

광합성세균 *Chromatium* sp.의 질소고정과 수소생산

文尙郁* · 松山通郎* · 高京民** · 李榮敦*** · 高有峰**

*長崎大學校, 海洋生産科學研究科

濟州大學校 海洋學科, *濟州大學校 海洋研究所

N₂ Fixation and H₂ Production by a Phototrophic Bacterium, *Chromatium* sp.

Sang-Wook Moon*, Michiro Matsuyama*,
Gyung-Min Go**, Young-Don Lee***, You-Bong Go**

*Graduate School of Marine Science and Engineering, Nagasaki University, Japan

Department of Oceanography, *Marine Research Institute,
Cheju National University, Korea

Chromatium sp., densely populated on the bacterial plate of Lake Kaiike throughout the seasons, possibly fix N₂ and concurrently produce H₂. N₂ Fixation and H₂ production by *Chromatium* sp. were performed under photoautotrophic growth condition, and of which rates were much higher and showed exponential growth phase. Bacterial plate samples from Lake Kaiike collected on July 27, 1994 were used to know the effect of the light or H₂S on N₂ fixation and H₂ production by the bacteria. At low light intensity (250 lux), low rates of N₂ fixation and H₂ production were detected after 18 hours. However, high rates of the production were observed under the condition of high light intensity (1000 lux). On the other hand, a very low rate of N₂ fixation was observed without an addition of H₂S, while the bacteria rapidly increased N₂ fixation and H₂ production after adding H₂S and the highest rate was observed in case of adding 20 mg H₂S-S/m^l to the bacterial plates.

Key words : Phototrophic bacterium, *Chromatium* sp., N₂ fixation, H₂ production

序 論

大型의 Purple sulfur bacteria인 *Chromatium* sp.는 日本 카고시마縣, 카미코시키 섬의 북쪽해변에 위치한 鹽分湖인 카이이케 湖水 (표면적 : 0.15 km², 최고수심 : 11.6 m ; 31° 50' N, 130° 10' E) 에서 연중 濃密한 個體群을 형성하고 있다(Matsuyama, 1977).

외부로부터의 流入水가 거의 없는 카이이케 호수는 수직적으로 호기성·혐기성 층으로 구분되며, 혐기성 층에는 毒性이 높은 황화수소를

비롯해서 인산염, 암모니아 등이 높은 濃度로 존재하고 있다(Matsuyama, 1981). 好氣性 층과 嫌氣性 層의 境界(4.5~5.5 m)에는 본 光合成 細菌 *Chromatium* sp.가 層이 펼쳐진 것처럼 水平的으로 넓고 濃密하게 分布하고 있으며, 이 농밀한 *Chromatium* sp.의 개체군을 "bacterial plate"라 부른다(Matsuyama, 1980). 그 위의 好氣性 層에는 비교적 깨끗한 水塊가 존재하는데, 營養鹽(N, P)의 부족으로 인해 극히 적은 식물 플랑크톤이 분포하고 있는 정도이다. 그러나 식물플랑크톤의 부족에도 불구하고 높은 개체수의

동물플랑크톤이 출현하고 있으며, 특히 bacterial plate의 수심을 중심으로 出現하는 樣相을 보이고 있다(Matsuyama, 1978).

호수의 중간수심대에 서식하고 있는 *Chromatium* sp.의 개체군은 下層에서 발생하는 독성의 황화수소 뿐만 아니라 영양염 등을 제거하는, 이른바 生物學的 濾過活動을 수행하며, 여러 종류의 동물 플랑크톤의 먹이생물로서도 존재하고 있는 등, 카이이케 호수에서의 중요한 基礎生産者로 알려져 왔다(Matsuyama, 1978).

광합성세균의 多面的인 生理的 特性은 자연계에서의 광합성세균의 普遍的 分布의 한 요인이 되고 있다. 이러한 다면적인 생리적 특성 중의 하나인, 窒素源으로서 질소가스를 이용하여 암모니아로 합성하는 窒素固定은 이미 광합성세균의 대표적인 생리특성으로 알려져 있다(Madigan and Gest, 1979; Gest et al., 1985). *Chromatium* sp.는 빛과 황화수소에 依存하는 光合成的 生長을 보여주며, 窒素源으로서 窒素가스를 이용하여 生長할 수 있고, 또한 질소고정의 수행시에 水素가스를 생산하기도 한다(Matsuyama, 1986; 1987a). 이를 실용적인 면에서 본다면, 최근들어 부각되고 있는 에너지부족, 특히 화석연료의 枯渴 등으로 인한 代替에너지의 개발 등의 문제에 대해 水素가스는 효율이 높고 깨끗한 대체에너지로 개발될 여지가 많기 때문에 經濟的인 解決方案이 될 수 있다(Mitsui and Kumazawa, 1977). 또한 광합성세균은 그 생물체 자체가 營養價가 높은 蛋白質源이므로, 동물플랑크톤 및 치어 등의 먹이생물로서도 利用開發의 가능성이 크다고 할 수 있다(Kobayashi and Kurata, 1978).

