(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) **1-0019371**

(51)[7] **C12N 1/20**

(13) **B**

(21) 1-2017-01394
(22) 14.04.2017
(45) 25.07.2018 364
(43) 26.06.2017 351
(73) HỢP TÁC XÃ NÔNG NGHIỆP HỮU CƠ TIÊN DƯƠNG (VN)
Thôn Tuần Lề (khu Đầm Rào), xã Tiên Dương, huyện Đông Anh, thành phố Hà Nội
(72) Phạm Thị Lý (VN), Nguyễn Việt Anh (VN)

(54) CHẾ PHẨM VI SINH ĐỂ XỬ LÝ CHẤT THẢI HỮU CƠ TRONG CHĂN NUÔI

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm vi sinh để xử lý chất thải hữu cơ trong chăn nuôi, trong đó chế phẩm chứa ít nhất sáu loài vi khuẩn bao gồm Bacillus subtilis, Pseudomonas alcaligenes, Bifidobacterium thermophilus, Clostridium pastenisium, Nirosomonas europaea và Lactobacillus casei. Bằng cách cải tiến môi trường nuôi, chế phẩm vi sinh thu được ổn định, có khả năng xử lý chất thải hữu cơ trong chăn nuôi một cách triệt để, giảm được mùi hôi. Ngoài ra, chế phẩm vi sinh theo sáng chế theo sáng chế giữ được hoạt tính lâu dài trong môi trường thực địa. Ngoài ra, chế phẩm vi sinh theo sáng chế có thể được hấp thụ lên chất mang rắn dùng làm đệm lót sinh học trong chăn nuôi.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh ứng dụng, cụ thể là sáng chế đề cập đến chế phẩm vi sinh để xử lý chất thải hữu cơ trong chăn nuôi. Sáng chế cũng đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề ô nhiễm môi trường đang là một thách thức lớn không chỉ đối với ngành công nghiệp, mà còn ngay cả trong ngành sản xuất nông nghiệp, cụ thể là trong chăn nuôi. Việc chăn nuôi tập trung đã thải ra một lượng lớn các chất thải chăn nuôi gây mùi hôi khó chịu, gây ra những hệ lụy về môi trường như gây ô nhiễm không khí, ô nhiễm nguồn nước và phát sinh dịch bệnh, v.v..

Các chất thải trong quá trình chăn nuôi như phân thải hoặc thức ăn thừa gây ra mùi khó chịu, làm ô nhiễm không khí và ảnh hưởng tới sức khỏe cho người và vật nuôi. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng có khoảng 200 hợp chất gây mùi, trong đó có khoảng 30 chất có khả năng gây bệnh về đường hô hấp cho người và vật nuôi. Ngoài ra, các chất thải có thể gây ô nhiễm nước, phát tán dịch bệnh ảnh hưởng đến năng suất, gây thiệt hại lớn, nhất là đối với các trang trại chăn nuôi tập trung.

Chế phẩm vi sinh vật hữu ích đã được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi như một phương thức trong phát triển bền vững và thân thiện với môi trường. Chế phẩm vi sinh hữu ích hay còn gọi là chế phẩm EM (effective microogarnism: EM) lần đầu tiên được Teuro Higa đề xuất và được áp dụng trong thực tiễn từ những năm 1980. Chế phẩm vi sinh vật hữu ích gốc là tập hợp của khoảng hơn 80 loài vi sinh vật có ích được chọn từ hơn 200 loài được sử dụng phổ biến thuộc 5 nhóm chính bao gồm vi khuẩn quang hợp, vi khuẩn lactic, xạ khuẩn và nấm men. Các vi sinh vật trong chế phẩm EM tạo ra môi trường ưu thế nhằm cạnh tranh, cản trở vi sinh vật có hại, đồng thời trực tiếp tham gia vào quá trình phân giải chất hữu cơ. Trong quá trình phân giải, các nhóm vi sinh tương hỗ sẽ trợ giúp nhau trong quá trình phân hủy giúp cho việc phân hủy trở nên triệt để, giảm được khí thải phát sinh. Nhờ có chế phẩm vi sinh vật hữu ích, việc xử lý môi trường trong các chuồng trại trở nên đơn giản và hiệu quả hơn.

Chế phẩm EM gốc này được coi như một chế phẩm đa năng do chứa các vi sinh vật hữu ích, thân thiện với môi trường, không gây bệnh cho người và động vật. Từ chế phẩm EM gốc, đã có nhiều chế phẩm EM thứ cấp được tạo ra nhằm các mục đích khác nhau, như dùng để xử lý chất thải lỏng, chất thải hữu cơ rắn, trợ giúp cho quá trình lên

men ủ chua thức ăn, giúp phòng trừ bệnh hại trên cây trồng v.v.. Mặc dù đã có nhiều ứng dụng và cho thấy có hiệu quả trong thực tiễn. Nhưng do trong chế phẩm EM gốc có mật độ vi sinh vật lớn và các chủng vi sinh vật này được phối trộn với nhau từ các chủng thuần, nên ngay trong chế phẩm đã xảy ra sự cạnh tranh giữa các vi sinh vật với nhau để giành nguồn thức ăn. Chính vì vậy, một số loài vi khuẩn sản sinh cơ chất nhằm tiêu diệt các vi sinh vật khác để giành nguồn thức ăn. Việc cạnh tranh này làm giảm chất lượng của chế phẩm. Ngoài ra, các vi sinh vật tạp nhiễm phát triển sản sinh ra chất độc sẽ tiêu diệt vi sinh vật hữu ích khiến chế phẩm trở nên mất tác dụng, thậm chí gây độc.

Đã có nhiều cải tiến về thành phần vi sinh nhằm mục đích khác nhau, trong đó tập trung vào các chủng vi sinh kỵ khí sản sinh axit lactic nhằm hạn chế sự phát triển của vi sinh vật ngoài tự nhiên đồng thời tăng cường các loài vi sinh vật phân giải chất hữu cơ chịu axit nhằm phân giải các chất hữu cơ. Các môi trường sử dụng thường là môi trường chứa đường, tinh bột và chất khoáng nhằm cung cấp đủ năng lượng cho vi sinh vật phát triển mạnh trong thời gian ngắn.

Về bản chất, việc sử dụng chế phẩm vi sinh hữu ích là tạo ra quần thể vi sinh hữu ích chiếm ưu thế cục bộ nhằm hạn chế, tiêu diệt các loài vi sinh vật gây hại hoặc không được ưu tiên khác. Tuy đã có nhiều cải tiến nhằm tạo ra được phức hợp vi sinh nhằm hạn chế thấp nhất đến khả năng cạnh tranh trong quần thể vi sinh này, nhưng quá trình cạnh tranh luôn xảy ra, dẫn đến việc kìm hãm hoặc tiêu diệt hoàn toàn một hoặc một số loài có ích. Do đó, chế phẩm vi sinh thường không ổn định.

