



Sfinansowano ze środków funduszu leśnego
Państwowego Gospodarstwa Leśnego Lasów Państwowych
przekazanych Tatrzańskiemu Parkowi Narodowemu w roku 2017

Monitoring genetyczny dynamiki populacji niedźwiedzi brunatnych

RAPORT

(WYKONANY W RAMACH UMOWY ZP/579/2017 Z DNIA 17.08.2017)

Teresa Berezowska-Cnota, Maciej Konopiński

Instytut Ochrony Przyrody PAN

kierowany przez prof. dr hab. Henryka Okarmę



KRAKÓW, GRUDZIEŃ 2017

Badania wykonano na podstawie umowy ZP/579/2017, z dnia 17.08.2017. Umowa obejmowała następujące czynności z wykorzystaniem własnego specjalistycznego sprzętu technicznego i materiałów:

- 1) Zbiór prób (20 kwadratów x 1 dzień x 3 kontrole w roku).
- 2) Analiza genetyczna – min. 150 prób.
- 3) Nadzór merytoryczny oraz opracowanie wyników z przeprowadzonych badań.

Zbiór materiałów

Do zbioru materiałów przygotowano 300 zestawów do pobierania prób genetycznych (Ryc. 1.), zawierających po dwie probówki 50 ml, wypełnionych alkoholem etylowym 96% cz.d.a., z oznaczonym poziomem do którego należy wypełnić probówkę odchodami, a także: rękawiczki, sterylną szpatułkę, koperty papierowe z nadrukiem (na sierść) i ołówek. Woreczki i probówki oklejono odpowiednio przygotowanymi etykietami.



Ryc. 1. Zestaw do pobierania prób genetycznych z odchodów niedźwiedzi.

Do przygotowania pułapek włosowych zakupiono 10 L (2 x 5 kg) smoły bukowej „horyzont” – preparat w formie koncentratu oraz drut kolczasty (Ryc. 2.).



Ryc. 2. Zestaw do przygotowania pułapek włosowych.

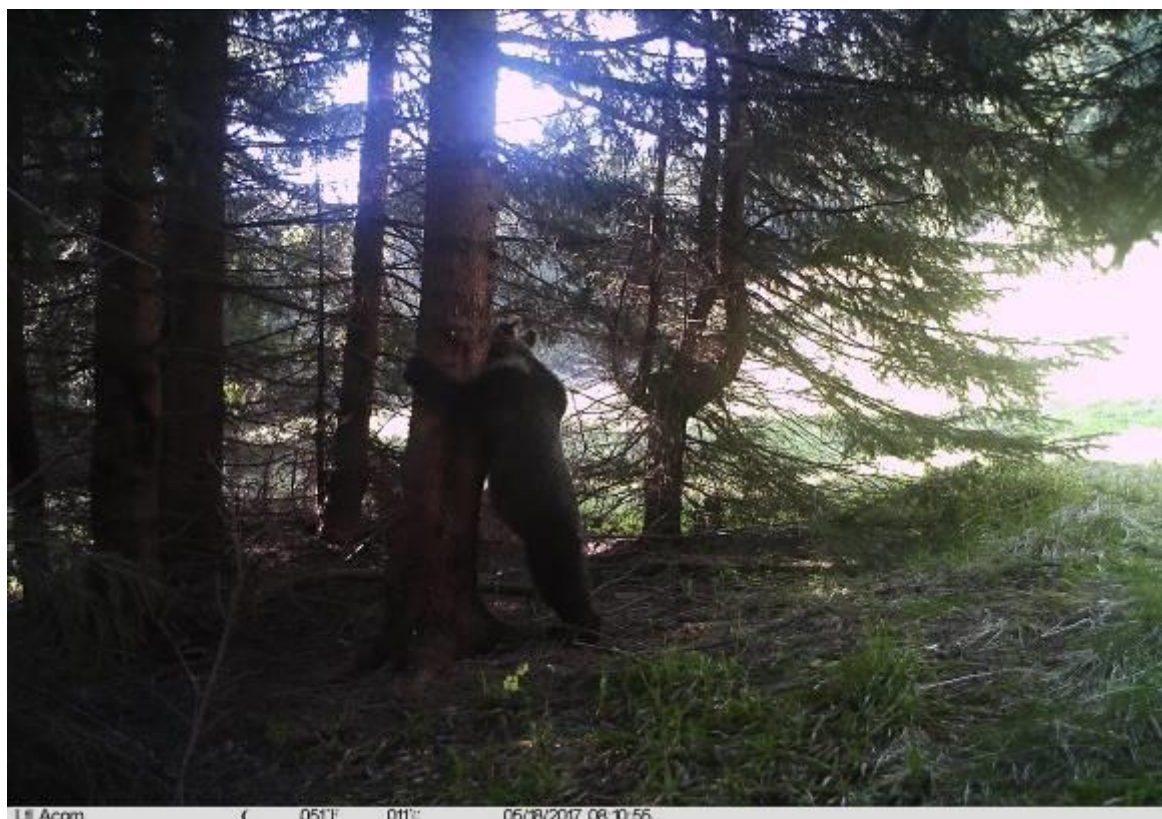
Prace terenowe w ramach projektu realizowano w okresie od 15 maja do 31 października 2017 r. W oparciu o siatkę kwadratów o bokach $5 \text{ km} \times 5 \text{ km}$ (Fernández i in. 2012) obszar Tatrzańskiego Parku Narodowego został podzielony na 20 kwadratów, przy czym tylko jeden pełny kwadrat tej siatki znajduje się w całości w obszarze badań, pozostałe 19 stanowią tylko fragmenty. Zgodnie z założeniami projektu metodyka badań obejmowała zbieranie sierści niedźwiedzi za pomocą pułapek włosowych (Ryc.3.) oraz prób odchodów niedźwiedzi wzdłuż transektów.

Do zainstalowania pułapek włosowych wytypowano 13 kwadratów o znacznie większym udziale terenów leśnych. W wyznaczonych w ten sposób powierzchniach badawczych w okresie 15-22 maja 2017 r. zamontowano po jednej pułapce włosowej w trzynastu lokalizacjach:

I.	19,85675	49,23449	(kwadrat 8)
II.	19,79912	49,26813	(kwadrat 13)
III.	19,79503	49,25297	(kwadrat 7)
IV.	19,89155	49,26063	(kwadrat 14)
V.	19,94750	49,26282	(kwadrat 15)
VI.	19,95559	49,25105	(kwadrat 9)
VII.	19,97987	49,25697	(kwadrat 10)
VIII.	20,00747	49,27521	(kwadrat 16)
IX.	20,06701	49,28031	(kwadrat 17)
X.	20,12820	49,29160	(kwadrat 18)
XI.	20,05792	49,25694	(kwadrat 11)
XII.	20,07395	49,21037	(kwadrat 5)
XIII.	20,07303	49,32195	(kwadrat 20)

Rozmieszczenie pułapek włosowych przedstawiono na mapie (Ryc.4.).

