

Projet InGEcoH (Bio-E 2008)

« InGénierie Ecologique d'écosystèmes microbiens producteurs de bioHydrogène par voie fermentaire »

Projet InGEcoH : « InGénierie Ecologique d'écosystèmes microbiens producteurs de bioHydrogène par voie fermentaire »



P1: Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) INRA – UR050

Jean-Philippe STEYER, Eric TRABLY*, Eric Latrille, Jérôme Hamelin,
Marianne Quéméneur et Yan Rafrafi



P2: Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP) CNRS – UPR9036

Marie-Thérèse GIUDICI-ORTICONI *, Maria-Luz Cardenas, Athel Cornish-Bowden,
Marianne Guiral, Marianne Ilbert, Gisèle Leroy et Saida Benomar



P3: Laboratoire d'Ingénierie de Systèmes Biologique et des Procédés (LISBP)

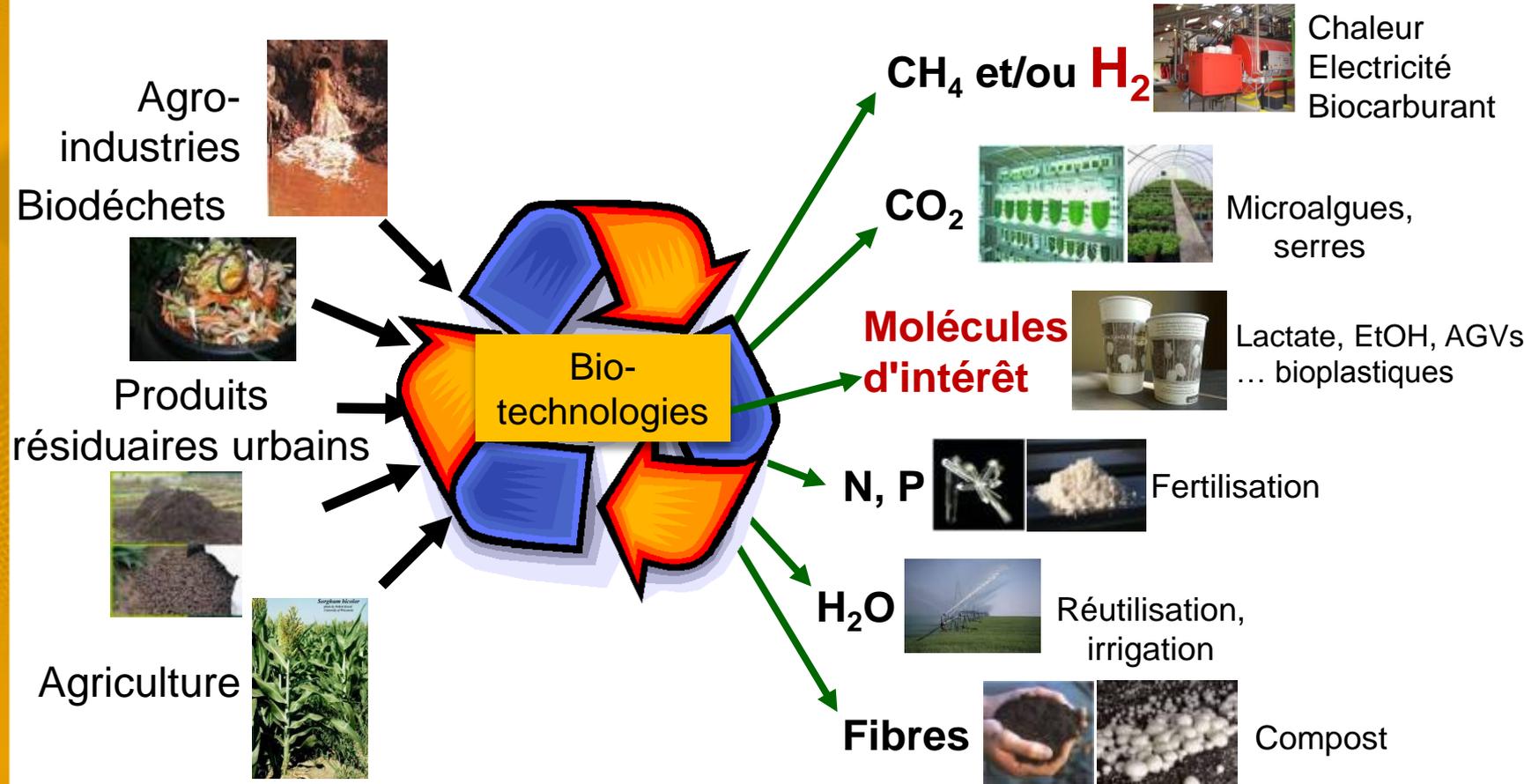
UMR INSA/CNRS 5504, UMR INSA/INRA 792

Isabelle MEYNIAL-SALLES*, Philippe Soucaille, Christian Croux ,
Benjamin Percheron et Velusamy Senthil Kumar



Contexte du projet

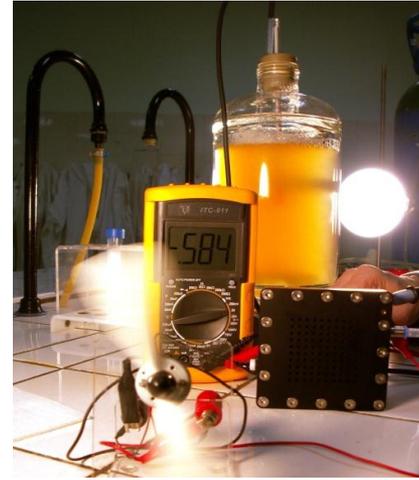
Le biohydrogène : au coeur du concept de bioraffinerie environnementale



sous contraintes d'innocuité sanitaire (détergents, hormones, pathogènes...)

Contexte du projet

Les voies de production du biohydrogène: la voie fermentaire



Productivité 0.07-0.35
(mmol_{H2}/L/h)
Rendement -
(mol_{H2}/mol_{glucose})

0.5-5

0.8-1.1

0.5 - 100

0.1 - 3

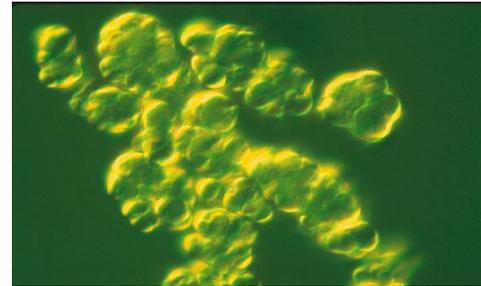
(+) Production en continu
ø lumière
Peu de surface requise
Utilisation de substrats complexes

Contexte du projet

Les cultures mixtes = un large potentiel de valorisation de la biomasse



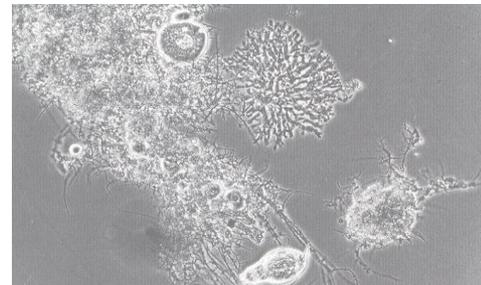
Un substrat simple (sucre)



Un microorganisme



Un substrat complexe (déchet)

