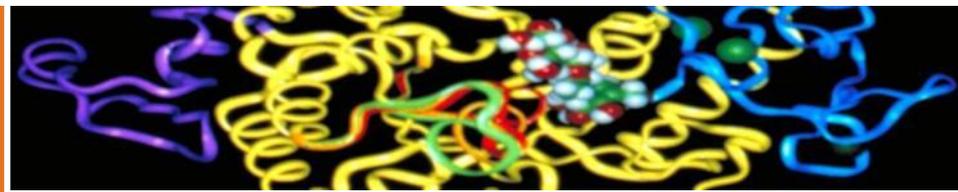


Ingénierie écologique microbienne appliquée à la production de biohydrogène



TRABLY E

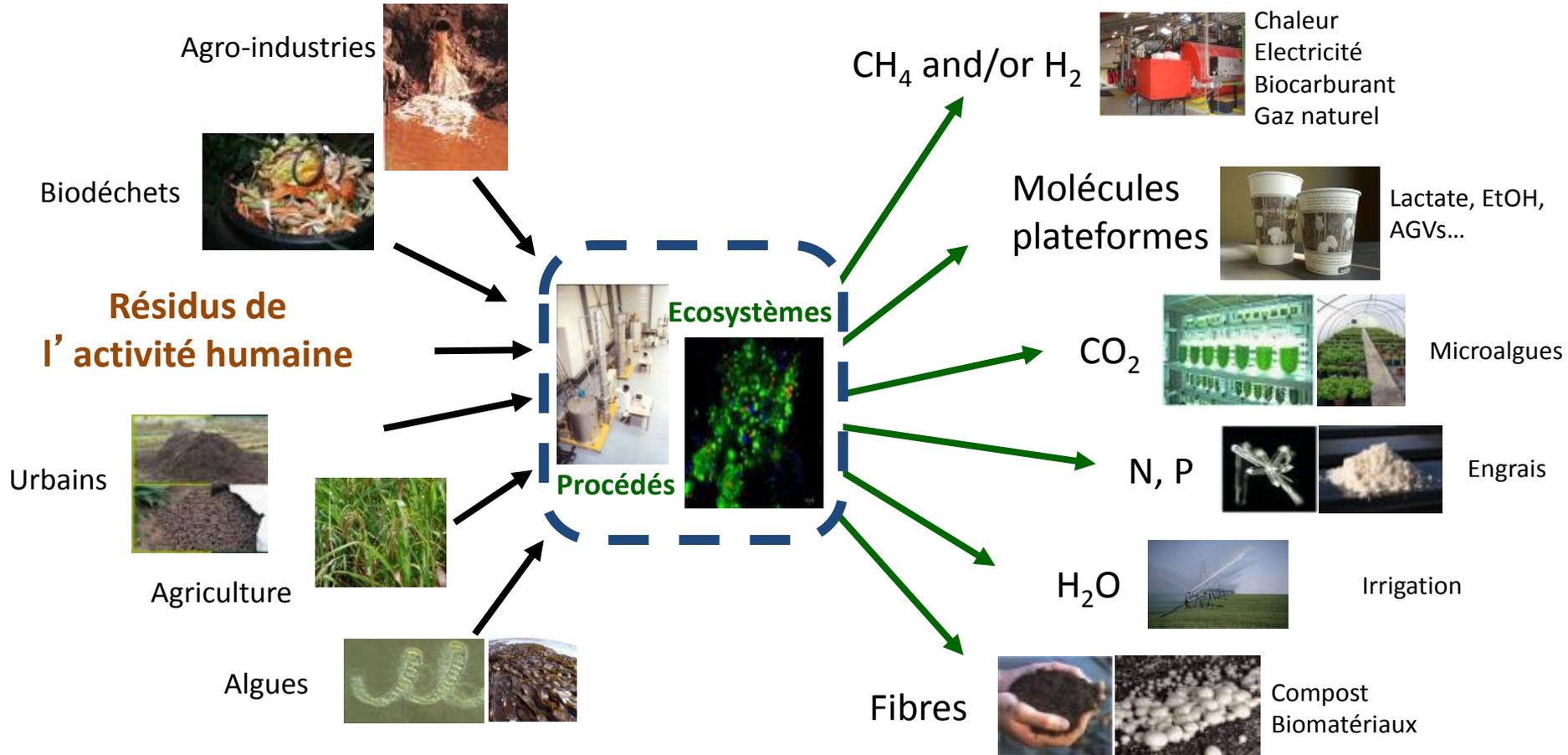
Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement
INRA-UR050 Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne
www1.montpellier.supagro.inra.fr



Contexte de bioraffinerie environnementale

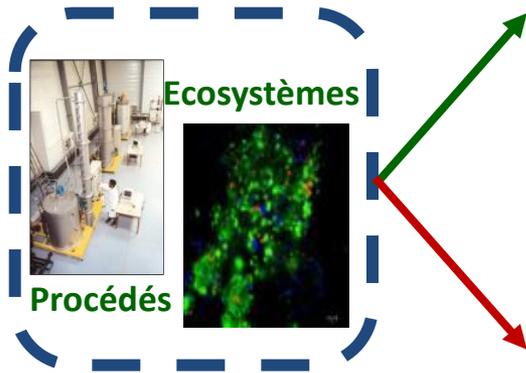
Substrats complexes,
variables et multiples

Au service de la
Bioéconomie



Sous contraintes environnementales et sanitaires

Spécificités des écosystèmes microbiens

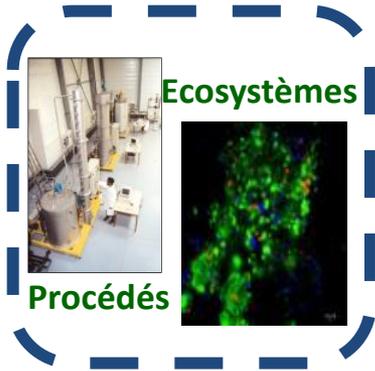
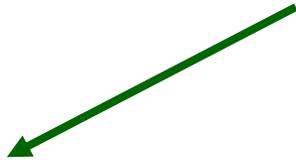


**(+) Flexibilité métabolique,
Adaptabilité aux substrats (complexité/variabilité/multiples)
Richesse et diversité des écosystèmes microbiens**

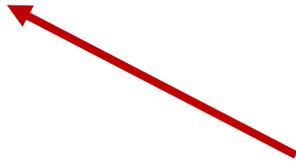
**(-) Variabilité métabolique et populationnelle
Interactions microbiennes mal connues/contrôlées
Richesse et diversité des écosystèmes microbiens**

Spécificités des écosystèmes microbiens

Conditions opératoires étudiées – peu de leviers
(pH, ° C, TSH...)



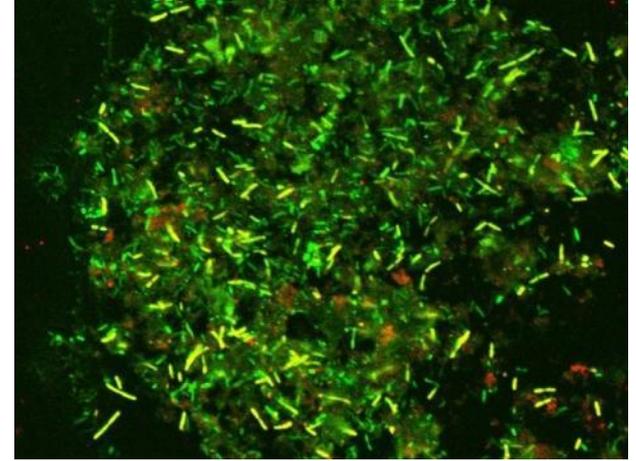
Facteurs biotiques
(lien structure – fonction,
interactions microbiennes)



L'ingénierie écologique appliquée aux écosystèmes microbiens



Constructed Wetlands



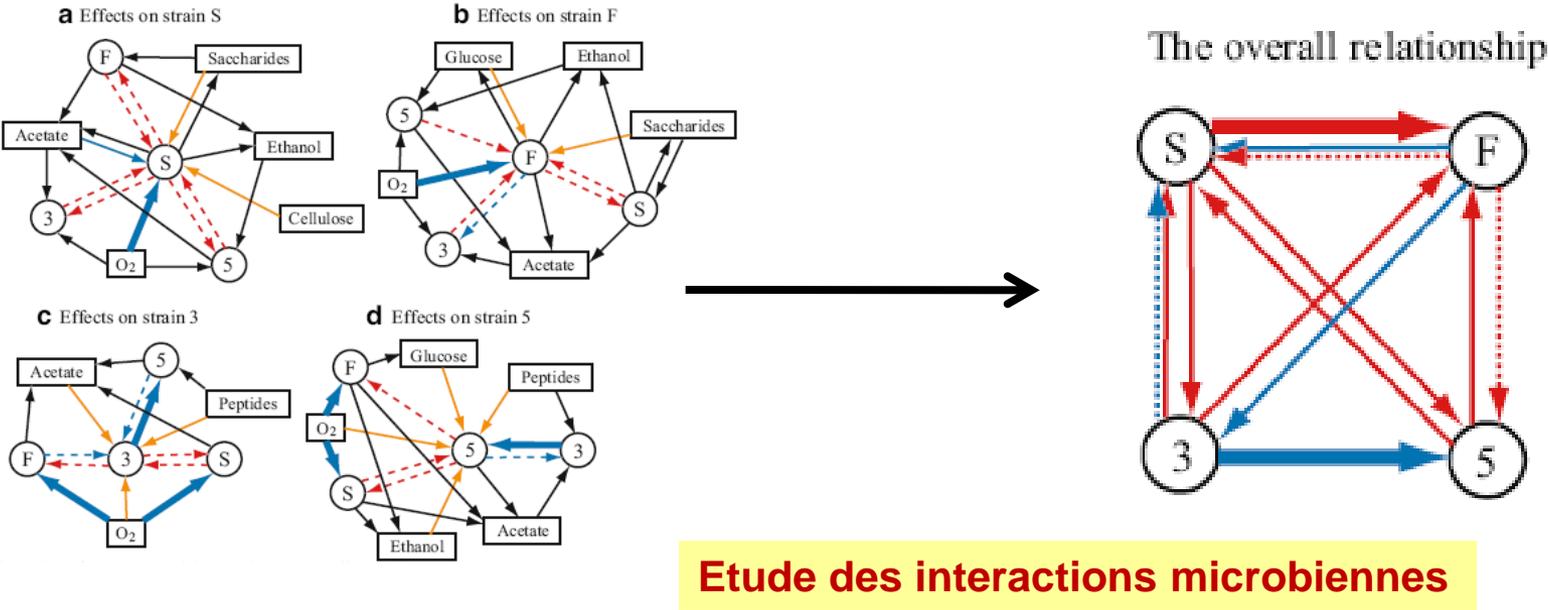
Microbial world

Ingénierie écologique microbienne:

Comment appliquer des concepts d'ingénierie écologique aux écosystèmes microbiens ?