W pierwszej kolejności pułapki instalowano na znanych drzewach znakowanych przez niedźwiedzie. W przypadku braku informacji o „naturalnym” drzewie na obszarze danej powierzchni badawczej, pułapkę włosową instalowano na drzewie wysmarowanym smołą bukową (Berezowska-Cnota i in. 2017).



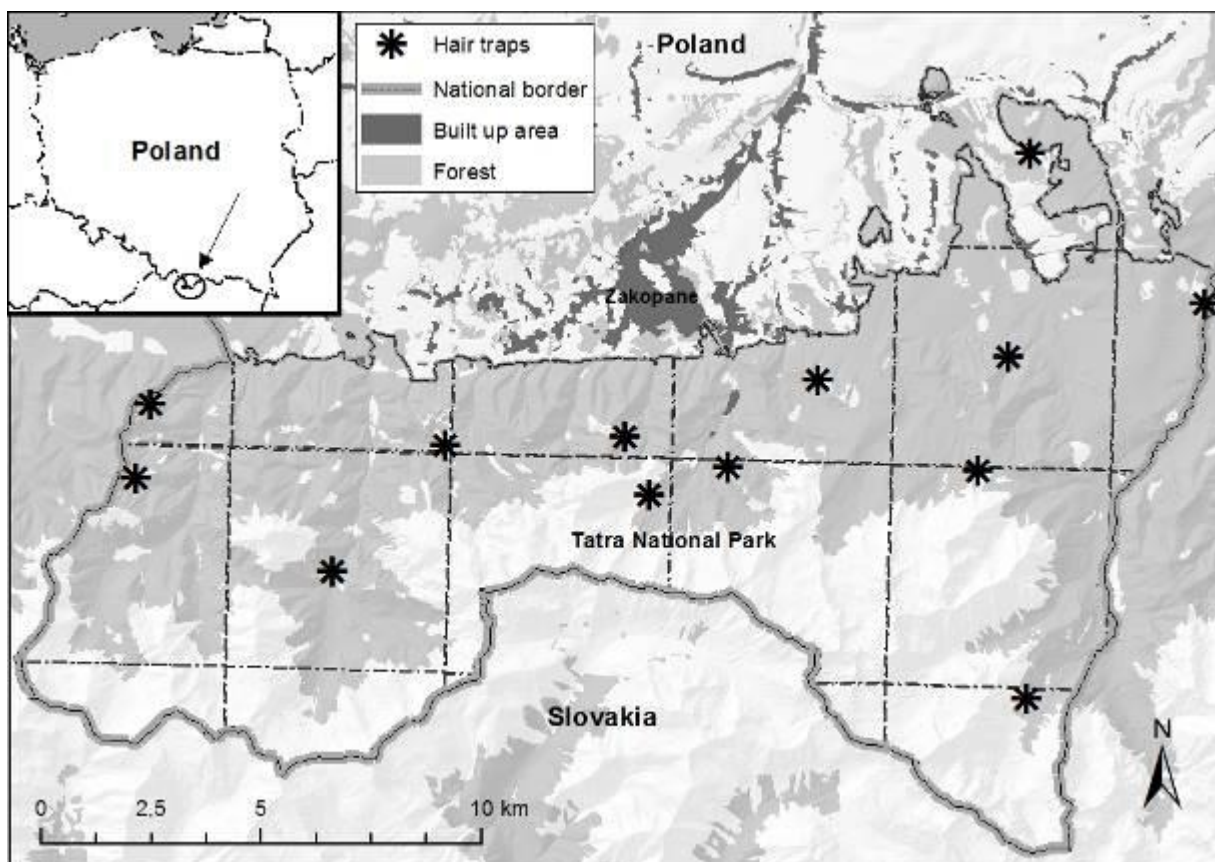
Ryc. 3. Niedźwiedź ocierający się o pułapkę włosową na Polanie Tyrałówka.

Pułapki włosowe kontrolowano do końca października 2017 r., średnio co dwa tygodnie. Łącznie przeprowadzono 116 kontroli, w czasie których zebrano 128 prób sierści niedźwiedzia brunatnego. Wszystkie pułapki sprawdzane były co najmniej ośmiokrotnie.

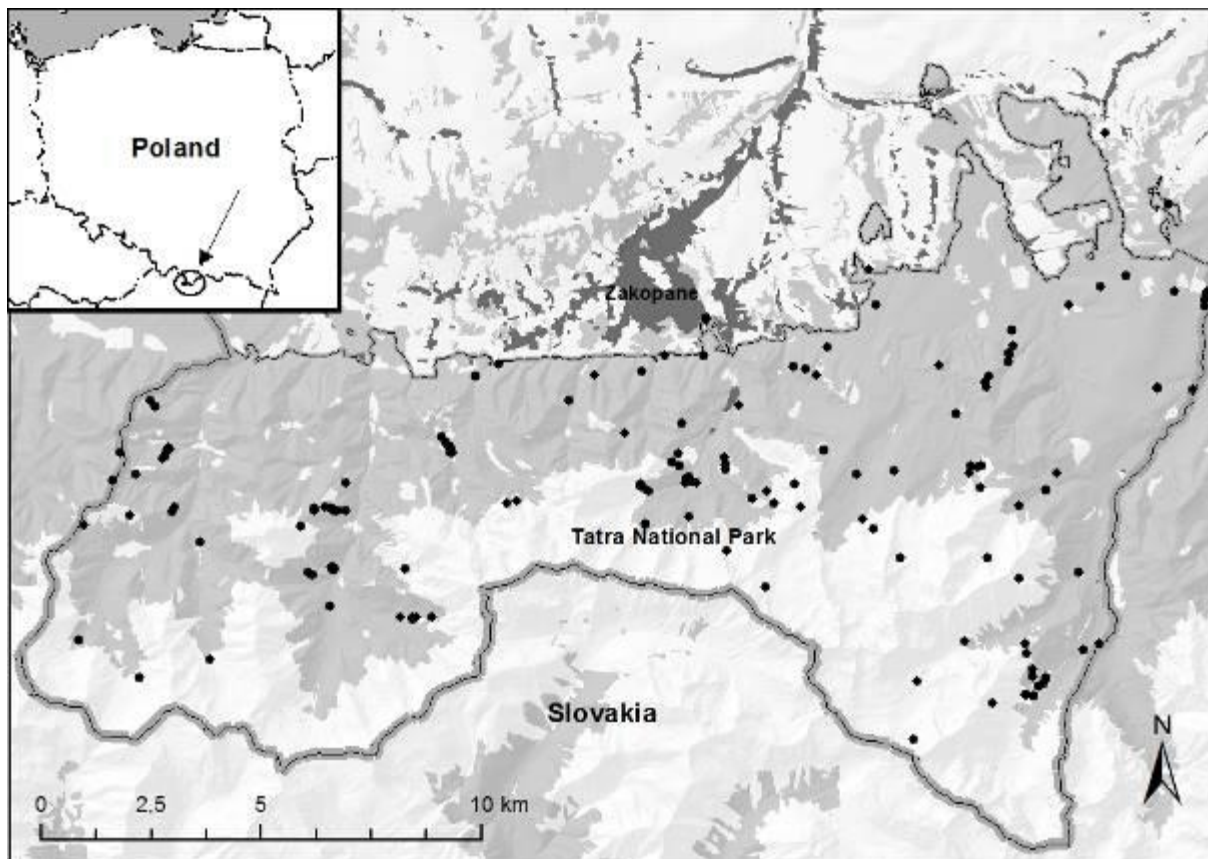
W trakcie kontroli pułapek włosowych zbierano także próby świeżego kału niedźwiedzi na wyznaczonych transektach. Łącznie pokonano ponad 200 km odcinków transektowych. Ponadto, świeży kał niedźwiedzi zbierano w sposób oportunistyczny poza wyznaczonymi transektami i poza wyznaczonymi terminami kontroli. Z każdego odchodu materiał pobierano do dwóch próbek. Łącznie zebrano 120 prób kału (240 próbek) niedźwiedzia brunatnego.