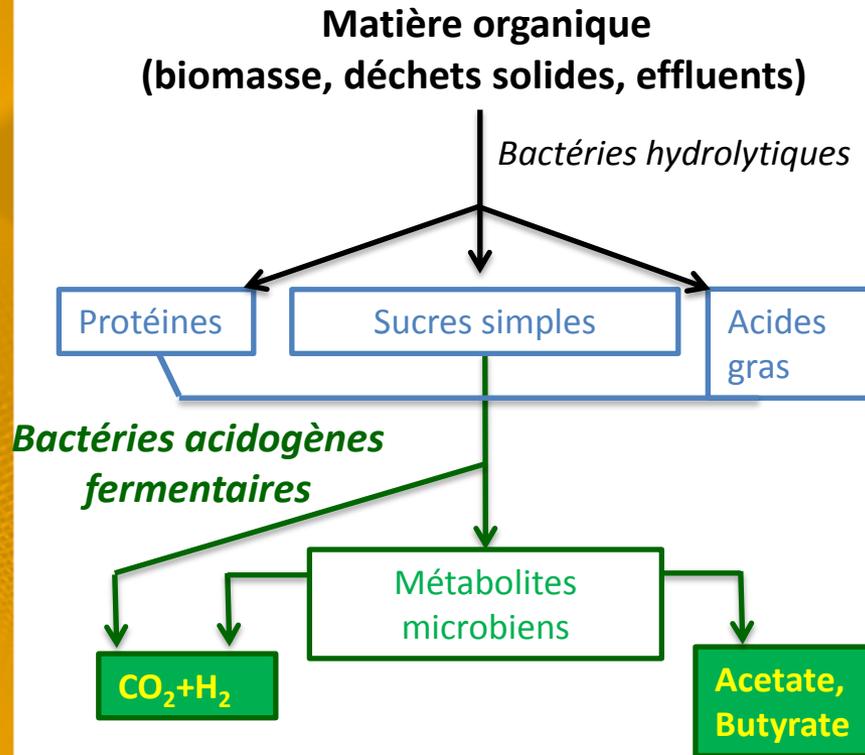


Un écosystème



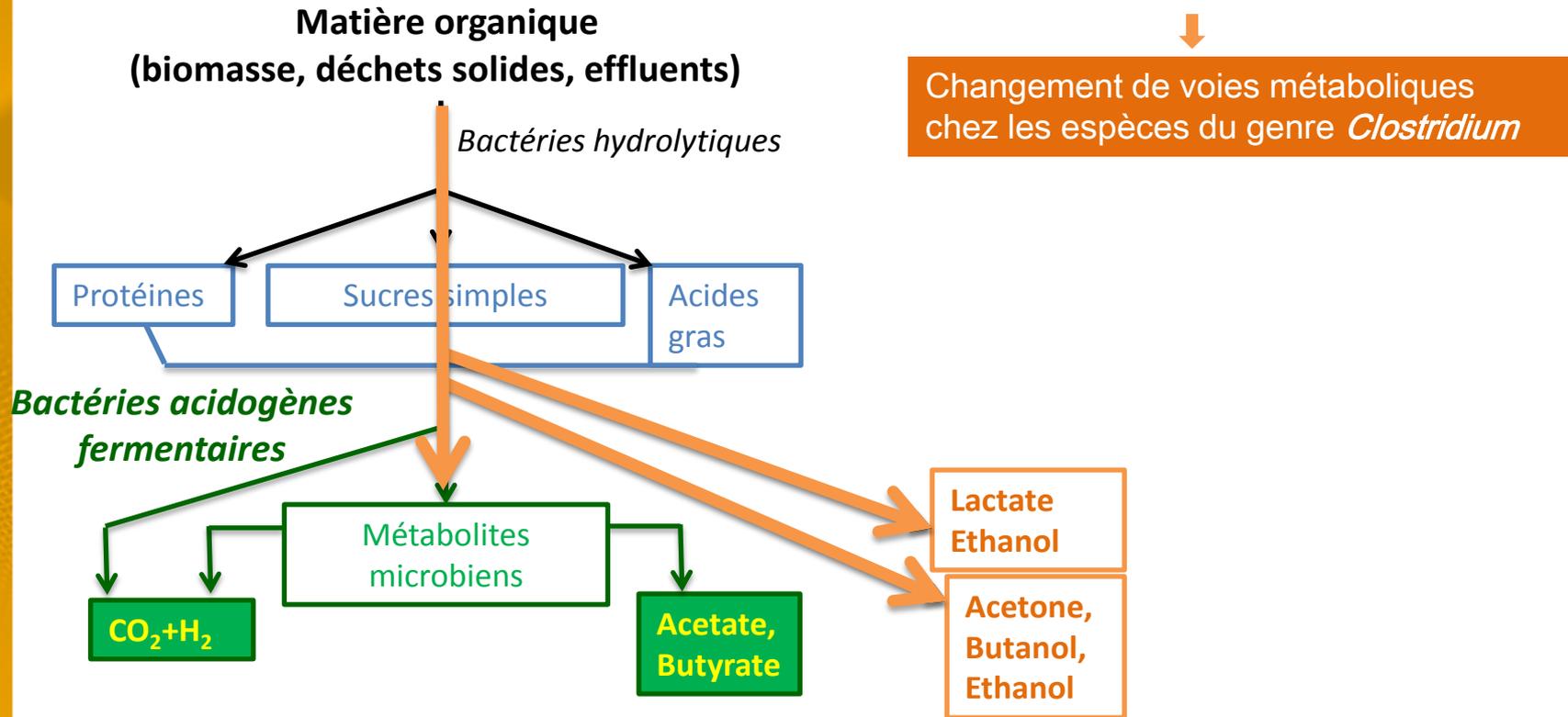
Contexte du projet

Les cultures mixtes = un large potentiel de valorisation de la biomasse... avec des limitations



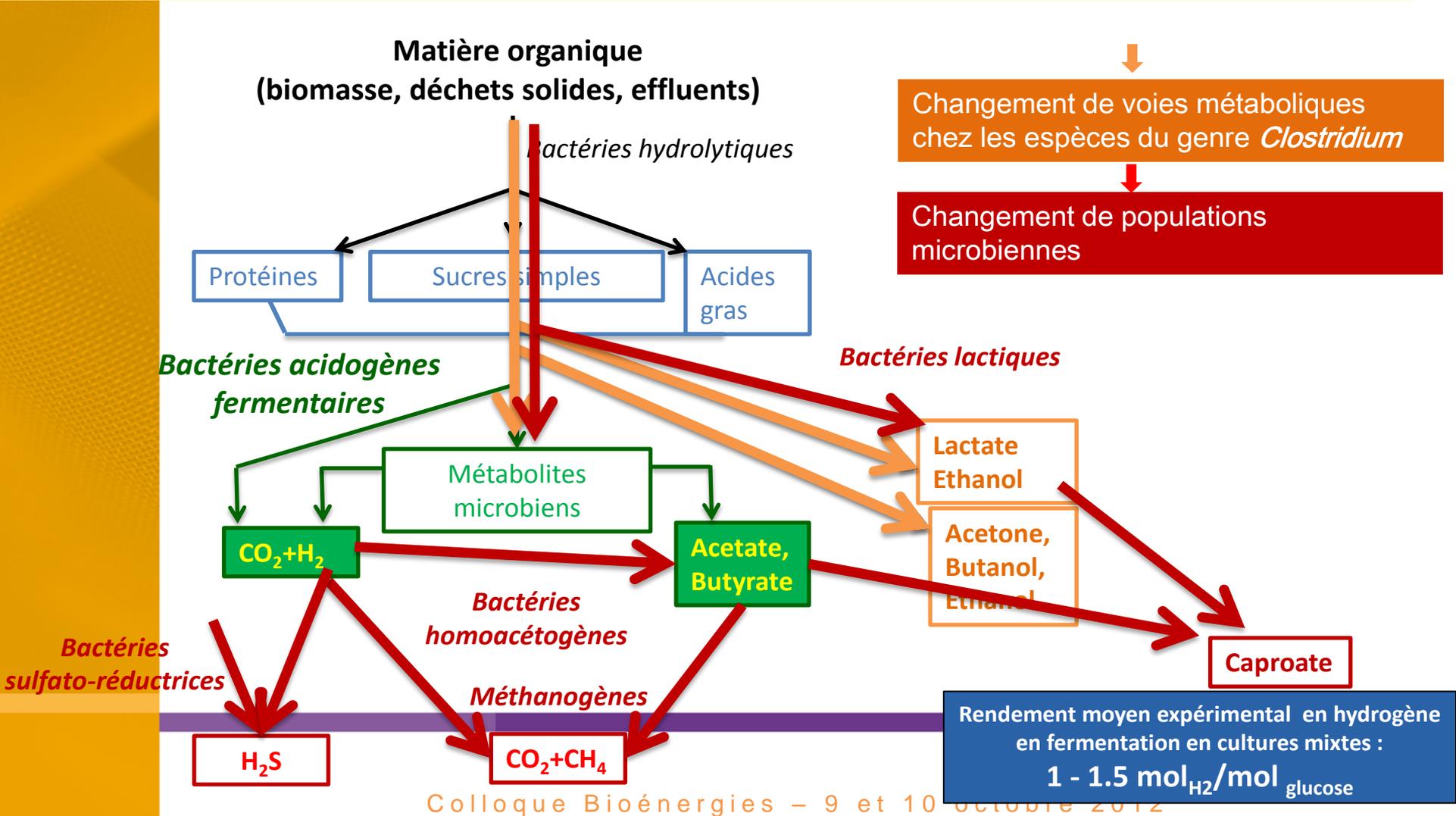
Contexte du projet

Les cultures mixtes = un large potentiel de valorisation de la biomasse... avec des limitations métaboliques



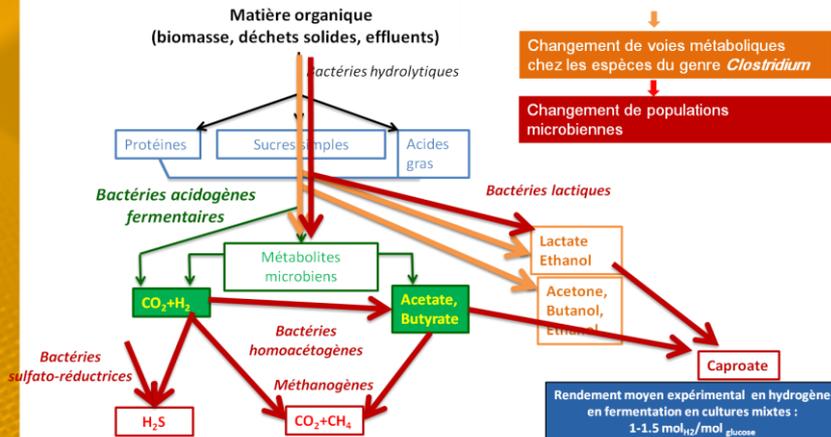
Contexte du projet

Les cultures mixtes = un large potentiel de valorisation de la biomasse... avec des limitations métaboliques et écologiques



Contexte du projet

Conditions opératoires très étudiées
(pH, °C, TSH...)

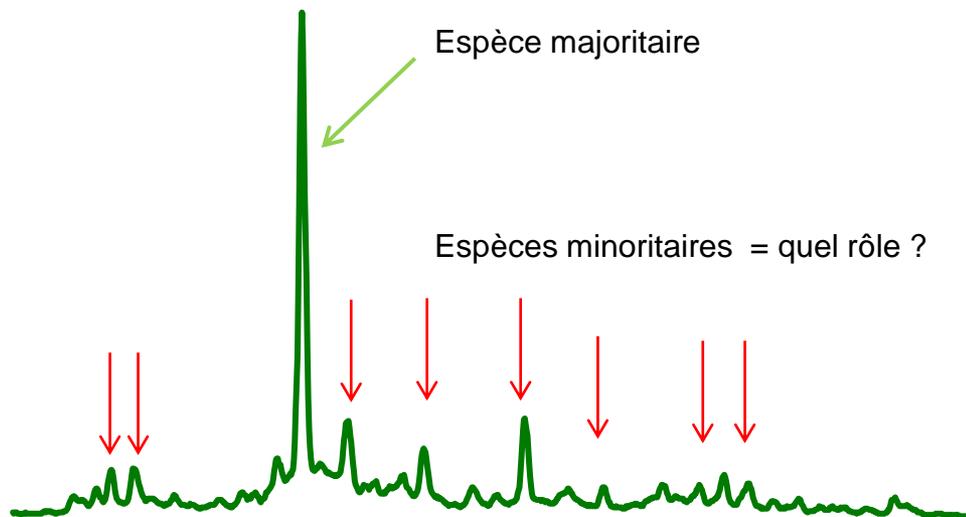


Facteurs biotiques
(lien structure – fonction,
interactions microbiennes)



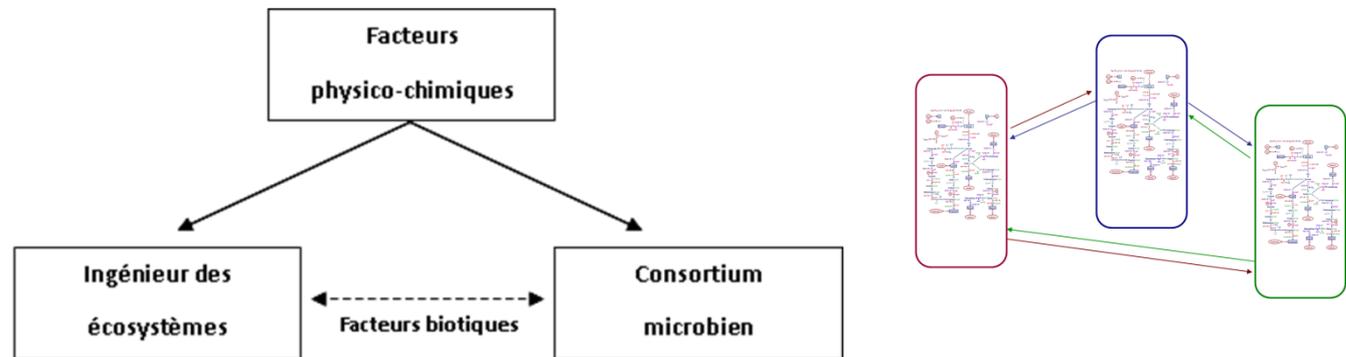
Contexte du projet

BioH2 = faible diversité = bon modèle pour étudier les interactions microbiennes en cultures mixtes

