

Ocena osiągnięcia naukowego pt. „Molekularna identyfikacja (endo)symbiotycznych bakterii związanych ze słodkowodnymi Bivalvia, Crustacea i Eutardigrada, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii z rodzaju *Wolbachia*” oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i organizacyjnego dr Moniki Mioduchowskiej

Poniższa recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo przewodnie Przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego, dr hab. Joanny Izdebskiej, prof. UG z dnia 14.12.2023r., na podstawie wniosku dr Moniki Mioduchowskiej do Rady Doskonałości Naukowej z dnia 08.08.2023r. o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego. Dostarczona dokumentacja obejmująca autoreferat, wykaz osiągnięć naukowych, kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wraz z oświadczeniami Habilitantki i współautorów o merytorycznym wkładzie w przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe oraz dodatkowe dokumenty m.in. informacje o stażach naukowych, została przygotowana poprawnie i spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm).

Sylwetka naukowa habilitantki

Dr Monika Mioduchowska jest absolwentką Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. W 2009 roku obroniła pracę magisterską pt. „Zróżnicowanie genetyczne halibuta grenlandzkiego (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum, 1792)) z zachodniego rejonu Morza Barentsa”, którą realizowała pod opieką dr Barbary Wojtasik we współpracy z Instytutem Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie oraz Katedrą Chemii Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Stopień doktora nauk biologicznych uzyskała w 2016 roku na podstawie rozprawy pt. Struktura genetyczna ginącego gatunku, skójki gruboskorupowej *Unio crassus* (Philipson, 1788), w rzekach Polski” przygotowanej pod kierunkiem dr hab. Jerzego Sella, prof. UG. Od 2014 roku Habilitantka jest zatrudniona w Katedrze Genetyki i Biosystematyki na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, początkowo na stanowisku asystenta (2014-2017), później specjalisty (2017-2018), a obecnie pracuje na stanowisku adiunkta. Dodatkowo, w latach 2019-2022 dr Mioduchowska była zatrudniona na stanowisku adiunkta naukowego (staż podoktorski) w ramach dwóch

projektów NCN, najpierw w Zakładzie Badań Planktonu Morskiego Instytutu Oceanografii na Wydziale Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego (2019-2021), a następnie w Katedrze Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego (2021-2022).

Ocena osiągnięcia naukowego będącego przedmiotem postępowania habilitacyjnego

Jako osiągnięcie naukowe będące podstawą do nadania stopnia doktora habilitowanego dr Mioduchowska wskazała cykl 7 publikacji zebranych pod wspólnym tytułem „Molekularna identyfikacja (endo)symbiotycznych bakterii związanych ze słodkowodnymi Bivalvia, Crustacea i Eutardigrada, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii z rodzaju *Wolbachia*”. Artykuły zostały opublikowane w latach 2018-2023, w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się w bazie JCR (*Journal Citation Reports*). Dwie z powyższych publikacji ukazały się w czasopismach o bardzo szerokim zasięgu tematycznym (PloS One i PeerJ), pozostałe 5 w bardziej specjalistycznych periodykach publikujących artykuły z zakresu zoologii, genetyki i ewolucji. Warto podkreślić, że 5 z 7 wskazanych do oceny publikacji ukazało się w czasopismach zaliczanych do pierwszego kwartyla (Q1) według listy JCI. Sumaryczny IF wszystkich artykułów, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi 21,507, a liczba punktów ministerialnych obliczona na podstawie wykazu czasopism punktowanych z dnia 17 lipca 2023r. – 730. Prace te były już wielokrotnie cytowane – 74 razy według bazy WoS i 93 razy według bazy Scopus. Pod względem ilościowym, cykl prac spełnia, moim zdaniem, wymogi Ustawy.

Wszystkie artykuły wchodzące w skład osiągnięcia naukowego są pracami wieloautorskimi (od 4 do 12 autorów). W sześciu z nich dr Mioduchowska jest pierwszym autorem, a w jednym figuruje na ostatniej pozycji, dodatkowo w pięciu pracach Habilitantka pełniła funkcję autora korespondencyjnego. Pomimo znacznej w przypadku niektórych prac liczby współautorów, załączone oświadczenia Habilitantki oraz współautorów jednoznacznie wskazują, że w większości prac dr Mioduchowska pełniła wiodącą rolę, a jej wkład w powstanie prac był bardzo wysoki. W sześciu z siedmiu pracach stanowiących osiągnięcie habilitacyjne (z wyjątkiem publikacji #5) dr Mioduchowska odpowiadała za większość etapów badań – brała udział w opracowaniu koncepcji i metod badań, wykonała wszystkie molekularne prace laboratoryjne oraz analizy uzyskanych danych oraz napisała większą część manuskryptów. Natomiast w dwuwątkowym artykule #5 była odpowiedzialna za prace dotyczące mikrobiomu Tardigrada i molekularną część taksonomii integratywnej.

