

二氧化氯对脱氧核糖核苷三磷酸和质粒 DNA 的作用

韦明肯^{1,2,3,4} 吴清平^{2*} 王大鹏² 吴军林² 张菊梅²

- (1. 中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)
(2. 广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)
(3. 广西玉林师范学院化学与生物系 玉林 537000)
(4. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要: 以 75 mmol/L 的二氧化氯作用于脱氧核糖核苷三磷酸 dCTP、dTTP、dGTP、dATP 混合物(浓度均为 100 $\mu\text{mol/L}$), 液相色谱显示它们在 260 nm 波长处的峰面积分别下降了 $54.23\% \pm 2.08\%$ 、 $66.25\% \pm 3.32\%$ 、 $55.47\% \pm 0.23\%$ 、 $59.59\% \pm 3.27\%$ 。纯化质粒被二氧化氯作用后电泳条带未出现明显弥散和拖尾现象。45 mmol/L 以上二氧化氯能彻底抑制质粒 DNA 的 PCR 模板活性, 150 mmol/L 的二氧化氯才能使纯化质粒的转化率降至对照组的 $0.20\% \pm 0.20\%$ 。实验证明二氧化氯对 DNA 具有损伤作用, 这种损伤可能与嘧啶碱和嘌呤碱的共轭双键被破坏有关。

关键词: 二氧化氯, 质粒, 高效液相色谱, 模板活性, 转化率

Effects of Chlorine Dioxide on Deoxyribonucleoside Triphosphate and Plasmid

WEI Ming-Ken^{1,2,3,4} WU Qing-Ping^{2*} WANG Da-Peng² WU Jun-Lin² ZHANG Ju-Mei²

- (1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301)
(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)
(3. Chemistry and Biology Department of Yulin Normal University, Yulin 537000)
(4. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: The mixture of deoxyribonucleoside, dCTP, dTTP, dGTP and dATP at concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$ for each, was treated by 75 mmol/L of chlorine dioxide for 10 min, high performance liquid chromatographic analyses indicated that all of the four decreased in peak area by $54.23\% \pm 2.08\%$, $66.25\% \pm 3.32\%$, $55.47\% \pm 0.23\%$, $59.59\% \pm 3.27\%$ respectively at wavelength of 260 nm. For 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of purified plasmid DNA, their activity as template in polymerase chain reaction were completely inhibited by chlorine dioxide at concentration of 45 mmol/L or above, and the transformation rate decreased to $0.20\% \pm 0.2\%$ when treated by 75 mmol/L of chlorine dioxide. Our result indicated that chlorine dioxide have substantial damages on deoxyribonucleoside and plasmid DNA.

Keywords: Chlorine dioxide, Plasmid, HPLC, Template, Transformation rate

过去的几十年, 二氧化氯被证明是一种安全高效的消毒剂。由于传统的含氯消毒剂被发现能与水中的有机物质发生反应生成致癌、致突变的副产物, 如三氯甲烷等, 所以使用二氧化氯代替含氯消毒剂在很多国家成为一种趋势。二氧化氯的氧化能力是次氯酸的 2.5 倍^[1], 因此能更有效地杀灭病毒、细菌、酵母和真菌等微生物。近几年, 有学者尝试将二氧化氯的应用拓展到食品、医疗器械消毒甚至藻类控制等领域, 并获得喜人效果^[2-6]。但目前对于二氧化氯的杀菌机理仍知之甚少。虽然 Alvarez 和 Noss 认为二氧化氯对病毒的杀灭作用可能是通过破坏病毒的核衣壳蛋白和核酸^[7,8], Li 等利用 Long-overlapping RT-PCR 和酶联免疫试验等发现二氧化氯导致甲肝病毒失活的原因可能是病毒 RNA 的 5' 非翻译区缺失或病毒抗原性的丧失^[9], Annamaria Buschini 通过体外试验证明二氧化氯对人类白细胞有轻度的基因毒性^[10], 陈春田等也用不同方法测定了二氧化氯作用后细菌核酸的泄漏^[11]。但迄今为止, 二氧化氯对 DNA 生理功能的损伤未有直接证据。本实验通过高效液相色谱检测二氧化氯对脱氧核糖核苷酸紫外吸收值的影响, 质粒 DNA 被二氧化氯作用后 PCR 模板活性和转化活性的变化等, 探讨二氧化氯对 DNA 的损伤及其可能的机制。