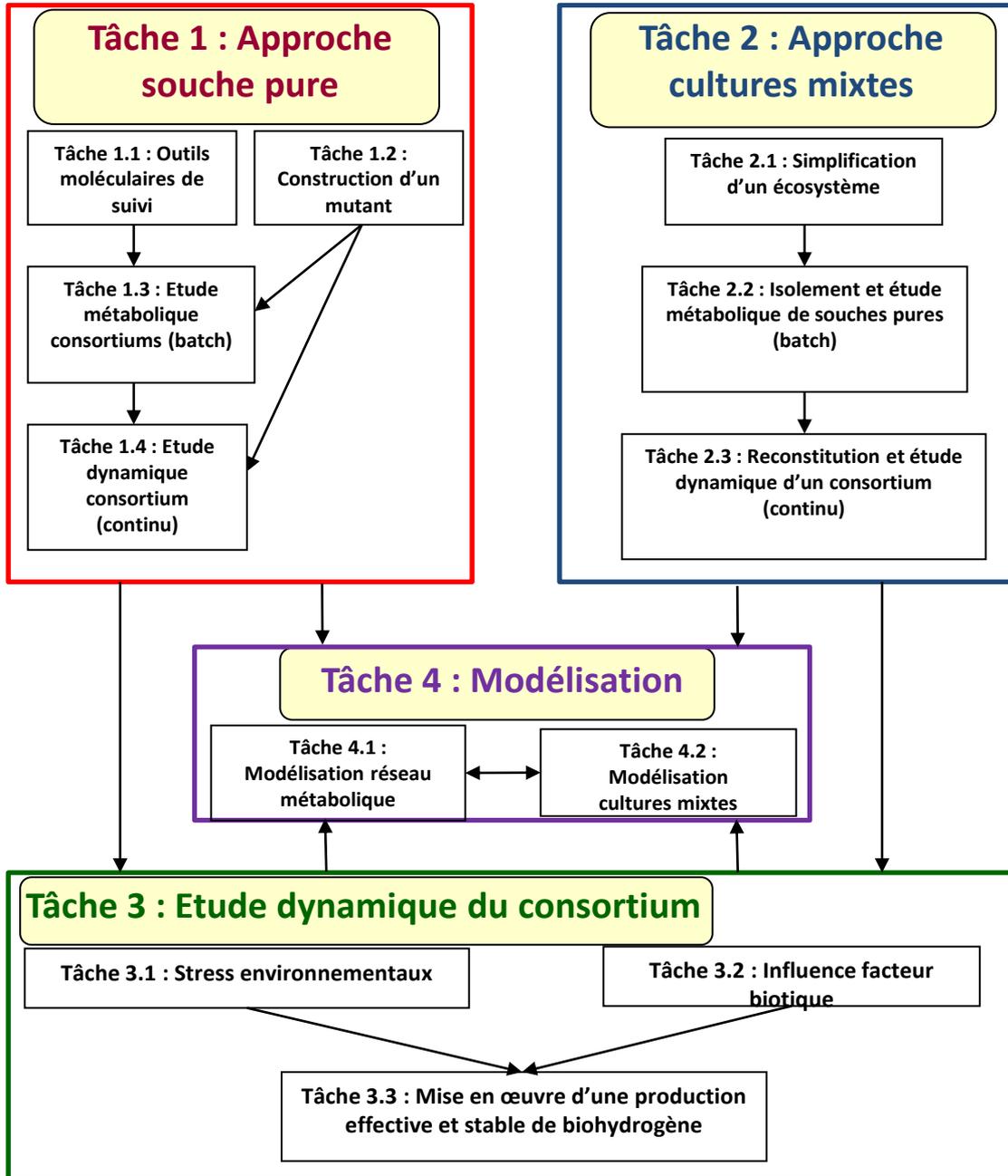


Contexte du projet

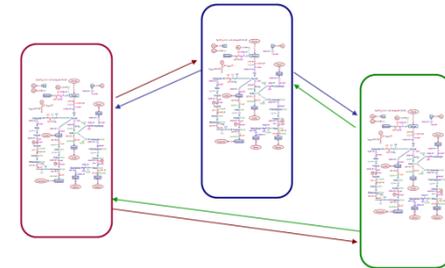
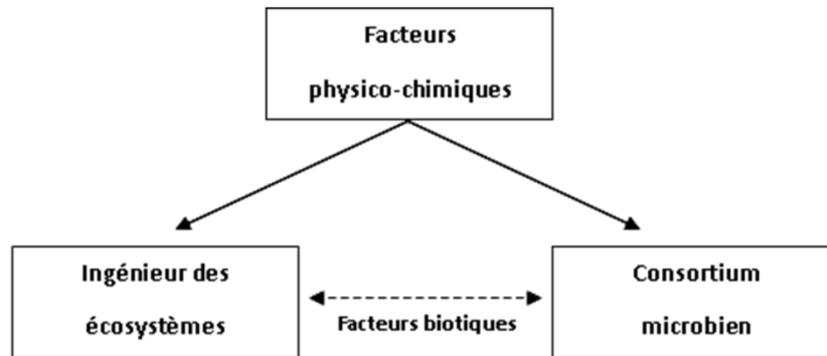
Développer une **approche innovante et pluridisciplinaire d'ingénierie écologique** qui consiste en la conception, la construction et l'étude de consortia microbiens afin d'établir les paramètres régissant les réseaux d'interactions métaboliques avec pour objectif d'optimiser la production d'hydrogène.



- (i) **de sélectionner et caractériser des bactéries à haut potentiel**
- (ii) **de construire /simplifier un consortium microbien** pour l'élaboration de modèles mécanistiques de réseaux d'interactions métaboliques,
- (iii) **d'étudier et optimiser les performances sous conditions réelles** en comparaison avec des écosystèmes plus complexes.



Structure du projet



- (i) **de sélectionner et caractériser des bactéries à haut potentiel** de production d'hydrogène,
- (ii) de construire /simplifier un consortium microbien pour l'élaboration de modèles mécanistiques de réseaux d'interactions métaboliques,
- (iii) d'étudier et optimiser les performances sous conditions réelles en comparaison avec des écosystèmes plus complexes.

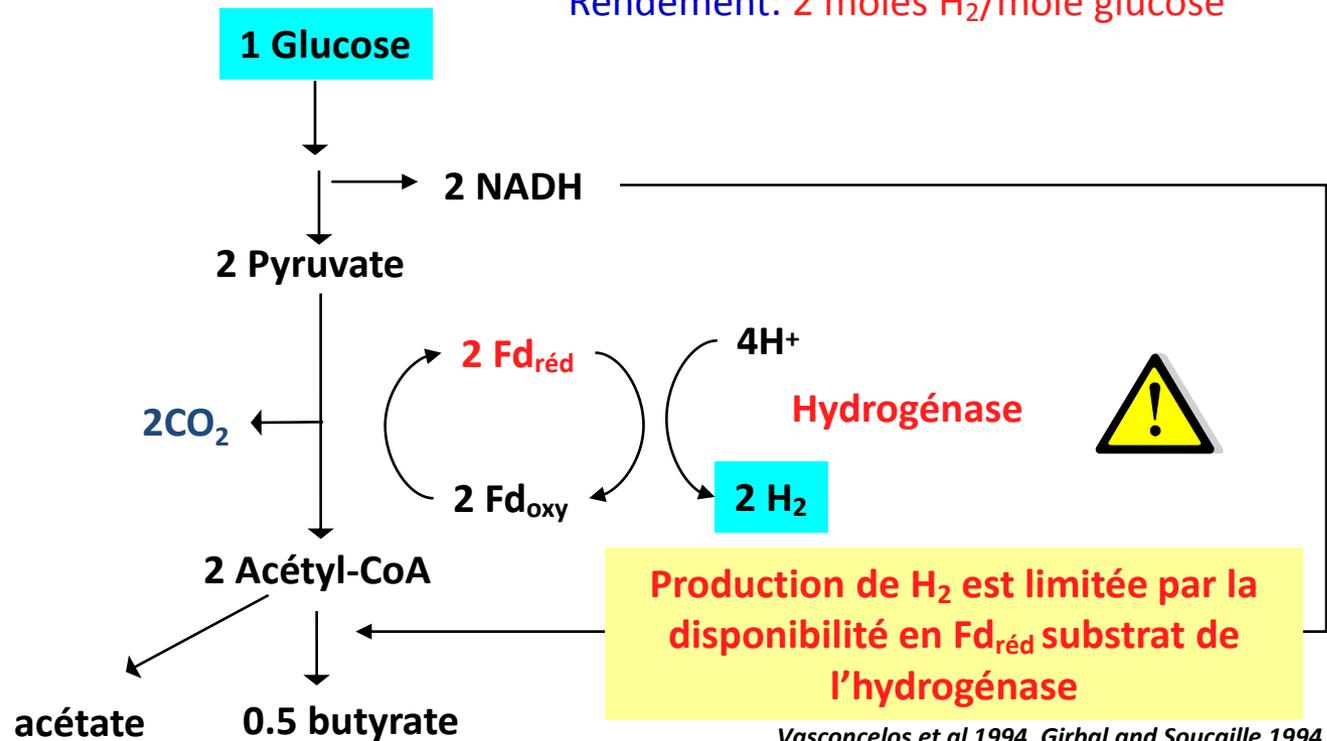
Résultats marquants: ingénierie métabolique

Stratégie d'ingénierie métabolique: augmenter le niveau de ferrédoxine réduite intracellulaire

Métabolisme H₂ de *Clostridium acetobutylicum*

Productivité 100 mmoles H₂/L.h

Rendement: 2 moles H₂/mole glucose

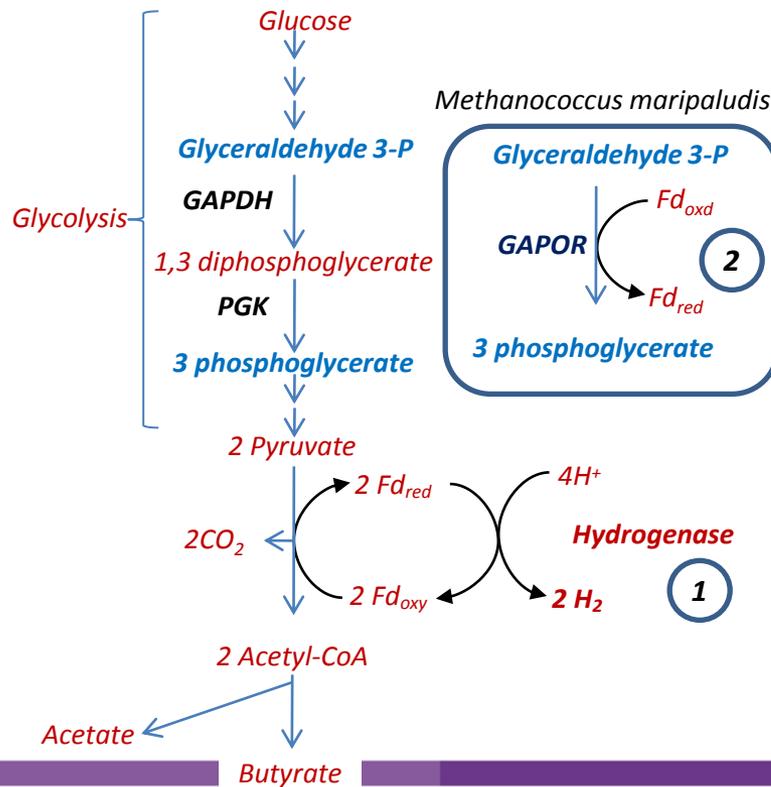


Vasconcelos et al 1994 Girbal and Soucaille 1994 Girbal et al. 1995

Résultats marquants: ingénierie métabolique

Stratégie d'ingénierie métabolique: augmenter le niveau de ferrédoxine réduite intracellulaire

