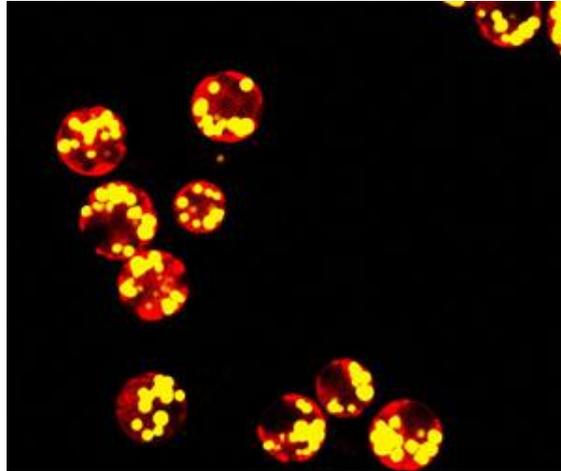


ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN  
DEPARTMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT  
INSTITUT UNR



## **Untersuchung des Lipidgehalts und Beeinflussung der Lipidproduktion von Mikroalgen durch Nährstofflimitierung**

Optimierung und Anwendung der Lipidmarkierung mit Nilrot

Bachelorarbeit

von

**Sonja Poltera**

Bachelorstudiengang 2015

Abgabedatum: 12.03.2019

Studienrichtung Umweltingenieurwesen

Fachkorrektoren:

Dr. Dominik Refardt & Sophia Egloff

Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften ZHAW

Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen IUNR

Campus Grüental

CH-8820 Wädenswil

Keywords: Nilrot, Fluoreszenz, Mikroalgen, Lipidproduktion, Stickstofflimitierung, Lipidgehalt, Nährstofflimitierung

Titelbild: Mittels Nilrot markierte, fluoreszierende *Chlamydomonas* Zellen. <https://scitechdaily.com/carbon-increases-oil-production-from-algae/>

Zitiervorschlag:

Poltera, S. (2019). *Untersuchung und Beeinflussung des Lipidgehalts in Mikroalgen - Optimierung und Anwendung der Lipidmarkierung mit Nilrot* (Bachelorarbeit). ZHAW, Wädenswil.

## Zusammenfassung

Mikroalgen sind in der Lage Lipide zu produzieren, welche für die Nahrungsmittel-, Biotreibstoff- und Tierfutterindustrie von grosser Bedeutung sind. Damit eine Produktion wirtschaftlich ist, muss der Lipidgehalt und die Biomassenproduktion der Mikroalgen maximiert werden. Der Lipidgehalt in Mikroalgen ist hauptsächlich von der Nährstoffverfügbarkeit, im speziellen Stickstoff, abhängig. Für die Bestimmung des Lipidgehalts wird eine rasche Messmethode benötigt. Dazu eignet sich die Markierung der Lipide mit Nilrot mit anschließender Fluoreszenzmessung. Aus diesem Grund wurde die Nilrotmethode optimiert und in einem Versuch zur Beeinflussung der Lipidproduktion durch Entzug von Nährstoffen angewendet.

Die optimierte Methode der Nilrot-Fluoreszenz wurde mit der gravimetrischen Lipidbestimmung mittels Soxhlet-Extraktion verglichen. Für die Beeinflussung der Lipidproduktion wurden *Chlamydomonas noctigama*, *Chlorella vulgaris* und *Tetrademus obliquus* bei einer Limitierung aller Nährstoffe, einer Limitierung von Stickstoff und einem nicht-nährstofflimitierten Medium über 24 Tagen inkubiert und überwacht. Die Proben für die Messung des Lipidgehalts wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur in DMSO inkubiert. Der Lipidgehalt wurde nach zehn Minuten Anfärbezeit in einer Mikrotiterplatte bei einer Anregung von 535 nm und einer Emission von 595 gemessen. Das optimierte Protokoll zeigte eine mässige Korrelation mit der Bestimmung des Lipidgehalts mittels Soxhlet-Extraktion. Die Beeinflussung der Lipidproduktion ergab, dass mit dem Entzug von Nährstoffen der Lipidgehalt in den Mikroalgen bis zu 4.5-fach erhöht werden konnte. Dabei ergab eine Limitierung aller Nährstoffe zwar höhere Lipidgehalte pro mg Trockenmasse, der Lipidgehalt in der Kultur lag bei der Stickstofflimitierung höher.

Die Methode der Nilrot-Fluoreszenz eignet sich für eine halbquantitative Bestimmung von Lipiden in Mikroalgen. Wird eine quantitative Bestimmung verlangt, muss die Nilrotfluoreszenz immer mit einer gravimetrischen Methode überprüft werden. Der Entzug von Nährstoffen führte eindeutig zur Erhöhung der Lipidproduktion, jedoch zu einer Abnahme des Wachstums. Für eine Optimierung dieses Verhältnisses sind noch weitere Untersuchungen nötig

## Abstract

Microalgae are able to produce lipids that are of great importance for the food, biofuel and animal feed industries. For production to be economical, the lipid content and biomass production of microalgae must be maximized. The lipid content in microalgae depends mainly on the availability of nutrients, in particular nitrogen. For the determination of the lipid content a rapid measuring method is required. The marking of lipids with Nile red with subsequent fluorescence measurement is suitable for this purpose. For this reason, the Nile red method was optimized and used in an experiment to influence lipid production by removing nutrients.

The optimized method of Nile red fluorescence was compared with gravimetric lipid determination using Soxhlet extraction. To influence lipid production, *Chlamydomonas noctigama*, *Chlorella vulgaris* and *Tetradismus obliquus* were incubated and monitored for 24 days with a limitation of all nutrients, a limitation of nitrogen and a medium not limited to nutrients. The samples for lipid measurement were incubated in DMSO for 30 minutes at room temperature. The lipid content was measured after ten minutes staining time in a microtiter plate at an excitation of 535 nm and an emission of 595. The optimized protocol showed a moderate correlation with the determination of the lipid content using Soxhlet extraction. The influence on lipid production showed that with the removal of nutrients the lipid content in the microalgae could be increased up to 4.5-fold. Although a limitation of all nutrients resulted in higher lipid contents per mg dry matter, the lipid content in the culture was higher with nitrogen limitation.

The Nile red fluorescence method is suitable for the semi-quantitative determination of lipids in microalgae. If a quantitative determination is required, the Nile red fluorescence must always be checked by a gravimetric method. The removal of nutrients clearly led to an increase in lipid production, but a decrease in growth. Further investigations are necessary to optimize this ratio.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
2.1	Mikroalgen und Medien.....	7
2.2	Bestimmung der optischen Dichte, der Zelldichte, der Trockenmasse .....	7
2.3	Nilrot-Fluoreszenzmessung.....	8
2.4	Optimierung der Methode zur Lipidmarkierung mit Nilrot.....	8
2.5	Übereinstimmung der Nilroteinfärbung und Lipidextraktionsmethode nach Soxhlet.....	10
2.6	Beeinflussung der Lipidproduktion von Mikroalgen.....	10
2.6.1	Selektion geeigneter Mikroalgenstämme.....	10
2.6.2	Versuchsaufbau.....	11
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>12</b>
3.1	Optimierung der Methode zur Lipidmarkierung mit Nilrot.....	12
3.2	Übereinstimmung der Nilroteinfärbung und Lipidextraktionsmethode nach Soxhlet.....	15
3.3	Beeinflussung der Lipidproduktion von Mikroalgen.....	16
3.3.1	Selektion geeigneter Mikroalgenstämme.....	16
3.3.2	Vergleich der Lipidgehalte in nährstofflimitierten und nicht-nährstofflimitierten Medien .....	17
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>21</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>24</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>27</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>28</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>29</b>

## 1 Einleitung

Mikroalgen werden als einzellige oder kleine mehrzellige, photosynthetische Wasserorganismen definiert. Aufgrund der breiten Definition ist es nicht überraschend, dass eine hohe Diversität innerhalb dieser Gruppe herrscht und Mikroalgen grosse Unterschiede in ihren Eigenschaften aufweisen. Mikroalgen können einerseits direkt verwendet werden oder es können Stoffe aus den Zellen extrahiert und weiterverarbeitet werden (Olaizola, 2003). Darunter sind zahlreiche Proteine, Farbstoffe, Kohlenhydrate und Lipide. Besonders interessant für eine kommerzielle Produktion sind Lipide und lipidangereicherte Mikroalgen. Die Anwendung dieser Lipide reicht von Nahrungsmittel, Tierfutter, Produktion von Biotreibstoffen bis biologisch abbaubaren Kunststoffen (Borowitzka, 2013).

Die Produktion der Lipide aus Mikroalgen gilt als nachhaltige Alternative zur Produktion von Lipiden aus Ackerpflanzen, vor allem wenn diese nicht zur Ernährung dienen. Ein Grund dafür ist, dass Mikroalgen auf für die Landwirtschaft unproduktiven Flächen kultiviert werden können. Weiter haben sie einen geringen Einfluss auf Gewässer und Trinkwasser, da eine Kultivierung in Salz- oder Abwasser möglich ist (Yang et al., 2011). Durch die Aufnahme der Nährstoffe direkt aus dem Wasser und der höheren photosynthetische Aktivität können mit Mikroalgen bis zu 100-fach mehr Lipide pro Hektare und Jahr produziert werden, als mit Ackerpflanzen (Huber, Iborra, & Corma, 2006; Rittmann, 2008).

Wie auch für Ackerpflanzen sind Lipide Speicherstoffe für Mikroalgen (Lari et al., 2016). Der Anteil der Lipide in den Zellen kann je nach Mikroalgenart z.B. *Botryococcus braunii* bis zu 80 % der Biomasse erreichen (Li & Qin, 2005). Diese Arten haben meist ein geringeres Wachstum, als solche mit Lipidgehalten von 20-40 % wie *Chlorella sp.*, *Nannochloropsis sp.* oder *Tetraselmis sp.* (Mata, Martins, & Caetano, 2010). Mikroalgen produzieren eine Vielzahl von neutralen Tri- und Diglyceriden, sowie den polaren Phospho- und Glycolipiden (Borowitzka, 2013). Für die meisten Anwendungen sind ausschliesslich Triglyceride von Bedeutung, weshalb in dieser Studie ausschliesslich diese behandelt wurden. Damit eine wirtschaftliche Nutzung von Lipiden aus Mikroalgen möglich wird, muss der Gehalt derselben und die Biomasse in einer Kultur maximiert werden.

Die erreichbare Biomasse und die Anteile der Stoffe in den Zellen ist hauptsächlich von Umweltfaktoren wie Licht, Temperatur, pH und Nährstoffverfügbarkeit abhängig (Dortch, 1990). Durch die Veränderung dieser Bedingungen kann die Zellaktivität in die gewünschte Richtung beeinflusst werden. Vor allem die Produktion von Lipiden lässt sich einfach beeinflussen. Da Lipide als Speicherstoffe für die Mikroalgen dienen, lässt sich mit dem Entzug von Nährstoffen eine erhöhte Produktion feststellen (Vitova, Bisova, Kawano, & Zachleder, 2015). Gleichzeitig wird das Wachstum der Alge verringert, um in diese Speicherstoffe zu investieren

Vor allem der Entzug von Stickstoff gilt als Auslöser für eine erhöhte Lipidproduktion. Stickstoff gehört zu den Schlüsselementen in der Proteinbiosynthese (Lari et al., 2016). Haben die Algen genügend Stickstoff zur Verfügung ist die Lipidproduktion tief und die Nährstoffe werden hauptsächlich in das Wachstum investiert. Die wenigen Lipide werden mit den aus der Umgebung aufgenommenen Nährstoffen produziert. Wird der Stickstoff aber limitiert können keine weiteren Proteine gebildet werden und das Wachstum der Alge wird gehemmt. Besteht akuter Stickstoffmangel sind eine Vielzahl der Mikroalgen sogar in der Lage Peptide und Kohlenhydrate abzubauen und aus diesen Nährstoffen weitere Lipide zu synthetisieren (Vitova et al., 2015). Die über beide Synthesewege erreichte Erhöhung der Lipidproduktion kann in einzelnen Fällen bis zu 80% betragen (Lari et al., 2016).

