

# 利用植物与微生物的分子协同作用高效去除环境污染物甲醛

作者：张奕杨

指导教师：廖辉

学校：上海中学国际部 (Shanghai High School International Division, SHSID)

**论文摘要：** 甲醛是一种易挥发、高毒性的室内空气污染物，而由于现代建筑的特点，单纯通过增加建筑通风率来消除甲醛污染效果并不理想。植物生态净化法利用植物光合作用对甲醛等有害有机物进行生物转化，将其分解转化为  $H_2O$  和  $CO_2$ ，具有长期适用性和有效性，并且可能实现环境零排放。但大多数植物在没有共生根际微生物的情况下，去除甲醛的能力有限，因而不适合处理高浓度室内甲醛污染。在此项研究中，我们首先通过扩增子测序技术分析普通家庭盆栽绿萝根系土壤中的微生物多样性及群落组成差异，并与文献报道中主要的具备甲醛降解能力的微生物种类进行了对比。同时利用平板划线分离法得到其中三种主要细菌，在实验室内分析了它们的甲醛耐受性。结果表明，中国家庭绿萝盆栽土壤中很可能缺乏能够有效清除甲醛的微生物种群。为解决这一问题，我们在国际开源数据库 NCBI 中检索了微生物中能够显著代谢甲醛的生物酶，从中选取了高度特异及体外高效的、来自于恶臭芽孢杆菌的甲醛歧化酶(Fdm)和来自于大肠杆菌的甲醛脱氢酶(FrmA)和 S-甲酰谷胱甘肽水解酶(FrmB)。通过商业化的基因合成服务定制了密码子优化后的全长 cDNA 序列，并在此基础上构建了两个转基因表达载体，*p35S:fdm* 表达载体和 *p35S:frmA-p35Smini:frmB* 双基因表达载体。在建立和优化了绿萝的组织培养体系和转基因方法的基础上，我们将这两个甲醛代谢通路转入模式植物拟南芥和绿萝。转基因拟南芥筛选后已获得纯合体，通过甲醛培养基生长实验、叶片提取液降解实验以及密闭舱熏蒸实验，均证实转基因拟南芥降解甲醛的能力得到了明显提升，而且 *35S:frmA-p35Smini:frmB* 植物的效果好于 *35S:fdm* 植物。同时，我们获得了在筛选培养基上处于生根阶段的绿萝转化子，因目前仍缺少完整植株，我们先利用绿萝的原生质体进行了甲醛的添加实验，通过  $H_2O_2$  荧光探针 H2DCFDA 观察细胞内活性氧(ROS)的积累。结果表明，相比于野生型细胞，转基因绿萝原生质体中由甲醛毒性诱导产生的 ROS 水平显著降低，从而在细胞水平上验证

了转基因效果。综上所述，本研究首先确定了家养绿萝品种在甲醛清除机制上可能缺少相应微生物协同作用这一缺陷，之后通过生物信息学方法和遗传工程手段将微生物中清除甲醛的关键代谢通路转入植物体内，使植物和微生物在甲醛降解的分子机制上实现分子协同，利用前者强有力的生物酶催化能力和后者良好的气体交换能力及体内强大的生化反应体系，大大增强了传统空气净化植物对室内环境中甲醛的去除，让环境友好型的、具有强大环境修复能力的植物成为可能。

**关键词：**甲醛、绿萝、拟南芥、微生物、植物基因工程。

## 目录

题目及作者.....	1
摘要.....	1-2
目录.....	3
研究背景及意义.....	4-8
实验材料及方法.....	9-15
实验结果及讨论.....	16-24
实验结论及展望.....	25
参考文献.....	26-29
成员贡献.....	30

# 论文正文

## 1.研究背景及意义：

最近研究报告表明，全世界每年因空气污染而死亡的人数约为 880 万人(Sarkar et al., 2019)。在中国，“室内空气污染”已成为继大气、水体、固体废弃物、噪声四大污染之后的第五大污染(蔡宝珍，熊伟，金荷仙，2011)。甲醛是一种挥发性有毒有机化学物质，具有高水溶性和持续释放的特性，是危害人体健康的首要室内空气污染物(Adaji et al., 2019)。甲醛具有很高的化学活性，可与蛋白质和核酸产生共价交联复合物(Heck et al., 1990)。2004 年，国际癌症组织(IARC)将甲醛定为第一类致癌物质，指出其不但导致嗅觉失常、过敏性反应、肝肾肺等脏器功能异常、免疫系统功能异常、中枢神经系统受损等，严重还会致癌(IARC, 2012)。长期接触甲醛还可能导致儿童白血病、早产和先天性异常，每年仅因室内甲醛污染而死亡的儿童人数就约为 210 万(Singh and Dixit, 2019)。因此，如何避免或者减少室内甲醛气体污染，改善室内空气质量，使人居环境更加安全具有非常重要的意义。

目前，控制与防治室内空气污染的措施众多。其中，物理空气净化仅对 PM 2.5 等粉尘颗粒进行过滤，而对有害分子如甲醛、二氧化硫、硫化氢、一氧化碳等没有很好的净化功能。除此之外，人们也开发了许多其他的治理技术，包括纤维过滤、膜分离净化、活性炭吸附、静电补集、光催化分解、低温等离子体分解和臭氧灭菌消毒等(龚圣，黄肖容，隋贤栋，2004; 王佳佳，施冰，刘晓东，2007)，但这些方法存在成本高、装置复杂、治标不治本、伴生二次污染等缺点(Chen et al., 2018)。与这些技术相比，植物生态净化技术具有经济长效、操作简单、环境破坏性小、能耗低、兼顾景观和气候调节能力等优点，对于普通居民来讲也往往比较容易实现(Chen et al., 2018)。在众多观赏植物中，大花惠兰、春芋、蚊草、洋桔梗、天竺葵、凤尾蕨、烟草等吸收甲醛能力最强，在甲醛浓度超标 10 倍的范围内，绿萝、常春藤、绿萝 3 种耐阴植物吸收甲醛的能力最强(曹受金，潘百红，田英翠等，2009; 王兵，王丹，任宏洋等，2015)。

绿萝 (*Eipremnum aureum*) 是天南星科麒麟叶属常绿附生藤本植物，原产于东南亚及南太平洋诸岛。绿萝茎蔓粗壮，可延伸十数米，攀附力强，其节处长气生根；叶呈

心脏形，随蔓茎伸高而长大。绿萝是优良的室内植物之一，通常作盆栽，生长旺盛且耐阴性好，易于栽培管理，除此之外，绿萝还能吸收空气中的苯、甲苯、二甲苯、三氯乙烯、甲醛、氨等，并将甲醛转化成糖或氨基酸等物质，也可以分解由复印机、打印机排放出的苯，被誉为天然的“空气净化器”。绿萝一般采用扦插法繁殖，但通过组织培养技术进行试管繁殖，可以达到经济、快繁、工业化生产的目的。

空气中的甲醛通过叶片吸收进入植物体内后，通常会进入 C1 代谢或转化为二氧化碳(Pilon-Smits, 2005; Irga *et al.*, 2018)。除此之外，氧化还原反应是植物去除甲醛的另一种可能途径(Liang *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019)。上世纪 80 年代，美国国家航空航天局 NASA 的研究人员构建了一个相对密闭的空间来研究绿萝对室内甲醛的吸收能力，结果表明 6 小时内吸收的甲醛值为  $0.46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Wolverton *et al.*, 1984)。除了植物自身对甲醛具有代谢能力之外，有学者认为对空气中甲醛的降解能力多来自于土壤微生物，在没有根际微生物的情况下，植物通过氧化还原去除甲醛的能力是有限的(Chen *et al.*, 2010)。而根际细菌能够有效降解甲醛的原因是因为甲醛是甲醇代谢的主要代谢中间体，也是一种细胞毒性化合物，这意味着甲基营养菌的微生物需要采取多种代谢策略来应对甲醛毒性(Orita *et al.*, 2005)。因此，当考虑利用植物对甲醛进行生态净化时(Yang *et al.*, 2020)，我们不仅要考虑植物的种类和甲醛在植物体内的扩散速率，还必须要考虑植物根际微生物的作用(Kim *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Aydogan and Montoya, 2011; Gaiero *et al.*, 2013; Teiri *et al.*, 2018)。

甲醛进入植物后，可以直接被植物细胞代谢或转移到根际环境由微生物所降解(Kim *et al.*, 2010)。但空气中的微生物没有固定类群，群体种类与水平取决于植被类型及面积大小、绿地植物种类及郁闭度、植物生长发育状况、人为活动强度、气候因素、化学污染及地域差别等综合因素。因此，虽然近年来包括甲基杆菌属 *Methylobacterium* sp. MF1 (Mitsui *et al.*, 2005) 和 *Methylobacterium* sp. XJLW (Qiu *et al.*, 2014)、酵母菌株 *Debaryomyces vanriji* (Kato *et al.*, 1982)、曲霉菌 *Aspergillus nomius* 等真菌(Kondo *et al.*, 2002)以及海洋藻类如微拟球藻 *Nannochloropsis* (Yoshida *et al.*, 2009) 等具有除甲醛能力的微生物不断被发现，但特定的土壤中却不一定包含这些微生物。而且在实际应用中，对微生物种类的选择也有特定的要求。除了要考虑甲醛代谢效率外，还需考虑以下几个方面。

首先，真菌虽然具有很好的除甲醛能力，但在一定的温度和湿度下会产生大量菌丝并形成孢子，对人体健康产生不利影响，因此不适合大规模使用。其次，致病微生物不能使用。除此之外，微生物净化法还有菌种稳定性、降解效率不高以及菌种安全等问题，其应用也一直处在实验室摸索阶段(杨航，李剑，刘庆辉等，2020)。所以，找到高效、稳定、安全的甲醛降解菌，添加在土壤里和植物共培养这个方法仍不成熟，同时还要考虑降低成本和减少环境负荷。