→ Rajouter une enzyme ferrédoxine-dépendante au sein de la glycolyse = Glycéraldéhyde-3-phosphate ferredoxine oxydo-réductase, **GAPOR** de *Méthanococcus maripaludis*



Production d'H₂ limitée par la disponibilité du substrat Fd_{red} hydrogenase



Rendement attendu : 4 moles H₂ / mole de glucose

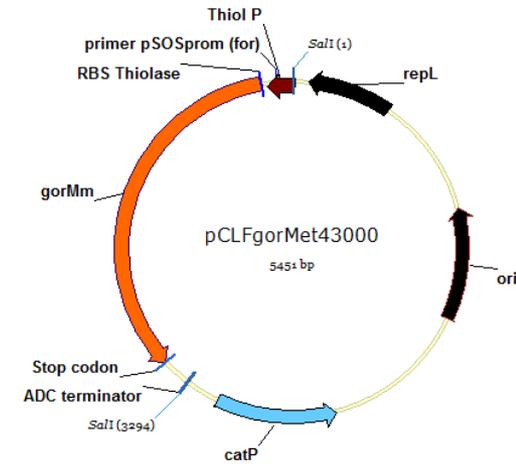
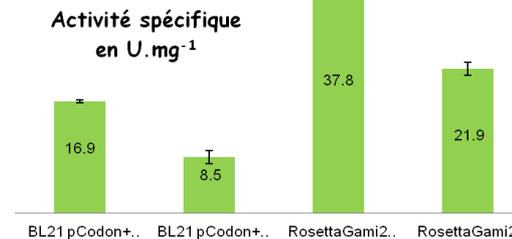
Résultats marquants: ingénierie métabolique

Stratégie d'ingénierie métabolique: augmenter le niveau de ferrédoxine réduite intracellulaire

Expression hétérologue et purification de la GAPOR chez *E. coli* et *C. acetobutylicum*

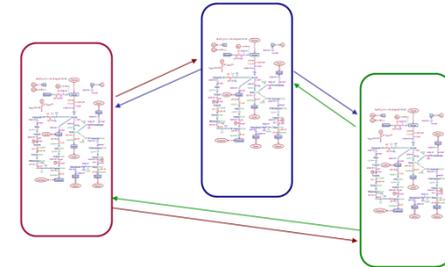
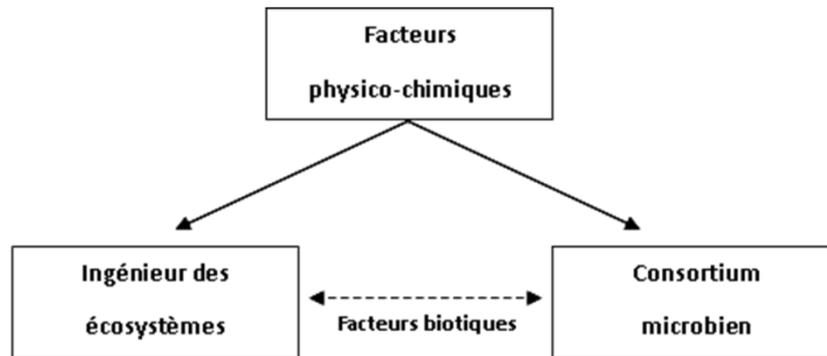
❖ Construction de nouveaux vecteurs d'expression pour *Clostridium acetobutylicum*

- ☞ Expression des GAPORs 43 000 et S2 sans étiquette
- ☞ Expression des GAPORs 43 000 et S2 fusionnées avec une étiquette histidine en N terminal



❖ Transformations de la souche *C. acetobutylicum* souche *D1502* + Souche délétée de la voie de synthèse du butyrate et de la solvantogénèse (brevet potentiel en cours)

Structure du projet

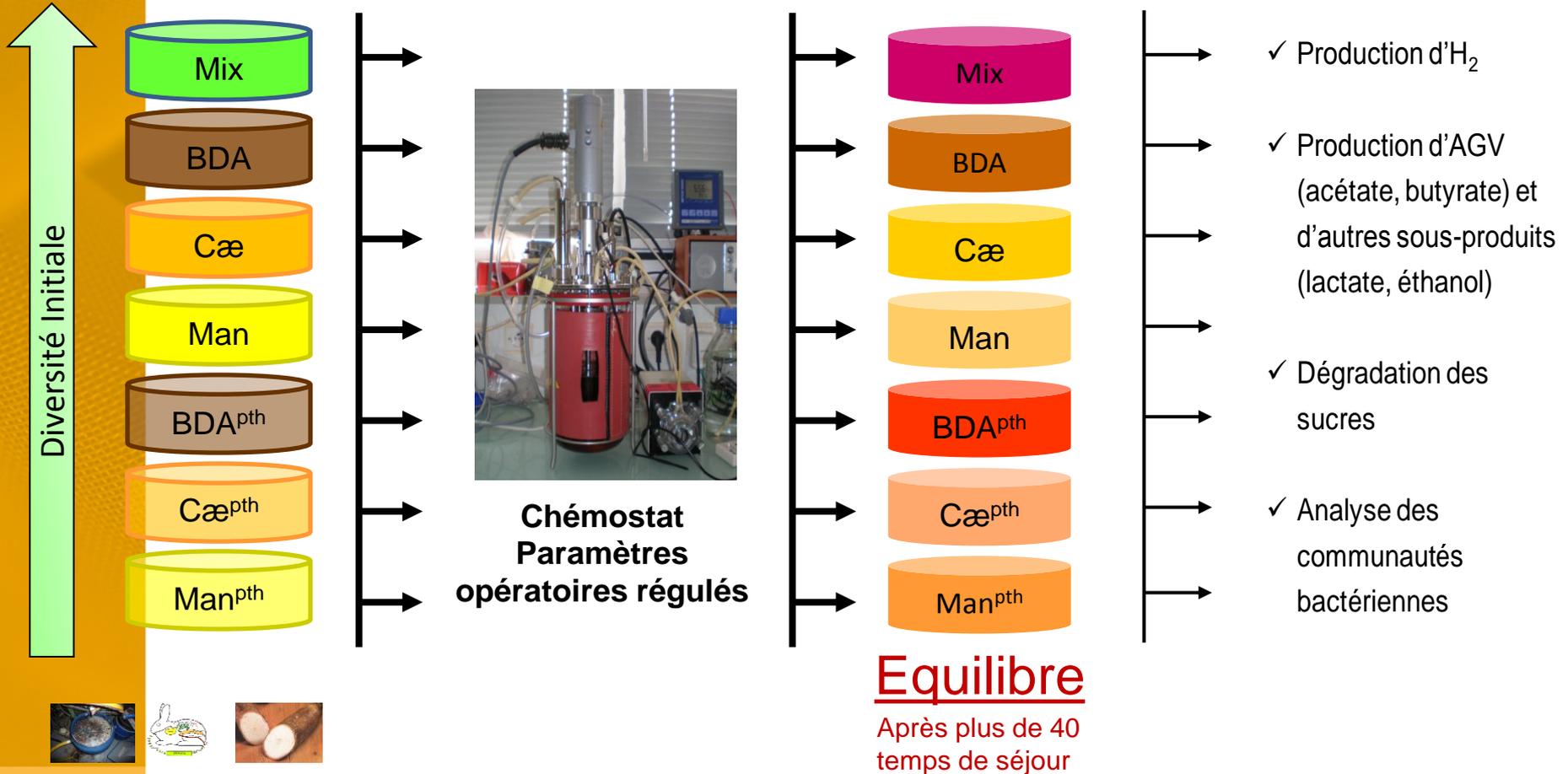


- (i) de sélectionner et caractériser des bactéries à haut potentiel de production d'hydrogène,
- (ii) **de construire /simplifier un consortium microbien** pour l'élaboration de modèles mécanistiques de réseaux d'interactions métaboliques,
- (iii) d'étudier et optimiser les performances sous conditions réelles en comparaison avec des écosystèmes plus complexes.