Damit eine Änderung in der Produktion und der Menge der Lipide in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen studiert werden können, bedarf es einer einfachen und rasch durchzuführenden Methode zur Quantifizierung der Lipide. Die heute existierenden Messmethoden können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Einerseits die gravimetrischen Methoden und andererseits die Markierung der Lipide mit Farbstoffen. Die gravimetrischen Messungen sind häufig mit aufwändiger Extraktion mit organischen Lösungsmitteln verbunden. Für eine rasch durchzuführende Quantifizierung der Lipide eignet sich die weniger aufwändige Anfärbung mit Nilrot. (Bertozzini, Galluzzi, Penna, & Magnani, 2011)

Der lipophile und fluoreszierenden Farbstoff Nilrot (7-Diethylamino-3,4-benzophenoxazin-2-on) dringt in die Zellen der Mikroalgen ein und bindet sich an die Lipide. Nilrot ist ein Farbstoff aus der Gruppe der Phenoazine und wird durch die Behandlung von Nilblau mit Schwefelsäure synthetisiert. Durch die lipophilen Eigenschaften werden die Lipide markiert, ohne die übrigen aus Wasser bestehenden Zellflüssigkeiten zu färben (Greenspan, 1985). Nilrot fluoresziert in Verbindung mit neutralen Lipiden im roten Wellenlängenbereich. Die Intensität und Wellenlänge der Fluoreszenz können sich unterscheiden, je nach verwendetem Lösungsmittel für die Markierung. Nilrot durchdringt die Zellmembranen vor allem bei Grünalgen schlecht. Aus diesem Grund wird oft ein Lösungsmittel dazugegeben, welches die Durchlässigkeit der Zellwände verbessern soll. Dazu eignet sich Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Fluoreszenz der Lipide um 5-20 % erhöhen kann (Rumin et al., 2015).

Die Methode der Lipidmarkierung mit Nilrot wird in zahlreicher Literatur beschrieben, es sind jedoch in den verschiedenen Publikationen grosse Unterschiede zu finden (Bertozzini et al., 2011; Chen, Zhang, Song, Sommerfeld, & Hu, 2009). Die Unterschiede betreffen meist die Inkubationszeit, die Fluoreszenzmessung und das verwendete Lösungsmittel. Die Unterschiede sind darauf zurück zu führen, dass die Markierung sich je nach Alge unterscheiden kann und sich so keine allgemein gültige Version der Methode durchsetzen konnte. Aus diesem Grund soll die Methode getestet und optimiert werden. Dazu sollen folgende Faktoren untersucht werden; a) Die Beeinflussung der Fluoreszenz durch die Nilrot-Konzentration in der Probe, b) die Bestimmung

der Anregungs- und Emissionswellenlänge, c) die Erstellung einer Standardkurve für die Umrechnung in Standardeinheiten für Triacylglyceride, d) die Veränderung der Fluoreszenz der Lipide in den Mikrolagen über sechs Stunden und e) die Übereinstimmung der Lipidgehalte gemessen mit der Nilrotfluoreszenz und der Extraktion nach Soxhlet. In einem weiteren Versuch soll mit dem Entzug von Nährstoffen getestet werden, ob und in welchem Masse sich die Lipidproduktion in drei Mikroalgenarten beeinflussen lässt. Dabei soll die optimierte Nilrot-Markierung angewendet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mikroalgen und Medien

Für die Experimente wurden *Chlamydomonas noctigama* SAG35.72, *Chlorella vulgaris* CCALA 256, *Chlorococcum novae-angliae* SAG 28.98, *Parachlorella kessleri* CCALA 250, *Porphyridium sorodidum* SAG 114.79, *Tetradismus obliquus* SAG 276 und *Synechocystis sp.* PCC6803 verwendet.

*Chlamydomonas noctigama*, *Chlorella vulgaris*, *Pa. kessleri* und *T. obliquus* wurden in einem Mineralmedium (Doucha's medium, DM) kultiviert (Brányiková et al., 2011). DM wurde in folgender Konzentration für 3 g/l Algen-Trockenmasse verwendet: 550 mg/l Harnstoff, 119 mg/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 102 mg/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 20 mg/l EDTA, 86.91 mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0.42 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.48 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 1.65 mg/l  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0.30 mg/l  $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1.35 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.085 mg/l  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0.007 mg/l  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ . Das Medium wurde zusätzlich in dreifacher Verdünnung für 1 g/l (DM1), in sechsfacher Verdünnung für 0.5 g/l (DM05), und in dreifacher Verdünnung für 1 g/l mit reduziertem Harnstoff (50 %) (DM1-N) verwendet.

*Chlorococcum novae-angliae* und *Po. sorodidum* wurden in F/2 Mineralmedium (Guillard, 1975) kultiviert. F/2 wurde in folgender Konzentration für 1.2 g/l Algen-Trockenmasse verwendet: 30 g/l Meersalz, 750 mg/l  $\text{NaNO}_3$ , 50 mg/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1.3 mg/l  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 8.7 mg/ml  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.001 mg/ml  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ,  $6.3 \cdot 10^{-4}$  mg/ml  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.002 mg/ml  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.001 mg/ml  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0.018 mg/ml  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0.5 mg/ml Vitamin B12, 0.5 mg/ml Biotin, 100 mg/ml Thiamin.

*Synechocystis sp.* wurde im BG11 Mineralmedium (Stanier, Kunisawa, Mandel, & Cohen-Bazire, 1971) kultiviert. BG11 wurde für 3 g/l in folgender Konzentration verwendet: 1500 mg/l  $\text{NaNO}_3$ , 40 mg/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 75 mg/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 36 mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 6 mg/l Zitronensäure, 6 mg/l Ammoniumeisen(III)-citrate, 1 mg/l  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 20 mg/l  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2.86 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 36 mg/l  $\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.22 mg/l  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.39 mg/l  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.08 mg/l  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0.05 mg/ml  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ .

Alle Medien wurden steril-filtriert. Die Mikroalgenkulturen wurden, soweit nicht anders erwähnt, in einem Inkubator (Infors HT Multitron pro, Schweiz) bei 25 °C, 2 %  $\text{CO}_2$  und 13 kLux unter ständiger Beleuchtung inkubiert.

### 2.2 Bestimmung der optischen Dichte, der Zelldichte, der Trockenmasse

Für die Messung der optischen Dichte wurden 200 µl Probe in einer Mikrotiterplatte (96-Well-Transparent, TTP, Schweiz) vorbereitet. Gemessen wurde die Absorption bei 750 nm (Infinite M200pro, Tecan, Schweiz).

Im Falle einer optischen Dichte von  $>1$  wurde eine zehnfache Verdünnung der Probe gemessen und auf die Originalkonzentration gerechnet. Alle Proben wurden doppelt gemessen.

Die Zelldichte wurde in einer Thoma-Zählkammer (0.1 mm Tiefe, 0.0025 mm<sup>2</sup> Fläche pro Quadrat) bei 400-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Proben wurden bei Bedarf auf eine angenehm zählbare Dichte verdünnt. *Chlamydomonas noctigama* wurde mit Lugol'scher Lösung (1 % in Wasser) im Verhältnis 1:9 fixiert.

Die Trockenmasse wurde im Rahmen der Arbeit auf zwei Arten bestimmt. Für die Berechnung des Lipidgehalts mittels Soxhlet (Kapitel 2.5) wurde die Trockenmasse mit 15 ml Probe bei 105 °C (MoistureAnalyzer HB43-S, Mettler Toledo, Schweiz) gemessen. Dabei wurde die Probe bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und aus dem Rückstand wurde die Trockenmasse berechnet.

Während des Versuchs zu Beeinflussung der Lipidproduktion in Mikroalgen (Kapitel 2.6) wurde die Trockenmasse mit 1 ml Probe durch Auswägen bestimmt. Dafür wurden 2 ml-Röhrchen mindestens zwölf Stunden bei 105 °C getrocknet und im Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wurde 1 ml Probe pro Replikat gezogen und bei 20'000 g sechs Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Röhrchen wurden bei 105 °C für mindestens zwölf Stunden getrocknet. Anschliessend wurden die Röhrchen gewogen und aus dem Rückstand wurde die Trockenmasse in g/l berechnet.

### 2.3 Nilrot-Fluoreszenzmessung

Es wurde mit dem Protokoll nach Chen et al. (2009) mit Abänderungen gearbeitet. Die Proben wurden in einer schwarzen Chimney 96-Well Platte (Greiner, Österreich) vorbereitet. Dazu wurden 200 µl 31 % Dimethylsulfoxid-Lösung (DMSO) vorgelegt. Zugegeben wurden 50 µl Mikroalgensuspension oder Triolein-Standardlösung (500 µg/ml in 2-Propanol). Die Proben wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend wurden 2 µl Nilrotlösung (50 µg/ml in Aceton) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von zehn Minuten (40 °C) wurde im Plattenlesegerät (Infinite M200pro, Tecan, Schweiz) die Fluoreszenz der Proben gemessen (Ex. 535 nm, Em. 595 nm).

### 2.4 Optimierung der Methode zur Lipidmarkierung mit Nilrot

Um genau festzulegen bei welcher Wellenlänge die Nilrot-Fluoreszenzmessung durchgeführt werden soll, wurden Wellenlängenscans durchgeführt. Dazu wurde jeweils acht Proben von *Chla. noctigama*, *Chlore. vulgaris*, *T. obliquus* und Wasser, sowie vier Proben von der Triolein Standardlösung verwendet. Die Algensuspension wurde jeweils unverdünnt verwendet.

Für den Anregungsscan wurde eine Bandbreite von 400 bis 600 nm in 2-nm Schritten mit einer Emission von 575 nm gescannt. Für den Emissionsscan wurden die Proben bei 530 nm angeregt und die Emission von 540 bis 700 nm in 2-nm Schritten gemessen.

Um die optimale Menge an Nilrot zu ermitteln wurden Mikroalgen mit verschiedenen Mengen Nilrot markiert. Dazu wurden jeweils 20 Replikate von *Chla. noctigama*, *Chlore. vulgaris* und *T. obliquus* verwendet. Ebenfalls wurden 20 Replikate ausschliesslich mit DMSO und Wasser hergestellt. Nach Inkubationszeit wurden zu jeweils vier der Replikaten 2-6  $\mu\text{l}$  Nilrotlösung in 1- $\mu\text{l}$  Schritten zugegeben.

Für die Festlegung der Inkubationszeit der Proben zur Sicherung einer vollständige Anfärbung der Lipide in den Mikroalgen wurde getestet, wie sich die Fluoreszenz der Proben nach Zugabe von Nilrot verhält. Es wurden jeweils 24 Replikate von *Chla. noctigama*, *Chlore. vulgaris*, *T. obliquus* und Triolein-Standardlösung verwendet. Die Fluoreszenz der Proben wurde nach Zugabe des Farbstoffes über sechs Stunden im Abstand von zehn Minuten gemessen.

Damit die Lipidmenge in den Mikroalgen berechnet werden kann, wurde eine Kurve erstellt, welche den Zusammenhang der Fluoreszenz mit der Triolein-Konzentration beschreibt. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe von 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bis 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Verdünnungsfaktor = 2) mit Triolein (5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Pyridin, Sigma-Aldrich) verwendet. Pro Verdünnung wurden vier Replikate gemessen. Zusätzlich wurde ein Replikat mit der Konzentration von 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gemessen. Aus den Messresultaten wurde mittels linearer Regression in Software R eine Standardkurve erstellt, welche für die Berechnung der Lipidkonzentration in Mikroalgen verwendet werden kann (R Core Team, 2015).

