

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЗАИМОСВЯЗИ БИОКОРРОЗИИ ПОЛИЭТИЛЕНА БИОПЛЕНКАМИ *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM* С ИХ СПОСОБНОСТЬЮ ФОРМИРОВАТЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ ПОЛИМЕРНЫЙ МАТРИКС¹

© 2020 г. М. В. Журина^а, А. В. Ганнесен^а, С. В. Мартьянов^а, В. К. Плакунов^а, *

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: plakunov@inmi.ru

Поступила в редакцию 19.06.2019 г.

После доработки 09.07.2019 г.

Принята к публикации 29.09.2019 г.

Метод основан на массивном засеве образцов полиэтилена чистыми культурами микроорганизмов или их смесями с последующим формированием биопленок в течение 5–7 сут. Степень повреждения поверхности полиэтилена определяли двумя альтернативными способами: разработанным нами оптическим методом, основанным на измерении интенсивности рассеянного света, а также стандартным методом с использованием профилометра. Оба способа обнаружили прямую корреляцию результатов и могут быть рекомендованы для практического измерения начальных этапов биокоррозии поверхности полиэтилена. Показано, что степень биокоррозии определяется, в первую очередь, не общим накоплением внеклеточного полимерного матрикса, а количеством жизнеспособных клеток микроорганизма в биопленке

Ключевые слова: бинарные биопленки, регуляция формирования биопленок, биокоррозия, деструкция полиэтилена, внеклеточный полимерный матрикс, *Chromobacterium violaceum*

DOI: 10.31857/S0026365620010176

В многочисленных исследованиях функций внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) микробных биопленок убедительно продемонстрирована его важная роль в защите биопленочного “населения” от воздействия экстремальных физико-химических факторов окружающей среды, а также от биоцидов (Стрелкова и соавт., 2013; Flemming, 2016). В состав ВПМ входит большое количество низкомолекулярных компонентов, а также биополимеров, в том числе внеклеточные ферменты, роль которых пока мало изучена (Saxena et al., 2019). Есть основания полагать, что в структуре ВПМ ферменты находятся в (квази)иммобилизованном состоянии в результате взаимодействия с полисахаридами и другими компонентами ВПМ, что способствует их устойчивости к внешним воздействиям и влияет на величину и специфичность ферментативной активности (Tielen et al., 2013; Romero et al., 2018).

В процессе биокоррозии полиэтилена (ПЭ) возникают структурные нарушения полимерной цепи

с появлением химически реакционных групп, включающих кислород (Kowalczyk et al., 2016). Эти результаты указывают на возможное включение в биодеградацию ПЭ, в частности, оксидаз и пероксидаз, участвующих в расщеплении лигнина (Sangale et al., 2012). Можно также предполагать (Arkatkar et al., 2009), что в процессах биодеградации ПЭ участвуют содержащиеся у нефтеокисляющих микроорганизмов оксигеназы, способные внедрять кислород в углеводородную цепь длинноцепочечных парафинов. Одними из таких активно окисляющих нефтепродукты бактерий являются представители рода *Chromobacterium*. Их деградирующая способность в отношении дизельного топлива, керосина и сырой нефти обнаружена в скоплениях водорослей по берегам рек (Bassey et al., 2018), а также в образцах отвержденной сырой нефти в морской воде и на берегах морей (Itah, Essien, 2005).

Учитывая важную роль ВПМ в формировании и функционировании микробных биопленок, целью данной работы являлось сравнение активности процессов биодеградации ПЭ, осуществляемых биопленками штамма дикого типа *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 (штамм WT), способного к

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.1134/S0026365620010176 для авторизованных пользователей.