L'ingénierie écologique appliquée aux écosystèmes microbiens

ACME = Artificially Created Microbial Ecosystems

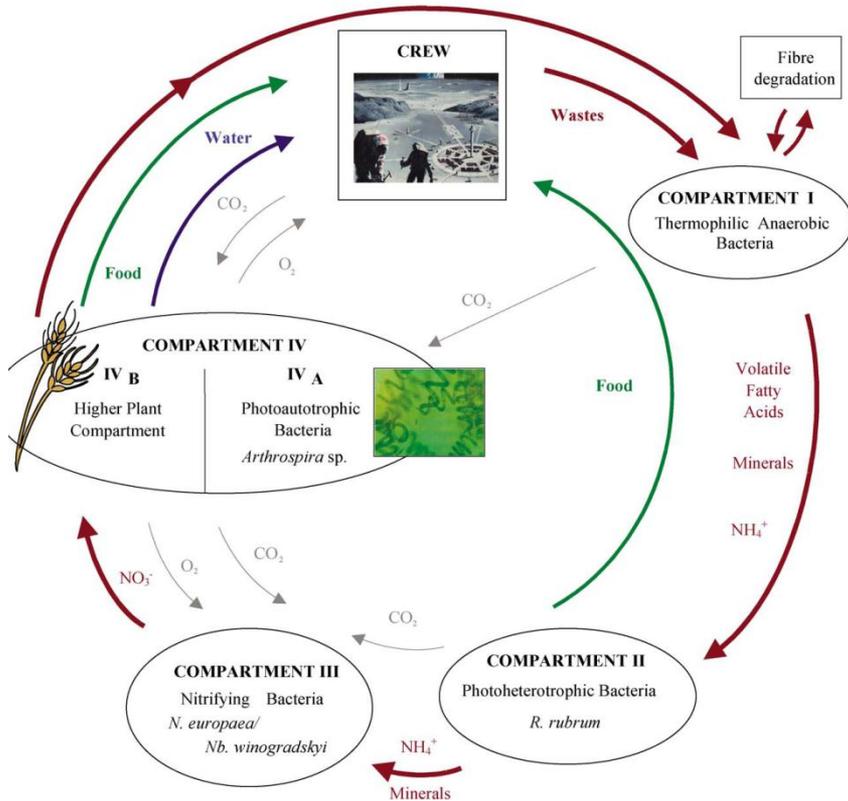


Kato *et al.* (2008) Network relationships of bacteria in stable mixed culture. *Microb.Ecol.* 56: 403-411

L'ingénierie écologique appliquée aux écosystèmes microbiens

ACME = Artificially Created Microbial Ecosystems :

Non-Edible Parts of Higher Plants



Création de chaînes trophiques uniques

Etude fondamentales d'écologie microbienne

Fukami T & PJ Morin (2003) Productivity–biodiversity relationships depend on the history of community assembly. *Nature*. 424: 423-426

Manefield *et al.* (2007) Influence of Sustainability and Immigration in Assembling Bacterial Populations of Known Size and Function. *Res.Microb.* 157: 77-86

Hendrickx *et al.* (2006) Microbial ecology of the closed artificial ecosystem MELISSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative). *Res.Microb.* 157: 77-86

L'ingénierie écologique appliquée aux écosystèmes microbiens

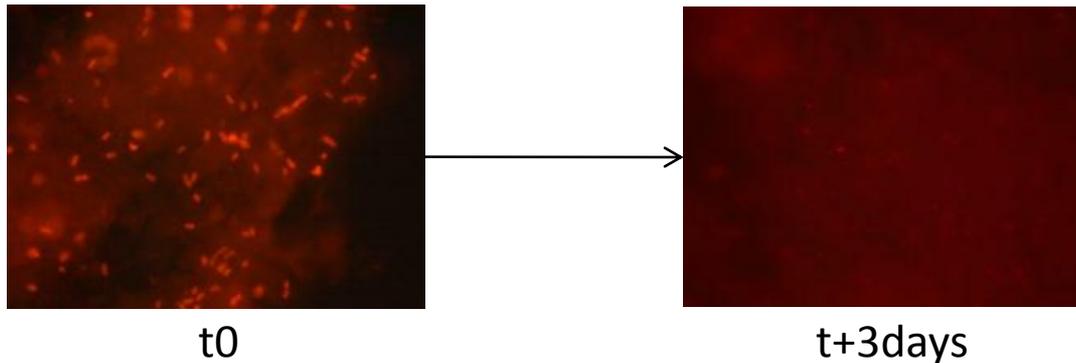
ACME = Artificially Created Microbial Ecosystems

BAME = Biologically Augmented Microbial Ecosystems

Un challenge = améliorer le taux de succès

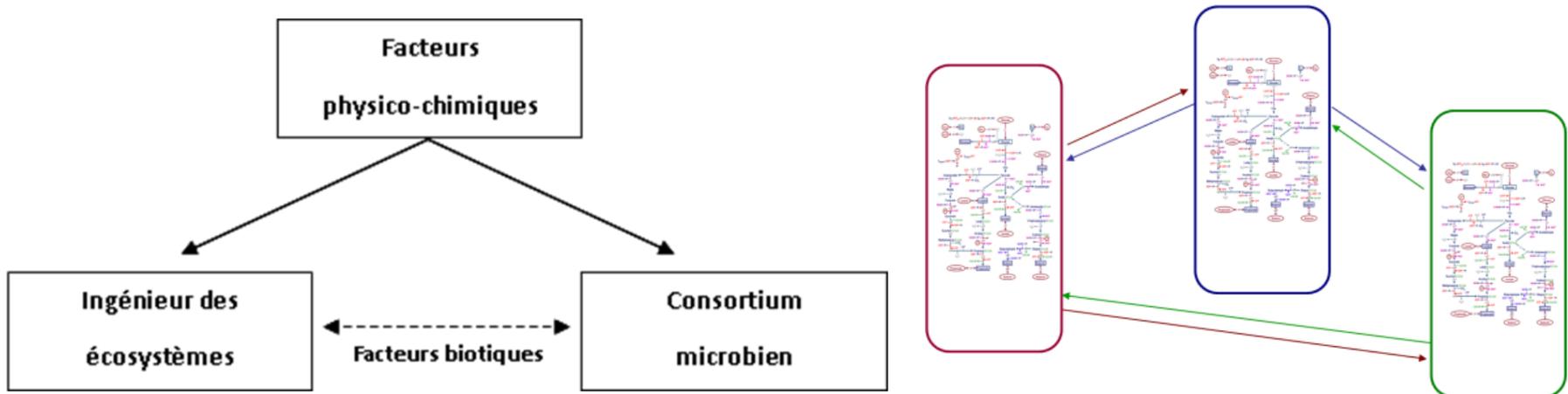
→ demande une meilleure connaissance des interactions microbiennes

→ Identification des interactions en jeu



L'ingénierie écologique appliquée aux écosystèmes microbiens

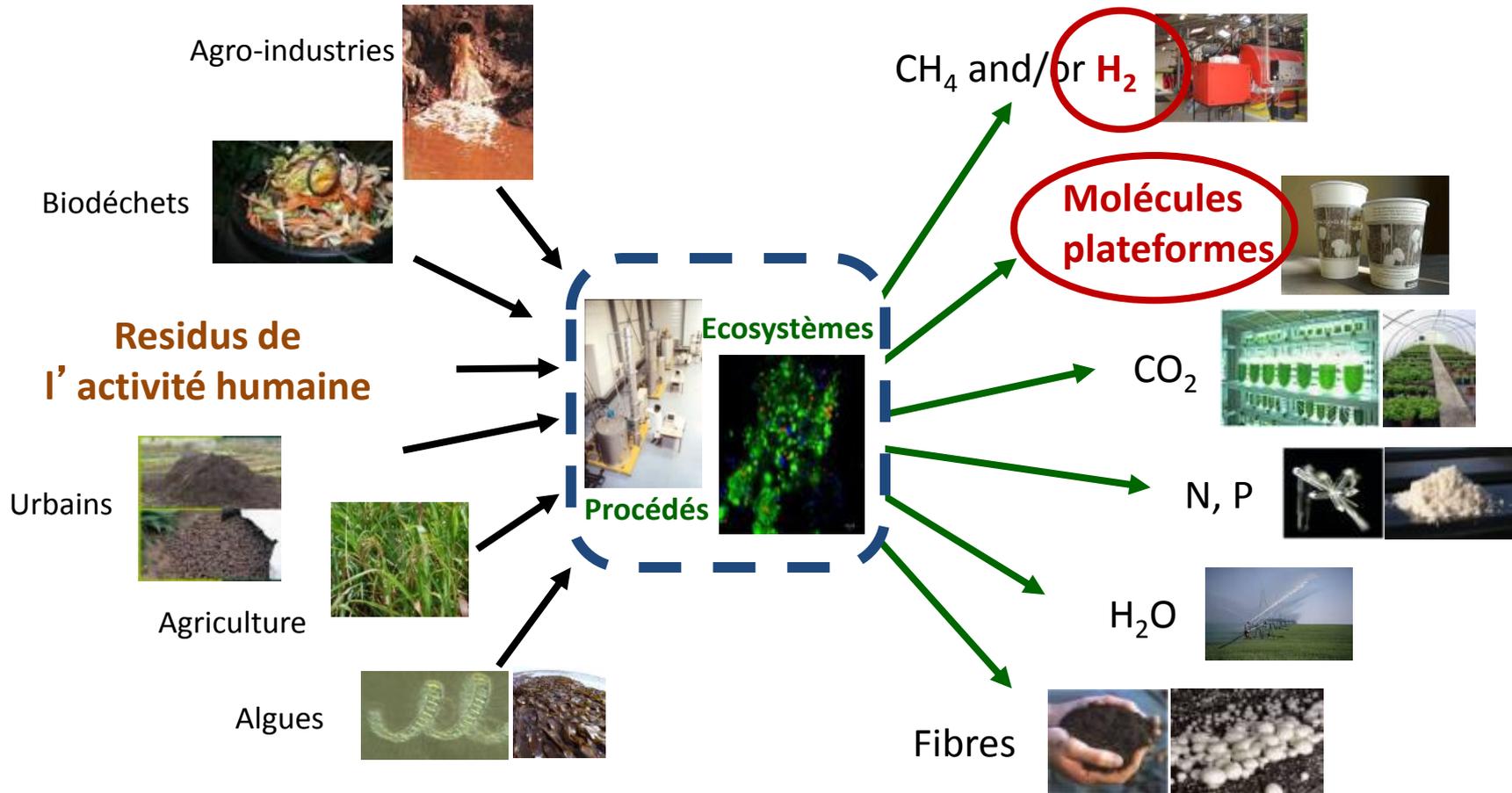
Développer une **approche innovante et pluridisciplinaire d'ingénierie écologique** qui consiste en **la conception, la construction et la mise en œuvre de consortia microbiens contrôlés** afin d'établir les paramètres régissant les réseaux d'interactions métaboliques



Exemple du biohydrogène par voie fermentaire

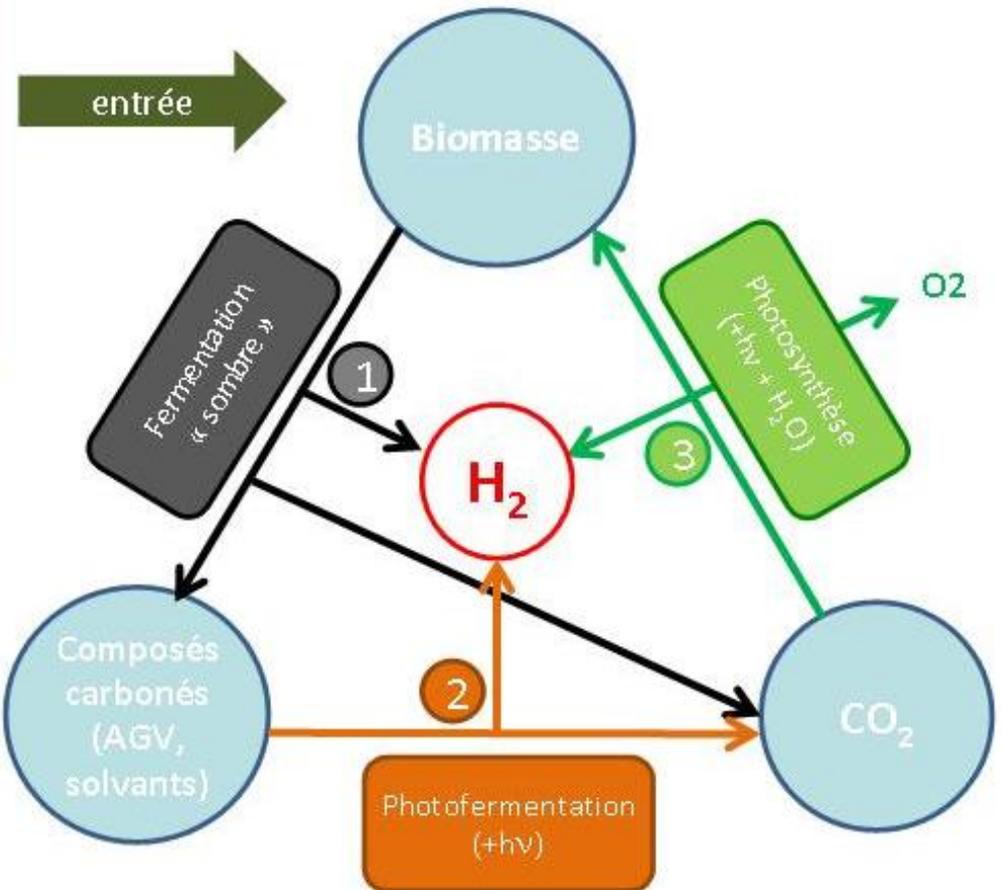
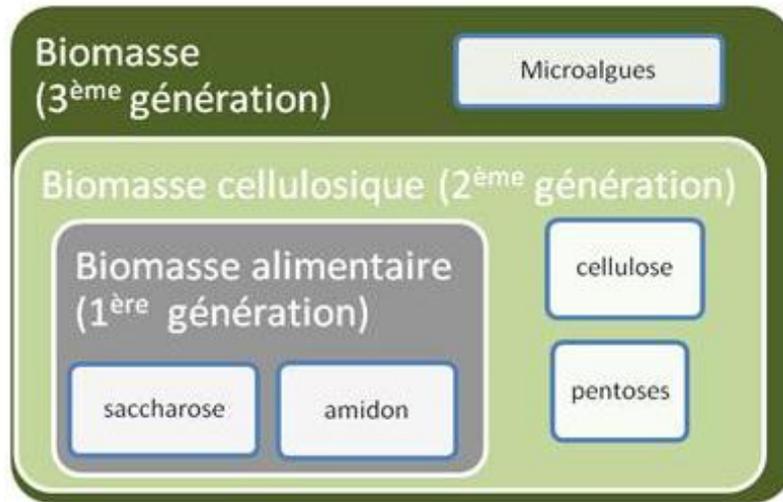
Substrats complexes,
variables et multiples