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse wurden folgende Punkte in die Methode übernommen und das optimierte Protokoll in Kapitel 2.3 für die nachfolgenden Versuche verwendet. Die Anregung wurde auf den Durchschnitt des Emissionsmaximum von Triolein und markierten *Chlore. vulgaris* gesetzt. Die Emission wurde aufgrund von der Störung von DMSO an den Anfang des Fluoreszenz-Peaks von markierten *Chlore. vulgaris* Zellen bei 592 nm gesetzt. Die Menge Nilrot wurde auf 2  $\mu\text{l}$  beschränkt, damit die Endkonzentration von 0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nicht überschritten und damit bei höheren Lipidkonzentrationen die Fluoreszenzen im Messbereich des Plattenlesegerätes bleiben. Zur Vermeidung der starken Streuung der Fluoreszenz in den ersten 60 Minuten und so eine Stabilisierung der Messresultate zu erreichen, werden die Proben für eine halbe Stunde in DMSO inkubiert. Dies soll die Zellmembranen für das Nilrot durchlässig machen und so verhindert werden, dass ein unterschiedlicher Zellaufbau einen Einfluss auf die Messung hat. Nilrot wird erst nach den 30 Minuten Inkubationszeit zugegeben, um ein mögliches Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden.

## 2.5 Übereinstimmung der Nilroteinfärbung und Lipidextraktionsmethode nach Soxhlet

Für eine Überprüfung der Nilrot-Fluoreszenzmethode soll diese mit einer gravimetrischen Methode (Soxhlet) verglichen werden. Dafür wurden von *Chla. noctigama*, *Chlorella vulgaris* und *T. obliquus* je zwei Liter Kultur für 3 g/l angesetzt und für zwei Wochen inkubiert. Zusätzlich wurde eine Probe *Chla. noctigama* aus einer Kultivierung in einem offenen Photobioreaktor (200 l) gezogen. Von jeder Kultur wurde die optische Dichte, die Nilrot-Fluoreszenz, die Zelldichte und die Trockenmasse bestimmt.

Die Kulturen wurden in 50 ml Röhrchen bei 7000 g sechs Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeleert und der Rückstand bei 60 °C für mindestens zwölf Stunden getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in der Kugelmühle für 30 Sekunden bei 25 Schwingungen pro Sekunde zu Pulver vermahlen.

Pro Alge wurden 3-5 g gemahlene Probe in eine doppelwandige Cellulose-Soxhlet-Hülse (Whatman, Grossbritannien) eingewogen. Es wurde eine Soxhlet-Extraktion mit n-Hexan ( $\leq 99\%$  für HPLC, Roth) für drei Stunden durchgeführt, was in etwa 30 Extraktionszyklen entspricht. Das n-Hexan wurde anschliessend im Rotationsverdampfer (R-210, Büchi, Schweiz) bei einem Druck von 535 mbar und einer Temperatur von 60 °C vom Extrakt abgetrennt. Für ein vollständiges Verdampfen des Lösungsmittels wurde das Extrakt anschliessend bei 60 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das Gewicht des Rückstands wurde bestimmt und daraus der Lipidgehalt pro Algentrockenmasse berechnet. Pro Probe wurden jeweils zwei Bestimmungen durchgeführt.

Aus der Nilrot-Fluoreszenz wurde die Konzentration in Triolein pro Trockenmasse in Prozent bestimmt. Der Rückstand aus der Soxhletextraktion wurde in Prozent Lipid pro Trockenmasse umgerechnet. Die Lipidgehalt-Werte berechnet aus der Nilrotfluoreszenz wurden mit einem t-Test mit dem Mittelwert der jeweiligen Werte der Soxhlet-Extraktion verglichen. Die optische Dichte und die Zelldichte wurden als Begleitparameter zur Überprüfung der Messungen bestimmt (Anhang B).

## 2.6 Beeinflussung der Lipidproduktion von Mikroalgen

Es wurde bestimmt, ob und in welchem Masse sich die Lipidproduktion von Mikroalgen durch den Entzug von Nährstoffen beeinflussen lässt.

### 2.6.1 Selektion geeigneter Mikroalgenstämme

Aus den sieben eingangs erwähnten Mikroalgenarten wurden jene ausgewählt, welche die höchste Fluoreszenz pro Zelle und ein hohes Wachstum aufwiesen. Um dies zu bestimmen wurde die Zelldichte und die Nilrot-Fluoreszenz der jeweiligen Kulturen bestimmt. Für die Fluoreszenzmessung mittels Nilrot wurde von

jeder Mikroalge eine Verdünnungsreihe in drei Schritten (Verdünnungsfaktor = 10) gemessen. Aus den Messresultaten wurde von jeder Mikroalgenart die Fluoreszenz pro Zellen berechnet. Die Mikroalgen mit der höchsten Fluoreszenz pro Zelle und dem höchsten Wachstum wurden ausgewählt.

### 2.6.2 Versuchsaufbau

Mit *Chla. noctigama*, *Chlore. vulgaris* und *T. obliquus* wurde geprüft, wie eine Nährstofflimitierung die Bildung von Lipiden beeinflusst. Von jeder Art wurde eine Kultur mit der Zelldichte von  $10^6$  Zellen pro Milliliter angesetzt und für sieben Tage inkubiert. Danach wurden die Mikroalgen aus den Vorkulturen mit einer Konzentration von 10'000 Zellen/ml in folgende Medien inokuliert: DM0.5, DM1 und DM1-N. Dafür wurden die Mikroalgen jeweils in DM für 1 g/l gegeben. Die Kultur wurde zu 25 ml in zwölf Erlenmeyer aufgeteilt. Für das DM1 Medium wurden zu vier Erlenmeyer zusätzlich 25 ml DM für 1 g/l, für das DM0.5 Medium zu vier Erlenmeyer 25 ml Wasser und für das DM1-N zu vier Erlenmeyer Douchas für 1 g/l ohne Harnstoff zugegeben. Dies stellt sicher, dass sich in jedem Replikat dieselbe Anzahl Zellen befinden.

Die Replikate wurden zufällig in der Mitte des Inkubators verteilt, um Randeffekte zu vermeiden. Die Kulturen wurden anschliessend für 24 Tage inkubiert, wobei die ersten acht Tage die Lichtstärke auf 70 % eingestellt wurde und danach für die restliche Zeit auf 100 % erhöht wurde. Die Probennahme erfolgte zweimal wöchentlich. Von jedem Replikat wurde die optische Dichte, die Nilrot-Fluoreszenz und die Trockenmasse bestimmt.

Die Veränderung der Lipidkonzentration in der Kultur wurde einerseits über das Verhältnis der Nilrot-Fluoreszenz und der Trockenmasse dargestellt. Andererseits wurde die Fluoreszenz in der gesamten Probe dargestellt. Die Werte wurden erst ab sechs Tagen in Betracht gezogen, da vorher die Trockenmasse kaum messbar war und die Fluoreszenz der Lösungsmittel das Verhältnis stark verzerrte.

Mit einer ANOVA wurden die Messwerte der Fluoreszenz pro Trockenmasse in den drei Medien pro Mikroalgenart am 24. Tag miteinander verglichen. Bei *Chlore. vulgaris* wurde am 24. Tag bei der Messung der Fluoreszenz der Messbereich des Gerätes überschritten, weshalb die Resultate am 20. Tag für die Auswertung verwendet wurden. Anschliessend an die ANOVA wurde mit einem Tukey HSD Test überprüft in welchen Medien eine Veränderung des Lipidgehalts festgestellt werden konnte. Ebenfalls wurde mit einer ANOVA und anschliessendem Tukey HSD die Trockenmasse und die Fluoreszenz in den drei Medien verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software R (R Core Team, 2015).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Optimierung der Methode zur Lipidmarkierung mit Nilrot

Das Fluoreszenzmaximum der mit Nilrot angefarbtem *Chlore. vulgaris* lag bei einer Wellenlänge von 526 nm. Bei Triolein lag das Fluoreszenzmaximum bei 538 nm. Nicht angefarbte Proben zeigten keine Anregung. (Abb. 1a). Die markierten Proben von *T. obliquus* und *Chla. noctigama* wiesen keine, respektive nur eine leicht erhöhte Anregung auf, im Gegensatz zur Leermessung mit DMSO und zeigten keinen Peak auf (Abb. S 1a-Abb. S 2a). Dies bedeutet, dass eine Anregung bei 535 nm für die Messung am geeignetsten ist.

Beim Emissionsscan (Abb. 1b) zeigte sich, dass mit Nilrot markierte *Chlore. vulgaris*-Zellen ein Fluoreszenzmaximum bei 676 nm aufweisen. Triolein zeigte das Fluoreszenzmaximum etwas früher bei 660 nm. Nicht markierte Proben fluoreszierten am stärksten bei 678 nm. Der Peak, der nicht angefarbten Proben begann bei 630 nm merklich zu steigen, der Peak der markierten *Chlore. vulgaris* Proben hingegen schon bei 590 nm. Im Bereich zwischen 580 nm und 630 nm lagen die Werte der angefarbten *Chlore. vulgaris* Proben deutlich höher als die Leermessung mit DMSO (Abb. 1). Bei *Chla. noctigama* und *T. obliquus* lagen die Fluoreszenzmaxima der markierten Proben bei 666 nm. Die Fluoreszenzstärke deckte sich nahezu mit der Fluoreszenz der DMSO Proben. Dies deutet darauf hin, dass bei *Chla. noctigama* und *T. obliquus* keine nachweisbaren Lipidmengen vorhanden waren (Abb. S 1b-Abb. S 2b). Damit das DMSO und Chlorophyll die Messung nicht oder nur gering beeinflussen, wird die Fluoreszenz der Lipide bei 595 nm gemessen.

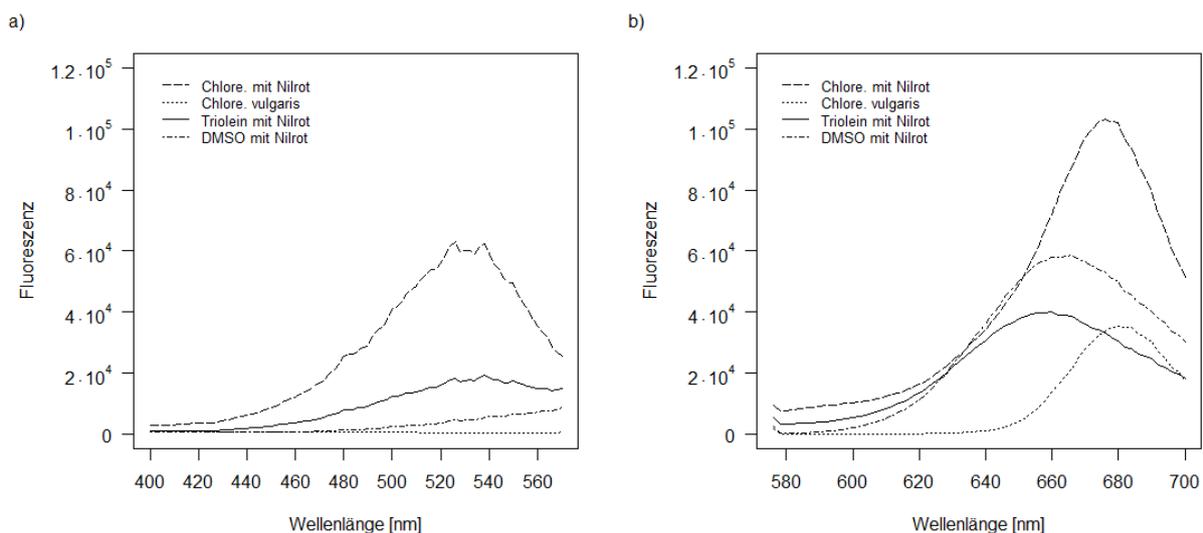
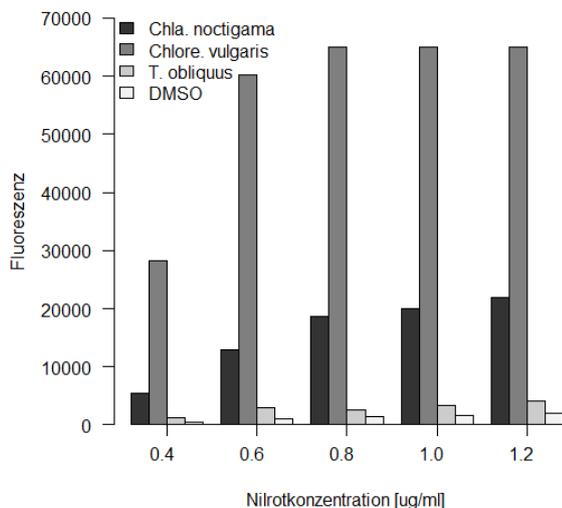


