

Pengoksidan Sulfit oleh Adenosin-5'-Posfosulfat Reduktase Dalam *Thiobacillus denitrificans*

(The oxidation of sulphite by Adenosine-5'-phosphosulphate reductase in *Thiobacillus denitrificans*)

M. AMINUDDIN

Jabatan Biokimia dan Mikrobiologi, Fakulti Sains dan Pengajian Alam Sekitar,
Universiti Pertanian Malaysia.

Key words: *Thiobacillus denitrificans*; APS-reduktase

RINGKASAN

Sulfit dioksidkan dengan adanya AMP oleh satu enzim yang terdapat dalam pecahan-larut sel. Dengan adanya ferrisianid, sulfit dan AMP dengan mudahnya membentuk APS di dalam ekstrak kasar. Tetapi, jika ferrisianid digantikan dengan nitrat dan FMN di bawah keadaan anaerobik hasilan APS hanya sebanyak 10% daripada yang terdapat dengan ferrisianid. APS reduktase telah dituliskan 35-kali. Enzim yang tertulin dihalang oleh bahan-bahan uji pengikat-thiol. Berat molekulnya dianggarkan sebanyak 250,000.

SUMMARY

Sulphite is oxidised in the presence of AMP by an enzyme present in the soluble fraction of the cell. In the presence of ferricyanide, sulphite and AMP readily formed APS in the crude extract. However, when ferricyanide was replaced by nitrate and FMN under anaerobic conditions the yield of APS was only about 10% of that obtained with ferricyanide. APS reductase was purified 35-fold. The purified enzyme was inhibited by thiol-binding reagents. Its molecular weight was estimated to be 250,000.

PENGENALAN

Thiobacillus denitrificans, seperti lain-lain thiobacilli (Lyric dan Suzuki, 1970; Moriarty dan Nicholas, 1970) adalah satu bakterium kimiolithotrof sebab ianya mengoksidkan sebatian-sebatian sulfan takorganik untuk mendapatkan tenaga bagi penumbuhan. Ianya juga satu anaerob fakultatif, iaitu ia menggunakan nitrat, bukan oksigen, sebagai penerima elektron di bawah keadaan anaerobik.

Di dalam *T. denitrificans* sulfit telah ditunjukkan sebagai hasil pengoksidan sulfid dan sulfan unsur (Aminuddin dan Nicholas, 1973; Aminuddin, 1979A). Pengoksidan sulfit seterusnya oleh thiobacilli dijalankan mengikut dua edaran. Mekanisma pertama yang dikemukakan oleh Peck (1960, 1962) melibatkan pembentukan adenosin-5'-posfosulfat (APS) daripada AMP dan sulfit yang dimangkinakan oleh APS-reduk-

tase. APS yang terbentuk kemudian ditukar kepada ATP oleh gabungan tindakan dua enzim iaitu ADP-sulfurilase dan adenilat kinase. Kedua-dua tindakbalas ini juga menghasilkan kembali AMP.

Sulfit juga boleh dioksidkan tanpa AMP (London dan Rittenberg, 1964; Charles dan Suzuki, 1966) dan dari itu melibatkan mekanisme yang berlainan. Charles dan Suzuki (1966) telah mengasingkan dan menuliskan suatu sulfit oksidase dari *Thiobacillus novellus* yang memerlukan ferrisianid atau sitokrom *c* sebagai penerima elektron. Enzim yang serupa juga telah dituliskan dari *Thiobacillus thioparus* (Lyric dan Suzuki, 1970A) dan *T. denitrificans* (Aminuddin dan Nicholas, 1974).

Kertas ini membentangkan penulinan APS-reduktase serta sifat-sifatnya dari *T. denitrificans*.

DEAE = diethylaminoethyl; EDTA = ethylenediamin tetrasetat; pCMB = para-kloromerkuribenzoat; HOQNO = 2-heptil-4-hidroksikuionolin-N-oksida; DIECA = diethildithiokarbamat.