Au service de la
Bioéconomie



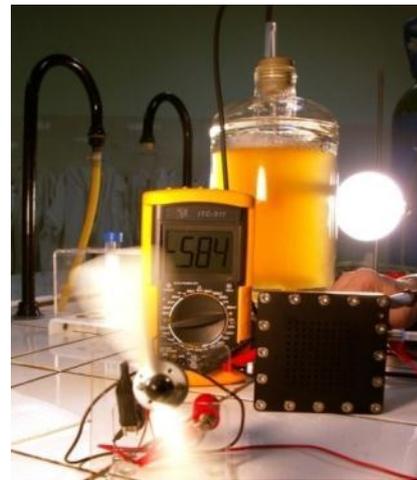
Sous contraintes environnementales et sanitaires

La filière biohydrogène



Exemple du biohydrogène par voie fermentaire

Les voies de production du biohydrogène = choix de la voie fermentaire



Productivité
($\text{mmol}_{\text{H}_2}/\text{L}/\text{h}$) 0.07-0.35

0.5-5

0.5 - 100

Rendement
($\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucose}}$) -

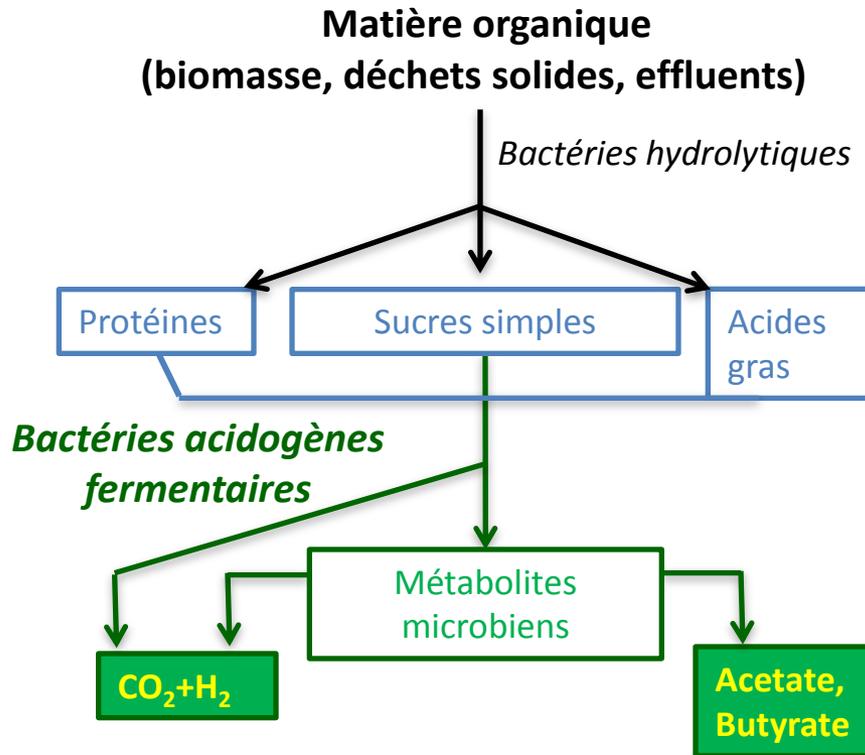
0.8-1.1

0.1 - 3

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

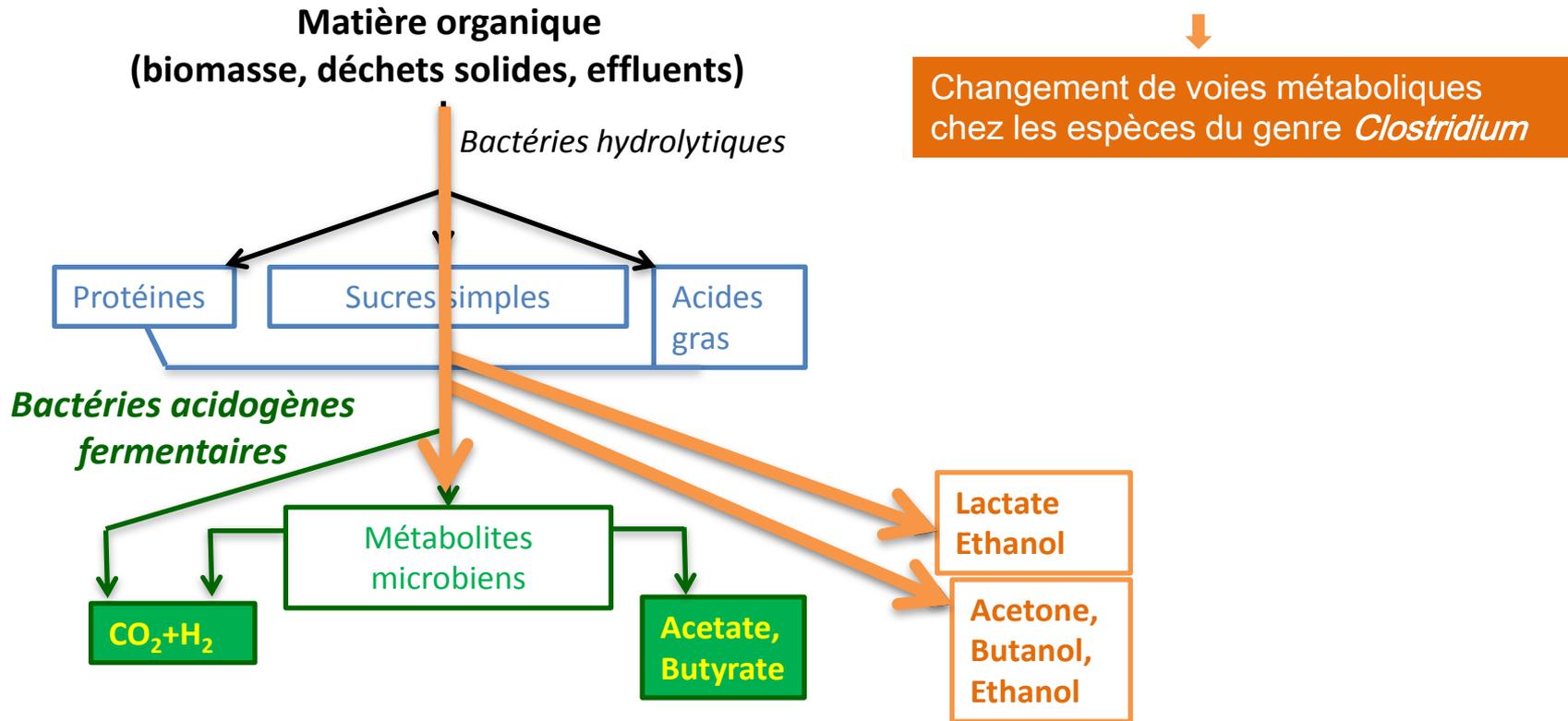
Exemple du biohydrogène par voie fermentaire

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



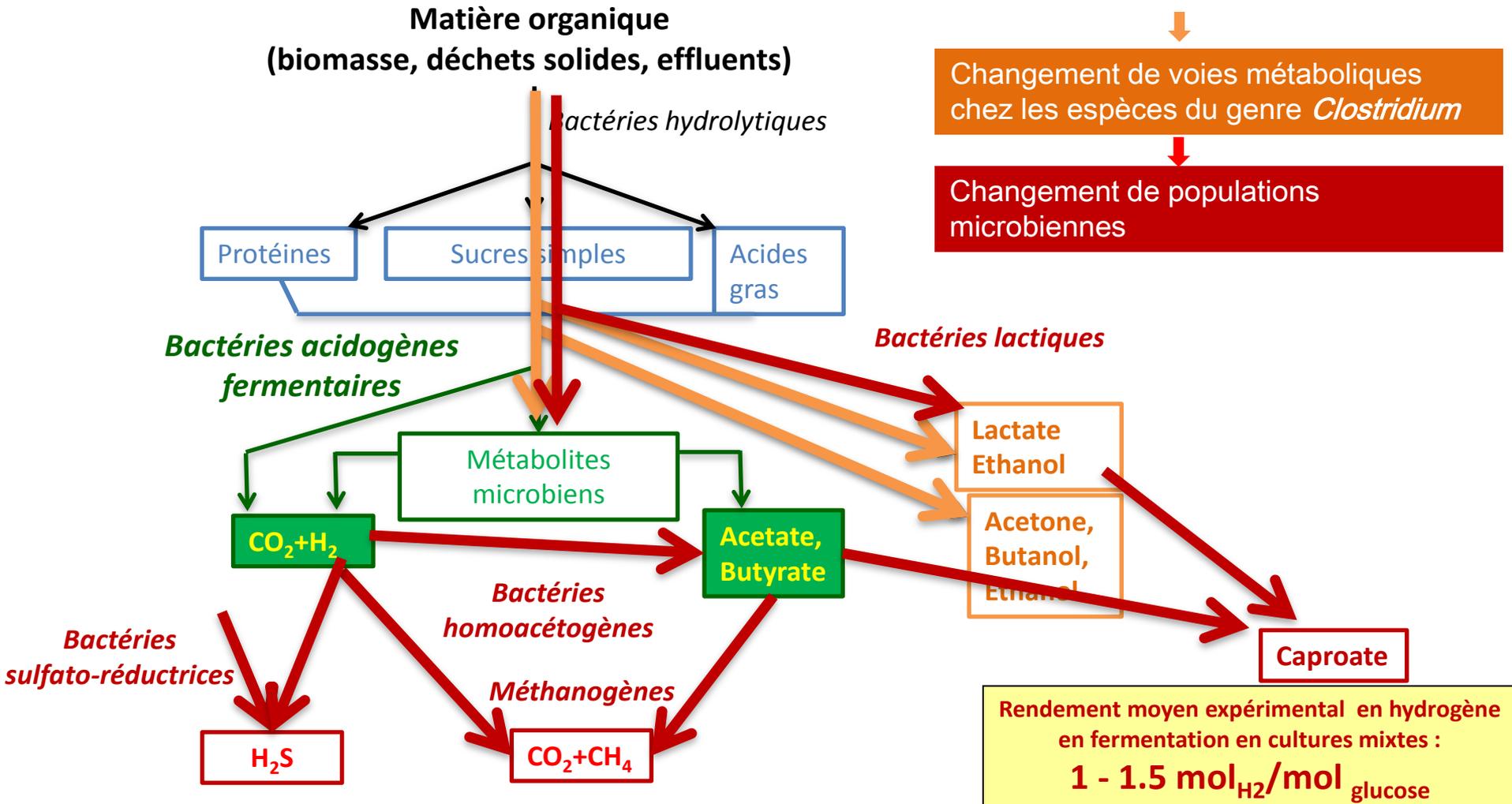
Exemple du biohydrogène par voie fermentaire

