

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.03.019

丙二酸盐克罗诺杆菌 *pspA* 基因的 干燥诱导及表达载体构建

汪馨, 董晶晶, 叶应旺

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:噬菌体休克蛋白(phage shock protein, Psp)系统目前已被证明与包膜应激反应相关。为了探索干燥胁迫下丙二酸盐克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)噬菌体休克蛋白 A(PspA)的作用,文章通过实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术验证干燥胁迫可以诱导丙二酸盐克罗诺杆菌 PspA 编码基因 *pspA* 显著表达,提示 Psp 系统对克罗诺杆菌抗干燥胁迫具有一定的作用。该文成功克隆出丙二酸盐克罗诺杆菌 *pspA* 基因并构建 pET28a-EGFP-PspA 原核表达载体,诱导 PspA 的高效表达,可用于后续分析 PspA 在干燥胁迫下的功能及定位情况,以期对丙二酸盐克罗诺杆菌 Psp 系统的干燥胁迫机制展开进一步的研究和讨论。

关键词:丙二酸盐克罗诺杆菌; *pspA* 基因; 原核表达; 干燥胁迫

中图分类号: Q936 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-5060(2023)03-0402-06

Desiccation induction and expression construct of *pspA* gene from *Cronobacter malonaticus*

WANG Xin, DONG Jingjing, YE Yingwang

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: The phage shock protein (Psp) system has been considered to be related to the envelope stress response (ESR). In this paper, the role of phage shock protein A (PspA) in *Cronobacter malonaticus* under desiccation stress was explored. Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) result showed *pspA* encoded by PspA in *C. malonaticus* was significantly expressed by desiccation stress, suggesting that Psp system has a certain effect on the resistance of *Cronobacter* to desiccation stress. The *pspA* of *C. malonaticus* was successfully cloned and pET28a-EGFP-PspA expression construct was produced. Inducing the high-efficiency expression of PspA can be used to analyze the function and location of PspA under desiccation stress for carrying out further research and discussion on the desiccation tolerance mechanism of *C. malonaticus* Psp system.

Key words: *Cronobacter malonaticus*; *pspA* gene; prokaryotic expression; desiccation stress

0 引 言

婴幼儿配方奶粉 (powdered infant formula, PIF) 作为婴幼儿日常食品,其产品质量的安全性

直接影响着婴幼儿的健康,关系着社会的稳定与发展^[1]。近年来,随着食品安全事件的频发,食品安全问题已成为全球关注的焦点。克罗诺杆菌是一种兼性厌氧革兰氏阴性菌,极易污染婴幼儿配

收稿日期:2021-03-22;修回日期:2021-05-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31972175)

作者简介:汪馨(1994—),女,安徽六安人,合肥工业大学硕士生;

叶应旺(1977—),男,安徽安庆人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者, E-mail: yeyw04@mails.ucas.ac.cn.

方奶粉导致致命感染,并伴有坏死性小肠结肠炎、菌血症和脑膜炎等疾病^[2-3],病死率高达 50%~80%^[4-5]。研究发现克罗诺杆菌在低水分活度(a_w)的食品中具有较强的生存能力。文献^[6]将 2 CFU/g 的克罗诺杆菌接种到奶粉中,于干燥环境放置 2 个月后仍具有活力。文献^[7]对 10 株克罗诺杆菌和 17 株其他肠杆菌的干燥培养物进行长期干燥实验,结果显示干燥处理后克罗诺杆菌耐干燥能力强于其他菌株并仍具有致病性。目前,克罗诺杆菌属已经确定有近 10 种,其中,丙二酸盐克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)作为从新生儿感染样品中分离出的最为常见的一种,值得人们进一步探索。

噬菌体休克蛋白(Phage shock protein, Psp)系统广泛存在于革兰氏阴性菌中,由 PspA/B/C/D/F 操纵子和 PspG 组成^[8]。噬菌体休克蛋白 A(PspA)最先是 Peter Model 实验室在研究大肠杆菌 K-12 丝状噬菌体 f1 感染时发现的^[9]。噬菌体分泌素蛋白 pIV 在合成过程中会产生大量的分子量约 25 kDa 的蛋白, Peter Model 实验室的研究者们将诱导产生的蛋白命名为噬菌体休克蛋白 A(PspA)^[9]。研究表明 PspA 蛋白编码基因 *pspA* 可由热应激、渗透应激、乙醇、蛋白跨胞质膜运输缺陷以及包括分泌素在内的一些完整膜蛋白的过量生产而诱导表达^[10]。