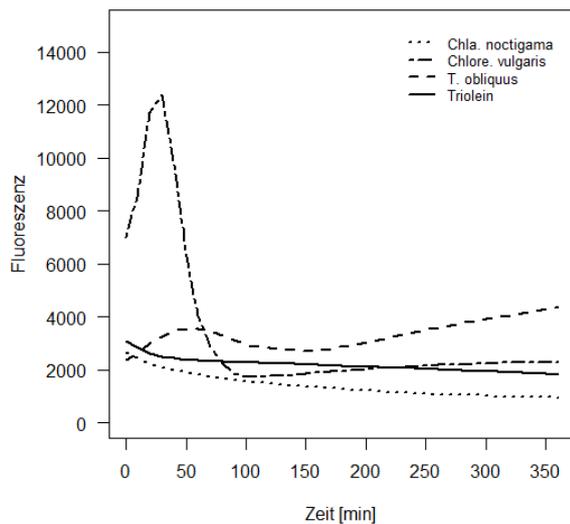
Abb. 1: Anregungsscan (a) und Emissionsscan (b) durchgeführt mit markierten und nichtmarkierten *Chlore. vulgaris* Proben, Triolein und einer Leermessung mit DMSO und Wasser.

Die Fluoreszenz der markierten Proben und DMSO stieg mit der Menge des zugegebenen Nilrot. Bei *Chlorella vulgaris* wurde ab 0.8 µg/ml Nilrot der Messbereich des Gerätes überschritten. *Chlamydomonas noctigama*, *T. obliquus* und DMSO zeigten bei mehr als 0.4 µg/ml Nilrot eine Sättigung der Fluoreszenz auf. Die Fluoreszenzmessung kann mit dem entsprechenden Standard mit einer Konzentration von 0.4 µg/ml durchgeführt werden. In folgenden Experimenten wurden durch Nährstofflimitierung noch höhere Fluoreszenzwerte gemessen. Bei diesen erhöhten Werten kann eine höhere Nilrot-Konzentration als 0.4 µg/ml zum Überschreiten des Messbereichs führen (Abb. 2).



**Abb. 2:** Fluoreszenz von *Chla. noctigama*, *Chlorella vulgaris*, *T. obliquus* und DMSO bei der Endkonzentration von Nilrot (µg/ml) in der Probe.

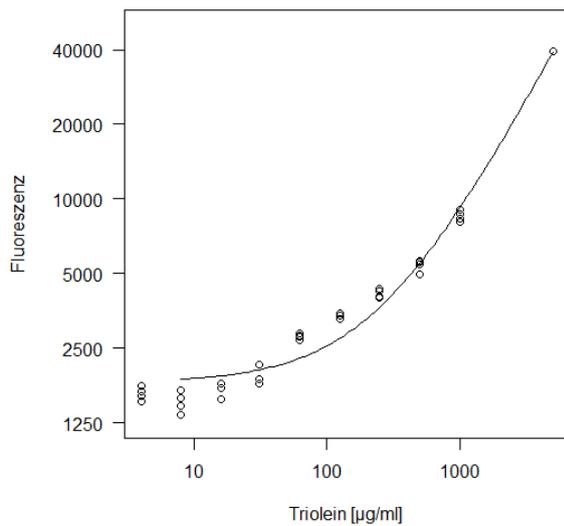
Die gemessenen Proben zeigten unterschiedliche Verläufe der Fluoreszenz über die Zeitspanne von sechs Stunden. *Chlamydomonas noctigama* und *Triolein* zeigten nach der Markierung eine stetige Abnahme der Fluoreszenz auf 36 %, respektive 60 % über den gesamten Zeitraum von sechs Stunden (Abb. 3). Die 24 Replikate zeigten bei beiden eine geringe Streuung. Bei *T. obliquus* hingegen nimmt die Fluoreszenz in den ersten 60 Minuten um 151 % zu, nimmt in den nächsten 60 Minuten wieder fast auf die Anfangsfluoreszenz ab und steigt danach stetig bis 185 % der Anfangsfluoreszenz an. *Chlorella vulgaris* zeigt durchschnittlich eine Zunahme der Fluoreszenz um 176 % in den ersten 40 Minuten. Während dieser Zeit zeigen die Replikate keine eindeutigen Resultate und reichen von einer Abnahme der Fluoreszenz auf 38 % und einer Zunahme von 303 %. Alle Replikate stabilisieren sich nach 100 Minuten bei 25 % der Anfangsfluoreszenz. Es kann bei allen Algenarten nicht abschliessend gesagt werden, nach welcher Zeit die korrekte Fluoreszenz der Probe gemessen wurde. Für die Messung der Nilrotfluoreszenz muss eine Anfärbezeit bestimmt werden und für die Reproduzierbarkeit der Resultate genau eingehalten werden.



**Abb. 3: Zeitliche Veränderung der Fluoreszenz von mit Nilrot markierten *Chla. noctigama*, *Chlore. vulgaris*, *T. obliquus* und Triolein**

In den obigen Versuchen zur Optimierung der Lipidmarkierung mit Nilrot wurde nicht im speziellen auf den Düngungszustand der Mikroalgen geachtet. Dies hat zu Folge, dass der Optimierungsprozesse mit unterschiedliche Lipidgehalten durchgeführt wurde. In weiteren Versuchen wurden teilweise um ein Vielfaches höhere Fluoreszenzen gemessen. Somit wurde die Methode an der unteren Grenze der möglichen Lipidgehalte von Mikroalgen entwickelt.

Die lineare Regression der Fluoreszenzwerten in Abhängigkeit der der Trioleinkurve ergab einen signifikanten Zusammenhang ( $R^2 = 0.99$ ,  $F_{1,31} = 5776$ ,  $p < 0.001$ ) (Abb. 4). Mit der Triolein-Standardkurve kann der Lipidgehalt von Mikroalgen aus den Fluoreszenzwerten berechnet werden. Die Standardkurve ist von  $8 \mu\text{g/ml}$  bis  $5000 \mu\text{g/ml}$  Triolein zuverlässig, weshalb es nicht möglich ist tiefere Konzentrationen als  $8 \mu\text{g/ml}$  Lipidgehalt in der Probe zu messen. Der lineare Bereich der Messung liegt bei  $>8 \mu\text{g/ml}$ . Es ist anzunehmen, dass bei Konzentrationen über  $5000 \mu\text{g/ml}$  eine Abflachung der Kurve eintritt. Bei Konzentrationen  $< 8 \mu\text{g/ml}$  führt die Fluoreszenz des Lösungsmittels zu einer inkorrekten Lipidkonzentration.



**Abb. 4: Standardkurve für die Berechnung der Lipidkonzentration aus der Fluoreszenz in µg/ml Triolein**

Im Messbereich wurde die folgende empirische Formel bestimmt, welche den Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Lipiden und der Nilrot-Fluoreszenz beschreibt.

$$\text{Lipidkonzentration} = 0.13 \cdot \text{Fluoreszenz} - 208.63$$

### 3.2 Übereinstimmung der Nilroteinfärbung und Lipidextraktionsmethode nach Soxhlet

Der Vergleich zwischen der gravimetrischen Quantifizierung der Lipide und Quantifizierung mittels Nilrotfluoreszenz ergab keine eindeutigen Resultate (Abb. 5). Bei *Chlorella vulgaris* konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Messmethoden gefunden werden ( $t_3 = 0.95$ ,  $p = 0.413$ ). Bei *Chlorella noctigama* aus dem Inkubator hingegen wurde über die Extraktion die doppelte Lipidmenge (12.5 %) pro Trockenmasse gefunden wie mit der Nilrotfluoreszenz (6.8%) ( $t_3 = -4.40$ ,  $p = 0.011$ ). Bei *Tetraselmis obliquus* und *Chlorella noctigama* aus dem Photobioreaktor lag die Fluoreszenz unterhalb des Messbereichs der Triolein-Standardkurve, weshalb kein Vergleich angestellt werden konnte. Die Extraktion mittels Soxhlet ergab bei beiden Proben einen höheren Lipidgehalt (4.2 % und 2.9 %) an, als bei *Chlorella vulgaris* (0.8 %), der Lipidgehalt konnte mit der Nilrotfluoreszenz nicht nachgewiesen werden. Die Unterschiede der Resultate der verschiedenen Proben zeigt, dass die direkte Umrechnung der Nilrotfluoreszenz in den Lipidgehalt stark von der Mikroalgenart abhängig ist. Wie bei *Chlorella noctigama* sichtbar ist, sind auch die Unterschiede innerhalb der Mikroalgenart möglich. Zudem wurden in *Chlorella vulgaris* Fluoreszenzen nachgewiesen, welche bei einer Umrechnung zu nicht erreichbaren Lipidgehalten führen. Die Unsicherheiten sind somit zu gross, als dass eine Berechnung des Lipidgehalts aus der Fluoreszenz ohne weiteres möglich ist.

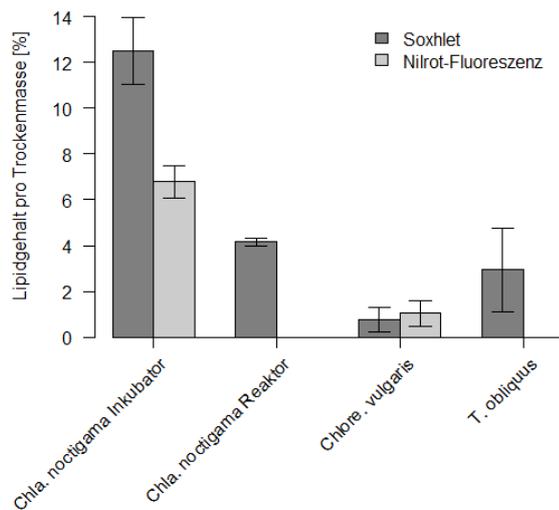


Abb. 5: Vergleich des Lipidgehalts mittels Soxhlet Extraktion und mittels Nilrotfluoreszenz gemessen. Bei der Soxhlet-Extraktion wurden zwei Replikate gemessen und die Standardabweichung berechnet. Die Nilrotfluoreszenz wurde mit vier Replikaten gemessen und die Standardabweichung berechnet.