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



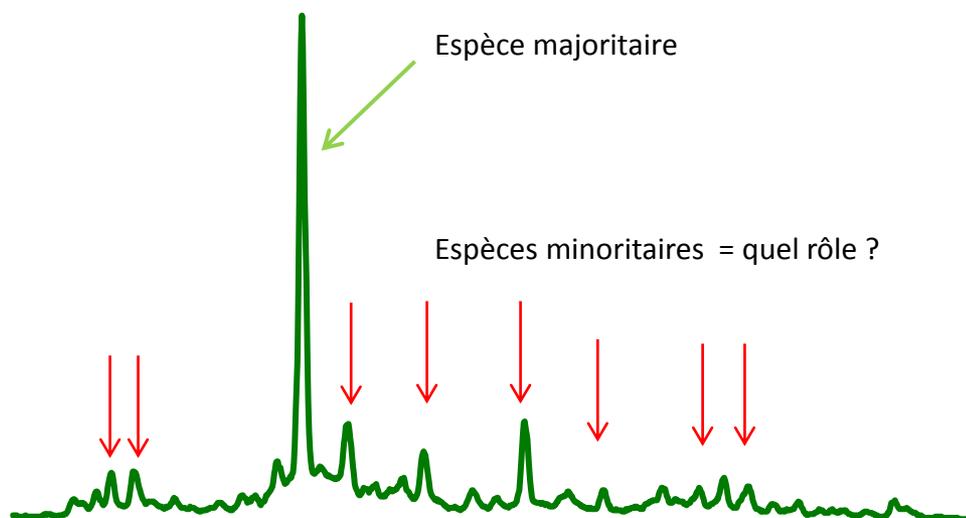
Exemple du biohydrogène par voie fermentaire

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



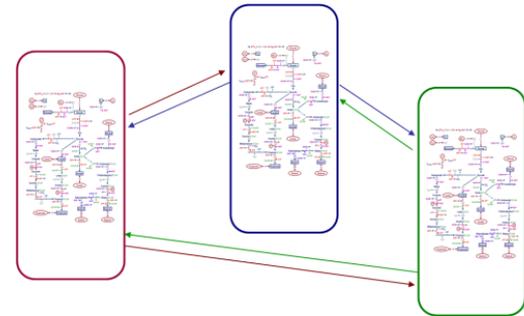
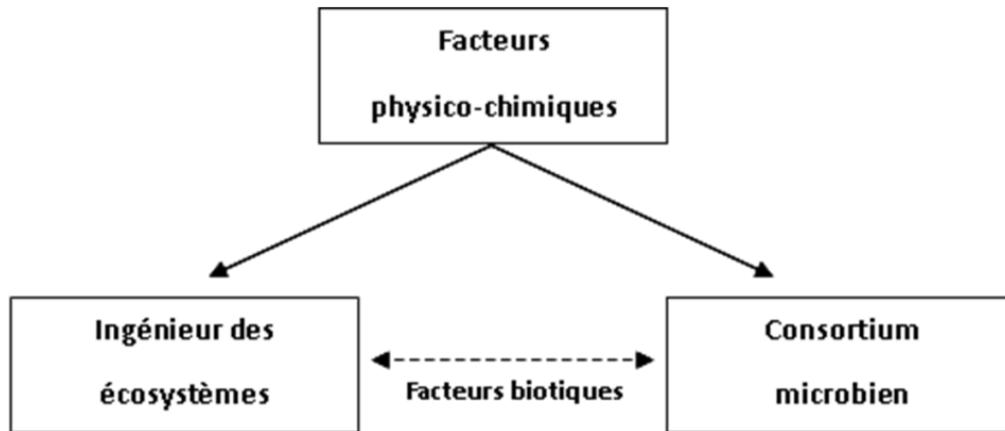
Exemple du biohydrogène par voie fermentaire

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



Ingénierie écologique microbienne: Méthodologie

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.



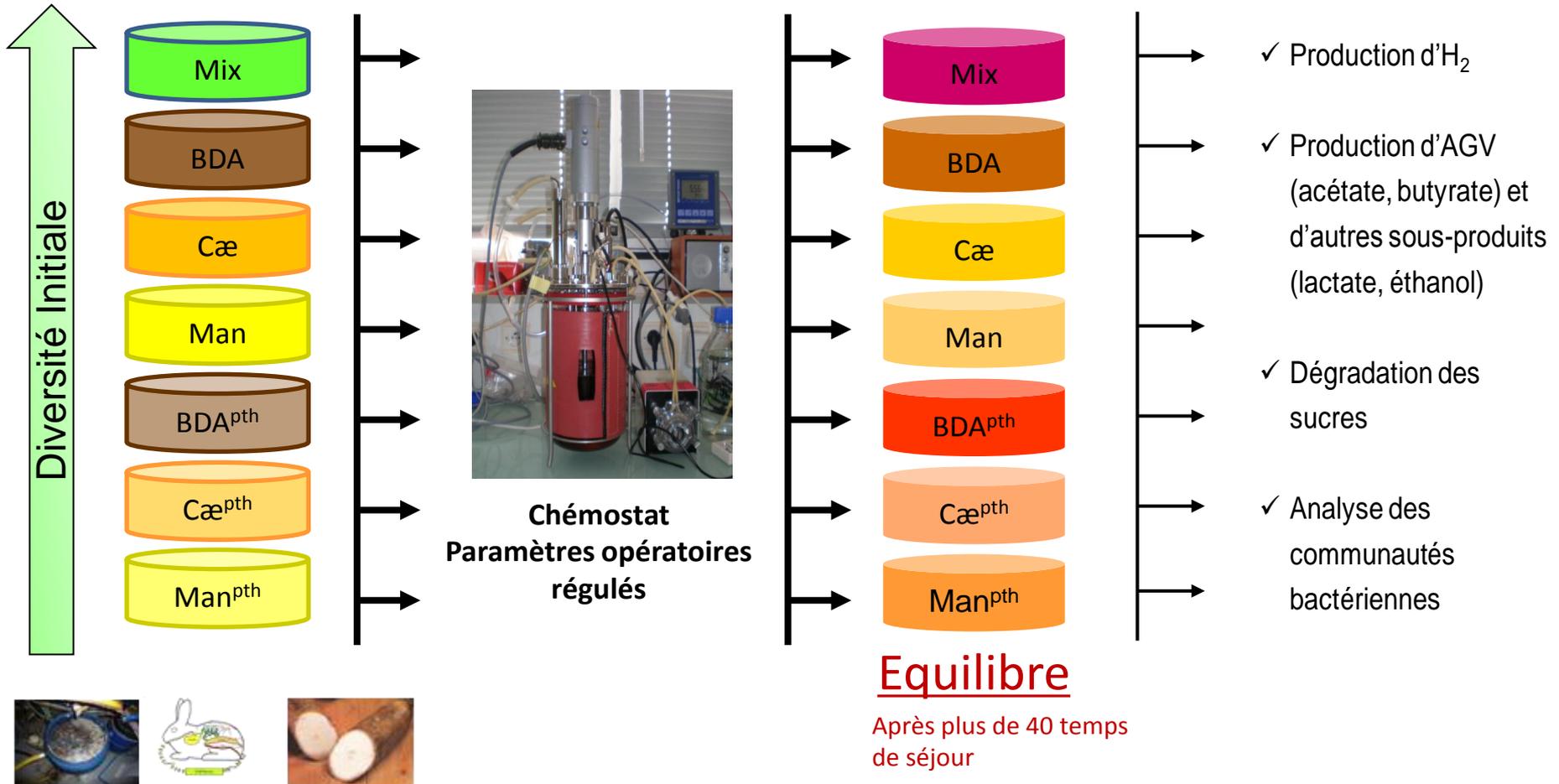
(i) Identifier des microorganismes « clés » (minoritaires) de ces écosystèmes

(ii) Elaborer des stratégies de contrôles biotiques

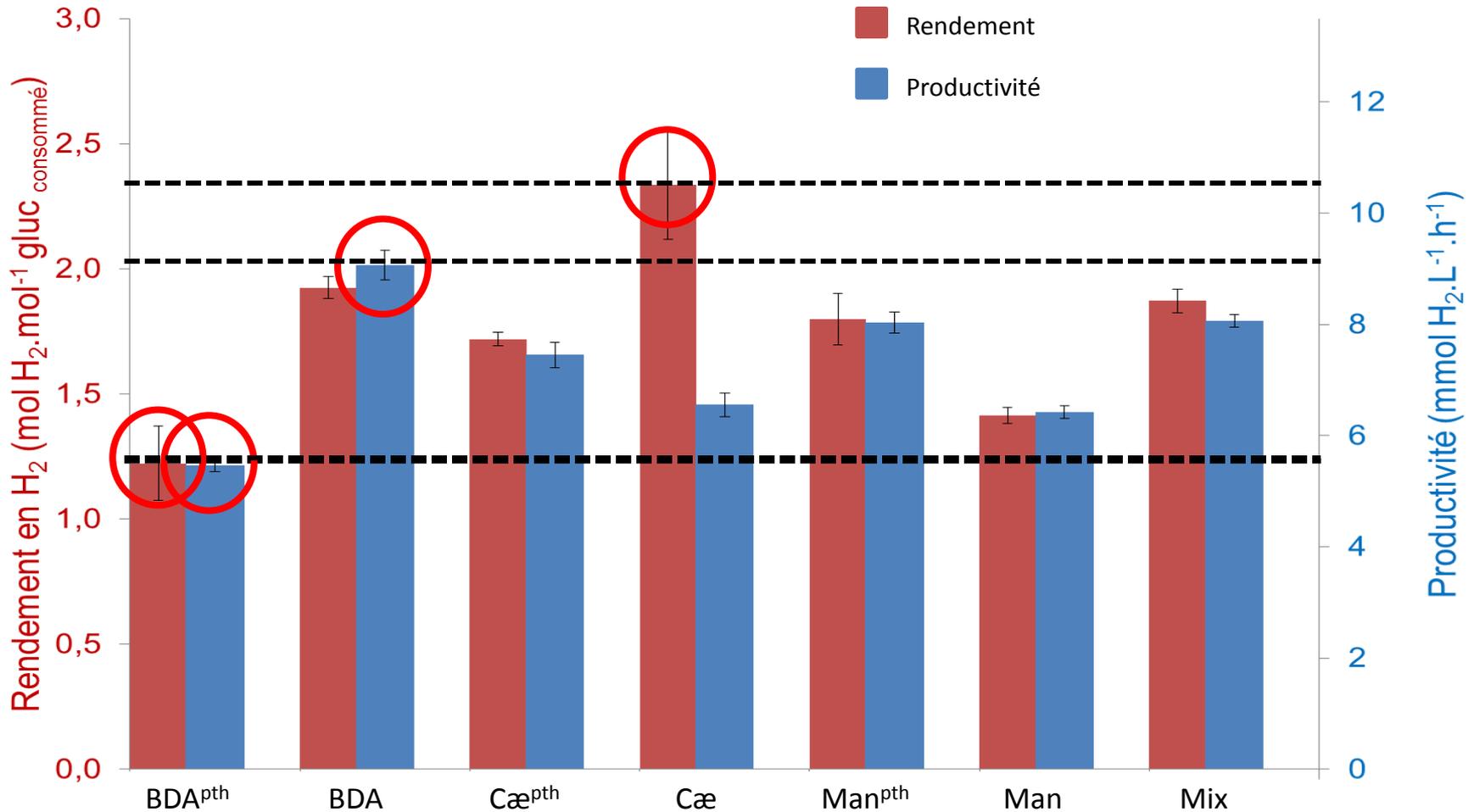
(iii) Caractériser la nature des interactions en consortium synthétique.

