

Two-component System 기반 재조합균을 이용한 인공폐수에서의 중금속 인지 및 제거

Sambandam Ravikumar · 홍순호 · 유익근*

울산대학교 공과대학 화학공학부

Heavy Metal Detection and Removal in Artificial Wastewater Using Two-Component System Based Recombinant Bacteria

Sambandam Ravikumar, Soon Ho Hong, and Ik-Keun Yoo*

School of Chemical Engineering and Bioengineering, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Republic of Korea

(Received August 29, 2012 / Accepted September 18, 2012)

Two-component system (TCS)-based bacterial zinc and copper biosensors, in which green fluorescent protein (GFP) is expressed under the control of *zraP* and *cusC* promoter in *ZraS/R* and *CusS/R* TCS, were evaluated in artificial wastewater. Bacterial biosensors developed in this study efficiently expressed GFP by the recognition of Zn^{2+} and Cu^{2+} in artificial wastewater. Secondly, TCS-based zinc and copper removing bacteria with the peptide displayed on cell surface were examined in artificial wastewater. Zinc and copper removing bacteria expressed the peptide as a fusion protein such as *OmpC-ZBP* (zinc binding peptide) and *OmpC-CBP* (copper binding peptide) on the cell surface when sensing exogenous Zn^{2+} and Cu^{2+} through *ZraS/R* and *CusS/R* TCS. The recombinant cell expressing metal-adsorbing peptide could efficiently remove copper and zinc (15 and 18 mg/g dry cell weight, respectively) in artificial wastewater. Therefore, it was demonstrated that the TCS-based recombinant cell for the recognition or removal of heavy metal functions well in artificial wastewater environment.

Keywords: *Escherichia coli*, artificial wastewater, biosensor, copper, zinc

중금속에 의한 환경오염은 전 세계적으로 매우 심각한 문제이며, 이의 지속적인 감시 및 제거를 위하여 각국이 많은 노력을 기울이고 있다. 중금속 오염 모니터링을 위해 현재 사용되는 방식은 매우 고가의 장비 및 복잡한 시료의 전처리 과정을 요구한다(Falchuk *et al.*, 1998). 따라서 환경 시료에 존재하는 중금속의 인지 및 그 농도를 효율적으로 정량할 수 있는 경제적인 방법이 필요하다. 여러 가지 오염물질의 생물학적 정량을 위해서 다양한 재조합 균주들이 개발되어 왔지만, 중금속의 경우 정량적 분석이 가능한 재조합 균주는 아직 보고되지 않았다(Biran *et al.*, 2000; Ivask *et al.*, 2001; Sagi *et al.*, 2003; Yong and Zhong, 2009). 또한 중금속 제거를 위한 재조합 균주 시스템으로는 중금속 친화성 펩타이드를 박테리아 표면에 발현하는 세포표면발현(cell surface display, CBD) 시스템들이 대표적으로 보고되었다. 이와 같은 CBD 기술은 유해 화학물질 제거, 생백신 개발, 펩타이드 라이브러리 스크리닝 등 다양하게 응용되고 있다(Lee *et*

al., 2000; Taschner *et al.*, 2002; Bae *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2004).

Zn^{2+} 와 Cu^{2+} 를 탐지하기 위한 박테리아 기반 바이오센서로 아연 해독 관련 유전자인 *zntA-zntR* 기반의 아연 인식 바이오센서 및 구리 해독 관련 *cueO* 유전자를 이용한 구리 인식 바이오센서가 개발되었다. 그러나 *zntA-zntR* 및 *cueO* 유전자 기반 시스템의 경우 높은 농도의 Zn^{2+} 와 Cu^{2+} 를 인식하지 못하는 단점을 가지고 있다(Ravikumar *et al.*, 2011a, 2011b). 반면에 Zn^{2+} 와 Cu^{2+} 를 인식하는 two-component system (TCS)인 *ZraS/R* (HydHG) 및 *CusS/R* 시스템은 각각의 중금속을 높은 농도에서도 인식할 수 있는 장점이 있다. TCS는 원래 박테리아의 외부환경 감지 센서로서 다양한 환경 변화를 감지하는 기능을 한다(Stock *et al.*, 2000). 각각의 TCS는 외부의 환경 변화를 감지하는 histidine kinase (HK)와 외부신호를 전달받아 관련 유전자의 발현을 유도하는 response regulator (RR)로 구성되어 있다(Mascher *et al.*, 2006). 현재까지 밝혀진 TCS 중에서 *ZraS/R*은 외부의 Zn^{2+} 를 감지하여 아연 efflux 연관 유전자인 *zraP*의 발현을 유도하여 균주 내부의 아연 농도를 낮추고 항상성을 유지하는 역할을 수행