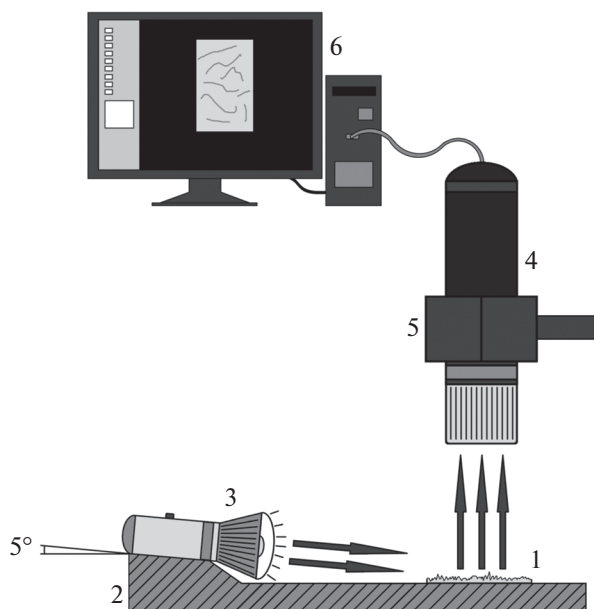


Рис. 1. Схема установки для проведения оптического анализа пластинок: 1 – анализируемая пластинка; 2 – подложка; 3 – фонарик; 4 – портативный USB-микроскоп “Levenhuk Inc.”; 5 – лапка штатива; 6 – компьютер.

формированию полноценного ВПМ, и его мутанта CV026 с дефектом синтеза ВПМ (Журина и соавт., 2013; Kamaeva et al., 2014).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Подготовка микробных культур. Культуры *Chromobacterium violaceum* сохраняли на столбиках полуцилиндрической (0.3% агара) среды LB (“Difco”) под вазелиновым маслом при комнатной температуре. Перед экспериментом культуры рассеивали методом “истощающего штриха” на поверхности плотной среды LA (среда LB с добавлением 2.5% агара) и инкубировали 48 ч при 30°C. Чашки с выросшими культурами хранили 2–3 недели при комнатной температуре в герметичных сосудах. Для эксперимента выбирали характерные колонии, которые засеивали на жидкую среду LB и выращивали 24 ч при 30°C на качалке (150 об./мин). Полученные культуры использовали в качестве тест-объектов для измерения биокоррозии ПЭ.

Подготовка тестируемых образцов пластмасс. Из листов полиэтиленовой нестабилизированной пленки ПВД толщиной 150 мкм (ГОСТ 10354-82) нарезали полоски 1 × 2 см, помещали на бумажные фильтры в чашки Петри и стерилизовали УФ в течение 60 мин (лампа ДБ 30-01 мощностью 30 Вт, бактерицидная мощность 6 Вт). Стерильные образцы хранили при комнатной температуре в герметизированных парафильмом чашках Петри.

Измерение биокоррозии ПЭ оптическим методом. Использовали чашки Петри с плотной средой LA, а также с этой же средой, разбавленной средой M9 в 10 и 50 раз (в присутствии 2.5% агара) без источника углерода. Тестируемые пластинки ПЭ погружали в застывшую среду примерно на 2/3 высоты. Непогруженная часть образца служила для микроскопического контроля его однородности: при наличии дефектов в исходном образце результаты для него не учитывались. Непосредственно вокруг основания образца и вглубь плотной среды вносили 5 мкл 24-часовой культуры изучаемого микроорганизма. При такой постановке опыта на одну чашку Петри диаметром 10 см можно поместить 4–6 образцов (один из них служил холостым вариантом и не подвергался воздействию микроорганизма (рис. S1).

Чашки инкубировали при 30°C в течение 4–7 сут. Затем образцы (не менее трех каждого типа) извлекали стерильным пинцетом, ополаскивали стерильной дистиллированной водой для удаления непрочно связанных бактерий, подсушивали на воздухе. Часть образцов фотографировали с помощью портативного цифрового микроскопа DNX 30 (“Levenhuk Inc.”, США) при боковом освещении светодиодным источником (под углом 5° относительно горизонтальной поверхности) на черном не рассеивающем свет фоне для визуального качественного выявления сформированных на поверхности ПЭ биопленок. Использовали такое увеличение микроскопа (примерно ×200), чтобы пластинка полностью помещалась в поле зрения микроскопа, и большая часть рассеянного света попадала в его объектив. Схема установки для оптического анализа отображена на рис. 1.