Wszystkie przedstawione prace łączą materiał badawczy (słodkowodne Bivalvia, Crustacea i Eutardigrada) oraz tematyka związana z analizą mikrobiomu. W pięciu artykułach analizy mikrobiomu są tematem wiodącym, podczas gdy w dwóch z nich badania mikroorganizmów symbiotycznych stanowiły dodatkowy aspekt (w artykule #1, główny nacisk został położony na identyfikację niepoprawnie zaklasyfikowanych jako bezkręgowce, a w rzeczywistości pochodzących od bakterii sekwencji pierwszej podjednostki oksydazy cytochromowej (cox1; marker molekularny COI), a artykuł #5 koncentruje się na opisanie nowego gatunku niesporczaka *Paramacrobotus experimentalis* sp. nov. (Macrobotidae) z Madagaskaru). We wszystkich artykułach analizy mikrobiomu zostały przeprowadzone z wykorzystaniem technik biologii molekularnej; początkowo pojedynczych reakcji PCR

i sekwencjonowania Sangera, a w kolejnych pracach z zastosowaniem sekwencjonowania NGS. Niewątpliwie więc dr Mioduchowska doskonała swój warsztat pracy wprowadzając nowe techniki badań oraz proponując nowe rozwiązania metodyczne m.in. poprzez projektowanie specyficznych starterów. Odnosząc się jednak do zastosowanej w artykułach metodyki, moim zdaniem dużym problemem jest brak negatywnych prób kontrolnych i brak zastosowania skutecznych metod eliminacji kontaminacji w przeprowadzonych analizach, które są kluczowe w interpretacji wyników badań mikrobiomu organizmów wolnożyjących. Do głównych źródeł kontaminacji danych w analizach mikrobiomu zaliczamy m.in. zanieczyszczenia środowiskowe (próby mogą zawierać mikroorganizmy, które znajdują się w środowisku ich życia, pożywce hodowlanej lub pożywieniu), skażenia DNA bakteryjnym odczynnikami chemicznymi i materiałów laboratoryjnych (kitów do izolacji DNA, odczynników do PCR) oraz zanieczyszczenia krzyżowe prób podczas przygotowywania bibliotek i późniejszego sekwencjonowania. W przypadku analiz mikrobiomu organizmów wodnych o mikroskopijnych rozmiarach ciała odżywiających się innymi mikroorganizmami (takich, jak niesporczaki czy skorupiaki), brak prób kontrolnych oraz brak krytycznej analizy danych (umożliwiającej np. stwierdzenie, że ten sam genotyp bakteryjny dominuje różne próby i może świadczyć o kontaminacji) są szczególnie istotne, gdyż mogą prowadzić do błędnego wnioskowania (do tego zastrzeżenia odniosę się jeszcze w dalszej części recenzji).

W pracach opisanych jako osiągnięcie naukowe dr Monika Mioduchowska podjęła się identyfikacji mikroorganizmów (endo)symbiotycznych związanych z bezkręgowcami wodnymi z grup Bivalvia, Crustacea oraz Tardigrada. Badania symbioz i interakcji w układzie symbiont-gospodarz są obecnie prowadzone w wielu wiodących ośrodkach naukowych na świecie na wielu poziomach: od identyfikacji symbiotycznych mikroorganizmów, przez analizy ich lokalizacji, transmisji i funkcji jaką pełnią w biologii swoich gospodarzy, po eksperymenty związane z manipulacjami genetycznymi i transferem symbiontów między gatunkami. Niewątpliwie symbioza odegrała kluczową rolę w ewolucji życia na Ziemi, a ukazujące się licznie artykuły naukowe potwierdzają ogromną rolę symbiontów w biologii i ewolucji wielu organizmów. Symbionty mikroskopijnych bezkręgowców słodkowodnych są stosunkowo słabo poznane, do tej pory ukazały się jedynie pojedyncze doniesienia na ten temat. Fakt ten może wynikać z trudności w uzyskaniu wiarygodnych wyników i ich właściwej interpretacji, które mogą wynikać z dużego zróżnicowania mikrobiomu pomiędzy gatunkami, populacjami oraz w środowisku życia tych organizmów. W tym świetle wybór tematyki badań przez dr Mioduchowską jest całkowicie uzasadniony. W swoich pracach dr Mioduchowska zbadała mikrobiom 16 gatunków bezkręgowców słodkowodnych opisując m.in. obecność symbiontów z rodzaju *Wolbachia* i *Cardinium*, oraz innych bakterii o nieznannej lub bardzo słabo poznanej do tej pory funkcji. Niestety, uważna lektura publikacji wchodzących w skład cyklu pokazała, że Habilitantka nie poradziła sobie z wyzwaniem jakim niewątpliwie jest analiza mikrobiomu bezkręgowców słodkowodnych. Moim zdaniem, liczne braki metodologiczne w przeprowadzonych badaniach doprowadziły niestety do budzących wątpliwości wyników i często błędnego wnioskowania.

