

粪肠、屎肠球菌及相近种部分持家基因的系统发育分析

张文羿 吕婧 徐海燕 宋宇琴 孙志宏 张和平 孙天松*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:【目的】利用 16S rRNA、*clpX* 和 *recA* 基因分子标记研究 *Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium* 及相近种间的种系发育关系,并比较这些基因序列对 *E. faecalis*、*E. faecium* 及相近种的区分能力。【方法】以分离自传统乳制品中的 9 株 *E. faecium* 和 1 株 *E. durans* 分离株为研究对象,以 *clpX* 和 *recA* 基因片段为标记,通过 PCR 扩增、测序,结合已公布的近缘种相应序列构建系统发育树并与 16S rRNA 基因进行比较。【结果】在基于 *clpX* 和 *recA* 基因的进化树中,10 株试验菌株与 *E. faecalis* 始终处于同一分支。与该物种这两个基因的平均相似性为 99.6% 和 98.6%,与另一分支的 Faecium-group (*E. durans* 和 *E. faecium*) 的平均相似性仅为 61.5% 和 33.5%。相近种 *E. durans* 和 *E. hirae* 间这两个基因的差异性为 20.3% 和 39.0%;在基于 16S rRNA 基因的进化树中,试验菌株与 Faecium-group (*E. lactis*、*E. faecium*、*E. durans*、*E. hirae*) 处于同一分支。与这些成员间该基因的相似性大于 99.6%,与 *E. faecalis* 基因的平均相似性可达 98.4%。相近种间该基因相似性无明显差异。【结论】按照 10 株试验菌株 *clpX* 和 *recA* 基因的分析结果可将由传统生理生化和 16S rRNA 基因序列鉴定的 9 株 *E. faecium* 和 1 株 *E. durans* 归类为 *E. faecalis*, *clpX* 和 *recA* 基因可用于部分相近种的分类鉴定。

关键词: 粪肠球菌, 屎肠球菌, 系统发育分析, 16S rRNA 基因, 持家基因

Phylogenetic analysis of closely related *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* species based on partial housekeeping genes

ZHANG Wen-Yi LÜ Qiang XU Hai-Yan SONG Yu-Qin SUN Zhi-Hong
ZHANG He-Ping SUN Tian-Song*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Objective] Using the 16S rRNA, *clpX* and *recA* gene sequences to identify the phylogenetic relationship among closely related *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* species. [Methods] Nine *E. faecium* and one *E. durans* strains originally isolated from traditional dairy products were characterized by PCR methods. The gene sequences, *clpX* and *recA*, were amplified and assessed for their suitability as phylogenetic markers. Phylogenetic trees were constructed with 16S rRNA and the aforementioned housekeeping genes obtained from this study and

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2013BAD18B01)

*通讯作者: Tel: 86-471-4309231; 信箱: sts9940@sina.com

收稿日期: 2013-11-03; 接受日期: 2013-12-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-12-27

public gene databases. **[Results]** In the phylogenetic tree of *clpX* and *recA* genes, 10 tested strains and *E. faecalis* belonged to the same branch. The sequence similarity was 99.6% and 98.6% with *E. faecalis*, and 61.5% and 33.5% with the Faecium-group (*E. durans* and *E. faecium*), respectively. The differences of these two genes between the closely related strains of *E. durans* and *E. hirae* were 20.3% and 39.0%. Based on the phylogenetic tree of 16S rRNA, the tested strains and Faecium-group (*E. lactis*, *E. faecium*, *E. durans* and *E. hirae*) belonged to the same branch. These members shared a similarity of higher than 99.6%, while an average homology of 98.4% with *E. faecalis*. No obvious difference was observed between closely related strains. **[Conclusion]** Based on the analysis results of the housekeeping genes, *clpX* and *recA*, we propose that nine *E. faecium* and one *E. durans*, could be transferred to *E. faecalis*. Meanwhile, the *clpX* and *recA* genes are suitable for classification and identification of some closely related *E. faecalis* and *E. faecium* species.