Поскольку пластинки ПЭ прозрачны, на фотографиях на темном фоне выявляется светорассеяние от дефектов поверхности, локализованных на обеих сторонах пластинки.

На погруженной в среду части пластинок с помощью инструмента Emboss (рельеф) графической программы Photoshop CS6 Extended визуализировали шероховатости, сформированные микробными биопленками. Примеры таких пластинок представлены на рис. 2.

На рис. 2 можно видеть, что штамм *C. violaceum* WT, по сравнению с мутантом CV026, в условиях наших экспериментов образует более плотную биопленку со сложной архитектурой.

Эти образцы (включая холостые, инкубированные в отсутствие микроорганизма) помещали в 5% раствор дихромата калия в концентрированной серной кислоте и выдерживали 24 ч при комнатной температуре для полного растворения биопленок и последующего измерения шероховатости поверхности полиэтилена.

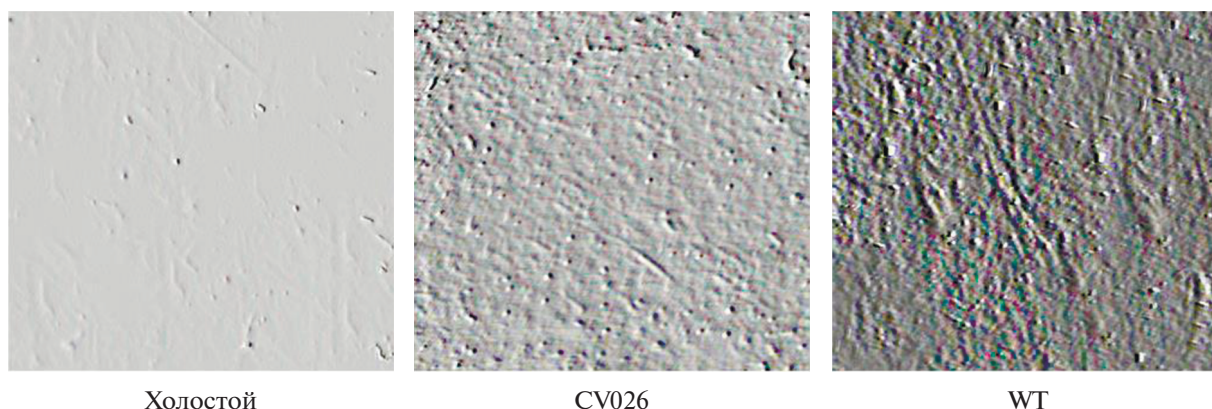


Рис. 2. Полоски полиэтилена после инкубации в плотной среде LA в присутствии изучаемых штаммов *Chromobacterium violaceum*, контрастированные с помощью инструмента Photoshop CS6 Extended Emboss (рельеф).

Два других варианта пластинок (каждый не менее чем в трех повторностях), инкубированных в среде LA, разбавленной в 10 (LA/10) и в 50 раз (LA/50), окрашивали с помощью метаболизируемого красителя, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-ди-фенилтетразолий бромид (МТТ), для выявления метаболически активных бактерий, а также кристаллическим фиолетовым (КФ) для определения общей массы биопленок (Плакунов и соавт., 2016). По сравнению с ранее описанными методами были внесены некоторые изменения.

При окрашивании МТТ пластинки с биопленками споласкивали дистиллированной водой и инкубировали 1 сут в 3 мл 0.1% раствора МТТ в среде LB при комнатной температуре (в планшетах с крышками) в присутствии 50 мкг/мл азитромицина (этот антибиотик подавляет рост микроорганизмов, но не препятствует восстановлению МТТ).

