

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ "КИЇВСЬКИЙ АВІАЦІЙНИЙ ІНСТИТУТ"  
ФАКУЛЬТЕТ НАУК ПРО ЗДОРОВ'Я  
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ  
Завідувач випускової кафедри  
\_\_\_\_\_Олексій БОЛДИРСЬВ  
«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
**(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)**

ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ «МАГІСТР»  
ЗІ СПЕЦІАЛЬНОСТІ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»  
ОСВІТНЬО-ПРОФЕСІЙНА ПРОГРАМА «ЕКОЛОГІЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА  
БІОЕНЕРГЕТИКА»

**Тема: «БІОДЕСТРУКЦІЯ ОРГАНІЧНИХ ВІДХОДІВ ВОДЕНЬ  
ПРОДУКУЮЧИМИ БАКТЕРІЯМИ РОДІВ *CLOSTRIDIUM* І  
*BACILLUS*»**

Виконавець: студент, гр. М-162-24-2-ЕТ

Іван РУДНИЦЬКИЙ

Керівник: к.т.н., доцент кафедри біотехнології

Ірина КОРНІЄНКО

Консультант розділу «Охорона праці»

Олександр ВАЛЬЧЕНКО

Консультант розділу «Охорона навколишнього середовища»

Лариса ЧЕРНЯК

Нормоконтролер

Олена КУЗНЄЦОВА

Київ 2025

ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ "КИЇВСЬКИЙ АВІАЦІЙНИЙ ІНСТИТУТ"

Факультет наук про здоров'я

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач випускової кафедри

\_\_\_\_\_ Олексій БОЛДИРСЬ

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ**

**на виконання дипломної роботи**

**Рудницького Івана Ігоровича**

1. Тема дипломної роботи: «Біодеструкція органічних відходів водень продукуючими бактеріями родів *Clostridium* і *Bacillus*» затверджена наказом президентки від «29» серпня 2025 р. №122/од.

2. Термін виконання роботи: «29» серпня 2025 р. по «26» грудня 2025 р.

3. власні експериментальні дані, зроблені на кафедрі біотехнології ФНЗ КАІ та Інституту рибного господарства НААН України, літературні джерела.

4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА. ВИСНОВКИ. СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.

5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 11 таблиць, 6 рисунків.

## 6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Вибір теми кваліфікаційної роботи, та його узгодження з керівником.	29.08.2025	
2	Проведення огляду літератури та збір необхідної інформації за темою кваліфікаційної роботи.	07.08.2025	
3	Ознайомлення з методикою організації експериментального дослідження на кафедрі біотехнології ФНЗ КАІ	25.08.2024	
4	Проведення експериментального дослідження на кафедрі біотехнології ФНЗ КАІ	01.09.2025	
5	Аналіз та обробка отриманих даних.	15.10.2025	
6	Оформлення практичної частини кваліфікаційної роботи на основі отриманих результатів.	10.11.2025	
7	Формулювання висновків до розділів дипломної роботи.	27.11.2025	
8	Перевірка кваліфікаційної роботи керівником.	01.12.2025	
9	Проведення попереднього захисту дипломної роботи.	12.12.2025	
10	Захист дипломної роботи	26.12.2025	

## 7. Консультація з окремого(мих) розділу(ів):

Назва розділу	Консультант (посада, П.І.Б.)	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Вальченко О. І.	10.11.2025	
Охорона навколишнього середовища	Черняк Л. М.	20.11.2025	

8. Дата видачі завдання: «29» серпня 2025 р.

Керівник дипломної роботи \_\_\_\_\_ Корнієнко І. М.  
(підпис керівника)

Завдання прийняв до виконання \_\_\_\_\_ Рудницький І.І.  
(підпис керівника)

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи: «Біодеструкція органічних відходів водень продукуючими бактеріями родів *Clostridium* і *Bacillus*»: 125 сторінка, 6 рисунків, 11 таблиць, 139 літературних джерел.

**Мета роботи.** Розробити та обґрунтувати технологію біологічної переробки органічних відходів із застосуванням принципів циркулярної економіки, оцінити можливість підвищення енергоефективності процесів та зменшення екологічного навантаження.

**Об'єкт дослідження.** Процеси біоконверсії органічних відходів з використанням мікроорганізмів-продуцентів біоводню.

**Предмет дослідження.** Оцінка якісних показників переробки органічних відходів.

**Методи дослідження.** Аналітичні методи досліджень.

У кваліфікаційній роботі розглянуто біотехнологічні методи переробки органічних відходів у контексті принципів циркулярної економіки. Проаналізовано склад сировини, досліджено властивості та активність мікроорганізмів *Bacillus subtilis* і *Clostridium butyricum*, а також оцінено їхній внесок у процеси гідролізу та темної ферментації. Вивчено вплив технологічних параметрів і стимуляторів метаболізму на ефективність біоконверсії. На основі отриманих результатів розроблено практичні рекомендації щодо підвищення екологічної та енергетичної ефективності технології та безпечного використання продуктів біодеструкції.

ОРГАНІЧНІ ВІДХОДИ, БІОКОНВЕРСІЯ, ЦИРКУЛЯРНА ЕКОНОМІКА, CLOSTRIDIUM, BACILLUS, БІОВОДЕНЬ, ТЕМНОВА ФЕРМЕНТАЦІЯ, СТИМУЛЯТОРИ РОСТУ, АНАЕРОБНІ ПРОЦЕСИ, ЕКОЛОГІЧНА БЕЗПЕКА.

## ЗМІСТ

Стор.

<b>ВСТУП</b> .....	<b>8</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД</b> .....	<b>11</b>
1.1. Наукові положення в області біоконверсії органічних відходів .....	11
1.2. Характеристика відходів та принципів їх переробки в Україні та країнах ЄС .....	12
1.3. Роль бактерій родів <i>Clostridium</i> та <i>Bacillus</i> в біодеструкції відходів .....	14
1.4. Енергоефективність біоводневих технологій .....	16
1.5. Перспективні біотехнології переробки органічних відходів .....	17
1.6. Наукові положення в області культивування <i>Clostridium</i> і <i>Bacillus</i> в практиці отримання біоводню .....	19
1.6.1. Роль стимуляторів росту та поживних речовин (вітамінів та іонів металів) ..	19
1.6.2. Збільшення виходу водню: умови експлуатації .....	21
1.6.3. Критичні параметри процесу .....	22
1.6.4. Технологічні методи підготовки насінневого матеріалу .....	24
1.6.5. Етапи біоконверсії відходів та утворення $H_2$ .....	25
1.7. Характеристика стимуляторів росту біомаси .....	26
Висновки до розділу 1 .....	29
<b>РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ ВОДЕНЬСИНТЕЗУЮЧИХ БАКТЕРІЙ РОДІВ <i>BACILLUS</i> ТА <i>CLOSTRIDIUM</i></b> .....	<b>31</b>
2.1. Воденьсинтезуючі мікроорганізми .....	31
2.1.1. Класифікація мікроорганізмів, що виробляють водень .....	31
2.2. Морфолого-культуральні ознаки бактерій родів <i>Bacillus</i> та <i>Clostridium</i> .....	32
2.3. Таксономія <i>Bacillus</i> та <i>Clostridium</i> .....	36
2.4. Органічні відходи як субстрати для мікробної конверсії .....	37
2.4.1. Класифікація органічних відходів .....	37
2.4.2. Хімічний склад та біодоступність .....	39

2.4.3.	Показники токсичності та інгібіруючі фактори .....	42
2.5.	Біодеструкція органічних субстратів .....	45
2.5.1.	Основні біохімічні шляхи розкладання органічних сполук .....	45
2.5.2.	Ферментативні системи деструкторів .....	47
2.5.3.	Вплив умов навколишнього середовища на швидкість біодеструкції .....	49
2.5.4.	Механізми біологічного синтезу водню .....	52
2.6.	Обґрунтування вибору стимулятора .....	54
2.7.	Наукове обґрунтування результатів досліджень щодо виходу біоводню в результаті культивування бактерій родів <i>Bacillus subtilis</i> та <i>Clostridium butyricum</i> .	56
2.7.1.	Вихід водню на складних субстратах рослинних відходів .....	57
2.7.2.	Роль спільного культивування з <i>Bacillus subtilis</i> .....	57
2.7.3.	Ферментативні механізми та синергія у спільному культивуванні .....	58
2.7.4.	Роль поглинання кисню та анаеробіозу .....	59
2.7.5.	Вплив прийому добавок вітаміну В <sub>1</sub> (тіаміну) .....	60
2.7.6.	Порівняння літературних даних з експериментальними результатами .....	61
	Висновки до розділу 2 .....	62
	<b>РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА .....</b>	<b>64</b>
3.1.	Особливості біоконверсії органічних відходів у водень .....	64
3.1.1.	Темнове ферментативне зброджування .....	64
3.1.2.	Обмеження, можливості оптимізації та теоретичні міркування .....	67
3.2.	Схема біоконверсії відходів в умовах отримання біоводню .....	70
3.3.	Розробка удосконаленої технології отримання біоводню на основі органічних відходів .....	74
3.4.	Конструктивні особливості апаратів для ферментації відходів в біогазових технологіях .....	81
	Висновки до розділу 3 .....	85
	<b>РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ .....</b>	<b>86</b>
4.1.	Аналіз умов праці .....	86
4.1.1.	Організація робочого місця .....	86
4.1.2.	Шкідливі та небезпечні фактори (основні небезпеки) .....	87

4.1.2.1. Біологічні небезпеки .....	88
4.1.2.2. Вибухо- та пожежонебезпека .....	89
4.1.2.3. Шкідливі речовини в повітрі робочої зони.....	89
4.1.2.4. Електробезпека.....	90
4.1.2.5. Мікроклімат (теплові та екологічні умови) .....	91
4.1.2.6. Промисловий шум та вібрація.....	91
4.1.3. Фактори тяжкості та напруження роботи.....	92
4.2. Розробка заходів безпеки.....	93
4.2.1. Ключові заходи щодо забезпечення біологічної безпеки .....	93
4.2.2. Заходи щодо пожежо- та вибухозахисту .....	93
4.2.3. Забезпечення електробезпеки.....	94
4.2.4. Ергономіка, технічна естетика та організація робочого місця.....	94
4.3. Пожежна безпека .....	95
4.3.1. Визначення категорії приміщення за вибухо- та пожежонебезпекою .....	96
4.3.2. Вибір засобів пожежогасіння .....	97
4.4. Розрахунки (вимоги до вентиляції).....	97
Висновки до розділу 4.....	98
<b>РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА .....</b>	<b>100</b>
5.1. Проблема захоронення органічних відходів як джерело кліматичної небезпеки .....	100
5.2. Визначення та характеристика впливу технології біодеструкції на компоненти навколишнього середовища .....	101
5.2.1. Характеристика найбільш значного впливу: викиди, що впливають на клімат, та забруднення води .....	102
5.3. Нормативні та правові вимоги до кінцевої продукції.....	103
5.3.1. Наслідки неконтрольованого управління викидами газів.....	103
5.3.2. Правові та екологічні наслідки невідповідності дигестату стандартам якості.....	103
5.4. Заходи та рекомендації щодо зменшення негативного впливу .....	104

5.4.1. Технологічні рекомендації на основі експериментальної оптимізації (вітамін B1).....	105
5.4.2. Рекомендації щодо управління газовими та фізичними викидами .....	106
5.4.3. Рекомендації щодо обробки дигестату (відповідність нормативно-правовій базі).....	106
Висновки до розділу 5.....	108
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>109</b>
<b>СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .</b>	<b>111</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

ТПВ – Тверді побутові відходи.

ОФТПВ – Органічна фракція твердих побутових відходів.

ЛЖК – Леткі жирні кислоти.

ХСК – Хімічне споживання кисню.

БСК – Біологічне споживання кисню.

ПГ – Парникові гази.

ШОУ – Швидкість органічного навантаження.

ГЧУ (або НРТ) – Гідравлічний час утримування.

ОВП – Окисно-відновний потенціал.

МПБ – М'ясо-пептонний бульйон.

ДСТУ – Державний стандарт України.

ЗІЗ – Засоби індивідуального захисту.

НМВ (або НПВ) – Нижня межа вибухонебезпечності.

ГДВ – Гранично допустимі викиди.

ГДК – Гранично допустима концентрація.

ПЗВ – Пристрій захисного відключення.

АТФ – Аденозинтрифосфат.

МКБ – Молочнокислі бактерії.

CSTR – Реактор безперервної дії з перемішуванням (Continuous Stirred-Tank Reactor).

UASB – Реактор з висхідним анаеробним шламним шаром (Upflow Anaerobic Sludge Blanket).

TAN – Загальний аміачний азот (Total Ammonia Nitrogen).

## ВСТУП

### **Актуальність теми.**

Актуальність даної роботи зумовлена зростаючими обсягами органічних відходів та необхідністю переходу до екологічно безпечних технологій їх переробки. Традиційні методи утилізації, зокрема захоронення та спалювання, призводять до значних викидів парникових газів, втрати цінних ресурсів і погіршення стану довкілля. Застосування принципів циркулярної економіки вимагає впровадження технологій, що забезпечують повторне використання матеріалів та відновлення енергетичного потенціалу відходів.

Біотехнологічні методи переробки, зокрема темнове ферментативне зброджування із залученням мікроорганізмів *Bacillus subtilis* та *Clostridium butyricum*, відкривають можливості отримання екологічно чистого біоводню та стабільних органічних добрив. Це формує науково й практично значущий напрям, що сприяє зменшенню навантаження на полігони, скороченню викидів парникових газів і підвищенню ефективності систем поводження з відходами. Саме тому дослідження біоконверсії органічних відходів із використанням біологічних агентів набуває особливої актуальності в умовах сучасних екологічних і енергетичних викликів.

**Мета роботи:** Розробити та обґрунтувати технологію біологічної переробки органічних відходів із застосуванням принципів циркулярної економіки.

### **Завдання роботи:**

1. Аналіз науково-технічної літератури з питань біоконверсії органічних відходів, що застосовуються у сфері циркулярної економіки.
2. Вивчення особливостей культивування та потреб продуцентів біоводню - бактерій родів *Bacillus* і *Clostridium*.
3. Розробка технології біоконверсії органічних відходів з використанням бактерій родів *Bacillus* і *Clostridium*. Проаналізувати умови праці та визначити небезпечні й

4. Аналіз шкідливих виробничих факторів, розробка заходи щодо забезпечення біологічної, хімічної, вибухопожежної та електробезпеки у процесах біоконверсії.

5. Оцінка екологічного впливу застосуванням технології біодеструкції органічних відходів, визначити потенційні наслідки та розробити рекомендації щодо зменшення негативного впливу на навколишнє середовище.

**Об'єкт дослідження:** Процеси біоконверсії органічних відходів з використанням продуцентів біоводню – бактерій родів *Bacillus* і *Clostridium*.

**Предмет дослідження:** Оцінка оптимальних параметрів біоконверсії органічних відходів бактеріями родів *Clostridium* та *Bacillus*.

**Методи дослідження:** аналітичні, порівняльні.

### **Наукова новизна**

Наукова новизна дипломної роботи полягає у вдосконаленні біотехнологічного підходу до переробки органічних відходів із урахуванням принципів циркулярної економіки.

Додатково обґрунтовано екологічні переваги запропонованої технології, зокрема щодо зменшення обсягів відходів, що підлягають захороненню, та потенційного скорочення викидів парникових газів.

### **Практична цінність**

Практична цінність даної роботи полягає у розробці та науковому обґрунтуванні технологічних рішень, що дозволяють підвищити ефективність переробки органічних відходів у відповідності до принципів циркулярної економіки. Отримані результати можуть бути використані для проектування та оптимізації малогабаритних або промислових біотехнологічних установок, орієнтованих на одержання біоводню та стабільних органічних добрив із побутових та харчових відходів.

Запропонована комбінація мікроорганізмів *Bacillus subtilis* та *Clostridium butyricum* забезпечує підвищений рівень біодеструкції та покращення виходу цінних продуктів ферментації, що створює підґрунтя для застосування отриманих результатів у практичних системах утилізації відходів.

Рекомендації щодо екологічно безпечного поводження з дигестатом можуть бути застосовані у комунальних підприємствах, аграрному секторі або біогазових комплексах для забезпечення відповідності національним та європейським екологічним вимогам. Реалізація запропонованих підходів сприяє зменшенню навантаження на полігони ТПВ, зниженню обсягів парникових газів та підвищенню матеріальної та енергетичної ефективності систем управління відходами.

# РОЗДІЛ 1

## ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### 1.1. Наукові положення в області біоконверсії органічних відходів

Глобальна проблема управління відходами нерозривно пов'язана з необхідністю сталого використання ресурсів. Традиційні лінійні економічні моделі, що характеризуються парадигмою «взяти-виготовити-утилізувати», виявляються екологічно та економічно нежиттєздатними. У відповідь відбувається зсув парадигми в бік циркулярної біоекономіки, яка прагне перетворити відходи на цінні ресурси, а не розглядати їх як тягар [1]. Ця трансформація сприяє біоконверсії, також відомої як біотрансформація, процесу, який використовує біологічні агенти та процеси, такі як мікроорганізми, ферменти, для перетворення органічних матеріалів на корисні продукти або джерела енергії [2]. Основним науковим та економічним принципом біоконверсії є «утилізація відходів», метою якої є отримання цінності з матеріалів, які в іншому випадку були б викинуті. Цей підхід вирізняється низьким споживанням енергії, м'якими умовами експлуатації та мінімальним утворенням вторинних відходів, що робить його наріжним каменем сучасних стратегій сталого розвитку [1].

Процеси біоконверсії не є універсально застосовними; їхня ефективність та вихідний результат фундаментально визначаються хімічним складом вхідного матеріалу або сировини. Різноманітність потоків органічних відходів вимагає індивідуальних та специфічних стратегій біоконверсії. Тому повне розуміння властивостей сировини є першим і найважливішим кроком у розробці ефективної системи біоконверсії.

Наукова основа біоконверсії базується на комплексі різноманітних, але часто взаємопов'язаних біологічних процесів. Ці методи загалом класифікуються залежно від наявності або відсутності кисню, причому кожен шлях пропонує унікальні переваги та дає окремі продукти.

Анаеробне розкладання – це висококонтрольований багатоетапний процес, у якому складна органічна речовина розкладається консорціумом мікроорганізмів за відсутності кисню [2]. Цей процес, також відомий як біометанізація, є наріжним каменем ініціатив з перетворення відходів на енергію.

Компостування – це біологічне розкладання органічної речовини в контрольованих аеробних умовах [3, 4]. На відміну від неконтрольованого процесу природного гниття, компостування вимагає ретельного управління ключовими параметрами навколишнього середовища для отримання стабільного, цінного кінцевого продукту.

Ферментація – це універсальний метод біоконверсії, який можна адаптувати для виробництва широкого спектру продуктів, від біопалива до ферментів та продуктів тонкого хімічного синтезу.

Головною метою біоконверсії є не просто утилізація відходів, а перетворення їх на цінні, комерційно вигідні продукти. Ці результати можна розділити на три основні потоки створення вартості: біоенергія, сільськогосподарські добавки та промислові хімікати.

## **1.2. Характеристика відходів та принципів їх переробки в Україні та країнах ЄС**

Відходи – це зростаюча глобальна проблема, оскільки щорічно у світі викидається понад 1,3 мільярда тонн. Однак біотехнології пропонують перспективні шляхи перетворення цього зобов'язання на актив. Завдяки інноваційним мікробним та ферментативним процесам те, що колись викидалося як відходи, може стати цінним товаром, включаючи органічні кислоти, натуральні ароматизатори та відновлювану енергію. Такий підхід до утилізації харчових відходів являє собою зміну парадигми в управлінні відходами, узгоджуючи це з принципами циркулярної економіки, водночас вирішуючи нагальні екологічні проблеми.

Поводження з органічними відходами перетворилося з проблеми муніципальної санітарії на критичний компонент глобальної кліматичної та ресурсної стратегії. Коли органічні відходи розкладаються на звалищах, вони утворюють метан,

парниковий газ, значно потужніший за вуглекислий газ [5, 6]. У відповідь Європейський Союз створив надійну, політично обумовлену систему, що базується на Рамковій директиві про відходи, яка встановлює амбітні, юридично обов'язкові цілі щодо переробки та перенаправлення відходів на звалища [7, 8]. Незважаючи на це, їх впровадження залишається складним завданням, зі значними прогалинами в інфраструктурі роздільного збору та помітною розбіжністю між політичними прагненнями та реальністю на місцях.

ЄС поставив перед своїми державами-членами низку амбітних, кількісно вимірюваних цілей. У наступній таблиці 1.1 наведено ключові кількісні цілі ЄС, які слугують критичним орієнтиром для оцінки прогресу та виявлення недоліків.

Таблиця 1.1

Цілі ЄС щодо управління відходами та їх переробки [7, 8, 9]

Тип цілі	Кінцевий термін	Вимога
Переробка побутових відходів	До 2025 року	Мінімум 55% за вагою
	До 2030 року	Мінімум 60% за вагою
	До 2035 року	Мінімум 65% за вагою
Звалище побутових відходів	До 2035 року	Максимум 10% від загальної кількості побутових відходів
Переробка біовідходів	Поточний стан	17% твердих побутових відходів

На противагу цьому, система управління відходами в Україні історично характеризувалася переважною залежністю від невідповідних сміттєзвалищ з мінімальним рівнем переробки [10]. Однак ця ситуація зазнає монументальних змін. Новий Закон «Про управління відходами», який набрав чинності в липні 2023 року, є основоположним законодавчим кроком до створення комплексної системи, узгодженої з ЄС [11].

До нещодавніх законодавчих реформ система управління відходами в Україні характеризувалася глибокою відсутністю сучасної інфраструктури та переважною

залежністю від застарілих практик. Вражаючою реальністю є те, що понад 90% побутових відходів України наразі потрапляє на звалища [10]. Це різко контрастує з метою ЄС обмежити захоронення відходів лише 10% до 2035 року [8]. Відходи країни захоронюються на понад 6000 звалищах та місцях утилізації, багато з яких працюють незаконно, переповнені та не відповідають сучасним екологічним стандартам [10]. Грибовицьке звалище у Львівській області є яскравим прикладом екологічної небезпеки, оскільки у 2016 році там стався смертельний зсув, спричинений відходами [12]. Результатом цієї системи є надзвичайно низький рівень переробки: в Україні переробляється лише 7% відходів порівняно з понад 40% у середньому по ЄС [10].

### 1.3. Роль бактерій родів *Clostridium* та *Bacillus* в біодеструкції відходів

*Bacillus subtilis* є плідним виробником промислових ферментів ( $\alpha$ -амілази, ксиланази, целюлази, ліпази, протеази, пектинази тощо), що дозволяє їй гідролізувати широкий спектр субстратів [13]. У ґрунті та компості ці бактерії секретують амілази (крохмаль  $\rightarrow$  цукри), протеази/желатинази (білки  $\rightarrow$  пептиди/амінокислоти), ліпази (тригліцериди  $\rightarrow$  гліцерин + жирні кислоти) та, в деяких штаммах, целюлази (целюлоза  $\rightarrow$  целобіоза/глюкоза) [14]. Оптимальне виробництво ферментів було зареєстровано за помірних умов (наприклад, найвищий рівень амілази при  $\sim 37^\circ\text{C}$ , рН 7–9; желатиназа/ліпаза при  $\sim 37^\circ\text{C}$ , рН 5–9) [15]. На практиці *Bacillus* розкладає багаті на крохмаль відходи (наприклад, харчові залишки) за допомогою амілаз, білкові відходи – протеазами, а багаті на ліпіди – ліпазами.

Клостридії – це облігатні анаероби (грампозитивні, ендоспороутворювачі), які чудово розкладають полімери в безкисневому середовищі, такому як звалища та біореактори. Багато видів *Clostridium* мають високу целюлозолітичну активність [16, 17]. Інші секретують ендоглюканази та  $\beta$ -глюкозидази для досягнення подібного розщеплення. Фактично, целюлозні відходи в анаеробних біореакторах значною мірою перетворюються *Clostridium* разом з целюломонадами [17]. Коли целюлази розщеплюють целюлозу на целюлобіозу та глюкозу, *Clostridium* ферментують ці цукри шляхом гліколізу на органічні кислоти (ацетат, бутират, капроат тощо), спирти

(етанол, бутанол), CO<sub>2</sub> та H<sub>2</sub> [16]. У змішаних відходах багаті на пептиди фракції обробляються протеолітичними клостридіями: багато видів ферментують амінокислоти (за допомогою реакцій Стікленда) до ацетату, бутирату, NH<sub>3</sub> та H<sub>2</sub> [16]. Довголанцюгові жирні кислоти (з ліпідів) окислюються синтрофно деякими клостридіями (спільно з метаногенами) до ацетату та водню, які метаногени потім перетворюють на CH<sub>4</sub>. Загалом, клостридії забезпечують гідролітичну/ацидогенну та ацетогенну фази анаеробного розщеплення: вони розщеплюють полісахариди, білки та жири на ЛЖК, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> та спирти [16, 17].

У складних системах утилізації відходів *Bacillus* та *Clostridium* часто співіснують та взаємодіють. Однією з ключових синергій є видалення кисню: аеробні/факультативні *Bacillus* поглинають залишковий O<sub>2</sub> у реакторах або компості, створюючи суворо анаеробні ніші для *Clostridium* [18]. Наприклад, спільне культивування *Clostridium* з аеробним штамом (таким як *Bacillus*) усуває необхідність промивання інертним газом, оскільки *Bacillus* споживатиме кисень, що дозволить *Clostridium* процвітати [18]. Крім того, *Bacillus* постачає *Clostridium* простіші субстрати шляхом позаклітинного гідролізу.

З огляду на їхні метаболічні можливості, *Bacillus* та *Clostridium* широко використовуються для обробки відходів

Деякі схеми переробки відходів ізолюють клостридії для виробництва H<sub>2</sub> з біомаси (наприклад, *C. butyricum* з фруктових відходів). *Bacillus* може допомогти, забезпечуючи гідролази та видалення кисню, як зазначено вище [19]. Аналогічно, клостридії, що подовжують ланцюг, перетворюють ацетат + етанол на вищі жирні кислоти або попередники біопалива; спільне культивування з іншими бактеріями (включаючи *Bacillus*) може посилити цей процес.

Таким чином, *Bacillus* та *Clostridium* відіграють взаємодоповнюючі ролі в біорозкладі органічних відходів. Види *Bacillus* процвітають в аеробних або факультативно-анаеробних умовах, виділяючи широкий спектр гідролітичних ферментів, які розкладають полімери на мономери [13, 14]. Потім види *Clostridium* ферментують ці мономери в анаеробних фазах, утворюючи органічні кислоти, спирти та гази [16, 17]. Їхні синергетичні взаємодії (поглинання кисню *Bacillus*, обмін

ферментами, передача субстрату) та гнучкі метаболізми роблять їх безцінними в компостних купах, біорозкладі на звалищах, анаеробних дигесторах та інших системах перетворення відходів на ресурси.

#### **1.4. Енергоефективність біоводневих технологій**

Біоводень – це екологічно чистий, відновлюваний вид біопалива з високою енергетичною щільністю [20], що дозволяє розглядати його в майбутньому як альтернативу викопному паливу.

Водень став ключовим компонентом глобального енергетичного переходу. Зелений та біоводень привертають дедалі більшу увагу, але їхня порівняльна промислова доцільність залишається недостатньо вивченою.

Попит на енергію зріс через швидке зростання населення, прискорену урбанізацію та глобальне економічне зростання. За даними Енергетичного інституту [20], споживання первинної енергії зросло на 2% порівняно з рівнем 2023 року, а викопне паливо, включаючи вугілля, нафту та природний газ, становить 82% енергетичного балансу. Однак залежність від викопного палива є однією з найактуальніших глобальних проблем. По-перше, доступність викопного палива обмежена, невідновлювана та нерівномірна в різних країнах. Крім того, використання викопного палива впливає на навколишнє середовище, включаючи викиди парникових газів (ПГ), які значною мірою сприяють глобальному потеплінню. Глобальні викиди вуглекислого газу, пов'язані з енергетикою, досягли 40 Гт CO<sub>2</sub> у 2023 році [20].

У цьому контексті водень розглядається як ключовий товар для успішного енергетичного переходу завдяки його подвійній функції як енергоносія та як хімічної сировини. Важливо, що водень сам по собі не є відновлюваним джерелом енергії, а виконує функцію зберігання, перетворення та транспортування енергії з різних джерел. Більше того, водень є центром хімічної промисловості як фундаментальна сировина для виробництва сполук, що мають вирішальне значення для сучасного світу, таких як аміак, метанол, формальдегід та різні вуглеводні.

Незважаючи на свою вирішальну роль в еру енергетичного переходу, більша частина водню наразі виробляється з викопних джерел. Згідно з «Проривним планом на 2024 рік» MEA, IRENA та ООН зі зміни клімату, виробництво низьковуглецевого та відновлюваного водню у світі досягло лише 1 Мт у 2023 році, що значно менше 70–125 Мт/рік, необхідних до 2030 року [20]. Для досягнення глобальних кліматичних цілей інтенсивність викидів від виробництва водню має зменшитися майже на 50% до 2030 року, прагнучи скоротити загальні викиди на 10%, незважаючи на очікуване збільшення виробництва [4]. Шлях до досягнення енергетичного переходу на основі водню все ще довгий, незважаючи на потребу в технологіях сталого виробництва водню та наближення міжнародного терміну – 2050 року.

Сьогодні технології на основі H<sub>2</sub> мають різний рівень зрілості та рівні технологічної готовності, і важко прокласти шлях до найкращої технології виробництва біо- та зеленого водню (наприклад, водень, отриманий з біомаси, проти електролізу з відновлюваною енергією), в яку можна інвестувати як з дослідницької, так і з промислової точки зору.

### **1.5. Перспективні біотехнології переробки органічних відходів**

Сучасні біотехнології пропонують інноваційні рішення для утилізації відходів, зокрема використання модифікованих мікроорганізмів, здатних ефективно розкладати складні органічні сполуки. В умовах глобальних екологічних проблем сталий розвиток стає пріоритетом для багатьох компаній та держав. Використання біотехнологій в управлінні відходами сприяє зменшенню екологічного навантаження та досягненню цілей сталого розвитку.

Підприємства з біологічної переробки органічних відходів продемонстрували значне підвищення ефективності за останні роки. Завдяки поширенню та зростаючій популярності ідей повторного використання відходів, методи їх активної біологічної переробки постійно вдосконалюються. Зараз вони розглядаються як основний підхід до підвищення цінності органічних побічних продуктів [21]. Сучасні технічні можливості ретельного контролю та модифікації параметрів біоконверсії дозволяють

досягати оптимальних результатів серед усього спектру методів переробки, що відкриває можливості не лише для традиційної утилізації відходів, а й для більш складного виробництва. Використовуючи різні форми біоконверсії, впроваджуються процеси відновлення ґрунтів [22], виробництва біопалива, підвищення ефективності сільського господарства тощо. Однак завдання їх оптимізації не втратили своєї актуальності та стали більш багатограними завдяки науковотехнічним досягненням останніх десятиліть, а також кращому розумінню впливу людини на навколишнє середовище.

Відходи слугують чудовим субстратом для мікробного виробництва органічних кислот, які мають значне промислове застосування. Молочна кислота, лимонна кислота та оцтова кислота є одними з найважливіших комерційно важливих продуктів, отриманих за допомогою цього підходу [23].

