

УДК 581 (132 + 174) + 541.144.7

© 1990 г.

С. ФУРНАДЖИЕВА, Н.А. ПРОНИНА*, Р. АНДРЕЕВА,
Г. ПЕТКОВ, В.Е. СЕМЕНЕНКО*

УЧАСТИЕ КАРБОАНГИДРАЗЫ В АССИМИЛЯЦИИ БИКАРБОНАТНОГО ИОНА КЛЕТКАМИ ХЛОРЕЛЛЫ И СЦЕНЕДЕСМУСА

Институт физиологии растений им. М. Попова Болгарской
Академии наук, София;

*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Академии наук СССР, Москва

Изучали организацию карбоангидразной системы в клетках *Chlorella* и *Scenedesmus* при выращивании водорослей в различных условиях углеродного питания. У хлореллы при снабжении клеток неорганическим углеродом в форме CO_2 карбоангидраза представлена мембраносвязанной формой (мсКА), которая локализована в плазмалемме (80%) и в хлоропластных мембранах (20%). При выращивании хлореллы на бикарбонатной среде снижается активность фермента в плазматической мембране, а также синтезируется *de novo* растворимая форма карбоангидразы (рКА) на 80 S рибосомах. В клетках сценедесмуса, выращенных в атмосфере насыщающих концентраций CO_2 , обнаруживается рКА, локализованная в цитоплазме, а при утилизации HCO_3^- синтезируется мсКА в хлоропласте. Специфический ингибитор КА ацетазоламид, не проникающий в клетку и подавляющий активность фермента в периферических мембранах, не снижал фотосинтетическую продуктивность культур хлореллы и сценедесмуса при выращивании их на бикарбонатной среде. Делается заключение, что КА, локализованная в наружных мембранах клеток, не принимает участия в использовании бикарбонатного иона. Обсуждаются механизмы утилизации водорослями HCO_3^- , а также участие КА в транспорте и концентрировании углекислоты в хлоропласте.

Фотосинтетическая ассимиляция бикарбоната – хлорелла – сценедесмус – карбоангидраза – локализация.

Для многих фототрофных клеток микроводорослей и цианобактерий экзогенным источником углекислоты наряду с CO_2 может служить ион бикарбоната [1–3]. Интерес к исследованию природы субстрата для углеродного питания водорослей в настоящее время возрос в связи с изучением механизма концентрирования C_H в клетках, выращенных при низком содержании CO_2 в среде. Предполагается, что концентрирование C_H в этих условиях может быть обусловлено дополнительным транспортом HCO_3^- в клетку [3, 4]. Рассматриваются два возможных механизма утилизации клетками микроводорослей экзогенного бикарбоната. Первый механизм связан с прямым транспортом HCO_3^- через клеточные мембраны. Второй – утилизация HCO_3^- микроводорослями путем дегидратации этого иона в околоклеточном пространстве с образованием CO_2 и последующим транспортом его в клетку. Этот процесс катализируется КА, локализованной в наружных мембранах или в периплазматическом пространстве клетки.

В качестве модельных объектов для исследования способов утилизации HCO_3^- , рассмотренных выше и различающихся формой транспортирования C_H в клетку, могут

Сокращения: КА – карбоангидраза (КФ 4.2.1.1.), мсКА – мембраносвязанная карбоангидраза, плКА – карбоангидраза плазмалеммы, рКА – растворимая карбоангидраза, C_H – неорганические соединения углерода, ХАФ – хлорамфеникол, хпКА – карбоангидраза хлоропластных мембран, ЦГИ – циклогексимид.

служить хлорелла и сценедесмус. Клетки сценедесмуса усваивают HCO_3^- из среды по первому механизму, транспортируя его через клеточную стенку в виде иона, по-видимому, с участием переносчика [2, 5]. Клетки хлореллы, растущие на бикарбонатных средах [2, 3, 6] и обладающие высокой активностью КА, локализованной в плазмалемме [6, 7], могут утилизировать бикарбонат путем его дегидратации в околоклеточном пространстве. В этом случае транспортируемой формой C_H в клетку хлореллы является CO_2 .

