



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003902

(51) **C05F 9/00; C05F 17/20**
2023.01

(13) **Y**

(21) 2-2024-00051

(22) 28/07/2021

(67) 1-2021-04656

(45) 27/01/2025 442

(43) 27/12/2021 405

(73) 1. Lê Thị Hoàng Yến (VN)

Tổ Dân phố Tân Xuân I, phường Xuân Đình, quận Bắc Từ Liêm, thành phố Hà Nội

2. Nguyễn Doãn Hải (VN)

Tổ 13, thị trấn Đông Anh, huyện Đông Anh, thành phố Hà Nội

3. Phạm Thị Hương (VN)

P407-ĐN2-CC9-CT4B khu đô thị Đại Kim, phường Đại Kim, quận Hoàng Mai,
thành phố Hà Nội

(72) Lê Thị Hoàng Yến (VN); Nguyễn Doãn Hải (VN); Phạm Thị Hương (VN); Đồng Thị
Hoàng Anh (VN); Trần Huyền Thanh (VN).

(74) Công ty TNHH Dịch thuật sáng chế PROINVEN (PROINVEN CO.,LTD.)

(54) **CHẾ PHẨM VI SINH ĐỂ XỬ LÝ RÁC THẢI HỮU CƠ VÀ QUY TRÌNH XỬ LÝ
RÁC THẢI HỮU CƠ**

(21) 2-2024-00051

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm vi sinh để xử lý rác thải hữu cơ thành phân bón vi sinh hữu cơ, trong đó chế phẩm này chứa các chủng *Bacillus subtilis* CNSH1001, *Bacillus megaterium* CNSH1002, *Bacillus licheniformis* CNSH1003, *Bacillus amyloliquefaciens* CNSH1004 và *Trichoderma harzianum* CNSH2001. Giải pháp hữu ích còn đề cập đến quy trình xử lý rác thải hữu cơ bằng chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm vi sinh để xử lý rác thải hữu cơ thành phân bón vi sinh hữu cơ, trong đó chế phẩm này chứa các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CNSH1001, *Bacillus megaterium* CNSH1002, *Bacillus licheniformis* CNSH1003, *Bacillus amyloliquefaciens* CNSH1004 và *Trichoderma harzianum* CNSH2001. Giải pháp hữu ích còn đề cập đến quy trình xử lý rác thải hữu cơ bằng cách sử dụng chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Theo báo cáo của Tổng cục Môi trường, tình trạng rác thải sinh hoạt ở các đô thị ngày càng lớn, số lượng rác thải này tại các đô thị năm 2019 ở mức 35.624 tấn/ngày, ở nông thôn là khoảng 28.394 tấn/ngày. Tổng khối lượng rác thải sinh hoạt phát sinh trên toàn quốc năm 2019 đã tăng 46% so với năm 2010. Tỷ lệ thu gom rác thải sinh hoạt ở Việt Nam trung bình năm 2019 tại khu vực đô thị đạt 92% và khu vực nông thôn đạt 66%. Cả nước có 1.322 cơ sở xử lý rác thải sinh hoạt, gồm: 381 lò đốt, 37 dây chuyền chế biến phân hữu cơ, 904 bãi chôn lấp. Chôn lấp vẫn là hình thức xử lý chính (71% khối lượng thu gom) nhưng chỉ có khoảng 20% bãi chôn lấp là hợp vệ sinh. Tại Hà Nội, hiện mỗi ngày thải ra khoảng 6.500 tấn rác mỗi ngày, 89% rác thải thủ đô được đem chôn lấp, riêng bãi rác Lam Sơn tiếp nhận 5000 tấn rác mỗi ngày (Vnexpress). Việc rác thải sinh hoạt ngập ngụa trong các đô thị, ngay cả các vùng nông thôn tình trạng rác thải sinh hoạt không được phân loại, xử lý triệt để dẫn đến tình trạng không đủ đất chôn lấp hoặc chôn lấp không hợp vệ sinh dẫn đến tình trạng ô nhiễm môi trường nặng nề tại các khu dân cư sinh sống. Nghiêm trọng hơn là tại các hộ dân sinh sống gần khu chôn lấp, xử lý rác thải. Lượng rác thải được thu gom tập kết nhưng chưa được xử lý, chôn lấp bốc mùi xú uế, ô nhiễm không khí và ô nhiễm nguồn nước ngầm quanh khu xử lý được đánh giá là trầm trọng.

Trong rác thải sinh hoạt, phần hữu cơ là phần bỏ đi của thực phẩm sau khi lấy đi phần chế biến được thức ăn cho con người; phần thực phẩm thừa hoặc hư hỏng không thể sử dụng cho con người; các loại hoa, lá cây, cỏ không được con người sử dụng. Những phần này là phần dễ phân hủy và có thể đưa vào tái chế, sử dụng cho việc chăm bón hoặc làm thức ăn cho động vật.

Tuy nhiên, hiện nay việc thu gom rác thải sinh hoạt đang được gom chung, bao gồm phần hữu cơ và phần không hữu cơ, phần hữu cơ dễ phân hủy thì dễ dàng bị vi sinh vật ngoài môi trường tấn công, phân hủy không kiểm soát, tạo các khí thải độc hại ra môi trường (H_2S , CH_4 , SH , $(CH_3)_2S$, axetat, hypoxanthin, các este, axeton, aldehyt, NH_3 , cadaverin, putraxin, histamin, v.v.). Nếu việc phân loại và xử lý rác thải hữu cơ có kiểm soát trong sinh hoạt được tiến hành tại đầu nguồn thì có thể chuyển đổi các rác thải hữu cơ trong sinh hoạt này thành phân vi sinh hữu cơ mà không gây ô nhiễm, không gây tác hại cho người và động vật.

Bacillus là chủng vi khuẩn gram dương, hình que, kích thước từ 0,5 μm đến 20 μm , có thể sinh bào tử, hiếu khí hoặc kỵ khí tùy tiện. *Bacillus* có nhiều loài có lợi, ví dụ như *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* hay *Bacillus subtilis*. Đây là những loài vi khuẩn có ích, không gây hại cho người và động, thực vật, ngoài ra chúng còn có một số đặc tính sinh học quý như khả năng sinh enzym ngoại bào: amylaza, xenlulaza, proteaza, xylanaza, v.v. Chúng được sử dụng nhiều trong các sản phẩm môi trường nhờ các đặc điểm sau:

1. Thích nghi tốt với nhiều điều kiện môi trường. Chúng có thể sống và phát triển ở cả môi trường hiếu khí, kỵ khí và tùy nghi. Nhờ vậy mà chủng vi khuẩn này rất được ưa chuộng trong các hệ thống xử lý nước thải sinh học.

2. Có khả năng tiết ra enzym proteaza, lexitinaza, xenlulaza nên góp phần phân hủy nhanh các chất hữu cơ. Trong đồng ủ sinh học, chúng cạnh tranh nguồn dinh dưỡng và oxy hòa tan với các vi sinh vật gây thối. Do đó, *Bacillus* thường được dùng để phân hủy chất hữu cơ, ủ phân và khử mùi hôi.

3. Tham gia vào quá trình amoni hóa, phản ứng nitrit và nitrat: *Bacillus* sử dụng các hợp chất chứa nitơ như axit amin, pepton, polypeptit. Trong điều kiện kỵ khí, *Bacillus* thực hiện quá trình khử nitrit (NO), khử nitrat (NO_3) tách oxy để oxy hóa các

chất hữu cơ. Nitơ trong quá trình này sẽ thoát ra khỏi nước, từ đó làm giảm hàm lượng BOD của nước thải.

4. Ngoài ra *Bacillus* còn có khả năng làm giảm lượng khí H_2S và độc tố sinh ra. Trong điều kiện tự nhiên, môi trường kỵ khí làm oxy hóa các chất hữu cơ dẫn đến quá trình phân hủy chậm và không hoàn toàn. Lúc này tích lũy nhiều axit hữu cơ, rượu, H_2S . Các dẫn suất của nó có tính độc như diamin, indon, tomain, scatone. Tuy nhiên, với khả năng thích nghi và sinh trưởng tốt trong môi trường kỵ khí *Bacillus subtilis* vẫn tiết ra các enzym đặc hiệu. Chúng giúp cho quá trình phân giải các chất diễn ra nhanh hơn. Từ đó làm giảm bớt lượng khí H_2S và các độc tố tích tụ.

5. Tạo sinh khối dưới dạng biofloc và lợi khuẩn: Khi quần thể *Bacillus* phát triển mạnh mẽ, chúng tiết chất kết dính gelatin để gắn kết với nhau và gắn kết với giá thể trong môi trường. Đó là một đặc tính của vi sinh vật để hình thành sinh khối. Đồng thời để dễ dàng sử dụng lượng hữu cơ hòa tan có trong môi trường, chúng sử dụng gelatin. Gelatin giúp chúng bám dính các phân tử hữu cơ hòa tan lại với nhau hình thành mảng thức ăn. Sinh khối *Bacillus* và mảng bám hữu cơ là nguồn thức ăn tự nhiên cho vật nuôi tôm cá và động vật phù du. Làm đa dạng hệ sinh thái ao nuôi, ổn định màu nước và chất lượng nước nuôi trồng.