W artykule #1 (Mioduchowska i wsp., 2018a; *PloS One*), który mocno odbiega tematycznie od cyklu prac i nie jestem pewna czy powinien być do niego włączony, nawiązaniem do tematyki osiągnięcia naukowego jest potwierdzenie, że startery uniwersalne

dla genu COI bezkręgowców: LCO i HCO (Former i wsp., 1994) mogą również amplifikować geny bakteryjne, a tym samym pozwalają m.in. na wykrycie infekcji niektórymi bakteriami np. *Wolbachia* – lub, pomylenie sekwencji bakterii z sekwencjami genów markerowych owada. Ta niewątpliwie istotna informacja nie jest jednak pionierskim odkryciem, gdyż w wielu wcześniejszych pracach opisano ten sam problem – np. w artykułach Smith i wsp. z 2012 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036514>), lub Klopstein i wsp. z 2016 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036514>), w których wykazano, że u owadów startery LCO i HCO oprócz genu mitochondrialnego gospodarza, amplifikują również geny COI bakterii *Wolbachia*, którymi zainfekowane były badane gatunki bezkręgowców. Wprawdzie dr Mioduchowska po raz pierwszy wykazała tę zależność u bezkręgowców wodnych, ale biorąc pod uwagę konserwatywność genów mitochondrialnych i zastosowanie tego samego zestawu starterów uzyskane wyniki były przewidywalne i moim zdaniem, nie można ich uznać za pionierskie. Cenne jest wskazanie, że wśród sekwencji w bazach danych opisywane jako barkody bezkręgowców znaczący odsetek mogą stanowić sekwencje bakterii, również innych niż *Wolbachia*. Natomiast brak systematycznej, szerszej analizy szerszych zasobów sekwencji odpowiadających barkodom różnych bezkręgowców w bazie Genbank, i skupienie na niewielkiej ilości danych uzyskanych dla niemodelowych gatunków przez autorów, znacząco ogranicza, moim zdaniem, szersze zastosowanie wyników.

W artykule #2 (Mioduchowska i wsp., 2018b, *PeerJ*) Habilitantka przeprowadziła screening siedmiu gatunków skorupiaków słodkowodnych pod kątem obecności bakterii *Wolbachia*, wykorzystując technikę sekwencjonowania metodą Sangera produktów PCR uzyskanych przy użyciu zaprojektowanych *in silico* starterów. Z lektury rozdziału „Materiały i metody” omawianej pracy wynika jednak, że startery zostały zaprojektowane na podstawie fragmentu pojedynczej sekwencji genu 16S rDNA bakterii *Wolbachia* wykrytej wcześniej u skorupiaką *Branchipus schaefferi*. Jednocześnie w abstrakcie Autorzy piszą, że zaprojektowane przez nich startery pozwalają na wykrycie „*various known bacterial endosymbiont species*” i polecają ich użycie jako pierwszy etap identyfikacji endosymbiontów. Autorzy wspominają, że do zaprojektowania starterów skorzystali z narzędzia Primer3, ale nie podali więcej szczegółów np. informacji o sprawdzeniu specyficzności starterów za pomocą powszechnie dostępnych narzędzi takich jak Silva TestPrime tool. W efekcie, specyficzność i uniwersalność zaprojektowanych starterów jest trudna do stwierdzenia - trudno jednak spodziewać się, że będą uniwersalne dla wszystkich *Wolbachia*. Analiza specyficzności starterów WOLBSL i WOLBSR jaką wykonałam przy użyciu narzędzia Silva TestPrime wykazała, że startery bezbłędnie pasują do 0.04% sekwencji bakteryjnych w bazie danych, w tym 36% sekwencji *Wolbachia*, i sekwencji pojedynczych szczepów z wielu innych grup. Mam więc bardzo poważne wątpliwości odnośnie przydatności tych starterów, ponieważ (nawet zakładając amplifikację przy niepełnej zgodności starterów i sekwencji referencyjnej) nie wykryją one przynajmniej części szczepów *Wolbachia*, a już na pewno nie można powiedzieć, że powinny być stosowane do detekcji różnych endosymbiontów. Jednocześnie, warto zwrócić uwagę że bardzo wysoka liczba użytych cykli PCR (44!) w połączeniu z dość niską temperaturą przyłączenia starterów (*annealing temperature*) w reakcji, z dużym prawdopodobieństwem będzie skutkować namnożeniem jakiegoś produktu – czy bakterii faktycznie obecnych w danej

próbie, czy jakiegoś typu kontaminacji - niestety w związku z brakiem zastosowania prób kontrolnych w analizach nie można jednoznacznie odpowiedzieć na to pytanie.