Zgromadzone próby sierści przechowywano w papierowych kopertach w temperaturze pokojowej, próby kału przechowywano w zamrażalniku w temperaturze -20°C .

W ramach prowadzonych prac terenowych zebrano łącznie 248 prób sierści i kału niedźwiedzia brunatnego (Ryc. 5., Załącznik 1).



Ryc. 4. Rozmieszczenie pułapek włosowych w Tatrzańskim Parku Narodowym na tle siatki kwadratów o bokach 5 x 5 km.



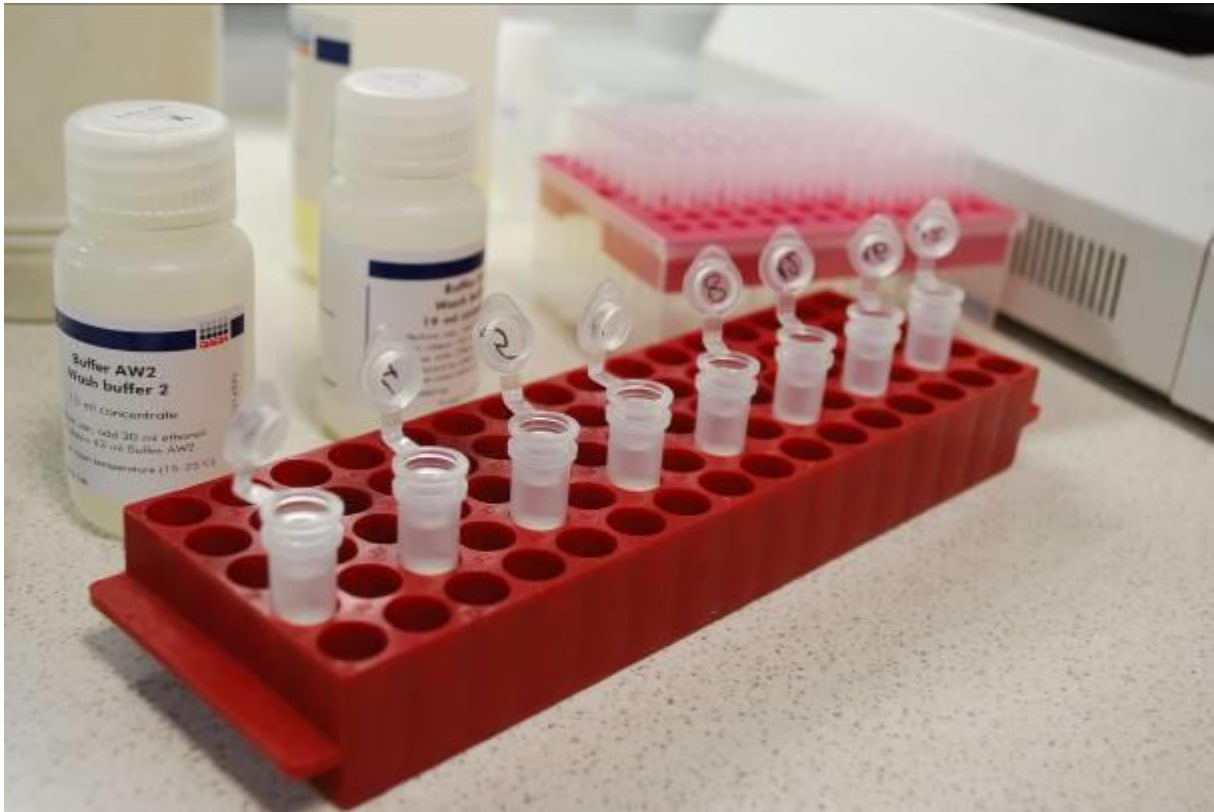
Ryc. 5. Lokalizacje prób sierści i kału zebranych na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego.

Analizy genetyczne

Izolację DNA przeprowadzono dla 120 prób odchodów oraz 112 prób sierści. Wstępne przygotowanie odchodów do izolacji DNA obejmowało ich rozdrobnienie i wydzielenie prób o wadze około 200 mg. Z prób sierści odcinano pod lupą cebulki włosowe. Tak przygotowane próby przechowywano w sterylnych probówkach w zamrażalniku w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz. 16 prób sierści nie zostało poddanych procesowi izolacji DNA ze względu na brak cebulek włosowych. Materiał genetyczny izolowano przy użyciu komercyjnych zestawów do izolacji DNA zgodnie ze standardowymi protokołami. Dla prób odchodów zastosowano zestaw Stool Kit (Qiagen™), w przypadku prób sierści wykorzystano zestaw Nucleospin Tissue Kit XS (Macherey & Nagel™).

Ilość oraz czystość DNA określono przy pomocy spektrofotometru NanoDrop 1000. Ilość DNA określano na podstawie absorbancji przez roztwór DNA promieniowania ultrafioletowego o długości 260 nm, natomiast czystość DNA określano jako stosunek absorbancji UV o długościach 260/280 nm (zanieczyszczenia

białkowe) i 260/230 nm (zanieczyszczenie niespecyficzne). Przed wykonaniem pomiaru próby zwirowano przez 5 min w 20 000 G, aby usunąć ewentualne cząstki koloidalne znajdujące się w roztworze, które mogłyby wpłynąć na wynik odczytu.



