



A review of PhD thesis of Karolína Ranglová “Cultivation, Monitoring and Application of Microalgal Cultures”

The present thesis is focused on highly interesting as well as highly up-to-date topic of microalgal biotechnologies. Algae *sensu latissimo* (in this case also including Cyanobacteria) influence our everyday lives more than one is usually aware of. Contrary to products of fossil algae and macroalgae the large-scale utilization of microalgae in wide array of applications is still in early stage. Candidate's publications included in this thesis are a contribution to further development of mass cultivation techniques of microalgal strains.

Karolína Ranglová performed her PhD study and research in Centre Algatech in Třeboň, one of institutions which significantly contribute to development of microalgal biotechnologies for 60 years (in this year 2020). Hence, Karolína Ranglová's research was tightly bound with institution's research topics and favorite organisms, mostly from their “pet” genus *Chlorella*.

The thesis consists of four chapters and seven annexes in form of published and submitted papers co-authored by the candidate. First chapter serves as a kind of General introduction. Especially first section of this part shows that its author pays attention to field-specific literature only and does not consider primary or more specific sources of information she works with. Since this is Ph.D. thesis, I would expect more sophisticated description of microalgae than the first paragraph with information on level of high school (no specification of evolutionary lineages where photoautotrophic microorganisms occur etc.). Another example is on page 3, where the author states: “Microalgae can be divided to four groups according their light-harvesting photosynthetic pigments: Rhodophyta (red algae), Chromophyta (brown algae), Chlorophyta (green algae) and cyanobacteria (Masojídek et al. 2013).” The cited work is a chapter from a field specific book, on the other hand, Chapter 1 of the thesis is more general, so more general information should be given and more general literature should be used – there is additional group of phototrophic microorganisms, which has another composition of photosynthetic pigments, i.e. Cryptophyta. Part 1.1 is dedicated to short overview of microalgal biotechnology including main types of product and, cultivation technologies. In this part were omitted photobioreactors and raceways, which are both widespread technologies of commercial microalgae production. Why? Part 1.2 is more focused on mass cultivation of microalgae. Here it is noticeable that this topic is author's cup of tea and provides decent amount of information for reader outside the field in sufficient depth.

The second chapter is dedicated to monitoring and maintenance of mass cultures and is bound with Annexes I and II. I have mixed feelings concerning this chapter. Its introduction is written clearly, but in some parts the text would need to be polished. E.g. just at the beginning the second sentence (on biological examination) does not make sense between the first and the third one (both on physicochemical variables). In the part 2.3 both papers contribute with no doubt to knowledge on optimization methods for mass cultivation of particular strains and on suitable Selenium concentrations for production of Se enriched biomass. However, there are some points to be clarified in both publications. In the first study included in this section authors used two strains of *Nostoc* sp. and *Cylindrospermum alatosporum* among others. These three organisms are soil or benthic and form larger colonies contrary to the other strains, which are more or less planktic, thus forming uniform suspension. This could influence the photosynthesis measurements: How was this factor reflected during the experiment? In the second paper in this section authors present three



experiments – test of three concentrations of Se in one light intensity, test of one concentration of Se in three light intensities both indoors, and test of one concentration outdoors. Why the indoor tests were performed in duplicates only? How was chosen the concentration of Se for test 2? On page 18 the candidate states “...According to these results, the effective concentration of 16 mg Se g⁻¹ DW was used to study changes of photosynthetic activity under various light intensities...”, but the above mentioned concentration was not tested. In conclusions of this chapter the last paragraph does not make sense in context of previous text – it is just a repetition of the first sentence of section 2.1 written in other words.