Autorzy wskazują, że reakcje PCR z użyciem zaprojektowanej pary starterów pozwoliły im na wykrycie w badanych gatunkach skorupiaków nie tylko α -proteobakterii *Wolbachia*, czy bakterii z rodzaju *Gortzia*, ale również bakterii klasyfikowanych do β -proteobakterii (*Methylophilus*) czy Bacteroidetes (*Cardinium*). Ze względu na brak jakichkolwiek informacji o próbach kontrolnych zastosowanych w prezentowanych analizach, moim zdaniem przedstawionych wyników nie można uznać za wiarygodne. Jak wspomniałam wcześniej, w metodyce pracy nie znalazłam np. żadnej wzmianki o analizie mikrobiomu wody, z której pochodziły badane gatunki skorupiaków, a wśród bakterii, które zostały zidentyfikowane u badanych skorupiaków (i określone jako endosymbionty) Autorzy wymieniają bakterie *Methylophilus* (wykryte wielokrotnie w słodkowodnych jeziorach) oraz bakterie *Candidatus Gortzia* znane jako endosymbionty pierwotniaków z rodzaju *Paramecium* (którymi mogą odżywiać się badane gatunki skorupiaków). Dodatkowo u wszystkich gatunków skorupiaków zebranych ze stanowiska 3 (Polska) zidentyfikowano bakterie *Methylophilus* o identycznym w 100% genotypie, co sugeruje że mikroorganizmy te mogą nie stanowić mikrobiomu badanych gatunków skorupiaków, a jedynie kontaminację środowiskową. Wykonanie reakcji PCR z wykorzystaniem DNA izolowanego z próbek wody prawdopodobnie umożliwiłoby uniknięcie takiej niepoprawnej interpretacji uzyskanych wyników. Detekcja bakterii *Wolbachia* u trzech gatunków skorupiaków jest prawdopodobna, ale przy braku kontroli negatywnych i krytycznej analizy uzyskanych wyników, a także braku dodatkowego potwierdzenia np. poprzez amplifikację genów markerowych dla *Wolbachia* czy analizy mikroskopowej, wiarygodność tego wyniku również budzi moją wątpliwość. Mam też poważne wątpliwości co do interpretacji wyników. Przykładowo, autorzy określają uzyskane sekwencje jako reprezentujące „endosymbionty” mimo braku dowodów na to, że zamieszkują komórki czy tkanki gospodarzy.

Moim zdaniem, ze względu na liczne problemy metodologiczne, wyniki przedstawione w artykule #2 budzą wątpliwości i mogą prowadzić do niepoprawnego wnioskowania na temat ewolucji symbioz u skorupiaków. Zdecydowanie nie zgadzam się też z rekomendacjami autorów, by opisane podejście i startery stosować jako „pierwszy etap identyfikacji endosymbiontów”.

Kolejne dwa artykuły (**artykuł #3 i #4**) dotyczą analizy mikrobiomu małży słodkowodnej *Unio crassus*. Do pierwszej części badań opisanych w bardzo kompaktowym **artykule #3 (Mioduchowska i wsp., 2020a; Conservation Genetics)** wytypowano 30 osobników (samiec i samców), u których wcześniej stwierdzono heteroplazmię pod względem genomu mtDNA typu M i F w tkance somatycznej (noga). Analiza mikrobiomu została przeprowadzona metodą sekwencjonowania amplikonów genu 16S rDNA, jednak z danych przedstawionych w artykule wynika, że dane amplikonowe pochodzą tylko z jednej próby (zmieszane DNA jednego samca i samicy), co uniemożliwia wnioskowanie o różnicach w składzie mikrobiomu pomiędzy osobnikami. Dodatkowo w metodyce zawartej w artykule nie ma w ogóle wzmianki o przygotowaniu bibliotek amplikonowych oraz analizach bioinformatycznych danych NGS. W wykonanych analizach ponownie zabrakło analizy prób kontrolnych, np. wody, ze zbiorników w których zbierane były analizowane małże, co skutkuje m.in. wskazaniem na Fig. 1 jako

składnika mikrobiomu skóry cyjanobakterii (choć według tabeli S1 odczyty te pochodzą z chloroplastowego DNA zielenic). Zaskakuje brak bliższego opisu w tekście dominującej grupy bakterii – przedstawicieli rzędu Rhizobiales. Przeprowadzenie diagnostycznych reakcji PCR z użyciem starterów specyficznych dla symbiontów *Wolbachia* i *Cardinium* pozwoliło Autorom na wykrycie obecności tych symbiontów u 33% badanych samic. Natomiast użycie aż 44 cykli PCR w reakcji diagnostycznej może znacząco zwiększać szansę uzyskania sygnału „false positive” i stwierdzenia obecności symbiontów tam, gdzie naprawdę nie występują. W artykule zaskakuje też brak porównania sekwencji uzyskanych z różnych osobników, lub próby uzyskania dodatkowych sekwencji markerowych. Reasumując, uważam że artykuł traktuje kwestię mikrobiomu skórek dość powierzchownie, a całkowita ilość przedstawionych nowych informacji jest niewielka.