Відходи можуть служити недорогим субстратом для мікробного синтезу різних смакових сполук та ароматизаторів, які в іншому випадку були б видобуті з високоякісної сировини або синтезовані хімічним шляхом.

Деякі мікроорганізми можуть перетворювати прості цукри, присутні в відходах, на складні полісахариди з унікальними функціональними властивостями, створюючи високоцінні інгредієнти для харчової, фармацевтичної та косметичної промисловості [24].

Відходи можуть служити чудовим середовищем для росту мікроорганізмів, які виробляють комерційно цінні ферменти амілази, протеази, ліпази, целюлази та геміцелюлази. Ці ферменти, у свою чергу, знаходять застосування в різних галузях промисловості, включаючи харчову промисловість, текстильну промисловість, мийні засоби та фармацевтику.

Відходи, з високим вмістом органічних речовин, слугують чудовою сировиною для різних процесів виробництва біопалива такі як біоетанол, біогаз, біодизель, біоводень, вирішуючи проблеми як управління відходами, так і енергетичної безпеки.

## 1.6. Наукові положення в області культивування *Clostridium* і *Bacillus* в практиці отримання біоводню

Види *Clostridium* є анаеробними «темновими ферментерами», які розщеплюють цукри на органічні кислоти та газу. Глюкоза розщеплюється шляхом гліколізу на піруват, який потім декарбоксилюється піруват:ферредоксин оксидоредуктазою (PFOR, тіамін-залежний фермент) до ацетил-КоА та CO<sub>2</sub> [25]. Електрони з цієї реакції відновлюють ферредоксин; [FeFe]-гідрогеназа потім використовує ці електрони (плюс протони) для генерації H<sub>2</sub> [25]. Таким чином, *Clostridium* виділяють водень (зазвичай 2–4 моль H<sub>2</sub> на моль гексози) разом з ацетатом та бутиратом. Ці бактерії є суворими анаеробами: навіть низькі рівні O<sub>2</sub> зупиняють їхній метаболізм [26]. На противагу цьому, багато *Bacillus* є факультативними анаеробами, які дихають киснем, коли він доступний. У змішаній культурі *Bacillus* споживатиме будь-який розчинений O<sub>2</sub> та створюватиме анаеробне середовище для *Clostridium* [26] [26]. Таке «поглинання кисню» *Bacillus* спрощує процеси біоводню, усуваючи потребу в хімічних відновлювальних агентах або очищенні від N<sub>2</sub> [26]. Більше того, *Bacillus* виділяє позаклітинні ферменти (амілази, целюлази, протеази тощо), які гідролізують складні субстрати (крохмаль, целюлозу, білки) на ферментовані цукри [5]. Потім *Clostridium* ферментує ці цукри до H<sub>2</sub> та кислот. Таке синергетичне перехресне живлення – *Bacillus* захищає від O<sub>2</sub> та постачає субстрати, *Clostridium* виробляє H<sub>2</sub> – робить спільні культури високоефективними [26].

### 1.6.1. Роль стимуляторів росту та поживних речовин (вітамінів та іонів металів)

*Clostridium spp.* та *Bacillus spp.*, потребують насичених середовищ зі специфічними факторами росту. *Clostridium* часто є ауксотрофами для кількох вітамінів групи В та амінокислот, тоді як види *Bacillus* є прототрофами (можуть синтезувати більшість поживних речовин). Для *Clostridium* необхідні добавки включають вітаміни (наприклад, тіамін (B<sub>1</sub>), біотин (B<sub>7</sub>), параамінобензойну кислоту (ПАБК)) [27]. На практиці середовища часто містять дріжджовий екстракт або

пептон (1–5 г/л) для постачання вітамінів, амінокислот та мікроелементів. Джерела азоту, такі як ацетат амонію або сечовина, також є поширеними; [28]. *Bacillus spp.* зазвичай синтезують власні вітаміни та можуть рости на простіших середовищах, але вони все одно отримують користь від органічних добавок (наприклад, дріжджового екстракту), які покращують біомасу та вироблення ферментів.

Окрім поживних речовин, додавання відновлювальних агентів та мікроелементів стимулює ріст та вироблення  $H_2$ . Добавки, що поглинають кисень (для підтримки суворого анаеробіозу), включають L-цистеїн (зазвичай 0,1–1,0 мМ) та аскорбінову кислоту (~5 мг/л) [29]. Наприклад, додавання 5 мг/л аскорбінової кислоти до ферментацій *Clostridium butyricum* зменшило час затримки та збільшило вихід водню до 2,20 моль  $H_2$ /моль глюкози (збільшення на 40,9% порівняно з контролем). L-цистеїн аналогічно покращує вихід, знижуючи окисно-відновний потенціал [29]. Мікроелементи, такі як  $Fe^{2+}$  та  $Ni^{2+}$ , є кофакторами для гідрогеназ: було показано, що низькі рівні  $FeSO_4$  ( $\approx 25$  мг/л) підвищують вихід  $H_2$  (наприклад, з 2,93 до 3,06 моль  $H_2$ /моль глюкози) [29].  $Ni^{2+}$  (<20–50 мг/л) також стимулює деякі штами (хоча надлишок  $Ni$  може пригнічувати). Таким чином, оптимізоване середовище включає дріжджовий екстракт або пептон, збалансоване джерело C/N (наприклад, глюкоза плюс амоній), вітаміни (тіамін, біотин, ПАБК), відновник (цистеїн/аскорбат) та мікроелементи (Fe, Ni тощо) на емпірично визначених рівнях [27].

Для ефективного метаболізму клостридії та бацили потребують різних кофакторів. Зокрема, вітаміни групи В (тіамін, біотин тощо) є важливими коферментами. Пірофосфат тіаміну (вітамін  $B_1$ ) є ключовим кофактором для PFOR та інших декарбоксилаз; без нього гліколітичний потік до ацетил-КоА сильно порушений. Біотин ( $B_7$ ) та інші вітаміни також підтримують ключові метаболічні етапи. Таким чином, дріжджовий екстракт або вітамінні суміші часто додають до ферментаційних середовищ. Емпіричні дослідження показують, що додавання дріжджового екстракту (багатого на вітаміни групи В) значно підвищує вихід водню. Виявили, що збільшення концентрації дріжджового екстракту підвищує вихід  $H_2$

приблизно на 30% [30]. Це вказує на те, що добавки вітамінів (В<sub>1</sub>, біотин тощо) можуть сильно посилити темне бродіння.

### 1.6.2. Збільшення виходу водню: умови експлуатації

Для максимізації виходу біоводню умови культивування повинні ретельно контролюватися. Анаеробіоз є критично важливим – кисень пригнічує гідрогенази. Окрім відновлювальних агентів, спільні культури *Bacillus* можуть активно видаляти залишковий О<sub>2</sub>. Факультативні види *Bacillus* споживають кисень і секретують гідролази, створюючи анаеробні ніші для *Clostridium* та постачаючи мономери з полімерів [31]. Підтримка низького окисно-відновного потенціалу (наприклад, ОВП <<0) – шляхом продувки газом або поглиначів – є важливою для високої активності Н<sub>2</sub>.

*Контроль рН:* Темна ферментація часто є оптимальною при слабокислому рН. Багато штамів *Clostridium* дають найкращі результати при рН 5,5–6,0 [32]. Наприклад, пакетні дослідження повідомляють про піковий вихід при рН ≈4,4–5,5 та 35–37 °С [8], хоча деякі оптимізації, специфічні для субстрату, виявили вищі оптимуми рН (наприклад, рН 8,98 для ферментації шкірки кавуна [28]). На практиці буферний або зворотний контроль підтримують рН у бажаному діапазоні (зазвичай 5–6), щоб сприяти кислотогенним шляхам та пригнічувати метаногени [31, 32].

*Температура:* Зазвичай використовуються мезофільні температури (~30–37 °С). Цей діапазон максимізує активність ферментів у ферментерах [32]. Термофільна робота (50–60 °С) може пришвидшити гідроліз стійкої біомаси, але мезофільні умови часто дають вищий вихід Н<sub>2</sub> та є енергозберігаючими.

*Завантаження та підживлення субстрату:* Високі швидкості органічного завантаження можуть збільшити об'ємне виробництво Н<sub>2</sub> до оптимального рівня. Наприклад, OLR до 850 г/л·день з 8-годинним утриманням дало рекордні 208,3 л Н<sub>2</sub>/(л·день) в одному дослідженні [32]. Однак надмірно високі навантаження можуть підкислити середовище. Періодичне або двостадійне підживлення (розділення реакторів гідролізу та гідрогенезу) також може покращити загальний вихід водню та

подальший вихід метану. Термічна або хімічна попередня обробка відходів (наприклад, тепловий шок) може гідролізувати полімери та інактивувати споживачі  $H_2$  (метаногени), збільшуючи пізніший вихід  $H_2$ .

*Співвідношення поживних речовин:* Підтримка відповідного співвідношення C:N:P є життєво важливою. Низький N/C (<0,5) часто максимізує  $H_2$  (надаючи перевагу ацетату над  $NH_3$ ). Додавання неорганічного N (амонію) та фосфору (фосфату) дозволяє уникнути обмеження поживних речовин. Емпірично, додавання 4–5 г/л ацетату натрію та  $\approx 1$  г/л ацетату амонію значно збільшило вихід  $H_2$  *C. butyricum* [28].

*Управління газами:* Часте або безперервне видалення водню (наприклад, шляхом барботажу або мембранної екстракції) зміщує рівновагу ферментації та збільшує вихід. Уникнення накопичення водню (< $10^{-4}$  атм) запобігає гальмування зворотним зв'язком.

На практиці застосовується комбінація цих стратегій: наприклад, інокулят тепловим шоком для видалення метаногенів, подача відновлювальних агентів, буфер при рН 5–6 та підтримка температури 35–37 °С. Оптимізація часто спирається на методи планування експерименту. Одне дослідження з використанням планів Плакетта-Бермана/Бокса-Бенкена виявило, що початковий рН, концентрація субстрату та ацетатний буфер є найважливішими факторами, з оптимальним виходом  $H_2$  для *C. butyricum* при рН 8,98, 45% твердих речовин субстрату, 4,49 г/л Na-ацетату, 1,15 г/л  $NH_4$ -ацетату [28]. Це ілюструє, що для певних відходів можуть знадобитися індивідуальні умови.

### 1.6.3. Критичні параметри процесу

Ключові параметри для моніторингу та оптимізації включають:

*рН:* Вирішальний для активності ферментів та мікробного співтовариства. Зазвичай підтримується на рівні 5,5–6,5 для ацидогенезу [32]. Екстремальний рН може змістити шляхи (наприклад, більше бутирату проти ацетату).

*Температура:* стандартна 35–37 °С. Відхилення впливають на швидкість росту (наприклад, повільніше при 25 °С, ризик термолізу при >45 °С).

*Гідравлічний час утримування (ГЧУ):* короткий ГЧУ (1–5 год) часто використовується для вимивання неводневих речовин (метаногенів) при збереженні ацидогенів [32].

*Швидкість органічного навантаження (ШОУ):* зазвичай 10–50 г ХСК/л·день для періодичної роботи; вище для безперервної (до 850 г/л·день у високошвидкісних системах [32]). Вище оптимальної ШОУ, ЛЖК накопичуються та пригнічують Н<sub>2</sub>.

*Співвідношення інокуляту:* Зазвичай використовується 10–20% (об./об.) або більше активної культури. Більший інокулят скорочує затримку та підвищує раннє виробництво.

*Концентрація субстрату:* Необхідно уникати інгібування субстратом. Наприклад, суспензії шкірки кавуна були оптимальними при ~45% твердих речовин [2], тоді як дуже розбавлена сировина утворює менше газу.

*Співвідношення C/N:* Низьке співвідношення C/N (<10) може пригнічувати гідрогеногени; занадто високе спричиняє токсичність аміаку. Збалансоване харчування (наприклад, добавки азоту) є критично важливим.

*Окисно-відновний потенціал (ОВП):* Бажаний діапазон сильно негативний (від –200 до –400 мВ). Додавання відновників (цистеїну) або барботажу N<sub>2</sub> підтримує цей показник.

*Перемішування/струшування:* покращує контакт та виділення газу, але надмірний зсув може пошкодити клітини.

*Рівень інгібіторів:* Побічні продукти (ацетат, бутират, розчинники) утворюють зворотний зв'язок під час бродіння. Метаногени або гомоацетогени можуть споживати Н<sub>2</sub>; тому гідрогенну стадію зазвичай ізолюють або підкислюють для їх придушення.

*Конфігурація реактора:* CSTR, UASB, реактори з ущільненим шаром тощо, мають різні характеристики змішування та утримання. Реактори періодичної дії зазвичай дають вищу продуктивність, але системи безперервної дії пропонують стабільну продуктивність.

Ці фактори взаємодіють; наприклад, оптимізація рН часто вимагає буферизації (фосфату, бікарбонату), а високі VFA можуть вимагати розведення або додавання основи. Дослідження з плануванням експерименту часто виявляють, що початковий рН та завантаження субстрату є найважливішими [28]. Для підтримки цільових заданих значень використовується надійний моніторинг (рН-метри, газові датчики, електроди ОВП).

#### 1.6.4. Технологічні методи підготовки насінневого матеріалу

*Попередня обробка тепловим шоком.* Стандартною практикою є термічна обробка посівного матеріалу для збагачення продуцентів водню. Наприклад, нагрівання культури (наприклад, при 80–100 °С протягом 15–30 хвилин) знищує неспоруютьовачі (метаногени, гомоацетогени, вегетативні клітини), одночасно індукуючи проростання спор *Clostridium* [33]. Цей селективний тепловий шок пригнічує небажані мікроби, що споживають  $H_2$ , та «активує» популяцію *Clostridium*. Багато дослідників регулярно нагрівають мул або інокулят до ~100 °С перед ферментацією [33] з цієї причини. Результатом є вихідна культура, в якій переважають споруотворюючі гідрогеногени.

*Імобілізація клітин.* Імобілізація бактеріальних клітин на твердих носіях (керамзит, активоване вугілля, полімерні кульки тощо) може покращити продуктивність реактора. Імобілізовані клостридії (та спільні культури) більш стійкі до змін рН, перевантаження субстратом або вимивання. Носії дозволяють утворювати щільні біоплівки, підтримуючи високу концентрацію клітин та безперервне виробництво  $H_2$ . Дослідження показують, що реактори з нерухомим або псевдозрідженим шаром (з кульками або гранулами) досягають вищої стабільності та продуктивності, ніж прості системи зі зваженими клітинами. Таким чином, імобілізація на носіях є поширеною стратегією масштабування процесів біоводню.

*Порційне проти безперервного культивування.* У лабораторних дослідженнях зазвичай використовується періодична ферментація (герметичні пляшки) для зручності контролю. Однак безперервні або напівбезперервні процеси, як правило,

кращі для промислового масштабу  $H_2$ . Безперервне культивування може працювати в стаціонарному режимі з безперервною подачею субстрату та видаленням продукту, досягаючи вищого кумулятивного виходу  $H_2$  та кращого контролю рН. Навпаки, у періодичних культивуваннях часто спостерігається зниження рН та виснаження субстрату, що обмежує загальний вихід. На практиці періодичний режим зручний для невеликих експериментів (як у цій роботі), тоді як системи безперервного потоку, як правило, забезпечують більшу об'ємну продуктивність  $H_2$  при тривалій експлуатації.

#### 1.6.5. Етапи біоконверсії відходів та утворення $H_2$

Анаеробне перетворення відходів відбувається послідовно. Спочатку гідроліз розщеплює складні полімери на розчинні мономерні за допомогою позаклітинних ферментів. Наприклад, целюлолітичні види *Clostridium* секретують целюлази та геміцелюлази для розкладання целюлози та геміцелюлози на цукри [31]. Протеолітичні бактерії (часто *Clostridium spp.*) гідролізують білки до амінокислот. Ліпіди гідролізуються ліпазами. Гідроліз, як правило, є найповільнішим (лімітуючим швидкість) етапом для лігноцелюлозних відходів.

Після гідролізу відбувається ацидогенез (гідрогенез): ферментативні бактерії перетворюють цукри, амінокислоти та жирні кислоти на леткі жирні кислоти (ЛЖК), спирти,  $CO_2$  та  $H_2$  [31]. Це фаза утворення біоводню. Суворі анаероби (наприклад, *Clostridium spp.*) використовують піруват-ферредоксин оксидоредуктазу (PFOR) для окислення пірувату, утворюючи відновлений ферредоксин, який повторно окислюється [FeFe]-гідрогеназою, вивільняючи  $H_2$  [34]. Основними продуктами зазвичай є ацетат, бутират (та незначний пропіонат), а також  $H_2$  та  $CO_2$ . *Bacillus spp.* (факультативні анаероби) також можуть брати участь на цьому етапі, ферментуючи глюкозу до ацетату та  $H_2$  через форміат-гідрогенліазу (шлях PFL) [35].

Водень утворюється під час кислотоутворюючої стадії. Вихід клостридіального  $H_2$  залежить від кінцевих продуктів: ферментація до ацетату генерує до 4 моль  $H_2$  на моль глюкози, тоді як утворення бутирату дає  $\sim 2$  моль  $H_2$  на моль глюкози [34]. (Наприклад, в одному дослідженні зазначається, що *C. beijerinckii* теоретично може

давати 4 моль  $H_2$ /глюкози, якщо утворюється лише ацетат [34]. Насправді, змішані кислотні продукти дають нижчий вихід.

Після ацидогенезу може відбуватися ацетогенез (часто пов'язаний зі споживанням водню): деякі ацидогени перетворюють ЛЖК (наприклад, пропіонат, бутират) на ацетат,  $H_2$  та  $CO_2$ , але це термодинамічно несприятливо, якщо парціальний тиск  $H_2$  не підтримується дуже низьким (завдяки синтрофним метаногенам або видаленню газу). Зрештою, якщо його не контролювати, відбувається метаногенез : гідрогенотрофні метаногени споживають  $H_2$  та  $CO_2$  для утворення метану, виснажуючи запаси  $H_2$ . У біоводневих процесах метаногени пригнічуються (часто через низький рН) або видаляються для збереження водню.

Підсумовуючи, гідроліз та ацидогенез – це стадії, що утворюють водень, причому ацидогенез (і будь-який подальший «гідрогенез») є основним процесом утворення  $H_2$  [34, 36] . Клостридії зазвичай домінують на цих стадіях у змішаних культурах, швидко розкладаючи цукри до кислот та  $H_2$  [31] . *Bacillus* та інші факультативні анаероби можуть брати участь у гідролізі субстратів та видаленні кисню, але їхній індивідуальний вихід  $H_2$  нижчий (наприклад, *Bacillus cereus* ~1,53 моль  $H_2$ /моль глюкози [37]). Наведений вище малюнок підсумовує етапи перетворення: полімери  $\rightarrow$  мономери  $\rightarrow$  ЛЖК +  $H_2/CO_2$ , ілюструючи, як субстрати проходять через гідроліз та ацидогенне бродіння.

### **1.7. Характеристика стимуляторів росту біомаси**

Систематична оптимізація росту мікробів та виходу біомаси вимагає детального розуміння потреб організму в харчуванні та його фізіологічного зв'язку з навколишнім середовищем. Спороутворюючі роди *Bacillus* та *Clostridium* представляють собою критичну дихотомію в бактеріальному метаболізмі, яка фундаментально визначає вибір та ефективність стимуляторів росту. Обидва роди є грампозитивними паличками, здатними утворювати стійкі ендоспори, що дозволяє їм довготривало виживати в навколишньому середовищі [38]. Однак їхня розбіжність у

використанні кисню зумовлює абсолютно різні стратегії максимізації лабораторного або промислового зростання.

*Bacillus* зосереджується на забезпеченні максимальних, легкозасвоюваних джерел вуглецю та азоту для досягнення високого потоку поживних речовин та швидкого експоненціального зростання.

На противагу цьому, види *Clostridium* є суворими облігатними анаеробами [38]. Кисень є для них токсичним, обмежуючи виробництво енергії менш ефективними ферментативними шляхами, такими як гліколіз у поєднанні з унікальною реакцією Стрікленда для генерації енергії [36]. Тому абсолютним першочерговим завданням є стимулювання.

Основні хімічні вимоги для росту будь-яких мікробів включають вуглець, азот, сірку та фосфор, які необхідні для біосинтезу основних макромолекул, таких як білки та нуклеїнові кислоти. Обмеження будь-якого конкретного елемента, тимчасові чи довгострокові, змушують еволюційно адаптуватися до фізіології мікробів, включаючи заходи жорсткої економії та механізми економії елементів [37].

Самі фактори росту поділяються на чотири основні категорії:

1. Амінокислоти (АК): Вони служать основними будівельними блоками для синтезу білка. Для деяких мікроорганізмів АК також можуть виконувати вторинну роль як джерело вуглецю або енергії [36].

2. Пурини та піримідини: ці сполуки є основними будівельними блоками нуклеїнових кислот (ДНК та РНК).

3. Вітаміни: Вітаміни функціонують переважно як кофактори ферментів і мають вирішальне значення для сприяння ключовим метаболічним реакціям.<sup>14</sup> Вітаміни групи В часто є ключовими компонентами, що містяться в харчових добавках, багатих на вітаміни та мінерали [37].

4. Мікроелементи: Такі елементи, як залізо, цинк, мідь та молібден, необхідні в незначних кількостях. Вони діють як незамінні кофактори для різних ферментів, включаючи ті, що беруть участь у стресовій реакції та окислювальному захисті.

Потреба в цих факторах підкреслює фундаментальну різницю в метаболічній стратегії між *Bacillus* та *Clostridium*. Види *Bacillus* зазвичай описуються як прототрофи, тобто вони володіють метаболічними шляхами для синтезу більшості необхідних органічних молекул, включаючи вітаміни, з нуля, за умови наявності джерела вуглецю та неорганічних солей. І навпаки, багато *Clostridium* є ауксотрофами, тобто втратили генетичну здатність до ключових біосинтетичних шляхів і тому потребують специфічних попередньо сформованих амінокислот і вітамінів [37].

Ця метаболічна дивергенція призводить до різних цілей оптимізації:

1. Абсолютна необхідність (*Clostridium*): Для клостридій забезпечення незамінними амінокислотами (наприклад, цистеїном, лейцином, ізолейцином) та вітамінами групи В (наприклад, біотином, піридоксином) є абсолютно необхідним для виживання та росту, що відображає справжні геномні дефіцити.12

2. Кінетичне прискорення (*Bacillus*): Хоча *Bacillus* здатний до самосинтезу, забезпечення попередньо сформованими комплексними факторами (такими як вітаміни групи В та короткі пептиди, що містяться в дріжджовому екстракті) дозволяє уникнути витрат енергії та часу, пов'язаних з біосинтезом *de novo* [38]. Ця стратегія значно прискорює кінетику росту, скорочуючи лаг-фазу та збільшуючи максимальну питому швидкість росту протягом експоненціальної фази [38]. Це демонструє, що хоча необхідність факторів росту для *Clostridium* продиктована геномним виживанням, перевага для прототрофної *Bacillus* є суто кінетичною, зосередженою на максимізації швидкості та ефективності промислової періодичної ферментації.

У таблиці 1.2 наведено порівняльний огляд цих різних ролей.

## Класифікація та функціональні ролі основних стимуляторів росту

Категорія фактора	Типові приклади	Основна біологічна функція	Відповідність <i>Bacillus</i>	Відповідність до <i>Clostridium</i>
Амінокислоти	Глутамінова кислота, ізолейцин, цистеїн	Синтез білка; Структурна цілісність; Джерело енергії	Критично важливий для виживання (Glu, Pe); Оптимальне джерело азоту	Основні вимоги (Cys, Leu, Val, Trp); Донори/акцептори електронів
Вітаміни	Біотин, пантотенат, піридоксин	Кофактори ферментів; Незамінні регулятори метаболізму	Підвищує швидкість росту (обхідний синтез)	Часто незамінні (ауксотрофи)
Мікроелементи	Fe, Zn, Cu, Mo	Кофактори ферментів; Захист від стресу	Потреби в основних мікроелементах	Потреби в основних мікроелементах; критично важливі для оксидативного захисту
Екологічний	Кисень (PK)	Термінальний акцептор електронів (TEA); високий вихід АТФ	Необхідно для високоефективного зростання	Токсичний; має бути виведений за допомогою відновлювальних агентів

## Висновки до розділу 1

У ході літературного огляду встановлено, що біоконверсія органічних відходів є ключовим напрямом сучасної циркулярної біоекономіки, спрямованим не лише на зменшення екологічного навантаження, а й на отримання цінних біопродуктів — біопалива, органічних кислот, ферментів і біоматеріалів. Проаналізовано сучасний стан управління відходами в Україні та ЄС, що підкреслює необхідність впровадження ефективних біотехнологічних рішень на національному рівні.

Особлива увага приділена ролі бактерій родів *Clostridium* та *Bacillus*, які становлять основу мікробних консорціумів під час біодеструкції складних органічних субстратів та є провідними продуцентами біоводню в темновій ферментації. Їхні метаболічні можливості, ферментативна активність та синергічна взаємодія визначають ефективність процесів гідролізу, ацидогенезу та утворення  $H_2$ .

Окремо розглянуто технологічні та фізико-хімічні параметри, що впливають на продуктивність біоводневих процесів: анаеробні умови, рН, температура, мікроелементи, типи попередньої обробки інокуляту та характеристики субстратів. Показано, що оптимізація цих факторів дозволяє суттєво підвищити вихід водню та стабільність мікробних систем.

Таким чином, аналіз літератури підтверджує перспективність використання *Clostridium* та *Bacillus* у технологіях переробки відходів та виробництва біоводню, а також обґрунтовує необхідність подальших досліджень щодо вдосконалення умов культивування, формування синтетичних консорціумів та підвищення енергоефективності біотехнологічних процесів.

## РОЗДІЛ 2

# ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ ВОДЕНЬСИНТЕЗУЮЧИХ БАКТЕРІЙ РОДІВ *BACILLUS* ТА *CLOSTRIDIUM*

### 2.1. Воденьсинтезуючі мікроорганізми

Водень може бути біологічно отриманий різними мікроорганізмами через різні метаболічні шляхи. Ці шляхи виробництва біоводню зазвичай поділяються на чотири основні типи: (1) прямий біофотоліз води зеленими мікроводоростями, (2) непрямий біофотоліз ціанобактеріями (часто двостадійний процес, що включає фотосинтетичне виробництво біомаси з подальшим утворенням водню), (3) фотоферментація фотосинтетичними бактеріями (наприклад, пурпуровими несірчаними бактеріями) з використанням органічних субстратів під освітленням та (4) темнова ферментація анаеробними бактеріями за відсутності світла [100]. Серед них темнове ферментаційне виробництво водню з органічних відходів є особливо перспективним для практичного застосування, такого як обробка відходів [100].

#### 2.1.1. Класифікація мікроорганізмів, що виробляють водень

*Анаеробні бактерії, що продукують водень:* Широкий спектр бактерій може генерувати  $H_2$  в анаеробних умовах шляхом ферментації органічних субстратів. Головними серед них є строгі анаероби, такі як види *Clostridium*, які є спороутворюючими ферментативними бактеріями, відомими високим виходом водню [101]. *Clostridium spp.* можуть використовувати різноманітні субстрати (цукри, крохмаль, гліцерин тощо) та виробляти  $H_2$  через шляхи піруватно-ферментаційної ферментації, що робить їх центральними учасниками процесів темно-ферментаційної ферментації [101]. Деякі факультативні анаероби також сприяють виробленню  $H_2$ ; наприклад, *Enterobacter* (родина *Enterobacteriaceae*) та деякі види *Bacillus* здатні до ферментативного виробництва водню в анаеробних умовах [101]. *Enterobacteriaceae* зазвичай виробляють водень через шлях форміат-водень-ліази,

перетворюючи формиат на  $H_2$  та  $CO_2$ , тоді як *Clostridia* використовують ферредоксин-пов'язані гідрогеназні шляхи [101]. Загалом, темно-ферментативні «гідрогени» процвітають у безкисневому середовищі та не потребують світла, що робить їх добре придатними для біоперетворення органічних відходів (наприклад, харчових відходів, сільськогосподарських залишків) на газоподібний водень [101].

*Інші гідрогеногенні системи:* Деякі мікроорганізми можуть виробляти водень більш спеціалізованими шляхами. Наприклад, деякі гіпертермофільні археї (наприклад, *Thermotoga spp.*, *Pyrococcus furiosus*) є продуктивними виробниками водню в екстремальних умовах, часто містять високоактивні гідрогенази, що функціонують за високої температури [102]. Існують також карбоксидотрофні бактерії (наприклад, *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*), які ферментують багаті на  $CO$  газу (синтез-газ) до  $H_2$  за допомогою реакції конверсії вода-газ. Крім того, нові технології біоводню використовують змішані мікробні консорціуми в системах, таких як мікробні електролізні комірки, але вони включають електроасистовані кроки, що виходять за рамки чистої ферментації. Загалом, ключові класи мікробів, що виробляють водень, можна узагальнити як ферментативні анаероби, фотосинтезуючі бактерії, фотосинтезуючі водорості/ціанобактерії та деякі екстремофіли - кожен клас використовує окремий метаболічний апарат для виробництва  $H_2$ .

## **2.2. Морфолого-культуральні ознаки бактерій родів *Bacillus* та *Clostridium***

Морфологічно *Bacillus subtilis* (сінна паличка) являє собою грампозитивну паличкоподібну бактерію. Розміри окремих клітин варіюються в межах 4–10 мкм у довжину та 0,25–1,0 мкм у діаметрі. У мазку ці бактерії можуть розташовуватися поодиночі, парами (як диплобацили) або формувати ланцюжки (стрептобацили), причому довжина таких ланцюжків часто залежить від умов середовища. Клітини рухливі завдяки наявності перитрихальних джгутиків, що покривають всю їхню поверхню. Важливою ознакою є здатність до споруляції за стресових умов: бактерія утворює еліпсоїдну або циліндричну ендоспору, яка розташовується центрально або

парацентрально, іноді викликаючи набрякання спорангія. На рис. 2.1 наведено фото бактерій *Bacillus subtilis* під світловим мікроскопом.

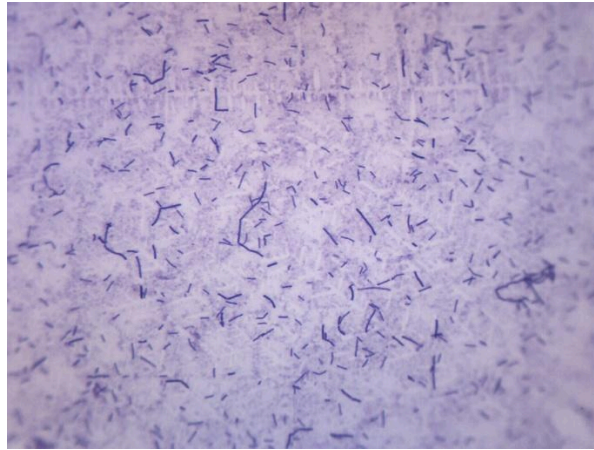


Рис. 2.1. Мікрофотографія клітин *Bacillus subtilis* під світловим мікроскопом 1000-кратне повне збільшення

Культуральні властивості цього мікроорганізму проявляються при вирощуванні на поживних середовищах при оптимальній температурі 30–35 °С. *Bacillus subtilis* є факультативним анаеробом. На щільних середовищах вона утворює колонії діаметром 2–4 мм, які мають білуватий або кремовий колір. Форма колоній варіюється від округлої до неправильної або лопатевої. Характерними рисами є хвилястий край та специфічна поверхня, яка може бути тьмяною, шорсткою, сухою або зморшкуватою (так звані R-форми колоній). На рис. 2.2 наведено фото колоній *Bacillus subtilis* на агарі.