Ryc. 6. Izolację DNA przeprowadzono na kolumnach ze złożem krzemionkowym przy użyciu komercyjnych zestawów.

Identyfikację osobników przeprowadzono w oparciu o polimorfizm długości loci mikrosatelitarnych. Wykorzystano zestaw dwunastu markerów opisany w Skrbinšek i in. 2010: Mu10, Mu50, G10L, Mu59, Mu23 (Bellemain i Taberlet 2004); G10X, G10P, Mu09, Mu15 (Taberlet i in. 1997); G1D, G10H, G10C (Paetkau i in. 1998) oraz w celu określenia płci osobników parę starterów do amplifikacji genu SRY (Bellemain i Taberlet 2004). Wszystkie loci namnażano w pojedynczej reakcji multiplexowej przy użyciu Multiplex PCR Kit (Qiagen™). Reakcje wykonywano w termocyklerze Eppendorf™ MastCycler Pro w następującym profilu temperaturowym

1. denaturacja wstępna (95°C, 15 min),
2. amplifikacja właściwa, powtarzana w 38 cyklach, obejmująca:
 - denaturację (94°C, 30 s),
 - hybrydyzację (58°C, 90 s),
 - wydłużanie (72°C, 60 s),
3. końcowe wydłużanie produktów (60°C, 30 min).

W reakcjach wykorzystano startery znakowane fluorescencyjnie czterema zostały wybarwione czterema różnymi różnymi znacznikami tak, aby zakresy długości

amplifikowanych mikrosatelitów barwionych tym samym fluorochromem nie nachodziły na siebie. Sekwencje i stężenie starterów, zakresy długości amplifikowanych produktów oraz fluorochromy, którymi zostały wybarwione startery przedstawia tabela 1. Reakcje prowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Skrbinšek i in. 2010. Skuteczność amplifikacji sprawdzano przez elektroforezę w 2,5% żelu agarozowym (Prona™, Ryc. 7). DNA znakowano fluorescencyjnie przez kąpiel w rozworze bromku etydyny (Applichem™). Skład mieszaniny reakcyjnej multiplex PCR przedstawia tabela 2. Produkty reakcji multiplex PCR przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C.

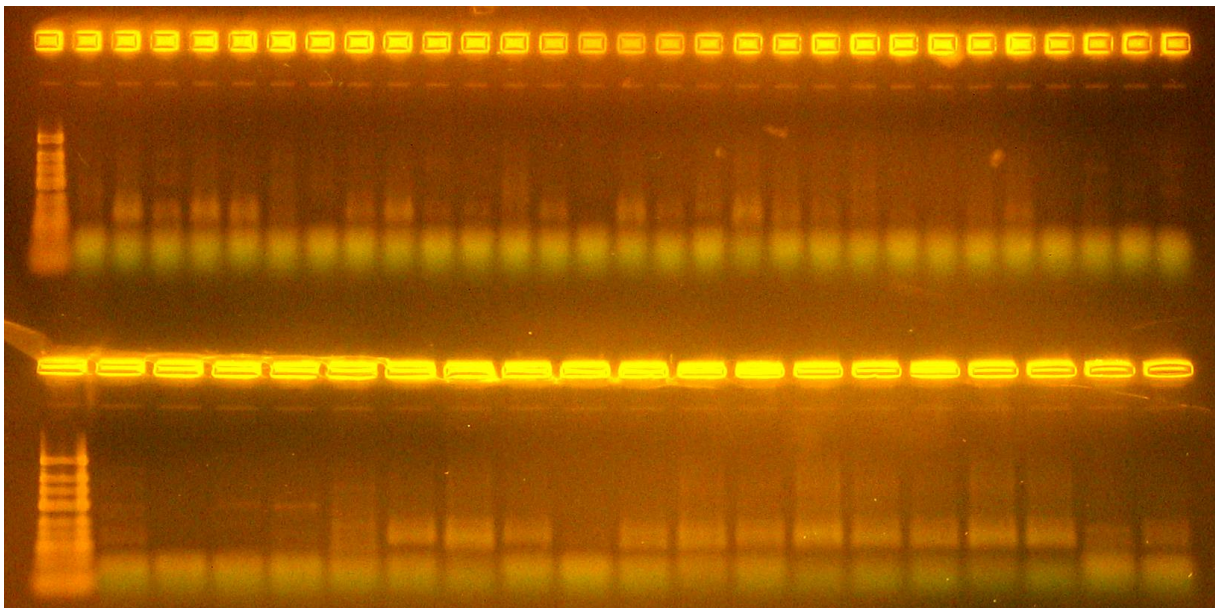
Tabela. 1. Nazwa locus, sekwencja wraz z użytym fluorochromem oraz stężenie starterów użytych w reakcji multiplex PCR wraz z zakresem długości produktu PCR.

Locus	5' starter	3' starter	C [μl]	zakres długości
Mu10	ATTCAGATTTTCATCAGTTTGACA	6FAM-TCAGCATAGTTACACAAATCTCC	0.19	114–130
G10X	6FAM-CCCTGGTAACCACAAATCTCT	TCAGTTATCTGTGAAATCAAAA	0.40	132–154
G1D	ATCTGTGGGTTTATAGGTTACA	6FAM-CTACTCTTCTACTCTTTAAGAG	0.25	168–182
G10H	6FAM-CAACAAGAAGACCACTGTAA	AGAGACCACCAAGTAGGATA	0.20	221–257
Mu50	GTCTCTGTCATTTCCCCATC	6FAM-AACCTGGAACAAAATTAACAC	0.06	79–103
G10P	TACATAGGAGGAAGAAAGATGG	VIC-AAAAGGCCTAAGCTACATCG	0.09	122–150
Mu09	AGCCACTTTGTAAGGAGTAGT	VIC-ATATAGCAGCATATTTTTGGCT	0.07	174–206
G10C	VIC-AAAGCAGAAGGCCTTGATTTCTG	GGGACATAAACACCGAGACAGC	0.05	97–116
SRY	GAACGCATTCTTGGTGTGGTC	PET-TGATCTCTGAGTTTTGCATTTG	0.06	75
Mu15	PET-CTGAATTATGCAATTAACAGC	AAATAAGGGAGGCTTGGGT	0.15	117–131
G10L	PET-ACTGATTTTATTCACATTTCCC	GATACAGAAACCTACCCATGCG	0.10	156–166
Mu59	GCTCCTTTGGGACATTGTAA	NED-TGACTGTCACCAGCAGGAG	0.15	97–121
Mu23	NED-TAGACCACCAAGGCATCAG	TTGCTTGCCCTAGACCACC	0.07	142–156

Tabela. 2. Odczynniki użyte w reakcji multiplex PCR.

