

Sposób przygotowania inokulum bakterii celuloitycznych do wytwarzania biopreparatów poprawiających właściwości gleby

Przedmiotem wynalazku jest sposób przygotowania inokulum bakterii celuloitycznych z rodzaju *Bacillus*, przydatnego do produkcji biopreparatów do kondycjonowania (poprawy) właściwości gleby oraz do stymulowania wzrostu i rozwoju roślin poprzez dostarczanie niezbędnych składników pokarmowych.

Inokulum w postaci porcji materiału zawierającego biomasę bakterii posiadających zdolność rozkładu celulozy, wprowadzone wraz z biopreparatem do gleby zapoczątkuje w niej wzrost i rozwój bakterii celuloitycznych. Spowoduje to mineralizację składników pochodzących z resztek poźniwnych, jak np. słomy.

Biopreparaty zawierające inokulum bakterii celuloitycznych przygotowane sposobem według wynalazku mogą być dodatkowym źródłem substancji odżywczych i stymulujących wzrost oraz rozwój roślin, stanowiąc cenne źródło strukturotwórcze próchnicy.

Biopreparaty zawierające mikroorganizmy są coraz częściej wykorzystywane w praktyce rolniczej.

Jak opisano w publikacjach naukowych m.in. N.Z. Lupwayi i in., *Field Crops Res.* 65, 259–270 (2000), R. Smith: *Can. J. Microbiol.* 38, 485–492 (1992), P. Sobiczewski: *Biotechnologia roślin*, red. S. Malepszy, PWN Warszawa, 2009, s. 172–213 proces produkcyjny biopreparatów rozpoczyna się od wyizolowania czystej kultury bakterii, a w kolejnych etapach dochodzi do ich dalszego rozmnożenia w wyniku zastosowania odpowiednich pożywek, najczęściej płynnych. Rozmnażanie mikroorganizmów kończy się zwykle, gdy gęstość hodowli osiąga wymagany poziom. Wyizolowane kolonie osadza się na skosach agarowych i przechowuje w niskich temperaturach.

W publikacji S. Martyniuka, *Post. Mikrobiol.*, 2011, 50, 4, 321–328, przedstawione zostały skuteczne i nieskuteczne preparaty

mikrobiologiczne stosowane w ochronie i uprawie roślin oraz rzetelne i nierzetelne metody ich oceny. Jako biopreparaty o sprawdzonej efektywności i dobrej jakości pod względem mikrobiologicznym wskazano m.in. szczepionki zawierające bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych.

Z opisu patentowego PL217740 B1 znane są preparaty do traktowania gleby i nasion roślin zawierające żywe mikroorganizmy lub mikroorganizmy zdolne do rozmnażania się w glebach, sposób wytwarzania produktów do traktowania gleby i nasion roślin, mikroorganizmy, sposób wytwarzania mikroorganizmów oraz sposób traktowania gleby i nasion roślin preparatami. W szczególności wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania kultur mikroorganizmów z rodzaju *Bacillus* (*Bacillus polymyxa* var. SW17, *Bacillus megaterium* var. M326) oraz sposobu traktowania gleby i roślin produktem zawierającym te mikroorganizmy.

Bakterie wspomagają również procesy kompostowania odpadów. Przykładowo w publikacji K. Cybulskiego i inni: Inż. Ap. Chem., 2012, 51, 4, 108-111, opisano sposób kompostowania szczeciny świńskiej zmieszanej z wiórkami drzewnymi lub słomą zbożową, pyłem węgla brunatnego oraz granulowanymi odchodami kurczymi przy udziale szczepionki drobnoustrojowej zawierającej bakterie z rodzaju *Bacillus* w formie świeżej biomasy, grzyby strzępkowe *Trichoderma* sp. i promieniowce *Streptomyces* sp. w postaci zmywu z hodowli płytkowej. Zastosowanie takiej szczepionki pozwoliło na zwiększenie efektywności rozkładu szczeciny w porównaniu do niezaszczepionego kompostu kontrolnego.