Рис. 2.2. Колонії *Bacillus subtilis* на агарі

*Clostridium butyricum* за своїми морфологічними ознаками також є грампозитивною паличкою з подібними розмірами (4–10 мкм завдовжки та 0,25–1,0 мкм у діаметрі). Клітини розташовуються переважно поодинці, парами, короткими ланцюжками, а іноді утворюють довгі нитки. Як і сінна паличка, цей кластридій рухливий завдяки перитрихальним джгутикам. Процес споруляції має свої особливості: спора зазвичай овальної форми, розташовується центрально або субтермінально (ближче до кінця клітини). Утворення спори часто призводить до характерного набрякання клітини (спорангія), що надає їй веретеноподібної форми. На рис. 2.3 наведено фото бактерій *Clostridium butyricum* під світловим мікроскопом.

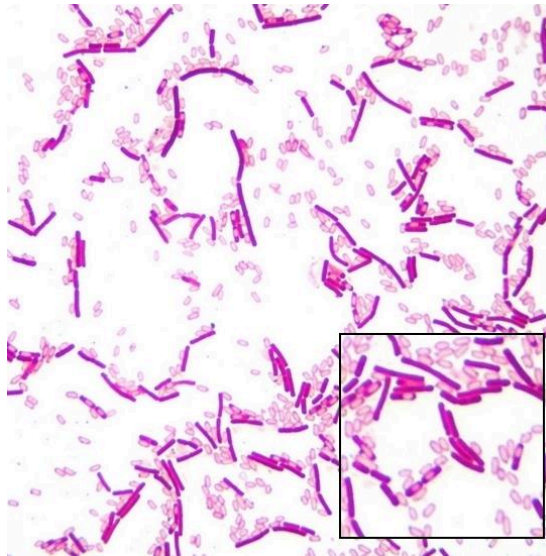


Рис. 2.3. Мікрофотографія клітин *Clostridium butyricum* під світловим мікроскопом 1000-кратне повне збільшення

Культуральні властивості *Clostridium butyricum* суттєво відрізняються тим, що цей мікроорганізм є облигатним анаеробом, тобто росте виключно за відсутності кисню. Оптимальна температура для росту становить від 30 °С до 40 °С. На щільних поживних середовищах бактерія формує колонії діаметром 2–4 мм. Вони зазвичай напівпрозорі, сіро-білого кольору, від округлої до неправильної форми з хвилястим краєм. Поверхня колоній, на відміну від бацил, переважно гладка і блискуча, хоча іноді може бути тьмяною із зернистою внутрішньою структурою. На рис. 2.4 наведено фото колоній *Clostridium butyricum* на агарі.



Рис. 2.4. Колонії *Clostridium butyricum* на агарі

### 2.3. Таксономія *Bacillus* та *Clostridium*

Таксономічне положення обох досліджуваних мікроорганізмів відповідно до сучасної біологічної класифікації. Обидва роди належать до одного типу (*Firmicutes/Bacillota*), проте різняться на рівні класу, що відображає їхні фундаментальні фізіологічні відмінності (зокрема, відношення до кисню).

*Bacillus subtilis* (сінна паличка) є типовим представником спороутворюючих аеробних бактерій. У таблиці 2.3 наведена таксономія роду *Bacillus subtilis*.

Таблиця 2.3

Таксономія роду *Bacillus subtilis*

Ранг (Таксон)	<i>Bacillus subtilis</i>
1	2
Домен	<i>Bacteria</i>
Тип	<i>Bacillota</i> (раніше <i>Firmicutes</i> )
Клас	<i>Bacilli</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>
Родина	<i>Bacillaceae</i>
Рід	<i>Bacillus</i>

1	2
<b>Вид</b>	<i>Bacillus subtilis</i>

*Clostridium butyricum* (маслянокисла бактерія) є типовим видом свого роду, що представляє групу спороутворюючих облігатних анаеробів. У таблиці 2.4 наведена таксономія роду *Clostridium butyricum*.

Таблиця 2.4

Таксономія роду *Clostridium butyricum*

Ранг (Таксон)	<i>Clostridium butyricum</i>
Домен	<i>Bacteria</i>
Тип	<i>Bacillota</i> (раніше <i>Firmicutes</i> )
Клас	<i>Clostridia</i>
Порядок	<i>Eubacteriales</i> (раніше <i>Clostridiales</i> )
Родина	<i>Clostridiaceae</i>
Рід	<i>Clostridium</i>
Вид	<i>Clostridium butyricum</i>

## 2.4. Органічні відходи як субстрати для мікробної конверсії

### 2.4.1. Класифікація органічних відходів

Органічні відходи загалом охоплюють будь-який біорозкладний матеріал рослинного або тваринного походження. За джерелом та характеристиками їх можна класифікувати на кілька типів [59]. У контексті мікробної конверсії найбільш релевантними категоріями є сільськогосподарські відходи, тверді побутові відходи (органічна фракція) та харчові відходи. Ці категорії відрізняються своїм складом та типовими методами обробки:

*Сільськогосподарські відходи:* сюди входять рослинні залишки (наприклад, солома сільськогосподарських культур, кукурудзяні стебла, рисове лушпиння) та залишки тваринництва (наприклад, гній худоби), що утворюються в результаті сільськогосподарської діяльності [59]. Відходи сільськогосподарських рослин здебільшого лігноцелюлозні, складаються з целюлози, геміцелюлози та лігніну, тоді як відходи тваринного походження, такі як гній, містять перетравлену органічну речовину, багату на азот. Ці відходи виробляються у великих кількостях на фермах і можуть створювати проблеми з утилізацією, але вони служать цінними субстратами для процесів біоконверсії, таких як анаеробне розщеплення та компостування.

*Тверді побутові відходи (ТПВ)* - органічна фракція: Потоки побутових та комунальних відходів містять значну біорозкладну фракцію, що складається з харчових відходів, обрізків саду (листя, трава), паперу/картону та інших органічних речовин. Це часто називають органічною фракцією ТПВ (ОФТПВ). Ефективне управління відходами зараз робить акцент на роздільному зборі цієї органічної фракції для біологічної обробки [60]. Високий вміст органічних речовин у ТПВ може бути використаний за допомогою мікробних процесів (наприклад, виробництва біогазу або компостування) замість захоронення на сміттєзвалищах.

*Харчові відходи:* Харчові відходи - це викинуті харчові матеріали з усього ланцюга постачання харчових продуктів, включаючи сільськогосподарські відходи, побічні продукти переробки, відходи роздрібної торгівлі та побутові відходи [61]. Вони складаються з фруктів, овочів, зерна, м'ясних або молочних залишків, які зазвичай є високобіологічно розкладними. Харчові відходи часто вважаються частиною твердих побутових відходів (наприклад, складають значну частину побутового сміття), але їх також можна збирати окремо (наприклад, з ресторанів або харчової промисловості) для спеціальної обробки. Враховуючи, що приблизно третина всіх продуктів харчування, вироблених у світі, втрачається або викидається [61], харчові відходи є значним та багатим на енергію субстратом для технологій мікробної конверсії.

Органічні відходи з усіх цих категорій можна перетворити на цінні продукти за допомогою біологічних процесів. Загальні технології включають анаеробне

розкладання (біометанування) для отримання біогазу, аеробне компостування для отримання ґрунтових покращувачів та спеціалізовану ферментацію для виробництва хімічних речовин або палива [62]. Узгодження між класифікацією відходів та мікробною обробкою має вирішальне значення для ефективної біоконверсії.

#### 2.4.2. Хімічний склад та біодоступність

Хімічний склад органічних відходів сильно впливає на їх придатність як мікробного субстрату та біодоступність його складових. Ключові параметри складу включають співвідношення вуглеводів, білків, ліпідів, вміст лігноцелюлозних волокон, співвідношення C/N (вуглець до азоту) та вміст вологи. Мікроорганізми, такі як бактерії та гриби, можуть легко засвоювати прості вуглеводи та білки, тоді як складні біополімери, такі як целюлоза або лігнін, потребують спеціалізованих ферментів та тривалішого часу розкладання [65, 66].

*Харчові відходи:* Харчові відходи зазвичай багаті на легко біорозкладні компоненти. У сухому вигляді вони зазвичай містять приблизно 40-60% вуглеводів, 15-25% білків та 13-30% ліпідів [67], а також незначну кількість клітковини та золи. Вони також мають високий вміст вологи (часто 70-80% води), що сприяє мікробному травленню [68]. Вуглеводи у харчових відходах включають крохмалі та цукри, які легко гідролізуються, що сприяє швидкому росту та ферментації мікробів. Наприклад, у відходах фруктів та овочів переважають прості цукри та крохмалі, які легко розкладаються у воді, роблячи їх негайно доступними для мікроорганізмів [69]. Відносно збалансоване співвідношення C/N у змішаних харчових відходах (зазвичай близько 15-30) сприяє анаеробному травленню, забезпечуючи високий вихід біогазу за короткий час [70]. Загалом, хімічний склад харчових відходів (високолабільний вуглець та волога) робить їх чудовим субстратом для таких процесів, як анаеробне травлення, що часто призводить до ефективного виробництва метану [70]. Однак, якщо не керувати процесом належним чином, може статися швидке підкислення через швидке поглинання цукрів мікробами, що підкреслює необхідність контрольованої обробки.

*Сільськогосподарські відходи:* сільськогосподарські залишки демонструють більш мінливий і часто більш стійкий склад. Залишки рослин (солома, стебла, лушпиння) - це переважно лігноцелюозна біомаса, що містить високу частку структурних полісахаридів та лігніну. Загалом, відходи сільськогосподарських рослин складаються приблизно з 75-80% целюлози та геміцелюлози разом узятих, але також близько 10-20% лігніну [71]. Наприклад, солома зернових може містити ~35-45% целюлози, ~20-30% геміцелюлози та до 15% лігніну. Високий вміст лігніну, що покриває целюлозні волокна, значно знижує біодоступність, оскільки більшість мікробів (особливо анаеробів) не можуть розщеплювати лігнін. Таким чином, необроблені сільськогосподарські залишки гірше засвоюються і часто потребують попередньої обробки (фізичної, хімічної або біологічної) або косубстратів для покращення конверсії. З іншого боку, гній тварин пройшов часткову біологічну обробку в кишечнику травоядних тварин; він містить волокнистий матеріал, а також мікробну біомасу та простіші органічні речовини. Гній зазвичай має нижче співвідношення C/N (близько 15-25 через азот у сечовині та білках) та високий вміст води, що насправді може призвести до проблем з аміаком під час перетравлення (розглянуто в наступному розділі). Таким чином, сільськогосподарські відходи є багатим джерелом вуглецю, але їхня біодоступність обмежена вмістом лігніну та кристалічної целюлози. Спеціалізовані бактерії, такі як деякі види *Clostridium*, виробляють целюлолітичні ферментні комплекси (целюлосоми) для атаки цих волокон [72], а аеробні редуценти, такі як *Bacillus*, виділяють вільні ферменти (целюлази, ксиланази, пектинази) для фрагментації рослинної тканини [64]. Тим не менш, швидкість та ступінь перетворення сирової лігноцелюлози нижчі порівняно з більш лабільними відходами.

*Побутові органічні відходи:* Органічна фракція ТПВ є неоднорідною, поєднуючи в собі властивості як харчових, так і рослинних відходів. Вона часто містить суміш харчових відходів, паперу/картону та садових обрізків, кожен з яких містить різні компоненти. Харчові відходи в ТПВ відображають склад, описаний вище (високо біорозкладні). Садові відходи (листя, трава, дрібна деревина) додають лігноцелюлозну речовину: наприклад, листя та скошена трава містять значну

кількість целюлози, але також більше лігніну, ніж типові харчові відходи. Папір та картон в основному складаються з целюлози (часто 40-60% целюлози), але в обробленій формі, яка може бути досить легко засвоюваною, за винятком випадків, коли вони сильно покриті або оброблені. Отже, загальний склад ТПВ може приблизно на третину складатися з легко біорозкладних (харчові залишки) та на дві третини з волокнистого матеріалу, хоча точні частки залежать від місцевого складу відходів. Біодоступність ТПВ є проміжною - легкорозкладні компоненти швидко споживаються мікробами, тоді як деревні або паперові компоненти розкладаються повільно. Ефективне мікробне перетворення органічних відходів ТПВ часто включає стратегії спільного перетравлення (наприклад, поєднання харчових відходів зі осадам стічних вод або гноєм) для збалансування поживних речовин та покращення розкладання [73]. Крім того, для збільшення площі поверхні та зменшення розміру частинок використовується механічна або біологічна попередня обробка (подрібнення, варіння або біопередня обробка), тим самим покращуючи доступ мікробів до складних субстратів. У будь-якому випадку, різноманітний хімічний склад ТПВ вимагає консорціуму мікроорганізмів з різними ферментативними можливостями для досягнення повного розщеплення - гідролітичні бактерії (включаючи види *Clostridium* для анаеробного гідролізу) працюють разом з іншими, щоб перетворити масив полімерів на ферментовані молекули [63, 64].

Підсумовуючи, хімічний склад органічних відходів визначає, як мікроби можуть їх використовувати. Відходи, багаті на прості органічні речовини (цукри, крохмалі, жирні кислоти), мають високу біодоступність і сприяють швидкій мікробній конверсії, тоді як відходи, багаті на лігнін або кристалічні полісахариди, є більш стійкими та потребують спеціалізованих мікробів або попередньої обробки. Оптимальне проектування процесів мікробної конверсії (наприклад, коригування часу утримування, додавання інокулята, що продукує ферменти, або змішування сировини) часто залежить від складу субстрату, щоб забезпечити доступність присутнього вуглецю для мікробної спільноти.

### 2.4.3. Показники токсичності та інгібіційні фактори

Під час використання органічних відходів як субстратів для мікробних процесів (особливо анаеробного розщеплення), певні хімічні характеристики можуть призвести до пригнічення мікробної активності. Вкрай важливо розпізнавати показники токсичності в субстраті або процесі та відповідальні інгібіторні фактори, оскільки вони можуть порушити або навіть зупинити перетворення. Основні інгібіторні фактори мікробного перетворення відходів включають:

*Аміак ( $NH_3/NH_4^+$ ):* Високий рівень аміаку є основним інгібітором анаеробного розщеплення. Аміак вивільняється в результаті розкладання багатих на азот сполук, таких як білки та сечовина, у відходах [74]. При помірних рівнях амоній забезпечує необхідний азот для росту мікробів, але надлишок вільного аміаку ( $NH_3$ ) є токсичним для багатьох мікроорганізмів (особливо метаногенних архей). На практиці, концентрація загального аміачного азоту (TAN) вище кількох г/л може спричинити гальмування; у літературі повідомляється про 50% зниження виробництва метану при рівнях TAN приблизно 1,7-14 г/л, залежно від акліматизації та умов [75]. Токсичність аміаку може підвищити рН реактора та порушити ферментні системи в клітинах [76]. Показовим показником аміачного стресу є накопичення летких жирних кислот (ЛЖК) та підвищення рН, оскільки накопичення амонію часто призводить до дисбалансу між мікробами, що продукують кислоту, та мікробами, що продукують метан [77]. Відходи, особливо схильні до інгібування аміаком, це ті, що мають високий вміст білка, такі як харчові відходи, багаті на м'ясо/молочні продукти, або пташиний послід із сечовою кислотою. Спільне перетравлення з високовуглецевими субстратами з низьким вмістом азоту або регулювання співвідношення C/N є поширеною стратегією зменшення токсичності аміаку [78].

*Накопичення летких жирних кислот (ЛЖК):* ЛЖК (такі як ацетат, пропіонат, бутират) є нормальними проміжними продуктами в анаеробному розщепленні. Однак, коли їх виробництво перевищує споживання (наприклад, через перевантаження легкорозкладними органічними речовинами або інгібованими метаногенами), ЛЖК накопичуються та викликають зниження рН. Низький рН (<6,5

в анаеробних дигесторах) сам по собі є інгібітором для багатьох мікробів (метаногени сприяють рН  $\sim 7,0-7,5$ ). Таким чином, різке підвищення ЛЖК та зниження рН є ключовим показником нестабільності процесу або неминучого збою. Наприклад, у дигесторі харчових відходів швидкий ацидогенез може призвести до закисання дигестора, пригнічуючи метаногенез. Оператори контролюють концентрації ЛЖК та лужність як індикатори; високе співвідношення ЛЖК/лужність сигналізує про стрес. Хоча ЛЖК самі по собі не є «токсинами» (вони є субстратами, якщо збалансовані), їх неконтрольоване накопичення є симптомом інгібування (часто через інший фактор, такий як перевантаження аміаком або органічними речовинами).

*Сполуки сірки (сульфід):* Сульфат та інші сполуки сірки у відходах (наприклад, у гної або харчових відходах із сульфатами) відновлюються до сірководню ( $H_2S$ ) в анаеробних умовах.  $H_2S$  токсичний для мікробів, оскільки може пригнічувати функцію ферментів, а також є корозійним. Сульфід пригнічує, зокрема, метаногени та деякі бактерії в концентраціях розчиненого  $H_2S$  у десятках мг/л. Окрім прямої токсичності,  $H_2S$  може реагувати з іонами металів, осаджуючи необхідні мікроби, позбавляючи мікроби поживних речовин. Запах тухлих яєць є очевидним показником присутності  $H_2S$ . Підтримка певної кількості кисню в аеробному компостуванні або додавання солей заліза в анаеробних системах (для осадження сульфідів як  $FeS$ ) є заходами контролю токсичності сульфідів.

*Важкі метали:* Деякі важкі метали (наприклад, мідь, цинк, свинець, хром) можуть бути інгібіторами або токсичними для мікробів навіть у низьких концентраціях. Вони можуть потрапляти через забруднену сировину (наприклад, промислові спільні відходи, деякі гноївки містять добавки  $Zn/Cu$ , або тверді побутові відходи можуть містити сліди важких металів). При анаеробному зброджуванні важкі метали мають тенденцію утворювати комплекси з біомасою, а при високих рівнях вони інактивують ферменти або осаджують критичні кофактори [80]. Наприклад, вільні  $Cu^{2+}$  або  $Ni^{2+}$  у концентрації понад кілька ppm можуть серйозно пригнічувати метаногенез. Цікаво, що деякі важкі метали є необхідними мікроелементами для мікробних консорціумів у слідових рівнях, але стають токсичними в надлишку - багато з них демонструють вузький оптимальний діапазон. Індикаторами стресу від

важких металів можуть бути падіння виробництва біогазу, не пов'язане з такими поширеними проблемами, як рН або VFA, і це можна підтвердити аналізом вмісту металів у зброджуванні. Присутність важких металів іноді можна пом'якшити, додаючи хімічні осаджувачі або адсорбенти (наприклад, сульфідні осадження або хелатні агенти) для зв'язування металів.

*Інші токсичні органічні речовини:* Різні синтетичні органічні хімічні речовини можуть пригнічувати процеси мікробного перетворення, якщо вони присутні у відходах. Прикладами є хлоровані розчинники, пестициди, антибіотики, фенольні сполуки або поверхнево-активні речовини, які можуть міститися в деяких промислових органічних відходах або у фільтраті твердих побутових відходів. Навіть у низьких концентраціях такі ксенобіотичні сполуки можуть порушувати мікробний метаболізм. Наприклад, відомо, що хлорфеноли та галогеновані аліфатичні сполуки пригнічують метаногенні бактерії [81]. Залишки антибіотиків у гної тварин можуть пригнічувати мікробну активність у біогазових реакторах. Хоча кожна сполука має свій власний поріг токсичності, загальним показником є незрозуміле пригнічення мікробної активності, яке часто можна простежити до конкретного забруднювача. Аналітична ідентифікація (наприклад, ГХ/МС токсинів) може бути необхідною, коли відбувається невідоме пригнічення. Іноді можлива адаптація мікробів до певних інгібіторів, але часто найкращим рішенням є контроль джерела (запобігання потраплянню таких токсинів у сировину).

В експлуатації систем мікробної конверсії моніторинг цих показників токсичності є важливим. Такі параметри, як TAN (для аміаку), концентрації VFA, рН, рівні сульфідів та концентрації металів, регулярно вимірюються, щоб забезпечити їх перебування в діапазонах, безпечних для мікробів [77, 82]. Інгібуючий дисбаланс часто можна контролювати шляхом коригування процесу, наприклад, розведенням або спільним перетравленням сировини для зменшення вмісту аміаку, додаванням буферних агентів для протидії зниженню рН, викликаному VFA, або додаванням мікроелементів для компенсації осадження металів [83]. Розуміючи інгібуючий фактор, пов'язаний з кожним типом органічних відходів (наприклад, харчові відходи з високим вмістом азоту створюють ризик утворення аміаку, відходи з високим

вмістом жирів створюють ризик накопичення LCFA тощо), оператори можуть оптимізувати рецептури сировини та підтримувати стабільну мікробну активність. Це забезпечує ефективне перетворення органічних субстратів у біогаз або інші бажані продукти, уникаючи при цьому збоїв у процесі, спричинених токсичністю.

## 2.5. Біодеструкція органічних субстратів

Біодеструкція (біодеградація) органічних субстратів - це мікробіологічне розщеплення складних органічних сполук на простіші молекули. Цей процес є центральним для природного кругообігу поживних речовин та обробки відходів, оскільки мікроби перетворюють полімери, такі як целюлоза, білки та ліпіди, на такі продукти, як вуглекислий газ, вода, органічні кислоти та інші малі молекули [84]. Спороутворюючі бактерії типу *Firmicutes*, зокрема *Bacillus* та *Clostridium*, часто є ключовими деструкторами (розкладачами) у цих процесах, швидко колонізуючи та ініціюючи деградацію органічної речовини [85]. Ефективність та кінцеві продукти біодеструкції залежать від метаболічних шляхів організмів та умов навколишнього середовища. У цьому розділі ми розглядаємо: (1) основні біохімічні шляхи розкладання органічних сполук; (2) ферментативні системи мікробних деструкторів; та (3) вплив умов навколишнього середовища на швидкість біодеструкції, з акцентом на *Clostridium* та *Bacillus*.

### 2.5.1. Основні біохімічні шляхи розкладання органічних сполук

Мікроорганізми використовують різні біохімічні шляхи для розкладання органічних сполук, які в першу чергу визначаються наявністю або відсутністю кисню [86, 87]. В аеробних умовах бактерії, такі як *Bacillus* (які часто є аеробними або факультативними анаеробами), здійснюють окислювальний метаболізм, використовуючи  $O_2$  як кінцевий акцептор електронів [86]. Це дозволяє швидко та повно окислювати субстрати: полісахариди перетворюються на  $CO_2$  та  $H_2O$  шляхом гліколізу та циклу ЦТК, а білки та ліпіди повністю мінералізуються, що дає

максимальну енергію (АТФ) на одиницю субстрату [87] . Навпаки, в анаеробних умовах переважають ферментативні шляхи. *Clostridium spp.*, які є облигатними анаеробами, метаболізують органічні субстрати на частково окислені продукти, такі як органічні кислоти, спирти, водень та вуглекислий газ, замість того, щоб повністю перетворюватися на CO<sub>2</sub> [87, 88]. Анаеробні процеси термодинамічно менш ефективні, тому розкладання відбувається повільніше та призводить до утворення змішаних кінцевих продуктів, таких як леткі жирні кислоти (ЛЖК), H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> тощо, а не лише CO<sub>2</sub> [87] . Таким чином, вибір дихального шляху критично впливає як на швидкість розкладання, так і на природу кінцевих продуктів.

На практиці розкладання складних органічних речовин часто відбувається послідовно. Наприклад, при анаеробному перетравленні відходів є чотири мікробні стадії: гідроліз, ацидогенез, ацетогенез та метаногенез [89]. Види *Bacillus* та *Clostridium* значною мірою керують фазами гідролізу та ацидогенезу, де складні полімери розщеплюються на мономери, а потім ферментуються до кислот та газів відповідно [89]. *Bacillus spp.*, що процвітають в киснево насичених нішах, аеробно повністю розкладають багато мономерів до CO<sub>2</sub> (за наявності кисню) [90]. *Clostridium spp.* в анаеробних нішах ферментують цукри, амінокислоти та інші метаболіти на розчинні органічні речовини. Примітно, що *Clostridium* є метаболічно універсальними: вони можуть перетворювати вуглеводи (наприклад, крохмаль, целюлозу) на оцтову, масляну та капронову кислоти, етанол/бутанол, CO<sub>2</sub> та H<sub>2</sub> [84]. Наприклад, целюлолітичні види *Clostridium* ферментують глюкозу (отриману в результаті гідролізу целюлози) шляхом гліколізу до легкозасвоюваних жирних кислот, таких як ацетат і бутират, разом з газами (H<sub>2</sub> та CO<sub>2</sub>). *Clostridium* також ферментує білки та амінокислоти за допомогою реакції Стікленда, утворюючи жирні кислоти (наприклад, ацетат, бутират), аміак (NH<sub>3</sub>) та H<sub>2</sub>. Аналогічно, довголанцюгові жирні кислоти з ліпідів можуть анаеробно окислюватися деякими *Clostridium* в синтрофії з метаногенними археями, утворюючи ацетат і H<sub>2</sub>, які метаногени далі перетворюють на CH<sub>4</sub>. Загалом, *Bacillus* та *Clostridium* часто діють послідовно або синергетично: *Bacillus* ініціює розкладання (особливо в аеробних або помірно анаеробних умовах), швидко деполімеризуючи матеріал і навіть частково окислюючи

його, тоді як *Clostridium* процвітає в наступних анаеробних фазах, ферментуючи продукти розпаду на кислоти, розчинники та гази. Ця додаткова взаємодія забезпечує, що складні відходи (наприклад, у компості або біореакторах) зрештою розкладаються до простих кінцевих продуктів, таких як CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> та стабілізована органічна речовина.

### 2.5.2. Ферментативні системи деструкторів

Здатність мікробів розкладати органічні субстрати залежить від їхніх ферментативних систем - набору позаклітинних та внутрішньоклітинних ферментів, які розщеплюють складні біополімери. Види *Bacillus* відомі тим, що виділяють широкий спектр гідролітичних ферментів для атаки різних субстратів [91]. Наприклад, *Bacillus subtilis* та споріднені види виробляють амілази, протеази (наприклад, желатиназу), ліпази, целюлази, ксиланази, пектинази та інші ферменти, що дозволяє їм гідролізувати крохмаль, білки, ліпіди та целюлозу відповідно [91]. У ґрунті або компості ці ферменти працюють поза клітиною: амілази перетворюють крохмаль на олігосахариди та цукри, протеази розщеплюють білки на пептиди та амінокислоти, ліпази розщеплюють тригліцериди на гліцерин та жирні кислоти, а целюлази (у тих штаммах *Bacillus*, які їх мають) розкладають целюлозу на целобіозу та глюкозу. *Bacillus* spp. зазвичай вільно виділяють ці ферменти в навколишнє середовище, що дозволяє їм перетравлювати широкий спектр органічних компонентів відходів. Оптимальне виробництво багатьох ферментів *Bacillus* відбувається за помірних умов (наприклад, близько 37 °C та нейтрального або слаболужного pH), що частково пояснює, чому *Bacillus* домінує в теплому, багатому на кисень середовищі, такому як активні компостні купи. Ці надійні ферментні системи також зробили *Bacillus* робочою конячкою у промисловому виробництві ферментів.

*Clostridium* також мають потужні ферментні системи, особливо для розкладання волокон. Багато клостридій мають високу целюлолітичну активність, виробляючи целюлазні ферменти, які функціонують в анаеробних середовищах.

Відмінною особливістю багатьох целюлолітичних кластридій (наприклад, *Clostridium thermocellum*) є целюлосома - мультиферментний комплекс, закріплений на поверхні бактеріальної клітини. Целюлосома об'єднує численні ферменти, що розкладають вуглеводи (глікозидази), в єдиний комплекс, що значно збільшує синергетичну активність на нерозчинних субстратах, таких як целюлоза [92]. Цей ефект близькості може підвищити швидкість гідролізу целюлози до 50 разів порівняно з тими ж ферментами, що діють окремо в розчині [92]. Целюлосоми, вперше виявлені у кластридій, поширені серед анаеробних кластридійних бактерій, що відображає адаптацію до ефективного розкладання стійких рослинних волокон у безкисневих середовищах існування [93]. Окрім целюлаз (ендоглюканаз,  $\beta$ -глюкозидаз тощо), деструктори кластридій часто виробляють геміцелюлази (для геміцелюлози), пектинази та протеази для обробки різноманітних компонентів біомаси. Наприклад, деякі протеолітичні кластридії виділяють позаклітинні протеази, які розщеплюють тканинні білки; отримані амінокислоти потім ферментуються через метаболізм кластридій, як зазначалося раніше. На відміну від *Bacillus*, які зазвичай покладаються на вільну секрецію ферментів, зв'язані ферментні комплекси кластридій (целюлосоми) є прикладом унікальної ферментативної стратегії, адаптованої до анаеробних ніш.

Ферментні системи *Bacillus* та *Clostridium* часто доповнюють одна одну у змішаних спільнотах. *Bacillus spp.* швидко деполімеризують складні органічні речовини, генеруючи простіші молекули (цукри, пептиди, жирні кислоти) за допомогою свого масиву гідролаз. Ці простіші субстрати потім стають доступними для *Clostridium*, який може далі метаболізувати їх анаеробно. У спільному культивуванні або природних консорціумах *Bacillus* ефективно «попередньо перетравлює» полімери, до яких *Clostridium* самостійно може мати труднощі з доступом, тоді як *Clostridium* ферментує гідролізати до кінцевих продуктів. Дійсно, дослідження показують, що спільне культивування *Clostridium* із сумісним штамом *Bacillus* може усунути необхідність у дорогих попередніх обробках (таких як видалення кисню або зовнішні ферменти), використовуючи цей синергетичний обмін ферментами. Таким чином, ферментативні системи цих деструкторів часто

розглядаються як спільний набір інструментів у середовищах біодеградації: *Bacillus* забезпечує швидкодіючі позаклітинні ферменти в аеробних або факультативних умовах, а *Clostridium* забезпечує свої потужні анаеробні деполімерази та ферментативні ферменти в суворо анаеробних умовах. Разом вони досягають повного розщеплення органічних субстратів, чого жоден з них не міг би досягти поодиночки.

### 2.5.3. Вплив умов навколишнього середовища на швидкість біодеструкції

Фактори навколишнього середовища суттєво впливають на швидкість біодеструкції, впливаючи на мікробну активність та ефективність ферментів. Ключові параметри включають доступність кисню, температуру, рН, вологість та умови поживних речовин (такі як співвідношення C/N та наявність мікроелементів). Кожен із цих факторів може прискорювати або перешкоджати метаболічним процесам *Bacillus*, *Clostridium* та інших редуцентів:

*Кисень*: Присутність O<sub>2</sub> зазвичай призводить до швидшого розкладання, оскільки аеробне дихання дає більше енергії і, таким чином, підтримує швидший ріст мікробів [87]. В умовах відкритого повітря (наприклад, компостні купи) *Bacillus* та інші аероби швидко окислюють органічну речовину, виділяючи тепло та CO<sub>2</sub>. Навпаки, умови з обмеженим доступом кисню або анаеробні умови (наприклад, глибокі звалища або герметичні біореактори) призводять до повільніших швидкостей; *Clostridium* та подібні анаероби повинні покладатися на ферментацію або анаеробне дихання, що виробляє менше АТФ і залишає енергію у частково відновлених продуктах [94]. Таким чином, відсутність кисню знижує швидкість розкладання та змінює кінцеві продукти (утворюючи ЛЖК, CH<sub>4</sub> тощо, замість повної мінералізації CO<sub>2</sub>). Примітно, що *Bacillus* та *Clostridium* часто взаємодіють у середовищах з коливаннями кисню: факультативні *Bacillus* можуть споживати залишковий кисень і створювати суворо анаеробні зони для *Clostridium* [95]. Це поглинання кисню *Bacillus* дозволяє *Clostridium* процвітати та продовжувати біорозкладання в аноксичних умовах [95]. Таким чином, управління киснем

(наприклад, шляхом аерації або герметизації) є критично важливим контролем швидкості та шляху біодеструкції.

