



HAL
open science

Caractérisation et quantification rationnelles de la physiologie de *Deinococcus geothermalis* par une approche de génie nutritionnel

Julie Bornot

► **To cite this version:**

Julie Bornot. Caractérisation et quantification rationnelles de la physiologie de *Deinococcus geothermalis* par une approche de génie nutritionnel. Bactériologie. INSA de Toulouse, 2013. Français. NNT : 2013ISAT0045 . tel-01073388

HAL Id: tel-01073388

<https://theses.hal.science/tel-01073388>

Submitted on 9 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

Discipline ou spécialité : Ingénieries Microbienne et Enzymatique

Présentée et soutenue par : Julie BORNOT

Le : 12 décembre 2013

Titre :

Caractérisation et quantification rationnelles de la physiologie de
Deinococcus geothermalis par une approche de génie nutritionnel

Membres du jury :

M. Georges BARBIER	Professeur d'Université, ESIAB, Plouzané	Rapporteur
M. Ivan MATIC	Directeur de Recherche, INSERM, Paris	Rapporteur
Mme Anne GODFROY	Directrice de Recherche, IFREMER, Plouzané	Examineur
M. Gaël ERAUSO	Professeur d'Université, MIO, Marseille	Examineur
Mme Nathalie GORRET	Chargée de Recherche, INRA, Toulouse	Examineur
Mme Carole MOLINA-JOUVE	Professeur, INSA, Toulouse	Président du Jury
M. Jean-Louis URIBELARREA	Professeur, INSA, Toulouse	Directeur de thèse

Ecole doctorale : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Unité de recherche : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

CNRS UMR 5504, INRA UMR 792, INSA 135 Avenue de Rangueil-31077 Toulouse, France

Directeur de thèse : M. Jean-Louis URIBELARREA

Rapporteurs : M. Georges BARBIER et M. Ivan MATIC

Nom : BORNOT

Prénom : Julie

Titre de la thèse : Caractérisation et quantification rationnelles de la physiologie de *Deinococcus geothermalis* par une approche de génie nutritionnel.

Année : 2013

Nombre de pages : 270

Spécialité : Ingénieries Microbienne et Enzymatique

Lieu : INSA Toulouse

Résumé :

Les bactéries du genre *Deinococcus* sont des microorganismes qui présentent des propriétés remarquables de résistance aux conditions extrêmes telles que les radiations ionisantes, les stress oxydatifs, la dessiccation ou encore les températures extrêmes. L'exploitation de leurs capacités présente donc un réel intérêt pour les procédés biotechnologiques de production de métabolites d'intérêt, les biocarburants. Néanmoins, la physiologie et le métabolisme de ces microorganismes ont été très peu étudiés à ce jour. L'objectif de ce travail est d'identifier les exigences nutritionnelles d'une souche de déinocoques, *Deinococcus geothermalis*, dans le but de définir la composition d'un milieu synthétique permettant une croissance sans limitation. L'étude statistique de quarante huit formulations de milieux de culture a mis en évidence la variabilité qualitative et quantitative des compositions des milieux utilisés pour leur culture. Il ressort que l'ajout de facteurs stimulant la croissance, sous forme d'extrait de levure, est indispensable à la croissance non limitée de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. En bioréacteur à 45 °C, sur un milieu complexe et substrat glucose, une concentration finale de 2,7 g_{MS}.L⁻¹ a été obtenue en six heures avec un taux de croissance égal à 0,65 h⁻¹. Les résultats ont montré une variabilité intra-espèce importante ; parmi les trois souches de *Deinococcus geothermalis* étudiées, DSM 11300, DSM 11301 et DSM 11302, la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 présente la meilleure croissance en termes de nombre de générations, en milieu défini ou complexe. L'étude de l'influence des étapes de préparation de l'inoculum a permis de standardiser les conditions de préparation de l'inoculum préalablement aux cultures en bioréacteur. La souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 présente une croissance exponentielle durant quatre heures en bioréacteur sur un milieu défini avec 10 g.L⁻¹ de glucose ; le taux de croissance de 0,25 h⁻¹ ne se maintient pas sur une durée plus longue. Le rendement de production de biomasse à partir du glucose atteint 0,25 g_X.g_{Glc}⁻¹ soit 0,30 Cmol_X.Cmol_{Glc}⁻¹. L'ajout de sources carbonées, sources soufrées, vitamines ou autres facteurs de croissance ne permet pas d'améliorer la croissance de la souche dans ces conditions. Sur ces bases, la quantification de la physiologie de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 a été étudiée lors d'une culture en mode discontinu alimenté avec une stratégie d'apport de deux substrats, l'extrait de levure et le glucose. Le mode de conduite a permis de révéler que le glucose n'est pas la source de carbone assimilée préférentiellement et que l'extrait de levure peut être consommé comme source azotée organique et/ou comme source carbonée. Les déinocoques sont caractérisés par un métabolisme principalement protéolytique : il a été possible de confirmer que l'extrait de levure est indispensable à la croissance non limitée de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302. Avec cette stratégie d'alimentation co-substrats, 253 g d'extrait de levure et 26 g de glucose ont été ajoutés pour produire 99 g_{MS} de biomasse soit 9,6 g_{MS}.L⁻¹ en six heures. Les vitesses spécifiques maximales de consommation des substrats, extrait de levure et glucose, atteignent respectivement 0,68 et 0,39 Cmol.Cmol_X⁻¹.h⁻¹. Le taux de croissance exponentiel maximal obtenu est égal à 1.05 h⁻¹, meilleur résultat décrit à ce jour pour un déinocoque. Ces résultats contribuent ainsi à implémenter l'état des connaissances sur la physiologie et les exigences nutritionnelles de *Deinococcus geothermalis* et donnent accès aux valeurs de paramètres cinétiques et de rendements, données absentes de la littérature.

Mots clés : *Deinococcus geothermalis*, physiologie, génie nutritionnel, milieu défini, facteur limitant

Last-name: BORNOT

First-name: Julie

Thesis title: Rational characterization and quantification of *Deinococcus geothermalis* physiology using nutritional studies.

Year: 2013

Number of pages: 270

Speciality: Enzymatic and Microbial Engineering

Place: INSA Toulouse

Abstract:

Bacteria belonging to *Deinococcaceae* family are microorganisms with exceptional resistance properties to extreme environmental conditions such as ionizing radiations, oxidative stress, dehydration or extreme temperatures. These properties make them interesting targets for biotechnological processes for metabolite production like biofuels. Nevertheless, physiological behaviour and metabolism of these microorganisms have been little studied to date. The main objective of this work was to study the nutritional requirements for the growth of a *Deinococcaceae* strain, *Deinococcus geothermalis*, in order to define a synthetic medium sufficient for a non-limiting growth of this strain. The statistical study of 48 culture media formulations highlighted a lot of variability between the compositions used for their growth. A limiting growth of the strain *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 was obtained on the defined medium DM chosen for this work, in Erlenmeyer flasks and in bioreactor, unless yeast extract was added to the medium. Cultivated in a bioreactor at 45 °C, on a complex medium with glucose (CMG), the biomass concentration reached 2.7 g_{MS}.L⁻¹ in six hours with a growth rate of 0.65 h⁻¹. The results showed intra-specie variability; the strain *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 exhibits the best number of generation in both complex and defined media. The study of the influence of inoculum preparation steps allowed standardizing the conditions of inoculum preparation before cultures in bioreactor. The strain *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 has a four hours exponential growth when cultured in bioreactor on the defined medium DM at 45 °C, but the maximal growth rate of 0.28 h⁻¹ decreases rapidly. The yield of biomass production on glucose reached 0.25 g_X.g_{Glc}⁻¹ (0.30 Cmol_X.Cmol_{Glc}⁻¹). Oxygen uptake and glucose specific uptake rates were 3.3 mmol.L⁻¹.h⁻¹ and 0.57 Cmol_{Glc}.Cmol_X.h⁻¹ respectively. None of the carbon sources, sulfur sources or growth factors added to the defined medium DM could improve growth results of the strain *Deinococcus geothermalis* DSM 11302. For the quantification of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 physiology, a fed-batch culture strategy with a yeast extract and glucose co-substrate feed was chosen. This strategy revealed that glucose is not the preferential carbon source for biomass production. In addition, yeast extract can be consumed as organic nitrogen source and/or as carbon source. *Deinococcaceae* are mainly proteolytic microorganisms, yeast extract is an essential element to obtain a non-limiting growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302. With this co-substrate feed strategy, 253 g of yeast extract and 26 g of glucose were added to produce 99 g_{MS} of biomass or 9.6 g_{MS}.L⁻¹ in six hours. The maximal yeast extract and glucose specific uptake rate reached respectively 0.68 and 0.39 Cmol.Cmol_X⁻¹.h⁻¹. The maximal exponential growth rate is 1.05 h⁻¹, which is the best result describes to date for a *Deinococcaceae* strain. These results implement the knowledge on physiology and nutritional requirements of *Deinococcus geothermalis* and give access to quantitative values for characteristic kinetic parameters and conversion yields.

Keywords: *Deinococcus geothermalis*, physiology, nutritional study, defined medium, limiting factor

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, au sein de l'équipe Fermentation Advanced and Microbial Engineering, dans le cadre du projet Deinol. Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Nic Lindley, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Je remercie Carole Molina-Jouve, Nathalie Gorret, Gérard Goma ainsi que Jacques Biton pour m'avoir fait confiance en me proposant ce projet de recherche ambitieux dans la cadre d'une collaboration Deinove - LISBP.

Je remercie chaleureusement Messieurs Ivan Matic et Georges Barbier pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse ainsi que Madame Anne Godfroy et Monsieur Gaël Erauso, pour avoir accepté d'examiner mon travail. Un grand merci à l'ensemble des membres du jury pour leur participation à ma soutenance de thèse et la discussion très intéressante qui en a suivi.

Je suis très reconnaissante à mon directeur de thèse, Jean-Louis Uribelarrea, pour avoir accepté de diriger ces travaux de thèse, pour toutes les discussions scientifiques très enrichissantes, pour m'avoir transmis sa passion pour la fermentation et m'avoir fait part de son expérience et de ses connaissances en génie microbiologique.

J'exprime ma profonde reconnaissance et de chaleureux remerciements à Nathalie Gorret, qui a participé de près à l'encadrement de ces travaux de doctorat, pour l'intérêt qu'elle a porté à ce sujet, pour sa disponibilité et son soutien sans faille, pour sa persévérance malgré les nombreux obstacles rencontrés avec notre petite bête peu coopérative. Sa passion pour la recherche et sa rigueur scientifique ont été communicatives et m'ont beaucoup apporté au cours de ces années. Je garderai de bons souvenirs de nos déplacements montpelliérains, de nos discussions tellement intéressantes qu'on en oublierait presque de se concentrer sur l'itinéraire !

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à Carole Molina-Jouve pour son investissement dans mon projet de recherche, pour sa disponibilité malgré un emploi du temps plus que chargé et pour sa bonne humeur quotidienne. Merci pour l'aide apportée lors de la rédaction et la préparation de la soutenance.

Mes sincères remerciements sont adressés à César Aceves-Lara pour son expertise et la patience dont il a fait preuve pour m'aider avec mes analyses statistiques ! Je le remercie également pour ses encouragements et les conseils avisés qu'il a su me donner tout au long de cette thèse.

Je remercie Jaques Biton, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet de recherche passionnant malgré les difficultés qu'il a fallu surmonter, merci à Jean-Paul Leonetti pour avoir suivi mon travail au sein de Deinove et avoir accepté de participer à mes comités de thèse.

Je remercie tous les membres de l'équipe Fermentation Advanced and Microbial Engineering qui ont contribué de près ou de loin à ce projet de thèse, pour l'aide, les conseils, les discussions scientifiques ou plus farfelues sur les potions et autres incantations à tester sur le deino...

Une grande pensée pour les amis et collègues « anciens » ou « nouveaux » qui ont partagé mon quotidien au laboratoire ou en dehors : Abril, Asma, Aurore, Alexis, Benjamin, Bérangère, Carlos, Céline, Claire, Claudia, Cuong, Damien, Elodie B., Elodie G., Estelle, Emilie, Florence, Ines, Jan, Julie M., Julien C., Julien P., Lamia, Lucie, Madalen, Maud, Mathieu, Nam, Nam², Nathalie, Naziha, Nicolas, Rafael, Rana, Romain, Sandra, Sandrine, Sandy, Sirichai, Xiaomin et Yuri (en espérant n'avoir oublié personne). Un grand merci pour leur bonne humeur quotidienne et l'ambiance chaleureuse de travail.

Je suis très reconnaissante envers l'équipe Symbiose et plus particulièrement Evrard Mengelle, Mansour Bounouba et Anil Shewani, pour m'avoir accueillie dans leur équipe pour réaliser mes analyses de carbone et d'azote. Merci pour la formation et les conseils !

Je souhaite remercier également Jérôme Lluch et l'équipe de la plateforme génomique de Toulouse pour la collaboration sur mon projet de séquençage, ainsi que Christophe Klopp de l'équipe Bioinformatique pour la formation et l'accompagnement sur l'analyse de ces données de séquençage.

De chaleureux remerciements pour les membres du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés que j'ai croisés tout au long de ma thèse, dans le cadre formel du travail ou simplement à la cafétéria, pour les échanges et les discussions que nous avons pu avoir.

Un grand merci à la Nam-Nam Team, mes compagnons de joies et de galères Jillian et Lannig. Ce fut un plaisir de partager leur bureau pendant ces trois années. Je garderai en mémoire les nam-nam pulses, les interminables discussions à refaire le monde assis au pied des fermenteurs, les conversations sans queue ni tête qui nous ont bien fait marrer... Sans eux, les heures passées au labo auraient été bien plus monotones ! Par contre je ne remercie pas David et Jonathan d'avoir sorti leur chanson « Est-ce que tu viens pour les vacances » en 1988, bien trop entêtante pour un thésard lorrain !

Un immense merci à Laurie, pour son amitié, pour avoir été là dans les bons comme dans les moins bons moments, merci pour tout le soutien et les conseils qui m'ont permis d'aller de l'avant devant les difficultés parfois rencontrées. Et merci également pour ces bons moments de détente et nos délires mémorables !

Au-delà du labo, je ne saurais oublier mes amis qui m'ont soutenu ces dernières années, merci pour leur présence et leur compréhension malgré mon emploi du temps chargé qui ne m'a pas toujours permis de les voir autant que je l'aurai souhaité...

Enfin mes pensées vont à ma famille ; du fond du cœur je remercie mes parents, Maman, Papa et bien sûr Martine et Bernard, de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce parcours, merci pour leur soutien, leur patience et leur amour. Merci d'avoir cru en moi ! Merci à ma sœur Caroline, Jean-Charles et mes grands-parents qui ont toujours été présents pour moi et m'ont permis d'aller de l'avant. Une spéciale dédicace à ma « mamie Gaby » qui a été pour moi un pilier tout au long de ma vie et qui m'a permis de croire en moi et d'accomplir de belles choses ! Merci pour tout !

J'adresse finalement un immense merci à Justin, qui me soutient depuis ces dix dernières années bien au-delà de ce travail de thèse. Mille mercis pour son soutien infailible, sa patience et sa compréhension malgré les longues soirées et les week-ends passés auprès de mes petites bêtes au laboratoire, pour son aide et son amour qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout. Merci pour sa présence à mes côtés et notre belle petite famille !

Je dédie cette thèse à ma fille chérie, Cassandra, véritable rayon de soleil dans ma vie...

Sache que tu es ma plus belle réussite et que je te souhaite tout le bonheur du monde !

Table des matières

Introduction et contexte de l'étude	3
Chapitre I. Etat de l'Art	9
I.1 Description générale des bactéries du genre <i>Deinococcus</i>	11
I.2 Résistance aux dommages à l'ADN et mécanismes de réparation de l'ADN	16
I.3 Applications : Production de molécules d'intérêt – Bioremédiation.....	23
I.4 Exigences nutritionnelles et métabolisme des déinocoques	24
I.5 Cultures : Mise en œuvre et cinétiques.....	40
I.6 Conclusions.....	44
Chapitre II. Matériels et méthodes	49
II.1 Souches	53
II.2 Milieux de culture	53
II.3 Conditions de culture.....	64
II.4 Techniques analytiques de suivi de la culture.....	73
II.5 Séquençage d'ADN génomique	80
II.6 Traitement des données.....	82
II.7 Détermination de la composition élémentaire de l'extrait de levure.....	91
Chapitre III. Experimental and statistical analysis of nutritional requirements for the growth of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	95
III.1 Introduction du chapitre.....	97
III.2 Publication : Experimental and statistical analysis of nutritional requirements for the growth of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300.....	98
III.3 Quantification de la croissance de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 en bioréacteur, sur milieu complexe à 45 °C.....	119

Chapitre IV. Influence of the inoculum preparation on the growth of the extremophilic strain <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302	125
IV.1 Introduction du chapitre.....	127
IV.2 Publication : Influence of the inoculum preparation on the growth of the extremophilic strain <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302	128
IV.3 Séquençage des souches <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 et <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302.....	142
Chapitre V. Quantification de la croissance de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 sur milieu défini - Recherche des conditions de culture optimales.....	149
V.1 Introduction du chapitre.....	151
V.2 Matériel et méthodes.....	151
V.3 Résultats et discussion.....	154
V.4 Conclusions	161
Chapitre VI. Growth of the extremophilic <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 using co-substrate fed-batch culture	167
VI.1 Introduction du chapitre.....	169
VI.2 Publication : Growth of the extremophilic <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 using co-substrate fed-batch culture.....	170
Discussion générale, conclusions et perspectives	189
Annexes.....	
Références bibliographiques.....	
Abréviations	

Table des figures

Figure 1 : Procédé de production de bioéthanol selon le projet Deinol (source : http://www.deinov.com/fr/programmes-et-applications/deinol)	4
Figure 2 : Observation microscopique (x 1000) d'une souche de déinocoques cultivée en milieu riche.....	13
Figure 3 : Tétrades de déinocoques formées par division cellulaire (source : http://catalogue-of-organisms.blogspot.com/2009_02_01_archive.html)	13
Figure 4 : Courbes de survie de <i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>Thermococcus gammatolerans</i> , <i>Halobacterium</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Deinococcus radiodurans</i> soumis à des radiations gamma (source : Confalonieri and Sommer, 2011)	17
Figure 5 : Relation entre la survie à une exposition aux radiations ionisantes et les concentrations intracellulaires en fer et manganèse (source : Daly 2009)	17
Figure 6 : Mécanisme de réparation de l'ADN endommagé par des radiations ionisantes chez <i>Deinococcus radiodurans</i> (source : Slade et al, 2009).....	22
Figure 7 : Les différentes voies de catabolisme du glucose	32
Figure 8 : Evolution de la DO _{600nm} , de l'agitation, du pH et de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps pour une culture de <i>Deinococcus radiodurans</i> en bioréacteur sur milieu complexe (source : He, 2009).....	42
Figure 9 : Evolution la DO _{600nm} et des concentrations en glucose, ammoniac, acétate et lactate en fonction du temps pour une culture de <i>Deinococcus radiodurans</i> en bioréacteur sur milieu complexe (source : He, 2009)	43
Figure 10 : Protocole d'ensemencement de cultures en fioles Erlenmeyer	64
Figure 11 : Protocole d'ensemencement de cultures en bioréacteur.....	65
Figure 12 : Schéma de l'ensemble du système bioréacteur	68
Figure 13 : Représentation des quatre modes de commande des pompes d'alimentation gérés par le logiciel fed2s.....	69
Figure 14 : Organigramme de la commande auto-adaptative d'alimentation	70
Figure 15 : Evolution de la densité optique mesurée à 600 nm en fonction du facteur de dilution de l'échantillon	74
Figure 16 : Schéma du système considéré pour les bilans gazeux	83
Figure 17 : Two-dimensional representation of the media formulations according to the principal components F1 and F2; F1 and F2 explained respectively 34 % and 20 % of the variance.....	104
Figure 18 : Growth curve of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 on the mineral medium DM.....	105

Figure 19 : Two-dimensional representation of the media formulations according to the principal components F1 and F2; F1 and F2 explained respectively 25 % and 14 % of the variance.....	108
Figure 20 : Physiological descriptors evolution during the culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300. Time course evolution of the dissolved oxygen (●), the OD _{600nm} (-◆-) and the pH (—); nutritional pulses are represented by the vertical bars – Mg = MgSO ₄ , Ca = CaCl ₂ , Fe = FeSO ₄ , Mn = MnSO ₄ , Co = CoCl ₂ , Zn = ZnSO ₄ , Mo = Na ₂ MoO ₄ , Cu = CuCl ₂ , B = H ₃ BO ₃ , CA = casamino acids vitamins-free, K N P = K ₂ HPO ₄ + (NH ₄) ₂ HPO ₄ , S N P = Na ₂ HPO ₄ + (NH ₄) ₂ SO ₄ + NH ₄ Cl.....	109
Figure 21 : Physiological descriptors evolution during the culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300. Time course evolution of the dissolved oxygen (●), the OD _{600nm} (-◆-) and the pH (—); nutritional pulses are represented by the vertical bars – YE means yeast extract	110
Figure 22 : Physiological descriptors evolution during the culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300. Time course evolution of the dissolved oxygen (●), the glucose uptake (—), the OD _{600nm} (-◆-) and the oxygen uptake rate (—); nutritional pulses are represented by the vertical bars – YE means yeast extract, Dgeo extract means <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 extract and f YE means fraction of yeast extract.....	111
Figure 23 : Physiological descriptors evolution during the culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300. Time course evolution of the dissolved oxygen (●), the glucose uptake (—), the OD _{600nm} (-◆-) and the oxygen uptake rate (—); nutritional pulses are represented by the vertical bars – f YE means fraction of yeast extract	112
Figure 24 : Physiological descriptors evolution during the culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300. Time course evolution of the dissolved oxygen (●), the glucose uptake (—), the OD _{600nm} (-◆-) and the oxygen uptake rate (—); nutritional pulses are represented by the vertical bars – YE means yeast extract and Dgeo extract means <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 extract.....	113
Figure 25 : Comparison of growth curve of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 obtained at 37 °C (—●—) and 45 °C (-◆-).	116
Figure 26 : Evolution de la DO _{600nm} (-◆-), de la pression partielle en oxygène dissous (●) et du pH (—) en fonction du temps.....	119
Figure 27 : Evolution du taux de croissance (-▲-) et des vitesses spécifiques de consommation de l'oxygène (-q _{O2}) (—) et de production du dioxyde de carbone (q _{CO2}) (—) en fonction du temps	120
Figure 28 : Comparison of growth curve of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 at 37 °C (-◆-) and 45 °C (—●)	134
Figure 29 : Description of the protocol for the experiments on yeast extract concentration, inoculation size, incubation duration of the preculture, cell washing number and number of precultures, in baffled Erlenmeyer flasks	140

Figure 30 : Description of the protocol for the experiments on strain preservation, frozen storage period, type of strain revivification and variability between CFU on Petri dishes, in baffled Erlenmeyer flasks (→ inoculation without cell washing step; → inoculation with 1 cell washing step).....	141
Figure 31 : Évolution de la $DO_{600\text{ nm}}$ (-◆-·), du glucose consommé (—), de l'oxygène dissous (●) et de la production d'acides organiques (▲) au cours de la culture de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302	155
Figure 32 : Évolution des vitesses de consommation de l'oxygène ($-r_{O_2}$) (—), de production de dioxyde de carbone (r_{CO_2}) (—) et du QR (▼) au cours de la culture de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302.....	155
Figure 33 : Évolution de la $DO_{600\text{ nm}}$ (-◆-·), du glucose consommé (—), de la pression partielle en oxygène dissous (●) et de la vitesse de consommation de l'oxygène ($-r_{O_2}$) (—) en fonction des ajouts de solutions nutritives au cours de la culture de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302.....	157
Figure 34 : Yeast extract (—) and glucose supplies (—), residual glucose (▲), dissolved oxygen (●), saline solution feed (- -), growth rate (—) and $OD_{600\text{ nm}}$ (-◆-·) evolution during fed-batch culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 (vertical bars represent glucose pulses).....	177
Figure 35 : <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 grown on glucose and yeast extract in fed-batch conditions (microscopic observation x1000).....	179
Figure 36 : Carbon substrate uptakes: yeast extract (■) and glucose (■) during fed-batch culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302.....	180
Figure 37 : Nitrogen substrate feed (left): yeast extract (■) and ammonium (■) and organic (■) and mineral (■) residual nitrogen (right) during fed-batch culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302	180
Figure 38 : Acidic (- -) and alkaline regulation (—) and yeast extract supply (—) evolution during fed-batch culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302.....	181
Figure 39 : Oxygen uptake rate (—), carbon dioxide production rate (—) and RQ (▼) evolution during fed-batch culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302.....	182

Table des tableaux

Tableau 1 : Milieu de croissance de <i>Micrococcus radiodurans</i> développé par Raj <i>et al.</i> (1960).....	25
Tableau 2 : Milieu de croissance de <i>Micrococcus radiodurans</i> développé par Shapiro <i>et al.</i> (1977).....	26
Tableau 3 : Milieu minimum utilisé pour la culture de <i>Deinococcus radiodurans</i> par Venkateswaran <i>et al.</i> (2000)	27
Tableau 4 : Milieu défini optimisé pour la culture de <i>Deinococcus radiodurans</i> par Holland <i>et al.</i> (2006)	28
Tableau 5 : Milieu de Degryse 162 (10 X) utilisé pour la culture de <i>Deinococcus geothermalis</i>	29
Tableau 6 : Milieu de Kongpol <i>et al.</i> (2008) utilisé pour la culture de <i>Deinococcus geothermalis</i>	30
Tableau 7 : Assimilation des sources carbonées par <i>Micrococcus radiodurans</i> , <i>Deinococcus radiodurans</i> R1 et <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 (++ : croissance ; + : faible croissance ; - : pas de croissance)	34
Tableau 8 : Récapitulatif des vitamines ajoutées aux milieux de culture définis pour la croissance des souches de déinocoques	37
Tableau 9 : Milieu minimum utilisé pour la culture de <i>Deinococcus radiodurans</i> par Venkateswaran <i>et al.</i> (2000) en présence d'une irradiation chronique.....	38
Tableau 10 : Besoins nutritionnels de la souche <i>Micrococcus lysodeiketicus</i>	39
Tableau 11 : Préparation d'un litre de milieu de culture DM.....	54
Tableau 12 : Préparation d'un litre de milieu de culture MCD	56
Tableau 13 : Préparation d'un litre de milieu de culture MM.....	57
Tableau 14 : Milieu de croissance de <i>Deinococcus radiodurans</i> décrit par Little and Hanawalt (1973)	58
Tableau 15 : Solutions de vitamines concentrées ajoutées au milieu DM.....	58
Tableau 16 : Solutions de vitamines concentrées ajoutées au milieu MM.....	59
Tableau 17 : Composition de la base saline du milieu pour les cultures discontinues alimentées.....	61
Tableau 18 : Composition de la solution saline d'alimentation.....	62
Tableau 19 : Variables disponibles en ligne et leurs unités	69
Tableau 20 : Analyse de la composition élémentaire en C.H.O.N.P.S. de la souche <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 cultivée en mode discontinu alimenté avec double substrat extrait de levure et glucose.....	75
Tableau 21 : Analyse de la composition élémentaire en C.H.O.N.P.S. de la souche <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 cultivée en mode discontinu alimenté avec double substrat extrait de levure et glucose.....	75
Tableau 22 : Decrease of the dissolved oxygen according to the concentration of yeast extract fraction pulses	113

Tableau 23 : Media formulation tested in baffled Erlenmeyer flasks	117
Tableau 24 : Number of generations and percentage of glucose uptake after 24 h and 48 h of growth of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300, DSM 11301 and DSM 11302 in DMG, CMG, TH162 medium and Holland medium.....	133
Tableau 25 : Effect of yeast extract concentration on the culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 in CMG.....	135
Tableau 26 : Effect of the strain preservation methods, the frozen storage period, the type of strain revivification and the variability between colony forming unit on Petri dishes on the culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 in CMG	136
Tableau 27 : Effect of the strain preservation methods, the frozen storage period, the type of strain revivification and the variability between colony forming unit on Petri dishes on the culture of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 in DMG	137
Tableau 28 : Effect of the inoculation size and the duration of incubation on the results of growth of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 in DMG	138
Tableau 29 : Effect of successive subcultures and cell washing steps before inoculation on the results of growth of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 in DMG.....	139
Tableau 30 : Concentrations ajoutées pour chacun des pulses de nutriments	152
Tableau 31 : Résultats de croissance de la souche <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 cultivée sur milieu défini supplémenté avec diverses sources soufrées.....	158
Tableau 32 : Résultats de croissance de la souche <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 cultivée sur milieu défini supplémenté avec divers facteurs de croissance.....	159
Tableau 33 : Résultats de croissance de la souche <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 cultivée sur milieu défini supplémenté avec diverses sources carbonées.....	159
Tableau 34 : Mass balance, carbon balance and yields for <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 fed-batch culture.....	178
Tableau 35 : Carbon substrate specific uptake rates during the three stages of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 culture.....	179

Introduction et contexte de l'étude

Introduction et contexte de l'étude

Les déinocoques sont des microorganismes polyextremophiles qui présentent des propriétés de survie exceptionnelles dans des conditions de vie extrêmes : radiations ionisantes, oxydation, rayons ultra-violets, sécheresse, froid, présence de solvants ou encore vide spatial. Ils ont été isolés dans des lieux très divers sur la planète tels que des échantillons de sol, de viande ou de poisson, des sources géothermales, sur des instruments chirurgicaux irradiés ou bien encore dans la stratosphère (Anderson *et al.* 1956; Kristensen and Christensen 2009; Lewis 1971; Oyaizu *et al.* 1987; Rainey *et al.* 2007; Väisänen *et al.* 1998). Les bactéries du genre *Deinococcus* sont capables de réparer leur matériel génétique endommagé en quelques heures seulement. Ce genre bactérien a donc principalement été étudié pour ses propriétés de réparation de l'ADN et de résistance aux conditions environnementales hostiles à la survie de la plupart des organismes. A ce jour seulement 1532 publications concernant le genre *Deinococcus* sont référencées, les mots clés « radiations » et « stress » étant associés au genre *Deinococcus* dans 50 % et 20 % des cas respectivement. Les travaux s'intéressant à la physiologie et au métabolisme des déinocoques restent peu nombreux : 13 publications contiennent les mots clés *Deinococcus* et « physiologie » et il n'y a que 7 publications qui concernent l'utilisation d'un milieu défini pour la croissance.

L'objectif principal de ce travail est donc de contribuer à une meilleure connaissance du comportement physiologique d'une espèce du genre *Deinococcus*, *Deinococcus geothermalis*, dans des conditions de culture parfaitement maîtrisées et reproductibles. Ces travaux de recherche s'inscrivent dans le projet collaboratif Deinol, projet d'Innovation Stratégique Industrielle qui bénéficie du partenariat de Deinove et Tereos et du soutien d'OSEO. Le projet Deinol est porté par le chef de file Deinove et ses partenaires sont BENP-Lillebonne, le Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologiques pour la Santé (de l'unité CNRS UMR 5236) et le Laboratoire d'Ingénieries des Systèmes Biologiques et des Procédés (de l'unité UMR INSA-CNRS 5504 et UMR INSA-INRA 792). Ce projet a pour objectif d'ouvrir la voie à la production industrielle d'éthanol de deuxième génération par les déinocoques, dans des installations industrielles existantes (Figure 1). Dans un contexte de raréfaction des énergies fossiles et de réduction des émissions de gaz à effet de serre, les besoins en bioénergies sont croissants. Les biocarburants constituent donc un enjeu majeur à l'échelle internationale. La production de bioéthanol repose sur les performances d'un procédé utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La principale limite de ce procédé est l'incapacité de la levure à résister à des températures élevées et à hydrolyser certains sucres complexes. Un des enjeux de la filière de production de bioéthanol de seconde génération est donc la digestion de la biomasse lignocellulosique préalable à l'étape de fermentation éthanolique. Le projet Deinol vise l'étude des potentialités fonctionnelles des déinocoques avec pour objectif principal de parvenir à isoler, caractériser et optimiser une souche de déinocoque performante pour l'hydrolyse des substrats et capable de produire de l'éthanol à partir d'une biomasse végétale industrielle. La souche sélectionnée pourrait alors intégrer le

procédé de production de bioéthanol à la place ou en complément des cocktails enzymatiques de déconstruction de la biomasse et de la souche *Saccharomyces cerevisiae*.

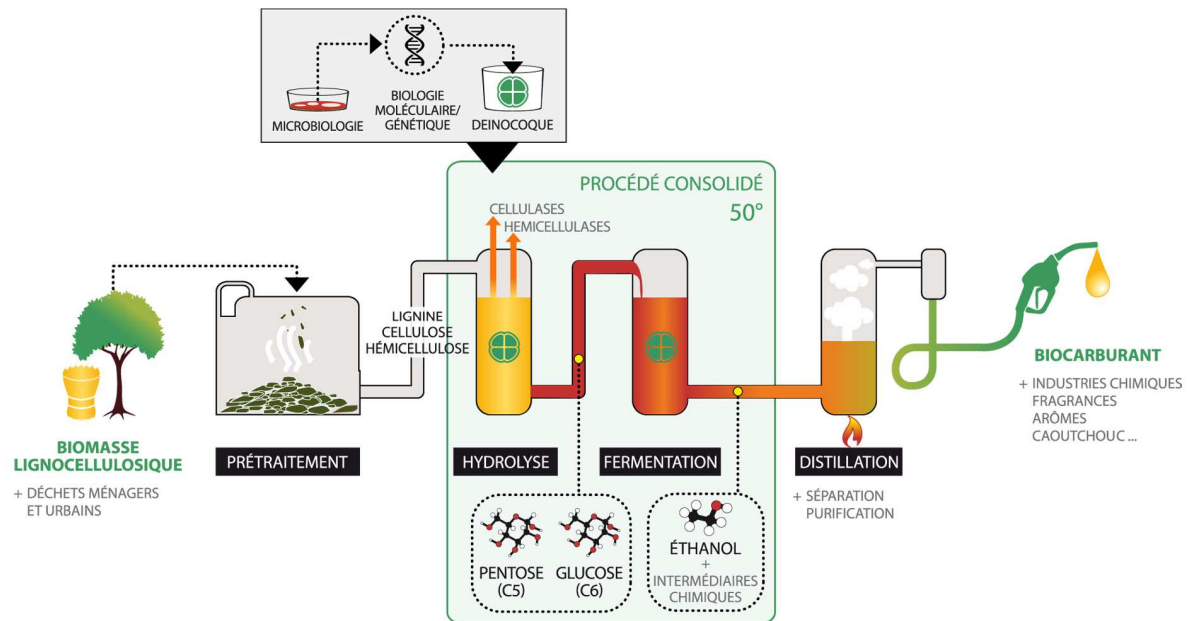


Figure 1 : Procédé de production de bioéthanol selon le projet Deinol
(source : <http://www.deinov.com/fr/programmes-et-applications/deinol>)

Le modèle d'étude choisi est l'espèce thermophile *Deinococcus geothermalis*.

Ce travail de recherche focalise donc sur l'étude et la quantification de la physiologie de deux souches de déinocoques thermophiles, *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, domaine peu exploré dans les travaux antérieurs. L'acquisition de nouvelles connaissances fondamentales sur les exigences nutritionnelles, le métabolisme et les dynamiques de croissance de *Deinococcus geothermalis* en conditions de cultures en bioréacteur, est indispensable à la maîtrise de son comportement pour des applications visées à terme dans le projet Deinol. L'utilisation de ces microorganismes comme modèles, souches publiques de collection, devrait ainsi permettre de transposer les connaissances établies sur les conditions de culture et de mise en œuvre en bioréacteur à d'autres déinocoques thermophiles.

La démarche expérimentale consiste en la caractérisation et la quantification du comportement microbien lors d'expérimentations réalisées en fioles Erlenmeyer et en bioréacteurs. Il est recherché, par des approches de génie nutritionnel, les étapes limitantes de la croissance pour déduire, par des approches de génie microbiologique, des stratégies de culture optimisant les performances de production de biomasse.

Ce manuscrit s'articule en quatre parties :

La première partie, l'état de l'Art, est une synthèse bibliographique des connaissances sur les bactéries du genre *Deinococcus*. Le premier paragraphe consiste en une description générale des bactéries du genre *Deinococcus* et de l'espèce thermophile *Deinococcus geothermalis*. Les mécanismes de protection et de réparation de l'ADN des déinocoques lorsqu'ils sont soumis à des conditions extrêmes sont ensuite détaillés. Un

troisième paragraphe fait état des applications potentielles des déinocoques. La majeure partie de cette synthèse bibliographique est consacrée à la description des travaux concernant les exigences nutritionnelles et le métabolisme de deux souches de déinocoques : *Deinococcus radiodurans* et *Deinococcus geothermalis*. Les déinocoques ayant été classés dans le genre *Micrococcus* lors de leur découverte, les besoins nutritionnels des microcoques sont abordés dans ce quatrième paragraphe. Enfin, les conditions de culture mises en œuvre pour la culture des bactéries du genre *Deinococcus* sont décrites.

La deuxième partie, matériel et méthodes, détaille les matériels et méthodes utilisés pour répondre aux objectifs du travail de thèse.

Les chapitres III à VI du manuscrit sont organisés en fonction des objectifs du travail de recherche, de la stratégie mise en place et des résultats obtenus :

- La priorité de ce travail de recherche est la définition de la composition d'un milieu minéral évitant toute limitation et inhibition de la croissance microbienne. A partir des données de la littérature, il s'agit dans un premier temps d'identifier les facteurs de croissance nécessitant un apport exogène (voies anaboliques incomplètes, exigences vitaminiques, etc.). Le premier chapitre de résultats consiste alors en une analyse statistique multifactorielle des compositions de milieux de culture décrits dans la littérature et mis en œuvre expérimentalement lors de cultures en fioles Erlenmeyer à 37 °C. Des pulses de solutions nutritives permettent l'étude des variations de la dynamique de croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 cultivé en milieu défini en bioréacteur à 45 °C ; le comportement de la souche en réponse à une perturbation de son environnement nutritionnel a été étudié par une approche adaptée de la respirométrie. Ce chapitre est rédigé sous forme d'un article scientifique publié dans le journal *Extremophiles*. De façon simultanée, la quantification du potentiel maximal de croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, en termes de taux de croissance et production de biomasse, est réalisée en bioréacteur sur milieu riche à 45 °C et à pH 6,8. La publication est complétée par ces résultats.

- Le deuxième chapitre est consacré à la comparaison des trois souches publiques de déinocoques thermophiles : *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, *Deinococcus geothermalis* DSM 11301 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302. La souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 est choisie pour ses capacités à produire plus de biomasse que les deux autres souches, en milieu défini ou complexe. L'influence des étapes de conservation de la souche, de remise en culture et de réalisation des précultures sur les performances de croissance en milieux complexe et défini est discutée dans ce chapitre. Ces résultats sont rédigés sous forme d'une publication soumise au journal *Extremophiles*. Le séquençage des souches *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 complète cette partie.

- Le troisième chapitre de résultats décrit la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 en conditions de culture parfaitement caractérisées en bioréacteur à 45 °C sur un milieu défini à pH 6,8. L'objectif est de caractériser et quantifier le comportement microbien de la souche d'intérêt. L'expérimentation est réalisée en bioréacteur parfaitement instrumenté, en conditions de culture maîtrisée avec un suivi de l'évolution des concentrations macroscopiques biologiques (substrats, biomasse,

métabolites liquides et gaz). Ces travaux permettent la détermination des cinétiques macroscopiques : vitesses nettes et spécifiques de production/consommation du substrat glucose, produits et co-produits et rendements de production de biomasse. L'influence de l'ajout de sources carbonées, de sources soufrées, de facteurs de croissance, de vitamines, de bases azotées et de sels sur la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 est aussi décrite.

- Le dernier chapitre de résultats concerne l'étude de la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 en bioréacteur à 45 °C et pH 6,8, en mode discontinu alimenté avec un apport double substrat extrait de levure et glucose. Il s'avère en effet que le milieu défini ne permet pas d'assurer une croissance non limitée de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302. La mise en place d'une conduite adaptée avec pour objectif de contrôler la croissance du microorganisme est décrite dans ce chapitre. Ce travail expérimental permet la quantification des performances de production du microorganisme et du devenir du carbone et de l'azote organique ou minéral apporté au milieu de culture. Ce chapitre est rédigé sous forme d'un article scientifique publié dans le journal *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Enfin, la dernière partie de ce mémoire consiste en une discussion générale de l'ensemble des résultats rapportés dans ce document et reprend les principales conclusions de ce travail pour répondre aux questionnements scientifiques. Ce chapitre se conclue des perspectives argumentées des observations et résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche.

Chapitre I. Etat de l'Art

Chapitre I. Etat de l'Art

I.1 Description générale des bactéries du genre <i>Deinococcus</i>	11
I.1.1 Les origines	11
I.1.2 Phylogénie et évolution.....	12
I.1.3 Ecologie/Biotope.....	12
I.1.4 Caractéristiques morphologiques et structure cellulaire.....	12
I.1.5 Génome	15
I.1.6 <i>Deinococcus geothermalis</i>	15
I.2 Résistance aux dommages à l'ADN et mécanismes de réparation de l'ADN	16
I.2.1 Résistance aux dommages à l'ADN	16
I.2.2 Résistance aux radiations ionisantes.....	16
I.2.3 Résistance aux UV	18
I.2.4 Résistance au stress oxydatif	19
I.2.5 Résistance à la dessiccation.....	20
I.2.6 Résistance à d'autres conditions extrêmes	20
I.2.7 Mécanismes de réparation de l'ADN.....	21
I.3 Applications : Production de molécules d'intérêt – Bioremédiation.....	23
I.4 Exigences nutritionnelles et métabolisme des déinocoques	24
I.4.1 Besoins nutritionnels	25
I.4.2 Métabolisme carboné	30
I.4.3 Métabolisme azoté	36
I.4.4 Vitamines.....	36
I.4.5 Facteurs qui améliorent la croissance.....	37
A - Acides aminés.....	37
B - Sources complexes	38
I.4.6 Exigences nutritionnelles des microcoques	39
I.5 Cultures : Mise en œuvre et cinétiques.....	40
I.5.1 Conservation des souches et préparation de l'inoculum	40
I.5.2 Les différents modes de culture.....	40
I.5.3 Respirométrie.....	41
I.5.4 Croissance de <i>Deinococcus radiodurans</i> en bioréacteur	41
I.5.5 Influence des paramètres opératoires	43
I.6 Conclusions.....	44

Chapitre I. Etat de l'Art

Les déinocoques sont des microorganismes atypiques, très résistants, retrouvés dans des environnements variés. De nombreuses études se sont consacrées et se consacrent encore à leurs mécanismes de protection et/ou de réparation de leur matériel génétique suite à des expositions à des conditions hostiles. Cependant, peu de travaux se sont intéressés à l'étude de leur physiologie et de leur métabolisme. Une meilleure compréhension de ce métabolisme pourrait permettre d'exploiter les propriétés fonctionnelles des déinocoques pour la production de molécules d'intérêt ou pour d'autres procédés.

Ce premier chapitre présente l'état de l'Art qui concerne notre domaine d'étude. La première partie est une description générale des bactéries appartenant au genre *Deinococcus* et de la principale souche thermophile du genre, *Deinococcus geothermalis*. La partie suivante est consacrée aux mécanismes de résistance aux conditions environnementales extrêmes ainsi qu'aux mécanismes de réparation de l'ADN. Les applications potentielles liées à l'utilisation de ces microorganismes sont résumées dans la troisième partie de cet état de l'Art. Puis, dans la quatrième partie, les besoins nutritionnels des déinocoques et les connaissances sur leur métabolisme sont identifiés. Enfin, la dernière partie se focalise sur la mise en œuvre et les performances des procédés pour l'étude des besoins nutritionnels des microorganismes. La seule étude consacrée à la production d'un déinocoque à l'échelle fermenteur est décrite dans cette dernière partie.

I.1 Description générale des bactéries du genre *Deinococcus*

I.1.1 Les origines

Le genre *Deinococcus* appartient à l'ordre des *Deinococcales*, de la famille *Deinococcus-Thermus*. La bactérie *Deinococcus radiodurans* R1 est le premier déinocoque découvert. Elle a été isolée pour la première fois en 1956 par Arthur W. Anderson dans l'Oregon, lors d'expériences de stérilisation de conserves de viande par rayonnement gamma (Anderson *et al.* 1956). Des échantillons de viande soumis à de fortes doses de radiations (3.10^6 röntgen equivalent physical (rep)) censées être létales pour tout microorganisme ne se conservaient pas malgré le traitement radioactif ; un coque formant des colonies roses a été isolé de ces échantillons. A cause de son extrême résistance au rayonnement, cette bactérie fut d'abord nommée *Micrococcus radiodurans* avant d'être renommée *Deinococcus radiodurans*.

I.1.2 Phylogénie et évolution

Du fait de leur grande similitude avec les bactéries du genre *Micrococcus*, les *Deinococcaceae* ont tout d'abord été classés dans le genre *Micrococcus* avant que cette classification ne soit remise en cause par des études taxonomiques (Brooks and Murray 1981; Cox and Battista 2005). En effet, bien que *Micrococcus radiodurans* et les souches radio-résistantes apparentées présentent des caractéristiques phénotypiques similaires à celles des bactéries du genre *Micrococcus*, des différences au niveau de la structure et de la composition de leur paroi ont été mises en évidence. Les analyses d'homologie génétique (ADN et ARN 16S) ont confirmé que les microcoques radio-résistants devaient être classés dans un nouveau groupe ; ce nouveau genre a été nommé *Deinococcus*, le préfixe grec *deinos* signifiant étrange, inhabituel (Brooks *et al.* 1980). Les espèces appartenant au genre *Deinococcus* forment une lignée phylogénique distincte, étroitement liée au genre *Thermus*. D'après les séquences d'ARN 16S, il a été proposé que le genre *Deinococcus* et le genre *Thermus* forment un seul phylum parmi les Eubactéries (Hensel *et al.* 1986; Rainey *et al.* 1997; Weisburg *et al.* 1989).

I.1.3 Ecologie/Biotope

Les bactéries du genre *Deinococcus* sont ubiquitaires. En effet, elles sont retrouvées dans des biotopes variés sur la planète ; des déinocoques ont été isolés dans des environnements riches en matières nutritives tels que les matières fécales animales (Oyaizu *et al.* 1987), le sol, de la viande (Anderson *et al.* 1956), du poisson (Lewis 1971; Shashidhar and Bandekar 2009) et dans des endroits beaucoup plus hostiles et pauvres d'un point de vue nutritionnel : sable du désert (de Groot *et al.* 2005; Rainey *et al.* 2007; Rainey *et al.* 2005; Yuan *et al.* 2009), sources géothermales (Bouraoui *et al.* 2012; Ferreira *et al.* 1997), sol et roche de l'Antarctique (Hirsch *et al.* 2004), poussières collectées dans l'atmosphère (Yang *et al.* 2009) et la stratosphère (Yang *et al.* 2010), aliments déshydratés, textiles (Kristensen and Christensen 2009) et matériel médical (Christensen *et al.* 1991).

I.1.4 Caractéristiques morphologiques et structure cellulaire

Les déinocoques forment un genre de bactéries non sporulantes, immobiles, généralement positives au test de Gram, qui se développent en aérobiose et forment sur milieu riche solide des colonies rondes, brillantes et pigmentées rose orangées (Holt and Bergey 1994). Les bactéries du genre *Deinococcus* sont des coques de 1,5 à 3 µm de diamètre. Une observation microscopique de déinocoques cultivés dans un milieu riche est présentée sur la Figure 2.

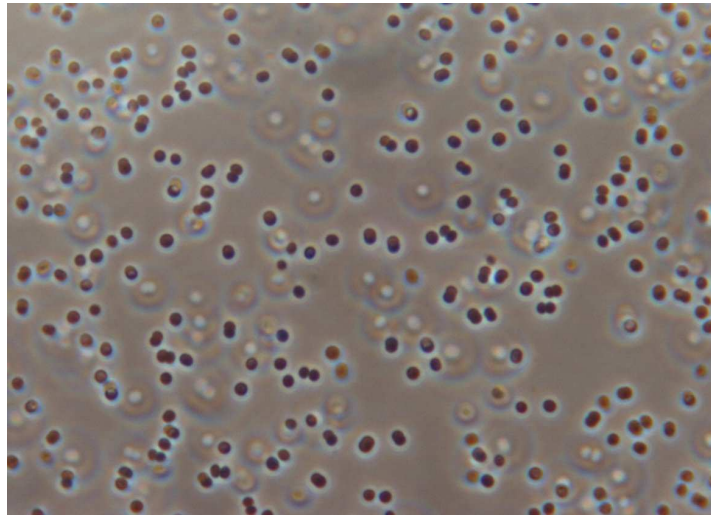


Figure 2 : Observation microscopique (x 1000) d'une souche de déinocoques cultivée en milieu riche

Dans le milieu riche utilisé par Anderson, les déinocoques ont été retrouvés majoritairement groupés par paires (Anderson *et al.* 1956) tandis que dans le milieu cœur-infusion de Difco, les cellules en phase exponentielle se développent sous forme de tétrades (Thornley *et al.* 1965). Les déinocoques se divisent de façon synchrone sur deux plans formant ainsi des tétrades (Figure 3). En milieu complexe, au début de leur croissance les déinocoques sont retrouvés sous forme de deux cellules accolées puis généralement au cours de la multiplication les tétrades se forment (Murray *et al.* 1983). Ces observations ont été rapportées également par les travaux de Daly et de ses collaborateurs (Daly *et al.* 2004). De plus, une fraction de la population microbienne peut être retrouvée sous forme de groupements de cellules, majoritairement en amas de seize cellules c'est-à-dire un regroupement de quatre tétrades (Jena *et al.* 2006) ; la culture sous la forme diplocoques, tétrades ou plus est dépendante des conditions de croissance. En 2009, l'hypothèse de l'influence de l'environnement nutritionnel sur le pléomorphisme et le regroupement des cellules de déinocoques a été confirmée (Joshi and Toleti 2009). Enfin, dans un milieu défini, les déinocoques sont majoritairement sous forme de diplocoques (Venkateswaran *et al.* 2000).

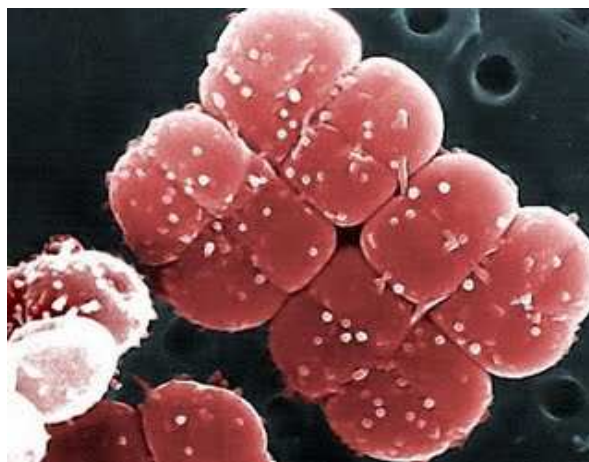


Figure 3 : Tétrades de déinocoques formées par division cellulaire
(source : http://catalogue-of-organisms.blogspot.com/2009_02_01_archive.html)

Bien qu'ils soient Gram positif, les déinocoques possèdent une enveloppe cellulaire complexe dont la structure se rapproche de celle des bactéries Gram négatif.

La paroi des bactéries Gram négatif est formée d'une membrane plasmique contenant des phospholipides et des protéines, d'un espace périplasmique, d'une fine couche de peptidoglycane et d'une membrane externe. Cette membrane externe est elle aussi constituée de phospholipides organisés en bicouches et de protéines intrinsèques, mais elle possède également des lipopolysaccharides (LPS). Les bactéries Gram positif possèdent généralement une membrane plasmique, un espace périplasmique plus mince que celui des bactéries Gram négatif et une paroi épaisse composée de peptidoglycane et d'acides techoïques. Chez la plupart des bactéries le peptidoglycane est formé de N-acétyl-glucosamine (NAG) et d'acide N-acétyl-muramique (NAM).

L'enveloppe cellulaire de *Deinococcus radiodurans* est constituée de quatre à cinq couches minimum (Thornley *et al.* 1965) : la membrane la plus interne est la membrane plasmique, puis il y a une couche interne de peptidoglycane qui présente des pores dont la fonction n'a pas encore été identifiée. La troisième est une couche intermédiaire divisée en de nombreux compartiments et donc appelée couche compartimentée. Les déinocoques possèdent ensuite une membrane dont la structure est proche de la membrane plasmique interne, puis une cinquième couche composée de sous-unités protéiques organisées de façon hexagonale. Enfin, certaines souches de déinocoques possèdent une couche supplémentaire composée d'hydrates de carbone qui forme la membrane la plus externe (Work and Griffiths 1968). Cette structure complexe a une épaisseur comprise entre 130 et 150 nm (Brooks and Murray 1981; Lancy and Murray 1978).

En plus de la L-alanine et de l'acide D-glutamique, l'acide aminé majoritaire du peptidoglycane de cette enveloppe est la L-ornithine (Work 1964), acide aminé peu répandu dans les membranes cellulaires bactériennes. Il remplace la lysine et l'acide diamino-pimélique qui sont classiquement retrouvés. Les acides techoïques sont absents de la structure pariétale de *Deinococcus radiodurans* (Brooks and Murray 1981) ; les membranes de phospholipides possèdent des lipides polaires atypiques, différents de la phosphatidylcholine, la phosphatidylethanolamine et la phosphatidylsérine couramment retrouvés (Thompson *et al.* 1980). Le palmitoléate est l'acide gras majoritaire des couches lipidiques. Il a été mis en évidence des acides gras saturés et insaturés avec un nombre impair d'atomes de carbone (C15 et C17), jusqu'à 18 % d'acide heptadécénoïque ce qui est rare pour un microorganisme (Embley *et al.* 1987; Knivett *et al.* 1965), tandis que la membrane externe ne contient pas de lipides A. Les polysaccharides isolés à partir de cette membrane externe sont composés majoritairement de rhamnose et de mannose (Work and Griffiths 1968).

Les bactéries du genre *Thermus* présentent des parois de structure comparable à celle des bactéries du genre *Deinococcus* (Hensel *et al.* 1986), avec des acides gras ramifiés et de l'ornithine dans le peptidoglycane. Ces observations confirment la proximité phylogénique entre ces deux genres bactériens.

I.1.5 Génome

En 1999, le génome de la souche mésophile *Deinococcus radiodurans* a été séquencé et annoté (White *et al.* 1999) ; elle possède deux chromosomes circulaires, un de 2648615 paires de bases et un autre de 412340 paires de bases (DR412), un mégaplasmide de 177466 paires de base (DR177) et un plasmide de 45702 paires de base (Makarova *et al.* 2001; White *et al.* 1999). Le taux de GC s'élève à 67 % et chaque cellule contient de 9.10^9 à $2,2.10^{10}$ daltons d'ADN (Hansen 1978). *Deinococcus radiodurans* possède plusieurs copies de son génome. Les cellules en phase exponentielle de croissance peuvent contenir jusqu'à dix copies du génome tandis que les cellules en phase stationnaire en contiennent quatre copies (Hansen 1978; Harsojo *et al.* 1981). Les résultats de Harsojo ont néanmoins démontré qu'il n'y avait aucune corrélation entre le nombre de copies du génome par cellule et la radio-résistance.

La souche thermophile *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 a été séquencée en 2007 (Makarova *et al.* 2007). Elle possède un chromosome circulaire de 2467205 paires de bases et deux mégaplasmides de 574127 paires de bases (DG574) et 205686 paires de bases (DG206).

I.1.6 *Deinococcus geothermalis*

Deinococcus geothermalis est la principale souche thermophile du genre *Deinococcus*. C'est un coque de 1,5 à 2 μm de diamètre qui produit un pigment rose orangé ; au cours de sa croissance il peut être retrouvé sous forme isolée ou regroupé en diplocoques et tétrades. *D. geothermalis* a été isolé pour la première fois en 1997 par Ferreira et ses collaborateurs dans des sources géothermales près de Naples en Italie et à São Pedro do Sul au Portugal (Ferreira *et al.* 1997). Trois souches de *D. geothermalis* ont été isolées et déposées à la collection de microorganismes DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) : *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, *Deinococcus geothermalis* DSM 11301 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302.

Les souches de *D. geothermalis* sont des souches modérément thermophiles dont la température optimale de croissance est comprise entre 45 °C et 50 °C. De plus ces souches tolèrent une large gamme de pH ; en effet, elles sont capables de croître pour des pH compris entre 4,5 et 8,5 avec un optimum à 6,5 (Ferreira *et al.* 1997). Elles possèdent des membranes cellulaires atypiques comparables à celles décrites chez *Deinococcus radiodurans*.

La souche de collection *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 s'est avérée moins résistante aux radiations ionisantes que *Deinococcus radiodurans*. Une dose de 1400 Gy suffit à diminuer de 90 % le nombre de cellules viables (Ferreira *et al.* 1997).

Les outils de génie génétique développés pour *Deinococcus radiodurans* sont efficaces pour transformer *Deinococcus geothermalis* (Daly *et al.* 1994). De ce fait l'utilisation de la principale souche thermophile de

déinocoques est envisageable pour la dépollution de sites radioactifs ou pollués dont la température est élevée (cf. § I.3 Applications).

Deinococcus geothermalis a été identifié dans des biofilms colorés formés sur des machines, sur des surfaces en acier inoxydable et dans l'eau (Kolari *et al.* 2003; Peltola *et al.* 2011; Peltola *et al.* 2008; Saarimaa *et al.* 2006; Väisänen *et al.* 1998). En effet, il peut former des biofilms sur des surfaces abiotiques telles que les machines à imprimer ; la formation de ces biofilms sur les équipements des industries du papier pose de nombreux problèmes.

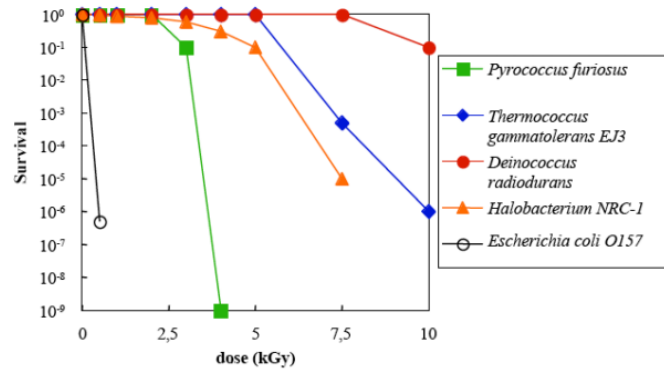
I.2 Résistance aux dommages à l'ADN et mécanismes de réparation de l'ADN

I.2.1 Résistance aux dommages à l'ADN

Les bactéries du genre *Deinococcus* sont polyextrémophiles ; elles sont connues pour leurs capacités exceptionnelles de résistance et de survie à des conditions extrêmes telles que les radiations ionisantes (Anderson *et al.* 1956), les températures extrêmes, la déshydratation ou encore l'exposition à des solvants (Kongpol *et al.* 2008).

I.2.2 Résistance aux radiations ionisantes

D. radiodurans peut supporter une irradiation aiguë ponctuelle de 17500 Gy de radiations gamma (Daly *et al.* 1994) et survivre à une irradiation chronique de 60 Gy par heure (Lange *et al.* 1998) ; pour tuer 90 % des cellules, il faut appliquer une irradiation minimum de 10000 Gy, dose 100 fois supérieure à celle que peuvent supporter la plupart des bactéries et 2000 fois supérieure à celle que peut supporter l'homme (Cox and Battista 2005). Une dose aiguë de 5000 Gy peut provoquer jusqu'à 200 cassures double-brin de l'ADN, 3000 cassures simple-brin et plus de 1000 bases abimées par génome (Confalonieri and Sommer 2011) ; cette résistance est extraordinaire, la plupart des microorganismes ne survivant pas à plus de deux ou trois cassures (Figure 4). La dose de radiations gamma suffisante pour inactiver une unité formant colonie de *Deinococcus radiodurans* R1 est de 6000 Gy, valeur 200 fois supérieure à la dose nécessaire pour obtenir le même résultat avec *Escherichia coli*.

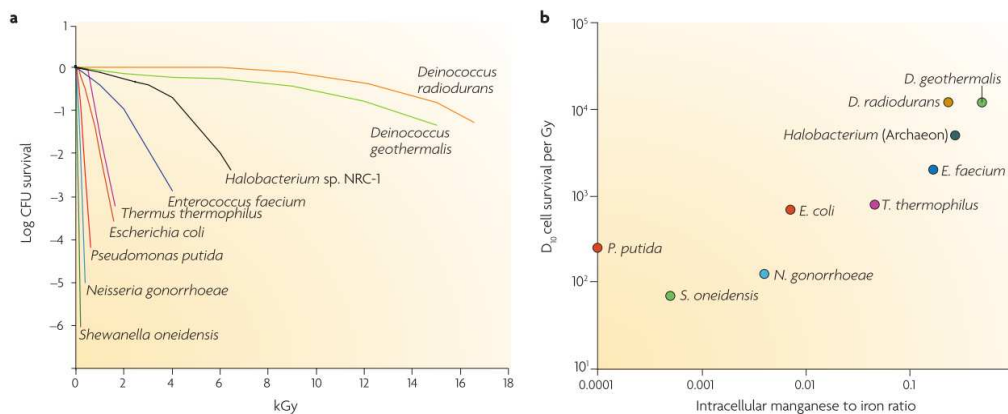


Survival curves for *Pyrococcus furiosus*, *T. gammatolerans*, *D. radiodurans*, *Halobacterium* and *E. coli*, following exposure to γ radiation

Figure 4 : Courbes de survie de *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus gammatolerans*, *Halobacterium*, *Escherichia coli* et *Deinococcus radiodurans* soumis à des radiations gamma (source : Confalonieri and Sommer 2011)

Les radiations ionisantes sont responsables de la formation de multiples espèces réactives oxygénées (ROS, Reactive Oxygen Species en anglais), dont le radical $\text{OH}\cdot$ libéré par l'ionisation des molécules d'eau. Ce sont ces radicaux libérés qui causent les dégâts cellulaires que sont les cassures des molécules d'ADN et l'oxydation des macromolécules (protéines).

La Figure 5 présente les courbes de survie de neuf microorganismes, dont deux déinocoques, aux radiations ionisantes et la relation entre le ratio intracellulaire Mn/Fe et la survie de ces mêmes cellules.



Relationship between survival following exposure to ionizing radiation and intracellular manganese and iron contents. a | Ionizing radiation (IR) survival curves for whole-genome sequenced strains that encode a similar repertoire of DNA-repair proteins^{8,16,38}. Standard growth, irradiation (^{60}Co at 0 °C) and recovery conditions were used¹⁶. **b** | Intracellular manganese to iron concentration ratios. For cells cultured under standard growth conditions, total manganese and iron contents were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry¹⁶. D_{10} represents the IR dose that reduces the number of viable cells by 90%. Other manganese to iron ratios and D_{10} survival values reported recently for novel IR-resistant desert bacteria³² include *Deinococcus radiodurans* 7b-1 (D_{10} = 13 kGy; manganese:iron = 0.14), *Deinococcus* sp. 1A1 (D_{10} = 17 kGy; manganese:iron = 0.15), *Deinococcus* sp. 5A5 (D_{10} = 15 kGy; manganese:iron = 0.38), *Deinococcus* sp. 1A6 (D_{10} = 7 kGy; manganese:iron = 0.15), *Deinococcus* sp. 3B1 (D_{10} = 10.5 kGy; manganese:iron = 0.12), alphaproteobacterium 4A4 (D_{10} = 1.5 kGy; manganese:iron = 0.07) and alphaproteobacterium 4A6 (D_{10} = 1.5 kGy; manganese:iron = 0.15). We did not investigate the distribution of manganese or iron in the desert strains, nor did we evaluate the extent of cell grouping before irradiation, which can significantly increase D_{10} survival values based on colony forming unit (CFU) assays^{16,22}. Part **b** is modified, with permission, from Ref. 81 © (2006) Elsevier science.

Figure 5 : Relation entre la survie à une exposition aux radiations ionisantes et les concentrations intracellulaires en fer et manganèse (source : Daly 2009)

Le manganèse et le fer semblent intervenir dans les mécanismes de résistance aux radiations ionisantes : il a été observé une accumulation intracellulaire de Mn par *Deinococcus radiodurans* soumis à des radiations (Daly *et al.* 2004 ; Daly *et al.* 2010) ; une concentration élevée en Mn couplée à un faible taux de fer est corrélée à la radiorésistance des microorganismes. Les déinocoques radio-résistants présentent un ratio Mn/Fe supérieur à 0,24, l'équilibre entre ces deux ions étant fondamental (Chou and Tan 1991). Ce couplage Mn/Fe protégerait les cellules des stress liés aux ROS. Les résultats ayant conduit à cette hypothèse sont détaillés dans le paragraphe sur la résistance au stress oxydatif.

Des gènes codant pour la synthèse d'enzymes Nitric Oxyde Synthases (NOSs) ont été identifiés chez *Deinococcus radiodurans* (Adak *et al.* 2002; Reece *et al.* 2009). Les NOSs sont des enzymes qui catalysent l'oxydation de la L-arginine en oxyde nitrique (NO) et en citrulline. Crane a mis en évidence l'implication de l'oxyde nitrique produit par ces enzymes NOSs dans les mécanismes de réparation des dommages causés par les rayons ultra-violets (UV) chez *D. radiodurans* (Crane 2008) : des souches dont les gènes codant pour les NOSs ont été délétés sont davantage sensibles aux radiations que les souches sauvages. De plus, en présence de NO exogène, les souches mutantes récupèrent leurs propriétés de résistance aux radiations (Patel *et al.* 2009).

Les mécanismes de résistance aux radiations ionisantes demeurent un des principaux sujets de recherche concernant les déinocoques. Plusieurs hypothèses ont été avancées : la transmission génétique de mécanismes de réparation de l'ADN très efficaces depuis des générations, des phénomènes d'évolution ou de transfert horizontal de gènes liés à la radiation-résistance, ou encore des mécanismes d'adaptation résultats de pressions de sélection abiotiques rencontrées dans leur environnement. Cette dernière hypothèse est la plus probable et de ce fait la résistance aux radiations ionisantes serait liée à plusieurs mécanismes de résistance aux conditions environnementales défavorables (Cox and Battista 2005).

I.2.3 Résistance aux UV

Deinococcus radiodurans présente également des capacités de résistance aux rayons ultra-violets (UV). Il peut être exposé à une dose de 500 J.m⁻² sans que cela ne lui soit létal malgré la formation de dimères de thymine (Battista 1997; Minton 1994). Bien que *D. radiodurans* ne possède pas de photolyase (Makarova *et al.* 2001), des mécanismes efficaces de réparation par excision de nucléotides ou action d'une endonucléase (Blasius *et al.* 2008) sont présents.

Le manganèse intervient à nouveau dans les mécanismes de résistance face aux UV. En effet, *Deinococcus radiodurans* cultivé en milieu défini contient jusqu'à 100 fois plus de Mn que *Escherichia coli*. De plus, la diminution de la concentration en ions manganèse dans le milieu de culture résulte en une augmentation de la sensibilité de *D. radiodurans* aux UV (Leibowitz *et al.* 1976). Ce résultat est lié à une relation inversement proportionnelle entre la concentration intracellulaire en manganèse et la formation de dimères de thymine qui endommagent l'ADN. Pour se protéger des dommages liés aux stress

environnementaux, *D. radiodurans* est donc capable d'accumuler le manganèse présent dans le milieu de culture.

La souche thermophile *Deinococcus geothermalis* peut également survivre et réparer son génome même après avoir été exposé à des très forts niveaux de radiations (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997).

I.2.4 Résistance au stress oxydatif

Les radiations ionisantes sont responsables de plusieurs altérations cellulaires : elles provoquent des cassures dans le génome bactérien mais elles génèrent aussi la formation d'espèces réactives oxygénées ROS. Les ROS oxydent les protéines cellulaires, dont celles impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN, qui perdent alors leurs propriétés fonctionnelles ; cela ralentit le processus de réparation du matériel génétique endommagé (Shuryak and Brenner 2010; Shuryak and Brenner 2009). *Deinococcus radiodurans* possède donc plusieurs mécanismes de défense face aux stress oxydatifs afin de piéger les ROS ainsi formées.

Le génome de *Deinococcus radiodurans* code pour deux types de catalase et deux types de superoxyde dismutase (SOD) (Battista *et al.* 2000), enzymes capables d'éliminer les molécules oxydantes telles que les radicaux libres oxygénés et le peroxyde d'hydrogène. L'activité catalase est 18 fois plus importante chez *D. radiodurans* que chez *Escherichia coli* (Tian *et al.* 2004).

D'autres molécules, non enzymatiques, ont été mises en évidence chez *Deinococcus radiodurans* pour leurs propriétés anti-oxydantes.

Les *Deinococcaceae* sont caractérisés par la présence de pigments de nature caroténoïde qui leur donnent une couleur rose orangée caractéristique (Brooks and Murray 1981), la déinoxanthine étant majoritaire (Lemee *et al.* 1997). La déinoxanthine, ou (2R)-2,1'-dihydroxy-3',4'-didéhydro-1',2'-dihydro- β,ψ -caroten-4-one, est une molécule qui possède des propriétés anti-oxydantes en piégeant les ROS. Elle joue un rôle essentiel en protégeant la cellule et les protéines contre les UV et autres stress oxydatifs (Sun *et al.* 2009). Elle semble donc contribuer à la résistance des déinocoques aux stress environnementaux (Tian *et al.* 2009) et aux lésions de l'ADN. Une souche mutante de *Deinococcus radiodurans* non pigmentée s'est révélée plus sensible aux dommages causés par le peroxyde d'hydrogène que d'autres souches qui avaient conservé leur pigmentation liée à la synthèse de caroténoïdes (Carbonneau *et al.* 1989). De plus, des souches mutantes de *D. radiodurans* déficientes dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes sont plus sensibles que les souches sauvages aux ROS ainsi qu'aux radiations et à la dessiccation (Tian *et al.* 2007). La déinoxanthine s'est montrée plus performante pour lutter contre les espèces réactives oxygénées que la plupart des autres caroténoïdes tels que le lycopène, le β -carotène, la zéaxanthine et la lutéine (Tian *et al.* 2007). A une concentration de 0,125 mM, elle élimine 70 % du peroxyde d'hydrogène tandis qu'une concentration égale à 0,0625 mM est suffisante pour éliminer 99 % de l'oxygène singulet présent dans son environnement.

Le manganèse semble également être essentiel dans la résistance des déinocoques face à l'oxydation. En effet, il a été montré qu'une concentration intracellulaire élevée en manganèse protège les protéines des dommages causés par le stress oxydatif (Daly *et al.* 2004 ; Sun *et al.* 2010) et est donc liée à une augmentation de la résistance microbienne. Les travaux de Daly ont même montré que l'homéostasie Mn/Fe joue un rôle prépondérant sur ces propriétés de lutte contre le stress oxydatif et les dommages liés aux radiations. Par exemple, *D. radiodurans* accumule 157 fois plus de manganèse et 3,3 fois moins de fer que la souche radio-sensible *Shewanella oneidensis* (Figure 5). Le manganèse peut exister sous forme complexée dans la cellule (Daly *et al.* 2010) ou agir en tant que cofacteur de l'enzyme Mn-SOD. Il a été montré que 40 % du Mn intracellulaire de *Deinococcus radiodurans* peut se retrouver lié à l'enzyme Mn-SOD (Tabares and Un 2013).

