

# 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)**

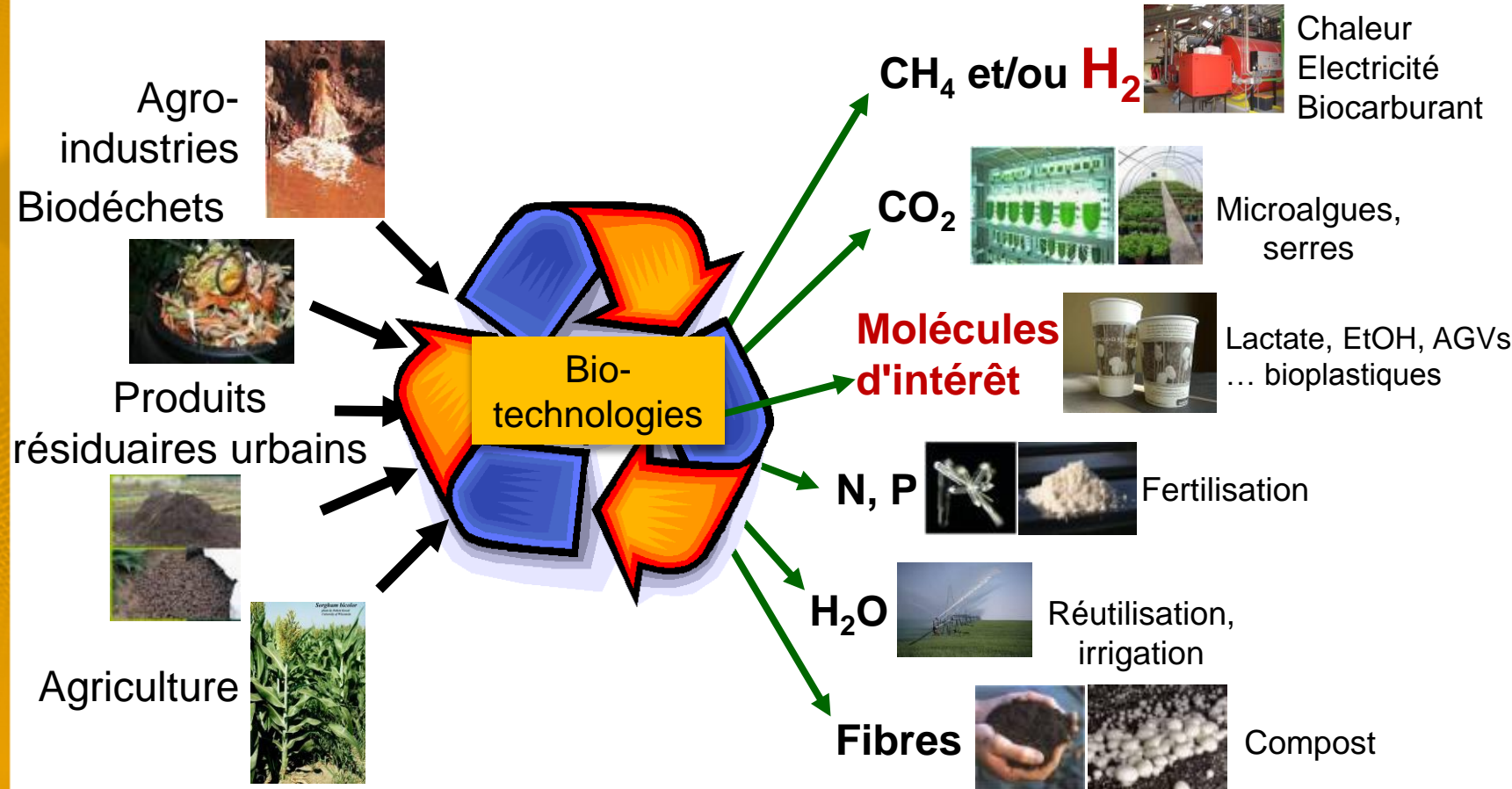
**UMR INSA/CNRS 5504, UMR INSA/INRA 792**

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



# Contexte du projet

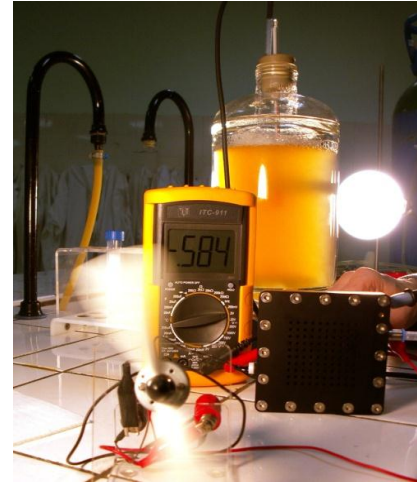
Le biohydrogène : au coeur du concept de bioraffinerie environnementale



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<sub>H2</sub>/L/h)  
Rendement -  
(mol<sub>H2</sub>/mol<sub>glucose</sub>)

0.5-5

0.8-1.1

**0.5 - 100**

**0.1 - 3**

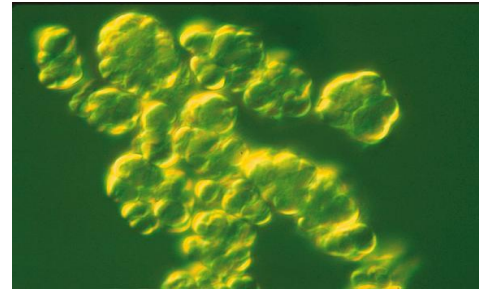
- (+) Production en continu
- ø lumière
- Peu de surface requise
- Utilisation de substrats complexes

# Contexte du projet

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



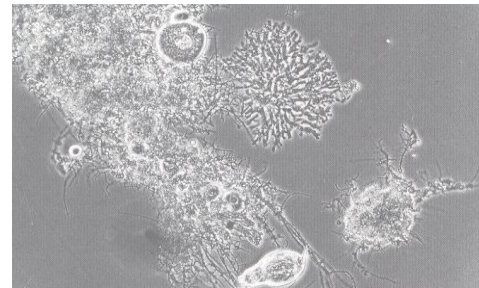
Un substrat simple (sucre)



Un microorganisme



Un substrat complexe (déchet)