Задачей настоящей работы являлось исследование системы транспорта HCO_3^- у хлореллы и сценедесмуса с целью выяснения механизма концентрирования C_H в клетках микроводорослей. В связи с этим изучали организацию карбоангидразной системы хлореллы и сценедесмуса при адаптации клеток к бикарбонатному типу углекислотного обеспечения, а также влияния ингибиторов синтеза белка на адаптивные изменения активности различных форм фермента.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использовали одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* Beijer. штамм С-3, *Scenedesmus acutus* Meyen штамм Tomaselli-8 из коллекции штаммов ИФР Болгарской АН.

Водоросли выращивали в условиях периодической смены света и темноты [8]. Длительность светового периода составляла 8 ч (интенсивность света $30 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$), темнового — 16 ч. Во время светового периода температуру поддерживали на уровне 30° , во время темнового периода — $22-24^\circ$. Состав среды для культивирования приведен в [6]. Обеспечение углекислотой в негидратированной форме осуществляли путем продувания культур 2% CO_2 в газовой смеси при поддержании рН около 6,5–7,0. Во время темнового периода культуры барботировали воздухом. Выращивание клеток на бикарбонатных средах проводили посредством добавления в среду $5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ NaHCO_3 при барботировании суспензии водорослей воздухом. Значение рН $\sim 9,0$ корректировали продуванием культур в течение 10–15 с углекислотой в темноте. Плотность культур составляла $1-2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$.

Разрушение клеток, выделение растворимой фракции белков и нерастворимых клеточных компонентов из гомогената, измерение активности КА в бесклеточном гомогенате и в отдельных его фракциях, а также в интактных неразрушенных клетках проводили по методике [9].

Содержание белка определяли по Лоури в пробах, предварительно обработанных кипящим метанолом для извлечения хлорофилла. Содержание хлорофилла определяли в экстрактах клеточных мембран в метаноле спектрофотометрически и рассчитывали по формуле [10].

Разделение клеточных мембран в градиенте плотности сахарозы проводили, как описано в [7]. Идентификацию полученных фракций клеточных мембран провели с помощью микроскопического контроля, по содержанию хлорофилла и жирно-кислотному составу липидов [11, 12].

Ингибиторы белкового синтеза ХАФ — $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, ЦГИ — $5 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$, а также специфический ингибитор КА ацетазоламид (1 мМ) добавляли в момент внесения в среду бикарбоната натрия. Использовали ингибиторы фирмы "Serwa" (ФРГ).

Эксперименты проведены в 3–5-кратных биологических повторностях. Представлены данные характерных опытов, а также среднестатистические данные биологических повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из рис. 1 и показано ранее [6], при переносе хлореллы, выращенной при насыщающих концентрациях CO_2 , на бикарбонатную среду в клетках синтезируется рКА и снижается активность фермента, измеренная в интактных неразрушенных клетках. Активность мсКА в суммарной фракции клеточных мембран не изменяется (рис. 1).

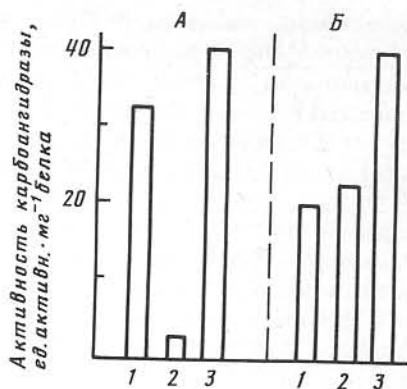


Рис. 1. Активность карбоангидразы хлореллы при выращивании клеток на различных источниках углеродного обеспечения

A — клетки, выращенные при 2% CO₂, B — то же при выращивании на среде HCO₃⁻ 1 — активность КА интактных клеток, 2 — активность рКА, 3 — активность мсКА