### 3.3 Beeinflussung der Lipidproduktion von Mikroalgen

#### 3.3.1 Selektion geeigneter Mikroalgenstämme

*Chlamydomonas noctigama*, *Chlore. vulgaris*, *Po. sorodidum* und *Chloro. novae-angliae* wiesen jeweils eine Fluoreszenz von  $>10^{-4}$  pro Zelle auf (Abb. 6). *Chlorella vulgaris*, *Pa. kessleri* und *T. obliquus* erreichten eine hohe Zellzahl von  $>10^8$  Zellen/ml. *Chlamydomonas noctigama* und *Chlore. vulgaris* wurden aufgrund der hohen Fluoreszenz und der hohen Wachstumsrate ausgewählt. *Tetradesmus obliquus* wurde aufgrund der hohen Wachstumsrate und der Relevanz in anderen Studien ausgewählt.

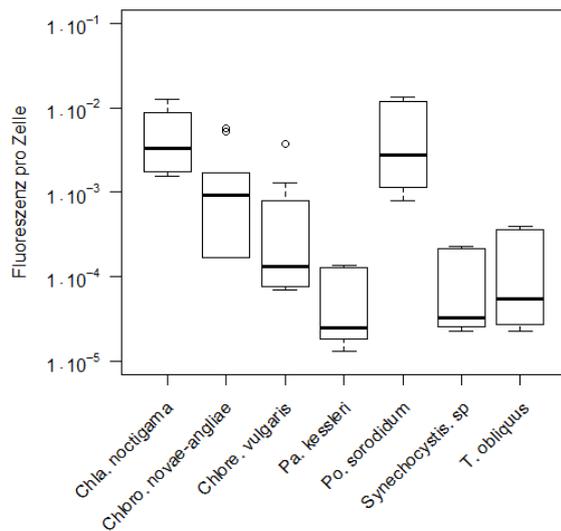


Abb. 6: Fluoreszenz pro Zelle von verschiedenen Mikroalgen

### 3.3.2 Vergleich der Lipidgehalte in nährstofflimitierten und nicht-nährstofflimitierten Medien

Bei den drei getesteten Mikroalgenarten konnte durch die Limitierung von Nährstoffen eine Erhöhung des Lipidgehalts pro mg Trockenmasse erreicht werden, was zu einer entsprechenden Erhöhung der Nilrot-Fluoreszenz pro mg Trockenmasse führte (Abb. 7). Sowohl eine Limitierung der gesamten Nährstoffe als auch eine Limitierung von Stickstoff führten bis zu einer 4.5-fachen Erhöhung der Fluoreszenz pro mg Trockenmasse relativ zu den nicht-nährstofflimitierten Medien bei *Chla. noctigama* ( $F_{2/9} = 61.34$ ,  $p < 0.001$ ), einer 2-fachen bei *Chlo. vulgaris* ( $F_{2/9} = 99.4$ ,  $p < 0.001$ ) und einer 6-fachen bei *T. obliquus* ( $F_{2/9} = 24.39$ ,  $p < 0.001$ ). Die verschiedenen Mikroalgenarten unterscheiden sich qualitativ in ihrer Reaktion auf Nährstofflimitierung. Bei *Chla. noctigama* und *T. obliquus* konnte zusätzlich eine Erhöhung der Fluoreszenz bei der Limitierung aller Nährstoffe relativ zur Limitierung von Stickstoff gemessen werden ( $p = < 0.001$  und  $p = 0.007$ ). Bei *Chlo. vulgaris* hingegen wurde kein Unterschied zwischen den zwei nährstofflimitierten Medien gefunden ( $p = 0.325$ ).

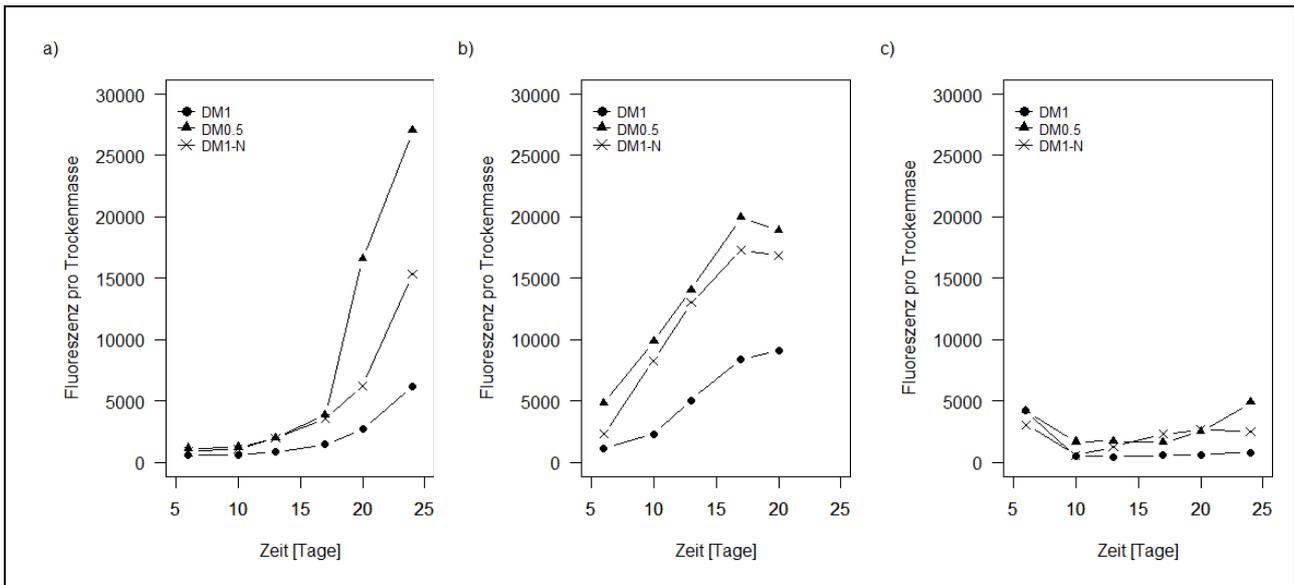


Abb. 7: Veränderung der Fluoreszenz pro mg Trockenmasse von *Chla. noctigama* (a), *Chlore. vulgaris* (b) und *T. obliquus* (c) bei Limitierung aller Nährstoffe (DM0.5), bei Stickstofflimitierung (DM0.5) und ohne Limitierung (DM1) über die Zeitdauer von 25 Tagen.

Bei den drei getesteten Mikroalgenarten wurde mit der Limitierung von Nährstoffen tiefere Trockenmassen gemessen (Abb. 8). Sowohl die Limitierung aller Nährstoffe als auch die Limitierung von Stickstoff führt zu einem geringeren Wachstum dem Mikroalgen. Bei *Chla. noctigama* und *Chlore. vulgaris* betrug diese Abnahme das 0.4-fache ( $F_{2/9} = 51.44$ ,  $p < 0.001$  und  $F_{2/9} = 166.30$ ,  $p < 0.001$ ) relativ zum nicht-nährstofflimitierten Medium, bei *T. obliquus* das 15-fache ( $F_{2/9} = 66.66$ ,  $p < 0.001$ ). Die Unterschiede zwischen den nährstofflimitierten Medien lagen bei allen getesteten Mikroalgen im signifikanten Bereich. *Tetrademus obliquus* bildet bei der Limitierung aller Nährstoffe Aggregate, weshalb die Messung der Fluoreszenz und der Trockenmasse fehlerhaft war.

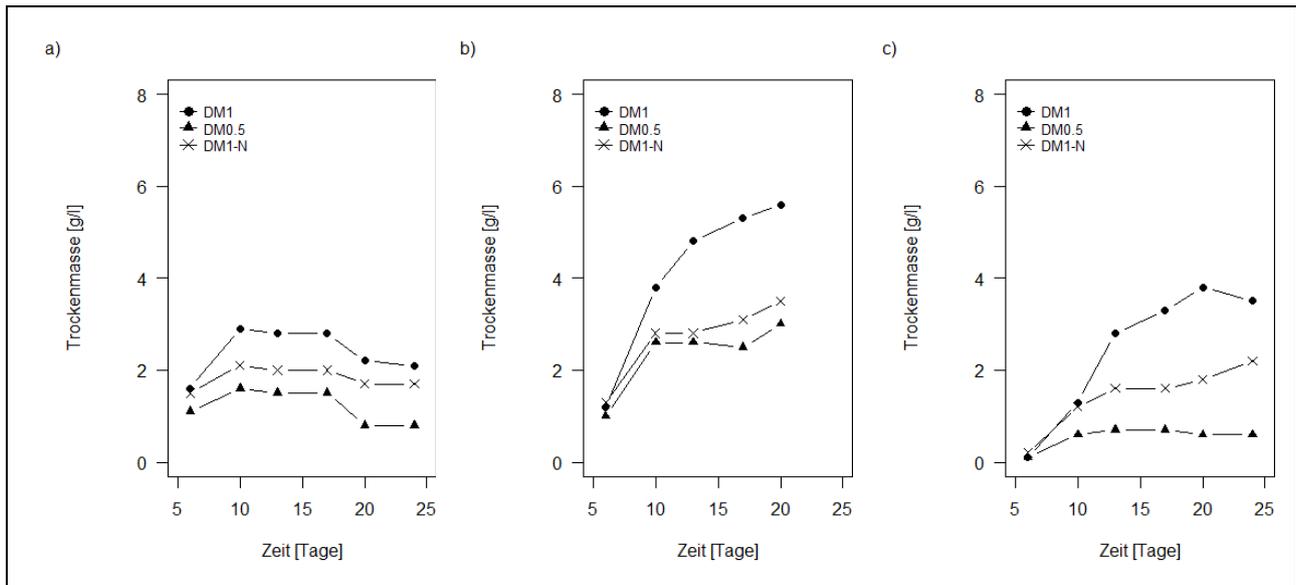


Abb. 8: Veränderung der Trockenmasse von *Chla. noctigama* (a), *Chlorella vulgaris* (b) und *T. obliquus* (c) bei Limitierung aller Nährstoffe (DM0.5), bei Stickstofflimitierung (DM1-N) und ohne Limitierung (DM1) über die Zeitdauer von 25 Tagen.

Bei der Fluoreszenz pro Trockenmasse wurden die höchsten Werte bei der Limitierung aller Nährstoffe erreicht. Wird die Fluoreszenz in der gesamten Probe gemessen, zeigten sich bei allen getesteten Mikroalgenarten die höchste Fluoreszenz in den Stickstofflimitierten Medien (Abb. 9). Bei *Chla. noctigama* wurden mit Nährstoffentzug eine Verdopplung des Lipidgehalts und dementsprechend der Fluoreszenz in der Probe, relativ zum nicht-nährstofflimitierten Medium gemessen ( $F_{2/9} = 14.59$ ,  $p = 0.002$ ). *Chlorella vulgaris* zeigte nur eine bis zu 1.2-fachen Erhöhung der Fluoreszenz in der Probe ( $F_{2/9} = 13.86$ ,  $p = 0.002$ ). Sowohl bei *Chla. noctigama* als auch bei *Chlorella vulgaris* konnte kein Unterschied des Lipidgehalts in der Probe zwischen den zwei nährstofflimitierten Medien gefunden werden ( $p = 0.268$  und  $p = 0.514$ ). Bei *T. obliquus* wurden ebenfalls signifikante Unterschiede in den Medien gefunden ( $F_{2/9} = 76.25$ ,  $p < 0.001$ ). Die Limitierung aller Nährstoffe führte zu einer reduzierten Fluoreszenz in der Probe ( $p = 0.005$ ), die Stickstofflimitierung zu einer Verdopplung der Fluoreszenz ( $p < 0.001$ ).