Artykuł #4 (Mioduchowska i wsp., 2020b; *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*) stanowi kontynuację i rozszerzenie badań opisanych w artykule #3 – Autorzy koncentrują się na analizach mikrobiomu wątrobotrzustki samic i samców *Unio crassus* pochodzących z trzech populacji żyjących w różnych warunkach ekologicznych. Analiza profilu mikrobiomu *U. crassus* przy użyciu dość standardowych protokołów pozwoliła na identyfikację szeregu bakterii, o zróżnicowanym rozmieszczeniu w populacjach. Wśród najliczniej występujących bakterii Autorzy wskazują przedstawicieli typów Proteobacteria, Firmicutes i Actinobacteria, zaznaczając, że osobniki zamieszkujące określone stanowiska wykazują różnice w składzie mikrobiomu. Rozmieszczenie unikalnych dla poszczególnych osobników bakterii przedstawiono na wykresie 2, nie znalazłam jednak w tekście informacji o tym jaki procent całkowitych danych uzyskanych dla każdej z prób stanowią te unikalne genotypy. Informacja ta byłaby niezwykle cenna i pomocna w interpretacji wyników, zwłaszcza, że analiza tabeli S1 wskazuje, że większość najbardziej abundantnych OTUs jest wspólna dla wszystkich prób. Autorzy jako jeden z ważniejszych wyników przeprowadzonych analiz wskazują wykrycie obecności bakterii *Candidatus Xiphinematobacter* u przedstawicieli jednej z badanych populacji. Do tej pory *C. Xiphinematobacter* został zidentyfikowany u Nematoda, u których wykazano koewolucję układu gospodarz-endosymbiont oraz stwierdzono, że symbiont ten może indukować partenogenezę u swoich gospodarzy (Vandekerckhove i wsp., 2000). Wykrycie obecności tej bakterii w mikrobiomie jelitowym małży *C. crassus* byłoby niewątpliwie ciekawe, jednak biorąc pod uwagę fakt że według danych zawartych w tabeli S1 odczyty odpowiadające temu mikroorganizmowi stanowią niewielki odsetek wszystkich odczytów uzyskanych dla tych prób (<0.5%), przy braku prób kontrolnych byłabym bardzo ostrożna z wnioskowaniem o „pionierskim odkryciu endosymbiotycznej bakterii z rodzaju *Candidatus Xiphinematobacter*” u *U. crassus* (cytat z Autoreferatu). Autorzy nie rozważyli np. możliwości takich jak infekcja małży przez nicienie które są prawdziwymi gospodarzami *Ca. Xiphinematobacter*.

Chociaż poza wymienionym wykryciem bakterii *C. Xiphinematobacter* wyniki artykułu #4 na pierwszy rzut oka nie budzą zastrzeżeń, to poważne wątpliwości wzbudzają analizy zawarte w niedawno opublikowanym preprincie, którego autorzy m.in. przeanalizowali ponownie wyniki uzyskane w ramach opisanego w tej publikacji badania, wraz z danymi z artykułów #5 i #6 (Surmacz et al., 2024, <https://doi.org/10.1101/2024.01.24.577024>). Stwierdzili, że dominującą bakterią w danych dla skórek i niesporczaków jest *Escherichia coli* – bakteria często wykorzystywana w przemyśle biotechnologicznym, i której DNA jest często

znajdowane w odczynnikach. Stwierdzili też, że średnio 64% odczytów z bibliotek dla skójek reprezentuje genotypy (zOTU) znalezione także w niesporczakach, co sugeruje bardzo znaczny stopień kontaminacji danych uzyskanych w tych projektach. Przeprowadzona przeze mnie re-analiza danych dla kilku bibliotek z tych projektów, które pobrałam z bazy danych NCBI, potwierdziła niestety wyniki przedstawione w preprincie. W związku z tym, konkluduję że duża część uzyskanych przez autorów wyników i wniosków jest artefaktem metodologicznym – prawdopodobnie odzwierciedlającym skażenie DNA obecnym w odczynnikach, którego autorzy nie wykryli wobec braku prób kontrolnych.

Kolejne dwa artykuły (**artykuł #5, #6**) wchodzące w skład cyklu dotyczą mikrobiomu niesporczaków. Habilitantka zbadała profil mikrobiomowy sześciu gatunków niesporczaków. **Artykuł #5 (Kaczmarek i wsp., 2020; *Molecular Phylogenetics and Evolution*)** dotyczy jednego z nich (*Paramacrobiotus experimentalis*), pochodzącego z 2-letniej hodowli laboratoryjnej, co umożliwiło określenie składu mikrobiomu zarówno pożywki na której hodowane były niesporczaki jak również mikrobiomu wrotków, którymi były one karmione. Przeprowadzone analizy wykazały, m.in. obecność w mikrobiomie badanych osobników bakterii z rzędu Rickettsiales oraz różnice w składzie mikrobiomu pomiędzy osobnikami należącymi do różnych populacji *P. experimentalis*. Pomimo zastosowania odpowiednich prób kontrolnych w przeprowadzonych eksperymentach Autorzy nie ustrzegli się jednak moim zdaniem błędnej interpretacji jednego z otrzymanych wyników. Wykryty sygnał obecności bakterii z rodzaju *Polynucleobacter* w mikrobiomie analizowanych osobników niesporczaków (bardzo mały odsetek odczytów) oraz ich znaczna ilość w mikrobiomie pożywki w której hodowane były wrotki stanowiące pokarm dla badanych gatunków niesporczaków świadczy o tym że pochodzą one od wrotków a nie są symbiontami niesporczaków uzyskanymi na drodze transferu horyzontalnego jak sugerują Autorzy. Niestety, w świetle wyników opublikowanych we wspomnianym powyżej preprincie, część z wyników wydaje się odzwierciedlać kontaminację wynikającą prawdopodobnie z obecności bakteryjnego DNA w odczynnikach.