Znana jest także z publikacji Rodziewicz A. i inni: Inżyn. Aparat. Chem., 2009, 3, 48(40), 95-97 oraz Rodziewicz A. i wsp.: Inż. Aparat. Chem., 2009, 3 48(40), 98-100, metoda utylizacji pierza drobiowego na drodze kompostowania, z dodatkiem wiórów drzewnych i pyłu węgla brunatnego w stosunku 2:1 (stosunek C:N wynosił 10:1). Masa

kompostowa była dwukrotnie zaszczepiona płynną hodowlą keratynolitycznych bakterii *Bacillus subtilis* P22: na początku procesu oraz w 37 dobie. Po zakończeniu kompostowania w 71 dobie jego trwania, struktura masy była puszysta, jednolita i glebopodobna, z widocznym pierzem o zaawansowanym stopniu degradacji.

Wiadomo powszechnie, że intensywną uprawę pieczarek (grzybów z rodzaju *Agaricus*) prowadzi się najczęściej na specjalnie przygotowanym podłożu wytwarzanym ze słomy, która jest mieszana z obornikiem końskim lub kurzym oraz z dodatkiem gipsu. Słoma stanowiąca źródło węgla używana do produkcji w zależności od dostępności surowca, różni się parametrami takimi jak wilgotność, zawartość składników, struktura, skład mikrobiologiczny. Węgiel występuje głównie w postaci: celulozy (50%) pentozanów (11,5%) i lignin (16%). Azot dostarczany za pośrednictwem obornika kurzego lub końskiego (3-4% s.m.) przechodzi w kompleks lignino-próchniczny oraz jest wbudowywany bezpośrednio w białka, aminokwasy, kwasy nukleinowe zawarte w biomacie bakteryjnej podłoża.. Gips dodaje się ze względu na jego działanie strukturotwórcze i stabilizujące kwasowość podłoża oraz z uwagi na fakt, że siarczan wapnia zmniejsza emisję odoru obornika do atmosfery.

Znany proces przygotowania podłoża dla intensywnej uprawy pieczarek można podzielić na cztery fazy. Faza pierwsza przygotowania podłoża polega na homogenizacji surowców oraz ich nawilżeniu do poziomu 60-80%. Proces jest prowadzony na betonowych posadzkach, a surowce są dodatkowo natleniane, co skutkuje narastaniem temperatury procesu do poziomu 75 - 82°C. W fazie pierwszej za rozkład materii organicznej odpowiadają wyspecjalizowane grupy mikroorganizmów działające w różnych zakresach temperatur. Zachodzi tu rozkład celulozy oraz amonifikacja substancji białkowych, jak również karmelizacja węglowodanów.

Faza druga przygotowania podłoża prowadzona jest w tunelach np. foliowych, przy kontrolowaniu temperatury, stężenia tlenu i amoniaku.

Przez pierwsze około 25 godzin temperatura podłoża jest wyrównywana do poziomu 56-60° C poprzez nadmuch powietrza oraz areację. Następnie podłoże jest poddane schłodzeniu do temperatury 25 -26°C. W tej fazie prowadzi się pasteryzację w temperaturze 56-60°C, powodującą zniszczenie organizmów patogennych dla grzybni, natomiast namnażanie drobnoustrojów celuloitycznych (kondycjonowanie podłoża) prowadzi się w temperaturze ok. 48°C. Faza druga umożliwia otrzymanie podłoża selektywnego, które stwarza dogodne warunki dla rozwoju grzybni pieczarki.

Faza trzecia przygotowania podłoża obejmuje zaszczepienie podłoża grzybnią pieczarki i przerost grzybni w masie. W podłożu utrzymuje się temperaturę 25-26°C. Proces odbywa się w tunelach, podobnie jak w fazie drugiej. Dzięki kontrolowaniu procesu można otrzymać równomierny rozrost grzybni, ograniczenie występowania chorób, optymalne wykorzystanie dokarmiaczy, równomierność i jednolitość rozrostu grzybni w całej masie. Podłoże w trzeciej fazie charakteryzuje się równomiernie przerośniętą grzybnią, wilgotnością 65 - 70%, odczynem pH 6 do 7 oraz stosunkiem C:N wynoszącym od 13,3:1 do 13,5 : 1.

Faza czwarta przygotowania podłoża rozpoczyna właściwy cykl uprawy pieczarki i obejmuje wyprowadzenie i zawiązanie owocników pieczarki. Jest prowadzona w odpowiednio przystosowanych halach, wyposażonych w system nadzorujący i monitorujący mikroklimat (wilgotność powietrza i podłoża, temperaturę powietrza i podłoża, stężenie CO₂, nawodnienie uprawy). Na podłoże uformowane w fazie trzeciej nakłada się okrywę, czyli specjalnie przygotowaną mieszankę torfów lub ziem, na powierzchni której uzyskuje się zawiązane małe owocniki w odpowiednim zagęszczeniu i ilości.