(i) Identification de microorganismes « clés » (IEM)

Approche Expérimentale

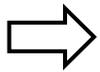
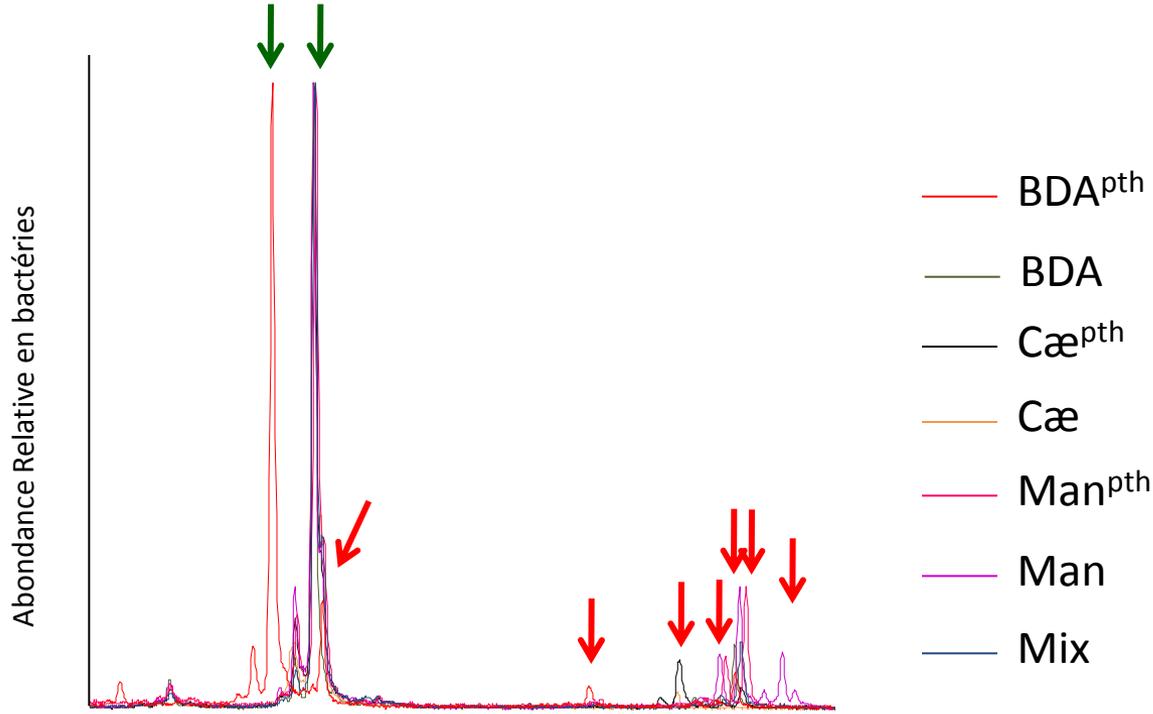


(i) Identification de microorganismes « clés » (IEM)

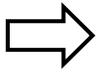


Différences significatives sur les performances de production H₂ à l'équilibre en fonction des cultures

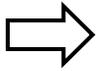
(i) Identification de microorganismes « clés » (IEM)



Une espèce dominante et de nombreuses minoritaires



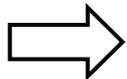
Excepté pour la culture BDA^{pth}, la **bactérie majoritaire est la même dans toutes les cultures**



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

(i) Identification de microorganismes « clés » (IEM)

	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

(ii) Stratégies de contrôle biotique

Introduction d'espèces bactériennes exogènes

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

(ii) Stratégies de contrôle biotique

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	-

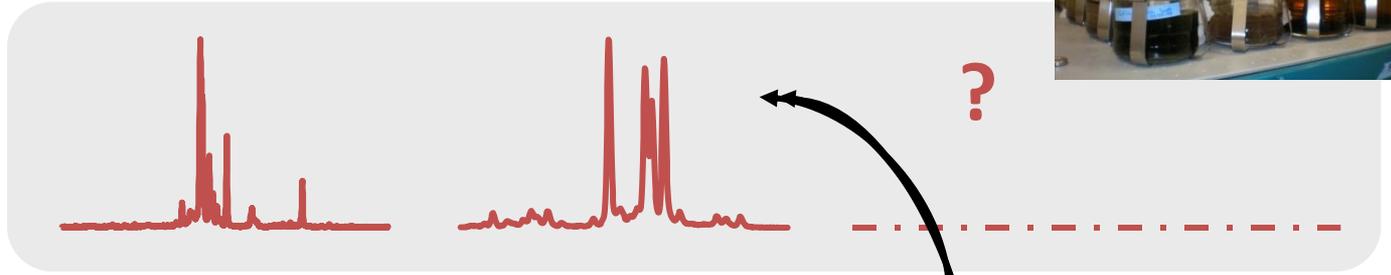
Choix d' un éventail représentatif de métabolismes susceptibles d' interagir avec l' écosystème

(ii) Stratégies de contrôle biotique

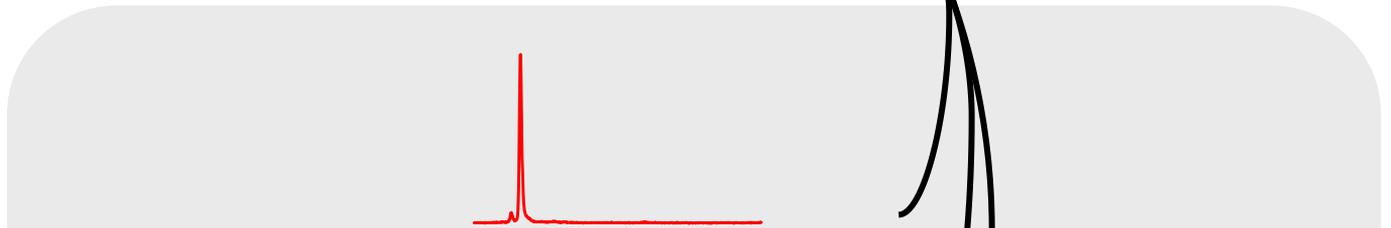
Cultures discontinues (glucose $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 37°C ; $\text{pH}=6$; milieu semi-synthétique)



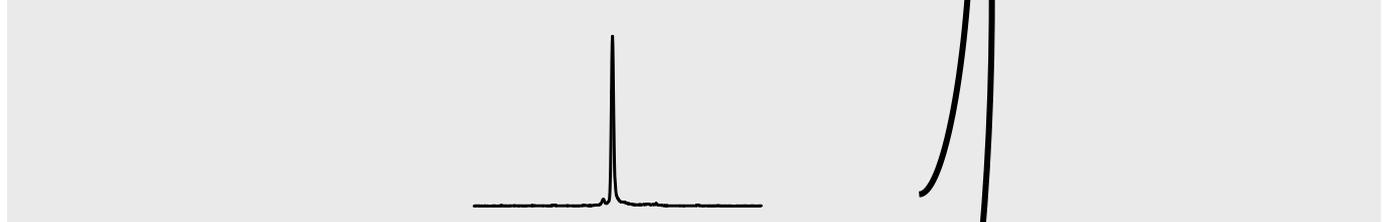
Eco A
Eco B



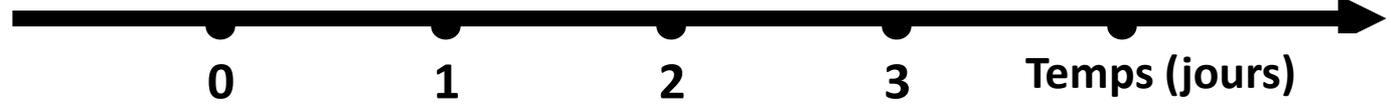
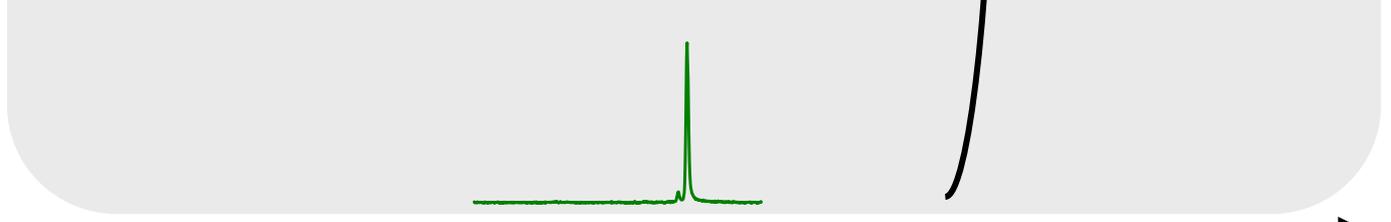
Espèce 1



Espèce 2



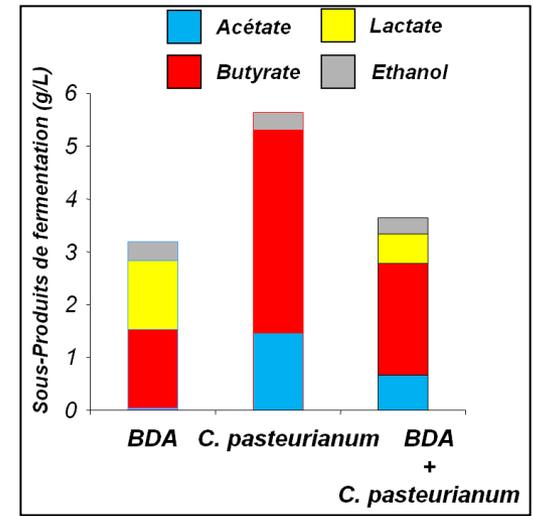
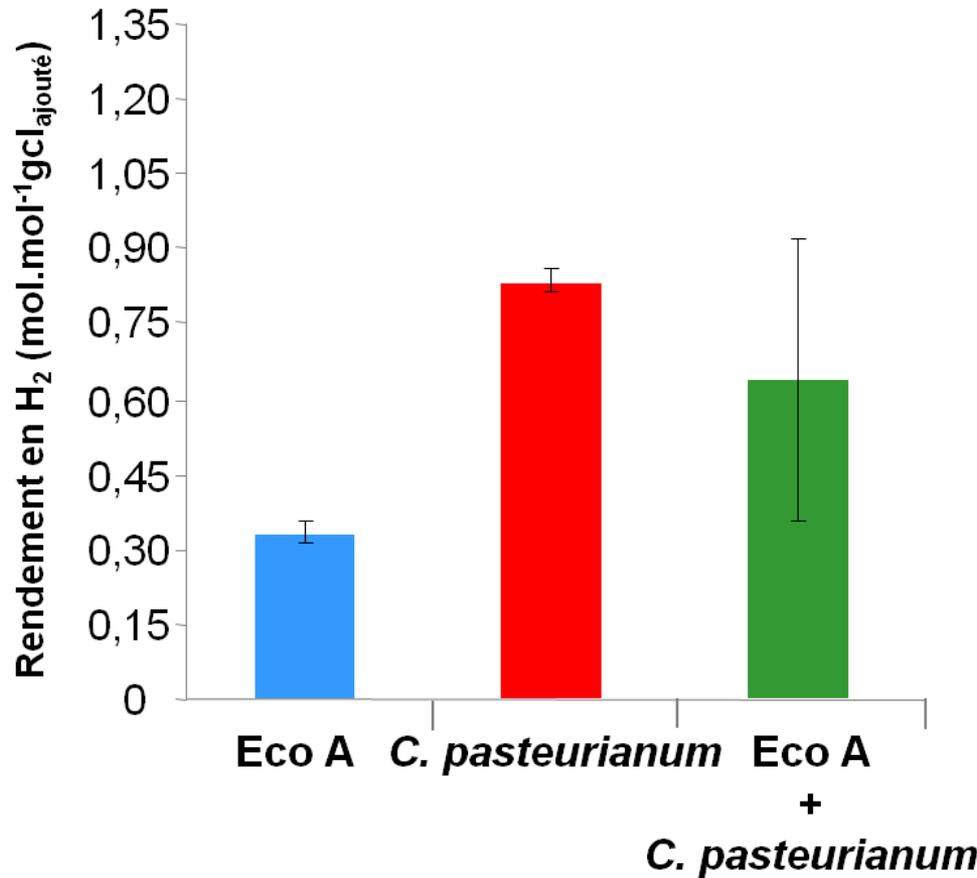
Espèce 3