Z kolei w **artykule #6 (Mioduchowska i wsp., 2021; *Genome*)** Habilitantka poddaje weryfikacji hipotezę o występowaniu symbiontów z rodzaju *Wolbachia* w mikrobiomie niesporczaków. Analizy zostały przeprowadzone z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania rejonu V3-V4 genu 16S rDNA bakterii, a analiza taksonomiczna uzyskanych sekwencji OTU została przeprowadzona w oparciu o dwie referencyjne bazy danych SILVA oraz GREENGENES. Wykonane analizy bioinformatyczne otrzymanych ampliconów, w oparciu o dwie bazy sekwencji referencyjnych, wykazały znaczące różnice w liczbie oraz taksonomii jednostek OTU – co jest wynikiem zaskakującym, ponieważ rekonstrukcja OTUs powinna być niezależna od ich anotacji taksonomicznej. Jedynie przy zastosowaniu bazy Greengenes u dwóch gatunków niesporczaków zidentyfikowano sekwencje przypisane do OTU *Wolbachia*, jednak odczyty te stanowiły jedynie 0,2-0,5% wszystkich odczytów uzyskanych dla danej próby. Przeprowadzone analizy filogenetyczne z użyciem otrzymanych krótkich sekwencji zaklasyfikowanych do rodzaju *Wolbachia* oraz rzędu Rickettsiales oraz sekwencji bakterii *Wolbachia* i *Rickettsiales* zdeponowanych w bazie sekwencji nukleotydowych GenBank potwierdziły ich przynależność do odpowiednich kladów. Wprawdzie inni autorzy potwierdzili wykrycie symbiontów z rzędu Rickettsiales u niesporczaków, jednak w opisywanych wynikach zastanawia bardzo niski udział procentowy w próbach symbionta *Wolbachia*, który zgodnie

z doświadczeniem moim i współpracownikami, zazwyczaj dominuje profile mikrobiomowe owadów. Zważywszy na mały rozmiar niesporczaków, identyfikacji dokonano na podstawie może kilku-kilkudziesięciu fragmentów DNA. Biorąc pod uwagę ewidentną skalę kontaminacji w danych (opisaną powyżej, przy publikacji #4) można mieć wątpliwości co do źródła pochodzenia tego sygnału. Niestety, Autorzy nie podjęli prób potwierdzenia obecności symbionta *Wolbachia* przy użyciu innych dostępnych technik, np. poprzez namnożenie i sekwencjonowanie innych genów markerowych tej bakterii, czy techniki mikroskopowe. W związku z tym, uważam że centralna, tytułowa konkluzja tego artykułu – że w niesporczakach występuje *Wolbachia* – jest wysoce problematyczna.

Ostatni artykuł (#7- Mioduchowska i wsp., 2023; *International Journal of Molecular Sciences*) włączony do cyklu dotyczy detekcji bakterii z rodzaju *Wolbachia* w mikrobiomie słodkowodnych skorupiaków, mały i niesporczaków metodą sekwencjonowania amplikonów rejonu V3V4 genu 16S rDNA uzyskanych w wyniku reakcji PCR ze starterami opisanymi jako specyficzne dla bakterii *Wolbachia*. Autorzy argumentują, że sekwencjonując amplikony uzyskane przy użyciu problematycznych moim zdaniem starterów opisanych w artykule #2, w połączeniu z protokołem opierającym się na 44 cyklach amplifikacji, są w stanie wykrywać bakterie *Wolbachia*, której protokół oparty na standardowych starterach nie wykrywa ze względu na niską abundancję. Przedstawiają dane ukazujące że stosując startery które powinny wykluczać dużą część bakterii, Autorzy uzyskują znacząco niższą całkowitą różnorodność bakterii, z których jedynie nieliczne pokrywają się z obecnymi w danych uzyskanych przy użyciu uniwersalnych starterów. Jednocześnie u kilku gatunków stwierdzają obecność bakterii *Wolbachia*, nieraz w oparciu o kilkadziesiąt odczytów rozgrupowanych na kilka OTU i łącznie stanowiących 0.01% całego zestawu danych dla danej próby. W ten sposób, Autorzy stwierdzili obecność symbionta *Wolbachia* u sześciu gatunków skorupiaków, dwóch gatunków mały oraz dwóch gatunków niesporczaków. Na podstawie uzyskanych sekwencji Autorzy pokusili się o zaklasyfikowanie wykrytych bakterii *Wolbachia* do odpowiednich supergrup, a nawet wyróżnienie nowej supergrupy V. Podobnie jak w poprzednich publikacjach moja wątpliwość dotyczy bardzo niskiej abundancji sekwencji zaklasyfikowanych do rodzaju *Wolbachia* w uzyskanych danych (2-113 odczytów) oraz brak wyników sekwencjonowania negatywnych prób kontrolnych (brak widocznego prążka na żelu nie oznacza braku produktu reakcji PCR). Tak niska abundancja bakterii *Wolbachia*, w połączeniu z nadzwyczajnie dużą różnorodnością w obrębie gospodarza (do 4 OTU) pomimo niewielkiego rozmiaru gospodarzy, znacząco kontrastowałaby z wynikami dla szczegółowo opisanych infekcji przez inne szczepy *Wolbachia*, co wzbudza dalsze wątpliwości odnośnie wiarygodności opisanych tutaj wyników. Dodatkowo wyodrębnianie nowej supergrupy *Wolbachia* w oparciu tylko o kilkanaście odczytów krótkiego fragmentu genu 16S rDNA, jest w moim odczuciu „na wyrost”. Podobnie jak w poprzednich publikacjach, Autorzy nie podjęli prób potwierdzenia detekcji *Wolbachia* innymi metodami.