De plus, l'ajout de 2,5 μM de manganèse Mn(II) à des cellules de *Deinococcus radiodurans* R1 en début de phase stationnaire permet de relancer de nouveaux cycles de division cellulaire qui forment des cellules filles dont les activités catalase et SOD sont amplifiées. Cependant, les cellules filles formées par ces nouveaux cycles de division sont plus petites et plus sensibles aux radiations (Chou and Tan 1990). Ces résultats se sont donc révélés en contradiction avec les données selon lesquelles l'activité SOD permettrait d'augmenter la radiorésistance des microorganismes.

I.2.5 Résistance à la dessiccation

Deinococcus radiodurans a été retrouvé dans des environnements très secs tels que de la nourriture lyophilisée, des sols ou des déserts. Même après avoir subi une déshydratation prolongée et presque totale, il est capable de réparer son matériel génétique endommagé. Après deux ans dans un dessiccateur avec un taux d'humidité inférieur à 5 %, le taux de survie de *D. radiodurans* est de 85 %. Des travaux menés par Mattimore et Battista en 1996 ont même suggéré un lien entre la résistance à la dessiccation et la résistance aux radiations ionisantes. Quand les souches de déinocoques sont génétiquement modifiées pour perdre leur radiorésistance, elles deviennent aussi sensibles à la dessiccation (Mattimore and Battista 1996).

I.2.6 Résistance à d'autres conditions extrêmes

Certains déinocoques ont été isolés à partir d'échantillons de sol et de roches en Antarctique. De ce fait, malgré des températures optimales de croissance comprises entre 9 °C et 16 °C, ils sont capables de croître à des températures pouvant atteindre 0,5 °C (Hirsch *et al.* 2004).

Deinococcus radiodurans est capable de survivre à des températures extrêmes, jusqu'à 60 °C en conditions humides et jusqu'à 80 °C en conditions sèches. Il tolère mieux un stress thermique lorsqu'il a subi une étape de séchage plutôt qu'une conservation en suspension dans un environnement liquide. La principale hypothèse de cette résistance est la capacité que possède *D. radiodurans* à protéger sa membrane plasmique de la déshydratation et des dommages conséquents aux températures élevées (Bauermeister *et al.* 2012).

Cependant, les études menées par Shapiro et ses collaborateurs ont mis en évidence une faible tolérance de *Micrococcus radiodurans* pour la salinité ; en effet aucune croissance n'est observée dans un milieu contenant 0,5 % de NaCl (Shapiro *et al.* 1977). *Deinococcus geothermalis* présente une meilleure résistance à la salinité que *D. radiodurans* : en effet, il est capable de croître en présence de 1 % de NaCl mais pas en présence de 2 % (Ferreira *et al.* 1997).

La robustesse des déinocoques face à ces nombreux stress environnementaux résulte principalement de leurs propriétés exceptionnelles de prévention des dégâts cellulaires causés par les radicaux libres oxygénés, liées à un mécanisme efficace de réparation de l'ADN endommagé (Krisiko and Radman 2013).

I.2.7 Mécanisme de réparation de l'ADN

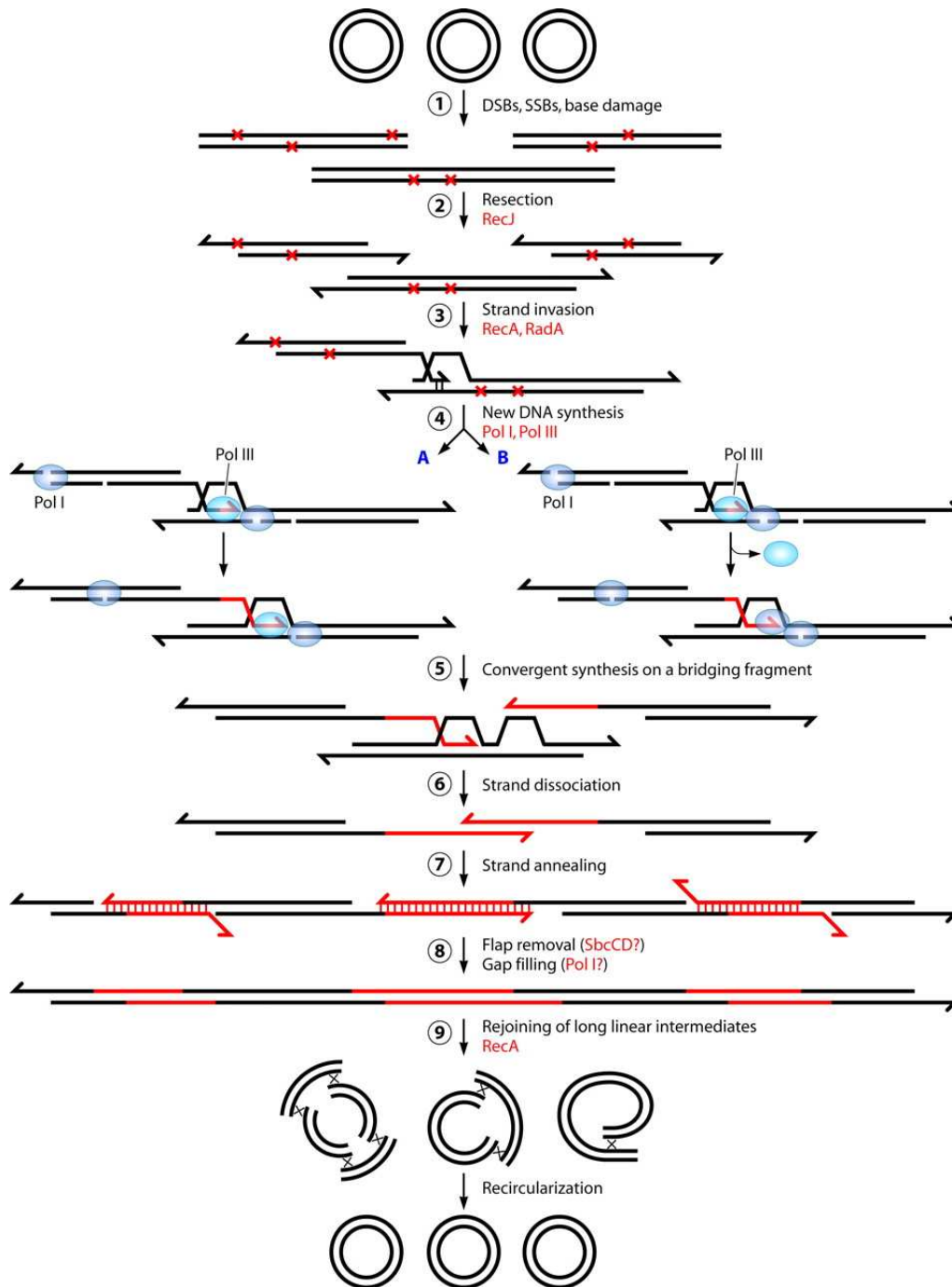
La bactérie *Deinococcus radiodurans* est donc principalement connue pour sa capacité exceptionnelle à résister aux effets mutagènes et létaux des agents qui endommagent l'ADN. Cette résistance est due à un système perfectionné de protection et de réparation de son ADN (Blasius *et al.* 2008).

Sous l'effet de conditions extrêmes, l'ADN peut être éclaté en plusieurs centaines de fragments. Les radiations ionisantes entraînent de nombreuses cassures simple-brin et double-brin et la formation de radicaux libres. Pourtant, les bactéries du genre *Deinococcus* sont capables de reconstituer leur patrimoine génétique en quelques heures seulement, sans perte de viabilité et sans mise en évidence de mutations.

Lorsque l'ADN de la bactérie est altéré par des conditions extrêmes, il est brisé en centaines de fragments ; les produits de dégradation trop endommagés sont exportés dans le cytoplasme tandis que les fragments réparables sont restructurés. Cette réparation comprend plusieurs étapes (Figure 6) :

- les extrémités 3' de chaque fragment sont transformées en extrémités simple-brin sous l'action de nucléases ;
- les protéines RecA et RadA permettent l'appariement des extrémités 3' simple-brin avec leur séquence complémentaire trouvée sur une copie du matériel génétique conservée par la bactérie ;
- les fragments formés se rassemblent en une chaîne linéaire pour initier la synthèse d'ADN. L'ADN complémentaire est alors synthétisé par les polymérases PolIII et PolII.
- les divers fragments ainsi obtenus s'assemblent pour former des fragments plus longs d'ADN double brin et enfin les chromosomes circulaires se reforment par recombinaison homologue dépendante d'une protéine, la protéine RecA.

Les mécanismes de réparation mis en jeu entraînent donc la production de nombreux déchets qui doivent être éliminés afin d'éviter leur incorporation dans le génome.



Two-step mechanism of DNA repair in *D. radiodurans* shattered by ionizing radiation. Several genomic copies of *D. radiodurans* undergo random DNA double-strand breakage, producing numerous fragments (step 1). The fragmented DNA is resected in a 5'-to-3' direction, presumably by *RecJ*, liberating single-stranded 3' overhangs (step 2), which, through *RecA*- and *RadA*-mediated strand invasion, prime synthesis on overlapping fragments through a migrating D loop (step 3). DNA synthesis is initiated by *Pol III* (step 4) and elongated by *Pol III*, with *Pol I* filling up gaps arising from the excision repair of damaged bases (A), or by *Pol I* alone (B). Two noncontiguous fragments are linked by convergent elongations on a third "bridging" fragment (step 5). Newly synthesized single strands dissociate from the template (step 6) and anneal to complementary single-stranded extensions, forming dsDNA intermediates (step 7). The flaps are removed (by *SbcCD?*), and the gaps are filled (by *Pol I?*) (step 8). Long linear intermediates are joined into circular chromosomes by *RecA*-dependent crossovers (step 9). (Modified from reference [572](#) with permission from Elsevier and based in part on data from reference [676](#).)

Figure 6 : Mécanisme de réparation de l'ADN endommagé par des radiations ionisantes chez *Deinococcus radiodurans* (source : Slade *et al.* 2009)

I.3 Applications : Production de molécules d'intérêt – Bioremédiation

Leurs capacités exceptionnelles à tolérer des conditions environnementales extrêmes et à croître dans une large gamme de pH et de température en font des candidats de choix pour des procédés de production d'agrocarburants et de produits biosourcés (Leonetti *et al.* 2011). En effet, les bactéries du genre *Deinococcus* possèderaient des propriétés intéressantes d'assimilation et de bioconversion de substrats provenant de biomasse agricole pour la production de composés d'intérêt dont l'éthanol. Des outils de génie génétique sont également disponibles pour l'obtention de bactéries modifiées exprimant de nouvelles enzymes nécessaires à la mise en œuvre des procédés biotechnologiques. Des souches de déinocoques pourraient alors être sélectionnées et exploitées pour la dégradation de biomasse ou résidus agricoles et la production de bioéthanol, à des températures proches de 50 °C ; l'obtention d'un tel procédé plus efficace et plus économique représente donc un intérêt industriel majeur.

De plus, des études de bioremédiation sont menées pour explorer les aptitudes des bactéries du genre *Deinococcus* à dégrader des déchets retrouvés dans des environnements pollués. En effet, les lieux de production d'armes ou de recherche nucléaire sont des sites contaminés à la fois par des matériaux radioactifs, uranium et plutonium, et des polluants tels que des métaux lourds (chrome, mercure, plomb) ou des solvants (trichloréthylène et toluène). La bioremédiation vise donc l'utilisation de bactéries capables de décomposer ces polluants organiques et/ou fixer les éléments radioactifs et les métaux lourds. En combinant les aptitudes fonctionnelles de dépollution des déinocoques et les outils d'ingénierie génétique disponibles pour leur transformation, cela ouvre de nombreuses possibilités de sélection de souches intéressantes pour la bioremédiation (Daly *et al.* 1994).

Les travaux de Lange et ses collaborateurs en 1998 ont permis de cloner chez *D. radiodurans* les gènes codant pour une enzyme toluène dioxygénase de *Pseudomonas putida*. La souche clonée est alors capable d'oxyder l'indole, le toluène, le chlorobenzène et le 3,4-dichloro-1-butène (Lange *et al.* 1998) même soumise en continu à des radiations de 60 Gy.h⁻¹ de ¹³⁷Cs.

Des études visent également l'utilisation des déinocoques thermophiles pour la dépollution, ces microorganismes étant résistants à la fois aux radiations et aux températures élevées retrouvées dans certains environnements extrêmes pollués par des déchets radioactifs. L'ingénierie génétique a permis la construction de souches de *Deinococcus radiodurans* et *Deinococcus geothermalis* capables de réduire le Hg(II) en présence d'une irradiation chronique de 50 Gy.h⁻¹ ou le Cr(VI) en composés moins toxiques pour l'environnement (Brim *et al.* 2003; Brim *et al.* 2000).

Plus récemment, il a été décrit dans la littérature une nouvelle souche de déinocoques isolée à partir d'échantillons de sol prélevés dans des sources géothermales à Krabi en Thaïlande, *Deinococcus geothermalis* T27. Cette souche tolère la présence de plusieurs solvants tels que le butyl acétate, l'éthyl acétate, le

toluène, le diéthylphtalate et le benzène et elle peut assimiler ces solvants hydrocarbonés comme sources de carbone (Kongpol *et al.* 2008).

Quatre systèmes d'expression ont été développés pour moduler l'expression du gène *merA* codant pour une enzyme mercurique réductase, qui réduit l'ion mercurique Hg (II) très toxique en mercure élémentaire inerte Hg (0). Une souche de *Deinococcus radiodurans* résistante à 30 à 50 μM de Hg (II) a été construite (Brim *et al.* 2000).

Enfin, la découverte des mécanismes de réparation des déinocoques pour la restauration de leur matériel génétique ouvre la voie à de nouvelles perspectives dans le domaine de la santé et de la médecine ; des équipes travaillent sur la possibilité de régénérer des cellules humaines, tels que les neurones, ou de prolonger leur espérance de vie afin de lutter contre le vieillissement ou même le cancer. On parlerait alors de médecine régénérative (Slade and Radman 2011). La production d'antibiotiques par des déinocoques est également étudiée.

I.4 Exigences nutritionnelles et métabolisme des déinocoques

Les déinocoques sont chimioorganohétérotrophes : ils utilisent les composés organiques comme sources de carbone et d'énergie et le dioxygène comme accepteur final d'électrons. Ce sont des microorganismes strictement aérobies.

Depuis leur découverte, le milieu de base le plus couramment utilisé pour la culture des déinocoques est le milieu TGY (Tryptone Glucose Yeast extract (extrait de levure)) : 5 g.L^{-1} de tryptone, 1 g.L^{-1} de glucose et 3 g.L^{-1} d'extrait de levure (Harada *et al.* 1982; Little and Hanawalt 1973).

Sa composition peut cependant varier légèrement suivant les études : 10 g.L^{-1} de tryptone, 1 g.L^{-1} de glucose et 5 g.L^{-1} d'extrait de levure (Jena *et al.* 2006) ou 5 g.L^{-1} de tryptone, 1 g.L^{-1} de glucose, 1 g.L^{-1} d'extrait de levure et 20 mg.L^{-1} de DL-méthionine (Krabbenhof *et al.* 1967).

Ce milieu est surtout utilisé pour le stockage des souches ou pour des cultures et dénombrements sur boîtes de Pétri. Dans les milieux riches, les déinocoques ont un temps de génération compris généralement entre 1,5 et 3 heures, correspondant à des taux de croissance variant de 0,23 à 0,46 h^{-1} (Cox and Battista 2005; Murray *et al.* 1983).

Peu de milieux définis adaptés à la croissance du genre *Deinococcus* ont été publiés. Les besoins nutritionnels des souches et leur comportement physiologique peuvent difficilement être évalués car peu de données quantitatives de croissance sont disponibles ; les concentrations en biomasse, les cinétiques de croissance ainsi que les taux de croissance ne sont généralement pas disponibles dans la littérature.

I.4.1 Besoins nutritionnels

Un milieu synthétique a été développé par Raj et ses collaborateurs en 1960 pour l'étude du métabolisme de *Micrococcus radiodurans* (Raj *et al.* 1960). Sa composition est décrite dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Milieu de croissance de *Micrococcus radiodurans* développé par Raj *et al.* (1960)

Constituants	Quantités pour 100 mL
Phosphate d'ammonium (dibasique)	50 mg
L-méthionine	1 mg
L-acide glutamique	50 mg
Biotine	1 µg
Pyridoxine	20 µg
Niacine	25 µg
Thiamine hydrochloride	50 µg
Glucose	500 mg
Sels - solution A	0,5 mL
	KH ₂ PO ₄ 25 g
	K ₂ HPO ₄ 25 g
	Eau qsp 250 mL
Sels - solution B	0,5 mL
	MgSO ₄ (7 H ₂ O) 10 g
	FeSO ₄ (7 H ₂ O) 0,5 g
	MnSO ₄ (4 H ₂ O) 0,5 g
	Eau qsp 250 mL

Ce milieu a été supplémenté en acide folique 10 µg.L⁻¹, en cobalamine (vitamine B12) 200 µg.L⁻¹ et en casamino acides vitamin-free pour améliorer la croissance de *D. radiodurans* (Little and Hanawalt 1973). Avec une souche mutante de *Deinococcus radiodurans* auxotrophe à la thymine, le taux de croissance a atteint 0,35 h⁻¹ sur ce milieu contenant 2 µg.mL⁻¹ de thymine.

Le milieu décrit dans le Tableau 1 (Raj *et al.* 1960), même amélioré par d'autres auteurs (Little and Hanawalt 1973), s'est finalement révélé insuffisant pour obtenir de bons résultats de croissance avec trois souches de microcoques : *Micrococcus radiodurans*, *Micrococcus roseus* et *Micrococcus radiophilus* (Shapiro *et al.* 1977). Un nouveau milieu synthétique de base, riche en éléments nutritifs, a donc été développé pour la culture de ces trois souches. Sa composition est décrite dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Milieu de croissance de *Micrococcus radiodurans* développé par Shapiro *et al.* (1977)

Constituants	Concentrations (mg.L ⁻¹)	Constituants	Concentrations (mg.L ⁻¹)
Potassium gluconate	450	Biotine	0,009
L-Acide malique	200	Cobalamine	0,008
Calcium succinate (H ₂ O)	20	Acide nicotinique	1,4
KH ₂ PO ₄	80	Pyridoxine HCl	1,1
MgSO ₄ (anhydre)	160	Thiamine HCl	0,3
L-Alanine	600	MnSO ₄ (H ₂ O)	7,9
L-Arginine (base)	800	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ (6 H ₂ O)	43,4
L-Asparagine (anhydre)	800	ZnSO ₄ (7 H ₂ O)	11,2
L-Cystéine HCl (H ₂ O)	30	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (4 H ₂ O)	1,84
Glycine	300	CuSO ₄ (anhydre)	0,51
L-Histidine (base)	200	NH ₄ VO ₃	0,23
L-Isoleucine	300	CoSO ₄ (7 H ₂ O)	0,24
L-Leucine	500	H ₃ BO ₃	0,29
L-Lysine HCl	300	CrKSO ₄ (12 H ₂ O)	0,49
L-Méthionine	100	NiSO ₄ (6 H ₂ O)	0,23
L-Phénylalanine	200		
L-Proline	360	L-Acide glutamique	600
L-Sérine	300	Glycerol	4500
L-Thréonine	200	Sodium acetate (3 H ₂ O)	400
L-Tryptophane	200	Na ₂ α,β glycerophosphate (5 H ₂ O)	1100
L-Tyrosine ethyl ester HCl	200		
L-Valine	200		

Pour *M. radiodurans*, le pH initial du milieu est ajusté à une valeur comprise entre 6,6 et 7 et les cultures en fioles Erlenmeyer sont réalisées à 30 °C. De plus il a été mis en évidence que *M. radiodurans* et *M. roseus* présentent une auxotrophie à la méthionine ou à la cobalamine, la présence de l'un des deux composés dans le milieu étant suffisante. Inversement, l'auxotrophie de la souche *Micrococcus radiophilus* pour la méthionine ne peut pas être compensée par un ajout de cobalamine. Dans ce milieu, les cultures des trois souches de microcoques permettent d'atteindre une valeur d'absorbance supérieure à 1.

Ce milieu décrit par Shapiro et ses collaborateurs pour la culture de *M. radiodurans* est un milieu synthétique qui contient 17 acides aminés, une grande variété de minéraux et de vitamines. Ces vitamines ne semblent pas indispensables selon les résultats de travaux effectués quelques années plus tard (Venkateswaran *et al.* 2000). Dans cette étude concernant l'effet des conditions nutritionnelles sur la capacité de *Deinococcus* à survivre aux radiations, *D. radiodurans* R1 est cultivé sur un milieu TGY (10 g.L⁻¹

de tryptone - 1 g.L⁻¹ de glucose - 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure) puis sur un milieu minimum à une température de 22 °C. En effet, dans un contexte de développement de l'utilisation de *Deinococcus radiodurans* pour la bioremédiation, l'étude de son comportement physiologique et de son métabolisme dans un environnement nutritionnel limité et contrôlé est stratégique. La définition d'un milieu minimal suffisant pour la croissance de *D. radiodurans* en absence et en présence de radiations est donc nécessaire. En absence de radiations, les besoins nutritionnels de *D. radiodurans* se révèlent assez simples (Tableau 3). Ils consistent en cinq sels, deux acides aminés, une vitamine, un tampon et le fructose comme source carbonée (Venkateswaran *et al.* 2000).

Tableau 3 : Milieu minimum utilisé pour la culture de *Deinococcus radiodurans* par Venkateswaran *et al.* (2000)

Constituants		Concentrations
Tampon	Tampon phosphate de potassium (pH 7,5 à 8)	20 mM
Sels	Chlorure de magnésium (4 H ₂ O)	0,2 mM
	Chlorure de calcium (2 H ₂ O)	0,1 mM
	Acétate de manganèse (II) (4 H ₂ O)	5,0 µM
	Molybdate d'ammonium (4 H ₂ O)	5,0 µM
	Sulfate de fer (7 H ₂ O)	5,0 µM
Acides aminés	L-Histidine	25 µg.mL ⁻¹
	L-Cystéine	30 µg.mL ⁻¹
Vitamines	Acide nicotinique	1,0 µg.mL ⁻¹
Source carbonée	Fructose	2 mg.mL ⁻¹

Ce milieu défini simplifié est suffisant pour permettre la croissance de *D. radiodurans* lorsque les cellules ne sont pas irradiées ; il doit être supplémenté en acides aminés lorsque *Deinococcus radiodurans* R1 est soumis à une irradiation chronique de 6000 rads.h⁻¹, pour que le microorganisme soit capable de réparer l'ADN endommagé. Soumis à des radiations et à un stress nutritionnel, il a donc été mis en évidence que les capacités de *D. radiodurans* à réparer son ADN sont limitées par les phénomènes de régulation de son métabolisme.

Le manganèse joue un rôle fondamental dans la physiologie et le métabolisme de *Deinococcus radiodurans*. L'ajout de manganèse (0,1 mM) dans un milieu riche constitué de tryptone, d'extrait de levure et de glucose permet d'induire le catabolisme du glucose par la voie d'Embden Meyerhof Parnas (Zhang *et al.* 2000). Il permet également d'augmenter le taux de croissance. La concentration en manganèse intracellulaire de *Deinococcus radiodurans* doit être accompagnée d'une concentration faible en fer pour assurer la résistance du microorganisme aux radiations gamma (Daly *et al.* 2004). La souche mésophile *Deinococcus radiodurans* a été cultivée dans le milieu minimal défini par Venkateswaran et ses co-auteurs en 2000 (Tableau 3) additionné de cystéine (50 mg.mL⁻¹), d'histidine et de méthionine (25 mg.mL⁻¹ chacun) et de 2,5 µM Mn(II) sous forme MnCl₂. Les résultats ont confirmé l'effet positif du manganèse sur la

croissance de la souche étudiée tandis que la croissance est indépendante des éléments Fe, Co et Mo. Avec une concentration de 5 μM de Mn, la croissance en fioles Erlenmeyer atteint une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1,55 en 50 heures ce qui représente un taux de croissance d'environ $0,05 \text{ h}^{-1}$. Cette concentration de 5 μM est toutefois supérieure à la concentration en manganèse du milieu TY (0,5 % de tryptone – 0,3 % d'extrait de levure) jugée suffisante pour les besoins de la croissance de *Deinococcus radiodurans*, à savoir 0,18 μM (Zhang *et al.* 2006). La concentration en manganèse est également liée à la résistance aux radiations ionisantes ; une souche sauvage qui possède une teneur en manganèse supérieure à une souche mutante est moins sensible aux radiations (Daly *et al.* 2007).

En vue d'une application de bioremédiation de sites pollués, Holland et ses collaborateurs ont cherché à mettre au point un milieu minimum défini, non limitant pour la croissance de *Deinococcus radiodurans*, afin d'étudier les interactions entre le microorganisme et les métaux lourds. Le métabolisme carboné a été étudié en utilisant un milieu riche tamponné avec l'acide morpholino-3-propane sulfonique (MOPS) ; la composition de ce milieu figure dans le Tableau 4 (Holland *et al.* 2006). Il a été mis en évidence que le substrat le plus adapté pour la croissance de cette souche est le fructose.

Tableau 4 : Milieu défini optimisé pour la culture de *Deinococcus radiodurans* par Holland *et al.* (2006)

Constituants	Concentrations	Constituants	Concentrations
MOPS acid	40 mM	FeCl ₃	20 μM
NH ₄ Cl	20 mM	Citrate de sodium	20 μM
NaOH	10 mM	Arginine	3 mM
KOH	10 mM	Cystéine	0,86 mM
CaCl ₂	0,5 μM	Histidine	1 mM
K ₂ SO ₄	0,276 mM	Isoleucine	2 mM
MgCl ₂	0,528 mM	Leucine	2 mM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	3 nM	Lysine	2 mM
H ₃ BO ₃	400 nM	Méthionine	0,50 mM
CoCl ₂	30 nM	Phénylalanine	1 mM
CuSO ₄	10 nM	Thréonine	2 mM
MnCl ₂	250 nM	Tryptophane	0,26 mM
ZnSO ₄	10 nM	Tyrosine	1,44 mM
D-Biotine	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Valine	2 mM
Niacine	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Alanine	1 mM
Pyridoxal HCl	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Asparagine	1 mM
Thiamine HCl	1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	Acide aspartique	0,78 mM
Fructose	16,3 mM	Glutamine	0,60 mM
K ₂ HPO ₄	1,23 mM	Acide glutamique	0,78 mM
KH ₂ PO ₄	0,77 mM	Glycine	1 mM
		Proline	1 mM
		Sérine	1 mM

Le milieu de base utilisé pour la croissance de la principale souche thermophile de déinocoques, *Deinococcus geothermalis*, est le milieu de Degryse 162 décrit dans le Tableau 5 ci-après (Degryse *et al.* 1978).

Tableau 5 : Milieu de Degryse 162 (10 X) utilisé pour la culture de *Deinococcus geothermalis*

Constituants	Quantités	
NaHPO ₄ (12 H ₂ O) 0,2 M	60 mL	
KH ₂ PO ₄ 0,2 M	20 mL	
Solution de nutriments concentrée (10 X) :		
- Acide nitrilotriacétique : 1 g		
- Solutions de micronutriments : 0,5 mL		
(Castenholz 1969 : eau distillée 1 L ;		
H ₂ SO ₄ 0,5 mL ;		
MnSO ₄ (H ₂ O) 2,28 g ;		
ZnSO ₄ (7 H ₂ O) 0,5 g ;		
H ₃ BO ₃ 0,5 g ;		100 mL
CuSO ₄ (5 H ₂ O) 0,025 g ;		
Na ₂ MoO ₄ (2 H ₂ O) 0,025 g ;		
CoCl ₂ (6 H ₂ O) 0,045 g)		
- Citrate de fer 0,01 M : 5 mL		
- CaSO ₄ (2 H ₂ O) : 0,4 g		
- MgCl ₂ (6 H ₂ O) : 2 g		
- Eau : qsp 1L		
Eau distillée	qsp 1 L	

Le pH de ce milieu est ajusté à 7,2. Selon les études, la source azotée est du chlorure d'ammonium à 10 mM ou du sulfate d'ammonium à 3,8 mM et la source carbonée est ajoutée à une concentration finale de 0,2 ou 0,4 % (Degryse *et al.* 1978; Ferreira *et al.* 1997). Ce milieu peut être enrichi en extrait de levure (0,1 à 2,5 g.L⁻¹) et/ou tryptone (2,5 g.L⁻¹).

Pour une étude d'assimilation de solvants comme sources carbonées, Kongpol et ses collaborateurs ont cultivé la souche *Deinococcus geothermalis* T27 sur le milieu salin décrit dans le Tableau 6, à 45 °C et pH 7,2 (Kongpol *et al.* 2008).

Tableau 6 : Milieu de Kongpol *et al.* (2008) utilisé pour la culture de *Deinococcus geothermalis*

Constituants	Concentration (g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	4,3
K ₂ HPO ₄	3,4
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
MgCl ₂ (6 H ₂ O)	0,34
MnCl ₂ (4 H ₂ O)	0,001
FeSO ₄ (7 H ₂ O)	0,006
CaCl ₂ (2 H ₂ O)	0,026
CoCl ₂ (6 H ₂ O)	2.10 ⁻⁵
CuSO ₄	1.10 ⁻⁵
NiSO ₄ (6 H ₂ O)	1.10 ⁻⁶
NaSeO ₄	1.10 ⁻⁶

Les résultats ont mis en évidence que dans ces conditions la valeur de la DO_{560nm} ne dépassait pas 0,3. Ce milieu a été enrichi avec 10 g.L⁻¹ d'extrait de levure. Dans ces conditions, la valeur de la DO_{560nm} a atteint 0,5.

I.4.2 Métabolisme carboné

Le catabolisme des carbohydrates chez *Micrococcus radiodurans* a été étudié en utilisant le milieu synthétique décrit par Raj et ses collaborateurs (Raj *et al.* 1960) : *Micrococcus radiodurans* peut utiliser le glucose, le fructose et le glycérol comme sources carbonées mais pas le mannose, le ribose, l'arabinose, le xylose et le gluconate. Les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques ont été testés également comme substrats : le succinate, le pyruvate, le fumarate et l'isocitrate sont métabolisés mais la croissance à partir de ces substrats est plus faible qu'à partir des sources carbonées citées précédemment.

Le génome de *Deinococcus radiodurans* code de manière fonctionnelle les voies de la glycolyse, de la néoglucogenèse, des pentoses phosphates et du cycle des acides tricarboxyliques, mais l'enzyme 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase est manquante dans la voie d'Entner Doudoroff (Makarova *et al.* 2001). Ces différentes voies métaboliques sont représentées sur la Figure 7. Les travaux de Zhang ont confirmé la fonctionnalité de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates chez *Deinococcus radiodurans* (Zhang *et al.* 2000). Les expérimentations utilisant du ¹⁴C ont mis en évidence la présence des enzymes glucose-6-phosphate déshydrogénase et fructose diphosphate aldolase.

Les voies du catabolisme du glucose ont été étudiées chez cinq souches mésophiles de déinocoques : *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus radiophilus*, *Deinococcus grandis*, *Deinococcus proteolyticus* et *Deinococcus radiopugnans* (Sung *et al.* 2006). Les activités des enzymes fructose-1,6-diphosphate aldolase, glucose-6-phosphate déshydrogénase et 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH) ont été identifiées chez ces cinq souches. La glycolyse et la voie des pentoses phosphates sont donc fonctionnelles chez ces déinocoques mésophiles. Cependant, seules *D. proteolyticus*, *D. radiopugnans* et *D. radiodurans* possèdent l'activité KDPG aldolase et peuvent donc cataboliser le glucose par la voie d'Entner Doudoroff. Ces résultats mettent en évidence que les voies du métabolisme carboné sont variables au sein du genre *Deinococcus*. De plus, malgré l'apparente absence des gènes codant pour la KDPG aldolase chez *D. radiodurans* (Makarova *et al.* 2001), la voie d'Entner Doudoroff semble fonctionnelle pour le catabolisme glycolytique.

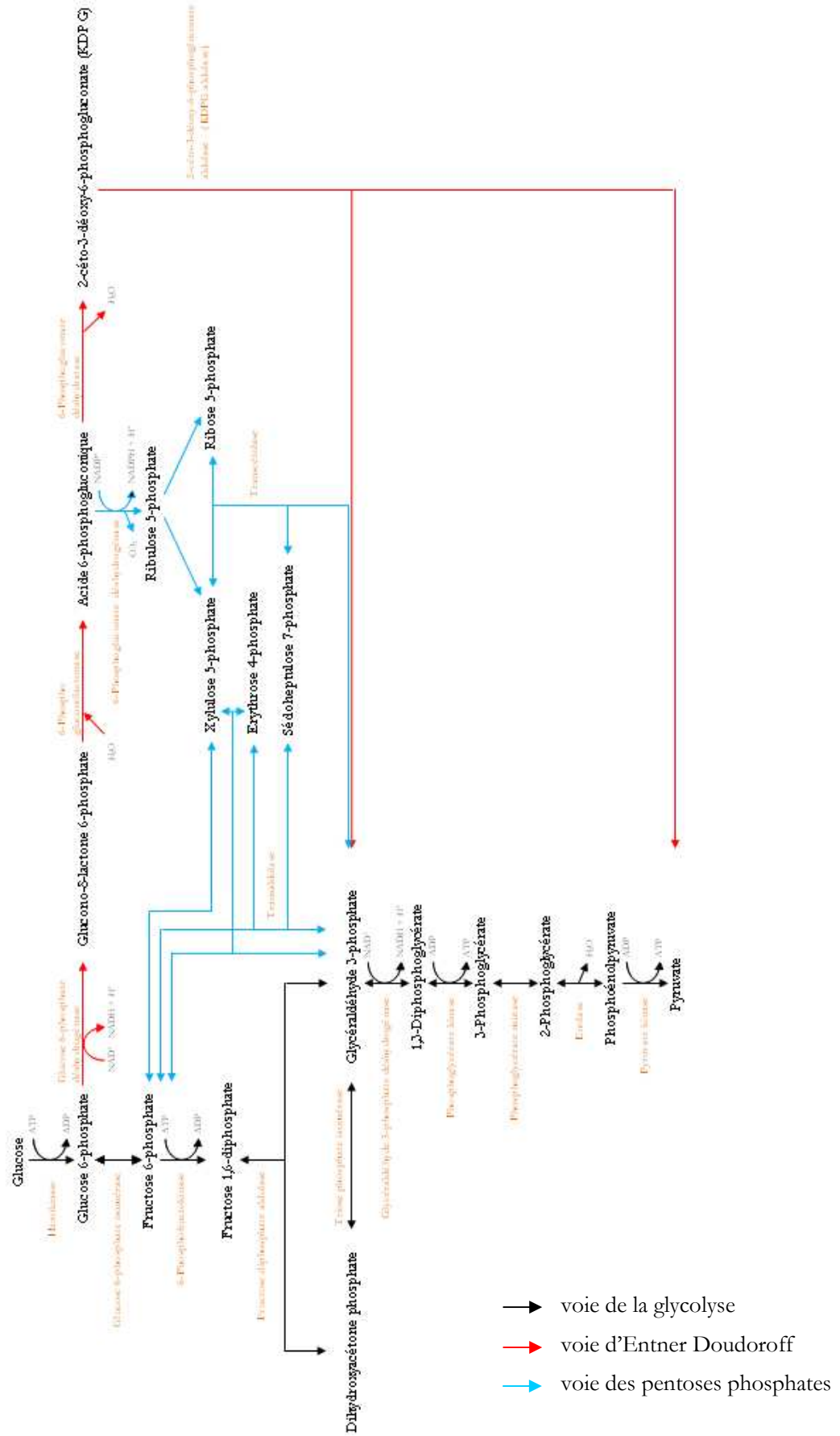


Figure 7 : Les différentes voies de catabolisme du glucose

Une autre étude rapporte le métabolisme de divers substrats carbonés chez *Deinococcus radiodurans* ; en utilisant le milieu défini décrit dans le Tableau 3, dix sources carbonées ont été testées : fructose, pyruvate, lactate, acétate, glucose, succinate, fumarate, citrate, oxaloacétate et malate. Parmi ces dix sources carbonées, le meilleur taux de croissance, $0,05 \text{ h}^{-1}$, a été obtenu avec le fructose. Avec le glucose le taux de croissance est égal à $0,04 \text{ h}^{-1}$, avec le pyruvate et le lactate il est de $0,03 \text{ h}^{-1}$ et seulement $0,02 \text{ h}^{-1}$ avec l'acétate. Malgré des voies métaboliques fonctionnelles pour le catabolisme des carbohydrates, les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques malate, fumarate, citrate, oxaloacétate et succinate ne permettent pas la croissance de *D. radiodurans* (Venkateswaran *et al.* 2000). La meilleure source carbonée pour ce milieu est donc le fructose à une concentration égale à 2 g.L^{-1} .

Il a été mis en évidence que dans un milieu riche contenant de la tryptone et de l'extrait de levure, le glucose n'est pas l'élément essentiel pour la production de biomasse (Zhang *et al.* 2000) et qu'il est peu incorporé dans la biomasse (4,4 % de glucose incorporé dans 10^8 cellules). De plus, en absence de manganèse, le glucose est métabolisé uniquement par la voie des pentoses phosphates (Zhang *et al.* 2000) alors que la voie d'Embden Meyerhof Parnas devient majoritaire en présence de $0,1 \text{ mM}$ de manganèse. Une des enzymes clés de la voie d'Embden Meyerhof Parnas, la fructose-1, 6-diphosphate aldolase, peut être induite par le glucose ou le manganèse (Zhang *et al.* 2006).

La souche thermophile *Deinococcus geothermalis* catabolise un grand nombre de substrat carbonés : amidon, D-glucose, D-cellobiose, D-tréhalose, lactose, maltose, D-fructose, D-galactose, D-mannose, L-rhamnose, saccharose, D-xylose, D-mannitol, D-sorbitol, glycérol, L-asparagine, L-glutamine, L-proline, L-sérine, malate, pyruvate et succinate. Cependant, le D-raffinose, le D-mélibiose, le L-arabinose, le ribitol, la L-arginine et le citrate ne sont pas métabolisés (Ferreira *et al.* 1997).

Ces résultats sont en accord avec ceux publiés dans une étude sur la bioremédiation par *D. geothermalis* de sites pollués par des déchets radioactifs (Brim *et al.* 2003) ; les auteurs ont en effet mis en évidence qu'en l'absence d'irradiation *D. geothermalis* est capable de croître sur un milieu minimum avec le fructose comme source carbonée et peut utiliser les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques alpha-cétoglutarate, succinate, fumarate, oxaloacétate et malate ajoutés à une concentration de 2 g.L^{-1} . Ces résultats ont été mis en évidence par des cultures réalisées à partir d'un milieu minimum (Tableau 3) adapté de celui décrit par l'équipe de Venkateswaran (2000) pour la culture de *Deinococcus radiodurans*.

Le Tableau 7 présente un récapitulatif des résultats des études publiées qui se sont intéressées à l'assimilation des substrats carbonés.

Tableau 7 : Assimilation des sources carbonées par *Micrococcus radiodurans*,
Deinococcus radiodurans R1 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11300
 (++) : croissance ; + : faible croissance ; - : pas de croissance)

Souche	Sources carbonées	Croissance	Concentrations (g.L ⁻¹)	Milieu de culture	Références
<i>M. radiodurans</i>	Glucose	++	0,60	Défini	(Raj <i>et al.</i> 1960)
	Fructose	++	0,60		
	Glycérol	++	0,31		
	Mannose	-	0,60		
	Ribose	-	0,50		
	Arabinose	-	0,50		
	Xylose	-	0,50		
	Gluconate	-	0,65		
	Succinate	+	0,39		
	Pyruvate	+	0,29		
	Fumarate	+	0,39		
	Isocitrate	+	0,64		
	<i>D. radiodurans</i> R1	Fructose	++ (0,05 h ⁻¹)		
Glucose		++ (0,04 h ⁻¹)			
Pyruvate		++ (0,03 h ⁻¹)			
Lactate		++ (0,03 h ⁻¹)			
Oxaloacétate		+			
Acétate		+ (0,02 h ⁻¹)			
Succinate		-			
Fumarate		-			
Citrate		-			
Malate		-			
<i>D. radiodurans</i> R1	Fructose	++ (0,27 h ⁻¹)	2,90	Défini	(Holland <i>et al.</i> 2006)
<i>D. radiodurans</i> R1	Fructose	++	2,00	Défini	(Brim <i>et al.</i> 2000)
	Alpha-cétoglutarate	-			
	Succinate	-			
	Fumarate	-			
	Oxaloacétate	+			
	Malate	-			

Tableau 7 (suite) : Assimilation des sources carbonées par *Micrococcus radiodurans*,
Deinococcus radiodurans R1 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11300
 (++) : croissance ; + : faible croissance ; - : pas de croissance)

Souche	Sources carbonées	Croissance	Concentrations (g.L ⁻¹)	Milieu de culture	Références
<i>D. geothermalis</i> 11300	D-glucose	+		Non défini	(Ferreira <i>et al.</i> 1997)
	D-cellobiose	+			
	D-tréhalose	+			
	Lactose	+			
	Maltose	+			
	D-fructose	+			
	D-galactose	+			
	D-mannose	+			
	L-rhamnose	+			
	Saccharose	+			
	D-xylose	+			
	D-mannitol	+			
	D-sorbitol	+			
	Glycérol	+			
	L-asparagine	+	2,00		
	L-glutamine	+			
	L-glutamate	+			
	L-proline	+			
	L-sérine	+			
	Malate	+			
	Pyruvate	+			
	Succinate	+			
	D-raffinose	-			
	D-mélibiose	-			
	L-arabinose	-			
	Ribitol	-			
L-arginine	-				
Citrate	-				
Myo-inositol	-				
<i>D. geothermalis</i> 11300	Fructose	++		Défini	(Brim <i>et al.</i> 2003)
	Alpha-cétoglutarate	++			
	Succinate	++	2,00		
	Fumarate	++			
	Oxaloacétate	++			
	Malate	+			

I.4.3 Métabolisme azoté

Deinococcus radiodurans n'est pas capable d'utiliser l'ammonium comme source azotée alors que l'annotation de son génome a montré qu'il possède les enzymes nécessaires au métabolisme de l'azote ammoniacal (Makarova *et al.* 2001). Sa croissance est donc entièrement dépendante d'une source d'azote organique exogène telle que les acides aminés (Venkateswaran *et al.* 2000), les acides aminés soufrés étant utilisés préférentiellement (Makarova *et al.* 2001).

La souche *Deinococcus geothermalis* a été décrite comme capable d'utiliser le sulfate d'ammonium comme source d'azote dans un milieu défini en l'absence d'irradiation (Brim *et al.* 2003).

I.4.4 Vitamines

En 1960, l'étude de Raj et des ses collaborateurs a montré que *Micrococcus radiodurans* semblait posséder toutes les voies de synthèse des coenzymes à l'exception de la voie de synthèse de l'acide nicotinique qui était alors ajouté dans le milieu à une concentration de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Raj *et al.* 1960). L'acide nicotinique est également la seule vitamine ajoutée au milieu de Venkateswaran pour la culture de *D. radiodurans* R1 (Venkateswaran *et al.* 2000). Cependant, dans une étude consacrée à la croissance de trois souches de microcoques, *Micrococcus radiodurans*, *Micrococcus radiophilus* et *Micrococcus roseus*, cinq vitamines sont ajoutées à un milieu défini de base. Il s'agit de la biotine, de la cobalamine, de l'acide nicotinique, de la pyridoxine et de la thiamine (Shapiro *et al.* 1977).

En 2006, il a été montré que la biotine et la niacine sont les seules vitamines indispensables à la croissance de *D. radiodurans* R1, bien que l'ajout de thiamine et de pyridoxal-HCl améliore la croissance. En présence de ces quatre vitamines le taux de croissance est égal à $0,26 \text{ h}^{-1}$ contre $0,22 \text{ h}^{-1}$ lorsque que seulement la biotine et la niacine sont ajoutées (Holland *et al.* 2006). Lors de l'étude du métabolisme du soufre et de la biosynthèse de la méthionine sur un milieu simple contenant deux acides aminés (glutamine et sérine), il est ressorti que lorsque la cobalamine est ajoutée au milieu de culture, la souche ne présente plus d'auxotrophie vis-à-vis de la méthionine et elle est capable de se développer à partir de la cystéine ou du sulfate comme seule source de soufre. A partir de ces résultats, les auteurs ont mis au point un milieu de culture défini simplifié pour la culture de *Deinococcus radiodurans*. Ce milieu simplifié reprend la composition du milieu riche décrite dans le Tableau 4 avec des modifications concernant les vitamines et les acides aminés : la cobalamine est ajoutée à une concentration de $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$ et uniquement 10 mM de glutamine et 10 mM de sérine sont conservés parmi les vingt acides aminés initialement présents. Cette formulation a permis d'obtenir un temps de doublement cellulaire égal à $3,1 \text{ h}$ soit un taux de croissance de $0,22 \text{ h}^{-1}$ (Holland *et al.* 2006).

Ces différents résultats concernant l'auxotrophie des déinocoques pour des vitamines sont récapitulés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Récapitulatif des vitamines ajoutées aux milieux de culture définis pour la croissance des souches de déinocoques

Souche	Vitamines	Concentrations (g.L ⁻¹)	Milieu de culture	Référence
<i>M. radiodurans</i>	Acide nicotinique	1,0.10 ⁻³	Défini	(Raj <i>et al.</i> 1960)
<i>M. radiodurans</i>	Biotine	9,0.10 ⁻³	Défini	(Shapiro <i>et al.</i> 1977)
	Cobalamine	8,0.10 ⁻³		
	Acide nicotinique	1,4		
	Pyridoxine HCl	1,4		
	Thiamine HCl	0,3		
<i>D. radiodurans</i> R1	Acide nicotinique	1,0	Défini	(Venkateswaran <i>et al.</i> 2000)
<i>D. radiodurans</i> R1	Biotine	1,0.10 ⁻⁶	Défini	(Holland <i>et al.</i> 2006)
	Niacine	1,0.10 ⁻⁶		
	Cobalamine	1,0.10 ⁻⁸		

I.4.5 Facteurs qui améliorent la croissance

A - Acides aminés

La majorité des études qui ont été menées à ce jour rapporte des phénomènes d'auxotrophie liés à des acides aminés.

L'analyse du génome de *D. radiodurans* a révélé que les voies de synthèse des acides aminés méthionine, lysine et cystéine sont incomplètes (Makarova *et al.* 2001). La L-méthionine est le seul acide aminé essentiel à la croissance de *Deinococcus radiodurans* dans les conditions testées par Raj et ses collaborateurs (Raj *et al.* 1960). Sa concentration dans le milieu influe sur la pigmentation du microorganisme : une concentration égale à 0,01 % augmente la production de pigment. De plus, l'acide glutamique n'est pas essentiel à la croissance de *D. radiodurans* mais il la stimule (Raj *et al.* 1960) ; les deux énantiomères D et L peuvent être métabolisés, avec une préférence toutefois pour la forme L. La meilleure croissance en fiole Erlenmeyer à 30 °C en 24 heures a été obtenue en ajoutant au milieu synthétique 0,05 % d'acide glutamique et 0,001 % de L-méthionine, le glucose étant la source carbonée.

Les acides aminés histidine et cystéine doivent être ajoutés au milieu minimal décrit par Venkateswaran et ses collaborateurs pour la croissance de *D. radiodurans* R1 (Tableau 3), mais pas nécessairement la méthionine et la lysine. Cependant, malgré ces observations, il a été mis en évidence que la concentration totale en acides aminés dans le milieu de culture avait plus d'influence sur les résultats de croissance que la composition du mélange d'acides aminés (Venkateswaran *et al.* 2000). L'hypothèse d'interconversions entre les différents acides aminés par des réactions de transamination est probable. De plus, la présence d'un stress environnemental influe sur les besoins nutritionnels de la souche ; lorsque la culture est soumise à une irradiation chronique de 6000 rads.h⁻¹, une supplémentation en acides aminés est indispensable pour restaurer la croissance de *D. radiodurans* R1 sur le milieu minimum. La composition du

milieu chimiquement défini permettant la croissance de *D. radiodurans* R1 en présence de radiations est alors décrite dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Milieu minimum utilisé pour la culture de *Deinococcus radiodurans* par Venkateswaran *et al.* (2000) en présence d'une irradiation chronique

Constituants		Concentration
Tampon	Tampon phosphate de potassium (pH 7,5 à 8)	20 mM
Sels	Chlorure de magnésium (4 H ₂ O)	0,2 mM
	Chlorure de calcium (2 H ₂ O)	0,1 mM
	Acétate de manganèse (II) (4 H ₂ O)	5,0 µM
	Molybdate d'ammonium (4 H ₂ O)	5,0 µM
	Sulfate de fer (7 H ₂ O)	5,0 µM
Acides aminés	L-Histidine	200 µg.mL ⁻¹
	L-Cystéine	30 µg.mL ⁻¹
	L-Glutamine	500 µg.mL ⁻¹
	L-Alanine	500 µg.mL ⁻¹
	L-Arginine	800 µg.mL ⁻¹
	L-Asparagine	800 µg.mL ⁻¹
	Glycine	300 µg.mL ⁻¹
	L-Leucine	500 µg.mL ⁻¹
	L-Lysine	300 µg.mL ⁻¹
	L-Méthionine	100 µg.mL ⁻¹
	L-Proline	370 µg.mL ⁻¹
	L-Sérine	300 µg.mL ⁻¹
	L-Thréonine	200 µg.mL ⁻¹
	L-Tryptophane	200 µg.mL ⁻¹
L-Tyrosine	200 µg.mL ⁻¹	
L-Valine	200 µg.mL ⁻¹	
Vitamines	Acide nicotinique	1,0 µg.mL ⁻¹
Source carbonée	Fructose	2 mg.mL ⁻¹

B - Sources complexes

L'influence des sources complexes tryptone et extrait de levure sur les performances de croissance de *Deinococcus radiodurans* R1 a aussi été étudiée. Malgré la présence de glucose, en milieu riche la production de biomasse est corrélée à la concentration en sources complexes tryptone et extrait de levure (Zhang *et al.* 2000). Cette souche de déinocoques semble donc préférentiellement protéolytique.

De ce fait, *D. geothermalis* ainsi que les autres déinocoques sont principalement cultivés en milieux complexes, en présence d'une ou plusieurs sources nutritives complexes telles que l'extrait de levure, la

tryptone ou la peptone (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997). Avec 2,5 g.L⁻¹ de tryptone et 2,5 g.L⁻¹ d'extrait de levure ajouté au milieu de Degryse (Tableau 5), Ferreira et ses co-auteurs rapportent un taux de croissance égal à 0,75 h⁻¹ pour la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, cultivée en fiole Erlenmeyer à 45 °C et pH 6,5 (Ferreira *et al.* 1997). Pour la croissance des souches thermophiles de *Deinococcus geothermalis*, ces mêmes auteurs rapportent que l'extrait de levure ne semble toutefois pas indispensable (Ferreira *et al.* 1997). Kongpol et ses collaborateurs ont montré la possibilité d'obtenir une croissance de *Deinococcus geothermalis* en absence d'extrait de levure ; cependant il s'avère que la croissance dans ces conditions est faible (Kongpol *et al.* 2008). Il a été reporté un taux de croissance égal à 0,12 h⁻¹ pour la croissance de *Deinococcus geothermalis* T27 en fiole Erlenmeyer dans un milieu riche HLB (Half-strength Luria-Bertani : 5 g.L⁻¹ de tryptone, 2,5 g.L⁻¹ d'extrait de levure, 5 g.L⁻¹ de NaCl), avec une température optimale de croissance de 45 °C et un pH optimum compris entre 6,0 et 6,5 (Kongpol *et al.* 2008).

I.4.6 Exigences nutritionnelles des microcoques

Les bactéries du genre *Deinococcus* ayant été préalablement classées dans le genre *Micrococcus*, les exigences nutritionnelles des microcoques ont été étudiées. Les premiers essais de détermination d'un milieu synthétique pour la culture de *Micrococcus lysodeiketicus* ont mis en évidence son incapacité à utiliser les sels d'ammonium comme unique source d'azote (Wolin and Naylor 1957). La présence d'acide glutamique ou de glutamine à une concentration égale à 1 % s'est révélée indispensable pour la croissance de la souche dans un milieu défini contenant 0,7 % de glucose. Une auxotrophie pour la biotine a également été révélée. Dans le milieu défini décrit dans le Tableau 10, 5.10⁹ cellules viables par mL ont été produites en 30 à 32 heures de culture.

Tableau 10 : Besoins nutritionnels de la souche *Micrococcus lysodeiketicus*

Constituants	Concentrations (g.L ⁻¹)
Glucose	7
Glutamate monosodique	10
K ₂ HPO ₄	2
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ (7 H ₂ O)	0,1
FeSO ₄ (7 H ₂ O)	0,004
MnCl ₂ (4 H ₂ O)	0,002
Biotine	1.10 ⁻⁴

Les résultats obtenus pour la définition d'un milieu de culture synthétique adapté à la croissance de *Micrococcus freudenreichii* ont montré que l'acide glutamique peut être utilisé comme source de carbone et d'azote, que les macro-éléments indispensables à la croissance sont le magnésium, le fer, le sodium et le

potassium, et que la souche est auxotrophe pour la thiamine et la biotine (McDonald 1960). La présence de méthionine permet d'augmenter la production de biomasse de *Micrococcus lysodeikticus* (McDonald 1963). Ces travaux ont montré également la capacité de cette souche à cataboliser le malate, le fumarate, l'oxaloacétate et l'alpha-cétoglutarate mais pas le citrate.

I.5 Cultures : Mise en œuvre et cinétiques

I.5.1 Conservation des souches et préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum comprend plusieurs étapes : la conservation de la souche, sa remise en culture et les différentes étapes de précultures avant l'inoculation du bioréacteur. Ces différentes étapes ont une influence significative sur les performances des procédés de fermentation (Orlowski and Barford 1987). Leur maîtrise assure une reproductibilité de l'inoculum essentielle pour standardiser le taux d'inoculation et optimiser le taux de croissance de la souche et la concentration en biomasse produite (Parton and Willis 1990). Les différentes étapes de l'inoculum doivent assurer la viabilité des cellules remises en culture depuis les stocks de conservation et la production de suffisamment de biomasse pour l'étape de culture ultérieure. De plus, la population microbienne produite par les précultures doit posséder les mêmes caractéristiques génotypiques et phénotypiques que celle qui a été initialement conservée dans la souchothèque (Hunt and Stieber 1986).

I.5.2 Les différents modes de culture

Les essais préliminaires ainsi que les inocula sont généralement réalisés en fioles Erlenmeyer bafflées. Les cultures en fioles peuvent être mises en œuvre rapidement et nécessitent peu de moyens. Cependant le pH du milieu de culture ne peut pas être régulé ; malgré l'utilisation de fioles Erlenmeyer bafflées, l'oxygénation du milieu devient vite le facteur limitant la croissance. Il n'est donc pas possible d'obtenir une concentration en biomasse élevée dans ces conditions et le comportement microbien ne peut être ni maîtrisé (effet substrat, accumulation de métabolites, etc.) ni aisément quantifié (contraintes de volumes limités de prélèvements)

Les cultures en bioréacteurs instrumentés sont les plus adaptées à la quantification pour la connaissance et la maîtrise des dynamiques microbiennes ; elles peuvent être réalisées selon trois modes principaux : le mode discontinu (batch), le mode discontinu alimenté (fed-batch) et le mode continu (chémostat). Les cultures en mode discontinu permettent les études des cinétiques de croissance et/ou production de métabolites des microorganismes en conditions maîtrisées ; l'aération, l'agitation, la température ainsi que le pH du milieu de culture peuvent être contrôlés au cours de la culture. Il n'y a aucun apport de solutions nutritives ce qui limite les risques de contamination. Néanmoins, ce mode de culture présente des inconvénients : la totalité du substrat étant initialement apportée, il est possible qu'une répression

métabolique de la croissance et/ou de la production par le substrat intervienne en limitant les performances avec, en plus, une accumulation de produits éventuellement toxiques dans le milieu de culture. Les cultures en mode discontinu alimenté peuvent palier à certains de ces inconvénients. Elles permettent de contrôler l'apport en substrat pour l'adapter aux besoins de la souche et pour maîtriser son taux de croissance et son comportement, en évitant un phénomène de répression ou d'inhibition ; elles permettent donc d'atteindre de hautes densités cellulaires et de hautes concentrations en produits. De plus, les réponses physiologique et métabolique des souches cultivées en fonction des modifications de leur environnement nutritionnel peuvent être étudiées (Korz *et al.* 1995; Lee *et al.* 1999; Riesenbergs and Guthke 1999). Les cultures en mode discontinu alimenté offrent une flexibilité essentielle quant au nombre de substrats d'alimentation et leur mode d'apport (débit constant, exponentiel, linéaire, pulses, etc.). Elles ne permettent cependant pas de s'affranchir d'une accumulation de composés ou co-produits toxiques dans le milieu qui pourraient ralentir la croissance ou plus généralement le métabolisme. La culture en mode continu permet de s'affranchir de ces contraintes, de maintenir un taux de croissance constant et le renouvellement des cellules. Par contre, dû à l'apport continu de milieu nutritif dans le bioréacteur, le risque de contamination est important et des mutations peuvent apparaître à cause de la durée de la culture. L'exploration reste évidemment contrainte par les valeurs du taux de croissance et donc du taux de dilution.

I.5.3 Respirométrie

La respirométrie est basée sur l'activité respiratoire des microorganismes mis en culture dans un bioréacteur. Le principe repose sur la mesure de la vitesse de consommation du dioxygène O₂ (Oxygen Uptake Rate – OUR). L'OUR est une caractéristique de l'état physiologique d'un microorganisme en culture car il mesure directement l'activité microbienne. Pendant la phase de croissance exponentielle, l'activité métabolique liée à la consommation du ou des substrat(s) est intense ce qui se traduit par une augmentation de l'OUR (Garcia-Ochoa *et al.* 2010). Les techniques de respirométrie sont employées pour caractériser la croissance et les cinétiques de dégradation de déchets organiques en traitement des eaux usées et des boues d'épuration (Marsili-Libelli and Vaggi 1997; Di Trapani *et al.* 2011; Tremier *et al.* 2005). Elles ont déjà été utilisées pour étudier la réponse d'un microorganisme à un changement de son environnement nutritionnel (Paca *et al.* 2010) tel que des pulses de solutions nutritives au cours d'une culture (Oliveira *et al.* 2011).

I.5.4 Croissance de *Deinococcus radiodurans* en bioréacteur

Une seule étude concernant la production d'une souche de déinocoque en bioréacteur a été publiée à ce jour ; elle porte sur l'optimisation de la production de biomasse de *Deinococcus radiodurans* (He 2009). La culture a été réalisée dans un bioréacteur de 20 L à partir d'un milieu complexe TGY (10 g.L⁻¹ tryptone, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure et 5 g.L⁻¹ de glucose).

Préalablement à la culture en bioréacteur, le milieu de culture a été optimisé par des essais en fioles : le milieu de base est le TY (10 g.L⁻¹ de tryptone et 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure) tamponné avec 50 mM d'HEPES. La meilleure croissance a été obtenue pour un milieu TY tamponné additionné de 10 g.L⁻¹ de glucose, 5 µM de manganèse et 0,5 g.L⁻¹ de magnésium, à savoir une DO_{600nm} finale de 42,2 contre seulement 9,95 pour un milieu TY + HEPES.

Dans un second temps, l'ajout de glutamate sous forme de Na-glutamate a été étudié par les auteurs mais il a provoqué une agrégation des cellules. Ayant un rôle important dans le métabolisme de *D. radiodurans* (Holland *et al.* 2006; Venkateswaran *et al.* 2000), le glutamate doit être ajouté au milieu de culture sous une autre forme que le Na-glutamate.

Un milieu de fermentation de composition initiale 10 g.L⁻¹ de tryptone, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure, 5 g.L⁻¹ de glucose, 0,5 g.L⁻¹ MgSO₄ (7 H₂O), 5 µM de MnCl₂ et 25 mM d'HEPES a donc été défini. L'ajout du glucose a été séquencé : aux 5 g.L⁻¹ initialement présents, 5 g.L⁻¹ ont été ajoutés 16 heures après l'inoculation du milieu. La culture a été réalisée dans un bioréacteur de volume utile 14 L, à 37 °C, le pH étant régulé à 7 avec ajout d'H₂SO₄ à 25 % et la pression partielle en oxygène dissous maintenue à 30 %. Les résultats de cette fermentation sont présentés sur la Figure 8 et la Figure 9.

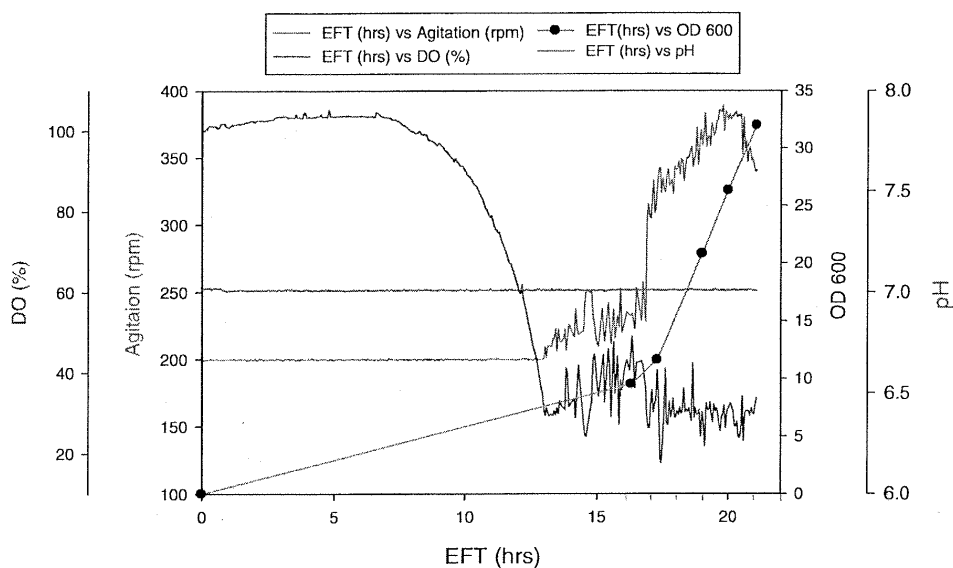


Figure 8 : Evolution de la DO_{600nm}, de l'agitation, du pH et de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps pour une culture de *Deinococcus radiodurans* en bioréacteur sur milieu complexe (source : He, 2009)

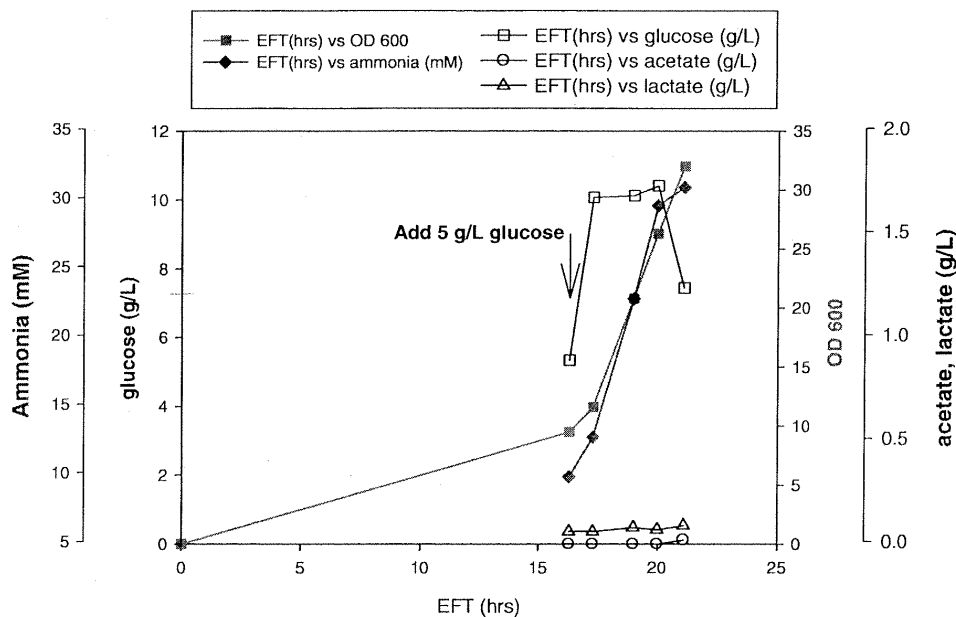


Figure 9 : Evolution la DO_{600nm} et des concentrations en glucose, ammoniac, acétate et lactate en fonction du temps pour une culture de *Deinococcus radiodurans* en bioréacteur sur milieu complexe (source : He 2009)

Comme le montrent ces figures, la culture peut être divisée en deux parties : durant les 20 premières heures de fermentation qui permettent d'atteindre une DO_{600nm} de 26, le glucose n'est pas consommé, la source carbonée préférentielle est le glutamate contenu dans l'extrait de levure et la tryptone, ce qui est confirmé par la production d'ammoniac durant la même période.

A la fin de la phase exponentielle de croissance, le glucose est partiellement consommé (il en reste environ 7 g.L^{-1} dans le milieu de culture) et la DO_{600nm} atteint la valeur de 32 après 21 heures de culture ; ce résultat représente 250 g de cellules pour 14 L de milieu de culture ou 18 g.L^{-1} de biomasse humide.

I.5.5 Influence des paramètres opératoires

Préalablement à l'optimisation du milieu de culture pour la croissance de *Deinococcus radiodurans* R1, Holland et ses collaborateurs ont déterminé la température optimale de croissance : trois températures ont été testées, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $35 \text{ }^\circ\text{C}$ et $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Cet essai a été effectué en construisant une souche mutante de *D. radiodurans* qui possède un gène rapporteur (gène codant pour la β -galactosidase) sous le contrôle d'un promoteur induit par un choc thermique. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ permet d'obtenir la croissance la plus rapide mais les résultats mettent en évidence une induction du promoteur avec une activité β -galactosidase qui est le double par rapport aux autres températures testées, $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ou $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Il n'y a donc pas eu de stress de type choc thermique à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ou $35 \text{ }^\circ\text{C}$; $35 \text{ }^\circ\text{C}$ a donc été choisie comme température optimale pour les expérimentations.

Deinococcus geothermalis est capable de se développer sur le milieu de Degryse 162 (Degryse *et al.* 1978), pour des températures comprises entre $30 \text{ }^\circ\text{C}$ et $55 \text{ }^\circ\text{C}$ avec un optimum compris entre $45 \text{ }^\circ\text{C}$ et $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Le pH

optimum pour la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 est égal à 6,5 (il n'y a pas de croissance à pH 4 ni à pH 9). Une autre souche de *D. geothermalis*, *D. geothermalis* T27, est capable de se développer jusqu'à 55 °C pour des pH compris entre 5 et 9.

I.6 Conclusions

Cette synthèse bibliographique a permis d'établir un état des lieux des connaissances des capacités exceptionnelles de résistance des déinocoques aux stress, stress liés à la présence de radioactivité, aux UV, à l'oxydation, aux températures et pH extrêmes, etc. Les résultats de plusieurs études concernant le métabolisme des bactéries du genre *Deinococcus*, principalement *Deinococcus radiodurans*, ont été reportés. Les métabolismes azotés et carbonés sont controversés ; bien que les déinocoques semblent capables dans un milieu défini d'assimiler des carbohydrates simples tels que le glucose et le fructose, les résultats ne sont pas toujours confirmés par tous les auteurs qui se sont intéressés à ce sujet. De plus, les performances d'assimilation des sources carbonées semblent difficilement reproductibles et les résultats mettent en évidence une variabilité inter-espèces importante. Les cinétiques de croissance et les performances en termes de production de biomasse et taux de croissance sont rarement présentées et disponibles dans les travaux publiés. Il ressort néanmoins que la croissance des déinocoques est favorisée par la présence de sources complexes telles que l'extrait de levure ou la tryptone. Les milieux définis synthétiques ne permettent pas d'obtenir une croissance comparable à celle obtenue en présence de ces substrats riches en protéines et acides aminés. Les acides aminés, et particulièrement la méthionine, améliorent la croissance des déinocoques ; les résultats décrits dans cette étude bibliographique mettent en évidence une auxotrophie pour la cobalamine, vitamine qui intervient dans la synthèse de la méthionine. Les résultats antérieurs montrent la nécessité d'améliorer les connaissances métaboliques des deinocoques pour comprendre leurs comportements. Une expérimentation pour une quantification rationnelle exige l'amélioration préalable des connaissances des besoins nutritionnels de ces microorganismes, l'ensemble des milieux décrits dans la littérature se révélant insuffisants pour réaliser une étude métabolique satisfaisante. La définition de la composition d'un milieu de culture parfaitement défini pour la culture des déinocoques en conditions maîtrisées et non limitantes reste donc aujourd'hui une étude indispensable préalable.

La souche *Deinococcus geothermalis* est capable de croître jusqu'à 55 °C. Sa mise en œuvre pour la production de bioéthanol ouvre des perspectives d'application originales par la réduction de la phase de refroidissement entre la liquéfaction-saccharification et la fermentation lors du procédé. Toutefois, l'état de l'Art fait nettement ressortir le besoin, avant d'explorer ses capacités éthanologènes, de maîtriser ses besoins nutritionnels et l'étude quantitative de son métabolisme.

De cet état de l'Art, il ressort plusieurs questionnements scientifiques auxquels ces travaux tenteront d'apporter des éléments de réponse :

- ⇒ Est-il possible de substituer les sources complexes présentes dans les milieux de culture par un ou plusieurs composés suffisants pour obtenir une croissance non limitée de *Deinococcus geothermalis* ?
- ⇒ Quel est l'influence du mode de conservation de la souche et de sa remise en culture sur les performances de croissance lors de cultures en milieu riche et en milieu défini ?
- ⇒ Existe-t-il une variabilité des performances de production et/ou de métabolisme intra-espèce ?
- ⇒ Quel mode de culture ou quelle stratégie de conduite peut-on déduire pour augmenter la production de biomasse de *Deinococcus geothermalis* et étudier les réponses du microorganisme à des perturbations de son environnement nutritionnel ?

En fonction des questions traitées, assimilation des substrats ou recherche de facteurs limitant la croissance, les méthodologies et modes de culture seront adaptés.