BAHAN DAN CARA

Penumbuhan dan penuaian organisma

T. denitrificans, strain "Oslo", ditumbuhkan secara anaerobik selama 3 hari pada 30°C dalam karboy-karboy 40-l. Larutan kultura mengandung (g/l): Na₂S₂O₃ · 5H₂O, 5.0; KOH, 0.2; NaHCO₃, 1.0; KNO₃, 2.0; NH₄Cl, 0.5; MgSO₄ · 7H₂O, 0.5; KH₂PO₄, 2.0; FeSO₄, 0.01. Apabila asiditi meningkat ianya diubah kepada pH 7.0 dengan 20% (berat/isipadu) K₂CO₃. 10 l inokulum dituangkan ke dalam 30 l medium untuk mendapatkan isipadu akhir 40 l.

Sel-sel yang tumbuh dikutip pada 2°C dalam pengempar sejuk Sorvall RC-2 yang dipasang dengan alat alir-terus. Sel-sel kemudiannya dibasuh dua kali dengan 0.05M penampapan posfat (pH 7.0).

Penyediaan ekstrak

Sel-sel yang diampai dengan 0.05M penampapan posfat (pH 7.0) dipecahkan melalui Sel Tekanan French pada 20,000 paun/in persegi pada 2°C. Prosidur ini diulangi. Homogenat kasar yang diperolehi kemudiannya digemparkan pada 10,000 xg selama 30 min dan supernatan yang didapati digunakan sebagai punca enzim.

Penetapan aktiviti APS-reduktase

Kaedah yang digunakan adalah berasaskan cara Peck (1961) dengan beberapa perubahan. Ramuan tindakbalas mengandungi (μmole): Tris-HCl (pH 7.5), 150; Na₂SO₃, 10; K₃Fe(CN)₆, 5.0; AMP, 5.0 dan enzim dalam isipadu akhir sebanyak 3.0 ml. Tindakbalas yang dijalankan dalam kuvet quartz (1 sm) dimula dengan memasukkan sulfit ke dalam kuvet sampel. Kuvet rujukan mengandungi semua komponen kecuali sulfit. Perubahan penyerapan pada 420 nm diikuti dengan menggunakan spektrofotometer perekod Unicam SP-800 yang telah diekuilibrasikan pada 30°C. Aktiviti enzim disebut secara μmole ferrisianid terturun per jam per mg protin.

Pengasingan nukleotid-nukleotid

Nukleotid-nukleotid diasingkan samada menggunakan kolom DEAE-selulos atau elektroforesis voltan tinggi. Kolom DEAE-selulos (8 × 1.7 sm) dibina dengan DE-11 yang telah diekuilibrasikan dengan 1M penampapan format (pH 6.0). Campuran nukleotid kemudian diletakkan di atas kolom dan dialir-keluar dengan cerunan linear 0.2M ammonium bikarbonat dan air suling (kedua isipadu sama). Pecahan-pecahan dikutip pada suhu bilik dengan menggunakan pemungut pecahan otomatik.

Untuk pengenalan, nukleotid-nukleotid seterusnya diasingkan di atas kertas kromatografi Whatman 3MM dalam 0.1M penampapan naterium sitrat (pH 5.0) pada 1500 V selama 1½ jam. Radas eletrophoresis Tate (1968) digunakan. AMP, ADP, APS dan ATP digunakan sebagai nukleotid piawai. Nukleotid-nukleotid ini dikesan di atas kertas yang sudah kering dengan mengikuti penyerapan mereka terhadap cahaya lampau-ungu.

Pengiraan radioaktiviti

Bahagian-bahagian radioaktif elektrophoretogram dipotong kecil-kecil (1.5 × 2 sm) dan setiap potongan diletakkan ke dalam vial kaca. Larutan kerlipan yang mengandungi 0.5% (berat/isipadu) 2,5-difeniloksazol (PPO) dan 0.3% (berat/isipadu) 1,4-bis-(2-(4-metil-5'-feniloksazolil))-benzen (POPOP) dalam toluen kemudiannya dimasukkan ke dalam vial dan radioaktiviti dikira dengan Spektrometer Kerlipan Cecair Packard Tri-Carb (Model 3375).