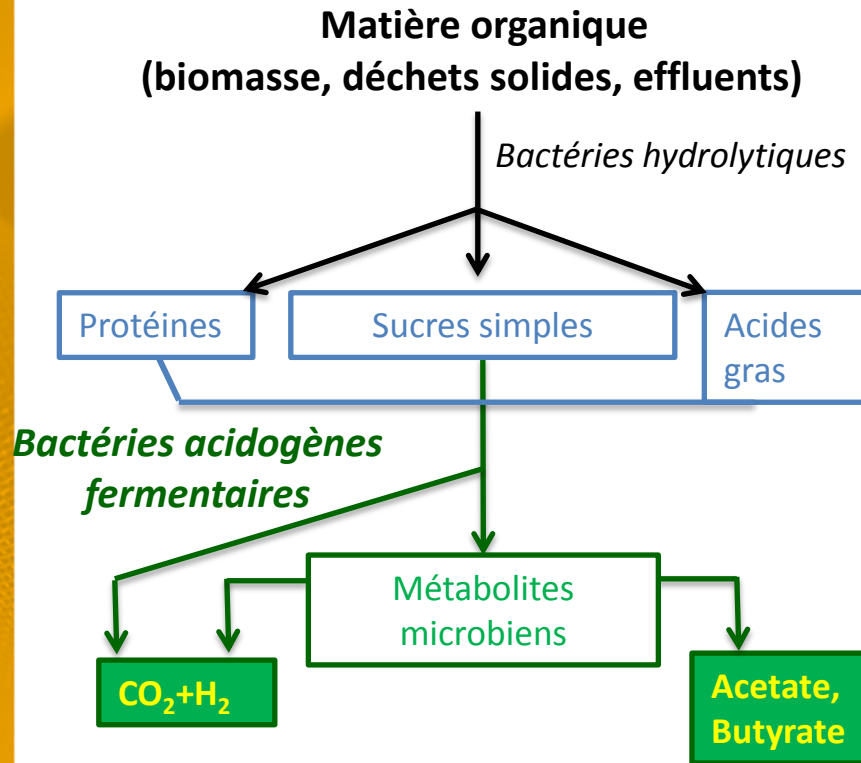


Un écosystème



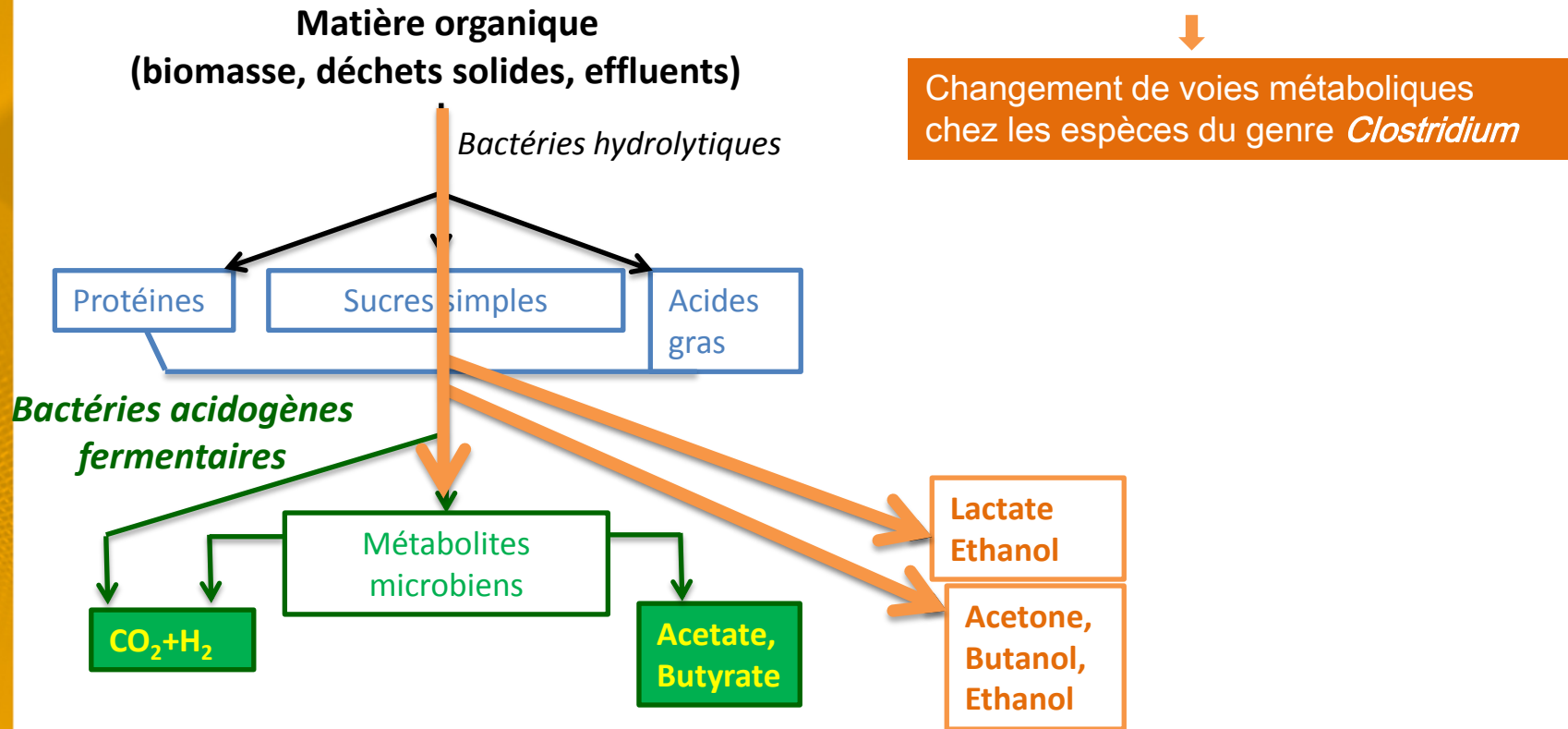
# Contexte du projet

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



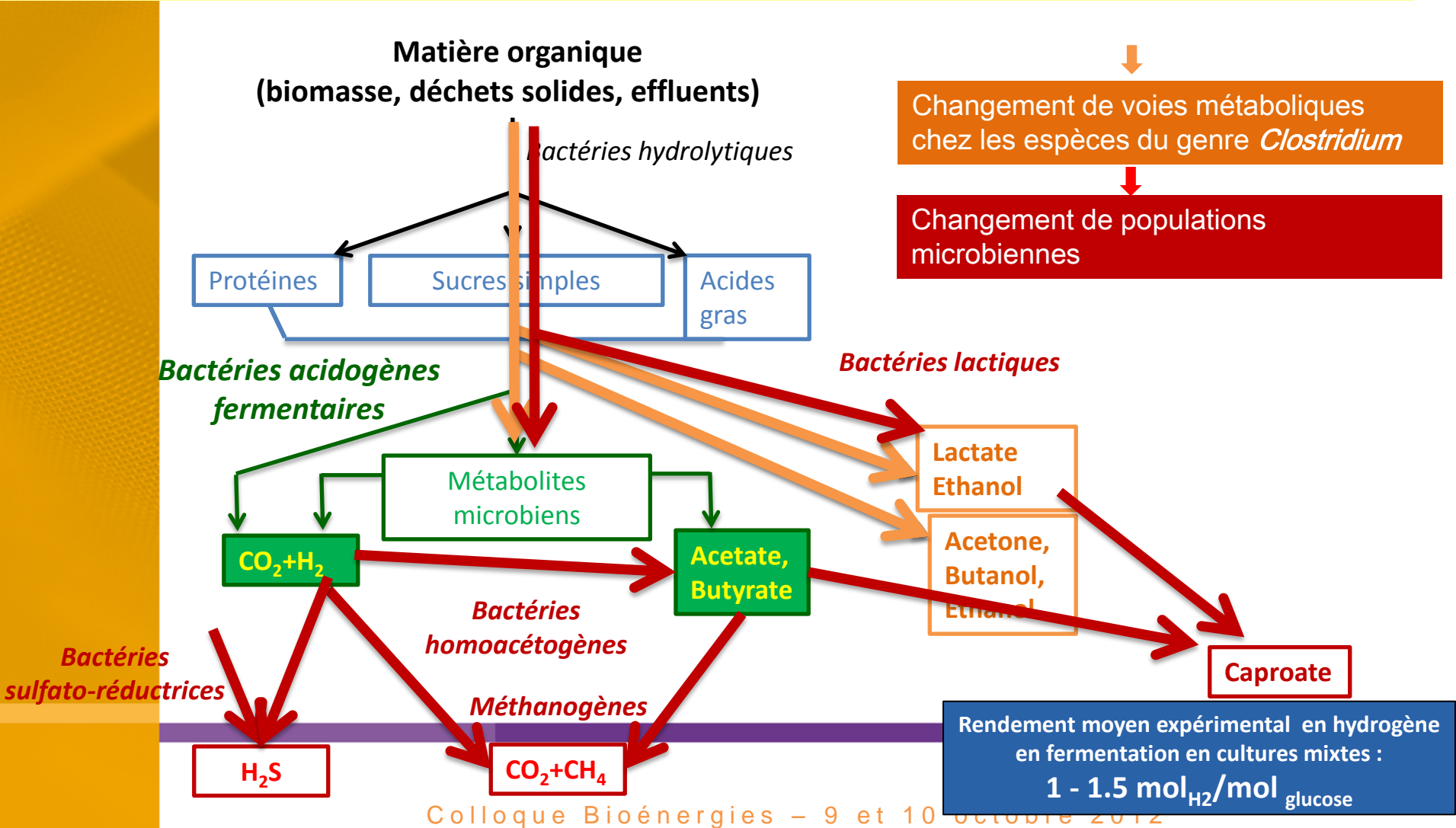
# Contexte du projet

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



# Contexte du projet

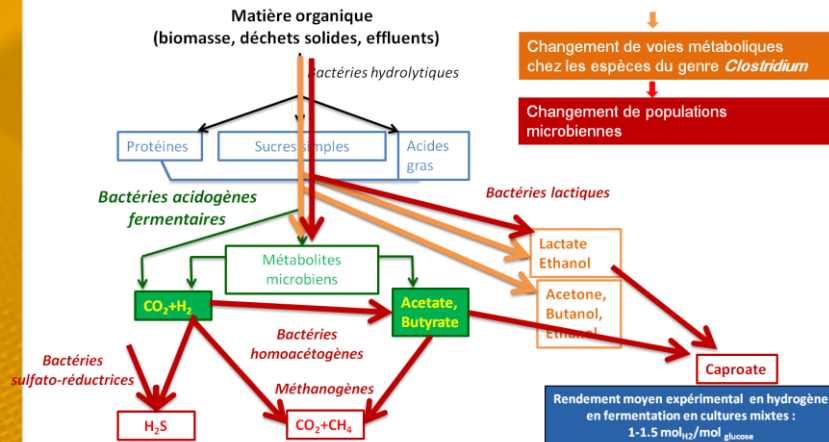
Les cultures mixtes = un large potentiel de valorisation de la biomasse... avec des limitations métaboliques et écologiques





# Contexte du projet

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

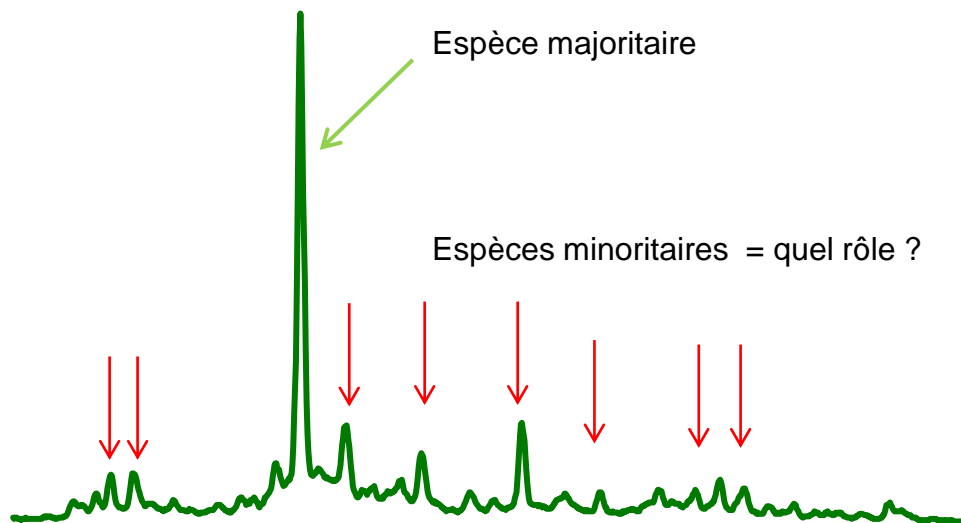


Facteurs biotiques  
(lien structure – fonction,  
interactions microbiennes)