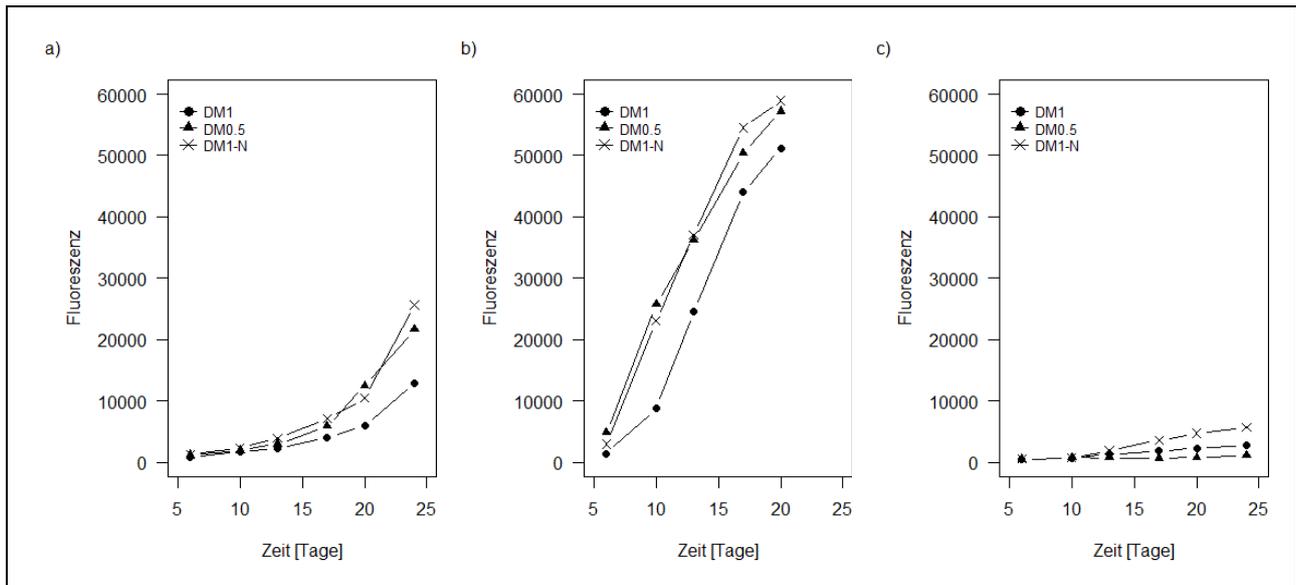


Abb. 9: Veränderung der Fluoreszenz in der Probe von *Chla. noctigama* (a), *Chlo. vulgaris* (b) und *T. obliquus* (c) bei Limitierung aller Nährstoffe (DM0.5), bei Stickstofflimitierung (DM0.5) und ohne Limitierung (DM1) über die Zeitdauer von 25 Tagen.

*Chlamydomonas noctigama* erreichte schon nach zehn Tagen die stationäre Phase in allen Medien und die Trockenmasse nahm anschliessend ab. Zum selben Zeitpunkt nahm die Lipidproduktion zu. Bei *Chlo. vulgaris* begann die stationäre Phase in den nährstofflimitierten Medien ebenfalls am zehnten Tag, die erhöhte Lipidproduktion schon nach sechs Tagen. Dies liegt nahe, dass *Chla. noctigama* mit der erhöhten Produktion von Lipiden beginnt, wenn kein Wachstum mehr stattfinden kann. *Chlorella vulgaris* hingegen hatte zu Beginn der Messungen eine erhöhte Fluoreszenz und steigerte diese auch wenn noch Wachstum möglich war. Werden die Resultate aus der Soxhlet-Extraktion mit einbezogen, wurde der Lipidgehalt in *Chla. noctigama* um die Hälfte unterschätzt. Dies kann bedeuten, dass obwohl bei *Chlo. vulgaris* die höchsten Fluoreszenzen gemessen wurden, *Chla. noctigama* höhere Lipidgehalte aufwies. Bei *T. obliquus* ist wiederum aufgrund der Aggregatbildung keine abschliessende Aussage möglich.

Als Begleitparameter wurde die optische Dichte gemessen. Generell lagen Trockenmasse und optische Dichte näher beieinander, wenn die Algen im Wachstum waren. Bei *Chla. noctigama* und *T. obliquus* lag die optische Dichte in der Wachstumsphase tiefer als die Trockenmasse, bei *Chlo. vulgaris* höher. Sobald die stationäre Phase erreicht wurde, stieg bei *Chla. noctigama* und *Chlo. vulgaris* die optische Dichte weiter an. Bei *T. obliquus* wurde die stationäre Phase in nicht-nährstofflimitierten Medium nicht erreicht, die optische Dichte stabilisierte sich trotzdem. Die optische Dichte lässt sich während der Wachstumsphase gut als Indikator für die Trockenmasse nutzen, ist aber stark von der Mikroalgenart abhängig. Gehen die Mikroalgen in die stationäre Phase über wird die Abschätzung der Trockenmasse aus der optischen Dichte ungenau.

## 4 Diskussion

Die Annahme, dass die Lipidproduktion in Mikroalgen durch die Limitierung aller Nährstoffe und Stickstoff, wie es in diversen Studien beschrieben wurde, konnte mit den drei getesteten Mikroalgen bestätigt werden (Benvenuti et al., 2015; Lari et al., 2016; Mujtaba, Choi, Lee, & Lee, 2012). Für eine möglichst hohe Lipidausbeute eignet sich die Limitierung von Stickstoff besser, als die Limitierung aller Nährstoffe. Obwohl höhere Lipidgehalte in Prozent der Trockenmasse mit der Limitierung aller Nährstoffe erreicht wurde, zeigte sich der Lipidgehalt in der Kultur mit der Stickstofflimitierung als höher. Dies ist möglich, da das Wachstum der Zellen im Stickstofflimitierten Medium weniger stark gehemmt wird, als bei der Limitierung aller Nährstoffe. Dies ist darauf zurück zu führen, dass Stickstoff zwar essenziell für die Proteinbiosynthese ist, aber nicht für die Produktion von anderen Zellbestandteilen (Lari et al., 2016). Trotzdem ist eine Abnahme der Biomasse auch bei einer Stickstofflimitierung zu finden, sofern keine weiteren Massnahmen ergriffen werden.

Eine Möglichkeit, wie die Abnahme der Biomasse verringert werden kann, ist es die Produktion in zwei Teilen zu unterbrechen. Im ersten Teil werden genügend Nährstoffe für ein schnelles und ungehindertes Wachstum zugegeben, bis die maximale Biomasse in der Kultur erreicht wird. In einem zweiten Teil kann eine Limitierung der entsprechenden Nährstoffe eingeleitet werden, welche zu einem Aushungern der Algen und somit einer erhöhten Lipideinlagerung führt. In Mujtaba et al. (2012) wurde eine zweistufige Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen mit *Chlorella vulgaris* getestet. Dabei ging wie in der hier präsentierten Studie *Chlorella vulgaris* in die stationäre Phase über und produzierte vermehrt Lipide. In Mujtaba et al (2012) wurde *Chlorella vulgaris* anschliessend in ein Stickstoffloses Medium überführt. Es zeigte sich, dass die Lipidproduktion in der ersten zwölf Stunden gesteigert werden konnte. Mit *Chlorella vulgaris* ist es demnach möglich die Abnahme der Biomasse durch die Limitierung von Nährstoffen zu umgehen. Ob dies mit *Chlorella noctigama* und *Tetraselmis obliquus* möglich ist, muss mit weiteren Versuchen geklärt werden.

Neben der unterschiedlichen Lipidkonzentration nach 24 Tagen, unterschieden sich die Zeitpunkte, bei denen die Mikroalgen die Lipidproduktion anregten zwischen den Mikroalgenarten. Die Studie von Benvenuti et al. (2015) zeigte auf, dass verschiedene Mikroalgen bei Stickstofflimitierung in unterschiedliche Wachstumsstadien mit der erhöhten Lipidproduktion beginnen. *Neochloris oleabundans* zeigte eine hohe Wachstumsrate während der ersten drei Tagen, stoppte das Wachstum danach und begann mit der Einlagerung von Lipiden. *Nannochloropsis sp.* hingegen zeigte tiefere Wachstumsraten, dafür ein gleichzeitiges Einlagern von Lipiden. Mit *Chlorella noctigama* und *Chlorella vulgaris* konnte derselbe Mechanismus beobachtet werden. *Chlorella vulgaris* begann mit der Lipidproduktion während noch Wachstum möglich war. *Chlamydomonas noctigama* hingegen zeigte tiefe Lipidgehalte während der Wachstumsphase in den ersten zehn Tagen und

sobald kein Wachstum sichtbar war, wurde die Lipidproduktion angeregt. Die unterschiedliche Reaktion der Mikroalgen auf die Nährstofflimitierung sollte bei der Produktion von Lipiden beachtet werden.

Der Vergleich der Nilrotfluoreszenz mit der Extraktionsmethode nach Soxhlet ergab sowohl zwischen den drei getesteten Mikroalgenarten als auch innerhalb derselben Mikroalgenart grosse Unterschiede. Zudem wurde ausschliesslich eine Kultur pro Mikroalgenart mittels Soxhlet-Extraktion gemessen. Diese befand sich in der Wachstumsphase und hatte vergleichsweise tiefe Lipidgehalte. Die Resultate einer Kultur reicht nicht aus für eine Überprüfung der Berechnung des Lipidgehalts aus der Nilrotfluoreszenz. Ausserdem wurde bei der Limitierung von Nährstoffen deutlich höhere Fluoreszenzen gemessen, welche bei einer Umrechnung bei *Chlorella vulgaris* zu unrealistischen Lipidgehalten von <80 % führten. Aus diesem Grund ist die Umrechnung der Fluoreszenz in den Lipidgehalt nicht ohne weitere Untersuchungen möglich.

Da nicht genau gesagt werden kann, wo sich das Nilrot in die Zellen einlagert, besteht die Möglichkeit, dass Nilrot nicht in der Lage war alle Lipide einzufärben. Die Studie von Pick & Rachutin-Zalugin (2012) besagt, dass Nilrot mit kurzkettigen Proteinen und anderen Zellbestandteilen mit einem hydrophoben Anteil reagiert. Bei grösseren Lipideinlagerungen wie sie in den grossen *Chlorella noctigama* Zellen vorkommen kann diese Interaktion mit anderen Bestandteilen zu einer Verlangsamung der Markierung und sogar zur Verhinderung einer gesamten Anfärbung der Lipide führen. Bei den einigesimal kleineren *Chlorella vulgaris* Zellen ist dies hingegen möglich. Bei *Tetraselmis obliquus* sollte dieses Problem nicht vorhanden sein, denn die Zellen haben in etwa die gleiche Grösse wie *Chlorella vulgaris*.

Eine weitere Unsicherheit bei der Markierung mit Nilrot ist, dass Grünalgen, zu welchen die getesteten Mikroalgenarten gehören, oft eine dicke und schlecht durchdringbare Zellwand aufweisen (Pick & Rachutin-Zalugin, 2012). Dies kann trotz der Inkubation in DMSO einen Einfluss auf den Transport des Nilrot in die Zellen haben. Es besteht die Möglichkeit, dass andere Lösungsmittel einen besseren Transport in die Zelle gewährleisten (Chen et al., 2009). Dazu kann in weiteren Versuchen mit anderen Lösungsmitteln getestet werden, ob die Fluoreszenz verändert wird.

In der hier präsentierten Studie wurde ausschliesslich die Gesamtmenge an Lipiden in den Mikroalgen beachtet. Die Zusammensetzung der Fettsäuren in den Zellen wurde nicht gemessen. Diese kann sich je nach Düngungszustand der Algen verändern (Breuer, Lamers, Martens, Draaisma, & Wijffels, 2012). In dieser Studie wird gezeigt, dass mit einer Nährstofflimitierung die Zusammensetzung der Fettsäuren in Grünalgen in Richtung von ungesättigten Fettsäuren verschoben wird. Diese ungesättigten Fettsäuren sind von besonderem Interesse für die Industrie. Die Studie behandelt nur *Chlorella vulgaris* und *Tetraselmis obliquus*, weshalb bei *Chlorella noctigama* anhand dieser Studie keine Aussage gemacht werden kann. Mit weiteren Versuchen können die

Resultate der Studie von Breuer et al. (2012) bei *Chlorella vulgaris* und *T. obliquus* bestätigt werden und bei *Chla. noctigama* gemessen werden, ob eine Übertragung der Resultate möglich ist.