Podłoże fazy czwartej po 3 - 4 dniach od nałożenia okrywy pozwala na zbiór pieczarek i zapewnia stały plon przez ok. 3-4 tygodnie.

Po zakończeniu owocowania, zazwyczaj trwającego 3 - 4 tygodnie, podłoże jest poddawane procesowi dezynfekcji parowej przez 0,5 do 12

godzin w 70°C. Czas trwania pełnego cyklu produkcyjnego pieczarki wraz z usunięciem zużytego podłoża jest zróżnicowany i zależy od technologii jaką stosuje się do kompostowania. Podłoże po wykorzystaniu go w celach uprawy ma charakterystykę zależną od technologii przygotowania oraz wykorzystania, czasu eksploatacji oraz traktowania bezpośrednio po produkcji.

Istota sposobu przygotowania inokulum bakterii celulolitycznych z rodzaju *Bacillus* do wytwarzania biopreparatów poprawiających właściwości gleby polega na tym, że mikroorganizmy izolowane są z substratu jakim jest podłoże do produkcji pieczarek lub podłoże popieczarkowe (tzn. podłoże poprodukcyjne).

Zgodnie z wynalazkiem, sposób przygotowania inokulum bakterii celulolitycznych do wytwarzania biopreparatów poprawiających właściwości gleby, polegający na wyizolowaniu z gleby bakterii z rodzaju *Bacillus* poprzez wymieszanie pobranych ze środowiska naturalnego próbek z jałowym roztworem soli fizjologicznej, namnożenie izolatu na płynnym podłożu i osadzenie zawiesiny bakteryjnej na płytce z zestaloną pożywką, a następnie na przechowywaniu w niskich temperaturach, charakteryzuje się tym, że z podłoża do produkcji pieczarek lub podłoża po produkcji pieczarek pobiera się próbki w ilości co najmniej 0,1 g, które miesza się z jałowym roztworem soli fizjologicznej zawierającym korzystnie 0,85 % masowych NaCl, przy korzystnej proporcji masowej próbki do roztworu soli w ilości od 1:5 do 1:20 i wykonuje szereg rozcieńczeń uzyskanej zawiesiny o stężeniach od 10^{-1} do 10^{-15} , po czym pobiera się z zawiesiny o każdym rozcieńczeniu dozę o objętości co najmniej 0,1 ml i przenosi na naczynie do hodowli mikroorganizmów, korzystnie jałową szalkę Petriego, zalewa się płynnym podłożem zawierającym: 1% mas. polipeptydów kazeinowych (Pepton K), 1% mas. karboksymetylocelulozy (CMC), 0,2% mas. K_2HPO_4 , 1,5% mas. agaru, 0,03% mas. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25% mas. $(NH_4)_2SO_4$, 0,2% mas. żelatyny i wodę demineralizowaną do 100%, i prowadzi namnażanie bakterii w

temperaturze nie niższej niż 15°C przez okres co najmniej 2 godzin, a proces ten powtarza do momentu uzyskania na podłożu pojedynczych kolonii bakterii *Bacillus* (kolonii o niestykających się ze sobą granicach), po czym poddaje się je analizie enzymatycznej na obecność enzymów celuloitycznych, a następnie izoluje kolonie wykazujące najwyższą aktywność celuloityczną, osadza je na skosach agarowych z zestaloną pożywką z bulionu i przechowuje się w temperaturze co najmniej - 24°C.

Korzystnie, próbki pobiera się z podłoża do produkcji pieczarek w pierwszej fazie jego przygotowania, w której mieszaninę słomy, obornika końskiego lub kurzego z dodatkiem gipsu homogenizuje się oraz nawilża do poziomu 60-80% i okresowo napowietrza, przy czym najlepiej jest gdy próbki pobiera się po trzeciej aeracji.

Korzystnie, próbki pobiera się z podłoża do produkcji pieczarek w drugiej fazie jego przygotowania, w której pasteryzuje się podłoże, a następnie ochładza do temperatury poniżej 48 st. C, a proces ten prowadzi się w tunelu przy kontrolowaniu temperatury, stężenia tlenu i amoniaku.