Psp 系统作为一种包膜应激反应(envelope stress response, ESR)途径,可以感知和响应细胞膜的损伤^[8]。后续研究发现, Psp 系统影响了大肠杆菌的生物膜形成能力^[11]。一般认为,菌膜的形成是细菌为了适应复杂的生存环境而产生的形态学变化,这种变化能够使细菌对外界环境的耐受能力得到有效提高^[12]。文献^[13]在 2007 年就已经通过实验证明,胞外聚合物包被的菌株对抵御低水分活度的干燥环境影响显著。菌膜的作用在菌株耐干燥机制的研究过程中是非常必要的。因此, Psp 系统与细菌抵抗干燥胁迫之间存在必然的联系。

目前,对于 Psp 系统的研究主要集中在大肠杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌等革兰氏阴性菌的结构功能及作用机理方面^[10,14],对于克罗诺杆菌 Psp 系统的研究并不多。在 PIF 贮藏过程中,克罗诺杆菌对干燥环境的长期耐受性能力给致病菌检测带来挑战,也给食品安全带来巨大的风险。因此,本文研究克罗诺杆菌干燥胁迫与 Psp 系统之间的联系,以丙二酸盐克罗诺杆菌为研究对象,探究 *pspA* 在

干燥胁迫条件下的表达情况,以期为进一步探索其干燥调控机制奠定基础,为预防和控制克罗诺杆菌食品污染提供重要的参考价值。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒与菌株

丙二酸盐克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)由本实验室从食品中分离得到;大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)购于上海唯地生物技术有限公司;质粒 pET28a-EGFP 购于武汉淼灵生物科技有限公司。

1.1.2 试剂材料

荧光定量试剂盒、反转录试剂盒均购于上海近岸蛋白科技有限公司;RNA 提取试剂 Trizol、细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购于上海翊圣生物科技有限公司;高保真 DNA 聚合酶、T4 连接酶均购于北京康润生物科技有限公司;限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*H I 均购于北京全式金生物技术有限公司;DL2000/1 kbp DNA Marker 均购于北京擎科新业生物技术有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购于北京天根生化科技有限公司。

1.1.3 仪器与设备

基因扩增仪(BIO-RAD 公司)、电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)、实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(Roche 公司)、荧光分光光度计(PerkinElmer 公司)、荧光倒置显微镜(Nikon 公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 PspA 生物信息学分析

利用 ExPASy 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析 PspA 蛋白的等电点、疏/亲水性情况、相对分子质量等理化性质。在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中通过比对搜索其他菌株 *pspA* 基因序列,使用 MEGA5.0 软件,采用邻接法(Neighbor-joining)绘制系统进化树,分析 *pspA* 的亲缘关系。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 分析

将培养至对数中期的丙二酸盐克罗诺杆菌置于 24 孔板内,再将孔板放入玻璃干燥器中进行 7、14、28 d 的干燥处理。分别提取处理前和干燥处理后的细菌总 RNA,反转录合成 cDNA。以丙二酸盐克罗诺杆菌 *gyrB*(NZ_CP013940.1)为内

参基因,进行实时荧光定量 PCR 分析 *pspA* 的表达情况。

pspA 定量引物如下:

RT-*pspA*-F:ACTGGTCCGCCTGATGATTC;

RT-*pspA*-R:TACGACGCGCAATCTGTTTC。

gyrB 定量引物如下:

RT-*gyrB*-F:CGGTATCCACCCGGAAGAAG;