*For correspondence. E-mail: ikyoo@ulsan.ac.kr; Tel.: +82-52-259-2251; Fax: +82-52-259-1689

Table 1. List of bacterial strains, plasmids and primers used in this study

Strain, Plasmid, or Primer	Relevant genotype and/or property	Source of reference
<i>E. coli</i> strains		
XL1-Blue	SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac F' (proAB ⁺ lacI ^q lacZAM15 Tn10 (tet ^R))	Laboratory stock
Plasmids		
pZGFP1	pUC19 (237 bp <i>zraP</i> -hydH intergenic region), <i>zraP</i> ⁻ - <i>gfp</i> transcriptional fusion vector, containing <i>zraP</i> promoter region, Amp ^r	Ravikumar <i>et al.</i> (2011a)
pZZ1056	pUC19 (237 bp <i>zraP</i> -hydH intergenic region), <i>zraP</i> ⁻ - <i>ompC</i> _i transcriptional fusion vector, containing <i>zraP</i> promoter region, Amp ^r	Ravikumar <i>et al.</i> (2011a)
pCGFP1	pUC19 (156 bp <i>cusC</i> - <i>cusR</i> intergenic region), <i>cusC</i> ⁻ - <i>gfp</i> transcriptional fusion vector, containing <i>CusC</i> promoter region, Amp ^r	Ravikumar <i>et al.</i> (2012)
pCC1056	pUC19 (156 bp <i>cusC</i> - <i>cusR</i> intergenic region), <i>cusC</i> ⁻ - <i>ompC</i> _i transcriptional fusion vector, containing <i>cusC</i> promoter region, Amp ^r	Ravikumar <i>et al.</i> (2011b)

한다. 또한 *CusS/R* TCS는 Cu²⁺를 감지하여 구리 efflux와 연관된 *cusC* 유전자를 발현시킨다(Munson *et al.*, 2000; Leonhartsberger *et al.*, 2001).

본 연구팀은 선행 연구에서 *ZraS/R* 및 *CusS/R*에 의하여 발현이 유도되는 *zraP*와 *cusC* 유전자의 프로모터와 GFP를 융합하는 전략을 통하여 Zn²⁺와 Cu²⁺의 정량이 가능한 박테리아 바이오센서를 제작하였다(Ravikumar *et al.*, 2011a, 2012). 이때 TCS 기반 아연 바이오센서는 0.001 mM의 Zn²⁺를 인식할 수 있었으며, 구리 바이오센서는 0.04 mM의 Cu²⁺를 인식할 수 있었다. 또한 세포표면 단백질 *OmpC*와 아연 친화성 펩타이드의 융합단백질을 *zraP* 유전자와 결합하여 아연의 인지 및 흡착제거가 가능한 재조합 대장균을 제작하였다(Ravikumar *et al.*, 2011a). 여기서 제작된 균주는 외부의 Zn²⁺가 인지될 경우에만 세포표면에 펩타이드를 발현하는 시스템으로 세포 1 g 건조중량당 최대 163.6 μmol의 Zn²⁺를 제거할 수 있었다. 구리의 경우는 *OmpC*와 구리 친화성 펩타이드의 융합 단백질을 *cusC* 프로모터와 결합한 재

조합균을 이용하여 세포 1 g 건조중량당 최대 92.2 μmol의 Cu²⁺를 제거하였다(Ravikumar *et al.*, 2011b). 본 연구는 이와 같은 선행연구를 바탕으로 실제 폐수를 모사한 인공폐수(artificial wastewater, AWW)에서의 아연과 구리 바이오센서, 아연과 구리 제거 박테리아의 성능 평가를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

