

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И ГЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТОКСИНОПРОДУКЦИИ ТИПИЧНЫХ И АТИПИЧНЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В СТРЕССОВЫХ УСЛОВИЯХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Сизова Ю.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Черепяхина И.Я., Бурлакова О.С.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, e-mail: yuisa@mail.ru

С появлением генетически измененных вариантов холерных вибрионов возник вопрос о диапазоне variability фенотипических и генотипических проявлений токсинопродукции у типичных и атипичных по генотипу вариантов холерных вибрионов. С учетом актуальности проблемы проведены опыты по оценке влияния стрессовых условий, с которыми вибрионы сталкиваются в окружающей среде, на способность к продукции холерогена. В результате проведенных исследований было показано, что токсигенные холерные вибрионы могут сохраняться в воде открытых водоемов при температуре 22⁰C-24⁰C достаточно продолжительный срок с сохранением продукции холерного токсина, при понижении температуры до 10⁰C и ниже уровни токсинопродукции снижаются вплоть до отрицательных значений. Установлено, что гены *ctxAB* обнаруживаются в ПЦР до тех пор, пока в популяции исследуемых штаммов сохраняются живые вибрионы, при этом изменений в популяции клеток вибрионов, связанных с утратой профага *CTXφ*, а также других значимых участков генома после низкотемпературного стресса в наших экспериментах не отмечено, что подтверждается в полногеномном секвенировании и INDEL-типировании исходных и стрессированных культур и говорит о стабильности генома холерных вибрионов в указанных условиях.

Ключевые слова: токсинопродукция, холерный вибрион, атипичные штаммы.

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC ANALYSIS OF TOXINPRODUCTION OF TYPICAL AND ATYPICAL STAMPS OF VIBRIO CHOLERAЕ IN STRESS ENVIRONMENTAL CONDITIONS

Sizova U.V., Pisanov R.V., Vodopyanov A.S., Cherepakhina I.J., Burlakova O.S.

The Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Federal Agency on Consumer Rights Protection and Human Welfare Supervision, Rostov-on-Don, e-mail: yuisa@mail.ru

With the advent of genetically altered variants of *V.cholerae*, the question arose about the range of variability of phenotypic and genotypic manifestations of toxin production in typical and atypical variants of *V.cholerae*. In view of the urgency of the problem, experiments have been conducted to assess the effect of stress conditions with which vibrios encounter in the environment the ability to produce cholero-gen. As a result of the conducted studies, it was shown that toxigenic *V.cholerae* can persist in the water of open reservoirs at a temperature of 22⁰C-24⁰C for a sufficiently long period, while preserving the production of cholera toxin, while lowering the temperature to 10⁰C and lower toxin production levels down to negative values. It has been established that *ctxAB* genes are detected in PCR as long as living vibrios are retained in the population of the strains under study, and no changes in the population of vibrio cells associated with the loss of *CTXφ* prophage and other significant regions of the genome after low-temperature stress have been observed in our experiments, Which is confirmed in the full genomic sequencing and INDEL-typing of the initial and stressed cultures and speaks of the stability of the genome of *V.cholerae* under the indicated conditions.

Keywords: toxinproduction, *Vibrio cholerae*, atypical stamps.

С учетом изменений условий существования холерных вибрионов при смене экологической ниши обитания вопрос о стабильности их генома в условиях стресса остается в настоящее время весьма актуальным, особенно в области признаков, касающихся эпидемической значимости возбудителя холеры. Установлено, что вся эволюция *V.cholerae* обеспечивается присутствием в геноме мобильных генетических элементов: профагов (*CTXφ*, *RS1φ*), островов пандемичности (*VSP-I* и *VSP-II*) и патогенности (*VPI-1* и *VPI-2*), а также транспозонов и IS-элементов [4,10,13]. Благодаря данным структурам, в конце

