

УДК 631.811.1

ОКИСЛЕНИЕ АММОНИЙНОГО АЗОТА ДО НИТРАТОВ В ТКАНЯХ СТЕРИЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

Б. А. ЯГОДИН, Н. А. САВИДОВ, И. В. ВЕРНИЧЕНКО

(Лаборатория микроэлементов и кафедра агрономической
и биологической химии)

В условиях стерильной культуры растений картофеля, микрклонально размноженных из апикальных меристем, впервые выявлен процесс окисления меченого ^{15}N аммонийного азота до нитратов в высших растениях. Стерильность растений в течение вегетации тщательно контролировали. Используемые для выделения нитратов из растений и определения их изотопного состава методы позволяли контролировать чистоту проб нитратного азота. Полученные результаты, несмотря на незначительное накопление нитратов эндогенного происхождения в опытной культуре растений, убедительно свидетельствуют в пользу существования растительной нитрификации.

Одной из особенностей высших растений, позволяющих им существовать в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды, является способность изменять степень окисления азота в составе различных соединений. Глобальный процесс переработки в растениях окисленных соединений азота почвы — нитратов — в белок обеспечивает питанием всех представителей фауны [24]. Усвоению растениями восстановленных и окисленных форм азота посвящены работы Д. Н. Прянишникова [12], Д. А. Сабинина [13], А. Н. Баха [2]. Однако внимание ученых было сосредоточено главным образом на изучении процессов

восстановления азота, представляющих собой жизненно необходимую функцию растения. В настоящее время механизмы восстановления нитратов и роль в данных процессах молибденсодержащих белков — нитратредуктаз — в значительной степени выяснены [7, 8, 31, 37]. Вместе с тем одним из наиболее интересных вопросов в азотном метаболизме, да и во всей физиологии растений, является возможность существования обратного процесса, широко распространенного у низших организмов, — окисления аммония до нитратов [33, 40]. Решение этой проблемы имеет большое теоретическое и практическое значение.

В последние годы намного яснее представляется роль молибденосодержащих белков в круговороте азота в природе. Сравнительно небольшое количество нитрогеназы (несколько килограммов) в составе свободнживущих и симбиотических азотфиксирующих бактерий обеспечивает связанным азотом все живые организмы [1]; нитратредуктаза делает доступным для усвоения нитратный азот. Факультативные литотрофы *Nitrobacter*, которым принадлежит главная роль в формировании нитратного пула, осуществляют процесс окисления нитритов до нитратов посредством нитритоксидоредуктазы — фермента, также содержащего молибден [35, 46]. Сходство структуры и функций молибденосодержащих ферментов позволило предположить их единое происхождение [8]. В пользу этого предположения, в частности, свидетельствует недавно открытая обратимость нитритоксидоредуктазы *Nitrobacter* [21, 25, 35, 46, 49]. В то же время высшие растения в некоторых случаях способны проявлять нитритоксидоредуктазную активность [22, 23, 39, 45]. В литературе встречаются сообщения о диссимиляторной активности растительных нитратредуктаз [41]. Таким образом, подтверждение наличия нитрифицирующей активности высших растений является сильным аргументом в пользу изложенной выше точки зрения.

Изучение возможности окисления аммония до нитратов в высших растениях имеет не только теоретическое, но и немалое практическое значение. Аккумуляция избыточного количества нитратов в растениях, используемых в пищу, может привести к тяжелому отравлению человека и животных. Для того, чтобы разрабатывать адекватные методы борьбы с этим нежелательным явле-

нием, необходимо знать происхождение нитратного азота, накапливаемого в растительных тканях. Современный уровень знаний в данной области не позволяет считать почву единственным источником нитратов в растениях, поскольку еще не решен вопрос о нитрифицирующей способности последних. К сожалению, многие специалисты не принимают во внимание такую возможность, хотя в настоящее время агрохимиками накоплено достаточное количество данных, заставляющих сомневаться в том, что высшие растения не способны синтезировать эндогенные нитраты [3, 4, 9, 19]. В экспериментах со стерильными растениями пшеницы, которые обрабатывали раствором ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$, накопление меченного ^{15}N нитратного азота было значительным [20].