Примеры окрашенных пластинок представлены на рис. 2S.

Окрашенные пластинки (в том числе холостой вариант) ополаскивали дистиллированной водой и подсушивали на воздухе. Затем каждую пластинку экстрагировали 3 мл 96% этанола (до практически полного обесцвечивания). Оптическую плотность экстрактов измеряли при 540 нм на спектрофотометре 722 Grating (Китай) против экстракта холостого варианта.

В случае окрашивания КФ пластинки ополаскивали дистиллированной водой и помещали в 3 мл 0.1% водного раствора КФ на 60 мин, после чего избыток несвязанного красителя удаляли промыванием дистиллированной водой. Пластинки подсушивали на воздухе. Примеры окрашенных пластинок представлены на рис. 3S.

Связанный с биопленками краситель экстрагировали 3 мл 96% этанола (до практически полного обесцвечивания). Оптическую плотность экстрактов измеряли при 595 нм против холостого образца.

Денситометрический анализ степени повреждения пластин. После экстракции красителей все образцы (в том числе из первой, неокрашенной порции), включая холостой вариант, помещали в хромовую смесь (5% раствор дихромата калия в концентрированной серной кислоте) на 1 сут при комнатной температуре для растворения биопленок, отмывали в большом объеме дистиллированной воды, подсушивали на воздухе и фотографировали с помощью микроскопа DNX 30 (“Levenhuk Inc.”, США).

Полученные фотографии обрабатывали с помощью инструментов Photoshop CS6 Extended. Для этого из каждой фотографии вырезали основную часть 400 × 400 пкс (исключая края фотографии), переводили в формат bmp и использовали как образцы для количественного анализа с помощью денситометрической программы (Sorbfil TLC View) для денситометра Сорбфил (ТУ 4436-003-16943778-99, ЗАО НПО “Техноком”, Россия).

Измерение биокоррозии ПЭ с помощью профилометра. После проведения денситометрического анализа производили измерение шероховатости профиля поверхности пластин при помощи прибора-профилометра TR110new (“Time Group Inc.”, Китай). Для этого пластину ПЭ закрепляли на прозрачной плексигласовой подложке, укрепленной на штативе выше уровня глаз. Сверху пластины устанавливали профилометр, игла которого во время измерения проходила путь длиной 6 мм. Производили 6–9 измерений профиля поверхности пластины в одной проекции, после чего прибор поворачивали на 90° и измеряли 6–9 раз в перпендикулярной проекции. Затем пластину переносили и повторяли измерения в двух проекциях. Прозрачность плексигласовой подложки обеспечивала визуальный контроль траектории иглы профилометра, необходимый для избегания прохождения иглы по одному и тому же месту.

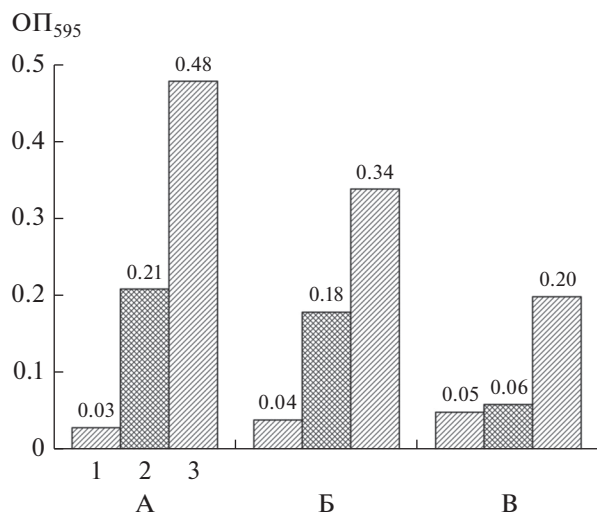


Рис. 3. Количественная оценка формирования биопленок на поверхности пластинок полиэтилена по окрашиванию КФ: А – на неразбавленной среде ЛА; Б – на среде ЛА/10; В – на среде ЛА/50. Варианты опытов: 1 – контроль; 2 – *Chromobacterium violaceum* CV026; 3 – *Chromobacterium violaceum* WT.