실험에 사용한 모균주는 대장균 XL1-Blue이다. Zn²⁺와 Cu²⁺ 인지를 위한 박테리아 바이오센서는 pZGFP1과 pCGFP1 플라스미드를 도입한 재조합 대장균을 사용하였다(Ravikumar *et al.*, 2011a, 2012). Zn²⁺와 Cu²⁺의 제거가 가능한 박테리아로는 pZZ1056과 pCC1056 플라스미드를 도입한 재조합 대장균을 사용하였다(Ravikumar *et al.*, 2011a, 2011b). 실험에 사용한 균주 및 플라스미드는 Table 1에 정리하였고, 중금속의 인지 및 펩타이드 표면발현 원리를 Fig. 1에 간단히 도시하였다. 균주의 배양은 Luria-Bertani (LB) broth (10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L bacto-yeast extract, 5 g/L NaCl)에서 수행하였다. 중금속 인지 및 제거 실험은 M9 배지 및 인공폐수(2 g/L starch, 1 g/L glucose, 80 mg/L NH₄NO₃, 30 mg/L KH₂PO₄, 15 mg/L K₂HPO₄, 1 ml/L nutrient solution)를 이용하여 수행하였다. 인공폐수에서 nutrient solution의 조성은 다음과 같다: 90 g/L MgSO₄·7H₂O, 6 g/L CaCl₂·2H₂O, 1.5 g/L FeCl₃·6H₂O, 6.5 g/L MnCl₂·4H₂O, 1.7 g/L ZnSO₄·7H₂O, 0.1 g/L CuCl₂·2H₂O, 1.9 g/L CoCl₂·6H₂O, 6.5 g/L NiSO₄·6H₂O, 0.1 g/L H₃BO₃, 0.6 g/L Na₂MoO₄·2H₂O, 1 g/L Yeast extract (Behera *et al.*, 2008).

중금속 인지 실험

플라스미드 pZGFP1과 pCGFP1를 도입한 재조합 대장균을 LB 배지에서 37°C로 배양한 후, 100배 희석하여 100 μg/ml ampicillin이 첨가된 인공폐수에 접종하였다. 접종한 균주는 흡광도가 OD 600에서 0.5가 될 때까지, 200 rpm, 37°C 조건에서 배양하였다. 그 다음 인공폐수 배지에 50 μM의 ZnCl₂와 CuSO₄를 각각 첨가한 후, GFP 형광도를 RF-5301PC spectrofluorimeter

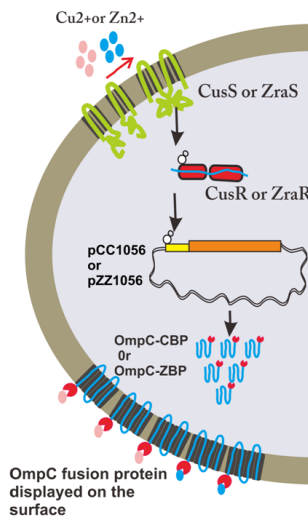


Fig. 1. Conceptual diagram of heavy metal sensing and adsorption of recombinant bacteria.

(Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정하였다. Spectrofluorimeter의 excitation 파장은 490/10 nm, 그리고 emission 파장은 510/10 nm로 이용하였다. Specific fluorescence intensity (SFI)는 각각의 시점에서 측정된 형광도를 그에 상응하는 600 nm에서 측정된 흡광도로 나눈 값으로, 각각의 시료로부터 최소한 3개의 측정치를 구하여 평균값을 구하였다.