Keywords: *E. faecalis*, *E. faecium*, Phylogenetic analysis, 16S rRNA gene, Housekeeping genes

肠球菌(*Enterococcus*)归属于硬壁菌门杆菌纲乳杆菌目肠球菌科肠球菌属,是一群过氧化氢酶阴性、无芽胞、兼性厌氧革兰氏阳性球菌的总称^[1]。到目前为止,细菌分类学官方认可的肠球菌属共包含 41 个种,多样性特别丰富。16S rRNA 基因分析技术作为一种常规的鉴定手段可以区分 *Enterococcus avium*、*Enterococcus casseliflavus*、*Enterococcus cecorum*、*Enterococcus faecium* 等常见菌群,但在分辨肠球菌属内亲缘关系较近的种时却显得相形见绌^[2]。例如: *E. faecalis*、*E. faecium* 菌群成员 *E. faecium*、*E. hirae*、*E. durans*、*E. villorum*、*E. mundtii* 和 *E. ratti*。它们之中, *E. faecalis* 和 *E. faecium* 为该属内研究较多的种。作为人体和动物肠道内的主要共生者,之前常被作为检测食品是否受到粪便污染的指示物,还被认为是条件致病菌。也有报道指出,肠球菌中危害人类健康的菌种主要是 *E. faecalis*, *E. faecium* 和 *E. durans* 紧随其后^[3]。但最近的研究又表明,多数肠球菌可以产生细菌素, *E. faecalis* 和 *E. faecium* 可作为益生菌或天然防腐剂添加到食品中或者作为杀菌剂用于医疗领域^[4-5]。此外,这两种菌也广泛存在于植物、土壤和乳制品中^[6]。因此,很有必要建立对它们进行准确鉴定的分类技术。然而,由于 *E. faecalis* 和 *E. faecium* 的 16S rRNA 基因相似性大于 99.0%,一定程度上影响了在分类学上对它们的准确区分。

持家基因广泛存在于细菌中,是系统进化分析中的有效分子标记。早在 2000 年,就有学者尝试采用不同持家基因分析肠球菌属内相近种的系统进化关系,同时证明持家基因 *sodA* 比 16S rRNA 基因具有更高的分辨率^[7]。这也暗示我们诸如 *sodA*、*clpX*、*recA* 等具有特殊功能的持家基因或许能够提供充足的信息来区分鉴定近缘细菌间的系统发育关系。本研究分析了 9 株 *E. faecium* 和 1 株 *E. durans* 分离株的 16S rRNA、*clpX* 和 *recA* 基因序列,通过与 GenBank 数据库中下载模式菌株和已完成基因组测序参考菌株的 16S rRNA、*clpX* 和 *recA* 基因序列比对分析,对 10 株试验菌株的系统发育关系进行全面地阐释。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株: 本研究所用 10 株菌由内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供,菌株具体信息包括 16S rRNA、*clpX* 和 *recA* 基因序列登录号(见表 1)。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 试剂,大连 TaKaRa 公司; Applied Biosystems PCR 仪,美国 Applied Biosystems 公司; ND-1000 型微量紫外分光光度计,美国 Nanodrop 公司; GDS8000 型 UPV 凝胶成像分析系统,美国 UVP 公司; Eppendorf 5810R 高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司; DYY-12 电泳仪,北京市六一仪器厂。

表 1 试验所用菌株信息及 16S rRNA、 <i>clpX</i> 和 <i>recA</i> 基因序列号					
Table 1 The information of strains and accession numbers of 16S rRNA, <i>clpX</i> and <i>recA</i> genes used in this study					
菌株编号 Strains No.	分离基物采集地 Sampling location	分离源 Source	16S rDNA	<i>clpX</i>	<i>recA</i>
<i>E. durans</i> IMAU60129	西藏拉萨地区当雄县乌玛糖乡	牦牛奶	FJ749846	KC691185	KC691195
<i>E. faecium</i> IMAU40164	青海海西州德令哈市蓄集乡	混合酸奶	FJ915701	KC691186	KC691196
<i>E. faecium</i> IMAU80788	甘肃省肃南县晒银滩乡二队	鲜牦牛奶	HM058954	KC691187	KC691197
<i>E. faecium</i> IMAU10442	内蒙古呼伦贝尔盟新巴尔虎左旗	酸牛奶	HM218167	KC691188	KC691198
<i>E. faecium</i> IMAU10427	内蒙古呼伦贝尔盟新巴尔虎左旗	酸牛奶	HM218152	KC691189	KC691199
<i>E. faecium</i> IMAU60007	西藏日喀则地区江孜县东郊乡	酸黄牛奶	FJ749740	KC691190	KC691200
<i>E. faecium</i> IMAU60134	西藏拉萨地区当雄县龙仁乡	牦牛奶	FJ749851	KC691191	KC691201
<i>E. faecium</i> IMAU60135	西藏地区拉萨地区当雄县龙仁乡	牦牛奶	FJ915637	KC691192	KC691202
<i>E. faecium</i> IMAU60169	西藏地区拉萨地区当雄县龙仁乡	牦牛奶	FJ749883	KC691193	KC691203
<i>E. faecium</i> IMAU60196	西藏日喀则地区江孜县东郊乡	酸黄牛奶	FJ915642	KC691194	KC691204

