

## Szczegółowy Opis Przedmiotu Zamówienia

**Weryfikacja występowania żółwia błotnego (*Emys orbicularis orbicularis*)  
z wykorzystaniem analizy DNA środowiskowego metodą qPCR  
na obszarach Natura 2000 w województwie lubelskim  
w ramach realizacji projektu  
„Lubelska Natura 2000 – wdrażanie planów zadań ochronnych”  
POIS.02.04.00-00-0024/16.**



Projekt współfinansowany ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020

Zadanie polega na pobraniu 100 próbek wody o objętości 250 ml oraz wykonaniu analiz laboratoryjnych polegających na potwierdzeniu obecności kwasu dezoksyrybonukleinowego zwanego dalej DNA żółwia błotnego metodą quantitative Polymerase Chain Reaction enzymatycznej amplifikacji in vitro specyficznych sekwencji DNA zwaną dalej metodą qPCR przedstawioną w szczegółowym opisie przedmiotu zamówienia.

Zadanie jest realizowane w ramach projektu współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko pt. Lubelska Natura 2000 - Wdrażanie planów zadań ochronnych POIS.02.04.00-000024/16.

## I. Przedmiot zamówienia

Przedmiotem zamówienia jest weryfikacja występowania żółwia błotnego (*Emys orbicularis orbicularis*) z wykorzystaniem analizy DNA środowiskowego (ang. eDNA - environmental DNA) metodą qPCR w obszarach Natura 2000 i innych w woj. lubelskim.

### Szacowanie obejmuje dwa etapy prac

Etap 1.

Pobranie 100 próbek wody o objętości 250 ml w okresie od dnia podpisania umowy do dnia 15 maja 2018 r. z 50 stanowisk. Lokalizacja miejsc pobrania próbek wody oraz metoda wykonania badań została wskazana w opisie przedmiotu zamówienia.

Etap 2.

Analiza laboratoryjna obecności DNA żółwia błotnego metodą qPCR przedstawioną w opisie przedmiotu zamówienia - 100 próbek - analizy qPCR w pięciu powtórzeniach.

Z wykonanych prac Wykonawca sporządzi sprawozdanie w ilości 3 egzemplarzy w formie maszynopisu i w formie elektronicznej, które obejmować będzie wykaz i opis wykonanych prac zawierających m.in. lokalizację oraz krótki opis zbiorników z których pobrano próby, wyniki analiz laboratoryjnych w formie raportu, podsumowanie wyników badań.

Sprawozdanie musi zawierać również część graficzną (mapy lub kopie map z naniesioną lokalizacją punktów poboru prób) i dokumentację fotograficzną z realizacji zadania obejmującą m.in. zbiorniki wodne (lub ich części) z których pobrano próby wody do badań.



Projekt współfinansowany ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020

## **II. Opis przeprowadzenia procedury monitoringu występowania żółwia błotnego na podstawie analizy DNA środowiskowego**

Procedura monitoringu żółwia błotnego składa się z dwóch zasadniczych etapów: części terenowej (pobranie próbek wody materiału biologicznego do badań weryfikujących obecność DNA żółwia błotnego) oraz części laboratoryjnej (analiza obecności DNA badanego gatunku metodą qPCR).

### **1. Opis części terenowej**

Z każdego stanowiska zostaną pobrane dwie próbki wody, każda o objętości 250 ml. Próbki muszą być zebrane w okresie od dnia podpisania umowy do 15 maja 2018 r. Jest to spowodowane tym, że DNA wolniej rozkłada się w niższych temperaturach. Zebrane próbki muszą być przewożone w niskiej temperaturze (przedział temp: od 0 do 10° C) i w ciągu 48 godzin od pobrania powinny być przefiltrowane.