In the third chapter candidate the focused onto mass cultivation systems. The introduction and parts 3.1 to 3.3 are well written with some relatively minor issues. E.g., there are many superfluous citations in last paragraph at page 25 – all papers are on the same topic with some alterations so why not to cite just the most recent one (which is missing in the references)? Other, and according to my opinion more important is the work with literature. More than half (9 of 16) of citations in this chapter has was written or at least co-authored by staff of Centre Algatech. The rest of references is seven years old or more, which is a lot in such dynamic field like algal biotechnology. This means the candidate is not very familiar with other publications and her overview of trends in the field may be limited. As an example may serve last paragraph of section 3.3 on productivity of photobioreactors – the candidate states that “In PBRs, despite some disadvantages, higher biomass density can be achieved than in open systems (with the exception of thin-layer systems).”, but there exist publications (reviewed e.g. in Nwoba et al. 2019) reporting even higher productivity than thin-layer systems. In this chapter I have to leave a comment also on Annex IV. Formally it is a regular review published in an international journal. On the other hand, it is more a PR text on workplace’s achievements published in special volume of the journal. I would be restrained in including such paper in the dissertation thesis, especially in case of the candidate, who has many other publications.

In fourth chapter the candidate deals with use of microalgae. Its introductory part is more or less sufficiently informative but should be more comprehensive. E.g., in section 4.2 Human and animal nutrition is completely omitted consumption of whole biomass of microalgae, which in some part of the world is traditional and even vital! The section is also imbalanced in terms effects of consumption – only positive effects are mentioned even though there exist published reports on negative effects. Another example is in subsection 4.2.2, where mostly “Chlorella” is mentioned even there are more taxa used in animal nutrition (*Limnospira* spp., *Aphanizomenon flos-aquae*). In following parts 4.3 and 4.4 are described methods of testing of antimicrobial, antifungal, and partially also biostimulating activities. They are well described. I am missing such a methodological overview for assessment of germination assay, and bioaccessibility assay of Se- amino acids (part 4.5.2). Why the author omitted results auxin- and cytokinin-like assay from chapter 4.5.3? In conclusions of chapter 5 the author states “The disintegration process influenced the bioaccessibility of Se-AAs in the Se-Chlorella biomass.”, which is definitely correct, but based on current knowledge, this is not a new finding. The fact, that green algal biomass has to be disintegrated before consumption in order to make cell content available/digestible, is known for many years and also mentioned by the candidate on page 41.

Overall, my feelings concerning the thesis are rather mixed. On one hand it is supported by very decent number of papers and one submitted manuscript and substantial part is well written. On the other hand, a PhD candidate should be able to keep an overview on literature in broader field than field of thesis’s topic and should be able to take advantage of such literature in the thesis. In case of this thesis 1/5 of references originated at least in some extent at candidate’s workplace; primary literature is not used very often (e.g. Masojídek & Torzillo 2014 were not the first nor the most



recent, who estimated age of Cyanobacteria). Another point I would rise is scientific exactness of the theses. The candidate often uses generic names without any specification. As an example, may serve "Chlorella". There exist 97 species names within the genus Chlorella, 31 of them nowadays belong to the genus (Guiry & Guiry 2020), the rest was transferred to other genera or is invalid. And there is even more strains of Chlorella and former-Chlorella. In this context, which "Chlorella" is the candidate talking about?? In some case she uses strain numbers, which is correct, but most cases the statements lack proper identification make no sense. The whole text feels like it has been finished in rush without proper proof-reading – 23 (!) cited works are missing in references (those with obvious typographic errors like Liy vs. Liu or Zittelli vs Zitelli not counted); citation Velusamy & Das 2014 occurs twice in References; there is incorrect usage of plural in several places; historical photographs in Chapter 3.4.3 and many other graphs, tables and figures have no source cited.

Despite my objections listed above, the present work still meets the requirements for Ph.D. theses and I recommend it to be accepted for defense.