Radioaktiviti dalam larutan pula dikira dengan mengambil satu alikuot sampel dan dicampurkan dengan campuran kerlipan yang terdiri dari 2.0 ml 95% (berat/isipadu) ethanol dan 5 ml toluen dalam vial kaca. PPO dan POPOP kemudian dimasukkan seperti di atas dan radioaktiviti dikira.

Penetapan protin

Kaedah Folin yang dihuraikan oleh Lowry *et al.* (1951) digunakan dengan albumin serum lembu sebagai protin piawai.

Bahan-bahan kimia

Larutan sulfit disediakan dengan melarutkan Na₂SO₃ · 9H₂O dalam air suling-berganda yang mengandungi 0.2 mM Na-EDTA. Protin penanda untuk penurasan gel dibeli dari Mann Research Laboratories, New York, U.S.A. Sitokrom *c*, albumin serum lembu, nukleotid-nukleotid, pCMB dan dithiothreitol didapati dari Sigma Chemical Co. Missouri, U.S.A. Naterium sulfit radioaktif (³⁵S-label) dibeli dari Radiochemical Centre, Amersham, U.K. Whatman DEAE-selulos dan kertas kromatografi Whatman 3MM dibekalkan oleh Reeve Angel and Co. Ltd. London. Sephadex G-200 dan dekstran biru dibeli dari Pharmacia, Uppsala, Sweden. PPO dan POPOP diperolehi dari Packard Instrument Co. Chicago, U.S.A. Mutu bahan-bahan kimia yang lain adalah yang paling tinggi yang boleh didapati.

HASIL-HASIL

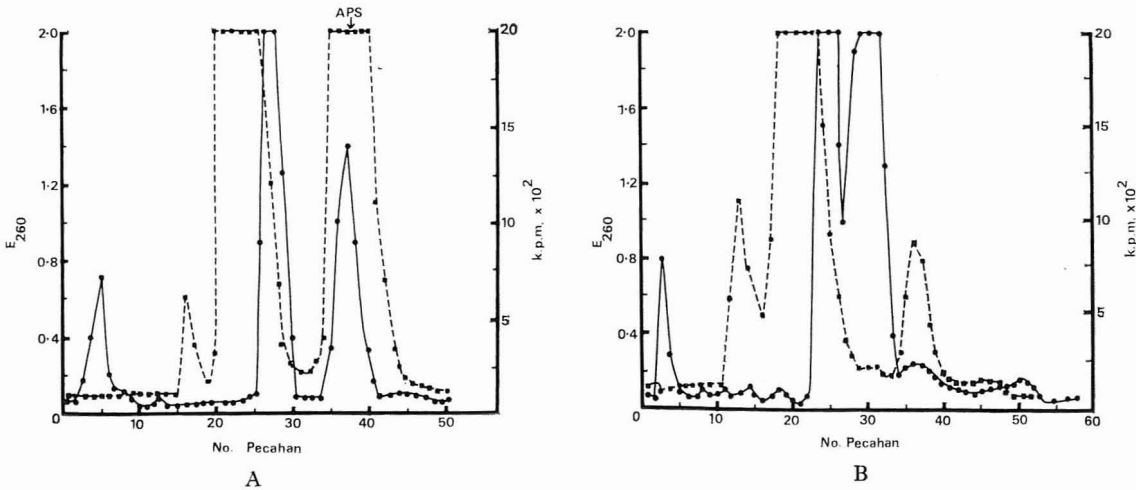
Pembentukan APS

Ekstrak kasar (S_{10}) telah diperamkan dengan ^{35}S -sulfit dan AMP serta beberapa penerima elektron. Hasil tindakbalas ini diasingkan dengan kromatografi kolom DEAE-selulos. Nukleotid-nukleotid yang mengalir-keluar seterusnya diasing dan ditetapkan dengan elektroforesis voltan tinggi.