Способность растений образовывать нитраты, в частности способность картофельного сока окислять аммоний до нитратов, еще в начале века обсуждалась Мазе и Бахом [по 19]. Затем на протяжении нескольких десятилетий неоднократно предпринимались попытки установить нитрификацию у высших растений. В нашей стране этот вопрос изучался Ф. В. Турчиным, обратившим внимание на способность растений, растущих на болотной почве, накапливать нитраты. Ф. В. Турчин связывал это с их способностью самостоятельно образовывать нитраты, поскольку в болотных почвах последние практически отсутствуют. В вегетационных опытах с овсом и картофелем нитраты накапливались в растениях при полном их отсутствии в питательной среде [19].

Проблема окисления аммонийного азота в растениях постоянно привлекала внимание сотрудников кафедры агрономической и биологической химии Тимирязевской акаде-

мии [3, 4, 9, 20]. В экспериментах с использованием стабильного изотопа азота ^{15}N [3, 9, 20] и без него [4] подтвердилось предположение Ф. В. Турчина о нитрифицирующей способности высших растений. Интерес к этой проблеме был проявлен и за рубежом, однако в итоге были получены многочисленные противоречивые сведения, свидетельствующие как в пользу существования растительной нитрификации [34, 36, 44, 48], так и против нее [32].

Существенным недостатком большинства проведенных экспериментов является использование нестерильных культур для доказательства нитрифицирующей активности растений, что снижает ценность полученных результатов, ибо в этом случае затрудняется оценка нитрифицирующей способности собственно растений из-за наличия широко распространенных автотрофных и гетеротрофных нитрификаторов (бактерий и грибов), способных быстро окислять аммоний до нитратов в опытной культуре растений [13]. Неопределенность в данной области физиологии растений способствовала тому, что в настоящее время многие специалисты отказываются всерьез принимать во внимание все еще продолжающиеся попытки обосновать возможность специфической биологической активности растений, приводящей к накоплению эндогенных нитратов [38, 42].

Следует, однако, отметить, что скептическое отношение к этой проблеме в немалой степени обусловлено характерным для таких исследований несоответствием использованных средств уровню поставленных задач. Широкое распространение и активность нитрифицирующих автотрофных бактерий, а также способность многих гетеротрофных организмов синтезировать нитраты

определяют необходимость строгого соблюдения стерильности в течение всего вегетационного периода [29]. В данном случае уместно сослаться на Д. А. Сабинина [13], который считал, что при исследовании азотного питания растений решающее значение могут иметь только результаты стерильных опытов. Такой же точки зрения придерживался и Д. Н. Прянишников. Специфика исследований нитрифицирующей активности растений предполагает необходимость повышенных требований к проведению стерильных опытов. При этом недостаточно использовать растения, полученные из поверхностно стерилизованных семян, так как последние могут быть заражены микроорганизмами, сохранившимися под оболочкой семян и не выявленными с помощью обычных сред. В связи с отмеченным наиболее корректным представляется использование растений, полученных методом культуры ткани из апикальных меристем.

Строгое доказательство образования нитратов из более восстановленного предшественника невозможно без применения меченных ^{15}N соединений [29], прецизионных методов определения изотопного состава, способных регистрировать даже небольшое количество окисленного азота, и препаративного выделения продукта окисления, тщательно очищенного от примеси азота из других источников.

К сожалению, в настоящее время отсутствуют работы, в которых в полной мере учитывались бы все указанные обстоятельства. Это побудило нас провести исследования, в которых была сделана попытка доказать возможность окисления аммония до нитратов в растениях, полученных с помощью культуры ткани из стерильных апикальных меристем. Кроме того, ставилась за-

дача разработать методы, позволяющие точно определять источники нитратов в опытных растениях.

Методика

Объектом исследования служила микроклональная культура картофеля, полученная из стерильных апикальных меристем (станция защиты растений ТСХА и НИИ картофелеводства). Растения выращивали в стерильных условиях в пробирках с ватными пробками, в которые помещали 10 мл среды Мурашиге — Скуга, содержащей 2,38 мг $N-NH_4^+$, обогащенного ^{15}N (95,2 ат. %). Повторность 20-кратная. В состав среды входили нитраты природного обогащения. Период вегетации составлял 49 дней. В качестве контроля использовали пробирки без растений. В течение вегетации проверяли стерильность культуры с помощью 4 сред: МПА, КА, МС и Сориана — Уокера. Зараженные пробирки отбраковывали. Все работы проводили в ламинарах с вертикальным потоком воздуха.