In České Budějovice, 23. 11. 2020

Digitally signed by
RNDr. Tomáš Hauer,
Ph.D.
Date: 2020.11.23
13:03:10 +01'00'
RNDr. Tomáš
Hauer, Ph.D.
Tomáš Hauer

Questions for the Candidate:

- 1) I am aware that taxonomic changes are not quickly reflected in biotechnologies, e.g. because of "rigidity" of certification processes. How many genera contain now species produced under commercial name Chlorella?
- 2) Could you estimate what is a real share of PBR's, TLC's, and RWP's on biomass production?
- 3) Annex V deals with mass cultivation of *Arthrospira platensis* M2. What is the origin of the strain? Which of the tested technologies is more feasible for production of this organism in terms of capital and operational costs?



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BOTANIKY

Korespondenční adresa: Benátská 2, CZ-128 01 Praha 2, Czech Republic

Tel.: +420 221 951 646

Fax: +420 221 951 645

Posudek na doktorskou práci Karolíny Ranglové: Cultivation, Monitoring and Application of Microalgae Cultures

Předložená doktorská práce obsahuje celkem 4 kapitoly. Práce je založena na 6 impaktových publikacích (1x je K. Ranglová první autor) a jednom rukopisu, opět prvo-autorském. Podíl Karolíny na jednotlivých publikacích je uveden na začátku práce a všechny publikované články a rukopis tvoří přílohu této práce.

První kapitola zahrnuje obecný úvod, kde je představena řasová biotechnologie a hlavní kultivační podmínky ovlivňující růst mikrořas. Rozhodně bych uvítala přesnější charakteristiku/rozdělení mikrořas. Je třeba si uvědomit, že eukaryotické mikrořasy netvoří žádnou evoluční jednotku a patří do různých říší eukaryot (supergroups) většinou i s mnohobuněčnými příbuznými. V podstatě se jedná o nepříbuzná protista (=jednobuněčné organismy), která dokázala během evoluce získat a udržet si chloroplast. Ať už procesem primární, sekundární či seriálních endosymbióz. Z rozdílného evolučního původu mikrořas plyne mimo jiné i ohromná rozmanitost jimi produkováných bioaktivních látek. Sinice jsou bakterie (konkrétně gramnegativní) ne jejich blízcí příbuzní. Podmínky ovlivňující růst řasových kultur jsou velmi komplexní a často provázané (ne pouze osvit, teplota a živiny, ale třeba i pH, sedimentace, výměna plynů, evaporace, příp. kontaminace jinými mikroorganismy). Bylo by asi správné zdůraznit, že se autorka věnuje jen těm nejdůležitějším, v kapitole o živinách bych uvítala zmínku o mikronutrientech.

Druhá kapitola pojednává o sledování a udržování kultur. Představuje soubor analýz fluorescence chlorofylu jako rychlé, citlivé a obecně používané metody pro okamžité zjištění fyziologického stavu pěstované řasové kultury. Autorka přehledně popisuje jednotlivé metody a vysvětluje jejich princip. Jako komplementární metodu pro optimalizaci růstových režimů příp. detekci nevhodných podmínek představuje měření produkce O₂. Součástí této kapitoly je i rekapitulace obsahu dvou impaktových článků, kde je analyzována fluorescence chlorofylu, tato srovnána s růstovou křivkou a využita pro hodnocení růstových charakteristik (teplotní optimum

E-mail: botanika@natur.cuni.cz

Fakturační adresa: Albertov 6, 128 43 Praha 2

<http://botany.natur.cuni.cz>

IČO: 00216208; DIČ: 001-00216208

růstu několika kmenů – Annex I a dávky anorganického Se, která již způsobuje inhibici růstu. Tato dávka je ovlivněna intenzitou záření – Annex II).