Résultats marquants: rôle des bactéries minoritaires



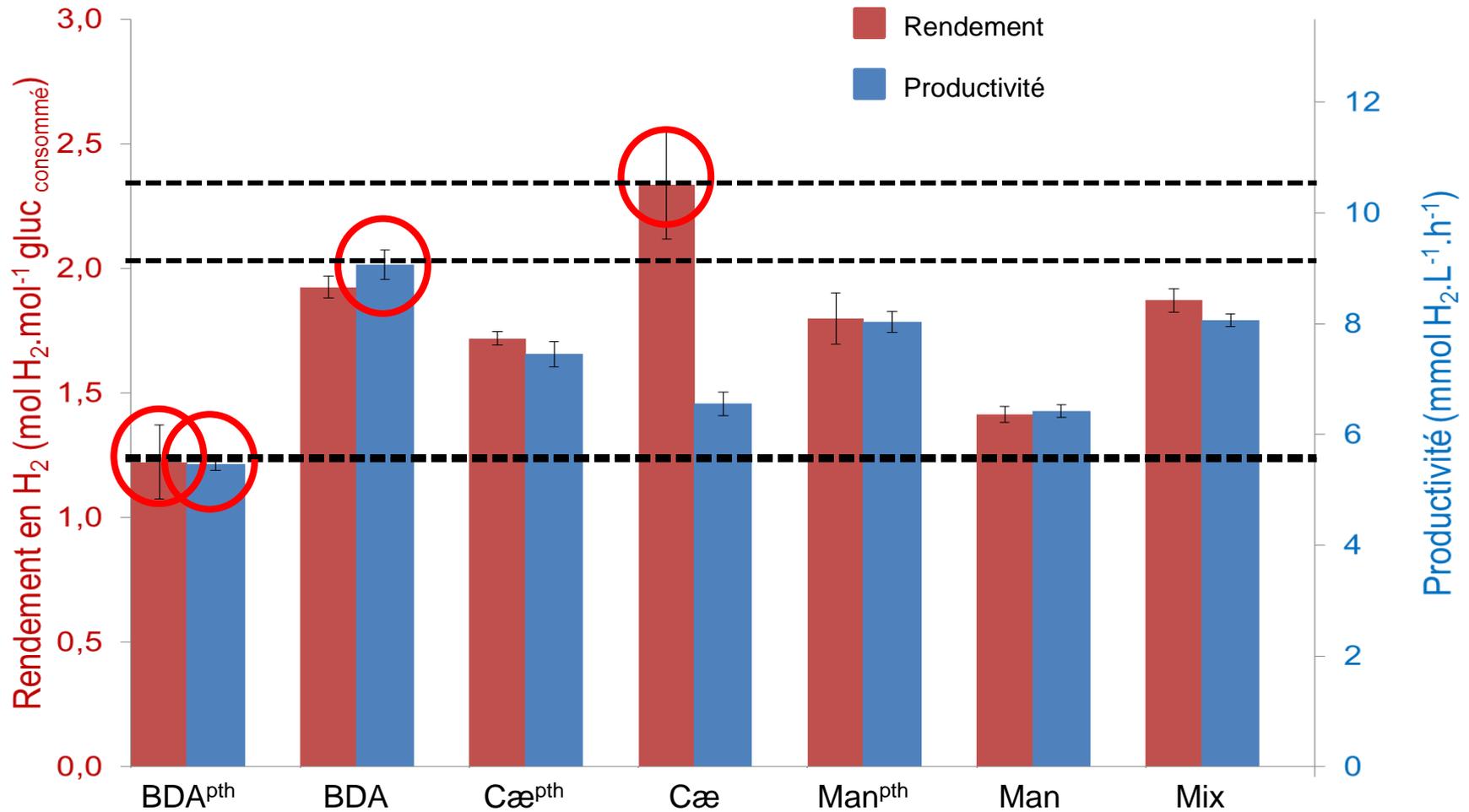
Approche Expérimentale



Equilibre

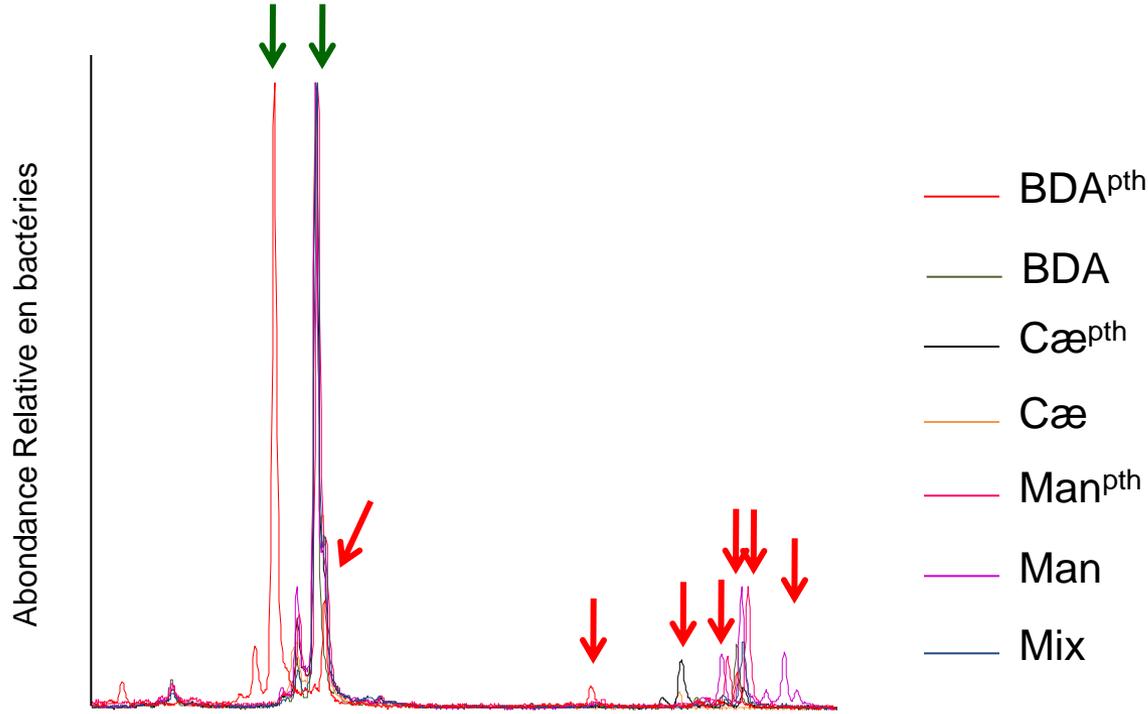
Après plus de 40 temps de séjour

Résultats marquants: rôle des bactéries minoritaires



Différences significatives sur les performances de production H₂ à l'équilibre en fonction des cultures

Résultats marquants: rôle des bactéries minoritaires



Une espèce dominante et de nombreuses minoritaires

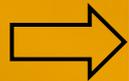
Excepté pour la culture BDA^{pth}, la **bactérie majoritaire est la même dans toutes les cultures**

La nature, le nombre et l'abondance relative des **bactéries minoritaires diffèrent**

Résultats marquants: rôle des bactéries minoritaires



	BDA ^{pth}	BDA	Cæ ^{pth}	Cæ	Man ^{pth}	Man	Mix
Rdt H ₂ (mol H ₂ .mol ⁻¹ glucose)	1,22	1,93	1,72	2,33	1,80	1,41	1,87
Productivité (mmolH ₂ .L ⁻¹ .h ⁻¹)	5,47	9,07	7,45	6,56	8,04	6,42	8,06
<i>Clostridium butyricum</i>	✓						
<i>Clostridium pasteurianum</i>		✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Clostridium beijerinckii</i>	✓	Clostridium	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Sporolactobacillus laevolacticus</i>	✓						
<i>Bacillus coagulans</i>	✓						
<i>Bacillus racemilacticus</i>	✓	✓					
<i>Lactobacillus paracasei</i>		Bactéries homolactiques			✓	✓	✓
<i>Lactobacillus casei</i>						✓	
<i>Lactobacillus nagelii</i>			✓				
<i>Lactobacillus ghanensis</i>			✓				
<i>Escherichia coli</i>		E. coli		✓			



3 groupes de bactéries minoritaires

Introduction d'espèces bactériennes exogènes

Utilisations de **facteurs biotiques** pour **stabiliser** ou **améliorer** la
production d'hydrogène par voie fermentaire en cultures mixtes
(Ingénieur des écosystèmes microbiens - IEM)

Résultats marquants: Ingénierie des écosystèmes microbiens



Espèces bactériennes testées :

Espèces	Métabolisme respiratoire	Métabolisme hydrogène
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Anaérobie strict	+
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Anaérobie strict	+
<i>Escherichia coli</i>	Anaérobie facultatif	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	Anaérobie facultatif	+
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Anaérobie facultatif	0
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Anaérobie facultatif	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aérobie strict	0
<i>Desulfovibrio vulgaris (DvH)</i>	Anaérobie strict	+ / -
<i>Ralstonia eutropha</i>	Aérobie strict	-

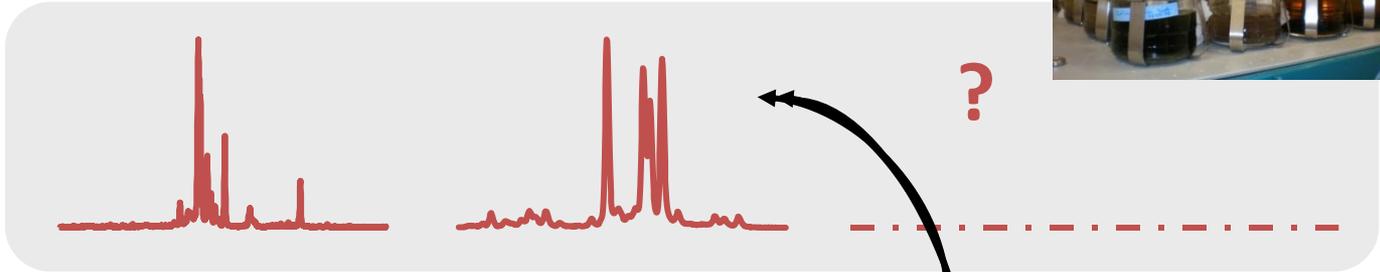
Choix d'un éventail représentatif de métabolismes susceptibles d'interagir avec l'écosystème

Résultats marquants: Ingénierie des écosystèmes microbiens

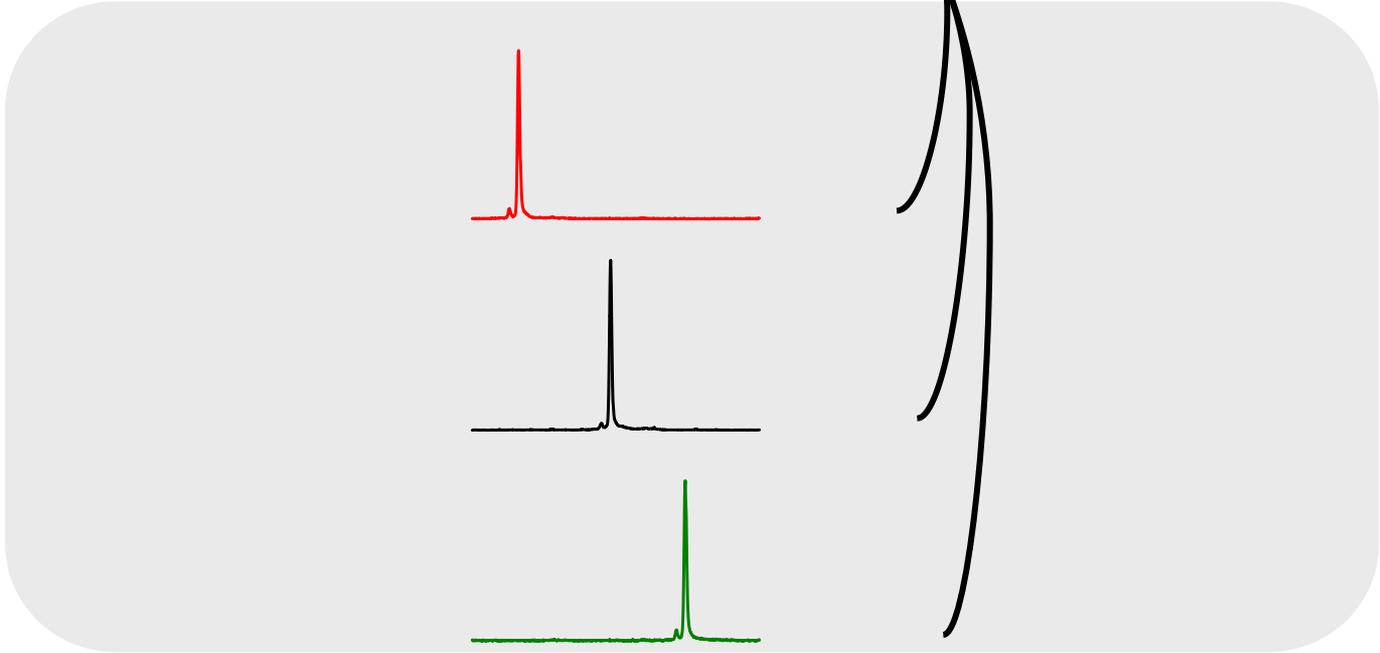
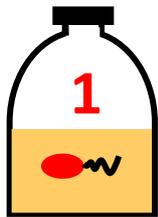
Cultures discontinues (glucose 10 g.L⁻¹; 37°C; pH=6; milieu semi-synthétique)