이 광합성세균 *Chromatium* sp.는 빛과 독성이 높은 황화수소를 함유한 廢水만으로 生長이 가능하며, 암모니아의 消耗에도 질소고정에 의해 持續的인 生長을 수행할 수 있다. 따라서 단백질원으로서의 菌體의 안정적인 收穫 뿐만 아니라 수소가스 등의 생산 등도 實用的인 면에서 가능하리라 생각된다.

이 연구는 *Chromatium* sp.에 대해 독성이 높은

황화수소를 含有한 海水의 處理, 동물플랑크톤이나 치어의 먹이생물로서의 이용가능성, 그리고 대체에너지로서 水素가스의 經濟性 등을 분석하는 基礎調査로서, 이 균의 질소고정 및 질소고정에 수반되는 수소생산과 관련한 특성, 그리고 카이이케 호수에서 농밀한 個體群을 形成하고 있는 *Chromatium* sp.의 現場試料의 窒素固定 및 水素生産에 대한 빛과 황화수소의 影響을 把握하고자 한다.

材料 및 方法

이 實驗에서 사용된 *Chromatium* sp.는 1983년 5월 카이이케 호수의 bacterial plate에서 分離된 것이며, Pfennig培地(1965)에 의해 照度 1,000 lux, 水溫 25°C, pH 8.0~8.4, 황화수소 130 mg H₂S-S/ℓ의 환경조건하에서 培養되어 왔다. 이 균의 해양성 棲息環境(염분도, 33%)을 고려하여 배지의 성분 중에 NaCl과 MgSO₄ · 7H₂O를 각각 25 g과 3.5 g/ℓ로 증가시켰으며, 微量元素溶液 SL 7을 SL 10으로 代置하였다(Matsuyama, 1987b).

이 균의 生長培地の 성분은 1 ℓ(증류수)당 첨가되는 농도로서 나타내었으며, 다음과 같다. NH₄Cl, 0.43 g; KH₂PO₄, 425 mg; KCl, 425 mg; CaCl₂ 325 mg; MgSO₄ · 7H₂O, 3.5 g; NaCl, 25 g. 上記의 배지는 120°C, 1기압 하에서 약 1시간 정도로 滅菌하고나서, N₂ 가스를 배지의 가스 相에 注入시키며, 室溫으로 冷却시킨다. 냉각된 배지는 다시 1시간 정도 CO₂ 가스로 交替하여 주입시킨다. 그리고나서 N₂ 가스의 주입 하에서 1 ℓ의 배지에 다음과 같은 농도로 첨가한다. 비타민 B₁₂, 26 μg; Na₂CO₃, 350 mg; NaHCO₃, 1.68 g; Na₂S · 9H₂O, 1 g; SL 10 용액(1 ℓ의 증류수에 다음과 같이 첨가한다. HCl (35%, mol/ℓ), 7 ml; FeCl₂ · 4H₂O, 1.5 g; ZnCl₂, 70 mg; MnCl₂ · 4H₂O, 100 mg; H₃BO₃, 6 mg; CoCl₂ · 6H₂O, 190 mg; CuCl₂ · 2H₂O, 2 mg; NiCl₂ · 6H₂O, 24 mg; NaMoO₄ ·

2H₂O, 36 mg), 1 ml 배지의 pH는 멸균후 1 N HCl 용액 또는 1 N NaOH 용액으로 8.2~8.4로 조절하였다.

對數生長期에 들어간 *Chromatium* sp.는 암모니아를 제외시킨 성장배지를 이용하여 遠心分離(670×g, 15분)를 遂行하였다(3회). 원심분리에 의해 얻어진 *Chromatium* sp.의 菌體를 各實驗에 사용하였다.

Chromatium sp.의 배양은 157 ml 용량의 유리병을 이용하여 혐기성 상태에서 이루어졌으며, 細胞數의 측정은 顯微鏡하에서 Thoma Haemocytometer를 사용하여 매일 실시하였다.