Jádrem celé práce je třetí kapitola, která se zabývá kultivačními systémy. V úvodu jsou popsány základní principy laboratorní kultivace, venkovní otevřené systémy (někdy pro redukci vnějších vlivů umístěné do skleníku) a fotobioreaktory. V úvodu této kapitoly autorka porovnává výhody a nevýhody jednotlivých velkoobjemových kultivačních systémů jako srovnávací kritérium používá max. výtěžek jednotlivých systémů. Chybí mi tu údaj, jak dlouho jednotlivé kultivace probíhaly, tj. po jakou dobu je možné tento výtěžek udržet (dny, měsíc/e). Text je vhodně doplněn obrázky různých typů kultivačních systémů. Součástí jsou shrnutí tří IF publikací; jeden přehledový článek typu review (Annex 3), pojednávající o vývoji zařízení pro kultivace řas v tenké vrstvě a dva články založené na originálních datech (Annex 4 a 5).

Čtvrtá kapitola se zabývá využitím mikrořas (potravinové doplňky, biopesticidy a biostimulanty). Tady bych uvítala oddělení komerčně vyráběných produktů z řas a sinic (většinou se jedná o potravinové doplňky z velkoplošně pěstovaných kmenů sinice *Arthrospira* a zelených řas *Chlorella*, *Dunaliella* a *Haematococcus*) od laboratorně testovaných aktivit (antifungální, antibakteriální, stimulační růst rostlin). V lidské výživě (potravinové doplňky) hrají důležitou roli i kmeny jiných rodů než zmíněné *Arthrospira* a *Chlorella*, např. eustigmatofyt *Nannochloropsis*, ruducha *Porphyridium* nebo již v úvodu zmíněné *Dunaliella* a *Haematococcus*. Následně jsou v úvodní kapitole přehledně popsány a obrazově dokumentovány testy stimulačních/inhibičních účinků látek (obecně) na růst patogenů a testy pro zjištění biostimulační aktivity řasových extraktů a suspenzí. Součástí této kapitoly je shrnutí obsahu impaktového článku, testujícího velmi komplexním způsobem dostupnost Se-aminokyselin v Se-oboženém preparátu chlorelly a srovnání obsahu a dostupnosti s různými na Se bohatými potravinami (Annex 6). Rukopis zasláný k publikaci do časopisu s IF (Algal Research) srovnává kultivaci kmene *Chlorella* MACC-1 ve dvou různých venkovních systémech, v anorganickém médiu a městské odpadní vodě.

Ve svém posudku se snažím komentovat a kriticky hodnotit především úvody jednotlivých kapitol. Téměř všechny články prošly recenzním řízením a byly publikovány v respektovaných oborových časopisech. Přinášejí velmi zajímavé vědecké poznatky a posunují teoretická zjištění blíže k praktickému využití.

Předložená práce představuje tematicky ucelené dílo. Dokládá, že Karolína Ranglová zvládla základy vědecké práce a je schopná pracovat v týmu. Předložené publikace mohou tvořit odrazový můstek pro její další vědeckou kariéru. Doktorská práce rozhodně splňuje požadavky kladené na tento typ práce a já ji doporučuji k obhajobě.

K práci mám několik dotazů:

1. Jaké formy N využívají řasy přednostně a proč?
2. *Chlorella vulgaris* R 117 (Annex 1) vykazuje velmi širokou teplotní valenci. Do jaké míry se jedná o evoluční paměť a do jaké míry se dokáže adaptovat?
3. Historie kultivací řas v tenké vrstvě – 1963-70 – průměrný výtěžek kolem 10 g/m²/d; v letech 2000-17 už cca 15 g/m²/d. Co vedlo k takto výraznému zvýšení? Kolik dní trvá průměrně kultivace?
4. Proč je *Arthrospira* dobře stravitelná? Mají všechny chlorelly celulózní buněčnou stěnu?
5. Jaké druhy řas se mohou vyskytovat v produktech (prášek, tablety) komerčně nazývaných „chlorela“? Görs et al. 2010 J Appl Phycol (2010) 22:265–276
6. Jaká je optimální hodnota F_v/F_m pro řasové a sinicové kultury? Lze mluvit o jednom konkrétním čísle tak, jak to víceméně platí u cévnatých rostlin (0.83)?