Дополнительное визуальное контрастирование царепин, оставляемых иглой, проводили при помощи светодиодного фонаря, направленного на пластину снизу под углом 60°.

Измеряли усредненный параметр шероховатости поверхности Ra (мкм), высчитываемый прибором автоматически на основе обработки сигналов от иглы на впадинах и возвышениях профиля.

Статистическую обработку результатов проводили, как и в предыдущих работах, с использованием программного пакета OriginLab 8.6. Поскольку тест на нормальность закона варьирования данных в наших экспериментах дал отрицательный результат, для оценки достоверности различий применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни–Вилкоксона при $p < 0.05$. Для графического отображения полученных закономерностей использовали алгоритм выбора типичного эксперимента (Paulson, 2008). Построение и сглаживание графиков проводили с использованием программы OriginLab 8.6 при помощи функции B-spline.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимосвязь процесса формирования биопленок с величиной биокоррозии ПЭ определяли с помощью разработанного нами экспресс-метода, который позволяет получить результаты в течение 5–7 дней, в отличие от классических подходов, требующих более длительной инкубации: от нескольких недель до нескольких месяцев (Sangale et al., 2012). Характерной особенностью нашего метода является использование массивного

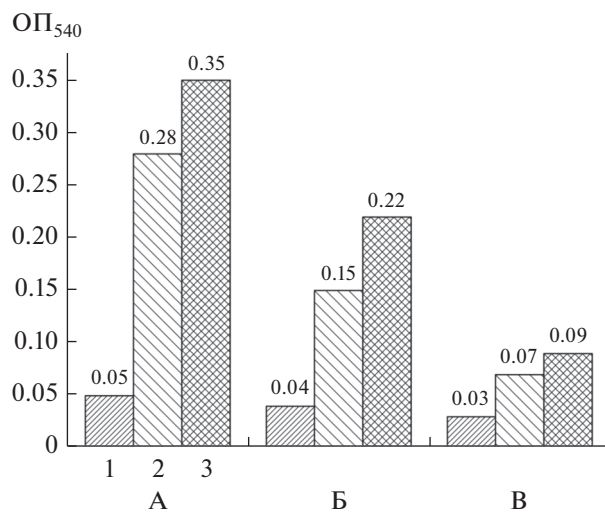


Рис. 4. Количественная оценка метаболически активных бактерий на поверхности пластинок полиэтилена по окрашиванию МТТ. Обозначения как на рис. 3.

воздействия микроорганизмов непосредственно на испытуемый образец. Кроме стандартной среды ЛА использовали два ее разведения в 10 и 50 раз с целью снижения возможного репрессирующего действия содержащихся в ней питательных веществ на синтез ферментов, участвующих в биодegradации ПЭ. С другой стороны, можно было ожидать, что, поскольку в биодegradации ПЭ участвуют не специфические для этого субстрата ферменты, а ферменты общего метаболизма (Agkatkar et al., 2009), массиванный засев микроорганизмов на богатой среде может способствовать увеличению общего количества ферментов, участвующих в биодegradации ПЭ.

Как показали проведенные эксперименты, общее накопление биопленок по окрашиванию КФ у исследуемых штаммов заметно отличалось (рис. 3), поскольку у мутанта *Chromobacterium violaceum* CV026 синтез ВПМ значительно снижен (Журина и соавт., 2013). Наибольшие различия наблюдались на неразбавленной среде ЛА и на среде, разбавленной в 50 раз (ЛА/50).

Методом, позволяющим количественно оценить содержание в биопленках метаболически активных бактерий, является окрашивание красителем МТТ (Плакунов и соавт., 2016) (рис. 4).