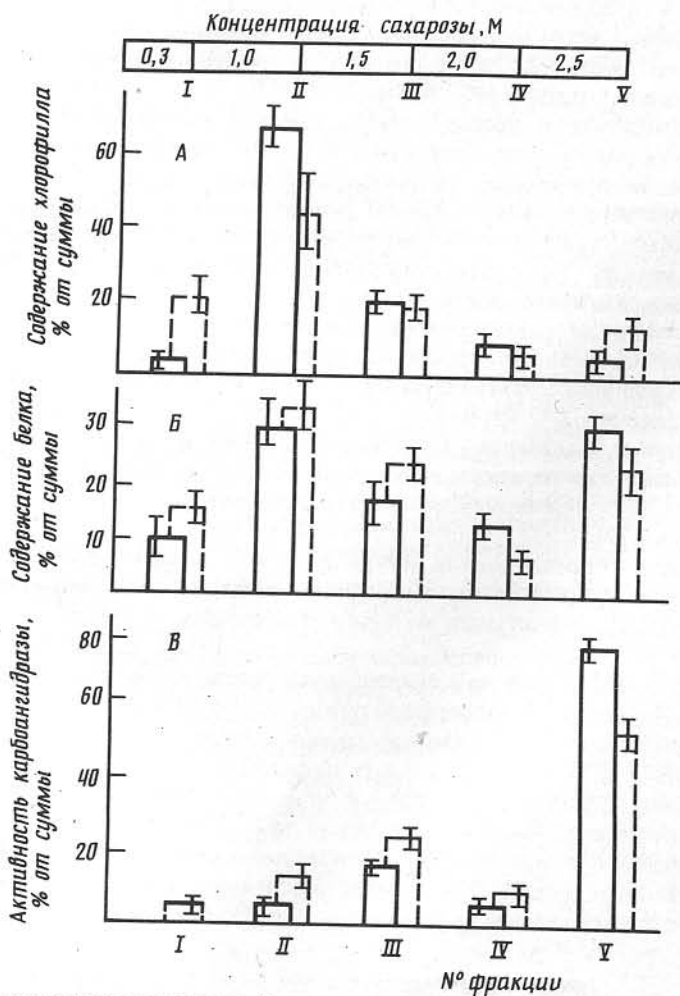


Рис. 2. Распределение хлорофилла, белка, активности КА (в % от суммы) при фракционировании в градиенте плотности сахарозы гомогената клеток хлореллы, выращенных на CO₂ (сплошная линия) и HCO₃⁻ (штриховая линия)

Представлены средние значения 5 биологических повторностей

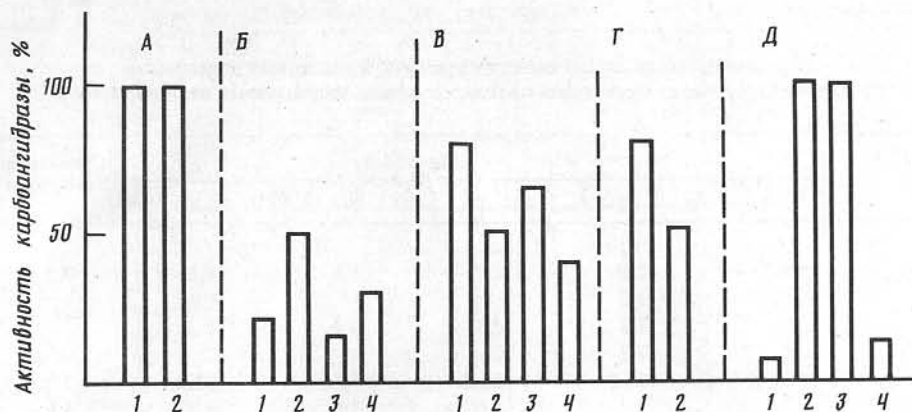


Рис. 3. Активность карбоангидразы клеток хлореллы, выращенных при 2% CO₂ (1) и при адаптации к HCO₃⁻ (2) и влияние хлорамфеникола (3) и циклогексимида (4) на изменение активности фермента

А – тотальная активность мсКА, Б – активность мсКА хлоропласта, В – активность мсКА плазмалеммы, Г – активность КА целых, неразрушенных клеток, Д – активность рКА. За 100% принята активность суммарной фракции мсКА. Время адаптации 6 ч

Более детальное изучение локализации мсКА в субклеточных фракциях хлореллы, выделенных в градиенте плотности, показало, что активность мсКА при выращивании клеток на бикарбонате увеличивается в тилакоидных мембранах, а во фракции клеточных стенок снижается. Как видно из рис. 2, в основных хлорофиллсодержащих фракциях II и III активность мсКА увеличивается при выращивании хлореллы на бикарбонате по сравнению с клетками, выращенными на CO₂, а во фракции V снижается. С помощью микроскопического контроля и цитохимического анализа фракций ранее [12] нами показано, что фракции II и III представлены мембранами хлоропластов, а фракция V содержит в основном клеточные стенки с элементами цитоплазматической мембраны. Для идентификации полученных из клеток хлореллы фракций исследовали также жирно-кислотный состав липидов [11]. Как видно из табл. 1, фракции II и III отличаются высоким содержанием жирных кислот 18 : 3, характерных для липидов тилакоидных мембран.