(ii) Stratégies de contrôle biotique

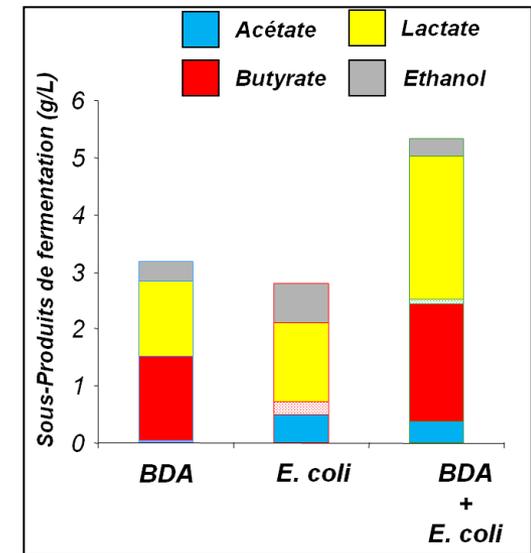
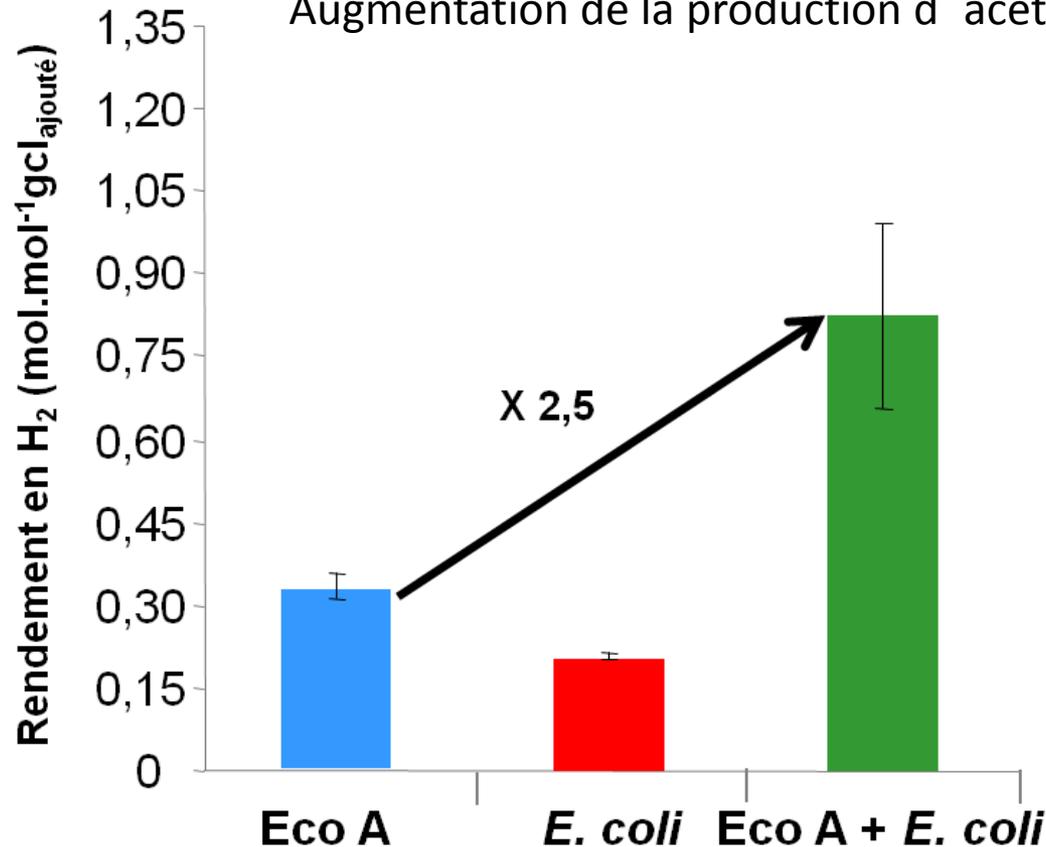
✓ 1^{er} cas : pas d'effet significatif d'interaction

– Ajout de *Clostridium pasteurianum* = compétition microbienne



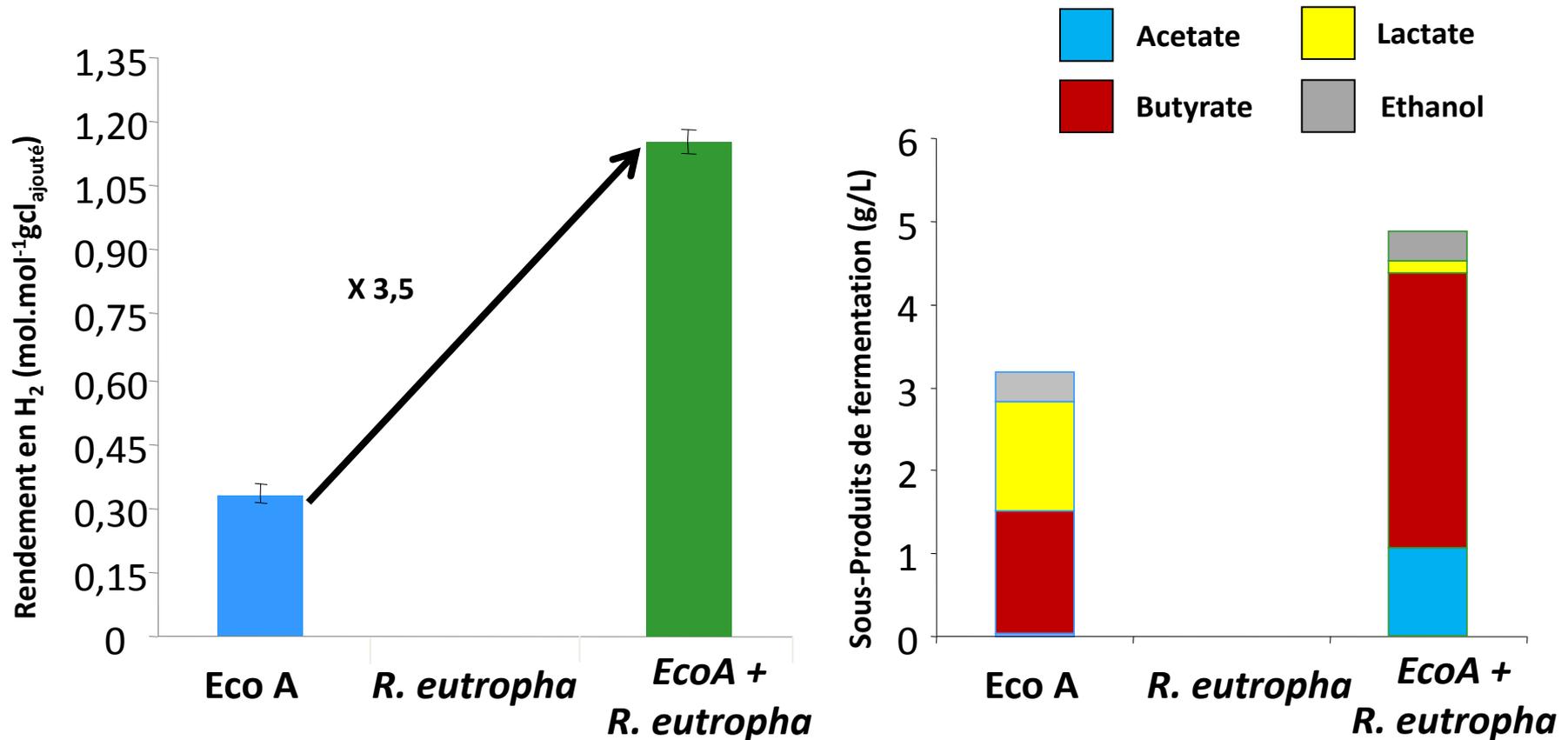
(ii) Stratégies de contrôle biotique

- ✓ 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



(ii) Stratégies de contrôle biotique

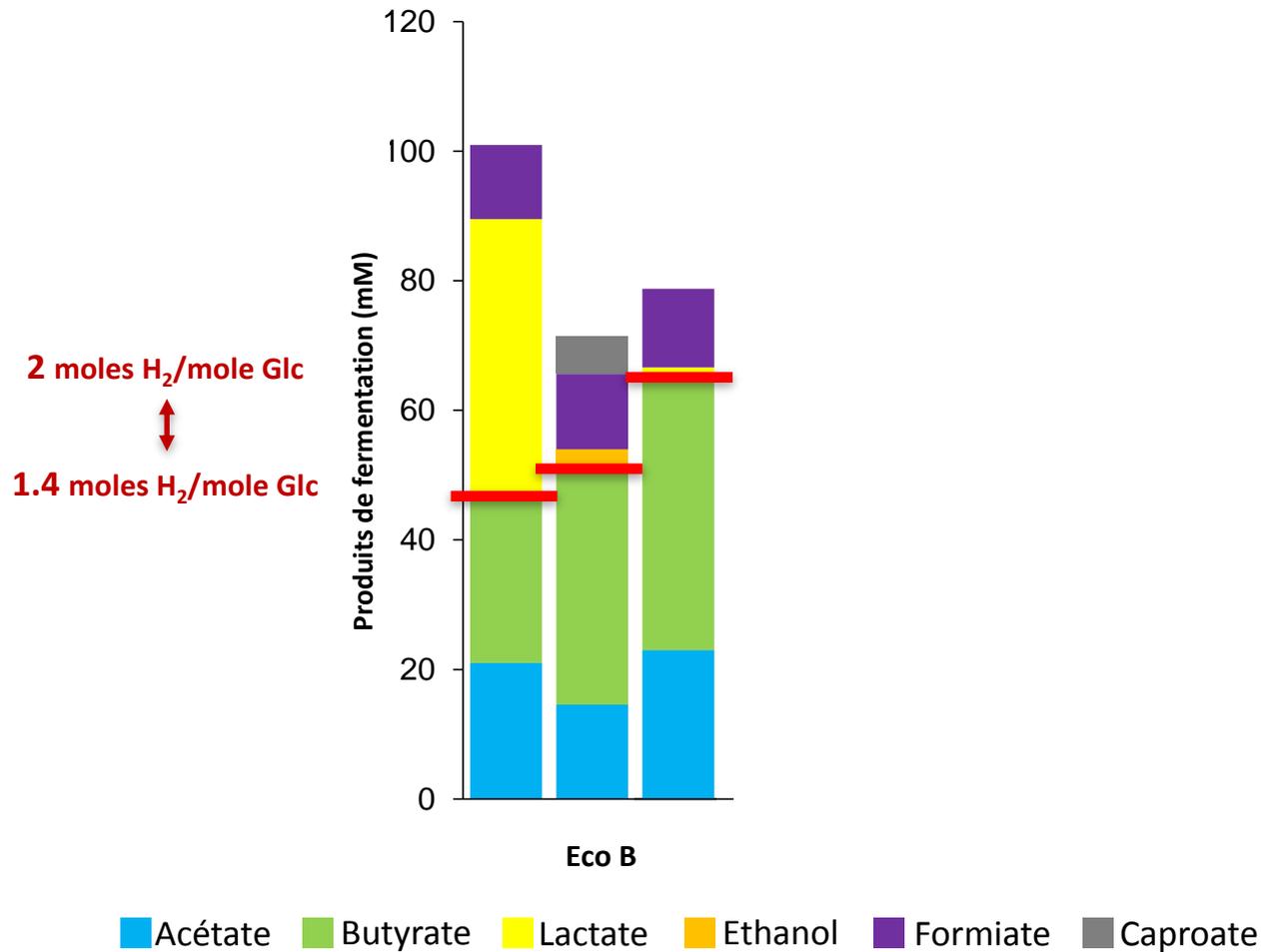
- ✓ 3^{ème} cas : **effet positif** sur les performances de production d'H₂
 - Ajout de *Ralstonia eutropha* = **synergie avec EcoA**
 - Augmentation de la production d'acétate et de butyrate dans le mélange