1 材料

1.1 质粒和菌株

重组质粒 pTZ57R-ORF₂N (携有氨苄青霉素抗性基因) 由本实验室自行构建; 宿主菌大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。

1.2 主要仪器和设备

高速冷冻离心机、核酸定量设备均为 BACKMAN 公司(美国)产品, 凝胶成像系统和成像软件为 UVI 公司产品, PCR 仪为 Biometra 公司产品, 高效液相色谱仪为日本岛津 Shimadzu LC-20 系统。

1.3 主要化学试剂

稳定性二氧化氯为广东环凯微生物科技有限公司产品(二元包装, 用前混合活化 30 min); dNTPs 混合物(2 mmol/L for each)购自 Fermentas MBI 公司; Taq 酶购自 TaKaRa 公司; 参考重组质粒的外源序列(GenBank 序列号: EF535854)自行设计引物, 具体为

Primer 1 : GAATGAAGATGGCGCGAATGACG,
Primer 2 : GCCATTATAA TGCACGTCTACG, 由北京赛百盛生物科技有限公司合成; 质粒提取试剂盒为上海生工公司产品。

2 方法

2.1 脱氧核苷酸被二氧化氯作用后紫外吸收的变化

2.1.1 几种相关物质的标准图谱: 脱氧核糖核苷三磷酸(dATP, dTTP, dCTP, dGTP)的标准图谱由 5 μ mol/L (按产品表示浓度稀释结果, 下同)的 dNTPs 混合物上机检测得出, 同时其紫外吸收值将被视为其他处理的对照值; 中和剂硫代硫酸钠的标准图谱由 15 mmol/L 的 Na₂S₂O₃ 溶液上机检测得出; 中和剂与二氧化氯反应产物的标准图谱由 200 μ L Na₂S₂O₃ 溶液(300 mmol/L)与 100 μ L ClO₂ 混合作用 10 min, 加 100 μ L 去离子水至体积为 400 μ L, 稀释 10 倍后上机检测得出(使 dNTPs 的浓度为 5 μ mol/L)。

2.1.2 中和剂对脱氧核苷酸紫外吸收的影响: 200 μ L 浓度为 300 mmol/L Na₂S₂O₃ 溶液与 100 μ L 浓度为 200 μ mol/L 的 dNTPs 等体积混合, 室温静置 10 min 后加去离子水 100 μ L 至总体积为 400 μ L, -20 $^{\circ}$ C 保存。上机检测前将样品稀释 10 倍(使 dNTPs 的浓度为 5 μ mol/L)。

2.1.3 中和剂与二氧化氯反应产物对脱氧核苷酸紫外吸收的影响: 200 μ L 浓度为 300 mmol/L Na₂S₂O₃ 溶液与 100 μ L 浓度为 75 mmol/L 的 ClO₂ 充分混合, 室温静置 10 min, 然后加入 100 μ L 浓度为 200 μ mol/L 的 dNTPs, 再次混匀放置 10 min, -20 $^{\circ}$ C 保存。上机检测前将样品稀释 10 倍(使 dNTPs 的浓度为 5 μ mol/L)。

2.1.4 二氧化氯对脱氧核苷酸紫外吸收的影响: dNTPs (200 μ mol/L) 和 ClO₂ 溶液(150 mmol/L)各取 100 μ L 充分混合并密闭作用 10 min, 然后加入 200 μ L 浓度为 300 mmol/L Na₂S₂O₃ 溶液, 再次混匀放置 10 min, -20 $^{\circ}$ C 保存。上机检测前将样品稀释 10 倍(使 dNTPs 的浓度为 5 μ mol/L)。

以上高效液相色谱的条件为: 分离柱为 250 mm \times 4.6 mm Hypersil GOLD 5 μ m, 紫外检测器为 SHIMADZU SPD-M20A, 检测波长 260 nm。流动相

由A、B液混合而得(A:B=98:2)。A液:1/15 mol/L KH_2PO_4 900 mL、1/15 mol/L K_2HPO_4 100 mL, 用1% H_3PO_4 调pH至6.0; B液: 甲醇。流动相流速为1.0 mL/min, 进样量20 μL 。