Podsumowując, stwierdzam, że Habilitantka podjęła się bardzo trudnego zadania - identyfikacji symbiotycznych mikroorganizmów u słodkowodnych mały, skorupiaków i niesporczaków. Analizy mikrobiomu wymienionych grup organizmów ze względu na ich drobne rozmiary ciała (w przypadku skorupiaków planktonicznych i niesporczaków),

Środowisko życia, odżywianie się zróżnicowanym pokarmem, oraz potencjalnie niską abundancją zasiedlających ich tkanki mikroorganizmów, stanowią duże wyzwanie i wymagają zastosowania licznych kontroli pozwalających na wyeliminowanie ewentualnych kontaminacji. W przedstawionych do oceny publikacjach brakuje rzetelnego, opartego na różnorodnych próbach kontrolnych systemu weryfikacji uzyskanych danych. Problemem jest też często interpretacja wyników, wynikająca z braku krytycznej analizy wygenerowanych danych. Niestety, w niemal wszystkich pracach występują poważne problemy metodologiczne. Najważniejsze z nich to: (1) brak negatywnych prób kontrolnych pozwalających na wykrycie kontaminacji środowiskowych i laboratoryjnych; (2) bardzo wysoka liczba cykli w reakcjach PCR (44, podczas gdy w standardowych protokołach zalecane są 27-32 cykle) przy jednocześnie niskiej temperaturze *annealingu* zwiększającej niespecyficzność reakcji oraz w przypadku analiz z wykorzystaniem sekwencjonowania NGS (3) wnioskowanie o obecności symbiontów (np. bakterii *Wolbachia*) na podstawie niewielkiego odsetka odczytów uzyskanych dla danej próby, przy braku dodatkowego potwierdzenia obecności symbiontów innymi metodami. Prowadzi to zazwyczaj do niewłaściwych moim zdaniem konkluzji, a czasem do rekomendacji, które mogą, zwłaszcza osoby niedoświadczone w analizach mikrobiomu, wprowadzić w błąd. Ze względu na opisane problemy, w artykułach #2-#7 miałam trudności ze wskazaniem konkretnych wyników, co do których miałabym przekonanie co do ich wysokiej jakości i wiarygodności.

Zgodnie z treścią Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz 1668 z późn. zm) osiągnięcie naukowe przedstawione jako część wniosku habilitacyjnego powinno stanowić „znaczący wkład w rozwój określonej dyscypliny”. Z przykrością muszę stwierdzić, że w mojej opinii, cykl publikacji przedstawiony przez dr Monikę Mioduchowską nie spełnia tych kryteriów.

Ocena pozostałego dorobku naukowego oraz aktywności naukowej realizowanej poza macierzystą jednostką

Pozostały dorobek naukowy dr Moniki Mioduchowskiej jest bardzo liczny i obejmuje współautorstwo w 31 publikacjach naukowych, z których 9 zostało opublikowanych przed, a 22 po uzyskaniu stopnia doktora. W 12 z tych publikacji Habilitantka jest pierwszym (6) lub ostatnim (6) autorem. Wszystkie prace znajdujące się w dorobku dr Mioduchowskiej które ukazały po uzyskaniu przez nią stopnia doktora zostały opublikowane w czasopiśmie z listy JCR, natomiast w dorobku z okresu przed uzyskaniem stopnia doktora dominują artykuły opublikowane w czasopiśmie nie posiadającym współczynnika wpływu „*Impact Factor*”. Sumaryczny IF wszystkich publikacji zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 73,594, a dorobek Habilitantki był do dnia 08.08.2023 według bazy WoS cytowany 241 razy/189 bez autocytacji, natomiast Index Hirscha wynosił 8 (WoS).

Tematyka publikacji jakie posiada w swoim dorobku dr Mioduchowska jest różnorodna i świadczy o szerokich zainteresowaniach naukowych Habilitantki. Oprócz publikacji poruszających zagadnienia dotyczące mikrobiomu organizmów słodkowodnych, dr Mioduchowska prowadziła/prowodzi badania z zakresu genetyki słodkowodnych małży i skorupiaków, taksonomii integratywnej niesporczaków (opis nowych i redeskrpcja znanych

gatunków), bioróżnorodności planktonu morskiego i różnorodności genetycznej australijskich skorupiaków morskich z grupy Tanaidacea. Publikacje powstały we współpracy z polskimi (Zakład Badań Planktonu Morskiego Instytutu Oceanografii na Wydziale Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego, Katedra Zoologii Bezkręgowców i Hydrobiologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego; Zakład Taksonomii i Ekologii Zwierząt Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu) i zagranicznymi (Laboratory of Aquatic Ecology, Evolution and Conservation, KU Leuven, Belgium) ośrodkami naukowymi. Dr Mioduchowska bardzo aktywnie promowała wyniki swoich prac na konferencjach krajowych i zagranicznych. Jest współautorką aż 62 doniesień konferencyjnych, z których 44 były prezentowane formie posteru, a 18 jako referat. W przygotowanych dokumentach nie została jednak podana informacja, w których z wymienionych konferencji dr Mioduchowska uczestniczyła i prezentowała wyniki swojej pracy osobiście, trudno więc ocenić ten element aktywności.