与上述方法相比，生物降解法去除甲醛不但具有有效性和适用性，而且成本很低，在生产过程中也不会产生额外的化学危害，这正是我们开展此项研究的初衷，即希望将植物尤其是常用的绿化植物作为生物降解法的主体，将微生物降解挥发性有机物 VOC 的分子机制整合进植物体内，从而大幅提升植物消除空气环境污染的能力。为确立这项研究的必要性，我们首先将普通家庭中的绿萝栽培土壤样本送至测序公司进行了土壤微生物群落分析和多样性检测，结果发现正常土样内并不包含文献报道中具有强甲醛降解能力的种群。同时我们也在实验室通过菌落划线分离法和 16S rDNA 测序分离了三种菌株，甲醛培养试验表明它们也均不具有甲醛耐受性。由此说明，在家庭正常环境内，很可能绿萝的生长土壤中缺乏共生的、能够降解甲醛的微生物。因此，我们萌发了将微生物中具有高效甲醛降解能力的功能基因通过遗传工程的方法转入植物中的想法。在利用模式植物进行功能验证的同时，我们重点选择绿萝进行基因工程转化具有其独特的优势，首先是因为绿萝具有非常发达的维管组织，可以将由气孔进入的甲醛气体迅速扩散到植物的所有组织进行代谢。其次，扦插是绿萝主要的繁殖手段，在生产实践中很容易获得更多的、具有相同基因型的植物群体。更重要的是，绿萝在正常培养条件下不会开花，因此在实际应用中不会通过花粉传播进行基因的水平转移。

为挑选出恰当的功能基因，我们首先对比了植物和微生物中的甲醛代谢途径，发现二者既有共性，也有区别。如图 1 所示，植物和微生物降解甲醛的主要途径包括：(a)主要存在于微生物中的 H4MPT 依赖途径；(b)在植物和微生物中均有发现的 H4F 依赖途径；(c)主要存在于植物中的甲基活化途径。通过查找文献，我们决定选取三个基因，因为它们以最简洁的步骤催化了两个不同的甲醛降解途径，并且已有研究者在体外酶学试验中证实了它们的甲醛降解活性。其中一个基因编码微生物特有的甲醛歧化酶 FDM，它可将甲

醛直接催化生成甲酸(Park *et al.*, 2010); 另外两个基因分别编码谷胱甘肽-依赖型解毒系统中的甲醛脱氢酶 A (*frm A*), 又名谷胱甘肽依赖型甲醛脱氢酶 (FALDH), 它与甲醛异化作用有关。另外一个基因编码甲醛脱氢酶 B (*frm B*), 又名 S-甲酰谷胱甘肽水解酶 (FGH)。当甲醛在植物体内与谷胱甘肽自发反应生成 S-羟甲基谷胱甘肽后, 先后被这两种酶氧化生成 S-甲酰谷胱甘肽, 再水解生成甲酸和谷胱甘肽(Gonzalez *et al.*, 2006), 而形成的甲酸可经线粒体中的甲酸脱氢酶和过氧化物酶体中的过氧化氢酶继续转化为二氧化碳和水(Halliwell and Butt, 1974)。*frmA* 和 *frmB* 存在于微生物和植物中, 但活性有所差异。前期研究表明, 大肠杆菌细胞中的 *frmA* 和 *frmB* 基因的表达量可被甲醛上调 20-100 倍(Herring and Blattner, 2004), 并且参与了体内的甲醛解毒作用(Gonzalez *et al.*, 2006)。接下来, 我们在 NCBI 公共数据库中查找和对比了多种微生物的同源基因后, 最终选择了来自于恶臭假单胞菌的 *fdm* 和大肠杆菌的 *frmA* 和 *frmB* 基因, 通过基因合成的方法, 分别将三个基因连接到两个不同的植物表达载体上, 借助于农杆菌侵染的方法, 将靶基因导入植物基因组内, 希望将微生物优良的甲醛降解能力和植物自身具有的净化能力加以整合, 构建友好型环境修复植物, 提升植物对甲醛的耐受性和去除能力。我们希望通过这样的方法, 哪怕环境中微生物的种类不够理想, 植物也能达到优良的空气净化效果。

本课题属于自主选题, 研究创新点在于构建了植物和微生物对污染物的协同降解机制, 打破了去除环境污染物对根际微生物的依赖性。并且我们在构建转基因质粒表达载体时也进行了创新, 用双向强启动子同时激活两个基因的活性, 使上下游的催化反应同步进行, 密切协调。同时, 鉴于绿萝作为单子叶植物, 转化体系并不完善, 我们利用模式植物拟南芥进行了转基因功能验证, 在短时间内确立了转基因效果, 目前实验仍在持续中。利用植物和微生物联合处理环境污染物被认为是一种高效、经济且环保的方法。前人工作中曾将致病性甲基杆菌 FD1 的甲醛变异酶基因在非致病性大肠杆菌中表达, 用来降解高浓度甲醛(Yonemitsu and Kikuchi, 2018)。Chen 等人将 5-磷酸核酮糖单磷酸 (RuMP) 途径中固定甲醛的关键酶 6-磷酸己酮糖合成酶 (HPS) 和 6-磷酸果糖异构酶 (PHI) 引入拟南芥和烟草中, 使单磷酸核酮糖合成途径相互连接(Chen *et al.*, 2010)。Song 等人在天竺葵叶绿体中过表达 HPS/HPI 融合酶(Song *et al.*, 2010)。此外, 植物来源的基因也能增强其他植物的除甲醛能力(Lee *et al.*, 2015)。而本研究将微生物降解甲醛途径中的关键调控因子转入家

庭常见绿色植物，希望可以为去除甲醛污染以及其它的挥发性有机化合物污染问题提供一种新的策略。

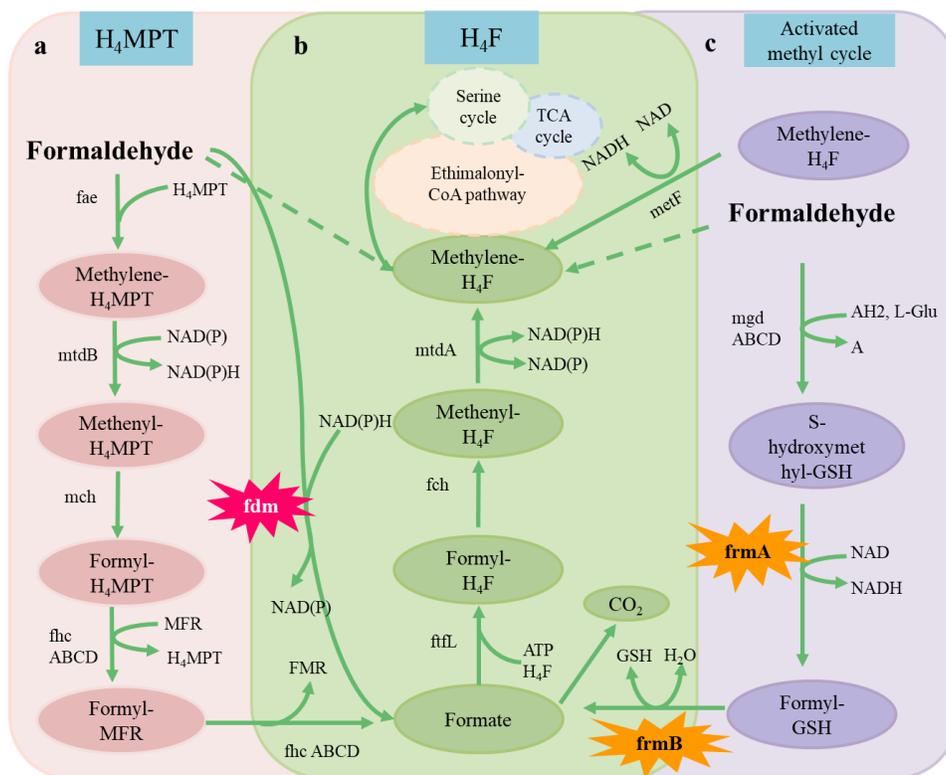


图 1: 植物和微生物降解甲醛的主要途径

- (a) H<sub>4</sub>MPT 依赖途径，主要存在于微生物中；
- (b) H<sub>4</sub>F 依赖途径，存在于植物和微生物中；
- (c) 非叶酸依赖途径，主要存在于植物中。

## 2. 实验材料及方法

### 2.1 主要试剂及实验装置

常用生化试剂及实验耗材购自上海生工生物工程股份有限公司。PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA 聚合酶 购自大连 TAKARA 宝生物公司；2×Taq PCR、DNA 电泳标品、大肠杆菌 Top10 和农杆菌 LBA4404 化学感受态细胞、电泳凝胶提取试剂盒、质粒小提试剂盒、pEASY-Blunt Simple 克隆试剂盒、EasyPure 植物 RNA 提取试剂盒和 EasyScript First Strand cDNA Synthesis SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司；SYBR Green Real Master Mix 购自天津沙船生物科技发展有限公司；细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒购自北京博迈德生物技术有限公司。主要试验仪器包括超净工作台（苏州净化）、立式压力灭菌锅（上海申安）、紫外分光光度计（UV2600，日本岛津公司）、分析天平（Setra BL-410A，美国西特公司）、pH 计（PHS30，上海仪电科学仪器股份有限公司）、高精度甲醛检测仪（RM6-2000b，美国 Interscan）、实时定量 PCR 仪（PikoReal 96 Real-time Thermal Cycler，美国 Thermo Fisher Scientific）等。

### 2.2 土壤细菌群落组成分析及实验室分离鉴定

绿萝 (*Epipremnum aureum*) 为市场购买，室内养护两个月后选择生长良好的盆栽，用土壤取样器采用 5 点法进行取样，取样深度 10-20cm，取根中及周边土壤基质 10 克，一部分土样液氮冷冻后干冰快递到武汉贝纳基因公司进行扩增子测序及分析。具体方法是，在 DNA 提取和定量后根据序列中的保守区域设计相应引物，并添加样本特异性 Barcode 序列，进而对 rRNA 基因可变区或特定基因片段进行 PCR 扩增。扩增产物使用磁珠纯化回收后进行荧光定量，根据荧光定量结果，按照每个样本的测序量需求，对各样本按相应比例进行混合。采用 Illumina 公司的 TruSeq Nano DNA LT Library 试剂盒制备测序文库。文库质检合格进行上机测序，使用 MiSeq 测序仪进行高通量测序。研究细菌多样性选择扩增 16S rDNA 序列，真菌选择 ITS 序列，按照序列 97% 的相似性进行 OTU 聚类。