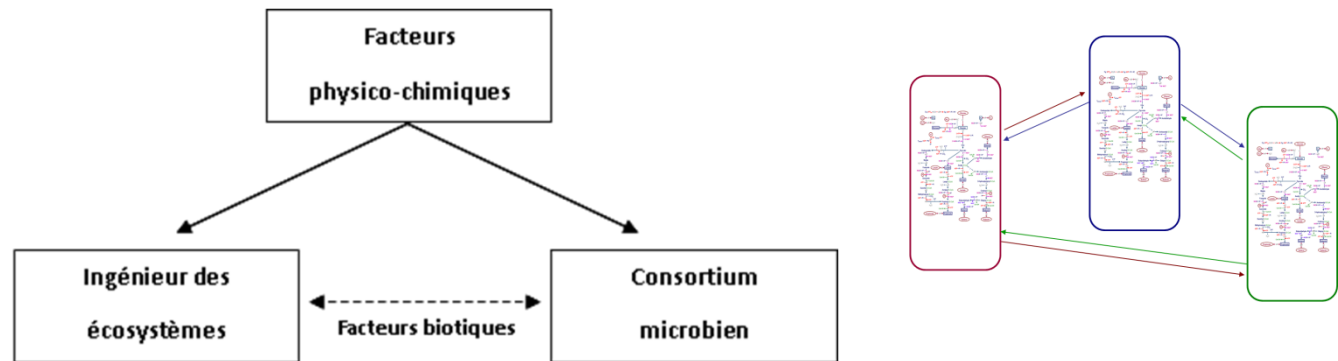
# Contexte du projet

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

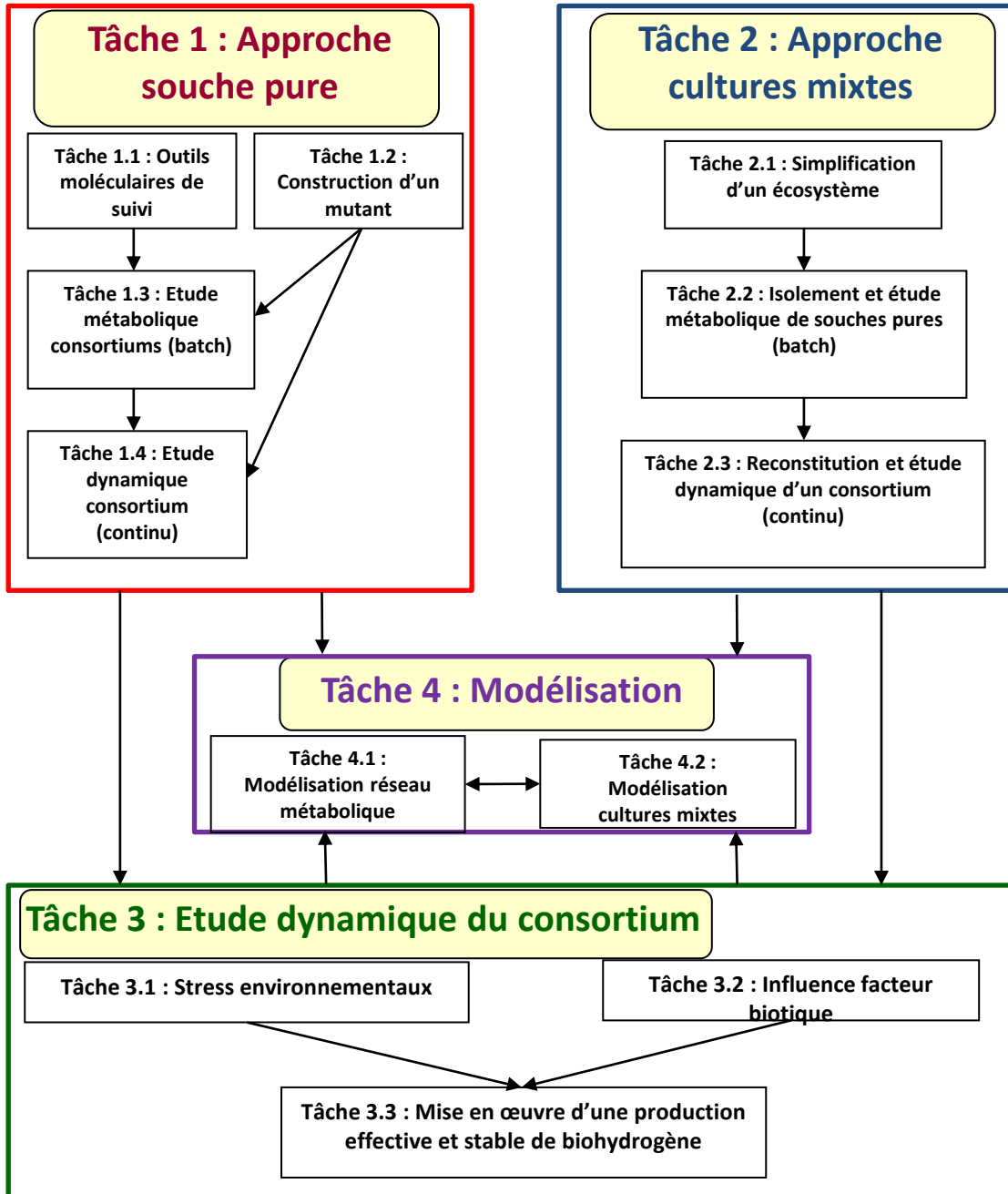


# Contexte du projet

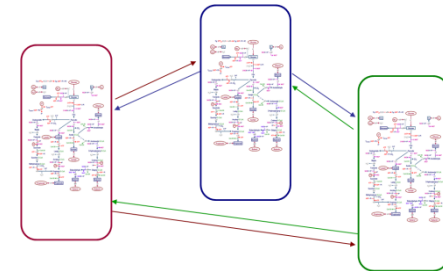
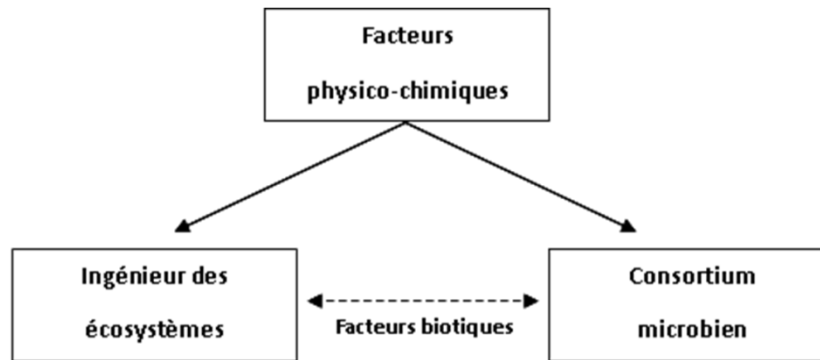
Développer une **approche innovante et pluridisciplinaire d'ingénierie écologique** qui consiste en la conception, la construction et l'étude de consortia microbiens afin d'établir les paramètres régissant les réseaux d'interactions métaboliques avec pour objectif d'optimiser la production d'hydrogène.



- (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.

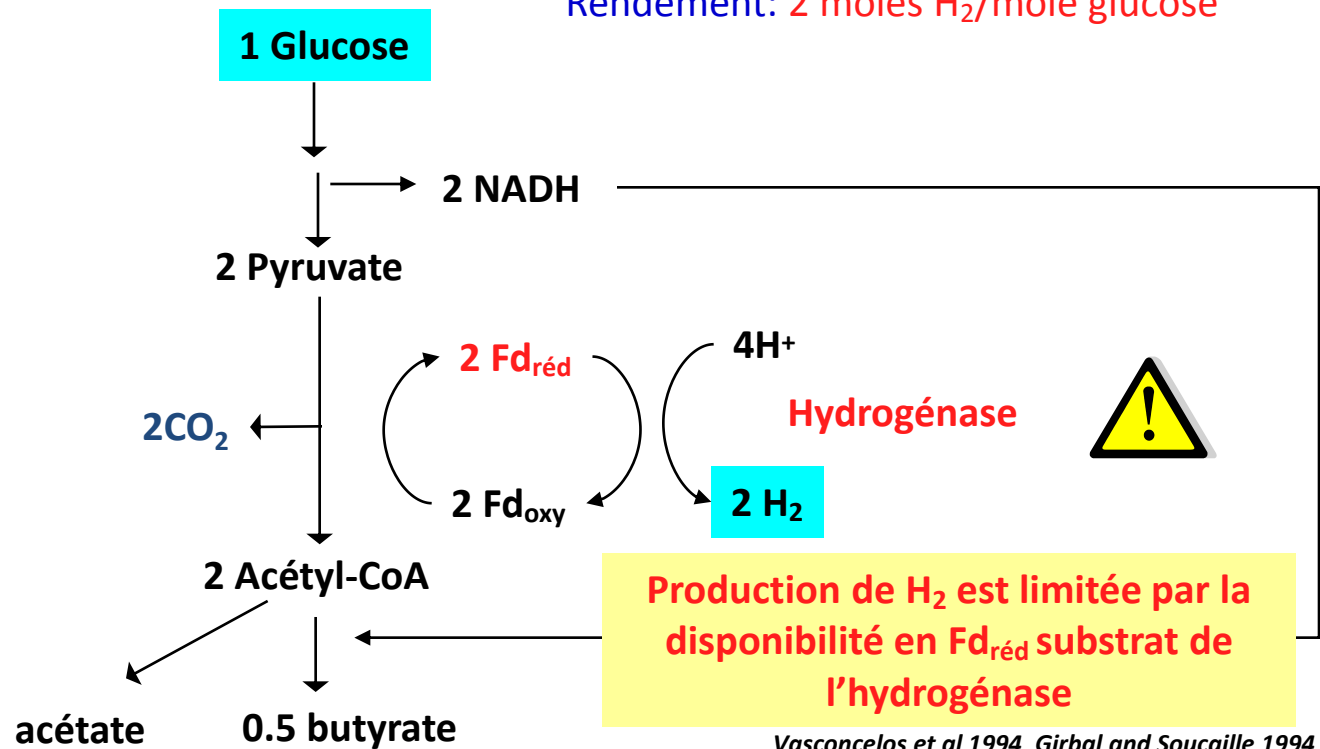
# Résultats marquants: ingénierie métabolique

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

Métabolisme H<sub>2</sub> de *Clostridium acetobutylicum*

Productivité 100 mmoles H<sub>2</sub>/L.h

Rendement: 2 moles H<sub>2</sub>/mole glucose

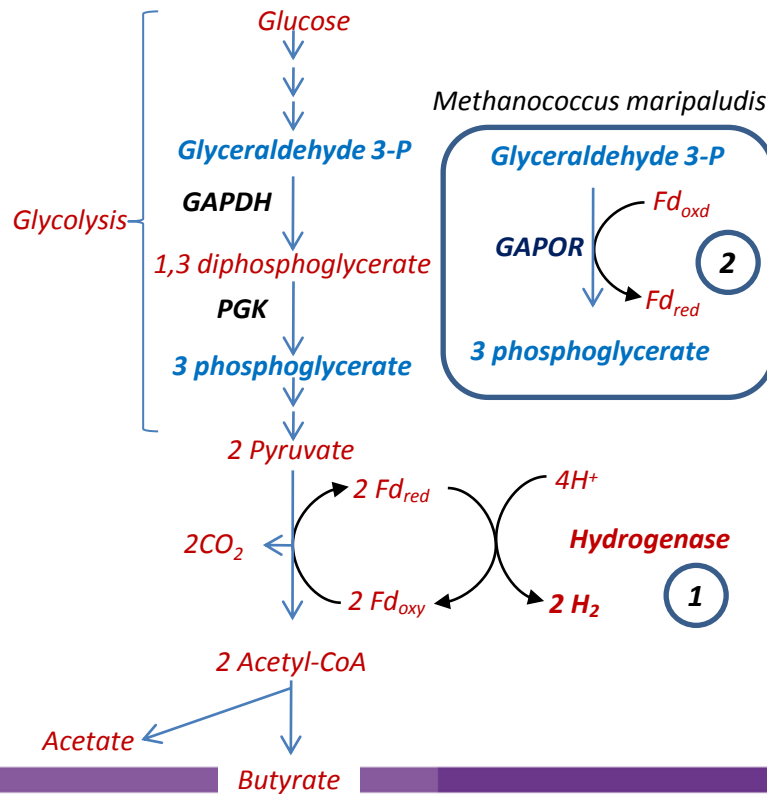


Vasconcelos et al 1994 Girbal and Soucaille 1994 Girbal et al. 1995

# 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 *Methanococcus maripaludis*



Production d'H<sub>2</sub> limitée par la disponibilité du substrat Fd<sub>red</sub> hydrogenase



