

# **Szczegółowy Opis Przedmiotu Zamówienia**

**Ochrona żółwia błotnego – badania e-DNA**  
**w ramach realizacji projektu**  
**„Lubelska Natura 2000 – wdrażanie planów zadań ochronnych”**  
**POIS.02.04.00-00-0024/16**

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 Polimerase 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.

### Zamówienie obejmuje dwa etapy prac

Etap 1.

Pobranie 100 próbek wody o objętości 250 ml w okresie od dnia podpisania umowy do dnia 16 maja 2019 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.



Unia Europejska  
Fundusz Spójności



## **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 prób 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 16 maja 2019 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 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 2019 r., w tym:

- a) prace terenowe: od daty zawarcia umowy do dnia 16 maja 2019 r.
- b) analizy laboratoryjne i opracowanie wyników: do dnia 1 listopada 2019 r.
- c) złożenie sprawozdania do zamawiającego: do dnia 19 listopada 2019 r.

#### IV. Lokalizacja powierzchni monitoringowych

Nr na mapie	Obręb ewidencyjny	Gmina	Powiat	Forma ochrony przyrody	Współrzędne geograficzne	
					E	N
1.	Wólka Polinowska	Konstantynów	białski		23°8'20,8"	52°10'4,5"
2.	Klonownica Mała	Janów Podlaski	białski		23°9'15,7"	52°10'18,2"
3.	Ortel Książęcy II	Biała Podlaska gmina	białski		23°15'41,2"	51°58'17,9"
4.	Rozwadów	Ulan-Majorat	radzyński		22°25'48,2"	51°49'20,0"
5.	Rusiły	Podedwórze	parczewski	Rezerwat przyrody: Warzewo	23°14'35,9"	51°41'58,1"
6. lub 6'	Żminne	Siemień	parczewski	PLB060004 Dolina Tyśmienicy (OSO)	22°46'42,8"	51°38'51,9"
	Jezioro	Siemień	parczewski	PLB060004 Dolina Tyśmienicy (OSO)	22°45'40,9"	51°39'20,9"
7.	Kuraszew	Wołyń	radzyński	PLB060004 Dolina Tyśmienicy (OSO)	22°43'5,9"	51°41'5,6"
8.	Lichty	Czemierniki	radzyński	PLB060004 Dolina Tyśmienicy (OSO)	22°37'4,5"	51°42'46,6"
9.	Czemierniki I	Czemierniki	radzyński	PLB060004 Dolina Tyśmienicy (OSO)	22°36'7,6"	51°41'37,6"
10.	Bełcząc	Czemierniki	radzyński	PLB060004 Dolina Tyśmienicy (OSO)	22°35'3,7"	51°40'22,1"
11. lub 11'	Tchórzew	Borki	radzyński	PLB060004 Dolina Tyśmienicy (OSO)	22°32'50,9"	51°40'5,2"
	Lipniak	Kock gmina	lubartowski	PLB060004 Dolina Tyśmienicy (OSO)	22°32'6,4"	51°39'43,0"
12.	Tarkawica	Ostrówek	lubartowski	PLB060004 Dolina Tyśmienicy (OSO)	22°32'2,4"	51°38'15,3"
13.	Pawłowice	Stężycza	rycki	PLH140033 Podebłocie	21°42'18,4"	51°38'18,8"
14.	Sobibór	Włodawa	włodawski	Sobiborski Park Krajobrazowy	23°37'0,2"	51°28'51,3"
15.	Zbereże (j. Brudno)	Wola Uhruska	włodawski	PLH060043 Lasy Sobiborskie , rezerwat przyrody „Trzy jeziora”	23°38'09,7"	51°24'21,5"
16.	Izabelin (dz. ewid. 40)	Sosnowica	parczewski	Poleski Obszar Chronionego Krajobrazu. Otulina Poleskiego PK	23°08'21,4"	51°31'13,1"
17.	Uścimów Nowy	Uścimów	lubartowski	Otulina PK Pojezierze Łęczyńskie	22°55'22,1"	51°26'15,2"
18.	Wola Przybyławska	Garbów	lubelski	Obszar Chronionego Krajobrazu Kozi Bór, użytek ekologiczny	22°17'54,2"	51°25'24,6"
19.	Dobrosławów	Puławy gmina	puławski		21°51'32"	51°24'50"
20.	Oblasy	Janowiec	puławski	otulina Kazimierskiego Parku Krajobrazowego	21°51'45,1"	51°21'17,2"
21.	Podpakule	Sawin	chełmski	PLH060048 Podpakule (SOO)	23°28'25,5"	51°21'12,3"
22.	Ostrówek Podyski	Cyców	łęczyński	PLH060009 Jeziora Uściwierskie (SOO); Poleski Obszar Chronionego Krajobrazu	23°8'41,1"	51°21'11,7"
23.	Biesiadki	Cyców	łęczyński	Chełmski Obszar Chronionego Krajobrazu	23°09'01,8"	51°16'37,9"
24.	Jasieniec	Puchaczów	łęczyński		23°3'4,2"	51°15'56,3"

