

ВОЗНИКНОВЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНВАГИНАЦИЙ (ЭЙЗОСОМ) В ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ ДРОЖЖЕЙ КАК РЕЗУЛЬТАТ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ: НОВАЯ ВЕРСИЯ

В. В. ДМИТРИЕВ¹⁾, Т. Г. РУСАКОВА¹⁾,
А. В. МАЧУЛИН¹⁾, В. В. ФАРОФОНОВА¹⁾, А. Н. ЗВОНАРЕВ¹⁾

¹⁾Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина
Пушкинского научного центра биологических исследований РАН,
пр. Науки, 5, 142290, г. Пушкино, Россия

На основании цитобиохимических и морфометрических данных впервые показана значительная вариабельность морфологии плазмалеммы у дрожжей в различных физиологических ситуациях. Обнаружены три типа адаптивных структурно-функциональных перестроек плазмалеммы. Ультраструктурные изменения в плазматической мембране и клеточной оболочке *Candida maltosa*, *Cryptococcus humicola* и *Saccharomycopsis lipolytica*, происходящие при потреблении гексадекана, поверхностно-активного вещества лаурокс-9 и оливкового масла соответственно, изучены с помощью электронно-микроскопической цитохимии и криофрактографии. Отмечено, что в первые часы инкубации (лаг-фаза) в цитоплазматических мембранах этих дрожжей появляются специфические структуры: сферические инвагинации у *C. maltosa*, карманоподобные инвагинации у *Cr. humicola* и обычные инвагинации у *S. lipolytica*. При дальнейшем культивировании все указанные инвагинации либо претерпевают структурные изменения, либо исчезают. Высказано предположение, что появление этих структур связано с увеличением площади цитоплазматической мембраны за счет включения мембран секреторных везикул. Интересным открытием был тот факт, что модифицированные участки клеточной оболочки, ранее описанные нами как каналы, наблюдались и у условно-патогенных видов дрожжей *C. albicans* и *C. tropicalis* при росте на углеводородах. Полученные данные не только расширяют представление об адаптивных перестройках дрожжевых клеток, но и могут иметь практическое значение, а именно в терапии микозов, вызванных дрожжевыми организмами.

Образец цитирования:

Дмитриев ВВ, Русакова ТГ, Мачулин АВ, Фарофонова ВВ, Звонарев АН. Возникновение специфических инвагинаций (эйзосом) в цитоплазматической мембране дрожжей как результат секреторных процессов: новая версия. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;1:14–25.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2023-1-14-25>

For citation:

Dmitriev VV, Rusakova TG, Machulin AV, Farofonova VV, Zvonarev AN. The occurrence of specific invaginations (eizosomes) in the yeast cytoplasmic membrane as a result of secretory processes: a new version. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2023;1:14–25. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2957-5060-2023-1-14-25>

Авторы:

Владимир Васильевич Дмитриев – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник, заведующий временным научно-творческим коллективом трехмерных структур микроорганизмов.

Татьяна Геннадьевна Русакова – младший научный сотрудник временного научно-творческого коллектива трехмерных структур микроорганизмов.

Андрей Валерьевич Мачулин – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории цитологии микроорганизмов.

Василина Валерьевна Фарофонова – аспирантка лаборатории регуляции биохимических процессов. Научный руководитель – доктор биологических наук Т. В. Кулаковская.

Антон Николаевич Звонарев – младший научный сотрудник временного научно-творческого коллектива трехмерных структур микроорганизмов.

Authors:

Vladimir V. Dmitriev, PhD (biology); senior researcher and head of the temporary scientific and creative team of three-dimensional structures of microorganisms.

dmitrievibpm@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-7294-3575>

Tatyana G. Rusakova, junior researcher at the temporary scientific and creative team of three-dimensional structures of microorganisms.

tgrus74@gmail.com

Andrey V. Machulin, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of cytology of microorganisms.

and.machul@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-4859-7219>

Vasilina V. Farofonova, postgraduate student at the laboratory of regulation of biochemical processes.

crazytide@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-7689-0738>

Anton N. Zvonarev, junior researcher at the temporary scientific and creative team of three-dimensional structures of microorganisms.

zvonarevibpm@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-7330-0678>

Ключевые слова: цитоплазматическая мембрана дрожжей; инвагинации; электронная микроскопия; криофрактография; цитохимия.

Благодарность. Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией регуляции биохимических процессов Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина Пушкинского научного центра биологических исследований РАН доктору биологических наук Татьяне Владимировне Кулаковской за ценные советы, а также сектору электронной микроскопии Центра коллективного пользования Пушкинского научного центра биологических исследований РАН за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований.

THE OCCURRENCE OF SPECIFIC INVAGINATIONS (EIZOSOMES) IN THE YEAST CYTOPLASMIC MEMBRANE AS A RESULT OF SECRETORY PROCESSES: A NEW VERSION

V. V. DMITRIEV^a, T. G. RUSAKOVA^a,
A. V. MACHULIN^a, V. V. FAROFONOVA^a, A. N. ZVONAREV^a

^aG. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences,
5 Nauki Avenue, Pushchino 142290, Russia

Corresponding author: V. V. Dmitriev (dmitrievibpm@gmail.com)

Based on cytobiochemical and morphometric data, a significant variability in the morphology of the plasmalemma in yeast in different physiological situations was shown for the first time. Three types of adaptive structural and functional rearrangements of the plasmalemma were found. Ultrastructural changes in the plasma membrane and cell wall of *Candida maltosa*, *Cryptococcus humicola* and *Saccharomycopsis lipolytica*, occurring with the consumption of hexadecane, the surfactant laurox-9 and olive oil respectively, were studied using electron microscopic cytochemistry and cryofractography. It was shown that in the first hours of incubation (lag phase), specific structures appear in the cytoplasmic membranes of these yeasts: spherical invaginations in *C. maltosa*, pocket-like invaginations in *Cr. humicola* and ordinary invaginations in *S. lipolytica*. With further cultivation, all these invaginations either underwent structural changes or disappeared. We assume that the appearance of these structures is associated with an increase in the area of the cytoplasmic membrane due to the inclusion of membranes of secretory vesicles. An interesting discovery was the fact that modified sections of the cell wall, which we previously described as canals, were also observed in opportunistic yeast species *C. albicans* and *C. tropicalis* when growing on hydrocarbons. The data obtained not only expand the understanding of the adaptive rearrangements of yeast cells, but may also be of practical importance, namely, in the treatment of mycoses caused by yeast organisms.

Keywords: yeast cytoplasmic membrane; invaginations; electron microscopy; cryofractography; cytochemistry.

Acknowledgements. The authors are grateful to Tatyana V. Kulakovskaya, doctor of science (biology), head of the laboratory of regulation of biochemical processes, G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, for valuable advice, as well as to the sector of electron microscopy, Center for collective use, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, for assistance in conducting electron microscopic studies.

Введение

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) дрожжевых клеток участвует в широком спектре динамических процессов, таких как секреция, поглощение питательных веществ, морфогенез, а также в синтезе и модификации клеточной стенки. Х. Мур и К. Мюлеталер [1] с помощью электронно-микроскопической криофрактографии (в 1960-х гг. это был новый подход) обнаружили в ЦПМ *Saccharomyces cerevisiae* палочковидные инвагинации длиной 300 нм, шириной 20–30 нм и глубиной 50 нм. Вместе с внутримембранными частицами (ВМЧ), которые представляют собой полиферментные комплексы, инвагинации являются основными элементами морфологии ЦПМ дрожжей.