Do đó, việc pha chế phẩm EM với nguồn nguyên liệu là chứa đường, tinh bột và các chất vi lượng, đa lượng sẽ kích thích vi sinh vật phát triển mạnh trong một thời gian ngắn, sau đó chúng tự cạnh tranh với nhau dẫn đến giảm chất lượng của chế phẩm. Vì vậy, đối với các chế phẩm vi sinh, cần lựa chọn các chủng vi sinh sao cho chúng giảm thấp nhất mức độ cạnh tranh nguồn nguyên liệu, tương đồng về điều kiện sinh trưởng hoặc có khả năng hạn chế thấp nhất mức độ ảnh hưởng bởi các vi sinh vật khác trong quần thể. Ngoài ra, cần cải tiến các thành phần môi trường nuôi cấy để kích thích vi sinh vật phát triển, thích nghi và tận dụng được hết ưu thế của quần thể vi sinh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là nhằm giải quyết các tồn tại nêu trên. Theo đó, sáng chế đề xuất chế phẩm vi sinh để xử lý chất thải hữu cơ và quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chế phẩm vi sinh để xử lý chất thải hữu cơ trong chăn nuôi. Chế phẩm này bao gồm các thành phần theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng như sau:

Chế phẩm vi sinh gốc	4-10
Rỉ đường	5-15
Cám gạo	3-10
Tinh bột	3-7
Chuối chín	5-10
Dịch chiết nấm men	1-5
Bột cây xuyến chi	2-5
Bột cây đỗ tương	2-5
Lá sả	3-5
Than hoạt tính	4-10
Dịch nền pha môi trường	30-70

trong đó khác biệt ở chỗ:

- chế phẩm vi sinh gốc bao gồm ít nhất bảy loài vi khuẩn bao gồm *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes, Bifidobacterium thermophilus*, *Clostridium pastenisium, Nirosomonas europaea, Saccharomyces cereviseae* và *Lactobacillus casei* với nồng độ mỗi loài từ 10^6 đến 10^7 CFU/ml;

- tổng trọng lượng của bột cây xuyến chi và bột cây đỗ tương/trọng lượng chế phẩm vi sinh gốc là 1/1, tỷ lệ than hoạt tính/chế phẩm vi sinh gốc là là 1/1; và

- dịch nền pha môi trường là dung dịch chứa 1% casein, 0,1% K_2HPO_4, 0,6% asparagin, 0,04% $MgSO_4.7H_2O$, 0,02% tryptophan, 0,01% sorbitan, 0,02% NaCl và 0,5% axit glutamic.

Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm vi sinh vật gốc của chế phẩm vi sinh theo sáng chế còn chứa các loài *Gluconobacter oxydans, Acetobacter aceti, Azotobacter salinestris, Rhizbium aegytiacum, Methylomonas methanica, Micrococcus flacvus, Streptococcus lactis, Leuconostoc mesenterioides, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus bulgaricus, Arthrobacter woluwensis, Achromobacter chlorophenolicus, Nitrospira moscoviensis và Sphaerotilus* sp với tỷ lệ từ 10^5 đến 10^6 CFU/ml.

Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm vi sinh theo sáng chế bao gồm các thành phần theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng sau:

Chế phẩm vi sinh gốc	5
Rỉ đường	10
Cám gạo	5

Tinh bột	5
Chuối chín	10
Dịch chiết nấm men	3
Bột cây xuyến chi	2,5
Bột cây đỗ tương	2,5
Lá sả	2
Than hoạt tính	5
Dịch nền pha môi trường	50.

Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm vi sinh gốc được hấp thụ lên than hoạt tính trước khi phối trộn với các thành phần còn lại.

Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm vi sinh theo sáng chế còn được hấp thụ lên chất mang là zeolit, vỏ trấu hoặc mùn cưa hoặc hỗn hợp của chúng để dùng làm đệm lót sinh học trong chăn nuôi gia súc hoặc gia cầm.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh, để xử lý chất thải hữu cơ trong chăn nuôi, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị chủng vi sinh thuần chủng bằng cách giải đông bảy chủng vi sinh gốc bao gồm *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes, Bifidobacterium thermophilus*, *Clostridium pastenisium, Nirosomonas europaea, Saccharomyces cereviseae* và *Lactobacillus casei* và nuôi cấy hoạt hóa chúng trong môi trường nuôi cấy chuẩn đến khi đạt mật độ 10^7 CFU/ml;

b) tạo chế phẩm vi sinh gốc bằng cách bổ sung lần lượt 20% môi trường chứa *Lactobacillus casei* và 20% môi trường chứa *Pseudomonas alcaligenes* vào môi trường chứa *Saccharomyces cereviseae*, bổ sung 20% môi trường chứa *Bifidobacterium thermophilus* và 20% môi trường chứa *Clostridium pastenisium* vào môi trường chứa *Nitrosomonass europea* và để trong 2 giờ trong điều kiện khuấy đảo nhẹ, tiếp đến bổ sung từ từ 50% hai hỗn dịch này vào môi trường chứa *Bacillus subtilis* và tiếp đó bổ sung từ từ các môi trường còn lại theo tỷ lệ cứ 1 giờ bổ sung được 20%, trong quá trình này có bổ sung dung dịch pepton và cao nấm men 10% theo tỷ lệ 20% tổng dung dịch được phối trộn thu được chế phẩm vi sinh gốc;

c) chuẩn bị dịch nền pha môi trường bằng cách pha casein, K_2HPO_4, asparagin, $MgSO_4.7H_2O$, tryptophan, sorbitan, NaCl, axit glutamic với nước để thu được dịch nền pha môi trường chứa là dung dịch chứa 1% casein, 1% K_2HPO_4, 0,6% asparagin, 0,04% $MgSO_4.7H_2O$, 0,02% tryptophan, 0,01% sorbitan, 0,02% NaCl và 0,5% axit glutamic, sau đó chuẩn bị các thành phần theo phần trăm trọng lượng như sau:

Chế phẩm vi sinh gốc	4-10
Rỉ đường	5-15
Cám gạo	3-10
Tinh bột	3-7
Chuối chín	5-10
Dịch chiết nấm men	1-5
Bột cây xuyến chi	2-5
Bột cây đỗ tương	2-5
Lá sả	3-5
Than hoạt tính	4-10
Dịch nền pha môi trường	30-70

d) thu chế phẩm vi sinh bằng cách xay mịn chuối chín và lần lượt bổ sung rỉ đường, cám gạo, tinh bột, chuối chín, dịch chiết nấm men vào dịch nền pha môi trường và khuấy trộn đều, tiếp đó bổ sung 10% chế phẩm vi sinh gốc và khuấy trộn trong 1 giờ trong điều kiện yếm khí, tiếp đó bổ sung bột cây xuyến chi và bột cây đỗ tương, phần chế phẩm vi sinh gốc còn lại được hấp phụ lên than hoạt tính và bổ sung vào chế phẩm và ủ trong điều kiện yếm khí nhiệt độ từ 20 đến 25°C trong khoảng từ 5 đến 7 ngày, tiếp đó bổ sung lá sả xay nhuyễn và ủ tiếp trong 1 ngày thu được chế phẩm vi sinh.