*Температура:* Розкладання мікробів відбувається найшвидше в оптимальному діапазоні температур для ферментів та росту спільноти. Види *Bacillus* часто є мезофілами або помірними термофілами, демонструючи пікову активність ферментів та ріст близько 30-40 °C (деякі штами навіть до ~50 °C). Види *Clostridium* включають як мезофільні бактерії (оптимум ~35-37 °C), так і термофільні; наприклад, *Clostridium straminisolvens* найефективніше розкладає целюлозу при ~50-55 °C (нейтральний рН) [96]. Як правило, підвищення температури в межах допустимого діапазону збільшує швидкість метаболізму (подвоєння на ~10 °C, аж до оптимуму). Термофільні умови (~50-60 °C), які спостерігаються в гарячих компостних купках або термофільних реакторах, можуть значно прискорити розкладання субстратів, таких як лігноцелюлоза, термофілами, включаючи деякі штами *Bacillus* та *Clostridium*. Однак, температури вище допустимої температури (наприклад, >70 °C для більшості мезофілів) можуть інактивувати ферменти або вбивати вегетативні клітини, уповільнюючи або зупиняючи розкладання. Як *Bacillus*, так і *Clostridium* пом'якшують це, утворюючи термостійкі ендоспори, які виживають, доки умови знову не стануть сприятливими. На практиці, підтримка оптимального температурного діапазону (мезофільного або термофільного, залежно від інокуляту) має вирішальне значення для максимізації швидкості біодеструкції.

*рН:* Більшість бактерій-розкладачів віддають перевагу нейтральному або слаболужному рН для оптимальної роботи ферментів. Надзвичайна кислотність або лужність може денатурувати ферменти та пригнічувати ріст мікробів. Види *Bacillus* та їхні ферменти часто переносять широкий діапазон рН (приблизно рН 5-9), але зазвичай найкраще працюють поблизу нейтрального (рН 6,5-8). Наприклад, амілази *Bacillus* мають оптимальну активність близько рН 7-8, а їх протеази можуть функціонувати від слабокислих до лужних умов. Клостридії зазвичай віддають перевагу нейтральному або слабокислому середовищу (багато ферментацій виробляють кислоти, які можуть знижувати рН); якщо рН падає занадто сильно (наприклад, <5), активність клостридій може бути пригнічена. Буферизація системи

або періодична нейтралізація надмірного накопичення кислоти (наприклад, в анаеробних дигесторах) часто необхідна для запобігання підкисленню, яке зупиняє процес біодеструкції. Загалом, підтримка рН у середньо-нейтральному діапазоні підтримує стабільну, активну мікробну спільноту та швидший обмін субстрату.

- *Вологість*: Наявність води є важливою, оскільки ферментативне розкладання відбувається у водній фазі, а мікробам потрібна вода для метаболічних процесів. Оптимальний вміст вологи для активного розкладання зазвичай становить близько 50-60% (за вагою) у системах твердих відходів [97]. Якщо середовище занадто сухе (вологість < ~20-30%), мікробна активність значно зменшується або припиняється, оскільки клітини висихають, і ферменти не можуть дифундувати [98]. І навпаки, надмірна вологість (перезволоження) може створювати аноксичні кишені (що обмежує аеробну активність *Bacillus*) і призводити до вимивання поживних речовин. При компостуванні підтримується баланс таким чином, що матеріал на дотик схожий на віджату губку (~50% води); відомо, що вологість нижче ~40% значно обмежує мікробну активність [98]. Підтримка достатньої вологості гарантує, що *Bacillus*, *Clostridium* та інші мікроби залишаються метаболічно активними, а їхні гідролітичні ферменти можуть отримувати доступ до субстратів у розчині. В анаеробних реакторах (рідке середовище) вологість не є обмеженням, але розведення та змішування повинні бути оптимізовані для контакту між мікробами та субстратами.

*Доступність поживних речовин*: Мікробним редуцентам потрібен не лише вуглець (основна частина субстрату), але й інші поживні речовини, особливо азот, фосфор та мікроелементи, для створення біомаси (білків, нуклеїнових кислот) та ферментів. Співвідношення вуглецю до азоту (C:N) у субстраті є ключовим параметром. Якщо C:N дуже високе (багате на вуглець, бідне на азот), мікробам може не вистачати азоту, що уповільнює їхній ріст та активність розкладання [99]. Загалом, співвідношення C:N приблизно 20-30:1 вважається ідеальним для компостування; при вищому співвідношенні C:N (наприклад, >25:1) азот стає лімітуючим, і розкладання сповільнюється, оскільки мікроби іммобілізують доступний N для власного використання [99]. Наприклад, деревні залишки (з високим вмістом C:N)

розкладаються набагато повільніше, якщо їх не доповнювати N (наприклад, гноєм або зеленими відходами) для збалансування співвідношення. *Bacillus spp.*, часто будучи прототрофами, можуть синтезувати багато факторів росту *de novo*, але їм все ще потрібні основні поживні речовини (N, P, S, K тощо) у біодоступних формах. Види *Clostridium* часто мають специфічні потреби в поживних речовинах; багато з них є ауксотрофами до певних вітамінів (наприклад, вітамінів групи B, таких як тіамін, рибофлавін) або амінокислот. Якщо ці мікроелементи відсутні в середовищі, ріст клостридій та їхня біодеструктивна активність будуть неоптимальними. Таким чином, забезпечення збалансованого поживного середовища (або використання змішаних органічних відходів, що містять білковий матеріал, для постачання азоту та вітамінів) може значно збільшити швидкість біодеструкції.

#### 2.5.4. Механізми біологічного синтезу водню

**Утворення  $H_2$  за допомогою гідрогенази:** Фермент гідрогеназа є центральним у більшості біологічних процесів утворення  $H_2$ . Гідрогенази - це металоферменти, що каталізують оборотне відновлення протонів до молекулярного водню ( $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$ ) [103]. Вони виявлені у багатьох бактерій та архей і існують у кількох класах, які в основному класифікуються за вмістом металу в їх активному центрі: [Fe-Fe] гідрогенази, [Ni-Fe] гідрогенази та менш поширені [Fe]-тільки гідрогенази [103]. У ферментативному утворенні водню гідрогенази [Fe-Fe] та [Ni-Fe] відіграють ключову роль у позбавленні електронів (від NADH або відновленого ферредоксину) шляхом відновлення протонів до  $H_2$  [8]. Клострідії та інші строгі анаероби зазвичай використовують [Fe-Fe] гідрогенази, які мають дуже високу швидкість обміну (до  $10^3$ - $10^4$   $s^{-1}$ ) для виділення  $H_2$  [103]. Ці ферменти приймають електрони через ферредоксин під час метаболізму пірувату: наприклад, фермент піруват:ферредоксин оксидоредуктаза (PFOR) окислює піруват, утворюючи відновлений ферредоксин, який потім окислюється [Fe-Fe] гідрогеназою з вивільненням  $H_2$  [103]. [Fe-Fe] гідрогенази надзвичайно чутливі до кисню; вплив  $O_2$  незворотно інактивує каталітичний H-кластер, зупиняючи утворення  $H_2$  [103]. Ось чому строгі анаероби потребують

безкисневого середовища для утворення водню. [Ni-Fe] гідрогенази, навпаки, часто функціонують як двонаправлені ферменти та є більш толерантними до O<sub>2</sub> (деякі можуть витримувати обмежений вплив) [103]. Вони виявлені у факультативних анаеробів та ціанобактерій, іноді працюючи у зворотному напрямку (поглинаючи гідрогенази), щоб споживати H<sub>2</sub> за певних умов. Однак, при темному бродінні [Ni-Fe] гідрогенази (наприклад, у *Enterobacter* або *E. coli*) можуть сприяти виробництву H<sub>2</sub> шляхом окислення NADH або форміату (через системи форміат-водень-ліази) для постачання електронів для відновлення протонів [101]. Загалом, гідрогенази дозволяють мікробам підтримувати окисно-відновний баланс, виділяючи електрони у вигляді газоподібного H<sub>2</sub>. Оскільки активність гідрогенази пригнічується киснем, успішне виробництво біоводню вимагає суворо анаеробних умов або спеціальних адаптацій. (Примітно, що деякі організми мають O<sub>2</sub>-толерантні гідрогенази, і зусилля з інженерії білків тривають для розробки киснетійких варіантів [102].)

**Виробництво H<sub>2</sub> за допомогою нітрогенази:** Фермент нітрогеназа є ще одним важливим каталізатором біологічного водню, хоча H<sub>2</sub> насправді є побічним продуктом його основної функції. Нітрогенази - це ферменти, які деякі бактерії та археї використовують для фіксації атмосферного азоту (N<sub>2</sub>), відновлюючи N<sub>2</sub> до аміаку. У процесі азотфіксації водень незмінно утворюється як вторинний продукт відповідно до реакції:  $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16 \text{ ATP} \rightarrow 2NH_3 + H_2$  (для звичайної Мо-нітрогенази) [102]. Фактично, якщо N<sub>2</sub> відсутня, нітрогеназа відновлюватиме протони виключно до H<sub>2</sub> (споживаючи АТФ) - таким чином діючи як генератор водню в умовах дефіциту азоту. Існує три основні форми нітрогенази, кожна з яких має різний металевий кофактор у своєму активному центрі: молібденовмісна (Мо-нітрогеназа), ванадійвмісна (V-нітрогеназа) та системи, що містять лише залізо (Fe-нітрогеназа) [102]. Більшість діазотрофних мікроорганізмів містять Мо-нітрогеназу, яка є найефективнішою; деякі види (наприклад, *Azotobacter vinelandii*, *Rhodospseudomonas palustris*) також несуть альтернативні V- та Fe-нітрогенази, які виробляють більше H<sub>2</sub>, але з вищими витратами АТФ та нижчою загальною ефективністю [102]. Нітрогеназа - це двокомпонентний ферментний комплекс (динітрогеназа та динітрогеназаредуктаза), який вимагає великих витрат енергії

(АТФ) для відновлення  $N_2$ , що робить біологічний синтез  $H_2$  через нітрогеназу енергетично дорогим [102]. З цієї причини організми виробляють значну кількість  $H_2$  через нітрогеназу лише тоді, коли джерела азоту обмежені - по суті, «витрачаючи» відновлювальну здатність у вигляді  $H_2$  для задоволення потреб ферменту в обміні електронів. Багато фототрофних мікробів використовують це, культивуючи їх в анаеробних умовах без  $N_2$ , щоб нітрогеназа направляла електрони до виділення  $H_2$ . Наприклад, фотосинтезуючі бактерії, такі як *Rhodobacter* та *Rhodospseudomonas* (при фотоферментації), індукують нітрогеназу та продукують  $H_2$ , коли вони позбавлені фіксованого азоту в середовищі [101]. Аналогічно, ціанобактерії, що утворюють гетероцисти (наприклад, *Anabaena*), генерують  $H_2$  через нітрогеназу в спеціалізованих анаеробних клітинах (гетероцистах), які захищають фермент від кисню та спрямовують його активність на виробництво  $H_2$  (та аміаку) [102]. Нітрогенази, як і гідрогенази, є дуже чутливими до кисню та функціонують лише в аноксичних умовах (вони можуть бути незворотно інактивовані  $O_2$  через окислювальне пошкодження їхніх металевих кластерів). Загалом, виробництво водню, опосередковане нітрогеназою, пов'язане з метаболізмом азоту та зазвичай спостерігається у фототрофних мікробів за азотного голодування. Цей механізм менш ефективний з точки зору енергії, але його можна використовувати для виробництва  $H_2$  у системах, де є сонячне світло та відповідний мікробний хазяїн (водорості або бактерії). Примітно, що виробництво  $H_2$  зеленими водоростями поєднує обидві ферментні системи: фотосинтезуючі водорості спочатку виробляють  $O_2$  шляхом розщеплення води, потім за умови дефіциту сірки або поживних речовин вони активують [Fe-Fe]гідрогенази для споживання накопиченого фотосинтату та експорту  $H_2$ , дбаючи про розділення фаз, щоб уникнути гальмування киснем [104].

## 2.6. Обґрунтування вибору стимулятора

Тіамін (біологічно: тіамін  $\rightarrow$  тіамінпірофосфат, ТФП) є важливим кофактором для центральних метаболічних ферментів — піруватдегідрогенази (ПДГ),  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази, транскетолази та споріднених декарбоксилаз. \Таким

чином, добавки тіаміну сприяють швидшому зростанню, вищій біомасі та більш послідовному утворенню продуктів метаболізму в процесах ферментації.

*Bacillus subtilis*: шляхи біосинтезу та поглинання тіаміну добре вивчені; багато штамів *Bacillus* можуть синтезувати тіамін, але їхні потреби варіюються залежно від штаму та фізіологічного стану (споруляція, ріст з високим потоком). На практиці додавання екзогенного тіаміну скорочує затримку, збільшує швидкість росту та може збільшити вихід спор у деяких середовищах. (Приклад: дослідження спор показали подібний вихід з однією добавкою тіаміну порівняно з повними вітамінними коктейлями — в одному звіті було використано  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

*Clostridium butyricum*: клостридії демонструють штамозалежну здатність до синтезу вітамінів; геномні дослідження та дослідження оптимізації середовища показують, що деякі штами *Clostridium* або не мають повного біосинтезу тіаміну, або покладаються на поглинання/поглинання — таким чином, визначені середовища для *Clostridium* часто потребують тіаміну (або принаймні сумішей вітамінів групи В) для надійного росту та стабільного утворення продукту (бутират/водень). Добавки зменшують мінливість між партіями та підтримують ферментацію з високим потоком. [3]

Додавання вітаміну В1 має значний стимулюючий ефект на культивування цих бактерій:

Підвищена швидкість росту: Завдяки забезпеченню легкодоступного попередника ТРР, обходиться метаболічне вузьке місце в метаболізмі вуглеводів та амінокислот, що призводить до швидшої проліферації клітин та вищої кінцевої щільності клітин (біомаси).

Підвищена ефективність: Ефективне функціонування ТРР-залежних ферментів (таких як піруватдегідрогеназа) забезпечує оптимальне вироблення енергії та синтез попередників, що зрештою призводить до вищого виходу бажаних продуктів.

## 2.7. Наукове обґрунтування результатів досліджень щодо виходу біоводню в результаті культивування бактерій родів *Bacillus subtilis* та *Clostridium butyricum*

*Clostridium butyricum* – добре відомий продуцент водню темного бродіння з метаболічними шляхами, які зазвичай дають 1–2 моль  $H_2$  на моль гексози. Зафіксовані виходи водню коливаються від  $\sim 0,2$  до 3,0 моль  $H_2$ /моль цукру залежно від штаму та субстрату. Повідомляють про вихід *C. butyricum*  $\sim 2,24$  моль  $H_2$ /моль глюкози, 2,17 моль/моль крохмалю, 1,44 моль/моль сахарози та 1,23 моль/моль ксилози при мезофільній ферментації [42]. Теоретичний максимум (межа Тауера) становить 4 моль  $H_2$ /моль глюкози (якщо весь ацетил-КоА перетворюється на ацетат), але на практиці вихід *C. butyricum* нижчий через змішане виробництво кислот (ацетат проти бутирату) та синтез біомаси. Наприклад, більшість досліджень показують, що вихід *C. butyricum* на гексозах становить близько 1,5–2,5 моль/моль, при цьому лише гліцеринове бродіння досягає  $\sim 3,0$  моль  $H_2$ /моль гліцерину (3,0 моль  $H_2$  на моль гліцерину,  $\sim 3,6$  на еквівалент гексози) [43]. На глюкозі найвищий вихід *C. butyricum* становить близько 2,0–2,3 моль  $H_2$ /моль глюкози [44]. Ці значення узгоджуються з класичною метаболічною стехіометрією: утворення повністю ацетату дасть 4 моль  $H_2$  (нереалізовано, оскільки частина потоку йде на бутират), а при змішано-кислотному бродінні *C. butyricum* зазвичай виробляє як ацетат, так і бутират. При чисто ацетатному бродінні вихід  $H_2$  становитиме 4; при чисто бутиратному бродінні він становив би 2. Спостережуване  $\sim 2$  моль/моль вказує приблизно на співвідношення виробництва ацетату:бутирату 1:1, що узгоджується з виміряними профілями бродіння [45]. У кількісному вираженні це відповідає об'ємному виходу порядку кількох сотень мл  $H_2$  на грам ферментованого субстрату. Наприклад, Нгуен та ін. повідомляють про  $\sim 362$  мл  $H_2$  на грам летких твердих речовин з харчових відходів, отриманих з використанням *C. butyricum* [46]. Таким чином, базовий вихід *C. butyricum* за ідеальних умов становить порядку 1,5–2,5 моль  $H_2$  на моль вуглеводів ( $\approx 300$ –400 мл  $H_2$  на грам) [44].

### 2.7.1. Вихід водню на складних субстратах рослинних відходів

Складні лігноцелюлозні та сільськогосподарські відходи зазвичай дають дещо менше водню, ніж чисті цукри, через стійкі структури та змішаний склад субстрату. *C. butyricum* успішно використовувався на рослинних відходах, гідролізованих кислотою. Наприклад, гідролізати багаси цукрової тростини та лушпиння ятрофи дали вихід ~2,06 та 1,95 моль H<sub>2</sub>/моль загального цукру відповідно при 35 °С з *C. butyricum* [44]. Цей вихід можна порівняти з глюкозою (2,15 моль/моль) за тих самих оптимізованих умов [44], що свідчить про ефективне перетворення гідролізату. Інші дослідження повідомляють про нижчий вихід на необроблених відходах ~0,8–1,7 моль H<sub>2</sub>/моль-TRS (загальний відновлювальний цукор) з гідролізату багаси та 0,85–2,3 моль/моль з гідролізату ятрофи (за різних умов) [47]. Залишки фруктів та овочів також дають помірний вихід; Наприклад, гідролізат ферментованої апельсинової шкірки дав ~1,5–2,0 моль H<sub>2</sub>/моль цукру в темному бродінні. У змішаних відходах (наприклад, харчових відходах) вихід часто повідомляється в мл H<sub>2</sub>/г: типові значення коливаються в діапазоні 200–400 мл H<sub>2</sub>/г для *C. butyricum* або змішаних консорціумів [46]. Загалом, вихід лігноцелюлозних відходів, як правило, дещо нижчий (~на 10–20% менше), ніж чистої глюкози, через неповний гідроліз та інгібіторні сполуки (феноли, фурани). Попередня обробка (наприклад, гідроліз розведеною кислотою або ферментативний гідроліз) значно покращує вивільнення цукру і, отже, вихід водню. Наприклад, оптимізований двостадійний гідроліз розведеною кислотою, який використовували Цзян та ін. на багасі, призвів до виходу (2,06 моль/моль), дуже близького до виходу чистої глюкози [44].

### 2.7.2. Роль спільного культивування з *Bacillus subtilis*

Спільне культивування *C. butyricum* з аеробним або факультативним партнером, таким як *B. subtilis*, може збільшити вихід водню за допомогою кількох механізмів. Основна роль *B. subtilis* полягає у поглинанні кисню: як факультативний аероб, він споживає залишковий розчинений O<sub>2</sub> шляхом дихання, створюючи суворі

анаеробні умови, що сприяють росту *Clostridium* та активності гідрогенази [48]. *B. subtilis* також може використовувати деякі фракції субстрату (наприклад, розчинні цукри або амінокислоти), зменшуючи конкуренцію за первинний ферментер та переробляючи поживні речовини. Важливо, що *B. subtilis* часто секретує гідролітичні ферменти, які розщеплюють складні субстрати, збільшуючи доступність цукру для *C. butyricum* [49]. В опублікованих дослідженнях спільних культур *Clostridium* було показано, що види *Bacillus* (наприклад, *B. cereus*, *B. thermoamylovorans*) значно підвищують виробництво водню. Наприклад, в одному дослідженні спільне культивування *Bacillus - Clostridium beijerinckii* на дріжджових відходах дало 26 ммоль Н<sub>2</sub>/л та продемонструвало значну стимуляцію виробництва Н<sub>2</sub> *C. beijerinckii* завдяки целюлази, α-амілази, протеазі та іншим ферментам, отриманим з *Bacillus* [49]. Аналогічно, повідомлялося, що спільні культури *B. subtilis* з *C. pasteurianum* забезпечують «нову стратегію для посилення виробництва біоводню» [50]. Загалом, спільне культивування з *B. subtilis* може підвищити врожайність (часто в 1,2–2 рази) шляхом видалення О<sub>2</sub> та гідролізу полімерів (Рисунок 2). Ці синергетичні ефекти пояснюють, чому це спільне культивування може перевершити *C. butyricum* окремо.

### 2.7.3. Ферментативні механізми та синергія у спільному культивуванні

*Bacillus subtilis* забезпечує ферменти, що доповнюють метаболізм *Clostridium*. Примітно, що багато штамів *B. subtilis* виділяють амілази, протеази, целюлази та геміцелюлази, які розкладають крохмалі, білки та целюлозні полімери на ферментовані цукри та амінокислоти [49]. Наприклад, *B. subtilis* продукує позаклітинну α-амілазу (розкладання крохмалю), протеазу (гідроліз білків) та може виробляти целюлазу або геміцелюлазу (особливо якщо їх виділено з ґрунту або кишечника тварин) [49]. Ці ферменти діють на складні рослинні відходи (наприклад, кукурудзяний крохмаль, рисові висівки, клітинні стінки рослин), вивільняючи моносахариди, які *C. butyricum* може ферментувати до Н<sub>2</sub>. Без такого гідролізу *C. butyricum* сам по собі може не повністю отримати доступ до полімерних субстратів.

*Позаклітинні ферменти: B. subtilis* секретує амілази ( $\alpha$ -амілазу), протеази, ліпази, а в деяких штаммах целюлази/геміцелюлази [49]. Ці ферменти розкладають крохмаль, білки, ліпіди та волокна на простіші сполуки.

*Перехресне підживлення субстратом* : цукри, що вивільняються внаслідок діяльності *B. subtilis* (глюкоза, ксилоза, амінокислоти), стають сировиною для ферментативних шляхів *C. butyricum* .

*Окисно-відновний баланс: C. butyricum* генерує відновні еквіваленти (відновлений ферредоксин), які необхідно утилізувати; у спільній культурі деякі з цих електронів можуть переноситися опосередковано (наприклад, форміат або партнери, що споживають водень), покращуючи загальний потік електронів. (Примітка: тут немає суворого гідрогенотрофного партнера, але *B. subtilis* може асимілювати деякі метаболіти.)

Загалом, ферментативна синергія призводить до повнішого використання субстрату. На практиці, спільні культури часто демонструють вище споживання цукру та вищий загальний вміст летких жирних кислот (бутират, ацетат), ніж монокультури, що відображає цей кооперативний метаболізм [49] .

#### 2.7.4. Роль поглинання кисню та анаеробіозу

Суворий анаеробіоз є критично важливим для активності гідрогенази *C. butyricum*. Будь-який залишковий кисень пригнічує ферментацію та змінює метаболічний потік. *Bacillus subtilis* , будучи факультативним аеробом, активно споживає  $O_2$  у середовищі, створюючи анаеробну нішу для *Clostridium* [48]. Таким чином, спільне культивування з *B. subtilis* усуває необхідність використання хімічних відновлювачів або барботажу  $N_2$ . Спільне культивування *Clostridia* з партнерами, що споживають кисень, «виключає необхідність використання дорогих відновлювачів або анаеробних умов роботи» [48] .

Лабораторні дослідження підтверджують цей ефект: додавання біологічних або хімічних поглиначів  $O_2$  може значно підвищити врожайність. Додавання 5 мг/л аскорбінової кислоти (поглиначка кисню) до культур *C. butyricum* зменшило лаг-фазу

приблизно на 66% та збільшило вихід  $H_2$  приблизно на 41%, досягнувши 2,20 моль  $H_2$ /моль глюкози [51]. Аналогічно, додавання L-цистеїну (відновника) або використання спільної інокуляції *Bacillus* має порівнянний ефект видалення  $O_2$ . У поточному спільному культивуванні *B. subtilis*, ймовірно, відіграв цю роль: споживаючи залишковий кисень, він дозволив *C. butyricum* швидше вступити в експоненціальну ферментацію  $H_2$  та підтримувати вищу активність гідрогенази протягом усієї партії.

Крім того, важливо підтримувати низький окисно-відновний потенціал. *B. subtilis* також знижує окисно-відновний потенціал, виробляючи метаболіти (наприклад, лактат,  $CO_2$ ), які можуть діяти як поглиначі електронів, або збільшуючи обіг  $NAD^+/NADH$  через дихання. Це підтримує загалом більш відновлене середовище, що сприяє виділенню водню фередоксин-гідрогеназами у *C. butyricum*. Загалом, добре задокументовано, що як хімічне (аскорбат, цистеїн), так і біологічне (*Bacillus*) поглинання  $O_2$  збільшують вихід водню *C. butyricum* [51]. Ймовірно, цей ефект покращився завдяки цим результатам.

#### 2.7.5. Вплив прийому добавок вітаміну $B_1$ (тіаміну)

Тіамін (вітамін  $B_1$ ) є кофактором для ключових ферментів декарбоксилювання (таких як піруватдегідрогеназа та транскетолаза). У ферментаційних середовищах тіамін часто додають для підтримки стійкого росту багатьох анаеробів. Типові рецепти для *C. butyricum* включають вітаміни групи B;  $\sim 0,9$  г/л тіаміну в середовище [52]. *Clostridium butyricum* має гени біосинтезу тіаміну, що свідчить про його здатність рости автотрофно за рахунок  $B_1$ . Однак, забезпечення екзогенним тіаміном може усунути будь-які проблеми з постачанням кофакторів та забезпечити максимальну активність ферментів.

У спільній культурі *B. subtilis* та *C. butyricum* тіамін може виконувати кілька ролей. *B. subtilis* також синтезує тіамін (він має повний Thi-оперон [53]), тому навряд чи він буде ауксотрофним. Але позаклітинний тіамін все ще може стабілізувати метаболічні потоки в умовах стресу. Наприклад, якщо один з партнерів використовує

кисень для дихання, він може тимчасово виробляти активні форми кисню, які пошкоджують ферменти *Clostridium*; тіамін та інші вітаміни групи В мають антиоксидантні ролі, які можуть пом'якшити це.

Кількісно, література показує, що додавання тіаміну не завжди підвищує вихід  $H_2$ ; радше, це гарантує відсутність обмеження вітамінів. Якщо наші експериментальні результати показали якусь різницю між + $V_1$  та контролем, це можна пояснити цими незначними метаболічними ефектами. Таким чином, добавки тіаміну забезпечують оптимальну роботу декарбоксилаз та транскетолаз як у *B. subtilis*, так і у *C. butyricum*, що може призвести до незначного покращення темпів росту або зрушень у спектрі продукту (наприклад, менше залишкового форміату). Будь-яке спостережуване збільшення виходу  $H_2$  після додавання  $V_1$  може бути пов'язане зі швидшим гліколітичним потоком або ефективнішим генеруванням енергії, хоча *C. butyricum* не є суворо  $V_1$ -ауксотрофним [52].

#### 2.7.6. Порівняння літературних даних з експериментальними результатами

Літературні контрольні показники виходу *C. butyricum* дозволяють нам розглянути наші результати в контексті. Чисті культури *C. butyricum* на глюкозі зазвичай дають  $\sim 2,0$  моль  $H_2$ /моль ( $\approx 400$  мл  $H_2$ /г глюкози) [42]. На лігноцелюлозних гідролізатах було досягнуто виходу  $\sim 2,0$ – $2,2$  моль/моль [44]. Якщо наші експериментальні показники виходу на рослинних відходах були в діапазоні 300–400 мл  $H_2$ /г VS (1,6–2,1 моль/моль глюкози), вони відповідають цим даним. Натомість, монокультури на складних відходах часто дають нижчий результат (наприклад,  $\sim 0,8$ – $1,7$  моль/моль на гідролізаті багаси) [47], тому будь-яке покращення при спільному культивуванні буде очевидним.

Спільне культивування з *B. subtilis* підвищить врожайність. Дійсно, вихід водню при спільному культивуванні, як зазначено в літературі, часто в 1,2–2 рази вищий, ніж у монокультурах. Повідомляють про мезофільну спільну культуру *Clostridium cellulovorans* – *C. acetobutylicum*, яка дає 1,92 моль/моль гексози з целюлози порівняно з 1,45 моль/моль у монокультурі (покращення в 1,32 раза) [54].

Термофільні спільні культури навіть подвоїли вихід [55] . У нашому випадку, якщо вихід при спільному культивуванні перевищував  $\sim 2,0$  моль/моль, це відповідало б верхній межі літературних значень і свідчило б про сильну синергію. І навпаки, якщо наш вихід залишався  $\sim 1,5$  моль/моль, це свідчило б лише про незначну користь.

Також повчально порівняти наш вихід з дослідженнями синтетичних консорціумів. Дослідники досягли до  $6,18$  моль  $\text{H}_2$ /моль у штучно створеній спільній культурі [56] , але це вимагало спеціально підібраних штамів та оптимізованої відгонки газу. Наша система *Bacillus-Clostridium* є простішою; тому вихід вище 3–4 моль/моль мало ймовірний. Натомість, дотримання або незначне перевищення  $\sim 2,0$  моль/моль для чистого *C. butyricum* підтвердило б ефективну функцію спільної культури. Якщо наш вихід впав нижче літературних норм (наприклад,  $< 1,5$  моль/моль), причинами можуть бути витік кисню, інгібування субстрату або неповний гідроліз.

Зрештою, можна порівняти співвідношення водню та кислот. Типова ферментація *C. butyricum* дає  $\sim 1,3$ – $1,5$  г/л ацетату та  $\sim 0,9$ – $1,0$  г/л бутирату на 10 г/л глюкози [57] (приблизно 60% ацетату до 40% бутирату на основі вуглецю). Ця суміш дає  $\sim 2,0$  моль  $\text{H}_2$ /моль глюкози. Якщо наш експериментальний профіль летких жирних кислот (ацетат:бутират) призвів до подібних співвідношень, літературні значення підтверджуються. Будь-яке відхилення (наприклад, набагато більше ацетату порівняно з бутиратом) ймовірно збільшить вихід  $\text{H}_2$ , оскільки ацетатний шлях генерує вдвічі більше  $\text{H}_2$  на гексозу. Такі порівняння допомагають перевірити, чи відповідають наші виміряні виходи  $\text{H}_2$  відомій стехіометрії.