Таким образом, как видно из рис. 2, при снабжении клеток хлореллы CO₂, фракции хлоропластных частиц содержат более 20% активности КА (хпКА), тогда как "клеточные стенки" (шКА) – около 80% от суммарной активности мсКА. Адаптация клеток к HCO₃⁻ приводит к увеличению активности хпКА и снижению активности плКА, так что эти значения становятся сопоставимыми.

Внесение ингибиторов синтеза белка (рис. 3) в культуру клеток хлореллы в момент перевода их на бикарбонатсодержащую среду показало, что увеличение активности хпКА на бикарбонате полностью подавляется ХАФ и не затрагивается ЦГИ. Эти данные свидетельствуют, что хпКА синтезируется в хлоропласте на 70S рибосомах. Активность плКА при адаптации к HCO₃⁻ снижается (рис. 3, В), вследствие чего это изменение не может быть исследовано с применением ингибиторов синтеза белка. Снижение активности плКА в условиях выращивания клеток хлореллы на бикарбонате хорошо коррелирует с установленным ранее [6] снижением активности КА в целых неразрушенных клетках (рис. 3, Г). Эти данные, как видно из сравнения рис. 3, В и 3, Г, могут с большой степенью достоверности свидетельствовать о локализации плКА клеток хлореллы на внешней стороне цитоплазматической мембраны.

Как было показано на рис. 1, адаптация к HCO₃⁻ приводит к увеличению активности рКА в клетках хлореллы. Данные, представленные на рис. 3, Д, показывают, что синтез рКА полностью подавляется ЦГИ и что эта форма КА синтезируется в цитоплазме клеток хлореллы.

Таблица 1

Жирно-кислотный состав липидов фракций, выделенных в градиенте плотности сахарозы из гомогената клеток хлореллы, выращенных на бикарбонате

Жирные кислоты	Фракция					Суммарный гомогенат
	I	II	III	IV	V	
14 : 0	4,7	2,0	1,1	1,2	1,8	0,5
x ¹	Сл.	1,3	Сл.	—	Сл.	—
x ²	”	1,3	2,5	0,4	”	—
x ³	”	2,1	Сл.	—	”	—
16 : 0	25,8	17,8	23,2	26,5	23,9	21,5
16 : 1	1,6	2,2	2,6	2,0	4,0	4,6
16 : 1	—	1,1	—	—	—	—
16 : 2	6,4	9,3	6,3	6,9	7,0	8,1
18 : 0	3,5	Сл.	Сл.	4,1	4,0	0,8
18 : 1	20,8	12,7	16,8	21,2	23,3	18,4
18 : 2	20,3	25,1	25,2	21,9	20,1	21,0
18 : 3	16,8	24,9	22,0	15,7	15,8	24,2

Примечание. x¹, x², x³ — неидентифицированные жирные кислоты.

Таблица 2

Жирно-кислотный состав липидов фракций, выделенных в градиенте плотности сахарозы из гомогената клеток сценедесмуса, выращенных на бикарбонате

Жирные кислоты	Фракция					Суммарный гомогенат
	I	II	III	IV	V	
14 : 0	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2
16 : 0	28,6	21,3	22,8	24,3	26,6	16,0
16 : 1	5,8	5,5	6,8	5,8	7,0	6,6
16 : 2	0,6	0,4	1,2	0,3	0,6	1,7
18 : 0	2,5	0,2	0,7	1,2	1,3	0,7
18 : 1 + 16 : 3	20,1	16,8	17,4	21,5	23,2	13,6
16 : 4	8,5	13,0	10,6	9,9	9,4	15,6
18 : 2	12,5	14,7	14,1	13,4	12,2	13,4
γ 18 : 3	Сл.	0,3	0,2	Сл.	Сл.	0,6
α 18 : 3	18,6	26,8	24,7	21,6	18,5	27,9
18 : 4	1,0	0,7	1,3	1,2	Сл.	2,0