在送土样至测序公司的同时，我们留取了一部分在实验室内采用稀释平板法进行土壤微生物分离。具体方法是将土样放入 1 mL 0.85% NaCl 中，并在室温下超声 3 分钟，释放样品中的微生物，然后用 NaCl 缓冲液连续稀释 10 倍，各取 100  $\mu$ L 涂布于 LB 平板上。在 30  $^{\circ}$ C 条件下，挑取单个菌落并培养获得纯菌种。采用 PCR 方法从细菌中扩增 16S

rDNA，引物序列 16S-F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 16S-R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3') (Imperato *et al.*, 2019)，扩增产物由苏州金唯智公司测序。收到返回的测序结果后，我们将序列与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) GenBank 数据库中的核酸序列进行 BLAST 比对，从而获得物种信息。与此同时，我们对单菌落进行了液体培养，测定了菌株的耐甲醛能力，在 30 °C 200 rpm 振荡培养 24 h，然后接种在新的 LB 培养基中培养至光密度为 OD<sub>600</sub>=0.05 时，在 15 mL 培养基中添加甲醛至浓度为 0 (对照)、0.01、0.05、0.1 mM，彻底混合后继续培养 24 小时。在 12 h 和 24 h 时通过 600 nm 的吸光值测定菌株生长情况。

### 2.3 甲醛降解酶的基因合成及转基因载体构建

经过文献检索，我们选定来自于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 的甲醛歧化酶 formaldehyde dismutase (fdm)，GenBank # L25862.1 和来自于大肠杆菌 *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 的 S-(hydroxymethyl)-glutathione dehydrogenase (frm A)，NCBI Gene ID 944988 和 S-formylglutathione hydrolase (frm B)，NCBI Gene ID 944991。在 NCBI 下载 cDNA 全长序列后，我们在序列末端添加所需的启动子序列，由苏州金唯智生物有限公司经密码子优化后以 100% 序列准确度合成 DNA 构建体，并连接到植物表达载体 *pBI121* 上，替代原有的 *GUS* 基因，形成新的植物表达载体 (图 2)。合成序列与原始序列对比见图 3。

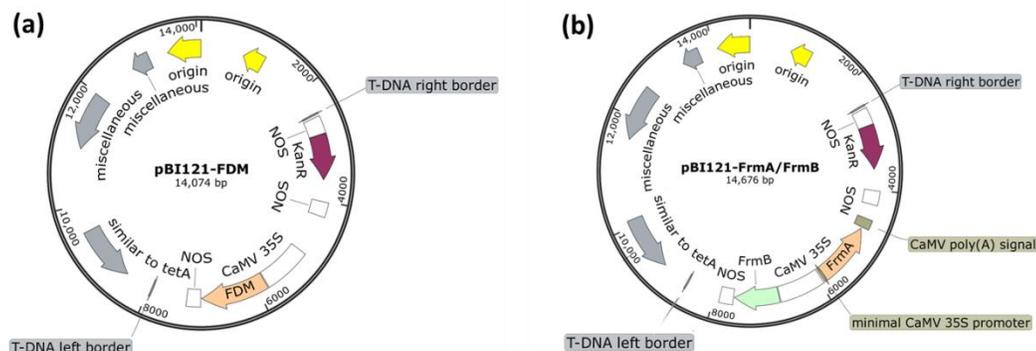


图 2：重组质粒构建图谱

(a) *Ppfdm* 基因由 CaMV 35S 启动子驱动； (b) *EcFrmA* 基因和 *EcFrmB* 基因分别由 CaMV 35S 最小启动子和 CaMV 35S 驱动。载体骨架来源于 *pBI121*。

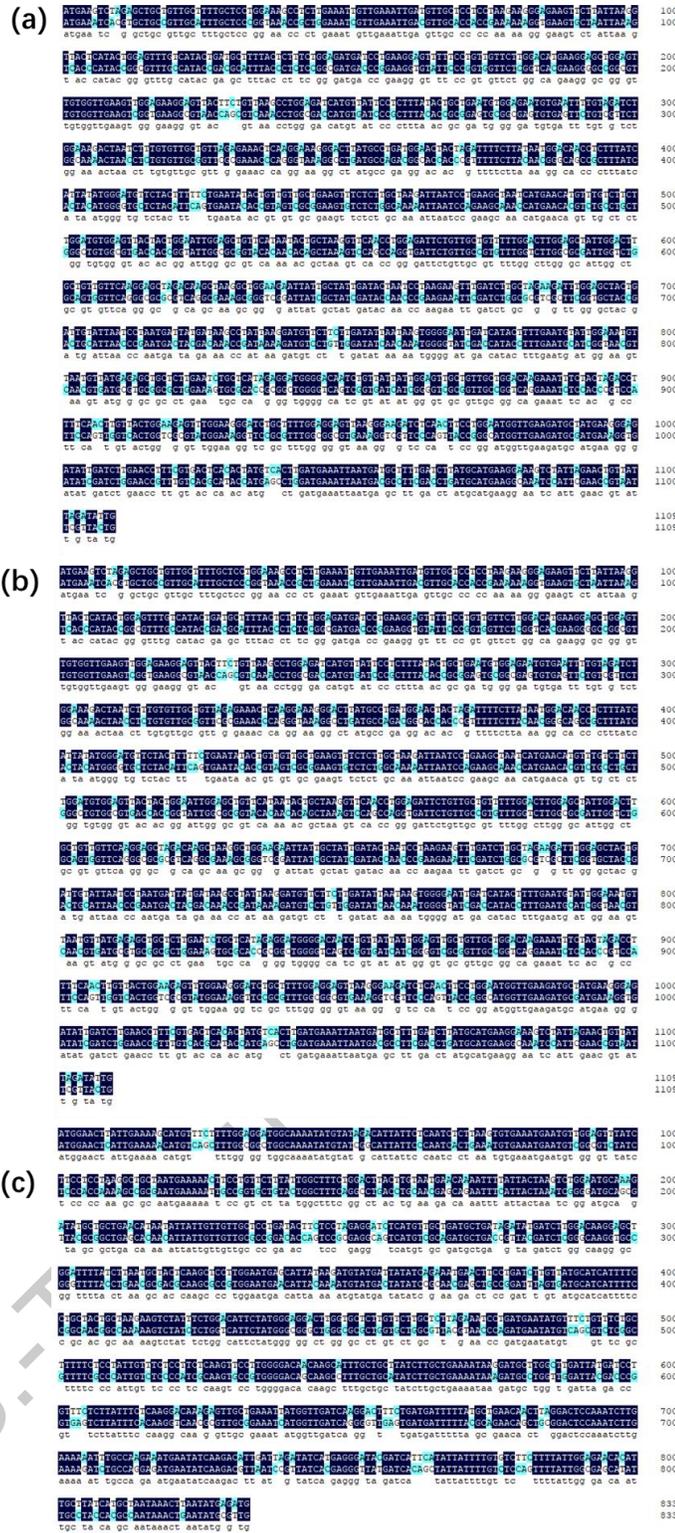


图 3: 经过密码子优化的三个微生物基因与各自原始的 cDNA 序列的比对

(a) *Ppfdm* 基因; (b) *EcFrmA* 基因; (c) *EcFrmB* 基因。

## 2.4 拟南芥及绿萝的组织培养及遗传转化

本研究中所用植物材料为哥伦比亚生态型 (Col-0) 拟南芥, 绿萝是市场上购买的普通绿叶和金叶品种。拟南芥室内培养条件为 22 °C, 光照强度为 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 光周期为 16 小时光照/8 小时黑暗, 相对湿度 60%。通过农杆菌介导的花序浸染法转化拟南芥 (Clough and Bent, 1998)。将拟南芥植株转化后筛选得到的第 1 批种子称为 T1 代。将灭菌后的 T1 种子继续播种到含有卡那霉素(Kan 50 mg/L)的 1/2 MS 固体培养基中 (琼脂浓度为 0.7%, 蔗糖 3.0%, pH 调至 5.7-5.8)。筛选出 1/4 致死率的单拷贝转化子后将 T1 绿色幼苗移到土壤中培养, 结实后收集 T2 代种子, 继续按照上述步骤重复操作纯化到第三代, 挑选抗性平板上成活率 100% 的幼苗, 确立 T3 转基因纯合株系, 再进行之后的实验。

取纯合株系叶片提取总 RNA, 使用 oligo-(dT)<sub>18</sub> 引物反转录合成 cDNA 后通过半定量 qRT-PCR 检测靶基因的表达量, 并选取表达量最高的 2 个独立株系进行下一步的实验。相关基因引物见表 1。半定量 PCR 实验条件为: 95°C 5 分钟, 接着 30 个循环 95°C 30 秒, 58°C 36 秒, 72°C 35 秒, 最后 72°C 10 分钟, 看家基因 *EF1- $\alpha$*  作为内参。

表 1. 拟南芥半定量 PCR 引物列表

基因	方向	引物序列 (5' to 3')
<i>AtEF1<math>\alpha</math></i>	F	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA
	R	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA
<i>PpFDM</i>	F	GGGAAGTGGTAGAAAAGGGC
	R	CCACCAGACCACCCTTTCA
<i>EcFrmA</i>	F	AAGGCGTAACCAGCGTCAAA
	R	GGCTGCCCGTTGTAAGAAAA
<i>EcFrmB</i>	F	TCATTCTATGGGCGGGCT
	R	TAAAAATCATCACTCAACCCCTG

绿萝的遗传转化实验首先是选取幼嫩带节茎段外植体进行灭菌处理, 用自来水冲洗 30 分钟后, 先用 75% 酒精处理 30 秒, 再用 2% 次氯酸钠消毒 6 分钟, 无菌水冲洗 5 次。将其放在芽增殖培养基上 (MS+2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA), 1-2 个月后长成正常的植株后再用无菌苗不带节茎段切片进行农杆菌介导的转化实验。含有重组质粒的农杆菌 LBA4404 在适当抗生素选择下过夜培养至 OD<sub>600</sub> 接近 0.6, 离心后重悬于 MS+2 mg/L

TDZ+0.2 mg/L NAA+100  $\mu$ M 乙酰丁香酮)，茎段切成 0.3 cm 厚度的小段浸泡农杆菌 20 分钟后，在灭菌滤纸上吸干菌液，接种于愈伤诱导培养基（MS+ 2.0 mg/L 6-BA +0.5 mg/L NAA+ 0.5 mg/L 2,4-D）避光生长 3 天，之后挪至添加 50 mg/L 卡那霉素(Km)的愈伤诱导筛选培养基上。约三周后，将生长状况相近的愈伤组织切块接入不定芽诱导筛选培养基（MS 培养基+2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA +50 mg/L Km）中，经过 2 个月将长度接近 2 厘米的芽接入生根筛选培养基（1/2 MS+0.2 mg/L NAA+50 mg/L Km）。