При препаративном выделении нитратного азота пришлось столкнуться с трудностями, которые были связаны с сорбцией аммония на стенках приборов и химической посуды в том случае, когда они были изготовлены из термостойкого («молибденовое», «пайрекс») стекла. При значительных различиях в изотопном составе аммонийного азота пробы и сорбированного ранее на стенках посуды аммония возможно искажение результатов опытов с ^{15}N [5, 47]. Это учитывалось в настоящих исследованиях, поскольку в них, как указывалось ранее, использовали соли аммония с максимально возможным обогащением ^{15}N (95,2 ат. %). Нами испытывались пародистилляционные аппараты, изготовленные из стекла различ-

ного сорта («молибденовое», «пайрекс») и кварца. В результате были полностью подтверждены данные В. Б. Замятиной [5] и сделан вывод о непригодности молибденового и боросиликатного стекла для прецизионных исследований с ^{15}N . Поэтому холодильник, каплеуловитель и все остальные части использованных пародистилляционных аппаратов были изготовлены из кварца, как и другие приборы и посуда (в НИИ ядерной физики АН СССР и предприятиях НПО «Химлабор-прибор»). Кварцевые аппараты для паровой дистилляции были аналогичны приборам, описанным в работе [26]. Использовали также одноразовую стеклянную посуду и герметично закрывающиеся полиэтиленовые пробирки для хранения проб нитратного азота, полученных после паровой дистилляции.

Традиционный пародистилляционный метод определения фракционного состава неорганического азота в растениях [26—28] непригоден для исследований с ^{15}N в связи с загрязнением выделяемых нитратов органическим азотом [27], поэтому нами использовался пародистилляционный метод в сочетании с предварительной очисткой растительного экстракта от органического и аммонийного азота [14—18].

По окончании вегетации меченные ^{15}N растительные пробы анализировали следующим образом: из пробы растительного материала, содержащей примерно 100—300 мкг нитратного азота, выделяли белок [10], в дальнейшем применяли фильтрат, содержащий все растворимые небелковые формы азота. Фильтрат после введения MgO на специальной установке интенсивно обрабатывали горячим паром для удаления аммонийного азота. После продувки образца паром в него

в 3-кратной повторности вводили 0,2 г сульфата аммония природного обогащения ^{15}N для проведения изотопного обмена с азотом образца и продолжали обработку на пародистилляционной установке. Затем суспензию центрифугировали со скоростью 10 000 об/мин (5600g). Надосадочную жидкость упаривали до 5 мл и пропускали через колонки с ионообменными смолами (аналогичные описанным выше) для выделения форм органического восстановленного азота и аммония. Для дальнейшего анализа отбирали фракцию элюата 10 мл (после появления осадка в пробе с BaCl_2 , предыдущие фракции отбрасывали) и подкисляли до pH 2—2,5 с помощью 0,1 н. раствора H_2SO_4 (объем 3 мл), упаривали до 1—2 мл, смешивали с сахарозой до получения насыщенного раствора и наносили на поверхность полиакриламидного геля или в случае барьерного микроионофореза на мембрану из ацетата целлюлозы, которую прикрепляли к колонке с гелем с помощью полихлорвиниловой трубки, сверху наслаивали катодный буферный раствор.

Для осуществления микроионофореза в качестве неподвижной фазы использовали мелкопористый кислый полиакриламидный гель [11]. Нижнюю часть трубки с гелем опускали в стакан с анодным электролитом. Микроионофорез проводили при плотности тока 20—30 мА на 1 см^2 в течение 30 мин. Затем анодный электролит, содержащий нитраты, переносили в колбу кварцевого аппарата для паровой дистилляции и анализировали по Бремнеру [28]. Восстановленный до аммиака азот отгоняли с паром (скорость 7,5 мл конденсата в минуту) до объема конденсата в стакане с H_3VO_3 30 мл. Полученные таким образом пробы высушивали в специальной герметичной камере в

потоке горячего воздуха, предварительно очищенного от следов аммиака и паров воды с помощью склянок Дрекслея с концентрированной H_2SO_4 . После высушивания пробы, содержавшие аммонийный азот (5—100 мкг N), переносили в кварцевые реакционные сосуды Риттенберга для определения изотопного состава [6].