Как следует из данных, представленных на рис. 4, различия между штаммами в количестве метаболически активных бактерий на пластинках ПЭ значительно меньше, чем различия в общем количестве биопленочного материала, поскольку КФ окрашивает как ВПМ, так и клетки бактерий. Таким образом, в условиях наших экспериментов способность бактерий переходить к “прикрепленному” способу существования, по-видимому, реализуется до того, как начинается активный

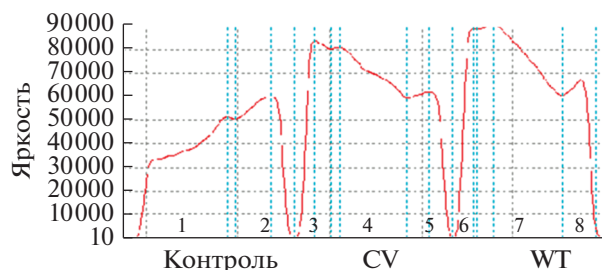


Рис. 5. Денситометрическое измерение степени биокоррозии изучаемыми штаммами поверхности полиэтилена в результате инкубации на неразбавленной среде LB. Величина светорассеяния представлена как “яркость” на оси ординат.

синтез ВПМ. Поэтому особый интерес представляло выявление связи между общим количеством биопленок на поверхности пластинок ПЭ, количеством метаболически активных бактерий в этих биопленках и степенью биокоррозии поверхности обрастаемого ими ПЭ. Степень биокоррозии определяли двумя способами: разработанным нами оптическим методом, а также стандартным методом измерения шероховатости поверхности с помощью профилометра. В случае оптического метода величину биокоррозии поверхности ПЭ оценивали денситометрически по величине интенсивности (площади пиков) рассеянного света, оцениваемой как “яркость” (рис. 5).

Аналогичным образом измеряли светорассеяние при инкубации пластинок ПЭ в разбавленных средах LA. Величины площадей полученных пиков светорассеяния использовали для построения диаграмм относительно контрольных образцов, инкубированных при тех же условиях в стерильной среде LA. Данные суммированы на рис. 6.

Для сравнения с предложенным нами оптическим методом был использован стандартный метод определения шероховатости поверхности ПЭ, подвергнутого биокоррозии, с помощью профилометра. Результаты представлены на рис. 7.

В целом между данными, полученными сравниваемыми методами, наблюдается положительная корреляция. Точного количественного совпадения результатов ожидать трудно, поскольку принципы определения шероховатости поверхности у этих методов принципиально различаются. В оптическом методе шероховатость характеризуется степенью светорассеяния от дефектов поверхности ПЭ, а в случае профилометрического метода она измеряется непосредственно по перемещению зонда по неровностям поверхности ПЭ. Однако предлагаемый нами метод дает более надежные усредненные результаты, поскольку для измерения шероховатости используется практически вся изучаемая поверхность пластинки, тогда как данные, получаемые с помощью профилометри-

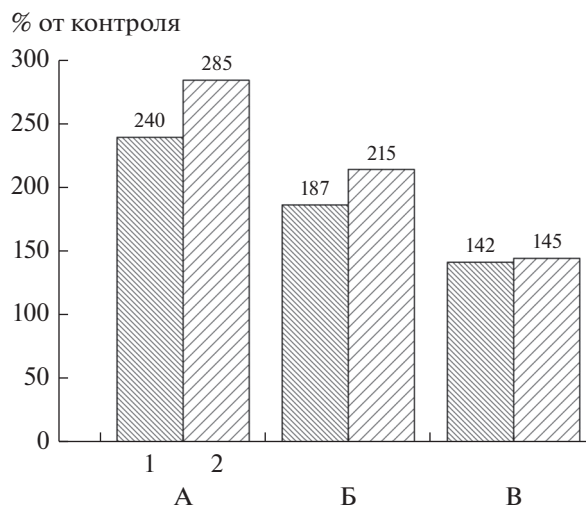


Рис. 6. Определение степени биокоррозии поверхности полиэтилена оптическим методом на среде LA с разной степенью разбавления: А – на неразбавленной среде LA; Б – на среде LA/10; В – на среде LA/50. Варианты опытов: 1 – *Chromobacterium violaceum* CV026; 2 – *Chromobacterium violaceum* WT.