Chế phẩm vi sinh thu được ở trên có thể bổ sung vi sinh vật bao gồm *Gluconobacter oxydans, Acetobacter aceti, Azotobacter salinestris, Rhizbium aegytiacum, Methylomonas methanica, Micrococcus flacvus, Streptococcus lactis, Leuconostoc mesenterioides, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus bulgaricus, Arthrobacter woluwensis, Achromobacter chlorophenolicus, Nitrospira moscoviensis và Sphaerotilus* sp. với tỷ lệ từ 10^5 đến 10^6 CFU/ml trước khi sử dụng để tăng cường hiệu quả xử lý chất thải hữu cơ.

Chế phẩm vi sinh thu được có màu vàng sẫm, mùi thơm, pH khoảng từ 3,5-5, hàm lượng vi sinh vật tổng số đạt khoảng từ 10^6 CFU/ml đến 10^7 CFU/ml.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích nhằm mô tả chi tiết sáng chế chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Các quy trình, kỹ thuật nhân giống vi khuẩn thuần chủng là đã biết và được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ và có thể áp dụng dễ

dàng. Các chủng vi sinh vật thuần chủng bao gồm các chủng vi sinh gốc như *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes, Bifidobacterium thermophilus*, *Clostridium pastenisium, Nirosomonas europaea, Saccharomyces cereviseae, Lactobacillus casei, Gluconobacter oxydans, Acetobacter aceti, Azotobacter salinestris, Rhizbium aegytiacum, Methylomonas methanica, Micrococcus flacvus, Streptococcus lactis, Leuconostoc mesenterioides, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus bulgaricus, Arthrobacter woluwensis, Achromobacter chlorophenolicus, Nitrospira moscoviensis và Sphaerotilus* sp có thể mua trên thị trường hoặc có thể thu nhận được từ Trung tâm giống và bảo tồn nguồn gen vi sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam hoặc Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học hoặc được phân lập ngoài tự nhiên, miễn là đảm bảo về dòng thuần, có hoạt lực và khả năng sinh trưởng trong điều kiện nuôi cấy chuẩn.

Các thành phần rỉ đường, cám gạo, tinh bột, dịch chiết nấm men là các thành phần thông dụng được sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật và có thể mua ngoài thị trường. Chuối chín được sử dụng tốt nhất là chuối tiêu, có mùi thơm. Than hoạt tính được sử dụng theo sáng chế là dạng bột mịn, có kích thước hạt từ 0,01 đến 0,07 mm, tốt hơn nếu than hoạt tính có kích thước nhỏ hơn, tốt hơn nếu than hoạt tính có kích thước từ 200 đến 500 nm.

Cây xuyến chi hay còn gọi là đơn buốt, đơn kim, quỷ châm, song nha lông, có tên khoa học là Bidens pilosa, là một loài cây thân thảo, bụi cao đến 1m, lá đơn mọc đối, phiến lá xẻ thùy sâu tận gân tạo thành 3 thùy phiến. Cây xuyến chi được dùng làm nguồn thực phẩm và cây thuốc, một số nơi sử dụng ngọn non như rau xanh.

Cây đỗ tương hay còn gọi là đậu tương có tên khoa học là Glycine max, là cây bản địa Đông Á, được trồng lấy hạt làm nguồn thức ăn cho người và gia súc. Cây đậu tương còn có tác dụng cải tạo đất, tăng năng suất do sự cộng sinh của loài vi khuẩn *Rhizobium* cộng sinh trên rễ. Trong sản xuất nông nghiệp, thân cây đậu tương được sử dụng như nguồn phân xanh.

Bột cây xuyến chi và bột cây đậu tương thu được bằng cách thu hái cả phần thân và lá cây xuyến chi và cây đỗ tương, sau khi loại bỏ tạp chất, phơi khô và xay thành dạng bột. Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rằng, việc xay thành bột mịn sẽ thích hợp để cho vi sinh vật sử dụng, nhưng sẽ tốn năng lượng xay nên hoàn toàn xác định được cỡ hạt tối ưu của bột cây xuyến chi và bột cây đỗ tương được sử dụng.

Lá sả được sử dụng theo sáng chế là phần lá tươi của cây sả, có tên khoa học là *Cymbopogon flexuosus*, lá cây chứa nhiều tinh dầu bao gồm geraniol và citronellol có mùi thơm dịu. Citronellol ở nồng độ cao có tác dụng ức chế sự phát triển của vi sinh vật. Lá sả được sử dụng nhằm mục đích tạo mùi thơm cho chế phẩm, tuy nhiên, không sử dụng với lượng trên 5% vì tác dụng ức chế vi khuẩn sẽ tác động đến hệ vi sinh vật có trong chế phẩm.

Các môi trường bảo quản, hoạt hóa và nhân giống vi sinh vật theo sáng chế là môi trường lỏng đã biết và có thể sử dụng môi trường nuôi cấy chuẩn đối với các loài vi sinh vật. Các môi trường nuôi cấy khác có thể tham khảo, ví dụ, Ronald M.Atlas, Hanbook of microbiological media, 4th Edition, CRC Press, 2009.

Môi trường sinh trưởng chuẩn cho *Bacillus subtilis*, ví dụ có thể bao gồm: dịch chiết đậu tương 50: g/l, tinh bột: 15g/l, $(NH_4)_2HPO_3$: 10g/l, KCl: 0,2 g/l và $MgSO_4.7H_2O$: 0,2g/l.

Môi trường sinh trưởng chuẩn cho *Pseudomonas alcaligenes*, ví dụ có thể bao gồm NH_4NO_3: 2,5g/l, $Na_2HPO_4.2H_2O$: 1g/l, Napthalen: 0,64 g/l, $MgSO_4.7H_2O$: 0,5g/l, $(FeSO_4)_3.5H_2O$: 0,01g/l, $Co(NO_3)_2.6H_2O$: 5mg/l, $CaCl_2.2H_2O$; 1mg/l, KH_2PO_4: 0,5 mg/l, $MnS_4.2H_2O$: 0,1mg/l và $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$: 0,1mg/l.

Môi trường sinh trưởng chuẩn cho *Bifidobacterium thermophilus* bao gồm: pepton: 10g/l, thiol: 8g/l, NaCl: 5g/l, dịch chiết nấm men: 5 g/l, glucoza: 1g/l và axit p-aminobenzoic (PABA): 0,05 g/l).

Môi trường sinh trưởng chuẩn cho *Clostridium pastenisium* bao gồm 20 mgKH_2PO_4: 1,65 g/l, NH_4Cl: 1 g/l, dịch chiết nấm men 0,6 g/l, Cystein: 0,5 g/l, $CaCl_2.6H_2O$: 0,118 g/l. KJ: 0,083 g/l và H_3BO_3:0,03 g/l.

Môi trường sinh trưởng chuẩn cho *Nirosomonas europaea* bao gồm: $MnCl_2.4H_2O$: 0,2 g/l, $Na_2MoO_4.H_2O$, 0,1 g/l, $ZnSO_4.7H_2O$: 0,1 g/l, $CuSO_4.5H_2O$: 2mg/l và $CoCl_2.6H_2O$: 0,2mg/l.