Pozn. Sinice rodu *Cylindrospermopsis* byly převedeny do rodu *Raphidiopsis* na základě molekulárních dat (Aguilera et al. 2018; <https://doi.org/10.2216/17-2.1>). Rodové jméno *Raphidiopsis* má přednost, protože bylo publikováno dříve. Správné je tedy použít rodové jméno *Raphidiopsis* (viz. Annex 1).

V Praze 18.11. 2020



Doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

Institute of Microbiology

Czech Academy of Sciences

Center of Excellence Algatech

379 81 Třeboň, Czech Republic



Review of PhD thesis of ing. Karolína Ranglová

Cultivation, Monitoring and Application of Microalgae Cultures

General evaluation

The presented thesis is mostly focused on the monitoring and optimization of microalgal cultures for biotechnological application.

The thesis consists of four chapters. Chapter #1 represents a general introduction about microalgae. Chapter #2 describes the application variable chlorophyll fluorescence measurements for monitoring of algal cultures. Chapter #3 describes various designs of cultivation units. Chapter #4 describes the practical utilization of algae for human or animal nutrition. Special attention is paid to Se-enriched *Chlorella*. Each chapter contains an introduction part and one or two case studies representing the experimental work. The case studies correspond to the seven publications enclosed, two where the PhD candidate is the first author and five chapters in co-authorship.

The submitted thesis clearly demonstrates the student's ability to orient himself in the scientific literature, summarize the current knowledge, identify research questions, perform original research, as well as to summarize and publish the obtained results. The thesis is a solid piece of work of good quality. English is good. There are only few typos and misspelling. The author presents new information and expanding our knowledge how chlorophyll fluorescence can be applied for monitoring of physiology of algal cultures.

Despite of that the text contains some problems which I am listing below.

Abbreviations:

Definition of F_0 and F_m' is incorrect. Please revise.

HPLC-APCI-HRMS – the full name incomplete

Chapter 1

Page 3. The presented division of microalgae on Rhodophyta, Chromophyta, Chlorophyta and Cyanobacteria is very old-fashioned. More modern system should be adopted.

Page 4. The paragraph starting *Light intensity and temperature ...* does not really fit here.

Probably should be move to the next subchapter.

Chapter 2

The author cites mostly publications from Prof. Masojídek and collaborators. She should cite also some original papers from Prof. Schreiber, Prof. Strasser, Prof. Nedbal, Prof. Falkowski etc. There is a whole book about Chlorophyll fluorescence published in Advances in Photosynthesis and Respiration series in 2010, definitely worth to read.

Experiments with Selenite do not have an optimal design as there are no replicates. It is not possible to calculate experimental error (i.e. as the standard deviation calculated from three replicates).

Chapter 3

There seems to be a mistake in the Legend of Fig. 10.

Growth of *Chlorella* in a photobioreactor – authors talk about exponential growth between day 3 and 9 of the experiment. From the difference between the two light regimes it seems that the cultures were light limited. In this case growth is probably only linear – biomass would be proportional to the delivered light energy. The Exponential growth can be only observed under light saturating conditions.

Pages 33-34 have strange formatting.

Chapter 4

From the text at page 51-53 it is not clear how the tests were performed. The description is very superficial. It is the pity as this is author's own work. The details of the extraction is not clear even in attached MS #7. Fig. 21 – what the lower case letters above the bars mean? It is not described in the legend. Also in Fig. 6 of the MS#7. Tables 2 and 3 in MS #7 are not very clear.

The thesis lacks general discussion of the main findings and clear conclusion.

In summary, the thesis contains original and interesting work which contributes to our knowledge of algal biotechnology. The work meets standards for a PhD thesis and I recommend its acceptance.

In Třeboň, Nov. 9th, 2020



Doc. Michal Koblížek Ph.D.