Korzystnie, próbki pobiera się z podłoża do produkcji pieczarek w trzeciej fazie jego przygotowania, w której w podłożu prowadzi się równomierny rozrost grzybni pieczarki przy temperaturze 25 -26°C.

Korzystnie, próbki pobiera się z podłoża do produkcji pieczarek w czwartej fazie jego przygotowania, w której prowadzi się właściwy cykl uprawy pieczarki.

Korzystnie, próbki pobiera się z podłoża po produkcji pieczarek, korzystnie poddanego uprzednio procesowi dezynfekcji parowej przez 0,5 do 12 godzin w 70°C.

Ponadto korzystnie, próbki pobiera się w postaci mieszaniny podłoża do produkcji pieczarek z pierwszej, drugiej, trzeciej, czwartej fazy przygotowania oraz podłoża po produkcji pieczarek.

Korzystnie jest również, gdy próbki pobiera się z podłoża po produkcji pieczarek, najlepiej poddanego uprzednio procesowi dezynfekcji

parowej przez 0,5 do 12 godzin w 70 st. C, a następnie procesowi kompostowania z dodatkiem torfu w stosunku 1:1.

Wyizolowane szczepy o największej aktywności celulolitycznej zabezpieczane są na skosach agarowych i zestalanej na płytkach pożywce z bulionu oraz przechowywane w kriobankach po uprzednim przygotowaniu szczepów na przykład według poniższej procedury:

1. schłodzone hodowle odwirować (10 minut przy 9 tys. obr/min w temperaturze 4°C);
2. usunąć supernatant przy pomocy pompki wodnej, a następnie zawiesić komórki w zimnej wodzie (4°C);
3. komórki odwirować (10 minut przy 9 tys. obr/min w temperaturze 4°C);
4. powtórzyć jeszcze 3 razy płukanie w zimnej wodzie;
5. po usunięciu wody z ostatniego płukania, bakterie zawiesić w 90 µl 10% zimnego, jałowego glicerolu, a próbówki umieścić w lodzie;
6. komórki odwirować (10 minut przy 9 tys. obr/min w temperaturze 4°C);
7. odrzucić supernatant i ponownie zawiesić bakterie w 90 µl 10% glicerolu;
8. porcje komórek zamrozić w ciekłym azocie i przechowywać w -70°C lub przetrzymywać w chłodziarce w -20°C:

Tak zabezpieczone szczepy stanowią bazę do wytwarzania biopreparatów poprawiających właściwości gleby i stymulujących wzrost i rozwój roślin.

Biopreparaty zawierające inokulum bakterii celulolitycznych przygotowane sposobem według wynalazku mogą być dodatkowym źródłem substancji odżywczych i stymulujących wzrost oraz rozwój roślin, stanowiąc cenne źródło strukturotwórcze próchnicy.

W celu stworzenia funkcjonalnego inokulum można poddać poszczególne kolonie identyfikacji na podstawie analizy sekwencji kodującej 16S rRNA. Pozwala to na określenie do jakiego gatunku bakterii zaliczany jest dany izolat oraz na zdeponowanie w Banku Mikroorganizmów np. w Polskiej Akademii Nauk.

Ponadto celem określenia przydatności danego wyizolowanego szczepu do zastosowań rolniczych, otrzymane inokulum poddawane jest badaniom *in vivo* w celu oceny czy dane inokulum bakterii nie wpływa negatywnie na siłę kiełkowania nasion. Badania prowadzone są zgodnie z Międzynarodowymi Zasadami Badań Nasion, wydanie 2011, IRST (International Rules for Seed Testing)

Wynalazek objaśniono poniżej w kilku szczegółowych przykładach jego realizacji.

Przykładowe sposoby otrzymywania inokulum bakterii celulolitycznych do wytwarzania biopreparatów poprawiających właściwości gleby.