Eco A
Eco B



Espèce 1



Espèce 2



Espèce 3

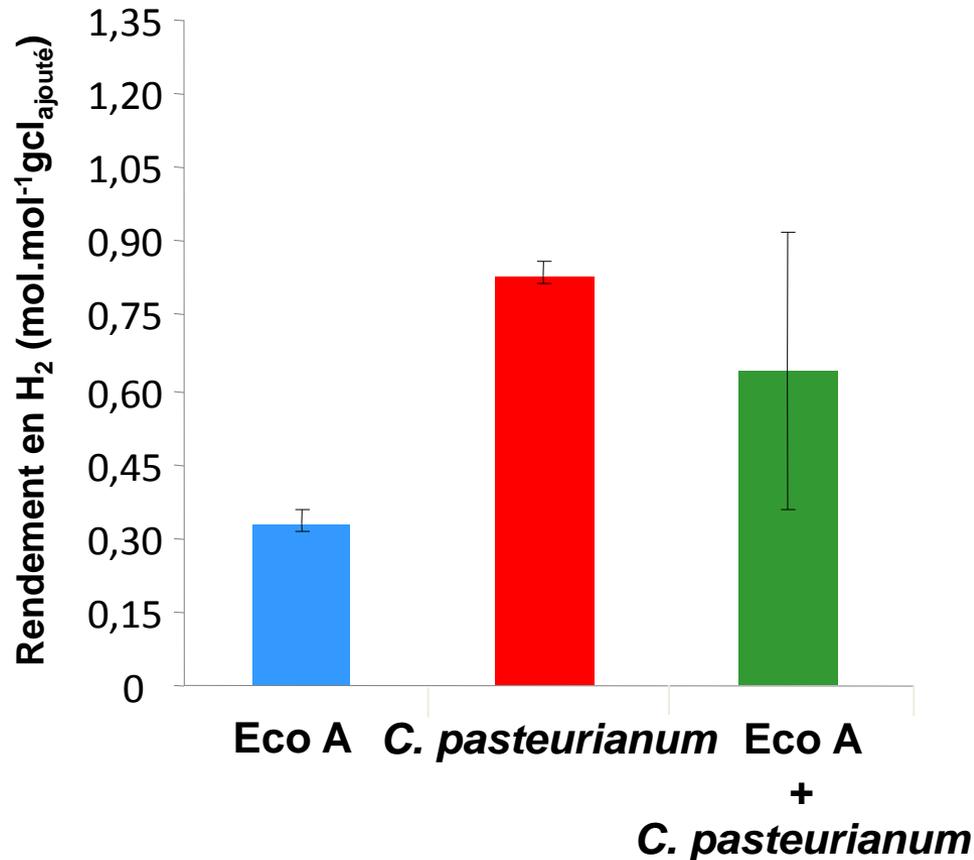


0 1 2 3 Temps (jours)

Résultats marquants: Ingénierie des écosystèmes microbiens

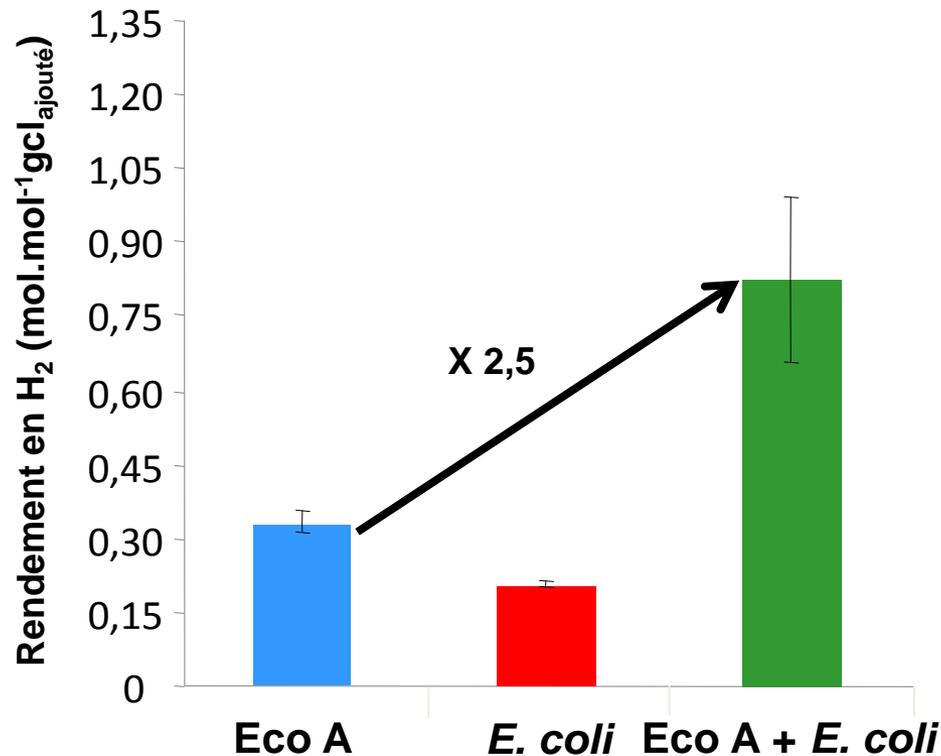


- ✓ 1^{er} cas : **pas d'effet significatif d'interaction**
 - Ajout de *Clostridium pasteurianum* = compétition microbienne



Résultats marquants: Ingénierie des écosystèmes microbiens

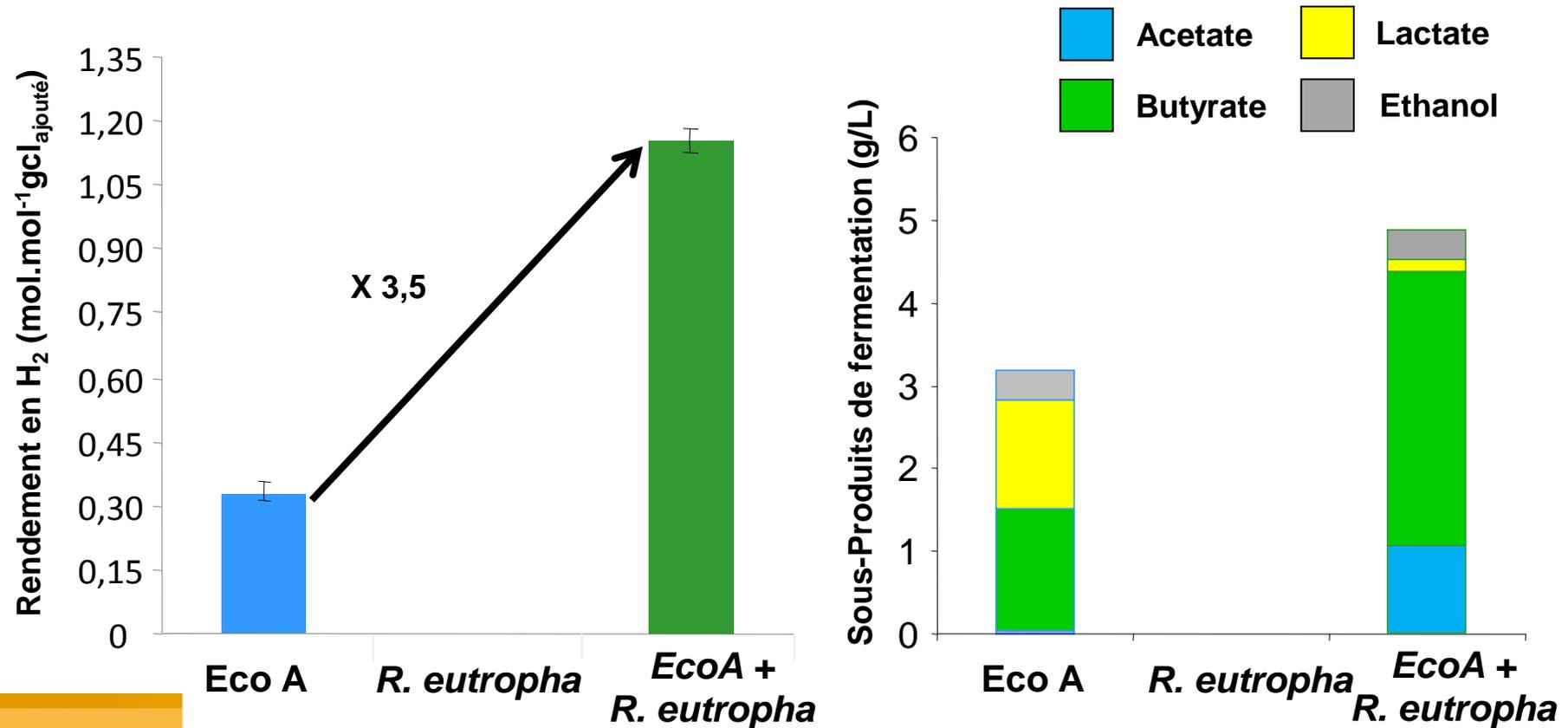
- ✓ 2nd cas : **effet positif** sur les performances de production d'H₂
 - Ajout d'*Escherichia coli* = interaction positive avec Eco A
 - Augmentation de la production d'acétate et de butyrate