Materiał biologiczny do badań DNA należy pozyskać z próbek wody poprzez filtrację w zestawie do filtracji próżniowej. Do filtracji należy zastosować filtry membranowe MF-Millipore™ z mieszanego estru celulozy – rozmiar sącza 47 mm, rozmiar porów 0,45µm. Materiał genetyczny w uzyskanych filtratach będzie konserwowany poprzez mrożenie filtratów w sterylnych pojemnikach do temp. -20°C. Zabezpieczone próbki zostaną następnie przewiezione do laboratorium w celu przeprowadzenia analiz DNA. O zakończeniu prac terenowych, czyli pobraniu i przefiltrowaniu próbek wykonawca na piśmie (pismo, faks, e-mail) zawiadomi zamawiającego.

### **2. Opis metodologii laboratoryjnych analiz DNA środowiskowego** **(metoda qPCR)**

Procedura analiz molekularnych obejmować będzie następujące etapy:

- a) Ekstrakcja DNA genomowego zestawem do izolacji DNA z próbek środowiskowych o śladowej zawartości materiału genetycznego z wykorzystaniem syntetycznego DNA do monitorowania skuteczności ekstrakcji i obecności inhibitorów łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction) zwanej dalej reakcją PCR.
- b) Analiza qPCR przeprowadzona z wykorzystaniem starterów reakcji PCR i sondy TaqMan specyficznych dla analizowanego gatunku (sekwencja sondy przetestowana *in silico* pod kątem specyficzności względem badanego gatunku oraz braku komplementarności w odniesieniu do gatunków zasiedlających ten sam biotop co żółw błotny). Para starterów i sonda TaqMan empirycznie dobrane na podstawie analizy sekwencji genu *cytb* dla



Projekt współfinansowany ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020

żółwia błotnego dostępnych w bazie GenBank ze szczególnym uwzględnieniem linii ewolucyjnych zidentyfikowanych na terenach objętych badaniem.

Analiza qPCR próbek środowiskowych prowadzona w pięciu powtórzeniach w obecności NTC i PTC.

- c) Analiza pod kątem występowania DNA w zbadanych próbkach.

Wyniki analiz powinny być zestawione w formie raportu. Raport powinien zawierać tabelaryczne zestawienie wyników, w tym również wyników dla poszczególnych powtórzeń, PTC i NTC dla każdej analizowanej próby.

Raport powinien zawierać określenie progu wykrywalności zastosowanej metody na podstawie przeprowadzonej analizy seryjnych rozcieńczeń DNA uzyskanego z próbek referencyjnych żółwia błotnego.

### III. Termin realizacji zamówienia

Od daty zawarcia umowy do dnia 19 listopada 2018 r., w tym:

- a) prace terenowe: od daty zawarcia umowy do dnia 15 maja 2018 r.
- b) analizy laboratoryjne i opracowanie wyników: do dnia 1 listopada 2018 r.
- c) złożenie sprawozdania do zamawiającego: do dnia 19 listopada 2018 r.



Projekt współfinansowany ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020

#### IV. Lokalizacja powierzchni monitoringowych

Miejscowość	Gmina	Powiat	Forma ochrony	x	y
Janów Podlaski	Janów Podlaski	białski		787005.52	488766.2
Wólka Polinowska	Konstantynów	białski		783270.60	486279.60
Cieleśnica	Rokitno	białski		796622.34	485116.68
Nepłe-Krzyczew	Terespol	białski	PLH140001 Ostoja Nadbużańska	808927.08	484020.74
Górska Wieś (Olszyn)	Rokitno	białski		799836.48	482815.7
Puchacze	Międzyrzec Podlaski	białski		767252.51	468189.05
Żdźary	Łuków	łukowski	PLH060108 Jata	721247.28	459431.93
Ortel Książęcy	Biała Podlaska	białski		792180.19	464898.31
Lebiedziew	Terespol	białski	Nadbużański Obszar Chronionego Krajobrazu	816427.57	474588.45
Kletnia	Stężyca	rycki	PLH140033 Podeblocie	690925.75	420391.98
Sobieszyn	Ułęż	rycki	PLH060051 Dolny Wieprz	719368.03	417478.08
Bełcząc	Czemierniki	radzyński	PLB060004 Dolina Tyśmienicy	747261.26	428163.25
Lichty	Czemierniki	radzyński	PLB060004 Dolina Tyśmienicy	749930.38	433679.08
Skoki	Czemierniki	radzyński	PLB060004 Dolina Tyśmienicy	753925.4	432957.47
Jezioro	Siemień	parczewski	PLB060004 Dolina Tyśmienicy	758504.80	428375.09