Môi trường sinh trưởng chuẩn cho *Saccharomyces cereviseae* bao gồm: $MgSO_4.7H_2O$: 3g/l, axit nitrilotriaxetic: 1,5 g/l, NaCl: 1g/l, $MnSO_4.2H_2O$: 0,5 g/l, $CoSO_4.7H_2O$: 0,18 g/l, $ZnSO_4.7H_2O$: 0,18 g/l, $CaCl_2.2H_2O$: 0,1 g/l, $FeSO_4.7H_2O$: 0,1 g/l, $NiCl_2.6H_2O$: 0,025 g/l, $Kal(SO_4)_2.12H_2O$: 0,02 g/l, $CuSO_4.5H_2O$: 0,01 g/l, H_3BO_3: 0,01 g/l, $NaMoO_4.2H_2O$: 0,01 g/l và $NaSeO_3.5H_2O$: 0,3 mg/l.

Môi trường sinh trưởng chuẩn cho *Lactobacillus casei* bao gồm: glucoza: 40 g/l, natri axetat: 40 g/l, casein: 10 g/l, K_2HPO_4:1g/l, KH_2PO_4: 1 g/l, Asparagin: 0,6 g/l, cystein.$HCl.H_2O$: 0,5 g/l, $MgSO_4.7H_2O$: 0,4 g/l, tryptophan: 0,2 g/l, sorbitan: 0,1 g/l,

$FeSO_4.7H_2O$: 0,02 g/l, NaCl: 0,02 g/l, xanthin: 0,02 g/l, $MnSO_4.7H_2O$: 0,015 g/l, adenin sulfat: 0,01 g/l, guanin.HCl: 0,01 g/l, uracil: 0,01 g/l, glutathion: 5 mg/l, pyridonin.HCl: 4 mg/l, aminobenzoic: 2mg/l và canxi pantothenat: 0,8 mg/l.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chế phẩm vi sinh để xử lý chất thải hữu cơ trong chăn nuôi, trong đó chế phẩm này bao gồm các thành phần theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng như sau:

Chế phẩm vi sinh gốc	4-10
Rỉ đường	5-15
Cám gạo	3-10
Tinh bột	3-7
Chuối chín	5-10
Dịch chiết nấm men	1-5
Bột cây xuyến chi	2-5
Bột cây đỗ tương	2-5
Lá sả	3-5
Than hoạt tính	4-10
Dịch nền pha môi trường	30-70.

Các thành phần bao gồm rỉ đường, dịch chiết nấm men ở dạng chế phẩm lỏng, có bán trên thị trường, chế phẩm vi sinh vật gốc, dịch nền pha môi trường được sản xuất như sau:

Để sản xuất chế phẩm vi sinh vật gốc, các chủng giống gốc bao gồm *Bacillus subtilis, Pseudomonas alcaligenes, Bifidobacterium thermophilus, Clostridium pastenisium, Nirosomonas europaea, Saccharomyces cereviseae* và *Lactobacillus casei* trong bộ mẫu chuẩn được hoạt hóa trước khi cấy vào môi trường đặc hiệu cho từng chủng như sau:

Đối với *Bacillus subtilis*, môi trường nuôi cấy bao gồm dịch chiết đậu tương 50: g/l, tinh bột: 15g/l, $(NH_4)_2HPO_3$: 10g/l, KCl: 0,2 g/l và $MgSO_4.7H_2O$: 0,2g/l, nuôi cấy trong thời gian 3 ngày, thu được môi trường chứa chủng gốc hoạt hóa, mật độ đạt khoảng 10^7 CFU/ml.

Đối với *Pseudomonas alcaligenes*, môi trường nuôi cấy bao gồm NH_4NO_3: 2,5g/l, $Na_2HPO_4.2H_2O$: 1g/l, Napthalen: 0,64 g/l, $MgSO_4.7H_2O$: 0,5g/l, $(FeSO_4)_3.5H_2O$: 0,01g/l, $Co(NO_3)_2.6H_2O$: 5mg/l, $CaCl_2.2H_2O$; 1mg/l, KH_2PO_4: 0,5 mg/l, $MnS_4.2H_2O$: 0,1mg/l và $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$: 0,1mg/l, nuôi cấy trong thời gian 3 ngày, thu được môi trường chứa chủng gốc hoạt hóa, mật độ đạt khoảng 10^7 CFU/ml.

Đối với *Bifidobacterium thermophilus*, môi trường nuôi cấy bao gồm pepton: 10g/l, thiol: 8g/l, NaCl: 5g/l, dịch chiết nấm men: 5 g/l, glucoza: 1g/l và axit p-aminobenzoic (PABA): 0,05 g/l), nuôi cấy trong thời gian 3 ngày, thu được môi trường chứa chủng gốc hoạt hóa, mật độ đạt khoảng 10^7 CFU/ml.

Đối với *Clostridium pastenisium*, môi trường nuôi cấy bao gồm 20 mgKH_2PO_4: 1,65 g/l, NH_4Cl: 1 g/l, dịch chiết nấm men 0,6 g/l, Cystein: 0,5 g/l, $CaCl_2.6H_2O$: 0,118 g/l. KJ: 0,083 g/l và H_3BO_3:0,03 g/l, nuôi cấy trong thời gian 3 ngày, thu được môi trường chứa chủng gốc hoạt hóa, mật độ đạt khoảng 10^7 CFU/ml.

Đối với *Nirosomonas europaea*, môi trường nuôi cấy bao gồm $MnCl_2.4H_2O$: 0,2 g/l, $Na_2MoO_4.H_2O$, 0,1 g/l, $ZnSO_4.7H_2O$: 0,1 g/l, $CuSO_4.5H_2O$: 2mg/l và $CoCl_2.6H_2O$: 0,2mg/l, nuôi cấy trong thời gian 3 ngày, thu được môi trường chứa chủng gốc hoạt hóa, mật độ đạt khoảng 10^7 CFU/ml.

Đối với *Saccharomyces cereviseae,* môi trường nuôi cấy bao gồm $MgSO_4.7H_2O$: 3g/l, axit nitrilotriaxetic: 1,5 g/l, NaCl: 1g/l, $MnSO_4.2H_2O$: 0,5 g/l, $CoSO_4.7H_2O$: 0,18 g/l, $ZnSO_4.7H_2O$: 0,18 g/l, $CaCl_2.2H_2O$: 0,1 g/l, $FeSO_4.7H_2O$: 0,1 g/l, $NiCl_2.6H_2O$: 0,025 g/l, $Kal(SO_4)_2.12H_2O$: 0,02 g/l, $CuSO_4.5H_2O$: 0,01 g/l, H_3BO_3: 0,01 g/l, $NaMoO_4.2H_2O$: 0,01 g/l và $NaSeO_3.5H_2O$: 0,3 mg/l, nuôi cấy trong thời gian 3 ngày, thu được môi trường chứa chủng gốc hoạt hóa, mật độ đạt khoảng 10^7 CFU/ml.