Apabila ada ferrisianid, sulfit dan AMP membentuk APS dalam ekstrak kasar (S_{10}) (*Rajah 1A*). Jika ferrisianid digantikan dengan penerima elektron lain seperti NO_3^- , O_2 atau sitokrom *c*, APS tidak terbentuk. Walau bagaimanapun, nitrat dengan kehadiran FMN didalam keadaan anaerobik membentuk APS dalam S_{10} tetapi jumlah APS yang dihasilkan hanya 10% daripada jumlah yang diperolehi dengan ferrisianid (*Rajah 1B*). APS-reduktase yang ditulinkan hanya membentuk APS dengan ferrisianid sahaja sebagai penerima elektron.

Penulinan APS-reduktase

Ekstrak kasar (S_{10}) digemparkan pada 144,000 *xg* selama 90 min dan pecahan supernatan (S_{144}) diambil (Pecahan II, Jadual 1). Ammonium sulfat kemudian dimasukkan ke dalam pecahan ini dan dikacau perlahan-lahan pada 4°C dengan pengacau magnet. Mendak yang dibentuk diantara ketepuan 35 - 65% dipungut, diampai semula dalam 0.05M penampam posfat (pH 7.0) dan didialiskan selama 12 jam menentang penampam yang sama. Penampam ditukar tiga kali dalam jangkamasa ini. Dialisat dari ini (Pecahan III) kemudiannya diletakkan ke atas kolom DEAE-selulos (DE-11, 2.5 x 20 sm) yang telah diekuilibrasikan dengan penampam yang sama. Kolom ini dikembangkan dengan cerunan linear posfat (0.05 M hingga 0.25 M; pH 7.0). APS-reduktase didapati mengalir-keluar pada pekatan garam kira-kira 0.2 M (*Rajah 2*). Enzim yang mengalir-keluar berwarna kuning. Effluen-effluen yang mengandungi enzim dikutip, disatukan dan dipekatkan dengan ultrafiltrasi selaput (Diaflo, PM-10, Amicon Corp.,



Rajah 1. Pengasingan hasil-hasil tindakan APS-reduktase dengan menggunakan kromatografi DEAE-selulos.

A: Ramuan tindakbalas mengandungi AMP, 5 μ mole; $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_3$, 0.89 μ Ci (ditambah 5 μ mole Na_2SO_3 sebagai pembawa); $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 μ mole; penampam Tris-HCl (pH 7.5), 10 μ mole dan 0.2 ml S_{10} (mengandungi 3.5 mg protein). Isipadu akhir ialah 0.32 ml. Tindakbalas dimulakan dengan memasukkan ferrisianid dan dihentikan selepas 5 min dengan dididihkan dalam air selama 2 min. Selepas pengemparan, 0.1 ml alikuot pecahan supernatan diletakkan ke atas kolom DEAE-11 selulos seperti yang diterangkan dalam Bahan dan Cara. Kolom ini kemudiannya dikembangkan dengan cerunan NH_4HCO_3 . Pecahan-pecahan effluen kemudian dipungut.

Radioaktiviti dikira dalam 0.1 ml alikuot tiap pecahan. Baki pecahan digunakan untuk menentukan pekatan nukleotid dengan menyukat penyerapan pada 260 nm. Nukleotid yang keluar dari kolom pula diasing dan ditetapkan dengan menggunakan elektroforesis voltan tinggi.

B: Campuran tindakbalas adalah sama seperti (A) tetapi ferrisianid digantikan dengan 5 μ mole FMN dan 5 μ mole NaNO_3 .