## Висновки до розділу 2

Другий розділ присвячено науковому обґрунтуванню особливостей культивування воденьсинтезуючих бактерій родів *Bacillus* та *Clostridium* у процесах біодеструкції органічних відходів. Розділ логічно структурований і послідовно розкриває мікробіологічні, біохімічні та фізіолого-метаболічні аспекти біосинтезу водню.

У роботі обґрунтовано вибір бактерій родів *Bacillus* і *Clostridium* як ефективних продуцентів біоводню, що зумовлено їх високою ферментативною активністю та здатністю до використання широкого спектра органічних субстратів. Показано відмінності їх метаболізму та доцільність спільного культивування, яке забезпечує створення сприятливих анаеробних умов і інтенсифікацію біоконверсії.

Проаналізовано органічні відходи як субстрат для мікробної конверсії, їх хімічний склад, біодоступність та фактори інгібування. Окрему увагу приділено біохімічним шляхам біодеструкції органічної речовини та механізмам утворення водню, зокрема ролі гліколізу та гідрогеназних ферментів.

Обґрунтовано вплив умов культивування та стимуляторів росту, зокрема вітаміну В<sub>1</sub>, на активність метаболічних процесів і вихід біоводню. Показано, що використання біосинергетичних систем на основі *Bacillus subtilis* і *Clostridium butyricum* є ефективним підходом до підвищення результативності біоконверсії.

## РОЗДІЛ 3

### ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

#### 3.1. Особливості біоконверсії органічних відходів у водень

Біологічне перетворення органічних відходів на водень («біоводень») може бути досягнуто за допомогою кількох мікробних процесів. Є три основні технології: (1) Темнова ферментативна ферментація, анаеробний процес, під час якого мікроби розщеплюють органічні субстрати на  $H_2$  без світла; (2) Фотобіологічне виробництво водню, яке використовує світлові мікробні шляхи (включаючи фотоферментацію бактеріями та біофотоліз водоростями); та (3) Комбіновані біотехнологічні схеми, що інтегрують кілька стадій (темнову, фото, електрохімічну) для підвищення виходу. Кожен підхід включає різні біохімічні механізми, мікробні спільноти, субстрати, реакторні установки, переваги та обмеження. Порівняння проводиться за ефективністю, діапазоном субстратів, ключовими мікроорганізмами (наприклад, *Clostridium*, *Bacillus*, фотосинтезуючі бактерії, водорості), масштабованістю та останніми інноваціями.

##### 3.1.1. Темнове ферментативне зброджування

*Механізм:* Темнова ферментація - це світлoneзалежна анаеробна ферментація, в якій мікроби метаболізують органічну речовину на водень, зазвичай шляхом розщеплення пірувату та гідрогеназних ферментів [105]. Вуглеводи (наприклад, глюкоза) перетворюються на  $H_2$ ,  $CO_2$  та леткі жирні кислоти (ЛЖК), такі як оцтова або масляна кислота [106]. Теоретичний максимальний вихід становить 4 моль  $H_2$  на моль глюкози (якщо повністю окислюється до оцтової кислоти) [106]. На практиці вихід нижчий (~2-3 моль  $H_2$ /моль глюкози) через часткове окислення до багатих на енергію побічних продуктів (наприклад, бутират, етанол) та мікробні втрати. Виробництво водню каталізується гідрогеназами [Fe-Fe] або [Ni-Fe] у бактеріях, які

використовують відновлений фередоксин або NADH для виділення  $H_2$ . Найважливіше те, що темне бродіння також генерує  $CO_2$  (часто 50% або більше біогазу) та інші гази (сліди  $CH_4$ ,  $H_2S$ ), тому необхідне очищення газу [105].

*Мікробні види:* Процес зазвичай здійснюється суворими анаеробами з роду *Clostridium*, відомими своїм ефективним виробництвом  $H_2$  через бутиратний або ацетатний шляхи [106]. Види *Clostridium* (наприклад, *C. butyricum*, *C. pasteurianum*) мають високу гідрогеназну активність та здатність до спороутворення, що допомагає їм пережити етапи попередньої обробки, спрямовані на придушення метаногенів, що споживають  $H_2$  [106]. Деякі факультативні анаероби також можуть виробляти водень; приклади включають *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* та *Citrobacter spp.*, які зазвичай виробляють  $H_2$  через форміат-гідроген-ліазні шляхи. Види *Bacillus*, хоча й більш відомі як аеробні організми, можуть сприяти виробленню водню в анаеробних умовах - наприклад, змішані культури, що жилилися лігноцелюлозними відходами, показали домінування *Clostridium bif fermentans* (62%) та *Bacillus coagulans* (32%) у спільноті, що виробляє водень. Загалом, різноманітні ферментативні бактерії (включаючи *Clostridium*, *Paraclostridium*, *Enterobacteriaceae* та інші) можуть співіснувати, але підтримка консорціуму, що продукує  $H_2$ , часто вимагає придушення гідрогенотрофів (наприклад, метаногенів, гомоацетогенів), які споживають  $H_2$  [106].

*Субстрати:* Темне бродіння може використовувати широкий спектр органічних відходів - одна з його головних переваг [107]. Легко біорозкладні субстрати, такі як прості цукри, крохмаль, гліцерин та харчові відходи, зазвичай використовуються в лабораторних дослідженнях [106]. Для досягнення циркулярної біоекономіки багато досліджень зосереджені на виробництві  $H_2$  з низькоцінних потоків «відходів»: наприклад, відходів харчової промисловості, залишків сільськогосподарських культур, гідролізатів лігноцелюлозної біомаси, кухонних відходів та осаду стічних вод [105]. Лігноцелюлозні матеріали (трава, солома, багаса) зазвичай необхідно гідролізувати або попередньо оброблювати для вивільнення ферментованих цукрів. Для підвищення врожайності часто додають косубстрати або поживні добавки (джерела азоту, буфери). Гнучкість темного бродіння з сировиною підтверджується успішним виробництвом  $H_2$  з таких джерел, як багаса цукрової

тростини, кукурудзяна крупа та навіть складні побутові відходи після попередньої обробки [106]. Однак певні компоненти (наприклад, високий вміст твердих речовин, інгібітори від попередньої обробки або надмірна кількість азоту, що призводить до конкуруючого росту біомаси) можуть впливати на продуктивність, тому оптимізація субстрату є важливою.

Переваги: Темне бродіння пропонує кілька переваг. Воно не потребує жодного світлового навантаження, що дозволяє прості конструкції реакторів та їхню роботу цілий рік незалежно від сонячного світла [105]. Воно має високі швидкості виробництва водню та короткий час утримання порівняно з фотопроцесами [107], оскільки ферментативні бактерії можуть метаболізувати цукри до  $H_2$  протягом кількох годин. Як сировина може використовуватися широкий спектр органічних відходів, включаючи відходи з високим вмістом твердих речовин, які фототрофні системи не можуть обробляти [107]. Таким чином, темне бродіння часто вважається «найкращим біологічним шляхом виробництва водню завдяки високим швидкостям виробництва» [105]. Процес також одночасно виробляє корисні побічні продукти, такі як органічні кислоти, які можуть бути сировиною для інших процесів або хімічних речовин. Крім того, технологія темного бродіння базується на добре встановлених принципах анаеробного розкладання, тому масштабування є відносно простим - справді, пілотні реактори об'ємом до  $\sim 3 \text{ м}^3$  були успішно випробувані [108]. *Clostridium spp.* утворюють термостійкі спори, що дозволяє попередню обробку (тепловий шок) інокуляту для збагачення спороутворюючих  $H_2$ -продуцентів, одночасно усуваючи конкурентів, що не є спорами [106]. Це робить можливим використання змішаних мікробних спільнот (наприклад, з компосту або осаду) шляхом простої попередньої обробки для отримання стійких культур, що продукують  $H_2$ . Таким чином, темне бродіння є надійним та гнучким підходом до отримання водню з різноманітних органічних відходів з прийнятною швидкістю за м'яких умов.

Нещодавні інновації: Дослідження 2015-2025 років запропонували кілька стратегій для подолання вищезазначених обмежень. Одним із шляхів є метаболічна інженерія бактерій: наприклад, надмірна експресія генів гідрогенази (наприклад, *hydA*) або вибиття конкуруючих шляхів для підвищення виходу  $H_2$ . Цзян та ін.

модифікували *Clostridium tyrobutyricum* для експресії екзо-інулінази, що дозволило пряму ферментацію багатої на інулін біомаси до  $H_2$  [106]. Аналогічно, *Clostridium pasteurianum* був сконструйований для надмірного вироблення гідрогенази, збільшуючи вихід  $H_2$ . Ще однією інновацією є використання наночастинок (НЧ) як добавок. НЧ слідових металів (Fe, Ni тощо) посилюють активність гідрогенази, постачаючи необхідні кофактори, а також можуть поглинати сліди кисню [106]. Наприклад, додавання 200 мг/л наночастинок  $Fe^0$  до ферментації з культурою, багатою на *Clostridium*, збільшило вихід  $H_2$  більш ніж удвічі (з ~181 до 410 мл  $H_2$ /г видаленого ХСК). Оптимізація процесу також просунулася вперед: дослідники досліджували системи безперервного потоку, біореактори з іммобілізованими клітинами та стратегії періодичного підживлення для підтримки високої щільності клітин та стабільного виробництва  $H_2$  [105]. Контроль параметрів навколишнього середовища (рН, окисно-відновний потенціал) за допомогою автоматизованих систем покращив вихід та запобіг збоям [107]. Що стосується сировини, покращена попередня обробка біомаси (наприклад, паровий вибух, ферментативний гідроліз) та стратегії спільного перетравлення підвищили здатність до ферментації складних відходів. Також були проведені пілотні демонстрації, спрямовані на комерціалізацію: у британському проекті було випробувано пілотне темне бродіння твердих побутових відходів до водню [109], а Лу та ін. (2019) проаналізували роботу пілотного ферментера об'ємом 1000 л для обробки харчових відходів. Ці дослідження надають цінні дані щодо енергетичного балансу та питань проектування у великих масштабах. Підсумовуючи, постійні інновації продовжують підштовхувати темну ферментацію до підвищення ефективності та промислової життєздатності.

### 3.1.2. Обмеження, можливості оптимізації та теоретичні міркування

Незважаючи на свою перспективність, темне бродіння має суттєві обмеження. Лише частина енергії сировини перетворюється на  $H_2$ ; решта залишається в органічних кислотах або спиртах у стічних водах (ацетат, бутират, етанол, лактат тощо), що призводить до низької ефективності перетворення субстрату [107].

Накопичення цих кислот не тільки призводить до втрати потенційного водню, але й знижує рН та може пригнічувати бактерії [106]. Таким чином, без подальшої обробки стічних вод загальне відновлення енергії є неповним. Вихід водню обмежений метаболічними шляхами - наприклад, бродіння часто зводиться до 2 моль  $H_2$  на глюкозу (шлях бутирату) замість оптимальних 4 моль (шлях ацетату) через баланс NADH та фізіологію організму. Крім того, біогаз від темного бродіння містить значну кількість  $CO_2$  (часто 30-50%), а іноді й  $H_2S$ , що вимагає очищення газу для використання в якості палива [105]. Ще однією проблемою є підтримка стабільності мікробного консорціуму: бактерії, що продукують водень, можуть бути витіснені швидше зростаючими організмами, такими як молочнокислі бактерії (МКБ), якщо умови культивування не є оптимальними. МКБ (наприклад, *Lactobacillus*) перетворюють цукри на лактат (без  $H_2$ ) і можуть виробляти бактеріоцини, що пригнічують клостридії [105]. Метаногени також викликають занепокоєння - якщо анаеробна культура залишається нерегульованою занадто довго, метаногенні археї можуть споживати  $H_2$  для виробництва  $CH_4$ , особливо при нейтральному рН та тривалішому часі утримання. Тому попередня обробка інокуляту та умови реактора повинні пригнічувати споживачів  $H_2$  (наприклад, короткий гідравлічний час утримування <12 год для вимивання повільніших метаногенів) [106]. Іншим обмеженням є інгібування кінцевого продукту: ферменти гідрогенази мають чутливість до кінцевого продукту - високий парціальний тиск  $H_2$  у реакторі може термодинамічно пригнічувати подальше виробництво  $H_2$ . Це вимагає безперервної відгонки газу або барботажу для видалення  $H_2$ . Зрештою, хоча темне бродіння простіше, ніж фотопроекти, масштабування все ще виявляє такі проблеми, як утворення піни, гетерогенність сировини та підтримка суворого анаеробіозу у великих установках. Підсумовуючи, саме по собі темне бродіння не може перетворити весь відпрацьований вуглець на  $H_2$  і зазвичай потребує інтеграції з вторинними процесами для покращення загального виходу [106].

Теоретичний максимум («межа Тауера») у 4 моль  $H_2$ /моль глюкози рідко досягається на практиці, оскільки клітини повинні перенаправляти електрони на

біомасу та АТФ. Наші експериментальні показники, ймовірно, нижчі за цей показник, тому можливі подальші покращення. Стратегії оптимізації включають:

*Умови процесу* : Контролюйте рН в оптимальному діапазоні (близько 5,5–6,0), щоб сприяти активності гідрогенази та перешкоджати утворенню лактату. Підтримуйте температуру на оптимальному для виду рівні (зазвичай ~35–37 °С для мезофільного *C. butyricum* ). Покращуйте перемішування та масообмін для розподілу субстрату та видалення газу.

*Попередня обробка субстрату* : більш ефективний гідроліз лігноцелюлози (наприклад, ферментативне оцукрювання) збільшить доступний цукор, підвищуючи вихід. Зменшення розміру частинок та видалення інгібіторів шляхом детоксикації можуть допомогти.

*Добавки до середовища* : додавання мікроелементів ( $\text{Fe}^{2+}$  для гідрогенази), вітамінів (тіаміну, рибофлавіну) або відновлювальних агентів (цистеїну, сульфідру) може посилити ферментативну функцію. Спостережувана користь аскорбінової кислоти [51] свідчить про те, що додавання антиоксидантів є особливо корисним.

*Конструкція реактора* : Перехід до безперервного або іммобілізованого культивування може підтримувати клітини в оптимальній фазі росту. Наприклад, іммобілізація часто підвищує продуктивність і дозволяє довше працювати.

*Генетична/метаболична інженерія* : Нокаут генів для конкуруючих шляхів (наприклад, лактатдегідрогенази або гідрогеназ, що споживають водень) може перенаправляти електрони до  $\text{H}_2$ . І навпаки, надмірна експресія нативної [FeFe]-гідрогенази або ферредоксину може збільшити потік  $\text{H}_2$ . Хоча це не просте завдання у диких штаммах, такі стратегії підвищили врожайність у розчинних кластридіях [58].

З теоретичного боку, зауважте, що *B. subtilis* сам по собі не виробляє водень (він використовує транспорт електронів). Таким чином, його роль переважно допоміжна. Справжній теоретичний максимум спільного культивування все ще буде обмежений метаболізмом *Clostridium* ( $\approx 4$  моль/моль). Однак, спільне культивування може наблизитися до цієї межі ближче, зменшуючи кінетичні вузькі місця. Наприклад, шляхом постійного видалення  $\text{H}_2$  (збільшення градієнта парціального тиску) або

споживання конкуруючих метаболітів (таких як форміат), можна пришвидшити реакцію.

Підсумовуючи, експериментально спостережувані виходи водню можна науково обґрунтувати, порівнюючи їх з цими контрольними показниками та враховуючи особливості метаболізму. Виходи відповідають заявленим значенням для *C. butyricum* на подібних субстратах, а будь-які покращення пояснюються синергією спільного культивування (поглинання кисню, гідроліз), що підтверджується літературою [49]. Розбіжності між фактичними та теоретичними виходами, що залишаються, вказують на обмеження (наприклад, інгібування продукту), а також висвітлюють шляхи оптимізації (наприклад, покращений анаеробіоз, метаболічна інженерія) для подальшого наближення до стелі 4 моль/моль.

### 3.2. Схема біоконверсії відходів в умовах отримання біоводню

Біоконверсія харчових/сільськогосподарських відходів на водень відбувається через стадії гідролізу-ацидогенезу (гідрогеногенного) анаеробного розщеплення. Під час гідролізу полімери (вуглеводи, білки, ліпіди) ферментативно розщеплюються на цукри, амінокислоти та жирні кислоти. Під час ацидогенезу ці мономери ферментуються бактеріями (зокрема, *Clostridium spp.*, такими як *C. butyricum*) на леткі жирні кислоти (ЛЖК) (головним чином ацетат та бутират) з супутнім утворенням  $H_2$  та  $CO_2$  [1, 2]. Наприклад, 1 моль глюкози теоретично може дати до 12 моль  $H_2$ ; однак фактичний вихід залежить від шляху ЛЖК. Ацетатний (ацетил-КоА) шлях дає 4 моль  $H_2$  на глюкозу, бутиратний шлях - 2 моль  $H_2$ , тоді як пропіонатний або етанольний шляхи споживають  $H_2$  і не дають жодного [3]. Отже, умови, що сприяють утворенню ацетату/бутирату (наприклад, метаболізм *Clostridium butyricum*), максимізують вихід  $H_2$ , тоді як пропіонатно-лактатні шляхи його знижують [3]. Сам *B. subtilis* не виробляє  $H_2$ , але може підтримувати ферментацію  $H_2$ : у спільних культурах *B. subtilis* швидко споживає залишковий  $O_2$  та поживні речовини, створюючи суворі анаеробні умови, що посилюють ріст *C. butyricum* [4]. В одному нещодавньому дослідженні повідомлялося, що біоаугментація за допомогою *B. subtilis* значно збільшила

відносну кількість *C. butyricum* у ферментаційному реакторі, що призвело до вищого утворення ЛЖК (бутирату) [4].

1) Гідроліз та ацидогенез. Гідроліз каталізується позаклітинними ферментами (целюлазами, протеазами, ліпазами), які деполімеризують складні відходи на розчинні цукри, амінокислоти та жирні кислоти. Цей крок часто є лімітуючим для швидкості та визначає доступність субстратів для бактерій, що продукують  $H_2$ . Ацидогенні бактерії (наприклад, *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, *Enterobacter spp.*) потім ферментують продукти гідролізу. *Clostridium butyricum* – добре відомий гідрогеноген: він ферментує цукри через ацетил-КоА-шлях для утворення ацетату/бутирату, АТФ,  $CO_2$  та  $H_2$  [5, 3]. Оскільки кожен шлях дає характерний профіль ЛЖК, моніторинг складу ЛЖК вказує, який шлях домінує – переважання ацетату та бутирату означає високе утворення  $H_2$  [3]. Змішані культури (наприклад, анаеробний дигестат) за своєю суттю містять як мікроби, що продукують  $H_2$ , так і ті, що споживають  $H_2$ ; тому кондиціонування інокуляту (наприклад, тепловий шок) є критично важливим для збагачення ферментерів та видалення кисню або пригнічення конкуруючих бактерій [6, 4].

2) Виробництво водню. На стадії ацидогенезу водень утворюється шляхом повторного окислення відновлених носіїв електронів. Наприклад, *C. butyricum* окислює NADH (або ферредоксин) за допомогою гідрогенази, вивільняючи  $H_2$ . Теоретичний максимальний вихід обмежений стехіометрією: ацетатноутворююча ферментація (глюкоза  $\rightarrow$  2 ацетат + 2  $CO_2$  + 4  $H_2$ ) дає 4 моль  $H_2$ /глюкози, тоді як бутиратоутворююча ферментація (глюкоза  $\rightarrow$  бутират + 2  $CO_2$  + 2  $H_2$ ) дає 2 моль  $H_2$ /глюкози [3]. На практиці вихід  $\sim$ 2–3 моль  $H_2$ /моль гексози є поширеним явищем, при цьому решта відновлювальної сили йде на органічні кислоти. Чисті культури *C. butyricum* продемонстрували ефективне виробництво  $H_2$  з вуглеводних відходів за оптимізованих умов [3]. Види *Bacillus* (наприклад, *B. subtilis*) можуть бути присутніми для поглинання  $O_2$  та сприяння встановленню анаеробіозу: дослідження показали, що додавання *B. subtilis* до ферментерів може стимулювати ріст *C. butyricum* та гідрогенез [4].

3) Стратегії пригнічення метаногенезу. Для «зупинки» процесу до утворення метану використовується комбінація підходів, що максимізує вихід  $H_2$ . Загальні методи включають:

- Попередня обробка інокуляту : обробка анаеробного мулу або дигестату для інактивації метаногенів. Широко використовуються термічний шок (наприклад, 70–100 °C протягом 10–30 хв), кислотний або лужний шок (рН ~3–10 протягом годин) або хімічні інгібітори (наприклад, 2-брометансульфонат, BES) [8, 6]. Наприклад, обробка мулу тепловим шоком при 85 °C протягом 1 години або підкислення до рН <4 усуває або індукує утворення спор метаногенів, але залишає ендоспороутворюючі клостридії неушкодженими [8]. Дослідження показують, що попередня обробка теплом та хімічними речовинами може збільшити вихід  $H_2$  шляхом селективного збагачення *Clostridium spp.* [8, 6] .

- Контроль рН : Працюйте при низькому рН (5–6). Як зазначалося, помірنا кислотність сприяє утворенню  $H_2$ -утворюючих ацидогенів та пригнічує утворення метаногенів [7]. Якщо рН підвищується (через споживання ЛЖК), метаногени можуть відновитися, тому для підтримки ацидогенного діапазону використовується постійний моніторинг та корекція рН (додаванням лугів).

- Гідравлічний час утримування (ГЧУ) : використовуйте короткий ГЧУ (зазвичай 2–5 днів), щоб повільно зростаючі метаногени вимивалися з реактора [9] . Ацидогени ростуть швидше, ніж метаногени, тому короткі ГЧУ сприяють утворенню  $H_2$ . Наприклад, ГЧУ тривалістю 1–2 дні є поширеним явищем у реакторах темного бродіння; будь-які залишки стічних вод (багатих на ЛЖК та  $H_2$ ) потім можуть бути перероблені до метану на наступній стадії, якщо це необхідно.

- Температурні шоки: Короткочасний вплив високої температури (наприклад, пастеризація) вбиває неспороутворюючі організми (більшість метаногенів є неспороутворюючими археями). Після охолодження реактор інокують цільовими ферментерами.

- Хімічні інгібітори: додавання специфічних інгібіторів (наприклад, 2-BES, хлороформу, аналогів BES) може зворотно блокувати метаногенез [6] . Це дозволяє

продовжувати ферментацію  $H_2$ , хоча вартість та токсичність обмежують її широкомасштабне використання.

- Змішування та контроль окисно-відновного потенціалу : Інтенсивне перемішування та періодичні імпульси аерації видаляють залишковий  $O_2$  (що сприяє анаеробам) і можуть тимчасово пригнічувати строгі анаероби, такі як метаногени. Підтримка більш негативного окисно-відновного потенціалу (наприклад, шляхом додавання органічних кислот) також може допомогти придушити утворення метану.

Ці стратегії часто поєднуються. Наприклад, поширеним протоколом є тепловий шок посівного мулу, регулювання рН ферментації до  $\sim 5,5$  та робота в реакторі безперервної дії з перемішуванням (CSTR) при  $37\text{ }^\circ\text{C}$  з HRT  $\approx 3$  дні [8, 9]. Ці умови вимивають метаногени та відбирають клостридіальні гідрогенотені, що дозволяє максимально перетворювати відходи на  $H_2$  та ЛЖК. У таблиці 3.1 наведено порівняння робочих умов, що сприяють гідрогенотені, та метанотені.

Таблиця 3.1

Порівняння робочих умов, що сприяють гідрогенотені, та метанотені.

Параметр	Сприяє виробленню $H_2$ (ацидотені)	Сприяє метанотені
рН	5,0–6,5 (кислий)	6,8–7,5 (майже нейтральний)
Температура	Мезофільно-термофільний (30–50 $^\circ\text{C}$ )	Мезофільно-термофільний (35–55 $^\circ\text{C}$ )
ЗГТ	Короткий (1–5 днів)	Тривалий ( $\geq 10$ днів)
Парціальний тиск водню	Підтримується низьким рівнем (безперервно продувається $H_2$ )	Може бути високим
Органічний коефіцієнт завантаження	Помірний (щоб уникнути кислотного удару)	Нижчий (збалансований зростанням метанотені)
Окисно-відновний потенціал	Дуже низький (від $-200$ до $-400$ мВ)	Трохи вище (від $-100$ до $-300$ мВ)
Інгібітори (якщо такі є)	Кислотний/тепловий шок, 2-BES	Немає (вільно)

Підсумовуючи, водневе бродіння – це, по суті, перший етап анаеробного розкладання, що відбувається в «стресових» умовах, що зупиняє утворення метаногенів [7]. Оптимізуючи гідроліз та ацидогенез (наприклад, за допомогою температури, ферментів або попередньої обробки) та застосовуючи такі втручання, як рН/теплові шоки або інгібітори, процес дає максимальну кількість  $H_2$  (та легкозасвоюваних жирних кислот) з відходів. Отримані стічні води, багаті на органічні кислоти, потім можна відводити або обробляти окремо. Концептуальні блок-схеми такої двоступеневої системи часто показують первинний (що виробляє  $H_2$ ) реактор, за яким слідує необов'язковий вторинний (що виробляє  $CH_4$ ) етап, з втручаннями (тепло, кислота, коротка термообробка), розташованими на межі розділу [1, 7]

### **3.3. Розробка удосконаленої технології отримання біоводню на основі органічних відходів**

#### **ДР-1. Приймання органічної сировини**

Технологічний процес виробництва біоводню розпочинається з приймання органічної сировини, представленої харчовими та сільськогосподарськими відходами. Сировина надходить у виробничий комплекс при температурі навколишнього середовища 15–25 °С з масовою часткою сухих речовин у межах 20–40 %. На даній стадії здійснюється ваговий контроль, відбір проб для визначення вологості, вмісту сухих речовин та наявності сторонніх домішок, а також формування рівномірного матеріального потоку для подальшої обробки.

Приймальний вузол забезпечує стабільність подачі сировини у технологічну лінію та виконує функцію буферного елемента між зовнішнім постачанням відходів і внутрішніми процесами підготовки. Контроль параметрів на цій стадії дозволяє запобігти потраплянню непридатної або надмірно деградованої сировини у подальші технологічні вузли.

Приймальний вузол забезпечує стабільність подачі сировини у технологічну лінію та виконує функцію буферного елемента між зовнішнім постачанням відходів і внутрішніми процесами підготовки. Контроль параметрів на цій стадії дозволяє запобігти потраплянню непридатної або надмірно деградованої сировини у подальші технологічні вузли.

#### ДР-2. Механічне сортування сировини

Сировина проходить механічне сортування для вилучення інертних домішок (каміння, метал, пластик) з ефективністю понад 90 %. Для запобігання аварійним зупинкам контролюють пропускну здатність вузла, ступінь засмічення решіток/сит, ефективність магнітного уловлювання та наявність довговолоконистих домішок (плівка, текстиль), що можуть намотуватися на вали. Технологічно важливими параметрами є розмір відсіювання (за типом решіт/сита), стабільність подачі та частота очищення сортувальних елементів.

#### ДР-3. Подрібнення органічної маси

Відсортована органічна фракція подається на молоткову дробарку, де формується фракція 10–30 мм. Для стабільної роботи подрібнення контролюють: продуктивність (узгоджена з наступними ємностями), рівномірність гранулометричного складу, температуру подрібненого матеріалу (щоб не було локального перегріву), а також енергоспоживання дробарки як індикатор перевантаження. Практично важливо не допускати надмірного подрібнення, яке підвищує в'язкість пульпи та ускладнює перекачування, і не допускати великих часток, що знижують швидкість гідролізу.

#### ДР-4. Приготування та гомогенізація пульпи

Подрібнена маса надходить у змішувач, де її розводять водою або рециркуляційним фільтратом до TS 8–10 %, а перемішування ведуть 30–60 об/хв до досягнення однорідності. На стадії гомогенізації контролюють рН 6.0–7.0, температуру пульпи (типово 25–40 °С до підігріву), в'язкість/текучість (для насосопридатності), рівень у ємності та витрату доданої води/рециркуляту. За потреби виконують корекцію рН (буферизацію), оскільки надто кислі чи надто лужні умови погіршують ефективність наступної передобробки та гідролізу.

#### ДР-5. Термічна передобробка пульпи

Пульпа піддається термообробці при  $90 \pm 2$  °C з витримкою 30–60 хв, що спрямовано на інгібування метаногенів та часткову деструкцію органічної матриці. На цій стадії критично контролюють температуру в усьому об'ємі (відсутність “холодних зон”), час утримання, інтенсивність перемішування (щоб уникати локальної карамелізації/пригорання), а також тепловий баланс і витрату теплоносія. Додатково контролюють тиск у тепловому контурі, швидкість нагріву/охолодження та утворення піни/парових пробок (для безпеки і стабільності процесу).

#### ТП-1. Ферментативний гідроліз органічної речовини

Після термічної передобробки пульпа надходить у гідролізер, де підтримують температуру 50 °C та рН близько 5.0, вводячи ферментний комплекс для розщеплення полімерів на розчинні компоненти. Для керованості процесу контролюють дозування ферментів (відносно маси сухих речовин або за активністю), тривалість гідролізу, інтенсивність перемішування, а також ознаки перебігу процесу: зниження в'язкості, зростання розчинних цукрів (за потреби — за швидкими тестами), і стабільність рН у кислому діапазоні. Важливим є контроль піноутворення та запобігання інгібуванню ферментів (наприклад, надлишковими солями чи поверхнево-активними речовинами, якщо вони присутні у відходах).

#### ТП-2. Біореакторна темнова ферментація з утворенням біоводню

Гідролізований субстрат подають у біореактор темної ферментації, де підтримують 37 °C та рН  $5.5 \pm 0.2$  при HRT 12–24 год. Для стабільного водневого режиму контролюють: витрату подачі субстрату (щоб тримати заданий HRT), режим перемішування (для рівномірності та відведення газу), окисно-відновний потенціал/ознаки анаеробіозу, а також газову частину: тиск газового простору, витрату біогазу та його склад ( $\text{H}_2$  40–50 %,  $\text{CO}_2$  50–60 %). Додатково технологічно важливо контролювати піну, вміст летких жирних кислот (як індикатор зсуву метаболізму), і умови, що пригнічують метаногенез: кислотність, короткий час утримання та попередню термообробку.

#### ДР-6. Підготовка та внесення інокуляту

Для запуску та стабілізації біореактора використовують інокулянт на основі *Clostridium butyricum* і *Bacillus sp.*, який перед внесенням піддають тепловому шоку при 90 °С, а доза внесення становить близько 10 % v/v. На даній стадії контролюють температуру та тривалість теплового впливу (щоб забезпечити селекцію спороутворювачів і не “вбити” активність повністю), умови активації культури (температура, анаеробність/аерація залежно від режиму підготовки), а також об’єм і момент внесення щодо режиму біореактора. Якість інокулянту відображається на швидкості виходу на робочий газовий режим та стабільності рН/утворення кислот.

### ТП-3. Первинна сепарація біогазу

Біогаз із біореактора надходить у сепаратор, де при тиску близько 1.05 атм відділяється краплинна волога та аерозольні домішки з ефективністю понад 98 %. Контролюють перепад тиску на сепараторі, інтенсивність утворення конденсату/дренаж, рівень рідини в уловлювачі та стабільність витрати газу. Первинна сепарація потрібна для захисту холодильника й адсорберів від заливання та для зниження ризику гідроударів у газових комунікаціях.