Chapitre II. Matériels et méthodes

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1 Souches	53
II.1.1 Description des souches.....	53
II.1.2 Conservation des souches	53
II.2 Milieux de culture.....	53
II.2.1 Milieu de remise en culture de la souche : milieu PGY.....	53
II.2.2 Milieu minimal défini (DM).....	53
II.2.3 Milieu complexe glucose (CMG)	55
II.2.4 Milieu chimiquement défini (MCD).....	55
II.2.5 Milieu de culture MM	57
II.2.6 Milieu de culture Little & Hanawalt	58
II.2.7 Vitamines	58
II.2.8 Fraction minérale de l'extrait de levure.....	59
II.2.9 Fractions d'extrait de levure (en fonction du poids moléculaire).....	59
II.2.10 Extrait cellulaire de <i>Deinococcus geothermalis</i>	60
A - Lyse des cellules par sonication (extrait cellulaire de <i>D. geothermalis</i> DSM 11300).....	60
B - Lyse des cellules par la presse de French (extrait cellulaire de <i>D. geothermalis</i> DSM 11302).....	60
II.2.11 Autolysat de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
II.2.12 Autolysat d' <i>Escherichia coli</i>	61
II.2.13 Base saline du milieu pour les cultures en bioréacteur.....	61
II.2.14 Solutions de glucose, d'extrait de levure et de sels.....	62
II.2.15 Détermination de la densité des solutions de substrat d'alimentation.....	63
II.2.16 Solutions d'ammoniaque et d'acide ortho-phosphorique.....	63
II.2.17 Théorie des facteurs d'excès.....	63
II.3 Conditions de culture.....	64
II.3.1 Précultures	64
II.3.2 Cultures en fioles Erlenmeyer	65
II.3.3 Description des bioréacteurs pour les cultures discontinues (batch).....	65
A - Bioréacteur B.Braun Biostat A de 2 L.....	65
B - Bioréacteur B.Braun Biostat A de 1,6 L.....	66
II.3.4 Description du bioréacteur pour les cultures discontinues alimentées (fed-batch).....	66
II.3.5 Acquisition des variables en ligne et commande du bioréacteur au cours de la culture discontinue alimentée	68
II.3.6 Echantillonnage	72
II.3.7 Analyse des gaz	72
A - Innova 1313.....	72
B - Analyseur EGAS8.....	73

II.4 Techniques analytiques de suivi de la culture.....	73
II.4.1 Détermination de la concentration en biomasse.....	73
A - Mesure turbidimétrique.....	73
B - Mesure gravimétrique.....	74
II.4.2 Détermination de la composition élémentaire de la biomasse.....	75
A - Echantillonnage et préparation des échantillons.....	75
B - Principe de l'analyse.....	75
C - Composition élémentaire de la biomasse.....	75
II.4.3 Dosage du substrat et des métabolites dans le milieu de culture.....	76
A - Dosage du glucose extracellulaire au cours de la fermentation.....	76
B - Dosage du glucose, de l'éthanol et des acides organiques par Chromatographie Liquide Haute Performance.....	76
II.4.4 Dosage des protéines.....	77
II.4.5 Dosage de l'azote ammoniacal.....	78
II.4.6 Dosage de l'azote total.....	78
A - Méthode de Kjeldahl.....	78
B - Analyseur automatique COT/NT mètre Shimadzu.....	79
II.4.7 Dosage du carbone organique total.....	79
II.4.8 Mesure de l'osmolalité du milieu de culture.....	80
II.5 Séquençage d'ADN génomique.....	80
II.5.1 Extraction de l'ADN.....	80
II.5.2 Préparation des librairies.....	80
II.5.3 Séquençage.....	81
II.5.4 Données fournies par le séquençage.....	81
II.6 Traitement des données.....	82
II.6.1 Analyse en Composantes Principales des formulations de milieux de culture.....	82
II.6.2 Traitement des données expérimentales des cultures en bioréacteur.....	83
A - Gaz de fermentation.....	83
A1 - Bilan pour un composé A du gaz.....	83
A2 - Bilan sur l'azote.....	84
A3 - Bilan sur l'oxygène.....	85
A4 - Bilan sur le dioxyde de carbone.....	86
B - Traitement de la variable "volume".....	87
C - Calculs des vitesses spécifiques et des rendements.....	88
D - Bilans élémentaires.....	89
E - Calcul du degré de réduction des composés.....	90
F - Lissage des données de fermentation.....	91

II.7 Détermination de la composition élémentaire de l'extrait de levure.....	91
II.7.1 Calcul théorique.....	91
II.7.2 Analyse élémentaire.....	92

Chapitre II. Matériels et méthodes

II.1 Souches

II.1.1 Description des souches

Les premières études expérimentales décrites dans ce rapport ont été effectuées avec la souche publique thermophile *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, dont la température optimale de croissance est de 45 °C. Cette souche provient de la souchothèque de Deinove (Deinolab, Montpellier).

Deux autres souches de deinocoques de collection, *Deinococcus geothermalis* DSM 11301 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, ont été commandées chez DSMZ (Allemagne) et utilisées pour les expérimentations.

II.1.2 Conservation des souches

Les souches sont stockées à - 80 °C dans un mélange 20 % glycérol stérile / 80 % PGY (bacto-Peptone 10 g.L⁻¹, Glucose 1 g.L⁻¹, Extrait de levure 5 g.L⁻¹). Elles sont ensuite repiquées sur boîte de Pétri sur milieu riche PGYA (PGY + Agar 14 g.L⁻¹). Les colonies isolées obtenues servent ensuite à l'inoculation des milieux de culture liquides.

II.2 Milieux de culture

II.2.1 Milieu de remise en culture de la souche : milieu PGY

Ce milieu riche est utilisé pour la remise en culture des souches ; il est composé de 1 g.L⁻¹ de glucose, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure et 10 g.L⁻¹ de bacto-peptone. Il est autoclavé 20 minutes à 121 °C, le glucose étant autoclavé séparément des autres éléments.

Ce milieu peut être utilisé pour des cultures sur boîtes de Pétri après ajout d'agar à 14 g.L⁻¹ (PGYA).

II.2.2 Milieu minimal défini (DM)

Le milieu minimal défini a été mis au point par l'équipe de Deinove (Deinolab, Montpellier) d'après les travaux de Holland et de ses collaborateurs en 2006 (Holland *et al.* 2006). Ce milieu est le principal milieu

défini servant de base à l'étude des besoins nutritionnels de *Deinococcus geothermalis*. Sa composition est donnée dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Préparation d'un litre de milieu de culture DM

Composés	Concentrations 1X (g.L ⁻¹)	Préparation sous forme de solution concentrée
K ₂ HPO ₄	1	/
Solution tampon MOPS		
- MOPS acid	8,371	
- NH ₄ Cl	1,070	
- NaOH	0,400	
- KOH	0,561	10 X
- CaCl ₂ (2 H ₂ O)	7,35.10 ⁻⁵	
- Na ₂ SO ₄	0,392	
- MgCl ₂ (6 H ₂ O)	0,107	
Micronutriments		
- (NH ₄) ₆ (Mo ₇)O ₂₄ (4 H ₂ O)	3,71.10 ⁻⁶	
- H ₃ BO ₃	2,47.10 ⁻⁶	
- CoCl ₂ (6 H ₂ O)	7,14.10 ⁻⁶	
- CuSO ₄ (5 H ₂ O)	2,50.10 ⁻⁶	10000 X
- MnCl ₂ (4 H ₂ O)	4,95.10 ⁻⁶	
- ZnSO ₄ (7 H ₂ O)	2,88.10 ⁻⁶	
Solution de fer III		
- FeCl ₃	3,24.10 ⁻³	
- C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ (2 H ₂ O)	5,88.10 ⁻³	100 X
Vitamines		
- D-Biotine	1.10 ⁻⁶	10000 X
- Niacine	1.10 ⁻⁶	10000 X
- Pyridoxal HCl	1.10 ⁻⁶	10000 X
- Thiamine HCl	1.10 ⁻⁶	10000 X
- Cobalamine	1.10 ⁻⁶	10000 X

Pour le milieu DMG, le glucose est ajouté à une concentration de 10 g.L⁻¹. Lors des tests d'assimilation d'autres sources carbonées, ces sources carbonées sont ajoutées au milieu DM à une concentration de 10 g.L⁻¹.

La source carbonée et le K₂HPO₄ sont préparés dans de l'eau osmosée et les solutions sont autoclavées 20 minutes à 120 °C.

Les autres solutions (tampon MOPS 10 X, FeCl₃ 100 X, micronutriments 10000 X et vitamines) sont stérilisées par filtration (Minisart 0,2 µm, Sartorius, Allemagne) et ajoutées au milieu de culture. Le pH de ce milieu est égal à 7,2.

II.2.3 Milieu complexe glucose (CMG)

Le milieu complexe glucose a la même composition que le milieu minimal défini avec glucose auquel il faut ajouter 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure et 2 g.L⁻¹ de bacto-peptone.

Ce milieu complexe est utilisé essentiellement pour les précultures de 1 mL en tubes et les précultures de 10 mL réalisées en fioles Erlenmeyer.

II.2.4 Milieu chimiquement défini (MCD)

Le milieu chimiquement défini ou MCD décrit dans le Tableau 12 ci-après a été initialement développé pour la culture des bactéries lactiques, bactéries nutritionnellement exigeantes. En plus des sels et des oligo-éléments, il contient de nombreux acides aminés et vitamines, la source carbonée étant le glucose. Il est utilisé pour la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300.

Tableau 12 : Préparation d'un litre de milieu de culture MCD

Composés	Concentrations 1X (g.L ⁻¹)	Préparation sous forme de solution concentrée
Glucose	10	10 X
Acétate de sodium	1,0	
Citrate d'ammonium	0,6	
KH ₂ PO ₄	3,0	10 X
K ₂ HPO ₄	2,5	
MgCl ₂ (6 H ₂ O)	0,2000	
FeSO ₄ (7 H ₂ O)	0,0110	
CaCl ₂ (2 H ₂ O)	0,0500	50 X
ZnSO ₄ (7 H ₂ O)	0,0050	
CoCl ₂ (6 H ₂ O)	0,0025	
Alanine	0,24	
Arginine	0,12	
Asparagine	0,34	
Glutamine	0,51	
Glycine	0,17	
Histidine	0,11	
Isoleucine	0,20	
Leucine	0,47	20 X
Lysine	0,35	
Méthionine	0,12	
Proline	0,68	
Sérine	0,34	
Thréonine	0,23	
Tryptophane	0,05	
Valine	0,33	
Phénylalanine	0,28	20 X
Tyrosine	0,29	20 X
Adénine	0,010	
Guanine	0,010	
Uracile	0,010	50 X
Xanthine	0,010	
Acide P-aminobenzoïque	0,0100	
Biotine	0,0100	
Cyano-cobalamine	0,0010	
Acide folique	0,0010	
Inosine	0,0050	
Acide nicotinique	0,0010	
Acide orotique	0,0050	
Pantothénate de calcium	0,0010	20 X
Pyridoxamine	0,0050	
Pyridoxine	0,0020	
Riboflavine	0,0010	
Thiamine	0,0010	
Acide D,L 6-8 thioctique	0,0025	
Thymidine	0,0050	
Cystéine	0,17	20 X

Les composés sont préparés sous forme de solutions concentrées qui sont mélangées au dernier moment et le volume de milieu est ajusté au volume final souhaité avec de l'eau distillée.

II.2.5 Milieu de culture MM

Le milieu MM a été mis au point au laboratoire pour la culture d'*Escherichia coli* ; ce milieu est utilisé tel qu'il est décrit dans le Tableau 13 ou concentré deux fois ou dilué au demi afin de faire varier la pression osmotique pour la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300.

Tableau 13 : Préparation d'un litre de milieu de culture MM

Composés	Concentrations (g.L ⁻¹)
Acide citrique C ₆ H ₈ O ₇	3,00
<u>Sels A</u>	
K ₂ HPO ₄	4,000
Na ₂ HPO ₄	1,000
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,375
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,000
NH ₄ Cl	0,065
<u>Sels B</u> (préparation sous forme de solutions stocks concentrées, stérilisées par filtration)	
MgSO ₄ (7 H ₂ O) (500 X)	0,50
CaCl ₂ (2 H ₂ O) (1000 X)	0,02
FeSO ₄ (7 H ₂ O) (1000 X, stérilisé par filtration après acidification par HCl, pH 2)	0,02
<u>Oligo-éléments</u> (préparation sous forme de solutions stocks concentrées 1000 X, stérilisées par filtration)	
MnSO ₄ (H ₂ O)	0,0100
CoCl ₂ (6 H ₂ O)	0,0040
ZnSO ₄ (7 H ₂ O)	0,0020
Na ₂ MoO ₄ (2 H ₂ O)	0,0020
CuCl ₂ (2 H ₂ O)	0,0010
H ₃ BO ₃	0,0005

II.2.6 Milieu de culture Little & Hanawalt

Ce milieu, dont la composition figure dans le Tableau 14, a été décrit dans la littérature pour la culture de *Deinococcus radiodurans* (Little and Hanawalt 1973). Il est testé pour la culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300.

Tableau 14 : Milieu de croissance de *Deinococcus radiodurans* décrit par Little and Hanawalt (1973)

Composés	Concentrations (g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ (7 H ₂ O)	0,2
FeSO ₄ (7 H ₂ O)	0,010
MnSO ₄ (H ₂ O)	7,6.10 ⁻⁶
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5
Glucose	5,0
L-Acide glutamique	0,5
L-Méthionine	0,010
Thiamine HCl	10.10 ⁻⁶
Biotine	10.10 ⁻⁶
Niacine	0,25.10 ⁻³
Pyridoxine	0,20.10 ⁻³
Cobalamine	0,20.10 ⁻³
Acide folique	10.10 ⁻⁶
Casamino Acids vitamin-free	1

II.2.7 Vitamines

Deux cocktails de vitamines sont utilisés, un pour le milieu défini DM (Tableau 15) et un pour le milieu MM (Tableau 16). Ces solutions de vitamines sont conservées à 4 °C à l'abri de la lumière.

Tableau 15 : Solutions de vitamines concentrées ajoutées au milieu DM

Vitamines	Concentrations (g.L ⁻¹)	Préparation sous forme de solution concentrée
D-biotine	0,010	(10000 X)
Niacine	0,010	(10000 X)
Pyridoxal HCl	0,010	(10000 X)
Thiamine HCl	0,010	(10000 X)
Cobalamine	0,010	(10000 X)

Tableau 16 : Solutions de vitamines concentrées ajoutées au milieu MM

Vitamines	Concentrations (g.L ⁻¹)	Préparation sous forme de solution concentrée
D-biotine	0,010	(200 X)
Niacine	10	(10000 X)
Pyridoxal HCl	10	(10000 X)
Thiamine HCl	10	(10000 X)
Cobalamine	1	(1000 X)

II.2.8 Fraction minérale de l'extrait de levure

La fraction minérale est obtenue par calcination de l'extrait de levure. La méthode consiste à réduire l'échantillon en cendres sous l'effet de la chaleur à 550 °C (en vue de décomposer la matière organique), puis à remettre en solution le résidu inorganique dans un volume approprié d'une solution d'acide.

Les creusets à incinération ainsi que l'extrait de levure sont préalablement séchés à 60 °C dans une étuve sous vide (Pression 200 mmHg, Heraeus, USA). L'échantillon est ensuite pesé dans un creuset préalablement taré et placé dans le four à moufle (Nabertherm Modèle L5/11 Controller B170). Le four est programmé pour une montée en température progressive (rampe passant de la température ambiante à 550 °C en 2 heures). Cette température de calcination est maintenue jusqu'à obtention de cendres blanches (plateau de 12 heures à 550 °C). Après refroidissement du four, les échantillons sont retirés et les creusets sont laissés dans un dessiccateur jusqu'à leur refroidissement. Ils sont alors pesés immédiatement.

Le poids du résidu est calculé en déduisant la tare et le résultat est exprimé en pour cent de l'échantillon.

Une fois les échantillons pesés, les cendres obtenues sont remises en solution. Elles sont humidifiées avec l'acide concentré (HCl ou HNO₃) jusqu'à leur dissolution complète puis diluées au volume approprié avec de l'eau ultra pure (18,2 MΩ.cm, Millipore, Allemagne).

II.2.9 Fractions d'extrait de levure (en fonction du poids moléculaire)

Le fractionnement de l'extrait de levure est réalisé à partir d'une solution concentrée d'extrait de levure à 200 g.L⁻¹.

Cette solution est fractionnée grâce à des unités d'ultrafiltration à centrifuger de type Amicon Ultra-15 (Millipore, USA) ou Microsep Centrifugal Devices (Pall Life Sciences, USA). Les seuils de coupure sont 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa et 3 kDa.

Les tubes Amicon sont centrifugés à 5000 g pendant 30 minutes et les tubes Microsep Centrifugal Devices sont centrifugés à 5000 g pendant 120 minutes.

Les solutions de concentrât et de filtrat sont récupérées et diluées dans de l'eau ultra pure (18,2 MΩ.cm, Millipore, Allemagne) stérile pour être équivalentes à des solutions à 200 g.L⁻¹ d'extrait de levure. Elles sont stérilisées par filtration (filtres Minisart 0,2 µm).

II.2.10 Extrait cellulaire de *Deinococcus geothermalis*

L'extrait cellulaire de *Deinococcus geothermalis* est préparé à partir d'une culture de 24 heures sur milieu CMG à 37 °C.

Le milieu de culture est centrifugé (15 minutes à 4000 g à 4 °C), le culot cellulaire est rincé trois fois à l'eau physiologique stérile (9 g.L⁻¹ NaCl) puis remis en suspension dans une solution tampon (eau physiologique + MOPS 40 mM).

A - Lyse des cellules par sonication (extrait cellulaire de *D. geothermalis* DSM 11300)

Pour la lyse cellulaire, l'échantillon de culture est placé dans un pot stérile de 40 mL maintenu au froid dans de la glace. Les cellules sont cassées grâce à un sonicateur (sonde ultrasonique Ø 13 mm Bioblock Scientific Vibra Cell 72434). La sonde permet d'émulsifier, de dégazer le liquide dans lequel elle est plongée et de casser les cellules biologiques en suspension. L'échantillon est soumis à 30 cycles de sonication : 20 secondes de pulse suivies de 20 secondes d'arrêt (amplitude 32 %).

L'extrait cellulaire ainsi obtenu est stérilisé par autoclavage 20 minutes à 121 °C.

B - Lyse des cellules par la presse de French (extrait cellulaire de *D. geothermalis* DSM 11302)

Les cellules biologiques sont cassées sous une pression choisie. En effet la presse de French provoque la lyse des cellules par passage forcé sous une forte pression par un petit orifice. L'échantillon est donc soumis à 3 cycles de casse successifs à une pression de 10000 psi imposée par la presse de French (220 V, 50 Hz, modèle FA-078A-E Thermo electron corporation). L'efficacité de lyse des cellules est évaluée par observations microscopiques.

II.2.11 Autolysat de *Saccharomyces cerevisiae*

La souche utilisée pour cet autolysat est la levure *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D. Après 4 heures de croissance à 30 °C dans le milieu YPD (extrait de levure 10 g.L⁻¹, bacto-peptone 20 g.L⁻¹ et glucose 100 g.L⁻¹), la culture de *Saccharomyces cerevisiae* est centrifugée 10 minutes à 4000 g. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est suspendu dans du tampon citrate 0,1 M à pH 5. L'autolyse est obtenue en incubant

la suspension ainsi obtenue à 52 °C pendant 72 heures sous une agitation de 140 rpm (Vosti and Joslyn 1954).

II.2.12 Autolysat d'*Escherichia coli*

La souche utilisée pour cet autolysat est la bactérie *Escherichia coli* K12. Après 12 heures de croissance à 37 °C dans le milieu LB (tryptone 10 g.L⁻¹, extrait de levure 5 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹ et glucose 10 g.L⁻¹), le moût de culture est centrifugé 10 minutes à 4000 g et le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est remis en suspension dans de l'eau ultra pure (volume correspondant à 50 % du volume centrifugé), puis après 15 secondes un même volume de tampon acétate de sodium 0,5 M pH 6,5 est ajouté. L'autolyse est réalisée en incubant la suspension ainsi obtenue à 37 °C pendant 48 heures sans agitation (Leduc and van Heijenoort 1980).

II.2.13 Base saline du milieu pour les cultures en bioréacteur

Ce milieu de base est utilisé pour les cultures discontinues alimentées, il s'agit du milieu initial introduit dans le fermenteur. Il peut être utilisé pour les précultures également. Sa composition est décrite dans le Tableau 17 ci après.

Tableau 17 : Composition de la base saline du milieu pour les cultures discontinues alimentées

Composés	Concentrations (g.L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	1,000
NH ₄ Cl	1,081
NaCl	0,584
KCl	0,753
Na ₂ SO ₄	0,039
MgCl ₂ (6 H ₂ O)	0,107
CaCl ₂ (2 H ₂ O)	7,4.10 ⁻⁵

Le pH du milieu est ajusté à 6,8 pour éviter sa précipitation

Remarque : le CaCl₂ (2 H₂O) est préparé sous forme de solution concentrée 1000 X, c'est-à-dire à 0,735 g.L⁻¹, avant d'être ajouté au milieu.

Pour les précultures, à ce milieu de base sont ajoutés plusieurs éléments :

- MOPS (pouvoir tampon) : 8,37 g.L⁻¹
- Extrait de levure : 5 g.L⁻¹
- Glucose : 4 g.L⁻¹

- Micronutriments 10000 X
- Citrate de fer 100 X
- Vitamines 10000 X

Pour la culture en bioréacteur, sont ajoutés au milieu initial avant l'inoculation :

- Citrate de fer 100 X
- Micronutriments 10000 X
- Vitamines 10000 X

II.2.14 Solutions de glucose, d'extrait de levure et de sels

Afin de limiter le volume ajouté lors de l'alimentation en substrats, les solutions sont concentrées au maximum. La solution de glucose est préparée à une concentration de 700 g.L⁻¹ et la solution d'extrait de levure est préparée à une concentration de 385 g.L⁻¹.

La composition de la solution saline d'alimentation a été déterminée théoriquement grâce à un logiciel mis au point au laboratoire, de manière à correspondre au mieux à un apport suffisant et équilibré de chacun des éléments (cf. § II.2.17 théorie des facteurs d'excès). Les sels présents dans l'extrait de levure n'étant pas forcément assimilables par les deinocoques, le Tableau 18 présente la composition de la solution saline d'alimentation dans l'hypothèse où les sels de l'extrait de levure ne seraient pas assimilés par les deinocoques.

Tableau 18 : Composition de la solution saline d'alimentation

Composés	Concentrations (g.L ⁻¹)
CaCl ₂ (2 H ₂ O)	2,481
CoCl ₂ (6 H ₂ O)	0,027
ZnSO ₄ (7 H ₂ O)	4,547
H ₃ BO ₃	0,024
MgCl ₂	7,232
FeCl ₃	2,443
MnCl ₂ (4 H ₂ O)	0,236
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,042
NaCl	12,35
H ₃ PO ₄	44,00
H ₂ SO ₄	22,00
Trisodium citrate (2 H ₂ O)	4,468

Le pH de la solution saline est égal à 1.

II.2.15 Détermination de la densité des solutions de substrat d'alimentation

La masse volumique des solutions d'alimentation est déterminée grâce à un densimètre DE40 (Metler, Toledo, USA). Cette mesure de masse volumique est basée sur la mesure d'une oscillation mécanique d'un tube en « U » sur lequel est fixé un aimant. Ce tube en « U » est une cellule de mesure avec un volume intérieur défini et constant pour une température donnée. L'appareil est calibré avec de l'air et de l'eau à la température de travail préalablement définie.

II.2.16 Solutions d'ammoniaque et d'acide ortho-phosphorique

Pour la régulation du pH, deux solutions sont préparées : une solution d'ammoniaque à 14 % (7,3 mol.L⁻¹) et une solution d'acide ortho-phosphorique à 8,5 % (1,47 mol.L⁻¹).

II.2.17 Théorie des facteurs d'excès

Les éléments qui composent les milieux de culture peuvent être classés en trois catégories :

- les éléments constitutifs : ce sont les éléments essentiels pour la production de biomasse, à savoir le carbone, l'oxygène, l'hydrogène, l'azote, le soufre et le phosphore ;
- les éléments catalytiques : ce sont principalement les éléments qui interviennent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques, tels que le fer, le cuivre, le magnésium, le manganèse ou encore le cobalt ;
- les autres éléments, qui permettent de maintenir l'homéostasie cellulaire (le sodium, le potassium, etc.).

Lors de la formulation d'un milieu de culture, il faut veiller à avoir un certain équilibre entre les différents composés afin d'éviter d'avoir des éléments en quantité insuffisante ce qui induirait une limitation, ou en excès ce qui pourrait provoquer une toxicité (pression osmotique trop élevée par exemple). Pour cela il est possible de calculer les facteurs d'excès.

Le facteur d'excès F d'un élément est défini comme étant le rapport entre la concentration de cet élément dans le milieu de culture $[E]$ multipliée par le rendement de production de biomasse à partir de cet élément $Y_{E,X}$, le tout divisé par le produit entre la concentration de l'élément carbone présent dans le milieu $[C]$ et le rendement de production de biomasse à partir du carbone $Y_{C,X}$ (le carbone est considéré comme l'élément limitant du milieu de culture). Le facteur d'excès de l'élément carbone est alors égal à 1. Pour les autres éléments, si le facteur d'excès est supérieur à 1, cela indique que l'élément considéré est présent en quantité suffisante dans le milieu pour permettre la croissance du microorganisme étudié alors que si le facteur d'excès est inférieur à 1, cela signifie que l'élément est potentiellement limitant.

$$F = \frac{[E] \times Y_{E,X}}{[C] \times Y_{C,X}}$$

Les milieux complexes et définis testés présentent des formulations assez variées avec des éléments qui n'ont pas les mêmes concentrations. Afin d'évaluer l'équilibre entre les différents composés d'un milieu de culture, les facteurs d'excès des éléments principaux ont été calculés.

Les grandeurs $Y_{E,X}$ et $Y_{C,X}$ n'étant pas connues pour le genre bactérien *Deinococcus*, elles ont été estimées à partir des données disponibles pour la culture d'*Escherichia coli* dont les besoins nutritionnels sont définis.

II.3 Conditions de culture

II.3.1 Précultures

Les précultures sont réalisées successivement en tubes puis en fioles Erlenmeyer dans le milieu CMG à 45 °C et sous agitation (110 rpm), à partir d'une colonie isolée sur PGYA après 48 heures de croissance. Le taux d'inoculation est de 10 % v/v.

Les protocoles d'ensemencement de cultures en fioles Erlenmeyer ou en bioréacteur sont représentés respectivement sur les Figure 10 et Figure 11 ci-après :

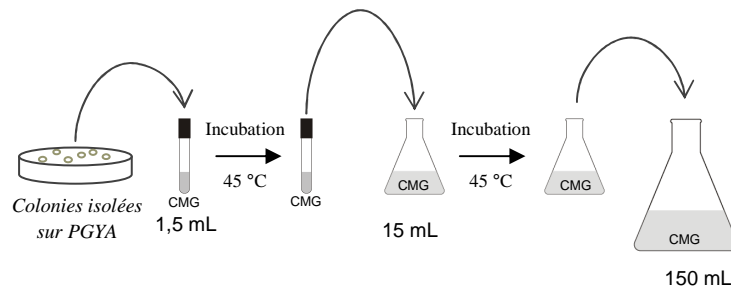


Figure 10 : Protocole d'ensemencement de cultures en fioles Erlenmeyer

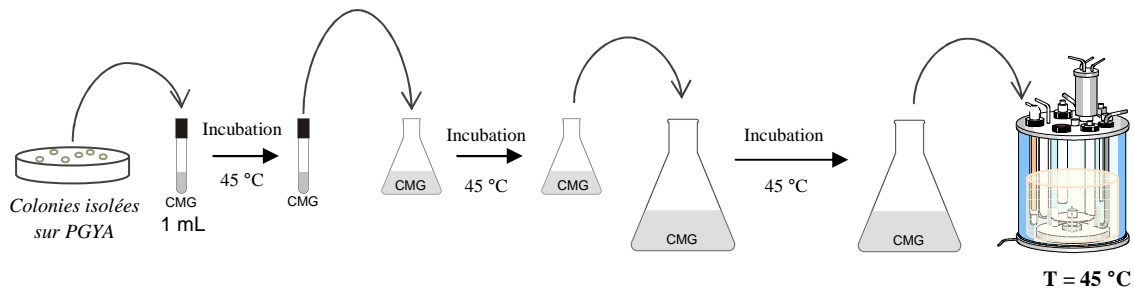


Figure 11 : Protocole d'ensemencement de cultures en bioréacteur

II.3.2 Cultures en fioles Erlenmeyer

Pour les cultures en fioles Erlenmeyer, les précultures sont réalisées comme décrit précédemment. Ces précultures servent d'inoculum pour le milieu préparé et stérilisé dans des fioles Erlenmeyer bafflées, à raison de 150 mL de milieu dans une fiole de 1 L. Le taux d'inoculum est fixé à 10 % (v/v). Les cultures sont incubées à 45 °C avec une agitation de 110 rpm.

II.3.3 Description des bioréacteurs pour les cultures discontinues (batch)

A - Bioréacteur B.Braun Biostat A de 2 L

Les cultures discontinues d'un volume de 1,8 L sont réalisées dans un bioréacteur B.Braun Biostat A (B.Braun Biotech International, Germany) de volume utile 2 L.

Le réacteur est équipé d'une unité de contrôle et de mesure Micro DCU-300, d'une sonde de température (Biotech International, Germany) et de sondes de mesure de l'oxygène dissous et du pH (Broadley-James Corporation, USA). L'agitation et l'aération sont réglées pour assurer un apport suffisant en oxygène mais aucune régulation pH n'est appliquée. Le système d'agitation est composé de quatre contre-pâles et une hélice marine à trois pâles. La température est réglée à 45 °C par un système de ceinture chauffante.

En cas de formation de mousse au cours de la culture, le struktol J673 (Struktol, Germany) est utilisé comme agent anti-mousse et ajouté directement à l'aide d'une seringue. Les paramètres du fermenteur sont contrôlés via le Micro DCU-300. Les suivis en ligne ainsi que les acquisitions des données de culture sont réalisés grâce à une connexion à un ordinateur équipé du logiciel MFCS/win 1.1.

B - Bioréacteur B.Braun Biostat Bplus de 1,6 L

Le fermenteur utilisé est un fermenteur Biostat Bplus B.Braun (Sartorius, Allemagne) de 1,6 L de volume total et 1 L de volume utile. Le réacteur est équipé d'un système d'agitation composé de deux turbines de type Rushton et quatre contre-pâles. La température est mesurée par une sonde et régulée à 45 °C par un système de double enveloppe. Le pH est mesuré en ligne grâce à une sonde pH (Broadley James, USA) et régulé à 6,8 par ajout d'ammoniaque (14 % vol/vol) ou d'acide orthophosphorique 2 M grâce à des pompes péristaltiques installées sur le DCU du fermenteur. La pression partielle en oxygène dissous dans le milieu de culture est mesurée par une sonde ampérométrique (électrode électrochimique, OxyFerm FDA 160, Hamilton, Suisse). Les contrôles et les commandes des paramètres du fermenteur sont réalisés avec le DCU du fermenteur. L'acquisition des données en ligne est réalisée grâce au logiciel MFCS/win 2.1.

II.3.4 Description du bioréacteur pour les cultures discontinues alimentées (fed-batch)

Les cultures en mode discontinu alimenté (fed-batch) sont réalisées dans un bioréacteur Biostat E (B.Braun Biotech International, Melsungen, Allemagne) d'un volume utile de 20 L, stérilisable en place. Ce réacteur est équipé d'un module d'agitation composé de trois turbines de type Rhuston et de systèmes de refroidissement et de chauffage par double enveloppe qui permettent de réguler la température. La température de l'eau qui circule dans la double enveloppe est ajustée par un système d'échangeur à plaques et un bain thermostaté.

Le réacteur est connecté à des modules de mesures et de régulations, permettant d'avoir un suivi en ligne et un contrôle des différents paramètres au cours de la culture (température, pH, pression partielle en oxygène dissous dans le milieu, pression). Ces mesures sont effectuées par des sondes dont une sonde pH FermProbe F600 (Broadley-James Corporation, Irvine, Etats-Unis), une sonde de mesure de l'oxygène dissous Oxyprobe D435 (Broadley-James Corporation, Irvine, Etats-Unis) et une sonde de température (Biotech International).

La régulation du pH est assurée par deux pompes péristaltiques permettant l'apport d'ammoniaque pour l'une et l'apport d'acide ortho-phosphorique pour l'autre.

En cas de détection d'un niveau élevé de mousse par la sonde anti-mousse, une troisième pompe péristaltique permet l'apport d'anti-mousse (struktol).

L'alimentation en substrats du réacteur est contrôlée par 4 pompes :

- une première pompe (Masterflex 7521-35 - Masterflex, Gelsenkirchen, Allemagne) est utilisée lors des pulses et permet un apport rapide de substrat dans le milieu (débit maximal 5 L.h⁻¹),

- une seconde pompe (FE411 - B.Braun Biotech International, Melsungen, Allemagne) permet d'ajuster le débit à une valeur plus précise pour un apport continu de ce même substrat (débit maximal $0,5 \text{ L.h}^{-1}$),

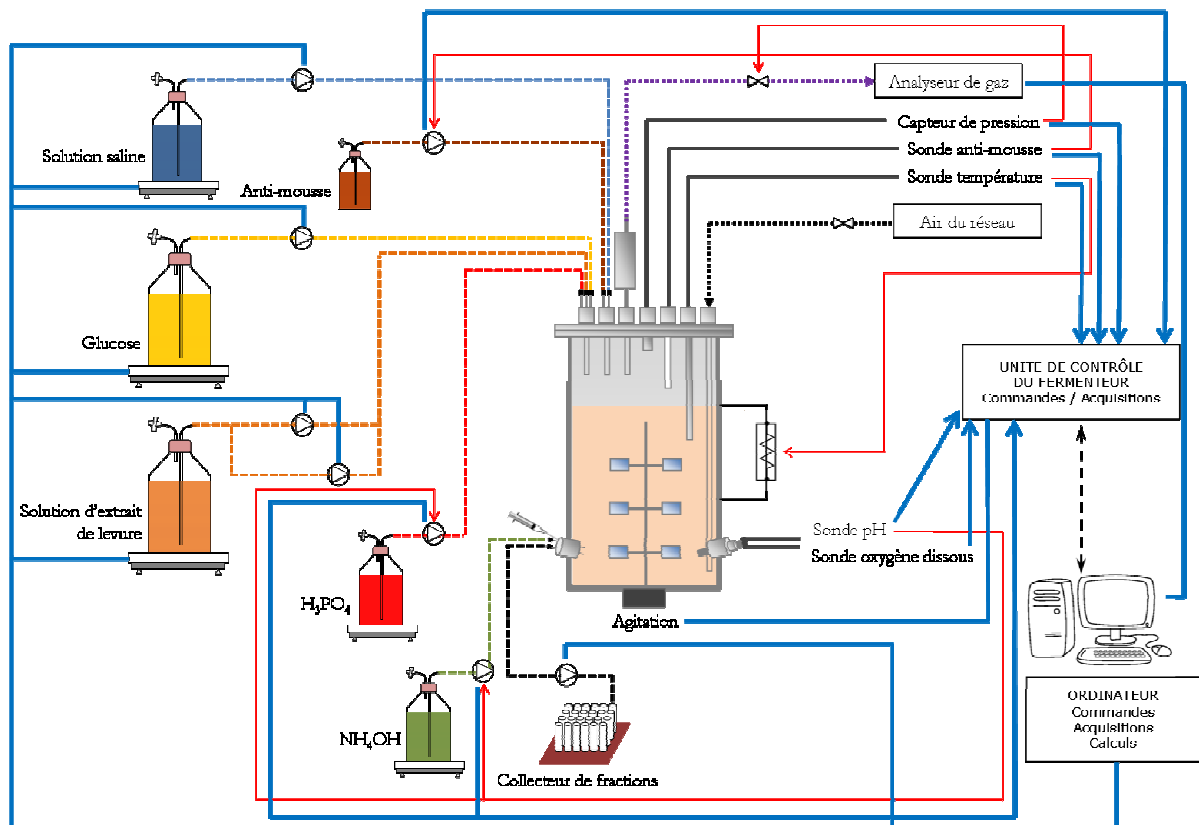
- une troisième pompe (Minipulse 3 - Gilson, Middleton, Etats-Unis) permet un apport précis et contrôlé d'un co-substrat,

- une quatrième pompe (Minipulse 3 - Gilson, Middleton, Etats-Unis) permet l'apport de la solution saline concentrée, son débit pouvant être asservi à celui des autres pompes (pour les cultures de *Deinococcus geothermalis*, l'alimentation en sels est asservie sur celle de l'extrait de levure, 1 volume de sels est apporté pour 10 volumes de solution d'extrait de levure).

Les bouteilles de solutions de substrats et d'ammoniaque sont placées sur des balances (modèles CP 2202 S, I 12000 S et IB 16000 S - Sartorius, Aubagne, France), l'acquisition en ligne de la masse des bouteilles permettant d'estimer le débit massique des solutions ajoutées au milieu de culture.

Le débit d'air entrant est mesuré et contrôlé par un débit mètre massique (5850 TR - Brooks Instrument, Hatfield, Etats-Unis).

L'ensemble du système est représenté sur la Figure 12.



- Alimentation en solution saline
- Alimentation en solution d'extrait de levures
- Alimentation en solution de glucose
- Apport d'anti-mousse
- Apport de solution acide
- Apport de solution basique
- Echantillonnage
- Gaz en sortie du fermenteur
- Air en entrée du fermenteur
- Capteurs / Sondes
- Acquisition / Commande
- Régulation
- ⊗ Débitmètre

Figure 12 : Schéma de l'ensemble du système bioréacteur pour les cultures discontinues alimentées

II.3.5 Acquisition des variables en ligne et commande du bioréacteur au cours de la culture discontinue alimentée

Les systèmes de mesure en ligne du bioréacteur sont connectés à un ordinateur par une interface analogique/digital. L'ordinateur est équipé d'un logiciel développé au laboratoire, le logiciel fed2s, qui permet l'acquisition des variables. Au cours de la culture, il est donc possible d'accéder à de nombreux signaux, soit directement à leurs valeurs brutes, soit à leurs dérivées et/ou intégrales. L'acquisition de ces mesures en ligne permet également, via les bilans matières, l'estimation des vitesses de consommation de

substrat, de production de dioxyde de carbone, du taux de croissance à partir de la production de CO₂, etc. Le Tableau 19 résume les principales variables disponibles en ligne.

Tableau 19 : Variables disponibles en ligne et leurs unités

Paramètres Fermenteur	Unités	Paramètres Balances	Unités	Paramètres Gaz	Unités
Température	°C	Masse initiale substrat 1	g	Pourcentage N ₂	%
Agitation	rpm	Masse actuelle substrat 1	g	Pourcentage O ₂	%
pH		Masse substrat ajouté 1	g	Pourcentage CO ₂	%
Oxygène dissous	%	Concentration équivalente substrat 1	g.L ⁻¹	Vitesse O ₂	mol.h ⁻¹
Pression	mb	Carbone ajouté S1	mol	Vitesse CO ₂	mol.h ⁻¹
Antimousse	s	Carbone ajouté S1	mol.L ⁻¹	μ (/CO ₂)	h ⁻¹
Base temps marche	s	Masse initiale substrat 2	g	Coefficient respiratoire	
Acide temps marche	s	Masse actuelle substrat 2	g	kLa	h ⁻¹
Débit entrant aération	nL.h ⁻¹	Masse substrat ajouté 2	g	Intégrale O ₂	mol.h ⁻¹
Volume base	mL	Concentration équivalente substrat 2	g.L ⁻¹	Intégrale CO ₂	mol.h ⁻¹
Volume acide	mL	Carbone ajouté S2	mol	Vitesse O ₂	mol.L ⁻¹ .h ⁻¹
		Carbone ajouté S2	mol.L ⁻¹	Vitesse CO ₂	mol.L ⁻¹ .h ⁻¹
		Carbone résiduel	mol.L ⁻¹		
		Volume fermenteur	L		
		C résiduel / C ajouté	g.g ⁻¹		
		C accumulé / C ajouté	g.g ⁻¹		

Le logiciel fed2s permet également la commande des pompes d'alimentation en substrats ; il est configuré pour quatre modes d'alimentation représentés sur la Figure 13.

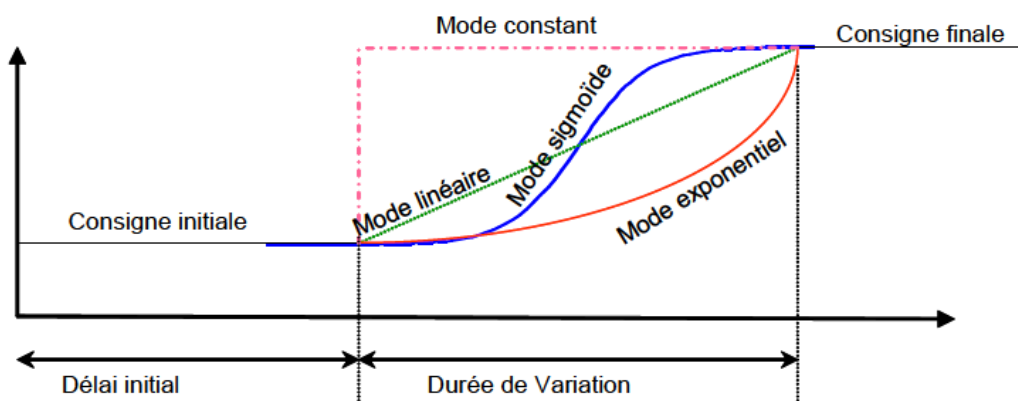


Figure 13 : Représentation des quatre modes de commande des pompes d'alimentation gérés par le logiciel fed2s

Le mode de commande d'alimentation des pompes en substrats utilisé pour les cultures discontinues alimentées de *Deinococcus geothermalis* est le mode constant. Il permet l'apport de la quantité de substrat adaptée à la demande biologique du microorganisme pour maintenir une croissance non limitée. Cette commande fonctionne par cycles successifs. Lors du premier cycle, une quantité connue de substrat est ajoutée par pulse au milieu de culture. Si ce substrat est le facteur limitant, le pulse se traduit par une croissance du microorganisme et une consommation de l'oxygène dissous dans le milieu de culture. Aussitôt le substrat épuisé, la croissance est limitée ce qui se traduit par une remontée de la valeur de la pO_2 ; c'est la fin du premier cycle d'alimentation. Le logiciel calcule alors la vitesse de consommation du substrat au cours de ce cycle en prenant en compte la quantité de substrat consommée et la durée du cycle. Ce calcul lui permet de relancer un second cycle avec un débit d'alimentation adapté à la vitesse de consommation du substrat par le microorganisme. L'organigramme de la commande est schématisé sur la Figure 14.

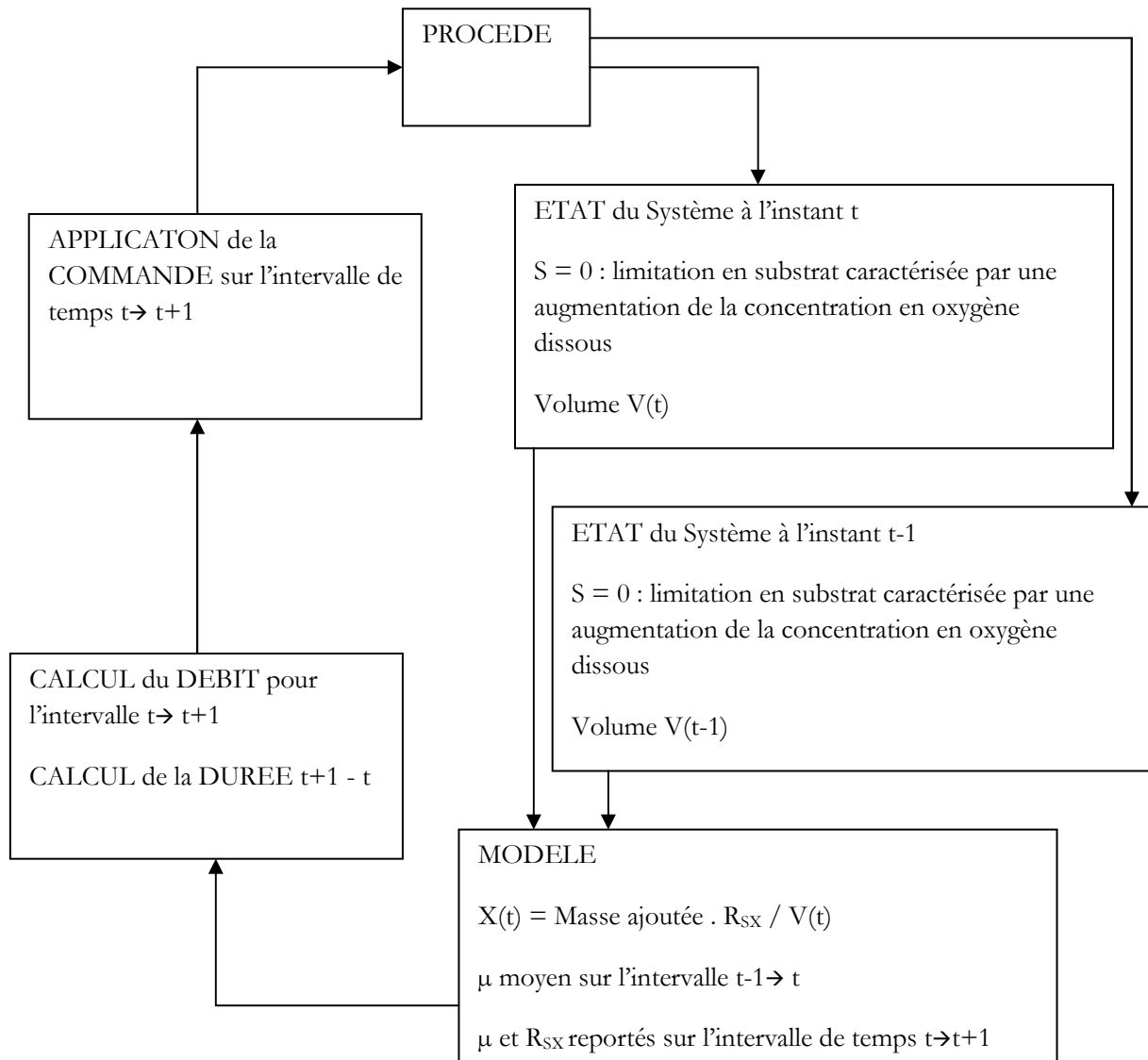


Figure 14 : Organigramme de la commande auto-adaptative d'alimentation

L'équation 1 permet d'exprimer la variation de la concentration en substrat en fonction du temps :

$$\frac{dS}{dt} = \left\{ Q_{(t)} \cdot (S_A - S) - \left(\frac{\mu}{Y_{SX}} + m \right) \cdot X \cdot V \right\} \cdot \frac{1}{V_{(t)}} \quad \text{Equation 1}$$

avec $Q_{(t)}$ le débit d'alimentation du substrat

S_A la concentration de la solution d'alimentation en substrat

S la concentration du substrat dans le milieu de culture

$$X \cdot V_{(t)} = X_0 \cdot V_0 \cdot \exp^{(\mu \cdot t)}$$

$$\text{soit } \frac{dS}{dt} = \left\{ Q_{(t)} \cdot (S_A - S) - \left(\frac{\mu}{Y_{SX}} + m \right) \cdot X_0 \cdot V_0 \cdot \exp^{(\mu \cdot t)} \right\} \cdot \frac{1}{V_{(t)}} \quad \text{Equation 2}$$

Sur un intervalle donné avec un débit d'alimentation constant :

$$Q_{(t)} = \text{constante} = Q ; \text{ variation du volume linéaire dans le temps } V_{(t)} = V_0 + Q \cdot t$$

Si le taux de croissance est constant, le rendement global sur l'intervalle $R_{SX} = \left(\frac{\mu}{Y_{SX}} + m \right)$ est lui même constant.

La solution de l'équation 2 décrit l'évolution de la concentration en substrat dans le temps :

$$S_{(t)} = \left\{ Q \cdot S_A \cdot t + S_0 V_0 + \frac{X_0 \cdot V_0 (1 - \exp^{(\mu \cdot t)})}{R_{SX}} \right\} \cdot \frac{1}{(V_0 + Q \cdot t)} \quad \text{Equation 3}$$

avec S_0 et V_0 les condition initiales au temps $t=0$.

Si une concentration maximale en substrat S_{\max} est imposée :

$$S_t = S_{\max} \text{ pour } \frac{dS}{dt} = 0 \text{ à un temps } t = t_{\max}$$

L'équation 2 conduit à l'expression du débit :

$$Q = \frac{\mu \cdot X_0 \cdot V_0 \cdot \exp^{(\mu \cdot t_{\max})}}{R_{SX}} \cdot \frac{1}{(S_A - S_{\max})} \quad \text{Equation 4}$$

et du temps d'obtention de la concentration maximale en substrat :

$$t_{\max} = \exp^{(\mu \cdot t_{\max})} \left\{ \frac{R_{SX} \cdot (S_A - S_{\max})}{X_0} + 1 \right\} - 1 \quad \text{Equation 5}$$

La solution numérique du système d'équation 4 et 5 permet d'accéder au débit à imposer et la solution de l'équation 3 pour l'épuisement en substrat $S(t) = 0$ permet de calculer la durée de la commande, c'est à dire la durée théorique du cycle avant une nouvelle limitation en substrat.

Estimation du taux de croissance

Pour résoudre le système, il est nécessaire d'avoir une estimation en ligne du taux de croissance. L'équation $X.V(t) = X_0.V_0 \cdot \exp^{\mu.t}$ permet d'estimer le taux de croissance moyen sur l'intervalle 0 à t :

$$\mu = \ln\left(\frac{X(t).V(t)}{X_0.V_0}\right) \cdot \frac{1}{t}$$

En considérant le rendement constant : $\mu = \ln\left(\frac{S(t)^{total}.V(t).R_{SX}}{S_0^{total}.V_0.R_{SX}}\right) \cdot \frac{1}{t}$ soit $\mu = \ln\left(\frac{S(t)^{total}.V(t)}{S_0^{total}.V_0}\right) \cdot \frac{1}{t}$

En considérant la masse de substrat consommé M^S : $\mu = \ln\left(\frac{M(t)^S}{M_0^S}\right) \cdot \frac{1}{t}$.

De même, dans les équations 4 et 5, il est possible de remplacer la grandeur $\frac{X_0.V_0}{R_{SX}}$ par la masse de substrat ajouté M_0^S .

II.3.6 Echantillonnage

Des échantillons de surnageant de milieu de culture sont prélevés grâce à un collecteur de fractions (Fraction Collector Frac-100, Pharmacia fine chemicals, USA) relié à un module de filtration tangentielle (Applikon, Pays-Bas). Ce module de filtration est alimenté par une boucle de recirculation fonctionnant avec une pompe péristaltique (Masterflex 77521-57, Cole-Parmer USA).

II.3.7 Analyse des gaz

Le choix de l'analyseur de gaz dépend du volume de travail et des débits d'aération associés.

A - Innova 1313

Pour les cultures discontinues (bioréacteurs 1,6 L et 2 L), l'analyse de la composition des gaz d'entrée et de sortie du bioréacteur est effectuée grâce un analyseur de gaz Innova 1313 couplé à un échantillonneur multipoint 1309 (LumaSense Technologies, Danemark).

L'analyseur Innova possède un dispositif de détection et de quantification du dioxygène par spectroscopie magnéto-acoustique et du dioxyde de carbone par spectrométrie infrarouge-acoustique. La détection

acoustique permet d'augmenter la sensibilité de l'analyse et présente donc un intérêt important pour des analyses de gaz associées à des fermenteurs de petit volume avec des débits d'aération faibles.

Pour l'analyseur de gaz Innova, le débit minimal qui doit être envoyé est de 130 mL.min⁻¹. Une aération de 200 mL.min⁻¹ est utilisée pour les cultures discontinues de 1 à 2 L, débit adapté pour ce type d'appareillage. L'échantillonneur multipoint permet d'analyser plusieurs voies d'entrée de gaz. La composition de l'air en entrée du bioréacteur peut donc être analysée en continu. Au cours de la culture, la composition des gaz de sortie du bioréacteur est analysée toutes les 120 secondes. L'étalonnage de l'analyseur est réalisé avec l'azote et un gaz étalon (mélange de 5 % CO₂ et 10 % O₂). Pour chaque gaz la calibration se fait en un seul point. Le gain sur le dioxygène est réalisé avec l'azote (0 % O₂) tandis que le gaz étalon sert à déterminer le gain sur le dioxyde de carbone (5 % CO₂). L'analyseur est géré par le logiciel BZ6009 v1.12.

B - Analyseur EGAS8

Les cultures en mode discontinu alimenté sont réalisées en bioréacteur Biostat E de 20 L avec 10 L de milieu, les débits d'aération en entrée variant de 180 à 600 NL.h⁻¹. Dans ce cas, la composition des gaz d'entrée et de sortie est mesurée par un analyseur (URAS 10 E, Hartmann & Braun, Allemagne) couplé à une armoire à gaz (EGAS8, B.Braun Biotech International, Melsungen, Allemagne).

Le principe de détection repose sur la mesure par spectrométrie infra-rouge pour le dioxyde de carbone et par paramagnétisme pour l'oxygène. La procédure d'étalonnage comprend trois étapes : le zéro O₂ et CO₂ est calibré avec l'azote, le dioxygène O₂ est calibré avec l'air du réseau et le dioxyde de carbone CO₂ est calibré avec un gaz étalon (mélange de 5 % CO₂ et 20 % O₂).

Ces analyses permettent de suivre les compositions en O₂, CO₂ et N₂ de l'air en entrée et en sortie du réacteur et, ainsi, de calculer les quantités d'O₂ consommé et de CO₂ produit au cours de la culture.

II.4 Techniques analytiques de suivi de la culture

II.4.1 Détermination de la concentration en biomasse

A - Mesure turbidimétrique

L'évolution de la densité cellulaire en fonction du temps est déterminée par mesure de la densité optique (DO_{600nm}) par spectrophotométrie à 600 nm (spectrophotomètre Biochrom Libra S4) dans une cuve en verre de 2 mm de trajet optique (Hellma, Allemagne). La suspension cellulaire est diluée de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0,2 et 0,6 unité d'absorbance.

La gamme de linéarité de l'appareil a été déterminée avec des dilutions successives d'un échantillon d'une culture en milieu PGYA de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. Pour cet appareil, la linéarité est admise jusqu'à une valeur de 0,65 (Figure 15).

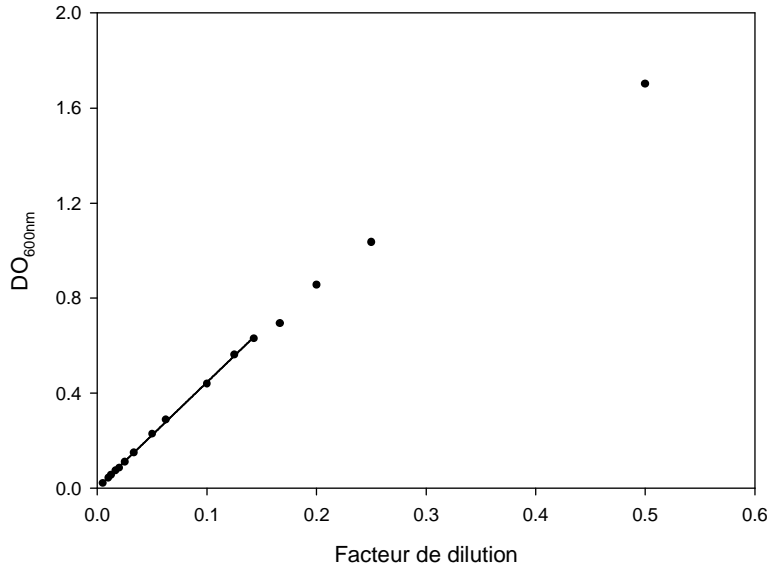


Figure 15 : Evolution de la densité optique mesurée à 600 nm en fonction du facteur de dilution de l'échantillon

B - Mesure gravimétrique

La biomasse sèche, exprimée en g.L⁻¹, est déterminée par gravimétrie. Un volume connu de milieu de culture est filtré sur une membrane (Sartolon polyamide 0,2 µm - Sartorius®) préalablement séchée et pesée. Après filtration, les membranes sont séchées à l'étuve (Heraeus, France) à 60 °C sous vide (200 mmHg) pendant 48 heures, puis pesées.

Parallèlement, des essais de mesure en tubes Eppendorfs sont réalisés : un volume de 1 mL de culture cellulaire (ou plusieurs fois de suite 1 mL) est centrifugé dans des tubes Eppendorfs préalablement séchés et pesés. Les culots obtenus sont resuspendus dans de l'eau distillée puis centrifugés à nouveau pour être lavés. Ils sont placés à l'étuve à 60 °C sous vide (200 mmHg) pendant 48 heures avant d'être à nouveau pesés.

La corrélation entre la valeur de la densité optique mesurée à 600 nm et la biomasse sèche en g.L⁻¹ (X_{MS}) a été établie à partir de cultures de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 en milieu complexe glucose à 45 °C.

Il a été établi la relation suivante : $DO_{600nm} = 0,946 * X_{MS}$ ou $X_{MS} = 1,087 * DO_{600nm}$

Cette corrélation a été utilisée pour l'ensemble du traitement des résultats.

II.4.2 Détermination de la composition élémentaire de la biomasse

A - Echantillonnage et préparation des échantillons

Au cours de la fermentation, un volume compris entre 10 et 15 mL de moût est placé dans un falcon de 15 mL. L'échantillon est centrifugé à 4 °C pendant 10 minutes à 4000 g. Le surnageant est jeté et le culot de cellules est rincé 3 fois à l'eau physiologique à 4 °C. L'eau de lavage est éliminée et le culot peut être conservé à - 80 °C jusqu'aux étapes d'analyse ultérieures.

Après la fermentation, les culots sont lyophilisés de 36 à 72 heures puis envoyés pour les analyses au « Service Central d'Analyse » du CNRS.

B - Principe de l'analyse

Les éléments C, H, O, N et S sont détectés et analysés après combustion ou pyrolyse de l'échantillon par un catharomètre ou par un détecteur infra-rouge spécifique.

Après minéralisation de l'échantillon en milieu acide, l'élément P est détecté et analysé par ICP-AES.

C - Composition élémentaire de la biomasse

Ces résultats d'analyse (Tableau 20 et Tableau 21) ont permis le calcul de la composition élémentaire de la biomasse organique des deux souches de déinocoques étudiées dans ce travail.

Tableau 20 : Analyse de la composition élémentaire en C.H.O.N.P.S. de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 cultivée en mode discontinu alimenté avec double substrat extrait de levure et glucose

Eléments	C	H	O	N	P	S
	44,12	6,97	29,60	11,92	1,42	0,42
Composition (%)	45,33	7,18	32,69	10,60	1,04	0,37
	44,23	6,86	29,88	11,19	1,20	0,40
Moyenne (%)	44,56	7,00	30,72	11,24	1,22	0,40
Ecart-type (%)	0,67	0,16	1,71	0,66	0,19	0,03

Tableau 21 : Analyse de la composition élémentaire en C.H.O.N.P.S. de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 cultivée en mode discontinu alimenté avec double substrat extrait de levure et glucose

Eléments	C	H	O	N	P	S
	44,56	6,53	28,59	12,93	2,04	0,36
Composition (%)	42,63	6,34	28,04	11,83	1,79	0,40
	43,60	6,62	29,78	11,99	1,74	0,55
Moyenne (%)	43,60	6,50	28,80	12,25	1,86	0,44
Ecart-type (%)	0,97	0,14	0,89	0,59	0,16	0,10

La biomasse sèche organique de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 possède la formule $C_{1,00}H_{1,87}O_{0,52}N_{0,22}$ et un poids moléculaire égal à 25,21 g.Cmol⁻¹. La biomasse sèche de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 a une formule élémentaire correspondant à $C_{1,00}H_{1,78}O_{0,50}N_{0,24}$ et un poids moléculaire de 25,11 g.Cmol⁻¹.

II.4.3 Dosage du substrat et des métabolites dans le milieu de culture

A - Dosage du glucose extracellulaire au cours de la fermentation

Le glucose est dosé par un analyseur automatique YSI 2700 (Yellow Springs Instruments®). Son principe repose sur la détection de l'eau oxygénée libérée lors de la transformation du glucose en acide gluconique par l'enzyme glucose oxydase immobilisée sur une membrane.



Le dosage est réalisé sur le surnageant du milieu de culture. La suspension bactérienne doit donc être centrifugée (12000 g, 3 minutes) puis le surnageant est séparé du culot cellulaire et dilué afin de se trouver dans la gamme de linéarité de l'appareil (0 à 2,5 g.L⁻¹).

La concentration en glucose est directement donnée par affichage digital.

B - Dosage du glucose, de l'éthanol et des acides organiques par Chromatographie Liquide Haute Performance

Les concentrations en molécules organiques : sucres simples, acides organiques et alcools, sont déterminées par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).

Les échantillons analysés sont les surnageants des prélèvements effectués au cours des cultures, obtenus par centrifugation du moût de fermentation 3 minutes à 12000 g (Minispin, Eppendorf, USA) et filtrés préalablement avec des filtres en polyamide de porosité 0,2 µm (Minisart, Sartorius, Allemagne).

Le chromatographe est constituée de plusieurs parties :

- un passeur d'échantillons (CTC Analytics, PAL system, HTC PAL),
- une pompe (Ultimate 3000 Pump),
- une précolonne (Micro-Guard IG Cation H, Bio-Rad),
- une colonne de type H+ (Aminex HPX-87H 300 x 7,8 mm, Bio-Rad),
- un détecteur UV à barrette de diodes (Ultimate 3000 Photodiode Array Detector),
- un réfractomètre RI (Shodex RI – 101).

Le logiciel d'acquisition et de traitement des données est le logiciel Chromoleon (Chromatography Management System version 6.80).

La séparation est effectuée avec l'acide sulfurique H_2SO_4 5 mM comme éluant en mode isocratique. Le débit de l'éluant est égal à $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, la température de la colonne est maintenue à $50 \text{ }^\circ\text{C}$ dans un four et les échantillons dans le passeur sont conservés à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Le volume d'échantillon injecté est de $20 \mu\text{L}$ et l'analyse dure 60 à 90 minutes, en fonction de la charge organique des échantillons contenant de l'extrait de levure.

L'éluant ainsi que les solutions de la gamme d'étalonnage sont préparées dans de l'eau ultra-pure (MilliQ, $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, Millipore, Allemagne). Les standards utilisés pour la détection et la quantification sont le glucose, l'éthanol, le formate, le malate, le succinate, le pyruvate, l'acétate, le lactate, le citrate et le gluconate. Trois solutions de standards sont préparées : $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir de ces solutions mères, trois autres solutions sont préparées par dilution : $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. La courbe d'étalonnage est alors réalisée sur six points de gamme.

Afin de vérifier la stabilité du système au cours du temps et valider la qualité des analyses, la gamme d'étalonnage est injectée au début et à la fin de la séquence d'analyse. De plus, tous les dix échantillons, un point de la gamme d'étalonnage ainsi qu'un échantillon d'eau ultra-pure sont injectés.

II.4.4 Dosage des protéines

La concentration en protéines dans les échantillons peut être déterminée par spectrophotométrie d'absorption, grâce à la méthode colorimétrique de Biuret (Gornall *et al.* 1949). La réaction fait intervenir les ions Cu^{2+} (ajoutés sous forme de sulfate de cuivre) qui sont capables de se lier aux atomes d'azote engagés dans les liaisons peptidiques de la protéine. A pH alcalin, le complexe formé a une couleur mauve et présente une absorption maximale à 540-560 nm. L'intensité de la coloration mesurée par l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration en protéines.

Les protéines sont dosées dans les surnageants des prélèvements de milieu de culture ainsi que dans la biomasse. Pour doser les protéines de la biomasse, les protocoles existants ont été adaptés. Un volume de 1 mL de moût de fermentation est centrifugé 3 minutes à 12000 g (MiniSpin® - Eppendorf, Hamburg, Allemagne) puis le culot est repris dans de l'eau ultra pure (qsp 1mL). Une étape de lyse des cellules est nécessaire afin de libérer le contenu protéique et le doser. Pour cela une étape de chauffage à $100 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 5 minutes après avoir ajouté de la soude est nécessaire avant l'ajout du réactif CuSO_4 (Stickland 1951). Pour ce dosage, la gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de sérum albumine bovine (SAB). Pour le dosage des protéines du surnageant, la gamme de dosage varie de 0 à $8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SAB, pour le dosage des protéines de la biomasse la gamme varie de 0 à $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de SAB. La concentration en protéines dans les échantillons est donc exprimée en équivalent SAB.

II.4.5 Dosage de l'azote ammoniacal

Le dosage des ions ammonium est réalisé avec une électrode à ammonium (modèle n° 95-12 - Thermo Scientific Orion, Beverly, Etats-Unis) reliée à un voltmètre (pH/ISE meter 710A, Thermo Scientific Orion, Beverly, Etats-Unis). La méthode de dosage repose sur la mesure d'une différence de potentiel (ddp) à l'aide d'une électrode sensible à l'ammoniac gazeux, l'ammoniac provenant de la transformation des ions ammonium par ajout d'un tampon ISA (Ionic Strength Adjustor). L'électrolyte de la sonde est constitué d'une solution de NH_4Cl à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et une gamme étalon de NH_4Cl de $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ à $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ est réalisée.

Pour la mesure, l'échantillon prélevé (10 mL) est agité avec un barreau aimanté. La sonde est placée de façon à effleurer la surface du liquide en évitant de former des bulles d'air ; 200 μL de tampon ISA sont ajoutés puis la ddp (mV) est lue sur le voltmètre.

La variation de la ddp mesurée en fonction du logarithme de la concentration en NH_4Cl est tracée pour la gamme d'étalonnage. En fonction de la valeur de la ddp lue pour l'échantillon, il est alors possible de déterminer sa concentration en NH_4Cl .

II.4.6 Dosage de l'azote total

A - Méthode de Kjeldahl

L'azote total (NT) est l'azote organique et ammoniacal contenu dans l'échantillon et déterminé après minéralisation.

L'analyse est réalisée sur un échantillon de 50 mL de surnageant du milieu de fermentation obtenu après centrifugation du moût 10 minutes à 4000 g (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, USA). L'échantillon peut être dilué dans un volume final de 50 mL si besoin. La première étape consiste en une minéralisation qui est réalisée à chaud, en milieu acide avec 10 mL d' H_2SO_4 concentré et en présence d'1 gramme de catalyseur (Dumazert et Marcelet). L'ajout de 3 billes de verre permet l'homogénéisation du milieu réactionnel. Cette étape permet de transformer l'azote organique sous forme d'ions ammonium. Lorsque la minéralisation est terminée, il faut laisser refroidir l'échantillon avant de passer à l'étape de distillation.

Les culots obtenus après la minéralisation sont suspendus dans 50 mL d'eau osmosée puis distillés pendant environ 5 minutes. Au début de la distillation, 50 mL de lessive de soude (NaOH à 9 N) sont ajoutés à l'échantillon pour déplacer l'équilibre de l'ion ammonium (NH_4^+) vers l'ammoniac (NH_3). 50 mL d'une solution titrée d' H_2SO_4 (0,02 N) sont placés dans une fiole Erlenmeyer pour la récupération des condensats contenant l'ammoniac.

La dernière étape est l'étape de titration (dosage acido-basique en retour) de l'acide sulfurique par une solution de soude (NaOH à 0,02 N). La concentration de cette solution de soude est préalablement

vérifiée avec une solution d'acide chlorhydrique 1 N titrimétrique diluée au 1/20^{ème}. L'indicateur coloré utilisé est le réactif de Tashiro (rouge de méthyle + bleu de méthylène), la couleur du milieu réactionnel passe du pourpre au vert. Cette méthode permet de doser des échantillons dont la concentration maximale en N est 350 mg.L⁻¹.

B - Analyseur automatique COT/NT mètre Shimadzu

L'azote total dans le surnageant du milieu de culture est également dosé grâce à un analyseur, le COT-NT mètre (Shimadzu, USA). Les composés azotés contenus dans l'échantillon sont soumis à une combustion à 720 °C catalysée par du platine. La matière azotée est alors transformée en monoxyde d'azote NO. Ce gaz produit subit une oxydation par réaction avec de l'ozone pour former du NO₂*. Le NO₂* libère un photon qui est détecté par chimiluminescence. L'analyse est réalisée sur un échantillon de 20 mL préalablement filtré (Minisart 0,2 µm). Pour ce dosage, une solution d'urée contenant 200 mg.L⁻¹ d'N est utilisée pour l'étalonnage.

II.4.7 Dosage du carbone organique total

Cette méthode s'applique à la détermination du Carbone Organique Total (COT) dans les surnageants de milieux de culture. Le dosage de la matière organique contenue dans l'échantillon est réalisé par oxydation et transformation de celle-ci en CO₂ qui est analysé par détection infra-rouge. Ce dosage est réalisé avec un appareillage de type COT-mètre (Shimadzu, USA).

Pour la mesure du Carbone Total (CT), un gaz vecteur (air purifié) circule à un débit contrôlé dans le tube de combustion rempli d'un catalyseur d'oxydation chauffé à 680 °C. Quand l'échantillon est injecté dans le tube de combustion, le carbone total de l'échantillon est oxydé ou décomposé pour former du dioxyde de carbone. Le gaz vecteur portant les produits de combustion est déshumidifié avant de passer dans le détecteur infrarouge qui permet l'analyse du CO₂. Le signal ainsi détecté forme un pic dont l'aire est proportionnelle à la concentration en CT de l'échantillon. La relation entre la concentration en CT et l'aire du pic est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée à partir de solutions de glucose seul, d'extrait de levure seul ou d'un mélange de deux composés (0 à 2500 ppm de CT).

Pour la mesure du Carbone Inorganique (CI), l'échantillon est acidifié et mis en contact avec le gaz vecteur (l'air purifié) pour convertir seulement les composés inorganiques de l'échantillon en dioxyde de carbone. Ce dioxyde de carbone est détecté par le détecteur infrarouge et la concentration est mesurée de la même façon que le carbone total, la courbe d'étalonnage étant réalisée à partir d'une solution standard à 1000 ppm de carbone inorganique. Le carbone inorganique représente l'acide carbonique, les carbonates et les bicarbonates.

L'analyse est réalisée sur un échantillon de 20 mL de surnageant de milieu, obtenu par centrifugation du moût de culture 10 minutes à 4000 g. L'échantillon est préalablement filtré (Minisart 0,2 µm). Pour déterminer la concentration en carbone organique total, il suffit de soustraire la concentration en carbone

inorganique de la concentration en carbone total (COT = TC-IC). Les concentrations en CT, CI et COT données par l'analyseur sont exprimées en ppm.

II.4.8 Mesure de l'osmolalité du milieu de culture

L'osmolalité du milieu de culture est déterminée grâce à un micro-osmomètre type 12/12 DR (Hermann Roebling, Allemagne) sur 100 μ L de surnageant obtenu par centrifugation du moût de fermentation 3 minutes à 12000 g.

La détermination de l'osmolalité du milieu de culture repose sur la mesure du point de congélation de la solution aqueuse ; en effet, il existe une relation linéaire entre l'osmolalité et le point de congélation. La mesure de la baisse du point de congélation en comparaison avec celui de l'eau pure équivaut donc à une mesure directe de la concentration osmolaire. Le micro-osmomètre est calibré en utilisant de l'eau osmosée et une solution standard à 300 mOsm.kg⁻¹ H₂O. La gamme de linéarité est donc comprise entre 0 et 300 mOsm.kg⁻¹ H₂O. La valeur de l'osmolalité en mOsm.kg⁻¹ H₂O est affichée directement.

II.5 Séquençage d'ADN génomique

Les échantillons utilisés pour le séquençage de l'ADN proviennent d'une culture de 24 heures en milieu complexe glucose CMG à 45 °C. Les culots cellulaires sont obtenus par centrifugation du moût de fermentation 10 minutes à 4000 g et lavés trois fois dans de l'eau physiologique (NaCl 9 g.L⁻¹) avant d'être stockés à - 20 °C jusqu'à la préparation des bibliothèques et le séquençage.

II.5.1 Extraction de l'ADN

L'ADN des échantillons est extrait avec le Kit UltraClean® Microbial DNA Isolation (Quiagen).

II.5.2 Préparation des bibliothèques

Les bibliothèques d'ADN génomique sont préparées à l'aide du kit TruSeq DNA Sample Preparation v2 (Illumina). Cette préparation comporte plusieurs étapes, chaque bibliothèque étant préparée en double :

- Quantification des échantillons d'ADN par dosage au Picogreen (Quant-it Picogreen dsDNA, Life Technologies)
- Fragmentation de l'ADN en fragments de 500 pb (\pm 50 pb) par ultra sonication
- Contrôle qualité de l'échantillon d'ADN à l'aide d'une puce DNA 7500 (Agilent)
- Purification des ADN sur colonnes (Qiaquick Spin Column)

- Réparation des extrémités des fragments d'ADN
- Adénylation en 3'
- Ligation des adaptateurs indexés
- Sélection de la taille des produits de ligation par migration sur gel (E-Gel clonewell 0,8 % SYBR SA Invitrogen)
- Amplification des fragments sélectionnés par PCR (ThermoCycleur 2720, Applied BioSystems)
- Purification des produits d'amplification sur gel (E-Gel clonewell 0,8 % SYBR SA Invitrogen)
- Contrôle qualité de la librairie et lecture de la taille des fragments à l'aide d'une puce DNA High Sensitivity (Agilent)
- Quantification de la librairie obtenue par qPCR (Light Cyclor 480, Roche)

Les librairies ainsi préparées sont prêtes pour le séquençage.