RT-*gyrB*-R:GTTTCTGGGACAGGGCGTTA。

实时荧光定量 PCR 反应体系为:95 °C、60 s; 95 °C、20 s,60 °C、1 min,40 个循环。

1.2.3 重组融合质粒的构建与鉴定

利用 NCBI 获得 *pspA* 基因序列 (NZ-CP013940.1),用 Premier 5.0 软件设计引物 *pspA*-F (CGGGATCCATGGGTATTTTTTCTCGTTTTGCCGAC,引入酶切位点 *BamH* I) 和 *pspA*-R (CCCAAGCTTTTATTCGCCGTCGCGCTG,引入酶切位点 *Hind* III)。以丙二酸盐克罗诺杆菌基因组 DNA 为模板,PCR 扩增目的基因 *pspA*。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳、纯化后,用 *BamH* I 和 *Hind* III 进行双酶切。酶切片段经胶回收后,与 *BamH* I 和 *Hind* III 双酶切回收后的 pET28a-EGFP 表达载体片段进行连接,连接产物转化大肠杆菌 BL21 (DE3),经菌落 PCR 鉴定、测序验证无误后,命名为 pET28a-EGFP-PspA。

1.2.4 重组融合蛋白的诱导表达与荧光检测

取含有 pET28a-EGFP-PspA 重组质粒的 BL21 (DE3) 菌液涂布于卡那霉素抗性平板上,挑取单菌落加入含卡那霉素的 Luria-Bertani (LB) 培养基中,于 37 °C 过夜培养后,按 1% 接种量继续扩大培养至对数生长期 (A_{600} 为 0.4~0.6),使用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导目的蛋白 PspA 的表达,以不经 IPTG 诱导的 BL21 (DE3) 作为对照组。为了在后期大量纯化蛋白时能够高效诱导其表达,本研究对 IPTG 诱导时间进行初步探索,诱导终浓度选择 1 mmol/L,分别在 IPTG 诱导时间为 1、2、3、4 h 时,使用荧光分光光度计测定菌液在 480 nm 激发下的发射图谱,使用荧光倒置显微镜观察诱导后的菌液是否自发荧光。

1.2.5 数据分析

利用 GraphPad Prism 8 软件处理实验数据,实验结果均为(平均值 \pm 标准差),显著性水平 $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)。

2 结果与分析

2.1 *pspA* 基因生物信息学分析结果

ExPASy 软件对编码蛋白理化性质分析结果显示,PspA 共编码 223 个氨基酸,编码的 PspA 蛋白理论相对分子质量为 25 403.64,理论等电点为 5.19,不稳定系数为 48.63,脂肪系数为 87.26,总平均亲水性为 -0.734,说明该蛋白整体表现为亲水性。在研究菌株之间的亲缘分析中,进化树最末端表示菌株之间的亲缘性更近^[15]。MEGA 软件邻接法对 PspA 的进化分析结果如图 1 所示,由图 1 可知,与其他致病菌物种包括大肠杆菌 (NC_000913.3)、痢疾志贺氏 (NZ_CP061527.1)、沙门氏菌 (NZ_CP053416.1)、弗氏柠檬酸杆菌 (NZ_CP033744.1)、克雷伯氏菌 (NZ_CP054254.1)、假结核耶尔森氏菌 (NZ_LR134373.1)、副溶血性弧菌 (NZ_CP014046.2) 的 *pspA* 基因比对结果显示,丙二酸盐克罗诺杆菌 (NZ_CP013940.1) 与克雷伯氏菌 (NZ_CP054254.1) 的同源性最高。克雷伯氏菌是多重耐药性细菌“ESKAPE”之一,该细菌和丙二酸盐克罗诺杆菌均为条件致病菌,当宿主免疫力降低时,能引起呼吸道、泌尿道等感染,尤其易引起儿童肺炎,甚至可导致严重的脑膜炎和败血症等^[16]。分析结果为丙二酸盐克罗诺杆菌的流行病学的研究与控制、溯源分析以及致病分子机理提供参考价值。