Résultats marquants: Ingénierie des écosystèmes microbiens



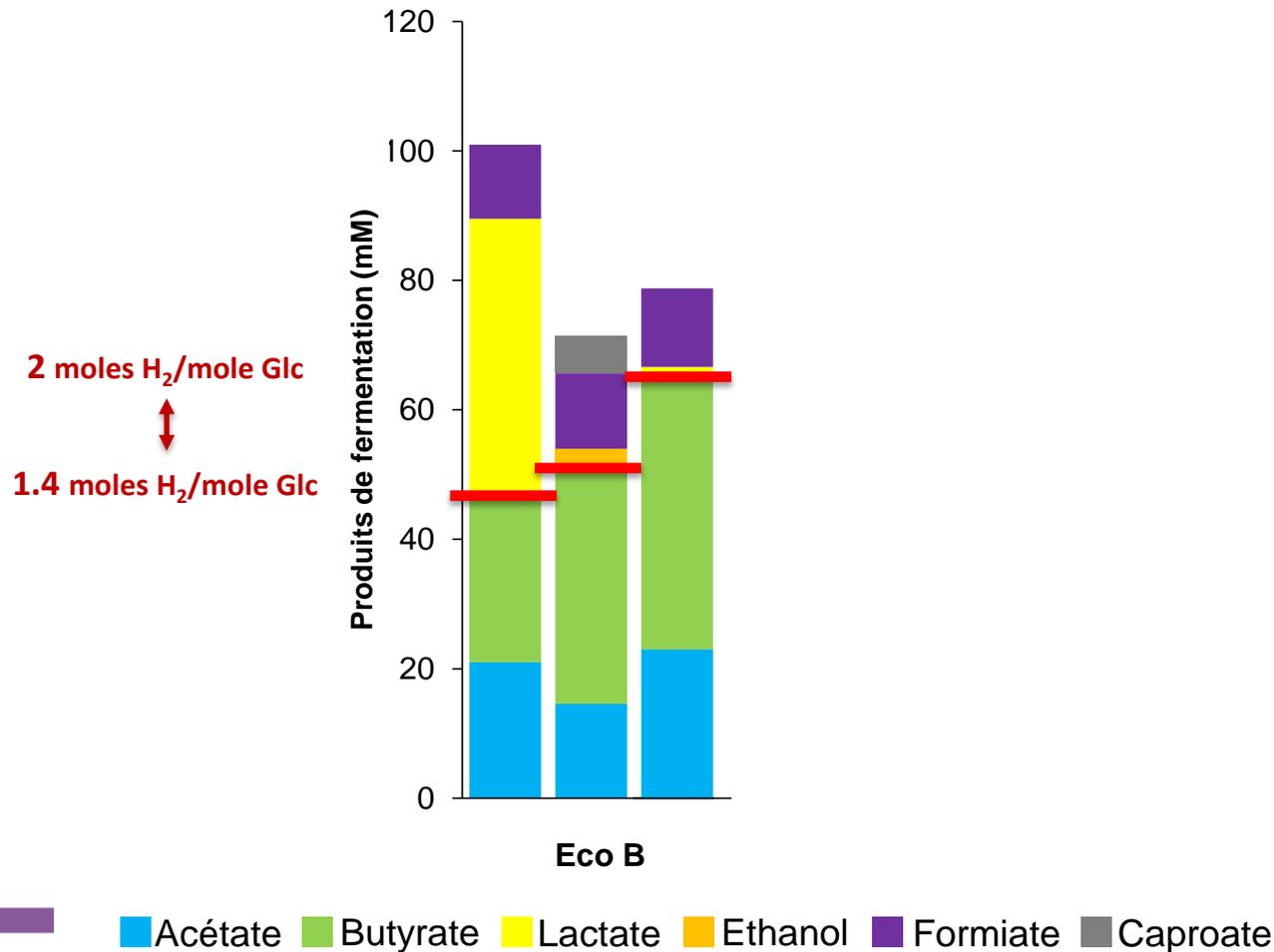
- ✓ 3^{ème} cas : **effet positif** sur les performances de production d'H₂
 - Ajout de *Ralstonia eutropha* = **synergie avec EcoA**
 - Augmentation de la production d'acétate et de butyrate dans le mélange



Résultats marquants: Ingénierie des écosystèmes microbiens

Stabilisation du métabolisme de l'écosystème (interaction positive)

exemple de *R. eutropha* ou *E.coli*



Résultats marquants: Ingénierie des écosystèmes microbiens



Espèces	Métabolisme respiratoire	Métabolisme hydrogène	Stabilité	Rendement H ₂
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Anaérobie strict	+	+	0
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Anaérobie strict	+	+	0
<i>Escherichia coli</i>	Anaérobie facultatif	+	+	++
<i>Enterobacter cloacae</i>	Anaérobie facultatif	+	-	+
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Anaérobie facultatif	0	0	0
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Anaérobie facultatif	0	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Aérobie strict	0	-	0
<i>Desulfovibrio vulgaris (DvH)</i>	Aérobie strict	- / +	0	**++++**
<i>Ralstonia eutropha</i>	Aérobie strict	-	+	+++

Résultats marquants: Ecosystème microbien synthétique



Clostridium

Clostridium acetobutylicum
ATTC824 (Cab)



Gram+
Fermentation ABE

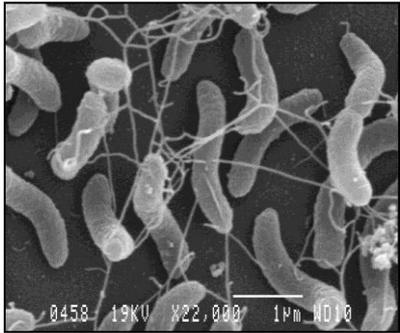
H₂, Ethanol

Anaérobie
Mesophile
**Genome
sequence**

Milieu Minimal
Un substrat
énergétique de façon
à contrôler le flux
métabolique
(Glucose 14 mM +
Oligo-éléments)

SRB

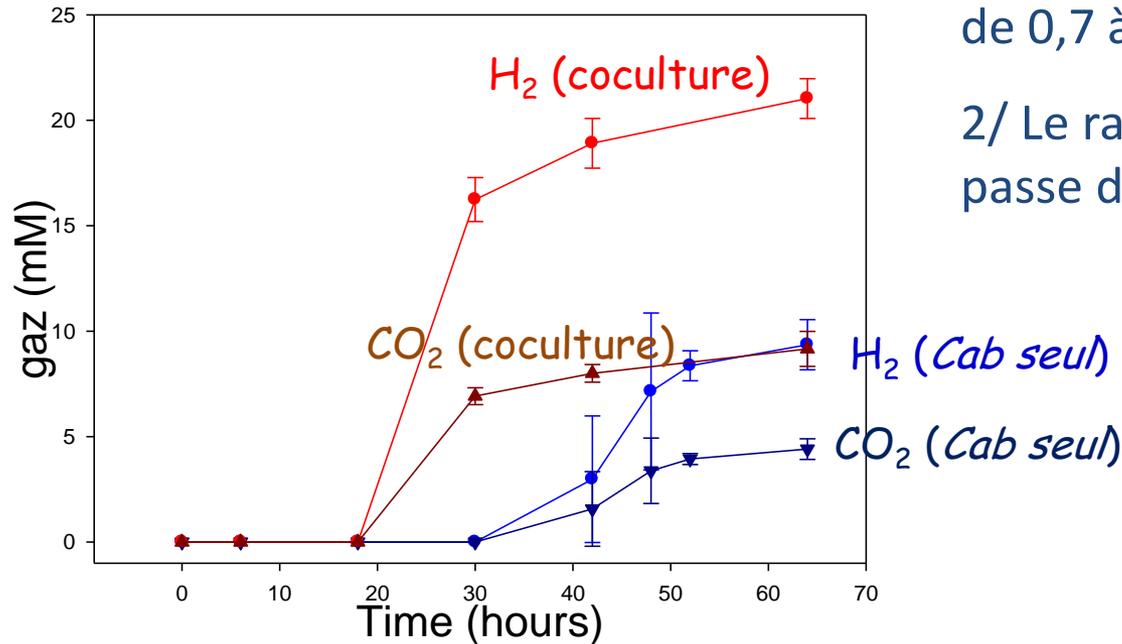
Desulfovibrio vulgaris
Hildenborough (DvH)



Gram-
sulfate respiration (BSR)

Production/consommation H₂

Résultats marquants: Ecosystème microbien synthétique



1/ Production H₂ (x 2.3)
de 0,7 à 1,6 mole H₂/mole Glc

2/ Le ratio H₂/CO₂
passe de 50:50 à 66:33

La co-culture présente des propriétés « émergentes »

Résultats marquants: Ecosystème microbien synthétique



Etude Transcriptomique (Q RT PCR)

Coculture (Cab)
/ Culture pure (Cab)