Habilitantka wykazała się również aktywnością i efektywnością w aplikowaniu o finansowanie swoich badań ze źródeł wewnętrznych i zewnętrznych. Była kierownikiem 12 projektów finansowanych ze środków Uniwersytetu Gdańskiego, oraz dwóch projektów zewnętrznych finansowanych przez NCN (Miniatura 1) oraz EMBO, a obecnie kieruje projektem Sonata 17 (NCN). Ponadto dr Mioduchowska była/jest wykonawcą w 11 innych projektach, w tym 7 projektach finansowanych ze źródeł zewnętrznych (MNIŚW, NCN, European Cooperation in Science and Technology). Liczba projektów w które Habilitantka była lub jest zaangażowana jest bardzo wysoka i świadczy o jej dużej aktywności naukowej.

Dr Mioduchowska nieustannie podnosi również swoje kwalifikacje. Brała udział w licznych kursach i szkoleniach zagranicznych (10 - zdecydowana większość prowadzona była w formie zdalnej) i krajowych (9). Odbiła również 3 staże naukowe: EMBO Short-Term Fellowship w Belgii oraz dwa staże krajowe w ramach projektów OPUS (jedne na Uniwersytecie Łódzkim, a drugi w macierzystej jednostce). Oprócz wymienionych staży podoktorskich Dr Mioduchowska brała także udział w trzech rejsach naukowo-badawczych (w ramach macierzystej jednostki), które odbyły się specjalistycznym statkiem Oceanograf w rejonie Zatoki Gdańskiej, a których celem było pobranie próbek planktonowych. Wymienione pobyty stażowe pozwoliły Habilitantce na zdobycie nowych umiejętności laboratoryjnych oraz poszerzenie swojego warsztatu pracy o bioinformatyczne metody analizy danych sekwencjonowania NGS. Wymiernym efektem odbytych staży są liczne publikacje naukowe i doniesienia konferencyjne oraz członkostwo w „MetaZooGene-ICE research group”, w ramach nawiązanej współpracy z prof. Ann Bucklin z Department of Marine Sciences, University of Connecticut w USA. W mojej ocenie, habilitantka spełnia więc jedno z istotnych wymagań stawianych kandydatom do uzyskania stopnia doktora habilitowanego jakim jest aktywność naukowa poza macierzystą jednostką.

Dr Monika Mioduchowska jest członkinią trzech towarzystw naukowych: American Society for Microbiology, Polskiego Towarzystwa Genetycznego oraz Stowarzyszenia Malakologów Polskich. Jest także zaangażowana w działalność ekspercką – wielokrotnie recenzowała artykuły naukowe dla czasopism tj. Current Microbiology, PLoS One, Diversity czy Systematic Entomology. Pełniła również funkcję edytora specjalnego wydania czasopisma Diversity poświęconego symbiontom bezkręgowców.

W załączonej dokumentacji nie znalazłam natomiast żadnych informacji o aktywności dydaktycznej i popularyzatorskiej Habilitantki, a jej działalność organizacyjna ograniczona jest tylko do współorganizowania międzynarodowej konferencji 9th European Ostracodologists Meeting. Biorąc pod uwagę fakt, że dr Mioduchowska od 2014 roku zatrudniona jest na stanowisku naukowo-dydaktycznym (pomijając okres staży podoktorskich), zaskakujący jest brak informacji o prowadzonych zajęciach dydaktycznych, opiece nad studentami i dorobku popularyzatorskim, które są istotnymi elementami całkowitej oceny sylwetki pracownika naukowo-dydaktycznego. Jednak, ze względu na to, że zgodnie z zapisem ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) na przedmiotową ocenę Recenzenta nie powinna wpływać ocena osiągnięć dydaktycznych, organizacyjnych, czy też popularyzujących naukę, brak informacji o tym aspekcie dorobku dr Moniki Mioduchowskiej nie wpływa na mają końcową ocenę.

Wniosek końcowy

Po szczegółowym zapoznaniu się z przedstawioną do oceny dokumentacją stwierdzam, że Dr Monika Mioduchowska jest dynamicznym, aktywnym naukowcem prowadzącym badania głównie w zakresie opisu różnorodności mikrobiomu metodami molekularnymi. Pod względem dorobku publikacyjnego oraz aktywności naukowej poza macierzystą jednostką dr Mioduchowska spełnia wymogi stawiane kandydatom do uzyskania stopnia doktora habilitowanego. Natomiast przedstawiony do oceny cykl siedmiu publikacji składających się na osiągnięcie habilitacyjne zawiera poważne błędy/braki metodologiczne, które budzą wątpliwości do jakości przedstawionych wyników. Uważam, że znaczna część wyników i konkluzji nie odzwierciedla rzeczywistości biologicznej, a zatem nie stanowi wkładu w rozwój biologii jako dyscypliny naukowej.

W związku z powyższym uważam, że osiągnięcie naukowe przedstawione przez dr Monikę Mioduchowską nie spełnia wymogu stawianego kandydatom do stopnia doktora habilitowanego określonym w art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm).