich S, Stemmann L, Weissenbach J, Wincker P, Acinas SG, Sunagawa S, Bork P, Sullivan MB, Karsenti E, Bowler C, de Vargas C, Raes J. (2015). Ocean plankton. Determinants of community structure in the global plankton interactome. *Science*. 348: 1262073.

Lin J, Ballim R. (2012). Biocorrosion control: Current strategies and promising alternatives. *Afr J Biotechnol*. 11(91): 15736-15747.

Little BJ, Lee JS, Ray RI. (2008). The influence of marine biofilms on corrosion: A concise review. *Electrochim Acta*. 54(1): 2–7.

Little B, Ray R, Wagner P, Lewandowski Z, Lee WC, Characklis WG, Mansfeld F. (1991). Impact of biofouling on the electrochemical behaviour of 304 stainless steel in natural seawater. *Biofouling*. 3(1): 45–59.

Little B, Wagner P, Mansfeld F. (1992). An overview of microbiologically influenced corrosion. *Electrochimica Acta*. 37(12): 2185–2194.

López MA, Zavala Díaz de la Serna FJ, Jan-Roblero J, Romero JM, Hernández-Rodríguez C. (2006). Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in a water pipeline in the Gulf of Mexico. *FEMS Microbiol Ecol*. 58(1): 145–154.

Magnuson JK, Lasure LL. (2004). Organic acid production by filamentous fungi. In: Tkacz JS, Lange L. Boston, MA. Adv fungal biotechnol ind agric med. Springer US. 307–340.

Marsh PD, Bradshaw DJ. (1995). Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol*. 15: 169–175.

Marshall PD, Bowden GHW. (2000). Microbial community interaction in biofilms. In: Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M (eds). Community Structure and Cooperation in Biofilms. Society for General Microbiology Symposia 59, Cambridge. 167–198.

Marty F, Gueuné H, Malard E, Sánchez-Amaya JM, Sjögren L, Abbas B, Quillet L, van Loosdrecht MC, Muyzer G. (2014). Identification of key factors in Accelerated Low Water Corrosion through experimental simulation of tidal conditions: influence of stimulated indigenous microbiota. *Biofouling*. 30(3):281-97.

Mattila M, Carpen L, Hakkarainen T, Salkinoja-Salonen MS. (1997). Biofilm development during ennoblement of stainless steel in Baltic Sea water: A microscopic study. *Int Biodeterior Biodegr*. 40(1): 1–10.

- McBeth JM, Little BJ, Ray RI, Farrar KM, Emerson D.** (2011). Neutrophilic iron-oxidizing "zetaproteobacteria" and mild steel corrosion in nearshore marine environments. *Appl Environ Microbiol.* 77:1405-12.
- Mehanna M, Basséguy R, Délia ML, Bergel A.** (2009). Effect of *Geobacter sulfurreducens* on the microbial corrosion of mild steel, ferritic and austenitic stainless steels. *Corros Sci.* 51: 2596-2604.
- Mollica A.** (1992). Biofilm and corrosion on active-passive alloys in seawater. *Int Biodeterior Biodegrad.* 29: 213-29.
- Nealson KH.** (2006). The Manganese-Oxidizing Bacteria. Chapter 3.1.10. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York. 5:222–231.
- Qian P-Y, Xu SY.** (2012). Antifouling activity of Marine Natural Products. Chapter 15. In: Fattorusso E, Tagliatela-Scafati O, Gerwick WH (eds). *Handbook of Marine Natural Products*. Springer, New York.
- Oliveira VM, Lopes-Oliveira PF, Passarini MR, Menezes CB, Oliveira WR, Rocha AJ, Sette LD.** (2011). Molecular analysis of microbial diversity in corrosion samples from energy transmission towers. *Biofouling.* 27(4):435-47.
- Ornek D, Jayaraman A, Syrett BC, Hsu CH, Mansfeld FB, Wood TK.** (2002). Pitting corrosion inhibition of aluminum 2024 by *Bacillus* biofilms secreting polyaspartate or gammapolyglutamate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58: 651–657.
- Païssé S, Ghiglione J-F, Marty F, Abbas B, Gueuné H, Amaya JMS, Muyzer G, Quillet L.** (2012). Sulfate-reducing bacteria inhabiting natural corrosion deposits from marine steel structures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(16): 7493–7504.
- Peters AC, Wimpenny JWT, Coombs JP.** (1987). Oxygen Profiles in, and in the Agar Beneath, Colonies of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus albus* and *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.* 133: 1257-1263.
- Plugge CM, Zhang W, Scholten JC, Stams AJ.** (2011). Metabolic flexibility of sulfate-reducing bacteria. *Front Microbiol.* 2:81.
- Pollet T, Berdjeb L, Garnier C, Durrieu G, Le Poupon C, Misson B, Jean-François B.** (2018). Prokaryotic community successions and interactions in marine biofilms: the key role of Flavobacteriia. *FEMS Microbiol Ecol.* 94(6).
- Prosser JI, Bohannan BJ, Curtis TP, Ellis RJ, Firestone MK, Freckleton RP, Green JL, Green LE, Killham K, Lennon JJ, Osborn AM, Solan M, van der Gast CJ, Young JP.** (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat Rev Microbiol.* 5(5):384-92.

Qian P-Y, Lau SCK, Dahms H-U, Dobretsov S, Harder T. (2007). Marine Biofilms as Mediators of Colonization by Marine Macroorganisms: Implications for Antifouling and Aquaculture. *Mar Biotechnol (NY)*. 9(4): 399–410.