(ii) Stratégies de contrôle biotique

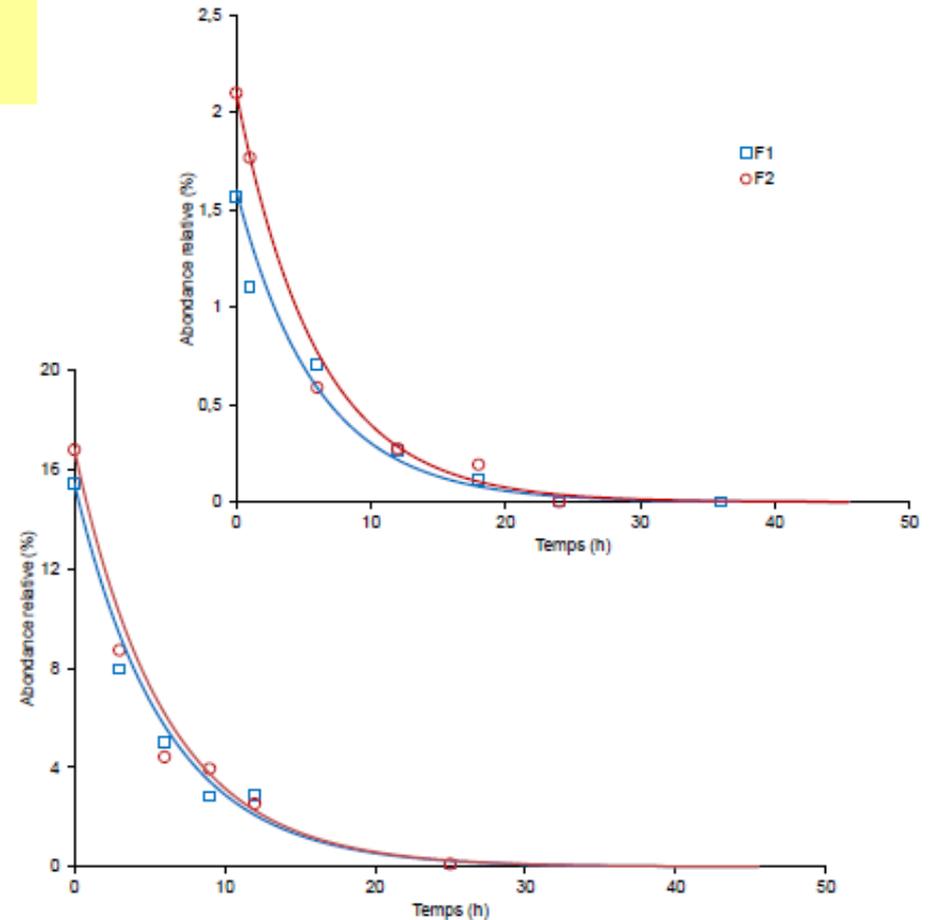
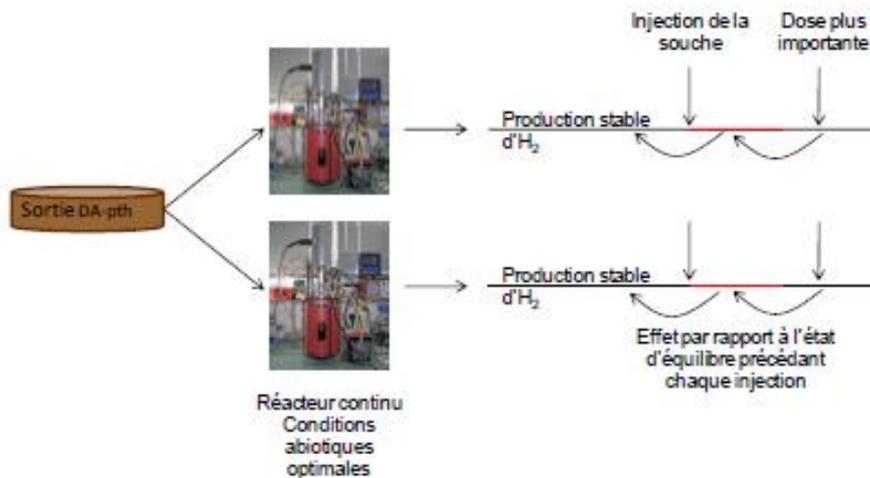
Stabilisation du métabolisme de l' écosystème (interaction positive)

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



(ii) Stratégies de contrôle biotique

En chémostat, *E. coli* (dose minimale 2% et plus importante 20%) :



Si la structure de l'écosystème est en forte interaction, la souche ne s'implante pas

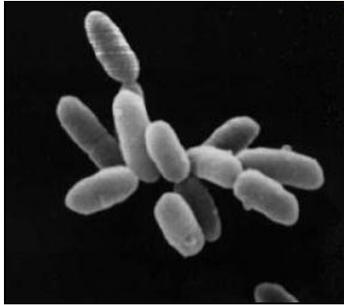
(ii) Stratégies de contrôle biotique

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	-	+	+++

Des comportements différents et fonction de l' écosystème récepteur

Clostridium

Clostridium acetobutylicum
ATTC824 (**Cab**)



Gram+
Fermentation ABE

H₂, Ethanol

Anaerobie

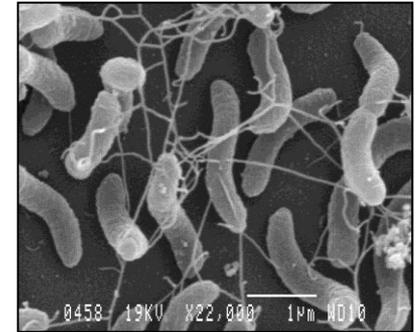
Mesophile

**Genome
sequence**

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

SRB

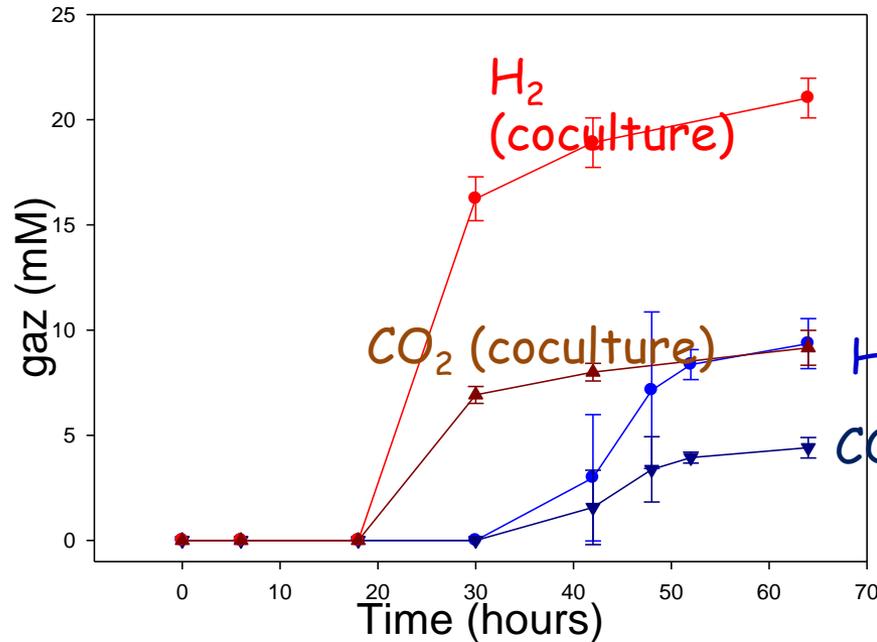
Desulfovibrio vulgaris
Hildenborough(**DvH**)



Gram-
sulfate respiration (BSR)

Production/consommation H₂

(ii) Etude de l'interaction Cab - DvH



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 »

(ii) Etude de l'interaction Cab - DvH

Etude Transcriptomique (Q RT PCR)

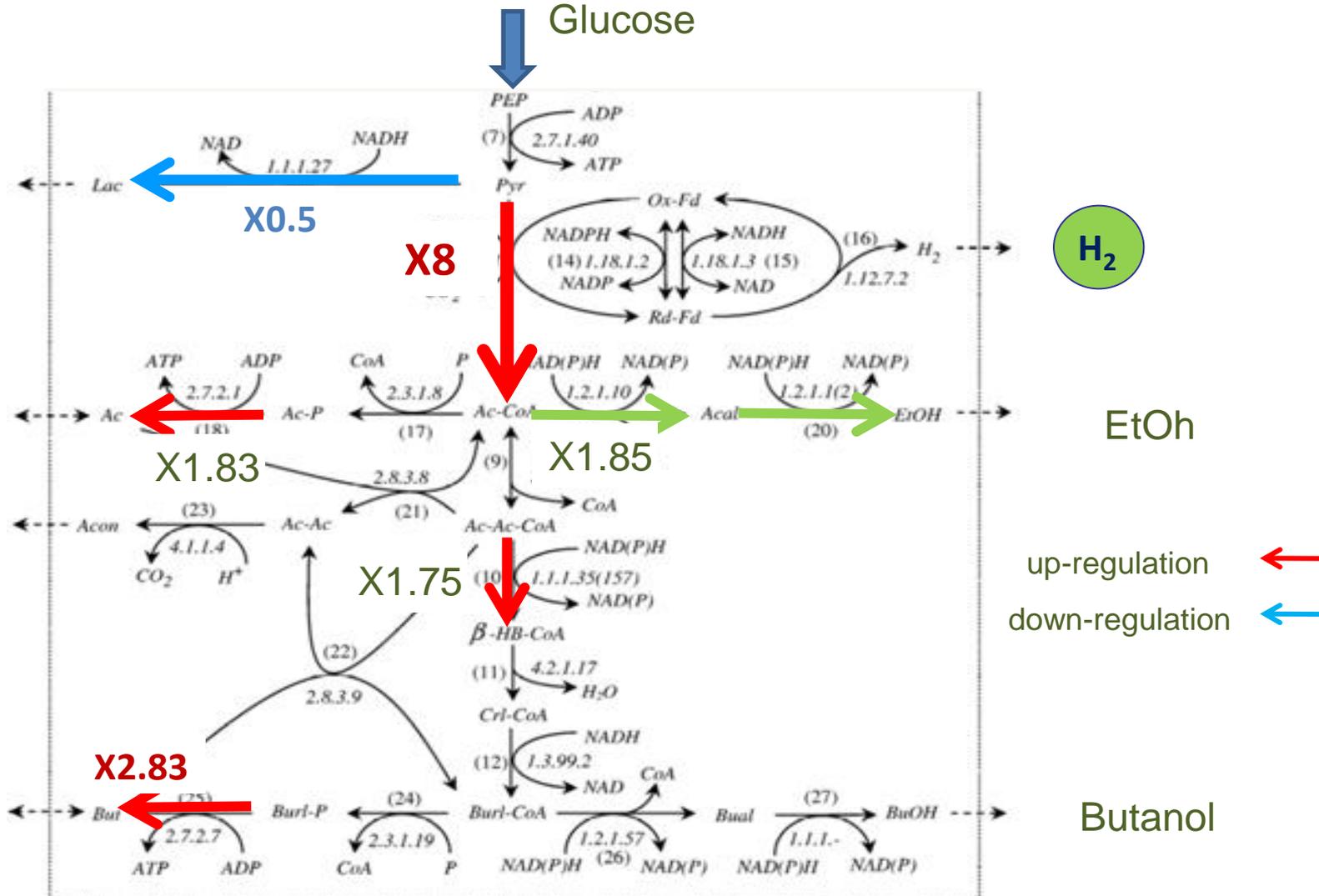
Coculture (*Cab*)
/ Culture pure
(*Cab*)