Таблица 3

Влияние ацетазоламида на накопление биомассы клетками хлореллы и сценедесмуса при ассимиляции бикарбоната

Условия выращивания	Прирост биомассы мг/мл			
	хлорелла		сценедесмус	
	1	2	1	2
Контроль (HCO ₃ ⁻)	3,75	2,20	1,58	2,57
Опыт (HCO ₃ ⁻ + ацетазоламид)	3,95	2,68	2,42	2,90

Примечание. Представлены данные двух опытов (1,2).

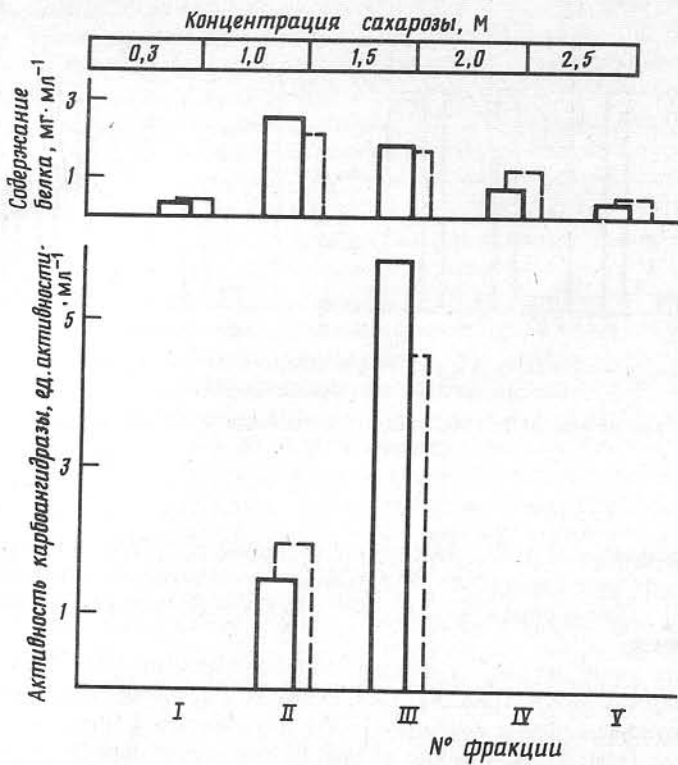


Рис. 4. Распределение белка и активности КА при фракционировании в градиенте плотности сахаразы гомогената клеток сценедесмуса, выращенных на CO_2 (сплошная линия) и HCO_3^- (штриховая линия)

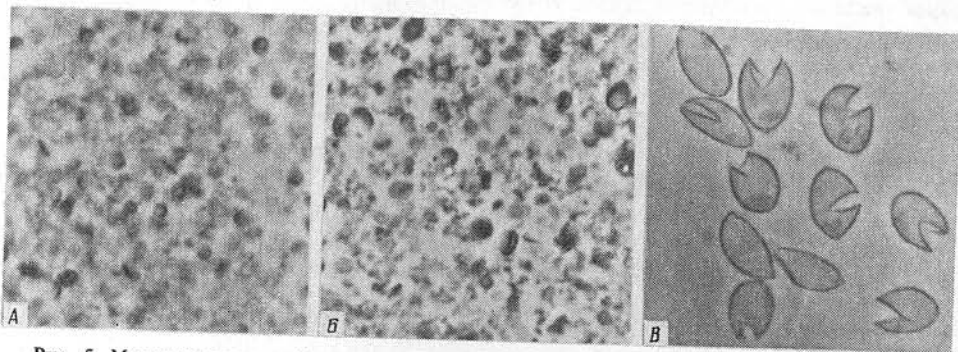


Рис. 5. Микроскопический контроль фракций, выделенных в градиенте плотности сахаразы из клеток сценедесмуса

А – фракция II, Б – фракция III, В – фракция V (см. рис. 4).