窒素固定은 C₂H₂還元法(Hardy et al., 1973)에 의했다. 원심분리에 의해 세척된 세포현탁액 50 ml를 100 ml 용량의 注射器에 넣고, Ar 가스 40 ml를 주사기에 注入한 후, 최종적으로 C₂H₂ 가스를 주입하였다(최종 농도 20%, V/V). 주사기의 가스相에서 일정한 시간간격을 두고 0.5 ml의 가스시료를 採取하여 가스크로마토그래프(Sensortec. Inc. Ltd.)로 측정하였다.

가스크로마토그래프에 의한 C₂H₄과 H₂의 檢出은 미리 C₂H₄과 H₂가스의 標準曲線을 만들어 실험 결과치와의 對照에 의해 각각 그 농도치를 구했다.

각 실험에서의 빛의 조건은 배양용기의 내부 표면에 도달하는 光度로 하였으며, 광도의 加減은 검정색 나이론천으로 조절하였다. 세포현탁액의 황화수소의 농도는 피펫 또는 0.5 ml 용량의 소형 주사기를 이용하여, Na₂S용액(pH 7.0)을 첨가하여 조절하였다.

Bacterial plate 시료의 採集은 1994년 7월 27일 호수의 중심부에서 하였다. Bacterial plate은 수심 5 m에 위치하고 있었으며, 2 l 용량의 採水器를 이용·채집하여, 1 l 용량의 유리병에 천천히 시료를 가득 채운 후에 냉암조건에서 보관하였고, 48 시간 이내에 실험하였다.

시료가 든 유리병 또는 주사기 온도는 水槽内の 水溫에 의해 조절되었다. 배양용기를 水槽에 투입하고, 光照射를 실시하는 것과 동시에 실험을

開始하는 것으로 하였다. 실험에 사용된 光源은 백열전구(100 W)를 이용하였다. 세포현탁액과 가스시료와의 원활한 교환을 위해 水槽내에 있는 배양용기를 1일에 4~5회 정도 가볍게 흔들어 주었다.

結果 및 考察

Fig. 1은 對數生長期에서 채취한 *Chromatium* sp.의 走査電子顯微鏡寫眞이다. 細胞의 形態는 卵形내지 桿狀形이며, 대수생장기에서 세포 크기는 폭이 3.5에서 8.0 μm, 길이 5.5에서 11.0 μm로 나타나고 있다.

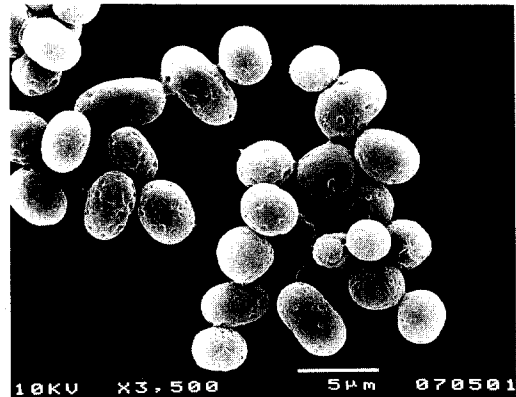


Fig. 1. Scanning electron microscope photograph of *Chromatium* sp. The bacterial cells are ovoid to rod-like in shape.

각각의 암모니아 농도에 대한 *Chromatium* sp.의 성장을 Fig. 2에 나타내었다. 窒素源으로서 암모니아를 각각 0, 1 및 20 mg/100 ml를 투여하여 그 성장에 미치는 영향을 파악하고자 하였다. 암모니아를 투여하지않은 시료는 미리 N₂ 가스로 폭기시켰다. 이 균은 모든 경우에서 좋은 성장을 나타내었다. 각 성장속도를 分散分析에 의해 처리한 결과 有意差는 인정되지 않았다(P>0.05). 그러나 生長量은 0, 1, 20 mg/100 ml의 암모니아 농도순으로 높았으며, 전 실험구간에 대해 有意的이었다(P<0.05). 이것은 N₂를 질소 원으로 이용하는 경우(암모니아 非投與)에 N₂

가스를 포화상태로 투여하여도 절대적인 질소량 (N-態로 환산할 경우)이 작기 때문에 성장량의 차이가 나타나는 것으로 여겨진다. 그러나 *Chromatium* sp.는 질소원으로서 암모니아를 이용한 것과 질소가스를 이용한 것에서도 生長速度間의 큰 차이를 나타내지 않는 것에서 본 균의 생장은 암모니아의 농도에 영향을 받고 있지 않음을 알 수 있으며, 빛이나 황화수소의 존재하에서는 암모니아의 消耗과 더불어 질소고정의 수행에 의해 생장이 지속되리라 판단된다.