중금속 제거 실험

플라스미드 pZZ1056과 pCC1056를 도입한 재조합 대장균을 37°C에서 배양한 후, 100배 희석하여 100 µg/ml ampicillin 첨가된 인공폐수에 접종하였다. 그 다음 접종한 균주의 흡광도가 OD600에서 0.5가 될 때까지, 200 rpm, 37°C에서 배양하였다. 인공폐수 배지에 50 µM의 ZnCl₂와 CuSO₄를 각각 첨가한 후 4시간 동안 배양하였다. 균주를 0.85% NaCl로 두 번 씻은 후, 최종 균주 농도를 10 g dry cell weight (DCW)/L로 맞추어 0.85% (w/v) NaCl (pH 5.8)에 희석하였다. 표면에 흡착된 중금속의 농도를 측정하기 위하여, 5 mM EDTA를 첨가하고 30분 동안 얼음에서 배양하여 세포 표면에 흡착된 중금속을 탈착시켰다. 탈착액의 Zn²⁺, Cu²⁺ 농도는 inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP, HP4500, Japan)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

인공폐수에서 재조합 대장균의 중금속 인지

대장균은 Two component system인 ZraS/R 및 CusS/R 시스템을 이용하여 외부의 Zn²⁺와 Cu²⁺를 인지하고, 이들 금속의 efflux 및 해독과정과 관련된 유전자의 발현을 조절한다. 본 연구는 선행 연구(Ravikumar *et al.*, 2011a, 2011b)를 통해 제작된 재조합 대장균(ZraS/R 및 CusS/R에 의하여 각각 활성화되는 *zraP*와 *cusC* 유전자의 프로모터에 GFP를 융합하여 Zn²⁺와 Cu²⁺의 인지 농도에 따라 형광이 발현되는 박테리아 바이오센서)이 실

제 환경시료에서 작동 가능한지 확인하기 위한 기초 실험으로서, 순수한 금속이온 용액을 이용한 선행 연구와 달리 인공폐수에서의 재조합 균주 성능을 평가하였다. 앞의 배양 조건에 나열한 조성물과 같이 인공폐수는 Zn²⁺와 Cu²⁺ 이외의 다양한 간섭이온 및 유기물이 포함되어 있다. 비교 실험으로 이용한 M9 배지와 Zn²⁺이 추가로 첨가되지 않은 인공폐수에서는 두 경우 모두 비슷한 수준의 형광도를 보였으며, 시간이 지남에 따라 조금씩 증가하는 경향을 보여주었다(Fig. 2). 이는 사용한 *zraP* 프로모터의 basal level expression에 의한 것이라 추측된다. 반면에 인공폐수에 추가로 50 µM의 ZnCl₂를 첨가한 배지에서는 1시간 이후부터 급격한 형광의 증가가 나타났으며 반응 5시간 후에 최고의 형광도를 보여주었다. 최고 형광도는 같은 시간대에 측정된 M9 배지 및 Zn²⁺가 첨가되지 않은 인공폐수의 약 2배에 달하였다. Figure 3에 나타난 Cu²⁺의 경우에도, Cu²⁺를 첨가하지 않은 M9과 인공폐수는 비슷한 수준의 형광도를 보여주었다. 반면에 인공폐수에 50 µM의 CuSO₄를 첨가한 경우, 1시간 이후부터 급격한 형광의 증가를 보였으며 반응 종료시까지 지속적으로 증가하였다. 즉, 본 연구팀이 two-component system에 기반하여 새롭게 제작한 재조합 대장균은 다양한 간섭물질이 포함된 인공폐수에서도 적절하게 목적 중금속인 Zn²⁺와 Cu²⁺를 인지할 수 있음을 확인하였다.

인공폐수에서 재조합 대장균의 중금속 제거

선행 연구에서 제작된 Zn²⁺와 Cu²⁺의 흡착 제거가 가능한 재조합 대장균은 외부의 Zn²⁺와 Cu²⁺를 ZraS/R 및 CusS/R을 이용하여 인지한 후, *zraP*와 *cusC* 유전자의 프로모터를 활성화하여 OmpC-ZBP (zinc binding peptide)와 OmpC-CBP (copper binding peptide) 융합 단백질을 세포표면에 발현시키는 원리이다. 이때 발현된 OmpC-ZBP와 OmpC-CBP는 각각 외부의 Zn²⁺와 Cu²⁺에 선택적 친화성을 보이는 펩타이드 서열을 포함하므로 외부의 Zn²⁺와 Cu²⁺가 흡착되어 이를 제거하는 시스템이다(Fig. 1).