Адаптивные перестройки активности КА и ее локализация при выращивании на бикарбонате были исследованы также на другом виде водорослей – сценедесмус, организация карбоангидразной системы которого отличается от хлореллы. Ранее установлено, что в клетках сценедесмуса в отличие от хлореллы при выращивании на 2% CO_2 вся КА находится во фракции растворимых белков [9]. При адаптации к низкой концентрации CO_2 [9] и HCO_3^- [6] в клетках этих видов водорослей синтезируется мсКА. Исследования распределения активности мсКА в отдельных фракциях клеточных мембран, выделенных в градиенте плотности сахаразы (рис. 4), показали, что мсКА ло-

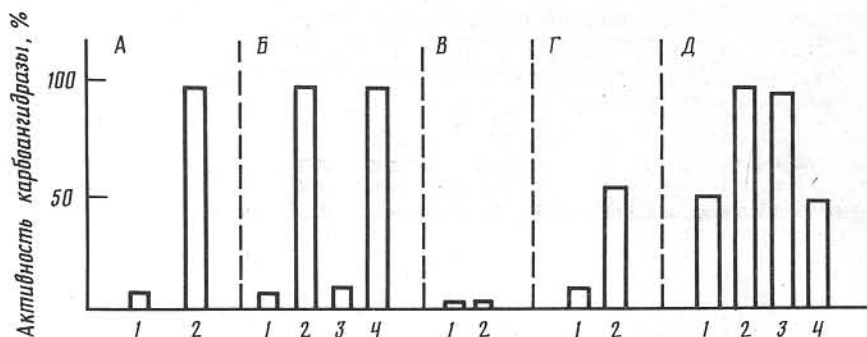


Рис. 6. Влияние циклогексимида и хлорамфеникола на изменение активности КА клеток сценедесмуса при адаптации к HCO_3^-

Обозначение, как на рис. 3. За 100% принята активность мсКА при выращивании клеток на HCO_3^-

кализована во фракциях II и III. Последние содержат хлорофилл и жирные кислоты 16 : 4 и 18 : 3, которые характерны для липидов фотосинтетического аппарата сценедесмуса (табл. 2). Таким образом, адаптивная мсКА сценедесмуса полностью локализована в хлоропласте.

Фракция V, как видно из рис. 5, представлена клеточными стенками и в отличие от хлореллы не содержит мсКА (рис. 4). Синтез мсКА в клетках сценедесмуса подавляется ХАФ, обнаруживая, что в условиях HCO_3^- питания эта форма КА синтезируется на 80 S рибосомах (рис. 6). Как видно из рис. 6, при утилизации HCO_3^- в клетках сценедесмуса увеличивается также активность рКА. Очевидно рКА локализована в плазмалемме на наружной стороне мембраны, поскольку активность ее проявляется на целых клетках (рис. 6, Г и 6, Д). При этом следует отметить, что плКА клеток сценедесмуса связана с цитоплазматической мембраной непрочно в отличие от плКА хлореллы, которая является прочно встроенным в мембрану ферментом [12].

В табл. 3 представлены приросты биомассы при выращивании клеток хлореллы и сценедесмуса на бикарбонатсодержащих средах в течение 72 ч в присутствии ингибитора КА. Как видно, не наблюдается снижение приростов биомассы водорослей при добавлении специфического ингибитора КА ацетазоламида, не проникающего в клетки и действующего только на фермент, локализованный на наружной поверхности клетки [13].

ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки хлореллы и сценедесмуса, а также многих других видов водорослей при выращивании их в условиях низких концентраций углекислоты способны более эффективно ассимилировать C_n по сравнению с клетками, выращенными при высоких концентрациях CO_2 [3, 14–16]. Эта высокая степень фотосинтетического сродства к наружной концентрации CO_2 может быть обусловлена концентрированием C_n в клетках водорослей, выращенных при низких содержаниях CO_2 в среде. Одним из возможных механизмов концентрирования C_n , как рассматривалось во введении, может быть использование клетками водорослей в качестве субстрата экзогенного бикарбоната наряду с CO_2 . Действительно, культуры хлореллы и сценедесмуса хорошо растут на бикарбонатсодержащих средах, что свидетельствует о способности этих организмов утилизировать HCO_3^- .