II.5.3 Séquençage

Le séquençage de l'ADN est réalisé avec un séquenceur MiSeq (Illumina, San Diego, USA). Les réactifs utilisés pour le séquençage sont prêts à l'emploi dans une cartouche spécifique fournie par Illumina.

Préalablement au séquençage, les échantillons d'ADN ainsi qu'un contrôle interne (PhiX) sont dénaturés avec une solution de NaOH puis dilués pour se retrouver dans la gamme de concentrations préconisée par le fournisseur (7 pM). Le contrôle interne est mélangé aux librairies ainsi préparées et le mélange est ajouté dans la cartouche de réactifs utilisée pour le séquençage. La cartouche est insérée dans le séquenceur, l'analyse peut ensuite être réalisée.

II.5.4 Données fournies par le séquençage

A la fin du séquençage, plusieurs données sont fournies pour l'analyse des résultats : le nombre de séquences, la taille totale de ces séquences et une analyse statistique sur les lectures et leur qualité (% de GC, longueur, K-mers, etc.). Une recherche de contaminant est également effectuée afin de valider l'analyse.

Avec les séquences obtenues, il est possible de réaliser un alignement des lectures sur un génome de référence. Les résultats donneront le nombre et le pourcentage de séquences alignées sur le génome de référence choisi.

II.6 Traitement des données

II.6.1 Analyse en Composantes Principales des formulations de milieux de culture

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est un traitement mathématique de réduction de dimensions pour l'exploitation statistique de données quantitatives complexes. Il s'agit d'une méthode d'analyse qui consiste à transformer des variables liées entre elles en nouvelles variables décorrélées les unes des autres, les composantes principales. Les composantes principales, classées en fonction de leur importance, permettent alors de détecter les éventuelles liaisons qui existent entre les variables de départ.

Les objectifs sont multiples : extraire l'essentiel de l'information contenue dans les données, décrire cette information et en fournir une représentation se prêtant plus aisément à l'interprétation.

L'analyse en composantes principales a été réalisée avec Matlab (Statistics Toolbox, Matlab 6.5, Mathworks) avec plusieurs étapes de calcul intermédiaires :

1. Standardisation des données à traiter

*Calcul des variables centrées réduites $Y_i = (X_i - m) / s$

* Y_i variable centrée réduite

* X_i variable

* m moyenne des variables x_i

* s écart type des variables X_i

2. Calcul de la matrice de covariance à partir des variables centrées réduites

3. Diagonalisation de la matrice

4. Calcul des valeurs propres et des vecteurs propres

5. Détermination des composantes principales

6. Représentation graphique des données dans le nouvel espace formé par les composantes principales

II.6.2 Traitement des données expérimentales des cultures en bioréacteur

A - Gaz de fermentation

Les vitesses de consommation de l'oxygène (r_{O_2}) et de production du dioxyde de carbone (r_{CO_2}) sont calculées en réalisant un bilan matière sur les composants des gaz sur le bioréacteur. La Figure 16 illustre le système pris en compte pour le bilan matière.

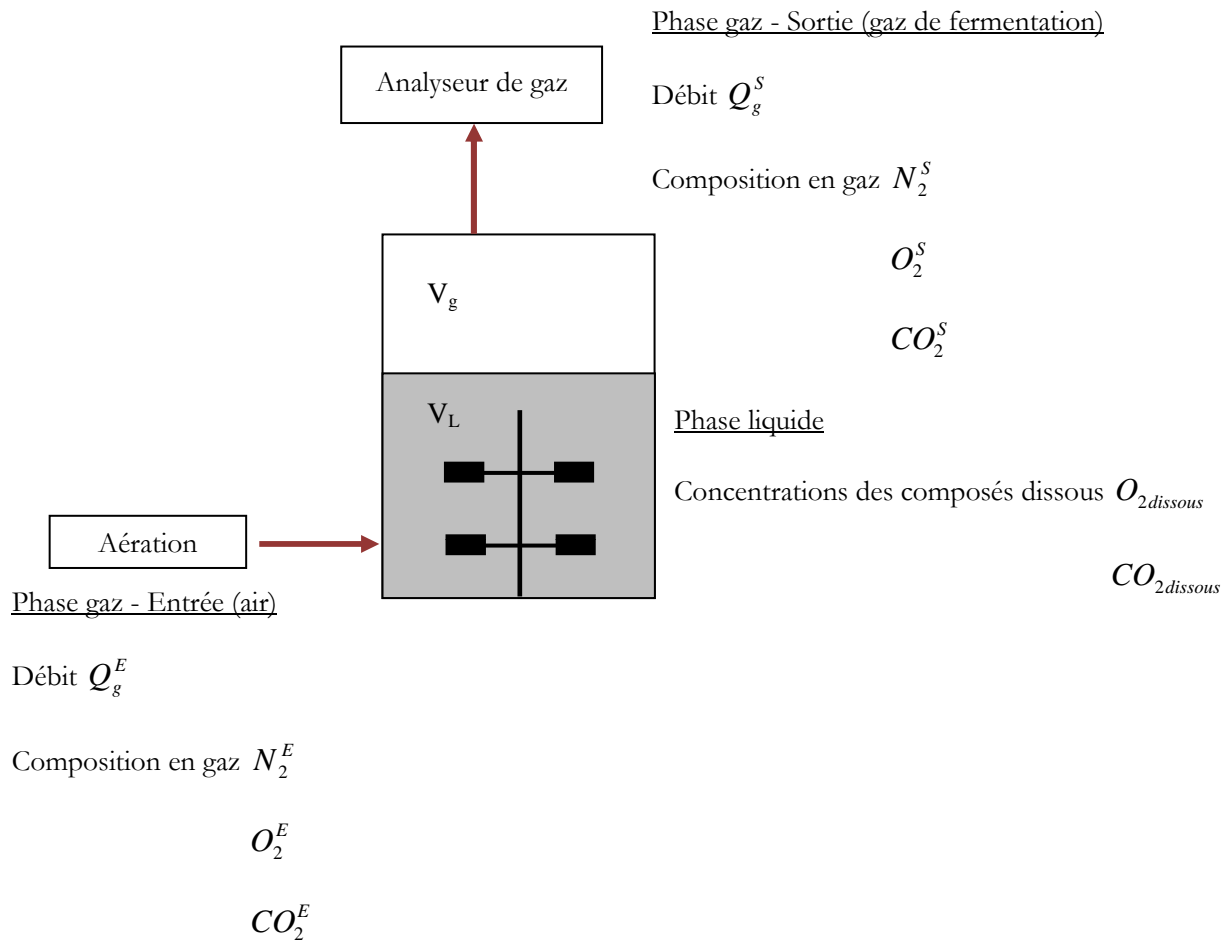


Figure 16 : Schéma du système considéré pour les bilans gazeux

A1 - Bilan pour un composé A du gaz

L'équation de conservation de la matière pour le composé A sur le bioréacteur s'écrit :

$$\text{Accumulation} = [\text{entrée} - \text{sortie}] + [\text{production} - \text{consommation}]$$

Où

$$[\text{entrée} - \text{sortie}] = \text{flux d'échange}$$

[production – consommation] = réaction

soit

$$\frac{d(A_{dissous} \cdot V_L)}{dt} + \frac{d(A_{gaz} \cdot V_g)}{dt} = (Q_g^E \cdot A^E - Q_g^S \cdot A^S) + r_A \cdot V_L$$

avec V_L et V_g représentent respectivement les volumes de phase liquide et de phase gaz en NL (V_g correspond au volume du ciel gazeux et au volume mort jusqu'à l'analyseur),

Q_g^E et Q_g^S représentent respectivement les débits gazeux à l'entrée et à la sortie du fermenteur,

A^E et A^S représentent respectivement les concentrations de l'espèce A dans les gaz d'entrée et de sortie du fermenteur,

r_A représente la vitesse de production/consommation du composé A ($r_A > 0$ si production et $r_A < 0$ si consommation),

$A_{dissous}$ et A_{gaz} représentent respectivement les concentrations de l'espèce A dans la phase liquide et dans la phase gaz du fermenteur.

Le terme flux de transfert global (Φ_A) regroupe le terme d'accumulation dans la phase liquide ainsi que le terme de production ou de consommation.

$$\frac{d(A_{gaz} \cdot V_g)}{dt} = (Q_g^E \cdot A^E - Q_g^S \cdot A^S) + \Phi_A$$

$$\Phi_A = \frac{d(A_{dissous} \cdot V_L)}{dt} + r_A \cdot V_L$$

A2 - Bilan sur l'azote

L'azote est un gaz inerte qui n'est ni produit ni consommé par le microorganisme. Il ne subit qu'un phénomène de transport au sein de la phase liquide sans conversion. L'azote étant très peu soluble dans la phase liquide, le terme $\frac{dN_{2gaz}}{dt}$ peut être négligé. Le flux global de transfert d'azote peut donc lui aussi

être négligé. Le bilan sur l'azote sur l'ensemble du fermenteur permet alors d'estimer le débit de sortie Q_g^S , d'après les mesures du débit d'entrée Q_g^E et des compositions en azote N_2^E et N_2^S des gaz d'entrée et sortie du fermenteur.

$$Q_g^S = \frac{\frac{d(V_g \cdot N_2^E)}{dt} + Q_g^E \cdot N_2^E}{N_2^S}$$

Avec le débit de sortie, les flux du transfert (en mol.h⁻¹) du dioxyde de carbone et de l'oxygène peuvent alors être exprimés ainsi :

$$\Phi_{CO_2} = \frac{d(V_g \cdot CO_2^S)}{dt} - Q_g^E \cdot CO_2^E + Q_g^S \cdot CO_2^S$$

$$\Phi_{O_2} = \frac{d(V_g \cdot O_2^S)}{dt} - Q_g^E \cdot O_2^E + Q_g^S \cdot O_2^S$$

Des expressions précédentes, nous obtenons les vitesses nettes de conversion en mol.L⁻¹.h⁻¹ :

$$r_X = \frac{\Phi_X + \frac{d(V_L \cdot A_{dissous})}{dt}}{V_L}$$

avec $\Phi_A > 0$ si production et $\Phi_A < 0$ si consommation.

A3 - Bilan sur l'oxygène

L'oxygène est présent sous sa forme dissoute dans le milieu. La mesure de l'oxygène dissous dans le milieu est donnée par la valeur de la pression partielle en oxygène dissous, pO₂. A 45 °C avec 300 mbars de surpression, la solubilité maximale de l'oxygène (C*) est égale à 7,65 mg.L⁻¹ (pO₂ = 100 %).

La concentration en oxygène dissous dans le milieu (mg.L⁻¹) est alors donnée par la formule :

$$O_{2dissous} = \frac{p_{O_2}}{100} \times 7,65$$

Pour la phase liquide supposée infiniment mélangée, le bilan peut être décrit par l'équation :

$$\frac{dO_{2dissous} \cdot V_L}{dt} = r_{O_2} \cdot V_L - \Phi_{O_2}$$

La vitesse de consommation de l'oxygène dissous r_{O_2} (mol.L⁻¹.h⁻¹) peut être calculée à partir de l'équation suivante :

$$r_{O_2} = \frac{\Phi_{O_2} + \frac{d(O_{2dissous} \cdot V_L)}{dt}}{V_L} \text{ en mol.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

Le $k_L a_{O_2}$, coefficient global de transfert de l'oxygène dans la phase liquide (h⁻¹) peut être calculé par l'équation suivante :

$$k_L a_{O_2} = r_{O_2} \times \left(\frac{p_{O_2}^*}{C^*} \right) \times (p_{O_2}^* - p_{O_2})$$

avec $p_{O_2}^*$ la pression partielle maximale en oxygène dissous dans le milieu, $p_{O_2}^* = 100 \%$

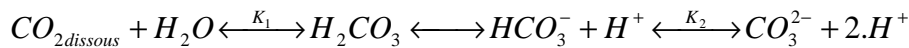
A4 - Bilan sur le dioxyde de carbone

La vitesse de production de CO_2 (r_{CO_2} en $mol.L^{-1}.h^{-1}$) peut être calculée avec l'expression suivante :

$$r_{CO_2} = \frac{\Phi_{CO_2} + \frac{d(CO_{2dissous} \cdot V_L)}{dt}}{V_L}$$

Le dioxyde de carbone dissous dans la phase liquide n'étant pas mesuré, sa concentration doit être estimée pour les calculs.

Dans la phase liquide, le dioxyde de carbone peut être retrouvé sous différentes formes dont les proportions dépendent du pH et de la salinité de la phase liquide : dioxyde de carbone (CO_2), acide carbonique (H_2CO_3), ion hydrogénocarbonate (HCO_3^-) et ion carbonate (CO_3^{2-}). L'équilibre entre ces différentes formes peut s'écrire ainsi :

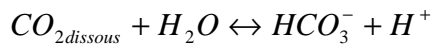


Les constantes de dissociation K_1 et K_2 sont données par leurs valeurs de pK à 25 °C :

$$pK_1 = 6,4 \text{ et } pK_2 = 10,3$$

L'acide carbonique se dissocie de façon pratiquement instantanée, les composés H_2CO_3 et CO_3^{2-} sont minoritaires et peuvent être négligés. Le CO_2 présent dans la phase liquide est donc retrouvé sous deux formes principales : la forme dissoute (CO_2 dissous) et la forme dissociée (HCO_3^-), l'accumulation des ions hydrogénocarbonates pouvant sous-estimer le bilan sur le CO_2 produit.

L'équation de l'équilibre est alors la suivante :



La constante d'équilibre de cette dissociation est :

$$\kappa = \frac{HCO_3^- \cdot H^+}{CO_{2dissous}} = 4,71 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$$

ce qui permet le calcul de la concentration en ions hydrogénocarbonates :

$$HCO_3^- = \frac{\kappa \cdot CO_{2dissous}}{H^+} = \frac{\kappa \cdot CO_{2dissous}}{10^{-pH}}$$

Dans l'hypothèse où la loi de Henry s'applique, la concentration en CO₂ dissous est proportionnelle à la pression partielle en CO₂ au-dessus du liquide dans le gaz effluent :

$$CO_{2dissous} = p_{CO_2} \cdot H_{CO_2}$$

avec H_{CO_2} : constante de Henry pour le CO₂ (0,0205 mol.L⁻¹.atm⁻¹ à 45 °C)

La quantité totale de CO₂ dans le milieu est donc donnée par l'équation suivante :

$$CO_{2total} = CO_{2dissous} + HCO_3^- = CO_{2dissous} + \frac{\kappa \cdot CO_{2dissous}}{H^+} = p_{CO_2} \cdot H_{CO_2} \cdot \left(1 + \frac{\kappa}{10^{-pH}}\right)$$

les vitesses spécifiques sont calculées avec les formules suivantes :

$$q_{O_2} = \frac{r_{O_2}}{X} \text{ et } q_{CO_2} = \frac{r_{CO_2}}{X}$$

avec q_{CO_2} représente la vitesse spécifique de production de CO₂ en mol.g⁻¹. h⁻¹,

q_{O_2} représente la vitesse spécifique de consommation d'O₂ en mol.g⁻¹. h⁻¹,

X représente la concentration en biomasse à l'intérieur du bioréacteur en g.L⁻¹.

Le quotient respiratoire peut alors être calculé :

$$QR = \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}} = \frac{q_{CO_2}}{q_{O_2}}$$

B - Traitement de la variable "volume"

Pour l'exploitation des données de fermentation lors des cultures discontinues alimentées, il est nécessaire de s'affranchir de l'évolution du volume réactionnel. Les variations de volume sont dues à l'apport des solutions de substrats, de la solution saline et des liquides correcteurs de pH, mais aussi aux volumes d'échantillonnage et à l'évaporation due à la température de travail.

Pour l'estimation du volume réactionnel de fermentation, nous prenons en compte les volumes suivants :

Volume initial : V₀

Volume de sels : V_{sels}

Volume de liquides correcteurs de pH : V_{pH}

Volume d'eau évaporée : V_{evap}

Volume prélevé : V_{prel}

Volume de solution de substrat : V_{alim}

$$V_{\text{ferm}} = V_0 + V_{\text{sels}} + V_{\text{pH}} - V_{\text{evap}} + V_{\text{alim}} - V_{\text{prel}}$$

Pour le volume d'alimentation en substrat, il faut distinguer le volume d'eau et le volume correspondant au substrat converti en biomasse ou produits.

$$V_{\text{equi}} = V_{\text{H}_2\text{O}} + V_{\text{X,P}}$$

$$V_{\text{H}_2\text{O}} = V_{\text{alim}} * (Q_{\text{alim}} - S_{\text{alim}})$$

$$V_{\text{X,P}} = \alpha * (V_{\text{alim}} - V_{\text{H}_2\text{O}}) * (1 - Y_{\text{S,CO}_2})$$

avec Q_{alim} : masse volumique de la solution d'alimentation (kg.L^{-1})

S_{alim} : concentration de la solution d'alimentation (kg.L^{-1})

$Y_{\text{S,CO}_2}$: rendement de conversion du substrat en CO_2 (g.g^{-1})

α : coefficient correcteur

Le coefficient correcteur α permet d'ajuster le volume final mesuré au volume final calculé.

Le volume de fermentation est alors exprimé par la formule suivante :

$$V_{\text{ferm}} = V_0 + V_{\text{sels}} + V_{\text{pH}} - V_{\text{evap}} + V_{\text{H}_2\text{O}} + V_{\text{X,P}} - V_{\text{prel}}$$

Sur un intervalle de temps dt la variation de volume s'exprime selon l'expression suivante :

$$d(V) = d(V_{\text{sels}}) + d(V_{\text{pH}}) + d(V_{\text{equi}}) + d(V_{\text{evap}}) + d(V_{\text{prel}})$$

Pour chaque temps le facteur de dilution peut être calculé.

$$Fd(t) = 1 + dt(V)/V(t-1)$$

Il est alors possible d'estimer le volume théorique de culture. Il s'agit du volume correspondant à la culture si elle avait été réalisée en mode discontinu (batch).

$$V_{\text{theo}}(t) = V_{\text{theo}}(t-1) * Fd(t) \text{ avec } V_{\text{theo}}(t=0) = V_0$$

Les valeurs expérimentales déterminées avec le volume mesuré peuvent alors être corrigées par rapport au volume théorique de fermentation.

C - Calculs des vitesses spécifiques et des rendements

La caractérisation cinétique du comportement du microorganisme peut être effectuée en calculant plusieurs vitesses et rendements.

Soit le composé M de concentration c comme variable d'état, X étant la variable biomasse.

- vitesse de réaction : r_M

- vitesse spécifique de réaction : q_M

$$q_M = \frac{r_M}{X}$$

Si le composé M est un substrat, il s'agit d'une vitesse spécifique de consommation ; si le composé M est un produit, la vitesse calculée est une vitesse spécifique de production.

- vitesse spécifique de croissance ou taux de croissance : μ

$$\mu = \frac{r_X}{X}$$

- rendement de conversion du substrat en composé M, si M est un produit : R_{SM}

$$R_{SM} = \frac{\Delta c}{\Delta S}$$

- coefficient respiratoire

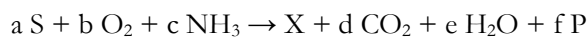
$$QR = \left| \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}} \right|$$

D - Bilans élémentaires

Afin de valider les données expérimentales, un bilan élémentaire sur le carbone est réalisé pour chaque point expérimental ou sur l'ensemble de la fermentation. Ce bilan permet de s'assurer que le carbone est conservé et qu'aucun composé carboné n'est omis pour l'interprétation des résultats.

La vérification du bilan carbone consiste en un bilan matière dans lequel chaque composé carboné est exprimé en quantité de Cmole. La formule en Cmole d'un composé correspond à la formule brute du composé ramenée à un atome de carbone.

D'une façon générale, la réaction globale qui se produit dans un bioréacteur s'écrit de la manière suivante :

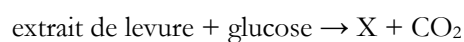


avec S = substrat

X = biomasse

P = produit

Dans notre cas, pour les cultures discontinues alimentées, la réaction prenant en compte les espèces carbonées s'écrit :



Il convient alors de vérifier que le carbone apporté est égal au carbone accumulé dans le bioréacteur ou retrouvé sous forme de gaz, c'est-à-dire que :

$$C_{\text{extrait de levure}} + C_{\text{glucose}} = C_X + C_{\text{CO}_2} + C_{\text{résiduel}}$$

Le pourcentage de vérification du bilan carbone sera donné par l'équation suivante :

$$Bilan_{\text{carbone}} = \frac{C_X + C_{\text{CO}_2} + C_{\text{résiduel}}}{C_{\text{extraitdelevures}} + C_{\text{glucose}}} * 100$$

Un bilan élémentaire peut également être effectué sur l'azote en tenant compte de la réaction suivante :



Soit :

$$N_{\text{extrait de levure}} + N_{\text{NH}_4\text{Cl}} + N_{\text{NH}_3} = N_X + N_{\text{résiduel}}$$

avec $N_{\text{résiduel}} = N_{\text{organique}} + N_{\text{minéral}}$

Le pourcentage de vérification du bilan azote sera donné par l'équation suivante :

$$Bilan_{\text{azote}} = \frac{N_X + N_{\text{résiduel}}}{N_{\text{extraitdelevures}} + N_{\text{NH}_4\text{Cl}} + N_{\text{NH}_3}} * 100$$

E - Calcul du degré de réduction des composés

Le degré de réduction d'un composé j de formule brute $\text{CH}_{\varepsilon_{C_j}^H} \text{O}_{\varepsilon_{C_j}^O} \text{N}_{\varepsilon_{C_j}^N}$ est donné par la formule

suivante :

$$\gamma_j = \sum_{i=1}^j (\gamma_i \cdot \varepsilon_{C_j}^i) = \gamma_C + \gamma_H \cdot \varepsilon_{C_j}^H + \gamma_O \cdot \varepsilon_{C_j}^O + \gamma_N \cdot \varepsilon_{C_j}^N$$

En considérant l'ammoniaque comme source azotée et le glucose comme source carbonée, les valeurs des degrés de réduction des différents éléments sont les suivantes :

$$\gamma_C = 4$$

$$\gamma_H = 1$$

$$\gamma_O = -2$$

$$\gamma_N = -3$$

F - Lissage des données de fermentation

Le lissage est un traitement des données obtenues au cours de la culture qui a plusieurs objectifs : s'affranchir des incertitudes expérimentales, interpoler et calculer directement les valeurs dérivées et intégrales (accès aux vitesses de réaction et aux valeurs de rendements).

Pour le lissage, les données brutes de fermentation sont converties en masses ou en quantités afin de s'affranchir des variations de volume et des dilutions dues aux ajouts et aux prélèvements. Les valeurs expérimentales prises en compte sont donc les masses ou quantités de substrats (glucose et extrait de levure), de biomasse, de protéines, d'azote (minéral ou organique) et de carbone. Les vitesses de consommation du dioxygène et de production du dioxyde de carbone sont également prises en compte.

Les résultats sont alors traités avec un logiciel de lissage. Un calcul polynomial permet l'interpolation à partir des valeurs expérimentales et l'obtention d'une courbe lissée de l'évolution des variables considérées au cours de la fermentation. Les courbes dérivées décrivent l'évolution de la vitesse de consommation ou de production de ces composés. Le lissage permet d'accéder aux vitesses réactionnelles et aux vitesses spécifiques.

II.7 Détermination de la composition élémentaire de l'extrait de levure

II.7.1 Calcul théorique

La composition élémentaire de l'extrait de levure a été estimée dans un premier temps grâce à un outil de calcul, le descripteur métabolique, développé sous Microsoft® Office Excel par Jean-Louis Uribe Larrea.

La composition qui a servi de base pour les calculs est celle donnée par Biokar Diagnostics (Annexe 1). La proportion en acides aminés trouvée dans la littérature a donc été intégrée au descripteur qui a permis d'évaluer, sur la base des connaissances du métabolisme et de la physiologie de *Saccharomyces cerevisiae*, une composition élémentaire théorique de l'extrait de levure Biokar Diagnostics. Pour 100 g d'extrait de levure, la composition élémentaire organique est la suivante : $C_{3,93}H_{6,68}O_{1,82}N_{0,76}$. La formule élémentaire de l'extrait de levure a été complétée en intégrant la concentration en éléments inorganiques (Difco Reference Guide Peptones & Hydrolysates Selection Guide - Annexe 2). La composition élémentaire théorique de l'extrait de levure a été définie comme étant $C_{1,00}H_{1,70}O_{0,46}N_{0,19}$ ce qui correspond à un poids moléculaire de $93,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ou $23,84 \text{ g}\cdot\text{Cmol}^{-1}$. Cette composition a servi de référence et a été utilisée pour les calculs ultérieurs.

II.7.2 Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire d'un échantillon d'extrait de levure a été réalisée au Service Central d'Analyse du CNRS. D'après les résultats, sa formule élémentaire est donc $C_{1,00}H_{1,97}O_{0,65}N_{0,25}$ ce qui correspond à un poids moléculaire de 27,91 g.Cmol⁻¹. Pour une homogénéité des calculs entre les expérimentations, la valeur obtenue par le calcul théorique a été conservée tout au long de ce travail de recherche.

**Chapitre III. Experimental and
statistical analysis of nutritional
requirements for the growth of
Deinococcus geothermalis DSM 11300**

Chapitre III. Experimental and statistical analysis of nutritional requirements for the growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300

III.1 Introduction du chapitre.....	97
III.2 Publication : Experimental and statistical analysis of nutritional requirements for the growth of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300.....	98
III.2.1 Abstract	98
III.2.2 Introduction.....	99
III.2.3 Materials and methods	100
A - Microorganism, media and growth conditions	100
A1 - Bacterial strain	100
A2 - Media and growth conditions	100
A3 - Media supplementations	101
A4 - Chemicals products.....	102
B - Batch fermentations.....	102
C - Analytical methods.....	102
C1 - Gaz analysis	102
C2 - Biomass analysis	102
C3 - Supernatant analysis	103
D - Statistical analysis.....	103
III.2.4 Results and discussion.....	103
A - Principal component analysis of the composition of defined media for the growth of <i>Deinococcaceae</i>	103
B - Growth of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 on several complex and defined media in Erlenmeyer flasks.....	105
C - Principal component analysis of published defined media and formulations tested in flasks experiments for the growth of <i>Deinococcaceae</i>	107
D - Study of the influence of nutrients solutions pulses on the growth of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 in fermentation conditions	108
D1 - Pulses of carbon sources, nitrogen sources, salts, oligo-elements, vitamins and casamino acids.....	109
D2 - Pulses of several factions of yeast extract, whole yeast extract and <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 extract	112
III.2.5 Conclusions.....	115
III.2.6 Supplementary material.....	116
III.3 Quantification de la croissance de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 en bioréacteur, sur milieu complexe à 45 °C.....	119

Chapitre III. Experimental and statistical analysis of nutritional requirements for the growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300

III.1 Introduction du chapitre

Ce chapitre est principalement rédigé sous forme d'un article scientifique publié dans le journal scientifique *Extremophiles*.

Il décrit une analyse statistique et expérimentale des différents milieux utilisés pour la culture de déinocoques. Il confronte des milieux décrits dans la littérature ainsi que des résultats d'expérimentations menées en fioles Erlenmeyer puis en bioréacteur.

Quelques milieux définis ont été publiés pour la croissance des deux principales souches de déinocoques, *Deinococcus radiodurans* et *Deinococcus geothermalis*. Ces milieux se sont révélés toutefois insuffisants pour obtenir une croissance non limitée de la souche de cette étude, *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. De plus, les données quantitatives et cinétiques des croissances obtenues à partir de ces milieux sont rarement disponibles dans les articles scientifiques. Avant d'explorer la physiologie de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, ses besoins nutritionnels restent à définir et quantifier.

La première partie de ce travail a consisté en une analyse statistique multifactorielle des différents milieux définis utilisés pour la culture de souches appartenant aux genres *Deinococcus* et *Micrococcus*. De nombreuses formulations de milieux de culture ont été testées par des cultures en fioles Erlenmeyer. Devant la complexité de la mise en évidence d'un milieu de culture adapté à la culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, la stratégie a été d'étudier la réponse de la souche à des pulses de solutions nutritives lors de cultures en bioréacteur. L'instrumentation du bioréacteur permet en effet d'accéder au suivi de l'activité respiratoire et de la dynamique de croissance en fonction des modifications de l'environnement nutritionnel. Enfin, le potentiel de croissance de la souche a été quantifié lors d'une culture non limitée sur un milieu complexe.

III.2 Publication : Experimental and statistical analysis of nutritional requirements for the growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300

Authors

Julie Bornot¹²³, César-Arturo Aceves-Lara¹²³, Carole Molina-Jouve¹²³, Jean-Louis Uribe Larrea¹²³, Nathalie Gorret*¹²³

¹ Université de Toulouse ; INSA, UPS, INP ; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

² INRA, UMR 792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

³ CNRS, UMR 5504, F-31400 Toulouse, France

* Corresponding author.

Tel.: +33 05 61 55 94 44; fax: +33 05 61 55 94 00.

E-mail address: nathalie.gorret@insa-toulouse.fr

III.2.1 Abstract

Few studies concerning the nutritional requirements of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 have been conducted to date. Three defined media compositions have been published for the growth of this strain but they were found to be inadequate to achieve growth without limitation. The growth curves were not shown and the biomass concentration and the growth rate were generally not available. Principal Components Analysis was used to highlight the main compounds which differ between published chemically defined media. The comparison was based on maximum growth rate or biomass concentration.

The formulations of the media were collected from existing literature; media compositions designed for the growth of several strains of *Deinococcaceae* or *Micrococcaceae* were included. The results showed that a defined medium adapted from Holland *et al.* (Holland *et al.* 2006) was the best basal medium and was chosen for further studies. A growth rate of 0.03 h⁻¹ and a final OD_{600nm} of 0.55 were obtained, but the growth was linear. Then the effects of several medium components on oxygen uptake and biomass production by *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 were studied using a respirometry-based method, in order to search for the nutritional limitation due to the defined medium composition. The results revealed that the whole yeast extract in the medium with glucose is necessary to obtain a non-limiting growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 at a maximum growth rate of 0.64 h⁻¹ at 45 °C.

Keywords: *Deinococcus geothermalis*; nutritional requirements; respirometry; Principal Components Analysis

III.2.2 Introduction

Deinococcus geothermalis belongs to the *Deinococcus - Thermus* group. It's a gram-positive and red-pigmented bacterium that forms spherical cells of 1.5 to 2 μm in diameter. It grows typically as diplococcus or tetracoccus. *Deinococcus geothermalis* was isolated for the first time in hot springs in Naples, Italy and in São Pedro do Sul, Portugal. It was identified at other locations including industrial paper machines where it can form biofilms (Kolari *et al.* 2002; Peltola 2011; Väisänen *et al.* 1998).

Deinococcus geothermalis is a moderate thermophile with an optimal growth temperature between 45 to 50 °C. It can grow between pH 4.5 to 8.5 with an optimal at 6.5 (Ferreira *et al.* 1997).

The genome of *D. geothermalis* is composed of a circular chromosome of 2,467,205 base pairs and two plasmids of 574,127 base pairs and 205,686 base pairs (Makarova *et al.* 2007). *D. geothermalis* can survive and repair its genome even after an exposition to high radiation levels (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997). *Deinococcus geothermalis* is a moderate thermophile with an optimal growth temperature between 45 to 50 °C. It can grow between pH 4.5 to 8.5 with an optimal at 6.5 (Ferreira *et al.* 1997).

D. geothermalis can tolerate high concentrations of solvents and reduce a variety of heavy metals which make it a good candidate for bioremediation of radioactive wastes and environments. For example, *D. geothermalis* is able to reduce Fe(III) and Cr(VI) and has been genetically modified to reduce Hg(II) (Brim *et al.* 2003). A strain of *D. geothermalis* isolated from soil samples (from hot springs areas, Krabi, Thailand) tolerates high concentrations of various solvents as decane, diethylphtalate, butyl acetate and ethyl acetate and can assimilate hydrocarbon solvents as carbon sources (Kongpol *et al.* 2008).

D. geothermalis is commonly cultivated in rich media containing at least one complex nutrient source such as yeast extract, peptone or tryptone (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997). Just a few defined media compositions have been published for the growth of *D. geothermalis*. In these conditions, *D. geothermalis* is able to grow on ammonium sulfate as nitrogen source and glucose, fructose and toluene as carbon sources (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997; Kongpol *et al.* 2008); but they were found to be inadequate for a good growth. The maximum growth rate at 45 °C was 0.12 h⁻¹ (Kongpol *et al.* 2008). However, no quantitative studies on the nutritional needs are available in literature.

Furthermore, the nutritional requirements of the strain and physiological behaviour were very difficult to quantify because of the differences between the compositions of the media and the absence of biomass measurements and/or growth rates. Therefore, the main objective of this study was to determine the nutritional requirements of the reference strain *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 in order to allow new insights into physiology of *D. geothermalis*. A synthetic defined medium is necessary to insure reproducible culture conditions in order to carry on physiological studies in well-controlled environmental conditions.

The multifactorial statistical method, Principal Component Analysis, was carried to compare and highlight the main differences in composition between media described in literature and media tested in flask experiments. Then, *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 was cultivated in a bioreactor on a basal defined

medium deducted from the PCA analyses. Finally, a respirometry-based strategy was chosen in order to study the effects of pulses of media components on oxygen uptake.

III.2.3 Materials and methods

A - Microorganism, media and growth conditions

A1 - Bacterial strain

The microorganism used in this study was *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, provided by Deinol project partners (program DEINOL ISI of OSEO). The strain was inoculated into PGY medium broth (bacto-peptone 10 g.L⁻¹, glucose 10 g.L⁻¹, yeast extract 5 g.L⁻¹) and incubated at 37 °C for 24 hours. The bacterial cells were then stored at - 80 °C with 20 % (v/v) glycerol.

A2 - Media and growth conditions

Pre-cultures of *D. geothermalis* DSM 11300 were carried out in a 5 mL tube containing 1.8 mL Complex Medium Glucose (CMG) incubated at 37 °C or 45 °C for 24 hours on an orbital shaker (110 rpm). Only one colony was chosen for each inoculum. The Complex Medium Glucose was prepared by adding 10 g.L⁻¹ of glucose, 5 g.L⁻¹ of yeast extract and 2 g.L⁻¹ of bacto-peptone to the mineral medium (see below). For each inoculum preparation, the strain was plated on PGY agar medium (PGY medium broth supplemented with agar 14 g.L⁻¹) for 48 h at 37 °C. Only one colony was chosen for each inoculum. Two successive steps of pre-cultures, 15 mL and 150 mL for flasks experiments or 18 mL and 180 mL for bioreactor cultures, were then carried out in CMG medium, in baffled Erlenmeyer flasks with an inoculum at 10 % (v/v). Each flask was incubated 12 hours at 37 °C or 45 °C and 110 rpm. In Erlenmeyer flasks experiments, the pH of the medium was between 6.5 and 6.8, the optimum pH for the growth of *Deinococcus geothermalis* being 6.5.

Due to technical constraints, the first experiments in flasks were conducted at 37 °C. Only four tests in baffled Erlenmeyer flasks and cultures in bioreactors were made at 45 °C. It's important to note that temperature positively affects growth rate, but has no effect on the maximal biomass concentration (see Figure 25 in the Supplementary Material).

After centrifugation 5 minutes at 4000 g (Centrifuge 5810R, Eppendorf), the pellet was rinsed with physiological saline solution (9 g.L⁻¹ NaCl) before inoculation.

Basal mineral media compositions designed for the growth of various bacteria were tested:

The mineral medium DM used in this study was adapted from a medium developed for the growth of *Deinococcus radiodurans* (Holland *et al.* 2006). The composition of the DM was designed and provided by Deinol project partners. Unlike the medium described by Holland *et al.* (2006), DM does not contain serine, glutamine and KH₂PO₄. In addition, glucose is used as carbon source instead of fructose and cobalamin (vitamin B12) is added at a concentration of 1 µg.L⁻¹ (0.01 µg.L⁻¹ in Holland *et al.* medium). The

mineral medium DM was prepared as follows : 5.74 mM K₂HPO₄, 10 % v/v MOPS buffer mixture (400 mM MOPS acid, 200 mM NH₄Cl, 100 mM NaOH, 100 mM KOH, 2.76 mM Na₂SO₄, 5.28 mM MgCl₂ and 5 μM CaCl₂), 1 % v/v of a 2 mM FeCl₃ solution in 2 mM sodium citrate, 0.01 % v/v of a trace element solution (3*10⁻⁵ M (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4*10⁻³ M H₃BO₃, 3*10⁻⁴ M CoCl₂, 1*10⁻⁴ M CuSO₄, 25*10⁻⁴ M MnCl₂ and 10*10⁻⁵ M ZnSO₄) and 0.01 % v/v of each vitamin (niacin, thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride, cobalamin and biotin prepared separately at a concentration of 10 mg.L⁻¹). The MOPS buffer mixture and the solutions of iron, micronutrients and vitamins added were sterilized by filtration. The initial pH was adjusted to the required value 6.8 with NH₄OH. The carbon source solutions were prepared and autoclaved separately and added to the mineral medium just before the inoculation.

Basal mineral media compositions designed for the growth of various bacteria were tested: the chemically defined medium (MCD) usually used for the culture of lactic acid bacteria (Cocaign-Bousquet *et al.* 1995), the medium described by Little and Hanawalt for the culture of *Deinococcus radiodurans* (Little and Hanawalt 1973) and the MM medium developed for the culture of *Escherichia coli* (Sunya *et al.* 2012). The composition of the chemically defined medium designed for the growth of lactic acid bacteria was chosen because these bacteria are known to have numerous nutritional requirements to achieve an exponential growth without limitation. The MCD medium has been further implemented with the following bases adenine, guanine, uracile and xanthine to a concentration of 0.01 g.L⁻¹. The MM medium is a balanced mineral medium which provides all the essential nutrients required for the growth of *Escherichia coli*. It was used as described by Sunya *et al.* and twice concentrated or half diluted in order to evaluate the impact of several osmotic pressures on the growth of *D. geothermalis* DSM 11300.

A lot of media formulations were tested in baffled flasks, they are given in Tableau 23 in the Supplementary Material.

A3 - Media supplementations

Yeast extract fractions were obtained by filtration of a 200 g.L⁻¹ yeast extract solution using Amicon Ultra-15 centrifugal filter units of 10, 30 and 50 kDa (Millipore, Germany) and Microsep centrifugal devices 3 kDa (Pall Life Sciences, USA). Each fraction was sterilized by filtration on Sartorius Minisart 0.2 μm.

Yeast extract mineral fraction was prepared by heating yeast extract powder at 550 °C during 12 hours. The ashes were solubilised in concentrated acid solution (HCl or HNO₃) and diluted in ultra-pure water (18 MΩ.cm MilliQ water). The solutions of ashes were autoclaved 20 minutes at 121 °C.

D. geothermalis DSM 11300 cellular extract was obtained by sonication of a 10 hours cell culture in CMG. The sonication was carried out with a 13 mm diameter ultrasonic probe (vibracell 72412, Bioblock scientific, USA). 30 cycles of 20 seconds pulses on and off were applied. The cellular extract of *Deinococcus* was sterilized 20 minutes at 121 °C.

A4 - Chemicals products

Glucose, fructose, salts and oligo-elements were obtained from Prolabo (USA) and yeast extract and casamino acids vitamin-free from Difco Diagnostics (USA). Bacto-peptone was obtained from Becton Dickinson (USA) and sucrose from Merck (Germany). ZnSO₄ and acetic acid were provided from Carlo Erba (France) and MgCl₂, vitamins, amino acids, lactic acid, egg yolk emulsion and the MOPS were provided from Sigma (USA). All products were of the highest analytical grade available.

B - Batch fermentations

Batch fermentations were performed in a bioreactor B.Braun Biostat A (B.Braun Biotech International, Germany) of 2 L working volume with a Micro DCU-300 measurement and control unit, a temperature probe (Biotech International, Germany) and dissolved oxygen and pH probes (Broadley-James Corporation, USA). Stirring and aeration were regulated to avoid oxygen limiting conditions but no pH regulation was applied. The mixing system consisted of four baffles and a three-blade marine impeller. The temperature was set at 45 °C. The antifoaming agent struktol J673 (Struktol, Germany) was used in case of foam formation during the fermentation. On-line acquisition and regulation were done using MFCS/win 1.1 software package.

The composition of exhaust gas of the reactor was measured with a gas analyser (Innova 1313, LumaSense Technologies, USA), by photo-acoustic spectroscopy for the carbon dioxide and by magneto-acoustic spectroscopy for the dioxygen. Compared with the composition of the air inlet, oxygen uptake and carbon dioxide production rates were determined during the culture.

Throughout the experiment, samples were harvested and stored at - 20°C.

C - Analytical methods

C1 - Gaz analysis

The composition of exhaust gas of the bioreactor, dioxygen and carbon dioxide, was measured with a gas analyser (Innova 1313, LumaSense Technologies, USA), by photo-acoustic spectroscopy for the carbon dioxide and by magneto-acoustic spectroscopy for the dioxygen. Compared with the composition of the air inlet, oxygen uptake and carbon dioxide production rates were determined during the culture.

C2 - Biomass analysis

Biomass concentration was determined by optical density measurement at 600 nm (spectrophotometer Libra S4, Biochrom, UK) with a 2 mm absorption cell (Hellma, Germany) and cell dry weight measurements. Cell dry weight was estimated by filtration on polyamide membrane (Sartolon 0.2 µm – Sartorius, Germany) and drying to a constant weight for 48 hours, at 60 °C under 200 mmHg in a vacuum oven (Heraeus, France).

C3 - Supernatant analysis

During the fermentation, culture supernatant was obtained by centrifuging (MiniSpin Eppendorf, USA) fermentation broth samples in Eppendorf tubes at 12000 g for 3 minutes. The glucose concentration in supernatant was measured with a YSI 2700 glucose analyzer (Yellow Springs Instruments[®], USA).

D - Statistical analysis

PCA is a useful multifactorial statistical method for analysing data of high dimension. It is a mathematical treatment that allows the reduction of dimension for the statistical exploration of complex quantitative information. Furthermore, its graphical representation is a way of expressing data to highlight their similarities and differences.

The data analyzed included the different formulations of synthetic media reported in the literature. The first column of the table corresponded to the authors having published the medium and in the other columns there were the concentrations of constituting nutrients. The data matrices used for the PCA are given in the electronic supplementary material (Online Resources 3 and 5 – Annexe 3 and Annexe 5). Obviously, if a compound was not present in the medium its concentration was equal to zero. Variables have very heterogeneous variances so they were normalized before applying the PCA method. The standardized variables X_i^* were calculated with the following formula: $X_i^* = (X_i - \text{mean}) / (\text{variance})^{(1/2)}$. Then, PCA was carried out with Matlab (Statistics Toolbox, Matlab 6.5, Mathworks).

First, the data were plotted in a two-dimensional plane given by the two principal components (the component coefficient matrices are given in the electronic supplementary material: Online Resources 4 and 6 – Annexe 4 and Annexe 6), in order to give a descriptive view of the importance of the main nutrients of the media. Then, with this representation of the data, the results of growth were reported to each medium. The comparison criteria were also the maximum exponential growth rate and biomass concentration (measured by OD at 600 nm), when they were available in the literature. Such a two-dimensional plot provided an adequate representation to get the best possible composition of a medium suitable for the growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300.

III.2.4 Results and discussion

A - Principal component analysis of the composition of defined media for the growth of *Deinococcaceae*

Fermentation media must satisfy all the nutritional requirements of microorganisms. Generally they must provide carbon and nitrogen sources, phosphorous and sulphur, salts, oligo-elements and sometimes growth factors like vitamin(s). Few results concerning nutritional requirements of *Deinococcus geothermalis* have been published to date (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997; Kongpol *et al.* 2008). A multifactorial statistical analysis was chosen in order to compare the composition of the different defined media

described for the culture of several strains of *Deinococcaceae* and *Micrococcaceae*. The analysis was carried out on all the available data on the media described for the growth of *Deinococcus radiodurans*, *Deinococcus geothermalis* and strains of *Micrococcus*. Initially, *D. radiodurans* was named *M. radiodurans* because of its similarity to strains of the genus *Micrococcus*. In 1981, research on *M. radiodurans* properties showed that this strain had to be renamed and classified in a new genus, *Deinococcus* (Brooks and Murray 1981). *D. radiodurans* is the main mesophile strain of *Deinococcus* and is the most studied strain of *Deinococcaceae*. Most of the chemically defined medium has been designed for the growth of *D. radiodurans*. As described previously, PCA was chosen for this statistical analysis. PCA helped providing a graphical representation of the data and evaluating the main factors (defined medium components) that had a significant influence on the growth of *Deinococcus* and *Micrococcus* strains.

Eleven formulations were then integrated into this analysis: 10 culture media from the literature (7 for *Deinococcus* and 3 for *Micrococcus*) and 1 medium developed by Deinol partners. The PCA matrix is given in the electronic supplementary material (Online Resource 3 – Annexe 3). The best two-dimensional representation of the data was given by the first two principal components F₁ and F₂ which explained 54 % of the variance (Figure 17). The others principal components were not retained because they explained less than 13 % of the variance. The compounds revealed by the first component F₁ are L-alanine and L-arginine. Those revealed by F₂ are maltose, DL-aspartic acid, L-methionine, L-cysteine, L-histidine, L-tryptophan and TRIS.

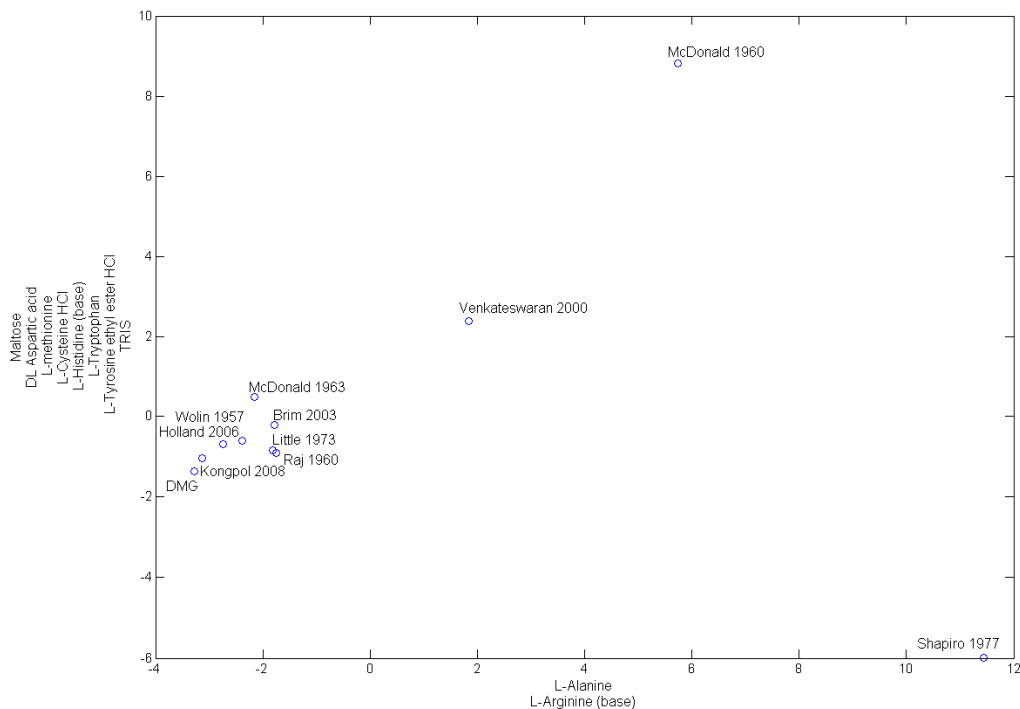


Figure 17 : Two-dimensional representation of the media formulations according to the principal components F₁ and F₂; F₁ and F₂ explained respectively 34 % and 20 % of the variance

PCA revealed many elements with various concentrations between the different media compositions. After the superimposition of the growth data (maximum exponential growth rate and/or biomass concentration), it's difficult to highlight a link between compounds in the medium and the results of the growth. The maximum growth rate, 0.27 h^{-1} , was obtained for *D. radiodurans* with the medium described by Holland *et al.* in 2006 (Holland *et al.* 2006).

However, *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 did not grow on Holland *et al.* (2006) medium but growth was possible on a simplified formulation of this medium provided by Deinol project partners (data not shown). This simplified medium, named DM, was chosen as a reference medium for the culture of the strain. A growth rate of 0.03 h^{-1} and a final $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of 0.55 (Figure 18) were obtained in 60 hours and the biomass yield on glucose was $0.23 \text{ gx.gGlc}^{-1}$.

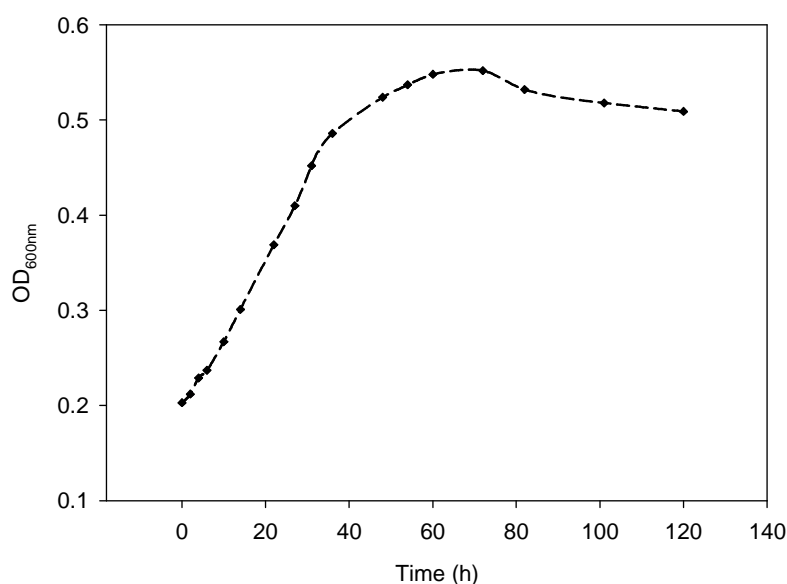


Figure 18 : Growth curve of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 on the mineral medium DM

However, when yeast extract was added to the medium, the growth rate and the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ reached 0.20 h^{-1} and 2.23 respectively. Further experiments were then necessary to test several media and component supplementations, in order to improve the growth of *D. geothermalis* DSM 11300 on a nutritionally controlled medium.

B - Growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 on several complex and defined media in Erlenmeyer flasks

The effects of the main components constituting a defined medium for the growth of microorganisms were investigated. All the media formulations tested are summarized in Tableau 23 in the Supplementary Material. The experiments were done in baffled Erlenmeyer flasks in order to compare growth in terms of maximal cell concentration and kinetic (maximal $\text{OD}_{600\text{nm}}$ and growth rate).

The results showed that fructose and sucrose could not be used as carbon source. On the other hand, glucose was assimilated by *D. geothermalis* DSM 11300 to produce biomass. At a temperature of 37 °C, the maximum OD_{600nm} and growth rate obtained with glucose 10 g.L⁻¹ as the only carbon source were 1.5 and 0.08 h⁻¹ respectively and the biomass yield reached 0.25 g_x.g_{GlC}⁻¹. These results differed from results published by Ferreira *et al.* who reported that *D. geothermalis* can utilize fructose and sucrose as carbon source (Ferreira *et al.* 1997). Lactate and acetate were not consumed as it was reported for *D. radiodurans* (Venkateswaran *et al.* 2000).

D. geothermalis DSM 11300 was not able to utilize (NH₄)₂HPO₄ or NH₄Cl. Unlike previous results (Brim *et al.* 2003), ammonia could not be the sole nitrogen source in the medium.

Many salts and oligo-elements (NH₄Cl, (NH₄)₆Mo₇O₂₄, H₃BO₃, CoCl₂, CuSO₄, MnCl₂, FeCl₃ and MnSO₄) and vitamins (biotin, thiamine, pyridoxal, niacin, panthotenate, mesoinositol, aminobenzoic acid and cobalamin) were added as medium supplementations. None of the minerals and growth factors tested could provide a non-limiting growth of the strain. A linear growth was observed, and the growth rate did not exceed 0.03 h⁻¹ as observed with the reference medium.

No growth was observed when manganese or iron were supplemented to the basal medium, even if it has been reported that manganese and iron play an important role in *D. radiodurans* metabolism and radiation resistance (Chou and Tan 1990; Daly *et al.* 2004).

Egg yolk emulsion, that could serve as precursor for the unusual phospholipids and fatty acids identified by several authors in *Deinococcaceae* cell wall (Knivett *et al.* 1965; Thornley *et al.* 1965; Work 1964; Work and Griffiths 1968), was added to the reference medium. No growth was observed within these lipid-enriched conditions.

In order to focus on particular metabolism pathways associated with radiation resistance, arginine and glutamate were tested as specific growth factors for the culture of *D. geothermalis* DSM 11300. Genes encoding for nitric oxide synthases (NOSs), enzymes catalyzing the production of nitric oxide (NO) from L-arginine, have been identified in *D. radiodurans* (Adak *et al.* 2002; Reece *et al.* 2009). Patel and Crane have reported that these bacterial NOSs appear to be involved in preventing damage caused by irradiation and oxidation (Crane 2008; Patel *et al.* 2009). Arginine and glutamate pathways are linked but neither arginine nor glutamate were used as substrates in the defined medium; both supplementations could not improve the growth when glucose was present. This result was surprising because glutamate has been described as a preferred carbon and/or nitrogen source for *D. radiodurans* growth (He 2009; Holland *et al.* 2006).

A relationship between gluconate-induced Entner-Doudoroff pathway and the carbohydrate catabolism was considered. D-gluconate was added to the mineral medium formulation. Although the Entner-Doudoroff and the pentose phosphate pathways appear to be functional for the sugar catabolism in *Deinococcus radiodurans* (Makarova *et al.* 2001; Venkateswaran *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2003), no growth of *D. geothermalis* DSM 11300 was observed on gluconate.

Finally, complex carbon and nitrogen sources were supplemented to the media formulations: the casamino acids vitamin-free provide all the essential amino acids (except tryptophan); tryptone and bacto-peptone contain oligopeptides and provide nitrogen, amino acids and vitamins in the culture medium. In addition, tryptone is rich in tryptophan. The observed growth in the presence of casamino acids vitamin-free, tryptone or bacto-peptone, added alone or with glucose, was linear. It was possible to achieve a maximum growth rate of 0.1 h⁻¹ with these substrates as carbon and/or nitrogen sources (Liedert *et al.* 2012) or as growth factors. When yeast extract was added to the medium, an exponential growth was observed with growth rate of 0.20 h⁻¹ and 0.64 h⁻¹ at 37 °C and 45 °C respectively. These results were in accordance with previous works which showed that *D. radiodurans* prefers other carbon sources than glucose, like amino acids in yeast extract (Venkateswaran *et al.* 2000). Ferreira *et al.* reported a growth rate of 0.75 h⁻¹ at pH 7 and 45 °C for the growth of *D. geothermalis* DSM 11300, cultivated in the presence of tryptone and yeast extract (Ferreira *et al.* 1997).

These results did not highlight the nature of the essential(s) compound(s) for the growth of *D. geothermalis* DSM 11300. At least one or several growth factor(s) were lacking in the DM medium. Unless yeast extract was added to the medium, none of the conditions described above made it possible to obtain a growth without limitation. This result was surprising because Ferreira *et al.* reported that yeast extract was not required for the growth of *D. geothermalis* DSM 11300; but no quantitative data of biomass concentration, OD or growth rate in a minimal medium without yeast extract was available in this published work (Ferreira *et al.* 1997). Nevertheless, all these experimental results implement the knowledge of the nutritional requirements for the growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300.

C - Principal component analysis of published defined media and formulations tested in flasks experiments for the growth of *Deinococcaceae*

A second PCA was carried out integrating data from literature and flask experiments.

As the previous analysis, the basic knowledge available on the substrates and various nutrient formulations for the growth of *Deinococcaceae* and *Micrococcaceae* was collected from the existing literature. The composition of the media used for the flasks experiments were implemented, resulting in a total of 48 media formulations; the PCA matrix is given in the electronic supplementary material (Online Resource 5 – Annexe 5).

previously been used for the characterization of the microbial growth and the kinetic of biodegradation in organic wastes (Marsili-Libelli and Vaggi 1997; Di Trapani *et al.* 2011; Tremier *et al.* 2005). In addition, respirometric methods have been applied to study the effect of nutrients pulses on the kinetic of growth of microorganisms (Oliveira *et al.* 2011). The OUR curve reflects the response of the microorganism, linked to its biological activity, when the nutritional environment is modified (Paca *et al.* 2010).

D1 - Pulses of carbon sources, nitrogen sources, salts, oligo-elements, vitamins and casamino acids

1.8 L of defined medium DM was inoculated with *D. geothermalis* DSM 11300. After 30 minutes of decrease, the value of the pO₂ stabilized at 60 %. After 3 hours, no increase in OD_{600nm} was observed traducing an absence of growth of the microorganism. After 3 hours with constant dissolved oxygen pressure, pulses of nutritive element solutions were made. Their effects on the cellular activity of *D. geothermalis* DSM 11300 were quantified by measuring the dissolved oxygen pressure online. The experimental results are shown on Figure 20 and Figure 21.

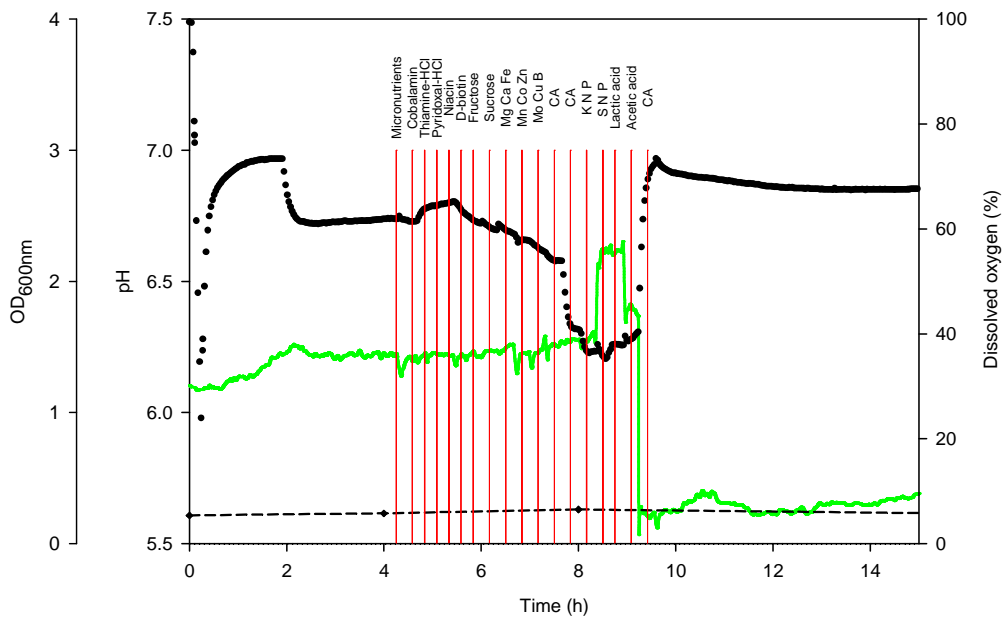


Figure 20 : Physiological descriptors evolution during the culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. Time course evolution of the dissolved oxygen (●), the OD_{600nm} (-◆-) and the pH (—); nutritional pulses are represented by the vertical bars – Mg = MgSO₄, Ca = CaCl₂, Fe = FeSO₄, Mn = MnSO₄, Co = CoCl₂, Zn = ZnSO₄, Mo = Na₂MoO₄, Cu = CuCl₂, B = H₃BO₃, CA = casamino acids vitamin-free, K N P = K₂HPO₄ + (NH₄)₂HPO₄, S N P = Na₂HPO₄ + (NH₄)₂SO₄ + NH₄Cl

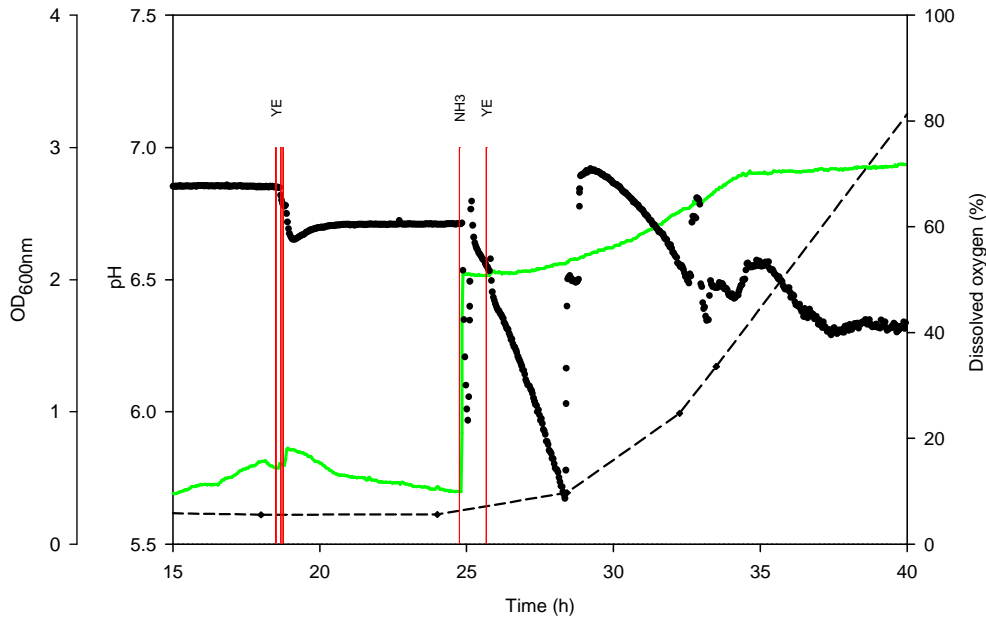


Figure 21 : Physiological descriptors evolution during the culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. Time course evolution of the dissolved oxygen (●), the OD_{600nm} (-◆-) and the pH (—); nutritional pulses are represented by the vertical bars – YE means yeast extract

The micronutrients were supplemented at a concentration ten fold higher than their initial concentration in the medium. Fructose and sucrose were added at 2 g.L⁻¹, lactate and acetate at 1 g.L⁻¹ and the casamino acids at 25 mg.L⁻¹ and 250 mg.L⁻¹. Yeast extract was added at a concentration varying from 0.5 to 2 g.L⁻¹. Vitamins, salts and oligo-elements were added at a concentration equal to 10 % of their initial concentration. All these concentrations were calculated in order to induce detectable response on the oxygen uptake, in the case of a positive effect of the supplementations on the metabolic activity.

The pulses of solutions of micronutrients, vitamins, fructose, sucrose, oligo-elements (Mg, Ca, Fe, Mn, Co, Zn, Cu, B, Mo) had poor influence on the variation of the pO₂, there no was significant oxygen uptake.

When the casamino acids vitamin-free were added for the first time, pO₂ decreased during 40 minutes. Nevertheless, no significant growth was observed regarding to the OD_{600nm}. The casamino acids may have been used as carbon source or provided one or several amino acids able to stimulate the metabolic activity but not enough to activate the growth. The pulses of solutions of salts (K, N, P and S) did not cause oxygen uptake. Those salts were not the factors limiting the growth.

Lactic and acetic acids could not be used as sources of carbon in these conditions. However, the addition of the acids caused an increase in the value of the pO₂. The pH variation had an important effect on the respiratory activity of *D. geothermalis*. In spite of the results of Ferreira *et al.* in 1997, *Deinococcus geothermalis* seemed to be affected by the reduction of the pH value to 5.7. Even when casamino acids or yeast extract were added, it had a poor effect on the cellular activity.

After 24 hours of culture, there was no increase of the OD_{600nm} and only 0.9 g.L⁻¹ of glucose were consumed. After an addition of ammonia which increased the pH to 6.6 (Figure 21), a pulse of yeast extract induced a significant oxygen uptake concomitant to glucose consumption. The value of the OD_{600nm} increased from 0.22 to 4.5 in 26 hours, with a maximum growth rate of 0.25 h⁻¹. The growth factor(s) was (were) provided by yeast extract and was effective at pH close to 6.6.

Previous results with manganese and magnesium were confirmed and few nitrogen sources were tested (Figure 22).

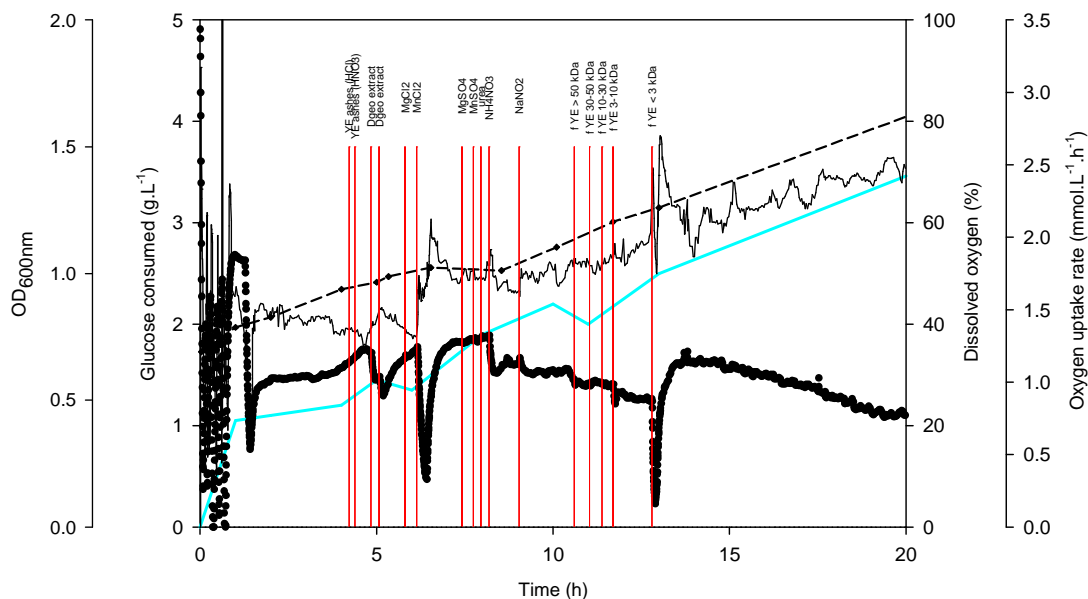


Figure 22 : Physiological descriptors evolution during the culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. Time course evolution of the dissolved oxygen (●), the glucose uptake (—), the OD_{600nm} (-◆-) and the oxygen uptake rate (—); nutritional pulses are represented by the vertical bars – YE means yeast extract, Dgeo extract means *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 extract and fYE means fraction of yeast extract

During this experiment, a four-hour linear growth phase corresponding to less than one generation was obtained and the pO₂ value remained at 30 %. The oxygen uptake rate was constant, the OD_{600nm} increased from 0.69 to 0.94 at 0.04 h⁻¹ linear growth rate. In order to avoid the limitation in the medium, pulses of potential lacking compounds were made. The salts MgCl₂, MgSO₄ and MnSO₄ (1 mM each pulse) did not have any effect on the value of the pO₂. MnCl₂ increased the respiratory activity and the pO₂ fell to 9 % in 17 minutes. However, this pulse did not have a direct effect on the growth because no increase of the biomass was quantified, even if manganese was described as an important oligo-element for the biomass production of *Deinococcus geothermalis* (Zhang 2000; Chou and Tan 1990). Then nitrogen sources were added at a concentration equal to 1 mM. NaNO₂ and urea pulses had no influence. The addition of NH₄NO₃ resulted in a decrease of 8 % of pO₂ which was not considered as a significant response because no effect on the respiration of the microorganism was observed. Nevertheless, a linear growth was obtained after the pulse of NH₄NO₃. The OD_{600nm} increased at a growth rate of 0.05 h⁻¹. After 13 hours of culture, an OD_{600nm} of 1.26 was reached (0.04 h⁻¹ growth rate) and 2.5 g.L⁻¹ of glucose

were consumed. During this culture, the respiratory quotient (RQ) was equal to 1.2. The effects of manganese and NH_4NO_3 were checked with experiments in Erlenmeyer flasks (data not shown). Neither manganese nor NH_4NO_3 improved the growth rate of *D. geothermalis* DSM 11300 cultivated on DM with glucose (10 g.L^{-1}) as carbon source. A linear growth with a growth rate equal to 0.05 h^{-1} was obtained.

D2 - Pulses of several factions of yeast extract, whole yeast extract and *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 extract

Since yeast extract was necessary to achieve good growth of *D. geothermalis*, its fractionation was done to observe which compound(s) may be responsible for the stimulating effect. According to Figure 23, during the first four hours which followed inoculation, there was no variation of the pO_2 . The cells were viable and oxygen brought was sufficient to maintain the respiratory activity of the cells. However, no growth was observed, confirming the results of the previous fermentation. The growth being always limited after four hours of culture, the pulses of nutritive elements in the DM started. The concentrations of the fractions of yeast extract added are listed in Tableau 22. Yeast extract ashes were added at a concentration equivalent to 0.1 g.L^{-1} of yeast extract. Autoclaved and filtered yeast extract were added at a concentration of 0.1 g.L^{-1} too. The results are shown on Figure 23 and Figure 24 and in Tableau 22.