Đối với *Lactobacillus casei*, môi trường nuôi cấy bao gồm glucoza: 40 g/l, natri axetat: 40 g/l, casein: 10 g/l, K_2HPO_4:1g/l, KH_2PO_4: 1 g/l, Asparagin: 0,6 g/l, cystein.HCl.H_2O: 0,5 g/l, $MgSO_4.7H_2O$: 0,4 g/l, tryptophan: 0,2 g/l, sorbitan: 0,1 g/l, $FeSO_4.7H_2O$: 0,02 g/l, NaCl: 0,02 g/l, xanthin: 0,02 g/l, $MnSO_4.7H_2O$: 0,015 g/l, adenin sulfat: 0,01 g/l, guanin.HCl: 0,01 g/l, uracil: 0,01 g/l, glutathion: 5 mg/l, pyridonin.HCl: 4 mg/l, aminobenzoic: 2mg/l và canxi pantothenat: 0,8 mg/l, nuôi cấy trong thời gian 3 ngày, thu được môi trường chứa chủng gốc hoạt hóa, mật độ đạt khoảng 10^7 CFU/ml.

Tiếp đó, để thu được chế phẩm vi sinh gốc, tiến hành tạo chế phẩm vi sinh gốc bằng cách bổ sung lần lượt 20% môi trường chứa *Lactobacillus casei* và 20% môi trường chứa *Pseudomonas alcaligenes* vào môi trường chứa *Saccharomyces cereviseae*, bổ sung 20% môi trường chứa *Bifidobacterium thermophilus* và 20% môi trường chứa *Clostridium pastenisium* vào môi trường chứa *Nitrosomonass europea* và để trong 2 giờ trong điều kiện khuấy đảo nhẹ để quần thể vi sinh vật thích ứng với nhau, không xảy ra sự cạnh tranh, tiêu diệt lẫn nhau. Tiếp đó, bổ sung từ từ 50% hai hỗn dịch này vào môi trường chứa *Bacillus subtilis* và tiếp đó bổ sung từ từ các môi

trường còn lại theo tỷ lệ cứ 1 giờ bổ sung được 20% cho đến hết, trong quá trình này có bổ sung dung dịch pepton và cao nấm men 10% theo tỷ lệ 20% tổng dung dịch được phối trộn thu được chế phẩm vi sinh gốc.

Dịch nền pha môi trường bao gồm casein, K_2HPO_4, asparagin, $MgSO_4.7H_2O$, tryptophan, sorbitan, NaCl, axit glutamic với nước theo tỷ lệ sau:

Thành phần	Nồng độ (%)
Casein	1
K_2HPO_4	0,1
Asparagin	0,6
$MgSO_4.7H_2O$	0,04
Tryptophan	0,02
Sorbitan	0,01
NaCl	0,02
Axit glutamic	0,5

Sau khi tạo ra dịch nền pha môi trường, chuẩn bị các thành phần bao gồm chế phẩm vi sinh gốc, rỉ đường, cám gạo, sau đó chuẩn bị các thành phần theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng như sau:

Chế phẩm vi sinh gốc	4-10
Rỉ đường	5-15
Cám gạo	3-10
Tinh bột	3-7
Chuối chín	5-10
Dịch chiết nấm men	1-5
Bột cây xuyến chi	2-5
Bột cây đỗ tương	2-5
Lá sả	3-5
Than hoạt tính	4-10
Dịch nền pha môi trường	30-70

Chuối chín được loại bỏ vỏ, xay mịn và lần lượt bổ sung rỉ đường, cám gạo, tinh bột, chuối chín, dịch chiết nấm men vào dịch nền pha môi trường và khuấy trộn đều. Tiếp đó bổ sung 10% chế phẩm vi sinh gốc và khuấy trộn trong 1 giờ trong điều kiện yếm khí. Việc bổ sung chế phẩm vi sinh này mục đích không để môi trường bổ sung bột cây xuyến chi và bột cây đỗ tương gây tạp nhiễm vi sinh vật khác.

Bổ sung bột cây xuyến chi và bột cây đỗ tương để thu được dung dịch bán thành phẩm. Phần chế phẩm vi sinh gốc còn lại được hấp phụ lên than hoạt tính bằng cách bổ

sung vào than hoạt tính để hấp phụ lên bề mặt của than hoạt tính, sau đó bổ sung vào dung dịch bán thành phẩm và ủ trong điều kiện yếm khí trong điều kiện nhiệt độ từ 20 đến 25°C trong khoảng từ 5 đến 7 ngày. Cuối cùng, bổ sung lá sả xay nhuyễn và ủ tiếp trong 1 ngày thu được chế phẩm vi sinh.

Chế phẩm vi sinh thu được có màu vàng sẫm, mùi thơm, pH khoảng từ 3,5 đến 5, hàm lượng vi sinh vật bao gồm *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes, Bifidobacterium thermophilus*, *Clostridium pastenisium, Nirosomonas europaea, Saccharomyces cereviseae* và *Lactobacillus casei* đạt khoảng từ 10^6 CFU/ml đến 10^7 CFU/ml với tỷ lệ tương đương.

Chế phẩm vi sinh thu được ở trên có thể bổ sung vi sinh vật bao gồm *Gluconobacter oxydans, Acetobacter aceti, Azotobacter salinestris, Rhizbium aegytiacum, Methylomonas methanica, Micrococcus flacvus, Streptococcus lactis, Leuconostoc mesenterioides, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus bulgaricus, Arthrobacter woluwensis, Achromobacter chlorophenolicus, Nitrospira moscoviensis và Sphaerotilus* sp với tỷ lệ từ 10^5 đến 10^6 CFU/ml. Quần thể vi sinh vật này có thể thu được từ chế phẩm EM gốc hoặc chế phẩm EM thứ cấp nhằm tăng cường hiệu quả xử lý chất thải hữu cơ.

Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm vi sinh theo sáng chế bao gồm các thành phần theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng như sau:

Chế phẩm vi sinh gốc	5
Rỉ đường	10
Cám gạo	5
Tinh bột	5
Chuối chín	10
Dịch chiết nấm men	3
Bột cây xuyến chi	2,5
Bột cây đỗ tương	2,5
Lá sả	2
Than hoạt tính	5
Dịch nền pha môi trường	50

Theo một phương án ưu tiên, chế phẩm vi sinh theo sáng chế còn được hấp thụ lên chất mang là zeolit, vỏ trấu hoặc mùn cưa hoặc hỗn hợp của chúng để dùng làm đệm lót sinh học trong chăn nuôi gia súc hoặc gia cầm.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh, để xử lý chất thải hữu cơ trong chăn nuôi, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) chuẩn bị chủng vi sinh thuần chủng; b) tạo chế phẩm vi sinh gốc; c) chuẩn bị môi trường pha chế; và d) thu chế phẩm vi sinh.

Trong bước chuẩn bị chủng vi sinh thuần chủng, bảy chủng vi sinh gốc từ mẫu vi sinh vật đông khô bao gồm *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes, Bifidobacterium thermophilus*, *Clostridium pastenisium, Nirosomonas europaea, Saccharomyces cereviseae* và *Lactobacillus casei* được hoạt hóa trên môi trường chuẩn cho đến khi đạt mật độ 10^7 CFU/ml. Các phương pháp hoạt hóa chủng vi sinh thuần chủng là đã biết hoặc được thực hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp chủng giống gốc.