Odczynnik	Ilość	Producent
Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5,00 μl	Qiagen™
Q- Solution	1,00 μl	Qiagen™
RNAse- Free Water	1,00 μl	Invitrogen™
Mieszanina starterów	1,00 μl	Applied Biosystems™
Matryca DNA	2 μl	-

Do odczytu długości amplifikowanych fragmentów użyto 16-sto kapilarowego analizatora genetycznego 3130XL Genetic Analyzer firmy Applied Biosystems™. Do elektroforezy użyto mieszaniny 0,5 µl mieszaniny PCR, 0,5 µl standardu długości GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2.0 Dx (Applied Biosystems™) oraz 10 µl dejonizowanego formamidu (Applied Biosystems™). Przed elektroforezą DNA zawarte w próbkach denaturowano przez ogrzanie w temperaturze 95 °C przez 2 minuty a następnie gwałtowne schłodzenie w mieszaninie wody z lodem. Próbki zawierające duże ilości produktu były rozcieńczane jałową wodą. Schemat rozcieńczenia próby do odczytu przedstawia tabela 3. Długości fragmentów oznaczono w programie GeneMapper® v.4.0 firmy Applied Biosystems™ (Ryc. 8).



Ryc. 7. Zdjęcie żelu z rozdzielonymi produktami reakcji PCR.

W celu wykrycia potencjalnych błędów genotypowania całą procedurę powtarzano od dwóch do czterech razy dla każdej próby. Genotyp konsensusowy ustalano według następującego wzoru – dla loci heterozygotycznych akceptowano wynik w przypadku dwóch jednakowych odczytów, dla loci homozygotycznych akceptowano wynik w przypadku trzech jednakowych odczytów. Następnie pogrupowano wszystkie próby o jednakowym genotypie uzyskując unikalne (odrębne) genotypy. Do identyfikacji osobników wybrano genotypy, które udało się ustalić genotyp w przynajmniej w 8 z 12 badanych loci. Za jednakowe uznawano genotypy różniące się najwyżej w jednym locus, kiedy różnica mogła być wynikiem wypadnięcia allelu (ang. *allelic dropout*) – t.j. w obu genotypach locus jest homozygotyczne i różni się wykrytym allelem lub w jednym genotypie locus jest heterozygotyczne, a allel w tym samym locus drugiego genotypu zgadza się długością z jednym z alleli genotypu pierwszego.



Ryc. 8. Chromatogramy trzech próbek zanalizowane w programie GeneMapper 4.0.

Tabela. 3. Schemat rozcieńczenia próby reakcji multiplex PCR użytej do analizy w analizatorze genetycznym.

Odczynnik	Ilość	Producent
Rozcieńczony produkt reakcji multiplex PCR	0,5 µl	-
GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard	0,5 µl	Applied Biosystems™
Formamid	10 µl	Applied Biosystems™

Analizy statystyczne

W celu oszacowania liczebności populacji dane na temat liczby unikalnych genotypów oraz częstości ich występowania zostały przeanalizowane przy użyciu pakietu 'capwire' (Pennell i in. 2013) implementowanego w programie R (wersja 3.0.3; R Development Core Team 2014). W procesie wyboru modelu z zastosowaniem testu współczynnika wiarygodności (LRT, ang. likelihood ratio test), wykazano różnicę w prawdopodobieństwie napotkania genotypów, dlatego w obliczeniach zastosowano model TIRM (Two Innate Rates Model). Model ten zakłada istnienie w populacji

dwóch klas osobników o odmiennym prawdopodobieństwie odłowu (ang. capture probability).

Wyniki

Liczebność niedźwiedzi na terenie Tatrzańskiego Parku Narodowego oszacowano wstępnie na 20-60 osobników.

Zgodnie z art 4 umowy ZP/579/2017, z dnia 17.08.2017 szczegółowe wyniki zostaną opublikowane w jednym z czasopism naukowych w przeciągu roku kalendarzowego liczonego od dnia rozliczenia umowy. Jako czasopisma naukowe rozumie się te wymienione w oficjalnych listach A i B czasopism na stronie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: <http://www.nauka.gov.pl/ujednolicony-wykaz-czasopism-naukowych/>.

Wcześniejsze upublicznienie wyników mogłoby zagrozić ich publikacji, gdyż większość liczących się czasopism naukowych prowadzi w tym zakresie bardzo restrykcyjną politykę. Wobec więc zapisów art. 3 ZP/579/2017, z dnia 17.08.2017 umowy podanie szczegółowych wyników w raporcie mogłoby narazić wykonawcę na problem ich późniejszego opublikowania i konieczność zwrotu całości wynagrodzenia.

Cytowana literatura

- Bellemain, E., Taberlet, P. 2004. Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces. *Molecular Ecology Notes* 4: 519–522.
- Berezowska-Cnota, T., Luque-Márquez, I., Elguero-Claramunt, I., Bojarska, K., Okarma, H., Selva, N. 2017. Effectiveness of different types of hair traps for brown bear research and monitoring. *PLoS ONE* 12(10): e0186605.
- Fernández, N., Selva, N., Yuste, C., Okarma, H., Jakubiec, Z. 2012. Brown bears at the edge: Modeling habitat constrains at the periphery of the Carpathian population. *Biological Conservation* 153: 134-142.
- Pennell, M.W., Stansbury, C.R., Waits, L.P., Miller, C.R. 2013. Capwire: a R package for estimating population census size from non-invasive genetic sampling. *Molecular Ecology Resources* 13: 154–157.
- Paetkau, D.W., Shields, G.F., Strobeck, C. 1998. Gene flow between insular, coastal and interior populations of brown bears in Alaska. *Molecular Ecology* 7: 1283-1292.

R Development Core Team. 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna: R foundation for statistical computing [software]. <http://www.r-project.org/>

Skrbinšek, T., Jelenčič, M., Waits, L., Kos, I., Trontelj, P. 2010. Highly efficient multiplex PCR of noninvasive DNA does not require pre-amplification. *Molecular Ecology Resources* 10: 495-501.

Taberlet, P., Camarra, J.J., Griffin, S., Uhrès, E., Hanotte, O., Waits L.P., Dubois-Paganon C., Burke T., Bouvet, J. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6: 869-876.