Для оценки чистоты нитратов, выделенных из растений, впервые применялся метод, основанный на принципе изотопного разбавления. Подобные методы обычно используются при необходимости особо точного определения небольших количеств соединений, способных вступать в реакции изотопного обмена [30, 43].

Аммоний природного обогащения в форме $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ вместе с окисью магния вводят в растительный экстракт перед пародистилляционным выделением нитратного азота (10 мкг N— NH_4). При этом аммонийный азот вступает в реакцию изотопного обмена с азотом всех возможных загрязняющих примесей (амидный азот аминокислот, аммонийный азот опытной пробы, не полностью выделенный из нее на предыдущих стадиях, аммонийный азот предыдущих образцов, адсорбированный ранее на поверхности пародистилляционного аппарата, и т. д.), затем выделяется в процессе паровой дистилляции и связывается в приемном стакане. Сравнивая обогащение ^{15}N контрольного образца аммонийного азота и выделяемых сразу после этого нитратов, получают надежный критерий чистоты последних (табл. 1).

Метод расчета количества тяжелого изотопа азота ^{15}N иного происхождения, чем нитратный в опытной пробе, основан на предположении, что фон всех загрязняющих аммонийных примесей практически не меняется на протяжении паровой

Использование контрольной пробы аммония известного обогащения ^{15}N для определения изотопного состава нитратного азота

Номер образца	Контрольная проба аммония природного обогащения ^{15}N (0,36 ат. %), введенная в растительный экстракт			Нитраты тестовой растительной пробы, выделенные после контрольной пробы аммония			
	обогащение ^{15}N после выделения (а), ат. %	содержание азота в образце (б), мкг	содержание примесного ^{15}N в образце (с), мкг	обогащение ^{15}N после выделения (д), ат. %	содержание азота в образце (е), мкг	избыток ^{15}N за счет примеси (г), ат. %	истинное обогащение нитратов (и), ат. %
1	0,37	1500	0,15	0,37	1540	0,01	0,36
2	0,37	1495	0,15	0,37	1490	0,01	0,36
3	0,42	150	0,09	0,42	145	0,06	0,36
Среднее	—	—	—	—	—	—	0,36

дистилляции одного опытного образца [14—18], поэтому, определяя количество примесного ^{15}N , попадающего при паровой дистилляции (3,3 мин) в контрольный образец аммонийного азота (это сделать несложно, зная исходное обогащение контрольной пробы тяжелым изотопом азота и общее количество азота в пробе), устанавливают количество примеси в опытной пробе нитратного азота. Содержание ^{15}N в выделяемом нитратном азоте, обусловленное наличием примеси амидного и аммонийного азота в пробе (г), определяют по формуле

$$g = (c/f) 100 \text{ (ат. \%)}, \quad (1)$$

$$\text{где } c = (a - 0,36) b / 100 \text{ (мкг)}. \quad (2)$$

Если количество аммонийного азота в контрольной и опытной пробах примерно одинаковое, то формула примет вид

$$g = a - 0,36 \text{ (ат. \%)}. \quad (3)$$

При более строгом расчете истинного обогащения нитратного азота должно учитываться количество не только примесного тяжелого изотопа азота аммонийного фона в пробе, но и общего азота загрязнений, так как в противном случае результаты

определения будут заниженными. Для этого недостаточно руководствоваться данными изотопного анализа контрольной пробы — необходимо располагать сведениями об обогащении ^{15}N аммонийного фона (i), при этом избыток ^{15}N нитратного азота растительной пробы ($h' = h - 0,36$ ат. %) рассчитывается следующим образом:

$$h' = (k - c) 100 / (f - l) \text{ (ат. \%)}, \quad (4)$$

где k — общее количество тяжелого изотопа азота нитратов растений и примеси азота, не связанного с нитратами, в пробе после паровой дистилляции.

$$k = d'f / 100 \text{ (мкг)}, \quad (5)$$

где l — общее количество азота примеси в пробе.

$$l = c \cdot 100 / i \text{ (мкг)}. \quad (6)$$

Потребность в таком расчете возникает в том случае, когда общее количество азота примеси в опытной пробе превышает 2—5 %. При малых значениях l уравнение (6) будет иметь вид

$$h' = d' - g \text{ (ат. \%)},$$

где d' — избыток ^{15}N в пробе после

паровой дистилляции, а g рассчитывается согласно уравнению (3).