Inst of Microbiology CAS, Třeboň

Posudek na PhD práci

Karolína Ranglová (2020): Cultivation, monitoring and application of microalgal cultures – Jihočeská univerzita v Č.Budějovicích, Fakulta zemědělská, 174pp.

Téma práce: Mikrořasy mají velký význam v přírodě, podílí se téměř polovinou na globálních cyklech C i O₂. Od 2 sv. války pak roste i jejich využití v biotechnologii. Původní idea produkce laciné bílkoviny jako potrava lidí se ale příliš neujala. Spíše se nyní ukazují zajímavější aplikace jako producenti karotenoidů, mastných kyselin, biologicky aktivních látek atd.

Literární úvod: Jmenovaná zřejmě obsáhla velké množství literatury. Doplnil bych pouze málo známý fakt, že vůbec první publikace o kultivaci mikrořas ve větším objemu byly z doby 2 sv. války kdy Harder a Witch v r. 1942 publikovali výsledky z kultivace rozsivek jako zdroje olejů, coby maziva pro armádu. Hned za nimi v r. 1946 publikoval R. Řetovský práci s výsledky kultivací rozsivek *Navicula* a *Nitzschia* v objemu 70 L a zelené řasy *Scenedesmus obliquus* ve stejném objemu. Rozsivky ale uvažoval spíš k produkci fukoxanthinu. Teprve po nich přišla slavná publikace Burlew (1953). Jinak ale tento úvod je perfektní informací pro začínající v oboru.

Vlastní publikace: Jmenovaná uvádí 6 již vyšlých a 1 publikaci podanou do tisku. To je více nežli dostačující podíl v oboru. Za velice cenné považuji výsledky dokládající korelaci mezi rychlým testem založeným na fluorescenci chlorofylu a růstem. Nicméně dlouhodobý růst po několik (nejméně 3) generací je nejspolehlivějším důkazem přijatelnosti fyzikálních ale i chemických podmínek (např. pro testy toxicity Se). Zde bych doporučil zavést si kultivaci ve zkřížených gradientech teploty a světla. Tato metoda umožňuje v reálném čase exponovat řasy do všech kombinací teploty a světla, dále je možno zavést další rozměr, např. koncentraci živin či nějakého prvku. Kultury mohou být i v suspenzi, v sérologických destičkách od 0,2 mL až po Petriho misky s objemem 20 i více mL, měření růstu jako OD 750 nm, nebo fluorescencí chlorofylu až po analýzy biomasy z Petriho misek.

Pro diskuse o rozdílech mezi tenkovrstevnou kultivací a vanou či meandry je pravdou, že silná vrstva suspenze je výhodnější z pohledu produkce na plochu ale tenká vrstva zase na objem. To poslední je samozřejmě výhodnější pro biotechnologii, centrifugují se menší objemy suspenzí.

V poslední době se diskutují i výhody heterotrofní kultivace. Ta produkuje čistý produkt po celý rok, nezávisle na Slunci či počasí, ale žádá si organický substrát, cukry, glycerol atd. Další perspektivu řasové biotechnologie vidím v bioprospekci, čili hledání zcela nových kmenů sinic a řas obzvláště extrémofilů, ti mohou produkovat zcela nové látky a navíc rozšiřovat kultivační sezónu (kryofilní řasy). Stejně tak svůdné téma jsou immobilizované řasy a sinice.

Úprava práce: je velmi dobrá. Pouze je poněkud nejasná kombinace stránkování práce a publikací. Angličtinu nejsem schopen hodnotit, ale je čtivá a srozumitelná.

Závěr: Předložená práce splňuje požadavky na udělení titulu PhD a proto ji rád doporučuji k přijetí. Po úspěšné obhajobě doporučuji udělit adeptce titul "doktor".

.....
RNDr. Jaromír Lukavský CSc, Botanický ústav AV ČR, Dukelská 135, 37982 Třeboň.

Jaromir.lukavsky@ibot.cas.cz