Однако остается неясным, в какой форме бикарбонат транспортируется из среды в клетку, а также участие КА в транспорте HCO_3^- и в работе концентрирующего C_n механизма. Очевидно, что при выращивании на бикарбонатных средах клетки водорослей используют в качестве субстрата углеродного питания HCO_3^- , а не диоксид угле-

рода, образованный в результате катализированной КА реакции дегидратации бикарбоната, как это предполагалось ранее [6]. На это указывает уменьшение активности плКА при выращивании хлореллы на бикарбонатных средах, а также тот факт, что подавление активности КА, локализованной в плазмалемме, не приводит к снижению продуктивности культур. Необходимо отметить, что добавление в бикарбонатсодержащую среду ингибитора КА не только не снижает продуктивность культур, но даже вызывает ее увеличение (табл. 3). Очевидно, снижение или ингибирование активности КА наружных мембран приводит к улучшению углеродного обеспечения клеток, позволяя исключить обратную десорбцию CO_2 из клетки, которая может иметь место в результате более высокого рН в среде по сравнению с цитоплазмой.

Учитывая сходство адаптивных реакций карбоангидразной системы хлореллы и сценедесмуса при ассимиляции низких концентраций CO_2 и HCO_3^- , можно заключить, что концентрирование C_H в клетках, выращенных при низких содержаниях CO_2 , может быть связано с дополнительным транспортом HCO_3^- , в котором КА периферических мембран не принимает участия. Однако увеличение активности рКА в цитоплазме и мсКА в хлоропласте показывает, что внутренние формы КА имеют важное значение для ассимиляции низких концентраций углекислоты и бикарбоната. Имеется целый ряд данных, свидетельствующих о том, что местом концентрирования C_H , обеспечивающего высокое фотосинтетическое сродство к наружной концентрации CO_2 , у клеток, выращенных при недостатке CO_2 , является оболочка хлоропласта [13, 17, 18]. Показано, что хлоропласты хламидомонады способны накапливать C_H , если они выделены из клеток, предварительно адаптированных к низким содержаниям CO_2 в газовой фазе [13]. Таким образом, внутренние формы КА (хпКА), очевидно, принимают участие в концентрировании C_H , возможно, в результате действия механизмов, рассмотренных нами ранее [7, 12].

Механизм транспорта бикарбоната через плазматическую мембрану для одноклеточных зеленых водорослей, к которым принадлежат хлорелла и сценедесмус, не изучен. Однако можно предполагать, что HCO_3^- транспортируется в клетки зеленых водорослей активно с помощью переносчиков подобно механизму, предложенному для цианобактерий [19].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Романова А.К. Проницаемость клеток автотрофов для углекислоты и методы ее изучения // Биохимические методы изучения автотрофии у микроорганизмов. М.: Наука, 1980. С. 12.
2. Findenegg G.R. Inorganic carbon transport in microalgae. II. Uptake of HCO_3^- ions during photosynthesis of five microalgal species // Plant Sci. Lett. 1980. V. 18. N 3. P. 289.
3. Aizawa K., Miyachi S. Carbonic anhydrase and CO_2 concentrating mechanisms in microalgal and cyanobacteria // FEMS Microbiol. Rev. 1986. V. 39. N 1. P. 215.
4. Moroney J.V., Husic H.D., Tolbert N.E. CO_2 and HCO_3^- accumulation by microalgae // Regulation of chloroplast differentiation. Plant Biol. V. 2. N.Y.: Alan R. Ziss Inc., 1985. P. 715.
5. Osterlind S. Inorganic carbon sources of green algae. Growth experiments with *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella pyrenoidosa* // Physiol. plantar. 1950. V. 3. N 2. P. 353.
6. Аврамова С.Т., Пронина Н.А., Семенов В.Е. и др. Карбоангидразная активность и усвоение бикарбонатного иона *Chlorella* и *Scenedesmus* // Хидробиология (Болгария). 1984. Т. 20. С. 8.
7. Пронина Н.А., Семенов В.Е. Локализация связанной карбоангидразы в мембранах клеток хлореллы // Физиология растений. 1988. Т. 35. Вып. 1. С. 51.
8. Дилов Х., Божкова М., Стаев С. Практический блок культивирования микроводорослей в лабораторных условиях // Докл. Акад. с.-х. наук (Болгария). Т. 4. № 2. С. 169.
9. Пронина Н.А., Аврамова С., Георгиев Д., Семенов В.Е. Динамика карбоангидразной активности *Chlorella* и *Scenedesmus* при адаптации клеток к свету высокой интенсивности и к низкой концентрации CO_2 // Физиология растений. 1981. Т. 28. Вып. 1. С. 43.
10. Mackinney G. Absorption of light by chlorophyll solution // J. Biol. Chem. 1944. V. 140. N 2. P. 315.
11. Hitchcock C., Nichols S.W. Plant lipid biochemistry. L.; N.Y.: Acad. Press, 1971. P. 387.
12. Пронина Н.А., Семенов В.Е. Локализация мембраносвязанной и растворимой карбоангидразы в клетках хлореллы // Физиология растений. 1984. Т. 31. Вып. 2. С. 241.
13. Moroney J.V., Kitayama M., Togasaki R.K., Tolbert N.E. Evidence for inorganic carbon transport by intact chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Physiol. 1987. V. 83. N 3. P. 460.
14. Miyachi S., Tsuzuki M., Avramova S. Utilization modes of inorganic carbon for photosynthesis in various species of *Chlorella* // Plant and Cell Physiol. 1983. V. 24. N 3. P. 3441.