Auf Grund der sehr unterschiedlichen Resultate und Aufbau der getesteten Mikroalgen muss für eine quantitative Analyse des Lipidgehalts mittels Nilrotfluoreszenz für jede Alge einzeln eine Standardkurve erstellt werden, welche den effektiven Lipidgehalt mittels Extraktion im Zusammenhang mit der Nilrot-Fluoreszenz beschreibt. Dafür sollen die Mikroalgen mit dem Entzug von Nährstoffen höhere Lipidgehalte produzieren, welche dann über die Nilrot-Fluoreszenz und die Soxhlet-Extraktion gemessen werden können. Zudem besteht dann auch die Möglichkeit die Parameter der Nilrotfluoreszenz den einzelnen Mikroalgenarten anzupassen.

Die Nilrotfluoreszenz eignet sich nur als halbquantitative Methode für die Bestimmung von Lipiden, da sich die Messresultate der Nilrot-Fluoreszenz und der Soxhlet-Extraktion stark unterscheiden. Zudem sind während der Methodenentwicklung und den folgenden Versuchen weitere Unsicherheiten aufgetreten.

Eine Fehlerquelle ist der Farbstoff selbst. Nilrot ist lichtempfindlich und bei falscher Lagerung kann es zu grossen Unterschieden in der Qualität des Farbstoffes kommen. Sobald das Nilrot in Lösung ist, ist diese nur beschränkt auf drei Monate bei 4 °C haltbar und sollte deshalb aliquotiert eingefroren werden. Aufgrund dessen ist die Zeit in der Methode ein wichtiger Faktor. Werden die zehn Minuten nach der Zugabe von Nilrot nicht eingehalten oder die Proben im Licht inkubiert, kann es zu einem Ausbleichen des Farbstoffes und somit zu falschen Resultaten führen (Govender, Ramanna, Rawat, & Bux, 2012).

Eine andere Fehlerquelle ist die Konzentration der Mikroalgen. Wenn hohe Konzentrationen an Mikroalgen vorhanden sind, besteht die Möglichkeit, dass die Zellen die Fluoreszenz abschwächen und der Lipidgehalt unterschätzt wird (Chen et al., 2009). Dieser Effekt wurde in der Methode bisher vernachlässigt.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Nilrot-Fluoreszenz sich für eine halbquantitative Messung von Lipiden eignet und gut zur Überwachung der Lipide in einer Kultur genutzt werden kann. Sollen aber absolute Lipidgehalte gemessen werden, kann die Methode erst nach weiteren Versuchen verwendet werden. Die Nilrotfluoreszenz sollte in jedem Falle mit einer gravimetrischen Methode überprüft werden.

## Literaturverzeichnis

- Benvenuti, G., Bosma, R., Cuaresma, M., Janssen, M., Barbosa, M. J., & Wijffels, R. H. (2015). Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation. *Journal of Applied Phycology*, *27*, 1425–1431.
- Bertozzini, E., Galluzzi, L., Penna, A., & Magnani, M. (2011). Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. *Journal of Microbiological Methods*, *87*, 17–23.
- Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, *25*, 743–756.
- Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., & Vítová, M. (2011). Microalgae—novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, *108*, 766–776.
- Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., & Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresource Technology*, *124*, 217–226.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, *77*, 41–47.
- Dortch, Q. (1990). The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, *61*, 183–201.
- Govender, T., Ramanna, L., Rawat, I., & Bux, F. (2012). BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresource Technology*, *114*, 507–511.

- Greenspan, P. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *The Journal of Cell Biology*, *100*, 965–973.
- Guillard, R. R. . (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* (pp. 26–60). New York, N.Y: Plenum Press.
- Huber, G. W., Iborra, S., & Corma, A. (2006). Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering. *Chemical Reviews*, *106*, 4044–4098.
- Lari, Z., Moradi-kheibari, N., Ahmadzadeh, H., Abrishamchi, P., Moheimani, N. R., & Murry, M. A. (2016). Bioprocess engineering of microalgae to optimize lipid production through nutrient management. *Journal of Applied Phycology*, *28*, 3235–3250.
- Li, Y., & Qin, J. G. (2005). Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. *Journal of Applied Phycology*, *17*, 551–556.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*, 217–232.
- Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.-G., & Lee, K. (2012). Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. *Bioresource Technology*, *123*, 279–283.
- Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, *20*, 459–466.
- Pick, U., & Rachutin-Zalogin, T. (2012). Kinetic anomalies in the interactions of Nile red with microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, *88*, 189–196.
- R Core Team. (2015). R: A language and environment for statistical computing. (Version Version 1.1.456). Vienna, Austr: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.R-project.org/>
- Rittmann, B. E. (2008). Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, *100*, 203–212.

- Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., ... Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 8, 42.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35, 35.
- Vitova, M., Bisova, K., Kawano, S., & Zachleder, V. (2015). Accumulation of energy reserves in algae: From cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 33, 1204–1218.
- Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., & Chen, Y. (2011). Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology*, 102, 159–165.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anregungsscan (a) und Emissionsscan (b) durchgeführt mit markierten und nichtmarkierten <i>Chlorella vulgaris</i> Proben, Triolein und einer Leermessung mit DMSO und Wasser. ....	12
Abb. 2: Fluoreszenz von <i>Chlorella noctigama</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Tetraselmis obliquus</i> und DMSO bei der Endkonzentration von Nilrot ( $\mu\text{g/ml}$ ) in der Probe. ....	13
Abb. 3: Zeitliche Veränderung der Fluoreszenz von mit Nilrot markierten <i>Chlorella noctigama</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Tetraselmis obliquus</i> und Triolein .....	14
Abb. 4: Standardkurve für die Berechnung der Lipidkonzentration aus der Fluoreszenz in $\mu\text{g/ml}$ Triolein ...	15
Abb. 5: Vergleich des Lipidgehalts mittels Soxhlet Extraktion und mittels Nilrotfluoreszenz gemessen. Bei der Soxhlet-Extraktion wurden zwei Replikate gemessen und die Standardabweichung berechnet. Die Nilrotfluoreszenz wurde mit vier Replikaten gemessen und die Standardabweichung berechnet.....	16
Abb. 6: Fluoreszenz pro Zelle von verschiedenen Mikroalgen.....	17
Abb. 7: Veränderung der Fluoreszenz pro mg Trockenmasse von <i>Chlorella noctigama</i> (a), <i>Chlorella vulgaris</i> (b) und <i>Tetraselmis obliquus</i> (c) bei Limitierung aller Nährstoffe (DM0.5), bei Stickstofflimitierung (DM0.5) und ohne Limitierung (DM1) über die Zeitdauer von 25 Tagen. ....	18
Abb. 8: Veränderung der Trockenmasse von <i>Chlorella noctigama</i> (a), <i>Chlorella vulgaris</i> (b) und <i>Tetraselmis obliquus</i> (c) bei Limitierung aller Nährstoffe (DM0.5), bei Stickstofflimitierung (DM1-N) und ohne Limitierung (DM1) über die Zeitdauer von 25 Tagen. ....	19
Abb. 9: Veränderung der Fluoreszenz in der Probe von <i>Chlorella noctigama</i> (a), <i>Chlorella vulgaris</i> (b) und <i>Tetraselmis obliquus</i> (c) bei Limitierung aller Nährstoffe (DM0.5), bei Stickstofflimitierung (DM0.5) und ohne Limitierung (DM1) über die Zeitdauer von 25 Tagen.....	20
Abb. S 1: Anregungsscan (a) und Emissionsscan (b) durchgeführt mit markierter und nichtmarkierter <i>C. noctigama</i> , Triolein und einer Leermessung ausschliesslich mit DMSO und Wasser. ....	30
Abb. S 2: Anregungsscan (a) und Emissionsscan (b) durchgeführt mit markierter und nichtmarkierter <i>T. obliquus</i> , Triolein und einer Leermessung ausschliesslich mit DMSO und Wasser.....	30
Abb. S 3: Vergleich der Entwicklung der Trockenmasse ( $\text{g/l}$ ) und der optischen Dichte (ohne Einheit) von <i>Chlorella noctigama</i> in den Medien DM1 (a), DM1-N (b) und DM0.5 (c) .....	31

Abb. S 4: Vergleich der Entwicklung der Trockenmasse (g/l) und der optischen Dichte (ohne Einheit) von *Chlorella vulgaris* in den Medien DM1 (a), DM1-N (b) und DM0.5 (b) ..... 31

Abb. S 5: Vergleich der Entwicklung der Trockenmasse (g/l) und der optischen Dichte (ohne Einheit) von *Tetraselmis obliquus* in den Medien D1 (a), D1-N (b) und D0.5 (c) ..... 32

## Tabellenverzeichnis

Tab. S 1: Zusätzlich gemessene Parameter der Kulturen für die Soxhlet-Extraktion. Die *Chla. noctigama* Probe aus dem Reaktor enthält zu 4 % *T. obliquus*. ..... 32

## Anhang

Anhang A: Zusätzliche Grafiken.....	30
Anhang B: Zusätzliche Tabellen.....	32
Anhang C: Selbstständigkeitserklärung.....	33

## Anhang A: Zusätzliche Grafiken

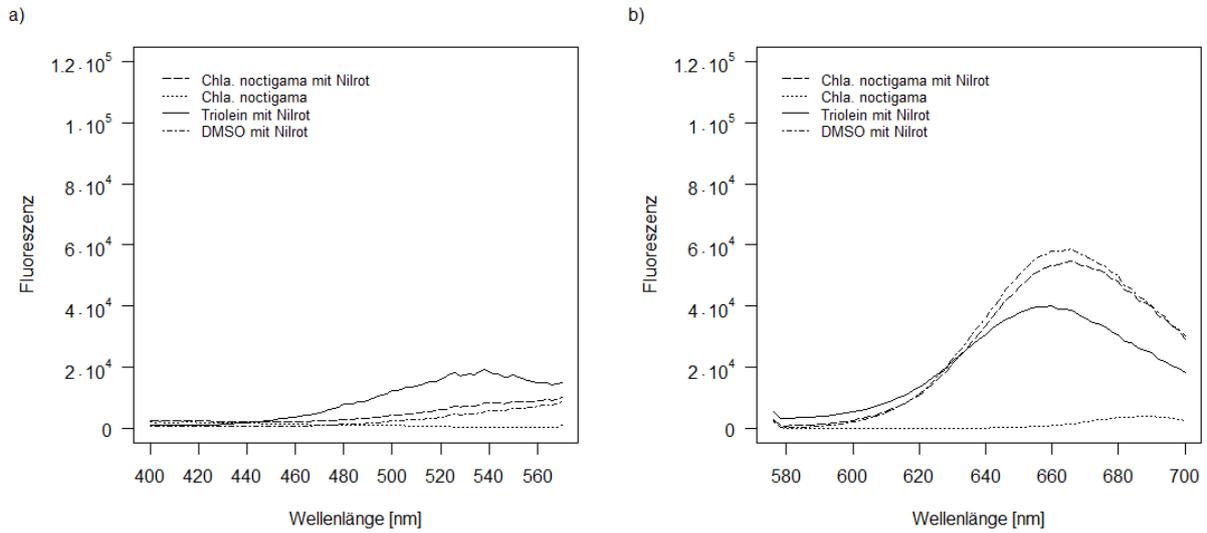


Abb. S 1: Anregungsscan (a) und Emissionsscan (b) durchgeführt mit markierter und nichtmarkierter *C. noctigama*, Triolein und einer Leermessung ausschliesslich mit DMSO und Wasser.