1.1.3 试验所用引物: 通过比较基因组学分析, 选择 *clpX* 和 *recA* 两个单拷贝且含有多变区的基因为目标序列, 结合序列比对信息, 采用 PRIMER 5.0 设计通用引物, 引物见表 2, 所有引物由上海桑尼生物科技有限公司合成。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序

采用 CTAB-冻融法提取菌株基因组 DNA^[8]。将提取的基因组 DNA 稀释到 100 mg/L 左右作为 PCR 扩增模板, 采用 50 μL 反应体系。对于 *clpX* 基因的扩增, 循环条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 52 °C 45 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。*recA* 基因的 PCR 扩增循环条件除了退火温度为 50 °C 外, 其余反应条件均与 *clpX* 基因一致。PCR 产物用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测,

将扩增成功的产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.3 序列分析与系统进化树的构建

10 株试验菌株的 *clpX* 和 *recA* 基因扩增产物经纯化和测序, 获得两个基因选定片段的核苷酸序列, 对应 16S rRNA 基因序列从 GenBank 数据库中下载获得, 菌株具体信息及序列登录号见表 1。对这些序列进行进一步分析的过程中, 如果数据库中检索到对应模式菌株的 16S rRNA、*clpX* 和 *recA* 基因序列则首选其对应序列作为参比序列。相反, 则以所选参考菌株对应基因序列作为参比序列。所得序列采用 ClustalW 比对, 之后通过 MEGA 4.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining, N-J)构建基于 16S rRNA、*clpX* 和 *recA* 基因的系统发育树, 数据自展重抽样次数 1 000 次。

模式菌株 *E. lactis* DSM 23655、*E. faecium* ATCC 19434^T、*E. durans* ATCC 19432^T、*E. hirae* ATCC 8043^T 和 *E. faecalis* ATCC 19433^T 的 16S rRNA 基因序列登录号分别为: GU983697、AJ301830、AJ276354、Y17302 和 AB012212; 参考菌株 *E. faecalis* 62、*E. faecalis* OG1RF、*E. faecalis* V583、*E. hirae* ATCC 9790、*E. durans* FB129-CNAB-4、*E. faecium* 1,230,933、*E. faecium* DO 和 *E. faecium* 1,231,408 的 *clpX* 基因序列

表 2 PCR 扩增引物		
Table 2 Primers used in PCR in this study		
基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
<i>recA</i>	r-F	TTCTTTAGCGTTAGATGTTG
	r-R	CCTTCTTGGGAAATACCTT
<i>clpX</i>	c-F	GATGAAGCAGTCCGAGAA
	c-R	TACAGGTAAGCGTCCAAT

登录号分别为: NC_017312、NC_017316、NC_004668、NC_018081、NZ_AGZB000000000、NZ_GG692537、NC_017960 和 NZ_GG688555; 参考菌株 *E. faecalis* 62、*E. faecalis* OG1RF、*E. faecalis* V583、*E. hirae* ATCC 9790、*E. faecium* Aus0004、*E. faecium* DO 和 *E. durans* FB129-CNAB-4 的 *recA* 基因序列登录号分别为 NC_017312、NC_017316、NC_004668、NC_018081、CP003351、NC_017960 和 NZ_AGZB000000000。

2 结果与分析

2.1 基于 16S rRNA 基因的系统发育分析

10 株试验菌株和模式菌株的 16S rRNA 基因序列下载自 GenBank 核酸序列数据库。通过多序列比对, 获得比对整齐的序列文件, 之后构建系统发育树(图 1)。结果显示, 这些菌株共可划分为两个较为独立的分支, 即为 Faecium-group 和 *E. faecalis*。其中, 处于同一分支的 Faecium-group 包括 10 株试验