Trong bước tạo chế phẩm vi sinh gốc, các môi trường chứa chủng giống gốc được chuẩn bị theo tỷ lệ tương đương, sau đó tiến hành thích nghi các chủng vi sinh bằng cách bổ sung lần lượt 20% môi trường chứa *Lactobacillus casei* và 20% môi trường chứa *Pseudomonas alcaligenes* vào môi trường chứa *Saccharomyces cereviseae*. Bổ sung 20% môi trường chứa *Bifidobacterium thermophilus* và 20% môi trường chứa *Clostridium pastenisium* vào môi trường chứa *Nitrosomonass europea*. Hai phức hợp này được để 2 giờ ở điều kiện nhiệt độ phòng có khuấy đảo nhẹ. Tiếp đó, bổ sung từ từ 50% hai hỗn dịch này vào môi trường chứa *Bacillus subtilis* để cho các chủng vi sinh thích ứng với nhau. Tiếp đó bổ sung từ từ các môi trường còn lại theo tỷ lệ cứ 1 giờ bổ sung được 20%, trong quá trình này có bổ sung dung dịch pepton và cao nấm men 10% theo tỷ lệ 20% tổng dung dịch được phối trộn thu được chế phẩm vi sinh gốc.

Trong bước chuẩn bị dịch nền pha môi trường, các thành phần bao gồm casein, K_2HPO_4, asparagin, $MgSO_4.7H_2O$, tryptophan, sorbitan, NaCl, axit glutamic được pha với nước để thu được dịch nền pha môi trường chứa là dung dịch chứa 1% casein, 1% K_2HPO_4, 0,6% asparagin, 0,04% $MgSO_4.7H_2O$, 0,02% tryptophan, 0,01% sorbitan, 0,02% NaCl và 0,5% axit glutamic1%.

Tiếp đó chuẩn bị các thành phần theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng như sau:

Chế phẩm vi sinh gốc	4-10
Rỉ đường	5-15
Cám gạo	3-10
Tinh bột	3-7
Chuối chín	5-10

Dịch chiết nấm men	1-5
Bột cây xuyến chi	2-5
Bột cây đỗ tương	2-5
Lá sả	3-5
Than hoạt tính	4-10
Dịch nền pha môi trường	30-70

Theo một phương án ưu tiên, các thành phần được chuẩn bị theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng sau:

Chế phẩm vi sinh gốc	5
Rỉ đường	10
Cám gạo	5
Tinh bột	5
Chuối chín	10
Dịch chiết nấm men	3
Bột cây xuyến chi	2,5
Bột cây đỗ tương	2,5
Lá sả	2
Than hoạt tính	5
Dịch nền pha môi trường	50.

Chuối chín được bỏ vỏ, xay mịn, tiếp đó lần lượt bổ sung rỉ đường, cám gạo, tinh bột, chuối chín, dịch chiết nấm men vào dịch nền pha môi trường và khuấy trộn đều. Tiếp đó bổ sung 10% chế phẩm vi sinh gốc và khuấy trộn trong 1 giờ trong điều kiện yếm khí. Sau khi vi sinh vật thích ứng với môi trường, bổ sung bột cây xuyến chi và bột cây đỗ tương và đảo trộn đều. Phần chế phẩm vi sinh gốc còn lại được hấp phụ lên than hoạt tính và bổ sung vào chế phẩm và ủ trong điều kiện yếm khí nhiệt độ từ 20 đến 25°C trong khoảng từ 5 đến 7 ngày. Tiiếp đó bổ sung lá sả xay nhuyễn và ủ tiếp trong 1 ngày thu được chế phẩm vi sinh.

Chế phẩm vi sinh thu được có màu vàng sẫm, mùi thơm, pH khoảng từ 3,5 đến 5, hàm lượng vi sinh vật bao gồm *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes, Bifidobacterium thermophilus*, *Clostridium pastenisium, Nirosomonas europaea, Saccharomyces cereviseae* và *Lactobacillus casei* đạt khoảng từ 10^6 CFU/ml đến 10^7 CFU/ml với tỷ lệ tương đương.

Chế phẩm vi sinh thu được ở trên có thể bổ sung vi sinh vật bao gồm *Gluconobacter oxydans, Acetobacter aceti, Azotobacter salinestris, Rhizbium aegytiacum, Methylomonas methanica, Micrococcus flacvus, Streptococcus lactis,*

Leuconostoc mesenterioides, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus bulgaricus, Arthrobacter woluwensis, Achromobacter chlorophenolicus, Nitrospira moscoviensis và Sphaerotilus sp với tỷ lệ từ 10^5 đến 10^6 CFU/ml trước khi sử dụng để tăng cường hiệu quả xử lý chất thải hữu cơ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất chế phẩm vi sinh

Bảy chủng vi sinh gốc được cung cấp bởi Trung tâm giống và bảo tồn nguồn gen vi sinh vật bao gồm *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes, Bifidobacterium thermophilus*, *Clostridium pastenisium, Nirosomonas europaea, Saccharomyces cereviseae* và *Lactobacillus casei* được hoạt hóa trên môi trường chuẩn của nhà cung cấp, mỗi chủng thu được 1 lít môi trường chứa chủng giống gốc.

Bổ sung 200 ml môi trường chứa *Lactobacillus casei* và 200 ml môi trường chứa *Pseudomonas alcaligenes* vào 1 lít môi trường chứa *Saccharomyces cereviseae*. Bổ sung 200ml môi trường chứa *Bifidobacterium thermophilus* và 200 môi trường chứa *Clostridium pastenisium* vào môi trường chứa *Nitrosomonass europea*. Hai phức hợp này được để 2 giờ ở điều kiện nhiệt độ phòng có khuấy đảo nhẹ. Tiếp đó, bổ sung từ từ 700 ml từng môi trường này vào hai hỗn dịch này vào 1 lít môi trường chứa *Bacillus subtilis* để cho các chủng vi sinh thích ứng với nhau. Tiếp đó bổ sung từ từ các môi trường còn lại theo tỷ lệ cứ 1 giờ bổ sung được 200ml. Trong quá trình này, bổ sung 1,4 lít dung dịch pepton và cao nấm men 10% (tỷ lệ pepton/cao nấm men là 1:1), thu được 8,4 lít chế phẩm vi sinh gốc.

Hòa 500g casein, 50g K_2HPO_4, 300g asparagin, 20g $MgSO_4.7H_2O$, 10g tryptophan, 5g sorbitan, 10g NaCl và 250g axit glutamic với 50 lít nước để thu được dịch nền pha môi trường.

Chuẩn bị các thành phần như sau:

Thành phần	Số lượng
Chế phẩm vi sinh gốc	5 lít
Rỉ đường	10 lít
Cám gạo	5 kg
Tinh bột	5 kg
Chuối chín	10 kg
Dịch chiết nấm men	3 lít
Bột cây xuyến chi	2,5 kg

Bột cây đỗ tương	2,5 kg
Lá sả	2 kg
Than hoạt tính	5 kg
Dịch nền pha môi trường	50 lít

Chuối chín được bỏ vỏ, xay mịn, tiếp đó lần lượt bổ sung rỉ đường, cám gạo, tinh bột, chuối chín, dịch chiết nấm men vào dịch nền pha môi trường và khuấy trộn đều. Tiếp đó bổ sung 0,5 lít chế phẩm vi sinh gốc và khuấy trộn trong 1 giờ trong điều kiện yếm khí. Sau khi vi sinh vật thích ứng với môi trường, bổ sung bột cây xuyến chi và bột cây đỗ tương và đảo trộn đều. Phần chế phẩm vi sinh gốc còn lại (4,5 lít) được trộn với than hoạt tính và bổ sung vào chế phẩm. Tiếp đó ủ chế phẩm trong điều kiện yếm khí nhiệt độ từ 25°C trong 7 ngày. Cuối cùng bổ sung lá sả xay nhuyễn và bổ sung thêm nước cho đủ 100 lít và ủ tiếp trong 1 ngày thu được chế phẩm vi sinh.