ческого метода, сильно зависят от характера распределения повреждений по поверхности пластинки, и для получения усредненных результатов требуют многократных измерений при движении зонда в разных направлениях. Поэтому для практического применения сравнительного определения степени биокоррозии поверхности ПЭ под воздействием разных микробных ассоциаций, разработанный нами оптический метод представляется более простым и корректным.

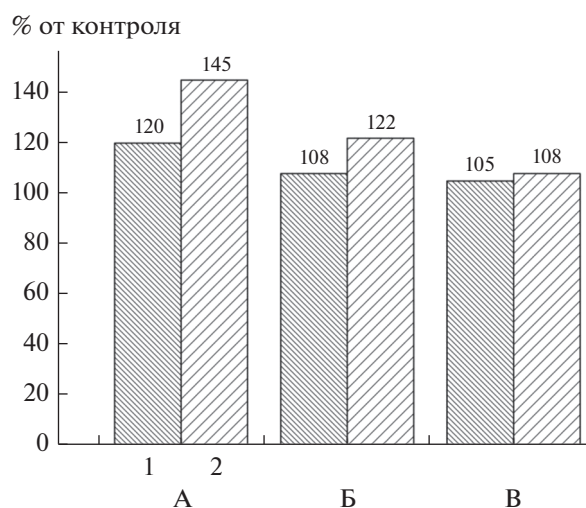


Рис. 7. Определение степени биокоррозии поверхности полиэтилена с помощью профилометра на среде LA с разной степенью разбавления. Обозначения как на рис. 6.

Предлагаемый экспресс-метод одновременно решает две задачи. Во-первых, он позволяет быстро проверить с помощью высокоактивных микробных ассоциаций большое количество защитных добавок, предупреждающих биокоррозию технологических покрытий или упаковок, изготавливаемых из ПЭ. Во-вторых, позволяет сформулировать рекомендации для создания эффективных микробных ассоциаций, позволяющих утилизировать отходы ПЭ, что является в настоящее время весьма актуальной проблемой.