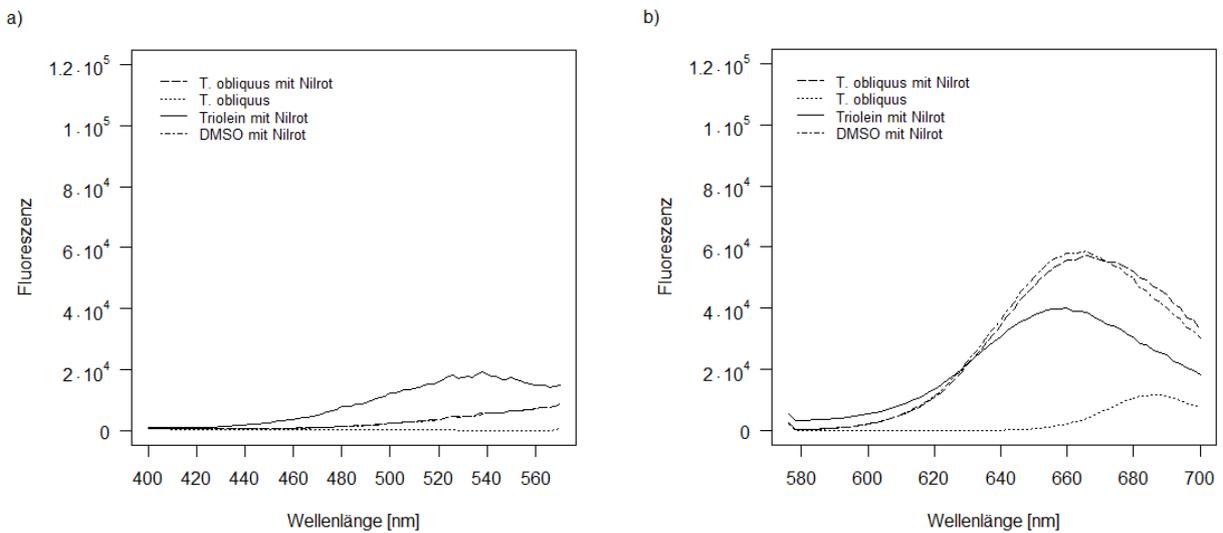
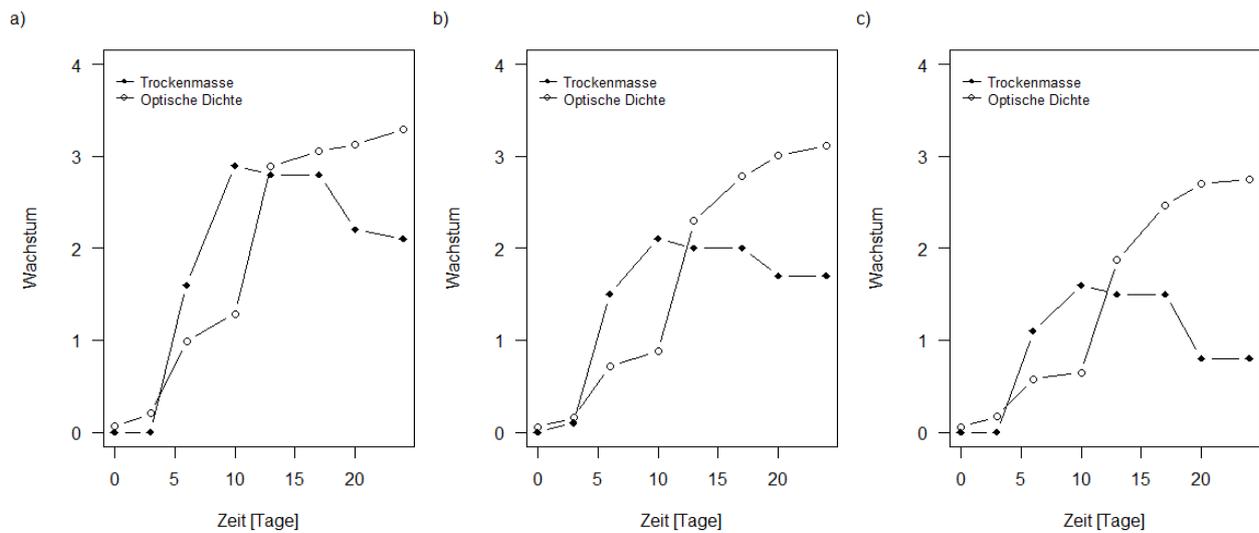
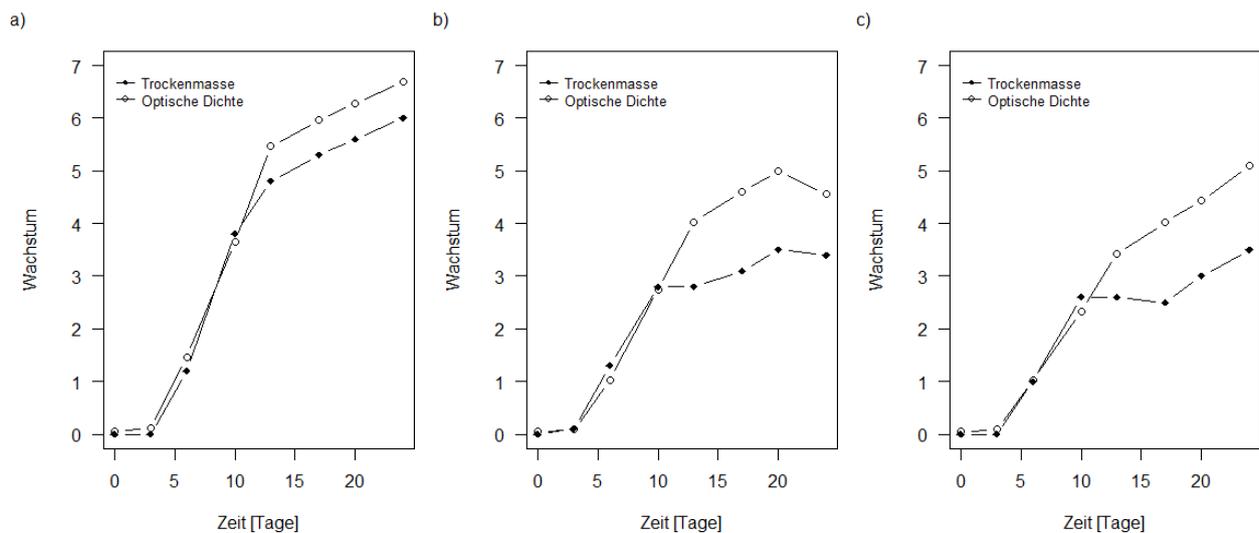


Abb. S 2: Anregungsscan (a) und Emissionsscan (b) durchgeführt mit markierter und nichtmarkierter *T. obliquus*, Triolein und einer Leermessung ausschliesslich mit DMSO und Wasser.



**Abb. S 3:** Vergleich der Entwicklung der Trockenmasse (g/l) und der optischen Dichte (ohne Einheit) von *Chla. noctigama* in den Medien DM1 (a), DM1-N (b) und DM0.5 (c)



**Abb. S 4:** Vergleich der Entwicklung der Trockenmasse (g/l) und der optischen Dichte (ohne Einheit) von *Chlo. vulgaris* in den Medien DM1 (a), DM1-N (b) und DM0.5 (b)

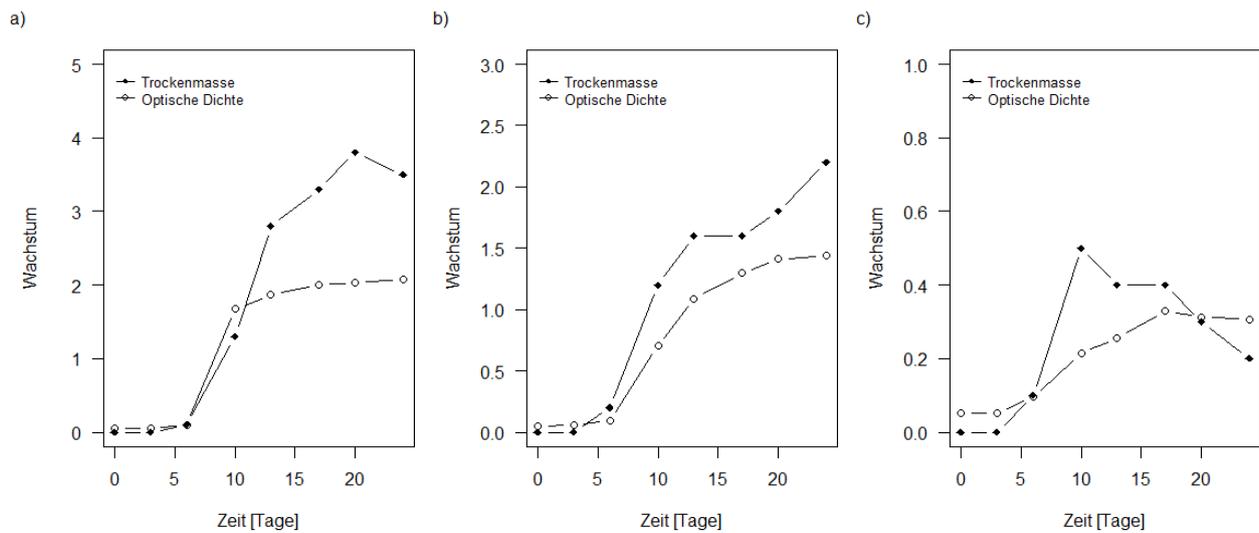


Abb. S 5: Vergleich der Entwicklung der Trockenmasse (g/l) und der optischen Dichte (ohne Einheit) von *T. obliquus* in den Medien D1 (a), D1-N (b) und D0.5 (c)

## Anhang B: Zusätzliche Tabellen

Tab. S 1: Zusätzlich gemessene Parameter der Kulturen für die Soxhlet-Extraktion. Die *Chla. noctigama* Probe aus dem Reaktor enthält zu 4 % *T. obliquus*.

	<i>C. noctigama</i> (Reaktor)	<i>C. noctigama</i> (Inkubator)	<i>C. vulgaris</i>	<i>T. obliquus</i>
Trockenmasse [g/l]	5.0	2.9	4.3	3.6
Zell-dichte [Zellen/ml]	$1.15 \cdot 10^8$	$5.64 \cdot 10^6$	$2.96 \cdot 10^8$	$1.15 \cdot 10^8$
Optische Dichte	0.485	0.569	0.440	0.340
Nilrotfluoreszenz	225	3118	1950	1532

## Anhang C: Selbstständigkeitserklärung

### Erklärung betreffend das selbstständige Verfassen einer Bachelorarbeit im Departement Life Sciences und Facility Management

Mit der Abgabe dieser Bachelorarbeit versichert der/die Studierende, dass er/sie die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst hat.

Der/die unterzeichnende Studierende erklärt, dass alle verwendeten Quellen (auch Internetseiten) im Text oder Anhang korrekt ausgewiesen sind, d.h. dass die Bachelorarbeit keine Plagiate enthält, also keine Teile, die teilweise oder vollständig aus einem fremden Text oder einer fremden Arbeit unter Vorgabe der eigenen Urheberschaft bzw. ohne Quellenangabe übernommen worden sind.

Bei Verfehlungen aller Art treten Paragraph 39 und Paragraph 40 der Rahmenprüfungsordnung für die Bachelor- und Masterstudiengänge an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften vom 29. Januar 2008 sowie die Bestimmungen der Disziplinarmaßnahmen der Hochschulordnung in Kraft.

Ort, Datum:

Unterschrift:

11.03.2019.....