**Rendement attendu : 4 moles H<sub>2</sub> / mole de glucose**

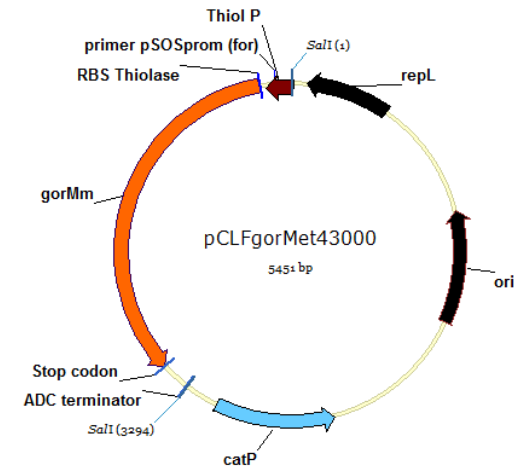
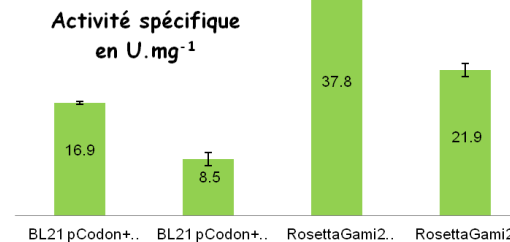
# Résultats marquants: ingénierie métabolique

**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*

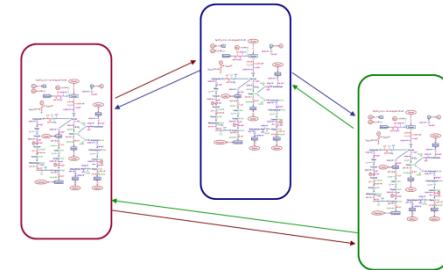
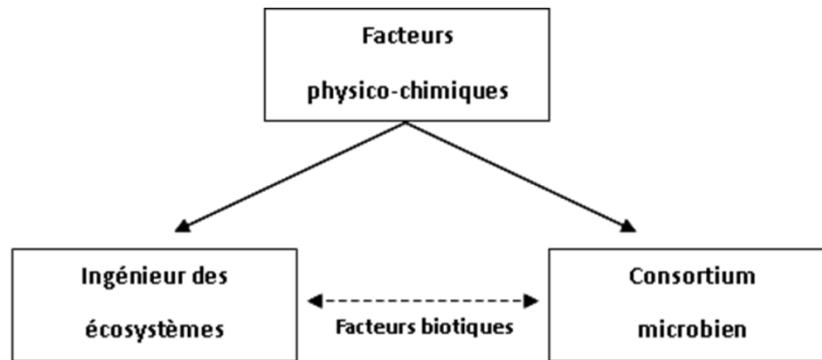
- ☞ Expression des GAPORs 43 000 et S2 sans étiquette
- ☞ Expression des GAPORs 43 000 et S2 fusionnées avec une étiquette histidine en N terminal



❖ 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

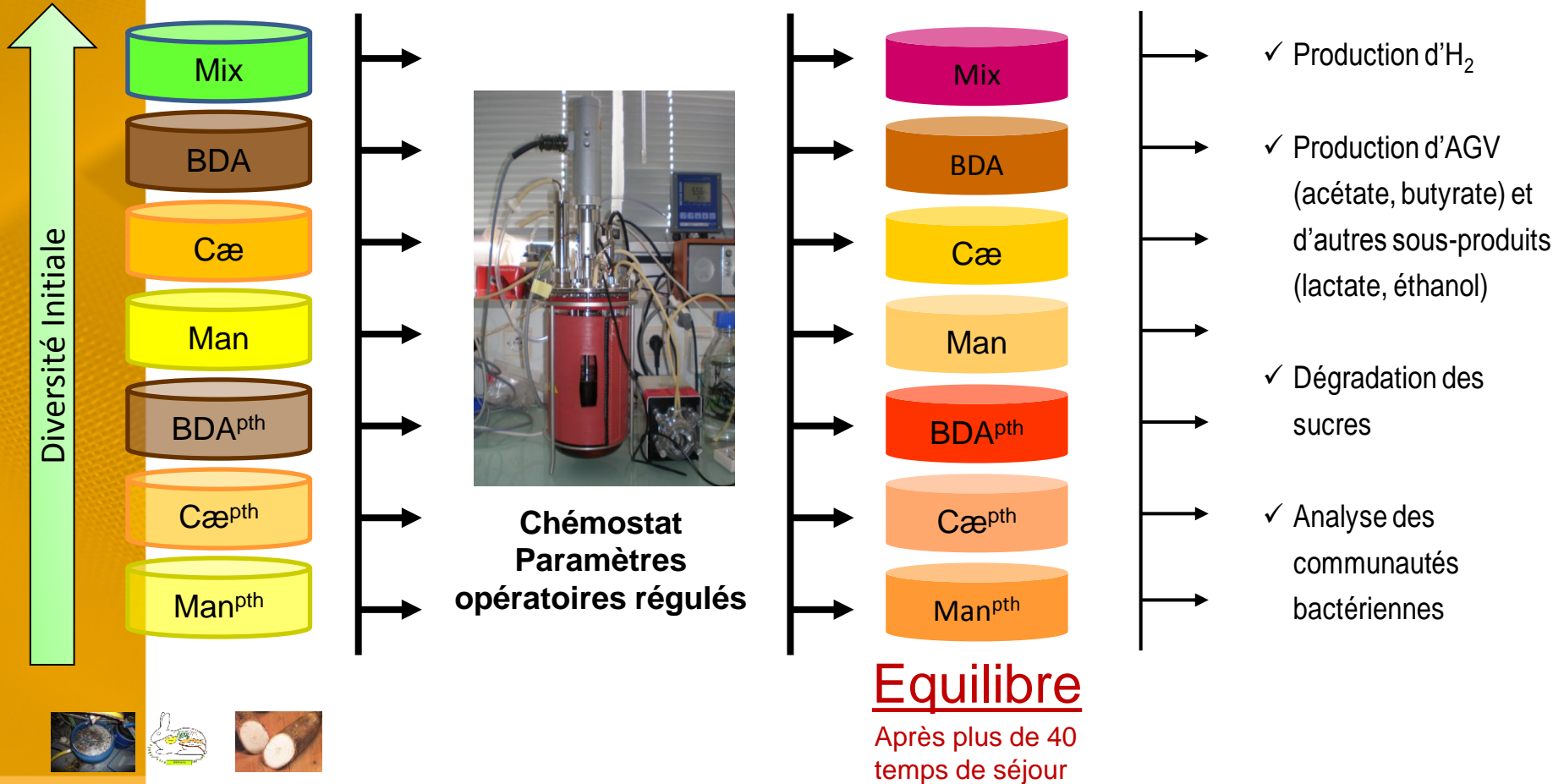


- (i) de sélectionner et caractériser des bactéries à haut potentiel de production d'hydrogène,
- (ii) **de construire /simplifier un consortium microbien** pour l'élaboration de modèles mécanistiques de réseaux d'interactions métaboliques,
- (iii) d'étudier et optimiser les performances sous conditions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

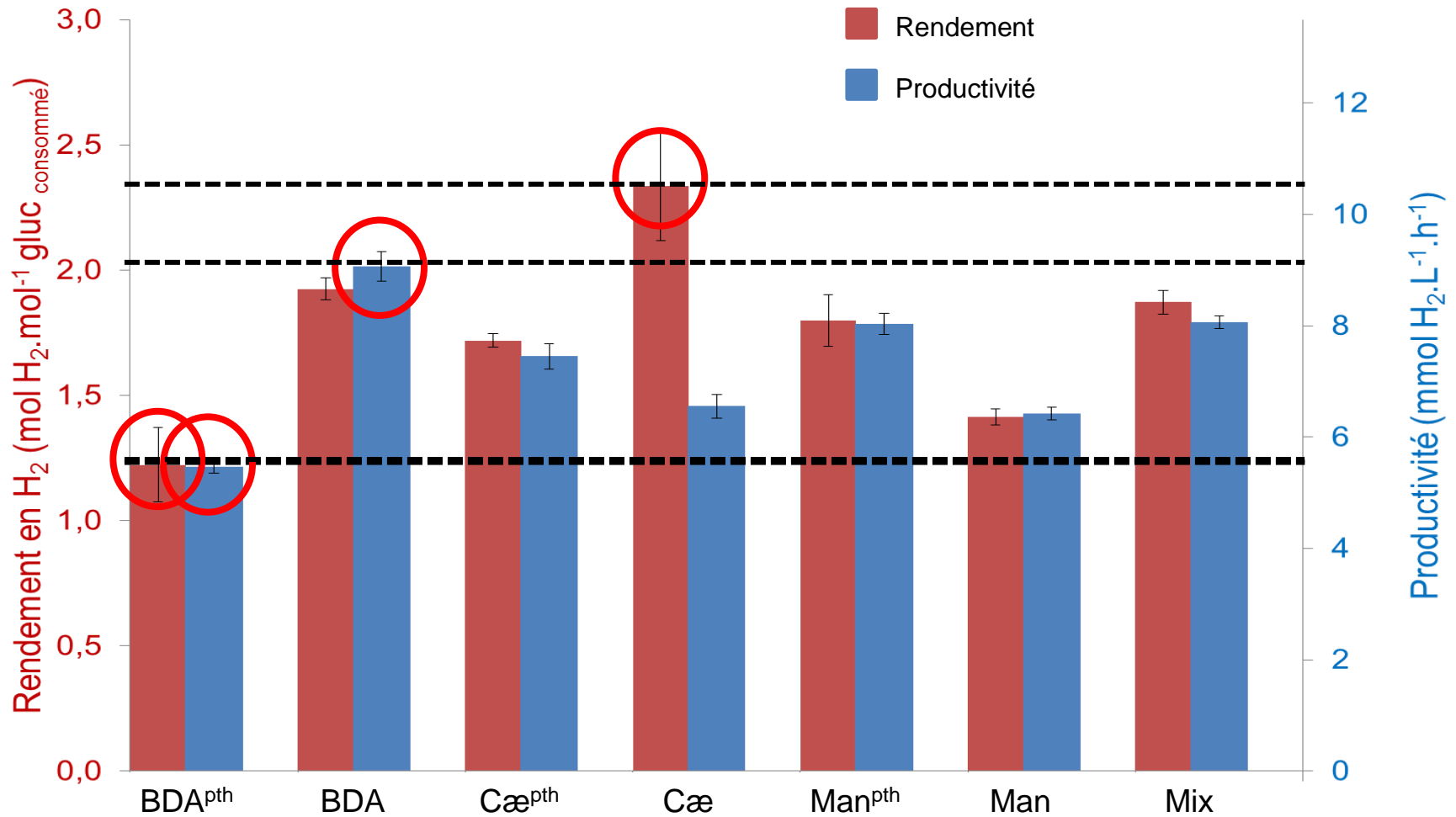
# Résultats marquants: rôle des bactéries minoritaires