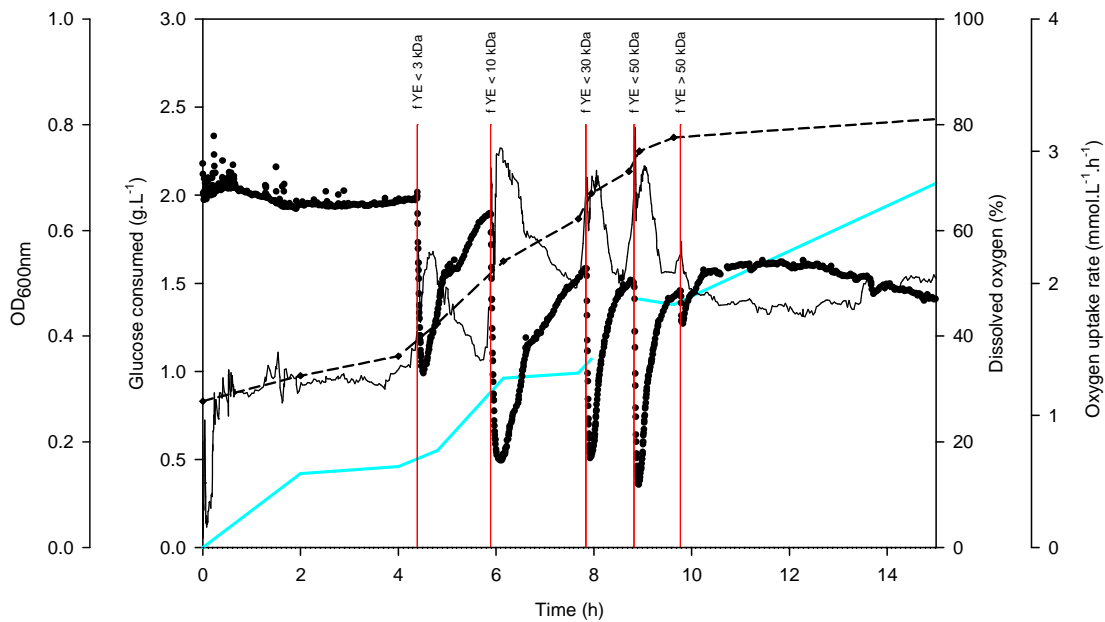


Figure 23 : Physiological descriptors evolution during the culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. Time course evolution of the dissolved oxygen (●), the glucose uptake (—), the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ (-◆-) and the oxygen uptake rate (—); nutritional pulses are represented by the vertical bars f YE means fraction of yeast extract

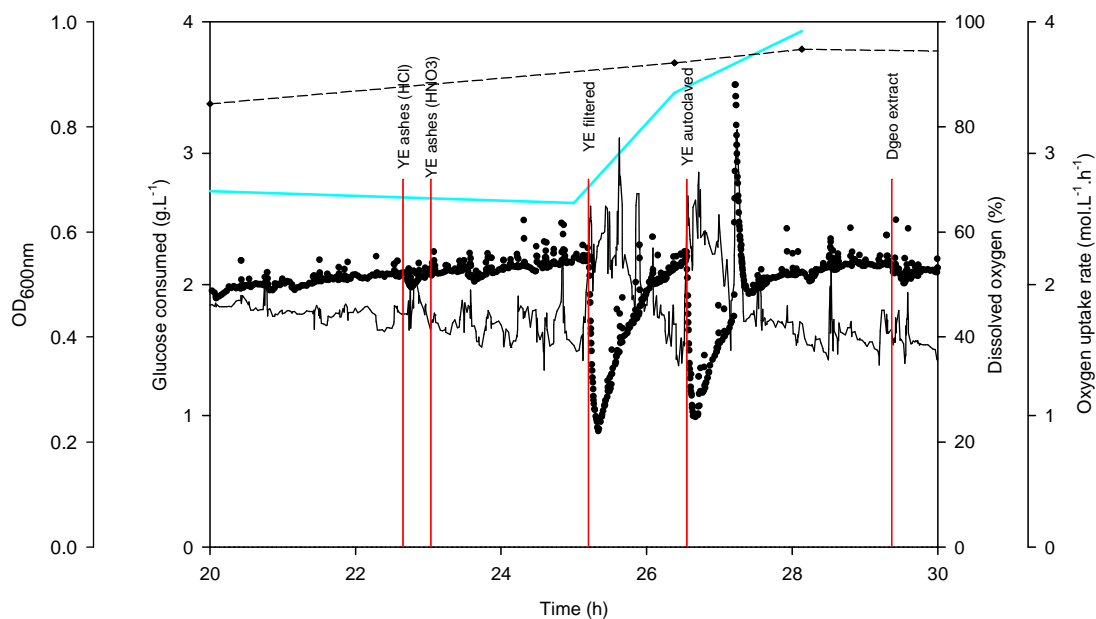


Figure 24 : Physiological descriptors evolution during the culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. Time course evolution of the dissolved oxygen (●), the glucose uptake (—), the OD_{600nm} (-◆-) and the oxygen uptake rate (—); nutritional pulses are represented by the vertical bars – YE means yeast extract and Dgeo extract means *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 extract

Tableau 22 : Decrease of the dissolved oxygen according to the concentration of yeast extract fraction pulses.

Fractions	Concentrations (g.L ⁻¹)	Decrease of dissolved oxygen (%)
F < 3 kDa	1	63 → 33
F < 10 kDa	0.3	63 → 17
F < 30 kDa	0.1	53 → 17
F < 50 kDa	0.1	50 → 12
F > 50 kDa	0.1	-

Five fractions of yeast extract were tested; the fraction containing compounds of molecular weight lower than 3 kDa induced a fast decrease of the pO₂, correlated with an increase of the oxygen uptake rate rO₂: it showed the presence of a growth factor within this solution. This growth factor could be a salt, a vitamin, an amino-acid, a cofactor, a nitrogenous base, a peptide, etc. The addition of the fraction with compounds of molecular weight lower than 10 kDa resulted in an increase in the respiratory activity more important than the previous fraction. Moreover, the pO₂ did not return to its initial value. This fraction induced an increase in the oxygen uptake which was maintained after the pulse. The fractions with compounds of molecular weight lower than 30 kDa or lower than 50 kDa had the same effect on the pO₂ value but the pO₂ reached its initial value. The results observed in terms of respiratory activity were correlated with the growth of *D. geothermalis* DSM 11300. Indeed, the OD_{600nm} increased during the same

time, from 0.36 to 0.78, with a growth rate of 0.14 h^{-1} . This growth rate was lower than the 0.64 h^{-1} obtained in flasks experiments at $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$. It suggested that these fractions of yeast extract could increase the metabolic activity and the growth of *D. geothermalis*, but whole yeast extract was needed to achieve a non-limiting growth with the maximum growth rate. It resulted in a yield of $0.26 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{YE}}^{-1}$ of biomass produced per yeast extract added to the medium. During the same time $0.9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of glucose were consumed. Finally, the fraction with compounds of molecular weight higher than 50 kDa had no significant influence on the cellular activity of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. Despite the nutrients pulses, the RQ was constant at 1.2.

The mineral fraction of yeast extract (ashes) did not have any effect on the respiratory activity of *D. geothermalis* DSM 11300 (Figure 24). It seemed that the growth factor was not a mineral one. The viability of the cells was checked by addition of $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of complete yeast extract. It caused a decrease of the pO_2 and an increase of the oxygen uptake rate. The $\text{OD}_{600\text{nm}}$ increased after both pulses and $1.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of glucose were consumed during the same time. The increase of the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ from 0.80 to 0.95 is in accordance with a maximum growth rate of 0.63 h^{-1} . At $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, when yeast extract was added for the experiments in Erlenmeyer flasks, the growth rate was 0.64 h^{-1} . With the whole yeast extract, the growth was better than with the fractions. The yeast extract could provided a growth factor or been used as nitrogen and/or carbon source. In addition, two methods of yeast extract sterilization were tested: filtration and autoclave. Both pulses induced the same response. There was no difference between yeast extract filtered or autoclaved on the respiratory activity of *Deinococcus*. Then, the results revealed that a cellular extract of *Deinococcus geothermalis* can not be used to induce the growth of *Deinococcus geothermalis*. This result may be explained by the difference of composition between yeast extract and the bacterial extract. Brown *et al.* compared the biochemical composition of several marine strains of yeasts and bacteria (Brown *et al.* 1996). They found that yeasts and bacteria contained the same ratio of nucleic acid and lipids but yeasts contained less protein and ashes but more carbohydrates than bacteria. The results have shown that the composition in amino-acids, fatty-acids and sugars varied with the strain. In addition, the difference in composition may be related to the stage of harvest of the culture for the preparation of the extract.

Results shown on Figure 22 confirmed that yeast extract ashes had no effect on the growth of *D. geothermalis* DSM 11300. With the pulses of $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of yeast extract fractions, it was confirmed that the substances having a significant effect on the pO_2 and on the cellular activity of *D. geothermalis* DSM 11300 were provided by the fraction of yeast extract with compounds of molecular weight lower than 3 kDa . There was an increase of the oxygen uptake rate, although the $\text{OD}_{600\text{nm}}$ continued to increase and the glucose to be consumed by following the same dynamics.

III.2.5 Conclusions

The formulation of a synthetic culture medium well-adapted to the culture of *D. geothermalis* DSM 11300 was assessed using a Principal Components Analysis (PCA) of eleven media compositions reported in literature. Even if the PCA did not highlight a particular group of components associated with growth efficiency, the maximum growth rate of 0.27 h⁻¹ was achieved on Holland *et al.* medium formulation with *D. radiodurans*. However it provided a limited growth of the strain *D. geothermalis* DSM 11300, the simplified mineral medium DM adapted from Holland *et al.* was chosen as a reference medium. Thirty seven complementary formulations were tested in Erlenmeyer flasks to implement the data used in PCA. Despite the number of formulations, the analysis could not discriminate compounds which would improve significantly the growth of *D. geothermalis* DSM 11300.

An original respirometry-based approach was conducted to study the effect of nutrients on the dynamics of growth and oxygen uptake of *D. geothermalis* DSM 11300 in well-controlled bioreactor with the DM medium with glucose. Despite the large number of different solutions added to the medium, the growth factor(s) was (were) not revealed by this nutritional strategy of pulses. No growth or a maximum growth rate of 0.08 h⁻¹ was obtained without yeast extract supplementation. This observation was in accordance with results published by Kongpol *et al.* in 2008 (Kongpol *et al.* 2008). Contrary to a previous work which showed that yeast extract was not necessary for the growth of *D. geothermalis* (Ferreira *et al.* 1997), Kongpol and coauthors reported that the growth of *D. geothermalis* T27, a solvent-tolerant strain isolated in Thailand, was possible but poor in the absence of yeast extract.

Experimental results showed that only yeast extract or its fraction containing the compounds of molecular weight lower than 3 kDa had a positive effect on the growth. *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 requires a single or several growth factor(s) with low molecular weight (vitamin, amino-acid, cofactor, nitrogenous base, peptide, etc.) to achieve a growth rate of 0.14 h⁻¹. However, the whole yeast extract is necessary to obtain a non-limiting growth with the maximum growth rate of 0.20 h⁻¹ at 37 °C and 0.64 h⁻¹ at 45 °C. Several explanations can be made to explain the positive effect of the growth factor(s). The growth factor is not a constitutive element of the microorganism, otherwise no growth at all would be obtained in its absence. So, it could be an element that i) acts as a catalyst, ii) combines with a toxic compound present in the medium or iii) modifies physicochemical properties of the medium to permit the growth (Koser and Saunders 1938).

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was financially supported by the program DEINOL ISI of OSEO, the French Agency for Innovation. We gratefully acknowledge Deinol project partners for supplying the strain *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 and the composition of the reference medium DM.

III.2.6 Supplementary material

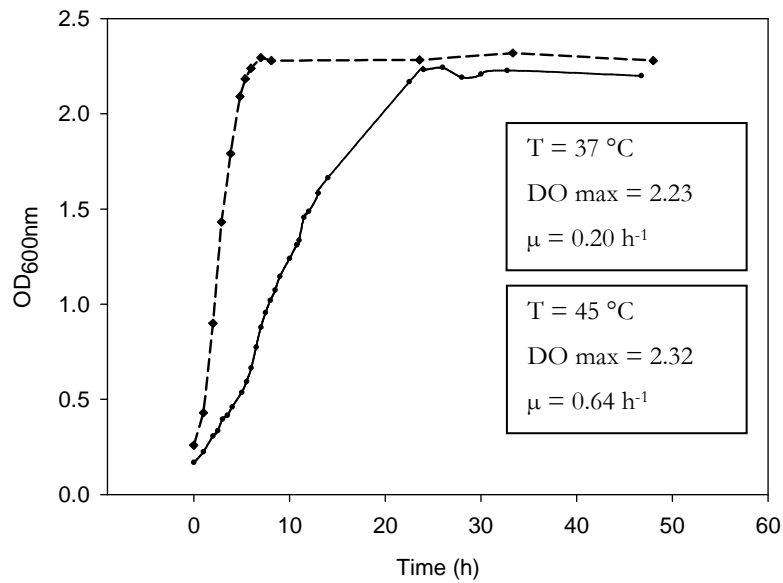


Figure 25 : Comparison of growth curve of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 obtained at 37 °C (—●—) and 45 °C (---◆---)

Tableau 23 : Media formulations tested in baffled Erlenmeyer flasks

<u>Basal media</u>	<u>Carbon sources</u>	<u>Others components</u>
	glucose (10 g.L ⁻¹)	
	fructose (10 g.L ⁻¹)	mm vitamins: biotin (50 µg.L ⁻¹),
	sucrose (10 g.L ⁻¹)	cobalamin (1 mg.L ⁻¹),
	acetic acid (1.5 g.L ⁻¹)	thiamin (1 mg.L ⁻¹),
	lactic acid (1.5 g.L ⁻¹)	pyridoxal (1 mg.L ⁻¹),
		niacin (1 mg.L ⁻¹)
	glucose (10 g.L ⁻¹)	casamino acids vitamin-free (2.5 g.L ⁻¹)
	glucose (10 g.L ⁻¹)	
MM2X	glucose (10 g.L ⁻¹)	mm vitamins: biotin (50 µg.L ⁻¹), cobalamin (1 mg.L ⁻¹), thiamin (1 mg.L ⁻¹), pyridoxal (1 mg.L ⁻¹), niacin (1 mg.L ⁻¹)
	glucose (10 g.L ⁻¹)	casamino acids vitamin-free (5 g.L ⁻¹)
	glucose (10 g.L ⁻¹)	yeast vitamins: biotin (0.8 mg.L ⁻¹), thiamin (13.3 mg.L ⁻¹), pyridoxal (13.3 mg.L ⁻¹), niacin (13.3 mg.L ⁻¹), panthotenate (16 mg.L ⁻¹), mesoinositol (0.33 g.L ⁻¹), aminobenzoic acid (2.7 mg.L ⁻¹)
MM	glucose (10 g.L ⁻¹)	
MM/2	glucose (10 g.L ⁻¹)	
MCD	glucose (10 g.L ⁻¹)	nitrogenous bases (0.01 g.L ⁻¹): adenine, guanine, uracile and xanthine
	glucose (10 g.L ⁻¹)	
Little	glucose (10 g.L ⁻¹)	casamino acids vitamin-free (1 g.L ⁻¹)
	glucose (10 g.L ⁻¹)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (2.5 g.L ⁻¹)
DM	glucose (10 g.L ⁻¹)	vitamins (1 µg.L ⁻¹): biotin, cobalamin, thiamin, pyridoxal, niacin
		yeast extract (5 g.L ⁻¹)
		bacto-peptone (2 g.L ⁻¹)
DM	glucose (10 g.L ⁻¹)	vitamins (1 µg.L ⁻¹): biotin, cobalamin, thiamin, pyridoxal, niacin
		egg yolk emulsion (0.5 % v/v)

Tableau 23 (suite) : Media formulations tested in baffled Erlenmeyer flasks

<u>Basal media</u>	<u>Carbon sources</u>	<u>Others components</u>
DM		yeast extract (5 g.L ⁻¹)
		bacto-peptone (2 g.L ⁻¹)
		yeast extract (2.5 g.L ⁻¹)
		tryptone (2.5 g.L ⁻¹)
DM	glucose (10 g.L ⁻¹)	vitamins (1 µg.L ⁻¹): biotin, cobalamin, thiamin, pyridoxal, niacin
		yeast extract (5 g.L ⁻¹), bacto-peptone (2 g.L ⁻¹)
		FeCl ₃ (50 µM)
		Micronutrients solutions 10 % (v/v)
		MnCl ₂ (10 µM)
		FeCl ₃ (40 µM), NH ₄ Cl (40 mM), MnSO ₄ (0.3 mM)
		arginine (2.5 g.L ⁻¹)
		glutamic acid (2.5 g.L ⁻¹)
DM	arginine (2.5 g.L ⁻¹)	yeast extract (2.5 g.L ⁻¹)
		tryptone (2.5 g.L ⁻¹)
DM	glutamic acid (2.5 g.L ⁻¹)	vitamins (1 µg.L ⁻¹): biotin, cobalamin, thiamin, pyridoxal, niacin
DM	D-gluconic acid sodium salt (5 g.L ⁻¹)	vitamins (1 µg.L ⁻¹): biotin, cobalamin, thiamin, pyridoxal, niacin
DM	glucose (10 g.L ⁻¹)	vitamins (1 µg.L ⁻¹): biotin, cobalamin, thiamin, pyridoxal, niacin
		egg yolk emulsion (0.5 % v/v)

III.3 Quantification de la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 en bioréacteur, sur milieu complexe à 45 °C

Les résultats décrits dans la publication « Experimental and statistical analysis of nutritional requirements for the growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 » mettent en évidence que l'extrait de levure est indispensable à la croissance sans limitation de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. La croissance de cette souche en bioréacteur de 2 L, sur le milieu complexe avec 10 g.L⁻¹ de glucose, a donc été quantifiée en culture discontinue à 45 °C. Les cinétiques de croissance et d'activité respiratoire sont représentées sur les Figure 26 et Figure 27.

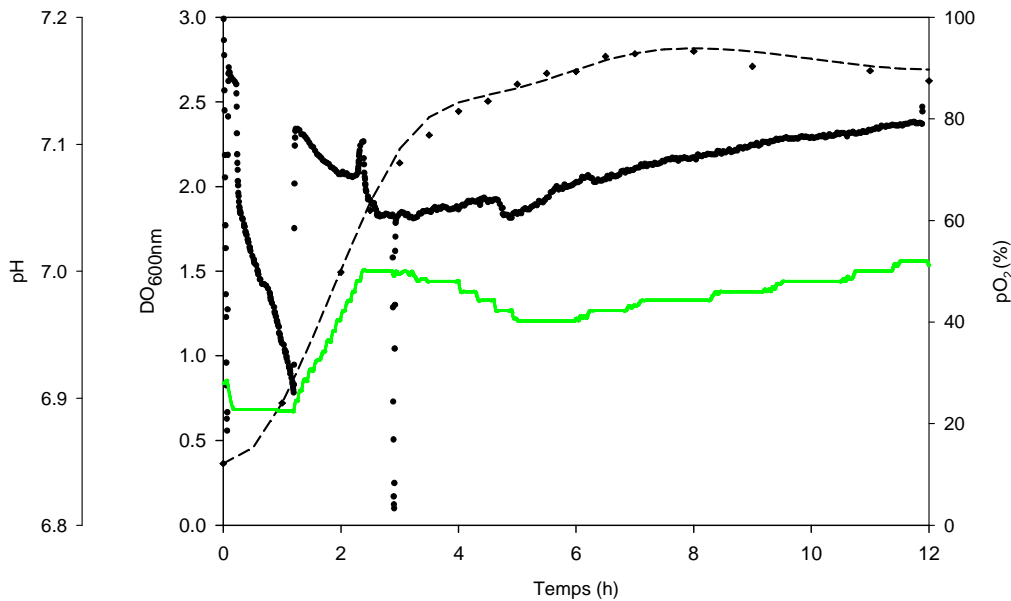


Figure 26 : Evolution de la DO_{600nm} (-◆-), de la pression partielle en oxygène dissous (●) et du pH (—) en fonction du temps

Comme le montre l'évolution de la pO₂ et de la DO_{600nm}, la phase exponentielle de croissance a duré environ 2 heures avec un taux de croissance maximum de 0,91 h⁻¹ et un taux de croissance moyen égal à 0,76 h⁻¹; puis il y a eu une phase de ralentissement et enfin une stabilisation de la valeur de la DO_{600nm}, la valeur maximale obtenue étant égale à 2,8 en six heures (Figure 26). *Deinococcus geothermalis* est un microorganisme très robuste, la valeur de la DO_{600nm} se stabilise mais ne diminue pas; aucune lyse n'est observée et il n'y a pas de variation de la morphologie des cellules. L'oxygène apporté au milieu de culture continu à être consommé, le microorganisme reste dans un état de maintenance. Le pH initial de 6,9 augmente jusqu'à la valeur de 7 durant la phase de croissance exponentielle, cela peut être expliqué par la

consommation des protéines apportées par l'extrait de levure et donc la libération d'ammoniaque dans le milieu.

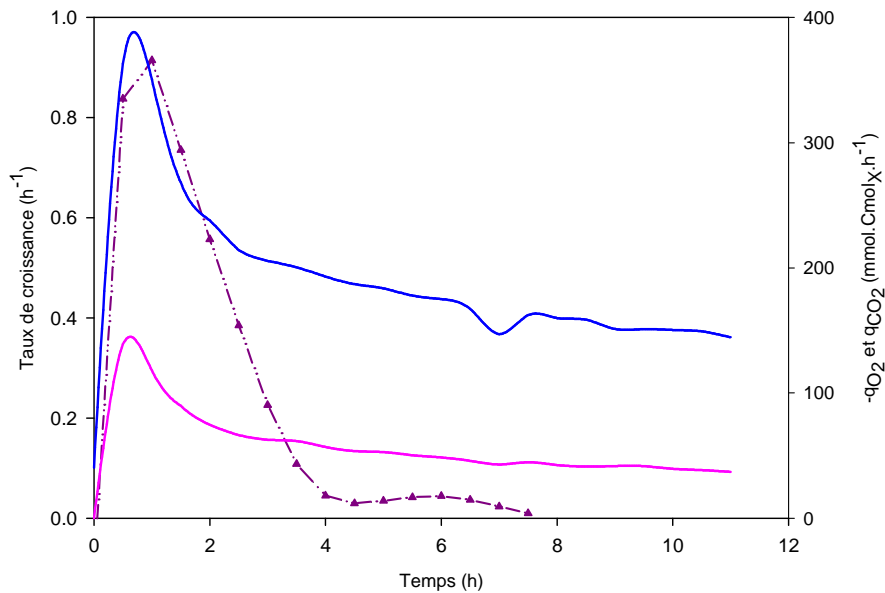


Figure 27 : Evolution du taux de croissance (—▲—) et des vitesses spécifiques de consommation de l'oxygène ($-q_{O_2}$) (—) et de production du dioxyde de carbone (q_{CO_2}) (—) en fonction du temps

Le taux de croissance obtenu au cours de cette expérimentation est supérieur à celui obtenu en fioles Erlenmeyer, à savoir $0,64 \text{ h}^{-1}$. En effet, en bioréacteur l'environnement du microorganisme est parfaitement contrôlé : la température, le pH, l'oxygénation du milieu sont régulés, paramètres difficilement contrôlables en fioles Erlenmeyer. En bioréacteur, lors de l'étude de l'effet de pulses de solutions nutritives sur la dynamique de croissance de *D. geothermalis* DSM 11300, les pulses d'extrait de levure avaient induit une augmentation de la valeur de la DO_{600nm} à un taux de croissance égal à $0,63 \text{ h}^{-1}$. Cette valeur est inférieure aux $0,76 \text{ h}^{-1}$ obtenus lors de cette culture discontinue. Néanmoins les pulses avaient été effectués après 25 heures de culture pour s'assurer de la viabilité de la souche. Le microorganisme est donc resté dans une phase de latence avant de trouver des conditions nutritionnelles favorables à sa croissance, ce qui peut expliquer ce ralentissement d'activité métabolique.

Les dynamiques de consommation de l'oxygène et de production du dioxyde de carbone, en vitesses réactionnelles (Figure 26) et en vitesses spécifiques (Figure 27), confirment que l'activité métabolique a diminué après 2,5 heures de culture. De plus, durant les quatre premières heures, seulement 1 g.L^{-1} de glucose a été consommé ; ce résultat confirme qu'en présence d'extrait de levure le métabolisme de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 semble préférentiellement protéolytique. Le QR moyen au cours de cette fermentation s'est stabilisé à 1,2. Le carbone de l'extrait de levure est consommé prioritairement à celui apporté par le glucose. A la fin de la croissance $2,7 \text{ g}_{MS}.\text{L}^{-1}$ de biomasse sèche ont été obtenus en six heures.

SYNTHESE DES RESULTATS

- ⇒ Une analyse statistique multifactorielle, l'Analyse en Composantes Principales, a été réalisée à partir des compositions de onze milieux de culture disponibles dans la littérature pour la croissance des déinocoques et des microcoques.
- ⇒ Il ressort que les milieux présentent une variabilité qualitative et quantitative trop importante pour que l'analyse statistique soit discriminante pour un ou plusieurs éléments indispensables à la croissance des déinocoques. Une approche de type plan d'expérience ne peut être envisagée.
- ⇒ Un milieu adapté du milieu de Holland et de ses coauteurs (Holland *et al.* 2006), le milieu DM, permet d'obtenir avec *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 un taux de croissance égal à $0,03 \text{ h}^{-1}$ et une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ finale de 0,55 pour un rendement de production de biomasse sur le substrat glucose égal à $0,23 \text{ g}_{\text{X}} \cdot \text{g}_{\text{Glc}}^{-1}$. Ce résultat a été obtenu en culture en fiole Erlenmeyer.
- ⇒ La présence d'extrait de levure, à pH 7 et à $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, permet d'augmenter les performances de production de la souche : le taux de croissance atteint en fioles Erlenmeyer $0,20 \text{ h}^{-1}$ et la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ finale 2,23.
- ⇒ Les résultats ont par ailleurs montré que le taux de croissance de la souche augmente avec la température : à $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ le taux de croissance atteint $0,64 \text{ h}^{-1}$ pour une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ finale de 2,32.
- ⇒ Les différents milieux et éléments nutritifs ont été testés individuellement lors de cultures en fioles Erlenmeyer ; dans les 37 conditions testées, les éléments limitant la croissance de *D. geothermalis* DSM 11300 cultivé sur le milieu DM n'ont pas pu être identifiés. Sans extrait de levure, le taux de croissance s'élève à $0,08 \text{ h}^{-1}$.
- ⇒ Le comportement de la souche cultivée à $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en bioréacteur de 2 L sur le milieu de base DM avec $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glucose ainsi que l'effet de pulses de solutions d'éléments nutritifs sur la vitesse de consommation de l'oxygène ont été étudiés en utilisant une approche de respirométrie.
- ⇒ Les résultats révèlent que l'extrait de levure complet, sans identification possible à ce jour de la fraction d'intérêt, est indispensable à la croissance non limitée de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300.
- ⇒ La culture de *D. geothermalis* DSM 11300 en bioréacteur sur le milieu complexe CMG à $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a permis d'obtenir une croissance exponentielle avec un taux de croissance égal à $0,76 \text{ h}^{-1}$ pour atteindre une concentration finale de $2,7 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$ en six heures.
- ⇒ Les milieux de culture retenus suite à ces résultats sont le milieu complexe CMG pour l'obtention d'une croissance non limitée et le milieu défini DM pour les expérimentations sur milieu synthétique.

**Chapitre IV. Influence of the inoculum
preparation on the growth of the
extremophilic strain *Deinococcus
geothermalis* DSM 11302**

Chapitre IV. Influence of the inoculum preparation on the growth of the extremophilic strain *Deinococcus geothermalis* DSM 11302

IV.1 Introduction du chapitre.....	127
IV.2 Publication : Influence of the inoculum preparation on the growth of the extremophilic strain <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302	128
IV.2.1 Abstract.....	128
IV.2.2 Introduction.....	129
IV.2.3 Materials and methods	130
A - Microorganisms, media and growth conditions.....	130
A1 - Bacterial strains.....	130
A2 - Media and growth conditions	130
A3 - Erlenmeyer flasks experiments	131
<i>Culture of the three strains of <i>Deinococcus geothermalis</i></i>	131
<i>Effect of yeast extract concentration</i>	131
<i>Effect of the strain preservation methods, the frozen storage duration, the type of strain revivification and the variability between colony forming units (CFU) on Petri dishes</i>	131
<i>Effect of inoculation size and incubation duration of the preculture</i>	132
<i>Effect of one- to three- stage inoculum cultures in complex medium</i>	132
<i>Effect of dilution of the residual yeast extract in the medium with cell washing before inoculation</i>	132
A4 - Determination of the respiratory type of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302.....	132
A5 - Chemicals products.....	132
B - Analytical methods.....	133
B1 - Biomass analysis	133
B2 - Supernatant analysis	133
IV.2.4 Results and discussion.....	133
A - Comparison of growth of <i>Deinococcus geothermalis</i> strains DSM 11300, DSM 11301 and DSM 11302.....	133
B - Effect of the temperature on the growth of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 and type of respiratory	134
C - Effect of yeast extract concentration.....	135
D - Effect of method of strain preservation, frozen storage period, type of strain revivification and variability between CFU on Petri dishes.....	136
E - Influence of inoculation size and duration of incubation phase of pre-culture.....	137
F - Influence of successive subcultures, dilution of the residual yeast extract in the medium and cell washing before inoculation on the growth of <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 in DMG ...	138
IV.2.5 Conclusions.....	139
IV.2.6 Supplementary material.....	140

IV.3 Séquençage des souches <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 et <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302.....	142
---	-----

Chapitre IV. Influence of the inoculum preparation on the growth of the extremophilic strain *Deinococcus geothermalis* DSM 11302

IV.1 Introduction du chapitre

Ce chapitre est principalement rédigé sous forme d'un article scientifique qui fait l'objet d'une soumission dans le journal scientifique *Extremophiles*.

Il présente l'influence des étapes de préparation de l'inoculum sur les performances de production de biomasse de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 cultivé en milieu complexe ou défini.

L'étude de la physiologie d'un microorganisme impose la maîtrise parfaite des étapes en amont de la culture en fioles Erlenmeyer ou en bioréacteur. En effet, depuis la conservation de la souche jusqu'aux différentes étapes de levains, il est impératif de s'assurer que ces étapes préalables à toute culture n'influencent pas de manière significative les résultats de la croissance (Orlowski and Barford 1987; Parton and Willis 1990).

Ce chapitre débute par une comparaison de la croissance des trois souches de collection de *Deinococcus geothermalis* : *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, *Deinococcus geothermalis* DSM 11301 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, afin de sélectionner celle qui présente le meilleur profil de croissance en milieu défini. Le type respiratoire ainsi que l'influence de la température sur la cinétique de croissance ont ensuite été abordés. La troisième partie de ce chapitre est consacrée à l'étude de l'influence des étapes de préparation de l'inoculum sur la croissance de la souche : le mode de conservation du stock de microorganismes, la durée de la conservation, la revivification, la variabilité entre les colonies isolées sur milieu gélosé, le taux d'inoculation, la durée d'incubation du levain, le nombre de subcultures ainsi que le lavage du culot cellulaire avant le repiquage ont été pris en compte. Enfin, le séquençage des souches *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 ouvre des hypothèses sur la variabilité de comportement physiologique observée ; ces résultats sont discutés dans une quatrième partie, à la fin de ce chapitre.

IV.2 Publication : Influence of the inoculum preparation on the growth of the extremophilic strain *Deinococcus geothermalis* DSM 11302

Julie Bornot¹²³, Carole Molina-Jouve¹²³, Jean-Louis Uribelarrea¹²³, Nathalie Gorret^{*123}

¹ Université de Toulouse ; INSA, UPS, INP ; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

² INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

³ CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

* Corresponding author.

Tel.: +33 05 61 55 94 44; fax: +33 05 61 55 94 00.

E-mail address: nathalie.gorret@insa-toulouse.fr

IV.2.1 Abstract

The growth of three *Deinococcus geothermalis* strains were compared using shake flask cultures to assess the potential of each strain to grow in complex and defined media. Among the *D. geothermalis* strains tested, including DSM 11300, DSM 11301 and DSM 11302, the strain DSM 11302 was found to give the highest biomass concentration and growth rate under the tested conditions: in shake flask experiments, in a complex medium with glucose, the maximum growth rate was 0.75 h⁻¹ at 45 °C; the biomass concentration and the growth rate were correlated to yeast extract concentration in the medium. Further investigations were conducted to study the effect of inoculum preparation on growth performances of *D. geothermalis* DSM 11302. The effect of the main steps of the inoculum development stage was evaluated: methods of strain preservation and revivification, frozen storage duration, variability between colony forming units on Petri dishes, inoculum size, duration of incubation phase of the pre-culture, successive subcultures and cell washing before inoculation. The results showed that the physiological descriptors such as growth rate, biomass concentration, number of generations, glucose uptake and biomass yield were not affected by the inoculum preparation steps.

Keywords: *Deinococcus geothermalis*; strain variability; inoculum preparation; growth performances

IV.2.2 Introduction

Bacteria belonging to the *Deinococcaceae* family possess very interesting properties as they are well-known for being the most radiation-resistant bacteria. *Deinococcus* species can survive and repair their genome even after an exposition to high radiation levels (Battista *et al.* 1999; Cox and Battista 2005; Ferreira *et al.* 1997) or others environmental stress agents including ultraviolet light, oxidative stress and desiccation (Blasius *et al.* 2008; Mattimore and Battista 1996; Slade and Radman 2011). Their ability to tolerate high temperatures, a broad range of pH and chemicals compounds make *Deinococcaceae* good candidates for production of bioenergy products such as bioethanol and metabolites derivatives (Leonetti *et al.* 2011). The most studied strains of *Deinococcaceae* are the mesophile one, *Deinococcus radiodurans* and the thermophilic one, *Deinococcus geothermalis*.

Many genetic engineering studies have been conducted in order to understand *Deinococcus radiodurans* efficient system for repairing DNA and to develop strategies of bioremediation using radiation resistant microorganisms (Brim *et al.* 2000; Daly 2000; Lange *et al.* 1998).

Concerning *Deinococcus geothermalis*, it is a gram-positive microorganism of 1.5 to 2 μm in diameter which divides as tetrads and forms orange-pigmented colonies when cultivated on agar plates (Ferreira *et al.* 1997). *Deinococcus geothermalis* was first isolated in hot springs in Naples, Italy and in São Pedro do Sul, Portugal (Ferreira *et al.* 1997). Since its discovery, it has been identified in other locations like industrial printing paper machine where it forms coloured biofilms (Kolari *et al.* 2002; Peltola 2011; Väisänen *et al.* 1998). Due to its extreme resistance properties and its ability to grow at high temperature, *D. geothermalis* is involved in bioremediation process of environmental radioactive wastes sites and is well-studied for its solvent-tolerance and solvent-utilization as carbon source (Kongpol *et al.* 2008). However, very few data on its physiology and growth conditions are available. Few defined media have been described for the culture of *D. geothermalis* strains (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997; Kongpol *et al.* 2008), and yeast extract was obviously necessary to avoid growth limitation (Kongpol *et al.* 2008). Consequently, *D. geothermalis* is commonly cultivated in rich media containing at least one complex nutrient source such as yeast extract, peptone or tryptone (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997). Only He reported high cell density production of a strain of *Deinococcaceae*, *Deinococcus radiodurans*. The growth has been performed in a 20 L fermentor with an enriched TGY (1 % tryptone, 1 % glucose and 0.5 % yeast extract) medium (He 2009). Although it has been shown that inoculum properties are important for bioprocess performances (Orlowski and Barford 1987), no study has been reported yet on the influence of the inoculum preparation on the growth properties (growth rate, maximal biomass concentration, glucose uptake) of *Deinococcaceae* strains. Inoculum preparation, including preservation method, revivification step and inoculum stages, is an essential element for the quality of the microbial culture. To achieve high performance culture, e.g. high biomass concentration and growth rate, a reproducible physiological state in the inoculum and a correct inoculation cell density are essential (Parton and Willis 1990). Inoculum preparation should maximize the

cell viability from stock culture, provide a genotypically identical population to the one that was stored, increase biomass concentration and provide a physiological state suitable for growth in the final bioreactor (Hunt and Stieber 1986). Obviously, need arises to better quantify and understand the physiology of *Deinococcus geothermalis* and to manage all the steps from inoculum preparation up to large scale industrial production.

The aim of the present investigation was first to compare the culture of three strains of *Deinococcus geothermalis* and choose the best candidate for further physiological studies.

Then, this study focused on the impact of storage conditions, revivification methods, subcultures in complex media and inoculum size on the biological activity of the strain *Deinococcus geothermalis* DSM 11302.

IV.2.3 Materials and methods

A - Microorganisms, media and growth conditions

A1 - Bacterial strains

Three strains of *Deinococcus geothermalis* were used in this study. Two of them, *Deinococcus geothermalis* DSM 11301 and *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 were received from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany). The strain *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 was provided by Deinol partners (CapAlfa, Montpellier, France). The strains were inoculated into PGY medium broth (peptone 10 g.L⁻¹, glucose 10 g.L⁻¹, yeast extract 5 g.L⁻¹) and incubated at 45 °C for 24 hours. The bacterial cells were then stored at - 80 °C with 20 % (v/v) glycerol.

For the comparison of the strain preservation methods, a freeze-dried stock of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 received from DSMZ and stored at 4 °C was used.

A2 - Media and growth conditions

For the reference inoculum preparation, the strain was plated on PGY agar medium (PGYA: PGY medium broth supplemented with agar 14 g.L⁻¹) for 48 hours at 45 °C.

Precultures of *D. geothermalis* were carried out in a 5 mL tube containing 1.5 mL of Complex Medium Glucose (CMG) at 45 °C for 24 hours on an orbital shaker (110 rpm). The Complex Medium Glucose was prepared by adding 10 g.L⁻¹ of glucose, 5 g.L⁻¹ of yeast extract (YE) and 2 g.L⁻¹ of bacto-peptone to the mineral medium (see below). Only one colony was chosen for each inoculum. To test revivification methods, essays were made by removing the step of culture on agar plate and inoculating directly the stock suspension in liquid medium (CMG) in tubes.

For the 150 mL flasks experiments, another step of pre-culture in 15 mL CMG medium was carried out, in baffled Erlenmeyer flasks with an inoculum at 10 % (v/v). The flasks were incubated 12 hours at 45 °C and 110 rpm. The pellet was rinsed once with physiological saline solution (9 g.L⁻¹ NaCl) before inoculation.

The mineral medium DM was prepared as follows: 5.74 mM K₂HPO₄, 10 % v/v MOPS buffer mixture (400 mM MOPS acid, 200 mM NH₄Cl, 100 mM NaOH, 100 mM KOH, 2.76 mM Na₂SO₄, 5.28 mM MgCl and 5 μM CaCl₂), 1 % v/v of a 2 mM FeCl₃ solution in 2 mM sodium citrate, 0.01 % v/v of a micronutrients solution (3*10⁻⁵ M (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4*10⁻³ M H₃BO₃, 3*10⁻⁴ M CoCl₂, 1*10⁻⁴ M CuSO₄, 25*10⁻⁴ M MnCl₂ and 10*10⁻⁵ M ZnSO₄) and 0.01 % v/v of each vitamin (niacin, thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride, cobalamin and biotin prepared separately at a concentration of 10 mg.L⁻¹). The MOPS buffer mixture and the solutions of iron, micronutrients and vitamins added were sterilized by filtration. The initial pH was adjusted to 6.8 with NH₄OH. This mineral medium DM was adapted from a medium developed for the growth of *Deinococcus radiodurans* (Holland *et al.* 2006) and was provided by Deinol partners. The defined medium DMG was the medium DM with 10 g.L⁻¹ glucose as carbon source.

Two others media were used to compare the growth of the strains: the original medium described by Holland *et al.* (Holland *et al.* 2006) and the DSMZ medium 878 (*Thermus* 162 medium).

The carbon source solutions were prepared and autoclaved separately and added to the media just before the inoculation.

A3 - Erlenmeyer flasks experiments

Culture of the three strains of Deinococcus geothermalis

Growth of the three type strains of *D. geothermalis* was evaluated using the number of generations and the glucose uptake in Erlenmeyer flask cultures. Before the experiment, 15 mL of sterile medium (DMG, CMG, TH162 or Holland medium) were added into sterile 100 mL Erlenmeyer flasks. The media were inoculated with 1.5 mL of a 12 hours preculture which had been grown in CMG medium at 45 °C.

Effect of yeast extract concentration

Five flasks with 150 mL CMG medium containing 1 g.L⁻¹, 2.5 g.L⁻¹ (two flasks), 5 g.L⁻¹ and 10 g.L⁻¹ of yeast extract were inoculated with 15 mL of a 150 mL CMG (5 g.L⁻¹ YE) preculture. In one flask of CMG with 2.5 g.L⁻¹ YE, a supplementary pulse of 2.5 g.L⁻¹ YE was made when the culture reached the stationary phase (Figure 29 in the supplementary material).

Effect of the strain preservation methods, the frozen storage duration, the type of strain revivification and the variability between colony forming units (CFU) on Petri dishes

The growth results in the complex medium CMG and in the defined medium DMG were compared. 150 mL of culture medium in 1 L Erlenmeyer flask were inoculated with 15 mL of a 12 hours preculture in CMG, after one step of cell washing for the DMG inoculation. Freeze-dried stock and glycerol stock

were compared. With the freeze-dried stock, two methods of revivification were carried out: a step of culture on agar medium (PGYA) and a direct inoculation of the stock in the liquid medium CMG in tube. With the frozen glycerol stock, these two methods of revivification were employed too. In addition, three colonies were picked on agar slants and inoculated separately in CMG broth to study the variability of growth between the colonies chosen on a solid medium. Another glycerol stock, six months older than the previous, was tested using the revivification on PGYA medium. This resulted in 7 preservation/revivification conditions and the cultures were carried out in complex and defined media (Figure 30 in the supplementary material).

Effect of inoculation size and incubation duration of the preculture

Six Erlenmeyer flasks with 150 mL DMG were inoculated at 10 % (v/v) with the same CMG preculture at different incubation time: 4 hours, 8 hours, 12 hours, 16 hours, 20 hours and 24 hours. The inoculation size was tested by inoculating 150 mL DMG in 1 L flasks at 10 % (v/v) or 20 % (v/v) with a 12 hours preculture in CMG (Figure 29 in the supplementary material).

Effect of one- to three- stage inoculum cultures in complex medium

Three successive precultures of 12 hours were made in 150 mL CMG. With each preculture, 150 mL DMG in 1 L flask was inoculated (Figure 29 in the supplementary material).

Effect of dilution of the residual yeast extract in the medium with cell washing before inoculation

The effect of dilution of the residual yeast extract in the inoculum, linked to the cell washing step, was studied by inoculating 150 mL DMG in 1 L Erlenmeyer flasks with cells which were washed one to three times with physiological saline solution. The preculture was a 150 mL CMG culture incubated 12 hours at 45 °C (Figure 29 in the supplementary material).

A4 - Determination of the respiratory type of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302

The growth was tested in an environment with or without oxygen. A *D. geothermalis* DSM 11302 culture was transferred into PGYA tubes (PGY medium broth supplemented with agar 6 g.L⁻¹) by stabbing with a sterile inoculation loop. In Petri dishes, PGYA was inoculated by spread plate technique, 0.1 mL of bacterial suspension was spread over the surface on the agar medium, or by streaking with an inoculation loop. To test the growth in the absence of oxygen, the pouring plate technique was used. A sterile empty Petri dish was inoculated with 0.1 mL of bacterial suspension and the PGYA medium was poured into the Petri dish. A second layer of agar medium was poured in the dish after the solidification of the first one. Tubes and Petri dishes were incubated at 45 °C.

A5 - Chemicals products

Glucose, fructose, salts and oligo-elements were obtained from Prolabo (USA) and yeast extract from Difco Diagnostics (USA). Bacto-peptone was obtained from Becton Dickinson (USA). ZnSO₄ was

provided from Carlo Erba (France) and MgCl₂, vitamins, amino acids and the MOPS were provided from Sigma (USA). All products were of the highest analytical grade available.

B - Analytical methods

B1 - Biomass analysis

Biomass concentration was determined by optical density (OD_{600nm}) measurement at 600 nm (spectrophotometer Libra S4, Biochrom, UK) with a 2 mm absorption cell (Hellma, Germany) and cell dry weight measurements. Cell dry weight was estimated by filtration on polyamide membrane (Sartolon 0.2 µm - Sartorius®) and drying to a constant weight for 48 hours, at 60 °C under 200 mmHg in a vacuum oven (Heraeus, France).

B2 - Supernatant analysis

During the fermentation, culture supernatant was obtained by centrifuging (MiniSpin Eppendorf, USA) fermentation broth samples in Eppendorf tubes at 12000 g for 3 minutes. The glucose concentration in supernatant was measured with a YSI 2700 glucose analyzer (Yellow Springs Instruments, USA). The glucose uptake and the biomass yield were calculated at the end of the growth phase.

IV.2.4 Results and discussion

A - Comparison of growth of *Deinococcus geothermalis* strains DSM 11300, DSM 11301 and DSM 11302

The growth of three strains of *D. geothermalis*, DSM 11300, DSM 11301 and DSM 11302, was compared in CMG, TH162 medium and two defined media: Holland medium and DMG. The results of growth are shown in Tableau 24.

Tableau 24 : Number of generations and percentage of glucose uptake after 24 h and 48 h of growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, DSM 11301 and DSM 11302 in DMG, CMG, TH162 medium and Holland medium

Strains	<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300				<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11301				<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302				
	DMG	CMG	TH162	Holland	DMG	CMG	TH162	Holland	DMG	CMG	TH162	Holland	
24 h	Generations nb	1.3	3.7	1.4	0.1	1.6	3.7	1.6	0.3	2.8	3.7	1.6	0.4
	Glucose uptake (%)	16	75	/	/	41	86	/	/	55	94	/	/
48 h	Generations nb	1.6	3.7	1.4	0.1	1.6	3.7	1.6	0.3	3.2	4.1	1.6	0.4
	Glucose uptake (%)	24	100	/	/	81	100	/	/	89	100	/	/

No growth was observed in the medium described by Holland *et al.* (Holland *et al.* 2006) and 1.4 to 1.6 generations were obtained in TH162 medium. The best growth was obtained in the complex medium CMG for the three strains (3.7 to 4.1 generations). The strain *D. geothermalis* DSM 11300 had a poor growth on DMG: only 1.6 generations were obtained in 48 hours. However, with the strain DSM 11302, more than 3 generations were obtained in 48 hours. In the two defined media and TH162 medium, flocculation of the strain *D. geothermalis* DSM 11301 was observed despite the weak growth.

The results showed that the TH162 medium and the Holland medium were not adapted for the growth of these strains of *Deinococcus geothermalis*. The tested conditions induced stress toward the strain DSM 11301 which formed pellets. Although the four strains belong to the same specie, they didn't have the same behaviour in the tested media. *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 and DSM 11302 have both been isolated from hot springs, but not in the same locations. The strain DSM 11300 have been recovered from water samples collected at the Termi di Agnano in Italy, whereas the strain DSM 11302 have been isolated at São Pedro do Sul in Portugal (Ferreira *et al.* 1997). Environment varies with geographical locations, so it could explain why *Deinococcus geothermalis* strains had different physiological properties. Finally, the maximum biomass concentration was obtained with DSM 11302, in both media CMG and DMG. According to these results, it seemed that *D. geothermalis* DSM 11302 is less fastidious and could produce more biomass in DMG than the others strains of *D. geothermalis*.

B - Effect of the temperature on the growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 and type of respiratory

The growth of *D. geothermalis* DSM 11302 was compared at 37 °C and 45 °C (Figure 28).

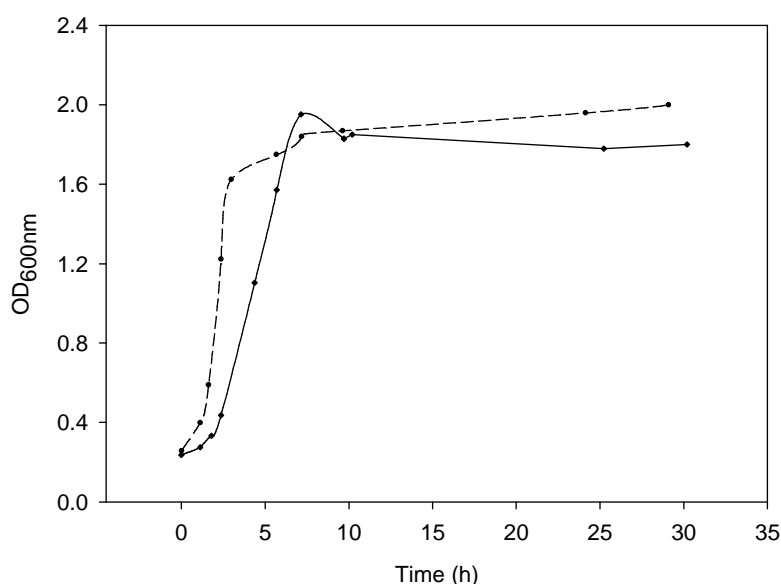


Figure 28 : Comparison of growth curve of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 at 37 °C (—◆—) and 45 °C (-●-)

At 37 °C the growth rate was 0.47 h⁻¹ and the maximal OD_{600nm} 1.8 whereas at 45 °C the growth rate was 0.79 h⁻¹ and the maximal OD_{600nm} 2. It's important to note that temperature positively affected growth rate, but had no effect on the maximal biomass concentration.

As oxygen requirement for growth relates to the energy metabolism of the microorganism, this study included the investigation of the type of respiratory of *D. geothermalis*.

Growth of *D. geothermalis* occurred only when oxygen was available, at the top of the PGYA tubes and at the top of the agar plates; this microorganism is strictly aerobic which is not surprising because *D. geothermalis* is an aerobic bacterium isolated from hot springs (Ferreira *et al.* 1997). Whether in tubes or in Petri dishes, *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 cultivated in rich environment formed orange-pigmented colonies.

C - Effect of yeast extract concentration

The addition of yeast extract varying from 1 to 10 g.L⁻¹ was tested in Erlenmeyer flask experiments in order to study the correlation between yeast extract concentration and the final biomass concentration of *D. geothermalis*. The results are shown in Tableau 25.

Tableau 25 : Effect of yeast extract concentration on the culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 in CMG

Medium	CMG				
Yeast extract concentration (g.L ⁻¹)	1	2.5	2.5 + 2.5	5	10
initial OD _{600nm}	0.338	0.324	0.329	0.323	0.373
final OD _{600nm}	1.40	1.90	2.67	2.56	4.02
Generations nb	2.1	2.6	3.0	3.0	3.4
μ (h ⁻¹)	0.43	0.51	0.58	0.73	0.75
pH final	6.90	7.07	7.19	7.19	7.63
Glucose uptake (%)	0	7	14	11	23

The growth rate, the number of generations and the percentage of glucose uptake increased with yeast extract concentration. The maximal growth rate was obtained with a minimum yeast extract concentration of 5 g.L⁻¹. This increase of the growth rate could be explained by the presence of one or many elements in yeast extract acting as catalysts with a sufficient amount in the medium when 5 g.L⁻¹ of yeast extract were added. The maximum number of generations, 3.4, was obtained with 10 g.L⁻¹ of yeast extract; doubling the concentration of yeast extract from 5 to 10 g.L⁻¹ did not result in a significant increase of the number of generations. With yeast extract concentrations higher than 5 g.L⁻¹, it was possible that the factor limiting the growth in the flask culture was dissolved oxygen concentration.

In addition, the final OD_{600nm} was correlated to the concentration of yeast extract. The biomass concentration of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 was proportional to yeast extract concentration in the tested conditions. It confirmed that yeast extract provided constitutive elements of the biomass. Even if the glucose uptake increased with the concentration of yeast extract, the compounds used as carbon source to produce biomass were mainly provided by yeast extract. The increase of the final pH value may be the consequence of the catabolism and the lysis of peptides and proteins resulting in ammonia liberation in the culture medium.

Two modes of yeast extract supply were also studied; in one case, 5 g.L⁻¹ were initially added in the culture medium and in the other case, two times 2.5 g.L⁻¹ were sequentially added: at the beginning of the culture and when cells entered the stationary phase. The same final OD_{600nm} and number of generations were obtained. Moreover, as previously described, when 5 g.L⁻¹ of yeast extract were added in the medium at the beginning of the culture, a 10 % increase of growth rate was observed compared to the second supply mode. So, sequenced yeast extract supplies did not increase the biomass concentration.

D - Effect of method of strain preservation, frozen storage period, type of strain revivification and variability between CFU on Petri dishes

Whether the strain was cultivated in CMG or in DMG, the results showed that the methods of preservation and revivification of the strain had effect neither on the growth rate nor on the biomass concentration of *D. geothermalis* DSM 11302 (Tableau 26 et Tableau 27).

Tableau 26 : Effect of the strain preservation methods, the frozen storage period, the type of strain revivification and the variability between colony forming unit on Petri dishes on the culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 in CMG

Medium	CMG						
Preservation method	Freeze dried cells		Cryotubes				
Storage period (months)	-		20	12			
Revivification	Petri dishes culture	Direct tube inoculation	Petri dishes culture	Petri dishes culture	Petri dishes culture	Petri dishes culture	Direct tube inoculation
initial OD _{600nm}	0.282	0.334	0.286	0.270	0.270	0.338	0.324
final OD _{600nm}	1.58	1.77	1.63	1.72	1.72	1.62	1.72
Generations nb	2.5	2.4	2.5	2.7	2.7	2.3	2.4
μ (h ⁻¹)	0.76	0.75	0.75	0.76	0.76	0.76	0.71
Glucose uptake (%)	0	0	0	4	0	0	3

Tableau 27 : Effect of the strain preservation methods, the frozen storage period, the type of strain revivification and the variability between colony forming unit on Petri dishes on the culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 in DMG

Medium	DMG						
Preservation method	Freeze dried cells		Cryotubes				
Storage period (months)	-		20	12			
Revivification	Petri dishes culture	Direct tube inoculation	Petri dishes culture	Petri dishes culture	Petri dishes culture	Petri dishes culture	Direct tube inoculation
initial OD _{600nm}	0.232	0.224	0.216	0.233	0.246	0.22	0.218
final OD _{600nm}	1.37	1.37	1.34	1.35	1.36	1.36	1.52
Generations nb	2.6	2.6	2.6	2.5	2.5	2.6	2.8
μ (h ⁻¹)	0.17	0.17	0.16	0.15	0.16	0.15	0.15
Glucose uptake (%)	38	36	42	50	26	40	51
Y _{s,x} (g _x ·g _{Glc} ⁻¹)	0.40	0.44	0.36	0.31	0.59	0.41	0.35

When *D. geothermalis* was grown in CMG, the growth rate reached 0.75 ± 0.02 h⁻¹ and the number of generations was 2.5 ± 0.2 . In DMG, the growth rate value varied from 0.15 h⁻¹ to 0.17 h⁻¹ and the number of generations was 2.6 on average. The growth performances were independent of the strain preservation and revivification methods and the duration of the storage in the conditions tested. Furthermore, these inoculum preparation steps had no significant effect on the biomass yield and the glucose uptake.

E - Influence of inoculation size and duration of incubation phase of preculture

The comparison of the growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 was made with precultures incubated from 4 to 24 hours. Two inoculation sizes, 10 % and 20 % (v/v) with a 12 hours preculture, were tested too. The results are shown in Tableau 28.

Tableau 28 : Effect of the inoculation size and the duration of incubation on the results of growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 in DMG

Age of pre-culture (h)	4	8	12	16	20	24	
Inoculation size (%)	10	10	10	20	10	10	
initial OD _{600nm}	0.201	0.270	0.213	0.439	0.203	0.231	0.260
final OD _{600nm}	1.72	1.79	1.61	2.00	1.41	1.51	1.57
Generations nb	3.0	2.7	2.9	2.2	2.7	2.7	2.6
μ (h ⁻¹)	0.17	0.11	0.14	0.14	0.09	0.09	0.08
Glucose uptake (%)	45	42	40	55	37	28	40
Y _{S,X} (g _X .g _{Glc} ⁻¹)	0.26	0.31	0.19	0.21	0.22	0.29	0.23

The growth rate reached 0.14 h⁻¹ and 0.20 g_X.g_{Glc}⁻¹ were obtained with the two tested inoculation sizes. With an inoculum size equals to 10 %, 2.9 generations were obtained and with an inoculum size of 20 % the number of generations was 2.2. Doubling the inoculation size increased neither the growth rate nor the biomass concentration.

With the precultures aged from 4 to 12 hours, the exponential growth rates were higher than 0.11 h⁻¹, whereas with older precultures a slightly lower growth rate was obtained, 0.09 h⁻¹. The highest yield of biomass production on glucose, 0.31 g_X.g_{Glc}⁻¹, was obtained with the preculture of 8 hours but the age of the preculture did not have a significant influence on the number of generations obtained during the culture. A preculture of 4 to 12 hours used at an inoculum size of 10 % was sufficient to achieve the maximal biomass concentration and growth rate. Nevertheless, a pre-culture older than 12 hours was able to grow in fresh medium. No morphological differences were highlighted with microscopic observations. Even after an incubation of 24 hours, no lysis of the cells was observed; *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 cultivated in rich medium remained very resistant. This result is in accordance with previously published works which have shown the robustness of *Deinococcus* species against physical and chemical stresses (Battista *et al.* 2000; Ferreira *et al.* 1997; Makarova *et al.* 2007).

F - Influence of successive subcultures, dilution of the residual yeast extract in the medium and cell washing before inoculation on the growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 in DMG

To study the influence of the residual yeast extract, the pellet was washed one to three times with physiological saline solution before inoculation. The results are shown in Tableau 29.

Tableau 29 : Effect of successive subcultures and cell washing steps before inoculation on the results of growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 in DMG

Precultures nb	1	2	3	1	2	3
Cell washing nb		1		1	2	3
Dilution of residual yeast extract		2.10 ⁻⁴		2.10 ⁻⁴	4.10 ⁻⁷	8.10 ⁻¹⁰
initial OD _{600nm}	0.192	0.245	0.233	0.292	0.285	0.239
final OD _{600nm}	1.76	1.84	1.90	1.70	1.66	1.62
Generations nb	3.2	2.9	3.0	2.5	2.5	2.8
μ (h ⁻¹)	0.13	0.10	0.06	0.13	0.13	0.13
Glucose uptake (%)	63	67	45	50	53	44
Y _{s,x} (gx.g _{Glc} ⁻¹)	0.14	0.15	0.25	0.20	0.18	0.25

In the defined medium DMG, the number of cell washing steps had no significant influence on the growth of *D. geothermalis* DSM 11302, in terms of growth rate, number of generations and biomass yield. With one cell washing, the residual medium in the pellet was 1:5000 diluted and with three steps of cell washing, it was 1:1.25x10⁹ diluted. One step of cell washing is enough to remove the medium containing yeast extract in the pellet. The growth observed in DMG was not due to a residual part of yeast extract transfer during the inoculation step.

One to three successive precultures in complex media were tested; there was no significant influence on the number of generations in DMG but it caused a decrease of the growth rate, 0.13 h⁻¹ with one preculture compared to 0.06 h⁻¹ with three successive precultures (Tableau 29). So, when the number of generations in the precultures increased, the capacity of growth of the microorganism, according to kinetics results (growth rate), decreased.

IV.2.5 Conclusions

The growth of three type strains of *Deinococcus geothermalis* was compared in complex and defined media and the results highlighted the strain DSM 11302 as the best candidate for culture in CMG and DMG. This specie was found to be less fastidious than the other ones. The variability of physiological behaviour between these strains could be related to the geographical locations where they have been isolated; differences of biochemical properties have already been described by Ferreira *et al.* in carbon sources assimilation studies (Ferreira *et al.* 1997).

This study confirmed that *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 is an aerobic bacterium, reaching a growth rate equal to 0.17 h⁻¹ at 45 °C in the defined medium DMG. However, yeast extract was necessary to

achieve a non-limiting growth at a maximal growth rate of 0.76 h^{-1} . Furthermore, the final biomass concentration and the growth rate were correlated with yeast extract concentration. Few hypotheses could explain the positive effect of yeast extract on the growth; yeast extract could bring a constitutive element of the cells or it could provide growth factors like vitamins or enzyme cofactors.

The results of growth, in terms of maximal biomass concentration, number of generations and biomass yield, were not affected by the methods of strain preservation and revivification. *D. geothermalis* DSM 11302 is a very robust microorganism capable of surviving 24 hours of preculture with a minimum of consequences on its growth properties. Moreover, it is not affected by the cell washing steps before the inoculation. The growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 in DMG was not explained by yeast extract transfer from the complex medium to the defined medium during the inoculation step. However, the results revealed that the accumulation of cell divisions in precultures resulted in a progressive decrease of the growth rate of *D. geothermalis* DSM 11302.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was financially supported by the project DEINOL ISI of OSEO, the French Agency for Innovation.

IV.2.6 Supplementary material

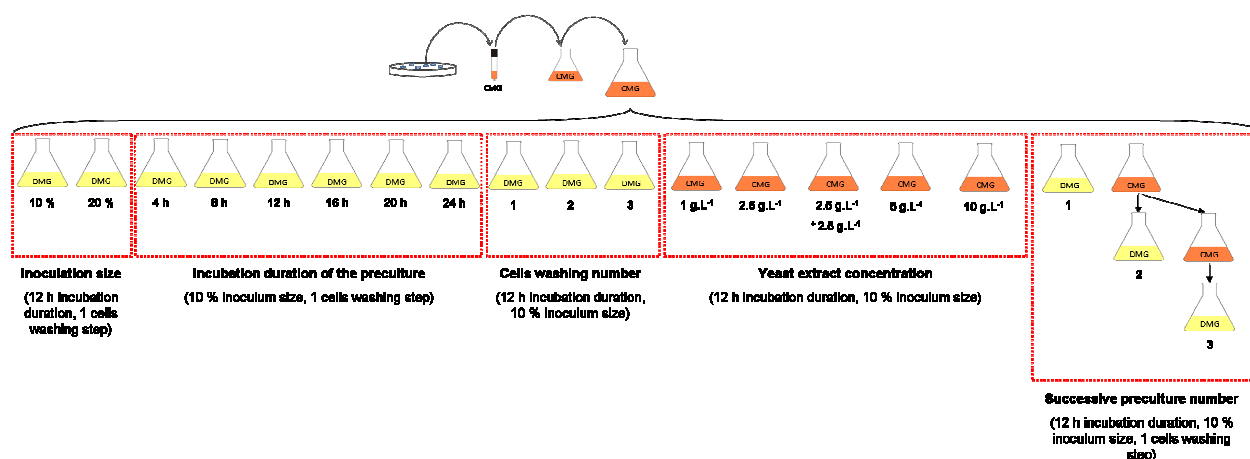


Figure 29 : Description of the protocol for the experiments on yeast extract concentration, inoculation size, incubation duration of the preculture, cell washing number and number of precultures, in baffled Erlenmeyer flasks

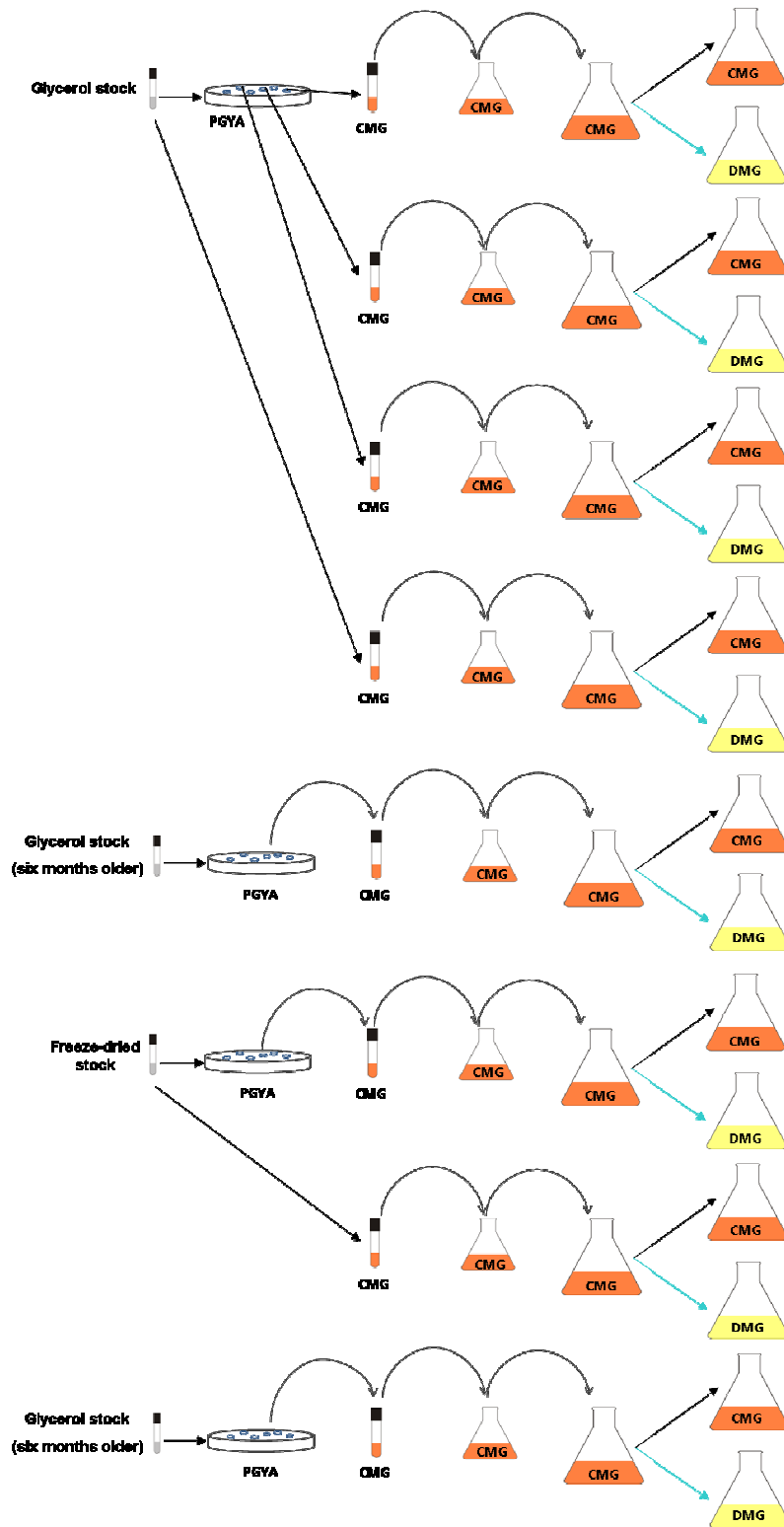


Figure 30 : Description of the protocol for the experiments on strain preservation, frozen storage period, type of strain revivification and variability between CFU on Petri dishes, in baffled Erlenmeyer flasks (→ inoculation without cell washing step; → inoculation with 1 cell washing step)

IV.3 Séquençage des souches *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302

Le séquençage des souches *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 a été effectué sur un run qui a fourni 8446946 séquences de 151 bases. Le génome de référence est celui de la souche de collection *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 (Ferreira *et al.* 1997), source NCBI genome - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=1238).

Les séquences obtenues pour chacune des souches ont été comparées au génome de référence. Les statistiques de l'alignement des lectures sur ce génome de référence ont été réalisées avec le logiciel d'alignement des séquences Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Les résultats ont révélé que 98,8 % des séquences de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 s'alignaient avec le génome de référence contre seulement 89,6 % de séquences alignées pour *Deinococcus geothermalis* DSM 11302.

Ces résultats permettent de vérifier que la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 utilisée dans cette étude correspond à la souche de référence *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 et qu'il n'y a pas d'évolution au cours de sa conservation. Concernant la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, 10 % des séquences ne s'alignent pas avec le génome de référence. *D. geothermalis* DSM 11302 possède un génome qui diffère de la souche de référence principalement au niveau de l'information génétique contenue sur les mégaplasmines. L'information génétique ne semble pas être conservée entre deux souches de la même espèce.

Cette information contenue sur les mégaplasmines des bactéries *Deinococcus radiodurans* et *Deinococcus geothermalis* est essentielle pour les propriétés de résistance des déinocoques (Makarova *et al.* 2007) ; le mégaplasmine de 574127 paires de bases de l'espèce *Deinococcus geothermalis* (DG574) pourrait être le résultat de la fusion et du réarrangement d'un chromosome et d'un mégaplasmine de *Deinococcus radiodurans* (DR412 et DR177). Les travaux de Makarova et de ses coauteurs en 2007 ont mis en évidence que chez *D. geothermalis*, les copies du mégaplasmine DG574 sont beaucoup plus nombreuses que celles du mégaplasmine de 205686 paires de bases (DG206). Des gènes codant jusqu'à 80 protéines impliquées dans le métabolisme des carbohydrates ont été identifiés sur DG574 ; en comparaison, sur le chromosome sont retrouvés des gènes codant pour 120 protéines impliquées dans le métabolisme carboné (Makarova *et al.* 2007). Le mégaplasmine DG574 semble donc avoir une influence fondamentale sur le comportement physiologique.

De plus, les deux souches ont été isolées à partir d'échantillons collectés dans des sources chaudes, mais localisées à des endroits différents. La souche *D. geothermalis* DSM 11300 a été isolée dans de l'eau prélevée d'une source géothermale à Agnano en Italie, tandis que la souche *D. geothermalis* DSM 11302 a été

découverte au Portugal, a São Pedro do Sul (Ferreira *et al.* 1997). Ces lieux sont éloignés géographiquement, l'environnement n'est pas le même ; les auteurs qui ont isolé ces souches pour la première fois ont d'ailleurs rapporté des différences de pH et de température entre les sources chaudes. En Italie, l'eau de la source d'Agnano a un pH plutôt acide, environ 6,5, et une température variant de 45 °C à 57 °C, alors que l'eau de la source située au Portugal à un pH alcalin de 8,6 et une température comprise entre 50 °C et 55 °C. Ces différences de propriétés peuvent en partie expliquer que des souches de déinocoques appartenant à la même espèce possèdent des comportements physiologiques variables.

Les résultats de ce séquençage ont donc mis en évidence la variabilité intra-espèce de l'information génétique portée par les plasmides chez *Deinococcus geothermalis*, cette information génétique pouvant être impliquée dans le métabolisme des sources carbonées. Par priorité et par choix, la variabilité entre les génomes n'a pas été davantage explorée. Les données disponibles pourront toutefois être traitées et exploitées pour permettre la comparaison entre le genotype et le phénotype observé lors des expérimentations.

SYNTHESE DES RESULTATS

⇒ La croissance des trois souches publiques de *Deinococcus geothermalis*, *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, *Deinococcus geothermalis* DSM 11301 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, a été quantifiée à partir de 2 milieux définis et 2 milieux complexes lors de cultures en fioles Erlenmeyer à 45 °C.

⇒ Les résultats mettent en évidence une variabilité intra-espèce de comportement dans les milieux de culture testés et il ressort les points forts suivants :

- le milieu complexe CMG permet la meilleure croissance des trois souches : 3,7 à 4 générations sont obtenues en 48 heures et 100 % du glucose initialement présent a été consommé.

- une floculation de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11301 a été observée dans les deux milieux définis et le milieu TH162 ; ces milieux induisent donc un stress pour cette souche.

- la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 a la meilleure croissance en termes de nombre de générations à la fois dans le milieu complexe CMG et dans le milieu défini DMG.

⇒ Dans le milieu défini DM, la souche *D. geothermalis* DSM 11302 produit le double de biomasse en comparaison avec la souche *D. geothermalis* DSM 11300. Elle est donc choisie pour l'étude de la quantification de son comportement physiologique.

⇒ Les mégaplasmes de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 comportent des séquences différentes de celles retrouvées chez *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 : des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme carboné étant présents sur ces mégaplasmes, ces résultats suggèrent que les différences de comportement physiologique pourraient être liées à la variabilité de l'information génétique portée par les mégaplasmes.

⇒ En complément, il est montré qu'en présence d'extrait de levure, l'augmentation de la température de 37 °C à 45 °C permet d'augmenter le taux de croissance de la souche de 0,47 h⁻¹ à 0,79 h⁻¹.

⇒ Les résultats confirment que la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 est aérobic stricte.

⇒ Il apparait que la concentration en biomasse, estimée par la DO_{600nm}, est corrélée à la concentration en extrait de levure du milieu de culture : l'extrait de levure semble donc apporter des éléments constitutifs de la biomasse indispensables à la croissance.

⇒ La méthode de conservation de la souche, la durée du stockage, la méthode de remise en culture, la variabilité entre les colonies isolées sur milieu riche gélosé, le taux d'inoculation ainsi que le nombre de lavages du culot cellulaire avant l'étape d'inoculation n'influencent pas les performances de production de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, que ce soit en termes de nombre de générations ou de taux de croissance, en milieu défini ou riche.

⇒ Cependant avec un levain âgé de plus de 12 heures, le taux de croissance diminue de 0,14 h⁻¹ à 0,08 h⁻¹. L'augmentation du nombre de générations lors d'étapes successives de précultures semble diminuer le taux de croissance de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302.