질소원으로서 N₂만을 첨가하여 성장(Fig. 3a) 하고 있는 *Chromatium* sp.의 질소고정속도와 수소생산속도를 각각 Fig. 3b, c에 나타내었다. 對數生長期(接種後 2일에서 6일까지)에서 전체 세포수의 증가와 더불어 分裂菌數도 같은 경향으로 증가하나, 安定期(接種後 7일부터 이 실험이 終了된 10일까지)에 접어서면서 분열균수는 빠르게 감소하고 있다(Fig. 3a).

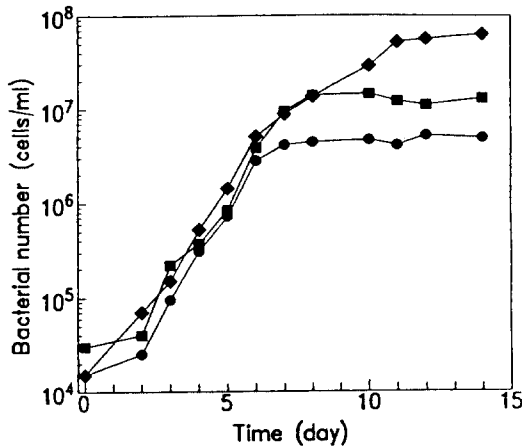


Fig. 2. Growth of *Chromatium* sp. at different NH₄⁺ concentrations. ◆, 20 ml/100 ml ■, 1 ml/100 ml ; ●, 0 mg/100 ml (N₂ saturated).

질소고정효소는 C₂H₂를 C₂H₄로 전환시킬 뿐만 아니라 H⁺에 작용하여 H₂를 생성시킨다(Yoch, 1978). 질소고정효소에 의한 H₂의 생산은 이 酵素의 활동에 따른 부수적인 생성물로서 알려져 있다(Wilson et al., 1983). 이 실험에서도 C₂H₄에

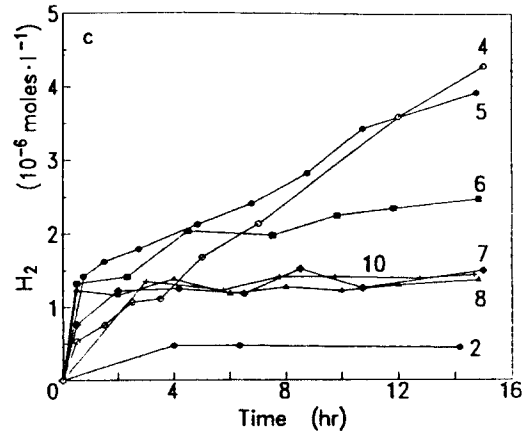
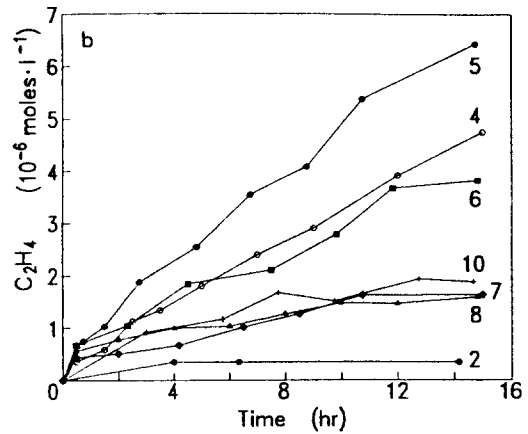
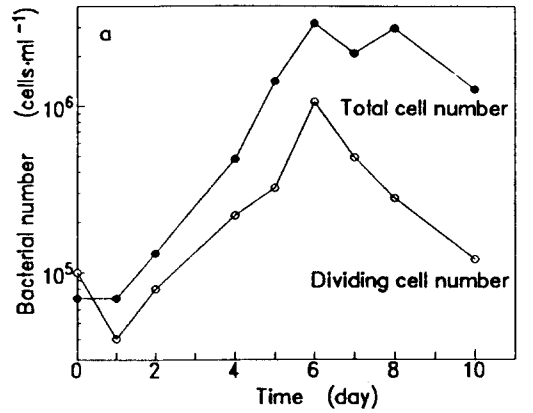


Fig. 3. Growth of *Chromatium* sp. on N₂ (a), the N₂ fixation (b) and H₂ production (c). Numerals in the graph indicate days after inoculation.