## 2.5 转基因拟南芥对甲醛的降解效应分析

甲醛在液体中的浓度测定采用变色酸法 (CTA 法)，原理是甲醛在浓硫酸溶液中可与变色酸(1,8-二羟基萘-3,6-二磺酸)作用形成紫色化合物，该化合物最大吸收波长在 580 nm 处，可用分光光度法进行分析测定。首先配制 1 和 10  $\mu$ g/mL 的甲醛标准溶液，配制 5 个不同浓度的甲醛标准溶液，分别作为低浓度和高浓度甲醛的标品，根据吸光度数据绘制标准曲线（图 4），再根据线性回归方程计算样品中甲醛含量。

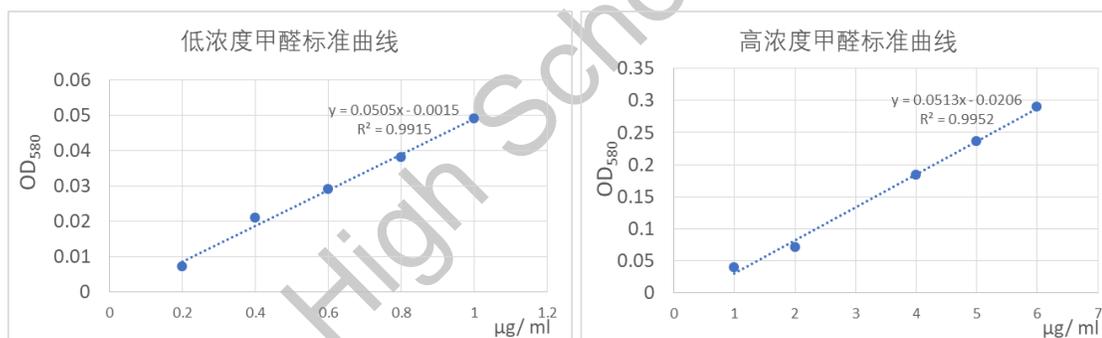


图 4：变色酸法测定溶液中甲醛浓度的标准曲线

对于转基因拟南芥，我们进行了三组实验来分析它们对外源甲醛的耐受或清除能力。第一组是在添加甲醛的培养基上进行幼苗生长指标的测定。具体方法是将野生型和转基因种子经 30% 次氯酸钠消毒后，无菌水漂洗 5 次，4  $^{\circ}$ C 春化 2 d 后播种于 1/2 MS 培养基上垂直培养，以胚根突破种皮为萌发标志，3d 后选取生长状况一致的小苗移至新的 1/2 MS 培养板(分别含有 0, 0.1, 0.5 mM 甲醛)上垂直培养，培养板完全密封防止甲醛挥发。一周后统计拟南芥幼苗的鲜重和根长。在第二个实验中，我们测定了野生型和转基因拟南芥叶片的提取液对于甲醛的降解能力，具体方法是将称取 1g 鲜重的叶片组织后，用 pH 为 7.8 的 20 mL 磷酸盐缓冲液研磨，混合后离心，在一系列 0.5 mL 上清液中加入相同体积但

不同浓度的甲醛溶液，使反应体系中甲醛的终浓度分别为 0, 2, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，反应 1 分钟后检测混合物中甲醛浓度的变化。对照组中使用研磨缓冲液代替叶片提取液。第三个实验中，我们将气密箱（亚克力板，500 $\times$ 500 $\times$ 200 mm）连接具有电化学传感器的甲醛分析仪进行了整株植物熏蒸实验，具体设备见图 5。

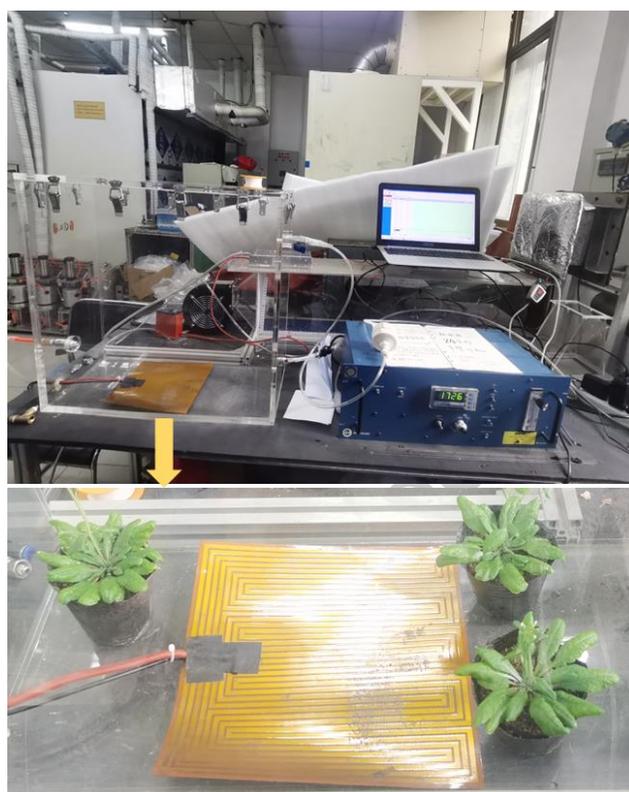


图 5：植物甲醛熏蒸实验设备图

进行熏蒸实验前，提前用保鲜膜把植物的盆和土壤紧密包裹，以防土壤对甲醛的吸收。将植物分别放置于密闭仓内。箱内有电热板，根据所需甲醛浓度用移液枪向上注射不同体积甲醛的溶液，立即封闭系统，待其挥发完全后，起始的稳定浓度约为 2 ppm，气体通过气泵循环，流经甲醛检测仪时由电化学模块实时监测 24 h 内甲醛浓度变化并记录，系统尾部设置尾气处理，避免对空气造成污染。不同处理每个重复 3 次，对照组注入甲醛但不放绿色植物，其甲醛浓度的降低认为是背景消减。实验持续约 4 小时，动态熏蒸系统起始和结束时甲醛检测仪测定的甲醛浓度用于计算甲醛去除效率 $=\frac{C_{start}-C_{end}}{C_{start}} \times 100\%$ ，其中  $C_{start}$  和  $C_{end}$  为进口和出口甲醛浓度。

## 2.6 绿萝原生质体的 ROS 反应检测

由于目前在抗性平板上形成的绿萝愈伤组织正处于生芽阶段，我们仍在等待获得完整的转基因植株，因此无法进行叶片抽提和植物熏蒸实验。但为了初步确定转基因对于降解甲醛的效果，我们采用了原生质体分离的方法，在只用很少愈伤组织的前提下，通过测定甲醛诱导后，绿萝细胞中活性氧 ROS 的积累水平，来判断目的基因的转入能否更好的保护细胞不受甲醛伤害即转基因细胞能否更好的代谢甲醛。具体方法是先准备细胞酶解液（1.5% 纤维素酶 R10、0.4% 离析酶 R10、0.4 M 甘露醇、20 mM KCl、10 mM MES, pH 5.8），55℃ 下加热 10 分钟并冷却至室温，之后再加入 10 mM CaCl<sub>2</sub> 和 0.1% BSA。之后取少量绿色的卡那霉素抗性愈伤组织和对照组非转基因愈伤组织，转移到配制好的 10 mL 酶溶液中，完全浸没后在黑暗条件下酶解 12 小时。消化后的溶液通过 75 μm 尼龙网过滤到具有 20 mL W5 溶液（154 mM NaCl、125 mM CaCl<sub>2</sub>、5 mM KCl、2 mM MES, pH 5.8）的 50 ml 圆底试管中，室温下 75g 离心 10 min。沉淀物悬浮在培养液（0.32% B5 培养基、0.25 M 甘露醇、4 mM MES, pH 5.8）中，再次 75g 离心 10 min，弃上清，将原生质体再次悬浮，显微镜下观察并通过血细胞计数器确定细胞浓度大约为 100 个细胞/mL。

甲醛处理实验与活性氧检测中，首先将原生质体转移到 24 孔培养板中，添加不同浓度（0、0.1 和 0.5 mM）的甲醛溶液，黑暗条件下静置 3h 后，加入 DCFH-DA（2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯）探针（终浓度 10 μM）室温下黑暗孵育 30 分钟。作为氧化应激指示剂的 DCFH-DA 探针具细胞膜渗透性，本身无荧光。一旦进入细胞后，被细胞酯酶水解生成 DCFH，之后被快速氧化生成强荧光产物 2',7'-二氯荧光素 DCF，因此可用荧光光谱检测确定总的氧化应激水平。探针处理结束后，用 W5 溶液洗涤原生质体两次，培养液洗涤一次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA，最终将原生质体悬浮在培养液中，使用荧光显微镜在 485 nm 激发波长和 530 nm 发射波长下观察进入细胞的探针荧光强度。

### 3. 实验结果及讨论

#### 3.1 绿萝生长土壤中很可能缺乏帮助降解甲醛的优势微生物

为确定家庭栽培绿萝的根际土壤中微生物（包括细菌和真菌）的群落结构和多样性，我们利用商业公司的 Illumina MiSeq 测序平台进行了扩增子高通量测序分析，即利用合适的通用引物扩增土壤中微生物的功能基因，通过高通量测序技术检测 PCR 产物的序列变异和丰度信息，分析该环境下的微生物群落的多样性和分布规律。细菌多样性选择性扩增 16S 序列，真菌优先选择 ITS 序列，在对序列按照 97% 的相似程度进行聚类后，基于分类单元（OTU, Operational Taxonomic Units）进行物种注释。结果表明，绿萝生长土壤细菌群落中，相对丰度大于 1% 的门类有 6 种（图 6），主要优势种类为变形菌门 (*Proteobacteria*)、拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、髯骨细菌门 (*Patescibacteria*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)，约占所有细菌丰度的 94-95%。3 个土壤样品之间，根系细菌群落多样性没有显著性差异，变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和髯骨细菌门 4 种细菌类群占有所有细菌总数的 80% 以上，分为 9 个纲、43 个目、86 个科和 120 个属（图 6）。根际土壤中共鉴定出相对丰度大于 5% 的真菌共 6 属 24 种，它们分别为镰刀霉属 (*Fusarium*) 3 种、黄曲霉属 (*Aspergillus*) 8 种、斜盖伞属 (*Clitopilus*) 2 种，小被孢霉 (*Mortierella*) 9 种、木霉菌 (*Trichoderma*) 1 种、彼得壳属 (*Petriella*) 1 种。其中以镰刀霉属 (*Fusarium*)、木霉菌属 (*Trichoderma*) 和黄曲霉 (*Aspergillus*) 为优势种群。