прошлого столетия появились генетически измененные варианты *V. cholerae* биовара Эль Тор с повышенной вирулентностью (так называемые «гибридные» или «атипичные»), несущие в своем геноме ген *ctxB1*, присущий холерным вибрионам классического биовара. Такие вибрионы с 2001 г. полностью вытеснили типичные штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор на территории ряда стран Южной Азии (Непал, Индия, Бангладеш, Шри Ланка) и Африки (Мозамбик, Нигерия, Камерун). В 1994 году «атипичные» («гибридные») штаммы вызвали эпидемию холеры в Дагестане, а в 2010–2011 гг. – на о. Гаити [3,10,14]. Однако, несмотря на высокую адаптивную способность холерных вибрионов, не решен вопрос: какие условия требуются для появления и закрепления изменений в геноме возбудителя. Между тем такие сведения крайне необходимы для оптимизации эпидемиологического надзора.

Цель исследования: изучение влияния ряда стрессоров, действию которых вибрионы подвергаются в окружающей среде, на токсинопродукцию.

Материалы и методы: в работе использовали 13 эпидемически значимых штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор (3 – типичные: *ctxAB3*, *rstR^{ElTor}*, 10 – атипичные: *ctxAB1*, *rstR^{ElTor}*) и 2 штамма классического биовара, содержащих гены *ctxAB1*, *rstR^{Class}*.

Для решения поставленных задач холерные вибрионы инкубировали в стерильной речной воде (конечная концентрация $1 \cdot 10^7$ м.к./мл) при $+4^{\circ}\text{C}$ и при $+22^{\circ}\text{C}$ в течение нескольких месяцев, а также (при моделировании условий пребывания возбудителя холеры в речной воде в летнее, осеннее, зимнее время) эксперимент продолжали 2 месяца при 22°C , 2 месяца – при 10°C , 5 месяцев – при 4°C при сниженном содержании кислорода (в речной воде оно составляет около 1 %). Ежемесячно производили высевы на агар Мартена для определения выживаемости холерных вибрионов. Выжившие в условиях стресса клетки культивировали по методике М. Iwanaga [12] для определения продукции холерогена в супернатантах в GM₁-ИФА с антитоксической сывороткой, полученной путем иммунизации кроликов по специально разработанной нами схеме, в рабочем разведении 1×20000 . Результаты оценивали при титрации супернатантов по следующей схеме: низкий уровень токсинопродукции – титр в GM₁-ИФА 1/2-1/20, средний уровень – 1/40-1/320, высокий уровень – 1/640-1/2560.

Выделение бактериальной ДНК из клеток *V. cholerae* проводили, согласно МУ 1.3.2569-09 [6]. Полученные образцы, содержащие тотальную ДНК холерного вибриона, использовали для амплификации фрагментов генов. Наличие гена *ctxAB* определяли в ПЦР[2]. Секвенирование геномной ДНК выполнялись на платформе MiSeq (Illumina). Пробоподготовку проводили согласно протоколам производителя. Сборку контигов осуществляли с помощью программы Velvet [15]. Биоинформационный анализ проводили с помощью программ GeneExpert и SeqAnalyzer, разработанных во ФКУЗ «Ростовский-на-

Дону противочумный институт» Роспотребнадзора с использованием ресурсов геномной базы данных NCBI.INDEL-типирование проводили по методике, предложенной А.С. Водопьяновым [1].

Результаты и обсуждение. Как нами было показано ранее [9], у холерных вибрионов при +4 °С в речной воде в течение первых 14 дней имеет место некоторое увеличение показателей токсинопродукции у большей части исследуемых штаммов (за исключением штаммов *V.cholerae* 1601 и 17427 – у них отмечалось незначительное снижение титра, и штаммов 569, 1310, 19188, у которых уровень продукции оставался без изменений). Однако уже через месяц стрессового воздействия показатели токсинообразования резко снижались, вплоть до полного исчезновения фенотипического проявления признака к концу второго месяца. Только три штамма *V.cholerae* *ElTor* сохраняли способность к токсинопродукции, определяемой методом ИФА: высокотоксигенный типичный 1310, типичный 3119 и атипичный 19667, выделенный от больного в Москве в 2014 г. Остальные 10 штаммов перестали продуцировать холероген, при сохранении генов *ctxAB*, определяемых в ПЦР. Через три месяца низкотемпературного стресса ни одна из культур не выросла в среде АК1, показатели токсинопродукции были отрицательными, гены *ctxAB* в ПЦР не обнаружены.