Nr na mapie	Obręb ewidencyjny	Gmina	Powiat	Forma ochrony przyrody	Współrzędne geograficzne	
					E	N
25.	Rudka - Kolonia	Ruda-Huta	chełmski		23°40'40,3"	51°14'34,0"
26.	Świerże	Dorohusk	chełmski	PLH060102 Las Żaliński (SOO); Chełmski Park Krajobrazowy	23°41'52,2"	51°12'5,2"
27.	Nowosiółki	Chełm	chełmski	PLH060064 Nowosiółki (Julianów) (SOO)	23°19'0,7"	51°11'16,6"
28.	Mogielnica	Siedliszcze - obszar wiejski	chełmski		23°13'49,6"	51°12'46,0"
29.	Olchowiec	Wierzbica	chełmski	Chełmski Obszar Chronionego Krajobrazu	23°14'22,5"	51°14'34,1"
30.	Białka Kolonia	Milejów	łęczyński	otulina Nadwieprzańskiego Parku Krajobrazowego	23°2'30,0"	51°12'46,8"
31.	Pogranicze	Dorohusk	chełmski	Chełmski Obszar Chronionego Krajobrazu	23°41'45,2"	51°5'43,2"
32.	Kanie	Rejowiec Fabryczny - gmina	chełmski	PLH060065 Pawłów (SOO); Pawłowski Obszar Chronionego Krajobrazu	23°9'38,3"	51°8'12,4"
33.	Ruda Godowska	Opole Lubelskie - obszar wiejski	opolski	Chodelski Obszar Chronionego Krajobrazu	22°4'16,7"	51°8'16,4"
34.	Emilcin	Opole Lubelskie - obszar wiejski	opolski	PLH060054 Opole Lubelskie (SOO)	22°1'52,6"	51°8'5,2"
35.	Starosiele	Dubienka	chełmski	PLH060032 Poleska Dolina Bugu, PLB060007 Lasy Strzeleckie (OSO); Strzelecki Park Krajobrazowy;	23°54'15,9"	51°01'44,6"
36.	Ubrodowice	Hrubieszów	hrubieszowski	PLH060099 Uroczyska Lasów Strzeleckich (SOO); PLB060007 Lasy Strzeleckie (OSO); Strzelecki Park Krajobrazowy;	23°53'26,8"	50°55'58,8"
37.	Kłodnica Górna	Borzechów	lubelski		22°17'29,6"	51°2'50,2"
38.	Bzowiec	Rudnik	krasnostawski	PLH060040 Dolina Łętowni (SOO)	22°53'32,7"	50°49'23,5"
39.	Chłaniówek	Żółkiewka	krasnostawski	PLH060040 Dolina Łętowni (SOO)	22°52'11,8"	50°49'45,6"
40.	Turkowice	Werbkowice	hrubieszowski	Ostoja Tyszowiecka PLB060011	23°44'57,8"	50°39'23,4"
41.	Tuczapy	Mircze	hrubieszowski	PLH060084 Adelina (SOO); PLB060011 Ostoja Tyszowiecka (OSO)	23°46'42,1"	50°37'29,8"
42.	Swaryczów	Komarów - osada	zamojski	PLH060025 Dolina Sieniochy (SOO); PLB060011 Ostoja Tyszowiecka (OSO)	23°35'50,0"	50°38'51,7"
43.	Dub	Komarów - osada	zamojski	PLH060025 Dolina Sieniochy (SOO); PLB060011 Ostoja Tyszowiecka (OSO)	23°34'23,3"	50°39'00,9"
44.	Flisy	Dzwola	janowski	Uroczyska lasów Janowskich PLH060031, Lasy Janowskie PLB060005, PK Lasy Janowskie	22°29'14,8"	50°39'39,2"

Nr na mapie	Obręb ewidencyjny	Gmina	Powiat	Forma ochrony przyrody	Współrzędne geograficzne	
					E	N
45.	Gwizdów	Modliborzyce-obszar wiejski	janowski	Rezerwat przyrody Imielty Ług, Uroczyska lasów Janowskich PLH060031, Lasy Janowskie PLB060005, PK Lasy Janowskie	22°13'31,8"	50°39'29,7"
46.	Łązek Ordynacki	Janów Lubelski-obszar wiejski	janowski	Otulina PK Lasy Janowskie	22°17'31,4"	50°38'26,2"
47.	Kunki	Susiec	tomaszowski	PLB060012 Roztocze (OSO); Krasnobrodzki Park Krajobrazowy	23°16'31,6"	50°27'11,1"
48.	Majdan Sopocki	Susiec	tomaszowski	PLB060012 Roztocze (OSO)	23°7'18,2"	50°28'21,0"
49. lub 49'	Brzeziny	Józefów gmina	biłgorajski	PLB060012 Roztocze (OSO)	23°1'45,2"	50°29'49,1"
	Brzeziny	Józefów gmina	biłgorajski	PLB060012 Roztocze (OSO)	23°1'39,7"	50°30'13,4"
50.	Aleksandrów IV	Aleksandrów	biłgorajski	PLH060034 Uroczyska Puszczy Solskiej (SOO); PLB060008 Puszcza Solska (OSO)	22°49'15,9"	50°28'11,9"