의 전환과 동시에 H₂도 생산되었으며, 두 가스의 일정한 濃度比를 나타내었다. 성장단계별 질소고정속도와 수소생산속도를 보면, 대수기에서 속도가 빠르고, 안정기에 들어서면서 속도가 늦어지게 되는 경향을 알 수 있다(Fig. 3b, c). 이 균의 질소고정은 성장과 밀접한 관계를 갖고 있는 것으로 고려되며, 이것은 질소고정에 필요한 에너지 및 還元力의 공급과 관련하여 최적의 성장조건에서 최적의 질소고정 활성이 나타나리라고 판단된다.

Chromatium sp.의 성장에 가장 큰 영향을 끼치는 요인은 빛과 황화수소이며, 이 균의 성장에 대한 유기화합물의 영향은 다른 광합성세균에 비교하여 현저히 적은 것으로 나타났다(Matsuyama, 1987b). 이 균은 광합성적 생장의 특성을 보이고 있으며, 질소고정의 측면에서도 이러한 생리적 특성 및 낮은 조도 또는 낮은 농도의 황화수소 조건에서도 상대적으로 빠른 질소고정속도(최적조건에서의 질소고정속도와와의 비교)를 나타내기 때문에 카이이케 호수에서의 유력한 窒素固定生物로 제안하였다(Moon and Matsuyama, 1995). 이 연구에서는 카이이케 호수의 bacterial plate 시료를 채집하여 試料의 질소고정 및 수소생산에 대한 빛과 황화수소의 영향을 측정하였으며, Fig. 4a, b 및 c에 나타내었다. Bacterial plate 시료는 주로 *Chromatium* sp.(3×10^5 cells/ml)와 *Macromonas* sp.(4×10^6 cells/ml)로 구성되어 있었다.

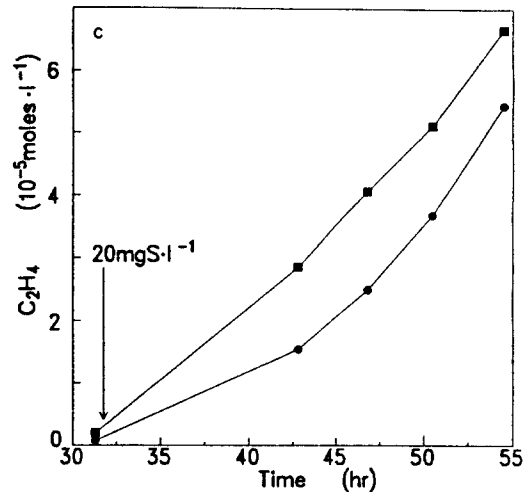
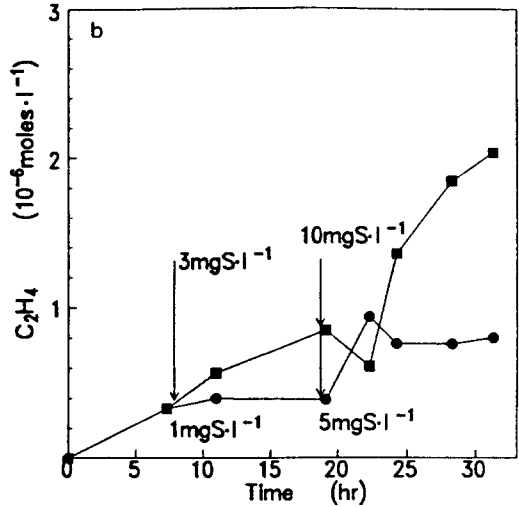
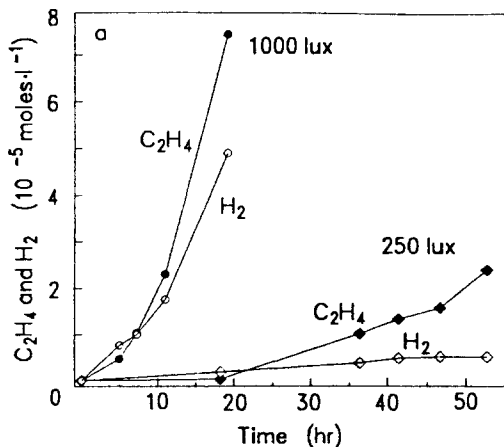