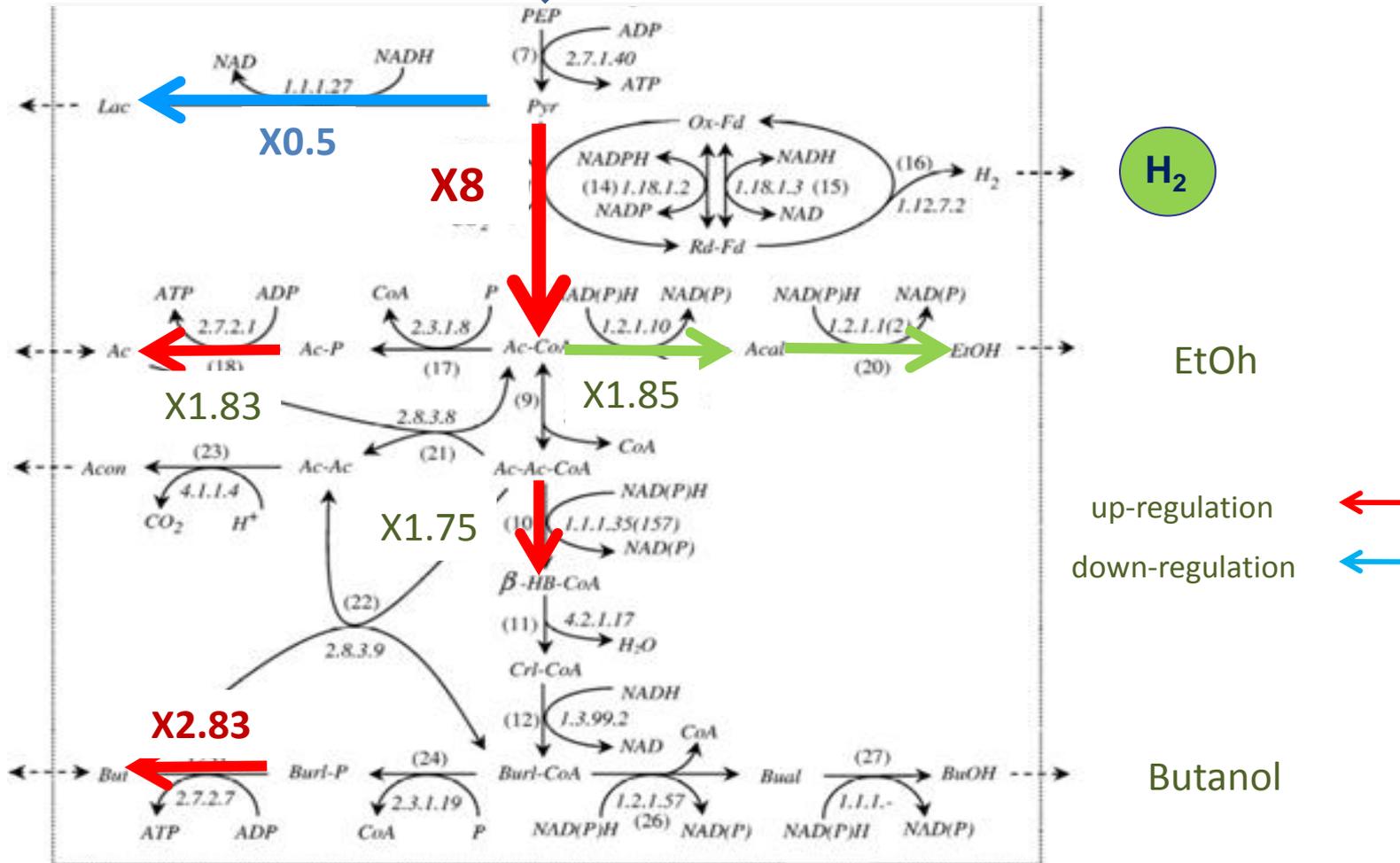
Glucose

Lactate

Acetate

Acetone

Butyrate



H₂

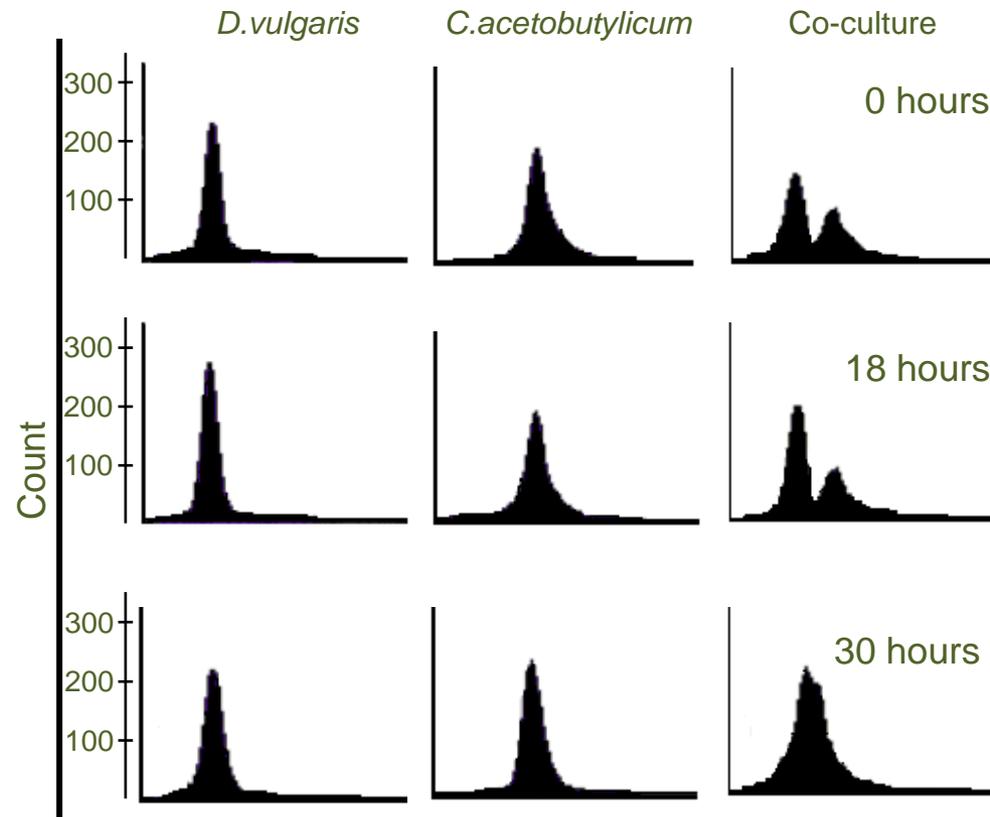
EtOH

up-regulation ←
down-regulation ←

Butanol

CONTACT PHYSIQUE NECESSAIRE (test membrane dialyse) !

Résultats marquants: Ecosystème microbien synthétique

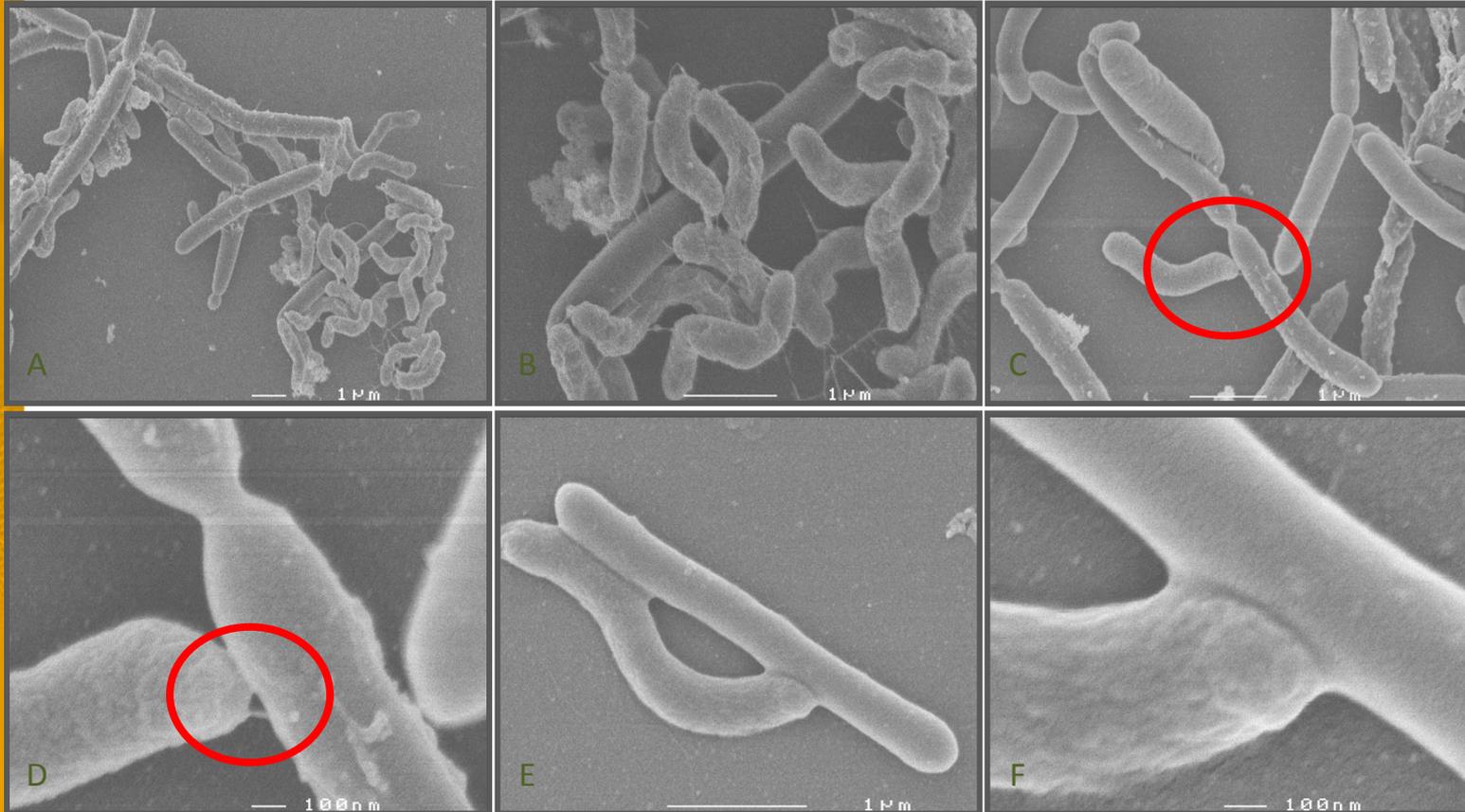


A la fin de la culture, DvH représente environ 50% des bactéries présentes (PCRq), Alors que seule elle ne pousse pas.

Résultats marquants: Ecosystème microbien synthétique

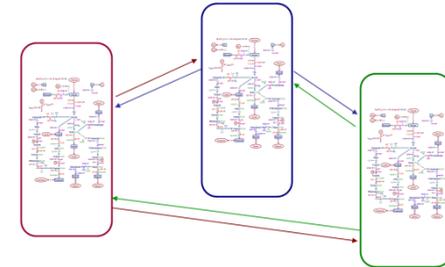
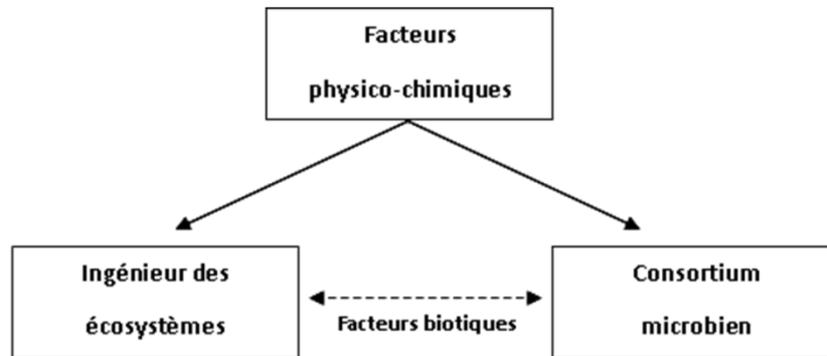
High Resolution Scanning Electron Microscopy

(ni pili ni flagelle – fusion peptidoglycane ? – stress nutritionnel)



. (A) (x8000). (B) = A (x22000), (C) (x18000), (D) = C (x80000). (E) (x30000) , (F) = E (x100000).

Structure du projet



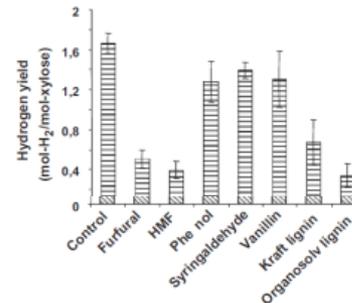
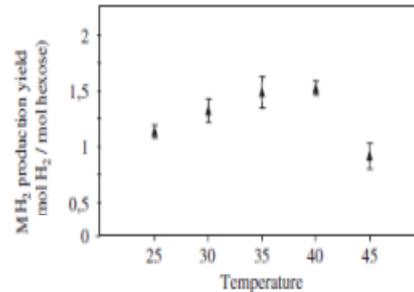
- (i) de sélectionner et caractériser des bactéries à haut potentiel de production d'hydrogène,
- (ii) de construire /simplifier un consortium microbien pour l'élaboration de modèles mécanistiques de réseaux d'interactions métaboliques,
- (iii) **d'étudier et optimiser les performances** sous conditions réelles en comparaison avec des écosystèmes plus complexes.

Résultats marquants: effet paramètres opératoires



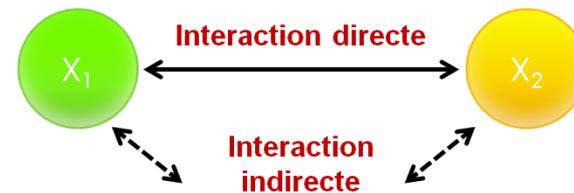
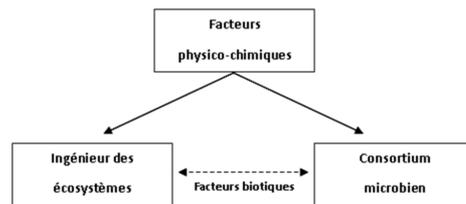
- Effet pH (4.5 à 7)
- Effet température (25 à 50°C)
- Effet type de substrat (□ avec PM)
- Effet inhibiteurs - biomasse (□ avec PM)
- Effet charge organique et Fer (limitations substrats)

Rendements moyens
1 à 1.5 moles H₂/mole Glc
entre
0.3 et 2.1 moles H₂/mole Glc



Bilans et perspectives

- ✓ Lien structure – fonction à nouveau observé (rôle important des minoritaires)
 - ✓ Effet des paramètres opératoires dépendant de la structure des communautés microbiennes présentes
 - ✓ **IEM = amélioration de la stabilité métabolique et redirection vers la production d'H₂ (vers des performances maximales)**
 - ✓ Etude approfondie de ces interactions bactéries/bactéries = phénomène répandu ??
 - ✓ 4 articles publiés, 2 soumis, +6 attendus // 14 communications orales // 1 brevet potentiel // 1 projet EU associé
- **Utilisation possible de facteurs biotiques pour stabiliser le système ou l'orienter vers la production de molécules d'intérêt**





Merci pour votre attention