P r z y k ł a d 1

Pobrano 10g podłoża do produkcji pieczarek z pierwszej fazy przygotowania podłoża oraz zawieszono je w 90 ml roztworu soli fizjologicznej (0,85% mas. NaCl). Próbkę poddano homogenizacji przez 3 min. przy obrotach 10 000 obr/min. Następnie wykonano szereg rozcieńczeń od 10^{-1} do 10^{-15} . Z każdego rozcieńczenia otrzymano zawiesiny z których pobierano po 1 ml i wykonywano posiewy metodą zalewową poprzez nakropienie pobranej zawiesiny na szalkę Petriego i zalanie jej podłożem bakteryjnym, zawierającym: 1% mas. polipeptydów kazeinowych (Pepton K), 1% mas. karboksymetylocelulozy (CMC), 0,2% mas. K_2HPO_4 , 1,5% mas. agaru, 0,03% mas. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25% mas. $(NH_4)_2SO_4$, 0,2% mas. żelatyny i wodę demineralizowaną do 100%. Każdą z 15 szalek inkubowano w temperaturze 32°C w czasie 48 godzin. Po zakończeniu procesu przesiano wyrosłe kolonie *Bacillus* z każdej z szalek na nowo przygotowane podłoża bakteryjne. Szalki inkubowano w temperaturze 32°C w czasie 48 godzin. Proces powtazany był 4 krotnie. Po zakończeniu wszystkich procesów inkubacji pojedyncze kolonie *Bacillus* poddano procedurze badawczej w celu określenia jakościowo-ilościowego produkowanych przez nie metabolitów. Szczepy o największej

aktywności celulolitycznej zabezpieczane są na skosach agarowych i zestalanej na płytkach pożywce z bulionu oraz przechowywane w kriobankach.

P r z y k ł a d II

Pobrano 5g podłoża do produkcji pieczarek z drugiej fazy przygotowania podłoża oraz zawieszono je w 70 ml roztworu soli fizjologicznej (0,85% mas. NaCl). Próbkę poddano mieszaniu przez 3 min. przy obrotach 100 obr/min. Następnie wykonano szereg rozcieńczeń od 10^{-1} do 10^{-10} . Z każdego rozcieńczenia otrzymano zawiesiny z których pobierano po 1 ml i wykonywano posiewy metodą zalewową poprzez nakropienie pobranej zawiesiny na szalkę Petriego i zalanie jej podłożem bakteryjnym, jak w przykładzie I. Każdą z 10 szalek inkubowano w temperaturze 32°C w czasie 48 godzin. Po zakończeniu procesu przesiano wyrosłe kolonie *Bacillus* z każdej z szalek na nowo przygotowane podłoża bakteryjne. Szalki inkubowano w temperaturze 25°C w czasie 24 godzin. Proces powtarzany był 6 krotnie. Po zakończeniu wszystkich procesów inkubacji pojedyncze kolonie *Bacillus* poddano procedurze badawczej w celu określenia jakościowo-ilościowego produkowanych przez nie metabolitów. Szczepy o największej aktywności celulolitycznej zabezpieczane są na skosach agarowych i zestalanej na płytkach pożywce z bulionu oraz przechowywane w kriobankach.

P r z y k ł a d III

Pobrano 7g podłoża do produkcji pieczarek z trzeciej fazy przygotowania podłoża oraz zawieszono je w 40 ml roztworu soli fizjologicznej (0,85% mas. NaCl). Próbkę poddano mieszaniu przez 5 min. przy obrotach 1000 obr/min. Następnie wykonano szereg rozcieńczeń od 10^{-1} do 10^{-15} . Z każdego rozcieńczenia otrzymano zawiesiny z których pobierano po 1 ml i wykonywano posiewy metodą zalewową poprzez nakropienie pobranej zawiesiny na szalkę Petriego i zalanie jej podłożem bakteryjnym, jak w przykładzie I. Każdą z 15 szalek inkubowano w temperaturze 30°C w

czasie 36 godzin. Po zakończeniu procesu przesiano wyrosłe kolonie *Bacillus* z każdej z szalek na nowo przygotowane podłoża bakteryjne. Szalki inkubowano w temperaturze 30°C w czasie 36 godzin. Proces powtarzany był 3 krotnie. Po zakończeniu wszystkich procesów inkubacji pojedyncze kolonie *Bacillus* poddano procedurze badawczej w celu określenia jakościowo-ilościowego produkowanych przez nie metabolitów. Szczepy o największej aktywności celulolitycznej zabezpieczane są na skosach agarowych i zestalanej na płytkach pożywce z bulionu oraz przechowywane w kriobankach.