Позже Т. К. Вальтер и его соавторы [2] продемонстрировали связь этих инвагинаций с белками, участвующими в эндоцитозе, и предложили термин «эйзосомы» (от греч. *eis* – вход и *soma* – тело). Последующие исследования на почкующихся дрожжах показали, что эйзосомы не являются местами

эндоцитоза [3–5], но предложенное название сохранилось. Авторы [6] считают, что эйзосомы, содержащие преимущественно белки Pil1 и Lsp1, выступают ключевыми элементами в формировании ЦПМ у дрожжей. Подобные инвагинации (эйзосомы) были обнаружены с помощью электронно-микроскопической криофрактографии у других грибов, ряда красных и зеленых микроводорослей, а также в цистах инфузории *Euplotes* [7].

Некоторые авторы [8; 9] считают, что, подобно кавеолам в клетках животных, эйзосомы у дрожжей служат мембранными резервуарами для увеличения клеточной поверхности в процессе размножения, а также при механическом или гипоосмотическом стрессе. Однако до настоящего времени механизмы увеличения площади дрожжевых ЦПМ остаются непонятными. Несмотря на многочисленные работы по изучению инвагинаций (эйзосом) у грибов и одноклеточных водорослей (см., например, [7]), функции этих образований во многом неясны. Высказывается предположение, что данные структуры представляют собой органеллы без явных физиологических функций. По мнению Дж. Б. Мозли [10], дальнейшие исследования инвагинаций (эйзосом) позволят раскрыть фундаментальные биологические принципы строения клетки и, возможно, ответить на вопросы о том, как происходят сборка и разборка эйзосом и как эти макромолекулярные структуры регулируют состав липидов. Кроме того, исследования инвагинаций (эйзосом) у патогенных грибов могут помочь определить мишени, чувствительные к лекарственным препаратам.

Проанализировав имеющиеся данные об инвагинациях (эйзосомах), мы полагаем, что для понимания смысла их образования в связи с изменением таких физиологических условий, как источники питания, фазы роста и т. д., необходимы дополнительные сведения об ультраструктуре ЦПМ. В настоящей работе представлены результаты сравнительного анализа адаптивных структурных изменений ЦПМ у дрожжей *Candida maltosa*, *Cryptococcus humicola* и *Saccharomycopsis lipolytica*, выращенных на гексадекане, поверхностно-активном веществе лаурокс-9 (эфир лауриновой кислоты и полиэтиленгликоля) и оливковом масле соответственно. Для утилизации этих субстратов клеткам нужны ферменты, которые секретируются и иммобилизуются на внеклеточных структурах.

Материалы и методы исследования

Микробные культуры и условия культивирования. В работе использовались дрожжи *C. maltosa* ВКМ Y-2359, *Cr. humicola* ВКМ Y-2238, *S. lipolytica* ВКМ Y-2015, *C. tropicalis* ВКМ Y-2771, *C. albicans* ВКМ Y-2994 из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Для получения инокулята клетки культивировали при температуре 28 °С в азотно-основной среде для дрожжей (*Difco*, США) с добавлением 1 % глюкозы до стационарной фазы. После промывки фосфатным буфером (pH 6,8) инокулят вносили в среды, содержащие в качестве источника углерода (по 1 % каждый) гексадекан, глюкозу, лаурокс-9 либо оливковое масло (*Sigma Diagnostics*, США) (cat. No. 0-1500), или в так называемую голодную среду, лишенную источника углерода (0,05 моль/л фосфатный буфер (pH 8,0)). Рост культуры определяли по оптической плотности, измеренной на спектрофотометре Spectromom 204 (*MOM*, Венгрия) при длине волны 600 нм.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Осадки клеток, собранные центрифугированием в разные периоды роста, фиксировали в 0,05 моль/л какодилатном буфере (pH 7,2), содержащем 1,5 % глутарового альдегида, при температуре 4 °С в течение 1 ч и постфиксировали в том же буфере, содержащем 1 % OsO₄, при температуре 20 °С в течение 3 ч. После обезвоживания клетки заключали в эпоксидную смолу Epon 812 (*Sigma*, Швейцария). Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме Ultracut E (*Reichert-Jung*, Австрия) с помощью алмазного ножа и идеальной петли (*perfect loop*) и просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (*Jeol*, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Сканирующая электронная микроскопия. Клетки фиксировали сначала в 0,05 моль/л натрий-какодилатном буфере (pH 6,8), содержащем 1,5 % глутарового альдегида, при температуре 4 °С в течение 1 ч, а затем в том же буфере, содержащем 1 % OsO₄, при температуре 20 °С в течение 3 ч. После обезвоживания клетки напыляли золотом с помощью ионного распылителя JFC-1100 (*Jeol*) и исследовали в сканирующем микроскопе JSM-6510LV (*Jeol*).

Электронно-микроскопическая криофрактография. Криофрактографические исследования проводили по методике, описанной в работе [11, с. 49–91]. Образцы в виде микрокапель клеточной суспензии замораживали в жидком пропане при температуре –150 °С и скорости более 10 000 °С в секунду без предварительной химической фиксации и пропитки антифризами. По достижении вакуума $3 \cdot 10^{-6}$ торр и температуры образца –100 °С производили разрыв замороженной капли и выдерживали образец в этих условиях в течение 1 мин (вакуумное травление). Для получения реплик поверхности скола покрывали платиноуглеродной смесью, напыляемой под углом 30° на протяжении 2–3 с, затем распыляли чистый уголь под углом 90° в течение 5–6 с. Для вытравливания органического материала реплики помещали в 40 % хромовую кислоту на 2 ч. После пятикратной промывки в дистиллированной воде реплики исследовали в электронном микроскопе.

Электронно-микроскопическая цитохимия. В ходе электронно-цитохимических исследований выявлялись следующие вещества.

Цитохромы. Для электронно-микроскопического выявления цитохромов клетки предварительно фиксировали 2,5 % глутаровым альдегидом в 0,1 моль/л какодилатном буфере (pH 7,2) при температуре 4 °C в течение 1 ч, затем окрашивали окисленным диаминобензидином по Хираи [12].

Липаза. Электронно-микроскопическое определение локализации липазы проводили по методу Нагаты [13]. Клетки предварительно фиксировали 2,5 % глутаровым альдегидом в 0,1 моль/л какодилатном буфере (pH 7,2) при температуре 4 °C в течение 1 ч, промывали тем же буфером и инкубировали при температуре 37 °C на протяжении 1 ч в среде следующего состава: 0,1 моль/л трис-буфер (pH 7,2) – 5 мл, 10 % CaCl₂ – 2 мл, оливковое масло – 2 мл, дистиллированная вода – 40 мл. После инкубации клетки промывали какодилатным буфером и 2 % ЭДТА в том же буфере, переносили на 30 мин в 0,15 % Pb(NO₃)₂ и затем фиксировали 1 % OsO₄ в 0,1 моль/л какодилатном буфере при температуре 0 °C в течение 2 ч.

Эстеразы лаурос-9. Электронно-цитохимическое исследование локализации гидролаз лаурос-9 в дрожжах проводили по методу Нагаты [13]. Клетки фиксировали 1 % глутаровым альдегидом в 0,1 моль/л какодилатном буфере (pH 7,2) в течение 1 ч. После трехкратной отмывки в какодилатном буфере материал инкубировали при температуре 28 °C в течение 1 ч на средах с Tween 60 (*Sigma-Aldrich*, Германия) или лауросом-9 в качестве субстрата. Затем материал фиксировали 1 % OsO₄ в этом же какодилатном буфере при температуре 0 °C в течение 2 ч.