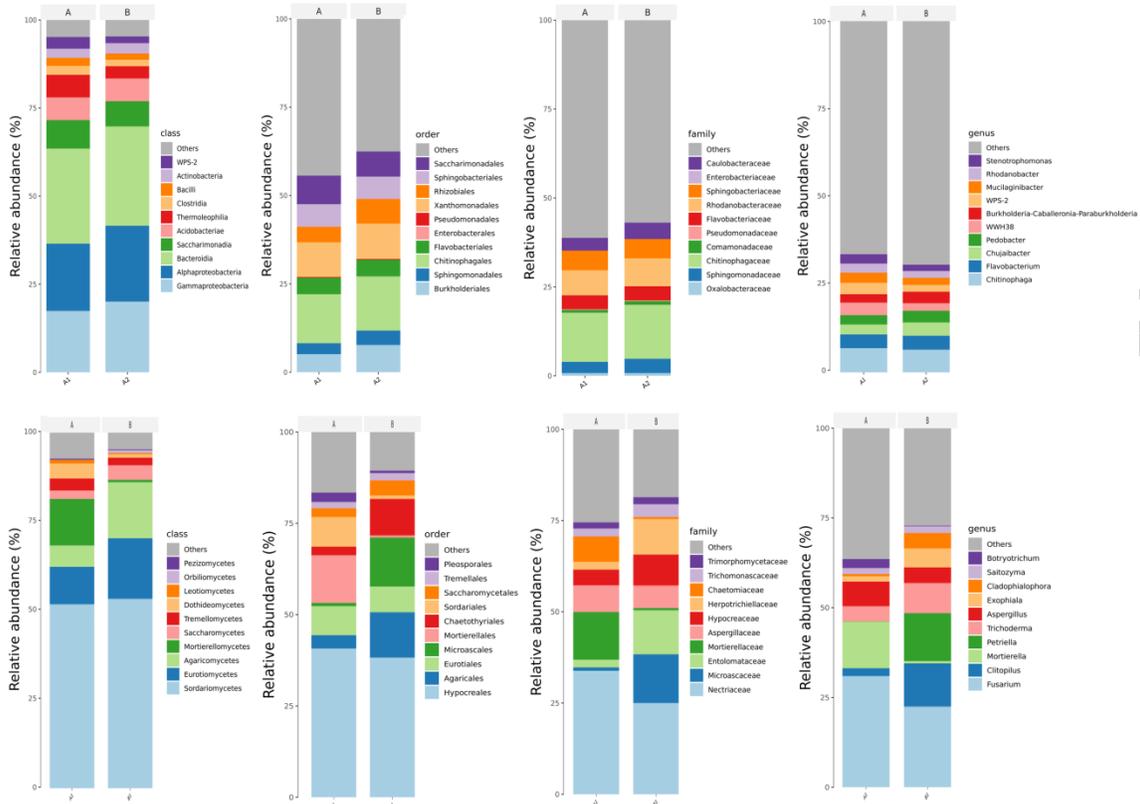


图 6: 普通绿萝中质土壤中纲目科属水平上的微生物相对丰度分布堆叠图

(a) 细菌相对丰度; (b) 真菌相对丰度。

经文献查阅, 具有甲醛分解能力的细菌类别主要包括甲烷细菌属、假单胞菌属、芽胞杆菌属; 而真菌类别主要包括酵母中的德巴利氏酵母属、毛孢子菌属、汉逊酵母属, 其他真菌则包括曲霉属、青霉菌属、拟青霉属、镰刀菌属等(Shao *et al.*, 2020)。美国雪城大学的研究者曾经在 2012 年从绿萝生长的土壤里分离鉴定出 7 个不同种类的细菌, 分别为 *Arthrobacter aureescens* 金黄节杆菌、*A. oxydans* 氧化节杆菌、*Leifsonia xyli* 雷弗松氏菌、*Pseudomonas putida* 恶臭假单胞菌、以及包括 *B. cereus* 蜡样芽孢杆菌在内的 *Bacillus sp.* 芽孢杆菌(Huang *et al.*, 2012)。我们将本研究中绿萝种植土壤中的微生物种类与文献曾报道过的具有甲醛分解能力的微生物类别进行比对, 可以发现它们吻合度并不高, 这说明中国家庭绿萝盆栽土壤中很可能缺乏能够有效清除甲醛的共生微生物种群。

为进一步确定上述结论, 我们在实验室通过划线培养法从同样的绿萝培植土样中分离出了三种典型细菌, 在提取细菌基因组 DNA 之后, 用 PCR 法扩增了每个菌株的 16S rDNA 基因序列, 片段大小均接近 1 kb (图 7)。

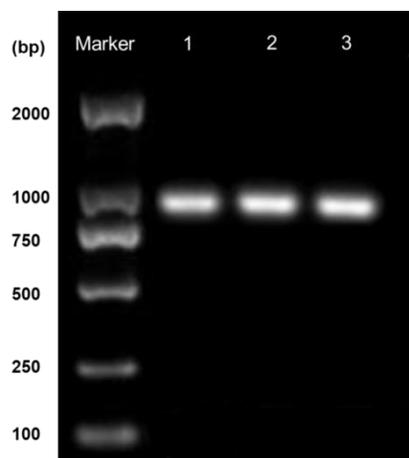


图 7: 从绿萝土壤中分离出的细菌 16S rDNA 序列 PCR 产物电泳图

测序结果表明三种细菌的 16S rDNA 片段分别为 1006 bp, 1025 bp, 996 bp, 通过 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 同源序列比对分析检索工具,将序列与 NCBI 基因库中的序列进行比较, 发现它们分别属于 *Kaistia defluvii* 生丝杆菌 strain B6-12 (NCBI Reference Sequence: NR\_108143.1)、*Microbacterium maritopicum* 海征微杆菌 (NCBI Reference Sequence: NR\_114986)、*Microbacterium paraoxydans* 副氧化微杆菌 (NCBI Reference Sequence: NR\_025548.1)。其中生丝杆菌是分枝丝状生长, 在菌丝顶部进行出芽繁殖的杆菌, 革兰氏染色不明, 生长需要二氧化碳, 能利用甲醇、甲胺等一碳化合物作惟一碳源和能源, 可好氧或厌氧生长, 但其对甲醇的代谢方式尚无报道。海征微杆菌和副氧化微杆菌同属变形菌门微杆菌属, 前者可用于大豆包囊线虫的生物防治试剂, 后者曾被报道可用于从污染环境中清除有毒六价铬离子, 但它们对甲醛的降解能力也都没有被报道过。接下来, 我们进行了甲醛生长实验, 发现即使在文献报道中的最低浓度 (0.1 mM) 下, 分离到的菌株也无法生长, 因此我们认为它们无法有效代谢甲醛从而消除其对生长造成的负面影响。

### 3.2 甲醛降解基因的选择及植物表达载体的构建

经过文献检索, 我们选择了来源于恶臭芽孢杆菌 *Pseudomonas putida* F61 的 *fdm* 基因。它编码甲醛歧化酶 EC1.2.98.1, 该基因包含 1200bp 的开放阅读框, 编码 400 个氨基酸残基, 分子量 42.8 kDa。大肠杆菌中此酶可以在没有外源性电子受体 NAD(H)的情况下, 催化甲醛以 1:1 的比例分解成甲醇和甲酸(Yanase et al., 1995)。另外我们还选择了来源于

大肠杆菌甲醛解毒系统的 *frmA* (*adhC*)和 *frmB* (*estD*) 基因，这是因为此系统被证实既可以去除来自外源的甲醛，也可以消除内源性代谢过程中产生的甲醛(Chen et al., 2013)，即使不是甲基营养菌的细菌中也存在这个系统。而在大肠杆菌中，*frmA* 和 *frmB* 可被甲醛以接近百倍的水平显著诱导，转基因大肠杆菌中的甲醛脱氢酶生化活性比野生型高约 50 倍，说明了它们积极参与了甲醛代谢(Gonzalez et al., 2006)。

在 NCBI 数据库中，我们找到了这三个基因的 cDNA 全长序列，后由苏州金唯智公司经密码子优化后进行合成，并经测序证实无碱基错误后，将合成片段接入 *pBI121* 表达载体中，替代了原有的 *GUS* 基因。我们将其中一个 *CaMV 35S* 驱动的 *fdm* 命名为 *pBI121-ppFdm*，另一个载体则包含了一个双向启动子，分别是 *CaMV 35S* 驱动 *frmA* 基因和 *mini-CaMV 35S* 驱动的 *frmB* 基因。两个载体转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，进行 PCR 鉴定后，提取重组质粒电转化农杆菌 LBA4404 感受态细胞，获得 PCR 阳性菌株（图 8）。

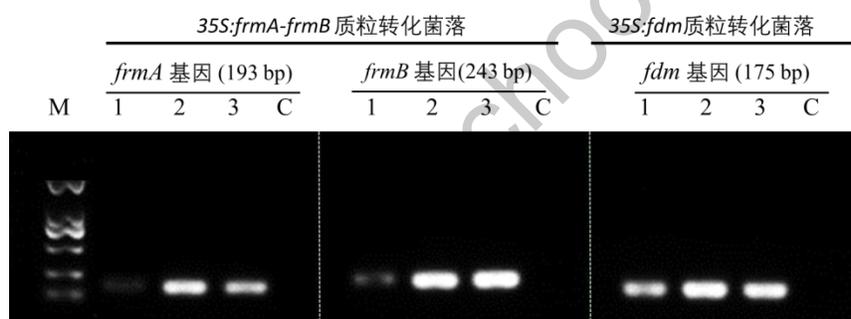


图 8：重组质粒转化农杆菌菌落 PCR 筛选电泳图

M: DNA marker, 1-3 为农杆菌电击转化后的独立菌落；C 为未转化受体菌对照

### 3.3 转基因拟南芥的构建、鉴定与筛选

拟南芥的整个遗传转化过程大约需要 4-5 个月的时间，在此期间内，我们对具有卡那霉素抗性的 T1 植株提取了总 RNA，反转录获得 cDNA 后进行了靶基因表达量的半定量 PCR 检测，从中挑选了每个载体表达量最高的两个转基因拟南芥株系（#1 和 #2），并继续纯化得到纯合体。转基因拟南芥在正常生长条件下与野生型没有明显的形态差异（图 9A），但叶片半定量 PCR 结果表明外源微生物基因在植物体内以较高水平正常转录（图 9B）。