菌株和 *E. lactis* DSM 23655、*E. faecium* ATCC 19434^T、*E. durans* ATCC 19432^T、*E. hirae* ATCC 8043^T, 它们之间的 16S rRNA 基因相似性大于 99.6%, 而 Faecium-group 与另一分支的 *E. faecalis* ATCC 19433^T 的平均相似性为 98.4%。

2000 年, Tsiodras 等通过 PCR 方法扩增肠球菌属内相近种的 23S rRNA 基因的主要可变区, 后经限制性内切酶 *Xba* I 和 *Pvu* II 水解, 试验表明这种方法无法把相近种 *E. hirae* 和 *E. durans* 准确区分开, 而 *E. faecium* 和 *E. faecalis* 分类鉴定结果不理想, 水解图谱中至少有 5 个相同的条带^[7]; 瑞典的 Monstein 等分析肠球菌属内的 14 个种, 通过 PCR 方法扩增菌株 16S rDNA 可变区 V6 基因片段, 分析发现 *E. hirae*、*E. durans* 和 *E. faecium* 具有相同的基因序列, 而 *E. faecalis* 与上述菌株不同^[9]。本试验分析了上述菌株的 16S rRNA 基因序列, 得到了同样的结果。

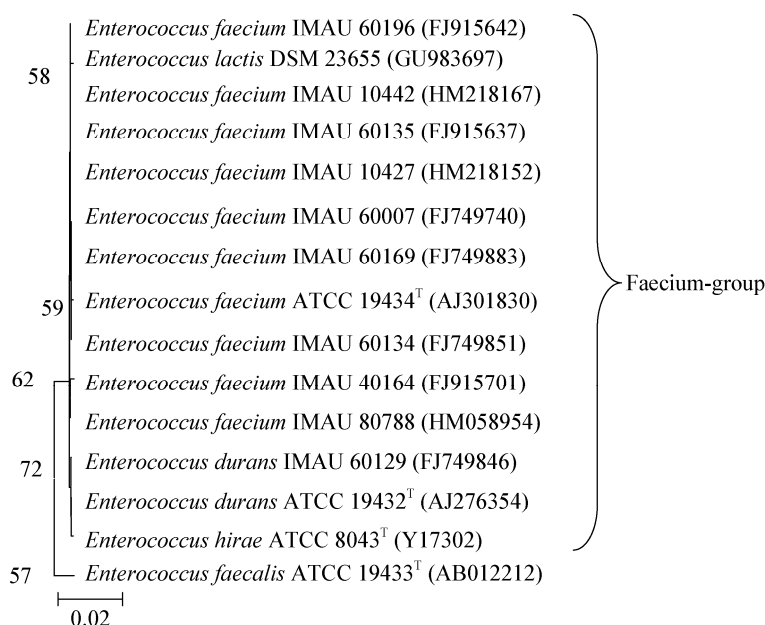


图 1 10 株试验菌株与参比菌株的 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 1 The phylogenetic tree constructed by the 16S rRNA gene sequences of 10 strains and references

注: 括号内为基因序列 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示 1 000 次重复抽样所得到的置信度; 标尺长度表明每个位点发生 0.02 次置换。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch point indicates the percentage of trees in which the grouping occurred after bootstrapping the data for 1 000 replicates. The scale bar indicates the number of substitutions per base is 0.02.