Załącznik 1. Wykaz prób zebranych w ramach projektu „Monitoring genetyczny dynamiki populacji niedźwiedzi brunatnych”.

lab	data	typ	analiza	x	y	sqr
U000	2015-05-29	sierść	przeanalizowano	19,979960	49,239148	10
U001	2017-04-04	kał	przeanalizowano	19,856300	49,246628	8
U002	2017-04-12	kał	przeanalizowano	19,954505	49,244349	9
U003	2017-05-15	kał	przeanalizowano	19,803238	49,256315	7
U004	2017-05-15	kał	przeanalizowano	19,803914	49,256929	7
U005	2017-05-15	kał	przeanalizowano	19,804426	49,257565	7
U006	2017-05-15	kał	przeanalizowano	19,805428	49,258206	7
U007	2017-05-15	kał	przeanalizowano	20,118965	49,293450	18
U008	2017-05-16	kał	przeanalizowano	20,067382	49,280015	17
U009	2017-05-16	sierść	przeanalizowano	19,893255	49,259494	14
U010	2017-05-17	kał	przeanalizowano	20,060468	49,273266	17
U011	2017-05-17	sierść	przeanalizowano	20,060993	49,275514	17
U012	2017-05-18	kał	przeanalizowano	19,907946	49,276675	15
U013	2017-05-18	kał	przeanalizowano	19,952500	49,275639	15
U014	2017-05-20	sierść	przeanalizowano	19,890223	49,261721	14
U015	2017-05-22	sierść	odrzucono	19,955622	49,251035	9
U016	2017-05-22	kał	przeanalizowano	20,076423	49,210203	5
U017	2017-05-25	kał	przeanalizowano	20,096556	49,220967	11
U018	2017-05-26	kał	odrzucono	19,962554	49,257073	10
U019	2017-05-26	kał	przeanalizowano	19,964263	49,258814	16
U020	2017-05-26	sierść	przeanalizowano	19,795043	49,253023	7
U021	2017-05-26	sierść	przeanalizowano	19,799109	49,268208	13
U022	2017-05-27	kał	przeanalizowano	20,076026	49,215743	11
U023	2017-05-27	sierść	przeanalizowano	20,076069	49,214196	11
U024	2017-05-28	kał	przeanalizowano	19,857749	49,234211	8
U025	2017-05-28	sierść	przeanalizowano	19,856715	49,234475	8
U026	2017-05-28	sierść	przeanalizowano	19,856725	49,234533	8

U027	2017-05-28	sierść	przeanalizowano	19,892934	49,259732	14
U028	2017-05-29	sierść	przeanalizowano	19,955622	49,251035	9
U029	2017-05-29	sierść	przeanalizowano	19,979960	49,239148	10
U030	2017-05-29	kał	przeanalizowano	19,979960	49,239148	10
U032	2017-05-30	kał	przeanalizowano	19,952897	49,252115	9
U033	2017-05-30	kał	przeanalizowano	19,952856	49,252545	9
U034	2017-05-31	kał	przeanalizowano	20,089743	49,235570	11
U035	2017-06-01	kał	przeanalizowano	20,058094	49,256919	11
U036	2017-06-01	sierść	przeanalizowano	20,057941	49,256911	11
U037	2017-06-01	sierść	przeanalizowano	20,007171	49,275450	16
U038	2017-06-01	sierść	odrzucono	20,068440	49,281767	17
U039	2017-05-30	kał	przeanalizowano	19,930194	49,269576	15
U040	2017-06-02	kał	przeanalizowano	19,800717	49,266844	13
U041	2017-06-02	sierść	przeanalizowano	19,799109	49,268208	13
U042	2017-06-03	sierść	przeanalizowano	19,882096	49,224685	8
U043	2017-06-03	sierść	przeanalizowano	19,856715	49,234475	8
U044	2017-06-02	kał	przeanalizowano	19,964779	49,256301	10
U045	2017-06-06	sierść	przeanalizowano	19,891529	49,260601	14
U046	2017-06-06	sierść	przeanalizowano	19,892934	49,259732	14
U047	2017-06-07	sierść	przeanalizowano	19,947499	49,262823	15
U048	2017-06-07	sierść	przeanalizowano	19,955622	49,251035	9
U049	2017-06-07	sierść	przeanalizowano	19,978766	49,258235	10
U050	2017-06-06	kał	przeanalizowano	20,079343	49,252393	11
U051	2017-06-08	kał	przeanalizowano	20,009716	49,260001	16
U052	2017-06-09	kał	przeanalizowano	20,023271	49,296995	20
U053	2017-06-07	kał	przeanalizowano	19,965294	49,265151	16
U054	2017-06-12	kał	przeanalizowano	19,994338	49,248831	10
U055	2017-06-12	kał	przeanalizowano	20,010505	49,281013	16
U056	2017-06-12	kał	przeanalizowano	20,113684	49,273813	18
U057	2017-06-12	sierść	odrzucono	20,022289	49,245989	10
U058	2017-06-10	kał	przeanalizowano	20,091594	49,219835	11
U059	2017-06-13	kał	przeanalizowano	19,914150	49,248744	9
U060	2017-06-13	kał	przeanalizowano	19,911044	49,248299	9
U061	2017-06-14	sierść	przeanalizowano	19,891529	49,260601	14
U062	2017-06-14	sierść	przeanalizowano	19,856717	49,234472	8
U063	2017-06-14	sierść	przeanalizowano	19,892846	49,259757	14
U064	2017-06-14	sierść	przeanalizowano	19,892846	49,259757	14
U065	2017-06-14	sierść	przeanalizowano	19,856717	49,234472	8
U066	2017-06-14	sierść	przeanalizowano	20,128281	49,291605	18
U067	2017-06-14	sierść	przeanalizowano	20,128246	49,291597	18
U068	2017-06-14	sierść	przeanalizowano	20,128246	49,291597	18
U069	2017-06-14	sierść	przeanalizowano	20,128246	49,291597	18
U070	2017-06-14	sierść	przeanalizowano	20,128281	49,291605	18
U071	2017-06-14	sierść	przeanalizowano	20,128260	49,291606	18
U072	2017-06-15	sierść	przeanalizowano	19,799109	49,268208	13