Аналитические методы исследования. В рамках данного этапа определялись следующие параметры.

Количество лаурос-9. Поверхностно-активное вещество лаурос-9 экстрагировали из культуральной жидкости четыреххлористым углеродом. Его концентрацию определяли методом инфракрасной (ИК) спектроскопии по полосам валентных колебаний связей C=O и C—O—C ($\gamma = 1730 \text{ см}^{-1}$ и $\gamma = 1100 \text{ см}^{-1}$ соответственно). Для записи ИК-спектров использовали спектрометр Specord IR-75 (*Carl Zeiss*, Германия) и неразборные кюветы из бромида калия (KBr) с толщиной поглощающего слоя 0,19 мм. Условия сканирования: время записи – 2,2 мин, масштаб – 400–2000 см⁻¹, усиление – 1.

Липолитическая активность. Липолитическую активность в культуральной жидкости (экзолипазы) определяли по модифицированному методу Оты и Ямады [14] и выражали в объемах 0,05 н. раствора NaOH, израсходованных на титрование образовавшихся жирных кислот.

Статистический анализ. Каждое табличное значение является результатом выборочного усреднения не менее 50 измерений. Данные представлены как среднее значение и стандартное отклонение. Наличие каких-либо статистически значимых различий ($p < 0,05$) между средними значениями исследуемых групп определялось с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Вертикальные планки погрешностей на диаграммах представляют стандартные ошибки среднего значения.

Статистический анализ криофрактографических данных. Для количественного ультраструктурного анализа использовали негативы, экспонированные при увеличении в 25 000 раз. Окончательное увеличение на экране проектора, на котором проводили измерения, составляло 150 000 раз. Для измерений выбирали фрагменты плазмалеммы, параллельные плоскости реплики. Длину инвагинаций измеряли курвиметром. Подсчет плотности ВМЧ на инвагинациях проводили на периплазматической поверхности складок. Стереологический параметр S_{s_n} («складчатость» плазмалеммы), численно равный площади инвагинаций, находящихся на единице площади плазмалеммы, определяли следующим образом. На выбранном для измерений фрагменте изображения наружной поверхности плазмалеммы, площадь которого S_0 не превышала 1 мкм², измеряли общую протяженность инвагинаций $L = \sum_{i=1}^n l_i$, а также подсчитывали число складок n . Значение стереологического параметра S_{s_n} вычисляли по формуле

$$S_{s_n} = \frac{P(L + 0,57nd)}{S_0 + (P - 2d)(L + 0,57nd)},$$

где d – ширина инвагинаций в плане реплики; P – длина поперечного профиля складок (ширина «разглаженной» инвагинации). Параметр P определяли на поперечных сколах клеток. При вычислении S_{s_n} поперечное строение инвагинаций у клеток, принадлежащих одной популяции, считали одинаковым.

Результаты и их обсуждение

Были изучены три физиологические ситуации, при которых первичные этапы утилизации углеродного субстрата у дрожжей происходят с помощью секретрируемых ферментов (экзоферментов).

Дрожжи-аскомицеты *C. maltosa*, утилизирующие гексадекан (ситуация 1). Ранее нами было обнаружено образование в клеточной стенке дрожжей гидрофобных участков, способных утилизировать

углеводороды при замене углеводного субстрата (глюкоза) на углеводородный (гексадекан и др.). Эти гидрофобные участки мы называли каналами [15–17]. Наличие в них высоких концентраций окислительных ферментов и других белков позволило предположить, что каналы являются местами первичного окисления углеводородов. В настоящей работе аналогичное явление наблюдалось в клеточной стенке *C. maltosa* (рис. 1, а–в).

Большинство каналов образовались в лаг-фазе и ранней лог-фазе роста *C. maltosa* на гексадекане. При дальнейшем культивировании количество каналов оставалось относительно постоянным (рис. 2).

С помощью электронно-микроскопической криофрактографии в местах контакта каналов с ЦПМ были выявлены специфические инвагинации (см. рис. 1, а и б; рис. 3, а–в), которые отличаются по морфологии от обычных инвагинаций, описанных у многих видов дрожжей. Они названы нами сферическими инвагинациями. Распределение ВМЧ в этих инвагинациях существенно отличалось от их распределения в остальной части ЦПМ (табл. 1). Как видно из табл. 1, у сферических инвагинаций ВМЧ переходят с внешней (EF) на внутреннюю (PF) поверхность скола по трансмембранному и латеральному типу, в остальной части ЦПМ они перемещаются в обратном направлении: от PF- к EF-поверхности скола.

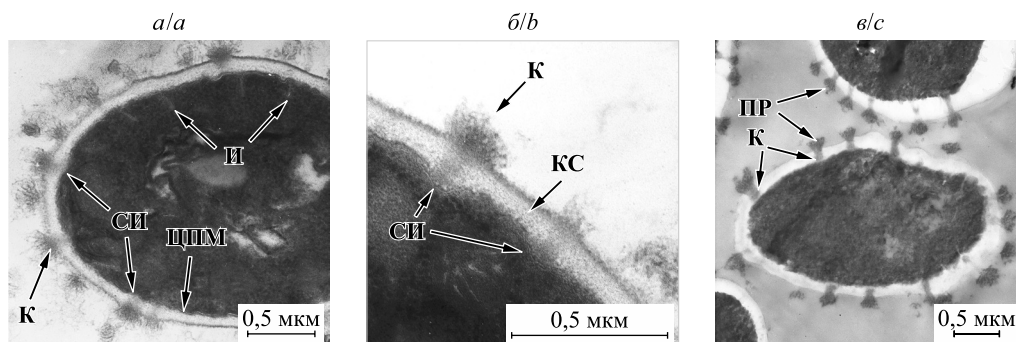


Рис. 1. *C. maltosa*, растущая на гексадекане: а, б – ультратонкие срезы, на которых выявляются каналы в клеточной стенке; в – электронно-цитохимическое определение гемсодержащих окислительных ферментов (клетки окрашивали окисленным диаминобензидином).

Используемые обозначения: И – обычные (палочковидные) инвагинации;
СИ – сферические инвагинации; ЦПМ – цитоплазматическая мембрана;
К – каналы в клеточной стенке; КС – клеточная стенка; ПР – продукт реакции

Fig. 1. *C. maltosa* growing on hexadecane: а, b – ultrathin sections, which reveal canals in the cell wall; c – electron cytochemical detection of heme-containing oxidative enzymes (the cells were stained with oxidised diaminobenzidine).