**Chapitre V. Quantification de la
croissance de *Deinococcus geothermalis*
DSM 11302 sur milieu défini - Recherche
des conditions de culture optimales**

**Chapitre V. Quantification de la croissance de
Deinococcus geothermalis DSM 11302 sur milieu défini
Recherche des conditions de culture optimales**

V.1 Introduction du chapitre.....	151
V.2 Matériels et méthodes	151
V.2.1 Recherche du facteur limitant la croissance de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 par la méthode des ajouts	152
V.2.2 Croissance de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 sur le milieu défini en fonction des sources carbonées, sources soufrées ou autres compléments nutritionnels	154
V.2.3 Culture de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 sur des supports solides	154
V.3 Résultats et discussion.....	154
V.3.1 Quantification de la croissance de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 en milieu défini.....	154
V.3.2 Recherche du facteur limitant la croissance de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 par la méthode des ajouts	157
V.3.3 Croissance de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 sur le milieu défini en fonction des sources carbonées, sources soufrées ou autres compléments nutritionnels	158
V.3.4 Croissance de <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 sur le milieu défini en présence de supports solides.....	160
V.4 Conclusions	161

Chapitre V. Quantification de la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 sur milieu défini - Recherche des conditions de culture optimales

V.1 Introduction du chapitre

Deinococcus geothermalis DSM 11302 présentant les meilleurs résultats de croissance à la fois sur milieu défini et sur milieu complexe, l'étude de ses capacités de croissance en milieu défini a été envisagée. Le premier paragraphe donne des informations complémentaires sur la méthodologie employée pour répondre aux besoins de cette étude. Puis les résultats décrits consistent en une quantification de la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 en termes de taux de croissance, activité respiratoire, vitesses de consommation de l'oxygène et de production de dioxyde de carbone et rendement de production de biomasse à partir du substrat carboné glucose. La souche ayant une croissance limitée en culture sur milieu défini DM, la recherche du facteur ou des facteurs limitant la croissance a été réalisée par pulses de solutions nutritives lors d'une culture en bioréacteur. Cette stratégie n'ayant pas révélé l'environnement nutritionnel adapté à cette souche d'étude, des essais d'assimilation de substrats carbonés et soufrés en présence de divers facteurs de croissance ont été menés en fioles Erlenmeyer. La présence de supports solides, inertes ou hydrolysables, a été testée pour créer un microenvironnement favorable à *D. geothermalis*, microorganisme réputé pour sa capacité à former des biofilms (Kolari *et al.* 2003; Peltola 2011; Peltola *et al.* 2008; Väisänen *et al.* 1998).

V.2 Matériels et méthodes

Ce paragraphe apporte des informations complémentaires sur les matériels et les méthodes propres à ces expérimentations.

V.2.1 Recherche du facteur limitant la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 par la méthode des ajouts

Cette croissance a été réalisée en bioréacteur de 1 L en mode discontinu sur le milieu défini DM ; des pulses de solutions nutritives ont été réalisés en vue de rétablir une dynamique de croissance exponentielle et mettre en évidence un ou plusieurs éléments responsables de la limitation nutritionnelle. Les solutions utilisées pour les pulses contiennent des éléments nutritionnels courants ou atypiques, retrouvés dans les formulations de milieux de culture pour des microorganismes nutritionnellement exigeants :

- Acides aminés : la solution contient un mélange de L-acide glutamique, L-alanine, L-arginine (base), L-asparagine, L-glutamine, L-isoleucine, L-lysine HCl, L-proline, L-sérine, L-tryptophane, L-valine, DL-acide aspartique, L-méthionine, L-thréonine, glycine, histidine et leucine. Les acides aminés phénylalanine, L-cystéine et L-tyrosine sont préparés séparément.

- Sels : NH_4VO_3 , NaBr, SrCl_2 , CrKSO_4 , NiSO_4 , Na_2SeO_4 , Na_2WO_4 .

- Bases azotées et leurs dérivés : guanine, xanthine, thymidine, uracile, adénine, cytosine, thymine.

- Vitamines : inosine, acide orotique, riboflavine, acide D,L 6-8 thioctique, biotine, pyridoxine, niacine, thiamine, acide para-amino benzoïque, panthoténate de calcium, pyridoxamine, cobalamine, méso-inositol, acide folique, L-acide ascorbique et choline.

Ces composés ont été ajoutés à des concentrations classiquement retrouvées dans les milieux de culture et suffisantes pour induire une variation significative de la consommation en oxygène en cas d'effet positif sur la croissance. Les concentrations sont détaillées dans le Tableau 30.

Tableau 30 : Concentrations ajoutées pour chacun des pulses de nutriments

Composés	Concentrations ajoutées (mg.L^{-1})
NaSeO_4	0,05
Na_2WO_4 (2 H_2O)	0,10
NH_4VO_3	0,12
NiSO_4 (6 H_2O)	0,12
CrKSO_4 (12 H_2O)	0,25
SrCl_2 (6 H_2O)	0,10
NaBr	0,10

Tableau 30 (suite) : Concentrations ajoutées pour chacun des pulses de nutriments

Composés	Concentrations ajoutées (mg.L ⁻¹)
<u>Bases azotées</u>	
Guanine	2
Xanthine	
Thymidine	
Uracile	
Adénine	
Cytosine	5
Thymine	
<u>Vitamines</u>	
Inosine	25
Acide orotique	25
Riboflavine	5
Acide D,L 6-8 thioctique	12
Biotine	50
Pyridoxine	10
Niacine	10
Thiamine	5
Acide para-amino-benzoïque	50
Panthoténate de calcium	5
Pyridoxamine	25
Cobalamine	5
Meso-inositol	17
Acide folique	0,10
L-Acide ascorbique	25
Choline	25
L-Glutathion	3
<u>Acides aminés</u>	
L-Alanine	48
L-Arginine (base)	24
L-Asparagine	68
L-Glutamine	102
L-Isoleucine	40
L-Lysine HCl	70
L-Proline	136
L-Sérine	68
L-Tryptophane	10
L-Valine	66
DL-Acide aspartique	4
L-Méthionine	24
L-Thréonine	46
Glycine	34
Histidine	22
Leucine	94
L-Acide glutamique	4
L-Cystéine	42
Phénylalanine	70
L-Tyrosine ethyl ester HCl	43

V.2.2 Croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 sur le milieu défini en fonction des sources carbonées, sources soufrées ou autres compléments nutritionnels

Cette expérimentation avait pour but d'essayer de mettre en évidence l'élément ou les éléments indispensable(s) à la croissance de *D. geothermalis* DSM 11302 en les testant individuellement lors de cultures en fioles Erlenmeyer. L'effet de substrats constitutifs pour la formation de biomasse ainsi que d'éléments nutritionnels ayant un rôle catalytique ont été testés : la possibilité de cultiver la souche en milieu défini en présence de diverses sources carbonées, de sources soufrées, de vitamines, de casamino acides et d'extraits cellulaires a donc été étudiée. Les vitamines testées correspondent aux vitamines présentes dans un ajout de 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure. Les extraits cellulaires sont des autolysats de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Escherichia coli* et un extrait cellulaire de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 obtenu par casse mécanique (cf. Chapitre II § 2.10 à 2.11). Les expérimentations ont été réalisées sur le milieu défini (DM) sans glucose pour les essais avec les sources carbonées et avec 10 g.L⁻¹ de glucose pour les autres conditions.

V.2.3 Culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 sur des supports solides

Quatre types de supports solides ont été testés : du riz, de la pouzzolane (roche naturelle volcanique), de la pâte à papier et des morceaux d'éponge de cellulose. Le milieu défini DM a été ajouté sur ces supports autoclavés séparément dans des fioles Erlenmeyer. Les milieux ont ensuite été placés à l'étuve à 45 °C sans agitation.

V.3 Résultats et discussion

V.3.1 Quantification de la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 en milieu défini

L'étude des performances de production de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 en milieu défini a donc été réalisée par une culture en bioréacteur en mode discontinu, avec 1 L de milieu salin DM et 10 g.L⁻¹ de glucose comme source carbonée. Le pré-levain de 100 mL a été effectué en fiole Erlenmeyer avec le milieu défini DMG.

La stratégie a été de cultiver le microorganisme en mode discontinu jusqu'à épuisement du substrat carboné, le but étant d'étudier son potentiel de croissance en conditions de culture parfaitement caractérisées avec des apports nutritionnels maîtrisés. Les résultats de cette culture sont présentés sur la Figure 31 et sur la Figure 32.

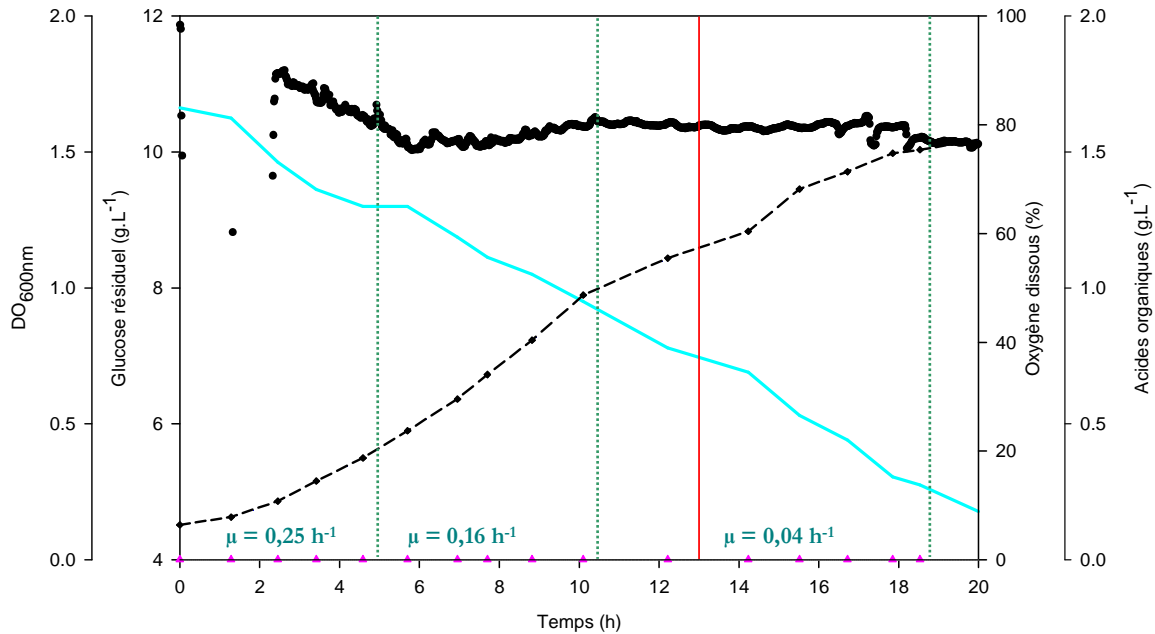


Figure 31 : Évolution de la DO_{600 nm} (-◆-), du glucose consommé (—), de l'oxygène dissous (●) et de la production d'acides organiques (▲) au cours de la culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302

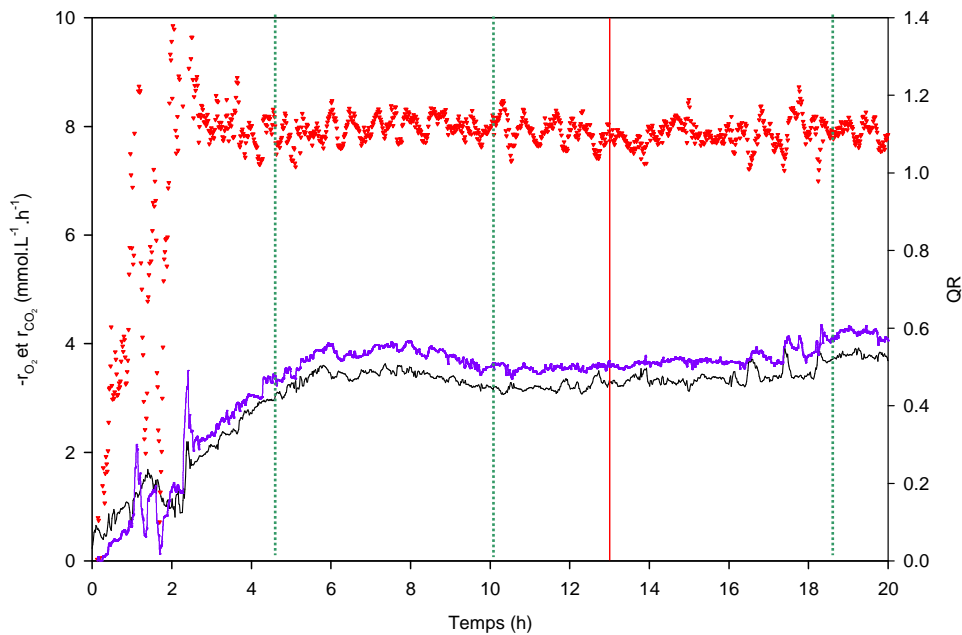


Figure 32 : Évolution des vitesses de consommation de l'oxygène (-r_{O₂}) (—), de production de dioxyde de carbone (r_{CO₂}) (—) et du QR (▼) au cours de la culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302

La croissance peut être divisée en trois phases :

Phase I : la culture a débuté par une croissance exponentielle pendant 4 heures avec un taux de croissance moyen de $0,25 \text{ h}^{-1}$ et un taux de croissance maximal égal à $0,28 \text{ h}^{-1}$, ce qui a permis d'obtenir 1,2 générations. Les vitesses de consommation de l'oxygène ($-r_{O_2}$) et de production du dioxyde de carbone (r_{CO_2}) ont atteint respectivement 3,3 et $3,5 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, le QR moyen étant égal à 1,17.

Phase II : après cinq heures de culture, la dynamique de croissance a commencé à diminuer. Ce changement de comportement est visible sur l'évolution de la concentration en oxygène dissous et des vitesses de respiration ; en effet entre 5 et 6 heures de culture, la consommation de l'oxygène a diminué et la valeur de la pO_2 s'est stabilisée entre 75 et 80 %. La vitesse de consommation de l'oxygène est restée à une valeur comprise entre 3,3 et $3,5 \text{ mmol}_{O_2}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Cette deuxième phase de croissance, correspondant à 1,5 générations, a duré cinq heures avec un taux de croissance moyen égal à $0,16 \text{ h}^{-1}$. La valeur du QR était en moyenne égale à 1,12.

Phase III : la croissance s'est ensuite maintenue environ 8 heures à un taux maximal de croissance égal à $0,04 \text{ h}^{-1}$; aucune variation de la dynamique de respiration du microorganisme n'a été observée durant cette phase. La pO_2 était stable à 80 %, le QR à 1,12 et les vitesses de consommation de l'oxygène et de production du dioxyde de carbone étaient en moyenne égales à 3,3 et $3,6 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivement.

La culture a donc débuté par une croissance exponentielle (taux de croissance maximal de $0,28 \text{ h}^{-1}$) puis le taux de croissance a diminué ; sa valeur moyenne sur l'ensemble de cette culture est égale à $0,13 \text{ h}^{-1}$. La consommation du substrat carboné glucose a suivi la même dynamique tout au long de la culture malgré la diminution de la cinétique de croissance. Au début de la croissance, la faible quantité de biomasse (inférieure à $400 \text{ mg}_{MS}.\text{L}^{-1}$) et la courte durée de la phase exponentielle (quatre heures) n'ont pas permis d'avoir accès à la vitesse spécifique maximale de consommation du glucose. Cependant, la valeur moyenne a été calculée, elle est égale à $0,57 \text{ Cmol}_{Glc}.\text{Cmol}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$. De plus, dans les limites de détection des appareils analytiques, aucun acide organique n'a été produit au cours de cette culture. Cette absence d'acides organiques, en présence d'oxygène et en excès de substrat carboné glucose, semble indiquer qu'il n'y a pas de bascule métabolique chez *Deinococcus geothermalis* DSM 11302. Sur ces trois phases de culture, 5,55 g de glucose ont été consommés pour 1,38 g de biomasse sèche. Le rendement de production de biomasse sur le glucose est alors égal à $0,25 \text{ g}_X.\text{g}_{Glc}^{-1}$ soit $0,30 \text{ Cmol}_X.\text{Cmol}_{Glc}^{-1}$.

La croissance s'est donc retrouvée limitée avant l'épuisement du substrat carboné glucose. Des ajouts de solutions nutritives concentrées ont été effectués ponctuellement dans le but de rétablir la dynamique de croissance initiale et mettre en évidence l'élément responsable de la limitation.

V.3.2 Recherche du facteur limitant la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 par la méthode des ajouts

L'influence des pulses de solutions nutritives sur l'activité respiratoire du microorganisme est présentée sur la Figure 33.

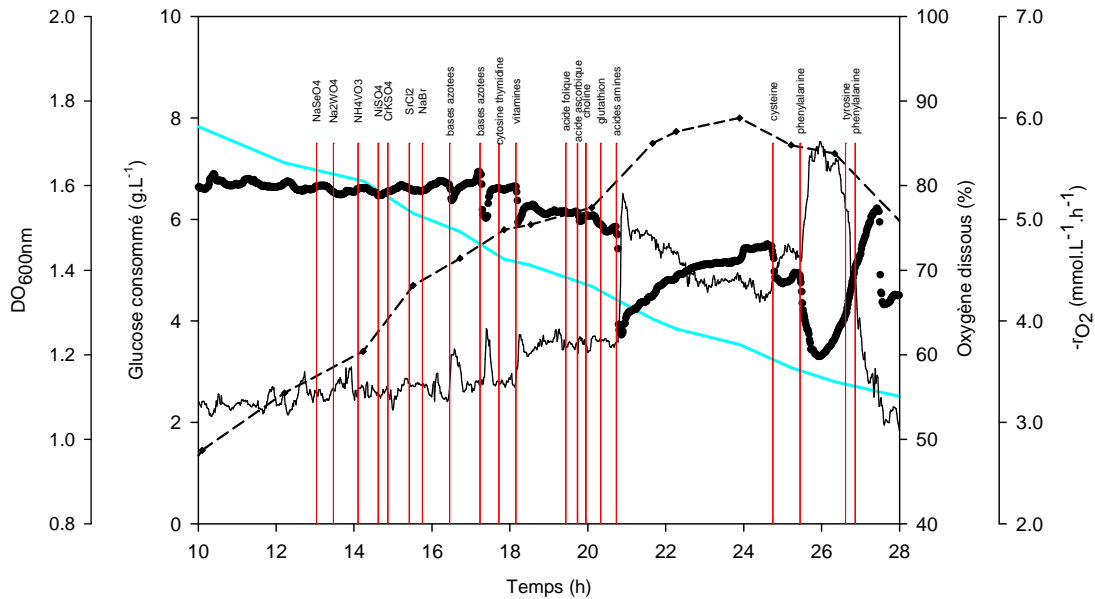


Figure 33 : Évolution de la DO_{600nm} (—◆—), du glucose consommé (—), de la pression partielle d'oxygène dissous (●) et de la vitesse de consommation de l'oxygène ($-r_{O_2}$) (—) en fonction des ajouts de solutions nutritives au cours de la culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302

Les sels, les bases azotées, les vitamines puis les acides aminés ont été ajoutés au milieu de culture. L'ajout de la solution de vitamines a provoqué une augmentation de la vitesse de consommation de l'oxygène (+ 15 %) mais cet effet a été de courte durée et n'a pas permis l'accroissement de la quantité de biomasse de façon significative. Le mélange d'acides aminés a également induit une augmentation de l'activité respiratoire, visible sur la vitesse de consommation de l'oxygène, qui ne s'est pas maintenue dans le temps. Les acides aminés ont probablement été métabolisés, utilisés comme source préférentielle de carbone et d'azote, mais ce ne sont pas les éléments limitant la culture. L'addition de phénylalanine a augmenté l'activité cellulaire, mais ce résultat n'a été confirmé ni par le second ajout, ni par un essai de croissance en fiole Erlenmeyer effectué par la suite.

Malgré les ajouts effectués, la culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 n'a pas retrouvé la dynamique de croissance observée pendant la première phase de la culture. La cause de ce changement de dynamique après quatre heures de croissance exponentielle n'a pas été identifiée. Plusieurs hypothèses sont avancées : l'apparition d'une limitation nutritionnelle non compensée par les ajouts, la dilution d'un élément catalytique intracellulaire ou la perte du potentiel de croissance en fonction du nombre de générations. Les

résultats obtenus ne permettent pas de privilégier une de ces hypothèses. La stratégie a alors été d'explorer l'effet de divers substrats constitutifs ou catalytiques sur la croissance de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 cultivée en fioles Erlenmeyer.

V.3.3 Croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 sur le milieu défini en fonction des sources carbonées, sources soufrées ou autres compléments nutritionnels

Les données de la littérature rapportent pour les déinocoques une auxotrophie pour la cobalamine (Holland *et al.* 2006; Little and Hanawalt 1973; Shapiro *et al.* 1977), cofacteur impliqué dans la voie de biosynthèse de la méthionine. De plus, la méthionine et la cystéine, deux acides aminés soufrés, sont fréquemment retrouvés dans les compositions de milieux de culture (Raj *et al.* 1960; Venkateswaran *et al.* 2000). Cinq sources soufrées, organiques ou minérales, ont donc été ajoutées au milieu DM. L'extrait de levure étant indispensable à la croissance non limitée de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, l'effet de cinq solutions de facteurs de croissance a été étudié : il s'agit d'une solution contenant les vitamines de l'extrait de levure, d'un mélange d'acides aminés et d'extraits cellulaires. Des extraits de levure et de bactérie préparés par autolyse ainsi qu'un extrait de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 obtenu par casse mécanique ont été testés comme inducteurs de la croissance. Enfin, l'assimilation de huit sources carbonées a été étudiée en vue d'augmenter les performances de production de biomasse de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 sur le milieu défini DM. Les résultats sont présentés dans les Tableau 31, Tableau 32 et Tableau 33.

Tableau 31 : Résultats de croissance de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 cultivée sur milieu défini supplémenté avec diverses sources soufrées

Milieu de base		DMG				
Suppléments	Na ₂ S ₂ O ₃	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	acide lignosulfonique	blanc œuf	HNaO ₃ S	
DO _{600nm}	t 0 h	0,238	0,399	0,246	0,249	0,237
	t 25 h	1,320	2,830	1,450	0,039	0,202
	t 47 h	1,780	3,120	1,680	/	/
	t 73 h	1,780	2,810	1,720	/	/
nb générations	2,9	2,8	2,8	/	/	
[glucose] (g.L ⁻¹)	t 0 h	8,60	8,60	8,60	/	/
	t 25 h	5,16	3,66	4,74	/	/
	t 47 h	3,19	1,68	2,12	/	/
	t 73 h	1,45	1,09	0,23	/	/
Y _{s,x} (gX.gGlc ⁻¹)	0,29	0,39	0,22	/	/	

Tableau 32 : Résultats de croissance de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 cultivée sur milieu défini supplémenté avec divers facteurs de croissance

Milieu de base		DMG					
Suppléments		vitamines YE	CA	extrait <i>D. geothermalis</i>	autolysat <i>S. cerevisiae</i>	autolysat <i>E. coli</i>	-
DO _{600nm}	t 0	0,242	0,248	0,288	0,301	0,230	0,246
	t 25 h	1,430	1,530	1,580	1,400	1,420	1,540
	t 47 h	1,810	1,570	1,890	1,750	1,670	1,710
	t 73 h	1,840	1,650	1,850	2,000	1,760	1,860
nb générations		2,9	2,7	2,7	2,7	2,9	2,9
[glucose] (g.L ⁻¹)	t 0	8,60	8,60	8,60	8,60	8,60	8,60
	t 25 h	5,25	5,04	5,07	4,92	5,04	5,79
	t 47 h	1,69	2,36	1,64	2,38	2,20	2,35
	t 73 h	0,00	0,82	0,00	0,03	0,00	0,51
Y _{s,x} (gx.gGlc ⁻¹)		0,23	0,21	0,23	0,23	0,23	0,23

Tableau 33 : Résultats de croissance de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 cultivée sur milieu défini supplémenté avec diverses sources carbonées

Milieu de base		DM								
Suppléments		CMC	mannose	tréhalose	galactose	fructose	maltose	lactose	saccharose	glucose
DO _{600nm}	t 0 h	0,269	0,257	0,245	0,296	0,272	0,261	0,248	0,240	0,242
	t 25 h	0,222	1,080	1,430	0,392	1,360	1,610	0,218	1,440	1,760
	t 47 h	/	1,850	2,030	0,690		1,970	/	1,920	2,080
	t 73 h	/	1,880	2,120	/	1,540	1,990	/	1,990	2,000
nb générations		/	2,9	3,1	1,2	2,5	2,9	/	3,1	3,1

Concernant les résultats obtenus avec les sources soufrées, il y a eu une inhibition de la croissance en présence de blanc d'œuf ou de sulfites et une précipitation dans le milieu de culture avec le sel de Mohr ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂). Ces composés ne permettent pas la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302. En présence du thiosulfate de sodium, de l'acide lignosulfonique, des vitamines ou des extraits cellulaires, la croissance a été comparable à celle obtenue dans le milieu DMG sans supplément, 3 générations ont été obtenues. L'effet positif de l'extrait de levure sur la croissance de *D. geothermalis* DSM 11302 n'est pas dû aux vitamines présentes dans cet extrait. Un extrait cellulaire, qu'il soit d'origine levurienne ou bactérienne, n'est pas suffisant pour apporter les éléments indispensables à la croissance non limitée de la souche. Un extrait de déinocoques ne parvient pas à induire de nouvelles divisions de *D. geothermalis*. Les techniques de préparation de ces extraits n'ont peut être pas rendu les composés libérés par l'autolyse ou la casse

physique biodisponibles pour être consommés par le microorganisme. L'ajout de casamino acids n'a pas augmenté le nombre de générations, mais il a augmenté la vitesse de croissance. Cette observation confirme les résultats obtenus avec l'extrait de levure, *D. geothermalis* consomme préférentiellement les sources carbonées et azotées de nature protéique.

Concernant les sources carbonées, il n'y a pas eu de croissance avec la carboxyméthylcellulose ou le lactose. Le lactose a pourtant été décrit comme source de carbone assimilée par *D. geothermalis* DSM 11300 (Ferreira *et al.* 1997). A partir du galactose une génération a été obtenue et bien que le fructose, le maltose et le mannose puissent être consommés, la production de biomasse a été inférieure à celle obtenue à partir du glucose. Le tréhalose et le saccharose ont également pu être utilisés comme sources carbonées mais les résultats sont comparables à ceux obtenus à partir du glucose. La croissance à partir des sources carbonées tréhalose, maltose, mannose, galactose, saccharose, fructose et glucose est en accord avec les données publiées pour la souche *D. geothermalis* DSM 11300 (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997).

Cependant, les conditions de culture testées n'ont pas permis de mettre en évidence une source de carbone, de soufre, de vitamines, préférentielle pour la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302. Comparées au milieu DMG, les formulations testées ne permettent pas une meilleure production de biomasse de la souche de déinocoque étudiée.

V.3.4 Croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 sur le milieu défini en présence de supports solides

Dans la littérature, il est reporté que *Deinococcus geothermalis* est un microorganisme fréquemment retrouvé dans les industries papetières sous forme de biofilms (Kolari *et al.* 2003; Peltola 2011; Peltola *et al.* 2008; Väisänen *et al.* 1998). Nous avons alors émis l'hypothèse que sa croissance pouvait être liée à son adhésion sur un support solide et à la formation de biofilms. La formation de biofilms crée un microenvironnement propre à chacune des bactéries qui constituent le biofilm. L'accès aux nutriments, les conditions de pH et d'oxygénation sont variables au sein du biofilm créant ainsi des gradients physico-chimiques.

Avec la pâte à papier et la pouzzolane, aucune croissance n'est apparue après 14 jours d'incubation. Avec le riz et l'éponge en cellulose, une faible croissance a été mise en évidence mais seulement dans la fraction de milieu libre, pas sur les supports. La culture sur ce type de supports dans les conditions testées ne convient pas à la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302.

V.4 Conclusions

La culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, en bioréacteur sur milieu DM et en présence de glucose, a montré la possibilité d'obtenir une croissance exponentielle pendant quatre heures avec un taux maximal de croissance de $0,28 \text{ h}^{-1}$. Cependant, malgré la présence de glucose résiduel dans le milieu de culture, le comportement physiologique de la souche évolue rapidement et le taux de croissance chute à $0,16 \text{ h}^{-1}$ puis $0,04 \text{ h}^{-1}$. Cette expérimentation a permis l'observation du comportement de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 cultivée sur un milieu défini avec des paramètres environnementaux parfaitement contrôlés (température de $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6,8). La vitesse de consommation de l'oxygène ($-r_{\text{O}_2}$) a atteint $3,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, le QR moyen étant égal à 1,17 pendant la croissance exponentielle. Sur ce milieu défini avec $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose, aucune production d'acides organiques n'a été mise en évidence. La vitesse spécifique moyenne de consommation du glucose est de $0,57 \text{ Cmol}_{\text{Glc}}\cdot\text{Cmol}_X^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ et le rendement de production de biomasse a atteint $0,25 \text{ g}_X\cdot\text{g}_{\text{Glc}}^{-1}$ soit $0,30 \text{ Cmol}_X\cdot\text{Cmol}_{\text{Glc}}^{-1}$. La quantification des paramètres cinétiques apporte des données essentielles à une meilleure connaissance de la physiologie de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 ; en effet, les données cinétiques ne figurent dans aucun des travaux publiés dans la littérature.

L'ajout de nombreuses solutions nutritives n'a pas permis de rétablir la dynamique de croissance observée au début de la culture. Les différents éléments ajoutés au milieu de culture lors des expérimentations en fioles Erlenmeyer n'ont pas révélé de composition d'un milieu de culture synthétique plus favorable à la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 que le milieu DM avec $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose. Les supports solides dans les conditions de culture testées n'ont pas permis la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 sous forme de biofilm.

SYNTHESE DES RESULTATS

- ⇒ La stratégie a consisté en une culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 en mode discontinu jusqu'à épuisement du substrat carboné glucose afin d'étudier et quantifier son potentiel de croissance en conditions de culture parfaitement caractérisées avec des apports nutritionnels maîtrisés.
- ⇒ La culture a été réalisée à 45 °C, pH 6,8 et en aérobiose avec 1 L de milieu de culture DM additionné de 10 g.L⁻¹ de glucose.
- ⇒ Les résultats mettent en évidence une croissance exponentielle pendant 4 heures à un taux de croissance maximal de 0,28 h⁻¹.
- ⇒ La dynamique de croissance ne se maintient pas malgré la présence de glucose résiduel : des pulses de solutions nutritives ont été effectués dans le but de mettre en évidence un ou plusieurs élément(s) responsable(s) de la limitation.
- ⇒ La croissance sur le milieu défini DM à 45 °C a permis la production de 1,38 g_{MS} de biomasse à partir de 5,55 g de glucose consommés, ce qui représente un rendement égal à 0,25 g_X.g_{GlC}⁻¹ (0,30 Cmol_X.Cmol_{GlC}⁻¹). Les valeurs moyennes du taux de croissance et de la vitesse spécifique de consommation du glucose sont respectivement égales à 0,13 h⁻¹ et 0,57 Cmol_{GlC}.Cmol_X⁻¹.h⁻¹.
- ⇒ Les conditions de culture testées n'ont pas permis de mettre en évidence un élément constitutif ou catalytique (sels, bases azotées, sources carbonées, sources soufrées, vitamines, extraits cellulaires) permettant d'augmenter la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302.
- ⇒ La présence d'un support solide ne crée pas un microenvironnement favorable à la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 dans les conditions testées.

**Chapitre VI. Growth of the extremophilic
Deinococcus geothermalis DSM 11302
using co-substrate fed-batch culture**

**Chapitre VI. Growth of the extremophilic *Deinococcus geothermalis*
DSM 11302 using co-substrate fed-batch culture**

VI.1 Introduction du chapitre.....	169
VI.2 Publication : Growth of the extremophilic <i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11302 using co-substrate fed-batch culture.....	170
VI.2.1 Abstract.....	170
VI.2.2 Introduction.....	171
VI.2.3 Materials and methods	172
A - Bacterial strain	172
B - Media and growth conditions.....	172
C - Chemicals	173
D - Cultures in bioreactor	173
E - Glucose, salts and yeast extract feeding strategy.....	174
F - Biomass determination.....	175
G - Biomass analyzes	175
H - Glucose, organic acids, proteins and ammonia determination in supernatant.....	175
VI.2.4 Results.....	176
A - Feeding strategy and microbial growth kinetic	176
B - Carbon substrates catabolism.....	179
C - Nitrogen sources catabolism.....	180
D - Acidic and alkaline regulation.....	181
E - Gas analyzes.....	181
VI.2.5 Discussion	182

Chapitre VI. Growth of the extremophilic *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 using co-substrate fed-batch culture

VI.1 Introduction du chapitre

Ce chapitre est rédigé sous la forme d'un article scientifique publié dans le journal scientifique Applied Microbiology and Biotechnology.

Il décrit les performances de production de biomasse de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 en termes de taux de croissance, vitesses réactionnelles et spécifiques de consommation de l'oxygène, de production du dioxyde de carbone et de consommation du substrat, lors d'une culture en mode discontinu alimenté avec un apport de deux substrats, le glucose et l'extrait de levure. Il s'intéresse également au devenir du carbone et de l'azote ajoutés au milieu de culture.

Le chapitre précédent a montré la possibilité d'obtenir une croissance exponentielle de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 à partir du milieu défini DM pendant seulement quatre heures. La croissance se trouve donc rapidement limitée dans ces conditions. Ce quatrième chapitre de résultats est alors consacré à la production de *D. geothermalis* en utilisant une stratégie de culture discontinue alimentée avec une alimentation double substrats, glucose et extrait de levure. Une culture de type fed-batch permet un apport contrôlé des éléments nutritifs et donc de s'affranchir d'éventuels effets inhibiteurs dus à une concentration élevée en substrats. Le taux de croissance de la souche peut alors être contrôlé par l'alimentation et ce mode de conduite rend possible l'étude de la dynamique de croissance de la souche en réponse à des perturbations de son environnement nutritionnel. Il s'agit donc de décrire les potentialités de production de la souche *D. geothermalis* DSM 11302 en bioréacteur en modulant l'apport des deux substrats. La première partie fait état de la conduite de la culture en adaptant les apports du glucose et de l'extrait de levure afin de quantifier la croissance et les rendements de production de biomasse à partir de chacun des substrats. Puis les métabolismes carboné et azoté sont discutés en fonction du devenir des substrats carbonés, glucose et extrait de levure, et des substrats azotés, azote ammoniacal et extrait de levure. Enfin, la relation entre la régulation acide/base et l'apport des substrats ainsi que l'activité respiratoire sont décrites dans ce chapitre. La dernière partie est une discussion des résultats obtenus ainsi qu'une confrontation aux données de la littérature.

VI.2 Publication : Growth of the extremophilic *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 using co-substrate fed-batch culture

Julie Bornot¹²³, Carole Molina-Jouve¹²³, Jean-Louis Uribelarrea^{*123}, Nathalie Gorret^{*123}

¹ Université de Toulouse ; INSA, UPS, INP ; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

² INRA, UMR 792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

³ CNRS, UMR 5504, F-31400 Toulouse, France

* These authors contributed equally to the supervision of this work

* Corresponding author.

Tel.: +33 05 61 55 94 44; fax: +33 05 61 55 94 00.

E-mail address: ngorret@insa-toulouse.fr

VI.2.1 Abstract

Deinococcus geothermalis metabolism has been scarcely studied to date although new developments on its utilization for bioremediation have been carried out. So, large-scale production of this strain and a better understanding of its physiology are required. A fed-batch experiment was conducted to achieve a high cell density non-limiting culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302. A co-substrate nutritional strategy using glucose and yeast extract was carried out in a 20 L bioreactor in order to maintain a non-limited growth at a maximal growth rate of 1 h⁻¹ at 45 °C. Substrate supplies were adjusted by monitoring on-line culture parameters and physiological data (dissolved oxygen, gas analyzes, respiratory quotient, biomass concentration). The results showed that yeast extract could serve as both carbon and nitrogen sources, although glucose and ammonia were consumed too. Yeast extract-carbon specific uptake rate reached a value 4.5 times higher than glucose-carbon specific uptake rate. Cell concentration of 9.6 g_{DCW}.L⁻¹ dry cell weight corresponding to 99 g_{DCW} of biomass was obtained using glucose and yeast extract as carbon and nitrogen sources.

Keywords: *Deinococcus geothermalis* DSM 11302; fed-batch culture; nutritional strategy; growth conditions.

VI.2.2 Introduction

Deinococcus geothermalis belongs to the bacterial family *Deinococcaceae*. Members of the genus *Deinococcus* are known for their resistance to extreme environmental conditions like solvent and heavy metal presence, desiccation, oxidative stress and ionizing radiations (Battista 1997; Blasius *et al.* 2008; Cox and Battista 2005; Kongpol *et al.* 2008; Mattimore and Battista 1996; Slade and Radman 2011). The main thermophilic strain of *Deinococcus*, *Deinococcus geothermalis*, has been isolated for the first time in hot springs at the Termini di Agnano near Naples in Italy (Ferreira *et al.* 1997). The strain DSM 11302 is a type strain of *Deinococcus geothermalis* which has been discovered in water samples from São Pedro do Sul in Portugal. Its optimum growth temperature is between 45 °C to 50 °C and its optimum pH is 6.5 (Ferreira *et al.* 1997).

Radiation and oxidation resistance properties of *Deinococcaceae* have been extensively investigated (Battista *et al.* 1999; Battista 1997; Blasius *et al.* 2008; Daly 2009; Daly 2006; Makarova *et al.* 2007) and Brim *et al.* have studied the possibility of using *Deinococcus geothermalis* properties for bioremediation of radioactive wastes and irradiated environments (Brim *et al.* 2003). Whereas advances in genetic engineering have been reported, metabolism of *Deinococcus geothermalis* and more generally of *Deinococcaceae* has been scarcely investigated (Ferreira *et al.* 1997; Liedert *et al.* 2012).

Deinococcus geothermalis is currently cultivated in rich media containing at least one complex nutrient source as yeast extract, peptone or tryptone (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997). Previous works have reported that growth in absence of yeast extract was possible but low (Kongpol *et al.* 2008). Nevertheless the role of yeast extract is still unclear; it can be a source of constitutive nutrients or of growth factors. In 2009, growth of *D. radiodurans* was firstly quantified under controlled conditions in a 20 L bioreactor (He 2009): at pH 7 and 37 °C, the composition of TGY (Tryptone Glucose Yeast extract) medium was optimized to achieve a final OD_{600nm} of 40 corresponding to 18 g_{WCW}.L⁻¹ of biomass. A batch experiment with an addition of glucose 16 hours after the inoculation was carried out. Moreover, kinetic of growth of *D. geothermalis* in a bioreactor under controlled parameters has never been investigated and reported yet.

Previous works have been done in order to define a synthetic medium for the growth of *Deinococcus geothermalis* (unpublished data). Experiments have been carried out in flasks and in batch-mode bioreactor cultures. Since yeast extract was necessary to achieve a non-limiting growth of *D. geothermalis*, the influence of a lot of vitamins, salts, amino acids and fewer fractions of yeast extract on biomass production and oxygen uptake by *D. geothermalis* have been tested. The results have revealed that whole yeast extract was needed to achieve a non-limiting growth with the maximum growth rate. The main purpose of this study was then to contribute to a better understanding of the physiology of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, under controlled nutritional and growth conditions (temperature, pH, aeration). The strain was cultivated with glucose and yeast extract using an adaptive fed-batch culture mode. Fed-batch culture offers numerous advantages (Korz *et al.* 1995; Lee *et al.* 1999; Riesenber and Guthke 1999) as production of high cell densities, control of growth rate and study of microorganism physiology in response to

nutritional environment changes. Moreover, fed-batch mode can reduce feedback inhibition due to high substrate concentrations and by-product production from over-flow metabolism can be avoided by limiting substrate feed to the amount required solely for growth. The fed-batch mode with a feeding strategy using glucose and yeast extract as co-substrates was then carried out in this work: allowing flexibility in the nutrients supply, the possibility of growth control and the role of yeast extract as a source of nitrogen, carbon and/or growth factors were investigated.

VI.2.3 Materials and methods

A - Bacterial strain

The microorganism used in this study was *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany). The strain was inoculated into PGY medium broth (peptone 10 g.L⁻¹, glucose 10 g.L⁻¹, yeast extract 5 g.L⁻¹) and incubated at 45 °C for 24 hours. Bacterial cells were then stored at - 80 °C with 20 % (v/v) glycerol.

B - Media and growth conditions

For inoculum preparation, one glycerol stock was streaked on PGY agar medium (PGY medium broth supplemented with agar 14 g.L⁻¹) and incubated for 48 hours at 45 °C.

Pre-culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 was carried out in a 5 mL tube containing 1.5 mL Yeast Extract Glucose Medium (YEGM), at 45 °C for 24 hours on an orbital shaker (110 rpm). Only one colony was used for the preculture. YEGM was prepared by adding 4 g.L⁻¹ of glucose, 5 g.L⁻¹ of yeast extract and 0.4 M of MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid used as pH buffering) to 1 L of the mineral medium prepared for the bioreactor culture (see below).

The successive steps of precultures were carried out in baffled Erlenmeyer flasks with increasing volumes (10 mL, 100 mL and 450 mL YEGM). The inoculum size was 10 % (v/v) and the cultures were incubated 12 hours at 45 °C and 110 rpm. The 450 mL preculture was used to inoculate 9 L of mineral medium in a 20 L bioreactor.

The mineral medium (10 L) was prepared as follows: 5.74 mM K₂HPO₄, 20 mM NH₄Cl, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 278 μM Na₂SO₄, 528 μM MgCl, 0.5 μM CaCl₂. After sterilization of this solution by autoclave, 100 mL of 2 mM FeCl₃ in 2 mM sodium citrate, 1 mL of a micronutrients solution (3*10⁻⁵ M (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4*10⁻³ M H₃BO₃, 3*10⁻⁴ M CoCl₂, 1*10⁻⁴ M CuSO₄, 25*10⁻⁴ M MnCl₂ and 10*10⁻⁵ M ZnSO₄) and 1 mL of each vitamin (niacin, thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride, cobalamin and biotin prepared separately at a concentration of 10 mg.L⁻¹) were added. The solutions of iron, micronutrients and vitamins added were sterilized by filtration. The initial pH was adjusted to the required

value 6.8 with NH_4OH . The mineral medium used in this study was adapted from a medium developed for the growth of *Deinococcus radiodurans* (Holland *et al.* 2006).

Two substrate solutions were prepared for fed-batch experiments: glucose at $730 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and yeast extract at $385 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A feeding saline solution containing $9.45\cdot 10^{-4} \text{ M CaCl}_2$, $5.58\cdot 10^{-5} \text{ M CoCl}_2$, $8.24\cdot 10^{-5} \text{ M ZnSO}_4$, $1.08\cdot 10^{-5} \text{ M H}_3\text{BO}_3$, $2.29\cdot 10^{-3} \text{ M K}_2\text{HPO}_4$, $9.49\cdot 10^{-3} \text{ M MgCl}_2$, $5.34\cdot 10^{-4} \text{ M FeSO}_4$, $1.48\cdot 10^{-5} \text{ M CuSO}_4$, $8.20\cdot 10^{-5} \text{ M MnCl}_2$, $3.53\cdot 10^{-6} \text{ M AlCl}_3$, $1.70\cdot 10^{-2} \text{ M H}_3\text{PO}_4$, $6.46\cdot 10^{-3} \text{ M H}_2\text{SO}_4$ and $7.93\cdot 10^{-6} \text{ M Na}_2\text{MoO}_4$ was also prepared. The composition was determined using calculation of excess factor for each element, as described in published works of Egli and co-authors (Egli and Fiechter 1981; Schneebeili and Egli 2013). The calculation was done under the assumption that the mineral elements presents in yeast extract solution are not consumed for the growth. Theoretical growth yields per element for *Deinococcus geothermalis* have been set based on average growth yields for microorganisms whose nutritional requirements are known. The pH of the saline solution was 1. These solutions were sterilized by autoclave 20 minutes at $121 \text{ }^\circ\text{C}$.

C - Chemicals

Glucose, ortho-phosphoric acid, ammonia, salts and oligo-elements were obtained from Prolabo (USA), yeast extract from Difco Diagnostics (USA) and sulphuric acid from Fisher (USA). The salts ZnSO_4 and MgCl_2 , vitamins and the MOPS were provided from Sigma (USA) and AlCl_3 from Fluka (USA). All products were of the highest analytical grade available.

D - Cultures in bioreactor

Fed-batch experiments were performed in a 20 L bioreactor B.Braun Biostat E (Braun, Melsungen, Germany) in-situ sterilisable. Stirring and aeration were manually adjusted to avoid oxygen-limiting conditions. The mixing system consists of four baffles and three Rushton turbines. The reactor was instrumented with dissolved oxygen probe (Ingold, Urdorf, Switzerland), pH probe (Fermprobe Broadley-James Co., Santa Ana, USA), temperature and pressure sensors. The temperature was maintained at $45 \text{ }^\circ\text{C}$ with a water-filled jacket connected to a thermostated vessel, the water temperature being regulated by a heat exchanger and a cooling-water circulation system. The pH was kept at 6.8 with addition of 14 % (v/v) ammonia solution or 8.5% (v/v) ortho-phosphoric acid solution. The bioreactor was maintained to a relative pressure of 0.3 bar and the antifoaming agent struktol J673 (Struktol, Germany) was used in case of foam formation during the fermentation. The solutions of ammonia, acid and antifoaming agent were supplied with three peristaltic pumps (B.Braun).

For fed-batch culture, the medium in the bioreactor was supplied with three sterile feeds, yeast extract, glucose and saline solutions, using peristaltic pumps (B.Braun, Masterflex and Gilson). The glucose feed concentration was $730 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, the second feed was a $385 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ yeast extract solution and the third feed was the saline solution. Yeast extract was added using two pumps: one with a flow range from 0 to $5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ (Masterflex 7521-35, Cole-Parmer Instrument Company, USA), the other one (B.Braun FE411, Braun,

Melsungen, Germany) with more precise flow, from 0 to 0.15 L.h⁻¹. The glucose and saline solutions were added with two Minipuls 3 pumps (Gilson, Gilson Inc., USA) with a maximal flow of 0.15 L.h⁻¹.

The density of these feeding solutions was measured with a density meter (DE40, Mettler Toledo, USA) and masses of yeast extract and glucose added to the bioreactor were measured on-line by weighing (IB16000S and CPA16001S, Sartorius, Goettingen, Germany).

The bioreactor was connected to a computer with homemade software for on-line acquisition, monitoring and regulation of the controlled parameters (stirring rate, pH, temperature, partial pressure of dissolved oxygen (DO), pH regulating solution and struktol additions). The inlet airflow was measured by a mass flowmeter (Brooks, USA). The composition of exhaust gas of the reactor was measured with an analyzer EGAS 8 (Braun, Germany), by infrared spectrometry for carbon dioxide and by paramagnetism for oxygen. These measurements, with mass balance equations, allowed calculating the oxygen uptake and carbon dioxide production rates and respiratory quotient (RQ). RQ is defined by the ratio between carbon dioxide production rate (r_{CO_2}) and oxygen uptake rate (r_{O_2}); its value depends on degrees of reduction of the carbon source (γ_s), the final electron acceptor (γ_{O_2}) and the biomass (γ_x).

$$RQ = \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}} = \left| \gamma_{O_2} \times \frac{1 - Y_{s,x}}{\gamma_s - \gamma_x \times Y_{s,x}} \right|$$

Throughout the experiment, samples were harvested and stored at - 20°C.

E - Glucose, salts and yeast extract feeding strategy

Glucose and yeast extract solutions flows were adapted to the microorganism needs to ensure a constant and maximal growth rate without nutrient limitation. Non-limiting conditions were ensured by dissolved oxygen monitoring.

During 5 hours, glucose was added by pulse to maintain a residual concentration higher than 0.4 g.L⁻¹ in order to be in glucose non-limiting conditions. Then, the glucose uptake rate of the strain was calculated using experimental data obtained since the beginning of the growth; the feeding rate was set at the glucose uptake rate value.

The yeast extract feeding strategy was to adjust the yeast extract solution flow to the uptake rate of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, to avoid yeast extract limitation during the culture. It was made by on-line monitoring the dissolved oxygen.

The saline solution supply was correlated to carbon substrates feeding; the flow of the pump was set at 1/10 of the total flows of glucose and yeast extract pumps. This value was chosen as a compromise between the nutritional requirements of the microorganism, the volume increase due to saline solution supply and technical constraints for feeding.

F - Biomass determination

Biomass concentration was determined by optical density (OD_{600nm}) measurements at 600 nm (spectrophotometer Libra S4, Biochrom, UK) and dry cell weight (DCW) measurements. Dry cell weight was estimated by filtration on polyamide membrane (Sartolon 0,2 μm - Sartorius) and drying to a constant weight for 48 hours, at 60 °C under 200 mmHg in a vacuum oven (Heraeus, France).

G - Biomass analyzes

Elemental composition of the biomass was analyzed. After centrifugation of the sample (4000 g for 10 minutes), the pellet was washed three times with physiological water at 4 °C and then frozen at - 80 °C. Fermentation samples were freeze-dried and sent for analyses to the Central Service of Analysis (CNRS, Solaize, France). Elements C, H, O and N are detected and analyzed after combustion of the sample by a katharometer or by a specific infrared detector.

The protein concentration in the samples was determined by spectrophotometry, according to the colorimetric method of Biuret (Gornall *et al.* 1949).

To measure the proteins of the biomass, the protocol was the following one: a volume of 1 mL of fermentation medium was centrifuged at 12000 g for 3 minutes (MiniSpin Eppendorf, USA) and the pellet was suspended in ultra-pure water (qsp 1mL). Cells had to be broken to release the protein contents: a step of heating at 100 °C in a water bath during 5 minutes in the presence of NaOH is necessary before the addition of the reactive $CuSO_4$ (Stickland 1951). For quantification, the standard used was a solution of bovine serum albumin.

H - Glucose, organic acids, proteins and ammonia determination in supernatant

During fermentation, culture supernatant was obtained by centrifuging (MiniSpin Eppendorf, USA) fermentation broth samples in Eppendorf tubes at 12000 g for 3 minutes. Glucose concentration was measured with an YSI 2700 glucose analyzer (Yellow Springs Instruments, USA).

Glucose and organic acid concentrations of filtered supernatants (Minisart filters 0.2 μm size pore, Sartorius, Germany) were determined by HPLC (Ultimate 3000, Dionex, USA) using an Aminex HPX-87H+ column (Bio-Rad, USA) under the following conditions: 50 °C, 5 mM H_2SO_4 as mobile phase at a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹ and detection with a refractometer and an UV detector at 210 nm. The samples were previously diluted in deionised water. External standards (0.2 to 5 g.L⁻¹) were used for compound identification and quantification. Chromatograms were analyzed with Chromoleon software 6.80.

The protein concentration in samples was determined by spectrophotometry, according to the colorimetric method of Biuret (Gornall *et al.* 1949).

The residual ammonium ion concentration in the supernatant was quantified using an ammonia electrode (Ammonia Gas-Sensing Electrode 95-12, Orion Research, Canada) and a pH/ISE meter (710 A). Total nitrogen (TN) and total organic carbon (TOC) in the samples were measured with a TOC-TN analyzer

(Shimadzu, USA). For Total Organic Carbon (TOC) analysis, carbon dioxide was measured by infrared detector after catalytic thermal oxidation at 680 °C. Total Nitrogen (TN) was determined after catalytic thermal decomposition at 720 °C and oxidation. NO* produced was quantified by chemiluminescence.

VI.2.4 Results

A - Feeding strategy and microbial growth kinetic

Deinococcus geothermalis DSM 11302 fed-batch culture was performed applying a glucose-yeast extract co-substrate nutritional strategy.

Feed cycles, mass of added substrates and growth results are shown on Figure 34. Yeast extract solution was supplied to the medium using an adaptive command to closely base the feeding profile on the substrate uptake rate of the microorganism. A change in the dissolved oxygen dynamic was considered as a nutritional limitation.

The feed cycles were controlled via pO₂ monitoring in order to avoid any limitation and accumulation in the course of the culture. The resulting feed ratio were calculated afterwards using mass balances: during the first 4 hours, yeast extract was supplied with a ratio varying between 3.4 and 3.9 g(YE)/g(X) and after 4 hours of culture, 2.5 g(YE)/g(X) were added.

The glucose flow was set based on the microorganism needs while maintaining a residual glucose concentration higher than 0.4 g.L⁻¹. During five hours, glucose was added by pulses; then glucose uptake rate was calculated and the flow rate was set up to adjust the glucose requirement. Glucose uptake rate increased from 0.7 to 0.9 g_{Glc}.L⁻¹.h⁻¹ which corresponded to a specific uptake rate of 0.10 g_{Glc}.g_X⁻¹.h⁻¹. As shown on Figure 34, no accumulation of this substrate in the culture medium was observed, glucose was consumed throughout the growth. The saline solution supply was correlated with carbon-substrate feeds, the flow being equal to 1/10 of the flows of the substrate feed pumps.

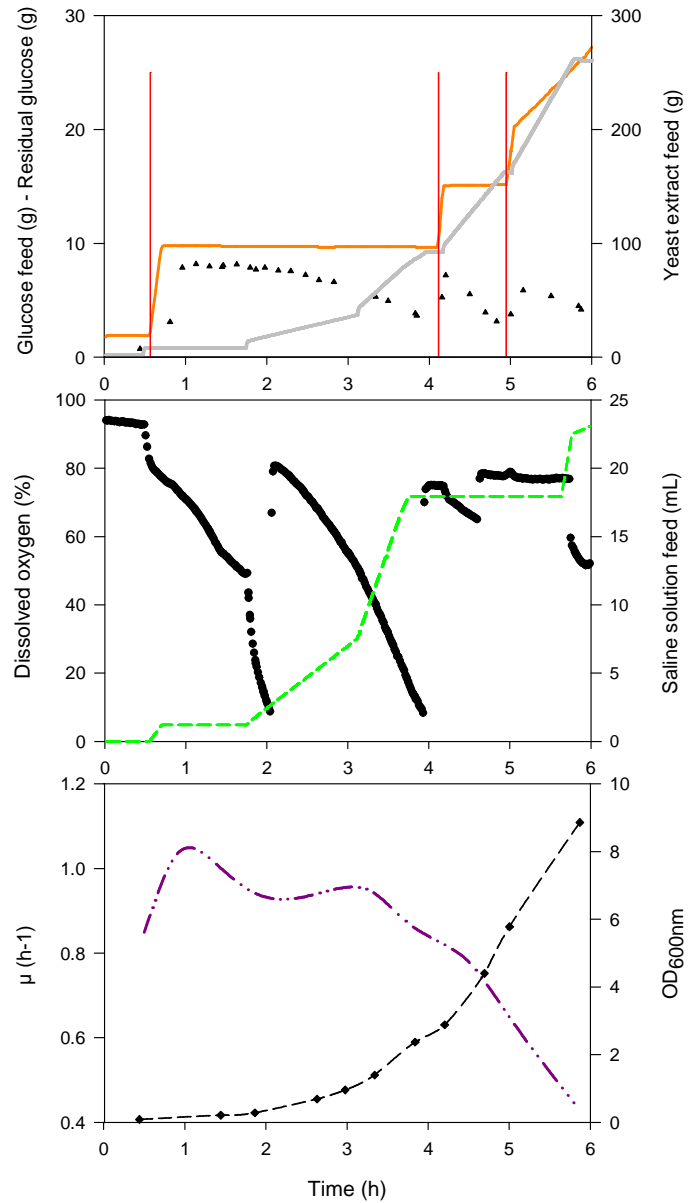


Figure 34 : Yeast extract (—) and glucose supplies (—), residual glucose (▲), dissolved oxygen (●), saline solution feed (—), growth rate (—) and OD_{600nm} (—◆—) evolution during fed-batch culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 (vertical bars represent glucose pulses)

The dynamic metabolic behavior of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 during growth in fed-batch experiments could then be analyzed in details in three phases.

Phase I - from 0 to 1.75 hours: after thirty minutes, the first pulse of yeast extract was made. This pulse induced a fast and immediate decrease of dissolved oxygen during few minutes. The growth rate varied from 0.85 h⁻¹ to 1.05 h⁻¹. Then, oxygen continued to be uptaken but slower and the growth rate decreased. As a pulse of glucose was made without any change of the growth dynamic, the absence of glucose limitation was revealed.

Phase II - from 1.75 hours to 4 hours: yeast extract feed started. That caused a significant decrease of dissolved oxygen. The growth rate on yeast extract reached 0.97 h^{-1} . This result showed that before the addition of yeast extract, glucose was the sole substrate available in the medium and the growth was thus limited by yeast extract. The growth on yeast extract was possible until 4 hours of culture, 3.8 generations were obtained; then, in spite of yeast extract feed and pulses of glucose, the dynamic of growth and oxygen uptake slowed down.

Phase III - from 4 hours to 6 hours: the glucose was still consumed but the growth rate decreased from 0.9 h^{-1} to 0.5 h^{-1} . The growth was linear and the biomass increased of 1.6 generations. Although both substrates were continuously added, dissolved oxygen remained constant from 4.7 hours to 5.7 hours.

The saline solution supply was set at 1/10 of the total substrate flow. However, in order to investigate a potential salt toxicity, the saline solution feed was suspended during the phase III from 3.8 h to 5.6 h of culture (Figure 34). A dissolved oxygen value decrease would have revealed a salt inhibition whereas an increase of dissolved oxygen value would have revealed that saline solution feed is required to ensure a salt non-limiting growth. The dissolved oxygen uptake and growth rate decreased, which could reveal a limitation by the salt solution. However, when the salt feed started again, it was not possible to obtain the dynamic of growth observed during the phases I and II.

Fed-batch balances and yields obtained with the co-substrate nutritional strategy are summarized in Tableau 34.

Tableau 34 : Mass balance, carbon balance and yields for
Deinococcus geothermalis DSM 11302 fed-batch culture

Substrate supplies and biomass concentration	added yeast extract	added glucose	biomass (dry cell weight)
Substrate mass (g)	253	26	99
Substrate carbon (Cmol)	10.6	0.9	3.9
Biomass yield $Y_{S,X}$ ($\text{g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$)	0.39	3.81	-
Biomass yield $Y_{S,X}$ ($\text{Cmol}_X \cdot \text{Cmol}_S^{-1}$)	0.37	4.52	-

The final biomass concentration reached $9.6 \text{ g}_{\text{DCW}} \cdot \text{L}^{-1}$ corresponding to a total biomass of $99 \text{ g}_{\text{DCW}}$. This biomass was obtained by the addition of $253 \text{ g}_{\text{YE}}$ and $26 \text{ g}_{\text{Glc}}$; yield on yeast extract added was $0.39 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{YE}}^{-1}$ and it was $3.81 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{Glc}}^{-1}$ on glucose.

Residual substrate quantities in preculture medium broth have been quantified (residual glucose was analysed and residual yeast extract was estimated with an average yield determined in previous experiments). Carbon and nitrogen sources carried by the preculture were considered in yield and carbon and nitrogen balance calculations. The presence of the organic acids formate, malate, succinate, pyruvate, acetate, lactate, gluconate and citrate in supernatants was analyzed; none of them was detected in samples collected until 3.5 hours of culture. Then, due to the complex nutrient source yeast extract, a lot of peaks

on chromatograms interfered with the analysis method. So, these organic acids were not quantified in samples harvested from 3.5 to 6 hours of culture.

The elemental composition of the biomass of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 grown on yeast extract and glucose was determined: $C_{1.00}H_{1.79}O_{0.51}N_{0.24}$. This corresponds to a molecular weight of 25.28 g.Cmol⁻¹. This result was consistent with biomass composition of others bacteria; elemental composition of *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* and *Paracoccus denitrificans* are respectively $C_{1.00}H_{1.77}O_{0.49}N_{0.24}$, $C_{1.00}H_{1.83}O_{0.55}N_{0.25}$ and $C_{1.00}H_{1.81}O_{0.51}N_{0.20}$ (Roels 1983).

Microscopic observations were made during the fed-batch culture of *D. geothermalis* DSM 11302. This bacterium grew as clusters of at least two cells (diplococci) in rich media under aerobic conditions (Figure 35). *Deinococcaceae* are cells generally in pairs or tetrads (Holt and Bergey 1994) and *D. radiodurans* has been described as a bacterium typically growing as diplococci and tetrads in rich media, due to its cell division (Daly *et al.* 2004; Murray *et al.* 1983).

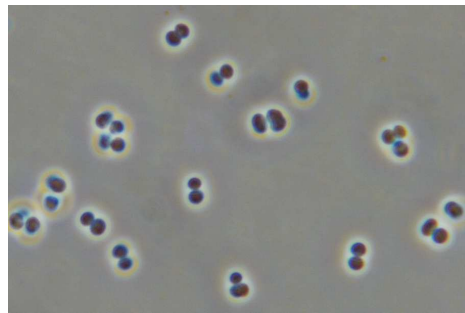


Figure 35 : *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 grown on glucose and yeast extract in fed-batch conditions (microscopic observation x1000)

B - Carbon substrates catabolism

The results in Tableau 35 and on Figure 36 confirmed that glucose was consumed throughout the culture but it was not the preferential carbon source.

Tableau 35 : Carbon substrate specific uptake rates during the three stages of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 culture

Culture stage	I	II	III
Glucose-carbon specific uptake rate (Cmol.Cmol ⁻¹ .h ⁻¹)	0.39	0.15	0.10
Yeast extract-carbon specific uptake rate (Cmol.Cmol ⁻¹ .h ⁻¹)	0 ↗ 0.32	0.68	0.68 ↘ 0.17

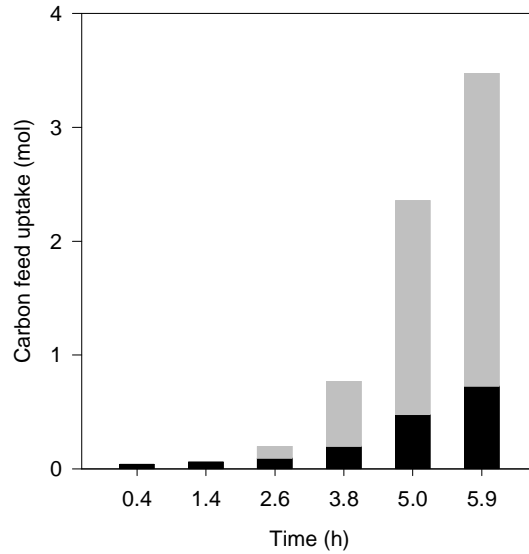


Figure 36 : yeast extract-carbon (grey) and glucose-carbon (black) uptakes during fed-batch culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302.

At the beginning of the culture (phase I), glucose was used as the sole carbon source and carbon of yeast extract was not consumed yet. Then, between 1.4 hours and 2.6 hours of culture the yeast extract-carbon specific uptake rate increased up to an average of $0.68 \text{ Cmol.Cmol}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$ while that of glucose-carbon decreased from 0.39 to $0.15 \text{ Cmol.Cmol}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$. As soon as the exponential yeast extract feed began (phase II), the preferential carbon source was yeast extract even if glucose-carbon uptake rate remained at 0.15 then $0.10 \text{ Cmol.Cmol}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$. At the end of the culture (phase III), in spite of both substrate supplies, yeast extract-carbon specific uptake rate decreased from 0.68 to $0.17 \text{ Cmol.Cmol}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$.

C - Nitrogen sources catabolism

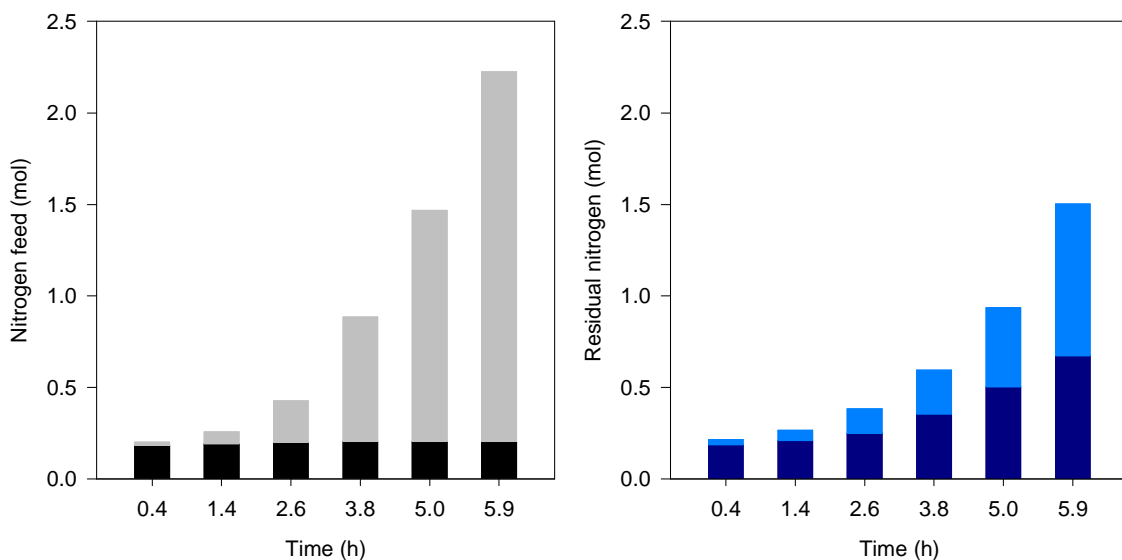


Figure 37 : Nitrogen substrate feed (left), yeast extract (grey) and ammonium (black), and residual nitrogen (right), organic (blue) and mineral (dark blue), during fed-batch culture of *D. geothermalis* DSM 11302

Nitrogen accumulated in the culture medium was organic (proteins/peptides/amino acids) and mineral (ammonium), these two forms being found in similar quantities (Figure 37).

Ammoniacal nitrogen accumulation could be explained by yeast extract amino acids catabolism. Proteins/peptides/amino acids of yeast extract were partially metabolized and used as nitrogen source for biomass production.

D - Acidic and alkaline regulation

The correlation between acidic/alkaline regulation and yeast extract supply is presented on Figure 38.

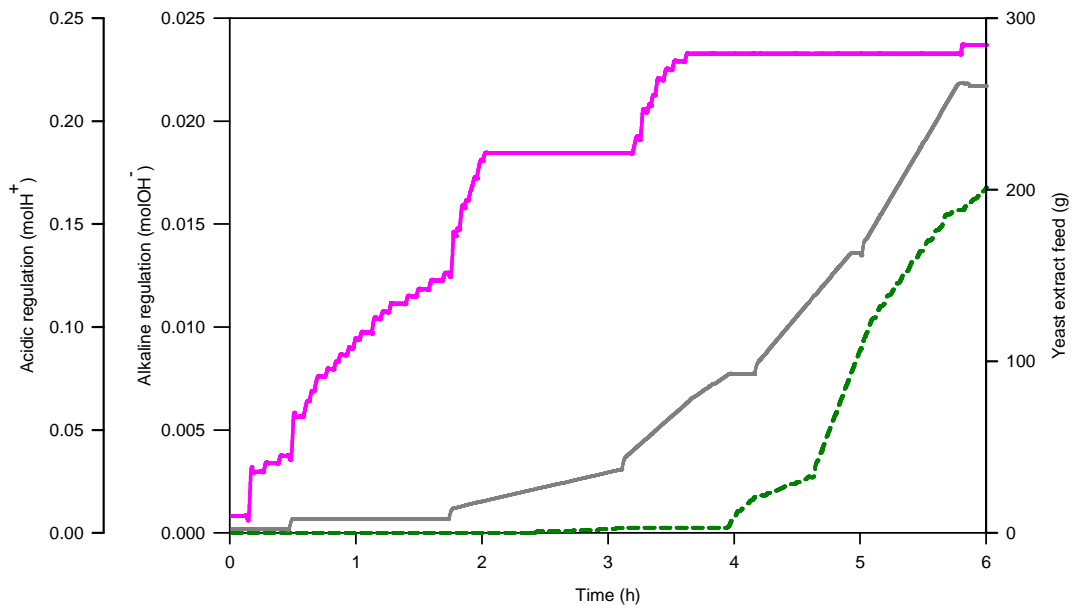


Figure 38 : Acidic (---) and alkaline regulation (—) and yeast extract supply (—) evolution during fed-batch culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302

During 4 hours low quantity of orthophosphoric acid was provided; it represented less than 2.5 mmol H⁺, while 23 mmol OH⁻ was added with ammonia regulation. Then, alkaline regulation stopped and orthophosphoric acid supply started. At the end of the culture, 23 mmol OH⁻ and 166 mmol H⁺ were added by the acidic/alkaline regulation.

E - Gas analyzes

The composition of exhaust gas and air inlet of the reactor was analyzed to quantify oxygen uptake rate (rO₂), carbon dioxide production rate (rCO₂) and respiratory quotient (RQ) during the culture (Figure 39).

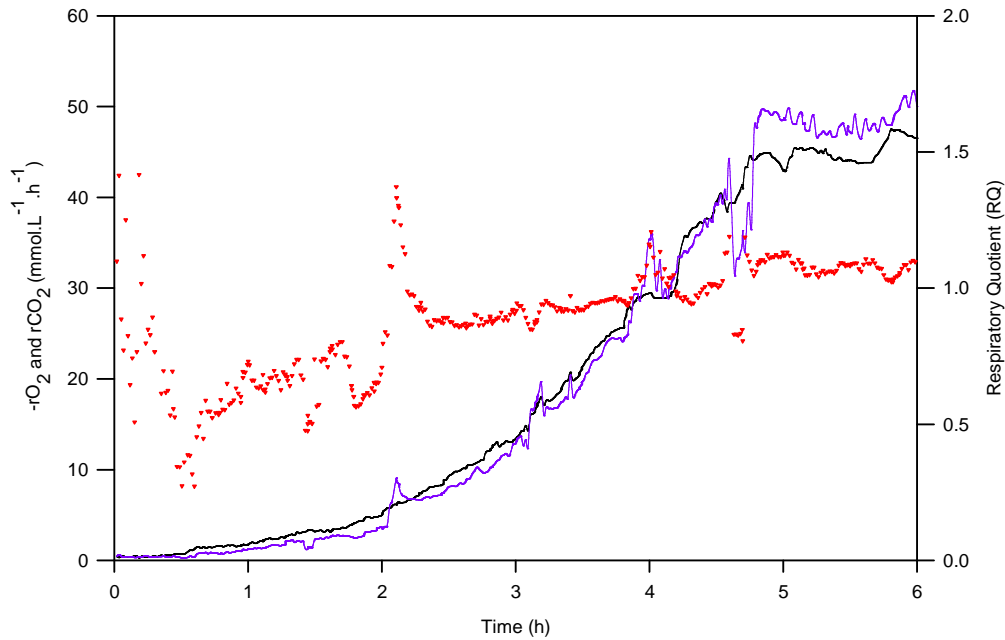


Figure 39 : Oxygen uptake rate (—), carbon dioxide production rate (—) and RQ (▼) evolution during fed-batch culture of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302

rO_2 absolute value and rCO_2 increased from 0.5 to 4.2 hours of culture, carbon dioxide production rate being slightly lower than oxygen uptake rate. After 4.2 hours, growth kinetic decreased and after 4.5 hours the carbon dioxide production rate was higher than the oxygen uptake rate, these two rates remaining constants until the end of the culture.

Moreover, when yeast extract supply started at 1.75 hours, RQ value increased from 0.6 to 0.9 in 2 hours and during the 2 following hours, it increased up to 1.1.

VI.2.5 Discussion

First, to define a synthetic medium optimized for a non-limiting growth of *Deinococcus geothermalis*, previous experiments have been carried out in Erlenmeyer flasks and bioreactors in batch culture mode (unpublished data). The results have revealed that yeast extract and glucose are needed to ensure favourable nutritional conditions and reach *D. geothermalis* maximum growth rate. Fed-batch strategy when both glucose and yeast extract feedings can be perfectly controlled, to prevent initial toxic effect of high glucose and yeast extract concentrations, is the most adapted culture mode for the quantification of physiological behaviour and role of each substrate during the growth.

A fed-batch strategy was then developed to produce *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 cells at a maximal growth rate, without inhibition or limitation of growth. Aerobic experiments were carried out in fed-batch culture mode with a co-substrate feeding approach. This required well-balance substrate feed with online metabolism descriptors monitoring.

The culture began with glucose as the sole carbon source but the growth was limited. Exponential feeding of yeast extract resulted in a change of catabolic behaviour: when yeast extract was supplied to the medium, it was used as a preferred carbon source to produce biomass, even if there was residual glucose in the culture medium.