2.2 二氧化氯对纯质粒的PCR模板活性及转化效率的影响

2.2.1 质粒pTZ57R-ORF₂N的药物作用: 分别取50 μL 浓度为0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的质粒DNA与等体积二氧化氯室温作用10 min, 二氧化氯的终浓度分别为7.5 mmol/L、15 mmol/L、30 mmol/L、45 mmol/L、60 mmol/L、75 mmol/L、90 mmol/L、120 mmol/L和150 mmol/L。然后加入100 μL 浓度为300 mmol/L的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液中和残余的二氧化氯, 各取4 μL 进行琼脂糖凝胶电泳, 余液分别加入1/10体积的3 mol/L NaAc溶液和2倍体积的无水乙醇沉淀DNA。4、12000 r/min离心15 min, 75%乙醇洗涤沉淀3次, 风干后溶于20 μL TE溶液中, -20℃保存备用。本实验设置3个对照, 即质粒与 ddH_2O 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液(终浓度75 mmol/L)以及二氧化氯的预中和液 [ClO_2 (150 mmol/L) 50 μL + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (300 mmol/L) 100 μL , 充分作用后加入50 μL 质粒DNA], 与前述样品一同处理。

2.2.2 二氧化氯对纯质粒模板活性变化的检测: 分别取上述二氧化氯处理并重新沉淀、溶解后的质粒溶液1 μL , 稀释100倍作为PCR反应的模板。扩增反应体系为: 总反应体系50 μL , 其中: 5 μL 10×PCR buffer(with Mg^{2+}), 2.5 μL dNTPs混合物, 正、反向引物(浓度均为40 $\mu\text{mol/L}$)各1 μL , 模板1 μL , Taq酶0.5 μL (5 U/ μL), 39 μL 去离子水。PCR扩增条件为: 94℃ 4 min; 94℃ 35 s, 52℃ 45 s, 72℃ 60 s, 35个循环; 72℃ 10 min。扩增产物以1%琼脂糖凝胶电泳结合自动凝胶成像系统进行检测。

2.2.3 二氧化氯对纯质粒转化效率的影响: 质粒的转化和感受态细胞的制备参照文献^[12]的方法进行。取上述不同处理的质粒DNA各2 μL , 用氯化钙法转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞。以含有100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的平板筛选转化子, 以非转化的感受态细胞作阴性对照。

3 结果与分析

3.1 二氧化氯对脱氧核苷酸紫外吸收的影响

3.1.1 各相关物质的标准图谱: 本实验所做的标准

图谱中, 脱氧核糖核苷酸dCTP、dGTP、dTTP、dATP的保留时间依次大约是18.053 min、21.476 min、29.746 min、35.581 min(图1A), 中和剂硫代硫酸钠的保留时间是7.840 min, 硫代硫酸钠与二氧化氯反应产物的保留时间是12.205 min。同种物质在不同次实验中的保留时间略有变动。

3.1.2 中和剂对脱氧核苷酸紫外吸收的影响: 脱氧核苷酸与硫代硫酸钠作用后在260 nm处的峰形、峰高和峰宽均没有明显变化(图1B), 与对照相比, dCTP、dGTP、dTTP、dATP的紫外吸收值分别下降了8.14%±2.2%、9.10%±1.39%、12.17%±4.89%、8.61%±2.14%(图2A)。此结果显示中和剂硫代硫酸钠对脱氧核苷酸的紫外吸收影响较小。

3.1.3 中和剂与二氧化氯反应产物对脱氧核苷酸紫外吸收的影响: 二氧化氯被过量硫代硫酸钠中和后的反应液中既含有反应产物, 也含有未反应的硫代硫酸钠。脱氧核苷酸被这种混合溶液作用后, 在260 nm处的峰形、峰高和峰宽均没有明显变化(图1C)。与对照相比, dCTP、dGTP、dTTP、dATP紫外吸收值分别下降了2.79%±5.02%、5.71%±6.30%、13.60%±3.29%、2.90%±4.54%(图2B)。显示中和剂与二氧化氯的反应产物对脱氧核苷酸的紫外吸收影响较小。

3.1.4 二氧化氯对脱氧核苷酸紫外吸收的影响: 脱氧核苷酸被二氧化氯作用后, 保留时间没有明显变化, 但是峰高显著下降(图1D)。与对照相比, dCTP、dGTP、dTTP、dATP紫外吸收值分别下降了54.23%±2.08%、66.25%±3.32%、55.47%±0.23%、59.59%±3.27%(图2C)。结果显示二氧化氯对4种脱氧核苷酸紫外吸收均有强烈影响。