Bacillus subtilis: *Bacillus subtilis* khởi đầu được đặt tên là *Vibrio subtilis* by Christian Gottfried Ehrenberg (1835), sau đó được *Vibrio subtilis* by Christian Gottfried Ehrenberg đặt tên lại là *Bacillus subtilis* (1872). Chúng còn được gọi là trực khuẩn cỏ khô hoặc trực khuẩn cỏ, là một vi khuẩn gram dương, có khả năng catalase hóa, được tìm thấy trong đất và đường tiêu hóa của động vật nhai lại và con người. *B. subtilis* có hình que, có thể hình thành bào tử trong điều kiện môi trường khắc nghiệt. Loài vi khuẩn này sống hiếu khí, tuy nhiên cũng có bằng chứng cho rằng chúng có khả năng sống kỵ khí không bắt buộc, đây là loài vi khuẩn có khả năng sinh enzym ngoại bào lớn, chúng được sử dụng rộng rãi trong các nhà máy, xí nghiệp (Errington và Aart 2020). Không những thế, chúng còn được sử dụng như là một mô hình để nghiên cứu sự sao chép nhiễm sắc thể vi khuẩn và phân biệt tế bào. Trong công nghiệp xử lý rác thải, *B. subtilis* có khả năng liên kết bề mặt nên được sử dụng rộng rãi, đặc biệt trong xử lý phóng xạ an toàn. Không những thế, *B. subtilis* có khả năng sinh enzym ngoại bào như amylaza, CMCaza, proteaza cao, đồng thời khả

lên men tạo sinh khối lớn (20-25 g/l) nên chúng được sử dụng để sản xuất các loại enzym này ở quy mô công nghiệp (van Dijk và Hecker 2013). Chúng được sử dụng để bổ sung vào đất trồng làm tăng năng suất, chất lượng cây (Sharaf-Eldin và cs August 2008). Ngoài ra *B.subtilis* còn được sử dụng trong kiểm soát sinh học (Ngugi và cs 2005). *B. subtilis* đã được Trung tâm Thú y FDA Hoa Kỳ, Cục Thức ăn Chăn nuôi và Sức khỏe Thực phẩm Canada, và Cơ quan An toàn Thực phẩm Châu Âu công nhận là vi khuẩn có ích, không gây hại cho động vật, chúng được dùng trong thức ăn chăn nuôi, giúp động vật đề kháng lại một số loại bệnh và giúp vật nuôi tăng cân tốt hơn. *B. subtilis* được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã công nhận là an toàn ("FDA partial list of microorganisms". Food and Drug Administration. 2002)

Bacillus megaterium: *B. megaterium* là một bào tử gram dương, hình que, có khả năng hình thành bào tử trong môi trường sống khác nhau, kích thước $4 \times 1,5 \mu\text{m}$. Đây là một trong những loài vi khuẩn lớn nhất được biết đến (Bunk và cs 2010). Vào những năm 1960, trước khi sử dụng *B. subtilis*, *B. megaterium* được sử dụng làm sinh vật mô hình để nghiên cứu chuyên sâu về hóa sinh, bào tử và vi khuẩn (Bunk và cs 2010). Đây là chủng vi khuẩn có dải nhiệt độ rộng, từ 3-45°C, nhiệt độ thích hợp là 30°C, một số chủng có khả năng chịu nhiệt lên tới 65°C. Hơn nữa, chúng được dùng trong kiểm soát sinh học; chuyển hóa nitơ. Chúng còn được sử dụng để sản xuất penixilin amidaza- được sử dụng để làm penixilin tổng hợp và một số enzym, như amylaza được sử dụng trong ngành công nghiệp nướng bánh và glucoza dehydrogenaza được sử dụng trong xét nghiệm glucoza máu. Nó cũng được dùng để sản xuất các enzym để sửa đổi corticosteroid, cũng như một số axit amin dehydrogenaza. Hơn nữa, nó được sử dụng để sản xuất pyruvat, vitamin B12 và các phân tử có đặc tính diệt nấm và kháng virus (Vary và cs 2007). Một số hợp chất hoạt tính sinh học này là lipopeptit, thuộc họ surfactin, iturin và fengycin lipopeptit, cũng được *B. megaterium* sinh ra (Pueyo và cs 2009). Không những thế *B. megaterium* còn được dùng để sản xuất axit poly- γ -glutamic, hàm lượng L-glutamat được tăng lên rất nhiều trong môi trường nước muối (2-10% NaCl) (Shimizu, Nakamura & Ashiuchi, 2007).

Bacillus licheniformis là vi khuẩn Gram dương, tìm thấy nhiều trong đất, ưa nhiệt, nhiệt độ tối ưu thường là 50°C, vì vậy chúng có thể sống, thậm chí là phát triển

tốt ở nhiệt độ cao. Khả năng sinh enzyme của chúng đạt hiệu quả khi nuôi ở nhiệt độ 37°C. Trong điều kiện khắc nghiệt chúng có thể sinh bào tử để sống sót và khi gặp điều kiện thích hợp bào tử sẽ nảy mầm trở lại. Chúng này có khả năng bài tiết proteaza serin kiềm cao, điều này đã làm cho *B. licheniformis* trở thành một trong những vi khuẩn quan trọng nhất trong sản xuất enzyme công nghiệp (Schallmeyer, Singh, Ward 2004). Đặc biệt, *B. licheniformis* còn có khả năng tiết ra Subtilisin Carlsberg- chúng được sử dụng như một proteaza tẩy rửa, được bán dưới tên Alcalase bởi công ty Novozymes. Amylaza cũng là một trong những loại enzyme mà *B. licheniformis* có thể tổng hợp công nghiệp (Muras, Andrea; Romero, Manuel; Mayer, Celia; Otero, Ana 2021). Ngoài ra chúng còn có khả năng phân hủy lông vũ - chứa một lượng lớn protein không tiêu hóa được cho các mục đích nông nghiệp (Burt, 2010) hay phân hủy keratin (Whitaker, Cristol, Forsyth, 2005). *B. licheniformis* cũng cho thấy có thể sử dụng được trong xử lý sinh học, khoáng hóa sinh học và nhiên liệu sinh học. Chúng cũng được sử dụng như một chế phẩm sinh học trong thức ăn chăn nuôi, có tác dụng ngăn ngừa bệnh tật và thúc đẩy tăng trưởng. Thậm chí chúng còn được sử dụng làm lợi khuẩn cho người (Muras, Andrea; Romero, Manuel; Mayer, Celia; Otero, Ana 2021).

Bacillus amyloliquefaciens: *Bacillus amyloliquefaciens* được một nhà khoa học Nhật Bản tên là Fukumoto phát hiện trong đất vào năm 1943 bởi, ông đã đặt tên cho vi khuẩn này vì nó tạo ra (faciens) một amylaza lỏng (hóa lỏng) (amylo) (Fukumoto 1943). Alpha amylaza từ *B. amyloliquefaciens* thường được sử dụng trong quá trình thủy phân tinh bột. Nó cũng là một nguồn subtilisin, xúc tác sự phân hủy protein theo cách tương tự như trypsin. Không những thế *B. amyloliquefaciens* còn được coi là một vi khuẩn kiểm soát sinh học khu trú vùng rễ, và được sử dụng để chống lại một số mầm bệnh trên rễ cây trồng trong nông nghiệp, nuôi trồng thủy sản và thủy canh. *B. amyloliquefaciens* mang lại lợi ích cho cây trồng trong cả ứng dụng đất và thủy canh. Nó có tác dụng chống lại mầm bệnh do vi khuẩn (Wu, Wu, Chen, Lin, Borriss, Gao 2014) và nấm, đồng thời có thể ngăn ngừa sự lây nhiễm bằng việc loại trừ cạnh tranh hoặc cạnh tranh với mầm bệnh không mong muốn (Tan, Gu, Yang, Dong, Mei, Shen, Xu 2015). Chúng có hiệu quả chống lại một số mầm bệnh rễ làm ảnh hưởng đến năng suất nông nghiệp trong đất và thủy canh, chẳng hạn như *Ralstonia solanacearum* trong cà chua, (Tan, Gu, Yang, Dong, Mei, Shen, Xu 2015; Huang và cs

2014; Tan và cs 2015; *Rhizoctonia solani* trong rau diếp (Grube và cs 2015), *Pythium* trong cà chua (Zouari và cs 2016), *Alternaria tenuissima* trong cây thường xuân (Soares và cs 2015) và *Fusarium* trong chuối và dưa chuột (Liu và cs 2014, Shen và cs 2015). Nó cũng giúp cải thiện khả năng chống chịu của rễ chống lại ứng suất, cho phép các cây trồng như ngô chịu được nồng độ muối cao trong các ứng dụng thủy canh, đồng thời cũng làm giảm nồng độ muối trong mô thực vật (Chen và cs 2016).

Trichoderma harzianum: Là chủng vi nấm thuộc nhóm nấm túi *Ascomycetes*, phân bố rộng rãi trên toàn thế giới. Chúng có vai trò lớn trong kiểm soát sinh học và khả năng sản xuất xenlulaza (Chaudhary và Tauro, 1982), chúng có thể phân hủy hoàn toàn cơ chất xenlulaza thành glucoza đơn phân (Ahmed và cộng sự, 2009). Enzym xenlulaza của *Trichoderma* có thể dùng để chuyển đổi chất thải để sản xuất đường, xi-rô, rượu và protein trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi ở quy mô lớn đã được nghiên cứu (Rye và Mandels, 1980, El-Katatny và cộng sự, 2003, 2004).

Các phương pháp ủ sinh học trong xử lý rác thải sinh hoạt: Có 2 phương pháp ủ sinh học trong xử lý rác thải sinh hoạt: 1. Phương pháp ủ kỵ khí và phương pháp ủ hiếu khí. Cả 2 phương pháp này đều sử dụng các chủng vi sinh vật có lợi, có khả năng sinh enzyme phân huỷ thành phần các hợp chất hữu cơ trong rác thải sinh hoạt, như: xenlulaza, tinh bột, protein, v.v. Chẳng hạn: *Bacillus*, *Fravobacterium*, *Pseudomonas*, *Ruminococcus flavefeciens*, *R. albus*, *R. parvum*, *Bacteroides succinpgenes*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, v.v.. Trong số các chủng nêu trên thì *Bacillus* và *Trichoderma* là hai chủng được phân lập với tần suất cao nhất trong đồng ủ do hoạt tính cao và dễ thích nghi ở các điều kiện đồng ủ của các chủng vi sinh vật này.

Trong đồng ủ kỵ khí, quá trình phân giải các hợp chất hữu cơ (tinh bột, xenlulaza, lipid và protein) xảy ra mà không có mặt của oxy, sản phẩm cuối cùng là khí CH₄, CO₂, NH₃, một lượng nhỏ các loại khí khác, axit hữu cơ và sinh khối vi sinh vật. Thời gian để đồng ủ kỵ khí hoàn thiện kéo dài từ 30-45 ngày (Nguyễn Thị Thu Hà, tạp chí môi trường tháng 1 năm 2020).

Trong đồng ủ hiếu khí, chất tạo thành cuối cùng là sinh khối vi sinh vật, CO₂ và nước. Tuy nhiên trong thực tế quá trình ủ hiếu khí rác sinh hoạt thường xảy ra không hoàn toàn nên sản phẩm tạo ra của chúng cũng là các sản phẩm chất hữu cơ

trung gian: Các axit amin, đường, chất mùn, chất khoáng, v.v.. Hiện nay trên thế giới có các công nghệ ủ trộn theo trạng thái đông ủ, theo phương pháp thông khí khối ủ, theo đặc điểm hệ thống ủ, v.v. Tuy nhiên mô hình ủ theo hệ thống mở phổ biến nhất là các phương pháp ủ luống tĩnh hoặc động có kết hợp thông khí cưỡng bức hoặc đảo trộn theo chu kỳ. Hiệu quả của hệ thống ủ này chịu ảnh hưởng của thời tiết và thời gian kéo dài, thường mất 30-45 ngày. Các biện pháp đông ủ này thường áp dụng cho quy mô nông trường, trang trại có diện tích mặt bằng lớn và xa khu dân cư và đô thị.

Rác thải hữu cơ trong sinh hoạt hàng ngày của người dân trong khu đô thị, trong các nhà máy, xí nghiệp, v.v., được thu gom và vận chuyển đến các bãi rác xa thành phố. Tuy nhiên, việc thu gom này cũng không được triển khai ngay lập tức. Thường là sau 1 ngày người dân mới bỏ rác thải ra hố rác tập trung nơi sinh sống, khi xe thu gom rác đến thì rác đã để đến ngày thứ 2, thứ 3- gây ô nhiễm môi trường bởi sự phân huỷ tùy tiện các chất hữu cơ trong rác, tạo các khí thải độc hại ra môi trường (H_2S , CH_4 , SH , $(CH_3)_2S$, axetat, hypoxanthin, các este, axeton, aldehyt, NH_3 , cadaverin, putraxin, histamin, v.v.).

Việc nghiên cứu, sáng tạo ra một quy trình xử lý rác thải sinh hoạt cộng hưởng các yếu tố sinh học, hoá học và vật lý để tạo thành phân bón hữu cơ trong vòng 24 đến 48 giờ là việc làm vô cùng ý nghĩa cho đời sống con người ở các khu đô thị, các nhà máy, xí nghiệp, nhà hàng, khách sạn. Quy trình này sẽ giúp người dân xử lý, chuyển hoá ngay lập tức rác thải sinh hoạt thành phân bón vi sinh, tạo hiệu quả kinh tế cũng như giảm thiểu ô nhiễm môi trường sống, nâng cao chất lượng cuộc sống cho người dân.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm vi sinh để xử lý rác thải hữu cơ thành phân bón vi sinh hữu cơ, trong đó chế phẩm này chứa các chủng vi sinh vật sau: *Bacillus subtilis* CNSH1001, *Bacillus megaterium* CNSH1002, *Bacillus licheniformis* CNSH1003, *Bacillus amyloliquefaciens* CNSH1004 và *Trichoderma harzianum* CNSH2001.

Mục đích khác của giải pháp hữu ích là đề cập đến quy trình xử lý rác thải hữu cơ bằng cách sử dụng chế phẩm nêu trên. Quy trình xử lý rác thải hữu cơ theo giải

pháp hữu ích có sử dụng kết hợp giữa chế phẩm vi sinh của giải pháp hữu ích, các yếu tố hoá sinh, vật lý và công nghệ vào quá trình chuyển hoá chất thải sinh hoạt hữu cơ thành phân bón vi sinh hữu cơ trong khoảng thời gian 24 đến 48 giờ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Hình ảnh của khuẩn lạc (a), tế bào (b) chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CNSH1001 trên môi trường NA và hoạt tính phân huỷ CMC (c) của chúng khi thử nghiệm trên môi trường chứa CMC 1% và thuốc nhận biết là thuốc nhuộm red congo 1%.

Hình 2. Hình ảnh của khuẩn lạc (a), tế bào (b) chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* CNSH1002 trên môi trường NA và hoạt tính phân huỷ photphat (c) của chúng khi thử nghiệm trên môi trường NBRIP (g/L): glucoza 10; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5; MgCl_2 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25; KCl 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1; H_2O .

Hình 3. Hình ảnh của khuẩn lạc (a), tế bào (b) chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* CNSH 1003 trên môi trường NA và hoạt tính phân huỷ casein (c) của chúng khi thử nghiệm trên môi trường chứa casein 1%.

Hình 4. Hình ảnh của khuẩn lạc (a), tế bào (b) chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* CNSH1004 trên môi trường NA và hoạt tính phân huỷ tinh bột (c) của chúng khi thử nghiệm trên môi trường chứa tinh bột 1%, thuốc nhận biết là thuốc thử Lugol.

Hình 5. Hình ảnh của khuẩn lạc (a) và bào tử (b) của chủng nấm *Trichoderma hazianum* và khả năng phân huỷ CMC, tinh bột, casein của chúng khi nuôi cấy trên môi trường chứa CMC, tinh bột và casein 1% tương ứng, thuốc nhận biết là thuốc thử red congo 1%- đối với hoạt tính phân huỷ CMC, Lugol - đối với hoạt tính phân huỷ tinh bột, hoạt tính casein nhận biết bằng quan sát vòng trong xung quanh khuẩn lạc.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích đề xuất chế phẩm vi sinh để xử lý rác thải hữu cơ thành phân bón vi sinh hữu cơ, trong đó chế phẩm này chứa các chủng vi sinh vật sau: *Bacillus subtilis* CNSH1001, *Bacillus megaterium* CNSH1002, *Bacillus*

licheniformis CNSH1003, *Bacillus amyloliquefaciens* CNSH1004 và nấm *Trichoderma harzianum* CNSH2001.

Theo khía cạnh khác, chế phẩm theo giải pháp hữu ích chứa *Bacillus subtilis* CNSH1001 với lượng khoảng 15-25% khối lượng, *Bacillus megaterium* CNSH1002 với lượng khoảng 15-25% khối lượng, *Bacillus licheniformis* CNSH1003 với lượng khoảng 15-25% khối lượng, *Bacillus amyloliquefaciens* CNSH1004 với lượng khoảng 15-25% khối lượng và nấm *Trichoderma harzianum* CNSH2001 với lượng khoảng 15-25% khối lượng.

Chế phẩm theo giải pháp hữu ích được tạo ra bằng phương pháp sau:

Bước 1: Phân lập, phân loại và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng phân huỷ xenlulaza, protein, tinh bột, photphat chuẩn bị cho quá trình chuyển hoá rác thải hữu cơ thành phân vi sinh hữu cơ.

- Phân lập:

Lấy các mẫu rác thải đã bị phân huỷ thành phân từ bãi rác Nam Sơn - Sóc Sơn - Hà Nội và phân lập các chủng vi khuẩn từ các mẫu rác này.

Phân lập các chủng vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng trên môi trường thạch giàu dinh dưỡng (nutrient agar-NA) bao gồm: pepton-6, cao thịt lợn-1, cao thịt bò-1, NaCl-5, CMC-1 thạch 14 (g/l)- đối với vi khuẩn và trên môi trường thạch khoai tây (PDA) đối với nấm (khoai tây gọt vỏ, thái miếng, ninh 20 phút, gạn nước trong, bổ sung 20 g đường, 5g pepton, cloramphenicol 0,04g, CMC-1g và nước tới 1 lít), khử trùng ở 120°C trong 15 phút. Lựa chọn các chủng có vòng phân huỷ CMC bằng cách sử dụng thuốc nhuộm red congo 1%.

Nuôi cấy các chủng vi khuẩn này trên môi trường dinh dưỡng, bao gồm (g/L): pepton-6, cao thịt lợn-1, cao thịt bò-1, NaCl-5, bổ sung Azo-CMC-1%- hợp chất này gồm xenlulaza gắn với vòng thơm, sau 48 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, quan sát sự tạo thành vòng trong xung quanh khuẩn lạc. Chủng nào hình thành vòng trong xung quanh khuẩn lạc là chủng có khả năng phân huỷ CMC, vừa có khả năng phân huỷ các chất có cấu tạo vòng thơm.

Các chủng vi khuẩn được nuôi trên môi trường NBRIP (g/L): Glucoza 10; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5; MgCl_2 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,25; KCl 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1; H_2O , ở nhiệt độ

30°C, sau 24 giờ quan sát sự hình thành vòng trong xung quanh khuẩn lạc. Chủng nào có khả năng tạo vòng trong thì chủng đó có khả năng phân huỷ photphat.

Thu dịch enzym của vi khuẩn: Nhân nuôi vi khuẩn trên môi trường dinh dưỡng (g/L): pepton-6, cao thịt lợn-1, cao thịt bò-1, NaCl-5. Thu dịch nuôi cấy sau 24-48 giờ nuôi ở nhiệt độ 30°C; ly tâm 10.000 vòng/phút, loại bỏ sinh khối.

Thử hoạt tính amylaza phân huỷ tinh bột: Chuẩn bị môi trường (chứa tinh bột 1% + 15% thạch aga), đem khử trùng ở 120°C, 1 atm, trong 20 phút, để nguội, đến 35-40°C, đổ ra đĩa Petri vô trùng. Để nguội đĩa, dùng ống hút vô trùng đục giếng thạch. Lấy 200 µl dịch enzym thô đã chuẩn bị ở trên, nhỏ vào giếng thạch. Sau 24 giờ, nhỏ dung dịch lugol, loại bỏ dung dịch Lugol sau 1 phút nhuộm. Quan sát sự hình thành vòng trong, nếu xung quanh giếng có vòng trong là chủng có hoạt tính.

Thử hoạt tính proteaza phân huỷ protein: Chuẩn bị môi trường chứa (casein 1% + 15% thạch aga), đem khử trùng ở 120°C, 1 atm, trong 20 phút, để nguội, đến 35-40°C, đổ ra đĩa Petri vô trùng. Để nguội đĩa, dùng ống hút vô trùng đục giếng thạch. Lấy 200 µl dịch enzym thô đã chuẩn bị ở trên, nhỏ vào giếng thạch. Sau 24 giờ, quan sát nếu có vòng trong xuất hiện quanh giếng thì chủng thử nghiệm có hoạt tính phân huỷ protein. Trong trường hợp không quan sát được hoặc quan sát vòng trong xung quanh giếng không rõ có thể dùng thuốc nhuộm xanh biếc comazi blu 0,01%, đổ tràn mặt thạch, để qua đêm, loại bỏ dịch nhuộm, rửa mặt thạch bằng nước cất nhiều lần đến khi quan sát được vòng trong quanh giếng. Giếng có xuất hiện vòng trong là chủng có hoạt tính phân huỷ proteaza.

- Phân loại các chủng vi sinh vật:

Tách chiết ADN: Sử dụng quy trình tách chiết ADN của Sakiyama và cộng sự cải tiến: Nuôi vi khuẩn/ xạ khuẩn/ nấm men trên môi trường LB/MPA, YSS để thu sinh khối, cho 1 ml dung dịch vi sinh vật vào ống Eppendorf 1,5 ml, ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 5 phút, thu phần cặn, hòa tan phần cặn này với 250 µl dung dịch TE (10 mM Tris + 1 mM EDTA, pH= 8), thêm 50 µl dung dịch SDS 10% và 10 µl Proteinase K (10 mg/l), ủ ở 65°C trong 20 phút, mỗi 5 phút đảo ngược ống Eppendorf một lần để trộn đều dung dịch, thêm 200 µl CTAB 10%/ NaCl 0,7M, trộn đều, ủ ở 65°C trong 20 phút, thêm 300 µl cloroform: rượu isoamyllic (tỷ lệ dung dịch là 24 : 1),

trộn đều và ly tâm ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút, dùng pipet chuyển cẩn thận phần dịch trong phía trên vào ống Eppendorf mới và thêm 1 ml isopropanol, lắc đều, giữ ở -20°C trong ít nhất 30 phút, ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút, giữ lại phần kết tủa, thêm 1 ml etanol 70% vào, ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 5 phút, giữ phần kết tủa (làm 2 lần) mỗi lần đổ bỏ etanol, để khô tự nhiên, hòa tan phần kết tủa trong 30 µl nước cất 2 lần đã khử trùng, trữ ở -20°C.

Đối với các chủng vi khuẩn:

Vùng gen 16S rADN được khuếch bằng cặp mồi tổng 27F và 1495R có trình tự 27F: 5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3' (SEQ ID NO.6); 1495R: 5'CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA 3' (SEQ ID NO.7) (Weisberg et al., 1991). Thành phần 01 phản ứng PCR bao gồm: ADN tổng số khoảng 30 ng, 5 µl dung dịch đệm 1X (Tris 10 mM, KCl 50 mM, pH = 9,0, 0,1% (thể tích) Triton X-100), 2 mM MgCl₂, 20 ng cho mỗi dNTP, 0,2 µM đoạn mồi xuôi 27F, 0,2 µM đoạn mồi ngược 1495R, 0,5 đơn vị Taq ADN polymeraza. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR như sau: 95°C trong 3 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước như sau: Biến tính ở 95°C trong 1 phút, gắn mồi ở 54°C trong 1 phút, tổng hợp ADN ở 72°C trong 2 phút. Cuối cùng phản ứng được duy trì 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được phân tích trên gel agarosa 1,5% trong dung dịch đệm TAE 1X ở 100V trong 90 phút và chụp bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000. Thang chuẩn 100 bp (Fermentas).

Đối với nấm:

Vùng gen 28S rADN đoạn D1D2 được khuếch đại có trình tự được nêu trong SEQ ID NO.5 bằng cặp mồi NL1 và NL4 có trình tự: (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') (SEQ ID NO.8) và NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (SEQ ID NO.9) và (O'Donnell, 1993). Thành phần 01 phản ứng PCR bao gồm: ADN tổng số khoảng 30 ng, 5 µl dung dịch đệm 1X (Tris 10 mM, KCl 50 mM, pH =9,0, 0,1% (thể tích) Triton X-100), 2 mM MgCl₂, 20 ng cho mỗi dNTP, 0,2 µM đoạn mồi xuôi ITS1, 0,2 µM đoạn mồi ngược NL4, 0,5 đơn vị Taq ADN polymeraza. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR như sau: 94°C trong 2 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước như sau: Biến tính ở 94°C trong 15 giây, gắn mồi

ở 56°C trong 30 giây, tổng hợp ADN ở 68°C trong 1:30 giây. Cuối cùng phản ứng được duy trì 68°C trong 10 phút và kết thúc phản ứng ở 4°C. Sản phẩm PCR được phân tích trên gel agarosa 0,8 % trong dung dịch đệm TAE 1X ở 100V trong 90 phút và chụp bằng máy chụp hình gel Biorad UV 2000. Thang chuẩn 100 bp (Fermentas).

Sản phẩm PCR: sản phẩm PCR được tinh sạch và xác định trình tự trên máy đọc trình tự tự động (ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer, Mỹ). Kết quả đọc trình tự được xử lý trên phần mềm Clustal X của Thompson và cộng sự, 1997. Các trình tự được so sánh với trình tự 16S rADN và ITS của các loài đã công bố từ dữ liệu của DDBJ, EMBL, GenBank. Cây phát sinh được xây dựng theo Kimura (1980), sử dụng phương pháp của Saitou và Nei (1987); phân tích Bootstrap (Felsenstein, 1985) được thực hiện từ 1000 lần lặp lại ngẫu nhiên.

- Tuyển chọn:

Kết quả, từ 20 chủng vi khuẩn được sàng lọc ở trên, thu được:

+ 01 chủng vi khuẩn có vừa có khả năng phân huỷ xenlulaza vừa có khả năng phân huỷ các chất có vòng thơm. Hoạt tính này được xác định bằng cách nuôi các chủng này trên môi trường chứa 0,1% Azo-CMC và azo-xylan (đây là 02 hợp chất polyme dạng xenlulaza và hemixenlulaza có gắn vòng thơm). Chủng này được phân tích trình tự axit ribosom deoxyribonucleic đoạn 16S chủng thuộc về loài *Bacillus subtilis*, kí hiệu là CNSH1001. Trong quá trình xử lý rác thải sinh hoạt, *Bacillus subtilis* CNSH 10001 các chất có thành phần là xenlulaza, hemixenlulaza (chất thải sinh hoạt có nguồn gốc thực vật như rau, vỏ hoa quả, giấy, v.v.) và các hợp chất có vòng thơm (những chất dư thừa của thuốc trừ sâu, phân bón hoá học, các chất khó phân huỷ từ thực vật v.v.).

+ 01 chủng vừa có khả năng phân huỷ CMC vừa có khả năng phân huỷ photphat, chủng này được thử nghiệm bằng cách nuôi trên môi trường NBRIP (g/L): Glucoza 10; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5; MgCl_2 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,25; KCl 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1; H_2O , quan sát sự tạo thành vòng trong sau 24 giờ nuôi cấy. Chủng này sau khi phân tích trình tự gen axit ribosom deoxyribonucleic đoạn 16S cho thấy chúng thuộc về loài *Bacillus megaterium*, kí hiệu là CNSH1002.

+ 01 chủng vừa có khả năng phân huỷ CMC vừa có khả năng phân huỷ protein, chúng được kiểm chứng bằng cách nuôi trên môi trường NA có bổ sung 1% casein, thu 0,2ml dịch nuôi cấy, nhỏ vào giếng trên đĩa thạch chứa 1% casein. Sau 24 giờ, quan sát thấy xuất hiện vòng trong xung quanh khuẩn lạc. Chủng này sau đó được đem phân loại dựa vào phân tích trình tự gen axit ribosom deoxyribonucleic đoạn 16S cho kết quả chúng thuộc về loài *Bacillus licheniformis*, được mang kí hiệu riêng là CNSH 1003.

+ 01 chủng vi khuẩn vừa có khả năng phân huỷ CMC, vừa có khả năng phân huỷ tinh bột, dựa vào khả năng tạo vòng trong của chúng khi nuôi cấy trên môi trường NA bổ sung tinh bột 1%, kiểm tra hoạt tính amylaza của chúng bằng cách nhỏ Lugol 1% sau 24 giờ nuôi cấy. Phân tích trình tự gen axit ribosom deoxyribonucleic đoạn 16S có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO.4, cho thấy chúng thuộc về loài *Bacillus amyloliquefaciens*, kí hiệu riêng là CNSH1004.

Bước 2: Nhân nuôi tạo chế phẩm vi sinh từ vi khuẩn.

- Bốn chủng vi khuẩn được lựa chọn trên đây (CNSH 1001, CNSH 1002, CNSH 1003, CNSH 1004 với tỷ lệ khối lượng là 1 : 1 : 1 : 1) được nhân nuôi trên môi trường MRS dịch thể, bao gồm các chất (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 5,9; CaCl_2 - 0,61; KCl- 0,58; NH_4Cl -0,2; KH_2PO_2 - 0,25; pepton- 5; cao nấm men-5; ri đường- 5. Sau 48 giờ nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, tiến hành thu dịch nuôi cấy. Đồng thời khử trùng hỗn hợp cám : trấu với tỷ lệ khối lượng là 1 : 1 ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút, để nguội. Trộn dịch nuôi cấy vi khuẩn của cả 4 chủng vi khuẩn trên với hỗn hợp cám + trấu với tỷ lệ khối lượng 1 : 1 (dịch nuôi vi khuẩn : (cám + trấu)). Ủ ở 48 giờ, thu sản phẩm đem sấy khô ở nhiệt độ 40-50°C đến trọng lượng không đổi, nghiền nhỏ. Đóng bao, hút chân không để nơi khô ráo, thoáng mát, nhiệt độ 25°C.

- Chủng nấm sợi *Trichoderma harzianum* CNSH2001 được nhân nuôi trên môi trường cám : trấu (tỷ lệ khối lượng là 1 : 1), đạo trộn sau 3 ngày nuôi cấy, thu chế phẩm sau 7 ngày nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C, sấy khô chế phẩm ở 40°C, nghiền nhỏ, tạo chế phẩm dạng hạt mịn. Đóng bao, hút chân không để nơi khô ráo, thoáng mát, nhiệt độ 25°C.

Trộn đều chế phẩm chứa bốn chủng vi khuẩn và chế phẩm chứa nấm nêu trên sao cho tỷ lệ khối lượng của bốn chủng vi khuẩn và nấm là 1 : 1 : 1 : 1 : 1. Chế phẩm theo giải pháp hữu ích được đóng bao, hút chân không để nơi khô ráo, thoáng mát và nhiệt độ khoảng 25°C.

Mục đích khác của giải pháp hữu ích là đề xuất quy trình xử lý rác thải hữu cơ. Quy trình xử lý rác thải hữu cơ theo giải pháp hữu ích có sử dụng kết hợp giữa chế phẩm vi sinh của giải pháp hữu ích, các yếu tố hoá sinh, vật lý và công nghệ vào quá trình chuyển hoá chất thải sinh hoạt hữu cơ thành phân bón vi sinh hữu cơ trong khoảng thời gian 24 đến 48 giờ.

Theo một khía cạnh, quy trình xử lý rác thải hữu cơ theo giải pháp hữu ích bao gồm các bước sau:

- thu gom rác thải hữu cơ trong sinh hoạt hàng ngày của các hộ dân, các nhà máy, xí nghiệp, nhà hàng, khách sạn, v.v. để chuẩn bị xử lý trong 1-2 ngày;
- ước lượng khối lượng rác thải sinh hoạt thu gom được;
- phối trộn chế phẩm vi sinh thu được theo giải pháp hữu ích với chế phẩm hoá học chứa natri bicacbonat (NaHCO_3 -) có bán sẵn trên thị trường với tỷ lệ khối lượng là 4 : 1, để thu được chế phẩm sinh-hoá;
- bổ sung chế phẩm sinh-hoá này vào đồng rác thải nêu trên với tỷ lệ khối lượng là 1 : 10 và trộn đều;
- đưa hỗn hợp rác thải sinh hoạt và chế phẩm sinh-hoá đã được trộn đều vào thiết bị có chức năng vừa nghiền rác thải, vừa đảo trộn rác thải và chế phẩm, vừa kiểm soát được đồng ủ luôn ở nhiệt độ 45 đến 50°C trong suốt quá trình ủ;
- sau khoảng từ 24 đến 48 giờ, kiểm tra đồng rác ủ đã nghiền, nếu sản phẩm đạt độ khô ráo, nhỏ, mịn đồng đều có thể sử dụng làm phân bón vi sinh hữu cơ.

Quy trình theo giải pháp hữu ích được thực hiện có sự kết hợp của các yếu tố sinh học, yếu tố hoá học và yếu tố vật lý, trong đó:

Yếu tố sinh học: là việc sử dụng chế phẩm vi sinh có ích theo giải pháp hữu ích chứa các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CNSH1001, *Bacillus megaterium* CNSH1002, *Bacillus licheniformis* CNSH1003, *Bacillus amyloliquefaciens* CNSH1004 và nấm *Trichoderma harzianum* CNSH2001. Các chủng sinh vật này sinh ra enzym amylaza,

proteaza, CMCaza, lipaza có khả năng phân huỷ nhanh các hợp chất hữu cơ thành các vật chất dạng trung gian như các axit amin, đường, các polyme mạch ngắn, H_2O và CO_2 , v.v., làm giảm thiểu các khí thải gây hại ra môi trường như khí H_2S , CH_4 , SH_2 , $(CH_3)_2S$, axetat, hypoxanthin, các este, axeton, aldehyt, NH_3 , cadaverin, putraxin, histamin, v.v..

Yếu tố hoá học: Quy trình xử lý rác sinh hoạt theo giải pháp hữu ích có sử dụng yếu tố hoá học là hợp chất natri bicacbonat ($NaHCO_3$ -), chất hoá học này được sử dụng trong thực phẩm, dược phẩm và được dùng làm chất tẩy rửa nhà bếp, bồn cầu và khử mùi hôi thùng rác, nên không gây hại cho môi trường.

Yếu tố vật lý: ngoài các yếu tố sinh học và hoá học, quy trình xử lý rác thải sinh hoạt theo giải pháp hữu ích còn sử dụng đến yếu tố vật lý- cung cấp nhiệt độ cho đồng rác ủ luôn đạt ở mức $45-50^\circ C$ trong suốt thời gian xử lý. Đồng thời rác thải luôn được đảo trộn, nghiền nhỏ trong suốt thời gian ủ, giúp quá trình phản ứng hoá học xảy ra nhanh hơn. Đồng thời giúp các vi sinh vật trong đồng ủ phát triển và sinh ra enzym phân huỷ rác tốt hơn.

Tất cả các yếu tố sinh học, hoá học và vật lý kết hợp với công nghệ nghiền, đảo trộn đồng ủ tạo thành một quy trình xử lý chất hữu cơ nhanh, tạo thành sản phẩm phân vi sinh hữu cơ chỉ sau 24 đến 48 giờ.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1:

Trong 100 g chế phẩm vi sinh để xử lý rác thải hữu cơ thành phân bón vi sinh hữu cơ theo giải pháp hữu ích chứa chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CNSH1001 với lượng 20% khối lượng, chủng vi khuẩn *Bacillus megaterium* CNSH1002 với lượng 20% khối lượng, chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis* CNSH1003 với lượng 20% khối lượng, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* CNSH1004 với lượng 20% khối lượng và nấm *Trichoderma harzianum* CNSH2001 với lượng 20% khối lượng.

Chế phẩm vi sinh theo giải pháp hữu ích được tạo ra bằng cách trộn đều chế phẩm chứa bốn chủng vi khuẩn và chế phẩm chứa nấm nêu trên sao cho tỷ lệ của bốn

chủng vi khuẩn và nấm là 1 : 1 : 1 : 1 : 1. Chế phẩm theo giải pháp hữu ích được đóng bao, hút chân không để nơi khô ráo, thoáng mát và nhiệt độ khoảng 25°C.

Ví dụ 2

Quy trình xử lý 10kg rác thải hữu cơ theo giải pháp hữu ích được thực hiện như sau:

- lấy 10 kg rác thải hữu cơ tại nhà ăn Công ty Sam Sung;
- phối trộn 0,8 kg chế phẩm vi sinh thu được theo giải pháp hữu ích với 0,2 kg chế phẩm hoá học chứa natri bicacbonat (NaHCO_3 -) có bán sẵn trên thị trường, để thu được chế phẩm sinh-hoá;
- bổ sung 1 kg chế phẩm sinh-hoá này vào đồng rác thải nêu trên (tỷ lệ khối lượng là 1 : 10) và trộn đều;
- đưa hỗn hợp rác thải sinh hoạt và chế phẩm sinh-hoá đã được trộn đều vào thiết bị vừa có chức năng vừa nghiền rác thải, vừa đảo trộn rác thải và chế phẩm, vừa kiểm soát được đồng ủ luôn ở nhiệt độ 45 đến 50°C trong suốt quá trình ủ;
- sau khoảng từ 24 đến 48 giờ, kiểm tra đồng rác ủ đã nghiền, nếu sản phẩm đạt độ khô ráo, nhỏ, mịn đồng đều có thể sử dụng làm phân bón vi sinh hữu cơ.

Hiệu quả của giải pháp hữu ích

Cứ 1 kg chế phẩm vi sinh được tạo ra theo quy trình trên sẽ xử lý được 10kg rác thải sinh hoạt hữu cơ thành phân bón vi sinh hữu cơ trong vòng 24-48 giờ với sự hỗ trợ của hệ thống đảo trộn, nghiền và điều chỉnh nhiệt độ đồng ủ luôn ở mức 45-50°C.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vi sinh để xử lý rác thải hữu cơ thành phân bón vi sinh hữu cơ, trong đó chế phẩm này chứa chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* CNSH1001 với lượng khoảng 15-25% khối lượng, *Bacillus megaterium* CNSH1002 với lượng khoảng 15-25% khối lượng, *Bacillus licheniformis* CNSH1003 với lượng khoảng 15-25% khối lượng, *Bacillus amyloliquefaciens* CNSH1004 với lượng khoảng 15-25% khối lượng và nấm *Trichoderma harzianum* CNSH2001 với lượng khoảng 15-25% khối lượng.

2. Quy trình xử lý rác thải hữu cơ thành phân bón vi sinh hữu cơ sử dụng chế phẩm như được nêu trong điểm 1 nêu trên kết hợp với các yếu tố hoá học và yếu tố vật lý, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

- thu gom rác thải hữu cơ trong sinh hoạt hàng ngày của các hộ dân, các nhà máy, xí nghiệp, nhà hàng và khách sạn, để chuẩn bị xử lý trong 1-2 ngày;
- ước lượng khối lượng rác thải sinh hoạt thu gom được;
- phối trộn chế phẩm vi sinh như được nêu trong điểm 1 với chế phẩm hoá học chứa natri bicacbonat (NaHCO_3 -) có bán sẵn trên thị trường với tỷ lệ khối lượng là 4 : 1, để thu được chế phẩm sinh-hoá;
- bổ sung chế phẩm sinh-hoá này vào đồng rác thải nêu trên với tỷ lệ khối lượng là 1 : 10 và trộn đều;
- đưa hỗn hợp rác thải sinh hoạt và chế phẩm sinh-hoá đã được trộn đều vào thiết bị có chức năng vừa nghiền rác thải, vừa đảo trộn rác thải và chế phẩm, vừa kiểm soát được đồng ủ luôn ở nhiệt độ 45 đến 50°C trong suốt quá trình ủ;
- sau khoảng từ 24 đến 48 giờ, kiểm tra đồng rác ủ đã nghiền, nếu sản phẩm đạt độ khô ráo, nhỏ, mịn đồng đều có thể sử dụng làm phân bón vi sinh hữu cơ.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Lê Thị Hoàng Yên
 <120> CHẾ PHẨM VI SINH ĐỀ XỬ LÝ RÁC THẢI HỮU CƠ VÀ QUY TRÌNH XỬ LÝ RÁC THẢI HỮU CƠ

<160> 9

<210> 1

<211> 1225

<212> ADN

<213> *Bacillus subtilis* CNSH1001

<400>

GGGGGTCTAT	AATGCAGTCG	AGCGGACAGA	TGGGAGCTTG	CTCCCTGATG	50
TTAGCGGCGG	ACGGGTGAGT	AACACGTGGG	TAACCTGCCT	GTAAGACTGG	100
GATAACTCCG	GGAAACCGGG	GCTAATACCG	GATGGTTGTT	TGAACCGCAT	150
GGTTCAAACA	TAAAAGGTGG	CTTCGGCTAC	CACTTACAGA	TGGACCCGCG	200
GCGCATTAGC	TAGTTGGTGA	GGTAACGGCT	CACCAAGGCA	ACGATGCGTA	250
GCCGACCTGA	GAGGGTGATC	GGCCACACTG	GGACTGAGAC	ACGGCCCAGA	300
CTCCTACGGG	AGGCAGCAGT	AGGGAATCTT	CCGCAATGGA	CGAAAGTCTG	350
ACGGAGCAAC	GCCGCGTGAG	TGATGAAGGT	TTTCGGATCG	TAAAGCTCTG	400
TTGTTAGGGA	AGAACAAGTA	CCGTTCGAAT	AGGGCGGTAC	CTTGACGGTA	450
CCTAACCAGA	AAGCCACGGC	TAACCTACGTG	CCAGCAGCCG	CGGTAATACG	500
TAGGTGGCAA	GCGTTGTCCG	GAATTATTGG	GCGTAAAGGG	CTCGCAGGCG	550
GTTTCTTAAG	TCTGATGTGA	AAGCCCCCGG	CTCAACCGGG	GAGGGTCATT	600
GGAAACTGGG	GAACCTGAGT	GCAGAAGAGG	AGAGTGGAAT	TCCACGTGTA	650
GCGGTGAAAT	GCGTAGAGAT	GTGGAGGAAC	ACCAGTGGCG	AAGGCGACTC	700
TCTGGTCTGT	AACTGACGCT	GAGGAGCGAA	AGCGTGGGGA	GCGAACAGGA	750
TTAGATACCC	TGGTAGTCCA	CGCCGTAAAC	GATGAGTGCT	AAGTGTTAGG	800
GGGTTTCCGC	CCCTTAGTGC	TGCAGCTAAC	GCATTAAGCA	CTCCGCCTGG	850
GGAGTACGGT	CGCAAGACTG	AAACTCAAAG	GAATTGACGG	GGGCCCCGAC	900
AAGCGGTGGA	GCATGTGGTT	TAATTGGAAG	CAACGCGAAG	AACCTTACCA	950
GGTCTTGACA	TCCTCTGACA	ATCCTAGAGA	TAGGACGTCC	CCTTCGGGGG	1000
CAGAGTGACA	GGTGGTGAT	GGTTGTGCTC	AGCTCGTGTC	GTGAGATGTT	1050
GGGTAAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAACCTTT	GATCTTAGTT	GCCAGCATTC	1100
AGTTGGGCAC	TCTAAGGTGA	CTGCCGGTGA	CAAACCGGAA	GAAAGGGGGG	1150
GATAACGTCA	AATCATCCTG	GCCCTTAATG	ACCTGGGGCT	ACCACCGTGC	1200
CTACAATGGG	ACAGAACCAA	AGGGG			1225

<210> 2

<211> 1166

<212> ADN

<213> *Bacillus megaterium* CNSH1002

<400>

AATACATGCA	AGTCGAGCGA	ACTGATTAGA	AGCTTGCTTC	TATGACGTTA	50
GCGGCGGACG	GGTGAGTAAC	ACGTGGGCAA	CCTGCCTGTA	AGACTGGGAT	100
AACTTCGGGA	AACCGAAGCT	AATACCGGAT	AGGATCTTCT	CCTTCATGGG	150
AGATGATTGA	AAGATGGTTT	CGGCTATCAC	TTACAGATGG	GCCCCGCGTG	200
CATTAGCTAG	TTGGTGAGGT	AACGGCTCAC	CAAGGCAACG	ATGCATAGCC	250
GACCTGAGAG	GGTGATCGGC	CACACTGGGA	CTGAGACACG	GCCCAGACTC	300
CTACGGGAGG	CAGCAGTAGG	GAATCTTCCG	CAATGGACGA	AAGTCTGACG	350
GAGCAACGCC	GCGTGAGTGA	TGAAGGCTTT	CGGGTCGTAA	AACTCTGTTG	400
TTAGGGAAGA	ACAAGTACGA	GAGTAACTGC	TCGTACCTTG	ACGGTACCTA	450
ACCAGAAAGC	CACGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	500
TGGCAAGCGT	TATCCGGAAT	TATTGGGCGT	AAAGCGCGCG	CAGGCGGTTT	550
CTTAAGTCTG	ATGTGAAAGC	CCACGGCTCA	ACCGTGGAGG	GTCATTGGAA	600
ACTGGGGAAC	TTGAGTGCAG	AAGAGAAAAG	CGGAATTCCA	CGTGTAGCGG	650
TGAAATGCGT	AGAGATGTGG	AGGAACACCA	GTGGCGAAGG	CGGCTTTTTG	700

GTCTGTA	ACT	GACGCTG	AGG	CGCGAAAG	CGG	TGGGGAG	CAA	ACAGGATT	AG	750
ATACCC	TGGT	AGTCCAC	GCC	GTAAACG	ATG	AGTGCTA	AGT	GTTAGAG	GGT	800
TTCCG	CCCTT	TAGTGCT	GCA	GCTAACG	CAT	TAAGCACT	CC	GCCTGGG	GAG	850
TACGGT	CGCA	AGACTGA	AAC	TCAAAGG	AAT	TGACGGG	GGG	CCGCACA	AAGC	900
GGTGG	AGCAT	GTGGTTT	TAAT	TCGAAGC	AAC	GCGAAGA	AACC	TTACCAG	GGTC	950
TTGAC	ATCCT	CTGACAA	CTC	TAGAGAT	AGA	GCGTTCC	CCCT	TCGGGGG	ACA	1000
GAGTG	ACAGG	TGGTGCA	TGG	TTGTCTG	CAG	CTCGTG	TCGT	GAGATGT	TGG	1050
GTTAAG	TCCC	GCAACG	AGCG	CAACCCT	TGA	TCTTAGT	TGC	CAGCAT	TTAG	1100
TTGGG	CACTC	TAAGGTG	ACT	GCCGGT	GACA	ACCGGAG	GAA	GGTGGG	GATG	1150
ACGTCA	ATCA	TCTGCC								1166

<210> 3
 <211> 1382
 <212> ADN
 <213> *Bacillus licheniformis* CNSH1003

<400>

TGCCTA	ATAC	ATGCAAG	TCG	AGCGGAC	CGA	CGGGAGC	TTG	CTCCCTT	TAGG	50
TCAGCG	GCGG	ACGGGTG	AGT	AACACGT	GGG	TAACCTG	CCCT	GTAAGAC	TGG	100
GATAAC	TCCG	GGAAAC	CGGG	GCTAAT	ACCG	GATGCTT	GAT	TGAACCG	CAT	150
GGTTCA	ATCA	TAAAAGG	TGG	CTTTTAG	CTA	CCACTTA	CAG	ATGGACC	CGC	200
GGCGCA	TTAG	CTAGTTG	GTTG	AGGTAAC	CGGC	TCACCA	AAGC	GACGATG	CGT	250
AGCCG	ACCTG	AGAGGGT	GAT	CGGCCAC	ACT	GGGACTG	GAGA	CACGGCC	CAG	300
ACTCCT	ACGG	GAGGCAG	CAG	TAGGGA	ATCT	TCCGCA	ATGG	ACGAAAG	TCT	350
GACGG	AGCAA	CGCCGCG	TGA	GTGATGA	AAGG	TTTTCG	GATC	GTAAAA	ACTCT	400
GTTGTT	AGGG	AAGAACA	AGT	ACCGTTC	GAA	TAGGGCG	GTA	CCTTGAC	GGT	450
ACCTAAC	CAG	AAAGCC	ACGG	CTAACTA	CGT	GCCAGC	AGCC	GCGGTA	ATAC	500
GTAGGT	GCCA	AGCGTT	GTC	GGAATT	ATTG	GGCGTA	AAGC	GCGCGC	AGGC	550
GGTTTC	TTAA	GTCTGAT	GTTG	AAAGCCC	CCG	GCTCA	ACCGG	GGAGGG	T	600
TGGAA	ACTGG	GGA	ACTT	GAG		TGCAGA	AAGAG	GAGAGT	GGA	650
AGCGGT	GAAA	TGCGT	AGAGA	TGTGG	AGGAA	CACCA	GTGGC	GAAGGC	G	700
CTCTGG	TCTG	TA	ACTG	ACGC		TGAGG	CGCGA	AAGCGT	G	750
ATTAG	ATACC	CTGGT	AGTCC	ACGCCG	TAAA	CGATG	AGTGC	TAAGT	GTTAG	800
AGGGTT	TCCG	CCCTTT	AGTG	CTGCAG	CAAA	CGCAT	TAAGC	ACTCCG	CCTG	850
GGGAGT	ACGG	TCGCA	AAGACT	GAA	ACTCA	AAA	GGA	ATTG	ACG	900
CAAGCG	GTTGG	AGCAT	GTTGGT	TTA	ATTC	GAA	GCA	ACG	CGAA	950
AGGTCT	TGAC	ATCCT	CTGAC	AACC	CTAG	AG	ATAGG	GCTTC	GGG	1000
GCAGAG	TGAC	AGGTGG	TGCA	TGGT	TGTCGT		CAGCT	CGTGT		1050
TGGGT	TAAAGT	CCC	GCAACGA	GCG	CAACCCT		TGATC	TTAGT		1100
CAGTT	GGCA	CTCTA	AGGTG	ACTG	CCCGTG		ACAA	ACCGGA		1150
GATG	ACGTCA	AATCAT	CATG	CCCC	TTATGA		CCTG	GGCTAC		1200
CAATG	GGCAG	AACAA	AGGGC	AGCG	AAGCCG		CGAGG	CTAAG		1250
AAATCT	GTTT	TCAGT	T	CGGA		TCGC	AGTCTG			1300
GGAAT	CGCTA	GTAAT	CGCGG	ATC	AGCAT	G	CGCGG	TGAAT		1350
GCCTT	GTACA	CACCG	CCCCGT	CAC	ACCACGA		GA			1382

<210> 4
 <211> 1420
 <212> ADN
 <213> *Bacillus amyloliquefaciens* CNSH1004

<400>

GCGGCG	TGCC	TAATAC	ATGC	AAGTCG	AGCG	GACAGAT	GGG	AGCTTG	GCTCC	50
CTGATG	T	CGGCGG	ACGG	GTGAGT	AACA	CGTGGG	TAA	CTGCCT	GTAA	100
GACTGG	GATA	ACTCCG	GGGAA	ACCGGG	GCTA	ATACCG	GATG	GTTGT	NTGAA	150
CCGCAT	G	CAGAC	ATAAA	AGGTGG	GCTTC	GGCTAC	CACT	TACAG	ATGGA	200
CCCGCG	GCGC	ATTAG	CTAGT	TGGTGA	G	ACGGCT	CACC	AAGGC	GACGA	250
TGCGT	AGCCG	ACCTG	AGAGG	GTGAT	CGGCC	ACACTG	GGGAC	TGAG	ACACG	300
CCCAG	ACTCC	TACGG	GAGGC	AGCAGT	AGGG	AATCTT	CCGC	AATGG	ACGAA	350
AGTCT	GACGG	AGCAAC	GCCG	CGTGA	GTGAT	GAAGG	TTTTT	GGAT	CGTAA	400
GCTCT	GTTGT	TAGGG	AAGAA	CAAGT	GCCGT	TCAA	ATAGG	CGGC	ACCTTG	450

ACGGTACCTA	ACCAGAAAGC	CACGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	500
AATACGTAGG	TGGCAAGCGT	TGTCCGGAAT	TATTGGGCGT	AAAGGGGCTCG	550
CAGGCGGT	CTTAAGTCTG	ATGTGAAAGC	CCCCGGCTCA	ACCGGGGAGG	600
GTCATTGGAA	ACTGGGGAAC	TTGAGTGCAG	AAGAGGAGAG	TGGAATTCCA	650
CGTGTAGCGG	TGAAATGCGT	AGAGATGTGG	AGGAACACCA	GTGGCGAAGG	700
CGACTCTCTG	GTCTGTAAC	GACGCTGAGG	AGCGAAAGCG	TGGGGAGCGA	750
ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	GTAACGATG	AGTGCTAAGT	800
GTTAGGGGGT	TTCCGCCCCCT	TAGTGCTGCA	GCTAACGCAT	TAAGCACTCC	850
GCCTGGGGAG	TACGGTTCGCA	AGACTGAAAC	TCAAAGGAAT	TGACGGGGGC	900
CCGCACAAGC	GGTGGAGCAT	GTGGTTTAAT	TCGAAGCAAC	GCGAAGAACC	950
TTACCAGGTC	TTGACATCCT	CTGACAATCC	TAGAGATAGG	ACGTCCCCTT	1000
CGGGGGCAGA	GTGACAGGTG	GTGCATGGTT	GTCGTCAGCT	CGTGTCGTGA	1050
GATGTTGGGT	TAAGTCCCGC	AACGAGCGCA	ACCCTTGATC	TTAGTTGCCA	1100
GCATTCAAGT	GGGCACTCTA	AGGTGACTGC	CGGTGACAAA	CCGGAGGAAG	1150
GTGGGGATGA	CGTCAAATCA	TCATGCCCTT	TATGACCTGG	GCTACACACG	1200
TGCTACAATG	GACAGAACAA	AGGGCAGCGA	AACCGCGAGG	TTAAGCCAAT	1250
CCCACAAATC	TGTTCTCAGT	TCGGATCGCA	GTCTGCAACT	CGACTGCGTG	1300
AAGCTGGAAT	CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGCCGCGG	TGAATACGTT	1350
CCCGGGCCTT	GTACACACCG	CCCGTCACAC	CACGAGAGTT	TGTAACACCC	1400
GAAGTCGGTG	AGGTAACCTT				1420

<210> 5
 <211> 697
 <212> ADN
 <213> *Trichoderma harzianum* CNSH2001

<400>

CGGTCTCGCC	GCAGCCTCTC	CTGCGCAGTA	GTTTGACAC	TCGCACCGGG	50
AGCGCGGCGC	GTCCACAGCC	GTTAAACACC	CAACTTTCTG	AAATGTTGAC	100
CTCGGATCAG	GTAGGAATAC	CCGCTGAACT	TAAGCATATC	AATAAGCGGA	150
GGAAAAGAAA	CCAACAGGGA	TTGCCCCAGT	AACGGCGAGT	GAAGCGGCAA	200
CAGCTCAAAT	TTGAAATCTG	GCCCCTAGGG	TCCGAGTTGT	AATTTGTAGA	250
GGATGCTTTT	GGTGAGGTGC	CGCCCCGAGT	CCCTGGAACG	GGACGCCACA	300
GAGGGTGAGA	GCCCCGTCTG	GCTGGCCGCC	GAGCCTCTGT	AAAGCTCCTT	350
CGACGAGTCG	AGTAGTTTGG	GAATGCTGCT	CAAAATGGGA	GGTATATGTC	400
TTCTAAAGCT	AAATATTGGC	CAGAGACCGA	TAGCGCACAA	GTAAGGTGAT	450
CGAAAGATGA	AAAGCACCTT	GAAAAGAGGG	TTAAATAGTA	CGTGAAATTG	500
TTGAAAGGGA	AGCGCTTGTG	ACCAGACTTG	GGCGCGGCGG	ATCATCCGGG	550
GTTCTCTCCG	GTGCACTTCG	CCGCGTCTAG	GCCAGCATCA	GTTCTGTCGG	600
GGGGAAAAAG	GCTTCGGGAA	CGTGGCTCCT	CCGGGAGTGT	TATAGCCCGT	650
TGCATAATAC	CCTGCGGTGG	ACTGAGGACC	GCGCATCTGC	AAGGATG	697