Ví dụ 2. Đánh giá tỷ lệ vi sinh trong chế phẩm vi sinh

Để đánh giá được khả năng phát triển và tỷ lệ của của các loài vi sinh vật có trong chế phẩm, tiến hành thử nghiệm chế phẩm vi sinh thu được từ Ví dụ 1 và 3 chế phẩm EM thứ cấp có bán trên thị trường, các mẫu được đánh số lần lượt là TN, CT1, CT2 và CT3 và pha loãng với nước cất với nồng độ 10^{-6} và cấy lên môi trường nuôi cấy đặc hiệu để xác định tỷ lệ thành phần vi sinh vật có trong chế phẩm. Tiến hành xác định đối với các loài tương đương có trong chế phẩm EM thương mại. Kết quả được thể hiện trong bảng sau (ở mức độ pha loãng 10^{-6}):

Loài vi khuẩn	TN (CFU/ml)	CT1 (CFU/ml)	CT2 (CFU/ml)	CT3 (CFU/ml)
Vi sinh vật phân giải tinh bột *(Bacillus)*	23	9	6	3
Vi sinh vật phân giải phosphat (*Pseudomonas)*	12	6	3	0
Vi sinh vật chuyển hóa axit hữu cơ (*Bifidobacterium)*	17	2	8	2
Vi sinh vật cố định nitơ (*Clostridium pastenisium)*	8	7	5	6
Vi khuẩn phân giải protein *(Nirosomonas)*	10	3	>40	7
Vi sinh vật lên men rượu *(Saccharomyces)*	7	0	5	0
Vi khuẩn sinh axit lactic *(Lactobacillus)*	30	25	10	>40

Kết quả cho thấy rằng, so với các chế phẩm khác, thành phần vi sinh vật hữu ích của chế phẩm theo sáng chế đồng đều, các chế phẩm khác tỷ lệ thành phần vi sinh vật không đồng đều và ưu thế thuộc về một số loài vi sinh vật ưu sinh, có khả năng phát triển, sử dụng nhiều nguồn nguyên liệu khác nhau và chủ yếu tập trung vào vi sinh vật sản sinh ra axit lactic. Do đó, có thể thấy rằng, thành phần của các chế phẩm vi sinh thương mại được thử nghiệm không đồng đều.

Ví dụ 3. Đánh giá khả năng bảo quản chế phẩm vi sinh

Để đánh giá khả năng bảo quản chế phẩm, các chế phẩm sử dụng như trong Ví dụ 2 được tiến hành bảo quản trong các can nhựa ở điều kiện mát, không có ánh nắng chiếu trực tiếp như điều kiện lưu kho. Thời gian bảo quản 4 tháng, chỉ tiêu đánh giá dựa trên hàm lượng vi sinh vật và chỉ số màu sắc, mùi vị cũng như xuất hiện tạp nhiễm (nấm trắng trên bề mặt). Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng sau:

Chỉ tiêu	TN	CT1	CT2	CT3
Tổng số vi sinh vật hữu ích	$1x10^6$	$2x10^5$	$8x10^4$	$9x10^4$
Tạp nhiễm	không	có	có	có
pH	4,2	5,2	5,4	5,8
Cảm quan	Nâu vàng, mùi thơm	Trắng đục, mùi khai	Trắng đục, mùi thối	Trắng đục, mùi thối

Kết quả trên cho thấy, chế phẩm theo sáng chế có khả năng giữ được chất lượng lâu hơn, hiệu quả bảo quản vượt trội so với các chế phẩm thương mại đối chứng. Các chế phẩm có trên thị trường có mùi khai, thối là do sinh vật phân hủy kỵ khí phát triển, khi đó chúng đàn áp sinh vật hữu ích và trở thành sinh vật ưu thế trong quần thể khiến quá trình trao đổi chất tạo ra các sản phẩm thứ cấp, sinh ra mùi.

Ví dụ 4. Thử nghiệm chế phẩm vi sinh trong xử lý chất thải hữu cơ

Để thử nghiệm khả năng xử lý chất thải hữu cơ, tiến hành thử nghiệm trên 5 chuồng lợn nuôi nhốt tập trung, mỗi chuồng nuôi 20 con lợn. Các công thức thử nghiệm bao gồm chế phẩm theo sáng chế và 3 chế phẩm EM thương mại như được sử dụng trong Ví dụ 2, ĐC không sử dụng chế phẩm. Các chế phẩm được hòa với nước sạch theo tỷ lệ 10% và sử dụng nước trong xịt rửa chuồng trại. Lượng nước thải của lợn và nước vệ sinh chuồng trại được thu gom về bể chứa, phân thải được ủ đống trong điều kiện kỵ khí bổ sung phần cặn của chế phẩm. Chỉ tiêu theo dõi bao gồm mùi, lượng ruồi muỗi, côn trùng, Kết quả thử nghiệm được thể hiện trong bảng sau:

Chỉ tiêu	TN	CT1	CT2	CT3	ĐC
Mùi	Giảm rõ rệt mùi khai và mùi thối	Có mùi khai, giảm mùi thối	Có mùi khai, giảm mùi thối	Có mùi khai, giảm mùi thối	Mùi khai, hôi thối
Côn trùng (con/chuồng)	10	20	25	17	>50
Phân ủ (sau 5 ngày)	Tơi xốp, không còn mùi	Tơi xốp, không còn mùi	Tơi xốp, không còn mùi	Tơi xốp, không còn mùi	Dính bết, mùi thối
Nước thải (sau 7 ngày)	Trong, cặn lắng ít	Trong, có cặn lắng	Trong, có cặn lắng	Trong, có cặn lắng	Đục, nhiều vẩn lơ lửng

Kết quả trên cho thấy, chế phẩm theo sáng chế có khả năng cải thiện được môi trường chăn nuôi tập trung. Việc giảm thiểu được lượng côn trùng, thời gian ủ phân cũng như mùi của chế phẩm cho thấy hiệu quả của chế phẩm sinh học trong việc phân giải các chất hữu cơ. Mặc dù không thể giảm được 100% lượng khí thải phát sinh trong quá trình nuôi, nhưng chế phẩm cho phép giữ được môi trường chuồng trại cũng như giảm thiểu được ô nhiễm do các chất thải hữu cơ trong quá trình chăn nuôi gây ra.

Việc sử dụng đệm lót sinh học bằng cách hấp thụ chế phẩm theo sáng chế lên vật mang là zeolit hoặc mùn cưa cho tác dụng tương tự. Phân ủ được sử dụng làm phân bón, tiến hành khảo nghiệm cho thấy hiệu quả tương đương với chế phẩm phân bón vi sinh được bổ sung N:P:K có trên thị trường.