RQ value, which depends on degree of reduction of substrates, increased from 0.5 to 1.1; values lower than 1 could be explained by a catabolism of compounds more reduced than glucose, probably from yeast extract (e.g. proteins, lipids). This study confirmed that nitrogen source could be mineral or organic (proteins). With the strain *D. geothermalis* DSM 11300, Brim *et al.* reported that ammonia could be the sole nitrogen source in the medium (Brim *et al.* 2003), and published works have already reported that amino acids were the preferential carbon source for the growth of *Deinococcus radiodurans* grown in complex nutritive media (He 2009; Holland *et al.* 2006; Venkateswaran *et al.* 2000).

The accumulation of mineral residual nitrogen in the medium could be explained by the catabolism of organic nitrogen sources like proteins, peptides and amino acids. This catabolism required acidic regulation due to ammonium excretion; only 2.5 mmol H⁺ were added by pH regulation, the medium buffering capacity and the carbon dioxide produced by the metabolism were sufficient to maintain the pH at 6.8. The results revealed that 30 to 34 % of the organic nitrogen sources were used as carbon source but not as nitrogen source. The remaining fraction of organic nitrogenous compounds can be catabolised for both carbon and nitrogen utilization; amino acids could be integrated directly into the metabolic pathways too.

Nevertheless, after 4.5 hours of culture, it was difficult to maintain the growth dynamic in spite of increasing yeast extract and glucose supplies. RQ stabilized at 1.1, the growth kinetic slowed down (phase III) and alkaline regulation stopped while acidic regulation started.

Both substrates were consumed as carbon source. Moreover, as it is shown on Figure 34, the saline solution supply was stopped between 3.8 and 5.7 hours of culture. This strategy was chosen to check both the need of concentrated salts besides those found in yeast extract solution for the growth of *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 and the absence of inhibition due to this saline solution. The growth decrease, in term of oxygen uptake rate and growth rate, started just after the stop time of salt feed. Twenty minutes after the stop time of the concentrated salt feed, the specific substrate uptake rates were divided by 2 for glucose and 5 for yeast extract. So, two hypotheses could explain these observations: it could result from a salts limitation because as soon as the saline solution supply started again, significant oxygen uptake was quantified. It revealed obviously that there was no inhibition due to the concentrated saline solution too. Nevertheless, this growth phase lasted only 30 minutes and oxygen uptake rate reached a plateau after 4.7 hours of culture, corresponding to 5.7 generations. The second hypothesis was an inhibition due to accumulation of yeast extract residual compounds or metabolic products, toxics for the microorganism.

In fed-batch experiments, *Deinococcus geothermalis* was grown to 9.6 g_{DCW}.L⁻¹ and reached 1.05 h⁻¹ with a glucose and yeast extract adaptive feed command. This is the best growth performances reported up to

date with a *Deinococcaceae* strain. In literature, He reported a final concentration of $18 \text{ g}_{\text{WetCellWeight}}\cdot\text{L}^{-1}$ of *Deinococcus radiodurans* (He 2009); the biomass has been harvested with a continuous centrifuge, this result corresponds to cell paste and has not been quantified in dry cell weight. It has been obtained in 21 hours, with a maximal growth rate corresponding to 0.3 h^{-1} , using a semi-defined medium; this medium provided $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of tryptone $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of YE and $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of glucose as potential carbon sources. Using the co-substrate feed strategy, the results showed that although glucose was consumed, it was not a preferential substrate for growth; carbon and nitrogen brought by yeast extract were partially uptaken to produce biomass. By adding in the culture medium 253 g of yeast extract and 26 g of glucose, $99 \text{ g}_{\text{DCW}}$ of biomass were obtained in this work. Yeast extract limiting factor being not identified yet, whole yeast extract was supplied as substrate. Accumulation of yeast extract components in the culture broth could be toxic toward cells and enables reaching higher biomass concentration. Biomass production yields on added yeast extract and glucose were respectively $0.4 \text{ g}_X\cdot\text{g}_{\text{YE}}^{-1}$ and $3.8 \text{ g}_X\cdot\text{g}_{\text{GlC}}^{-1}$, which represents on the whole added carbon substrates $0.4 \text{ Cmol}_X^{-1}\cdot\text{Cmol}_S^{-1}$.

This work reports the first quantitative description of the dynamic behaviour of a *Deinococcus* strain in well-controlled environmental conditions. Kinetic parameters (growth rate, substrate uptake rates, respiration rate, respiratory quotient) and conversion yields implement the knowledge on quantitative physiology of *Deinococcus geothermalis*. Such data are of interest to compare growth conditions and growth performances of several *Deinococcus geothermalis* strains grown in rich medium. This can help in defining further culture strategies.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was financially supported by the program DEINOL ISI of OSEO, the French agency for innovation.

SYNTHESE DES RESULTATS

- ⇒ La croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 en culture discontinue alimentée, sur un milieu salin complétement en extrait de levure avec apport d'un substrat carboné le glucose, a été étudiée.
- ⇒ La stratégie nutritionnelle consiste à ajuster tout au long de la culture les flux d'alimentations en extrait de levure et en glucose dans le but d'atteindre rapidement le taux maximal de croissance de la souche et de le maintenir.
- ⇒ Le glucose est consommé au cours de la culture, sans accumulation dans le milieu, avec une vitesse spécifique de consommation égale à $0,10 \text{ g}_{\text{Glc}} \cdot \text{g}_X \cdot \text{h}^{-1}$.
- ⇒ Le glucose n'est pas la source de carbone consommée préférentiellement. La vitesse spécifique de consommation du carbone du glucose varie entre $0,10$ et $0,39 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}_X \cdot \text{h}^{-1}$ tandis qu'elle atteint $0,68 \text{ Cmol} \cdot \text{Cmol}_X \cdot \text{h}^{-1}$ pour le carbone de l'extrait de levure.
- ⇒ Les sources azotées complexes de l'extrait de levure, acides aminés, peptides et protéines, sont partiellement utilisées comme sources azotées pour la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302. Une libération d'ammoniaque est mise en évidence au cours de la croissance.
- ⇒ Néanmoins, une diminution du taux de croissance du microorganisme a été observée malgré l'apport double substrat : les hypothèses avancées sont une limitation par les sels, la disponibilité des substrats ou encore l'accumulation d'un composé toxique de l'extrait de levure.
- ⇒ Avec la stratégie d'alimentation co-substrats, 253 g d'extrait de levure et 26 g de glucose ont été ajoutés pour produire 99 g_{MS} de biomasse soit $9,6 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$. Le taux de croissance exponentiel a atteint $1,05 \text{ h}^{-1}$.

Discussion générale, conclusions et perspectives

Discussion générale, conclusions et perspectives

Peu de travaux sont disponibles dans la littérature sur le genre *Deinococcus* et seules 1533 publications sont répertoriées depuis 1981. La majorité de ces travaux publiés est consacrée à l'étude des capacités de résistance aux conditions extrêmes (radiations ionisantes, UV, oxydation, température, pH, etc.) des déinocoques, à leurs mécanismes de réparation de l'ADN et à leur utilisation dans des procédés de bioremédiation. En effet, sur ces 1533 publications disponibles, la moitié concerne les mécanismes de résistance aux radiations.

Il ressort également que le biotope des déinocoques est difficile à définir ; des souches de bactéries appartenant au genre *Deinococcus* ont été retrouvées dans divers échantillons prélevés dans des endroits dont les caractéristiques géographiques et climatiques diffèrent totalement. Des déinocoques ont été isolées à partir d'échantillons de sol, de viandes, dans des sources géothermales, sur des instruments chirurgicaux irradiés, dans des biofilms formés dans l'industrie du papier etc (Anderson *et al.* 1956; Kristensen and Christensen 2009; Lewis 1971; Oyaizu *et al.* 1987; Rainey *et al.* 2007; Väisänen *et al.* 1998). Leur croissance a donc été mise en évidence dans des matières organiques riches, mais ils semblent tolérer des conditions environnementales et nutritionnelles bien plus hostiles.

Malgré l'intérêt croissant pour l'exploitation des propriétés exceptionnelles des déinocoques, peu de chercheurs se sont intéressés au comportement physiologique de ces souches, à leurs exigences nutritionnelles ainsi qu'à leur production. Les quelques études sur le métabolisme des déinocoques concernent principalement la souche mésophile *Deinococcus radiodurans* mais les résultats sont souvent controversés (He 2009; Holland *et al.* 2006; Shapiro *et al.* 1977; Venkateswaran *et al.* 2000) ; la définition de la composition d'un milieu défini non limitant pour la croissance des déinocoques constitue une étude préliminaire indispensable qui reste non aboutie malgré les résultats publiés à ce jour. Il faut ajouter également que les performances des procédés de production de biomasse de *Deinococcus* à partir des milieux de la littérature sont difficilement accessibles et les courbes de croissance sont rarement présentées.

Dans ce contexte scientifique, la première étape de ce projet de recherche a consisté à choisir parmi les bactéries du genre *Deinococcus* une souche modèle pour l'étude ; dans un objectif d'utilisation de ce déinocoque dans un procédé de production de bioéthanol de seconde génération, la souche sélectionnée doit posséder la capacité à dégrader des sources carbonées complexes et tolérer des températures élevées. Les deux espèces du genre *Deinococcus* les plus étudiées sont *Deinococcus radiodurans* et *Deinococcus geothermalis*. Le choix s'est donc porté sur *Deinococcus geothermalis*, de part sa température optimale de croissance

comprise entre 45 °C et 50 °C et la disponibilité de quelques données dans la littérature sur son métabolisme et ses conditions de culture (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997; Kongpol *et al.* 2008). Les données de la littérature font apparaître que *Deinococcus geothermalis* possède un métabolisme préférentiellement protéolytique : les meilleurs résultats de croissance ont été obtenus en présence de sources complexes riches en protéines telles que l'extrait de levure, la tryptone et la peptone (Brim *et al.* 2003; Ferreira *et al.* 1997; Kongpol *et al.* 2008)

Ce travail avait donc pour objectif principal l'étude des besoins nutritionnels de la souche *Deinococcus geothermalis* dans un but d'exploration de son métabolisme, en intégrant l'influence des étapes en amont de la culture (conservation de la souche et remise en culture) et l'étude de la variabilité intra-espèce.

Sur la base des travaux antérieurs, il a été possible de formuler les questions scientifiques suivantes :

- ⇒ Quels sont les besoins nutritionnels spécifiques de la souche *Deinococcus geothermalis* ? Est-il possible de substituer les sources complexes présentes dans les milieux de culture mentionnés dans la littérature par un ou plusieurs composé(s) défini(s) pour obtenir une croissance non limitée ?
- ⇒ Quel est l'influence du mode de conservation de la souche et de sa remise en culture sur les performances de croissance lors de cultures en milieu riche et en milieu défini ?
- ⇒ Existe-t-il une variabilité des performances de production et/ou de métabolisme intra-espèce ?
- ⇒ Quel mode de culture ou quelle stratégie de conduite peut-on déduire pour augmenter la production de biomasse de *Deinococcus geothermalis* et étudier les réponses du microorganisme à des perturbations de son environnement nutritionnel ?

Dans un premier temps, les compositions des milieux décrits pour la croissance des déinocoques et des microcoques ont été extraites des travaux disponibles dans la littérature. Ces compositions ont été analysées par une Analyse en Composantes Principales (ACP). Ce traitement statistique avait pour but de décrire la variabilité de formulation des différents milieux mis au point à ce jour et mettre en évidence les éléments nutritifs communs retrouvés dans ces milieux. Les résultats de ces analyses ont montré une grande disparité entre ces onze milieux, tant au niveau de leur composition qualitative que des concentrations des composés. De plus, les résultats sont parfois contradictoires entre les différentes études. La stratégie choisie pour la suite de ces travaux a été de cultiver le microorganisme en fioles Erlenmeyer en testant individuellement différents milieux, éléments nutritifs et sources carbonées. L'effet de la majorité des éléments constitutifs de milieux de culture sur la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 a été exploré. Les résultats de croissance obtenus ont permis d'implémenter l'Analyse en Composantes Principales. Quarante huit formulations ont ainsi été analysées.

L'exploitation des résultats, statistiques et expérimentaux, a permis de sélectionner le milieu défini d'étude DM, sur la base d'un milieu décrit dans la littérature par Holland et ses co-auteurs (Holland *et al.* 2006). Un taux de croissance égal à 0,03 h⁻¹ et une DO_{600nm} finale de 0,55 en 72 heures ont été obtenus en fiole Erlenmeyer à 37 °C sur le milieu DM. Ces performances modestes augmentent en présence d'extrait de

levure (milieu complexe glucose CMG), le taux de croissance atteint $0,37 \text{ h}^{-1}$ et la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ finale 2,70 en 22 heures. Le taux de croissance est encore amélioré par l'augmentation de la température à $45 \text{ }^\circ\text{C}$, température optimale de croissance de la souche : il augmente à $0,64 \text{ h}^{-1}$. Ces résultats révèlent que les performances de croissance et de production de biomasse sont réduites sur le milieu DM.

A l'issue de l'ACP, le nombre restreint d'informations disponibles sur les exigences nutritionnelles de *D. geothermalis* rend inadéquate une approche de type plan d'expérience pour la définition de la composition d'un milieu de culture synthétique adaptée à la croissance de cette espèce bactérienne. La recherche de facteurs améliorant la croissance de la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 a été menée en réalisant les expérimentations en bioréacteur d'après une méthode adaptée de la respirométrie ; ce choix d'outil de culture vise une amélioration de la quantification dynamique du comportement microbien. La vitesse de consommation de l'oxygène (OUR ou r_{O_2}), utilisée comme un indicateur de suivi en ligne de l'activité métabolique de cellules en culture (Garcia-Ochoa *et al.* 2010; Oliveira *et al.* 2011; Paca *et al.* 2010), a été déterminée en réponse à des pulses de nutriments au cours de la culture. *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 a donc été cultivé en mode discontinu à $45 \text{ }^\circ\text{C}$ et pH 6,8 sur le milieu DM en présence de 10 g.L^{-1} de glucose. Les résultats ont mis en évidence que l'apport de la fraction de l'extrait de levure contenant les composés de poids moléculaire inférieur à 3 kDa améliore la croissance de *D. geothermalis* : le taux de croissance atteint $0,14 \text{ h}^{-1}$. L'extrait de levure complet est toutefois indispensable pour obtenir une croissance non limitée de la souche avec un taux de croissance de $0,63 \text{ h}^{-1}$ à $45 \text{ }^\circ\text{C}$ en bioréacteur. La fraction minérale de l'extrait de levure n'est pas responsable de cet effet positif. Ces données se sont révélées en accord avec les résultats publiés par Kongpol et ses co-auteurs en 2008 (Kongpol *et al.* 2008), résultats selon lesquels la croissance de *D. geothermalis* T27 serait possible mais faible en absence d'extrait de levure ; à contrario, la publication sur l'isolement de la souche *D. geothermalis* DSM 11300 a rapporté que l'extrait de levure n'est pas nécessaire à la croissance de *Deinococcus geothermalis* (Ferreira *et al.* 1997).

Les résultats préliminaires ont montré que la croissance de la souche est améliorée par la présence d'extrait de levure dans le milieu et l'augmentation de la température à $45 \text{ }^\circ\text{C}$; le potentiel maximal de production de biomasse sur le milieu complexe CMG à $45 \text{ }^\circ\text{C}$ a alors été quantifié en bioréacteur en mode discontinu. Dans ces conditions, il est possible d'obtenir une croissance exponentielle avec un taux de croissance égal à $0,76 \text{ h}^{-1}$ pour atteindre une concentration finale de $2,7 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ en 6 heures. Dans la littérature, Kongpol et ses collaborateurs ont obtenu un taux de croissance égal à $0,12 \text{ h}^{-1}$ à $45 \text{ }^\circ\text{C}$, avec la souche *D. geothermalis* T27, sur le milieu complexe Half-strength Luria-Bertani (Kongpol *et al.* 2008).

Afin d'étudier la variabilité intra-espèce, une partie du travail s'est focalisée sur la comparaison de la croissance de trois souches de déinocoques thermophiles, *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, *Deinococcus geothermalis* DSM 11301 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, sur des milieux définis et complexes. Ce sont les trois souches de collection de l'espèce *Deinococcus geothermalis*. Elles ont été isolées dans des sources géothermales, à Agnano en Italie pour les souches DSM 11300 et DSM 11301 et à São Pedro do Sul au Portugal pour la souche DSM 11302. Les résultats ont révélé une variabilité intra-espèce évidente. Les milieux définis testés ont induit un stress sur la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11301 qui a floculé.

Concernant les deux autres souches, le milieu défini DM avec glucose a permis la production de davantage de biomasse de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 (3,2 générations) que de biomasse de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 (1,6 générations). Les différences de comportement mises en évidence entre ces souches peuvent s'expliquer par la variabilité des lieux d'isolement. De plus, Ferreira et ses co-auteurs avaient déjà rapporté des différences d'assimilation de substrats carbonés (Ferreira *et al.* 1997).

Les deux souches *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 et DSM 11302 ont été séquencées afin d'essayer d'expliquer leurs différences de comportement au cours des cultures. Le séquençage a montré que les mégaplasmites de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 comportent des séquences différentes de celles retrouvées chez *Deinococcus geothermalis* DSM 11300. Or, des chercheurs ont mis en évidence en 2007 que l'information génétique portée par le mégaplasmitide DG574 de l'espèce *D. geothermalis* code pour des protéines impliquées dans les voies du métabolisme carboné (Makarova *et al.* 2007). Les gènes présents sur ces mégaplasmitides peuvent donc avoir une influence significative sur le métabolisme et la croissance de ces microorganismes. La différence de comportement physiologique entre ces deux souches pourrait en effet s'expliquer par la variabilité intra-espèce de l'information génétique portée par les mégaplasmitides.

Que ce soit en milieu complexe ou en milieu défini, la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 présente les meilleures performances de production de biomasse. Cette souche a donc été retenue pour la suite des travaux de recherche sur la quantification du comportement physiologique.

Afin de standardiser le mode opératoire et s'affranchir de l'acquis des cellules au cours des étapes de précultures, l'influence de la préparation de l'inoculum sur les performances de production de *D. geothermalis* DSM 11302 a été étudiée. En effet, pour la quantification du comportement physiologique d'un microorganisme, toutes les étapes depuis la remise en culture sur milieu gélosé en boîte de Pétri jusqu'aux différents levains en milieu liquide doivent être parfaitement maîtrisées et reproductibles (Hunt and Stieber 1986; Parton and Willis 1990).

Les résultats ont montré que la méthode de conservation de la souche, la durée du stockage, la méthode de remise en culture, la variabilité entre les colonies isolées sur milieu riche gélosé, le taux d'inoculation ainsi que le nombre de lavages du culot cellulaire avant l'étape d'inoculation n'influent pas sur les performances de production de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302, que ce soit en termes de nombre de générations ou de taux de croissance, en milieu défini ou complexe. Les résultats ont simplement mis en évidence qu'avec un levain âgé de plus de 12 heures, le taux de croissance diminue de 0,14 h⁻¹ à 0,08 h⁻¹ et que des étapes successives de précultures diminuent le taux de croissance de la souche : 0,13 h⁻¹ avec une préculture contre seulement 0,06 h⁻¹ avec trois étapes de préculture. Le potentiel de croissance de la souche semble donc diminuer avec le nombre de repiquages.

Cette étude a également révélé que la production de biomasse, estimée par la DO_{600nm}, est corrélée à la concentration en extrait de levure du milieu de culture : l'extrait de levure apporte des éléments constitutifs de la biomasse pour sa croissance. Les résultats ont confirmé les observations faites avec la souche *D. geothermalis* DSM 11300 : en fioles Erlenmeyer, l'ajout d'extrait de levure au milieu défini à 45 °C

permet l'augmentation du taux de croissance de $0,13 \text{ h}^{-1}$ à $0,75 \text{ h}^{-1}$. Il a été calculé d'après les résultats de Ferreira et de ses co-auteurs un taux de croissance de $0,75 \text{ h}^{-1}$ à 45 °C en milieu complexe en fioles Erlenmeyer (Ferreira *et al.* 1997), ce qui est en accord avec nos données. De plus, *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 est aérobic stricte ce qui cohérent avec le milieu naturel duquel elle a été isolée, des sources géothermales au Portugal (Ferreira *et al.* 1997). L'action positive de l'extrait de levure peut avoir différentes explications : l'extrait de levure peut apporter au milieu de culture un élément constitutif de la biomasse, ce qui expliquerait la corrélation entre la production de biomasse et la concentration en extrait de levure dans le milieu de culture ; l'extrait de levure peut aussi être la source d'un ou plusieurs éléments limitants tels que des vitamines, des acides aminés ou des cofacteurs enzymatiques. Enfin, dans une moindre mesure, l'hypothèse selon laquelle l'extrait de levure piègerait un composé du milieu de culture ayant une action inhibitrice sur la culture du microorganisme ne peut être exclue.

Afin de progresser dans la connaissance du métabolisme en conditions contrôlées, une culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 en bioréacteur en mode discontinu sur le milieu défini avec 10 g.L^{-1} de glucose a été réalisée à 45 °C et pH 6,8 : une croissance exponentielle de 4 heures à un taux de croissance maximal de $0,28 \text{ h}^{-1}$ a été obtenue. La maîtrise des paramètres environnementaux pour la culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 a permis de doubler le taux de croissance par rapport aux performances obtenues en fioles Erlenmeyer. Durant la phase exponentielle de croissance, la vitesse de consommation de l'oxygène a atteint $3,3 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et le QR une valeur moyenne de 1,17. De plus, l'absence de production d'acides organiques en aérobiose et en présence d'un excès de glucose laisse penser qu'il n'y a pas de bascule métabolique chez *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 dans ces conditions ; ce résultat devra toutefois être confirmé compte tenu de la faible quantité de biomasse obtenue et du seuil de détection des appareils analytiques. Le bilan de la croissance est la production de $1,38 \text{ gms}$ de biomasse en 20 heures à partir de $5,55 \text{ g}$ de glucose consommés, ce qui représente un rendement égal à $0,25 \text{ gX.g}_{\text{Glc}}^{-1}$ ($0,30 \text{ CmolX.Cmol}_{\text{Glc}}^{-1}$). Les valeurs moyennes du taux de croissance et de la vitesse spécifique de consommation du glucose ont atteint respectivement $0,13 \text{ h}^{-1}$ et $0,57 \text{ Cmol}_{\text{Glc}}.\text{CmolX}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Ces résultats ont donc permis d'avoir accès aux paramètres cinétiques essentiels à la caractérisation du comportement d'un microorganisme en culture, données inexistantes à ce jour dans la littérature pour une souche de déinocoques.

Après 5 heures de culture, la dynamique de croissance ne s'est pas maintenue en présence de glucose résiduel. De façon similaire aux observations réalisées avec la souche *Deinococcus geothermalis* DSM 11300, les pulses de solutions nutritives ont révélé que la dynamique de croissance observée pendant les cinq premières heures de culture de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 ne peut être rétablie.

En complément, les éléments constitutifs ou catalytiques tels que des sources carbonées, sources soufrées, vitamines ou extraits cellulaires se sont révélés insuffisants pour l'amélioration des performances de croissance de la souche cultivée en fiole Erlenmeyer sur le milieu DM à 45 °C et pH 6,8. Enfin, il a également été montré que la présence d'un support solide ne constitue pas un microenvironnement favorable à la croissance de *Deinococcus geothermalis* DSM 11302.

Afin de quantifier et distinguer le rôle du glucose et de l'extrait de levure sur le comportement de la souche, une stratégie de culture en mode discontinu alimenté à partir d'un milieu salin a ensuite été développée. A 45 °C et pH 6,8, l'apport contrôlé des co-substrats extrait de levure et glucose visait à identifier le devenir du carbone et de l'azote apportés au milieu de culture. Lors de la phase de croissance en présence d'extrait de levure et de glucose, la valeur du coefficient respiratoire a augmenté de 0,5 à 1. Une valeur inférieure à 1 peut être expliquée par le catabolisme de composés de l'extrait de levure plus réduits que le glucose (protéines, lipides, etc.). La libération d'ammoniaque dans le milieu de culture a confirmé le caractère préférentiellement protéolytique des déinocoques (He 2009; Holland *et al.* 2006; Venkateswaran *et al.* 2000). Le taux de croissance a atteint 1,05 h⁻¹. Avec la stratégie d'alimentation co-substrats, 253 g d'extrait de levure et 26 g de glucose ont été ajoutés pour produire 99 g_{MS} de biomasse en 6 heures ce qui représente 9,6 g_{MS}.L⁻¹. Les résultats les plus proches à ce jour sont ceux décrits dans la littérature par He (He, 2009). Ils concernent la croissance en bioréacteur à 37 °C et pH 7 de la souche mésophile *Deinococcus radiodurans*, cultivée sur un milieu riche avec 10 g.L⁻¹ de tryptone, 5 g.L⁻¹ d'extrait de levure et 10 g.L⁻¹ de glucose comme sources carbonées potentielles. Ces travaux rapportent la production de 18 g.L⁻¹ de biomasse humide en 21 heures et le taux de croissance estimé ne dépasse pas 0,3 h⁻¹.

La stratégie de génie nutritionnel mise en œuvre pour définir la composition d'un milieu minéral nutritif maîtrisé et parfaitement reproductible pour l'étude de la physiologie de *Deinococcus geothermalis* a révélé que, quelque soit la souche étudiée, l'extrait de levure est indispensable à la croissance non limitée de cette espèce bactérienne.

En complément, il apparaît que l'apport continu d'extrait de levure ne permet pas de maintenir la dynamique de croissance de *Deinococcus geothermalis* au cours de la culture ; ce comportement peut résulter d'un phénomène de limitation (sels de la solution saline), de la non disponibilité des substrats apportés par l'extrait de levure (assimilation des sels, nature des substrats) ou d'une inhibition par un excès d'extrait de levure dans le milieu de culture.

Ce travail a permis d'acquérir des connaissances essentielles sur les exigences nutritionnelles des souches *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 et *Deinococcus geothermalis* DSM 11302 et de quantifier leurs comportements physiologiques lors de croissances en bioréacteur sur milieu défini ou complexe. Les observations faites au cours de ce projet de recherche ont permis d'ouvrir des perspectives intéressantes.

Dans la continuité de ce travail, des analyses de métabolome soluble et structural réalisées lors de cultures en bioréacteur sur milieu défini pourraient mettre en évidence la présence et la nature de modifications du métabolisme lors de la croissance. Le suivi de l'évolution de la composition minérale des milieux aux cours des cultures permettrait d'accéder aux besoins nutritionnels spécifiques de *Deinococcus geothermalis* et ainsi définir les rendements de production de biomasse à partir des éléments constitutifs de milieux de culture. Pour cela, il est nécessaire de s'affranchir de l'extrait de levure difficilement compatible avec cette stratégie. Ces analyses nécessitent toutefois de maîtriser la croissance sur un milieu défini pour assurer la production de suffisamment de biomasse pour dépasser la limite de détection des phénomènes ; les concentrations en

métabolites et les variations des concentrations en éléments minéraux devront également être quantifiables par les techniques analytiques disponibles.

Par ailleurs, la croissance de *D. geothermalis* pourrait être contrôlée lors de cultures sur milieu défini en mode discontinu alimenté, en maintenant le taux de croissance à 0,1 h⁻¹ avec l'apport en substrat glucose. Ce mode de conduite devrait permettre d'avoir une fenêtre d'observation plus longue pour étudier le comportement de la souche en réponse à l'ajout de solutions nutritives et co-substrats. La possibilité de passer en culture continue avec le substrat extrait de levure pourrait également être envisagée. Ce mode de culture permettrait de s'affranchir de l'accumulation de l'extrait de levure lors des cultures discontinues alimentées et assurer un renouvellement des cellules ; comme cela a été montré, l'accumulation d'extrait de levure peut conduire à la fois à une inhibition de la croissance de la souche et à une augmentation de la concentration en substances organiques dans les échantillons qui interfèrent avec les méthodes analytiques employées. La difficulté de la mise en œuvre de ce mode de culture réside dans la stabilité de la souche en fonction du nombre de repiquage. Les résultats ont mis en évidence une diminution du taux de croissance avec l'augmentation du nombre de précultures ; une culture en mode continu ne peut être envisagée que si le potentiel de croissance se maintient suffisamment pour assurer la stabilité du chimostat en fonction du nombre de générations.

La diversité des composés contenus dans l'extrait de levure rendent complexes la caractérisation et l'identification de molécules ayant un impact positif sur les performances de la culture. Néanmoins, une étude plus poussée du fractionnement de l'extrait de levure par des procédés de filtration membranaire, de précipitation ou de chromatographie, permettrait d'affiner la recherche de la nature du ou des composé(s) présent(s) dans l'extrait de levure indispensable(s) à la croissance des souches de *D. geothermalis*.

Les déinocoques sont très résistants à des conditions environnementales défavorables et peuvent survivre à de nombreux stress ; il est donc difficile de savoir si les trois sous-espèces de *Deinococcus geothermalis* ont été isolées à partir d'échantillons de sources géothermales parce qu'elles sont capables de s'y développer ou uniquement si elles y sont retrouvées dans un état de dormance. L'analyse des paramètres physico-chimiques des échantillons d'isolement ainsi que l'étude des microorganismes ou consortia microbiens présents dans les sources thermales pourraient enrichir les connaissances sur l'environnement physico-chimique et nutritionnel adapté à ces souches de déinocoques. Il faudrait pour cela avoir accès aux échantillons prélevés pour l'isolement des souches d'intérêt ou faire de nouveaux prélèvements. Cette piste n'a pas été suivie par priorité ; la réalisation d'échantillonnage requiert des autorisations administratives et des procédures standardisées pour la conservation et l'analyse des échantillons. L'étude des consortia microbiens exige également des méthodologies adaptées à la co-culture. Ces axes de recherche n'ont donc pas été intégrés à la démarche choisie pour ce projet de recherche mais peuvent faire l'objet de recherche ultérieure.

Enfin, les données de séquençage disponibles pourront être filtrées pour mettre en évidence toutes les variations entre le génome de référence de *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 et le génome de la souche

Deinococcus geothermalis DSM 11302. Le temps nécessaire au traitement de ces données est difficile à estimer, c'est pourquoi cette analyse n'a pas été poursuivie par priorité dans le cadre de ces travaux de recherche. L'analyse des variations permettrait ainsi de rechercher les mutations qui impactent les séquences codantes dont la synthèse des protéines. Les séquences non alignées sur le génome de référence, après assemblage, formation de contigs et traduction en protéines, permettraient également d'affiner la recherche sur la présence éventuelle d'autres protéines fonctionnelles chez *Deinococcus geothermalis* DSM 11302.

Annexes

Annexe 1

Fiche technique de l'extrait autolytique de levure Biokar Diagnostics

EXTRAIT AUTOLYTIQUE DE LEVURE

FACTEUR D'ENRICHISSEMENT POUR MILIEU DE CULTURE

A1202HA

A1202GC

1 DOMAINE D'UTILISATION

L'extrait autolytique de levure est considéré comme le principal facteur d'enrichissement des milieux de culture. Il permet d'accélérer la croissance d'une grande variété de microorganismes, y compris les levures et les moisissures. En raison de sa teneur en glucides, il ne doit pas être utilisé dans les milieux destinés à l'étude des fermentations sucrées.

2 DESCRIPTION

La digestion enzymatique ménagée des constituants cellulaires de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) par ses propres enzymes (autolyse) conduit à un extrait riche en acides aminés et en oligopeptides, en vitamines (notamment du groupe B), en facteurs de croissance, en glucides, en bases puriques et pyrimidiques provenant des acides nucléiques.

3 ANALYSE-TYPE

Caractères physiques

- Aspect, couleur poudre.....	jaune
- Solubilité dans l'eau à 5%.....	totale
- pH de la solution aqueuse à 5%	7,0 ± 0,5
- Stabilité à pH 7,0 après autoclavage pendant 15 min à 121°C	stable

Caractères chimiques

- Azote total.....	10,6 ± 1%
- Azote α aminé	5,0 ± 0,5%
- Indole.....	absence
- Nitrites	absence
- Chlorures (exprimés en NaCl).....	inférieurs à 1,0%
- Calcium.....	0,1%
- Cendres sulfuriques.....	inférieures à 15,0%
- Perte à la dessiccation	inférieure à 6,0%

Acides aminés totaux (en g pour 100 g de produit)

- Acide aspartique.....	6,5
- Thréonine	2,6
- Sérine	2,4
- Acide glutamique	11,5
- Proline.....	2,3
- Glycine.....	3,0
- Alanine.....	4,8
- Valine.....	4,1
- Cystine.....	non dosée
- Méthionine	0,9
- Isoleucine	3,1
- Leucine	4,2
- Tyrosine	1,1
- Phénylalanine	2,6
- Lysine	4,6
- Histidine	1,4
- Arginine.....	3,2
- Tryptophane.....	0,9

Vitamines (en mg pour 100 g de produit)

- Thiamine.....	2,1
- Riboflavine.....	12,5
- Pyridoxine.....	2,4
- Acide nicotinique.....	60,0
- Acide pantothénique.....	10,5
- Acide folique.....	0,6
- Choline.....	150,0
- Biotine.....	0,4

4 **CONTROLE MICROBIOLOGIQUE**

Microorganismes	Croissance
Flore aérobie mésophile totale	moins de 5000 ufc/g
Spores thermorésistantes dans 1 g	absente

5 **PRESENTATION**

Flacon de 500 g	A1202HA
Seau de 5 kg	A1202GC

6 **AUTRES INFORMATIONS**

Les mentions portées sur l'étiquette sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : A1202/F/2003-01 : 5.

Date de création : 01-2003

Date de révision : 06-2012

Motif de la révision : Remaniement général ; § 3 : caractères chimiques



Annexe 2

Compositions de sources complexes (Difco)

Reference Guide

PEPTONES & HYDROLYSATES SELECTION GUIDE

TYPICAL ANALYSIS

PRODUCT	PHYSICAL CHARACTERISTICS					BIOLOGICAL TESTING - CFU/g					NITROGEN CONTENT		
	Ash (%)	Clarity (% Soln/NTU)	Filtrability (g/cm ³)	Loss on Drying (%)	pH, % Sol'n	Coliform	Salmonella	Spore Count	Standard Plate Count	Thermophile Count	Total Nitrogen (%)	Amino Nitrogen (%)	AN/N (%)
Beef Extract	24.1	116.8	0.1	77.2*	5.4	neg	neg	299	117	33	11.2	3.8	33.8
Beef Extract, Dessicated	10.2	1.7	0.6	2.5	6.9	neg	neg	585	690	28	14.0	2.2	15.7
Casamino Acids	24.4	0.5	2.9	4.5	6.4	neg	neg	390	950	25	10.5	8.8	83.8
Casamino Acids, Technical	38.3	0.3	2.6	4.5	6.7	neg	neg	2375	2250	<50	8.1	6.4	79.0
Casein Digest	6.4	0.4	2.6	4.7	7.2	neg	neg	235	250	178	13.4	7.2	53.9
Casitone	7.0	0.6	1.7	3.7	7.2	neg	neg	300	1850	100	13.3	4.7	35.3
Neopeptone	7.0	1.2	0.3	3.2	7.4	neg	neg	175	400	75	13.7	3.3	23.8
Bacto Peptone	4.4	0.5	0.5	3.0	7.0	neg	neg	90	273	13	15.5	3.1	20.0
Proteose Peptone	11.1	1.4	0.9	3.1	7.2	neg	neg	393	443	73	14.0	2.9	20.7
Proteose Peptone No. 2	12.7	1.5	0.6	3.5	7.2	neg	neg	75	1450	<50	12.6	5.0	39.7
Proteose Peptone No. 3	11.4	2.2	0.5	4.0	7.2	neg	neg	890	915	25	13.2	3.5	26.5
Soytone	12.0	1.0	1.2	4.6	7.2	neg	neg	10	38	<3	9.4	3.1	33.0
TC Lactalbumin Hydrolysate	7.2	0.4	7.3	4.6	7.1	neg	neg	<50	300	<50	13.0	6.3	48.3
TC Yeastolate	13.0	1.4	4.5	3.6	6.9	neg	neg	175	175	<50	10.8	6.5	59.8
Tryptone	6.8	0.5	1.3	3.7	7.2	neg	neg	73	870	8	13.0	5.2	40.0
Tryptose	9.7	0.8	2.3	3.2	7.4	neg	neg	875	825	100	13.4	4.4	32.5
Yeast Extract	11.2	1.5	2.7	3.1	6.7	neg	neg	9	60	<5	10.9	6.0	55.0

PRODUCT	VITAMINS - µg/g												
	Biotin	Choline	Cyanocobalamin	Folic Acid	Inositol	Nicotinic Acid	PABA	Pantothenic Acid	Pyridoxine	Riboflavin	Thiamine	Thymidine	
Beef Extract	0.1	1171.5	0.5	3.3	4113.2	774.7	20.0	91.0	7.3	0.4	<0.1	1093.4	
Beef Extract, Dessicated	0.1	1300.0	<0.1	0.6	2100.0	138.1	40.5	8.7	2.8	<0.1	<0.1	111.3	
Casamino Acids	<0.1	160.0	<0.1	<0.1	<100.0	<20.0	<5.0	<0.1	<0.1	1.8	1.2	<30.0	
Casamino Acids, Technical	<0.1	<50.0	<0.1	<0.1	<38.0	<0.1	9.8	<0.6	<0.1	0.2	0.2	<14.0	
Casein Digest	0.1	<40.0	<0.1	1.0	490.0	14.1	6.1	6.7	0.4	<0.1	1.5	8297.0	
Casitone	0.2	550.0	<0.1	0.8	980.0	20.3	15.9	7.7	1.3	0.4	<0.1	342.9	
Neopeptone	0.2	3100.0	<0.1	0.4	3600.0	52.2	2.9	16.0	2.3	1.3	<0.1	<14.0	
Bacto Peptone	0.2	2000.0	<0.1	0.3	2400.0	21.9	<0.5	5.9	1.7	3.9	<0.1	413.0	
Proteose Peptone	0.1	2300.0	<0.1	0.4	5000.0	79.9	4.2	20.0	1.1	<0.1	1.2	99.7	
Proteose Peptone No. 2	0.3	4500.0	<0.1	0.5	4700.0	157.1	1.2	47.0	4.0	6.4	1.6	1319.0	
Proteose Peptone No. 3	0.4	3700.0	<0.1	0.3	8900.0	124.2	<0.5	20.0	1.3	6.8	0.1	659.6	
Soytone	0.2	2200.0	<0.1	3.0	2100.0	19.1	9.0	13.0	11.0	<0.1	1.2	113.2	
TC Lactalbumin Hydrolysate	<0.1	280.0	<0.1	0.2	360.0	<0.1	11.3	4.3	1.0	8.5	0.5	<14.0	
TC Yeastolate	6.7	3400.0	<0.1	25.2	1900.0	945.0	96.6	300.0	77.5	21.8	54.3	2975.0	
Tryptone	0.1	350.0	<0.1	0.3	1400.0	97.8	3.7	5.3	0.6	<0.1	0.4	93.4	
Tryptose	0.2	2700.0	<0.1	0.4	5400.0	47.4	11.4	16.0	1.4	4.3	0.1	769.0	
Yeast Extract	3.3	300.0	<0.1	1.5	1400.0	597.9	763.0	273.7	43.2	116.5	529.9	217.5	

*Represents Total Solids value rather than loss on drying.



Reference Guide

PEPTONES & HYDROLYSATES SELECTION GUIDE TYPICAL ANALYSIS

PRODUCT	AMINO ACIDS - %																	Vials
	Alanine	Arginine	Aspartic Acid	Cysteine	Glutamic Acid	Glycine	Histidine	Isoleucine	Leucine	Lysine	Methionine	Phenylalanine	Proline	Serine	Threonine	Tryptophan	Tyrosine	
Beef Extract	2.54	1.39	1.67	0.18	6.01	4.14	4.94	0.53	1.00	1.45	0.30	<0.01	2.16	0.90	0.67	0.05	1.99	0.86
Beef Extract, Dessicated	8.96	5.66	4.30	0.17	12.55	16.25	2.50	1.45	3.63	3.27	1.08	2.00	9.58	2.10	1.42	0.32	1.03	2.62
Casamino Acids	3.26	2.20	4.76	0.16	15.30	1.31	1.66	3.34	5.47	5.71	1.28	2.11	6.17	2.19	2.41	<0.01	0.47	4.30
Casamino Acids, Technical	1.64	1.77	3.42	0.34	10.97	1.09	1.31	0.13	2.54	2.14	1.19	5.23	4.44	2.64	1.99	0.01	1.33	3.24
Casein Digest	2.92	3.02	6.75	0.17	23.10	1.93	2.52	4.66	8.29	7.70	2.66	4.27	11.04	5.55	4.33	1.16	2.54	6.51
Casitone	3.01	3.76	6.61	0.02	20.03	1.97	2.17	4.16	8.74	13.62	1.71	4.02	8.57	4.82	3.74	0.14	2.09	4.06
Neopeptone	4.03	4.14	6.19	0.26	13.22	7.02	<0.01	0.36	3.65	5.16	2.00	8.67	6.73	4.22	3.69	0.96	4.21	4.96
Bacto Peptone	8.67	6.76	5.60	0.20	10.21	15.59	0.58	1.45	3.01	3.42	1.19	1.81	8.80	2.87	1.81	0.36	0.64	2.35
Proteose Peptone	6.50	5.12	7.28	0.87	11.95	9.68	2.01	3.04	5.66	5.33	1.97	2.86	5.93	3.49	3.14	0.60	2.35	3.76
Proteose Peptone No. 2	6.08	5.47	7.45	0.40	10.57	10.84	<0.01	1.00	3.57	5.22	1.51	7.94	5.31	4.64	3.90	0.94	1.92	4.73
Proteose Peptone No. 3	5.99	5.49	6.92	1.12	12.38	9.26	1.74	2.65	5.70	5.02	1.86	2.72	4.94	3.65	3.32	0.59	1.96	3.62
Soytone	2.46	3.82	7.27	1.45	12.76	2.51	1.24	2.37	4.03	3.45	0.86	2.46	2.92	2.87	2.17	0.47	1.93	2.65
TC Lactalbumin Hydrolysate	3.70	2.67	7.13	0.55	16.30	2.02	1.83	1.18	5.43	4.11	2.11	10.81	6.62	4.62	4.76	1.75	1.22	5.82
TC Yeastolate	4.84	2.99	5.58	0.45	10.53	4.02	<0.01	0.56	3.23	3.82	0.96	5.59	2.59	2.81	2.80	0.79	1.21	3.80
Tryptone	2.86	3.03	6.11	0.42	17.05	1.75	2.02	4.40	7.11	6.70	2.57	3.71	7.45	4.29	3.58	0.71	1.42	5.00
Tryptose	4.45	4.65	6.34	0.44	13.92	2.84	<0.01	0.34	3.67	4.64	1.92	7.52	6.33	4.09	3.55	0.62	2.21	1.93
Yeast Extract	5.36	3.02	6.69	0.74	14.20	3.25	1.20	3.23	4.69	5.15	1.05	2.53	2.60	2.84	2.95	1.36	1.20	3.79

PRODUCT	INORGANICS - %														Total (%)	
	Calcium	Chloride	Cobalt	Copper	Iron	Lead	Magnesium	Manganese	Phosphate	Potassium	Sodium	Sulfate	Sulfur	Tin		Zinc
Beef Extract	0.068	1.284	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.239	<0.001	5.458	5.477	2.315	0.629	0.707	<0.001	<0.001	0.2
Beef Extract, Dessicated	0.018	1.576	<0.001	0.001	0.011	<0.001	0.022	<0.001	0.345	1.994	2.774	0.829	0.661	<0.001	0.002	<0.1
Casamino Acids	<0.001	7.400	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	3.325	0.410	8.710	0.045	0.420	<0.001	<0.001	
Casamino Acids, Technical	0.019	21.212	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.008	<0.001	1.358	0.273	13.721	0.167	0.424	<0.001	0.002	3.4
Casein Digest	0.019	0.059	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	0.018	<0.001	2.670	0.078	2.937	0.167	0.621	<0.001	0.002	4.2
Casitone	0.010	0.110	<0.001	<0.001	0.003	<0.001	0.019	<0.001	2.604	0.162	3.073	0.339	0.676	<0.001	0.004	0.2
Neopeptone	0.012	0.344	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.006	<0.001	2.209	0.149	2.057	0.340	0.657	<0.001	<0.001	0.8
Bacto Peptone	0.008	1.086	<0.001	<0.001	0.004	<0.001	0.007	<0.001	0.445	0.203	1.759	0.244	0.410	<0.001	0.001	6.9
Proteose Peptone	0.021	4.510	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	0.027	<0.001	0.872	0.685	3.677	0.162	0.812	<0.001	0.002	<0.1
Proteose Peptone No. 2	0.024	3.644	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.024	<0.001	1.674	0.815	3.956	0.232	0.698	<0.001	0.003	1.3
Proteose Peptone No. 3	0.023	3.581	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	0.027	<0.001	1.447	0.982	3.815	0.232	0.975	<0.001	0.007	1.4
Soytone	0.055	0.165	<0.001	<0.001	0.008	<0.001	0.161	<0.001	0.820	2.220	3.404	2.334	1.660	<0.001	0.001	24.0
TC Lactalbumin Hydrolysate	0.095	<0.010	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	0.026	<0.001	1.309	0.932	1.357	0.379	0.750	<0.001	0.002	9.2
TC Yeastolate	0.002	0.299	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.025	<0.001	2.633	5.085	0.819	0.488	0.528	<0.001	0.007	10.3
Tryptone	0.013	0.186	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.017	<0.001	2.669	0.229	2.631	0.241	0.740	<0.001	0.003	7.7
Tryptose	0.001	1.886	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	0.022	<0.001	2.144	0.679	3.410	0.308	0.737	<0.001	0.005	7.1
Yeast Extract	0.013	0.380	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.075	<0.001	3.270	3.195	1.490	0.091	0.634	<0.001	0.011	17.5

Reference Guide



	Biotin	Pyridoxin	Niacin	Thiamin HCl	Vitamin B12	Folic acid	DL Aspartic acid	L-methionine	L-Glutamic acid	L-Alanine	L-Arginine (base)	L-Asparagine
Raj 1960	4.08E-08	9.73E-07	2.03E-06	1.48E-06	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	6.70E-05	3.40E-03	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Little 1973	4.09E-08	9.73E-07	2.03E-06	2.96E-08	1.48E-07	2.27E-08	0.00E+00	6.70E-05	3.40E-03	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Shapiro 1977	3.68E-08	5.35E-06	1.14E-05	8.89E-07	5.90E-09	0.00E+00	0.00E+00	6.70E-04	4.08E-03	6.73E-03	4.59E-03	6.06E-03
Venkateswaran 2000	0.00E+00	0.00E+00	8.12E-06	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	6.70E-04	0.00E+00	2.05E-03	4.59E-03	6.06E-03
Holland 2006	4.09E-08	4.86E-09	8.12E-06	2.96E-09	7.38E-12	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Brim 2003	0.00E+00	0.00E+00	8.12E-06	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	3.35E-04	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Kongpud 2008	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
DMG	4.08E-09	4.86E-09	8.12E-06	2.96E-09	7.38E-10	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Wolin 1957	4.08E-08	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	5.91E-02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
McDonald 1960	1.64E-08	0.00E+00	0.00E+00	1.19E-06	0.00E+00	0.00E+00	3.78E-03	3.35E-03	6.80E-03	5.61E-03	2.87E-03	0.00E+00
McDonald 1963	1.64E-07	0.00E+00	0.00E+00	5.93E-06	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.34E-04	3.40E-02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	L-Cysteine HCl	L-Glutamine	Glycine	L-Histidine (base)	L-Isoleucine	L-Leucine	L-Lysine HCl	L-Phenylalanine	L-Proline	L-Serine	L-Threonine	L-Tryptophan
Raj 1960	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Little 1973	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Shapiro 1977	1.71E-04	0.00E+00	4.00E-03	1.29E-03	2.29E-03	3.81E-03	1.64E-03	1.21E-03	3.13E-03	2.85E-03	1.68E-03	9.79E-04
Venkateswaran 2000	0.00E+00	2.45E-03	4.00E-03	1.37E-03	0.00E+00	3.81E-03	2.05E-03	0.00E+00	3.21E-03	2.85E-03	1.68E-03	9.79E-04
Holland 2006	0.00E+00	1.00E-02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	1.00E-02	0.00E+00	0.00E+00
Brim 2003	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Kongpud 2008	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
DMG	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
Wolin 1957	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
McDonald 1960	4.13E-03	0.00E+00	6.86E-03	3.22E-03	3.81E-03	3.81E-03	3.42E-03	3.03E-03	4.34E-03	4.78E-03	4.20E-03	2.45E-03
McDonald 1963	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
	L-Tyrosine ethyl ester HCl	L-Valine	L-Cysteine	N2 of glycero phosphate	Potassium phosphate	TRIS	MOPS acid					
Raj 1960	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00					
Little 1973	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00					
Shapiro 1977	8.14E-04	1.71E-03	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00					
Venkateswaran 2000	1.10E-03	1.71E-03	2.52E-04	0.00E+00	2.00E-02	0.00E+00	0.00E+00					
Holland 2006	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	4.00E-02					
Brim 2003	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	2.00E-02	0.00E+00	0.00E+00					
Kongpud 2008	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00					
DMG	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	4.00E-02					
Wolin 1957	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00					
McDonald 1960	2.78E-03	4.27E-03	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	4.13E-03	0.00E+00					
McDonald 1963	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00					

Annexe 4

**Component coefficient matrix of the principal component analysis of media
from literature**

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8	PC 9	PC 10
(NH4)2HPO4	-0,0425	-0,0360	-0,0892	-0,0419	0,0283	0,3676	-0,1359	0,4662	-0,0462	0,1032
KH2PO4	-0,0450	0,0099	-0,1591	-0,1100	0,1536	-0,2724	-0,0171	0,1310	-0,0512	0,0468
K2HPO4	-0,0765	-0,0396	-0,0650	-0,0855	0,3336	-0,1356	-0,0898	-0,1764	0,0855	-0,0820
NH4Cl	-0,0906	-0,0540	0,2594	-0,0807	-0,0522	0,0098	-0,0869	-0,3381	0,1684	-0,0993
NaOH	-0,0764	-0,0496	0,3174	-0,0560	-0,0620	-0,0845	0,0012	-0,0054	-0,1964	-0,0122
KOH	-0,0764	-0,0496	0,3174	-0,0560	-0,0620	-0,0845	0,0012	-0,0054	-0,1964	-0,0122
Na2SO4	-0,0764	-0,0496	0,3174	-0,0560	-0,0620	-0,0845	0,0012	-0,0054	-0,1964	-0,0122
NaCl	-0,0348	0,0133	-0,1763	-0,1107	-0,3054	-0,2502	-0,0329	0,0392	-0,0817	0,1258
(NH4)2SO4	-0,0442	-0,0193	-0,0942	-0,0460	0,3642	-0,2700	0,0067	0,0419	-0,0197	-0,0341
Glucose	-0,0762	-0,0521	0,0608	-0,0949	0,0065	0,2654	-0,1984	-0,2510	-0,2347	-0,0347
Fructose	-0,0393	0,0096	0,1746	0,2652	-0,0834	-0,1206	0,1922	0,1518	0,2700	-0,0401
Glycerol	0,1842	-0,1661	0,0050	-0,0344	-0,0071	-0,0323	0,0303	-0,0222	0,0043	0,0183
Maltose	0,0427	0,1909	-0,0964	-0,1745	-0,1968	-0,1548	0,0487	0,0272	-0,0652	0,0844
L-malic acid	0,1842	-0,1661	0,0050	-0,0344	-0,0071	-0,0323	0,0303	-0,0222	0,0043	0,0183
Sodium acetate	0,0536	-0,0156	0,0058	-0,0207	0,0023	-0,0036	0,0172	-0,0056	0,0004	0,0032
Potassium gluconate	0,1842	-0,1661	0,0050	-0,0344	-0,0071	-0,0323	0,0303	-0,0222	0,0043	0,0183
Calcium succinate	0,1842	-0,1661	0,0050	-0,0344	-0,0071	-0,0323	0,0303	-0,0222	0,0043	0,0183
MgSO4	-0,0276	0,0167	-0,1802	-0,1163	-0,3073	-0,2399	-0,0223	0,0434	-0,0800	0,1275
MnSO4	0,1088	-0,1538	-0,0634	-0,0581	0,0146	0,2499	-0,0791	0,3351	-0,0332	-0,3779
FeSO4	-0,0341	0,0295	-0,1889	0,0273	-0,3131	-0,2473	0,0281	0,0037	-0,1152	0,1031
Fe(NH4)2(SO4)2	0,1842	-0,1661	0,0050	-0,0344	-0,0071	-0,0323	0,0303	-0,0222	0,0043	0,0183
ZnSO4	0,1742	-0,1571	0,0049	-0,0326	-0,0067	-0,0306	0,0287	-0,0210	0,0040	0,0173
(NH4)6Mo7O24	0,0009	0,0448	-0,0418	0,3704	-0,0372	-0,0064	0,1656	-0,0969	-0,0958	-0,0559
CuSO4	0,1834	-0,1670	0,0045	-0,0356	-0,0002	-0,0381	0,0305	-0,0215	0,0031	0,0176
NH4VO3	0,1842	-0,1661	0,0050	-0,0344	-0,0071	-0,0323	0,0303	-0,0222	0,0043	0,0183
CoSO4	0,1842	-0,1661	0,0050	-0,0344	-0,0071	-0,0323	0,0303	-0,0222	0,0043	0,0183
H3BO3	0,1770	-0,1733	0,0419	-0,0412	-0,0144	-0,0424	0,0307	-0,0231	-0,0184	0,0170
CrKSO4	0,1842	-0,1661	0,0050	-0,0344	-0,0071	-0,0323	0,0303	-0,0222	0,0043	0,0183
NiSO4	0,1841	-0,1662	0,0046	-0,0346	-0,0055	-0,0335	0,0304	-0,0221	0,0042	0,0181
MgCl2	-0,0666	-0,0296	0,0375	-0,0288	0,3053	-0,2881	-0,0309	0,0356	-0,0996	-0,0374
CaCl2	-0,0260	0,0055	-0,0694	0,1455	0,1484	-0,1105	0,1786	-0,0409	-0,0593	-0,0479
Manganese (II) acetate	0,0298	0,0663	0,0023	0,3203	-0,0237	-0,0843	-0,3437	-0,0040	-0,0500	-0,0144
CoCl2	-0,0006	-0,0003	0,0005	-0,0006	0,0027	-0,0025	0,0001	0,0003	-0,0009	-0,0003
MnCl2	-0,0288	-0,0059	-0,0588	0,1791	-0,0261	0,0758	0,5669	-0,1278	-0,0780	-0,0614
FeCl3	-0,0764	-0,0496	0,3174	-0,0560	-0,0620	-0,0845	0,0012	-0,0054	-0,1964	-0,0122
NaSeO4	-0,0442	-0,0193	-0,0942	-0,0460	0,3642	-0,2700	0,0067	0,0419	-0,0197	-0,0341
Biotin	0,0000	-0,0001	-0,0008	-0,0006	-0,0012	-0,0004	-0,0004	0,0002	0,0001	0,0005
Pyridoxine	0,0886	-0,0892	-0,0084	-0,0228	-0,0001	0,0294	-0,0015	0,0469	-0,0037	0,0222
Niacin	0,1334	-0,1005	-0,0430	0,2383	-0,0276	0,0382	0,1200	-0,0025	-0,0758	-0,0082
Thiamin HCl	0,0039	0,0294	-0,1741	-0,1422	-0,2821	-0,1758	-0,0315	0,1156	-0,0892	-0,5880
Vitamin B12	-0,0044	-0,0061	-0,0111	-0,0053	0,0053	0,0497	-0,0174	0,0579	-0,0044	0,6336
Folic acid	-0,0003	-0,0002	-0,0006	-0,0002	0,0003	0,0025	-0,0009	0,0029	-0,0002	0,0317
DL Aspartic acid	0,0924	0,2441	0,0463	-0,1246	0,0401	0,0415	0,0986	-0,0026	-0,0062	-0,0120
L-methionine	0,1330	0,2285	0,0333	-0,0564	0,0203	0,0263	0,0897	-0,0065	-0,0284	-0,0097
L-Glutamic acid	-0,0356	0,0041	-0,1253	-0,1256	-0,1537	0,0234	-0,1491	-0,4554	0,4726	-0,0605
L-Alanine	0,2179	0,0463	0,0358	-0,0330	0,0154	-0,0188	0,0065	-0,0206	-0,0129	0,0032
L-Arginine (base)	0,1955	0,0380	0,0261	0,1496	-0,0041	-0,0652	-0,1811	-0,0201	-0,0356	-0,0026
L-Asparagine	0,1576	-0,0734	0,0054	0,2105	-0,0227	-0,0859	-0,2308	-0,0194	-0,0336	0,0029
L-Cysteine HCl	0,0979	0,2320	0,0455	-0,1232	0,0389	0,0393	0,0976	-0,0034	-0,0059	-0,0110
L-Glutamine	-0,0419	-0,0125	0,2522	0,0712	-0,0748	-0,1625	0,0063	0,2719	0,4052	-0,0027
Glycine	0,1856	0,1548	0,0426	0,0395	0,0182	-0,0239	-0,0752	-0,0154	-0,0282	-0,0081
L-Histidine (base)	0,1678	0,1932	0,0463	-0,0022	0,0255	-0,0068	-0,0331	-0,0124	-0,0241	-0,0101
L-Isoleucine	0,1784	0,1269	0,0434	-0,1276	0,0315	0,0194	0,1026	-0,0140	-0,0031	-0,0009
L-Leucine	0,1823	0,0859	0,0319	0,0960	0,0055	-0,0447	-0,1278	-0,0172	-0,0308	-0,0048
L-Lysine HCl	0,1588	0,1631	0,0401	0,0408	0,0180	-0,0197	-0,0744	-0,0125	-0,0272	-0,0095
L-Phenylalanine	0,1481	0,1584	0,0431	-0,1233	0,0332	0,0255	0,0987	-0,0102	-0,0040	-0,0042
L-Proline	0,1440	0,1012	0,0301	0,0511	0,0102	-0,0257	-0,0781	-0,0126	-0,0233	-0,0055
L-Serine	0,0517	0,0554	0,2675	0,0163	-0,0575	-0,1513	0,0455	0,2571	0,3905	-0,0036
L-Threonine	0,1621	0,1859	0,0449	-0,0093	0,0253	-0,0047	-0,0244	-0,0119	-0,0222	-0,0095
L-Tryptophan	0,1680	0,1927	0,0465	-0,0097	0,0262	-0,0049	-0,0253	-0,0123	-0,0231	-0,0099
L-Tyrosine ethyl ester HCl	0,1416	0,1977	0,0435	-0,0059	0,0255	-0,0016	-0,0267	-0,0096	-0,0222	-0,0110
L-Valine	0,1524	0,1748	0,0422	-0,0088	0,0238	-0,0044	-0,0229	-0,0112	-0,0209	-0,0089
L-Cysteine	0,0298	0,0663	0,0023	0,3203	-0,0237	-0,0843	-0,3437	-0,0040	-0,0500	-0,0144
Na2 α,β glycerophosphate	0,1842	-0,1661	0,0050	-0,0344	-0,0071	-0,0323	0,0303	-0,0222	0,0043	0,0183
Potassium phosphate	0,0008	0,0449	-0,0418	0,3704	-0,0372	-0,0063	0,1656	-0,0969	-0,0958	-0,0559
TRIS	0,0924	0,2441	0,0463	-0,1246	0,0401	0,0415	0,0986	-0,0026	-0,0062	-0,0120
MOPS acid	-0,0764	-0,0496	0,3174	-0,0560	-0,0620	-0,0845	0,0012	-0,0054	-0,1964	-0,0122

	PC 11	PC 12	PC 13	PC 14	PC 15	PC 16	PC 17	PC 18	PC 19	PC 20
(NH4)2HPO4	-0.2650	0.0631	0.0015	0.0982	0.0049	0.0631	0.0982	0.0107	-0.3218	0.1003
KH2PO4	-0.0213	-0.0352	-0.0328	-0.0412	-0.0038	-0.0352	-0.0412	-0.0735	-0.3316	-0.0585
K2HPO4	-0.2843	0.1632	-0.0109	0.2311	0.0213	0.1632	0.2311	0.0075	0.2608	0.0161
NH4Cl	-0.0910	-0.0596	0.0197	-0.0605	-0.0188	-0.0596	-0.0605	0.0699	0.0141	0.1532
NaOH	0.1884	-0.0194	0.1301	0.0095	0.0021	-0.0194	0.0095	0.0446	-0.0067	0.0235
KOH	0.0604	0.0314	0.0301	-0.0249	0.0163	0.0314	-0.0249	0.0988	-0.0592	0.1667
Na2SO4	0.0692	0.1066	-0.1625	0.0879	0.0138	0.1066	0.0879	-0.0601	-0.0044	-0.1045
NaCl	0.2087	0.0325	-0.2855	0.0124	0.0139	0.0325	0.0124	-0.3970	0.1763	-0.3479
(NH4)2SO4	0.4177	0.0297	-0.0102	-0.0846	0.0317	0.0297	-0.0846	0.0220	0.0007	0.0036
Glucose	-0.0985	0.0060	-0.0003	-0.0291	0.0283	0.0060	-0.0291	-0.1749	0.0340	-0.1980
Fructose	0.0929	0.1131	0.1763	-0.0657	0.0792	0.1131	-0.0657	0.1613	-0.1585	0.0588
Glycerol	-0.0517	0.9321	0.0034	-0.0599	-0.0163	-0.0679	-0.0599	-0.0160	-0.0189	-0.0063
Maltose	-0.1101	0.0147	0.8579	0.0208	-0.0028	0.0147	0.0208	-0.1437	0.1020	-0.1273
L-malic acid	0.1626	-0.0448	0.0453	0.9180	0.0010	-0.0448	-0.0820	0.0343	-0.0692	0.0273
Sodium acetate	-0.0638	-0.0197	-0.0153	-0.0073	0.9916	-0.0197	-0.0073	-0.0146	0.0089	-0.0071
Potassium gluconate	-0.0517	-0.0679	0.0034	-0.0599	-0.0163	0.9321	-0.0599	-0.0160	-0.0189	-0.0063
Calcium succinate	0.1626	-0.0448	0.0453	-0.0820	0.0010	-0.0448	0.9180	0.0343	-0.0692	0.0273
MgSO4	-0.1621	-0.0038	-0.1371	0.0104	-0.0017	-0.0038	0.0104	0.7892	0.1248	-0.1983
MnSO4	0.1884	-0.0079	0.0696	-0.0456	0.0075	-0.0079	-0.0456	0.0899	0.6569	0.0966
FeSO4	-0.0873	0.0111	-0.1144	0.0164	0.0053	0.0111	0.0164	-0.1916	0.1231	0.7930
Fe(NH4)2(SO4)2	0.0180	-0.0604	0.0171	-0.0671	-0.0107	-0.0604	-0.0671	0.0003	-0.0353	0.0046
ZnSO4	-0.1097	-0.0707	-0.0087	-0.0505	-0.0204	-0.0707	-0.0505	-0.0294	-0.0036	-0.0154
(NH4)6Mo7O24	0.0370	0.0223	0.0148	0.0320	0.0048	0.0223	0.0320	0.0020	0.0350	-0.0595
CuSO4	-0.0459	-0.0681	0.0058	-0.0615	-0.0159	-0.0681	-0.0615	-0.0138	-0.0198	-0.0041
NH4VO3	-0.0517	-0.0679	0.0034	-0.0599	-0.0163	-0.0679	-0.0599	-0.0160	-0.0189	-0.0063
CoSO4	-0.0368	-0.0663	0.0063	-0.0615	-0.0151	-0.0663	-0.0615	-0.0125	-0.0224	-0.0039
H3BO3	-0.1330	-0.0770	-0.0097	-0.0519	-0.0229	-0.0770	-0.0519	-0.0323	0.0021	-0.0174
CrKSO4	-0.0418	-0.0668	0.0054	-0.0610	-0.0155	-0.0668	-0.0610	-0.0137	-0.0213	-0.0047
NiSO4	-0.1214	-0.0756	-0.0100	-0.0530	-0.0220	-0.0756	-0.0530	-0.0322	-0.0025	-0.0169
MgCl2	-0.2134	-0.0509	0.0230	-0.0113	-0.0181	-0.0509	-0.0113	-0.0046	0.0829	0.0224
CaCl2	-0.0451	-0.0137	0.0144	0.0029	-0.0057	-0.0137	0.0029	0.0023	0.0482	-0.0158
Manganese (II) acetate	0.0688	0.0306	0.0508	0.0199	0.0154	0.0306	0.0199	0.0202	-0.0059	-0.0153
CoCl2	-0.0702	-0.0078	-0.0132	0.0069	-0.0057	-0.0078	0.0069	-0.0161	0.0168	-0.0105
MnCl2	-0.1731	-0.0170	-0.0607	0.0391	-0.0213	-0.0170	0.0391	-0.0534	0.0892	-0.0887
FeCl3	-0.0906	-0.0084	0.0049	0.0115	-0.0064	-0.0084	0.0115	0.0032	0.0404	-0.0007
NaSeO4	-0.0838	-0.0430	0.0405	-0.0321	-0.0093	-0.0430	-0.0321	0.0194	0.0463	0.0455
Biotin	-0.0089	-0.0009	-0.0021	0.0009	-0.0007	-0.0009	0.0009	-0.0027	0.0023	-0.0019
Pyridoxine	0.0057	-0.0284	0.0064	-0.0316	-0.0052	-0.0284	-0.0316	-0.0008	-0.0300	0.0056
Niacin	0.0038	-0.0297	0.0142	-0.0206	-0.0068	-0.0297	-0.0206	-0.0072	-0.0114	-0.0404
Thiamin HCl	-0.0669	0.0097	-0.0722	0.0140	0.0018	0.0097	0.0140	-0.1014	-0.2253	-0.0989
Vitamin B12	0.0558	0.0044	-0.0335	-0.0172	0.0071	0.0044	-0.0172	-0.0525	0.2349	-0.0439
Folic acid	0.1688	0.0181	0.0308	-0.0179	0.0137	0.0181	-0.0179	0.0363	-0.0272	0.0238
DL Aspartic acid	0.1253	0.0354	-0.0360	0.0058	0.0064	0.0354	0.0058	0.0423	-0.0151	0.0439
L-methionine	-0.0614	0.0091	-0.0709	0.0200	-0.0094	0.0091	0.0200	-0.0096	0.0306	-0.0023
L-Glutamic acid	0.0713	0.0192	0.0173	0.0051	0.0085	0.0192	0.0051	0.0205	-0.0187	0.0324
L-Alanine	0.0697	-0.0224	-0.0070	-0.0406	-0.0043	-0.0224	-0.0406	0.0229	-0.0293	0.0223
L-Arginine (base)	0.0325	-0.0148	0.0157	-0.0225	-0.0007	-0.0148	-0.0225	0.0135	-0.0162	-0.0014
L-Asparagine	0.0000	-0.0288	0.0375	-0.0282	-0.0017	-0.0288	-0.0282	0.0001	-0.0153	-0.0179
L-Cysteine HCl	0.0868	0.0282	-0.0417	0.0067	0.0029	0.0282	0.0067	0.0328	-0.0076	0.0374
L-Glutamine	-0.1545	-0.0330	-0.0740	0.0473	-0.0228	-0.0330	0.0473	-0.1462	0.1200	-0.1098
Glycine	0.0120	-0.0001	-0.0228	-0.0049	-0.0033	-0.0001	-0.0049	0.0137	-0.0013	0.0101
L-Histidine (base)	-0.1073	-0.0052	-0.0578	0.0147	-0.0128	-0.0052	0.0147	-0.0129	0.0310	-0.0037
L-Isoleucine	0.0307	-0.0103	-0.0400	-0.0212	-0.0072	-0.0103	-0.0212	0.0165	-0.0110	0.0271
L-Leucine	-0.1163	-0.0228	-0.0285	0.0002	-0.0130	-0.0228	0.0002	-0.0196	0.0234	-0.0182
L-Lysine HCl	-0.0758	-0.0035	-0.0401	0.0106	-0.0090	-0.0035	0.0106	-0.0071	0.0222	-0.0042
L-Phenylalanine	-0.0185	-0.0047	-0.0527	-0.0048	-0.0091	-0.0047	-0.0048	0.0058	0.0060	0.0194
L-Proline	-0.0123	-0.0047	-0.0159	-0.0036	-0.0040	-0.0047	-0.0036	0.0047	0.0026	0.0018
L-Serine	-0.0421	-0.0265	-0.0729	0.0267	-0.0180	-0.0265	0.0267	-0.1119	0.0897	-0.0795
L-Threonine	0.0713	0.0133	-0.0226	-0.0043	0.0015	0.0133	-0.0043	0.0285	-0.0113	0.0244
L-Tryptophan	-0.1462	-0.0098	-0.0665	0.0181	-0.0162	-0.0098	0.0181	-0.0221	0.0399	-0.0091
L-Tyrosine ethyl ester HCl	0.0449	0.0162	-0.0283	0.0045	0.0006	0.0162	0.0045	0.0224	-0.0023	0.0199
L-Valine	-0.1911	-0.0152	-0.0717	0.0224	-0.0194	-0.0152	0.0224	-0.0338	0.0499	-0.0174
L-Cysteine	0.0090	0.0241	0.0391	0.0260	0.0106	0.0241	0.0260	0.0061	0.0081	-0.0247
Na2 α,β glycerophosphate	0.1626	-0.0448	0.0453	-0.0820	0.0010	-0.0448	-0.0820	0.0343	-0.0692	0.0273
Potassium phosphate	-0.0178	0.0164	0.0041	0.0377	0.0004	0.0164	0.0377	-0.0109	0.0479	-0.0681
TRIS	0.1652	0.0397	-0.0282	0.0017	0.0096	0.0397	0.0017	0.0517	-0.0245	0.0502
MOPS acid	-0.0906	-0.0084	0.0049	0.0115	-0.0064	-0.0084	0.0115	0.0032	0.0404	-0.0007