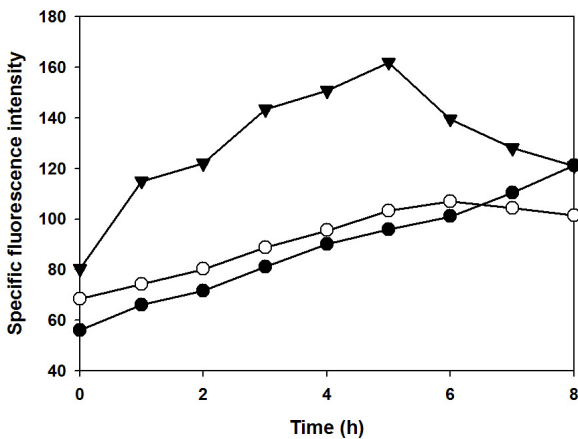


Fig. 2. Time course of GFP fluorescence of *E. coli* (pZGFP1) after induction with 50 µM of ZnCl₂. The recombinant bacteria were cultured in M9 media without ZnCl₂ (●), artificial wastewater without ZnCl₂ (○) and artificial wastewater with ZnCl₂ (▼).

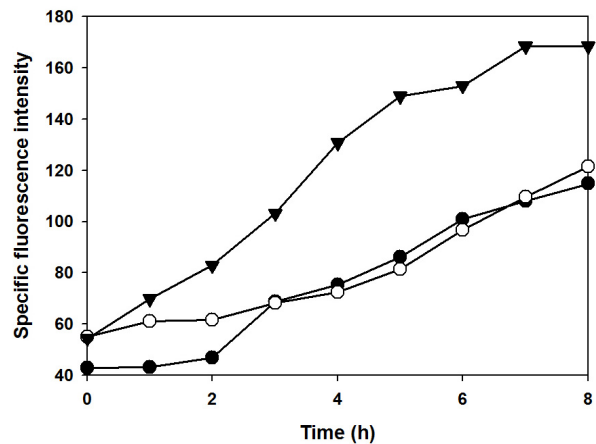


Fig. 3. Time course of GFP fluorescence of *E. coli* (pCGFP1) after induction with 50 µM of CuSO₄. The recombinant bacteria were cultured in M9 media without CuSO₄ (●), artificial wastewater without CuSO₄ (○) and artificial wastewater with CuSO₄ (▼).

우선 외부의 Zn²⁺와 Cu²⁺를 인지했을 때 발현되는 OmpC-ZBP와 OmpC-CBP를 SDS-PAGE로 확인해 보았다. 플라스미드 pZZ1056과 pCC1056를 도입한 재조합 대장균을 0.5 mM ZnCl₂와 0.5 mM CuSO₄가 각각 첨가된 M9 배지에서 4시간동안 배양한 후 단백질 발현량의 변화를 관찰하였다(Fig. 4). 단백질 발현을 명확히 확인하기 위하여 발현 및 흡착실험보다 높은 농도의 ZnCl₂와 CuSO₄를 사용하였다. 그림에서와 같이 Zn²⁺와 Cu²⁺의 첨가에 의하여 OmpC-ZBP와 OmpC-CBP 발현량이 증가함을 확인하였다.

그 다음 Zn²⁺와 Cu²⁺ 제거 박테리아의 중금속 제거 능력을 인공폐수에서 테스트하였다. 비교 실험으로 M9 배지에서 흡착 실험을 수행하였을 경우 Zn²⁺와 Cu²⁺의 흡착량은 미미하였다(Fig. 5). 또한 Zn²⁺와 Cu²⁺를 첨가하지 않은 인공폐수에서는 약 7 mg/g DCW 정도의 Zn²⁺와 Cu²⁺가 세포 표면에 흡착되었다. 이는 인공폐수에 첨가된 Zn²⁺와 Cu²⁺에 의하여 Zn²⁺와 Cu²⁺의 인지 및 펩타이드 발현 시스템이 미약하게나마 활성화되었기 때문이다. 반면에 앞의 중금속 인지 실험과 마찬가지로 인공폐수에 추가적으로 Zn²⁺와 Cu²⁺를 첨가한 경우는, 약 15-18 mg/g DCW 정도로 증가된 Zn²⁺와 Cu²⁺가 세포 표면에 흡착되었다. 따라서 본 연구진이 제작한 중금속 제거 재조합 대장균은 실제 폐수를 모사한 인공폐수에서도 효율적으로 기능하는 것을 확인하였고, 향후 추가적인 최적화 및 보완 연구를 통해서 실제 폐수 조건에서도 선택적으로 중금속 제거가 가능한 재조합 균주의 개발이 가능할 것이다.