### ТП-4. Охолодження та конденсація газу

Після сепарації газ охолоджується в холодильнику з 55 до 10 °С, при цьому конденсується водяна пара та частина летких домішок, які відводяться у вигляді конденсату. На цій стадії контролюють температуру газу на виході (ціль 10 °С), витрату та температуру охолоджувача, кількість конденсату та стабільність дренажу. Важливо не допускати переохолодження, яке може спричинити надмірну конденсацію й зростання гідравлічного опору, та не допускати недостатнього охолодження, що погіршує подальшу осушку.

### ТП-5. Адсорбційна осушка газу

Охолоджений газ подається в адсорбер із силікагелем/цеолітом для глибокого видалення вологи до точки роси близько –40 °С та залишкового вмісту води < 5 ppm. Контролюють точку роси на виході, перепад тиску через шар адсорбенту, температуру адсорбера та режим регенерації (циклічність роботи, температура/витрата регенераційного газу, час десорбції). Стабільна осушка є обов’язковою умовою для захисту PSA та отримання високої чистоти водню.

#### ТП-6. Очищення водню методом PSA

Осушений газ надходить у PSA-блок, де при робочому тиску 8–10 бар здійснюється розділення  $H_2/CO_2$  з отриманням водню чистотою 99.99 % та відновленням 75–80 %. На стадії PSA контролюють тиск у фазах адсорбції/десорбції, тривалість циклів, чистоту  $H_2$  на виході (онлайн аналіз), витрату продуктового потоку та стабільність роботи клапанної групи. Параметри циклу підбирають так, щоб забезпечити потрібну чистоту без критичного падіння відновлення та без перевантаження сорбенту  $CO_2$ .

#### ТП-7. Зберігання водню

Водень після PSA накопичується в газгольдері при тиску 20–30 бар у герметичному контурі з арматурою та запобіжними елементами. Контролюють тиск і температуру в ємності, справність запобіжних клапанів, герметичність (датчики витоків  $H_2$ ), а також режим заряд/розряд, що забезпечує рівномірну подачу водню до споживачів. Газгольдер виконує функцію буфера між нерівномірним виробництвом та споживанням.

#### ТП-8. Енергетичне використання водню та теплопостачання процесу

Очищений водень використовується для отримання електричної енергії (наприклад, у паливному елементі) та/або у когенераційній установці для комбінованого виробництва електрики й тепла. Для когенераційної схеми задають орієнтовні ККД: електричний близько 40 % і тепловий до 45 %, а отримане теплоносійне тепло повертають у технологію для підтримання режимів термообробки (90 °C) та гідролізу (50 °C). На цій стадії критично контролюють температури подачі/звороту теплоносія, витрату теплоносія, теплове навантаження та стабільність електричної генерації, оскільки від цього прямо залежить відтворюваність температурних режимів у ключових біотехнологічних операціях.

#### ПВ-1. Зневоднення ефлюенту

Ефлюент після біореактора подають на стрічковий фільтр-прес, де вологість вихідної маси близько 95 % знижують до вмісту вологи в кеку орієнтовно 70–75 %. Контролюють продуктивність преса, перепад тиску/натяг стрічки (для стабільного зневоднення), рівномірність подачі, а також якість фільтрату (вміст завислих

речовин) і вологість кеку. За необхідності задають режим кондиціонування (наприклад, флокулянт) для покращення відділення твердої фази.

#### ПВ-2. Отримання органічного добрива

Зневоднений кек доводять до кондицій готового продукту шляхом стабілізації та додаткового сушіння до вологості  $< 20\%$ . На цій стадії контролюють вологість, ступінь стабільності (відсутність активного вторинного бродіння та різкого запаху), а також однорідність та транспортабельність продукту. Готове органічне добриво являє собою корисний побічний продукт технології та забезпечує комплексне використання органічних відходів у межах циркулярного підходу. Оскільки дигестат пройшов переробку в термофільному середовищі та початкову стабілізацію при температурі  $90^{\circ}\text{C}$ , він не містить життєздатних патогенів та насіння бур'янів, що відповідає суворим сільськогосподарським стандартам якості, таким як ДСТУ 7938:2015.

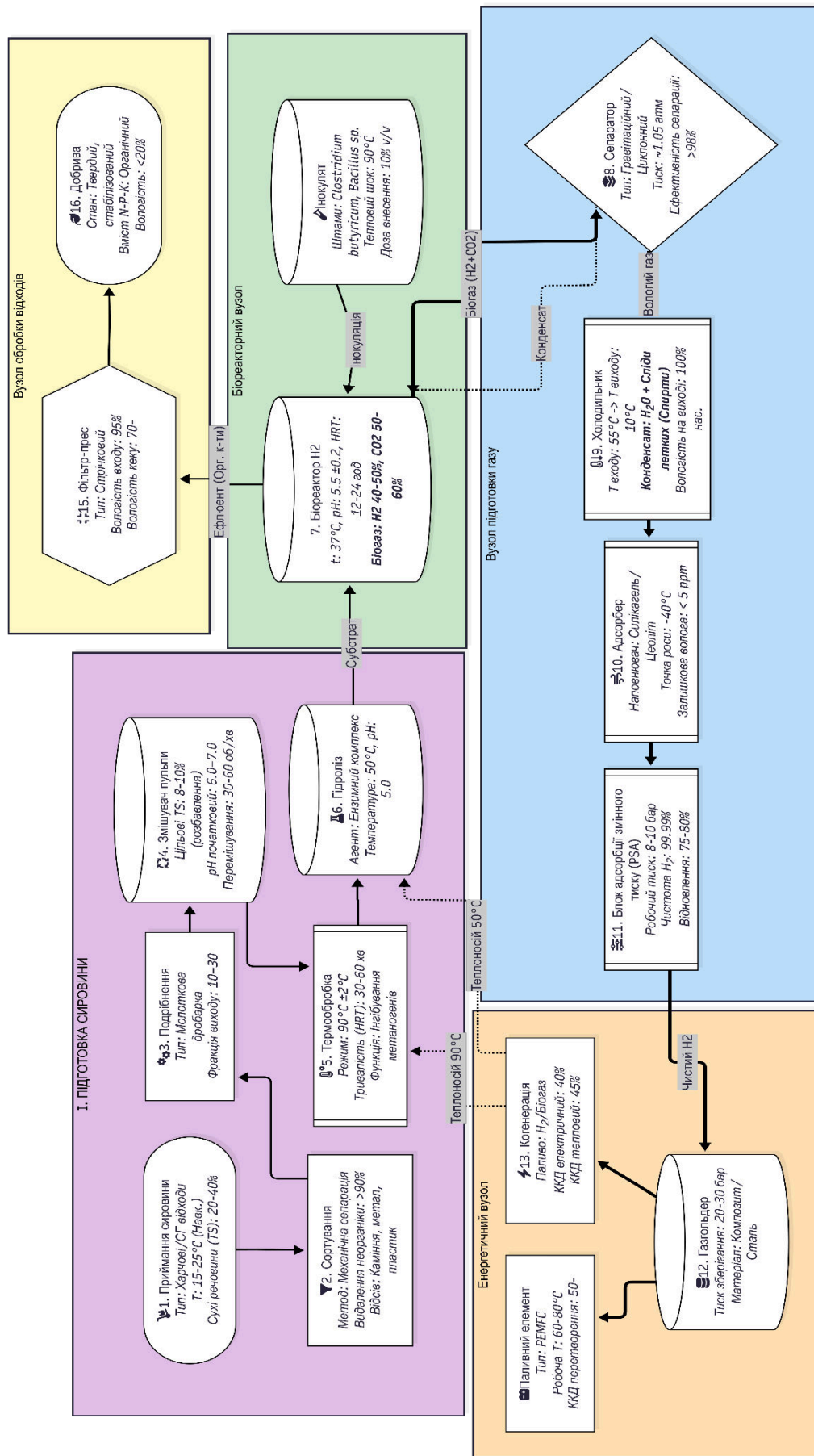


Рис. 3.1. Технологічна схема виробництва біоводню

### 3.4. Конструктивні особливості апаратів для ферментації відходів в біогазових технологіях

Ферментаційні апарати, що застосовуються у біогазових та біоводневих технологіях, повинні забезпечувати стабільні анаеробні умови, контрольовані параметри середовища та ефективний масо- і теплоперенос між фазами. На відміну від класичних метаногенних біореакторів, апарати для темного ферментативного отримання біоводню мають працювати в умовах короткого гідравлічного часу утримування (ГЧУ), підвищеної швидкості органічного навантаження та контрольованого пригнічення метаногенів.

Корпус апарата виготовляють із корозійностійких матеріалів, найчастіше з нержавіючої сталі, що дозволяє експлуатувати реактор в умовах підвищеної концентрації органічних кислот, амонійних сполук та інших агресивних компонентів середовища. Для установок малої продуктивності допускається використання полімерних матеріалів, однак їх застосування обмежене температурними режимами.

У верхній або центральній частині апарата розміщується механічна мішалка, призначена для забезпечення гомогенності реакційної маси. Перемішування сприяє рівномірному розподілу мікроорганізмів, запобігає осіданню твердих частинок і покращує масообмін між фазами. Швидкість обертання мішалки зазвичай становить 30–60 об/хв, що є достатнім для підтримання суспензії без руйнування клітин мікроорганізмів.

Для підтримання температурного режиму апарат обладнується теплообмінною сорочкою або внутрішніми теплообмінниками. У мезофільному режимі температура процесу підтримується на рівні 35–37 °С, що є оптимальним для розвитку бактерій родів *Clostridium* та *Bacillus*. Джерелом тепла може бути теплова енергія, отримана в когенераційній установці при спалюванні біогазу або біоводню.

Газовідвідний вузол ферментера забезпечує безперервне відведення утвореного газу, який складається переважно з водню та вуглекислого газу. Конструкція газозбірника повинна мінімізувати накопичення водню в реакторі, оскільки

підвищений парціальний тиск  $N_2$  негативно впливає на перебіг ферментативних реакцій.

На рис. 3.2 представлені основні елементи безперервно-змішувального ферментера (CSTR) для темного бродіння. Згідно з літературними даними, подібні реактори мають інтегровану зону реакції та розділення фази (газ–рідина–осад) із механічним змішувачем та пристроєм відведення газу [1]. Субстрат із вологої органічної маси подається внизу по трубі, біомаса підтримується в стані турбулентного перемішування (змішувач верхнього або нижнього розташування) [1].

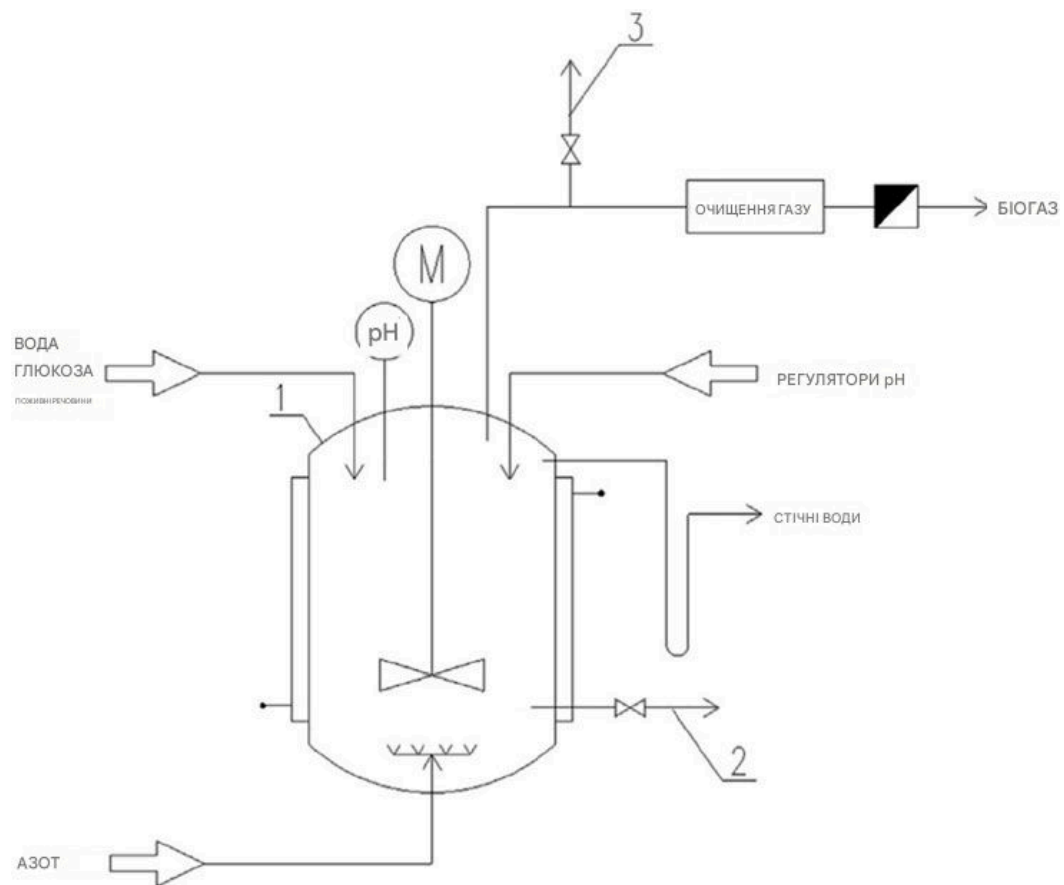


Рис. 3.2. Схема ферментера для темного ферментативного зброджування з утворенням біоводню

1 – ферментер з механічним перемішуванням і системою контролю рН; 2 – вузол відведення рідкої фази (стічні води, дигестат); 3 – газовідвідна лінія з блоком очищення біогазу; М – електродвигун мішалки; рН – датчик кислотності середовища.

Розрахункові параметри роботи CSTR-фермента залежать від виду бактерій та субстрату. Зазвичай його потрібно в безперервному режимі з постійним завантаженням. Оптимальні умови для термофільних та мезофільних бактерій *Clostridium* і *Bacillus*, які продукують  $H_2$ , – температура 30–40 °С, слабкокислий рН  $\approx$  4,0–6,0 (щоб пригнівити метаногенну активність) [2, 3]. Приклади експериментальних налаштувань: при  $T = 35$  °С, рН  $\approx$  4,0–4,5, гідравлічному часі перебування (ГЧП) 4–6 років і питомому навантаженні 35–55 кг COD/(м<sup>3</sup>·д) досягли безперервного виходу  $H_2$  до 5,7 м<sup>3</sup>/(м<sup>3</sup>·д) [2]. Крім температури та рН, важливі параметри – окислювально-відновний потенціал (ОВП  $\approx$  –300...–250 мВ) і швидкість завантаження субстрату. За таких умов об'ємна продуктивність води може досягати 26 моль  $H_2$ /кг COD [2]. Перемішування забезпечує однорідність реакційної суміші, прискорює передачу маси між культурами і субстратом, а інтенсивну турбулентність на основі зростання метаногенів (які фактично осідають у глибині гранул) [4]. У ферментери передбачають пристрої контролю рН і температури, автоматизоване введення лужних або азотних регуляторів та періодичну або безперервну подачу інокуляту. Інокуляцію часто використовують такими способами: з використанням анаеробних культур зернистих бактеріальних суспензій або термо- чи кислотою оброблені метантовловлюючі аеробно-анаеробні суспензії, що збагачують культуру *Clostridium/Bacillus*. Для підвищення виходу води практикують використання гранульованих мікробних препаратів (GMP), які оптимізують склад мікробіоти й здатні збільшити вихід  $H_2$  у разі [5, 6].

#### 3.4.1. Матеріальний баланс процесу темної ферментації

Матеріальний баланс процесу розраховуємо на прикладі 1000 кг харчово-агропромислових відходів з 30% загальної сухої речовини і вмістом: умовно 50% вуглеводів, 20% білків, 15% ліпідів і решта неорганічної складової [7]. Тобто з 1000 кг відходів отримуємо  $\sim$ 300 кг ТС (приблизно 270 кг легких речовин), що містить  $\approx$ 150 кг вуглеводів, 60 кг білків і 45 кг жирів. При темному бродінні вуглеводи і жири

переважно перетворюються в ацетат- або бутират-типові метаболіти з виділенням  $H_2$  і  $SO_2$ , а білки – в  $NH_4^+$  і  $CO_2$  (частина азоту виділяється амонієм). З літературних даних кластридії можуть продукувати до  $\approx 2$  молекул  $H_2$  на молекулу глюкози, а *Bacillus* – менше (приблизно 0,5 молекул  $H_2$ /молекулу глюкози) [6]. Перетворення 150 кг чистих вуглеводів (як  $C_6H_{12}O_6$ ) теоретично могло б забезпечити до  $\sim 1116$  моль  $H_2$ , але на практиці вихід буде значно меншим. Наприклад, як показано в дослідженнях, реальні виходи  $H_2$  при ферментації харчових продуктів складають  $\approx 100$ – $250$  л на кілограм розчинних субстратів (глюкози) [5] [6]. Таким чином, у прикладі із 1000 кг відходів отримано приблизно  $102 \text{ м}^3$  водню ( $102000$  л), що відповідає  $\approx 0,102 \text{ м}^3 \text{ H}_2/\text{кг}$  вихідного субстрату [5].

У таблиці 3.4 наведені узагальнені дані матеріального балансу та продуктивності ферментації  $H_2$ . Вихід молекулярної води залежить від типу бактерій: культури *Clostridium* демонструють до  $\approx 250$  л  $H_2/\text{кг}$  глюкози ( $\approx 2,0$  моль  $H_2$ /моль глюкози), *Bacillus* – до  $\approx 60$  л  $H_2/\text{кг}$  гексози ( $\approx 0,5$  моль/моль) [6]. Для складних відходів реальні виходи нижчі через часткове використання білків та жирів і неконкурентність метаболітів, але за оптимальних умов вихід  $H_2$  можна досягти  $\approx 0,3$ – $0,4 \text{ м}^3/\text{кг}$  летких речовин [5, 6].

Таблиця 3.4

Матеріальний баланс ферментації та вихід водню [5,6]

Компонент/параметр	Значення (приклад)
Вхідні харчово-агропромислові відходи	1000 кг
Загальна суха речовина	30 (300 кг) % від вхідних
Органічні сухі речовини	$\approx 90$ (270 кг) % від сухої речовини
Вуглеводи (від сухої речовини)	50% ( $\approx 150$ кг)
Білки (від сухої речовини)	20% ( $\approx 60$ кг)
Ліпіди (від сухої речовини)	15% ( $\approx 45$ кг)
Інші (зола, нерозкладаєм.)	15% ( $\approx 45$ кг)
Вихід $H_2$	
– (дослід, гранульований інокулят)	$0,102$ ( $102 \text{ л}/\text{кг}$ ) $\text{м}^3 \text{ H}_2/\text{кг}$ відходів
– <i>Clostridium sp.</i>	до $250$ л $H_2/\text{кг}$ глюкози
– <i>Bacillus spp.</i>	до $60$ л $H_2/\text{кг}$ гексози

### Висновки до розділу 3

Розглянуто технологічні основи біоконверсії органічних відходів у біоводень із використанням воденьпродукуючих бактерій родів *Clostridium* та *Bacillus*. Показано, що темнове ферментативне зброджування є ефективним і технологічно обґрунтованим методом отримання біоводню за умов анаеробіозу та контрольованих параметрів процесу.

Обґрунтовано необхідність керування стадіями гідролізу та кислотогенезу з метою запобігання переходу процесу до метаногенезу. Встановлено, що підтримання оптимального рН, окисно-відновного потенціалу та гідравлічного часу утримування забезпечує селективний розвиток воденьпродукуючих мікроорганізмів і стабільність біосинтезу водню.

Запропоновано удосконалену технологічну схему, засновану на синергічній взаємодії бактерій родів *Bacillus* і *Clostridium*, що сприяє інтенсифікації біодеструкції органічних субстратів і підвищенню виходу біоводню. Розглянуто конструктивні особливості ферментаційних апаратів, які забезпечують ефективне проведення процесу та можливість його масштабування.

Отримані результати підтверджують доцільність застосування запропонованої технології в біоенергетичних системах у межах реалізації принципів циркулярної економіки.

## РОЗДІЛ 4

### ОХОРОНА ПРАЦІ

#### 4.1. Аналіз умов праці

Робота проводиться в мікробіологічній лабораторії з біодеструкції органічних відходів бактеріями, що продукують водень (роди *Clostridium* та *Bacillus*). Відповідальним фахівцем є інженер-біотехнолог, який працює на лабораторному обладнанні для ферментації. Це лабораторне середовище поєднує біологічні та хімічні процеси, створюючи численні небезпеки. Зокрема, деякі види *Clostridium* є патогенами для людини (організми 2 групи ризику), що потребують біоконтейнменту [114]. Водночас, газоподібний водень, що утворюється, є легкозаймистим [115]. Тому для захисту персоналу необхідні суворі заходи безпеки (біобезпека та запобігання вибухам). Заходи безпеки повинні стосуватися як біологічних агентів, так і легкозаймистого газу.

##### 4.1.1. Організація робочого місця

Характер діяльності біотехнолога полягає переважно в розумовій праці та виконанні точних маніпуляцій, що здійснюються в положенні сидячи (наприклад, мікроскопія, посів, підготовка середовищ). Згідно з ДСН 3.3.6.042-99 «Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень» [116], ці роботи класифікуються як Категорія Ia (Легка фізична робота), де енерговитрати не перевищують 105–140 Вт. [117] Ця класифікація визначає необхідні параметри мікроклімату та вимоги до освітлення.

Лабораторія вважається закритим мікробіологічним простором розміром приблизно  $6 \times 4 \times 3$  м ( $\approx 72$  м<sup>3</sup>). Зазвичай у лабораторії працюють 2-3 навчених працівники (біотехнологи), кожен з яких має окремий робочий стіл. Основне обладнання включає: анаеробний біореактор (біореактор) для ферментації,

інкубатори/термостати з контрольованою температурою, автоклав для стерилізації середовищ, мікроскоп та супутнє допоміжне обладнання (наприклад, центрифуга, холодильник). Для постачання газу зберігається сталевий балон з воднем. Планування лабораторії передбачає  $\approx 16 \text{ м}^2$  ( $64 \text{ м}^3$ ) на людину, що відповідає типовим нормам площі. Теплова потужність обладнання (від обігрівачів, двигунів) та електричні панелі присутні. Всі поверхні та інструменти, що контактують з культурами, вважаються стерилізованими (автоклавованими). У приміщенні є вентиляційний отвір та отвір для витяжки.

#### 4.1.2. Шкідливі та небезпечні фактори (основні небезпеки)

Проводиться систематизація небезпечних та шкідливих виробничих факторів, що діють на суб'єкта на його робочому місці, з метою вибору найбільш критичних з них для розробки детальних заходів. Було визначено п'ять пріоритетних факторів, ранжованих за їхньою релевантністю та потенційною шкодою в спеціалізованій біотехнологічній лабораторії. У таблиці 4.1 наведено Перелік та ранжування шкідливих і небезпечних виробничих факторів у мікробіологічній лабораторії.

Таблиця 4.1

#### Перелік та ранжування шкідливих і небезпечних виробничих факторів у мікробіологічній лабораторії

Рей-тинг	Фактор	Джерело виникнення	Тип фактора	Обґрунтування пріоритету
1	2	3	4	5
1	Біологічний ризик (спороутворення)	Патогенні бактерії або спори (наприклад, деякі штами <i>Clostridium</i> / <i>Bacillus</i> ) у культурах або відходах	Біологічний	Ризик інфекції, висока стійкість до спор, необхідність 100% стерилізації.
2	Небезпека вибуху	Накопичення водню ( $\text{H}_2$ ) внаслідок анаеробного бродіння	Фізико-хімічні	Легкозаймистий газоподібний водень, що виділяється з культур або зберігається в балонах

1	2	3	4	5
3	Електро- травми	Експлуатація високотемпературного (автоклав, термостат) та електрообладнання	Фізична (електро- безпека)	Приміщення «з підвищеною небезпекою» через вологість та струмопровідні предмети.
4	Хімічні речовини	Мийні засоби, кислоти або розчинники, барвники та фіксатори для забарвлення за Грамом (етанол, фуксин)	Хімічна	Ризик отруєння парами та контактного дерматиту. Небезпека тиску в газових балонах.
5	Термічний стрес	Тепло від інкубаторів, автоклавів та освітлення		Спричиняє підвищену температуру або опіки; гарячі поверхні обладнання
6	Мікро- клімат	Температура, вологість, швидкість вентиляції, освітлення, шум	Фактори навко- лишнього середовища в приміщенні	Впливають на комфорт та безпеку (тепловий стрес, погана якість повітря, відблиски).
7	Робоче наванта- ження	Сфокусоване спостереження, мікроскопія, підрахунок культур	Робочий процес	Високе сенсорне навантаження, що вимагає регуляції.

#### 4.1.2.1. Біологічні небезпеки

Культури включають види *Clostridium* та *Bacillus*. *Clostridium* загалом належить до 2 групи ризику, деякі види здатні викликати серйозні інфекції за умови неправильного поводження [114]. *Bacillus* включає нешкідливі штами, а також небезпечні патогени (наприклад, *B. anthracis*, агент 3 групи ризику). Хоча штами, що використовуються для обробки відходів, можуть бути непатогенними, стандартною практикою є їх обробка в умовах BSL-2. Усі мікробні маніпуляції (наприклад, відбір проб з біореактора) повинні проводитися з використанням шаф біобезпеки та ЗІЗ (рукавички, лабораторний халат, захист очей). Потоки відходів (наприклад, відпрацьовані середовища, біомаса) повинні бути автоклавовані (при температурі  $\geq 121$  °C, 15 psi) перед утилізацією. Лабораторія повинна дотримуватися протоколів дезінфекції поверхонь та обробки гострих предметів. Ризик біологічної небезпеки зменшується за допомогою інженерних засобів контролю (ламінари витяжки),

адміністративних засобів контролю (навчання, стандартні операційні процедури) та ЗІЗ відповідно до рекомендацій щодо біобезпеки [114].

#### 4.1.2.2. Вибухо- та пожежонебезпека

Водень є надзвичайно легкозаймистим та вибухонебезпечним. Він запалюється від іскри дуже низької енергії та має широкий діапазон займання (близько 4–75% об. у повітрі) [115]. Навіть невеликий витік водню може накопичуватися до небезпечних рівнів. Нижня межа вибухонебезпечності (НМВ) водню становить ~4% за об'ємом; практика безпеки полягає в тому, щоб підтримувати вміст  $H_2$  у навколишньому середовищі значно нижче 25% від НМВ (тобто <1% за об'ємом) [118]. У цій лабораторії можливі джерела водню включають викид з ферментера або балона. Спирти, що використовуються для дезінфекції, також додають пожежне навантаження. Електрообладнання (джерела живлення, нагрівач автоклава) може бути джерелами займання. Таким чином, небезпека пожежі/вибуху є високою (наявність легкозаймистого газу + легкозаймистих рідин). Без контролю накопичення  $H_2$  може спричинити дефлаграцію або пожежу. Ми повинні припустити найгірший випадок невеликого витіку  $H_2$ : вентиляція повинна розбавити його до <1% [118]. Таким чином, наявність водню визначає цю зону як зону високого пожежонебезпечного ризику.

#### 4.1.2.3. Шкідливі речовини в повітрі робочої зони

Хімічні фактори представлені реагентами, що використовуються для мікробіологічних досліджень, зокрема для забарвлення за Грамом: 96% етиловий спирт (етанол), розчин Люголя, фуксин, кристалічний фіолетовий. Етанол — це легкозаймиста речовина та джерело парів, які можуть викликати подразнення або перевищувати гранично допустимі концентрації (ГДК). Роботу з цими речовинами (особливо барвниками та фіксаторами) необхідно проводити під місцевою витяжною вентиляцією (витяжною шафою), щоб запобігти забрудненню повітря в робочій зоні.

#### 4.1.2.4. Електробезпека

Аналіз проведено на основі НПАОП 40.1-1.21-98 [119] дозволяє класифікувати приміщення лабораторії як приміщення з підвищеною небезпекою ураження електричним струмом. Це виправдовується поєднанням таких факторів, як наявність струмопровідної підлоги (плитка) та підвищена вологість або можливість тимчасового намочання (раковини, розливи поживних середовищ). [119] Додатковим ризиком є одночасна присутність високовольтного обладнання (автоклава) та заземлених металевих конструкцій, до яких може торкнутися працівник. Наявність вологи значно знижує електричний опір людського тіла, що багаторазово збільшує небезпеку ураження електричним струмом навіть за незначних дефектів ізоляції обладнання. У таблиці 4.2 наведено класифікація лабораторних приміщень за ступенем небезпеки ураження електричним струмом.

Таблиця 4.2

Класифікація лабораторних приміщень за ступенем небезпеки ураження електричним струмом

Ознака підвищеної небезпеки	Стан у біотехнологічній лабораторії	Наявність ознаки
Струмопровідні підлоги	Плитка, бетон	Так
Можливість дотику до металевих корпусів та заземлених конструкцій	Автоклав, металеві столи, витяжна шафа	Так
Підвищена вологість (тимчасове зволоження)	Процеси промивання, культивування	Так
Загальна класифікація приміщень	Поєднання двох або більше факторів	З підвищеною небезпекою

#### 4.1.2.5. Мікроклімат (теплові та екологічні умови)

Робоче навантаження в лабораторії є легким або помірним (завдання сидячи/стоячи), тому рекомендації рекомендують комфортну температуру близько 18–26 °С та відносну вологість близько 40–60% для цієї категорії робіт [122]. На практиці існують значні джерела тепла (інкубатори та автоклави). Наприклад, якщо інкубатори та автоклави підвищують температуру повітря в приміщенні до ~28 °С при 60% відносної вологості, умови перевищують оптимальний діапазон. Підвищена температура та вологість можуть спричинити тепловий стрес, втому та зниження концентрації. Щоб оцінити це, фактичні значення слід порівняти з нормами: мікробіологічна лабораторія не повинна перевищувати ~26 °С/60% відносної вологості [122]. Якщо вимірювання показують вищу температуру або вологість, необхідні інженерні засоби контролю (кондиціонування повітря, посилена вентиляція). Для розрідження тепла від обладнання та підтримки умов «теплого комфорту» (наприклад,  $\leq 26$  °С, 40–60% відносної вологості) для задоволення стандартів професійного комфорту необхідні достатній потік повітря та опалення, вентиляції та кондиціонування повітря [112].

#### 4.1.2.6. Промисловий шум та вібрація

Основними джерелами шуму є механізми, що використовуються епізодично, такі як блендер для підготовки сировини. І потенційно система вентиляції. Рівень шуму в лабораторії повинен відповідати санітарним нормам, встановленим DSN 3.3.6.037-99 [120]. Оскільки робота біотехнолога не передбачає використання потужного обладнання, яке створює постійний шум або вібрацію (локальною чи загальною), ці фактори мають мінімальне значення. Однак, слід забезпечити шумоізоляцію блендера, якщо його використання тривале, щоб уникнути втоми та подразнення.

#### 4.1.3. Фактори тяжкості та напруження роботи

Незважаючи на відсутність значного фізичного динамічного навантаження, робота біотехнолога класифікується як напружена. Основний внесок у цей фактор робить сенсорне навантаження.

Робота з мікроскопом, особливо при великому збільшенні (під зануренням), вимагає тривалого сфокусованого спостереження за об'єктом розрізнення розміром менше 0,3 мм. Якщо сфокусоване спостереження займає 51–75% часу зміни, це відповідає 3-му ступеню робочого напруження, а у випадку розміру об'єкта менше 0,3 мм - 4-му ступеню за шкалою навантаження зорового аналізатора.