3.2 二氧化氯对纯化质粒PCR模板活性以及转化率的影响

与不同浓度的二氧化氯作用后, 质粒pTZ57R-ORF₂N的电泳条带没有出现明显拖尾或者弥散现象(见图3)。二氧化氯作用后的质粒经75%乙醇沉淀、洗涤、溶解于TE并作为模板进行PCR扩增。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 单纯的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 或者 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 与 ClO_2 的反应产物都没有抑制质粒的模板活性。随着二氧化氯作用浓度的升高, 扩增产物量呈不断下降趋势。当二氧化氯的浓度达到45 mmol/L时, 能完全抑制质粒的PCR模板活性(图4)。

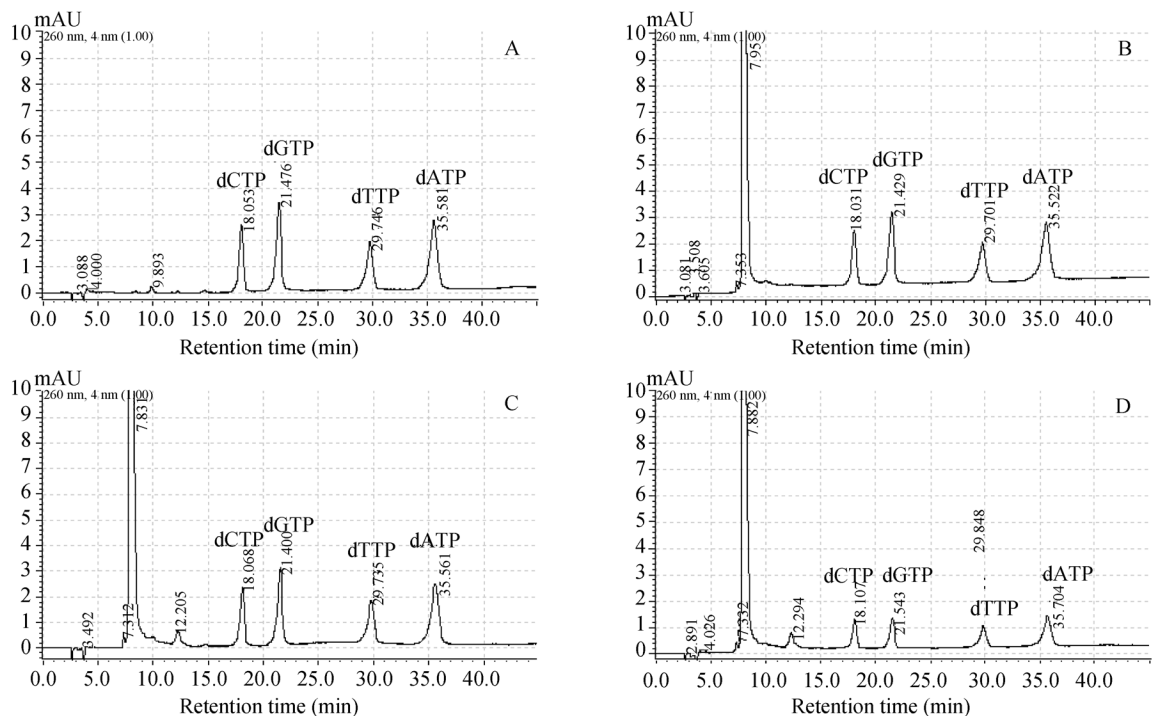


图 1 脱氧核糖核苷酸与去离子水(A)硫代硫酸钠(B)、硫代硫酸钠和二氧化氯反应产物(C)、二氧化氯(D)作用后的高效液相色谱图

Fig. 1 Comparisons of the chromatographic profile of deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) treated by (A) ddH₂O, (B) Na₂S₂O₃, (C) the mixtures of ClO₂ and excessive Na₂S₂O₃, and (D) ClO₂

注：保留时间在 18 min、21 min、29 min 和 35 min 左右的吸收峰分别对应 dCTP、dGTP、dTTP 和 dATP
Note: The peak corresponding to the retention times of about 18 min, 21 min, 29 min and 35 min represented dCTP, dGTP, dTTP and dATP respectively