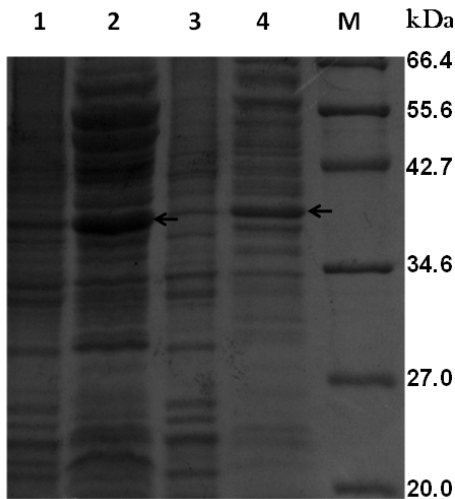


Fig. 4. SDS-PAGE of the OmpC-CBP and OmpC-ZBP fusion protein in extracts from independent culture medium of cells harboring pCC1056 and pZZ1056. Non-induced recombinant plasmid pCC1056 and pZZ1056 as controls (1 and 3). Induced recombinant plasmid pCC1056 and pZZ1056 (2 and 4). Overnight cultures were diluted 1/10 in fresh medium (20 ml) containing 100 mg/ml ampicillin, induced after 2 h with 0.5 mM CuSO₄, and 0.5 mM ZnCl₂ respectively, grown for a further 4 h. The culture medium was subsequently recovered for protein samples; proteins were detected in Coomassie Blue-stained SDS-PAGE gels. The location of the OmpC-CBP and OmpC-ZBP fusion protein is indicated by arrows.

적 요

Two component system (TCS)인 ZraS/R 및 CusS/R의 *zraP*와 *cusC* 유전자의 프로모터에 의해 green fluorescent protein (GFP)이 발현되도록 제작된 박테리아 바이오센서의 성능을 인공폐수에서 평가하였다. 제작된 박테리아 바이오센서는 실제 폐수를 모사한 인공폐수에서도 시료 중의 Zn²⁺와 Cu²⁺를 인지하여 GFP를 효율적으로 발현시키는 것을 확인할 수 있었다. 두번째는 세포 표면에 금속 친화성 펩타이드가 표현되도록 제작된 구리 및 아연 제거 박테리아를 인공폐수 조건에서 평가하였다. 제작된 박테리아는 각각 ZraS/R 및 CusS/R TCS에 의해 주변의 Zn²⁺와 Cu²⁺를 인지하여 세포 표면에 OmpC-ZBP와 OmpC-CBP 융합 단백질을 발현시키는 시스템이다. 실험을 통해 표면에 금속 흡착 펩타이드가 발현된 재조합 균은 인공폐수 조건에서도 효과적으로 구리 및 아연을 흡착시키는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 개발된 TCS 기반 재조합 균은 인공폐수 조건에서 중금속의 인지 및 제거 기능이 효과적으로 작동하는 것이 확인되었다.

감사의 말

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2009-0071482) 및 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 수행된 기초연구사업(2010-0012850)임.

참고문헌

Bae, W., Wu, C.H., Kostal, J., Mulchandani, A., and Chen, W. 2003. Enhanced mercury biosorption by bacterial cells with surface-displayed MerR. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 3176-3180.