Designations: И – usual (rod-shaped) invaginations; СИ – spherical invaginations;
ЦПМ – cytoplasmic membrane; К – canals in the cell wall; КС – cell wall; ПР – product of reaction

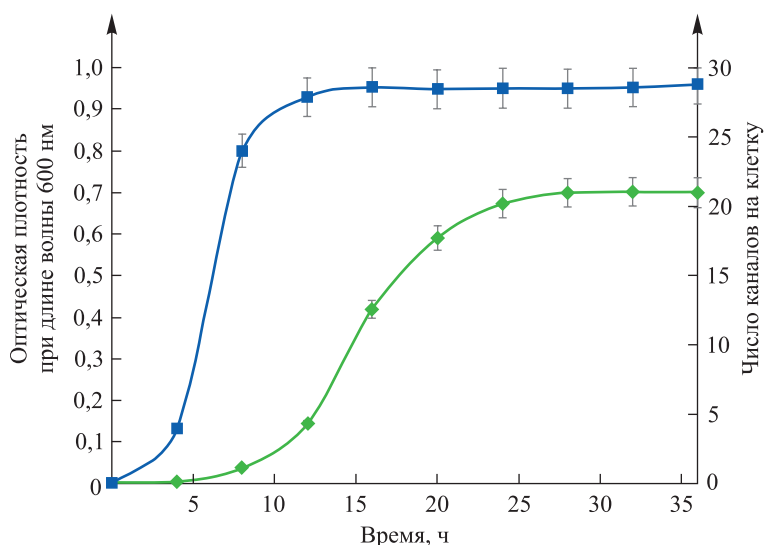


Рис. 2. Динамика формирования каналов (синяя линия) в процессе роста *C. maltosa* на гексадекане (зеленая линия)

Fig. 2. The dynamics of canal formation (blue line) during growth of *C. maltosa* on hexadecane (green line)

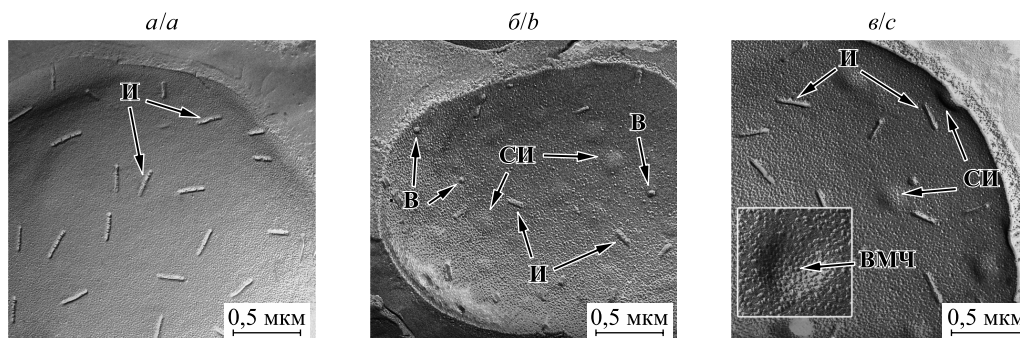


Рис. 3. Углеродно-платиновые реплики криосколов *C. maltosa*:
а – при выращивании на среде с глюкозой в качестве источника углерода;
б – через 2 ч культивирования на гексадекане; в – углеродно-платиновая реплика скола ЦПМ, на которой видны обычные и сферические инвагинации, на увеличенном фрагменте заметны ВМЧ.
Используемые обозначения: И – обычные (палочковидные) инвагинации;
СИ – сферические инвагинации; В – везикулы; ВМЧ – внутримембранные частицы

Fig. 3. Carbon-platinum replica of *C. maltosa* freeze fracture:
а – growth in the medium supplied with glucose as the carbon source;
б – the first 2 h of cultivation on hexadecane; в – carbon-platinum replica of the cytoplasmic membrane freeze fracture, which shows the usual and spherical invaginations, the enlarged fragment shows the intramembrane particles.
Designations: И – usual (rod-shaped) invaginations;
СИ – spherical invaginations; В – vesicles; ВМЧ – intramembrane particles

Таблица 1

Плотность ВМЧ на EF- и PF-поверхностях скола плазмалеммы *C. maltosa*
в зависимости от источника углерода, частиц на 1 мкм²

Table 1

Density of IMP intramembrane particles on the EF (outer) and PF (inner) surfaces
of the freeze fracture of *C. maltosa* plasmalemma depending on the carbon source, particles per 1 μm²

Источник углерода	EF-поверхность		PF-поверхность	
	Гладкая поверхность	Сферическая инвагинация	Гладкая поверхность	Сферическая инвагинация
Углеводороды	1410 ± 176	691 ± 102 (с учетом кривизны поверхности)	3210 ± 155	3550 ± 117 (с учетом кривизны поверхности)
Глюкоза	680 ± 136	–	4700 ± 312	–

Принимая во внимание тот факт, что сферические инвагинации и каналы образуют единую структуру, участвующую в первичной модификации углеводородного субстрата, можно предположить, что в этих зонах оболочки дрожжей активация секреторных процессов происходит уже в первые часы культивирования. Установлено, что везикулы в ЦПМ *C. maltosa* (согласно своему размеру отнесенные к секреторным везикулам) появлялись спустя 2 ч культивирования на гексадекане (см. рис. 3, б).

Как видно из рис. 4, при дальнейшем культивировании по мере увеличения числа сферических инвагинаций в ЦПМ количество везикул уменьшалось, т. е. наблюдалась обратная корреляция. Это может свидетельствовать о том, что формирование таких сложных структур (сферические инвагинации плюс каналы) завершается примерно в течение 10–12 ч. Мы предполагаем, что в ЦПМ дрожжей сферические инвагинации образуются за счет встраивания в нее мембран секреторных везикул (рис. 5).

Интересным открытием был тот факт, что модифицированные участки клеточной оболочки, ранее описанные нами как каналы, наблюдались и у условно-патогенных видов дрожжей *C. albicans* и *C. tropicalis* при росте на углеводородах (рис. 6, а–в). Сравнительный электронно-микроскопический анализ позволил обнаружить очевидное сходство структурных признаков у дрожжей, выращиваемых на углеводородах, и у патогенных дрожжей, описанных в работе [18] (см. рис. 6, г). Каналоподобные структуры, именуемые авторами статьи [18] *cell wall pimples* (CWP), были обнаружены у клеток *C. albicans* WO-1, выделенных из крови и легких пациента с иммуносупрессией.

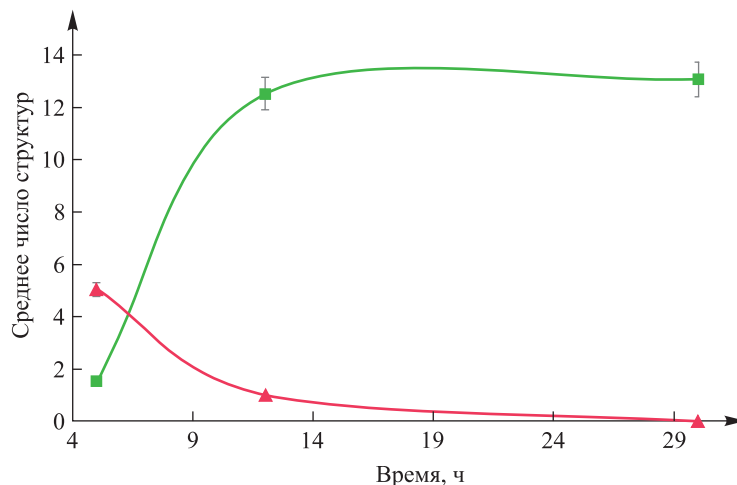


Рис. 4. Динамика образования везикул (красная линия) и сферических инвагинаций (зеленая линия) у *C. maltosa* при культивировании на гексадекане

Fig. 4. Dynamics of the formation of vesicles (red line) and spherical invaginations (green line) in *C. maltosa* when cultured on hexadecane

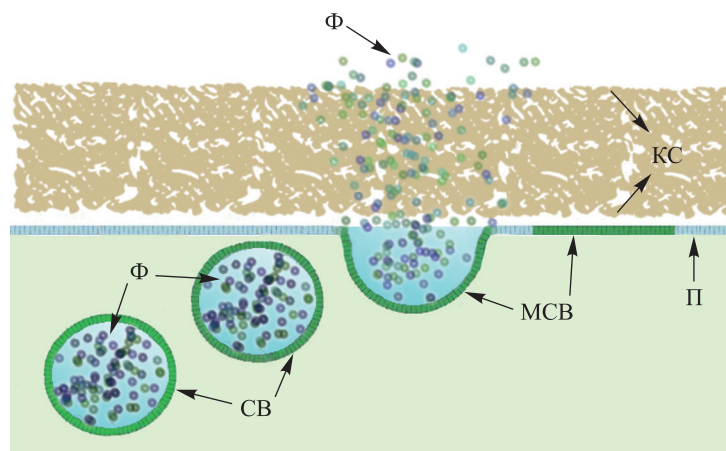


Рис. 5. Схема увеличения площади дрожжевой ЦПМ за счет встраивания секреторных везикул: Ф – ферменты; СВ – секреторные везикулы; МСВ – мембраны секреторных везикул; П – плазматическая мембрана; КС – клеточная стенка

Fig. 5. Scheme of increasing the area of the yeast cytoplasmic membrane by embedding of secretory vesicles: Ф – enzymes; СВ – secretory vesicles; МСВ – membranes of secretory vesicles; П – plasma membrane; КС – cell wall

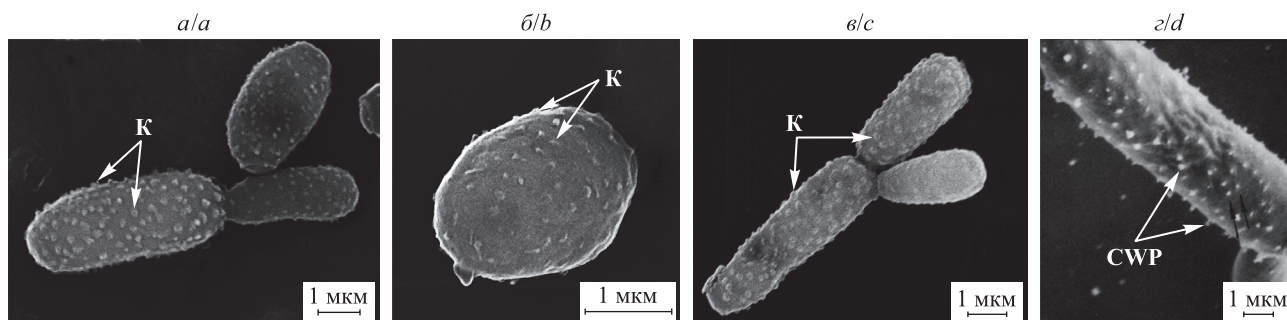


Рис. 6. Сканирующая электронная микроскопия: а – *C. maltosa* при росте на гексадекане; б – *C. albicans* при росте на гексадекане; в – *C. tropicalis* при росте на гексадекане; г – *C. albicans* в условиях патогенеза (фотография взята из статьи [18]).

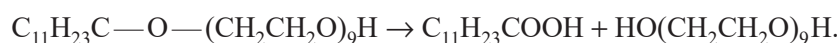
Используемые обозначения: К – каналы; CWP – каналоподобные структуры клеточной стенки

Fig. 6. Scanning electron microscopy: а – *C. maltosa* grown on hexadecane; б – *C. albicans* grown on hexadecane; в – *C. tropicalis* grown on hexadecane; д – *C. albicans* in pathogenesis (the photo from the article [18]). Designations: К – canals; CWP – canal-like structures of the cell wall

Обнаружение структур, подобных каналам, у дрожжей в условиях патогенеза позволило сделать предположение об универсальности каналов, функционирующих как матрица для иммобилизации и секреции ферментов и других белков, необходимых дрожжевым клеткам в определенных физиологических ситуациях. В случае утилизации углеводов в каналах выявлены окислительные ферменты, что предполагает участие этих структур в первичных этапах метаболизма углеводов. Вероятно, каналы у условно-патогенных дрожжей могут участвовать в процессах адгезии и инвазии при патогенезе. Дальнейшее изучение участия каналов в переходе дрожжей в патогенное состояние может помочь в понимании механизмов этого явления.

Дрожжи-базидиомикеты *Cr. humicola* при росте на лауроксе-9 (ситуация 2). В данном случае исследовался процесс утилизации лаурокса-9 базидиомикетными дрожжами *Cr. humicola* в качестве источника углерода.

Молекула лаурокса-9 состоит из лауриновой кислоты и полиэтиленгликоля, связанных между собой сложноэфирной связью. Ранее установлено, что первой стадией разрушения лаурокса-9 является внеклеточный ферментативный гидролиз связи C—O в фрагменте C(O)—O с образованием лауриновой кислоты и полиэтиленгликоля [19]:



Динамика использования лаурокса-9 в качестве источника углерода в процессе роста культуры представлена на рис. 7.

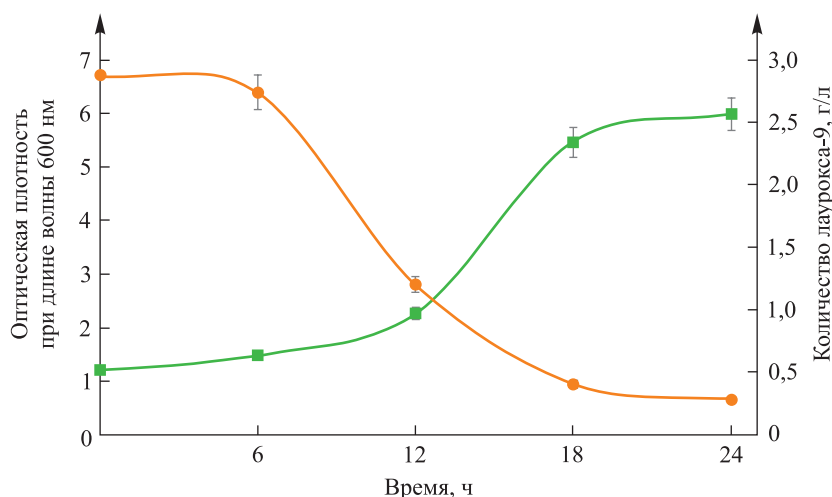


Рис. 7. Динамика утилизации лаурокса-9 (оранжевая линия) клетками *Cr. humicola* в процессе роста (зеленая линия)

Fig. 7. The dynamics of the utilisation of laurox-9 (orange line) by *Cr. humicola* in the process of growth (green line)

Электронно-микроскопическая криофрактография выявила образование карманоподобных инвагинаций в ЦПМ *Cr. humicola* в первые часы инкубации клеток в среде с лауроком-9 (рис. 8, а), которые исчезали при дальнейшем культивировании. При этом обычные (палочковидные) инвагинации, характерные для многих дрожжей, у *Cr. humicola* не обнаруживались ни при каких условиях. Следует отметить, что в лог-фазе роста клеток *Cr. humicola* в среде с лауроком-9 (рис. 8, б) значительно увеличивалась сеть их экзоцеллюлярных компонентов. Электронно-микроскопическая цитохимическая реакция на гидролазы выявила локализацию продукта реакции на этих компонентах (рис. 8, в).

Мы предполагаем, что образование карманоподобных инвагинаций связано с увеличением (возможно, избыточным) общей площади ЦПМ при активации секреторно-везикулярных процессов в ходе адаптивной модификации клеточной стенки, а также с транспортом гидролаз на экзоцеллюлярные компоненты клеток.

Сравнительная характеристика количества ВМЧ в клетках *Cr. humicola*, растущих на глюкозе и лауроке-9, показывает, что при адаптации к росту на лауроке-9 их ЦПМ претерпевает глубокие адаптивные структурные перестройки: количество ВМЧ значительно возрастает на обеих поверхностях (ЕФ и РФ) криоскола (табл. 2).

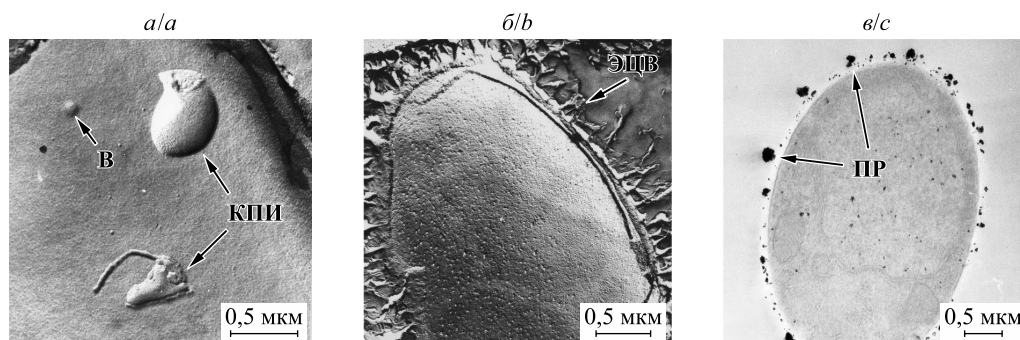


Рис. 8. *Cr. humicola*, выращенная на среде с лауроком-9:
а – криоскол ЦПМ через 2 ч культивирования; б – криоскол ЦПМ клеток *Cr. humicola* в лог-фазе роста;
в – электронно-микроскопическая цитохимическая реакция на гидролазы в клетках *Cr. humicola* в лог-фазе роста.
Используемые обозначения: КПИ – карманоподобные инвагинации; В – везикулы;
ЭЦВ – экзоцеллюлярное вещество; ПР – продукт реакции на гидролазу

Fig. 8. *Cr. humicola* growing in the medium with laurox-9:
а – freeze fracture of cytoplasmic membrane after 2 h of cultivation;
b – freeze fracture of cytoplasmic membrane of the cells taken from the log-phase of growth;
c – electron microscopic cytochemical reaction for hydrolases in the cells taken from the log-phase of growth.
Designations: КПИ – pocket-like invaginations; В – vesicles;
ЭЦВ – exocellular substance; ПР – reaction product for hydrolase

Таблица 2

Плотность ВМЧ
на EF- и PF-поверхностях скола плазмалеммы *Cr. humicola*
в зависимости от источника углерода, частиц на 1 мкм²

Table 2

Density of intramembrane particles
on the EF and PF surfaces of the freeze fracture of *Cr. humicola*
plasmalemma depending on the carbon source, particles per 1 μm²

Источник углерода	EF-поверхность	PF-поверхность
Глюкоза	898 ± 164	2328 ± 295
Лаурокс-9	1142 ± 235	3953 ± 305

Дрожжи *S. lipolytica* при росте на среде с оливковым маслом в качестве источника углерода (ситуация 3). В этом варианте опытов изучались ультраструктурные изменения ЦПМ *S. lipolytica* в связи с секрецией липазы. *S. lipolytica* была выбрана за ее способность проявлять высокую экзолипазную активность при выращивании в присутствии оливкового масла как источника углерода. Активность экзолипазы была максимальной к концу лог-фазы роста. В этих условиях для нейтрализации образовавшихся жирных кислот в культуральную жидкость необходимо было добавить 9 мл 0,05 н. NaOH, тогда как в случае клеток, лишенных экзоцеллюлярного вещества, для нейтрализации этих кислот требовалось всего 2,6 мл 0,05 н. NaOH.

Электронно-микроскопическая криофрактография *S. lipolytica* в первые 2–3 ч после переноса в среду с оливковым маслом (лаг-фаза) выявила активные перестройки в ЦПМ, а именно образование большого количества везикул различного диаметра и переходных форм инвагинаций (рис. 9, а). В процессе дальнейшего культивирования (лог-фаза) структура инвагинаций становилась более четкой и на поверхности клеток появлялось значительное количество экзоцеллюлярного вещества (рис. 9, б). Электронно-микроскопическое определение активности липазы показало, что продукт реакции с липазой был локализован в экзоцеллюлярном веществе, а также инвагинациях ЦПМ (рис. 9, в).

Мы предположили, что инвагинации ЦПМ могут быть связаны с секрецией липазы. Был проведен сравнительный анализ ультраструктуры ЦПМ *S. lipolytica* при высокой экзолипазной активности клеток и при ее снижении до нуля после переноса липолитически активных клеток *S. lipolytica* в 0,05 моль/л фосфатный буфер (рН 8,0), т. е. в так называемые условия голодания (табл. 3). Многочисленные (до 80 % от общего числа инвагинаций) короткие (длиной около 200 нм) инвагинации, появляющиеся при высокой экзолипазной активности *S. lipolytica* (см. рис. 9, б), значительно удлинялись в условиях голодания (рис. 9, г).

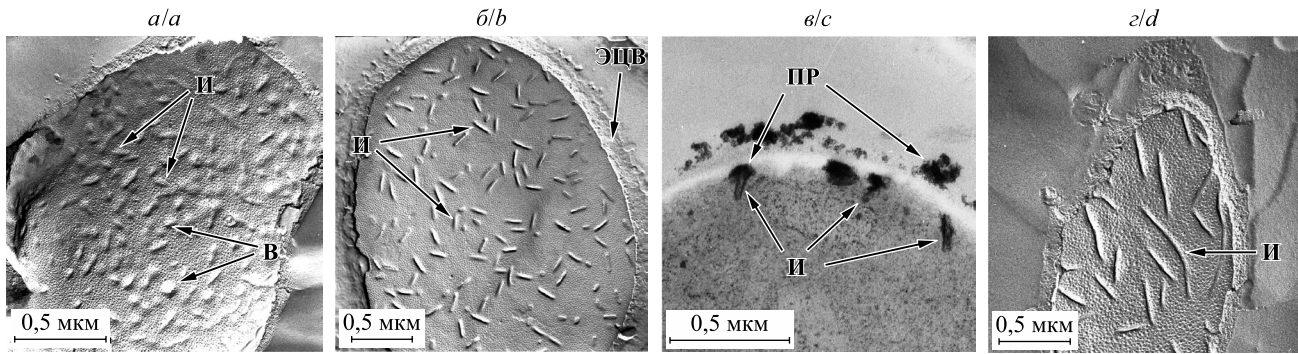


Рис. 9. Криофрактография скола ЦПМ *S. lipolytica* и цитохимическое выявление липазы:
а, б – лаг- и лог-фазы роста *S. lipolytica* соответственно;
в – электронно-микроскопическое цитохимическое определение активности липазы;
г – скол *S. lipolytica* при отсутствии питательных веществ (условия голодания).
Используемые обозначения: И – обычные (палочковидные) инвагинации;
В – везикулы; ПР – продукт реакции на липазу; ЭЦВ – экзоцеллюлярное вещество

Fig. 9. Cryofractography of the fracture of *S. lipolytica* cytoplasmic membrane and cytochemical detection of lipase:
а, б – lag and log growth phases of *S. lipolytica* respectively;
с – electron microscopic cytochemical determination of lipase activity;
д – *S. lipolytica* fracture in the absence of nutrients (starvation conditions).
Designations: И – ordinary (rod-shaped) invaginations;
В – vesicles;
ПР – reaction product for lipase; ЭЦВ – exocellular substance

Таблица 3

**Характеристика инвагинаций плазмалеммы
S. lipolytica в зависимости от состояния клеток**

Table 3

**Characteristics of *S. lipolytica* plasmalemma
invaginations depending on the state of the cells**

Состояние клеток	Размер инвагинаций, нм	
	Длина	Ширина
Липолитическая активность	106 ± 23	19 ± 3
Голод	307 ± 137	17 ± 2

Было обнаружено, что при высокой липолитической активности *S. lipolytica* количество ВМЧ значительно выше на РР-поверхности скола (табл. 4).

Таблица 4

**Плотность ВМЧ в плазмалемме *S. lipolytica*
в зависимости от состояния клеток**

Table 4

**Density of intramembrane particles in the plasmalemma
of *S. lipolytica* depending on the state**

Состояние клеток	Плотность ВМЧ, частиц на 1 мкм ²	
	ЕФ-поверхность	РР-поверхность
Липолитическая активность	698 ± 83	2750 ± 254
Голод	399 ± 67	2411 ± 150

Вероятно, более высокая плотность ВМЧ и преобладание коротких инвагинаций связаны с высокой экзолитической активностью. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что при отсутствии экзолитической активности в условиях голодания увеличивается сворачивание ЦПМ и снижается плотность ВМЧ. Эти факты, а также наличие удлиненных инвагинаций можно считать структурным эквивалентом снижения метаболической активности мембраны.

Заключение

Показаны три типа ультраструктурных изменений ЦПМ в зависимости от физиологического состояния дрожжевых клеток, что свидетельствует о лабильности и полифункциональности этого клеточного аппарата. Во всех трех рассмотренных физиологических ситуациях культивирования ростовые субстраты утилизируются внеклеточно с помощью ферментов, секретируемых и транспортируемых на внеклеточные компоненты дрожжей по известному везикулярному механизму [20]. При этом мембраны секреторных везикул встраиваются в ЦПМ, увеличивая тем самым ее площадь (см. рис. 5). Мы полагаем, что дрожжи формируют специфические инвагинации в результате переизбытка ЦПМ в замкнутом пространстве, ограниченном клеточной стенкой.

В ситуации 1 указанный тип структурных изменений ЦПМ в случае утилизации углеводов связан с формированием в дрожжевой оболочке модифицированного участка, состоящего из сферической инвагинации, канала клеточной стенки с экзоцеллюлярными компонентами, выступающими за пределы клетки. В данном случае сферические инвагинации, функционально связанные с клеточной стенкой, входят в структуры, названные нами трофосомами [15]. Трофосомы – это субстратзависимые структуры, существующие во время всего процесса утилизации углеводов. К такому типу структурных изменений оболочки можно отнести образование каналов у условно-патогенных дрожжей при росте на углеводородах и формирование каналоподобных структур у дрожжей при патогенезе. Однако последнее утверждение требует дополнительных исследований.

В ситуации 2 крупные карманоподобные инвагинации ЦПМ появлялись только в первые часы культивирования (лаг-фаза) и исчезали в дальнейшем. Это указывает на то, что данные инвагинации не участвуют в гидролизе лаурокса-9. Мы предполагаем, что образование этих инвагинаций связано со структурно-приспособительными перестройками клеточной оболочки при адаптации дрожжей к утилизации лаурокса-9. Эти перестройки обусловлены модификацией клеточной стенки и образованием внеклеточных компонентов, на которых иммобилизованы ферменты гидролиза лаурокса-9. Активация секреторных процессов приводит к временному увеличению площади ЦПМ.

В ситуации 3 везикулярный аппарат клеток активизировался в первые часы культивирования дрожжей в среде с оливковым маслом. Это вполне естественно, так как для утилизации данного субстрата необходим комплекс экзоферментов. Электронно-микроскопическая цитохимическая реакция на липазу выявила локализацию продукта реакции на экзоцеллюлярных компонентах и в инвагинациях ЦПМ. Об участии инвагинаций в утилизации оливкового масла свидетельствуют значительные структурные перестройки ЦПМ, такие как удлинение инвагинаций и снижение плотности ВМЧ, происходящие в ответ на изменение физиологических условий – переход клеток в состояние покоя или голодания, когда ферменты не секретируются.

Таким образом, на основании цитобиохимических и морфометрических данных впервые показана значительная вариабельность морфологии ЦПМ у дрожжей в различных физиологических ситуациях. Были обнаружены три типа адаптивных структурно-функциональных перестроек ЦПМ. Мы предполагаем, что эти изменения обусловлены активизацией секреторных процессов, приводящих к увеличению площади ЦПМ. Полученные данные не только расширяют представление об адаптивных перестройках дрожжевых клеток, но и могут иметь практическое значение, например в терапии микозов, вызванных дрожжевыми организмами [21].

Библиографические ссылки

1. Moor H, Mühlethaler K. Fine structure in frozen-etched yeast cells. *Journal of Cell Biology*. 1963;17(3):609–628. DOI: 10.1083/jcb.17.3.609.
2. Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*. 2006; 439(7079):998–1003. DOI: 10.1038/nature04472.
3. Grossmann G, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer WB, et al. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *Journal of Cell Biology*. 2008;183(6):1075–1088. DOI: 10.1083/jcb.200806035.
4. Brach T, Specht T, Kaksonen M. Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *Journal of Cell Science*. 2011;124(3):328–337. DOI: 10.1242/jcs.078519.
5. Murphy ER, Boxberger J, Colvin R, Lee SJ, Zahn G, Loo F, et al. Pil1, an eisosome organizer, plays an important role in the recruitment of synaptojanins and amphiphysins to facilitate receptor-mediated endocytosis in yeast. *European Journal of Cell Biology*. 2011;90(10):825–833. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.06.006.
6. Olivera-Couto A, Salzman V, Mailhos M, Digman MA, Gratton E, Aguilar PS. Eisosomes are dynamic plasma membrane domains showing Pil1-Lsp1 heteroligomer binding equilibrium. *Biophysical Journal*. 2015;108(7):1633–1644. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.02.011.
7. Lee J-H, Heuser JE, Roth R, Goodenough U. Eisosome ultrastructure and evolution in fungi, microalgae, and lichens. *Eukaryotic Cell*. 2015;14(10):1017–1042. DOI: 10.1128/EC.00106-15.
8. Douglas L, Konopka JB. Fungal membrane organization: the eisosome concept. *Annual Review of Microbiology*. 2014;68: 377–393. DOI: 10.1146/annurev-micro-091313-103507.
9. Kabeche R, Howard L, Moseley JB. Eisosomes provide membrane reservoirs for rapid expansion of the yeast plasma membrane. *Journal of Cell Science*. 2015;128(22):4057–4062. DOI: 10.1242/jcs.176867.
10. Moseley JB. Eisosomes. *Current Biology*. 2018;28(8):R376–R378. DOI: 10.1016/j.cub.2017.11.073.
11. Фихте БА, Заичкин ЭИ, Ратнер ЕН. Новые методы физического препарирования биологических объектов для электронно-микроскопических исследований (криофрактография и ионное травление). Москва: Наука; 1973. 148 с.