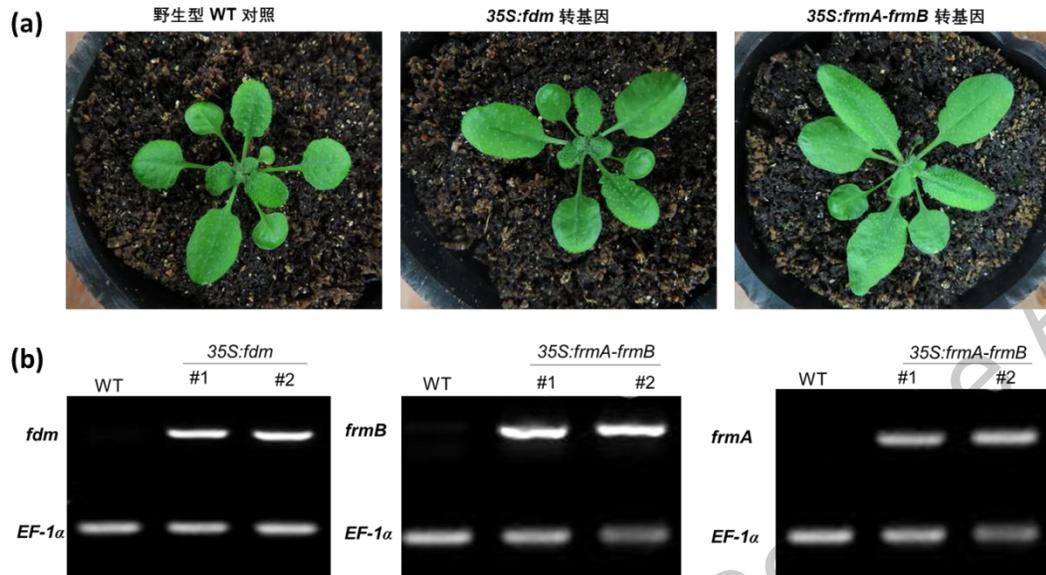


图 9：转基因拟南芥及外源基因半定量 PCR 电泳图

a) 15 天拟南芥植物照片； (b) 不同拟南芥株系叶片 cDNA 中外源基因的表达水平

### 3.4 绿萝的组培体系优化及转基因方法的建立

绿萝作为单子叶植物，农杆菌转化相对困难，国际上的成功报道见于 2019 年，迄今为止也很少(Zhang *et al.*, 2019)。本试验在充分参考前人对绿萝组织培养的基础上，建立了较为完善的绿萝组培体系，在外植体选择与灭菌、初代培养、继代培养、增殖培养、生根培养、及组织褐化方面也做了较为全面的对比研究，将各配方培养基进行分析比较和优化组合，可以对绿萝高效扩繁。在实验中，我们首先选择将带节的茎段消毒灭菌，接种到芽增殖固体培养基中，直至长出新的无菌苗。再利用伸长的无菌苗不带节茎段进行遗传转化。实验表明，带节茎段在培养基中培养 10 天左右，腋芽开始萌动，继续培养便可诱导出丛生芽，MS+ 6-BA 1.0 mg/L+ NAA 0.2 mg/L+ 2,4-D 0.1 mg/L 是最适合带节茎段丛生芽诱导的培养基，MS+ 6-BA 2.0 mg/L+ NAA 0.5 mg/L+ 2,4-D 0.5mg/L 为最适合诱导愈伤组织的培养基。将不带节的茎段接种到诱导愈伤组织培养基中培养 10 天后，外植体开始萌动，继续培养 30 天以后外植体四周切口处有浅白色的愈伤组织分化，在绿萝愈伤组织诱导中，激素 6-BA 和 NAA 是必需的。在未添加任何激素的培养基上，愈伤组织分化率很低，而且叶片出愈率均低于茎段，且需要的诱导时间较长。此外，褐色的愈伤组织可通过在培养基中添加活性炭加以改善。将诱导形成的愈伤组织切下后转入分化培养基，经过 60 天的培养，在愈伤组织上开始分化出芽，继而很快形成丛生芽。将丛生芽分成小单株，

分别转入筛选生芽培养基中培养 MS+6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L。待芽伸长后转入生根培养基 1/2MS+NAA0.2 mg/L 中，待根长到 3-5 cm 即可驯化移栽。将已生根的组培苗置于室温并打开瓶盖进行炼苗一周，然后将苗取出，洗净残留培养基，移栽到透气性良好的基质中，浇透水，20 天后统计移栽成活率。

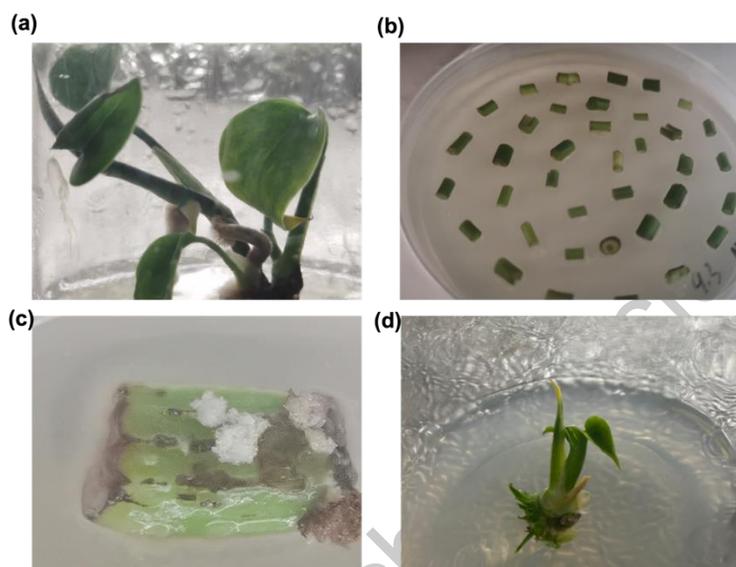


图 10：绿萝的遗传转化主要步骤示意图

(a) 带节茎段在芽增殖培养基中的生长； (b) 无菌不带节茎段切片后置于愈伤诱导培养基上； (c) 在筛选培养基上茎段诱导出愈伤组织； (d) 在筛选培养基上愈伤组织分化出芽。

### 3.5 转基因拟南芥对甲醛的净化效果分析

转基因拟南芥在正常生长状态下和野生型并无差异（图 11）。我们将种子消毒春化后播种于不含甲醛的固体培养基上，待其萌发后 3 天，选取长势一致的幼苗分别挪至含有不同甲醛浓度的培养基上（0、0.1 和 0.5 mM），竖直培养 7 天后测量幼苗的根长和鲜重。结果表明，在含有甲醛的 MS 固体培养基上培养时，转基因株系的生长状况明显优于对照植物，而 35S:*frmA-frmB* 双基因效果又好于 35S:*fdm* 单基因（图 11），这可能是由于后者催化一个单可逆反应，容易达到反应平衡；而前者由于相互之间的上下游关系，可以很好的消减底物，促使反应朝甲醛分解的方向进行。

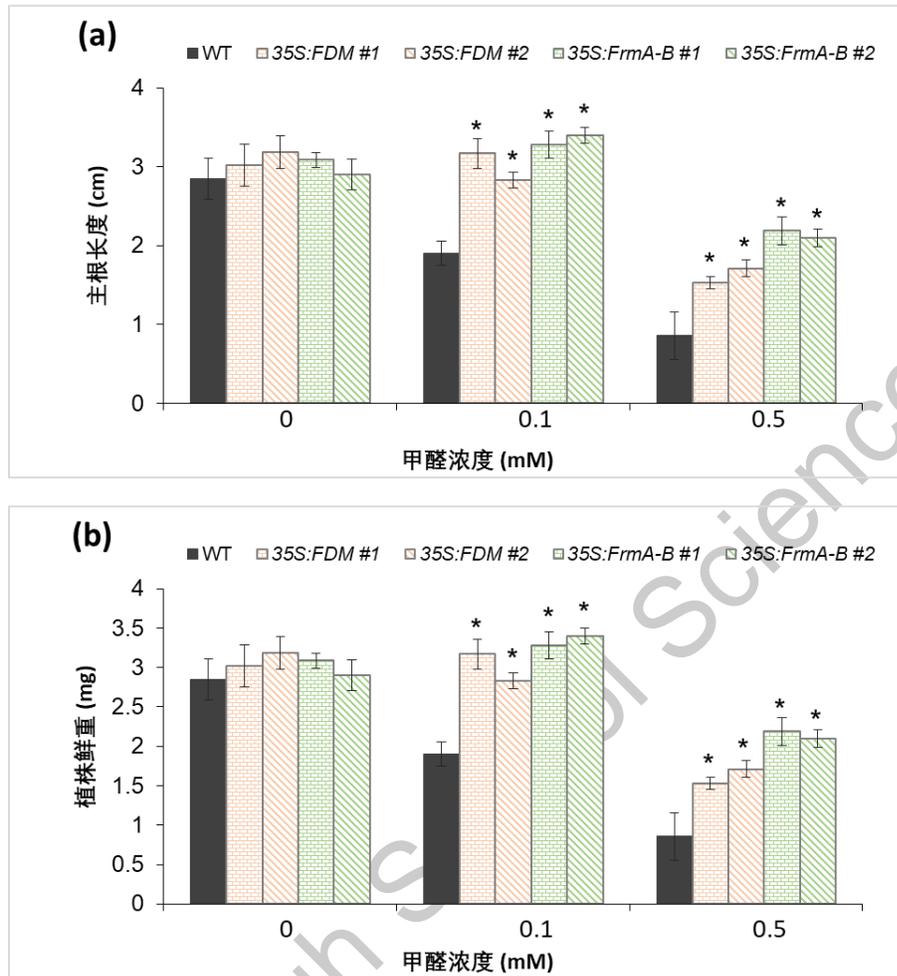


图 11: 转基因拟南芥在甲醛平板上生长 7 天后的根长和鲜重

(a) 不同浓度甲醛对拟南芥根长的影响; (b) 不同浓度甲醛对拟南芥鲜重的影响。

接下来, 我们利用不同类型拟南芥的叶片, 制备了新鲜的植物提取液, 通过测定和比较不同植物类型提取液对外加甲醛的降解能力, 来判断叶肉组织中转基因产物净化甲醛中的作用, 这种方法简单、快速且高效, 可以用于在组织水平上筛选甲醛高效净化植物。结果表明, 当初始浓度设定在 2 和 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  两个浓度时, 拟南芥叶片新鲜提取液中甲醛浓度均随着反应时间的增加而迅速降低, 在一分钟内可降解 90% 以上的甲醛。而且, 在甲醛较高浓度下, 单位时间内降解的甲醛量还有所提高, 这表明新鲜植物提取液可快速代谢甲醛, 并具有一定的浓度依赖性。考虑到操作的方便性, 在后续实验中我们对新鲜植物提取液进行适当的稀释, 使反应体系大约在 1 分钟时达到反应平衡。与野生型叶片提取液相比, 在两个甲醛浓度下, 60 秒内 35S:*fdm* 转基因叶片提取液使可代谢的甲醛大致是 3 倍