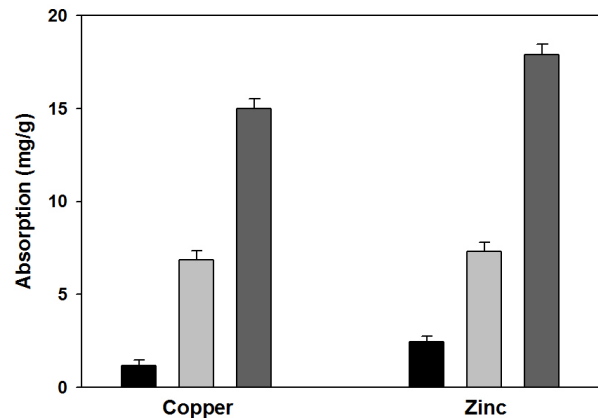


Fig. 5. Bioadsorption of Zn²⁺ and Cu²⁺ by *E. coli* (pZZ1056) and *E. coli* (pCC1056). The metal contents of these samples were determined using inductively coupled plasma-mass spectrometry. The recombinant bacteria were cultured in M9 media without heavy metal (black), artificial wastewater without heavy metal (light grey) and artificial wastewater with heavy metal (dark grey). The data are aggregate results from replicate experiments (n=3).

- Behera, S.K., Rene, E.R., and Murthy, D.V.S.** 2008. Effect of hydraulic retention time and initial nitrate concentration on the performance of an up-flow anoxic bioreactor: A factorial design study. *Indian Chem. Eng.* **50**, 27–33.
- Biran, I., Babai, R., Levkov, K., Rishpon, J., and Ron, E.Z.** 2000. Online and *in situ* monitoring of environmental pollutants: electrochemical biosensing of cadmium. *Environ. Microbiol.* **2**, 285–290.
- Falchuk, K.H., Hilt, K.L., and Vallee, B.L.** 1998. Determination of zinc in biological samples by atomic absorption spectrometry. *Method Enzymol.* **158**, 422–434.
- Harvey, B.R., Georgiou, G., Hayhurst, A., Jeong, K.J., Iverson, B.L., and Rogers, G.K.** 2004. Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from *Escherichia coli*-expressed libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9193–9198.
- Ivask, A., Hakkila, K., and Virta, M.** 2001. Detection of organomercurials with sensor bacteria. *Anal. Chem.* **73**, 5168–5171.
- Lee, J-S., Shin, K-S., Pan, J-G., and Kom, C-J.** 2000. Surface-displayed viral antigens on *Salmonella carrier* vaccine. *Nat. Biotechnol.* **18**, 645–648.
- Leonhartsberger, S., Huber, A., Lottspeich, F., and Bock, A.** 2001. The *hydH/G* genes from *Escherichia coli* code for a 아연 and lead responsive two-component regulatory system. *J. Mol. Biol.* **307**, 93–105.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Udden, G.** 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 910–938.
- Munson, G.P., Lam, D.L., Outten, F.W., and O'Halloran, T.V.** 2000. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **182**, 5864–5871.
- Ravikumar, S., Pham, V.D., Lee, S.H., Yoo, I.K., and Hong, S.H.** 2012. Modification of CusSR bacterial two-component systems by the introduction of an inducible positive feedback loop. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 861–868.
- Ravikumar, S., Yoo, I.K., Lee, S.Y., and Hong, S.H.** 2011a. A study on the dynamics of the *zraP* gene expression profile and its application to the construction of zinc adsorption bacteria. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **34**, 1119–1126.
- Ravikumar, S., Yoo, I.K., Lee, S.Y., and Hong, S.H.** 2011b. Construction of copper removing bacteria through the integration of two-component system and cell surface display. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **165**, 1674–1681.
- Sagi, E., Hever, N., Rosen, R., Bartolome, A.J., Premkumar, J.R., Ulber, R., Lev, O., Scheper, T., and Belkin, S.** 2003. Fluorescence and bioluminescence reporter functions in genetically modified bacterial sensor strains. *Sensor Actuat. B-Chem.* **90**, 2–8.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N.** 2000. Two-component signal transduction. *Ann. Rev. Biochem.* **69**, 183–215.
- Taschner, S., Meinke, A., von Gabain, A., and Boyd, A.P.** 2002. Selection of peptide entry motifs by bacterial surface display. *Biochem. J.* **367**, 393–402.
- Yong, Y.C. and Zhong, J.J.** 2009. A genetically engineered whole-cell pigment-based bacterial biosensing system for quantification of N-butyryl homoserine lactone quorum sensing signal. *Biosen. Bioelectron.* **25**, 41–47.