Projekt współfinansowany ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020

Miejscowość	Gmina	Powiat	Forma ochrony	x	y
Tyśmienica	Parczew	parczewski	PLB060004 Dolina Tyśmienicy	766606.17	416977.43
Stawy Prokop	Parczew	parczewski	PLB060004 Dolina Tyśmienicy	767820.29	415287.61
Jedlanka	Uścimów	lubartowski	Park Krajobrazowy Pojezierze Łęczyńskie	773622.65	412051.08
Białka	Dębowa Kłoda	parczewski	PLB060006 Lasy Parczewskie	778738.09	415837.41
Zbójno	Sosnowica	parczewski	Poleski Park Narodowy	787497.04	410198.03
Zastawie	Urszulin	włodawski	Poleski Park Narodowy	795926.90	398270.47
Jagodno	Ludwinów	łęczyński	Poleski Park Narodowy	781470.43	402331.62
Dołhobrody	Hanna	włodawski	PLH060032 Poleska Dolina Bugu	813183.92	434038.84
Nowiny	Stary Brus	włodawski	Poleski Park Narodowy	794895.41	408675.3
Dubeczno	Hańsk	włodawski	PLH060043 Lasy Sobiborskie	808437.73	406046.8
Osowa (wysokie napięcie)	Hańsk	włodawski	PLH060043 Lasy Sobiborskie	810736.92	403991.74
Osowa I	Hańsk	włodawski	PLH060043 Lasy Sobiborskie	815281.67	402229.18
Osowa II (ciek)	Hańsk	włodawski	PLH060043 Lasy Sobiborskie	816111.86	403235.85
Zbereże (j.Brudno)	Hańsk	włodawski	PLH060043 Lasy Sobiborskie	822308.14	403346.52
Konstantynówka	Hańsk	włodawski		807880.83	398116.37
Wojciechów	Hańsk	włodawski	Chełmski Obszar Chronionego Krajobrazu	802733.85	397422.07



Projekt współfinansowany ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020

Miejscowość	Gmina	Powiat	Forma ochrony	x	y
Ostrówek Podyski	Cyców	łęczyński	PLH060009 Jeziora Uściwierskie	788888.01	395399.45
Dziadowice	Sawin	chełmski	Chełmski Park Krajobrazowy	805628.32	389508.29
Sawin	Sawin	chełmski		813085.22	387028.05
Nowosiółki	Chełm	chełmski	PLH060064 Nowosiółki (Julianów)	81668.49	377847.72
Mogielnica	Siedliszcze	chełmski		794634.47	380364.88
Kurów-Szumów	Kurów	puławski		721944.96	398806.63
Oblasy-Kochanów	Janowiec	puławski		697963.74	393973.41
Janowice	Janowiec	puławski	PLH060045 Przełom Wisły w Małopolsce	700807.36	388057.4
Bronowice	Puławy	puławski		703797.41	400952.01
Zalesie Kańskie	Rejowiec Fabryczny	chełmski	PLH060065 Pawłów	790970.0	371608.22
Turka	Dorohusk	chełmski	PLB060003 Dolina Środkowego Bugu	836123.58	372687.37
Starosiele	Dubienka	chełmski	PLH060032 Poleska Dolina Bugu	843767.67	362828.07
Puszcza	Żmudź	chełmski	Chełmski Obszar Chronionego Krajobrazu	829208.91	367468.58
Wieprzec k. Hubale	Zamość	zamojski	PLH060087 Dolina Łabuńki i Topornicy	794797.41	319339.48



Projekt współfinansowany ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020