左右；而 *35S:frmA-frmB* 转基因叶片降解量是 4.5 倍左右，说明转基因提取液对外加甲醛的去除能力显著升高（图 12）。

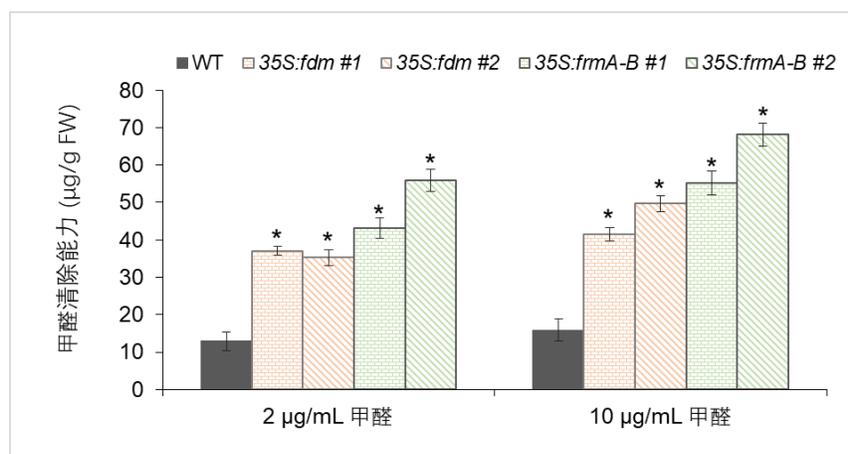


图 12: 转基因拟南芥叶片提取物对甲醛的降解效果

利用气密箱熏蒸实验，我们进一步验证了转基因拟南芥的甲醛去除能力。首先，由于气密箱中的气体会在实验整个过程中循环流经电化学甲醛检测仪，因而会造成一定的背景消减，因此我们将起始浓度调整到约 2000 ppb，测定时间设置为 300 分钟。将 5 棵拟南芥植物放入后，1 小时内甲醛浓度急剧下降增长，之后对甲醛的吸收量逐步降低，直至趋于稳定，接近我国规定的室内甲醛浓度限值 80 ppb，此时植物的净化效率大致对应为 95%，基本净化干净。而 *35S:fdm* 和 *35S:frmA-frmB* 两种转基因植物的净化速率均高于野生型，它们分别在 47 分钟和 32 分钟时间点使甲醛浓度减少到 50% 初始浓度，而拟南芥野生型则需要 68 分钟（图 13）。

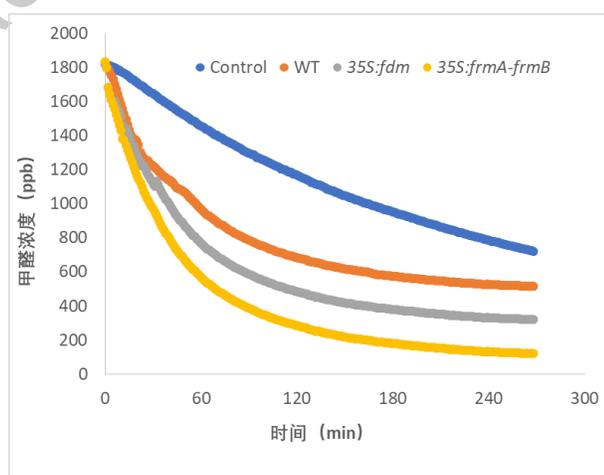


图 13: 转基因拟南芥气密箱熏蒸实验结果

### 3.6 转基因绿萝原生质体对甲醛诱导的应答

在本研究中，我们采用酶解法分离了绿萝的原生质体，摸索了酶的种类和浓度，确立了最佳酶组合为纤维素酶和离析酶，同时确立了最佳酶解温度和时间、酶解液的 pH 值以及离心转速。为了防止游离出来的原生质体破裂，酶解液中添加了 0.4 M 甘露醇以维持合适的渗透压。同时，为了防止质膜损伤，酶解放置在黑暗环境下进行。愈伤组织的细胞壁较薄，没有角质和蜡质的阻碍，相比于叶片组织有效降低了分离难度。为探究转基因愈伤组织分离出的细胞是否比野生型细胞更好的对抗甲醛的伤害作用，我们利用活性氧 ROS 特异性染料 H2DCF-DA 对不同浓度甲醛处理后的绿萝原生质体细胞进行染色（图 14）。在 0 mM 甲醛处理后，*35S:fdm* 和 *35S:frmA-frmB* 中 ROS 积累量和野生型细胞基本一致；而在 0.1 和 0.5 mM 甲醛处理后，它们的细胞内荧光信号，即 ROS 积累水平要显著低于野生型细胞，说明转基因绿萝单细胞在甲醛胁迫下，产生了较少量的 ROS，也就是说转基因产物为细胞提供了更好地保护作用，对 ROS 的生成具有负调控功能。

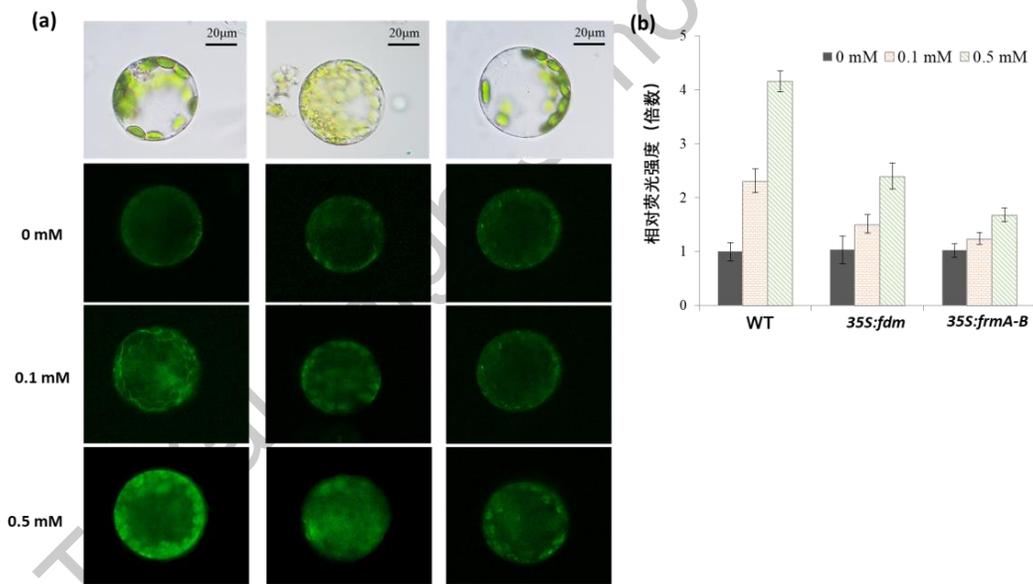


图 14. 甲醛诱导绿萝原生质体 ROS 荧光染色及定量分析

(a) 不同浓度甲醛处理后利用 H2DCF-DA 染色反映细胞内 ROS 含量；(b) 以 0 mM 浓度甲醛处理野生型细胞后的荧光强度作为 1，利用 Image J 软件对荧光染色进行定量分析。

#### 4. 实验结论与展望：

室内有害气体的来源、污染特性及影响、检测与治理技术已成为国际研究的热点，其中生物去除策略更高效、更清洁、更经济。植物和微生物都具备一定的、但同时也有有限的去除甲醛的能力，植物利用自身的新陈代谢将甲醛转化为可利用的碳源，促进植物的生长，而土壤中的一些微生物也可通过同化途径和异化途径将甲醛作为碳源降解转化为自身的营养物质。当大多数植物与去除甲醛能力超群的微生物并没有形成共生关系时，它们可能不适合处理高浓度的室内甲醛污染，这点通过我们本研究的前半部分内容已经得到印证。为解决这一问题，我们将微生物中可以高效代谢甲醛的基因转入模式植物和园艺植物中，实现了植物与微生物在甲醛清除机制上的高效整合和分子协同，使植物与微生物之间的合作不仅仅局限于根际，从而有效增强了传统空气净化植物去除甲醛的能力，创制了环境友好型的、具有强大环境修复潜力的植物。

室内甲醛去除技术的发展需要生物因素和非生物因素的多因素相互作用。植物与微生物的分子水平上的组合策略，显示出有效、经济和安全的甲醛去除能力，而当该组合系统与采暖、通风、空调、制冷系统集成时，就可以建立一个实用的甲醛去除组合系统。生物生态净化法是治理空气中有机挥发物的最佳方法，其资源的开发利用也具有广泛的前景。我们希望我们的研究可以帮助绿色植物在未来成为生物过滤器的主体结构，并且具有强大的环境耐受性和 VOC 清洁能力。

## 5. 参考文献:

- Adaji, E.E., Ekezie, W., Clifford, M., Phalkey, R., 2019. Understanding the effect of indoor air pollution on pneumonia in children under 5 in low- and middle-income countries: a systematic review of evidence. *Environ Sci Pollut Res Int* 26, 3208-3225.
- Aydogan, A., Montoya, L.D., 2011. Formaldehyde removal by common indoor plant species and various growing media. *Atmos Environ* 45, 2675-2682.
- Chen, F., Lin, Z., Chen, R., Norback, D., Liu, C., Kan, H., Deng, Q., Huang, C., Hu, Y., Zou, Z., Liu, W., Wang, J., Lu, C., Qian, H., Yang, X., Zhang, X., Qu, F., Sundell, J., Zhang, Y., Li, B., Sun, Y., Zhao, Z., 2018. The effects of PM<sub>2.5</sub> on asthmatic and allergic diseases or symptoms in preschool children of six Chinese cities, based on China, Children, Homes and Health (CCHH) project. *Environ Pollut* 232, 329-337.
- Chen, L.M., Yurimoto, H., Li, K.Z., Orita, I., Akita, M., Kato, N., Sakai, Y., Izui, K., 2010. Assimilation of Formaldehyde in Transgenic Plants Due to the Introduction of the Bacterial Ribulose Monophosphate Pathway Genes. *Biosci Biotech Bioch* 74, 627-635.
- Chen, N.H., Counago, R.M., Djoko, K.Y., Jennings, M.P., Apicella, M.A., Kobe, B., McEwan, A.G., 2013. A glutathione-dependent detoxification system is required for formaldehyde resistance and optimal survival of *Neisseria meningitidis* in biofilms. *Antioxid Redox Signal* 18, 743-755.
- Clough, S.J., Bent, A.F., 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735-743.
- Gaiero, J.R., McCall, C.A., Thompson, K.A., Day, N.J., Best, A.S., Dunfield, K.E., 2013. Inside the Root Microbiome: Bacterial Root Endophytes and Plant Growth Promotion. *Am J Bot* 100, 1738-1750.
- Gonzalez, C.F., Proudfoot, M., Brown, G., Korniyenko, Y., Mori, H., Savchenko, A.V., Yakunin, A.F., 2006. Molecular basis of formaldehyde detoxification. Characterization of two S-formylglutathione hydrolases from *Escherichia coli*, FrmB and YeiG. *J Biol Chem* 281, 14514-14522.
- Halliwell, B., Butt, V.S., 1974. Oxidative decarboxylation of glycollate and glyoxylate by leaf peroxisomes. *Biochem J* 138, 217-224.
- Heck, H.D., Casanova, M., Starr, T.B., 1990. Formaldehyde toxicity--new understanding. *Crit Rev Toxicol* 20, 397-426.

- Herring, C.D., Blattner, F.R., 2004. Global transcriptional effects of a suppressor tRNA and the inactivation of the regulator *frmR*. *J Bacteriol* 186, 6714-6720.
- Huang, W.H., Wang, Z.Q., Choudhary, G., Guo, B., Zhang, J.S., Ren, D.C., 2012. Characterization of microbial species in a regenerative bio-filter system for volatile organic compound removal. *Hvac&R Res* 18, 169-178.
- IARC, 2012. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Chemical agents and related occupations. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum100 (Pt F), 9–562.
- Imperato, V., Kowalkowski, L., Portillo-Estrada, M., Gawronski, S.W., Vangronsveld, J., Thijs, S., 2019. Characterisation of the *Carpinus betulus* L. Phyllosphere microbiome in Urban and Forest Areas. *Front Microbiol* 10, 1110.
- Irga, P.J., Pettit, T.J., Torpy, F.R., 2018. The phytoremediation of indoor air pollution: a review on the technology development from the potted plant through to functional green wall biofilters. *Rev Environ Sci Bio* 17, 395-415.
- Kato, N., Miyawaki, N., Sakazawa, C., 1982. Oxidation of formaldehyde by resistant yeasts *Debaryomyces vanriji* and *Trichosporon penicillatum*. *Agric Biol Chem* 46, 655–661.
- Kim, K.J., Il Jeong, M., Lee, D.W., Song, J.S., Kim, H.D., Yoo, E.H., Jeong, S.J., Han, S.W., Kays, S.J., Lim, Y.W., Kim, H.H., 2010. Variation in Formaldehyde Removal Efficiency among Indoor Plant Species. *Hortscience* 45, 1489-1495.
- Kim, K.J., Kil, M.J., Song, J.S., Yoo, E.H., Son, K.C., Kays, S.J., 2008. Efficiency of volatile formaldehyde removal by indoor plants: Contribution of aerial plant parts versus the root zone. *J Am Soc Hortic Sci* 133, 521-526.
- Kondo, T., Morikawa, Y., Hayashi, N., Kitamoto, N., 2002. Purification and characterization of formate oxidase from a formaldehyde-resistant fungus. *FEMS Microbiol Lett* 214, 137-142.
- Lee, S.Y., Lee, J.L., Kim, J.H., Kim, K.J., 2015. Enhanced removal of exogenous formaldehyde gas by *AtFALDH*-transgenic petunia. *Hortic Environ Biotechnol* 56, 247-254.
- Liang, H.X., Zhao, S.Y., Su, Y.H., 2018. Self-Enhancement Effect and Mechanism of Potted *Chlorophytum comosum* on Formaldehyde Removal from Air. *Int J Environ Res* 12, 337-346.
- Mitsui, R., Omori, M., Kitazawa, H., Tanaka, M., 2005. Formaldehyde-limited cultivation of a newly isolated methylotrophic bacterium, *Methylobacterium* sp MF1: Enzymatic analysis related to C-1 metabolism. *J Biosci Bioeng* 99, 18-22.

- Orita, I., Yurimoto, H., Hirai, R., Kawarabayasi, Y., Sakai, Y., Kato, N., 2005. The Archaeon *Pyrococcus horikoshii* possesses a bifunctional enzyme for formaldehyde fixation via the ribulose monophosphate pathway. *J Bacteriol* 187, 3636-3642.
- Park, H., Lee, H., Ro, Y.T., Kim, Y.M., 2010. Identification and functional characterization of a gene for the methanol : N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductase from *Mycobacterium* sp. strain JC1 (DSM 3803). *Microbiology (Reading)* 156, 463-471.
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annu Rev Plant Biol* 56, 15-39.
- Qiu, L.Q., Chen, W.W., Zhong, L., Wu, W.X., Wu, S.J., Chen, J.M., Zhang, F.M., Zhong, W.H., 2014. Formaldehyde biodegradation by immobilized *Methylobacterium* sp XJLW cells in a three-phase fluidized bed reactor. *Bioproc Biosyst Eng* 37, 1377-1384.
- Sarkar, S., Rivas-Santiago, C.E., Ibrionke, O.A., Carranza, C., Meng, Q., Osornio-Vargas, A., Zhang, J., Torres, M., Chow, J.C., Watson, J.G., Ohman-Strickland, P., Schwander, S., 2019. Season and size of urban particulate matter differentially affect cytotoxicity and human immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 14, e0219122.
- Shao, Y., Wang, Y., Zhao, R., Chen, J., Zhang, F., Linhardt, R.J., Zhong, W., 2020. Biotechnology progress for removal of indoor gaseous formaldehyde. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 3715-3727.
- Singh, S., Dixit, P., 2019. Impact of household air pollution exposure on rural India: a systemic review. *Environ Conserv J* 20, 115-132.
- Song, Z., Orita, I., Yin, F., Yurimoto, H., Kato, N., Sakai, Y., 2010. Overexpression of an hps/phi fusion enzyme from *Mycobacteriumgastrii* chloroplasts of geranium enhances its ability to assimilate and phytoremediate formaldehyde. *Biotechnol Lett* 32, 1541-1548.
- Sun, T.R., Cang, L., Wang, Q.Y., Zhou, D.M., Cheng, J.M., Xu, H., 2010. Roles of abiotic losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil. *J Hazard Mater* 176, 919-925.
- Teiri, H., Pourzamani, H., Hajizadeh, Y., 2018. Phytoremediation of VOCs from indoor air by ornamental potted plants: A pilot study using a palm species under the controlled environment. *Chemosphere* 197, 375-381.
- Wolverton, B.C., McDonald, R.C., Watkins, E.A., 1984. Foliage plants for removing indoor air pollutants from energy-efficient homes. *Economic Botany* 38, 224-228.
- Xu, Z.J., Qin, N., Wang, J.G., Tong, H., 2010. Formaldehyde biofiltration as affected by spider plant. *Bioresource Technol* 101, 6930-6934.

- Yanase, H., Noda, H., Aoki, K., Kita, K., Kato, N., 1995. Cloning, sequence analysis, and expression of the gene encoding formaldehyde dismutase from *Pseudomonas putida* F61. *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 197-202.
- Yang, Y.X., Su, Y.H., Zhao, S.Y., 2020. An efficient plant-microbe phytoremediation method to remove formaldehyde from air. *Environ Chem Lett* 18, 197-206.
- Yonemitsu, H., Kikuchi, Y., 2018. Biodegradation of high concentrations of formaldehyde using *Escherichia coli* expressing the formaldehyde dismutase gene of *Methylobacterium* sp FD1. *Biosci Biotech Bioch* 82, 49-56.
- Yoshida, K., Ishii, H., Ishihara, Y., Saito, H., Okada, Y., 2009. Bioremediation potential of formaldehyde by the marine microalga *Nannochloropsis oculata* ST-3 strain. *Appl Biochem Biotechnol* 157, 321-328.
- Zhang, L., Routsong, R., Strand, S.E., 2019. Greatly Enhanced Removal of Volatile Organic Carcinogens by a Genetically Modified Houseplant, Pothos Ivy (*Epipremnum aureum*) Expressing the Mammalian Cytochrome P450 2e1 Gene. *Environ Sci Technol* 53, 325-331.
- Zhao, S., Su, Y., Liang, H., 2019. Efficiency and mechanism of formaldehyde removal from air by two wild plants; *Plantago asiatica* L. and *Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz. *J Environ Health Sci Eng* 17, 141-150.
- 蔡宝珍, 熊伟, 金荷仙, 2011. 室内植物对甲醛净化性能的研究进展. 27, 30-34.
- 曹受金, 潘百红, 田英翠等, 2009. 6种观赏植物吸收甲醛能力比较研究. *生态环境学报* 18, 1798-1801.
- 龚圣, 黄肖容, 隋贤栋, 2004. 室内空气净化技术. *环境污染治理技术与设备* 4, 55-57.
- 王兵, 王丹, 任宏洋等, 2015. 不同植物和吸附剂对室内甲醛的去除效果. *环境工程学报* 9, 1343-1348.
- 王佳佳, 施冰, 刘晓东, 2007. 3种木本植物对室内空气净化能力的研究. *北方园艺* 11, 142-143.
- 杨航, 李剑, 刘庆辉等, 2020. 绿萝根际微生物中甲醛降解菌的筛选及回用. *南昌航空大学学报:自然科学版* 34, 29-50.

每一个队员在论文撰写中承担的工作以及贡献：张奕杨负责撰写论文初稿，和老师共同修改后定稿。

指导老师与学生的关系：指导老师负责研究整体方向和研究内容以及技术路线的制定。

他人协助完成的研究成果：该研究无他人协助，非机构项目。

2021 S.-T. Yau High School Science Award