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Đoạn mới

<400>

GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400>

CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi

<400>

GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG

<210> 9

<211> 19

<212> ADN

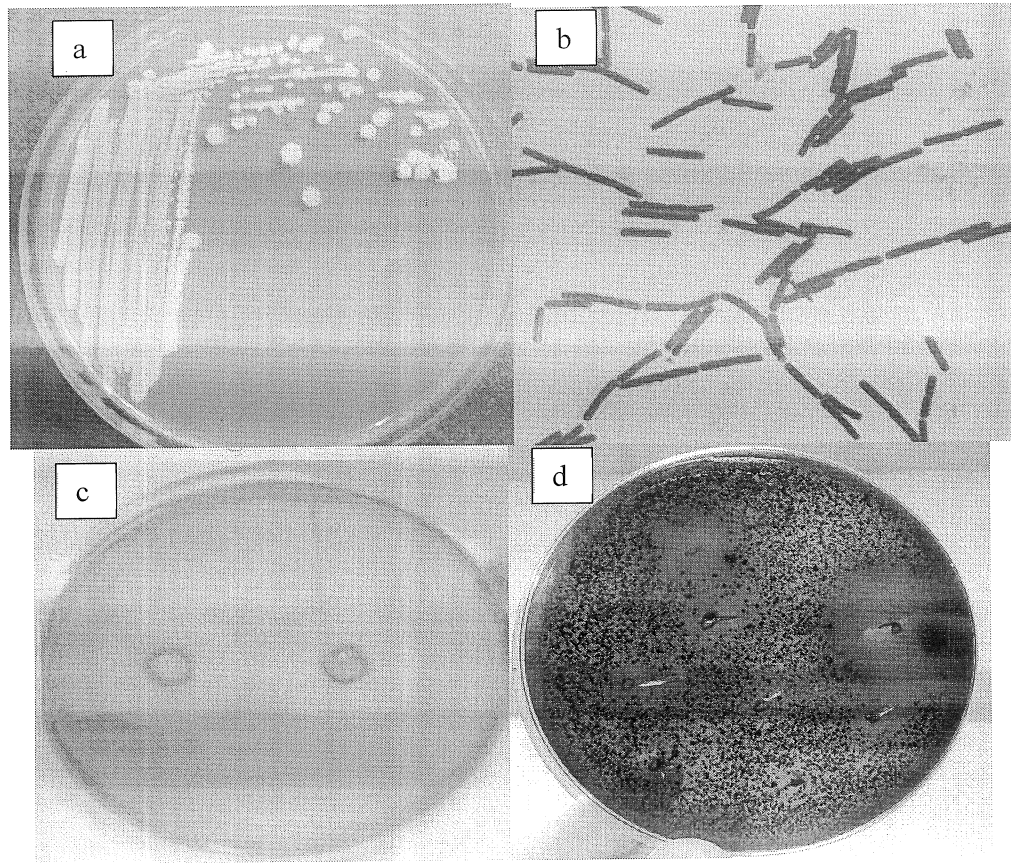
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

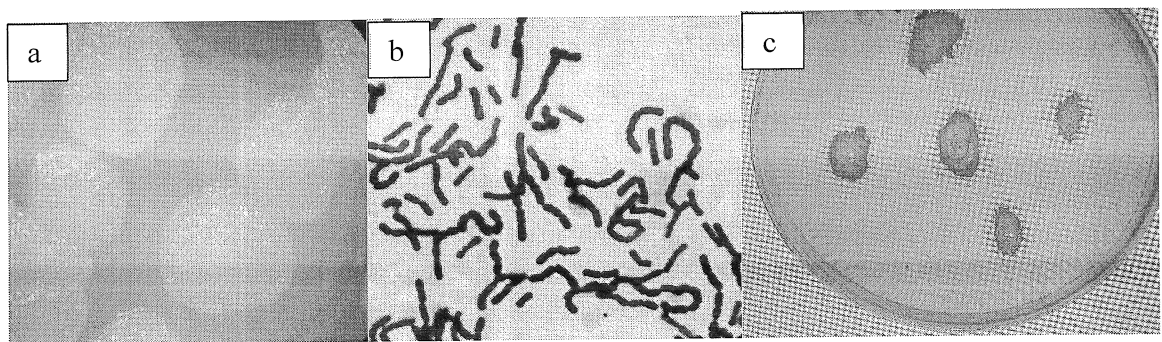
<223> Đoạn mỗi

<400>

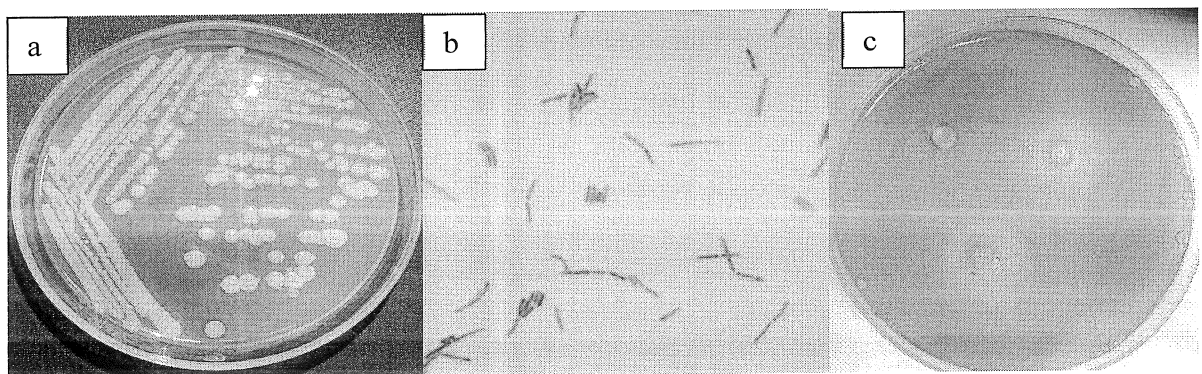
GGT CCG TGT TTC AAG ACG G



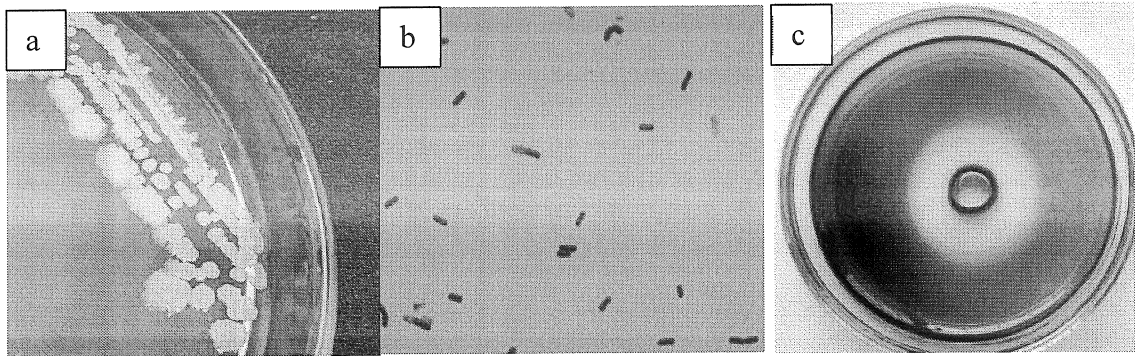
Hình 1



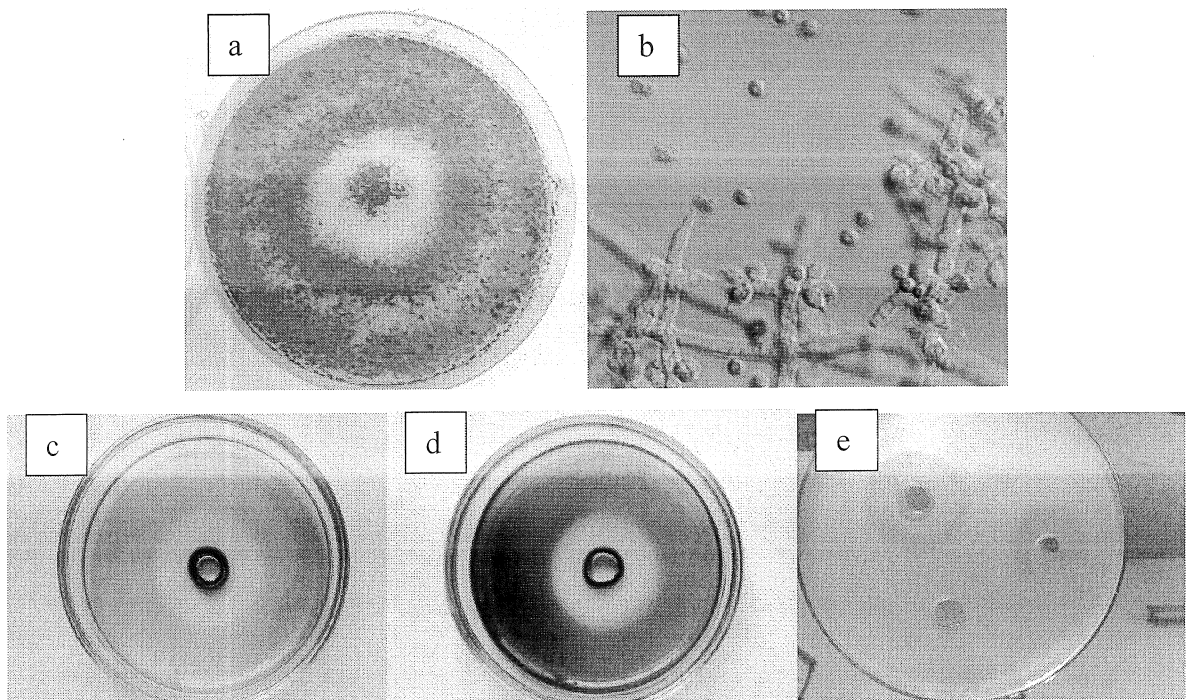
Hình 2



Hình 3



Hình 4



Hình 5