Fig. 4. Effect of light (a) and H₂S concentrations of 1, 3, 5 and 10 mg S · l⁻¹ in concentrations (b) and 20 mg S · l⁻¹ in concentration (c) upon N₂ fixation and H₂ production of bacterial plate samples. Arrows indicate the time that each H₂S concentration was added into the culture vessel. In Fig. 4b, □—□, H₂ production with the additions of 3 and 10 mg S · l⁻¹; ○—○, H₂ production with the additions of 1 and 5 mg S · l⁻¹; ■—■, C₂H₄ formation with the additions of 3 and 10 mg S · l⁻¹; ●—●, C₂H₄ formation with the additions of 1 and 5 mg S · l⁻¹. In Fig. 4c, apparent increase of production and formation of H₂ and C₂H₄ in all the culture vessels at each addition of 20 mg S · l⁻¹ was shown. Bacterial plate samples mainly consist of *Chromatium* sp.(3×10^5 cells/ml) and *Macromonas* sp.(4×10^6 cells/ml). For the details, see the "Materials and Methods" in the text.

低照度인 250 lux에서 18시간 후에 낮은 속도의 질소고정과 수소생산이 있었으나, 最適照度인 1000 lux인 경우에는 빛의 照射와 동시에 높은 속도로 질소고정과 수소생산이 관측되었다 (Fig. 4a).

현장시료에 황화수소를 첨가하여 그 농도를 각각 0, 1, 3, 5, 10, 20 mg H₂S-S/ℓ로 조절하여 시료의 질소고정 및 수소생산 속도를 측정하였다 (Fig. 4b, c). 황화수소를 전혀 넣지 않은 시료에서 극히 적은 양의 질소고정 및 수소생산이 일어났다. 질소고정 및 수소생산 속도는 황화수소의 농도증가에 따라 높아져 갔으며, 20 mg H₂S-S/ℓ의 농도에서 가장 높은 속도를 보였다.

카이이케 호수의 bacterial plate 시료의 질소고정과 수소생산은 빛과 황화수소에 의존하는 경향을 가졌다. 이것은 주로 시료중의 *Chromatium* sp.에 의해 질소고정이 일어나고 있는 것으로 보고되고 있다(Matsuyama, 1987a).

Chromatium sp.는 카이이케 호수의 중요한 一次生産者로 알려져왔다(Matsuyama, 1987b). 이 균이 서식하고 있는 수심(4~5 m)을 중심으로 용존산소와 황화수소의 농도변화가 크게 일어나고 있으며, 이 균의 棲息水深 및 이곳을 중심으로 한 바로 윗부분에는 다수의 동물플랑크톤이 출현하고 있다. 다수의 동물플랑크톤이 존재할 수 있는 가장 중요한 이유로서 *Chromatium* sp.라는 풍부한 먹이생물의 존재와 황화수소의 상층부에의 擴散抑制를 들 수 있다(Matsuyama, 1978). *Chromatium* sp.는 독성이 높은 황화수소, 암모니아, 인산염 등을 이용하여 성장하며, 그 결과로서 이 균이 서식하고 있는 수심의 상층부는 식물플랑크톤이 성장하기 어려울 정도로 영양염농도가 극미량이거나 검출이 안되는 경우가 많다(Matsuyama, 1987b). 폐쇄적인 환경의 이 호수에는 외부로부터의 영양염의 유입이 거의 없으며, 流失되어 부족하게 되는 窒素源의 補充은 *Chromatium* sp.의 生物的 窒素固定에 의존하리라 보고되고 있는 등(Moon and Matsuyama, 1995), 優占種으로 존재하는 *Chromatium* sp.가 이 호

수에서 生態的으로 중요한 위치를 차지하고 있음을 알 수 있다.

폐쇄된 오염수중의 미생물군의 개괄적인 遷移過程은 好氣性細菌, 光合成細菌, 그리고 藻類 등의 優占순서로 진행되며, 이 과정에서 purple sulfur bacteria (예, *Chromatium* sp.)는 오염수중에 발생된 독성의 황화수소를 신속히 제거하여 遷移過程의 진행을 촉진하는 역할을 한다(Kobayashi, 1972). 또한, 암모니아의 농도가 낮은 오염수에서는 광합성세균 또는 窒素固定菌에 의한 질소고정에 의해 부족한 질소를 補充하는 역할을 수행하는 것으로 여겨진다. 특히 광합성세균의 증식은 광합성세균 자체가 蛋白質, 비타민, 色素 등을 높은 농도로 함유하고 있는 高營養의 먹이 생물이기 때문에, 동물 플랑크톤이나 稚魚 등에 있어서 먹이생물의 증가를 의미하게 된다(Kobayashi and Kurata, 1978).