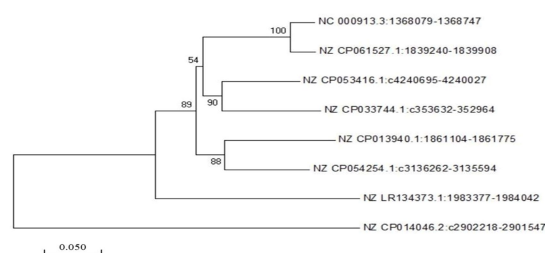


图 1 丙二酸盐克罗诺杆菌 *pspA* 基因进化树

2.2 干燥胁迫下 *pspA* 定量表达分析

本实验对丙二酸盐克罗诺杆菌在干燥胁迫下的 *pspA* 进行定量分析,在不同干燥时间下的实时荧光定量 PCR 分析结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,*pspA* 基因表达量在干燥 7、14、28 d 时均呈显著性增高,证明干燥胁迫可以诱导 *pspA* 的表达;此外,干燥 7 d 时 *pspA* 的表达量最高,后续随着干燥时间的增加,该基因的表达量呈现出下降的趋势,这可能是由于细菌的体内会存在

除 Psp 系统之外的多种包膜应激反应,协同保护细菌抵御外界环境的刺激。最常见的是通过 σ^E 通路和 CpxAR 调控机制,分别响应外膜/周质和内膜胁迫的应激作用^[17]。还有双组分调控系统(如 PhoPQ 和 EnvZ/OmpR 等)也能影响细菌适应胞膜压力的过程^[17]。研究结果显示 Psp 系统对于干燥胁迫是较为敏感的,因此在干燥早期表现出较为明显的刺激应答。随着时间的推移,细菌体内其他调控系统也会感应干燥刺激产生应答,这种协同作用势必会减少 Psp 系统的应答效果,造成 *pspA* 相对表达水平的降低。

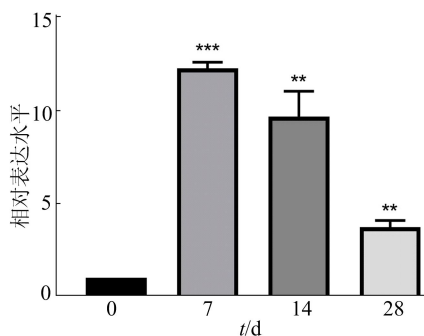
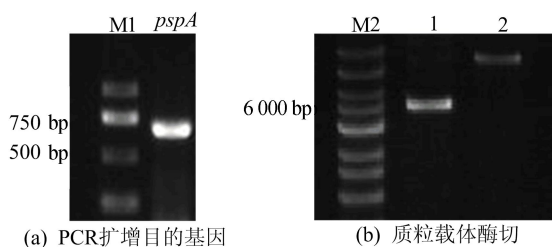


图2 实时荧光定量 PCR 分析 *pspA* 的表达情况

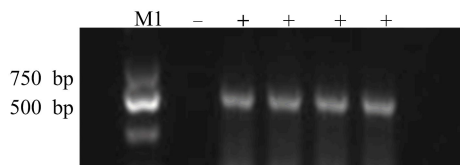
2.3 *pspA* 原核表达载体的构建

以丙二酸盐克罗诺杆菌基因组 DNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增目的基因,结果如图 3 所示。

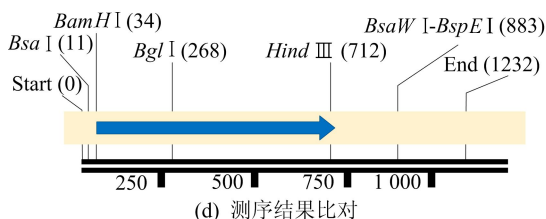


(a) PCR 扩增目的基因

(b) 质粒载体酶切



(c) 重组质粒转化 DH5 α 菌落 PCR 鉴定



(d) 测序结果比对

图3 pET28a-EGFP-PspA 原核表达载体构建结果分析

图 3 中: M1 为 Marker (DL2000); M2 为 Marker (1 000 bp); 1 为未酶切片段; 2 为酶切片段; - 为阴性对照; + 为阳性对照。

从图 3a 可以看出,通过琼脂糖凝胶电泳检测得到条带大小 672 bp 的 *pspA* 片段,与预期结果一致。将 PCR 产物纯化后,用 *Hind* III 和 *Bam*HI 限制性酶进行酶切。酶切片段进行胶回收,然后与图 3b 中表达载体 pET28a-EGFP 酶切成功后的片段进行连接、大肠杆菌 BL21(DE3) 转化。从图 3c 可以看出,菌落 PCR 初步鉴定为阳性菌的菌液,并送上海生工生物公司测序作最终鉴定。