Przykład IV

Pobrano 10g podłoża do produkcji pieczarek z czwartej fazy przygotowania podłoża oraz zawieszono je w 50 ml roztworu soli fizjologicznej (0,85% mas. NaCl). Próbkę poddano homogenizacji przez 3 min. przy obrotach 5000 obr/min. Następnie wykonano szereg rozcieńczeń od 10^{-1} do 10^{-15} . Z każdego rozcieńczenia otrzymano zawiesiny z których pobierano po 1 ml i wykonywano posiewy metodą zalewową poprzez nakropienie pobranej zawiesiny na szalkę Petriego i zalanie jej podłożem bakteryjnym, jak w przykładzie I. Każdą z 15 szalek inkubowano w temperaturze 32°C w czasie 48 godzin. Po zakończeniu procesu przesiano wyrosłe kolonie *Bacillus* z każdej z szalek na nowo przygotowane podłoża bakteryjne. Szalki inkubowano w temperaturze 32°C w czasie 48 godzin. Proces powtarzany był 4 krotnie. Po zakończeniu wszystkich procesów inkubacji pojedyncze kolonie *Bacillus* poddano procedurze badawczej w celu określenia jakościowo-ilościowego produkowanych przez nie metabolitów. Szczepy o największej aktywności celulolitycznej zabezpieczane są na skosach agarowych i zestalanej na płytkach pożywce z bulionu oraz przechowywane w kriobankach.

Przykład V

Pobrano 1g podłoża popieczarkowego (poprodukcyjnego) oraz zawieszono je w 10 ml roztworu soli fizjologicznej (0,85% mas. NaCl).

Próbkę poddano homogenizacji przez 3 min. przy obrotach 10 000 obr/min. Następnie wykonano szereg rozcieńczeń od 10^{-1} do 10^{-15} . Z każdego rozcieńczenia otrzymano zawiesiny z których pobierano po 1 ml i wykonywano posiewy metodą zalewową poprzez nakropienie pobranej zawiesiny na szalkę Petriego i zalanie jej podłożem bakteryjnym, jak w przykładzie I. Każdą z 15 szalek inkubowano w temperaturze 32°C w czasie 48 godzin. Po zakończeniu procesu przesiano wyrosłe kolonie *Bacillus* z każdej z szalek na nowo przygotowane podłoża bakteryjne. Szalki inkubowano w temperaturze 32°C w czasie 48 godzin. Proces powtarzany był 4 krotnie. Po zakończeniu wszystkich procesów inkubacji pojedyncze kolonie *Bacillus* poddano procedurze badawczej w celu określenia jakościowo-ilościowego produkowanych przez nie metabolitów. Szczepy o największej aktywności celulolitycznej zabezpieczane są na skosach agarowych i zestalonej na płytkach pożywce z bulionu oraz przechowywane w kriobankach.

Przykład VI

Pobrano 15g podłoża popieczarkowego (poprodukcyjnego) oraz zawieszono je w 165 ml roztworu soli fizjologicznej (0,85% mas. NaCl). Próbkę mieszano przez 4 minuty przy 60 obr/min. Następnie wykonano szereg rozcieńczeń od 10^{-1} do 10^{-12} . Z każdego rozcieńczenia otrzymano zawiesiny z których pobierano po 2 ml i wykonywano posiewy metodą zalewową poprzez nakropienie pobranej zawiesiny na szalkę Petriego i zalanie jej podłożem bakteryjnym, jak w przykładzie I. Każdą z 12 szalek inkubowano w temperaturze 15°C w czasie 128 godzin. Po zakończeniu procesu przesiano wyrosłe kolonie *Bacillus* z każdej z szalek na nowo przygotowane podłoża bakteryjne. Szalki inkubowano w temperaturze 15°C w czasie 128 godzin. Proces powtarzany był 5 krotnie. Po zakończeniu wszystkich procesów inkubacji pojedyncze kolonie *Bacillus* poddano procedurze badawczej w celu określenia jakościowo-ilościowego produkowanych przez nie metabolitów. Szczepy o największej aktywności

celulolitycznej zabezpieczane są na skosach agarowych i zestalonej na płytkach pożywce z bulionu oraz przechowywane w kriobankach.

Przedstawione powyżej przykłady realizacji należy traktować jedynie jako szczegółowe przybliżenie wynalazku, w niczym nie zawężające jego istoty ani nie ograniczające zakresu jego ochrony.