U073	2017-06-15	sierść	przeanalizowano	19,799159	49,268257	13
U074	2017-06-15	kał	przeanalizowano	19,789913	49,257393	7
U075	2017-06-15	kał	przeanalizowano	19,805342	49,258458	7
U076	2017-06-16	sierść	przeanalizowano	20,057941	49,256911	11
U077	2017-06-16	sierść	przeanalizowano	19,967493	49,254008	10
U078	2017-06-19	sierść	przeanalizowano	20,067007	49,280307	17
U079	2017-06-20	kał	przeanalizowano	20,025701	49,243970	10
U081	2017-06-21	kał	przeanalizowano	19,857304	49,234103	8
U082	2017-06-21	sierść	przeanalizowano	19,882096	49,224685	8
U083	2017-06-21	sierść	przeanalizowano	19,882339	49,224090	8
U084	2017-06-21	kał	przeanalizowano	19,883216	49,224527	8
U085	2017-05-30	kał	przeanalizowano	19,878274	49,224608	8
U086	2017-06-16	kał	przeanalizowano	19,992142	49,231849	10
U087	2017-06-22	sierść	przeanalizowano	19,947499	49,262823	15
U088	2017-06-26	sierść	przeanalizowano	19,955622	49,251005	9
U089	2017-06-26	sierść	przeanalizowano	19,891529	49,260601	14
U090	2017-06-26	kał	przeanalizowano	20,066961	49,278666	17
U091	2017-06-30	sierść	przeanalizowano	19,799159	49,268257	13
U092	2017-07-02	kał	przeanalizowano	19,860697	49,251996	8
U093	2017-07-02	kał	przeanalizowano	19,854414	49,246802	8
U094	2017-07-02	kał	przeanalizowano	19,857210	49,246151	8
U095	2017-07-02	kał	przeanalizowano	19,858175	49,246113	8
U096	2017-07-02	kał	przeanalizowano	19,860989	49,246236	8
U097	2017-07-04	kał	przeanalizowano	19,787763	49,251789	7
U098	2017-07-04	kał	przeanalizowano	19,793413	49,244610	7
U099	2017-07-04	kał	przeanalizowano	19,806648	49,245428	7
U100	2017-07-04	kał	przeanalizowano	19,807500	49,246420	7
U101	2017-07-04	kał	przeanalizowano	20,001013	49,253024	10
U102	2017-07-05	kał	przeanalizowano	19,857388	49,234405	8
U103	2017-07-05	sierść	przeanalizowano	19,856717	49,234472	8
U104	2017-07-06	sierść	przeanalizowano	20,057941	49,256911	11
U105	2017-07-07	kał	przeanalizowano	20,060056	49,274285	17
U106	2017-07-07	kał	przeanalizowano	20,067946	49,285107	17
U107	2017-07-07	kał	przeanalizowano	19,947718	49,262951	15
U108	2017-07-07	kał	przeanalizowano	20,124786	49,273350	18
U109	2017-07-10	sierść	przeanalizowano	19,978766	49,258235	10
U110	2017-07-10	sierść	przeanalizowano	19,978766	49,258235	10
U111	2017-07-10	sierść	przeanalizowano	19,978766	49,258235	10
U112	2017-07-10	sierść	przeanalizowano	19,978766	49,258235	10
U113	2017-07-10	sierść	przeanalizowano	19,967493	49,254008	10
U114	2017-07-09	kał	przeanalizowano	20,055524	49,255601	11
U115	2017-07-09	sierść	przeanalizowano	20,050890	49,267797	17
U116	2017-07-12	sierść	przeanalizowano	20,007171	49,275450	16
U117	2017-07-12	sierść	przeanalizowano	20,007138	49,275412	16
U118	2017-07-05	sierść	odrzucono	20,076026	49,215743	5

U119	2017-07-12	sierść	przeanalizowano	19,978760	49,258219	10
U120	2017-07-12	kał	przeanalizowano	19,978766	49,258235	10
U121	2017-07-12	kał	przeanalizowano	19,987713	49,249981	10
U122	2017-07-11	kał	przeanalizowano	20,116744	49,311208	21
U123	2017-07-14	sierść	przeanalizowano	20,128260	49,291606	18
U124	2017-07-14	sierść	przeanalizowano	20,128260	49,291606	18
U125	2017-07-14	sierść	przeanalizowano	20,128260	49,291606	18
U126	2017-07-14	sierść	przeanalizowano	20,128260	49,291616	18
U127	2017-07-14	sierść	przeanalizowano	20,032021	49,255907	11
U128	2017-07-18	sierść	przeanalizowano	19,856717	49,234472	8
U129	2017-07-18	kał	przeanalizowano	19,879478	49,234590	8
U130	2017-07-18	sierść	przeanalizowano	20,128260	49,291616	18
U131	2017-07-18	kał	przeanalizowano	20,128281	49,291605	18
U132	2017-07-18	sierść	przeanalizowano	20,128246	49,291597	18
U133	2017-07-18	kał	przeanalizowano	19,938011	49,274644	15
U134	2017-07-21	kał	przeanalizowano	19,850927	49,246064	8
U135	2017-07-21	kał	przeanalizowano	19,970256	49,253012	10
U136	2017-07-22	kał	przeanalizowano	20,055906	49,257078	11
U137	2017-07-22	sierść	przeanalizowano	20,057948	49,256893	11
U138	2017-07-26	sierść	przeanalizowano	19,955622	49,251005	9
U139	2017-07-26	sierść	przeanalizowano	19,955622	49,251005	9
U140	2017-07-26	kał	przeanalizowano	19,954600	49,251352	9
U141	2017-07-26	kał	przeanalizowano	19,954600	49,251352	9
U142	2017-07-26	kał	przeanalizowano	19,979121	49,256748	10
U143	2017-08-02	sierść	przeanalizowano	19,978760	49,258219	10
U144	2017-07-22	kał	przeanalizowano	19,846795	49,242921	8
U145	2017-07-22	kał	przeanalizowano	20,058792	49,252626	11
U146	2017-07-27	kał	przeanalizowano	19,968805	49,253285	10
U147	2017-07-29	kał	przeanalizowano	19,968054	49,245964	10
U148	2017-08-03	kał	przeanalizowano	19,815519	49,239328	7
U149	2017-08-04	kał	przeanalizowano	20,020333	49,255209	10
U150	2017-08-08	sierść	przeanalizowano	20,128202	49,291596	18
U151	2017-08-08	sierść	przeanalizowano	20,128202	49,291596	18
U152	2017-08-09	sierść	przeanalizowano	19,856717	49,234472	8
U153	2017-08-09	sierść	przeanalizowano	19,856717	49,234472	8
U154	2017-08-09	sierść	przeanalizowano	19,856717	49,234472	8
U155	2017-08-09	sierść	przeanalizowano	19,856717	49,234472	8
U156	2017-08-09	kał	przeanalizowano	20,128573	49,292541	18
U157	2017-08-11	sierść	przeanalizowano	19,799159	49,268257	13
U158	2017-08-11	kał	przeanalizowano	19,779049	49,242450	7
U159	2017-08-14	sierść	przeanalizowano	19,955622	49,251005	9
U160	2017-08-14	sierść	przeanalizowano	19,955607	49,251010	9
U161	2017-08-14	sierść	przeanalizowano	20,067007	49,280307	17
U162	2017-08-15	kał	przeanalizowano	20,039138	49,200953	5
U163	2017-08-15	kał	przeanalizowano	19,819102	49,215280	1