———— Penyerapan pada 260 nm
 - - - - - Radioaktiviti

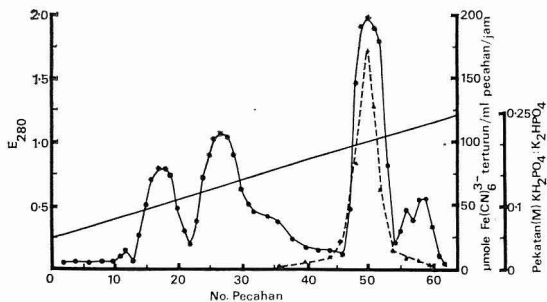
JADUAL 1

Penulinan APS-reduktase

Pecahan S₁₀ (lihat Bahan dan Cara) digunakan sebagai bahan permulaan dalam penulinan enzim (Pecahan I)

Pecahan	Prosidur	Jumlah Aktiviti	Aktiviti Spesifik	Hasilan Kembali (%)	Kali Penulinan
I	Ekstrak kasar (S ₁₀), pecahan supernatan selepas pengemparan homogenat sel pada 10,000 xg selama 30 min.	9894	26	100	1
II	S ₁₄₄ (pecahan supernatan selepas pengemparan pecahan I pada 144,000 xg selama 90 min).	9374	81	94	3.1
III	Pecahan II dimendak dengan ammonium sulfat (ketepuan 35-60%)	5048	237	51	8.9
IV	Pecahan III dialir-keluarkan dari kolom DEAE-selulos dengan menggunakan cerunan linear 0.05-0.25 M larutan penampam posfat.	3135	650	38	25.0
V	Pecahan IV dialir-keluarkan dari kolom Sephadex G-200 dengan 0.05 M larutan penampam posfat (1.5-2.0 kali isipadu void)	2688	960	27	36.3

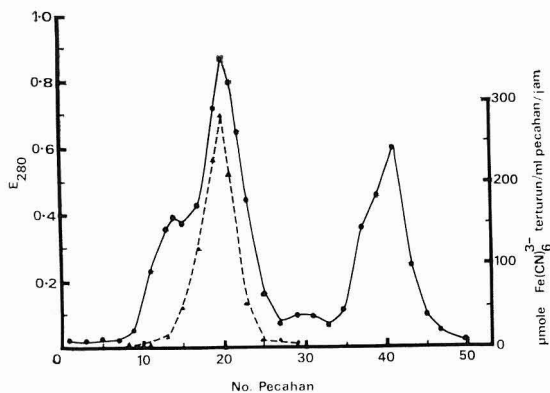
U.S.A.) untuk menghasilkan pecahan IV. Ini kemudiannya diturunkan melalui kolom Sephadex G-200 (Rajah 3). Penulinan enzim yang didapati ialah 35 kali (Jadual 1).



Rajah 2. Profil pengaliran-keluar APS-reduktase dari kolom DEAE-selulos.

Pecahan III (Jadual 1) yang telah didialiskan dialir-keluar dari kolom DEAE-selulos (DE-11, 2.5 x 20 sm) dengan menggunakan cerunan linear larutan tampam posfat (pH 7.5) diantara 0.05 M hingga 0.25 M. Pecahan-pecahan 5 ml dikutip pada 2°C dengan menggunakan pengutip pecahan automatik. Aktiviti APS-reduktase ditentukan seperti yang diterangkan dalam Bahan dan Cara. Pekatan protin ditetapkan dengan sukatan pada 280 nm.

(●—●) E₂₈₀; (-----) aktiviti APS-reduktase; (—) pekatan penampam posfat



Rajah 3. Profil pengaliran-keluar APS-reduktase dari kolom Sephadex G-200

Pecahan IV (Jadual 1) telah dialir-keluarkan dari kolom Sephadex G-200 dengan 0.05M penampam posfat. Pecahan effluen (10 ml tiap-tiap satu) dikutip untuk penentuan aktiviti APS-reduktase. Pekatan protin ditetapkan dengan sukatan pada 280 nm.

(—) E₂₈₀; (-----) aktiviti APS-reduktase

Sifat-sifat APS-reduktase

Kebanyakan daripada kajian-kajian yang telah dijalankan ke atas APS-reduktase menunjukkan persetujuan dengan hasil-hasil penyelidikan Bowen, Happold dan Taylor (1966). Mithalnya, didapati bahawa optimum pH enzim ialah 7.5 dan ianya terikat kepada satu moiti flavin.