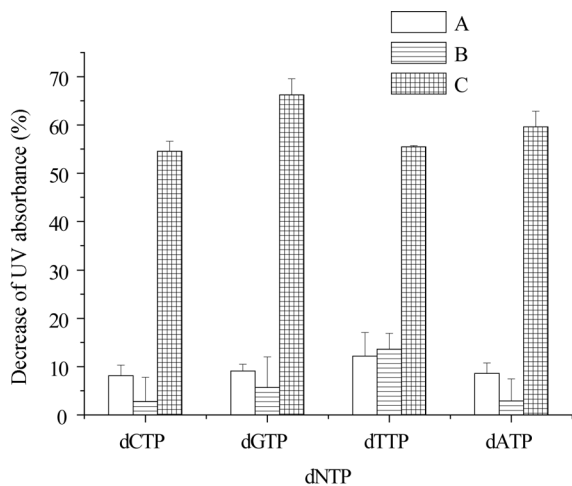


图 2 脱氧核苷酸与硫代硫酸钠(A)、硫代硫酸钠和二氧化氯反应产物(B)、二氧化氯(C)作用后的紫外吸收下降率
Fig. 2 The decrease of UV absorbance of deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) treated by Na₂S₂O₃ (A), the mixtures of ClO₂ and excessive Na₂S₂O₃ (B), and ClO₂ (C)

以过量Na₂S₂O₃与ClO₂的混合液所处理的质粒为对照(转化率为 100%), 质粒被二氧化氯作用后转化率随着作用浓度的升高呈不断下降趋势。与PCR的结果不同的是在二氧化氯的浓度达到 45 mmol/L

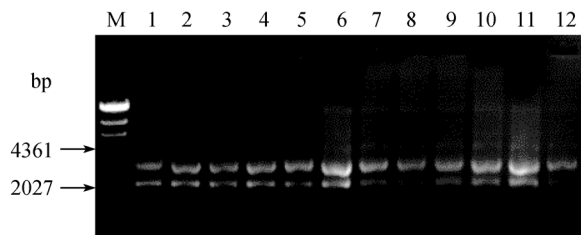


图 3 纯化质粒pTZ57R-ORF₂N被二氧化氯作用后的电泳图谱

Fig. 3 Purified plasmid of pTZ57R-ORF₂N that treated by variant concentration of ClO₂

M: DNA marker; 1-12 : 对应的处理依次为去离子水、硫代硫酸钠、硫代硫酸钠与二氧化氯的反应产物以及浓度为 7.5 mmol/L、15 mmol/L、30 mmol/L、45 mmol/L、60 mmol/L、75 mmol/L、90 mmol/L、120 mmol/L 和 150 mmol/L 的二氧化氯
M: DNA marker; 1-12 corresponding to the treatments of ddH₂O, Na₂S₂O₃, mixture of ClO₂ and excessive Na₂S₂O₃, 7.5 mmol/L, 15 mmol/L, 30 mmol/L, 45 mmol/L, 60 mmol/L, 75 mmol/L, 90 mmol/L, 120 mmol/L, and 150 mmol/L of ClO₂ treatment respectively

时, 转化率仍然较高。只有二氧化氯的浓度升高到 150 mmol/L 时, 转化率才降至对照的 0.2%±0.2% (图 5)。

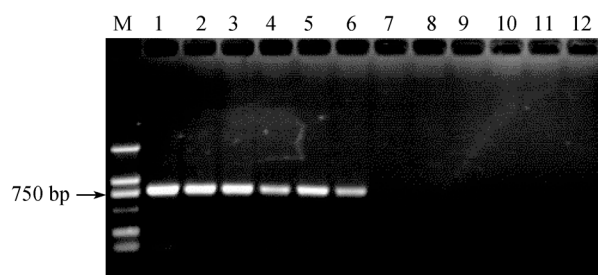


图 4 纯化质粒pTZ57R-ORF₂N被二氧化氯作用后作为模板的PCR扩增结果

Fig. 4 Polymerase chain reaction(PCR) products with models treated by variant concentration of ClO₂

M: Marker; 1-12: 对应的处理依次为去离子水、硫代硫酸钠、硫代硫酸钠与二氧化氯的反应产物以及浓度为 7.5 mmol/L、15 mmol/L、30 mmol/L、45 mmol/L、60 mmol/L、75 mmol/L、90 mmol/L、120 mmol/L 和 150 mmol/L 的二氧化氯