## Approche Expérimentale

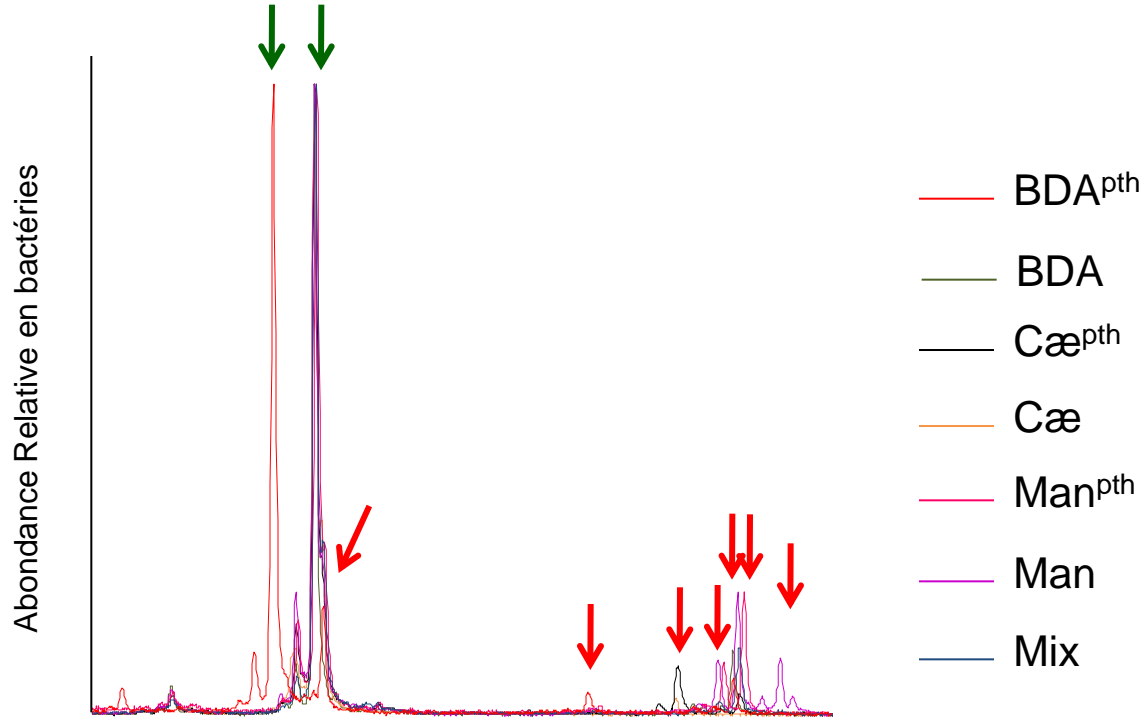


# Résultats marquants: rôle des bactéries minoritaires



**Différences significatives sur les performances de production H<sub>2</sub> à l'équilibre en fonction des cultures**

# Résultats marquants: rôle des bactéries minoritaires



Une espèce dominante et de nombreuses minoritaires

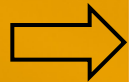
Excepté pour la culture BDA<sup>pth</sup>, la **bactérie majoritaire est la même dans toutes les cultures**

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

# Résultats marquants: rôle des bactéries minoritaires



	BDA <sup>pth</sup>	BDA	Cæ <sup>pth</sup>	Cæ	Man <sup>pth</sup>	Man	Mix
Rdt H <sub>2</sub> (mol H <sub>2</sub> .mol <sup>-1</sup> glucose)	1,22	1,93	1,72	2,33	1,80	1,41	1,87
Productivité (mmolH <sub>2</sub> .L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	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	-

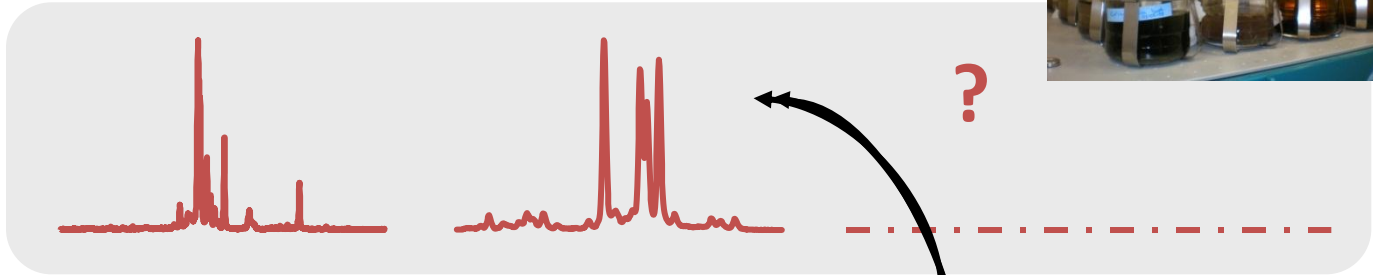
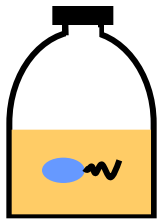
Choix d'un éventail représentatif de métabolismes susceptibles d'interagir avec l'écosystème

# Résultats marquants: Ingénierie des écosystèmes microbiens

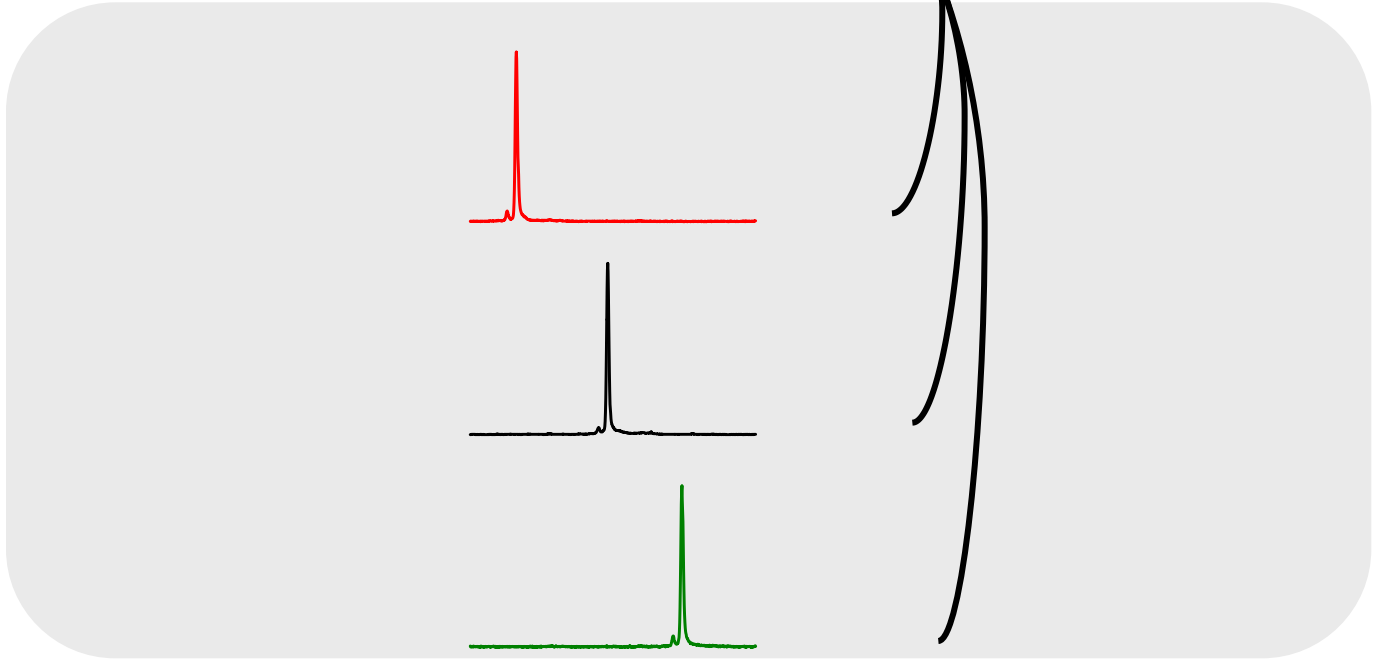
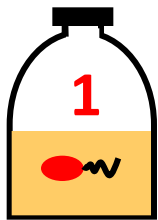
Cultures discontinues (glucose 10 g.L<sup>-1</sup>; 37°C; pH=6; milieu semi-synthétique)