이 균의 성장과 질소고정은, 타 광합성세균의 光從屬營養的인 성장특성과는 다르게, 빛과 황화수소에 의존한다(Matsuyama, 1986; Moon and Matsuyama, 1995). 이 실험에서 수행된 *Chromatium* sp.의 질소고정은 이러한 의미에서 有機物의 種類와 그 농도에 의존하는 타 미생물의 성장을 조절하기가 쉽다고 판단된다. 황화수소를 함유한 폐수의 처리와 더불어, 비록 폐수중의 질소원이 부족하다 하더라도 질소고정에 의해 영양가가 높은 균체를 안정적으로 수확하여 먹이생물로 이용하는 것도 가능하리라 여겨진다.

광합성세균의 질소고정에 따른 水素生産은 널리 알려져 왔다(Gest and Kamen, 1949; Newton and Wilson, 1953; Wilson et al., 1983). 이 실험에서도 *Chromatium* sp.는 빛과 황화수소의 존재하에서 활발히 수소를 생산하였다(Fig. 3c). 광합성세균의 수소를 생산하는 특성으로부터, 심각해가는 화석에너지의 부족과 관련하여 태양에너지를 이용한 生物學的 水素에너지의 개발에 대해 많은 연구가 수행되어 왔다(Mitsui and Kumazawa, 1977). 특히 熱帶 또는 亞熱帶 지역에서 분리한 광합성세균을 이용한 수소생산

시스템의 연구는 열대 또는 아열대지역에서의 局地的인 규모의 수소생산시설의 가능성을 제시하고 있다(Ohta et al., 1981). 열대 또는 아열대 지역보다 氣溫 및 日射量의 변화가 큰 溫帶域에서의 수소생산시스템의 최적 對象種은 수온변화에 따른 환경조건의 변동(Moon and Matsuyama, 1995), 그리고 유기물의 종류와 농도에 생장이나 질소고정활성이 제약받지 않아야 한다. 이러한 제약조건을 고려할 때 *Chromatium* sp.는 빛과 황화수소의 존재만으로 수소를 생산할수 있기 때문에 적절한 수소생산자라고 판단된다.

바다로 둘러쌓인 濟州道에서는 水海洋資源의 環境管理와 더불어 水産業의 活性化는 중요하다고 할 수 있다. 특히 魚貝類에 대한 需要는 養殖業에 점점 의존해가고 있으며, 동시에 산업활동에 따른 廢水의 量도 점차 증가되어가는 실정이다. 이러한 廢水의 再利用과 더불어 유익한 생산(예, 광합성 세균의 균체수확 및 수소가스의 이용)이 가능하게 된다면 산업적·환경적으로 의미가 크다고 할 수 있다. 이 실험에서 *Chromatium* sp.는 광합성적으로 질소고정과 수소생산을 하여 無機的인 환경에서 有機物을 생산하고 있다. 광합성세균인 *Chromatium* sp.를 배양하는데는 여러 종류의 미생물의 혼입으로 大量培養에 어려움이 많으므로, 앞으로 이에 대한 연구가 선행되어야 할 것이다.

要 約

카이이케 호수에서 年中 濃密한 個體群을 형성하고 있는 *Chromatium* sp.는 窒素固定能을 가지고 있으며, 窒素固定過程에 水素를 生産한다. 이 菌의 窒素固定과 水素生産은 광합성 조건에서 활발히 이루어지며, 生長段階中 對數生長期(exponential growth phase)에서 活性도가 가장 높았다. 1994년 7월 27일 채집한 카이이케 호수의 bacterial plate 試料를 이용하여 실험실에서 질소고정과 수소생산에 끼치는 빛과 황화수소의 영향을 調査하였다. 低照度(250 lux)에서는 실

험개시후 약 18시간이 지나고나서 질소고정과 수소생산이 측정되었으나, 高照度(1000 lux)에서는 照射와 동시에 높은 속도의 질소고정과 수소생산이 관측되었다. 황화수소를 전혀 투입하지 않은 경우에는 극히 낮은 질소고정이 나타났으나, 황화수소의 농도의 증가에 따라 질소고정속도가 높아졌으며, 20 mg H₂S-S/l에서 가장 높았다.