测序结果利用 Snapgene 软件与原始序列比对,如图 3d 所示。由图 3d 可知,插入序列与目的基因一致,表明已完成 pET28a-EGFP-PspA 原核表达载体的正确构建。

2.4 诱导 PspA 目的蛋白的表达

使用 1 mmol/L 的 IPTG 溶液在不同时间梯度条件下诱导 PspA 蛋白表达的光谱图如图 4 所示。

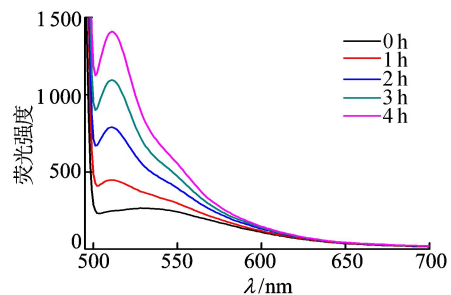
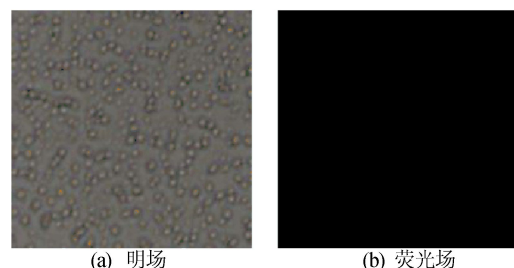


图4 重组融合蛋白的激光光谱

图 4 中,激发波长为 485 nm,通过测定 509 nm 处的荧光强度可以看出,在 509 nm 发射波长处有明显的荧光峰值,而且荧光强度随着 IPTG 诱导时间的增加而增强。

本文选取未诱导和诱导 4 h 的菌液,制成玻片后用倒置荧光显微镜观察荧光现象。未用 IPTG 溶液诱导的菌株如图 5 所示。



(a) 明场

(b) 荧光场

图5 IPTG 未诱导的明场和荧光场

使用 IPTG 溶液诱导 4 h 的菌株如图 6 所示。

从图 5、图 6 可以看出, IPTG 未诱导菌株在荧光场下无荧光现象; 诱导后的菌株在荧光场可以看到明显的绿色荧光现象, 从而证明了目的蛋白 PspA 在 IPTG 诱导 4 h 显著表达的。

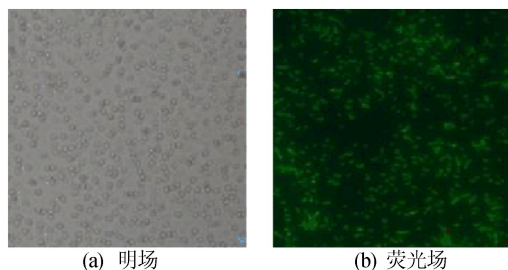


图 6 IPTG 诱导 4 h 的明场和荧光场

以上实验结果说明, 目的蛋白 PspA 被成功诱导表达且蛋白的表达强度随着诱导时间的增加而增强。

3 讨 论

婴幼儿配方奶粉是婴幼儿的必需主食, 其营养与质量安全关系到下一代的身心健康, 更是关系到国家政治、经济和社会稳定发展的重要因素。克罗诺杆菌因其极强的耐干燥性以及婴幼儿、免疫低下的成年人和老年人造成致死率极高的致病性, 成为奶粉中微生物安全的主要威胁之一。

本实验首先通过生物信息学分析得出丙二酸盐克罗诺杆菌与克雷伯氏菌的 *pspA* 基因同源性最高。克雷伯氏菌是多重耐药性细菌的一种, 与克罗诺杆菌均为条件性致病菌。因此推测 *pspA* 是否与菌株的耐药性相关, 功能基因的确定对后续建立起细菌基因型与表型之间的联系, 进而深入探究各菌株具体的致病、耐药机理具有深刻意义^[18]。本研究对丙二酸盐克罗诺杆菌干燥胁迫下 *pspA* 的表达量进行测定, 发现干燥胁迫下, *pspA* 的表达量显著升高, 实验结果证明干燥胁迫可以诱导 *pspA* 的表达。现有的研究也表明, *pspA* 的表达可由多种因素诱导, 包括一些分泌素、极端温度、渗透压、乙醇、脂肪酸生物合成过程的中断等^[19]。