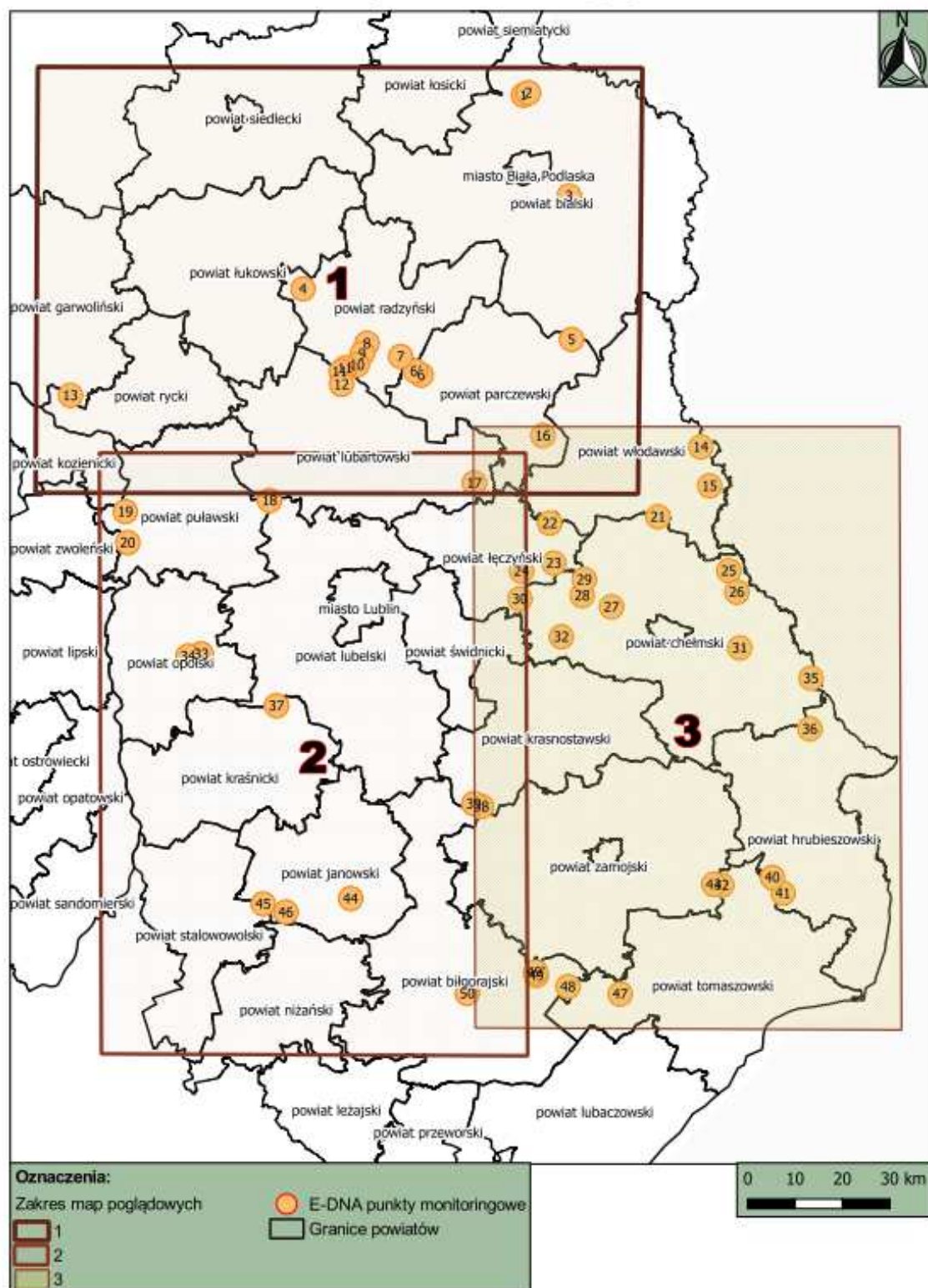
**UWAGA:**

W pozycjach 6, 11 i 49 wskazano po dwie równorzędne lokalizacje, spośród których Wykonawca dokona wyboru jednego miejsca poboru próbek wody uwzględniając lokalne uwarunkowania siedliskowe.

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.

## Lokalizacja stanowisk monitoringowych





# 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

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).

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.