Lactate

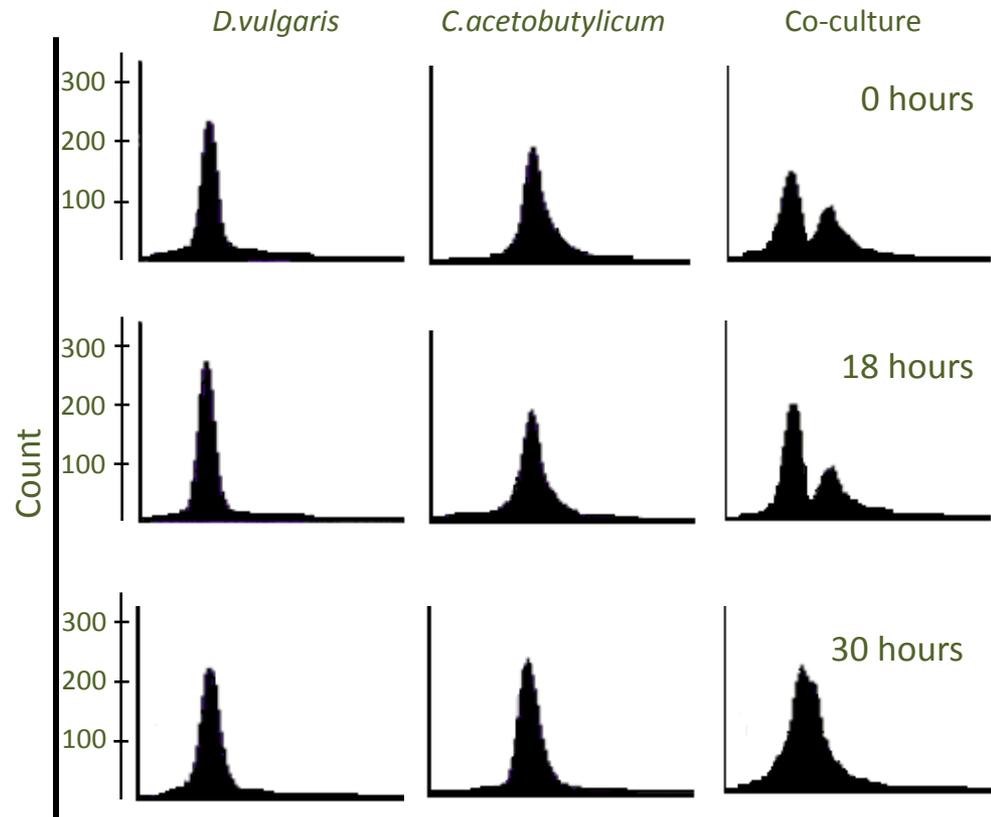
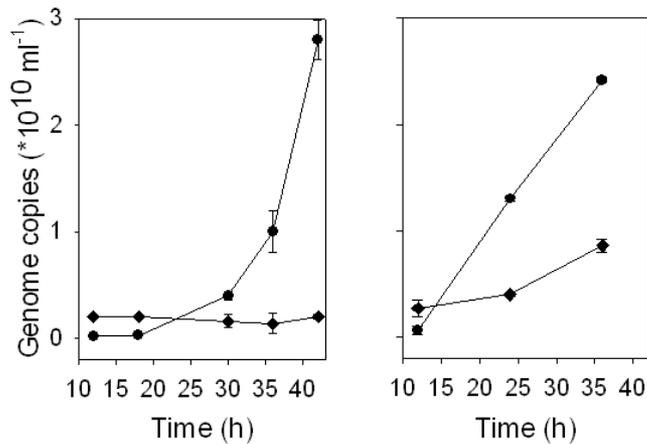
Acetate

Acetone

Butyrate



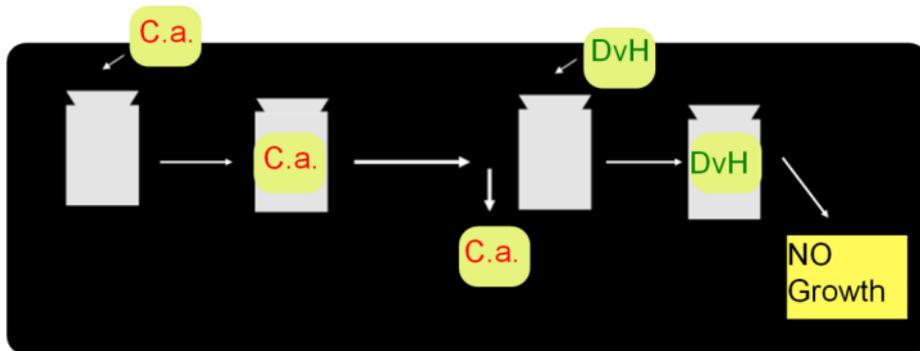
(ii) Etude de l'interaction Cab - DvH



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

(ii) Etude de l'interaction Cab - DvH

CONTACT PHYSIQUE NECESSAIRE (test membrane dialyse) !



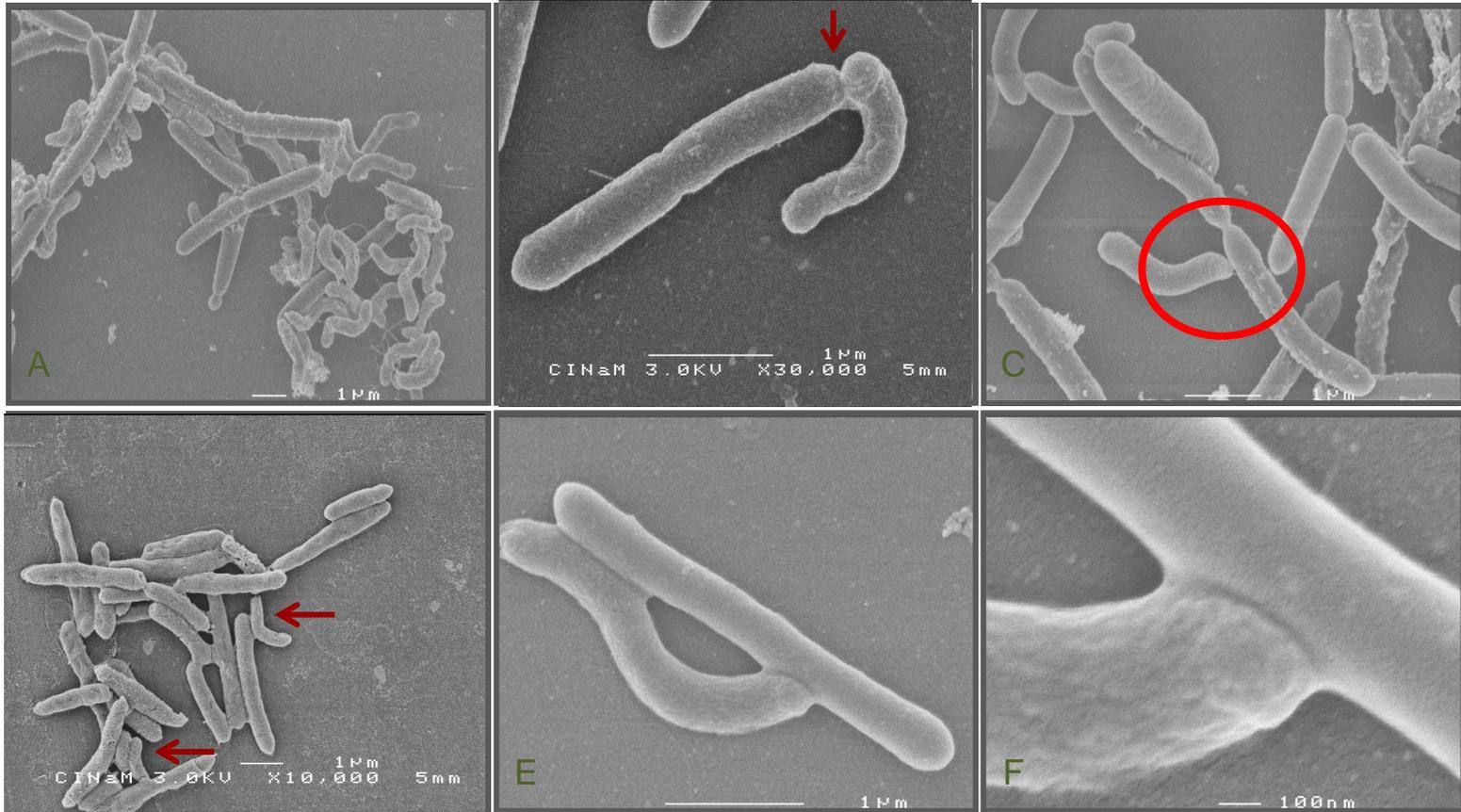
Séparation des 2 bactéries par une membrane à dialyse (7kDa) permettant uniquement la diffusion des métabolites et/ou petites protéines



Croissance (OD₆₀₀)
Analyse Métabolique, gaz...

(ii) Etude de l'interaction Cab - DvH

High Resolution Scanning Electron Microscopy



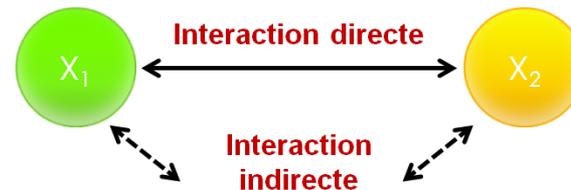
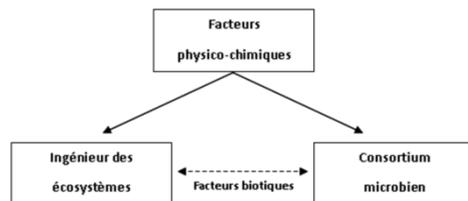
. (A) (x8000). (B) = A (x22000), (C) (x18000), (D) =C (x80000). (E) (x30000) , (F) =E (x100000).

(ni pili ni flagelle – fusion peptidoglycane (enzymes Cab) – stress nutritionnel uniquement ! Passage protéines gfp)

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
- ✓ Etude approfondie de l'interaction bactéries/bactéries = interaction généralisable ?

→ **Utilisation possible de facteurs biotiques pour stabiliser le système ou l'orienter vers la production de molécules d'intérêt**



Projet InGEcoH (2008–2012) :

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

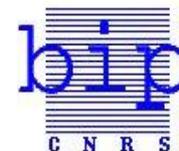
P1: Laboratoire de Biotechnologie de l' Environnement (LBE) INRA – UR050

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 des 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



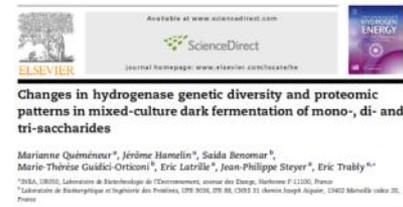
Des écosystèmes producteurs d'hydrogène



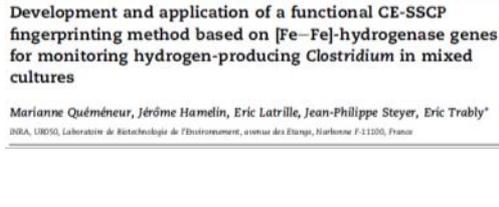
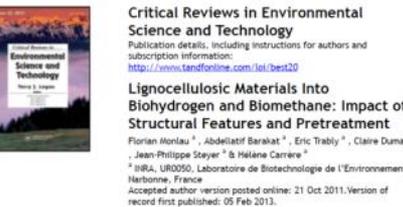
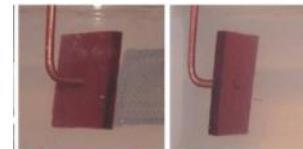
Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen

Yan Rajrafi^a, Eric Trably^{a,c}, Jérôme Hamelin^a, Eric Latrille^a, Isabelle Meynal-Salles^b, Saida Benomar^a, Marie-Thérèse Giudici-Orticoni^a, Jean-Philippe Steyer^a

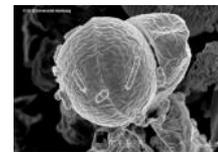
^aINRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Marbonne F-11100, France
^bLaboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (I2BP), UMR INRA CNRS 5304, UMR INRA-INRA 710, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse, France
^cLaboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Procédés, UMR 7250, FR3479, CNRS-AMU, 31 chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille cedex 20, France



aux biofilms électroactifs



aux écosystèmes microalgues/bactéries



.....



Merci pour votre attention



Laboratoire de Biotechnologie Environnementale

INRA-UR050 Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne www1.montpellier.supagro.inra.fr