Rajasekar A, Anandkumar B, Maruthamuthu S, Ting YP, Rahman PK. (2010). Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines. *Appl Microbiol Biotechnol*. 85(4):1175-88.

Rampadarath S, Bandhoa K, Puchoo D, Jeewon R, Bal S. (2017). Early bacterial biofilm colonizers in the coastal waters of Mauritius. *Electron J Biotechnol*. 29: 13-21.

Ray JL, Töpper B, An S, Silyakova A, Spindelböck J, Thyraug R, Dubow MS, Thingstad TF, Sandaa R-A. (2012). Effect of increased pCO₂ on bacterial assemblage shifts in response to glucose addition in Fram Strait seawater mesocosms. *FEMS Microbiol Ecol*. 82: 713–723.

Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol*. 11:94-100.

Rickard AH, Leach SA, Hall LS, Buswell CM, High NJ, Handley PS. (2002). Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 68:3644-50.

Sandbeck KA, Hitzman DO. (1995). Biocompetitive exclusion technology: a field system to control reservoir souring and increase production. In R. Byrant and K. L. Sublette (ed.), Proceedings of the 5th International Conference on Microbial Enhanced Oil Recovery and Related Biotechnology for Solving Environmental Problems. National Technical and Information Services, Springfield, Va. p. 311–320

Satomi M, Tateo F. (2014). The Family Oceanospirillaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (eds.). The Prokaryotes: Gammaproteobacteria. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 4th Edition. p. 517.

Scotto V, Cintio RD, Marcenaro G. (1985). The influence of marine aerobic microbial film on stainless steel corrosion behaviour. *Corros Sci*. 25(3): 185–194.

Scotto V, Lai M. (1998). The ennoblement of stainless steels in seawater: a likely explanation coming from the field. *Corros Sci*. 40(6): 1007–1018.

Sheng X, Ting Y-P, Pehkonen SO. (2007). The influence of sulphate-reducing bacteria biofilm on the corrosion of stainless steel AISI 316. *Corros Sci*. 49(5): 2159–2176.

Siu N. (2013). The effects of elevated temperature and ocean acidity on bacterioplankton community structure and metabolism. WWU Graduate School Collection. 263.

Sreekumari KR, Nandakumar K, Kikuchi Y. (2001). Bacterial attachment to stainless steel welds: Significance of substratum microstructure. *Biofouling*. 17(4): 303–316.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 56:187-209.

Tabari K, Tabari M, Tabari O. (2011). Application of biocompetitive exclusion in prevention and controlling biogenetic H₂S of petroleum reservoirs. *Aust J Basic Appl Sci.* 5(12): 715-718.

Uchiyama T, Ito K, Mori K, Tsurumaru H, Harayama S. (2010). Iron-corroding methanogen isolated from a crude-oil storage tank. *Appl Environ Microbiol.* 76: 1783–1788.

Vaccari L, Molaei M, Niepa THR, Lee D, Leheny RL, Stebe KJ. (2017). Films of bacteria at interfaces. *Adv Colloid Interface Sci.* 247: 561–572.

Videla HA. (1994). Biofilms and corrosion interactions on stainless steel in seawater. *Int Biodeterior Biodegr.* 34(3-4): 245–257.

Videla HA. (2000). An overview of mechanisms by which sulphate-reducing bacteria influence corrosion of steel in marine environments. *Biofouling.* 15(1-3): 37-47.

Videla HA, Herrera LK. (2005). Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *Int Microbiol.* 8(3):169-80.

Videla HA, Mele MFL, Brankevich GJ. (1989). Biofouling and corrosion of stainless steel and 70/30 copper-nickel samples after several weeks of immersion in seawater. Paper No. 291. CORROSION 89.

Washizu N, Katada Y, Kodama T. (2003). Role of H₂O₂ in microbially influenced ennoblement of open circuit potentials for type 316L stainless steel in seawater. *Corros Sci.* 46: 1291-1300.

Wright JM, Colling A, Bearman G. (1995). Seawater: its composition, properties and behaviour. 2nd Edition. Open University Oceanography Series. Elsevier Butterworth-Heinemann, United Kingdom.

Xu D, Li Y, Song F, Gu T. (2013). Laboratory investigation of microbiologically influenced corrosion of C1018 carbon steel by nitrate reducing bacterium *Bacillus licheniformis*. *Corros Sci.* 77: 385–390.

Yang L. (2008). Techniques for Corrosion Monitoring. 1st Edition. Woodhead Publishing Limited & CRC Press LLC. 64-65.

Zhang H-J, Dexter SC. (1995). Effect of Biofilms on Crevice Corrosion of Stainless Steels in Coastal Seawater. *CORROSION.* 51(1): 56–66.

Zhang T, Fang HHP. (2001). Phylogenetic diversity of a SRB-rich marine biofilm. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57(3): 437–440.

Zhang T, Fang HH, Ko BC. (2003). Methanogen population in a marine biofilm corrosive to mild steel. *Appl Microbiol Biotechnol.* 63(1):101-6.

Zuo R, Ornek D, Syrett BC, Green RM, Hsu C-H, Mansfeld FB, Wood TK. (2004). Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing bacteria using antimicrobial-producing biofilms in Three-Mile-Island process water. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64:275-283.

Zuo R, Wood TK. (2004). Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing and iron-oxidizing bacteria using gramicidin-S-producing biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65: 747–753.