15. Badger M.R., Kaplan A., Berry J.A. Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*. Evidence for a carbon dioxide concentrating mechanisms // Plant Physiol. 1980. V. 66. N 3. P. 407.
16. Beardall J., Raven J. Transport of inorganic carbon and CO₂ concentrating mechanism in *Chlorella emersonii* (Chlorophyceae) // J. phycol. 1981. V. 17. N 2. P. 134.
17. Beardall J. CO₂ accumulation by *Chlorella saccharophita* (Chlorophyceae) at low external pH evidence for active transport of inorganic carbon at the chloroplast envelope // J. Phycol. 1981. V. 17. N 4. P. 371.
18. Moroney J.V., Husie H.D., Tolbert N.E. Effect of carbonic anhydrase inhibitors on inorganic carbon accumulation by *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Physiol. 1985. V. 79. N 1. P. 177.
19. Abe T., Tsuzuki M., Kaplan A., Miyashi S. Transport and fixation of inorganic carbon during photosynthesis in the cells of *Anabaena* grown under ordinary air // Plant and Cell Physiol. 1987. V. 28. N 4. P. 671.

Поступила в редакцию
27.IV. 1988

После доработки
14.II. 1989

S. FURNAJIEVA, N.A. PRONINA, P. ANDREEVA, G. PETKOV,
V.E. SEMENENKO

INVOLVEMENT OF CARBONIC ANHYDRASE IN BICARBONATE
ION ASSIMILATION BY *CHLORELLA* AND *SCENEDESMUS* CELLS

*M. Popov Institute of Plant Physiology, Bulgarian Academy of Sciences,
Sofia*

*K.A. Timiriazev Institute of Plant Physiology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The organization of carbonic anhydrase system in *Chlorella* and *Scenedesmus* cells grown under different carbon nutrition has been studied. In *Chlorella* supplied with inorganic carbon in the form of CO₂, carbonic anhydrase (CA) was present in membrane-bound form and localized in the plasmalemma (80%) and chloroplast membranes (20%). When *Chlorella* was grown in a bicarbonate medium, the membrane-bound CA activity in plasma membranes decreased, while that in chloroplast membranes increased, and soluble CA was also synthesized *de-novo* on 80 S ribosomes. In *Scenedesmus* cells grown in the atmosphere of saturating CO₂ concentrations, soluble CA was found in the cytoplasm, and in the cells grown on HCO₃⁻ the membrane-bound enzyme was synthesized in the chloroplast. Acetazolamide, a specific CA inhibitor which cannot penetrate into the cells thus suppressing the activity in outer membranes, had no effects on photosynthetic production in both algae grown in bicarbonate media. It is concluded that the CA located in outer membranes is not involved in bicarbonate ion utilization. Mechanisms by which HCO₃⁻ is utilized in algal cells, as well as the involvement of CA in the transport and concentration of CO₂ in the chloroplast are discussed.