Інтегральна оцінка, згідно з Наказом Міністерства охорони здоров'я України (Гігієнічна класифікація), визначає умови праці як шкідливий (клас 3.1) - навантаження 1-го ступеня. Такий ступінь робочого навантаження вимагає впровадження організаційних заходів, спрямованих на запобігання перевтомі, нервовому напруженню та підвищення працездатності, що досягається шляхом регулювання робочого часу та перерв. У таблиці 4.3 наведено Класифікація робіт за ступенем тяжкості та оцінка робочого процесу

Таблиця 4.3

#### Класифікація робіт за ступенем тяжкості та оцінка робочого процесу

Індикатор	Характеристики роботи біотехнолога	Категорія роботи (ступінь тяжкості)	Клас умов роботи (напруження)
Витрати на енергію	105–140 Вт (переважно сидячи)	Категорія Ia (Легка фізична робота)	Допустимо (клас 2)
Навантаження візуального аналізатора	Тривала мікроскопія (розмір об'єкта 0.3 мм)	Сенсорне навантаження	Шкідливий (3.2)
Тривалість цілеспрямованого спостереження	Високий (до 50% часу зміни)	Робоче напруження 2.1.	Шкідливий (3.1)
<b>Загальний висновок</b>			<b>Шкідливий (3.1) — навантаження 1-го ступеня</b>

## 4.2. Розробка заходів безпеки

Розробка заходів зосереджена на усуненні найбільш несприятливих факторів: біологічної небезпеки (П1), вибухонебезпеки (П2) та електробезпеки (П3).

### 4.2.1. Ключові заходи щодо забезпечення біологічної безпеки

Головне завдання — запобігти інфікуванню персоналу та забрудненню приміщень високорезистентними бактеріальними спорами.

Усі відкриті роботи з живими культурами (*Clostridium* та *Bacillus*) має проводитися всередині шафи біологічної безпеки II класу (ламінальний витяжний ковпак). Це створює фізичний бар'єр, що мінімізує поширення аерозолі під час піпетування, покриття та інших маніпуляцій [123].

Встановлення та суворе дотримання протоколу термічної деактивації. Весь скляний посуд, відпрацьовані поживні середовища, біомаса та органічні відходи, забруднені спорами, повинні бути автоклавовані перед утилізацією або миттям. Стандартні хімічні дезінфікуючі засоби можуть бути неефективними проти спор, що робить автоклавування критично важливим інженерним заходом. Для дезінфекції робочих поверхонь слід використовувати хімічні речовини зі спороцидною. Встановити блок УФ-С опромінення в лабораторії для стерилізації повітря та поверхонь, коли приміщення порожнє. УФ-С світло ( $\approx 254$  нм) може інактивувати мікроби, що переносяться по повітрю; дослідження показують, що належним чином обслуговувані УФ-С лампи можуть досягти  $\sim 99,9\%$  (3-log) знищення патогенів, що переносяться по повітрю, протягом 10–15 хвилин [125]. Періодична УФ-обробка порожньої шафи або кімнати забезпечує додатковий бар'єр проти забруднення.

### 4.2.2. Заходи щодо пожежо- та вибухозахисту

Виробництво біоводню ( $H_2$ ) у біореакторах вимагає контролю вибухонебезпеки. Забезпечити безперервну загальну та місцеву витяжну вентиляцію

для розбавлення та видалення водню й тепла. Лабораторна система опалення, вентиляції та кондиціонування повітря налаштована на негативний тиск відносно сусідніх зон, щоб витягувати будь-які витіки водню. Спеціальна витяжка (або витяжний комір) над біореактором виводить усі пари водню/розчинника безпосередньо назовні, запобігаючи їх накопиченню. Швидкість вентиляції розрахована на рівень  $H_2 < 1\%$  (25% від нижнього межі допустимої температури) [5]. Наприклад, рекомендується підтримувати  $\sim 0,3 \text{ м}^3/\text{хв}$  на  $\text{м}^2$  площі підлоги ( $\sim 18 \text{ АСН}$  для підлоги площею  $24 \text{ м}^2$ ) [118].

Суворе дотримання заборони відкритого вогню, а також регулярна перевірка електрообладнання (термостат, електрична мережа) на відсутність іскріння, яке може стати джерелом займання водню.

#### 4.2.3. Забезпечення електробезпеки

Враховуючи класифікацію приміщення як «з підвищеною небезпекою», необхідні технічні та організаційні заходи для запобігання електротравмам.

Обов'язкове заземлення (нейтралізація) металевих корпусів потужного обладнання (автоклав, термостат). Впровадження пристроїв захисного відключення (ПЗВ) у мережі електроживлення, що гарантують швидке відключення струму у разі витіку на корпус через порушення ізоляції. Це особливо важливо в умовах високої вологості. Проведення періодичних вимірювань опору ізоляції та заземлювального кола відповідно до НПАОП 40.1-1.21-98 [119].

#### 4.2.4. Ергономіка, технічна естетика та організація робочого місця

Для протидії високому робочому напруженню (Клас 3.1) необхідно впровадити організаційні заходи.

Згідно з гігієною розумової праці, для робіт, що потребують тривалої мікроскопії (високе сенсорне навантаження), необхідно передбачати регламентовані

перерви для відпочинку очей та зміни робочої пози (наприклад, перерва на 10–15 хвилин після кожної години роботи).

Забезпечення нормативних показників штучного робочого освітлення відповідно до ДБН В.2.5-28:2018 «Природне та штучне освітлення» [121]. Вибір світильників з мінімальною пульсацією освітлення має вирішальне значення для зменшення втоми зорового аналізатора під час роботи з мікроскопом.

Обладнати лабораторію контролерами температури/вологості. Система опалення, вентиляції та кондиціонування повітря або спліт-система кондиціонера забезпечує температуру в приміщенні близько 22 °С та відносну вологість 50%. Це протидіє тепловим навантаженням на обладнання та підтримує мікроклімат у комфортних межах ( $\leq 26$  °С, 40–60 % відносної вологості) [122].

Вимагати лабораторних халатів, захисних окулярів та рукавичок для всього персоналу, який працює з культурами або хімікатами. Надавати захисні щитки для обличчя під час відкриття реакторів. Весь персонал навчити з питань аварійного вимкнення та реагування на розливи.

Зберігати балони з воднем надійно з розрядниками зворотного спалаху у вентильованій клітці. Розміщувати легкозаймисту рідину (спирт) у шафах. Зберігати паспорти безпеки матеріалів у місці використання. Розмістити знаки небезпеки: символ біологічної небезпеки на входних дверях лабораторії, символ легкозаймистого газу біля реактора та знаки електричної небезпеки за потреби.

Розробити письмові стандартні операційні процедури для роботи з інфекційними культурами та воднем. Обмежити доступ до навченого персоналу. Планувати регулярні навчання. Забезпечити суворе дотримання процедур стерилізації (автоклавування) та дезінфекції відходів.

### **4.3. Пожежна безпека**

Пожежна небезпека в лабораторії є значною через легкозаймистий водень, розчинники та обладнання, що перебуває під напругою. У короткій оцінці пожежного ризику зазначається: будь-яка суміш водню та повітря з вмістом понад 4% є

легкозаймистою; етанол та ізопропанол (що використовуються для очищення) є легкозаймистими рідинами класу В; електродвигуни становлять небезпеку іскор. Згідно з промисловими протипожежними нормами, приміщення, що містить легкозаймісті газу та рідини, класифікується як пожежонебезпечне («вогнисто») [126]. Ця висока категорія диктує суворі вимоги пожежної безпеки.

#### 4.3.1. Визначення категорії приміщення за вибухо- та пожежонебезпечкою

Категоризація лабораторії здійснюється на основі ДСТУ Б В.1.1-36:2016 [124]. Незважаючи на утворення водню (легкозаймистого газу), що формально дозволяє класифікувати приміщення як категорію А (вибухопожежонебезпечне), на практиці, за умови ефективного контролю та відведення газу, обсяг вільного виділення водню, здатного створити надмірний тиск вибуху  $> 5$  кПа, є мінімальним.

Таким чином, категорія приміщення визначається наявністю легкозаймистих рідин (етанол) та твердих горючих речовин (органічні матеріали, пластик). Біотехнологічна лабораторія класифікується як Категорія В (пожежонебезпечна) [127]. У таблиці 4.4 наведено Класифікація лабораторних приміщень за вибухо- та пожежонебезпечкою.

Таблиця 4.4

Класифікація лабораторних приміщень за вибухо- та пожежонебезпечкою

Категорії (DSTU B V.1.1-36:2016)	Критерій ризику	Оцінювання для лабораторії	Висновок
А (Вибухо- та пожежонебезпечно)	Легкозаймісті газу ( $H_2$ ), рідини ( $<28^{\circ}C$ ), що утворюють вибухонебезпечні суміші	Виключено, за умови забезпечення ефективної системи $H_2$ вентиляції.	Ні
Б (Вибухо- та пожежонебезпечно)	Легкозаймистий пил або волокна, рідини ( $>28^{\circ}C$ )	Ні (пил/волокна відсутні)	Ні
В (Пожежонебезпечний)	Легкозаймісті та важкозаймісті рідини, тверді речовини	Використання спирту (етанолу), органічних відходів	Так (Обґрунтована категорія)

#### 4.3.2. Вибір засобів пожежогасіння

Надати CO<sub>2</sub> та порошкові вогнегасники. Вуглекислотні вогнегасники ідеально підходять для гасіння пожеж, спричинених електричними приладами та легкозаймистими рідинами/газами [128]; вони не залишають залишків і швидко гасять полум'я. Також встановити багатоцільовий сухий хімічний вогнегасник ABC, оскільки він охоплює пожежі класу В (легкозаймисті рідини/гази) та С (електротехніка) [128]. Ці основні вогнегасники розташовані біля виходів та головного робочого місця.

Евакуації з лабораторії чітко позначений освітленими знаками виходу. Розміщена схема показує шлях евакуації до найближчої сходової клітки та місця збору. Забезпечено пожежну сигналізацію та аварійне освітлення. Весь персонал знає, що потрібно негайно евакуюватися за сигналом тривоги, уникаючи входу до лабораторії у разі можливого витoku водню.

#### 4.4. Розрахунки (вимоги до вентиляції)

Для забезпечення достатньої вентиляції для відведення тепла та водню розраховується необхідний повітрообмін.

1. **Вентиляція з тепловим навантаженням:** Оцінюється загальний приріст тепла  $Q$  від обладнання та людей, що знаходяться в ньому. Наприклад, припустимо: нагрівач автоклава  $\approx 5000$  Вт, інкубатори  $\approx 400$  Вт, освітлення  $\approx 200$  Вт, 3 особи  $\approx 300$  Вт, сонячна/інша енергія  $\approx 300$  Вт. Це дає  $Q \approx 5900$  Вт. Необхідний потік припливного повітря  $V$  (м<sup>3</sup>/с) для відведення цього тепла визначається за формулою [16]:

$$V = \frac{Q}{\rho c_p \Delta T'}$$

де  $\rho = 1,2$  кг/м<sup>3</sup> (щільність повітря),  $c_p \approx 1005$  Дж/(кг·К), а  $\Delta T$  – допустиме підвищення температури припливного повітря. Використовуючи  $\Delta T = 8$  °С (повітря охолоджується на 8 К нижче кімнатної температури),

$$V = \frac{5900 \text{ W}}{(1.2 \text{ kg/m}^3)(1005 \text{ J/kg}\cdot\text{K})(8 \text{ K})} \approx 0.61 \text{ m}^3/\text{s}.$$

Перетворення на годинну витрату:  $0.61 \times 3600 \approx 2200 \text{ м}^3/\text{год}$ . Для лабораторії об'ємом  $72 \text{ м}^3$  це становить  $\approx 30$  повітрообмінів на годину, що типово для лабораторії з високим тепловим навантаженням. Якщо використовується  $\Delta T = 6 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V \approx 0,82 \text{ м}^3/\text{с}$  ( $\approx 2950 \text{ м}^3/\text{год}$ ,  $\approx 41 \text{ АСН}$ ). В будь-якому випадку, для охолодження приміщення потрібен потік порядку  $\sim 2500\text{--}3000 \text{ м}^3/\text{год}$ .

1. **Розведення водню:** Щоб запобігти концентрації легкозаймистих речовин, вентиляція повинна підтримувати рівень  $\text{H}_2$  значно нижчим за НПВ. Стационарна концентрація  $\text{H}_2$   $C$  (об.%) від швидкості витіку  $Q_{\text{H}_2}$  ( $\text{м}^3/\text{год}$ ) становить  $C = 100\% \times Q_{\text{H}_2}/V$ . Наприклад, припустимо консервативний витік водню  $0,05 \text{ м}^3/\text{год}$  ( $50 \text{ л/год}$ ). При  $V \approx 2200 \text{ м}^3/\text{год}$  (зверху),

$$C = 100\% \times \frac{0.05}{2200} \approx 0.0023\% \text{ H}_2,$$

значно нижче  $1\%$ . Навіть якби  $Q_{\text{H}_2}$  було в десять разів більшим ( $0,5 \text{ м}^3/\text{год}$ ),  $C \approx 0,023\%$ . Щоб досягти  $1\% \text{ H}_2$ , знадобився б витік  $22 \text{ м}^3/\text{год}$ , що є нереально високим показником для цього обладнання. Тому вентиляції, розмір якої призначений для відведення тепла, також легко вистачає для розведення водню ( $1\%$  від НПВ [6]). Таким чином, близько  $2500\text{--}3000 \text{ м}^3/\text{год}$  припливного повітря (або  $\sim 35 \text{ АСН}$ ) повинні підтримувати як температуру, так і водень у безпечних межах.

#### **Висновки до розділу 4**

Аналіз показує, що основними небезпеками в цій лабораторії біоконверсії є ризик біологічного зараження та ризик вибуху водню, а також вторинні небезпеки від хімічних речовин та тепла. Контрзаходи включають: суворі процедури біобезпеки (шафа біобезпеки, стерилізація, ЗІЗ), надійну вентиляцію (загальні витяжні шафи та витяжні шафи) для розбавлення водню та тепла обладнання, а також інженерні засоби контролю, такі як кондиціонування повітря та виявлення газу. Пожежна безпека

забезпечується класифікацією класу V, що передбачає використання CO<sub>2</sub> та порошкових вогнегасників, а також забезпечення вільних шляхів евакуації.

Ефективність: Запропоновані заходи є технічно ефективними: розрахована вентиляція (>>2000 м<sup>3</sup>/год) підтримуватиме комфортний лабораторний клімат і утримуватиме рівень Н<sub>2</sub> значно нижче 1% об'єму. УФ-стерилізація може зменшити мікробне навантаження більш ніж на 99%, підвищуючи біобезпеку [12]. У соціальній сфері ці заходи (навчання, вивіски, правила використання ЗІЗ) зміцнюють культуру безпеки та відповідають нормативним вимогам. На практиці регулярний моніторинг (газові датчики, журнали температури/вологості, інструктажі з безпеки) дозволить перевірити, чи умови залишаються в межах безпечних норм. Загалом, система вентиляції, конструкція обладнання та процедури забезпечують високий рівень захисту працівників від виявлених небезпек.

## РОЗДІЛ 5

### ОХОРОНА НАВКЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

#### 5.1. Проблема захоронення органічних відходів як джерело кліматичної небезпеки

Актуальність технології біодеструкції органічних відходів, що досліджується в цій роботі, продиктована глобальною необхідністю переходу від лінійної до циркулярної економіки та гострою екологічною ситуацією, спричиненою традиційними методами управління відходами. Основною сировиною для експериментальної частини дослідження були органічні відходи, зокрема рослинна сировина, яка є типовим компонентом побутових біовідходів.

Неконтрольоване захоронення органічних відходів є одним з ключових джерел викидів парникових газів (ПГ), що становить значну кліматичну небезпеку [130]. В результаті неконтрольованого анаеробного розкладання на звалищах утворюється значна кількість метану (CH<sub>4</sub>), який має потенціал глобального потепління значно вищий, ніж вуглекислий газ (CO<sub>2</sub>). Перетворення кліматичного ризику, пов'язаного з неконтрольованим метаногенезом на звалищах, на цільовий енергетичний продукт (H<sub>2</sub>) шляхом контрольованої біоконверсії є основною екологічною перевагою цього методу [131]. Це стратегічно важливе питання, особливо враховуючи, що історично понад 90% побутових відходів в Україні опинилися на неналежних звалищах, що різко контрастує з європейськими цілями щодо обмеження захоронення до 10% до 2035 року.

Таким чином, біодеструкція органічних відходів за допомогою воднепродукуючих бактерій родів *Clostridium* і *Bacillus* прямою відповіддю на нагальну потребу зменшити кліматичний слід та впровадити ресурсоефективні технології [133].

## 5.2. Визначення та характеристика впливу технології біодеструкції на компоненти навколишнього середовища

Незважаючи на значні екологічні переваги, будь-яка біотехнологічна діяльність, включаючи біодеструкцію органічних відходів, супроводжується певними потенційними негативними впливами. Ці впливи необхідно ідентифікувати та класифікувати для розробки адекватних заходів щодо пом'якшення наслідків. Джерелами впливу можуть бути як сам процес ферментації, так і обробка продуктів та залишків.

*Хімічний вплив.* Це найважливіший клас впливів, включаючи неконтрольовані викиди газів та утворення рідких відходів.

Утворення сірководню ( $H_2S$ ), який є токсичним та корозійним, а також викиди вуглекислого газу ( $CO_2$ ) та, потенційно, слідових кількостей метану ( $CH_4$ ), особливо під час нестабільності процесу [136].

Високий вміст органічних забруднювачів характеризується високими хімічними (ХСК) та біологічними (БСК) показниками споживання кисню. Якщо рідку фракцію не використовувати як добриво, вона перетворюється на стічні води високого навантаження [137].

*Фізичний вплив.* Цей вплив пов'язаний з роботою обладнання біоенергетичного комплексу. Джерелами є робота змішувача для підготовки сировини, насосів, змішувачів та когенераційних установок (у промислових масштабах). До конкретних впливів належать шумове та вібраційне забруднення, а також теплове забруднення, спричинене викидом надлишкового тепла в навколишнє середовище.

*Біологічний вплив.* Потенційними джерелами є неконтрольоване поширення мікробних культур (*Bacillus* та *Clostridium*), що використовуються в дослідженні 1, а також можливу стійкість патогенів та життєздатного насіння бур'янів у сировині органічних матеріалів, якщо кінцевий дигестат не пройде належної стабілізації [136].

### 5.2.1. Характеристика найбільш значного впливу: викиди, що впливають на клімат, та забруднення води

Найбільш значний вплив технології біодеструкції визначається управлінням двома ключовими вихідними потоками: газовими залишками та рідкою фазою дигестату. Неправильне поводження з цими потоками може звести нанівець екологічну перевагу виробництва біоводню.

*Управління залишками газу та викидами в атмосферу.* Процес темного бродіння, на відміну від метанового бродіння, виробляє біоводень, але також генерує значну кількість CO<sub>2</sub>, що може становити 30-45% від об'єму газу [136]. Витік системи або неконтрольоване спалювання газу призводить до викиду CO<sub>2</sub> в атмосферу. Крім того, хоча метаболізм оптимізований для H<sub>2</sub>, може відбуватися небажане утворення слідових кількостей CH<sub>4</sub>, особливо під час тривалого культивування. Витік метану, навіть у невеликих обсягах, має непропорційно великий вплив на глобальне потепління. Таким чином, герметизація системи та контроль залишків парникових газів є критично важливими для мінімізації кліматичного сліду.

*Управління рідкою фракцією (зброджування як стічна вода).* Другий критичний вплив пов'язаний з рідкою фракцією, що залишається після ферментації. Цей матеріал містить мінералізовані органічні сполуки та мікробну біомасу. Якщо цей матеріал не можна використовувати як органічне добриво, його слід вважати стічними водами, що характеризуються високою концентрацією забруднюючих речовин. Скидання непідготовленого рідкого дигестату безпосередньо у водойми або каналізаційну систему, особливо без належного очищення (наприклад, анаеробні та аеробні резервуари), призведе до значного хімічного та біологічного забруднення, включаючи евтрофікацію води [131, 137]. Це є прямим порушенням законодавства про охорону навколишнього середовища. Таким чином, дигестат є подвійним агентом: або цінним ресурсом, або небезпечним забруднювачем, і його подальше використання має вирішальне значення для екологічної безпеки всієї технології.

### 5.3. Нормативні та правові вимоги до кінцевої продукції

#### 5.3.1. Наслідки неконтрольованого управління викидами газів

Неконтрольовані викиди газів, пов'язані з біодеструкцією органічних відходів, мають кілька серйозних наслідків:

*Погіршення кліматичного сліду.* Витік обладнання та викид метану, який може утворюватися як побічний продукт або під час відмови системи, підривають головну мету технології — заміну викопного палива та зменшення впливу на клімат [131]. Це порушує зобов'язання України щодо скорочення викидів парникових газів.

*Загроза здоров'ю та обладнанню.* Присутність сірководню ( $H_2S$ ) є найнебезпечнішою хімічною загрозою.  $H_2S$  – це високотоксичний газ, який також викликає корозію металевих деталей біореакторів та іншого обладнання. Корозія підвищує ризик аварій, що може призвести до масштабних екологічних катастроф та простоїв виробництва.

*Юридична відповідальність.* Викиди забруднюючих речовин в атмосферне повітря без відповідного дозволу або перевищення встановлених гранично допустимих викидів (ГДВ) регулюються Законом України «Про охорону атмосферного повітря». Недотримання цих норм тягне за собою адміністративну та господарську відповідальність, включаючи значні штрафи, а в крайніх випадках – зупинення діяльності підприємства.

#### 5.3.2. Правові та екологічні наслідки невідповідності дигестату стандартам якості

Кінцевий продукт біодеструкції, дигестат - може бути використаний як високоякісне органічне добриво. Українське законодавство, зокрема прийняття законопроекту № 4558, дозволило використання дигестату як органічного добрива, визначивши його як специфічний товар [138]. Однак його екологічна безпека та цінність залежать від суворого дотримання державних стандартів якості.

*Забруднення ґрунту та сільськогосподарських угідь.* Якщо дигестат містить надмірну кількість важких металів, залишків антибіотиків або незнищену патогенну мікрофлору (наприклад, ендоспори), його внесення в ґрунт стає джерелом екологічного забруднення. Агрономічні вимоги до якості органічних добрив, включаючи заходи безпеки та охорони навколишнього середовища (розділи 6 та 7), встановлені Національним стандартом DSTU 7938:2015 "ОРГАНІЧНІ ДОБРИВА. Агрономічні вимоги до якості добрив для використання в органічному виробництві" [139] Невиконання вимог ДСТУ призводить до забруднення ґрунту, що негативно впливає на продовольчу безпеку та якість сільськогосподарської продукції.

*Забруднення водою.* Якщо дигестат не відповідає вимогам якості для використання як добриво та має бути скинутий як стічні води, він повинен пройти повний цикл очищення. Вимоги до якості стічних вод, що скидаються у водні об'єкти, регулюються низкою нормативних актів, зокрема DSTU 8691:2016 "Стічні води. Керівні принципи встановлення технологічних норм скидання зливових стічних вод у водні об'єкти" Недотримання стандартів, таких як граничні показники біохімічного споживання кисню (БСК), які в деяких випадках не повинні перевищувати 300 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup> при скиданні в каналізацію [8], призводить до забруднення поверхневих водних об'єктів, що є порушенням Водного кодексу України та створює ризик порушення екосистемного балансу.

Управління якістю дигестату є ключовим фактором, що визначає, чи є технологія переробки відходів справді екологічно безпечною.

#### **5.4. Заходи та рекомендації щодо зменшення негативного впливу**

Для забезпечення екологічної безпеки та максимальної ефективності технології біодеструкції органічних відходів необхідне впровадження комплексу технологічних та організаційних заходів, що охоплюють оптимізацію процесів та управління кінцевим продуктом.

#### 5.4.1. Технологічні рекомендації на основі експериментальної оптимізації (вітамін B1)

Експериментальне дослідження впливу вітаміну B1 (тіаміну) на фізіологічні показники *Bacillus* та *Clostridium* спільне культивування продемонструвало пряму можливість підвищення екологічної та економічної ефективності процесу.

Тіамін (у формі тіамініпрофосфату, ТПП) є життєво важливим кофактором для центральних метаболічних ферментів, таких як піруватдегідрогеназа. Лабораторні дослідження підтвердили, що додавання вітаміну B1 у концентраціях 0,2; 0,6 та 1,2 мл сприяло інтенсивному росту бактерій та збільшенню виходу цільового продукту, що підтверджується збільшенням газоутворення в колбоподібних біореакторах та збільшенням оптичної щільності культури.

Обґрунтування екологічної ефективності. Збільшення темпів зростання та видобутку газу має прямі екологічні наслідки:

*Стабілізація процесу.* Інтенсифікація *Bacillus* та *Clostridium* метаболізм забезпечує ефективніше розщеплення субстрату та зменшує ймовірність небажаного накопичення токсичних летких жирних кислот (ЛЖК), що стабілізує біодеструкцію та усуває ризик переходу до нецільового метаногенезу.

*Зменшення ресурсоемності.* Збільшення продуктивності системи (кгH<sub>2</sub> на одиницю сировини) та скорочення часу гідравлічної утримки (HRT) дозволяє зменшити загальний об'єм відходів, необхідних для отримання фіксованої кількості енергії. Це означає, що промислове впровадження вимагає біореакторів меншого об'єму, що зменшує капітальні та експлуатаційні витрати, а також фізичний простір, необхідний для виробництва.

Таким чином, використання вітаміну B1 є стратегічним технологічним заходом, який не лише покращує економічні показники, а й забезпечує стабільність, надійність та екологічну чистоту біоенергетичного процесу.

#### 5.4.2. Рекомендації щодо управління газовими та фізичними викидами

Управління викидами газів має бути спрямоване на максимальне очищення біоводню та утилізацію залишкових парникових газів:

*Очищення біогазу.* Для видалення сірководню ( $H_2S$ ) необхідно впровадити ефективну систему десульфуризації (хімічну або біологічну). Це захищає обладнання від корозії, а навколишнє середовище та персонал – від токсичного впливу.

*Утилізація залишкових газів.* Залишкову газову суміш, що містить  $CO_2$  та потенційні сліди  $CH_4$ , слід направляти до когенераційної установки для виробництва електроенергії та тепла. Якщо обсягів газу недостатньо для когенерації, слід використовувати факельну систему для перетворення  $CH_4$  на менш потужний парниковий газ ( $CO_2$ ), мінімізуючи його вплив на клімат.

Щодо фізичного впливу, ключові заходи включають:

*Шумоізоляція та вібраційне гашення.* Регулярне обслуговування та акустична ізоляція джерел шуму, зокрема блендерів<sup>1</sup>, насоси та вентиляційні системи відповідно до санітарних норм.

*Теплове забруднення.* Впровадження систем рекуперації тепла для використання надлишкового тепла, що виробляється когенераційними установками. Тепло може бути використано для підтримки оптимальної температури біореакторів ( $37^\circ C$ ) або для опалення прилеглих виробничих та адміністративних будівель, що є прикладом соціально-економічного ефекту [131].

#### 5.4.3. Рекомендації щодо обробки дигестату (відповідність нормативно-правовій базі)

Управління дигестатом як вторинним продуктом є ключовим для екологічної стійкості. Його пріоритетне використання - як органічне добриво, що вимагає дотримання DSTU 7938:2015 [139]

Для забезпечення дотримання агрономічних вимог та розділу 6 (Вимоги безпеки) ДСТУ 7938:2015 необхідний контроль за вмістом важких металів та патогенної мікрофлори.

Для гарантованого знищення патогенної мікрофлори та життєздатного насіння бур'янів, що може міститися в сировині, дигестат необхідно піддати термічній стабілізації або пастеризації (наприклад, витримці при температурі 70°C протягом 1 години). Це забезпечує його екологічну безпеку перед внесенням на сільськогосподарські угіддя, згідно з досвідом внесення дигестату, наприклад, на кукурудзу в нормах від 50 до 240 т/га. [136].

*Альтернативний план (очищення стічних вод).* Якщо дигестат не може бути використаний як добриво, рідка фракція повинна пройти комплексну обробку перед скиданням у каналізацію відповідно до DSTU 8691:2016 та місцеві правила:

Первинне лікування: Механічне очищення (грохоти та піскоуловлювачі) для видалення основних твердих забруднювачів [137].

Біологічна обробка: Застосування двоступеневих біологічних методів (наприклад, анаеробних дигесторів для додаткового вилучення енергії, а потім аеробних резервуарів) для зниження ХСК/БСК до стандартних показників [137]. У таблиці 5.2 наведено Кореляція між оптимізацією експериментального процесу (вітамін B1) та підвищенням екологічної та економічної ефективності.

Таблиця 5.2.

Кореляція між оптимізацією експериментального процесу (вітамін B1) та підвищенням екологічної та економічної ефективності [137]

Експериментальний індикатор	Механізм дії вітаміну B1 (тіаміну)	Екологічна перевага	Економічна перевага
1	2	3	4
Темпи зростання ( <i>Clostridium/ Bacillus</i> )	Усунення ауксотрофних обмежень, прискорення вуглеводного обміну	Знижений ризик накопичення токсичних проміжних ЛЖК; коротший час реакції (ЗГТ)	Зниження капітальних витрат на біореактори (менший розмір)

1	2	3	4
Інтенсивність видобутку газу (H <sub>2</sub> вихід)	Оптимізація потоку вуглеводів (PDH)	Збільшення виходу чистого енергоносія на одиницю відходів	Підвищення прибутковості виробництва біоводню
Стабільність та кінцева біомаса	Підтримка метаболічної активності в анаеробних умовах	Більш надійне та передбачуване управління процесами; Зниження ризику нецільового метаногенезу	Зниження експлуатаційних витрат на моніторинг та налаштування середовища

### Висновки до розділу 5

Біорозкладання органічних відходів клостридіями та бацилами пропонує багатообіцяючий шлях до сталого розвитку шляхом отримання відновлюваного водню та зменшення навантаження на звалища. Наш лабораторний експеримент з ферментації підтвердив, що додавання вітаміну B1 до культур стимулює ріст мікробів та виробництво біогазу, демонструючи, як оптимізація процесу може підвищити врожайність. З екологічної точки зору, ключовим є розумне управління побічними продуктами: вловлювання та використання виробленого водню та CO<sub>2</sub>, а також стерилізація будь-якої біомаси, що залишилася, перед утилізацією. Ці методи перетворюють обробку відходів на відновлення з доданою вартістю та запобігають ненавмисному забрудненню.

Такий підхід повністю відповідає екологічним цілям ЄС та України. Надаючи пріоритет переробці та енергетичному відновленню біовідходів та дотримуючись принципу запобіжних заходів, цей процес мінімізує негативний вплив. Дійсно, експерти погоджуються, що перехід до відновлюваної водневої економіки, такої як перетворення біовідходів на H<sub>2</sub>, може значно зменшити вплив на глобальне потепління порівняно з викопним паливом. Таким чином, за належного контролю та дотримання чинних норм, біорозкладання органічних відходів на основі водню може значно зменшити екологічний слід управління відходами та сприяти чистішому енергетичному майбутньому.