Ví dụ 5. Thử nghiệm chế phẩm vi sinh trong ủ thức ăn bổ sung trong chăn nuôi

Để đánh giá khả năng ủ thức ăn chăn nuôi đối với chế phẩm vi sinh thu được từ Ví dụ 1, tiến hành thử nghiệm đối với các chế phẩm như đề cập trong Ví dụ 2, trong việc ủ chua thức ăn chăn nuôi là rau, củ dùng trong chăn nuôi lợn theo công thức ủ của Viện chăn nuôi sử dụng chế phẩm vi sinh thử nghiệm.

Chỉ tiêu	TN	CT1	CT2	CT3
Cảm quan của thức ăn ủ	Thơm, lên men đều	Thơm, lên men đều	Mùi chua, không đều	Mùi chua, không đều
Mức độ ưa thích (lợn ăn hết khẩu phần)	Ăn hết khẩu phần	Ăn hết khẩu phần	Bỏ 20% khẩu phần	Bỏ 10% khẩu phần
Chất lượng phân thải	Mềm, tạo khuôn, ít thối	Mềm, tạo khuôn, ít thối	Nát, thối	Nát, thối
Thể trạng lợn	Khỏe mạnh, hoạt bát	Khỏe mạnh, hoạt bát	Có biểu hiện ốm	Có biểu hiện ốm
Thể trọng so với ĐC	Tăng nhanh	Tăng nhanh	Tăng chậm	Tăng chậm

Kết quả trên cho thấy, chế phẩm theo sáng chế thích hợp sử dụng để lên men cho thức ăn bổ sung trong chăn nuôi. Chế phẩm vi sinh thương mại dễ bị hỏng nên quá trình ủ có thể gây hỏng thức ăn bổ sung cho lợn, ảnh hưởng đến kết quả chăn nuôi.

Ví dụ 5. Thử nghiệm chế phẩm vi sinh làm chế phẩm trừ bệnh hại trên cây

Để thử nghiệm khả năng ứng dụng chế phẩm vi sinh trong việc bón cho cây để phòng trừ các bệnh hại do nấm và vi khuẩn, giảm lượng phân bón hóa học sử dụng, tiến hành thử nghiệm với các chế phẩm như nêu trong Ví dụ 4 để tưới cho cây hoa màu:

Chỉ tiêu	TN	CT1	CT2	CT3	ĐC
Bệnh thối nhũn	Không	Có	Không	Không	Có
Bệnh vàng lá, xoăn lá	Không	Không	Không	Có	Có
Bệnh héo xanh do vi khuẩn	Không	Không	Có	Không	Có
Bệnh đốm lá	Không	Không	Không	Không	Có

Kết quả trên cho thấy, chế phẩm theo sáng chế có khả năng bảo vệ được cây trồng trước một số loại bệnh thông thường trên cây hoa màu, trong khi một số chế phẩm vi sinh thương mại, mặc dù bị ít hơn so với đối chứng không sử dụng chế phẩm vi sinh, nhưng vẫn bị bệnh hại. Chế phẩm vi sinh theo sáng chế chứng minh hiệu quả vượt trội trong việc trợ giúp cây trồng trong việc hạn chế bệnh hại do vi sinh vật gây ra trên cây trồng.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Bằng cách cải tiến cách thức phối trộn, dựa trên nguyên tắc giữ được tỷ lệ các vi sinh vật hữu ích đồng đều, sáng chế đã tạo ra được chế phẩm bao gồm ít nhất bảy loài vi khuẩn bao gồm *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes, Bifidobacterium thermophilus*, *Clostridium pastenisium, Nirosomonas europaea, Saccharomyces cereviseae* và *Lactobacillus casei* với tỷ lệ tương đương tạo nên chế phẩm vi sinh hữu ích có khả năng phân giải các chất thải hữu cơ trong chăn nuôi.

Bằng cách sử dụng các thành phần vừa mang tác dụng như giá thể vừa có tác dụng hấp thụ các chất tạo ra trong quá trình trao đổi chất, chế phẩm theo sáng chế có thời gian bảo quản kéo dài, vẫn giữ được tỷ lệ các vi sinh vật hữu ích, chế phẩm hữu ích sử dụng để phân giải các chất hữu cơ, xử lý chuồng trại chăn nuôi, ủ thức ăn bổ sung cũng như sử dụng làm chế phẩm trừ bệnh hại trên cây trồng giúp góp phần trong việc hỗ trợ nền nông nghiệp phát triển bền vững.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vi sinh để xử lý chất thải hữu cơ trong chăn nuôi bao gồm các thành phần theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng như sau:

Chế phẩm vi sinh gốc	4-10
Rỉ đường	5-15
Cám gạo	3-10
Tinh bột	3-7
Chuối chín	5-10
Dịch chiết nấm men	1-5
Bột cây xuyến chi	2-5
Bột cây đỗ tương	2-5
Lá sả	3-5
Than hoạt tính	4-10
Dịch nền pha môi trường	30-70,

khác biệt ở chỗ:

- chế phẩm vi sinh gốc bao gồm ít nhất bảy loài vi khuẩn bao gồm *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas alcaligenes, Bifidobacterium thermophilus*, *Clostridium pastenisium, Nirosomonas europaea, Saccharomyces cereviseae* và *Lactobacillus casei* với nồng độ mỗi loài từ 10^6 đến 10^7 CFU/ml;
- tổng trọng lượng của bột cây xuyến chi và bột cây đỗ tương/trọng lượng chế phẩm vi sinh gốc là 1/1, tỷ lệ than hoạt tính/chế phẩm vi sinh gốc là là 1/1; và
- dịch nền pha môi trường là dung dịch chứa 1% casein, 0,1% K_2HPO_4, 0,6% asparagin, 0,04% $MgSO_4.7H_2O$, 0,02% tryptophan, 0,01% sorbitan, 0,02% NaCl và 0,5% axit glutamic.

2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm vi sinh vật gốc còn chứa các loài *Gluconobacter oxydans, Acetobacter aceti, Azotobacter salinestris, Rhizbium aegytiacum, Methylomonas methanica, Micrococcus flacvus, Streptococcus lactis, Leuconostoc mesenterioides, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus bulgaricus, Arthrobacter woluwensis, Achromobacter chlorophenolicus, Nitrospira moscoviensis và Sphaerotilus* sp với tỷ lệ từ 10^5 đến 10^6 CFU/ml.

3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm này bao gồm các thành phần theo tỷ lệ phần trăm trọng lượng như sau:

Chế phẩm vi sinh gốc	5
Rỉ đường	10
Cám gạo	5
Tinh bột	5
Chuối chín	10
Dịch chiết nấm men	3
Bột cây xuyến chi	2,5
Bột cây đỗ tương	2,5
Lá sả	2
Than hoạt tính	5
Dịch nền pha môi trường	50.

4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm vi sinh gốc được hấp thụ lên than hoạt tính trước khi phối trộn với các thành phần còn lại.

5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó chế phẩm này được còn được hấp thụ lên chất mang là zeolit, vỏ trấu hoặc mùn cưa hoặc hỗn hợp của chúng để dùng làm đệm lót sinh học trong chăn nuôi gia súc hoặc gia cầm.