M: Marker; 1-12 corresponding to the treatments of ddH₂O, Na₂S₂O₃, mixture of ClO₂ and excessive Na₂S₂O₃, 7.5 mmol/L, 15 mmol/L, 30 mmol/L, 45 mmol/L, 60 mmol/L, 75 mmol/L, 90 mmol/L, 120 mmol/L, and 150 mmol/L of ClO₂ treatment respectively

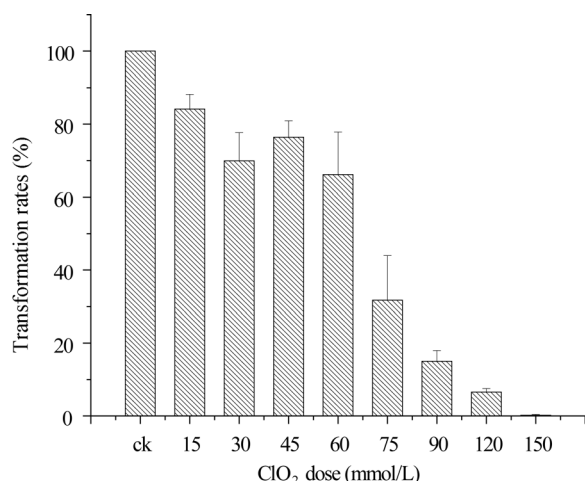


图 5 纯化质粒pTZ57R-ORF₂N被不同浓度二氧化氯作用后的转化率

Fig. 5 Transformation rates of purified plasmids that treated by variant concentrations of ClO₂

CK: 过量硫代硫酸钠与二氧化氯反应产物所处理的质粒

CK: Plasmid that treated by the mixture of ClO₂ and excessive Na₂S₂O₃

4 讨论

前人的研究表明, 二氧化氯可以迅速透过细菌的细胞壁和细胞膜进入细胞内, 抑制酶的活性, 使细胞质发生凝集等^[1,10,11,13,14]。我们在研究中也发现, 二氧化氯能使白色念珠菌的有氧呼吸在几秒钟之内受到强烈抑制, 证明二氧化氯能穿过细胞质并透过线粒体膜(结果将另文发表)。因此, 二氧化氯到达原

核细胞的核区或真核生物细胞核并与DNA发生作用是有可能的。

DNA是 4 种不同脱氧核糖核苷酸的特异性排列组合, 其损伤一般包括主链的断裂、侧链基团被修饰或化学键断裂等。本研究以游离脱氧核糖核苷三磷酸的混合物为作用对象, 首次揭示了二氧化氯对单分子核苷酸的效应。研究结果表明二氧化氯作用后 4 种脱氧核糖核苷酸在 260 nm 处的紫外吸收均有明显下降(图 1D)。脱氧核糖核苷酸的紫外吸收特性源于嘌呤碱和嘧啶碱上的共轭双键, 共轭双键被破坏将直接导致紫外吸收下降。实验中用于中和二氧化氯的中和剂硫代硫酸钠以及二氧化氯与硫代硫酸钠的反应产物对脱氧核糖核苷酸的紫外吸收的影响都有限(图 1B, C; 图 2A, B), 而二氧化氯处理后紫外吸收的下降非常显著(图 1D, 图 2C), 说明碱基中的共轭双键遭到了损伤, 并且这种损伤是由二氧化氯的作用导致的。值得注意的是, 4 种脱氧核苷酸紫外吸收下降幅度均比较接近, 显示二氧化氯对这几类核苷酸的作用没有很强的选择性。嘌呤碱和嘧啶碱可以和溶液中的强氧化性基团发生反应。例如 NO₂ 与体内的过氧化氢反应生成超氧阴离子自由基和羟自由基, 这些自由基进而与嘧啶碱或嘌呤碱发生电子转移反应或加成反应^[15]。二氧化氯也是一种强氧化剂, 它与脱氧核糖核苷酸发生反应的机制是否与前者相似有待于进一步的研究。