Miejscowość	Gmina	Powiat	Forma ochrony	x	y
Aleksandrów	Aleksandrów	biłgorajski	PLH060034 Uroczyska Puszczy Solskiej	779552.83	294427.63
Kolonia Łukowa	Łukowa	biłgorajski	PLH060097 Dolina Dolnej Tanwi	782253.71	287264.29
Dąbrowica	Biłgoraj	biłgorajski	PLH060034 Uroczyska Puszczy Solskiej	758337.81	306106.32
Borowina	Józefów	biłgorajski	PLB060012 Roztocze	786199.55	299608.34
Aleksandrów	Aleksandrów	biłgorajski	PLH060034 Uroczyska Puszczy Solskiej	779552.83	294427.63

*W przypadku braku możliwości pobrania prób wody z obiektów wskazanych w tabeli powyżej zamawiający dopuszcza możliwość zmiany lokalizacji powierzchni monitoringowych i wskaże nową lokalizację oddaloną nie dalej niż 5 km od dotychczasowej. Łączny zakres zmian lokalizacji powierzchni monitoringowej nie może przekroczyć 10 obiektów.*

*Zmiana, o której mowa wyżej nie powoduje konieczności zmiany Umowy.*



Projekt współfinansowany ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020

WOF.261.7.3.2018.WM	Załącznik nr 1 do SIWZ / Załącznik Nr 1 do Umowy Nr ..... Szczegółowy opis przedmiotu zamówienia	Strona 8 z 11
---------------------	---	---------------



# SŁOWNIK POJĘĆ

## WYKORZYSTYWANYCH W SZCZEGÓŁOWYM OPISIE PRZEDMIOTU ZAMÓWIENIA

### 1. Kontrola ekstrakcji DNA

Umożliwia walidację etapu ekstrakcji DNA z próbek środowiskowych. W próbkach środowiskowych mogą się znajdować inhibitory, które uniemożliwiają skuteczną ekstrakcję DNA lub powodują jego degradację. Kontrola ekstrakcji DNA zawiera znane stężenie komórek, które zawierają kontrolną sekwencję DNA. Komórki zawierające wewnętrzny kontrolny DNA dodaje się do buforu do lizy z badaną próbką przed ekstrakcją DNA. Po ekstrakcji mieszaninę DNA z DNA kontrolnym poddaje się amplifikacji. Obecność DNA kontroli wewnętrznej potwierdza powodzenie etapu ekstrakcji i zmniejsza szansę uzyskania fałszywie ujemnego wyniku w próbce DNA (tzn. DNA badanego gatunku było obecne, ale nie zostało wykryte np. W wyniku obecności inhibitorów, amplifikacja DNA kontrolnego potwierdza prawidłowy przebieg wcześniejszych etapów analizy). Kontrola czyli syntetyczny DNA ma sekwencję bez homologii z żadnym znanym organizmem i została zaprojektowana tak, aby nie zakłócać wykrywania DNA badanego gatunku.

### 2. Walidacja

Ogół czynności mających na celu zbadanie odpowiedniości, trafności lub dokładności czegoś (Słownik PWN). W naukach technicznych działanie mające na celu potwierdzenie w sposób udokumentowany i zgodny z założeniami, że procedury, procesy, urządzenia, materiały, czynności i systemy rzeczywiście prowadzą do zaplanowanych wyników (WIKIPEDIA).

### 3. In silico

Jest wykorzystywane w znaczeniu "wykonywane na komputerze lub za pomocą symulacji komputerowej", termin ten oznacza iż zaprojektowane sondy zostały sprawdzone pod względem podobieństwa do gatunków innych niż żółw błotny w celu wyeliminowania ryzyka wyników pozytywnie fałszywych (tzn. DNA gatunku badanego nie było obecne w próbce, ale wynik uzyskany był pozytywny, bo pochodził od innego gatunku o sekwencji DNA takiej jak sekwencja sondy). Do przeprowadzenia tej analizy wykorzystano sekwencje DNA żółwia błotnego uzyskane w trakcie własnych badań oraz sekwencje DNA wszystkich



Projekt współfinansowany ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020

gatunków dostępnych w bazie GenBank oraz narzędzia informatyczne z rozbudowanymi algorytmami porównań sekwencji DNA.