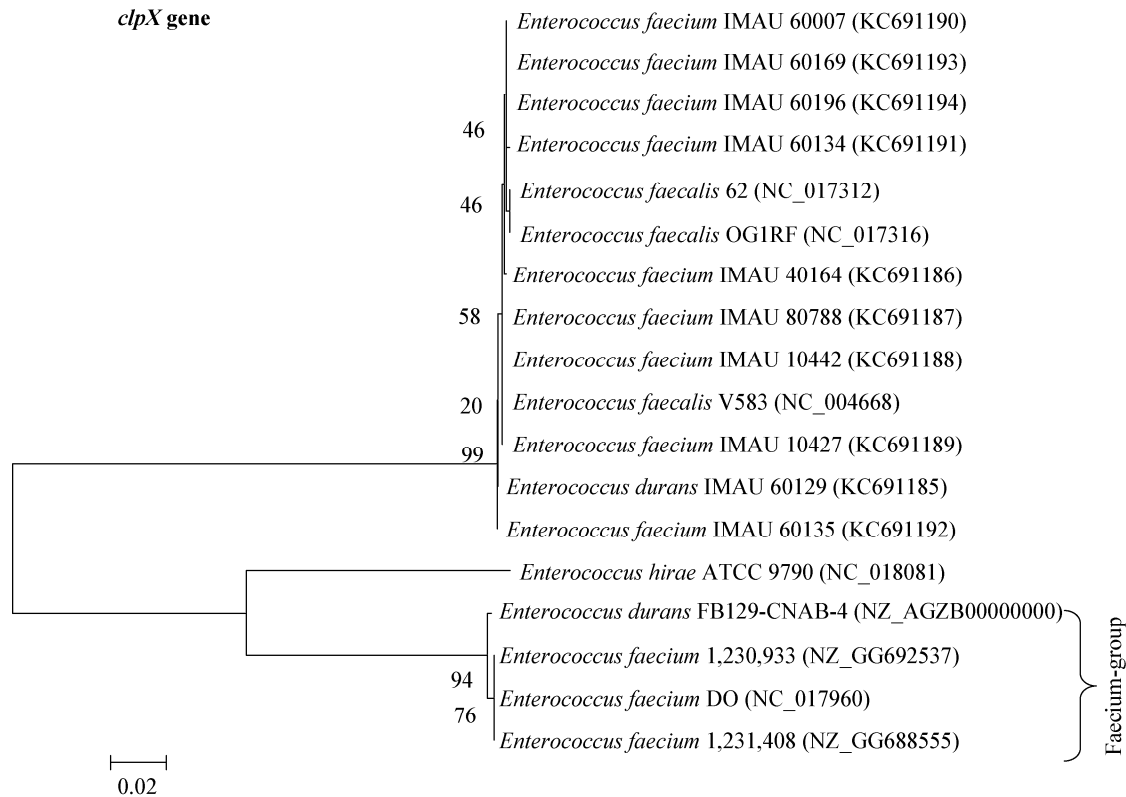
2.2 基于 *clpX* 和 *recA* 基因部分序列的系统发育分析

本研究测定 10 株试验菌株相应的 *clpX* 和 *recA* 基因部分序列(表 1), 采用与 16S rRNA 基因相同的方法构建系统发育树。通过比较构建的系统发育树发现, 基于 16S rRNA 基因和两个不同持家基因构建的系统发育树拓扑结构差异较大。后者可将试验菌株和参比菌株划分为 3 个明显的系统进化分支, 同时暗示我们由传统生理生化 and 16S rRNA 基因序列鉴定的这 10 个分离株应重新归类为 *E. faecalis*。

在使用 *clpX* 基因序列构建的系统发育树中(图 2), 10 株试验菌株与 *E. faecalis* 62、*E. faecalis* OG1RF 和 *E. faecalis* V583 处于同一分支, 相似性大于 99.6%, 而与 *E. hirae* ATCC 9790 的平均相似性为 60.6%, 与另一分支的 Faecium-group

(*E. durans* 和 *E. faecium*) 的平均相似性为 61.5%; *E. hirae* ATCC 9790 和 *E. durans* FB129-CNAB-4 种间的差异为 20.3%; *E. durans* FB129-CNAB-4 和 *E. faecium* 的种间的差异为 0.04%。

同样, 在使用 *recA* 基因构建的系统发育树中, 10 株试验菌株与 *E. faecalis* 62、*E. faecalis* OG1RF 和 *E. faecalis* V583 处于同一分支, 相似性大于 98.6%, 而与 *E. hirae* ATCC 9790 平均相似性仅为 39.7%, 与另一分支的 Faecium-group (*E. durans* 和 *E. faecium*) 的平均相似性为 33.5%。这个结果进一步支持了从 *clpX* 基因序列构建系统发育树获得的结论, 即这 10 个分离株应重新归类为 *E. faecalis*。此外, *E. hirae* ATCC 9790 和 *E. durans* FB129-CNAB-4 种间的差异为 39.0%; *E. durans* FB129-CNAB-4 和 *E. faecium* 的种间相似性为 100.0%。



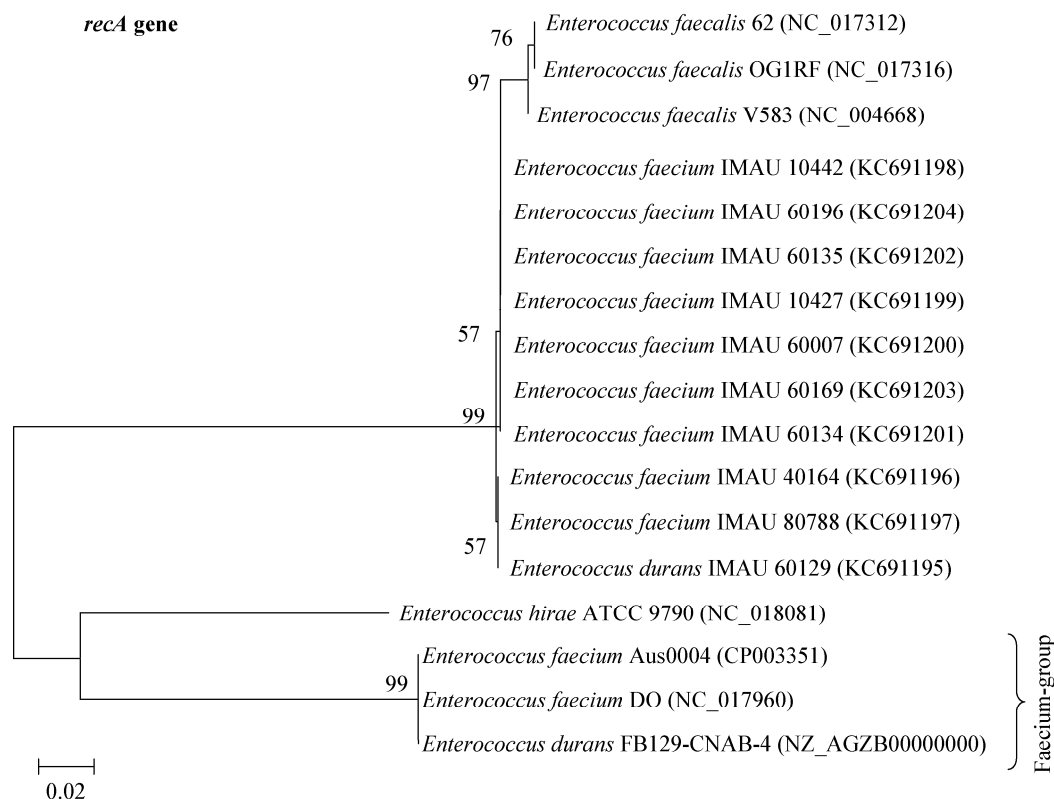


图2 采用邻接法构建的 *clpX* 和 *recA* 基因系统发育树

Figure 2 Phylogenetic trees derived from *clpX* and *recA* gene sequences by N-J method

注：括号内为基因序列 GenBank 登录号；分支点上的数字表示 1 000 次重复抽样所得到的置信度；标尺长度表明每个位点发生 0.02 次置换。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch point indicates the percentage of trees in which the grouping occurred after bootstrapping the data for 1 000 replicates. The scale bar indicates the number of substitutions per base is 0.02.

3 讨论

近几年的研究表明，16S rRNA 基因序列分析已广泛用于细菌的分类鉴定。但事实上，使用不同的持家基因作为分子标记在近缘细菌间的系统发育分析中已显示出独特的优势^[10]，逐渐发展成为一种新的技术。2007 年，Bruyne 等采用分析 *pheS*、*rpoA* 和 *atpA* 基因序列的方法完成了分离自发酵咖啡中乳酸菌的鉴定，新命名了一个种 *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov.^[11]；同年，Chelo 等使用 *dnaA*、*gyrB*、*rpoC* 等持家基因快速准确的完成了对明串珠菌、魏氏菌和酒球菌的鉴定^[12]。2008 年，东京农业大学的 Endoa 等根据 *rpoC* 和 *recA* 基因序列构建系统发育树，将 *Leu. durionis*、*Leu. ficulneum*、

Leu. fructosum 和 *Leu. pseudoficulneum* 菌株重新归类为 *Fructobacillus* gen. nov.^[13]。2012 年，意大利的研究者 Morandi 等根据 16S rRNA、*pheS* 和 *rpoA* 基因序列分析，将一株分离自当地奶酪中的肠球菌最终确立为新种 *Enterococcus lactis* sp. nov.^[14]。

在本结果中，采用持家基因 *clpX* 和 *recA* 分析 9 株 *E. faecium* 和 1 株 *E. durans* 分离株及其近缘物种也显示出较高的分辨率。10 株试验菌株与 *E. faecalis* 在进化树中始终处于同一分支，其 *clpX* 和 *recA* 基因平均相似性为 99.6%和 98.6%，与另一分支的 Faecium-group (*E. durans* 和 *E. faecium*)的平均相似性分别为 61.5%和 33.5%；而在 16S rRNA 基因序列分析中，10 株试验菌株与 Faecium-group

(*E. lactis*、*E. faecium*、*E. durans*、*E. hirae*)相似性大于 99.6%, 与 *E. faecalis* 的平均相似性为 98.4%。因此, 通过分析 *clpX* 和 *recA* 基因序列可将原来由传统生理生化和 16S rRNA 基因序列鉴定的 9 株 *E. faecium* 和 1 株 *E. durans* 重新归类为 *E. faecalis*。比较相近种间的系统发育关系, *E. durans* 和 *E. hirae* 间的 *clpX* 和 *recA* 基因序列差异性为 20.3%和 39.0%, 即 *clpX* 和 *recA* 基因可作为 *E. durans* 和 *E. hirae* 系统发育的分子标记; *E. durans* 和 *E. faecium* 种间的相似性分别为 99.6%和 100.0%, 侧面反映 *clpX* 和 *recA* 基因并不能有效区分两者。

本研究以 *clpX* 和 *recA* 基因作为分子标记, 成功将使用 16S rRNA 基因无法区分的菌株准确鉴定到种水平。然而, 对于 *E. durans* 和 *E. faecium* 的区分效果并不理想。与此相反, Poyart 等通过分析 *sodA* 基因序列却可将 16S rDNA 相似性大于 99.0% 的 *E. durans* 和 *E. faecium* 菌株鉴定到种水平^[15]。这一现象可以说明不同持家基因对不同物种的分辨率具有差异性, 因此选择多个持家基因同时进行分析或可作为一种研究策略在今后的研究中加以考量。

参考文献

- [1] 李梅花, 王芳, 孙婷, 等. 自然发酵乳中粪肠球菌和尿肠球菌的4种鉴定方法的比较[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(9): 98-103.
- [2] Naser SM, Thompson FL, Hoste B, et al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes[J]. Microbiology, 2005, 151(7): 2141-2150.
- [3] Boyle JF, Soumakis SA, Rendo A, et al. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococci*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1993, 31(5): 1280-1285.
- [4] 刘虎传, 张敏红, 姜海龙. 益生肠球菌的研究进展[J]. 动物营养学报, 2011, 23(12): 2090-2096.
- [5] Aslam M, Diarra MS, Checkley S. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 156(3): 222-230.
- [6] Lindenstrauß AG, Pavlovic M, Bringmann A. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2011, 34(8): 553-560.
- [7] Tsiodras S, Gold HS, Coakley EPG. Diversity of domain V of 23S rRNA gene sequence in different *Enterococcus* species[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(11): 3991-3993.
- [8] 乌日娜, 张和平, 孟和毕力格. 酸马奶中乳杆菌 *L. casei* Zhang, ZL12-1的16S rDNA 基因序列及聚类分析[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(6): 4-9.
- [9] Monstein HJ, Ahrné S, Molin G. Identification of enterococcal isolates by temperature gradient gel electrophoresis and partial sequence analysis of PCR-amplified 16S rDNA variable V6 regions[J]. Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 2001, 109(3): 209-216.
- [10] 蒋德明, 周秀文, 田晓翔, 等. 基于16S rRNA 和 HSP60 基因序列分析粘细菌孢囊杆菌亚目形态分类的种属之间的亲缘关系[J]. 微生物学报, 2008, 48(6): 711-716.
- [11] Bruyne KD, Schillinger U, Caroline L. *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(12): 2952-2959.
- [12] Chelo IM, Zé-Zé LB, Tenreiro RR. Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc*-*Oenococcus*-*Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *dnaA*, *gyrB*, *rpoC* and *dnaK*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(12): 276-286.
- [13] Endoa OS. Reclassification of the *Leuconostoc* genus and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(9): 2195-2205.
- [14] Morandi S, Cremonesi P, Povoletto M. *Enterococcus lactis* sp. nov., from Italian raw milk cheeses[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(8): 1992-1996.
- [15] Poyart C, Quesnes G, Cuot PT. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of *Enterococci*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(1): 415-418.