В данных исследованиях загрязнения контрольной пробы аммония тяжелым изотопом азота при предварительном выделении органического и аммонийного азота из растительных экстрактов практически не обнаружено (табл. 2).

Таблица 2
Избыток ^{15}N в составе нитратного азота, выделенного из стерильных растений картофеля (ат.%)

Повторность	Образец	
	контрольный	опытный
<i>Листья</i>		
1	—	0,044
2	—	0,040
3	—	0,034
$t_{05}S\bar{x}$		0,012
<i>Микроклубни</i>		
1	—	0,210
2	0,002	0,164
3	0,002	0,244
$t_{05}S\bar{x}$		0,093
<i>Корни</i>		
1	—	0,034

Примечание. Избыток ^{15}N в составе контрольных образцов аммония для листьев, корней и микроклубней (1-я повторность) не обнаружен.

Изотопный состав контрольных и опытных образцов определяли на масс-спектрометре «МИ-1201В». Применяли качественные реакции с реактивом Несслера, раствором BaCl_2 , AgNO_3 и нингидрина. Содержание нитратов в образцах устанавливали по Бремнеру [28]. В экспериментах использовали воду, которая проходила 3-ступенчатую предварительную обработку: дистилляция; обработка на ионообменных колонках (3,7 м); подкисление серной кислотой и повторная дистилляция через кварцевый холодильник. Чистоту воды контролировали кондуктометрически и колориметрически с реактивом Несслера

на спектрофотометре СФ-26. Определяли содержание примеси нитратов в использовавшихся реактивах.

Окисление аммония до нитратов в стерильной культуре картофеля

В растительных пробах в конце вегетации выявлено значительное превышение количества ^{15}N в составе нитратного азота над природным содержанием ^{15}N , что свидетельствует о наличии процесса окисления меченного ^{15}N аммония в пробах с растениями (табл. 2). Достоверного изменения содержания ^{15}N в составе нитратной фракции питательной среды в контрольных пробах не отмечено (избыток ^{15}N в нитратной фракции составлял 0,004 ат. % в начале и 0,005 ат. % в конце вегетации). Это свидетельствует о том, что в данном случае окисление аммония обусловлено биологической активностью растений.

Органы растения отличались разной способностью нитрифицировать аммоний. Наиболее активными в этом отношении были микроклубни. Особый интерес вызывает обнаруженная в экспериментах высокая скорость окисления восстановленного азота в тканях прорастающих микроклубней картофеля. Избыток ^{15}N в нитратной фракции растений в течение 6 нед прорастания возростал в 10 раз (с 0,025 до 0,240 ат. %). Активизация процессов образования эндогенных нитратов при прорастании отмечалась ранее [5, 44, 48]. Можно предположить, что данный процесс играет конкретную физиологическую роль в азотном обмене прорастающих растений, например способствует детоксикации избыточного количества аммония, выделяющегося в процессе прорастания при мобилизации запасного азота ами-

дов аминокислот. Некоторые исследователи считают, что этот процесс имеет определенное значение для углеводного обмена растений [48].

Необходимо отметить невысокие темпы окисления аммония до нитратов. Так, за 49 дней вегетации окислилось в среднем лишь около 0,02 % общего количества аммония, внесенного в субстрат. Очевидно, что невысокая скорость образования нитратов в тканях растений или его крайняя лабильность, зависящая от многих (пока неизвестных) факторов, препятствовали обнаружению и детальному изучению этого процесса.

В данном случае, однако, нельзя не учитывать специфики стерильной культуры (замедленный обмен веществ, малый прирост сухой массы и т. д.). Возможно и влияние нитратов, которые входили в состав среды Мурашиге — Скуга и использовались как ловушка меченого продукта окисления. Все же представляется более вероятным, что подобные процессы и в естественных условиях протекают с невысокой скоростью.