Eco A  
Eco B



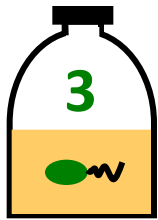
Espèce 1



Espèce 2



Espèce 3



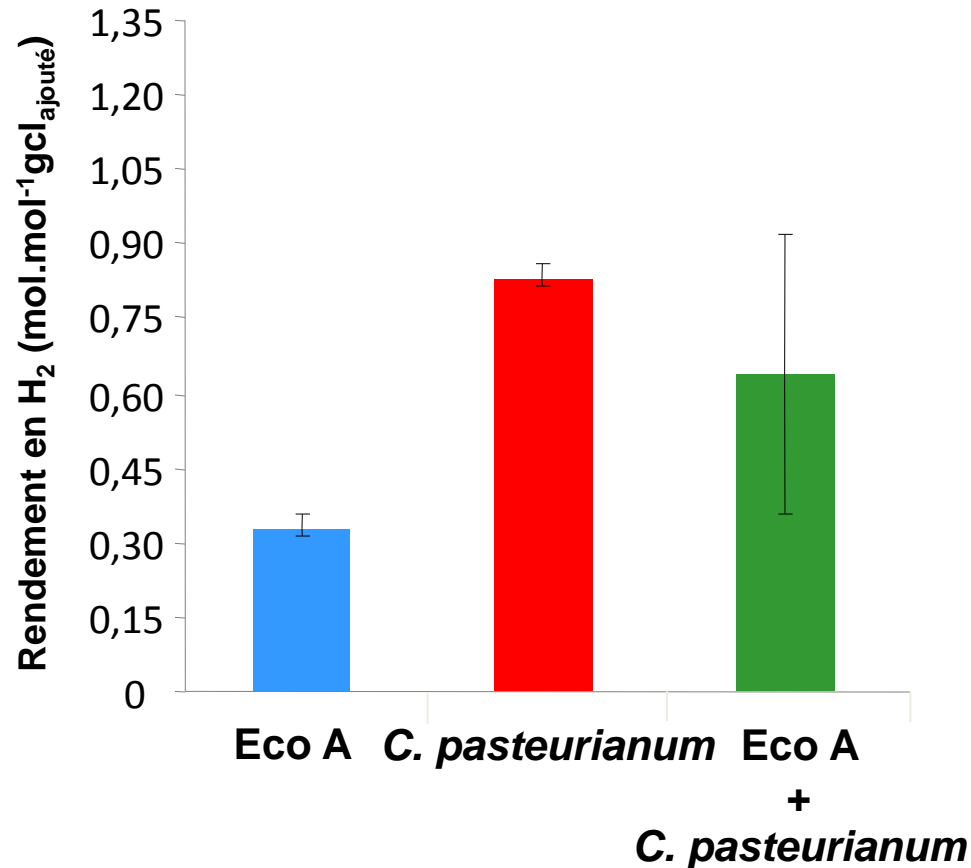
0 1 2 3 Temps (jours)



# Résultats marquants: Ingénierie des écosystèmes microbiens

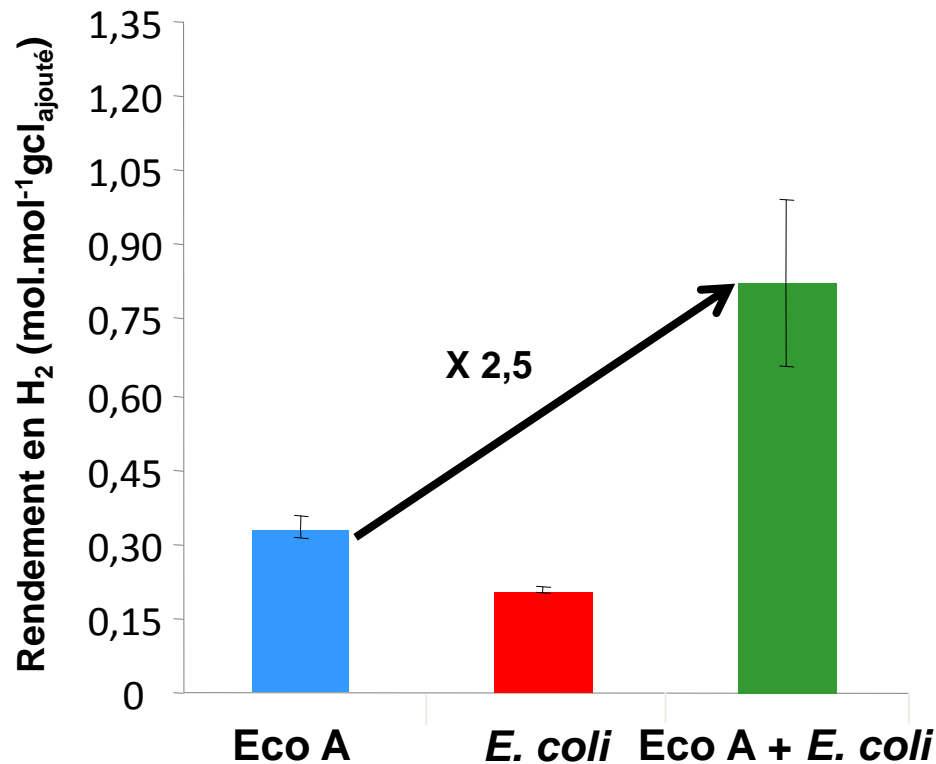


- ✓ 1<sup>er</sup> cas : **pas d'effet significatif d'interaction**
  - Ajout de *Clostridium pasteurianum* = compétition microbienne



# Résultats marquants: Ingénierie des écosystèmes microbiens

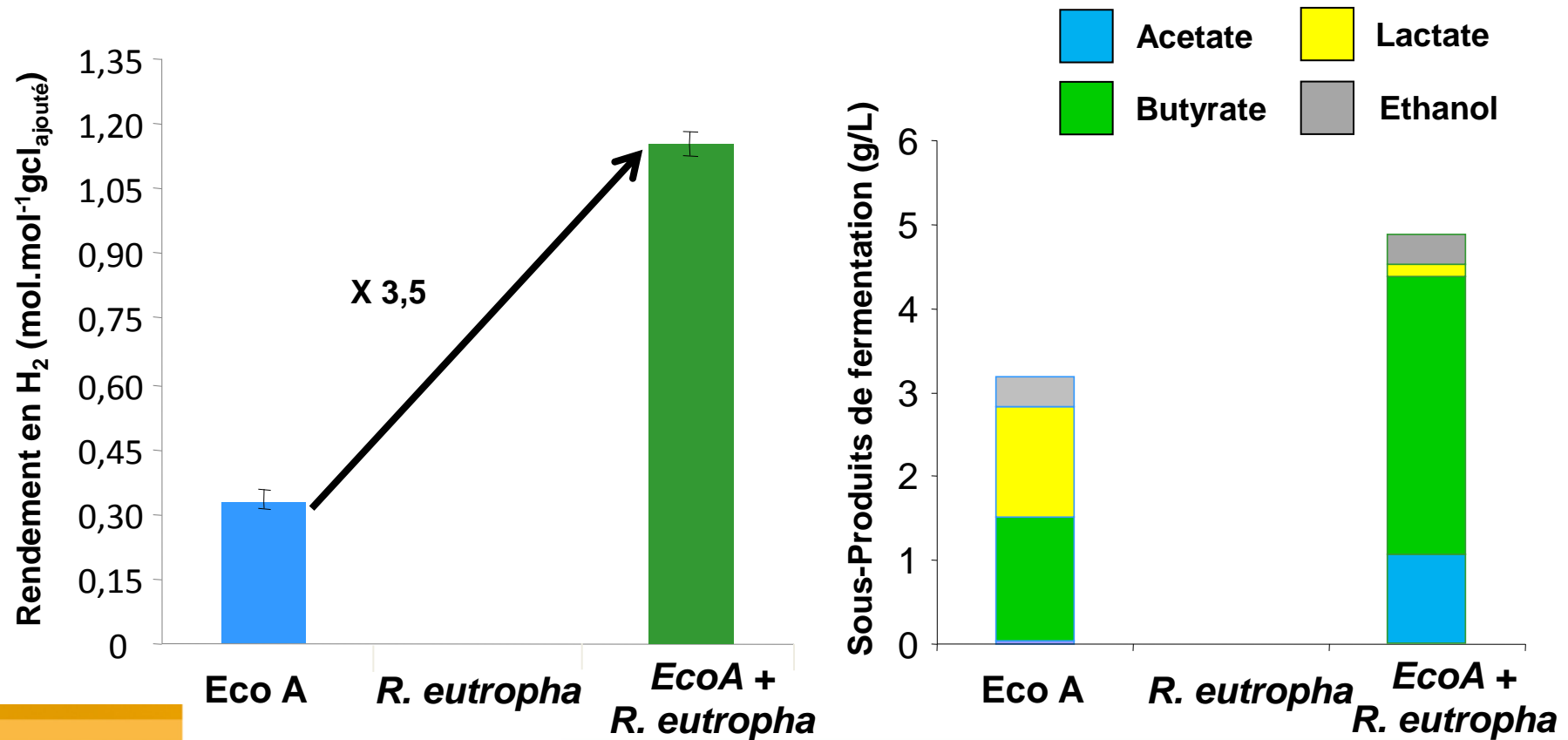
- ✓ 2<sup>nd</sup> cas : **effet positif** sur les performances de production d'H<sub>2</sub>
  - Ajout d'*Escherichia coli* = interaction positive avec Eco A
  - Augmentation de la production d'acétate et de butyrate