虽然 Alvarez 和 Li 发现了二氧化氯对病毒 RNA 有直接的损伤作用^[7,9], 但是至今未有关于二氧化氯对 DNA 生理功能损伤的报道。一些研究者试图通过监测消杀体系中 OD₂₆₀ 的变化来判断二氧化氯对 DNA 的损伤^[11,13], 但由于中和剂硫代硫酸钠及其与二氧化氯的反应产物、ATP 泄漏^[16] 等在 260 nm 附近均有吸收峰, 对测定结果造成较大的干扰。聚合酶链式反应是一种灵敏度很高的 DNA 扩增方法, 可以直接检测二氧化氯对质粒 DNA 的损伤效应。实验中, 二氧化氯作用后的纯化质粒条带仍显得相当整齐, 而且大小没有改变(图 3), 说明质粒 DNA 主链仍保持高度完整。但 PCR 扩增和质粒转化试验均证明 DNA 受到了损伤, 并且损伤强度与二氧化氯的作用浓度呈正相关(图 4, 图 5)。因此我们推测质粒模板活性的丧失以及转化率下降的主要原因是侧链的某些基团被修饰、损伤所致, 由于构成 DNA 主链的是

磷酸戊糖结构, 而侧链是嘌呤碱或嘧啶碱。由此判断是DNA上的嘌呤或者嘧啶受到了损伤, 这与脱氧核糖核苷酸紫外吸收值下降的结果是一致的。

综上所述, 我们认为: 二氧化氯对 DNA 具有某种程度的损伤作用, 这种损伤可能与嘧啶碱和嘌呤碱的共轭双键被破坏有关。但在细胞内二氧化氯如何作用于 DNA 以及这种损伤与细胞被杀灭之间的关联度有待于进一步研究。

致 谢: 感谢广东省菌种保藏与应用重点实验室甘丽霞老师在液相色谱工作方面提供的支持和帮助!

参 考 文 献

- [1] Benarde MA, Israel BM, Olivieri VP, *et al.* Efficiency of chlorine dioxide as a bactericide. *Appl Microbiol*, 1965, **13**: 776–780.
- [2] Ana A, Francisco A, Barberána T, *et al.* Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, **17**: 513–519.
- [3] Zhang S, Farber JM. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiol*, 1996, **13**: 311–321.
- [4] 张 珩, 杨维东, 高 洁, 等. 二氧化氯对球形棕囊藻的抑制和杀灭作用. 应用生态学报, 2003, **14**(7): 1173–1176.
- [5] Chauret CP, Radziminski CZ, Lepuil M, *et al.* Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 2993–3001.
- [6] Radziminski C, Ballantyne L, Hodson J, *et al.* Disinfection of *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide: a bench-scale and pilot-scale study. *Water Res*, 2002, **36**: 1629–1639.
- [7] Alvarez ME, O'Brien RT. Mechanisms of inactivation of poliovirus by chlorine dioxide and iodine. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **44**: 1064–1071.
- [8] Noss CI, Hauchman FS, Olivieri VP. Chlorine dioxide reactivity with proteins. *Water Res*, 1985, **20**: 351–356.
- [9] Li JW, Xin ZT, Wang XW, *et al.* Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide. *Water Res*, 2004, **38**: 1514–1519.
- [10] Buschini A, Carboni P, Furlini M, *et al.* Sodium hypochlorite-, chlorine dioxide- and peracetic acid-induced genotoxicity detected by the Comet assay and *Saccharomyces cerevisiae* D7 tests. *Mutagenesis*, 2004, **19**(2): 157–162.
- [11] 陈春田, 李东力, 刘希真, 等. 二氧化氯对细菌杀灭作用机理的实验观察. 中国消毒学杂志, 2002, **19**(3): 137–141.
- [12] 黄培唐等译, Sambrook J, Russell DW 著. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. 北京: 科学出版社, 2002, pp.96–99.
- [13] Benarde MA, Snow BW, Olivieri VP, *et al.* Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. *Appl Microbiol*, 1967, **15**: 257–265.
- [14] Roller SD, Olivieri VP. Mode of bacterial inactivation by chlorine dioxide. *Water Res*, 1980, **14**: 635–641.
- [15] 邱 榕, 范维澄. 火灾常见有害燃烧产物的生物毒理 ()——一氧化氮、二氧化氮. 火灾科学, 2001, **10**(4): 200–208.
- [16] 张晓煜, 吴清平, 张菊梅, 等. 二氧化氯对大肠杆菌作用机理的研究. 中国消毒学杂志, 2007, **24**(1): 16–20.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材, 两种商品等。