Заключение

Впервые для доказательства возможности окисления аммония до нитратов в растительных тканях использована стерильная культура растений картофеля, полученная из размноженных микроклональным способом апикальных меристем. В экспериментах применяли меченый ^{15}N сульфат аммония (95,2 ат. %) в составе питательной среды и изотопную методику определения количества аммонийного азота, окисленного в растениях. Авторами предложены оригинальные методы выделения нитратов из растений и определения их изотопного состава, позволяющие гарантировать чистоту выделяемого нитрат-

ного азота, что обусловило точное определение изотопного состава нитратов растений.

Полученные результаты убедительно свидетельствуют в пользу существования растительной нитрификации. Обнаруженный в конце вегетации картофеля (49 дней) избыток ^{15}N в составе нитратов растений колебался от 0,34 ат. % для листьев и корней до 0,244 ат. % для микроклубней, что предполагает незначительную скорость образования эндогенных нитратов в растениях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Андерсон Дж. М.* Экология и науки об окружающей среде: биосфера, экосистемы, человек.— Л.: Гидрометеоиздат, 1985.— 2. *Бах А. Н.* Собр. тр. по химии и биохимии.— М.: Изд-во АН СССР, 1950.— 3. *Верниченко И. В.* Поступление и скорость усвоения аммонийного и нитратного азота цветной капустой при корневом и некорневом внесении.— Вопросы агрохимии азота. М.: ТСХА, 1982, с. 73—79.— 4. *Гукова М. М.* Нитраты в азотном обмене растений.— Изв. ТСХА, 1971, вып. 6, с. 72—80.— 5. *Замятина В. Б.* Методика анализа почв и растений в агрохимических исследованиях с ^{15}N .— В сб.: Методы применения изотопа азота ^{15}N в агрохимии. М.: Колос, 1977, с. 10—54.— 6. *Зерцалов В. В.* Методы определения изотопного состава азота, применяемая аппаратура и ее особенности.— В сб.: Методы применения изотопа азота ^{15}N в агрохимии. М.: Колос, 1977, с. 55—88.— 7. *Кретович В. Л.* Усвоение и метаболизм азота у растений.— М.: Наука, 1987.— 8. *Львов Н. П.* Молибден в ассимиляции азота у растений и микроорганизмов.— М.: Наука, 1989.— 9. *Муравин Э. А., Кожемячко В. А.* Усвоение яровой пшеницей меченого ^{15}N азота мочевины и аммиачной селитры при поздних некорневых подкормках.— Изв. ТСХА, 1973, вып. 6, с. 67—76.— 10. *Петербургский А. В.* Практикум по агрономической химии.— М.: Колос, 1968.— 11. *Плешков Б. П.* Практикум по биохимии растений.— М.: Ко-

лож, 1985.— 12. *Прянишников Д. Н.* Азот в жизни растений и в земледелии СССР.— М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1945.— 13. *Сабинин Д. А.* Физиологические основы минерального питания растений.— М.: Изд-во АН СССР, 1955.— 14. *Савидов Н. А., Ягодин Б. А., Верниченко И. В.* Изобретение: Способ определения количества азота, окисленного в растениях. (Решение о выдаче АС от 6/VI—89 г. по заявке № 4 670 918).— 15. *Савидов Н. А., Ягодин Б. А., Верниченко И. В.* То же (Решение о выдаче АС от 6/VI—89 г. по заявке № 4 672 019).— 16. *Савидов Н. А., Ягодин Б. А., Верниченко И. В.*, То же (Решение о выдаче АС от 14/VI—89 г. по заявке № 4 670 916).— 17. *Савидов Н. А., Ягодин Б. А., Верниченко И. В.* То же (Решение о выдаче АС от 15/VI—89 г. по заявке № 4 670 917).— 18. *Савидов Н. А., Ягодин Б. А., Верниченко И. В.* То же (Решение о выдаче АС от 15/VI—89 г. по заявке № 4 671 199).— 19. *Турчин Ф. В.* Образование нитратов и нитритов в растениях.— Научно-агрономический журн., 1930, № 4, с. 297—309.— 20. *Ягодин Б. А., Верниченко И. В.* Возможность окисления аммонийного азота в тканях растений до нитратов (опыты с ^{15}N).— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1984, № 2, с. 266—272.— 21. *Ahlers B., Konig W., Bock E.*— FEMS Microbiol., 1990, vol. 67, p. 121—126.— 22. *Aslam M., Rosichan J. L., Huffaker R. C.*— Plant Physiol., 1987, vol. 83, p. 579—584.— 23. *Aslam M., Huffaker R. C.*— Ibid., 1989, vol. 91, p. 1152—1156.— 24. *Beevers L., Hageman R. H.*— Encyclopedia of Plant Physiol.— N. Y.: Academic Press, 1983, vol. 15a, p. 351—375.— 25. *Bock E., Koops H. P., Moller U. C., Rudert M.*— Arch. Microbiol., 1990, vol. 153, p. 105—110.— 26. *Bremner J. M., Edwards A. P.*— Soil Sci., Soc. Proc., 1965, vol. 29, p. 504—507.— 27. *Bremner J. M., Keeney D. R.*— Analytica Chimica Acta, 1965, vol. 32, p. 485—497.— 28. *Bremner J. M., Keeney D. R.*— Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 1966, vol. 30, p. 577—594.— 29. *Brete-*