# Résultats marquants: Ingénierie des écosystèmes microbiens



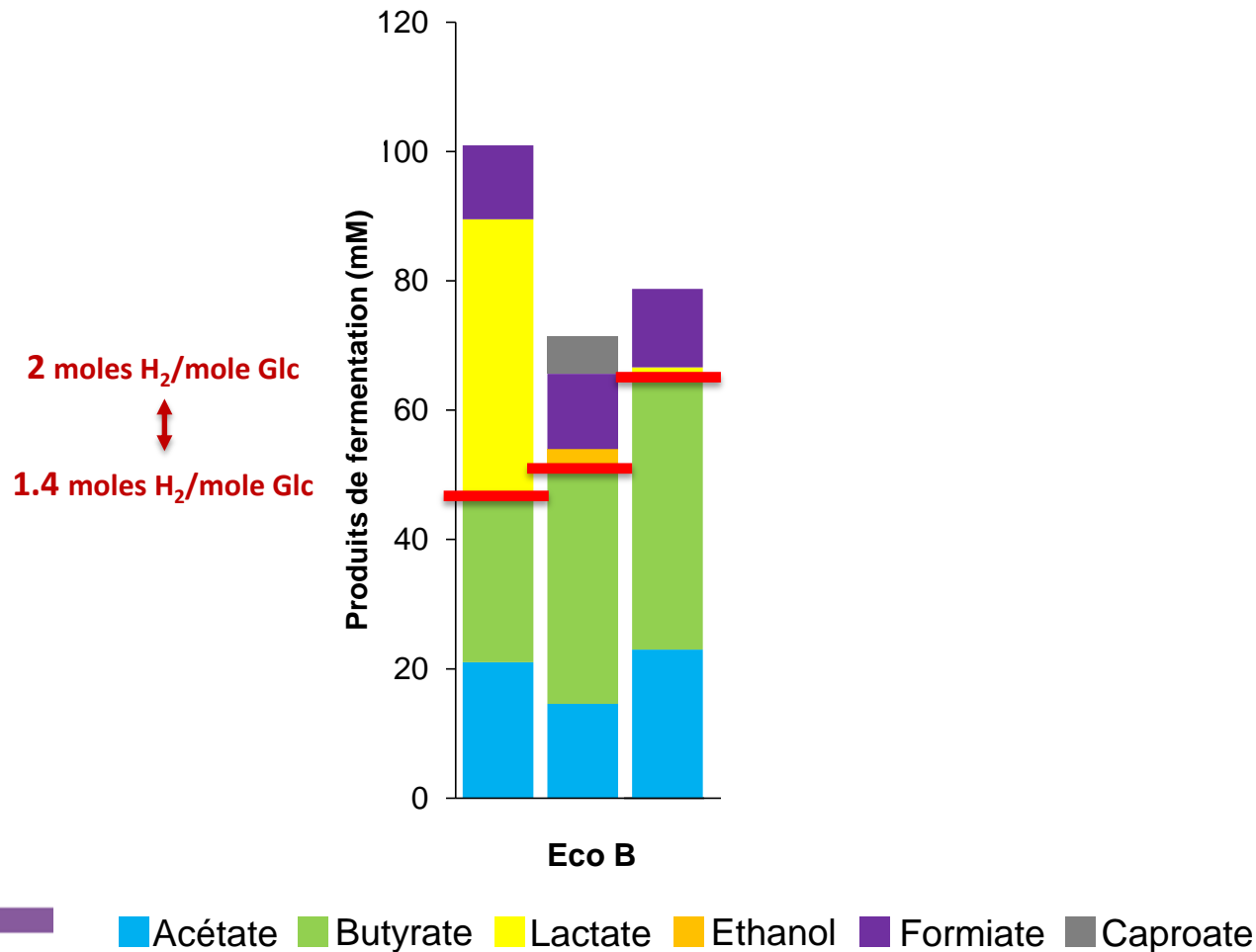
- ✓ 3<sup>ème</sup> cas : **effet positif** sur les performances de production d'H<sub>2</sub>
  - Ajout de *Ralstonia eutropha* = **synergie avec EcoA**
  - Augmentation de la production d'acétate et de butyrate dans le mélange



# 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 <sub>2</sub>
<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

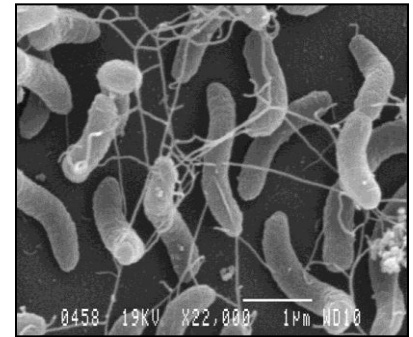
H<sub>2</sub>, Ethanol

Anaérobie  
Mesophile  
**Genome  
sequence**

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

## SRB

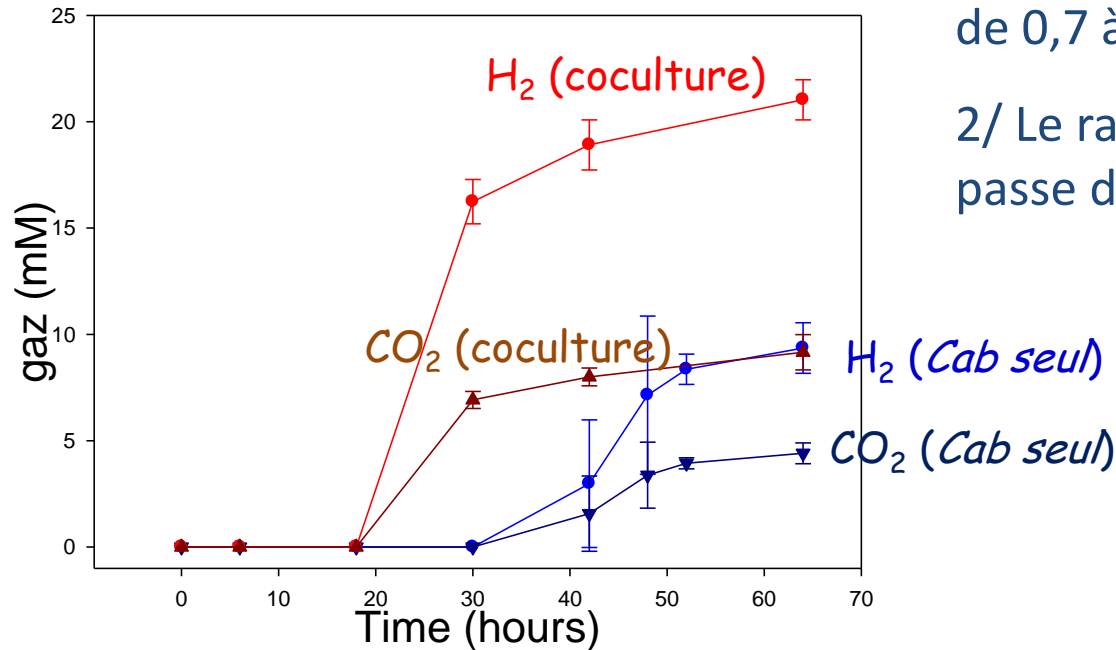
*Desulfovibrio vulgaris*  
Hildenborough (DvH)



Gram-  
sulfate respiration (BSR)

**Production/consommation H<sub>2</sub>**

# Résultats marquants: Ecosystème microbien synthétique



1/ Production H<sub>2</sub> (x 2.3)  
de 0,7 à 1,6 mole H<sub>2</sub>/mole Glc

2/ Le ratio H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>  
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)