謝 辭

자료의 統計處理에 도움을 주신 제주대학교 해양과학대학 수산생물학과 박사과정에 재학중인 박무억씨에게 感謝의 뜻을 전한다.

參 考 文 獻

- Duncan, D. B., 1955. Multiple range and multiple tests. *Biometrics*, 11 : 1-42.
- Gest, H., J. L. Favinger, M. T. Madigan, 1985. Exploitation of N₂-fixation capacity for enrichment of anoxygenic photosynthetic bacteria in ecological studies. *FEMS Microbiology Ecology*, 31 : 317-322.
- Gest, H. and M. D. Kamen, 1949. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. *Science*, 109 : 558-559.
- Hardy, R. W. F., R. C. Burns and R. D. Holsten, 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.*, 5 : 47-81.
- Kobayashi, M., 1972. Utilization of photosynthetic bacteria. Proc. IV IFS, Ferment. Technol. Today, 527-531.
- Kobayashi, M. and S. Kurata, 1978. The mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria. *Process Biochemistry*, 13 : 27-30.
- Madigan, M. T. and H. Gest, 1979. Growth of photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas capsulata* chemoautotrophically in darkness with H₂ as the energy source. *J. Bacteriology*, 137 : 524-530.
- Matsuyama, M., 1977. Limnological features of lake Kaiike, a small coastal lake on Kamikoshiki island, Kagoshima Prefecture,

- Japan. Jpn. J. Limnol., 38 : 9-18.
- Matsuyama, M., 1978. Importance of photosynthetic sulfur bacteria, *Chromatium* sp. as an organic matter producer in Lake Kaiike, Jpn. J. Limnol., 39 : 103-111.
- Matsuyama, M., 1980. Some considerations on the dense population of a purple sulfur bacterium, *Chromatium* sp., at the mid-depth of lake Kaiike. Jpn. J. Limnol., 41 : 84-94.
- Matsuyama, M., 1981. Comparative aspects of a small coastal lake, Kaiike, on Kamikoshiki island, southern Kyushu, Japan. Verh. Internat. Verein. Limnol., 21 : 979-986.
- Matsuyama, M., 1986. N₂ fixation of a large phototrophic bacterium isolated from the bacterial plate of lake Kaiike with some considerations on its *in situ* growth. Jpn. J. Limnol., 47 : 369-375.
- Matsuyama, M., 1987a. H₂ production by a large phototrophic bacterium isolated from the bacterial plate of lake Kaiike. Jpn. J. Limnol., 48 : 133-136.
- Matsuyama, M., 1987b. A large phototrophic bacterium densely populating the O₂-H₂S interface of Lake Kaiike on Kamikoshiki island, southwest Japan. Acta Academiae Aboensis, 47 : 29-43.
- Mitsui, A. and S. Kumazawa, 1977. Biological solar energy conversion, Academic Press, New York, pp. 23-51.
- Moon, S.-W. and M. Matsuyama, 1995. Effects of environmental factors upon nitrogen fixation of *Chromatium* sp. isolated from lake Kaiike. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ., 76 : 1-6.
- Newton, J. W. and P. W. Wilson, 1953. Nitrogen fixation and photoproduction of molecular hydrogen by THIORHODACEAE. Antony van Leeuwenhoek : Microbiol. Serol., 19 : 71-77.
- Ohta, Y., J. Frank and A. Mitsui, 1981. Hydrogen production by marine photosynthetic bacteria : Effect of environmental factors and substrate specificity on the growth of a hydrogen-producing marine photosynthetic bacterium, *Chromatium* sp. Miami PBS 1071. Int. J. Hydrogen Energy, 6 : 451-460.
- Pfennig, N., 1965. Anreicherungskulturen für rote und grüne schwefelbakterien. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. Suppl., 1 : 179-189, 503-504.
- Simpson, F. B. and R. H. Burris, 1984. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. Nature, 224 : 1095-1097.
- Wilson, J. C., Y. Jouanneau, A. Colbeau and P. M. Vignais, 1983. H₂ metabolism in photosynthetic bacteria and relationship to N₂ fixation. Ann. Microbiol., 134B : 115-135.
- Yoch, D. C., 1978. The photosynthetic bacteria. Plenum Press, New York, pp. 657-676.