Из полученных нами результатов следует, что биокоррозия определяется не столько общей величиной обрастания биопленкой корродируемого материала, измеряемого по окрашиванию биопленок КФ, сколько наличием в этой биопленке жизнеспособных метаболически активных клеток. Накопление ВПМ, стимулирующего прикрепление микроорганизмов к поверхности материалов, несомненно, играет важную, но не всегда решающую роль, как можно судить при сравнении данных, представленных на рис. 3–4 и 6–7. Поэтому для корректной оценки корродирующей активности микробного сообщества необходимо определять не только общую степень обрастания материала, но и количество содержащихся в нем метаболически активных микроорганизмов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена за счет средств проекта РФФИ МК-18-29-05048 и частично за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, полученных с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Журина М.В., Кострикина Н.А., Паршина Е.А., Стрелкова Е.А., Юсипович А.И., Максимов Г.В., Плакунов В.К. Визуализация внеклеточного полимерного матрикса биопленок *Chromobacterium violaceum* с помощью микроскопических методов // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 502–509.
- Zhurina M.V., Kostrikina N.A., Parshina E. Yu., Strelkova E.A., Yusipovich A.I., Maksimov G.V., Plakunov V.K. Visualization of the extracellular polymeric matrix of *Chromobacterium violaceum* biofilms by microscopic methods // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 517–524.
- Стрелкова Е.А., Позднякова Н.В., Журина М.В., Плакунов В.К., Беляев С.С. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды // Микробиология. 2013. Т. 82. С. 131–138.
- Strelkova E.A., Pozdnyakova N.V., Zhurina M.V., Plakunov V.K., Belyaev S.S. Role of the extracellular polymer matrix in resistance of bacterial biofilms to extreme environmental factors // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 119–125.
- Arkatkar A., Arutchelvi J., Sudhakar M., Bhaduri S., Uppara P.V., Doble M. Approaches to enhance the biodegradation of polyolefins // Open Environ. Engineer. J. 2009. V. 2. P. 68–80.
- Bassey I.U., Andy I.E., Unimke A.A., Akpanke J. Hydrocarbon degrading potentials of *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus* isolated from lemna waste dumpsite, Cross River State, Nigeria // Int. J. Sci. Res. Public. 2018. V. 8. P. 122–129.
- Flemming H.C. EPS – Then and Now // Microorganisms. 2016. V. 4. pii: E41.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms4040041>
- Itah A.Y., Essien J.P. Growth profile and hydrocarbonoclastic potential of microorganisms isolated from tarballs in the Bight of Bonny, Nigeria // World J. Microbiol. Biotechnol. 2005. V. 21. P. 1317–1322.
- Kamaeva A.A., Vasilchenko A.S., Deryabin D.G. Atomic force microscopy reveals a morphological differentiation of *Chromobacterium violaceum* cells associated with biofilm development and directed by N-hexanoyl-L-homoserine lactone // PLoS One. 2014. V. 9. e103741.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103741>
- Kowalczyk A., Chyc M., Ryszka P.Ł., Latowski D. *Achromobacter xylosoxidans* as a new microorganism strain colonizing high-density polyethylene as a key step to its biodegradation // Environ Sci. Pollut. Res. 2016. V. 23. P. 11349–11356.
- Paulson D.S. Biostatistics and Microbiology // Springer Science + Business Media, 2008.
- Romero C.M., Martorell P.V., López A.G., Peñalver C.G.N., Chaves S., Mechetti M. Architecture and physicochemical characterization of *Bacillus* biofilm as a potential enzyme immobilization factory // Colloids Surf. B: Biointerfaces. 2018. V. 162. P. 246–255.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.057>
- Sangale M.K., Shahnawaz M., Ade A.B. A Review on biodegradation of polythene: the microbial approach // J. Bioremed. Biodeg. 2012. V. 3(10).
<https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000164>
- Saxena P., Joshi Y., Rawat K., Bisht R. Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms // Indian J. Microbiol. 2019. V. 59. P. 3–12.
- Tielen P., Kuhn H., Rosenau F., Jaeger K.E., Flemming H.C., Wingender J. Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of *Pseudomonas aeruginosa* // BMC Microbiol. 2013. V. 13. Article 159.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-159>

Express Method for Determining the Relation between Polyethylene Biocorrosion by *Chromobacterium violaceum* Biofilms and Their Ability to Form Extracellular Matrix

M. V. Zhurina¹, A. V. Gannesen¹, S. V. Martyanov¹, and V. K. Plakunov^{1, *}

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: plakunov@inmi.ru

Received June 19, 2019; revised July 9, 2019; accepted September 29, 2019

Abstract—An express method for measuring biocorrosion of the surface of polyethylene by mono- and multi-species microbial biofilms was developed. The method involves massive inoculation of polyethylene samples with pure microbial cultures or their mixtures, with subsequent incubation for 5–7 days providing for the biofilm development. The damage to the surface of polyethylene was determined both by the optical method described in this paper and based on measuring the intensity of scattered light and by the standard method using a profilometer. Both methods found a direct correlation of the results and may be recommended for practical measurement of the initial stages of biocorrosion of the surface of polyethylene. The degree of biocorrosion was found to depend primarily upon the number of viable microbial cells in the biofilm, rather than by accumulation of the extracellular polymer matrix.

Keywords: binary biofilms, regulation of biofilm formation, biocorrosion, polyethylene degradation, extracellular polymer matrix, *Chromobacterium violaceum*