EGFP 作为分子标签是研究基因表达、调控、细胞分化及蛋白质在生物体内定位和转运的有效办法^[20]。本文成功构建了 pET28a-EGFP-PspA 重组质粒, 将 EGFP 与目的蛋白 PspA 融合形成荧光标记分子, 为进一步研究 PspA 在干燥胁迫下的定位变化以及与 Psp 系统其他蛋白潜在的相互作用奠定了基础。本文对 *pspA* 基因功能的

研究, 不仅有利于探讨丙二酸盐克罗诺杆菌干燥应答的分子机制, 也可以为进一步预防和控制 PIF 中该菌的污染提供理论依据。同时对保证 PIF 产品质量以及卫生安全、保障婴幼儿群体健康意义重大。

[参 考 文 献]

- [1] 田洪芸, 徐立清, 任雪梅, 等. 国产婴幼儿配方乳粉的质量安全现状及监管对策[J]. 中国乳业, 2016(6): 62-65.
- [2] CORTI G, PANUNZI I, LOSCO M, et al. Postsurgical osteomyelitis caused by *Enterobacter sakazakii* in a healthy young man[J]. Journal of Chemotherapy, 2007, 19(1): 94-96.
- [3] GURTNER J B, KORNACKI J L, BEUCHAT L R. *Enterobacter sakazakii*; a coliform of increased concern to infant health[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 104(1): 1-34.
- [4] BOWEN A B, BRADEN C R. Invasive *Enterobacter sakazakii* diseases in infants[J]. Emerging Infectious Diseases, 2006, 12(8): 1185-1189.
- [5] FRIEDEMANN M. Epidemiology of invasive neonatal Cronobacter (*Enterobacter sakazakii*) infections[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2009, 28(11): 1297-1304.
- [6] LIN L C, BEUCHAT L R. Survival of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, water activity, and temperature[J]. Food Microbiology, 2007, 24(7/8): 767-777.
- [7] CAUBILLA-BARRON J, FORSYTHE S. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(9): 2111-2117.
- [8] MODEL P, JOVANOVIĆ G, DWORKIN J. The *Escherichia coli* phage shock protein operon[J]. Molecular Microbiology, 1997, 24(2): 255-261.
- [9] BRISSETTE J L, RUSSELL M, WEINER L, et al. Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990, 87(3): 862-866.
- [10] NICOLAS J, CHRISTOPH E, GORAN J, et al. Managing membrane stress: the phage shock protein (Psp) response, from molecular mechanisms to physiology[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(5): 797-827.
- [11] BELOIN C, VALLE J, LATOUR-LAMBERT P, et al. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(3): 659-674.
- [12] FLEMMING H C, WINGENDER J, SZEWCZYK U, et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life[J]. Nature Reviews Microbiology, 2016, 14(9): 563-575.
- [13] BARRON J C, FORSYTHE S J. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae

- ae in dehydrated powdered infant formula[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(9): 2111-2117.
- [14] JOVANOVIĆ G, LLOYD L J, STUMPF M P, et al. Induction and function of the phage shock protein extracytoplasmic stress response in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(30): 21147-21161.
- [15] 郭晶晶, 王慧珠, 滑明溪, 等. 以铜绿假单胞菌为例利用16S测序技术进行细菌同源基因型分析应用价值探讨[J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(10): 1690-1693.
- [16] 王艳君, 冯永其, 徐静. 东非黑白疣猴肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2018(5): 14-15.
- [17] HEWS C L, CHO T, ROWLEY G, et al. Maintaining integrity under stress: envelope stress response regulation of pathogenesis in gram-negative bacteria [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019, 9: 313-313.
- [18] 赵位, 喻东, 程建国, 等. 肺炎克雷伯氏菌毒力因子及其基因组学研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2019, 46(6): 942-949.
- [19] KOBOYASHI H, YAMAMOTO M, AONO R. Appearance of a stress-response protein, phage-shock protein A, in *Escherichia coli* exposed to hydrophobic organic solvents[J]. Microbiology, 1998, 144: 353-359.
- [20] 孟祥潮, 刘国富, 刘营, 等. 通用型植物 GFP 标签蛋白表达载体的构建和蛋白质的细胞内定位研究[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(5): 28-31.