U164	2017-08-16	kał	przeanalizowano	19,967768	49,254088	10
U165	2017-08-16	sierść	przeanalizowano	19,967493	49,254008	10
U166	2017-08-16	sierść	przeanalizowano	19,967269	49,253869	10
U167	2017-08-17	sierść	przeanalizowano	20,073873	49,210412	5
U168	2017-08-17	kał	przeanalizowano	19,850349	49,233076	8
U169	2017-08-17	kał	przeanalizowano	19,856280	49,226632	8
U170	2017-08-17	sierść	przeanalizowano	19,849456	49,233362	8
U171	2017-08-17	sierść	przeanalizowano	19,850698	49,233077	8
U172	2017-08-17	sierść	przeanalizowano	19,856717	49,234472	8
U173	2017-08-18	sierść	przeanalizowano	19,978760	49,258219	10
U174	2017-08-24	sierść	przeanalizowano	19,799159	49,268257	13
U175	2017-08-24	sierść	odrzucono	19,799159	49,268257	13
U176	2017-08-24	sierść	przeanalizowano	19,799159	49,268257	13
U177	2017-08-24	sierść	odrzucono	19,799159	49,268257	13
U178	2017-08-25	kał	przeanalizowano	20,128345	49,290515	18
U179	2017-08-25	sierść	przeanalizowano	20,128202	49,291596	18
U180	2017-08-28	kał	przeanalizowano	19,893917	49,258426	14
U181	2017-08-30	sierść	przeanalizowano	19,955607	49,251010	9
U182	2017-08-30	kał	przeanalizowano	20,034149	49,238175	11
U183	2017-08-31	kał	przeanalizowano	19,797212	49,211455	1
U184	2017-09-01	sierść	przeanalizowano	20,073873	49,210412	5
U185	2017-09-05	kał	przeanalizowano	20,045652	49,277593	17
U186	2017-09-07	kał	przeanalizowano	20,003936	49,276549	16
U187	2017-09-07	sierść	przeanalizowano	19,955607	49,251010	9
U188	2017-09-08	kał	przeanalizowano	20,080044	49,213831	11
U189	2017-09-06	kał	przeanalizowano	20,079638	49,213239	11
U190	2017-09-13	sierść	przeanalizowano	19,856717	49,234472	8
U191	2017-09-13	kał	przeanalizowano	19,882096	49,224685	8
U192	2017-09-14	kał	przeanalizowano	20,058999	49,257133	11
U193	2017-09-14	sierść	odrzucono	20,057948	49,256893	11
U194	2017-09-11	kał	przeanalizowano	20,082809	49,255793	11
U195	2017-09-15	kał	przeanalizowano	20,002982	49,248381	10
U196	2017-09-15	kał	przeanalizowano	19,983056	49,268907	16
U197	2017-09-15	sierść	przeanalizowano	20,073946	49,210356	5
U198	2017-09-15	kał	przeanalizowano	20,128993	49,293406	18
U199	2017-09-18	kał	przeanalizowano	19,979211	49,255825	10
U200	2017-09-18	sierść	przeanalizowano	19,799159	49,268257	13
U201	2017-09-18	sierść	przeanalizowano	19,799159	49,268257	13
U202	2017-08-22	kał	przeanalizowano	19,959726	49,868677	25
U203	2017-09-25	kał	przeanalizowano	20,025703	49,290028	16
U204	2017-09-25	kał	przeanalizowano	19,900866	49,274097	15
U205	2017-09-27	kał	przeanalizowano	20,039896	49,212820	5
U206	2017-09-27	kał	przeanalizowano	19,972097	49,279087	16
U207	2017-09-29	kał	przeanalizowano	19,972638	49,286672	16
U208	2017-09-28	kał	przeanalizowano	20,061359	49,238317	11

U209	2017-09-30	kał	przeanalizowano	19,959673	49,278904	16
U210	2017-09-30	kał	przeanalizowano	19,959673	49,278904	16
U211	2017-09-30	kał	przeanalizowano	19,959673	49,278904	16
U212	2017-09-30	kał	przeanalizowano	19,972598	49,286564	16
U213	2017-09-27	sierść	przeanalizowano	20,113818	49,273414	18
U214	2017-10-02	kał	przeanalizowano	20,054598	49,221259	11
U215	2017-10-04	sierść	odrzucono	19,856717	49,234472	8
U216	2017-10-04	sierść	odrzucono	19,850785	49,246499	8
U217	2017-10-04	sierść	odrzucono	19,850785	49,246499	8
U218	2017-10-04	sierść	odrzucono	19,850847	49,246571	16
U219	2017-09-29	sierść	przeanalizowano	19,882339	49,224090	5
U220	2017-10-05	sierść	przeanalizowano	20,007138	49,275412	14
U221	2017-10-06	sierść	przeanalizowano	20,073946	49,210356	14
U222	2017-10-06	sierść	przeanalizowano	19,891518	49,260601	8
U223	2017-10-06	sierść	przeanalizowano	19,891518	49,260601	21
U224	2017-10-10	sierść	odrzucono	20,085835	49,290388	8
U225	2017-10-10	kał	przeanalizowano	19,966762	49,252962	10
U226	2017-10-12	kał	przeanalizowano	20,095658	49,294210	17
U227	2017-10-12	kał	przeanalizowano	20,073961	49,218891	11
U228	2017-10-12	kał	przeanalizowano	20,077649	49,212278	5
U229	2017-05-22	sierść	odrzucono	19,992105	49,251365	10
U230	2016-05-09	sierść	przeanalizowano	19,992105	49,251365	10
U231	2016-08-09	sierść	przeanalizowano	20,073608	49,220710	11
U232	2017-10-10	sierść	przeanalizowano	19,959673	49,278904	15
U233	2015-06-10	sierść	przeanalizowano	20,000120	49,276976	16
U234	2015-03-18	sierść	przeanalizowano	20,070889	49,249217	11
U235	2017-10-10	kał	przeanalizowano	20,096494	49,325707	21
U236	2017-10-15	kał	przeanalizowano	20,063521	49,208677	5
U237	2017-10-16	sierść	przeanalizowano	20,128281	49,291605	18
U238	2017-10-16	sierść	przeanalizowano	20,128362	49,291545	18
U239	2017-10-16	sierść	przeanalizowano	20,128362	49,291545	18
U240	2017-10-18	kał	przeanalizowano	20,071450	49,234291	11
U241	2017-10-19	sierść	przeanalizowano	20,057958	49,256893	11
U242	2017-10-19	sierść	przeanalizowano	20,057958	49,256893	11
U243	2017-10-19	sierść	odrzucono	20,057958	49,256893	11
U244	2017-10-25	sierść	przeanalizowano	19,891518	49,260601	14
U245	2017-10-25	sierść	odrzucono	19,856717	49,234472	8
U246	2017-10-25	sierść	przeanalizowano	19,856717	49,234472	8
U247	2017-10-25	sierść	odrzucono	19,856717	49,234472	8
U248	2017-10-06	kał	przeanalizowano	19,891518	49,260601	14
U249	2017-10-06	kał	przeanalizowano	20,079316	49,212631	5
U250	2017-08-28	kał	przeanalizowano	19,778253	49,218711	1