ler H., Luczak W.— Planta. 1982, vol. 156, p. 226—232.— 30. *Buresh R. L., Austin E. R., Craswell E. T.*— Fert. Res. 1982, vol. 3, p. 37—62.— 31. *Campbell W.*— Nitrogen fixation and CO_2 metabolism / Ed. P. W. Ludden, J. E. Burris. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Co. Inc., 1985, p. 143—151.— 32. *Delwiche C. C.*— J. Biol. Chem., 1951, vol. 189, p. 167—175.— 33. *Focht D. D., Verstraete W.*— Advances in microbiol. ecology. / NY: Plenum Press, 1977, p. 135—214.— 34. *Frenyo V.*— Ann. Univ. Sci. Budapest. Sect. Biol., 1966, vol. 8, p. 77—85.— 35. *Fukuoka M., Fukumori Y., Yamataka T.*— J. Biochem., 1987, vol. 102, p. 525—530.— 36. *Funkhouser E. A., Garay A. S.*— Plant a. Cell Physiol., 1981, vol. 22, p. 1279—1286.— 37. *Guerreiro M. G., Vega J. M., Losada M.*— Ann. Rev. of Plant Physiol., 1981, vol. 32, p. 169—204.— 38. *Hewitt E. L.*— Plant Mineral Nutrition. L.: The English Univ. Press, 1974, p. 219—222.— 39. *Kaplan D., Roth-Bejerano N., Lips H.*— European J. Biochem., 1974, vol. 49, p. 393—398.— 40. *Killham K.*— Special Public. of Soc. for Gen. Microbiol. / Ed. J. I. Prosser, 1986, vol. 20, p. 117—126.— 41. *Mulvaney C. S., Hageman R. H.*— Plant Physiol., 1984, vol. 76, p. 118—124.— 42. *Marschner H.*— Mineral nutrition of hegher plants. L: Academic Press, 1986.— 43. *Neubauer J., Heumann K. G.*— Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemia, 1988, Bd. 331, S. 170—173.— 44. *Routchenko W., Delmas J.*— C. R. Acad. Sci (Paris), 1963, vol. 256, p. 2910—2913.— 45. *Sahulka J., Liza L.*— Biol. plant., 1978, vol. 20, p. 359—367.— 46. *Sundermeyer-Klinger H., Meyer W., Warninghoff B., Bock E.*— Arch. Microbiol., 1984, vol. 140, p. 153—158.— 47. *Vanden Heuvel R. M., Giamalva J. A.*— Soil Sci. Soc. Amer. J., 1988, vol. 52, p. 424—428.— 48. *Watt M. P., Cresswell C. F.*— Plant Cell Env., 1987, vol. 10, p. 327—332.— 49. *Yamanaka T., Fukumori Y.*— FEMS Microbiol. Review, 1988, vol. 54, p. 259—270.

Статья поступила 28 февраля 1991 г.

SUMMARY

In sterile culture of potato plants reproduced by microclones from apical meristems the process of oxidation of labelled ^{15}N ammonium nitrogen into nitrates by higher plants has been first revealed. Plant sterility during vegetation was carefully controlled. The methods used for extracting nitrates from plants and determining their isotope composition allowed to check purity of nitrate nitrogen samples. In spite of slight accumulation of nitrates of endogenic origin in experimental plant culture, the results obtained are a convincing evidence in favour of the fact that plant nitrification really exists.