(责任编辑 闫杏丽)

(上接第 351 页)

本文试验成果可为实际排水管道回填施工提供理论依据,若对管道回填土中细颗粒质量比的上限作出规定,则可有效预防地面塌陷灾害。

[参 考 文 献]

- [1] DAVIES J P, CLARKE B A, WHITE R J T, et al. Factors influencing the structural deterioration and collapse of rigid sewer pipes[J]. Urban Water, 2001, 3(1/2): 73-89.
- [2] 郭帅. 城市排水系统地下水入渗及土壤侵蚀问题研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [3] 侯超群, 董满生, 逢焕平. 松散土体型地面塌陷成因分析及机理研究[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版), 2013, 36(1): 63-67.
- [4] INDIKETIYA S, JEGATHEESAN P, RAJEEV P, et al. The influence of pipe embedment material on sinkhole formation due to erosion around defective sewers[J]. Transportation Geotechnics, 2019, 19: 110-125.
- [5] JANDA A, ZURIGUEL I, GARCIMARTIN A, et al. Jamming and critical outlet size in the discharge of a two-dimensional silo[J]. EPL (Europhysics Letters), 2008, 84(4): 44002-1-44002-6.
- [6] SHELDON H G, DURIAN D J. Granular discharge and clogging for tilted hoppers [J]. Granular Matter, 2010, 12(6): 579-585.
- [7] MUKUNOKI T, KUMANO N, OTANI J, et al. Visualization of three dimensional failure in sand due to water inflow and soil drainage from defective underground pipe using X-ray CT[J]. Soils and Foundations, 2009, 49(6): 959-968.
- [8] MUKUNOKI T, KUMANO N, OTANI J. Image analysis of soil failure on defective underground pipe due to cyclic water supply and drainage using X-ray CT[J]. Frontiers of Structural and Civil Engineering, 2012, 6(2): 85-100.
- [9] GHULAM A N, NILE B K, AL-BAIDHANI J H. Evaluation of the effect of leak size of defective sewer pipes on soil erosion[J]. Journal of Engineering and Applied Sciences, 2018, 13: 10708-10712.
- [10] GUO S, SHAO Y, ZHANG T Q, et al. Physical modeling on sand erosion around defective sewer pipes under the influence of groundwater[J]. Journal of Hydraulic Engineering, 2013, 139(12): 1247-1257.
- [11] GUO S, ZHU D Z. Soil and groundwater erosion rates into a sewer pipe crack[J]. Journal of Hydraulic Engineering, 2017, 143(7): 06017008-1-06017008-5.
- [12] TANG Y, ZHU D Z, CHAN D H. Experimental study on submerged sand erosion through a slot on a defective pipe [J]. Journal of Hydraulic Engineering, 2017, 143(9): 04017026-1-04017026-14.
- [13] ZHANG D M, DU W W, PENG M Z, et al. Experimental and numerical study of internal erosion around submerged defective pipe [J]. Tunnelling and Underground Space Technology, 2020, 97: 103256.
- [14] ZHANG D M, DU W W, GAO C P. Model test of seepage erosion around defective buried pipelines[C]//HU L B, GU X Q, TAO J L, et al. Proceedings of GeoShanghai 2018 International Conference: Multi-physics Processes in Soil Mechanics and Advances in Geotechnical Testing. Singapore: Springer, 2018: 261-270.
- [15] KWAK T Y, WOO S I, KIM J, et al. Model test assessment of the generation of underground cavities and ground cave-ins by damaged sewer pipes[J]. Soils and Foundations, 2019, 59(3): 586-600.
- [16] SATO M, KUWANO R. Model tests for the evaluation of formation and expansion of a cavity in the ground[C]// Proceedings of Seventh International Conference on Physical Modelling in Geotechnics. [S. l.]: CRC Press, 2010: 581-586.
- [17] WANG X K, TANG Y, HUANG B, et al. Review on numerical simulation of the internal soil erosion mechanisms using the discrete element method[J]. Water, 2021, 13(2): 169.

(责任编辑 张淑艳)