APS-reduktase (Pecahan IV, Jadual 1) dihalang dengan kuat oleh bahanuji-bahanuji pengikat thiol dan penghalangan ini boleh dibalikkan separa dengan dithiothreitol. Penghalang-penghalang pengangkutan elektron tidak mempunyai kesan atas aktiviti APS-reduktase kecuali mepakrin (Jadual 2). Km sulfit ialah 0.5 mM (Rajah 4).

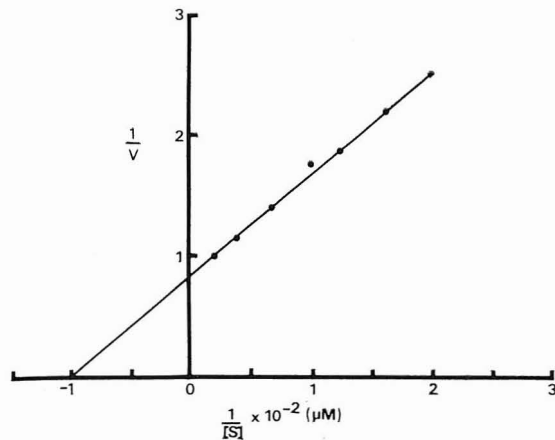
JADUAL 2

Kesan penghalang ke atas APS-reduktase

Ramuhan tindakbalas adalah seperti yang diterangkan dalam Bahan dan Cara. Enzim (Pecahan IV, Jadual 1) diperamkan terlebih dahulu dengan penghalang (pekatan terakhir seperti yang ditunjukkan) selama 5 min sebelum tindakbalas dimulakan. Aktiviti enzim adalah disebutkan sebagai peratusan penghalangan tindakbalas biasa (tanpa penghalang) yang mempunyai aktiviti spesifik sebanyak 630 μ mole ferrisianid terturun/jam/mg protin.

Penghalang	Pekatan terakhir (mM)	% penghalangan
pCMB	1.0	90
	0.1	65
Indoasetamid	1.0	87
	0.1	75
N-ethylmaleimid	1.0	45
	0.1	15
Iodoasetamid campur *dithiothreitol		15
Arsenit	1.0	0
HOQNO	1.0	0
Mepakrin	1.0	21
Azid	1.0	6
Sianid	1.0	0
DIECA	1.0	0
O-fenanthrolin	1.0	0

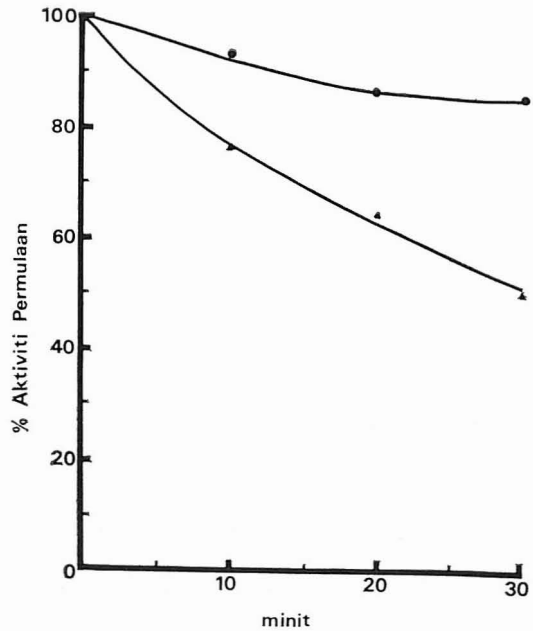
*Ditambah 5 min selepas tindakbalas bermula. Pekatan akhir 1.0 mM.



Rajah 4. Kesan pekatan sulfit ke atas aktiviti APS-reduktase

Aktiviti APS-reduktase ditentukan seperti yang dicatitkan dalam Bahan dan Cara tetapi pekatan akhir sulfit adalah diubahsuai seperti yang ditunjukkan dalam rajah.