## ВИСНОВКИ

У результаті досліджень, проведених під час виконання кваліфікаційної роботи, можна зробити наступні висновки:

1. Охарактеризовано сучасний стан наукових досліджень у сфері біоконверсії органічних відходів та біологічного виробництва водню. Проаналізовано основні напрями розвитку біотехнологій переробки органічної сировини в умовах реалізації принципів циркулярної економіки. Визначено ключові підходи до управління органічними відходами в Україні та країнах ЄС, а також нормативно-правові вимоги щодо їх утилізації та переробки. Обґрунтовано доцільність застосування темної ферментації як ефективного біотехнологічного методу отримання біоводню та вибір бактерій родів *Clostridium* і *Bacillus* як перспективних агентів біодеструкції органічних відходів.

2. Проаналізовано мікробіологічні, фізіолого-біохімічні та метаболічні особливості воденьсинтезуючих бактерій родів *Bacillus* та *Clostridium*. Описано класифікацію мікроорганізмів-продуцентів водню, їх морфолого-культуральні та таксономічні характеристики. Визначено роль органічних відходів як субстратів для мікробної конверсії та вплив їх хімічного складу, біодоступності й інгібуючих факторів на перебіг процесів біодеструкції. Розкрито основні біохімічні шляхи розкладання органічної речовини та механізми біологічного синтезу водню. Обґрунтовано вплив умов культивування та стимуляторів росту, зокрема вітаміну В<sub>1</sub>, на інтенсифікацію метаболічних процесів і підвищення виходу біоводню. Показано ефективність спільного культивування *Bacillus subtilis* і *Clostridium butyricum* як біосинергетичної системи.

3. Описано технологічні особливості біоконверсії органічних відходів у біоводень шляхом темного ферментативного зброджування. Визначено критичні параметри процесу, що впливають на ефективність утворення водню та пригнічення метаногенезу. Обґрунтовано необхідність керування послідовними стадіями анаеробного розкладання органічної речовини для забезпечення стабільного

біосинтезу водню. Розроблено удосконалену технологічну схему отримання біоводню на основі біосинергетичної взаємодії бактерій родів *Bacillus* і *Clostridium*. Охарактеризовано конструктивні особливості ферментаційних апаратів, що забезпечують керованість процесу, його стабільність і можливість масштабування.

4. Визначено повний комплекс небезпечних і шкідливих факторів, притаманних біотехнологічним процесам, що включають культивування анаеробних мікроорганізмів, утворення газоподібного водню та використання хімічно активних речовин. У межах розділу виконано аналіз біологічних ризиків, імовірності вибухонебезпечних ситуацій, хімічного впливу на персонал, а також електричних та термічних небезпек. Результати оцінки продемонстрували необхідність впровадження системного підходу до управління безпекою, який охоплює регламентацію роботи з обладнанням, вентиляційні системи, санітарні вимоги та застосування засобів індивідуального захисту. Розгорнуто рекомендації щодо організації безпечних умов праці, які відповідають національним стандартам та є міжнародно визнаними практиками. Запропоновані заходи мінімізують ризики і забезпечують стабільність виробничих процесів при роботі з біологічними агентами.

5. Оцінено екологічний вплив біотехнологічної переробки органічних відходів на навколишнє середовище, що дозволило визначити її значні переваги у порівнянні з традиційними методами утилізації, такими як спалювання та захоронення. Дослідження показало, що впровадження технології біоконверсії сприяє зменшенню обсягів твердих побутових відходів, які потрапляють на полігони, а також скороченню викидів парникових газів, що є ключовим фактором для боротьби зі зміною клімату. Розглянуто властивості дигестату та можливості його безпечного використання в сільському господарстві, включаючи агрохімічні параметри та ризики вторинного забруднення. На основі цього розроблено рекомендації щодо екологічно раціонального застосування продуктів біоконверсії та інтеграції технології в системи циркулярної економіки. Загалом матеріали розділу підтверджують доцільність і екологічну ефективність запропонованої технології.

## СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Volatile Fatty Acid Recovery from Arrested Anaerobic Digestion for the Production of Sustainable Aviation Fuel: A Review . URL: [https://www.mdpi.com/journal/fermentation/special\\_issues/2A881E5G52](https://www.mdpi.com/journal/fermentation/special_issues/2A881E5G52) (дата звернення: 01.09.2025).
2. Bioconversion of biowaste into renewable energy and resources: A sustainable strategy . ResearchGate, 2022. URL: [https://www.researchgate.net/publication/362122241\\_Bioconversion\\_of\\_biowaste\\_into\\_renewable\\_energy\\_and\\_resources\\_A\\_sustainable\\_strategy](https://www.researchgate.net/publication/362122241_Bioconversion_of_biowaste_into_renewable_energy_and_resources_A_sustainable_strategy) (дата звернення: 01.09.2025).
3. Microbial fermentation of lignocellulosic agricultural residues as sustainable biorefinery feedstock. *Fermentation and Bioengineering*. 2023. Vol. 15, No. 3.
4. Zaman M., Hossain S., Liu L., Ahmed M., Hasan M. Bioconversion of organic wastes for their agricultural providence. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*. 2014. Vol. 3. P. 1–12.
5. Waste Framework Directive – Overview . European Commission. URL: [https://environment.ec.europa.eu/topics/waste-and-recycling/waste-framework-directive\\_en](https://environment.ec.europa.eu/topics/waste-and-recycling/waste-framework-directive_en) (дата звернення: 05.09.2025).
6. Bio-waste in Europe: ECN data report overview . European Compost Network. URL: <https://www.compostnetwork.info/policy/biowaste-in-europe/> (дата звернення: 05.09.2025).
7. Waste management reform in Ukraine: key changes . Vox Ukraine. URL: <https://voxukraine.org/en/waste-management-reform> (дата звернення: 08.09.2025).
8. Anaerobic digestion and composting: European approaches . Municipal Waste Europe. URL: <https://www.municipalwasteurope.eu/anaerobic-digestion-composting> (дата звернення: 08.09.2025).
9. Composting and anaerobic digestion policy comparison . Zero Waste International Alliance. URL: <https://zwia.org/composting-and-anaerobic-digestion-policy/> (дата звернення: 10.09.2025).

10. New EU regulatory requirements: mandatory separate collection of bio-waste . WasteVision. URL: <https://wastevision.com/en/news/new-eu-regulations/> (дата звернення: 10.09.2025).
11. van Dijn J. M., Hecker M. Bacillus subtilis: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*. 2020. Vol. 19. Art. 33.
12. Rahman M. A., Mahmud T., Hossain M. A., Alam S. A. Biodegradation of organic waste using Bacillus species isolated from soil. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*. 2022. Vol. 10, No. 3. P. 123–131.
13. Du Y., Zou W., Zhang K., Ye G., Yang J. Advances and applications of Clostridium co-culture systems in biotechnology. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. Art. 560223.
14. Aerobic composting and anaerobic digestion. *BioCycle*. 2019. Vol. 60, No. 4. P. 34–41.
15. Kovalev A. A., Kovalev D. A., Panchenko V. A., Zhuravleva E. A., Laikova A. A. Energy efficiency of hydrogen production during dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2024. Vol. 87. P. 171–178.
16. Antonenko D. A., Belyuchenko I. S., Gukalov V. V. Complex compost and its effect on soil properties and crop productivity. *Agricultural Chemistry*. 2015. No. 6. P. 45–52.
17. Strachel R., Wyszowska J., Bacmaga M. Impact of organic amendments on soil quality. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2017. Vol. 228. Art. 9.
18. Carabassa V., Domene X., Alcañiz J. M. Soil restoration using composted organic waste. *Journal of Environmental Management*. 2020. Vol. 255. Art. 109909.
19. Agegnehu G., Srivastava A. K., Bird M. I. Soil carbon sequestration and crop productivity. *Applied Soil Ecology*. 2017. Vol. 119. P. 156–170.
20. Gupta S., Fernandes A., Lopes A., Grasa L., Salafranca J. Microbes and parameters influencing dark fermentation for hydrogen production. *Applied Sciences*. 2024. Vol. 14, No. 23. Art. 10789.

21. Nadal Alemany N., Verboon D. C., Kleerebezem R. Defined and refined: development of a minimal medium for *Clostridium pasteurianum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2025. Vol. 109, No. 1. Art. 219.
22. Elerakey N., Rasmey A.-H. M., Mohammed Y. M., Aboseidah A. A., Hawary H. Maximizing biohydrogen production from watermelon peels using *Clostridium butyricum*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2025. Vol. 18. Art. 54.
23. Baeyens J., Zhang H., Nie J., Appels L., Dewil R. Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020. Vol. 131. Art. 110023.
24. Jiang D., Fang Z., Chin S.-X. Biohydrogen production from hydrolysates of selected tropical biomass wastes with *Clostridium butyricum*. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. Art. 27205.
25. Dell'Orto A., Trois C. Considerations on bio-hydrogen production from organic waste in South African municipalities. *South African Journal of Science*. 2022. Vol. 118, No. 5–6. Art. e8222.
26. Dickentmann C., Fiehn O., Willscher E., Hess M. Advancements in biohydrogen production. *RSC Advances*. 2024. Vol. 14. P. 11535–11575.
27. ENV2008-086. Environmental impacts of waste processing technologies . URL: <https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/4939230/ENV2008-086.pdf> (дата звернення: 01.10.2025).
28. Giraldele L. D., Fonseca B. C., Mahmud S. N., Yusoff R., de Oliveira M. F. F. Investigating how biomass hydrolysis derivatives inhibit H<sub>2</sub> production by *Clostridium beijerinckii*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2020. Vol. 45, No. 17. P. 9397–9408.
29. Bio-hydrogen production by dark anaerobic fermentation of organic wastewater . URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9485808/> (дата звернення: 03.10.2025).
30. Sekoai P. T., Chunilall V., Ezeokoli O. Creating value from acidogenic biohydrogen fermentation effluents. *Fermentation*. 2023. Vol. 9, No. 7. Art. 602.

31. Dinesh G. H., Kumar P. S., Vettermann R. Simultaneous biohydrogen and bioplastic productions. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2019. Vol. 44, No. 5. P. 2211–2225.
32. Plant growth–promoting microbes and microalgae-based biostimulants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2024. Vol. 379. Art. 20240251.
33. Hecker M., Pané-Farré J. Transient growth requirement in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 2004. Vol. 186, No. 19. P. 6775–6782.
34. Host and *Clostridioides difficile* response modulated by micronutrients and glutamine. *Frontiers in Nutrition*. 2022. Vol. 9. Art. 849301.
35. Setlow P. Differential amino acid requirements for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 1975. Vol. 122, No. 2. P. 642–649.
36. Intermediate role of gut microbiota in vitamin B nutrition. *Frontiers in Nutrition*. 2022. Vol. 9. Art. 1031502.
37. Neumann-Schaal M., Hofmann J. D. Proline-dependent regulation of *Clostridium difficile* Stickland metabolism. *Journal of Bacteriology*. 2013. Vol. 195, No. 14. P. 3100–3111.
38. Sabouraud dextrose agar . URL: [https://www.humeau.com/media/blfa\\_files/\\_\\_\\_TC\\_Sabouraud-Dextrose\\_EN.pdf](https://www.humeau.com/media/blfa_files/___TC_Sabouraud-Dextrose_EN.pdf) (дата звернення: 13.10.2025).
39. Nutrient broth . URL: [https://www.humeau.com/media/blfa\\_files/TC\\_Nutrient-bouillon\\_EN.pdf](https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_Nutrient-bouillon_EN.pdf) (дата звернення: 15.10.2025).
40. Ястремська Л. С., Малиновська І. М., Зінов'єва Н. А. Загальна мікробіологія і вірусологія : лабораторний практикум. Київ : НАУ, 2017. 120 с.
41. Dzul Karnain E. L. N., Audu J. O., Wan Dagang W. R. Z., Abdul-Wahab M. F. Microbiomes of biohydrogen production from dark fermentation of industrial wastes. *Bioresources and Bioprocessing*. 2022. Vol. 9, No. 1. Art. 16.
42. Jiang D., Fang Z., Chin S.-X. та ін. Biohydrogen production from hydrolysates of selected tropical biomass wastes with *Clostridium butyricum*. *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. Art. 27205.

43. Du Y., Zou W., Zhang K., Ye G., Yang J. Advances and applications of *Clostridium* co-culture systems in biotechnology. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. Art. 560223.
44. Pistekova H., Dusankova M., Sopik T. та ін. Optimization of the dark fermentation technique using *Clostridium butyricum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2025. Vol. 73, No. 22. P. 13654–13662.
45. Vítězová M., Bochmann G., Rittmann S. K.-M. R. Scale-up of dark fermentative biohydrogen production by artificial microbial co-cultures. *Applied Microbiology*. 2022. Vol. 2, No. 1. P. 215–226.
46. Masset J., Calusinska M., Hamilton C. та ін. Fermentative hydrogen production from glucose and starch substrates. *Biotechnology for Biofuels*. 2012. Vol. 5. Art. 35.
47. Tan J.-Y., Zhang Y.-T., Ren N.-Q., Zhao L. Evaluating bio-hydrogen production potential from organic substrates. *Fermentation*. 2022. Vol. 8, No. 12. Art. 739.
48. Elerakey N., Rasmey A. M., Aboseidah A. A., Hawary H. Modeling biohydrogen production via dark fermentation of fruit peel wastes. *BMC Biotechnology*. 2024. Vol. 24. Art. 105.
49. Deng X., Guo L., Zhang Y. Biohydrogen production from carbohydrate substrates by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2015. Vol. 40, No. 25. P. 7955–7962.
50. Nguyen D., Ngo T., Lee M. K. Hydrogen production from food waste using *Clostridium butyricum*. *Renewable Energy*. 2019. Vol. 132. P. 1075–1084.
51. Ergal D., Massotti F. R., Mezzina M. B. Enhanced hydrogen production in synthetic microbial consortia. *Biotechnology Advances*. 2022. Vol. 52. Art. 107813.
52. Srivastava A. S., Singh P. A. Biohydrogen enhancement in lignocellulosic hydrolysates. *Bioresource Technology*. 2018. Vol. 254. P. 177–183.
53. Liu R., Ren S., Chen J. Hydrogen production from fruit and vegetable wastes by dark fermentation. *Waste Management*. 2016. Vol. 58. P. 249–256.

54. Taherdanak M., Zilouei L. Improved biohydrogen production by co-culturing hydrogen-producing bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2016. Vol. 41, No. 4. P. 2217–2225.
55. Kim D., Han J., Kim M. Effect of vitamin supplementation on hydrogen production performance. *Bioresource Technology*. 2016. Vol. 219. P. 758–764.
56. Sivagurunathan P., Sen G., Kumar S. Inoculum adaptation and co-culture strategies for enhanced biohydrogen production. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2022. Vol. 12. P. 1963–1974.
57. Kumar M., Das S. Hydrogen production via dark fermentation using *Clostridium* spp.: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2021. Vol. 46. P. 24585–24603.
58. Tymchuk I. Technical and technological aspects of biological reclamation using anthropogenic organic waste in composition with sewage sludge. *Journal of Environmental Problems*. 2023. Vol. 8, No. 2. P. 126–132.
59. Morales-Polo C., Cledera-Castro M. M., Moratilla Soria B. Y. Reviewing the anaerobic digestion of food waste: from waste generation to process perspectives. *Applied Sciences*. 2018. Vol. 8, No. 10. Art. 1804.
60. Pleissner D., Lin C. S. K. Valorisation of food waste in biotechnological processes. *Sustainable Chemical Processes*. 2013. Vol. 1, No. 1. P. 21.
61. Chen Y., Cheng J. J., Creamer K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*. 2008. Vol. 99, No. 8. P. 4044–4064.
62. Aguilar-Paredes A., Valdés G., Araneda N. та ін. Microbial community in the composting process and its positive impact on soil biota. *Agronomy*. 2023. Vol. 13, No. 2. Art. 542.
63. ISCC. Waste and residues guidance document . URL: [https://www.iscc-system.org/wp-content/uploads/2025/03/ISCC\\_WnR\\_Guidance\\_Document\\_March2025-1.pdf](https://www.iscc-system.org/wp-content/uploads/2025/03/ISCC_WnR_Guidance_Document_March2025-1.pdf) (дата звернення: 14.11.2025).
64. European Commission. Waste Framework Directive – Overview . URL: [https://environment.ec.europa.eu/topics/waste-and-recycling/waste-framework-directive\\_en](https://environment.ec.europa.eu/topics/waste-and-recycling/waste-framework-directive_en) (дата звернення: 14.11.2025).

65. Municipal Waste Europe. Anaerobic digestion and composting: European approaches . URL: <https://www.municipalwasteurope.eu/anaerobic-digestion-composting> (дата звернення: 17.11.2025).
66. Zero Waste International Alliance. Composting and anaerobic digestion policy comparison . URL: <https://zwia.org/composting-and-anaerobic-digestion-policy/> (дата звернення: 17.11.2025).
67. Vox Ukraine. Waste management reform in Ukraine: key changes . URL: <https://voxukraine.org/en/waste-management-reform> (дата звернення: 19.11.2025).
68. Cellulose, hemicellulose, and lignin contents in common agricultural residues and wastes . ResearchGate. URL: [https://www.researchgate.net/figure/Cellulose-Hemicellulose-and-Lignin-Contents-in-Common-Agricultural-Residues-and-Wastes\\_tbl1\\_276026567](https://www.researchgate.net/figure/Cellulose-Hemicellulose-and-Lignin-Contents-in-Common-Agricultural-Residues-and-Wastes_tbl1_276026567) (дата звернення: 19.11.2025).
69. Giraldeli L. D., Fonseca B. C., Mahmud S. N., Yusoff R., de Oliveira M. F. F. Investigating how biomass hydrolysis derivatives inhibit H<sub>2</sub> production by *Clostridium beijerinckii*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2020. Vol. 45, No. 17. P. 9397–9408.
70. Inhibition of anaerobic digestion process . URL: <https://zjubiolab.zju.edu.cn/shiji/userfiles/lab-paper/000293-20101226120756.pdf> (дата звернення: 21.11.2025).
71. Saxena M., Tiwari R., Pathak A. Isolation and characterization of thermophilic cellulolytic strains of *Clostridium thermocellum*. ResearchGate . URL: <https://www.researchgate.net/publication/234030798> (дата звернення: 24.11.2025).
72. Zaborowska D. R., Wysocki J. S. Anaerobic treatment of food waste. *Applied Sciences*. 2018. Vol. 8, No. 10. Art. 1804.
73. Chen Y. та ін. Toxicants inhibiting anaerobic digestion: a review. *Bioresource Technology*. 2014. Vol. 154. P. 354–363.
74. Tanaka T. Microbial bioconversion of organic waste. *Biotechnology Advances*. 2009. Vol. 27, No. 2. P. 115–121.
75. Ghosh S. Anaerobic digestion of organic wastes: a review. *Environmental Progress*. 1984. Vol. 3, No. 3. P. 178–181.

76. Pagés-Díaz M., Pereda-Reyes J., Taherzadeh M. J., Sarvari Horvath A. Anaerobic co-digestion of solid slaughterhouse waste with agricultural residues. *Waste Management*. 2017. Vol. 68. P. 640–650.
77. Mata-Alvarez J., Macé S., Llabrés P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. *Bioresource Technology*. 2000. Vol. 74, No. 1. P. 3–16.
78. Jain A. K., Yadav R., Dahiya R. S. Microbial degradation of lignocellulosic food and yard waste. *Journal of Cleaner Production*. 2020. Vol. 270. Art. 122464.
79. Guo F., Fang H., Xu X. Effects of ammonia nitrogen on anaerobic biotreatment of landfill leachate. *Environmental Technology*. 2007. Vol. 28, No. 6. P. 639–646.
80. Farhan A. E., Kumar R., Khan M. A. Challenges in anaerobic digestion of organic municipal solid waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2018. Vol. 86. P. 354–364.
81. Komilis D., Evangelou C. Organic waste characterization: A study on food and green waste in Europe. *Waste Management*. 2014. Vol. 34, No. 9. P. 1693–1701.
82. Karthikeyan B., Kumar S. N., Nair K. N. Bioavailability of organic fractions in food waste for anaerobic digestion. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2019. Vol. 7, No. 2. Art. 102878.
83. Daboussi A. M., Balsalobre R. M., Wang H. Advances and applications of *Clostridium* co-culture systems in biotechnology. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. Art. 560223.
84. Choi M., Choi H. K., Park J. S. та ін. Composition and functional diversity of bacterial communities during swine carcass decomposition. *Animal Bioscience*. 2023. Vol. 36, No. 10. P. 1575–1585.
85. Aerobic versus anaerobic pathways . Sustainability Directory. URL: <https://pollution.sustainability-directory.com/area/aerobic-versus-anaerobic-pathways/> (дата звернення: 21.11.2025).
86. Rahman M. A., Mahmud T., Hossain M. A., Alam S. A. Biodegradation of organic waste using *Bacillus* species isolated from soil. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*. 2022. Vol. 10, No. 3. P. 123–131.

87. Bayer M., Lamed G., Doi R. H. Lignocellulose degradation in bacteria and fungi: cellulosomes and industrial relevance. *Frontiers in Microbiology*. 2025. Vol. 16. Art. 1583746.
88. Kato A., Kato S., Watanabe K. *Clostridium straminisolvens* sp. nov., a moderately thermophilic cellulolytic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004. Vol. 54, No. 6. P. 2043–2048.
89. Haug R. E. Optimum moisture levels for biodegradation of mortality composting. *Waste Management*. 2007. Vol. 27, No. 6. P. 830–839.
90. Karamanev M. I., Zeng R. R., Lee J. Evaluation of optimum moisture content for composting of beef feedlot manure. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2016. Vol. 11, No. 3.
91. Crop residue decomposition and nutrient release rates . KSU Agronomy. URL: <https://eupdate.agronomy.ksu.edu/article/crop-residue-decomposition-and-nutrient-release-rates-442> (дата звернення: 24.11.2025).
92. Cha M., Park M.-S., Kim S.-J. Biological routes for biohydrogen production: A clean and carbon-free fuel. *Biotechnology Journal*. 2025. Vol. 20, No. 7. Art. e70074.
93. Gupta S., Fernandes A., Lopes A., Grasa L., Salafranca J. Microbes and parameters influencing dark fermentation for hydrogen production. *Applied Sciences*. 2024. Vol. 14, No. 23. Art. 10789.
94. Xuan J., He L., Wen W., Feng Y. Hydrogenase and nitrogenase: key catalysts in biohydrogen production. *Molecules*. 2023. Vol. 28, No. 3. Art. 1392.
95. Pandit C., Srivastava S., Chang C.-T. Catalytic innovations for high-yield biohydrogen production in integrated systems. *Catalysts*. 2025. Vol. 15, No. 9. Art. 848.
96. Akhlaghi N., Najafpour-Darzi G. A comprehensive review on biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2020. Vol. 45, No. 43. P. 22492–22512.
97. Singh A. K., Singh S., Singh D. N. Towards industrial biological hydrogen production: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2023. Vol. 39, No. 10. Art. 246.

98. Reungsang M. T., Sittijunda S., Srinophakun W. Biohydrogen produced via dark fermentation: a review. *BioEnergy Research*. 2023. Vol. 3, No. 3. P. 287–316.
99. Roy S., Yakkala H. S., Tesch M. A., Scott C. T. Pilot-scale biological fermentation systems for biohydrogen. *Nature Communications*. 2024. Vol. 15. Art. 48790.
100. Ibrahim M. A. та ін. Impact of nano/microplastics on fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2024. Vol. 64. P. 220–235.
101. Dark fermentation: hydrogen from waste via Alps Eco System . UK Government Technical Report. URL: <https://assets.publishing.service.gov.uk/media/649a8d699e7a8b000c932bd9/alps-eco-ph1-redacted-report.pdf> (дата звернення: 26.11.2025).
102. Kothari R., Kumar V., Pathak A., Tyagi V. V. Photobiological hydrogen production: recent advances. *International Journal of Energy Research*. 2011. Vol. 35, No. 12. P. 1194–1215.
103. Zielińska E. M. та ін. Producing hydrogen in wastewater using bioreactors. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2021. Vol. 30, No. 5. P. 4121–4134.
104. Borkenstein S., Wukk M., Posten J., Huber B. Recent achievements in microalgal photobiological hydrogen production. *Energies*. 2021. Vol. 14, No. 21. Art. 7170.
105. Pathogen safety data sheets: *Clostridium* spp. . Canada.ca. URL: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/clostridium.html> (дата звернення: 28.11.2025).
106. Ensuring electrical safety in hydrogen operations . Power Magazine. URL: <https://www.powermag.com/ensuring-electrical-safety-in-hydrogen-operations/> (дата звернення: 28.11.2025).
107. ДСН 3.3.6.042-99. Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень. Київ, 1999.
108. НПАОП 40.1-1.21-98. Правила безпечної експлуатації електроустановок споживачів. Київ, 1998.

109. ДСН 3.3.6.037-99. Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку. Київ, 1999.
110. ДБН В.2.5-28:2018. Природне і штучне освітлення. Київ, 2018.
111. Temperature and humidity control of laboratory cleanroom . Best Leader Tech. URL: <https://www.bestleader-tech.com/news/temperature-and-humidity-control-of-laboratory-cleanroom/> (дата звернення: 29.11.2025).
112. Вимоги біобезпеки і біозахисту в лабораторно-діагностичних установах . URL: [https://www.jvm.kharkov.ua/sbornik/103/1\\_4.pdf](https://www.jvm.kharkov.ua/sbornik/103/1_4.pdf) (дата звернення: 29.11.2025).
113. ДСТУ Б В.1.1-36:2016. Визначення категорій приміщень за вибухопожежною небезпекою. Київ, 2016.
114. UV light in biosafety cabinets: pros and cons . BioSafe Tech. URL: <https://qualia-bio.com/blog/uv-light-in-biosafety-cabinets-pros-and-cons/> (дата звернення: 01.12.2025).
115. Класи виробничих та складських приміщень за вибухопожежною небезпекою . URL: <https://studfile.net/preview/5226642/page:22/> (дата звернення: 01.12.2025).
116. Категорії приміщень за вибухопожежною та пожежною небезпекою . URL: <https://ts.kiev.ua/kategorii-prymishen-za-vybuhopozhezhnoyu-ta-pozhezhnoyu-nebezpekoju/> (дата звернення: 01.12.2025).
117. Are there different types of fire extinguishers? . Statewide Fire Protection. URL: <https://www.statewidefireprotectionco.com/blog/are-there-different-types-of-fire-extinguishersnbsp> (дата звернення: 03.12.2025).
118. Design of ventilation systems . Engineering Toolbox. URL: [https://www.engineeringtoolbox.com/design-ventilation-systems-d\\_121.html](https://www.engineeringtoolbox.com/design-ventilation-systems-d_121.html) (дата звернення: 03.12.2025).
119. Екологічні ефекти реалізації біогазових проєктів . GetMarket. URL: <https://getmarket.com.ua/ua/news/6-ekologichnih-efektiv-realizaciyi-biogazovih-proyektiv> (дата звернення: 03.12.2025).
120. Переваги біогазових станцій . AgroBiogas. URL: [https://agrobiogas.com.ua/advantages\\_of\\_biogas\\_stations/](https://agrobiogas.com.ua/advantages_of_biogas_stations/) (дата звернення: 03.12.2025).

121. Закон України «Про управління відходами» від 20.06.2022 № 2320-IX. Київ, 2022.
122. Про управління відходами . ЛІГА:ЗАКОН. URL: <https://ips.ligazakon.net/document/T222320> (дата звернення: 03.12.2025).
123. Мінекономіки підписало меморандуми щодо управління відходами . URL: <https://me.gov.ua/News/Detail/8fa315bf-22c2-4ef4-bd32-7b4cba364517> (дата звернення: 05.12.2025).
124. Дигестат: вплив норм внесення на врожайність кукурудзи . KWS. URL: <https://www.kws.com/ua/uk/novyny-ta-podiyi/novyny/novyny-kukurudzy/dyhestat-vplyv-zastosuvannya-riznykh-norm-na-vrozhaynist-kukurudzy-na-zerno/> (дата звернення: 05.12.2025).
125. Національний університет харчових технологій. Освітні матеріали . URL: <https://dspace.nuft.edu.ua/bitstreams/8667494c-a68b-4978-8677-dfe09e54c88c/download> (дата звернення: 05.12.2025).
126. В Україні дозволили використовувати органічні добрива з відходів біогазових установок . URL: <https://ecopolitic.com.ua/ua/news/v-ukraini-dozvolili-vikoristovuvati-organichni-dobryva-z-vidhodiv-biogazovih-ustanovok/> (дата звернення: 05.12.2025).
127. ДСТУ 7938:2015. Добрива органічні. Агрономічні вимоги щодо якості. Київ, 2015.
128. ДСТУ 8691:2016. Стічні води. Настанови щодо встановлення нормативів. Київ, 2016.
129. Waste Framework Directive – overview . European Commission. URL: [https://environment.ec.europa.eu/topics/waste-and-recycling/waste-framework-directive\\_en](https://environment.ec.europa.eu/topics/waste-and-recycling/waste-framework-directive_en) (дата звернення: 05.12.2025).
130. Anaerobic digestion and composting: European approaches . Municipal Waste Europe. URL: <https://www.municipalwasteurope.eu/anaerobic-digestion-composting> (дата звернення: 05.12.2025).

131. Composting and anaerobic digestion policy comparison . Zero Waste International Alliance. URL: <https://zwia.org/composting-and-anaerobic-digestion-policy/> (дата звернення: 05.12.2025).
132. Waste management reform in Ukraine: key changes . Vox Ukraine. URL: <https://voxukraine.org/en/waste-management-reform> (дата звернення: 05.12.2025).
133. Cellulose, hemicellulose and lignin contents in agricultural residues . ResearchGate. URL: [https://www.researchgate.net/figure/Cellulose-Hemicellulose-and-Lignin-Contents-in-Common-Agricultural-Residues-and-Wastes\\_tbl1\\_276026567](https://www.researchgate.net/figure/Cellulose-Hemicellulose-and-Lignin-Contents-in-Common-Agricultural-Residues-and-Wastes_tbl1_276026567) (дата звернення: 05.12.2025).
134. ISCC. Waste and residues guidance document . URL: [https://www.iscc-system.org/wp-content/uploads/2025/03/ISCC\\_WnR\\_Guidance\\_Document\\_March2025-1.pdf](https://www.iscc-system.org/wp-content/uploads/2025/03/ISCC_WnR_Guidance_Document_March2025-1.pdf) (дата звернення: 05.12.2025).
135. Aerobic versus anaerobic pathways . Sustainability Directory. URL: <https://pollution.sustainability-directory.com/area/aerobic-versus-anaerobic-pathways/> (дата звернення: 05.12.2025).
136. Ventilation. Hydrogen Tools . URL: <https://h2tools.org/bestpractices/laboratory-safety/laboratory-design/ventilation> (дата звернення: 05.12.2025).
137. Design of ventilation systems . Engineering Toolbox. URL: [https://www.engineeringtoolbox.com/design-ventilation-systems-d\\_121.html](https://www.engineeringtoolbox.com/design-ventilation-systems-d_121.html) (дата звернення: 05.12.2025).
138. Categories of rooms by explosion and fire hazard . URL: <https://ts.kiev.ua/kategorii-prymishen-za-vybuchopozhezhnoyu-ta-pozhezhnoyu-nebezpekoju/> (дата звернення: 05.12.2025).
139. Fire extinguishers: types and application . Statewide Fire Protection. URL: <https://www.statewidefireprotectionco.com/blog/are-there-different-types-of-fire-extinguishersnbsp> (дата звернення: 05.12.2025).