#### 4. GenBank

To otwarta i dostępna w internecie amerykańska bioinformatyczna baza danych zawierająca zbiór sekwencji nukleotydowych. Baza GenBank jest zbiorem sekwencji pochodzącym z jednostek naukowych i badawczych z całego świata oraz baz wielkoskalowych. Zawiera informacje na temat sekwencji DNA, RNA i białek, obecnie największa dostępna baza danych o sekwencjach DNA.

#### 5. NTC

(No Template Control) tzw. kontrola czystości odczynników, reakcja PCR zawierająca wszystkie odczynniki oprócz DNA, wynik pozytywny reakcji świadczy o zanieczyszczeniu odczynników, kontrola negatywna powinna dać negatywny wynik testu (eliminacja wyników pozytywnie fałszywych)

#### 6. PTC

Pozytywna kontrola reakcji, zawiera wszystkie odczynniki reakcji PCR oraz DNA wyizolowane z próbki referencyjnej dla danego gatunku o znanym stężeniu, informuje o prawidłowości zachodzącej reakcji, kontrola pozytywna powinna dać pozytywny wynik testu (eliminacja wyników fałszywie negatywnych gdy wynik negatywny może wynikać z problemów związanych z samą reakcją a nie z braku obecności DNA szukanego gatunku w próbce).

#### 7. PCR

Łańcuchowa Reakcja Polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction) to metoda *in vitro* powszechnie stosowana w biologii i medycynie molekularnej. Podstawową zasadą tej metody jest powielanie określonej sekwencji DNA w niewielkiej próbce. Opisana i zastosowana po raz pierwszy w 1985 roku przez Saiki i wsp. (1985).

#### 8. Sondy TaqMan

To są krótkie oligonukleotydy (fragmenty kwasów nukleinowych o długości od kilkunastu do kilkuset nukleotydów) zawierające na końcu 5' znacznik fluorescencyjny, a na końcu 3' cząsteczkę wygaszającą fluorescencję (WIKIPEDIA).



Projekt współfinansowany ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020

*To sondy hydrolizujące emitujące fluorescencję, gdy aktywność egzonukleazowa enzymu polimerazy Taq w kierunku 5'-3' nici DNA hydrolizuje sondę. Analiza na bazie sondy TaqMan wykorzystuje odcięcie pojedynczej cząsteczki sondy od nici DNA szukanego gatunku, a więc intensywność sygnału fluorescencji jest uzależniona od liczby kopii DNA gatunku szukanego. Sonda zawiera zarówno reporter fluorescencyjny jak i fluorescencyjny wygaszacz. Kiedy sonda jest nienaruszona, barwnik wygaszający jest wystarczająco blisko barwnika reporterowego aby tłumić sygnał fluorescencyjny reportera (wygaszanie fluorescencji za pomocą FRET - zjawiska bezpromienistego transferu energii). Podczas PCR, aktywność nukleazowa 5' polimerazy rozszczepia sondę przyłączoną do nici DNA gatunku szukanego, oddzielając reporter i wygaszacz i pozwala barwnikowi reporterowemu emitować fluorescencję.*

### **9. Startery reakcji PCR**

*To syntetyczne, krótkie fragmenty DNA o określonej sekwencji. Są to jednoniciowe sekwencje DNA, składające się z ok 18-30 nukleotydów. Każda z nich jest komplementarna do jednego z końców sekwencji DNA badanego gatunku. Po połączeniu się starterów z sekwencją DNA gatunku polimeraza DNA wydłuża każdy ze starterów dobudowując drugą nić DNA na nici matrycowej, do której dołączył się starter. W ten sposób następuje amplifikacja czyli klonowanie DNA badanego gatunku.*



Projekt współfinansowany ze środków Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko na lata 2014-2020