Обращает на себя внимание, что реакция на стрессовое воздействие разных температур, имитирующих условия пребывания холерных вибрионов в речной воде, отличалась у типичных и атипичных вариантов. Так, средние показатели токсинопродукции при холодном стрессе (4°С) у атипичных вариантов были выше только в первые две недели (рис. 1), затем уровень холерогена у них снижался интенсивнее, чем у типичных штаммов (показания высокотоксигенного исходного мутантного штамма 1310 в расчет не принимались), т.е. они были более чувствительны к низким температурам, чем типичные.

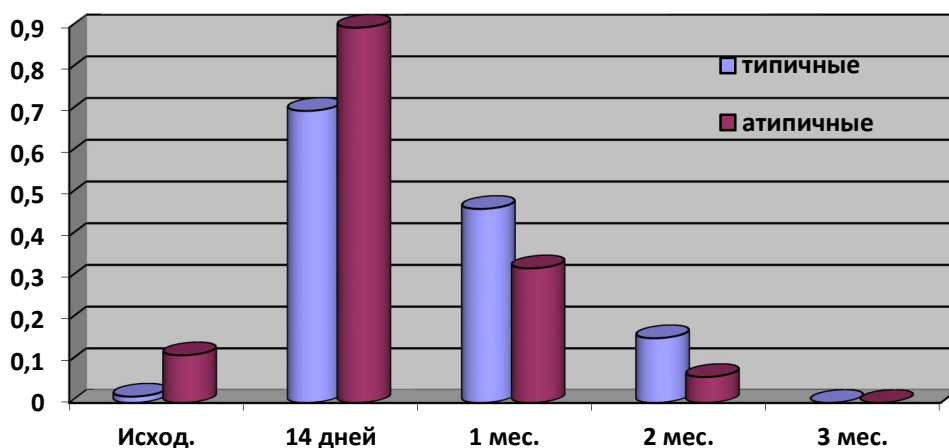


Рис. 1. Средние показатели токсинопродукции при длительной инкубации типичных и атипичных холерных вибрионов в речной воде при 4°С

Напротив, в отсутствие температурного стресса (22 °С) средние показатели токсинопродукции у атипичных вариантов вибрионов Эль Тор на всем протяжении исследования были в 2–8 раз выше, чем у типичных штаммов, что в полной мере характеризует их, как варианты с повышенной вирулентностью (рис. 2).

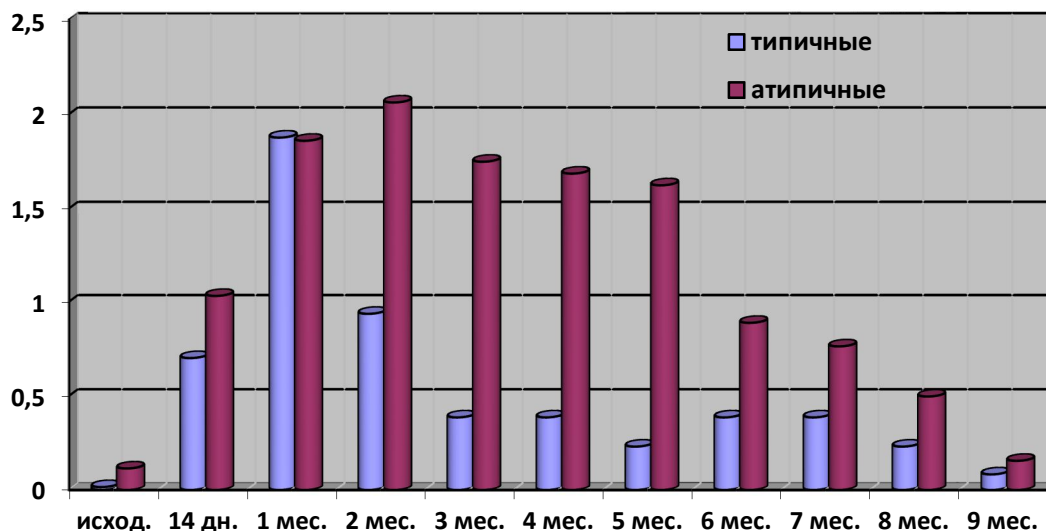


Рис. 2. Средние показатели токсинопродукции при длительной инкубации типичных и атипичных холерных вибрионов в речной воде при 22°С

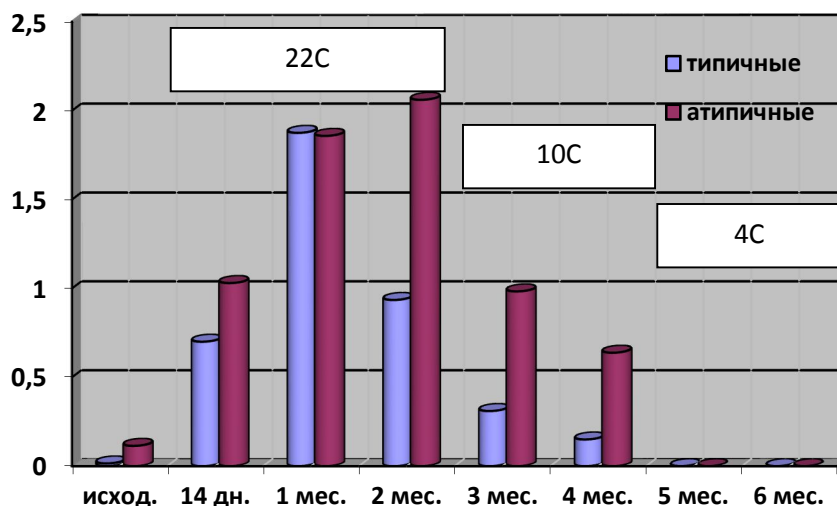


Рис. 3. Средние показатели токсинопродукции при длительной инкубации типичных и атипичных холерных вибрионов в речной воде при постепенной смене температур

При моделировании условий пребывания холерных вибрионов в водоемах Российской Федерации, в которых на протяжении эпидемического сезона температура постепенно снижается, токсинопродукция к 5 месяцу инкубации практически отсутствовала, но на

протяжении 4 летне-осенних месяцев при 22 °С и 10 °С она в среднем в 2–4 раза была выше у атипичных вариантов (рис. 3), что необходимо учитывать при проведении эпиднадзора за холерой. Проведенные исследования показали, что фенотип возбудителя холеры в части токсинопродукции выражено «отвечает» на стрессовые воздействия окружающей среды.

Что касается структуры генома, то в эксперименте Т.А. Кульшань с соавторами была показана возможность утраты генов профага *CTXφ*, в том случае, когда исследуемые «типичные» штаммы холерных вибрионов несли одну копию профага, в то время как атипичные «гибридные» геноварианты с двумя копиями профага *CTXφ* сохраняли указанные гены [5]. В наших опытах в ПЦР отмечено сохранение генов патогенности вне зависимости от отрицательных показателей ИФА, до тех пор, пока в популяции исследуемых штаммов сохранялись живые вибрионы. В «пустых» пробах, исследуемых после гибели всей популяции *V.cholerae*, гены, ответственные за токсинопродукцию, не обнаруживались.

В свете полученных данных представляло интерес сравнить геномы исходных и стрессированных вариантов холерных вибрионов, для чего было проведено полногеномное секвенирование 3 штаммов, а также сравнение их INDEL-профилей по 9 локусам (табл.1,2).

В таблице 1 представлены результаты сиквенса, выраженные в процентах совпадения с референс-последовательностью.

Таблица 1

Результаты полногеномного секвенирования исходных и стрессированных культур холерных вибрионов

Анализируемые гены		<i>V.cholerae</i> ElTor 19241 (301) морская вода, 2011г		<i>V.cholerae</i> ElTor 5879 больной, 1972г		<i>V.cholerae</i> classical 569 больной, 1968	
		исходный	стресс	исходный	стресс	исходный	стресс
		Принадлежность к виду <i>V. cholerae</i>	ompW (VCA0867)	100,00	100,00	100,00	100,00
Коллагеназа(VC1650)	99,74		99,70	99,80	99,80	99,21	99,21
VCA0164	100,00		100,00	100,00	100,00	98,1	98,1
Серогруппа	O1 (ген wbe)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Биовары	hlyA Eltor	100,00	100,00	100,00	100,00	98,9	98,9
	hlyA classical	94,6	94,6	97,6	97,6	100,00	100,00
	rtxCETor(VC1450)	100,00	100,00	100,00	100,00	-	-
Профаг CTX	cep (VC1461)	100,00	100,00	100,00	100,00	98,00	98,00
	orfU (VC1460)	100,00	100,00	100,00	100,00	96,1	96,1
	ace (VC1459)	100,00	100,00	100,00	100,00	98,6	98,6
	zot (VC1458)	100,00	100,00	100,00	100,00	98,8	98,8
	ctxA (VC1457)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	ctxB1 (Classical)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,47	99,47
	ctxB3 (El Tor)	99,47	99,47	100,00	100,00	-	-
Профаг RSI	RstR (VC1464)	100,00	100,00	100,00	100,00	-	-
	RstA (VC1454)	99,63	100,00	98,81	98,81	98,8	98,8
	rstC (VC1452)	100,00	100,00	100,00	100,00	-	-

	rstREITor(VC1455)	100,00	100,00	100,00	100,00	-	-
Остров патогенности VPI-I	aldA (VC0819)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	mop (VC0823)	100,00	100,00	100,00	100,00	97,7	97,7
	tcpA (VC0828)	99,85	99,85	100,00	100,00	80,4	80,4
	toxT (VC0838)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,88	99,88
	acfB (VC0840)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,89	99,89
Остров патогенности VPI-II	VC1757	100,00	100,00	100,00	100,00	99,90	99,90
	VC1810	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	nanH (VC1784)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	VC1803	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Остров пандемичности VSP-I	VC0175	100,00	100,00	100,00	100,00	-	-
	VC0178	100,00	100,00	100,00	100,00	-	-
	VC0180	99,93	100,00	100,00	100,00	-	-
	VC0183	100,00	100,00	100,00	100,00	-	-
	VC0185	100,00	100,00	100,00	100,00	-	-
Остров пандемичности VSP-II	VC0490	100,00	100,00	100,00	100,00	-	-
	VC0496	-	-	100,00	100,00	-	-
	type IV pilin (VC0502)	-	-	100,00	100,00	-	-
Кластер RTX	RTX toxin RtxA (VC1451)	100,00	100,00	100,00	100,00	-	-
	RTX toxin transporter (VC1447)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,86	99,93
Кластер MSHA	mshA (VC0409)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	proteinCsrD (VC0398)	99,85	99,85	99,80	99,80	99,85	99,85
	MSHA pilin protein MshD (VC0411)	100,00	100,00	99,84	99,84	100,00	100,00
Система секреции шестого типа (T6SS)	vasA (VCA0110)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,44	99,44
	vasF (VCA0115)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	vasK (VCA0120)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,87	99,87
	vgrG3 (VCA0123)	100,00	100,00	100,00	100,00	99,93	99,93
Тол-кластер и локус vps	tolQ (VC1839)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	TolA (VC1837)	100,00	100,00	99,91	100,00	100,00	100,00
	TolR (VC1838)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	vpsA (VC0917)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	vpsL (VC0934)	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	ToxT	100,00	100,00	100,00	100,00	80,40	80,40
	ToxR	99,66	99,66	100,00	100,00	99,84	99,84
	ToxS	100,00	100,00	100,00	100,00	99,89	99,89

Как видно из таблицы, полногеномное секвенирование стрессированных культур не выявило полиморфизма структуры генома в сравнении с исходными штаммами по основным наборам генов.

В связи с тем, что в литературе есть сведения об изменениях VNTR-профиля холерных вибрионов на начальном этапе стрессового воздействия у отдельных штаммов, которые рассматриваются авторами как первичная реакция на стресс [7], вероятно, следует

учитывать их при анализе результатов молекулярного типирования вибрионов, выделенных в рамках проведения мониторинга при эпидемиологическом надзоре за холерой. В связи с этим возникала необходимость выбора более стабильного метода типирования выделяемых штаммов холерных вибрионов, в том числе разработанного А.С. Водопьяновым INDEL-типирование [1]. Проведение INDEL-типирования исследуемых штаммов по 9 локусам показало, что все изученные стрессированные культуры сохранили свой INDEL-профиль без изменений (табл. 2).

Таблица 2

Результаты INDEL-типирования исходных и стрессированных культур холерных вибрионов

№ п/п	№ штамма	Дата выделения	Место выделения	Источник выделения	ctx	tcp	INDEL-аллель по локусам								
							CoA	OmpU	hutG	2456	122	704	3186	CheA	p1070
1	19241/301	2011	г. Таганрог	морская вода	+	+	98	166	159	78	79	77	67	169	67
	19241-1		стрессир.1		+	+	98	166	159	78	79	77	67	169	67
	19241-2		стрессир.2		+	+	98	166	159	78	79	77	67	169	67
2	5879	1972	г. Таганрог	больной	+	+	98	166	159	78	79	77	67	169	67
	5879-1		стрессир.1		+	+	98	166	159	78	79	77	67	169	67
	5879-2		стрессир.2		+	+	98	166	159	78	79	77	67	169	67
3	569В (классич.)	1968	Индия	больной	+	+	98	166	159	87	79	77	67	169	80
	569В -1		стрессир.1		+	+	98	166	159	87	79	77	67	169	80
	569В -2		стрессир.2		+	+	98	166	159	87	79	77	67	169	80

Выводы. Таким образом, токсигенные холерные вибрионы могут персистировать в воде открытых водоемов при температуре 22⁰С-24⁰С достаточно продолжительный срок с сохранением продукции холерного токсина, т.е. оставаясь эпидемически значимыми; при понижении температуры до 10⁰С и ниже уровни токсинопродукции снижаются вплоть до отрицательных значений, а низкая температура как стрессор, имитирующий условия окружающей среды в речной воде в холодное время года, возможно, ингибирует активацию белка *ToxT*, ответственного за транскрипцию генов, кодирующий холерный токсин, уже в первый месяц. Установлено, что, вне зависимости от отрицательных показателей ИФА, гены *ctxAB* обнаруживаются в ПЦР до тех пор, пока в популяции исследуемых штаммов сохраняются живые вибрионы. В «пустых» пробах, исследуемых после гибели всей популяции *V.cholerae*, гены, ответственные за токсинопродукцию, не обнаруживаются. Изменений в популяции клеток вибрионов, выживших после низкотемпературного стресса, связанных с утратой профага *CTXφ*, несущего гены, ответственные за синтез холерного токсина, а также утратой других значимых участков генома, в наших экспериментах не отмечено, что подтверждается в полногеномном секвенировании INDEL-типировании

исходных и стрессированных культур и говорит о его стабильности. Возможно, изменение токсинопродукции в стрессовых условиях связано не с реорганизацией генома, а с изменением экспрессии каскада регуляторных генов *ToxR-S*, *ToxT*, регуляция которых находится в непосредственной зависимости от состояния кворум сенсинга бактериальной культуры *V.cholerae* и управляется четырьмя малыми РНК, получившими название Qrr1-4 [8]. Возможно, регуляторная система малых РНК позволяет *V.cholerae* сохранять гены патогенности в стрессовых условиях, что и является предметом наших дальнейших исследований.

Список литературы

1. Водопьянов А.С. INDEL-и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации / А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, И.П. Олейников, Б.Н. Мишанькин, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, Д.А. Зубкова, М.И. Ежова // ЗНиСО. – 2015. – № 5 (266). – С. 41-44.
2. Водопьянов С.О. Испытание метода ПЦР в работе индикационной лаборатории мобильного комплекса СПЭБ при исследовании экспериментальных проб на холеру/ С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников, Р.В. Писанов, А.Б. Мазрухо // ЗНиСо. – 2011. – № 8. – С.43-45.
3. Заднова С.П. Изменение свойств штаммов холерного вибриона классического биовара под действием факторов внешней среды и мобильных генетических элементов / С.П. Заднова, Н.Д. Исаев, Ю.В. Лозовский, Н.И. Смирнова // Холера и патоген. для чел-ка вибр.: Матер. совещ. и пробл. комис. – Ростов-на-Дону, 2007. – Вып. 20. – С. 102–105.
4. Кульшань Т.А. Сравнительный анализ участков генома, связанных с вирулентностью, у природных штаммов *Vibrio cholerae* классического и Эль Тор-биоваров / Т.А. Кульшань, Н.Б. Челдышова, Н.П. Гусева, Н.И.Смирнова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2014. – № 2. – С.26-33.
5. Кульшань Т.А. Оценка функциональных особенностей и стрессоустойчивости изогенных токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор / Т.А. Кульшань, С.П. Заднова, Н.Б. Челдышова, Н.И. Смирнова // Журн. микробиол., эпидем. и иммунобиол. – 2015. – № 3. – С. 11–17.
6. Методические указания (МУ) 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» [Электронный ресурс]. – URL: <http://lawru.info/dok/2009/12/22/n229579.htm> (дата обращения: 25.04.2017 г.).

7. Миронова Л.В. Анализ стабильности генома *Vibrio cholerae* в условиях низкой температуры и дефицита питательных веществ / Л.В. Миронова, Ж.Ю. Хунхеева, Е.А. Басов, А.С. Пономарева, С.К. Миткеева, С.В. Балахонов // Проблемы ООИ. – 2016. – № 3. – С.52-56.
8. Писанов Р.В., Симакова Д.И. Роль малых рнк в контроле экспрессии генов, вовлеченных в реализацию патогенности *Vibrio cholerae* / Р.В. Писанов, Д.И. Симакова // Холера и патоген. для чел-ка вибр.: Матер. совещ. и пробл. комис. – Ростов-на-Дону, 2016. – Вып. – С. 136-139.
9. Сизова Ю.В. Влияние температуры на токсинопродукцию холерных вибрионов в речной воде / Ю.В. Сизова, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепахина, Л.П. Алексеева, В.В. Евдокимова, Р.В. Писанов, С.О. Водопьянов // ЗНиСО. – 2016. – № 6. – С. 54-56.
10. Смирнова Н.И. Эволюция возбудителя холеры / Н.И. Смирнова, В.В. Кутырев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2004. – 4. – С.3–13.
11. Faruque S.M. Pathogenicity island and phages in *Vibrio cholerae* evolution / S.M. Faruque, J.J. Mekalanos // Trends. Microbiol. – 2003. – V.11(11). – P.505-510.
12. Iwanaga M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor /M. Iwanaga, K. Yamamoto, N. Higa // Microbiol. Immunol. – 1986. – Vol.30. – P.1075–83.
13. Mutreja A. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic / A. Mutreja, D.W. Kim, N.R. Thomson, T.R. Connor et al. // Nature. – 2011. – P. 462–465.
14. Safa, A. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1 /A. Safa, G.B. Nair, R.Y. Kong // Trends Microbiol. – 2010. – V. 18. – P. 46-54.
15. Zerbino D.R., Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs / D.R. Zerbino, E. Birney // Genome Research. – 2008. – Т. 18. – №. 5. – С. 821-829.