12. Hirai K-I. Comparison between 3,3'-diaminobenzidine and auto-oxidized 3,3'-diaminobenzidine in the cytochemical demonstration of oxidative enzymes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1971;19(7):434–442. DOI: 10.1177/19.7.434.
13. Nagata T. Lipase. In: Nayat MA, editor. *Electron microscopy of enzymes. Volume 2. Principles and methods*. New York: Van Nostrand Reinhold; 1974. p. 132–148.
14. Ota Y, Yamada K. Lipase from *Candida parailipolytica*. Part I. Anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyl alcohol. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1966;30(4):351–358. DOI: 10.1080/00021369.1966.10858605.
15. Dmitriev VV, Crowley DE, Rogachevsky VV, Negri CM, Rusakova TG, Kolesnikova SA, et al. Microorganisms form exocellular structures, trophosomes, to facilitate biodegradation of oil in aqueous media. *FEMS Microbiology Letters*. 2011;315(2):134–140. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02184.x.
16. Dmitriev VV, Crowley DE, Zvonarev AN, Rusakova TG, Negri MC, Kolesnikova SA. Modifications of the cell wall of yeasts grown on hexadecane and under starvation conditions. *Yeast*. 2016;33(2):55–62. DOI: 10.1002/yea.3140.
17. Zvonarev AN, Crowley DE, Ryazanova LP, Lichko LP, Rusakova TG, Kulakovskaya TV, et al. Cell wall canals formed upon growth of *Candida maltosa* in the presence of hexadecane are associated with polyphosphates. *FEMS Yeast Research*. 2017;17(3):fox026. DOI: 10.1093/femsyr/fox026.
18. Anderson J, Mihalik R, Soll DR. Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. *Journal of Bacteriology*. 1990;172(1):224–235. DOI: 10.1128/jb.172.1.224-235.1990.
19. Дмитриев ВВ, Бибикина ИИ, Офицеров ЕН, Наумова РП. О дрожжах, утилизирующих поверхностно-активное вещество лаурокс-9. *Микробиология*. 1988;57(2):223–230.
20. Bonifacino JS. Vesicular transport earns a Nobel. *Trends in Cell Biology*. 2014;24(1):3–5. DOI: 10.1016/j.tcb.2013.11.001.
21. Дмитриев ВВ, Звонарев АН, Русакова ТГ. Роль поверхностных и экзоцеллюлярных структур в адаптации микроорганизмов к экстремальным факторам внешней среды. *История науки и техники*. 2020;12:30–43. DOI: 10.25791/intstg.12.2020.1245.

References

1. Moor H, Mühlethaler K. Fine structure in frozen-etched yeast cells. *Journal of Cell Biology*. 1963;17(3):609–628. DOI: 10.1083/jcb.17.3.609.
2. Walther TC, Brickner JH, Aguilar PS, Bernales S, Pantoja C, Walter P. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*. 2006;439(7079):998–1003. DOI: 10.1038/nature04472.
3. Grossmann G, Malinsky J, Stahlschmidt W, Loibl M, Weig-Meckl I, Frommer WB, et al. Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *Journal of Cell Biology*. 2008;183(6):1075–1088. DOI: 10.1083/jcb.200806035.
4. Brach T, Specht T, Kaksonen M. Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *Journal of Cell Science*. 2011;124(3):328–337. DOI: 10.1242/jcs.078519.
5. Murphy ER, Boxberger J, Colvin R, Lee SJ, Zahn G, Loo F, et al. Pil1, an eisosome organizer, plays an important role in the recruitment of synaptojanins and amphiphysins to facilitate receptor-mediated endocytosis in yeast. *European Journal of Cell Biology*. 2011;90(10):825–833. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.06.006.
6. Olivera-Couto A, Salzman V, Mailhos M, Digman MA, Gratton E, Aguilar PS. Eisosomes are dynamic plasma membrane domains showing Pil1-Lsp1 heteroligomer binding equilibrium. *Biophysical Journal*. 2015;108(7):1633–1644. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.02.011.
7. Lee J-H, Heuser JE, Roth R, Goodenough U. Eisosome ultrastructure and evolution in fungi, microalgae, and lichens. *Eukaryotic Cell*. 2015;14(10):1017–1042. DOI: 10.1128/EC.00106-15.
8. Douglas L, Konopka JB. Fungal membrane organization: the eisosome concept. *Annual Review of Microbiology*. 2014;68:377–393. DOI: 10.1146/annurev-micro-091313-103507.
9. Kabeche R, Howard L, Moseley JB. Eisosomes provide membrane reservoirs for rapid expansion of the yeast plasma membrane. *Journal of Cell Science*. 2015;128(22):4057–4062. DOI: 10.1242/jcs.176867.
10. Moseley JB. Eisosomes. *Current Biology*. 2018;28(8):R376–R378. DOI: 10.1016/j.cub.2017.11.073.
11. Fikhte BA, Zaichkin EI, Ratner EN. *Novye metody fizicheskogo preparirovaniya biologicheskikh ob'ektov dlya elektronno-mikroskopicheskikh issledovaniy (kriofraktografiya i ionnoe travlenie)* [New methods of the physical preparation of biological objects for electron microscopic investigations (cryofractography and ion etching)]. Moscow: Nauka; 1973. 148 p. Russian.
12. Hirai K-I. Comparison between 3,3'-diaminobenzidine and auto-oxidized 3,3'-diaminobenzidine in the cytochemical demonstration of oxidative enzymes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1971;19(7):434–442. DOI: 10.1177/19.7.434.
13. Nagata T. Lipase. In: Nayat MA, editor. *Electron microscopy of enzymes. Volume 2. Principles and methods*. New York: Van Nostrand Reinhold; 1974. p. 132–148.
14. Ota Y, Yamada K. Lipase from *Candida parailipolytica*. Part I. Anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyl alcohol. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1966;30(4):351–358. DOI: 10.1080/00021369.1966.10858605.
15. Dmitriev VV, Crowley DE, Rogachevsky VV, Negri CM, Rusakova TG, Kolesnikova SA, et al. Microorganisms form exocellular structures, trophosomes, to facilitate biodegradation of oil in aqueous media. *FEMS Microbiology Letters*. 2011;315(2):134–140. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02184.x.
16. Dmitriev VV, Crowley DE, Zvonarev AN, Rusakova TG, Negri MC, Kolesnikova SA. Modifications of the cell wall of yeasts grown on hexadecane and under starvation conditions. *Yeast*. 2016;33(2):55–62. DOI: 10.1002/yea.3140.
17. Zvonarev AN, Crowley DE, Ryazanova LP, Lichko LP, Rusakova TG, Kulakovskaya TV, et al. Cell wall canals formed upon growth of *Candida maltosa* in the presence of hexadecane are associated with polyphosphates. *FEMS Yeast Research*. 2017;17(3):fox026. DOI: 10.1093/femsyr/fox026.
18. Anderson J, Mihalik R, Soll DR. Ultrastructure and antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* opaque phenotype. *Journal of Bacteriology*. 1990;172(1):224–235. DOI: 10.1128/jb.172.1.224-235.1990.
19. Dmitriev VV, Bibikova II, Ofitserov EN, Naumova RP. [Yeast that utilizes the surfactant laurox-9]. *Mikrobiologiya*. 1988;57(2):223–230. Russian.
20. Bonifacino JS. Vesicular transport earns a Nobel. *Trends in Cell Biology*. 2014;24(1):3–5. DOI: 10.1016/j.tcb.2013.11.001.
21. Dmitriev VV, Zvonarev AN, Rusakova TG. The role of surface and exocellular structures of microorganisms in their adaptation to extreme environments. *History of Science and Engineering*. 2020;12:30–43. Russian. DOI: 10.25791/intstg.12.2020.1245.