APS reduktase didapati stabil terhadap haba jika dibandingkan dengan beberapa enzim lain. Pada suhu 60°C hanya 5% daripada aktiviti permulaan yang hilang apabila diperam selama 10 min sementara pada 75° hanya 10% sahaja yang hilang dalam jangkamasa yang sama (Rajah 5). Berat molekul enzim telah ditetapkan dengan



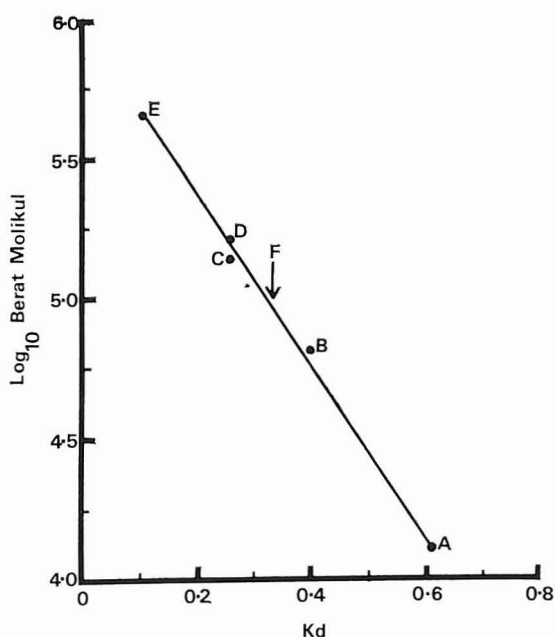
Rajah 5. Aktiviti APS-reduktase pada suhu 60°C dan 75°C

Dua alikuot APS-reduktase (Pecahan IV, Jadual 1) telah dipanaskan pada suhu 60°C dan 75°C. Sampel-sampel kemudiannya diambil untuk menentukan aktiviti APS-reduktase. Aktiviti enzim disebut sebagai satu peratusan daripada aktiviti enzim sebelum ia dipanaskan iaitu 590 μ mole ferrisianid terturun/jam/mg protin.

(● ——— ●) dipanaskan pada 60°C

(△ ——— △) dipanaskan pada 75°C

menggunakan kromatografi Sephadex G-200. Jika APS-reduktase dianggap lebih kurang berbentuk globular, berat molekul yang dianggarkan ialah 250,000 (\pm 5000, ralat piawai) (Rajah 6).



Rajah 6. Penentuan berat molekul APS-reduktase

Sephadex G-200 adalah disukat dengan menggunakan protin-protin piawai yang mana berat molekul mereka diketahui dan juga dekstran biru serta ³⁵S-sulfat (Andrews, 1965). Pengalir taburan, K_d , adalah dihitung mengikut formula

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_l}$$

dimana V_e = isipadu aliran-keluar, V_o = isipadu void dan V_l = isipadu dalam (inclusion volume). Simbol digunakan: A - sitokrom c, B - albumin serum lembu, C - laktat dehidrogenase, D - globulin, E - apoferritin dan F - APS-reduktase.

PERBINCANGAN

Dalam *T. denitrificans* pengoksidan sulfat yang bergantung kepada AMP didapati di bahagian larut sel dan dimangkin oleh APS-reduktase sementara sulfat oksidase pula didapati di bahagian selaput sel dan mengoksid sulfat tanpa memerlukan AMP (Aminuddin dan Nicholas, 1974). Lyric dan Suzuki (1970A) telah mendapati yang APS-reduktase merupakan 3% daripada jumlah protin sel dalam *T. thioparus* dan dalam *T. denitrificans* pula enzim ini berjumlah 4-5% (Bowen *et al.*). Jumlah seumpama ini dengan kuat menyokong pandangan yang ianya

mempunyai fungsi penting dalam metabolisme tenaga thiobacilli (Aminuddin, 1979B). Aktiviti tinggi enzim ini telah digunakan untuk membentuk APS dalam kuantiti yang banyak (Adams, Warnes dan Nicholas, 1971).