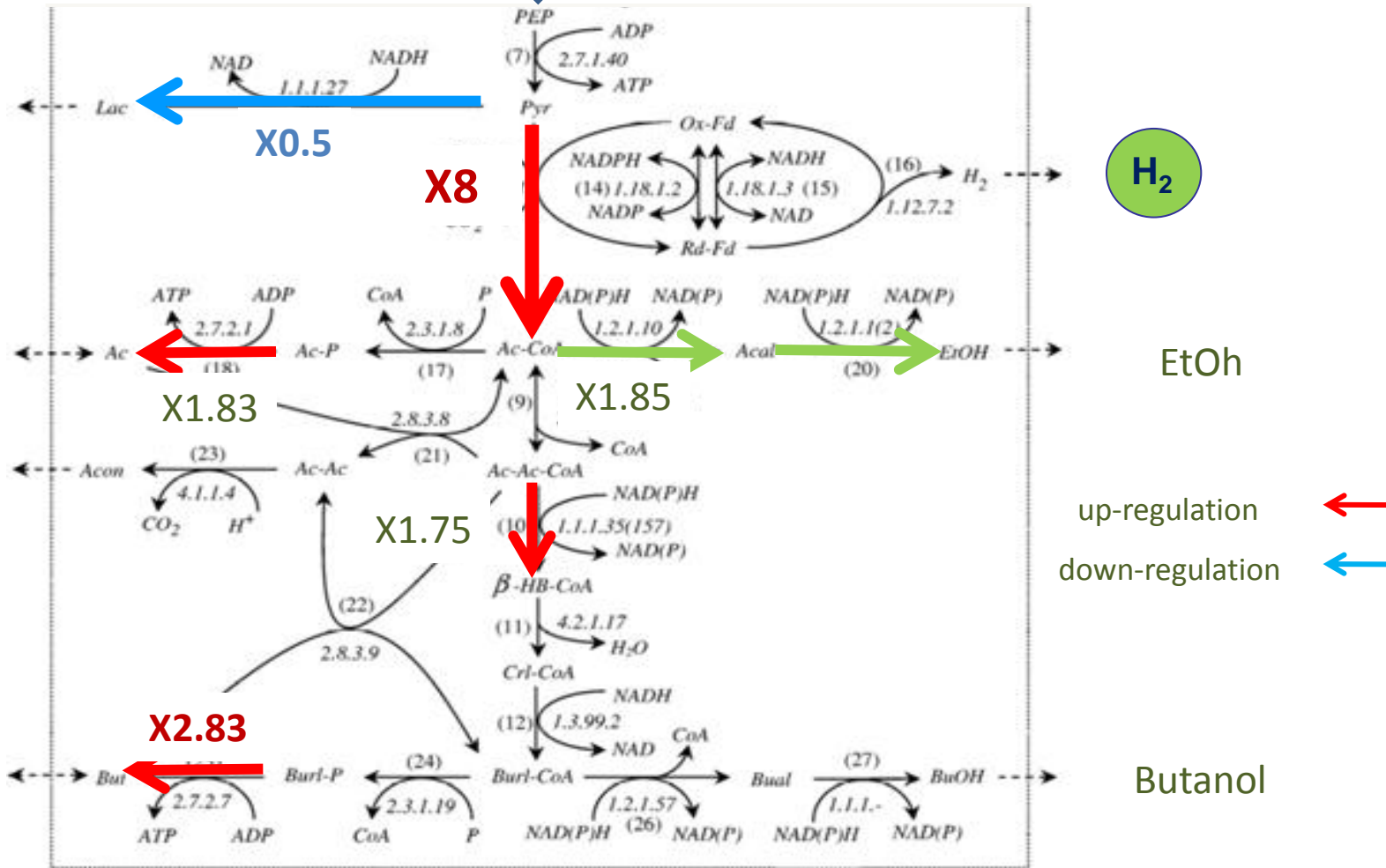
Glucose

Lactate

Acetate

Acetone

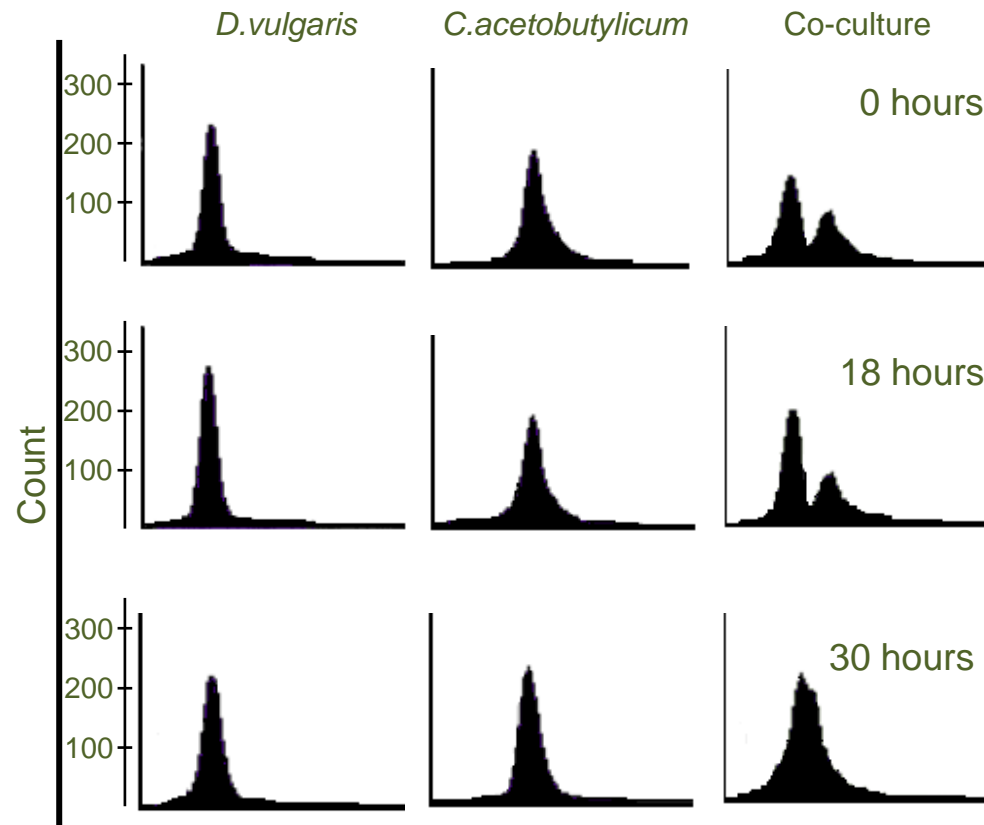
Butyrate



**CONTACT PHYSIQUE NECESSAIRE (test membrane dialyse) !**



# Résultats marquants: Ecosystème microbien synthétique

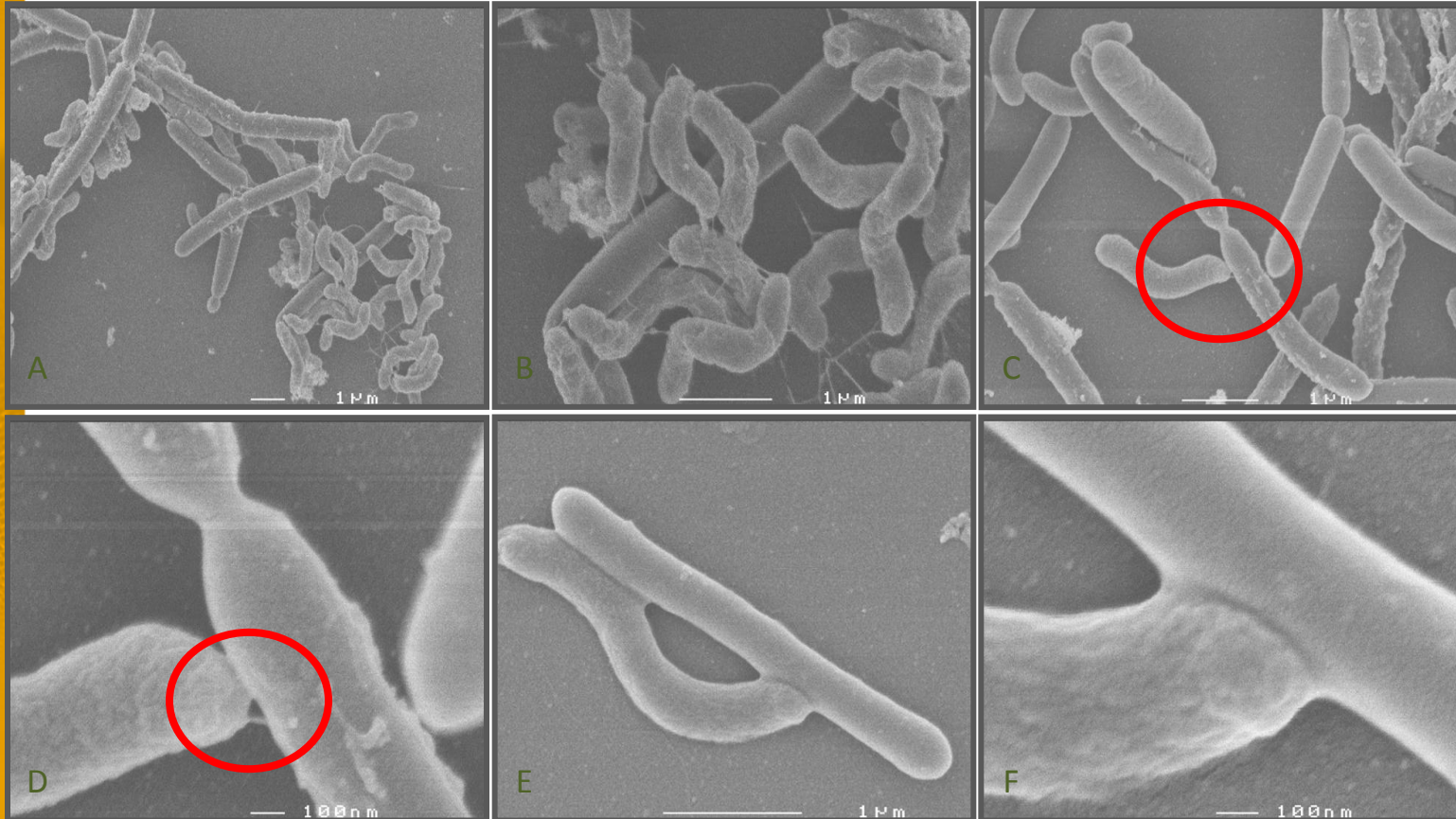


A la fin de la culture, DvH représente environ 50% des bactéries présentes (PCRq), Alors que seule elle ne pousse pas.

# Résultats marquants: Ecosystème microbien synthétique

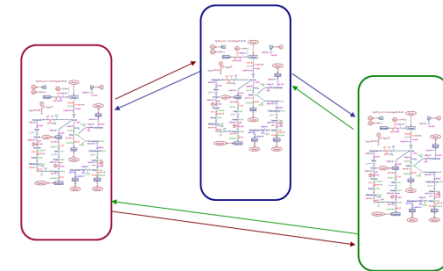
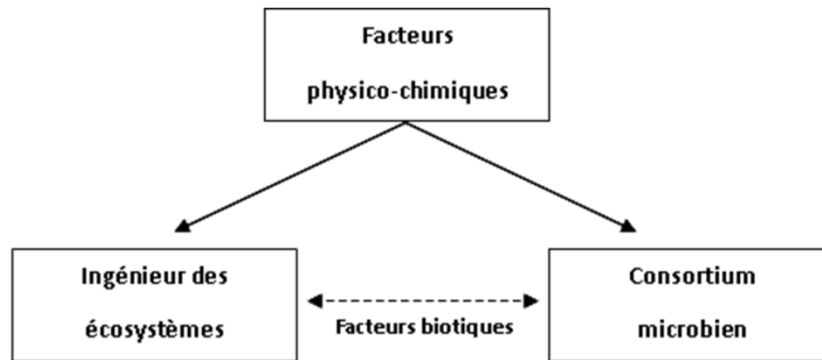
High Resolution Scanning Electron Microscopy

(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



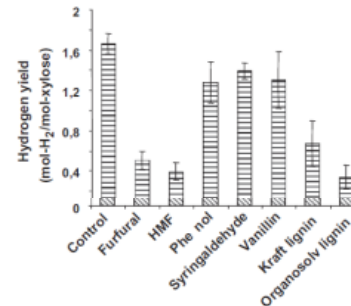
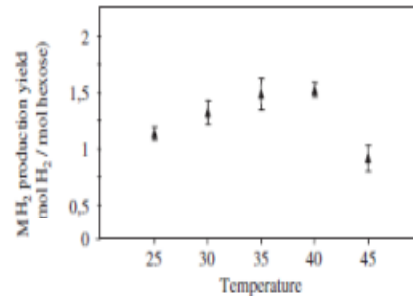
- (i) de sélectionner et caractériser des bactéries à haut potentiel de production d'hydrogène,
- (ii) de construire /simplifier un consortium microbien pour l'élaboration de modèles mécanistiques de réseaux d'interactions métaboliques,
- (iii) **d'étudier et optimiser les performances** sous conditions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

# Résultats marquants: effet paramètres opératoires



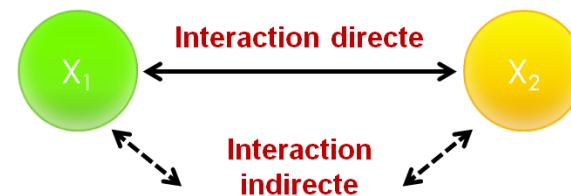
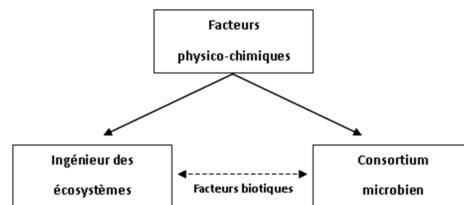
- Effet pH (4.5 à 7)
- Effet température (25 à 50°C)
- Effet type de substrat (□ avec PM)
- Effet inhibiteurs - biomasse (□ avec PM)
- Effet charge organique et Fer (limitations substrats)

Rendements moyens  
1 à 1.5 moles H<sub>2</sub>/mole Glc  
entre  
0.3 et 2.1 moles H<sub>2</sub>/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'H<sub>2</sub> (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**