APS-reduktase yang dituliskan dari *T. denitrificans* menggunakan hanya ferrisianid sebagai penerima elektron walaupun sitokrom c juga ditunjukkan berkesan dalam *T. thioparus* (Lyric dan Suzuki, 1970B). Tetapi di dalam ekstrak kasar (S_{10}) *T. denitrificans* APS boleh dibentuk dari AMP dan sulfat dengan adanya nitrat.

Bowen *et al.* (1966) melaporkan yang bahanuji-bahanuji pengikat thiol tidak menghalang APS-reduktase. Sebaliknya data yang dibentangkan disini mengesahkan yang penghalang sulfidril mempunyai kesan negatif terhadap aktiviti enzim.

Kepentingan fisiologi APS-reduktase kurang terang, mungkin oleh kerana ianya terdapat di bahagian larut sel, ia bersekutu dengan enzim-enzim yang terlibat dalam fosforilasi peringkat substrat (Aminuddin, 1979B).

RUJUKAN

- ADAMS, C. A., WARNES, G. M. dan NICHOLAS, D. J. D. (1971): Preparation of labelled adenosine-5'-phosphosulphate using APS-reductase from *Thiobacillus denitrificans*. *Anal. Biochem.* **42**, 207-213.
- AMINUDDIN, M. (1979A): The oxidation of elemental sulphur by *Thiobacillus denitrificans*. *Pertanika* **2**, 21-27.
- AMINUDDIN, M. (1979B): Substrate level *versus* oxidative phosphorylation in the generation of ATP in *Thiobacillus denitrificans* (diserahkan untuk penerbitan).
- AMINUDDIN, M. dan NICHOLAS, D. J. D. (1973): Sulphide oxidation linked to the reduction of nitrate and nitrite in *Thiobacillus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* **325**, 81-93.
- AMINUDDIN, M. dan NICHOLAS, D. J. D. (1974): An AMP-independent sulphite oxidase from *Thiobacillus denitrificans*: purification and properties. *J. Gen. Microbiol.* **82**, 103-113.
- ANDREWS, P. (1965): The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**, 595-606.
- BOWEN, T. J., HAPPOLD, F. C. dan TAYLOR, B. F. (1966): Studies on adenosine-5'-phosphosulphate reductase from *Thiobacillus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **118**, 566-576.
- CHARLES, A. M. dan SUZUKI, I. (1966): Purification and properties of sulphite: cytochrome c oxidoreductase from *Thiobacillus novellus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **128**, 522-534.

A.P.S. - REDUKTASE DALAM *THIOBACILLUS DENITRIFICANS*

- LONDON, J. dan RITTENBERG, S. C. (1964): Path of sulphur and thiosulphate oxidation by Thiobacilli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **52**, 1183-1190.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. C., FARR, A. L. dan RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- LYRIC, R. M. dan SUZUKI, I. (1970A): Enzymes involved in the metabolism of thiosulphate by *Thiobacillus thiooparus*. I. Survey of enzymes and properties of sulphite: cytochrome *c* oxidoreductase. *Can. J. Biochem.* **48**, 334-343.
- LYRIC, R. M. dan SUZUKI, I. (1970B): Enzymes involved in the metabolism of thiosulphate by *Thiobacillus thiooparus*. II. Properties of APS-reductase. *Can. J. Biochem.* **48**, 344-354.
- MORIARTY, D. J. W. dan NICHOLAS, D. J. D. (1970): Electron transfer during sulphide and sulphide oxidation by *Thiobacillus concretivorus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **216**, 130-138.
- PECK, H. D. (1960): Adenosine-5'-phosphosulphate as an intermediate in the oxidation of thiosulphate by *Thiobacillus thiooparus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **46**, 1053-1057.
- PECK, H. D. (1961): Evidence for the reversibility of the reaction catalysed by APS-reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **49**, 621-624.
- PECK, H. D. (1962): Symposium on metabolism of inorganic compounds. V. Comparative metabolism of inorganic sulphur compounds in microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **26**, 67-94.
- TATE, M. E. (1968): Separation of myoinositol pentaphosphates by moving paper electrophoresis (MPPE). *Anal. Biochem.* **23**, 141-149.

(Received 11 June 1972)