	PC 21	PC 22	PC 23	PC 24	PC 25	PC 26	PC 27	PC 28	PC 29	PC 30
(NH4)2HPO4	0,0745	0,0497	0,1997	0,0659	0,0631	0,0655	0,0546	0,0647	0,0520	0,0646
KH2PO4	-0,0371	-0,0316	0,0504	-0,0382	-0,0352	-0,0356	-0,0321	-0,0355	-0,0339	-0,1218
K2HPO4	0,1853	0,1352	-0,0044	0,1623	0,1632	0,1680	0,1408	0,1664	0,1405	-0,2221
NH4Cl	-0,0599	-0,0561	0,2219	-0,0604	-0,0596	-0,0596	-0,0682	-0,0596	-0,0594	-0,0077
NaOH	-0,0100	-0,0267	-0,0552	-0,0202	-0,0194	-0,0174	-0,0646	-0,0181	-0,0289	-0,1579
KOH	0,0130	0,0456	0,2516	0,0278	0,0314	0,0274	0,0405	0,0287	0,0493	-0,0769
Na2SO4	0,1005	0,1061	-0,1269	0,1116	0,1066	0,1053	0,0903	0,1057	0,1141	0,2337
NaCl	0,0260	0,0365	0,1266	0,0331	0,0325	0,0311	0,0494	0,0316	0,0392	0,0897
(NH4)2SO4	-0,0075	0,0605	0,0363	0,0204	0,0297	0,0218	0,0667	0,0244	0,0656	-0,1685
Glucose	-0,0054	0,0156	-0,0242	0,0059	0,0060	0,0035	0,0100	0,0044	0,0176	0,0469
Fructose	0,0549	0,1576	-0,1276	0,1093	0,1131	0,1006	0,1863	0,1048	0,1714	0,2232
Glycerol	-0,0653	-0,0665	0,0172	-0,0678	-0,0679	-0,0673	-0,0718	-0,0675	-0,0705	-0,0064
Maltose	0,0167	0,0122	0,0296	0,0150	0,0147	0,0152	0,0092	0,0150	0,0128	-0,0059
L-malic acid	-0,0569	-0,0319	0,0088	-0,0458	-0,0448	-0,0474	-0,0299	-0,0466	-0,0328	0,0481
Sodium acetate	-0,0157	-0,0221	0,0087	-0,0194	-0,0197	-0,0188	-0,0250	-0,0191	-0,0237	-0,0131
Potassium gluconate	-0,0653	-0,0665	0,0172	-0,0678	-0,0679	-0,0673	-0,0718	-0,0675	-0,0705	-0,0064
Calcium succinate	-0,0569	-0,0319	0,0088	-0,0458	-0,0448	-0,0474	-0,0299	-0,0466	-0,0328	0,0481
MgSO4	0,0008	-0,0076	0,0164	-0,0034	-0,0038	-0,0028	-0,0141	-0,0031	-0,0084	-0,0223
MnSO4	-0,0202	0,0032	0,0452	-0,0085	-0,0079	-0,0105	0,0087	-0,0097	0,0044	0,0644
FeSO4	0,0128	0,0090	-0,0507	0,0114	0,0111	0,0115	0,0049	0,0113	0,0095	-0,0074
Fe(NH4)2(SO4)2	0,9374	-0,0552	0,0145	-0,0607	-0,0604	-0,0609	-0,0581	-0,0607	-0,0582	0,0113
ZnSO4	-0,0641	0,9273	0,0186	-0,0704	-0,0707	-0,0693	-0,0798	-0,0698	-0,0774	-0,0216
(NH4)6Mo7O24	0,0255	0,0184	0,8263	0,0231	0,0223	0,0230	0,0194	0,0228	0,0193	0,0087
CuSO4	-0,0659	-0,0662	0,0182	0,9319	-0,0681	-0,0676	-0,0713	-0,0678	-0,0702	-0,0078
NH4VO3	-0,0653	-0,0665	0,0172	-0,0678	0,9321	-0,0673	-0,0718	-0,0675	-0,0705	-0,0064
CoSO4	-0,0647	-0,0641	0,0166	-0,0663	-0,0663	0,9341	-0,0689	-0,0661	-0,0679	-0,0026
H3BO3	-0,0689	-0,0800	0,0177	-0,0767	-0,0770	-0,0753	0,9104	-0,0759	-0,0852	-0,0346
CrKSO4	-0,0649	-0,0649	0,0168	-0,0668	-0,0668	-0,0664	-0,0698	0,9335	-0,0687	-0,0039
NiSO4	-0,0682	-0,0779	0,0202	-0,0752	-0,0756	-0,0740	-0,0856	-0,0745	0,9171	-0,0247
MgCl2	-0,0380	-0,0594	0,0534	-0,0533	-0,0509	-0,0481	-0,0673	-0,0491	-0,0645	0,7981
CaCl2	-0,0083	-0,0177	-0,0611	-0,0145	-0,0137	-0,0125	-0,0176	-0,0129	-0,0194	-0,0671
Manganese (II) acetate	0,0271	0,0319	-0,0719	0,0305	0,0306	0,0298	0,0356	0,0301	0,0341	-0,0072
CoCl2	-0,0030	-0,0116	0,0032	-0,0075	-0,0078	-0,0068	-0,0140	-0,0071	-0,0126	-0,0192
MnCl2	0,0012	-0,0320	-0,1561	-0,0151	-0,0170	-0,0131	-0,0396	-0,0144	-0,0352	-0,0201
FeCl3	-0,0019	-0,0137	-0,0207	-0,0089	-0,0084	-0,0070	-0,0293	-0,0075	-0,0150	-0,0885
NaSeO4	-0,0394	-0,0438	0,0713	-0,0460	-0,0430	-0,0422	-0,0421	-0,0425	-0,0474	-0,1525
Biotin	-0,0003	-0,0014	0,0006	-0,0009	-0,0009	-0,0008	-0,0017	-0,0008	-0,0015	-0,0020
Pyridoxine	-0,0295	-0,0260	0,0177	-0,0285	-0,0284	-0,0286	-0,0274	-0,0286	-0,0274	0,0086
Niacin	-0,0267	-0,0306	-0,1002	-0,0290	-0,0297	-0,0290	-0,0331	-0,0292	-0,0325	0,0111
Thiamin HCl	0,0111	0,0079	0,0007	0,0098	0,0097	0,0100	0,0057	0,0099	0,0083	-0,0113
Vitamin B12	-0,0026	0,0103	0,0352	0,0041	0,0044	0,0029	0,0116	0,0034	0,0115	0,0333
Folic acid	0,0064	0,0273	-0,0047	0,0173	0,0181	0,0156	0,0331	0,0164	0,0298	0,0439
DL Aspartic acid	0,0257	0,0418	0,0202	0,0348	0,0354	0,0333	0,0482	0,0340	0,0450	0,0464
L-methionine	0,0127	0,0056	0,0030	0,0096	0,0091	0,0099	0,0050	0,0096	0,0056	-0,0004
L-Glutamic acid	0,0146	0,0222	0,0465	0,0218	0,0192	0,0182	0,0363	0,0185	0,0244	0,1631
L-Alanine	-0,0283	-0,0160	0,0094	-0,0228	-0,0224	-0,0236	-0,0147	-0,0232	-0,0164	0,0269
L-Arginine (base)	-0,0173	-0,0119	-0,0289	-0,0150	-0,0148	-0,0154	-0,0114	-0,0152	-0,0123	0,0019
L-Asparagine	-0,0286	-0,0275	-0,0398	-0,0288	-0,0288	-0,0288	-0,0291	-0,0288	-0,0291	-0,0132
L-Cysteine HCl	0,0212	0,0328	0,0218	0,0278	0,0282	0,0267	0,0377	0,0272	0,0353	0,0366
L-Glutamine	-0,0068	-0,0539	0,0391	-0,0312	-0,0330	-0,0274	-0,0694	-0,0292	-0,0591	-0,1115
Glycine	-0,0016	0,0013	-0,0066	-0,0001	-0,0001	-0,0004	0,0023	-0,0003	0,0015	0,0063
L-Histidine (base)	0,0013	-0,0105	0,0059	-0,0046	-0,0052	-0,0038	-0,0131	-0,0042	-0,0116	-0,0209
L-Isoleucine	-0,0139	-0,0067	0,0289	-0,0105	-0,0103	-0,0111	-0,0057	-0,0108	-0,0068	0,0242
L-Leucine	-0,0153	-0,0281	-0,0127	-0,0222	-0,0228	-0,0212	-0,0322	-0,0217	-0,0303	-0,0316
L-Lysine HCl	0,0011	-0,0073	-0,0044	-0,0030	-0,0035	-0,0025	-0,0089	-0,0028	-0,0080	-0,0169
L-Phenylalanine	-0,0047	-0,0044	0,0285	-0,0046	-0,0047	-0,0047	-0,0045	-0,0047	-0,0047	0,0107
L-Proline	-0,0044	-0,0048	-0,0084	-0,0046	-0,0047	-0,0047	-0,0049	-0,0047	-0,0051	-0,0024
L-Serine	-0,0092	-0,0402	0,0465	-0,0253	-0,0265	-0,0228	-0,0515	-0,0240	-0,0438	-0,0735
L-Threonine	0,0076	0,0176	0,0004	0,0130	0,0133	0,0121	0,0211	0,0125	0,0191	0,0249
L-Tryptophan	-0,0007	-0,0172	0,0090	-0,0091	-0,0098	-0,0079	-0,0211	-0,0085	-0,0189	-0,0302
L-Tyrosine ethyl ester HCl	0,0124	0,0187	-0,0001	0,0161	0,0162	0,0154	0,0216	0,0157	0,0201	0,0174
L-Valine	-0,0030	-0,0251	0,0104	-0,0142	-0,0152	-0,0126	-0,0306	-0,0135	-0,0275	-0,0422
L-Cysteine	0,0248	0,0223	-0,0696	0,0243	0,0241	0,0243	0,0239	0,0242	0,0235	-0,0224
Na2 α,β glycerophosphate	-0,0569	-0,0319	0,0088	-0,0458	-0,0448	-0,0474	-0,0299	-0,0466	-0,0328	0,0481
Potassium phosphate	0,0233	0,0095	-0,1715	0,0175	0,0164	0,0179	0,0087	0,0174	0,0097	-0,0053
TRIS	0,0273	0,0483	0,0186	0,0389	0,0397	0,0370	0,0560	0,0379	0,0521	0,0566
MOPS acid	-0,0019	-0,0137	-0,0207	-0,0089	-0,0084	-0,0070	-0,0293	-0,0075	-0,0150	-0,0885

	PC 31	PC 32	PC 33	PC 34	PC 35	PC 36	PC 37	PC 38	PC 39	PC 40
(NH4)2HPO4	0,1236	0,1405	-0,0107	0,1043	0,0215	0,0646	-0,0017	-0,0375	0,0874	-0,0041
KH2PO4	-0,0308	-0,0094	0,0008	0,0815	0,0131	-0,1414	0,0000	-0,0071	0,0270	0,6300
K2HPO4	-0,0820	-0,0655	-0,0235	0,0100	-0,0148	-0,1916	-0,0025	0,1095	0,1502	-0,0203
NH4Cl	0,0577	0,3507	-0,0001	-0,0517	-0,0726	-0,0200	0,0001	-0,0092	0,1490	0,0242
NaOH	-0,0424	-0,0273	-0,0107	-0,0674	-0,3064	-0,0234	-0,0007	-0,0042	-0,0512	-0,0237
KOH	0,1757	-0,1922	0,0174	0,5717	-0,0829	-0,0577	0,0024	0,0021	0,1966	-0,0647
Na2SO4	0,0546	0,0710	0,0079	-0,2279	-0,2014	0,3231	0,0008	0,0561	-0,0067	0,2151
NaCl	0,0913	0,0502	0,0072	0,1352	0,0858	0,0447	-0,0007	0,0114	0,1131	0,0948
(NH4)2SO4	-0,1099	0,1071	0,0348	0,0247	-0,0062	-0,2590	0,0049	-0,0070	0,0334	-0,1625
Glucose	0,0479	-0,1280	0,0117	0,1207	-0,0648	0,0746	0,0008	0,0021	-0,0095	0,0858
Fructose	0,0071	-0,1175	0,0591	0,0736	0,1175	0,1088	0,0075	0,0374	-0,0113	0,0320
Glycerol	0,0027	0,0286	-0,0026	-0,0110	-0,0059	-0,0035	-0,0004	-0,0312	-0,0352	-0,0029
Maltose	0,0092	0,0524	-0,0020	-0,0165	-0,0316	0,0041	-0,0006	0,0135	0,0410	0,0507
L-malic acid	0,0156	0,0076	0,0122	0,0309	0,0276	0,0193	0,0015	-0,0259	-0,0269	-0,0029
Sodium acetate	-0,0019	0,0180	-0,0041	-0,0152	-0,0090	-0,0058	-0,0005	-0,0076	-0,0069	0,0000
Potassium gluconate	0,0027	0,0286	-0,0026	-0,0110	-0,0059	-0,0035	-0,0004	-0,0312	-0,0352	-0,0029
Calcium succinate	0,0156	0,0076	0,0122	0,0309	0,0276	0,0193	0,0015	-0,0259	-0,0269	-0,0029
MgSO4	0,0065	0,0173	-0,0048	-0,0051	-0,0485	0,0021	-0,0012	0,0057	0,0183	0,0616
MnSO4	0,0438	0,0109	0,0126	0,0773	0,0375	0,0323	0,0017	-0,0284	-0,0031	0,2398
FeSO4	-0,0236	-0,0134	-0,0018	-0,0585	-0,0392	0,0131	-0,0007	0,0151	-0,0158	0,0735
Fe(NH4)2(SO4)2	0,0069	0,0218	0,0022	0,0026	0,0050	0,0039	0,0002	-0,0295	-0,0325	-0,0029
ZnSO4	-0,0011	0,0330	-0,0067	-0,0223	-0,0151	-0,0098	-0,0009	-0,0310	-0,0357	-0,0027
(NH4)6Mo7O24	-0,0900	-0,0500	-0,0030	-0,1910	0,0001	0,0209	-0,0002	0,0206	-0,0984	0,0377
CuSO4	0,0023	0,0281	-0,0022	-0,0082	-0,0044	-0,0064	-0,0003	-0,0313	-0,0345	-0,0047
NH4VO3	0,0027	0,0286	-0,0026	-0,0110	-0,0059	-0,0035	-0,0004	-0,0312	-0,0352	-0,0029
CoSO4	0,0036	0,0271	-0,0016	-0,0081	-0,0036	-0,0019	-0,0002	-0,0308	-0,0347	-0,0029
H3BO3	-0,0057	0,0387	-0,0083	-0,0327	-0,0312	-0,0153	-0,0011	-0,0326	-0,0396	-0,0031
CrKSO4	0,0033	0,0276	-0,0019	-0,0091	-0,0044	-0,0025	-0,0003	-0,0309	-0,0349	-0,0029
NiSO4	-0,0016	0,0354	-0,0074	-0,0242	-0,0166	-0,0117	-0,0010	-0,0329	-0,0379	-0,0033
MgCl2	-0,0558	0,0000	-0,0144	0,0434	-0,0252	-0,1887	-0,0015	-0,0140	0,0122	-0,0848
CaCl2	0,9223	0,0218	-0,0059	-0,1162	0,0143	-0,0730	-0,0005	0,0023	-0,0442	-0,0202
Manganese (II) acetate	0,0091	0,7631	0,0036	0,1476	0,0111	0,0098	0,0005	0,0142	-0,0300	0,0057
CoCl2	-0,0046	0,0069	0,9951	-0,0131	-0,0110	-0,0089	-0,0006	-0,0018	-0,0025	-0,0008
MnCl2	-0,1396	0,1844	-0,0182	0,5651	-0,0348	0,0021	-0,0021	0,0099	-0,1086	0,0452
FeCl3	-0,0369	0,0258	-0,0072	-0,0678	-0,0775	-0,0368	-0,0006	0,0047	-0,0113	-0,0013
NaSeO4	-0,0395	0,0056	-0,0048	0,0823	0,0419	0,8203	-0,0004	-0,0161	0,0265	-0,0932
Biotin	-0,0003	0,0009	-0,0006	-0,0014	-0,0014	-0,0007	0,9999	-0,0002	-0,0002	0,0002
Pyridoxine	0,0105	0,0153	0,0011	0,0110	0,0020	0,0050	0,0001	0,9823	-0,0129	-0,0103
Niacin	-0,0525	-0,0109	-0,0028	-0,1305	-0,0020	0,0194	-0,0003	-0,0120	0,9069	0,0126
Thiamin HCl	-0,0012	0,0042	-0,0015	-0,0063	-0,0227	-0,0008	-0,0005	0,0110	0,0161	-0,4966
Vitamin B12	0,0312	0,0139	0,0072	0,0494	0,0005	0,0226	0,0006	-0,0088	0,0162	-0,3988
Folic acid	0,0115	-0,0155	0,0119	0,0349	0,0260	0,0188	0,0015	0,0036	0,0073	-0,0200
DL Aspartic acid	0,0131	0,0488	0,0098	-0,0004	0,0243	0,0182	0,0013	0,0147	0,0412	0,0074
L-methionine	-0,0067	0,0440	-0,0035	-0,0477	-0,0061	0,0029	-0,0004	0,0081	0,0127	0,0134
L-Glutamic acid	0,1071	-0,0722	0,0060	0,1442	0,1064	0,1345	0,0003	0,0183	0,0634	0,0963
L-Alanine	0,0139	-0,0032	0,0061	0,0290	0,0159	0,0129	0,0008	-0,0115	-0,0077	0,0041
L-Arginine (base)	0,0122	-0,1243	0,0026	0,0910	0,0090	0,0088	0,0004	-0,0065	-0,0298	0,0054
L-Asparagine	0,0080	-0,1521	-0,0002	0,0981	0,0018	0,0033	0,0000	-0,0128	-0,0486	0,0021
L-Cysteine HCl	0,0109	0,0522	0,0071	-0,0074	0,0182	0,0141	0,0010	0,0123	0,0376	0,0072
L-Glutamine	0,0027	-0,0113	-0,0266	0,0066	-0,0846	-0,0400	-0,0036	-0,0052	0,0090	0,0070
Glycine	0,0109	-0,0540	0,0016	0,0486	0,0071	0,0076	0,0003	0,0013	-0,0022	0,0077
L-Histidine (base)	0,0030	-0,0150	-0,0065	0,0087	-0,0114	-0,0051	-0,0008	0,0021	0,0044	0,0082
L-Isoleucine	0,0098	0,0631	0,0036	-0,0164	0,0101	0,0086	0,0005	-0,0048	0,0156	0,0050
L-Leucine	0,0028	-0,0752	-0,0075	0,0417	-0,0139	-0,0068	-0,0009	-0,0063	-0,0222	0,0061
L-Lysine HCl	0,0046	-0,0451	-0,0046	0,0292	-0,0071	-0,0022	-0,0005	0,0020	-0,0024	0,0076
L-Phenylalanine	0,0060	0,0647	0,0001	-0,0261	0,0021	0,0031	0,0000	-0,0007	0,0198	0,0056
L-Proline	0,0071	-0,0526	-0,0003	0,0405	0,0019	0,0034	0,0000	-0,0007	-0,0074	0,0056
L-Serine	0,0133	0,0034	-0,0176	0,0212	-0,0626	-0,0246	-0,0024	-0,0048	0,0191	0,0096
L-Threonine	0,0133	-0,0266	0,0059	0,0398	0,0163	0,0136	0,0008	0,0060	0,0119	0,0078
L-Tryptophan	0,0006	-0,0060	-0,0092	-0,0018	-0,0175	-0,0093	-0,0011	0,0009	0,0037	0,0081
L-Tyrosine ethyl ester HCl	0,0110	-0,0258	0,0039	0,0342	0,0119	0,0105	0,0006	0,0081	0,0137	0,0079
L-Valine	-0,0029	0,0002	-0,0124	-0,0131	-0,0250	-0,0146	-0,0015	-0,0007	0,0011	0,0073
L-Cysteine	0,0055	-0,2310	-0,0006	0,1359	0,0017	0,0034	0,0000	0,0128	-0,0324	0,0057
Na2 α,β glycerophosphate	0,0156	0,0076	0,0122	0,0309	0,0276	0,0193	0,0015	-0,0259	-0,0269	-0,0029
Potassium phosphate	-0,0933	-0,0447	-0,0068	-0,2017	-0,0085	0,0151	-0,0007	0,0193	-0,1006	0,0377
TRIS	0,0155	0,0449	0,0126	0,0074	0,0305	0,0224	0,0017	0,0157	0,0428	0,0074
MOPS acid	-0,0369	0,0258	-0,0072	-0,0678	-0,1225	-0,0368	-0,0006	0,0047	-0,0113	-0,0013

	PC 41	PC 42	PC 43	PC 44	PC 45	PC 46	PC 47	PC 48	PC 49	PC 50
(NH4)2HPO4	-0.1252	0.0209	0.0014	0.0103	0.2946	0.0880	0.1412	0.1479	-0.0016	-0.0619
KH2PO4	0.4983	0.0204	0.0295	0.0336	-0.0206	-0.0111	-0.0178	-0.0325	0.0284	0.0199
K2HPO4	0.0795	0.0564	0.0214	-0.0069	-0.1340	0.1332	0.0685	0.0680	0.0169	-0.1309
NH4Cl	0.1112	0.0049	-0.0470	0.0148	-0.3086	0.0063	0.1885	0.2144	-0.0482	0.0037
NaOH	0.0510	0.0250	0.1542	0.1204	0.3252	0.0826	0.0308	-0.0361	0.1454	-0.3883
KOH	-0.0327	-0.0452	-0.0801	-0.0096	-0.0828	-0.0784	-0.1422	-0.1151	-0.0683	0.0438
Na2SO4	0.1243	-0.0083	-0.1745	-0.1522	0.1467	-0.0148	0.0525	0.1319	-0.1634	0.1745
NaCl	-0.2534	-0.0283	0.0007	0.0306	-0.1507	0.0380	0.0632	0.0621	0.0052	-0.2185
(NH4)2SO4	-0.2063	-0.0988	-0.0951	0.0229	0.3362	-0.0192	0.0749	0.1075	-0.0739	0.2692
Glucose	-0.0585	-0.0301	0.1644	0.1768	-0.0541	0.0822	-0.0079	-0.0878	0.1665	0.3543
Fructose	0.0851	-0.1342	-0.0126	0.1425	-0.2335	0.0452	0.0213	0.0072	0.0204	-0.0217
Glycerol	-0.0104	0.0057	0.0238	0.0088	0.0099	-0.0313	-0.0189	-0.0294	0.0193	0.0001
Maltose	-0.0642	0.0014	-0.0459	-0.0444	0.0296	-0.0058	0.0267	0.0491	-0.0452	0.0797
L-malic acid	0.0063	-0.0284	0.0071	0.0340	-0.0540	-0.0313	-0.0173	-0.0252	0.0109	0.0504
Sodium acetate	-0.0059	0.0093	-0.0002	-0.0123	0.0184	-0.0110	-0.0034	-0.0020	-0.0029	-0.0105
Potassium gluconate	-0.0104	0.0057	0.0238	0.0088	0.0099	-0.0313	-0.0189	-0.0294	0.0193	0.0001
Calcium succinate	0.0063	-0.0284	0.0071	0.0340	-0.0540	-0.0313	-0.0173	-0.0252	0.0109	0.0504
MgSO4	-0.0955	0.0062	0.0347	0.0191	0.0393	0.0252	0.0230	0.0092	0.0316	0.0906
MnSO4	0.2145	-0.0185	-0.0181	0.0193	0.0422	-0.0177	0.0004	0.0044	-0.0121	-0.0087
FeSO4	-0.0651	0.0008	0.0421	0.0265	0.0492	0.0342	0.0164	-0.0020	0.0408	0.1128
Fe(NH4)2(SO4)2	-0.0050	-0.0054	0.0184	0.0170	-0.0109	-0.0313	-0.0184	-0.0280	0.0166	0.0165
ZnSO4	-0.0146	0.0150	0.0273	0.0012	0.0275	-0.0296	-0.0183	-0.0290	0.0206	-0.0141
(NH4)6Mo7O24	0.0627	0.0106	0.0235	-0.0070	0.0815	0.0220	-0.0110	-0.0210	0.0224	0.0308
CuSO4	-0.0107	0.0046	0.0242	0.0106	0.0077	-0.0314	-0.0190	-0.0298	0.0199	0.0013
NH4VO3	-0.0104	0.0057	0.0238	0.0088	0.0099	-0.0313	-0.0189	-0.0294	0.0193	0.0001
CoSO4	-0.0093	0.0033	0.0227	0.0106	0.0054	-0.0313	-0.0188	-0.0291	0.0187	0.0036
H3BO3	-0.0131	0.0188	0.0314	0.0005	0.0475	-0.0303	-0.0177	-0.0297	0.0236	-0.0166
CrKSO4	-0.0097	0.0041	0.0231	0.0100	0.0069	-0.0313	-0.0188	-0.0292	0.0189	0.0025
NiSO4	-0.0161	0.0167	0.0295	0.0009	0.0305	-0.0314	-0.0195	-0.0309	0.0222	-0.0163
MgCl2	-0.0411	0.0286	0.0597	0.0251	0.0665	0.0010	-0.0164	-0.0398	0.0501	-0.0587
CaCl2	0.0109	0.0134	0.0260	0.0048	0.0461	0.0126	0.0147	0.0050	0.0222	0.0003
Manganese (II) acetate	0.0231	-0.0071	0.0486	0.0317	-0.0031	-0.0012	-0.1247	-0.1513	0.0505	-0.0031
CoCl2	-0.0057	0.0111	0.0058	-0.0078	0.0210	0.0000	-0.0005	-0.0015	0.0031	-0.0165
MnCl2	0.0497	0.0460	-0.0049	-0.0592	0.1579	0.0309	0.1087	0.1199	-0.0143	0.0082
FeCl3	0.0254	0.0167	0.0157	-0.0016	0.1430	0.0111	0.0162	0.0116	0.0119	-0.0019
NaSeO4	-0.0493	0.0060	0.0436	0.0385	-0.0233	-0.0034	-0.0091	-0.0282	0.0392	-0.0350
Biotin	-0.0010	0.0013	0.0008	-0.0009	0.0024	0.0001	0.0000	-0.0001	0.0004	-0.0018
Pyridoxine	-0.0191	-0.0034	0.0069	0.0074	0.0166	-0.0147	-0.0058	-0.0095	0.0061	0.0028
Niacin	0.0154	0.0078	0.0302	0.0022	0.0936	-0.0059	-0.0172	-0.0304	0.0269	0.0195
Thiamin HCl	0.3631	0.0216	0.0072	0.0032	0.0019	0.0139	0.0125	0.0100	0.0068	0.0525
Vitamin B12	0.5878	-0.0374	-0.0046	0.0173	0.0365	0.0029	0.0148	0.0148	-0.0009	0.0528
Folic acid	-0.0077	0.9718	-0.0132	0.0203	-0.0477	0.0002	0.0020	0.0040	-0.0065	0.0416
DL Aspartic acid	0.0164	-0.0221	0.8907	-0.0693	-0.0306	-0.0344	0.0164	0.0637	-0.1008	0.0441
L-methionine	0.0037	0.0086	-0.0834	0.9122	0.0428	-0.0374	-0.0011	0.0385	-0.0829	0.0084
L-Glutamic acid	0.1159	-0.0051	-0.0035	0.0146	0.5677	-0.0053	-0.0374	-0.0382	-0.0005	-0.0488
L-Alanine	0.0091	-0.0137	-0.0431	-0.0304	-0.0165	0.9513	-0.0347	-0.0177	-0.0402	0.0314
L-Arginine (base)	0.0137	-0.0052	0.0058	-0.0062	0.0019	-0.0389	0.9038	-0.1020	0.0063	0.0092
L-Asparagine	0.0084	0.0009	0.0544	0.0284	0.0087	-0.0240	-0.1059	0.8667	0.0519	-0.0052
L-Cysteine HCl	0.0129	-0.0161	-0.1033	-0.0714	-0.0195	-0.0349	0.0150	0.0605	0.9035	0.0352
L-Glutamine	-0.0617	0.0591	0.0909	0.0152	0.0810	0.0356	-0.0046	-0.0373	0.0749	0.5979
Glycine	0.0122	-0.0031	-0.0473	-0.0498	0.0081	-0.0453	-0.0594	-0.0395	-0.0456	0.0116
L-Histidine (base)	0.0024	0.0155	-0.0561	-0.0764	0.0432	-0.0445	-0.0431	-0.0160	-0.0582	-0.0145
L-Isoleucine	0.0048	-0.0082	-0.0794	-0.0624	-0.0061	-0.0468	0.0041	0.0395	-0.0764	0.0266
L-Leucine	0.0016	0.0179	-0.0062	-0.0407	0.0458	-0.0398	-0.0772	-0.0735	-0.0106	-0.0227
L-Lysine HCl	0.0054	0.0111	-0.0401	-0.0590	0.0342	-0.0401	-0.0553	-0.0366	-0.0415	-0.0106
L-Phenylalanine	0.0021	0.0001	-0.0802	-0.0717	0.0096	-0.0418	0.0071	0.0442	-0.0786	0.0131
L-Proline	0.0078	0.0012	-0.0254	-0.0340	0.0128	-0.0337	-0.0528	-0.0423	-0.0252	0.0025
L-Serine	-0.0496	0.0387	0.0426	-0.0054	0.0488	0.0106	-0.0065	-0.0201	0.0322	-0.3565
L-Threonine	0.0157	-0.0129	-0.0693	-0.0541	-0.0108	-0.0432	-0.0377	-0.0087	-0.0645	0.0276
L-Tryptophan	-0.0010	0.0216	-0.0546	-0.0819	0.0544	-0.0448	-0.0407	-0.0134	-0.0582	-0.0231
L-Tyrosine ethyl ester HCl	0.0140	-0.0084	-0.0678	-0.0573	-0.0026	-0.0394	-0.0354	-0.0064	-0.0638	0.0200
L-Valine	-0.0054	0.0289	-0.0450	-0.0811	0.0668	-0.0406	-0.0374	-0.0133	-0.0505	-0.0346
L-Cysteine	0.0184	0.0024	0.0533	0.0247	0.0147	-0.0012	-0.1252	-0.1525	0.0528	-0.0172
Na2 α,β glycerophosphate	0.0063	-0.0284	0.0071	0.0340	-0.0540	-0.0313	-0.0173	-0.0252	0.0109	0.0504
Potassium phosphate	0.0584	0.0193	0.0278	-0.0135	0.0978	0.0220	-0.0114	-0.0220	0.0245	0.0179
TRIS	0.0195	-0.0285	-0.1124	-0.0646	-0.0425	-0.0344	0.0167	0.0645	-0.1024	0.0535
MOPS acid	0.0254	0.0167	0.0157	-0.0016	0.1430	0.0111	0.0162	0.0116	0.0119	-0.0019

	PC 51	PC 52	PC 53	PC 54	PC 55	PC 56	PC 57	PC 58	PC 59	PC 60
(NH4)2HPO4	0.0872	0.0429	0.0260	0.0890	0.0617	0.0055	0.0726	-0.0268	0.0674	0.0338
KH2PO4	0.0051	0.0172	0.0088	-0.0034	0.0108	0.0169	0.0010	0.0211	0.0120	0.0185
K2HPO4	0.0350	-0.0185	0.0884	0.0073	-0.0115	0.0419	0.0232	-0.0562	0.0395	-0.0287
NH4Cl	0.1078	0.0743	-0.0725	0.1461	0.1086	-0.0626	0.0993	-0.0204	0.0635	0.0668
NaOH	0.0922	0.0951	0.1182	0.0368	0.0771	0.1154	0.0573	-0.3060	0.1167	0.0913
KOH	-0.1217	-0.0789	-0.0402	-0.0906	-0.0945	-0.0309	-0.0919	-0.0089	-0.1186	-0.0652
Na2SO4	-0.0482	-0.0751	-0.0926	0.0194	-0.0479	-0.1077	-0.0182	0.1172	-0.0899	-0.0739
NaCl	0.0519	0.0547	0.0227	0.0685	0.0548	0.0227	0.0445	-0.2074	0.0354	0.0573
(NH4)2SO4	0.0434	0.0888	-0.0401	0.1320	0.0876	-0.0146	0.0530	0.1975	-0.0106	0.1063
Glucose	0.0933	0.1437	0.1562	0.0581	0.1032	0.1670	0.0584	0.4048	0.1133	0.1534
Fructose	0.0722	0.1781	0.0921	0.1576	0.1347	0.1223	0.0673	-0.0534	0.0278	0.2124
Glycerol	-0.0036	-0.0004	-0.0168	-0.0167	-0.0003	-0.0071	-0.0057	-0.0041	0.0056	-0.0024
Maltose	-0.0075	-0.0232	-0.0340	0.0070	-0.0112	-0.0388	-0.0006	0.0647	-0.0187	-0.0255
L-malic acid	0.0048	0.0332	-0.0084	0.0169	0.0248	0.0097	0.0048	0.0295	0.0014	0.0395
Sodium acetate	-0.0069	-0.0138	-0.0136	-0.0127	-0.0100	-0.0136	-0.0060	-0.0113	-0.0036	-0.0164
Potassium gluconate	-0.0036	-0.0004	-0.0168	-0.0167	-0.0003	-0.0071	-0.0057	-0.0041	0.0056	-0.0024
Calcium succinate	0.0048	0.0332	-0.0084	0.0169	0.0248	0.0097	0.0048	0.0295	0.0014	0.0395
MgSO4	0.0293	0.0227	0.0251	0.0154	0.0221	0.0222	0.0199	0.1076	0.0333	0.0199
MnSO4	0.0042	0.0254	-0.0109	0.0264	0.0210	0.0007	0.0072	-0.0294	-0.0068	0.0317
FeSO4	0.0317	0.0326	0.0416	0.0187	0.0268	0.0388	0.0211	0.1326	0.0363	0.0322
Fe(NH4)2(SO4)2	-0.0008	0.0106	-0.0141	-0.0057	0.0079	-0.0016	-0.0023	0.0069	0.0042	0.0113
ZnSO4	-0.0057	-0.0098	-0.0182	-0.0253	-0.0074	-0.0115	-0.0084	-0.0133	0.0065	-0.0141
(NH4)6Mo7O24	0.0012	0.0000	0.0301	-0.0116	-0.0052	0.0239	-0.0027	0.0475	0.0091	-0.0005
CuSO4	-0.0030	0.0012	-0.0162	-0.0156	0.0009	-0.0061	-0.0052	-0.0032	0.0060	-0.0006
NH4VO3	-0.0036	-0.0004	-0.0168	-0.0167	-0.0003	-0.0071	-0.0057	-0.0041	0.0056	-0.0024
CoSO4	-0.0030	0.0020	-0.0162	-0.0143	0.0014	-0.0059	-0.0050	-0.0017	0.0053	0.0005
H3BO3	-0.0049	-0.0113	-0.0192	-0.0277	-0.0081	-0.0126	-0.0083	-0.0139	0.0089	-0.0166
CrKSO4	-0.0032	0.0012	-0.0164	-0.0151	0.0009	-0.0063	-0.0052	-0.0025	0.0054	-0.0004
NiSO4	-0.0062	-0.0111	-0.0194	-0.0275	-0.0084	-0.0124	-0.0091	-0.0150	0.0070	-0.0159
MgCl2	0.0058	-0.0060	0.0160	-0.0318	-0.0067	0.0145	-0.0038	-0.0323	0.0268	-0.0128
CaCl2	0.0180	0.0099	0.0116	0.0047	0.0113	0.0096	0.0115	0.0140	0.0228	0.0066
Manganese (II) acetate	-0.0581	-0.0257	0.0615	-0.0838	-0.0535	0.0598	-0.0563	0.0149	-0.0284	-0.0185
CoCl2	-0.0026	-0.0107	-0.0026	-0.0109	-0.0080	-0.0053	-0.0033	-0.0110	0.0016	-0.0134
MnCl2	0.0536	0.0015	-0.0269	0.0440	0.0284	-0.0397	0.0451	0.0247	0.0437	-0.0124
FeCl3	0.0125	0.0002	0.0045	0.0010	0.0041	0.0006	0.0081	0.0098	0.0161	-0.0038
NaSeO4	0.0126	0.0152	0.0130	-0.0065	0.0114	0.0179	0.0051	-0.0226	0.0236	0.0132
Biotin	-0.0003	-0.0013	-0.0003	-0.0013	-0.0009	-0.0006	-0.0004	-0.0011	0.0003	-0.0016
Pyridoxine	0.0007	0.0053	-0.0082	-0.0007	0.0047	-0.0023	0.0001	-0.0022	0.0022	0.0056
Niacin	0.0006	0.0030	0.0087	-0.0147	-0.0005	0.0116	-0.0035	0.0268	0.0106	0.0017
Thiamin HCl	0.0110	0.0074	0.0104	0.0085	0.0077	0.0076	0.0082	0.0584	0.0106	0.0066
Vitamin B12	0.0157	0.0265	0.0036	0.0285	0.0238	0.0088	0.0146	0.0447	0.0075	0.0300
Folic acid	0.0073	0.0273	0.0067	0.0274	0.0207	0.0134	0.0088	0.0282	-0.0029	0.0340
DL Aspartic acid	-0.0353	-0.0377	-0.0702	0.0128	-0.0242	-0.0694	-0.0149	-0.0036	-0.0621	-0.0340
L-methionine	-0.0484	-0.0691	-0.0711	-0.0282	-0.0516	-0.0768	-0.0305	-0.0220	-0.0591	-0.0724
L-Glutamic acid	-0.0230	-0.0095	0.0105	-0.0204	-0.0176	0.0111	-0.0190	-0.0508	-0.0193	-0.0055
L-Alanine	-0.0404	-0.0303	-0.0452	-0.0237	-0.0284	-0.0369	-0.0279	-0.0004	-0.0444	-0.0272
L-Arginine (base)	-0.0616	-0.0413	-0.0008	-0.0722	-0.0539	0.0039	-0.0531	0.0005	-0.0436	-0.0374
L-Asparagine	-0.0459	-0.0211	0.0324	-0.0759	-0.0411	0.0378	-0.0463	0.0060	-0.0166	-0.0178
L-Cysteine HCl	-0.0360	-0.0422	-0.0707	0.0066	-0.0277	-0.0708	-0.0165	-0.0089	-0.0598	-0.0399
L-Glutamine	0.0159	-0.0188	0.0430	-0.0476	-0.0163	0.0274	-0.0007	-0.3359	0.0482	-0.0324
Glycine	0.9352	-0.0607	-0.0405	-0.0558	-0.0595	-0.0397	-0.0488	-0.0135	-0.0617	-0.0590
L-Histidine (base)	-0.0668	0.9178	-0.0568	-0.0640	-0.0715	-0.0622	-0.0500	-0.0354	-0.0629	-0.0857
L-Isoleucine	-0.0350	-0.0415	0.9274	-0.0057	-0.0276	-0.0688	-0.0187	-0.0134	-0.0506	-0.0413
L-Leucine	-0.0656	-0.0694	-0.0231	0.9164	-0.0700	-0.0257	-0.0556	-0.0271	-0.0466	-0.0719
L-Lysine HCl	-0.0648	-0.0721	-0.0405	-0.0659	0.9327	-0.0443	-0.0504	-0.0269	-0.0574	-0.0739
L-Phenylalanine	-0.0371	-0.0512	-0.0730	-0.0120	-0.0348	0.9269	-0.0208	-0.0221	-0.0512	-0.0530
L-Proline	-0.0508	-0.0478	-0.0251	-0.0502	-0.0483	-0.0249	0.9601	-0.0120	-0.0443	-0.0470
L-Serine	-0.0012	-0.0265	0.0105	-0.0383	-0.0215	0.0007	-0.0080	0.6812	0.0182	-0.0358
L-Threonine	-0.0565	-0.0515	-0.0496	-0.0326	-0.0474	-0.0478	-0.0386	-0.0070	0.9361	-0.0481
L-Tryptophan	-0.0672	-0.0878	-0.0600	-0.0682	-0.0750	-0.0668	-0.0507	-0.0417	-0.0619	0.9071
L-Tyrosine ethyl ester HCl	-0.0562	-0.0551	-0.0482	-0.0350	-0.0499	-0.0485	-0.0387	-0.0111	-0.0625	-0.0527
L-Valine	-0.0632	-0.0888	-0.0567	-0.0710	-0.0749	-0.0651	-0.0489	-0.0469	-0.0550	-0.0957
L-Cysteine	-0.0604	-0.0350	0.0591	-0.0932	-0.0606	0.0551	-0.0593	0.0055	-0.0272	-0.0302
Na2 α,β glycerophosphate	0.0048	0.0332	-0.0084	0.0169	0.0248	0.0097	0.0048	0.0295	0.0014	0.0395
Potassium phosphate	-0.0010	-0.0086	0.0279	-0.0202	-0.0116	0.0196	-0.0054	0.0389	0.0102	-0.0112
TRIS	-0.0338	-0.0315	-0.0687	0.0191	-0.0196	-0.0663	-0.0130	0.0027	-0.0629	-0.0262
MOPS acid	0.0125	0.0002	0.0045	0.0010	0.0041	0.0006	0.0081	0.0098	0.0161	-0.0038

	PC 61	PC 62	PC 63	PC 64	PC 65	PC 66	PC 67
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,0553	0,0211	0,1307	0,0982	0,1907	0,0080	0,0215
KH ₂ PO ₄	0,0159	0,0184	-0,0078	-0,0412	0,0519	0,0284	0,0131
K ₂ HPO ₄	0,0140	-0,0445	-0,0844	0,2311	-0,0218	0,0340	-0,0148
NH ₄ Cl	0,0679	0,0608	0,3510	-0,0605	0,2221	-0,0471	-0,0726
NaOH	0,1121	0,0749	-0,0354	0,0095	-0,0626	0,1595	-0,3064
KOH	-0,1113	-0,0438	-0,1765	-0,0249	0,2660	-0,0906	-0,0829
Na ₂ SO ₄	-0,0954	-0,0620	0,0762	0,0879	-0,1221	-0,1779	-0,2014
NaCl	0,0344	0,0575	0,0558	0,0124	0,1317	-0,0030	0,0858
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,0027	0,1276	0,1390	-0,0846	0,0656	-0,1164	-0,0062
Glucose	0,1153	0,1487	-0,1182	-0,0291	-0,0153	0,1579	-0,0648
Fructose	0,0415	0,2414	-0,0676	-0,0657	-0,0818	-0,0459	0,1175
Glycerol	0,0107	-0,0043	0,0264	-0,0599	0,0152	0,0253	-0,0059
Maltose	-0,0205	-0,0248	0,0507	0,0208	0,0281	-0,0447	-0,0316
L-malic acid	0,0107	0,0460	0,0180	-0,0820	0,0183	0,0002	0,0276
Sodium acetate	-0,0034	-0,0183	0,0146	-0,0073	0,0055	0,0021	-0,0090
Potassium gluconate	0,0107	-0,0043	0,0264	-0,0599	0,0152	0,0253	-0,0059
Calcium succinate	0,0107	0,0460	0,0180	-0,0820	0,0183	0,0002	0,0276
MgSO ₄	0,0310	0,0142	0,0134	0,0104	0,0127	0,0374	-0,0485
MnSO ₄	-0,0007	0,0390	0,0214	-0,0456	0,0549	-0,0251	0,0375
FeSO ₄	0,0338	0,0278	-0,0149	0,0164	-0,0521	0,0431	-0,0392
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	0,0107	0,0120	0,0236	-0,0671	0,0162	0,0171	0,0050
ZnSO ₄	0,0101	-0,0183	0,0273	-0,0505	0,0135	0,0311	-0,0151
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,0055	-0,0031	-0,0527	0,0320	-0,1761	0,0253	0,0001
CuSO ₄	0,0113	-0,0023	0,0263	-0,0615	0,0166	0,0254	-0,0044
NH ₄ VO ₃	0,0107	-0,0043	0,0264	-0,0599	0,0152	0,0253	-0,0059
CoSO ₄	0,0107	-0,0008	0,0258	-0,0615	0,0154	0,0236	-0,0036
H ₃ BO ₃	0,0124	-0,0219	0,0317	-0,0519	0,0113	0,0360	-0,0312
CrKSO ₄	0,0107	-0,0020	0,0260	-0,0610	0,0153	0,0241	-0,0044
NiSO ₄	0,0108	-0,0205	0,0291	-0,0530	0,0145	0,0337	-0,0166
MgCl ₂	0,0255	-0,0224	-0,0110	-0,0113	0,0433	0,0671	-0,0252
CaCl ₂	0,0213	0,0014	0,0172	0,0029	-0,0654	0,0291	0,0143
Manganese (II) acetate	-0,0292	-0,0139	-0,2339	0,0199	-0,0692	0,0467	0,0111
CoCl ₂	0,0003	-0,0162	0,0028	0,0069	-0,0006	0,0086	-0,0110
MnCl ₂	0,0366	-0,0265	0,1687	0,0391	-0,1704	0,0056	-0,0348
FeCl ₃	0,0138	-0,0089	0,0202	0,0115	-0,0258	0,0195	-0,1225
NaSeO ₄	0,0256	0,0090	0,0026	-0,0321	0,0685	0,0457	0,0419
Biotin	0,0001	-0,0019	0,0004	0,0009	0,0001	0,0011	-0,0014
Pyridoxine	0,0053	0,0059	0,0161	-0,0316	0,0185	0,0063	0,0020
Niacin	0,0119	-0,0009	-0,0135	-0,0206	-0,1025	0,0319	-0,0020
Thiamin HCl	0,0089	0,0048	0,0030	0,0140	-0,0004	0,0081	-0,0227
Vitamin B12	0,0099	0,0331	0,0200	-0,0172	0,0408	-0,0086	0,0005
Folic acid	0,0005	0,0406	-0,0055	-0,0179	0,0045	-0,0199	0,0260
DL Aspartic acid	-0,0600	-0,0227	0,0571	0,0058	0,0278	-0,1148	0,0243
L-methionine	-0,0602	-0,0686	0,0410	0,0200	0,0002	-0,0814	-0,0061
L-Glutamic acid	-0,0187	-0,0011	-0,0683	0,0051	0,0501	-0,0062	0,1064
L-Alanine	-0,0388	-0,0197	0,0019	-0,0406	0,0141	-0,0465	0,0159
L-Arginine (base)	-0,0403	-0,0318	-0,1222	-0,0225	-0,0269	0,0044	0,0090
L-Asparagine	-0,0136	-0,0164	-0,1523	-0,0282	-0,0400	0,0545	0,0018
L-Cysteine HCl	-0,0583	-0,0303	0,0582	0,0067	0,0273	-0,1073	0,0182
L-Glutamine	0,0392	-0,0513	-0,0337	0,0473	0,0186	0,1058	-0,0846
Glycine	-0,0598	-0,0522	-0,0527	-0,0049	-0,0054	-0,0482	0,0071
L-Histidine (base)	-0,0640	-0,0831	-0,0206	0,0147	0,0008	-0,0524	-0,0114
L-Isoleucine	-0,0471	-0,0345	0,0661	-0,0212	0,0316	-0,0814	0,0101
L-Leucine	-0,0467	-0,0715	-0,0816	0,0002	-0,0186	-0,0019	-0,0139
L-Lysine HCl	-0,0578	-0,0708	-0,0490	0,0106	-0,0079	-0,0375	-0,0071
L-Phenylalanine	-0,0497	-0,0480	0,0647	-0,0048	0,0285	-0,0802	0,0021
L-Proline	-0,0431	-0,0429	-0,0529	-0,0036	-0,0087	-0,0252	0,0019
L-Serine	0,0129	-0,0470	-0,0115	0,0267	0,0329	0,0525	-0,0626
L-Threonine	-0,0614	-0,0388	-0,0217	-0,0043	0,0049	-0,0726	0,0163
L-Tryptophan	-0,0636	-0,0919	-0,0139	0,0181	0,0018	-0,0494	-0,0175
L-Tyrosine ethyl ester HCl	0,9389	-0,0446	-0,0225	0,0045	0,0029	-0,0700	0,0119
L-Valine	-0,0577	0,0300	-0,0103	0,0224	0,0008	-0,0380	-0,0250
L-Cysteine	-0,0292	-0,0279	0,7684	0,0260	-0,0701	0,0537	0,0017
Na ₂ α,β glycerophosphate	0,0107	0,0460	0,0180	0,9180	0,0183	0,0002	0,0276
Potassium phosphate	0,0055	-0,0160	-0,0506	0,0377	0,8231	0,0317	-0,0085
TRIS	-0,0600	-0,0134	0,0555	0,0017	0,0283	0,8805	0,0305
MOPS acid	0,0138	-0,0089	0,0202	0,0115	-0,0258	0,0195	0,8775

Annexe 5

**Data matrix for the principal component analysis of media from literature
and flask experiments**

	(NH4)2HPO4	KH2PO4	K2HPO4	NH4Cl	NaOH	KOH	Na2SO4	NaCl	(NH4)2SO4	Na2HPO4
Raj 1960	3,79E-03	3,67E-03	2,87E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little 1973	3,79E-03	3,67E-03	2,87E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Shapiro 1977	0,00E+00	5,88E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Venkateswaran 2000	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Holland 2006	0,00E+00	7,70E-04	1,23E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MCD published	0,00E+00	2,20E-02	1,44E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Brim 2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Kongpol 2008	0,00E+00	2,50E-02	2,47E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,51E-02	0,00E+00
DMG	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMGMn	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG µN	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G	6,06E-02	0,00E+00	4,59E-02	2,43E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,68E-03	1,41E-02
MM2X F	6,06E-02	0,00E+00	4,59E-02	2,43E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,68E-03	1,41E-02
MM2X S	6,06E-02	0,00E+00	4,59E-02	2,43E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,68E-03	1,41E-02
MM2X Ac	6,06E-02	0,00E+00	4,59E-02	2,43E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,68E-03	1,41E-02
MM2X Lac	6,06E-02	0,00E+00	4,59E-02	2,43E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,68E-03	1,41E-02
MM2X G Vit mm	6,06E-02	0,00E+00	4,59E-02	2,43E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,68E-03	1,41E-02
MM2X G Vit yeast	6,06E-02	0,00E+00	4,59E-02	2,43E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,68E-03	1,41E-02
DM Arg	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Glu	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Arg	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Glu	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM G	3,03E-02	0,00E+00	2,30E-02	1,22E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,68E-03	7,04E-03
Little	3,79E-03	3,67E-03	2,87E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM/2 G	1,51E-02	0,00E+00	1,15E-02	6,08E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,42E-03	3,52E-03
DMG modif	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	4,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little modif	1,89E-02	3,67E-03	2,87E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Gluconic acid	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Wolin 1957	0,00E+00	0,00E+00	1,15E-02	1,87E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1960	0,00E+00	3,67E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1963	0,00E+00	1,47E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	8,56E-02	0,00E+00	0,00E+00
DMG YE 5	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE 5	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MCD	0,00E+00	2,20E-02	1,44E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little CA	3,79E-03	3,67E-03	2,87E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G CA 2.5	6,06E-02	0,00E+00	4,59E-02	2,43E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,68E-03	1,41E-02
MM2X G CA 5	6,06E-02	0,00E+00	4,59E-02	2,43E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,68E-03	1,41E-02
DMG YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
CMG	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM P	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMGP	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE P	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
CMG Fe	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X wo vit	6,06E-02	0,00E+00	4,59E-02	2,43E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,68E-03	1,41E-02
DMG lipids	0,00E+00	0,00E+00	5,74E-03	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	2,76E-04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

	Dgluconic acid sodium salt	Calcium succinate	MgSO4	MnSO4	FeSO4	Fe(NH4)2(SO4)2	ZnSO4	(NH4)6 Mo7O24	CuSO4	CuCl2
Raj 1960	0,00E+00	0,00E+00	8,12E-04	3,86E-05	3,60E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little 1973	0,00E+00	0,00E+00	8,12E-04	2,93E-05	3,60E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Shapiro 1977	0,00E+00	1,26E-04	1,33E-03	4,67E-05	0,00E+00	1,11E-04	3,90E-05	1,49E-06	3,20E-06	0,00E+00
Venkateswaran 2000	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	5,00E-03	0,00E+00	0,00E+00
Holland 2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
MCD published	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,96E-05	0,00E+00	1,74E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Brim 2003	0,00E+00	0,00E+00	8,00E-04	0,00E+00	5,00E-03	0,00E+00	0,00E+00	5,00E-03	0,00E+00	0,00E+00
Kongpol 2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,16E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,27E-08	0,00E+00
DMG	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DMG Mn	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DMG µN	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-05	3,00E-06	1,00E-05	0,00E+00
MM2X G	0,00E+00	0,00E+00	7,23E-03	1,18E-04	1,44E-04	0,00E+00	1,39E-05	0,00E+00	0,00E+00	1,17E-05
MM2X F	0,00E+00	0,00E+00	7,23E-03	1,18E-04	1,44E-04	0,00E+00	1,39E-05	0,00E+00	0,00E+00	1,17E-05
MM2X S	0,00E+00	0,00E+00	7,23E-03	1,18E-04	1,44E-04	0,00E+00	1,39E-05	0,00E+00	0,00E+00	1,17E-05
MM2X Ac	0,00E+00	0,00E+00	7,23E-03	1,18E-04	1,44E-04	0,00E+00	1,39E-05	0,00E+00	0,00E+00	1,17E-05
MM2X Lac	0,00E+00	0,00E+00	7,23E-03	1,18E-04	1,44E-04	0,00E+00	1,39E-05	0,00E+00	0,00E+00	1,17E-05
MM2X G Vit mm	0,00E+00	0,00E+00	7,23E-03	1,18E-04	1,44E-04	0,00E+00	1,39E-05	0,00E+00	0,00E+00	1,17E-05
MM2X G Vit yeast	0,00E+00	0,00E+00	7,23E-03	1,18E-04	1,44E-04	0,00E+00	1,39E-05	0,00E+00	0,00E+00	1,17E-05
DM Arg	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DM Glu	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DMG Arg	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DMG Glu	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
MM G	0,00E+00	0,00E+00	3,61E-03	5,92E-05	7,20E-05	0,00E+00	6,96E-06	0,00E+00	0,00E+00	5,87E-06
Little	0,00E+00	0,00E+00	8,12E-04	4,50E-05	3,60E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2 G	0,00E+00	0,00E+00	1,81E-03	2,96E-05	3,60E-05	0,00E+00	3,48E-06	0,00E+00	0,00E+00	2,93E-06
DMG modif	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
Little modif	0,00E+00	0,00E+00	8,12E-04	4,50E-05	3,60E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Gluconic acid	2,29E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
Wolin 1957	0,00E+00	0,00E+00	4,06E-04	0,00E+00	1,44E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1960	0,00E+00	0,00E+00	1,66E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1963	0,00E+00	0,00E+00	4,15E-02	0,00E+00	1,80E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG YE 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DM YE 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
MCD	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,96E-05	0,00E+00	1,74E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little CA	0,00E+00	0,00E+00	8,12E-04	2,93E-05	3,60E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G CA 2.5	0,00E+00	0,00E+00	7,23E-03	1,18E-04	1,44E-04	0,00E+00	1,39E-05	0,00E+00	0,00E+00	1,17E-05
MM2X G CA 5	0,00E+00	0,00E+00	7,23E-03	1,18E-04	1,44E-04	0,00E+00	1,39E-05	0,00E+00	0,00E+00	1,17E-05
DMG YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DM YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DMG T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DM T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
CMG	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DM P	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DMGP	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
DM YE P	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
CMG Fe	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00
MM2X wo vit	0,00E+00	0,00E+00	7,23E-03	1,18E-04	1,44E-04	0,00E+00	1,39E-05	0,00E+00	0,00E+00	1,17E-05
DMG lipids	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,00E-08	3,00E-09	1,00E-08	0,00E+00

	NH4VO3	CoSO4	H3BO3	CrKSO4	NiSO4	MgCl2	CaCl2	Manganese (II) acetate	CoCl2	MnCl2
Raj 1960	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little 1973	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Shapiro 1977	1,97E-06	8,54E-07	4,69E-06	1,21E-06	8,75E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Venkateswaran 2000	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,00E-04	1,00E-04	5,00E-03	0,00E+00	0,00E+00
Holland 2006	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
MCD published	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,84E-04	3,40E-04	0,00E+00	1,05E-05	0,00E+00
Brim 2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,80E-04	0,00E+00	0,00E+00	5,40E-03
Kongpol 2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,80E-09	1,67E-03	1,77E-04	0,00E+00	8,41E-08	5,98E-06
DMG	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
DMG Mn	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	1,00E-04
DMG µN	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-04	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-01	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-05	2,50E-04
MM2X G	0,00E+00	0,00E+00	1,62E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,72E-04	0,00E+00	3,36E-05	0,00E+00
MM2X F	0,00E+00	0,00E+00	1,62E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,72E-04	0,00E+00	3,36E-05	0,00E+00
MM2X S	0,00E+00	0,00E+00	1,62E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,72E-04	0,00E+00	3,36E-05	0,00E+00
MM2X Ac	0,00E+00	0,00E+00	1,62E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,72E-04	0,00E+00	3,36E-05	0,00E+00
MM2X Lac	0,00E+00	0,00E+00	1,62E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,72E-04	0,00E+00	3,36E-05	0,00E+00
MM2X G Vit mm	0,00E+00	0,00E+00	1,62E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,72E-04	0,00E+00	3,36E-05	0,00E+00
MM2X G Vit yeast	0,00E+00	0,00E+00	1,62E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,72E-04	0,00E+00	3,36E-05	0,00E+00
DM Arg	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
DM Glu	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
DMG Arg	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
DMG Glu	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
MM G	0,00E+00	0,00E+00	8,09E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,36E-04	0,00E+00	1,68E-05	0,00E+00
Little	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2 G	0,00E+00	0,00E+00	4,04E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	6,80E-05	0,00E+00	8,41E-06	0,00E+00
DMG modif	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
Little modif	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Gluconic acid	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
Wolin 1957	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,20E-05
McDonald 1960	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1963	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG YE 5	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
DM YE 5	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
MCD	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	9,84E-04	3,40E-04	0,00E+00	1,05E-05	0,00E+00
Little CA	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G CA 2.5	0,00E+00	0,00E+00	1,62E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,72E-04	0,00E+00	3,36E-05	0,00E+00
MM2X G CA 5	0,00E+00	0,00E+00	1,62E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,72E-04	0,00E+00	3,36E-05	0,00E+00
DMG YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
DM YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
DMG T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
DM T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
CMG	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
DM P	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
DMGP	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
DM YE P	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
CMG Fe	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07
MM2X wo vit	0,00E+00	0,00E+00	1,62E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,72E-04	0,00E+00	3,36E-05	0,00E+00
DMG lipids	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,28E-04	5,00E-07	0,00E+00	3,00E-08	2,50E-07

	FeCl3	Na2MoO4	NaSeO4	Biotin	Pyridoxin	Niacin	Thiamin HCl	P-amino benzoic acid	Inosin	Orotic acid
Raj 1960	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-08	9,73E-07	2,03E-06	1,48E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little 1973	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-08	9,73E-07	2,03E-06	2,96E-08	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Shapiro 1977	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	3,68E-08	5,35E-06	1,14E-05	8,89E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Venkateswaran 2000	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	8,12E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Holland 2006	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MCD published	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-05	9,73E-06	8,12E-06	2,96E-06	7,29E-05	1,86E-05	3,20E-05
Brim 2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	8,12E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Kongpol 2008	0,00E+00	0,00E+00	6,03E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Mn	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG µN	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G	0,00E+00	1,67E-05	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X F	0,00E+00	1,67E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X S	0,00E+00	1,67E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X Ac	0,00E+00	1,67E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X Lac	0,00E+00	1,67E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G Vit mm	0,00E+00	1,67E-05	0,00E+00	2,05E-07	4,86E-06	1,08E-04	2,96E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G Vit yeast	0,00E+00	1,67E-05	0,00E+00	3,27E-06	6,47E-05	0,00E+00	3,94E-05	1,97E-05	0,00E+00	0,00E+00
DM Arg	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Glu	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Arg	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Glu	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM G	0,00E+00	8,37E-06	0,00E+00	4,09E-06	4,86E-06	8,12E-06	2,96E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-08	9,73E-07	2,03E-06	2,96E-08	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2 G	0,00E+00	4,19E-06	0,00E+00	2,05E-07	4,86E-06	8,12E-06	2,96E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG modif	4,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little modif	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-08	9,73E-07	2,03E-06	2,96E-08	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Gluconic acid	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Wolin 1957	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-08	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1960	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,64E-08	0,00E+00	0,00E+00	1,19E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1963	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,64E-07	0,00E+00	0,00E+00	5,93E-06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG YE 5	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE 5	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MCD	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-05	9,73E-06	8,12E-06	2,96E-06	7,29E-05	1,86E-05	3,20E-05
Little CA	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-08	9,73E-07	2,03E-06	2,96E-08	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G CA 2.5	0,00E+00	1,67E-05	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G CA 5	0,00E+00	1,67E-05	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG YE 2.5	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE 2.5	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG T 2.5	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM T 2.5	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
CMG	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM P	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMGP	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE P	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
CMG Fe	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X wo vit	0,00E+00	1,67E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG lipids	2,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,09E-09	4,86E-09	8,12E-09	2,96E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

	Calcium pantothenate	Pyridoxamin	Riboflavin	D,L 6-8 thioctic acid	Vitamin B12	Folic acid	Meso inositol	Adenine	Guanine	Uracile
Raj 1960	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little 1973	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,48E-07	2,27E-08	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Shapiro 1977	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	5,90E-09	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Venkateswaran 2000	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Holland 2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-12	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MCD published	2,10E-06	2,97E-05	2,66E-06	1,21E-05	7,38E-07	2,27E-06	0,00E+00	3,70E-05	6,62E-06	4,46E-05
Brim 2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Kongpol 2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Mn	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG µN	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X F	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X S	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X Ac	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X Lac	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G Vit mm	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G Vit yeast	3,36E-05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,85E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Arg	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Glu	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Arg	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Glu	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM G	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,48E-07	2,27E-08	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM/2 G	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-07	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG modif	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little modif	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,48E-07	2,27E-08	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Gluconic acid	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Wolin 1957	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1960	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1963	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG YE 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MCD	2,10E-06	2,97E-05	2,66E-06	1,21E-05	7,38E-07	2,27E-06	0,00E+00	7,40E-05	6,62E-05	8,92E-05
Little CA	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,48E-07	2,27E-08	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G CA 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G CA 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
CMG	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM P	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG P	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE P	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
CMG Fe	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X wo vit	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG lipids	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,38E-10	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

	L-Tyrosine ethyl ester HCl	L-Valine	L-Cystéine	Na2 α,β glycerophosphate	Ammonium citrate	Potassium phosphate	TRIS	MOPS acid	YE	Tryptone
Raj 1960	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little 1973	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Shapiro 1977	8,14E-04	1,71E-03	0,00E+00	5,09E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Venkateswaran 2000	1,10E-03	1,71E-03	2,52E-04	0,00E+00	0,00E+00	2,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Holland 2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	0,00E+00	0,00E+00
MCD published	1,60E-03	2,82E-03	0,00E+00	0,00E+00	2,65E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Brim 2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,00E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Kongpol 2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	0,00E+00	0,00E+00
DMG Mn	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG µN	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X F	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X S	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X Ac	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X Lac	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G Vit mm	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G Vit yeast	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Arg	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Glu	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Arg	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Glu	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM G	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2 G	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG modif	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little modif	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Gluconic acid	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Wolin 1957	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1960	2,76E-03	4,27E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,13E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1963	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG YE 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	5,00E+00	0,00E+00
DM YE 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	5,00E+00	0,00E+00
MCD	1,60E-03	2,82E-03	0,00E+00	0,00E+00	2,65E-03	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little CA	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G CA 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G CA 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	2,50E+00	0,00E+00
DM YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	2,50E+00	0,00E+00
DMG T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	0,00E+00	2,50E+00
DM T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	0,00E+00	2,50E+00
CMG	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	5,00E+00	0,00E+00
DM P	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	0,00E+00	0,00E+00
DMG P	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	0,00E+00	0,00E+00
DM YE P	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	5,00E+00	0,00E+00
CMG Fe	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	5,00E+00	0,00E+00
MM2X wo vit	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG lipids	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-02	0,00E+00	0,00E+00

	Peptone	CA vf	Lipids
Raj 1960	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little 1973	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Shapiro 1977	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Venkateswaran 2000	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Holland 2006	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MCD published	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Brim 2003	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Kongpol 2008	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Mn	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG µN	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X F	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X S	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X Ac	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X Lac	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G Vit mm	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X G Vit yeast	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Arg	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Glu	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Arg	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG Glu	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM G	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM/2 G	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG modif	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little modif	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM Gluconic acid	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Wolin 1957	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1960	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
McDonald 1963	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG YE 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE 5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MCD	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Little CA	0,00E+00	1,00E+00	0,00E+00
MM2X G CA 2.5	0,00E+00	2,50E+00	0,00E+00
MM2X G CA 5	0,00E+00	5,00E+00	0,00E+00
DMG YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM T 2.5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
CMG	2,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM P	2,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG P	2,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DM YE P	2,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
CMG Fe	2,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
MM2X wo vit	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
DMG lipids	0,00E+00	0,00E+00	5,00E-01

Annexe 6

**Component coefficient matrix of the principal component analysis of media
from literature and flask experiments**

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PC 8	PC 9	PC 10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-0.0283	-0.0966	0.2514	0.0319	-0.0735	-0.0784	-0.0475	-0.0303	-0.1200	-0.0327
K ₂ HPO ₄	0.1264	-0.0966	-0.0300	-0.0170	0.0715	0.2171	-0.0212	0.0005	0.1485	0.2809
K ₂ HPO ₄	-0.0170	-0.1239	0.2347	0.0086	-0.0911	-0.0769	-0.0584	-0.0362	-0.0895	0.0622
NH ₄ Cl	-0.0852	0.0335	-0.1906	-0.0792	-0.1304	-0.0848	0.0291	0.0137	-0.1611	0.0028
NaOH	-0.0792	0.0425	-0.2123	-0.0822	-0.1238	-0.0938	0.0348	0.0174	-0.1660	0.0471
KOH	-0.0792	0.0425	-0.2123	-0.0822	-0.1238	-0.0938	0.0348	0.0174	-0.1660	0.0471
Na ₂ SO ₄	-0.0792	0.0425	-0.2123	-0.0822	-0.1238	-0.0938	0.0348	0.0174	-0.1660	0.0471
NaCl	-0.0035	0.0031	0.0066	0.0565	0.1246	0.4056	0.0737	0.0847	-0.2706	-0.0028
(NH ₄) ₂ SO ₄	-0.0235	-0.0818	0.2017	0.0298	-0.0282	-0.0092	-0.0719	-0.0522	0.1407	0.3253
Na ₂ HPO ₄	-0.0268	-0.0953	0.2491	0.0308	-0.0776	-0.0846	-0.0449	-0.0282	-0.1444	-0.0202
Glucose	-0.0038	-0.0941	-0.0136	-0.0786	-0.1178	-0.0395	0.0530	0.0760	0.1310	-0.3696
Fructose	-0.0042	-0.0094	0.0504	0.0370	0.1049	-0.1003	-0.0432	-0.0141	-0.1496	0.2017
Glycerol	0.0677	0.2046	0.0912	-0.1711	-0.0023	0.0327	0.0011	-0.0224	-0.0019	0.0010
Sucrose	-0.0081	-0.0229	0.0676	0.0120	-0.0149	-0.0209	-0.0765	-0.0141	-0.0937	0.0740
Lactic acid	-0.0081	-0.0229	0.0676	0.0120	-0.0149	-0.0209	-0.0765	-0.0141	-0.0937	0.0740
Acetic acid	-0.0081	-0.0229	0.0676	0.0120	-0.0149	-0.0209	-0.0765	-0.0141	-0.0937	0.0740
Maltose	0.0538	0.0639	-0.0078	0.2285	-0.0460	0.2946	0.0373	0.0606	-0.1634	-0.0084
L-malic acid	0.0677	0.2046	0.0912	-0.1711	-0.0023	0.0327	0.0011	-0.0224	-0.0019	0.0010
Sodium acetate	0.1821	-0.0921	-0.0392	-0.0976	-0.0051	0.0183	-0.0146	-0.0015	-0.0184	-0.0068
Potassium gluconate	0.0677	0.2046	0.0912	-0.1711	-0.0023	0.0327	0.0011	-0.0224	-0.0019	0.0010
D gluconic acid sodium salt	-0.0124	0.0072	-0.0308	-0.0086	-0.0078	-0.0019	-0.0009	-0.0099	0.0134	0.0521
Calcium succinate	0.0677	0.2046	0.0912	-0.1711	-0.0023	0.0327	0.0011	-0.0224	-0.0019	0.0010
MgSO ₄	-0.0114	-0.0318	0.1232	0.0728	0.0796	0.3448	0.0467	0.0651	-0.3028	-0.0198
MnSO ₄	-0.0269	-0.0514	0.1888	-0.0039	-0.0788	-0.0678	-0.0397	-0.0318	-0.0885	-0.0876
FeSO ₄	0.0032	0.0132	0.0106	0.0883	0.2465	0.3133	0.0932	0.0931	-0.2472	-0.0295
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	0.0677	0.2046	0.0912	-0.1711	-0.0023	0.0327	0.0011	-0.0224	-0.0019	0.0010
ZnSO ₄	0.0981	0.0180	0.2119	-0.1407	-0.0628	-0.0421	-0.0404	0.0634	-0.1085	-0.0048
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.0183	0.0345	-0.0022	0.0939	0.3547	-0.1864	0.0674	0.0380	0.0268	-0.0720
CuSO ₄	0.0090	0.0703	0.0090	-0.0821	-0.0559	-0.0463	-0.0200	0.5193	0.0215	0.0655
CuCl ₂	-0.0268	-0.0953	0.2491	0.0308	-0.0776	-0.0846	-0.0449	-0.0282	-0.1444	-0.0202
NH ₄ VO ₃	0.0677	0.2046	0.0912	-0.1711	-0.0023	0.0327	0.0011	-0.0224	-0.0019	0.0010
CoSO ₄	0.0677	0.2046	0.0912	-0.1711	-0.0023	0.0327	0.0011	-0.0224	-0.0019	0.0010
H ₃ BO ₃	-0.0146	-0.0006	0.0098	-0.0295	-0.0670	-0.0688	-0.0262	0.5474	0.0044	0.0628
CrKSO ₄	0.0677	0.2046	0.0912	-0.1711	-0.0023	0.0327	0.0011	-0.0224	-0.0019	0.0010
NiSO ₄	0.0676	0.2046	0.0913	-0.1710	-0.0021	0.0330	0.0009	-0.0226	-0.0004	0.0032
MgCl ₂	-0.0118	0.0076	-0.0200	-0.0311	-0.0575	-0.0591	-0.0211	0.5491	0.0219	0.0665
CaCl ₂	0.0696	-0.1564	0.1968	-0.0007	0.0194	-0.0872	-0.0453	-0.0241	-0.0539	0.0603
Manganese (II) acetate	0.0303	0.0432	-0.0038	0.0975	0.3003	-0.2284	0.0738	0.0255	-0.1169	0.0030
CoCl ₂	-0.0050	-0.1117	0.2309	0.0075	-0.0929	-0.0996	-0.0527	0.1422	-0.1386	-0.0004
MnCl ₂	-0.0056	0.0055	-0.0007	0.0324	0.1932	-0.0349	0.0196	0.0258	0.1564	-0.1011
FeCl ₃	-0.0770	0.0401	-0.2030	-0.0802	-0.1249	-0.0944	0.0323	0.0150	-0.1646	0.0258
Na ₂ MoO ₄	-0.0268	-0.0953	0.2491	0.0308	-0.0776	-0.0846	-0.0449	-0.0282	-0.1444	-0.0202
NaSeO ₄	-0.0040	-0.0116	0.0158	0.0093	0.0423	0.0756	-0.0508	-0.0429	0.3369	0.5019
Biotin	0.1660	-0.1381	-0.0461	-0.0876	0.0040	0.0120	0.0121	0.0018	-0.0118	-0.0110
Pyridoxin	0.0349	-0.0567	0.0962	-0.0305	-0.0851	-0.0307	0.4550	-0.0055	0.0660	0.0192
Niacin	0.0204	-0.0209	0.0768	-0.0144	0.0266	-0.0336	-0.0488	-0.0057	0.0525	-0.2441
Thiamin HCl	0.0158	-0.0521	0.0975	0.0048	-0.0743	0.0253	0.4699	0.0084	0.0250	0.0219
P-aminobenzoic acid	0.1638	-0.1407	-0.0357	-0.0866	-0.0085	0.0047	0.0767	0.0020	-0.0126	0.0045
Inosin	0.1665	-0.1344	-0.0541	-0.0879	0.0087	0.0124	-0.0134	0.0023	-0.0212	-0.0064
Orotic acid	0.1665	-0.1344	-0.0541	-0.0879	0.0087	0.0124	-0.0134	0.0023	-0.0212	-0.0064
Calcium panthotenate	0.0110	-0.0535	0.0880	-0.0068	-0.0891	-0.0383	0.4701	-0.0017	0.0420	0.0563
Pyridoxamine	0.1665	-0.1344	-0.0541	-0.0879	0.0087	0.0124	-0.0134	0.0023	-0.0212	-0.0064
Riboflavin	0.1665	-0.1344	-0.0541	-0.0879	0.0087	0.0124	-0.0134	0.0023	-0.0212	-0.0064
D,L-6-8 thioctic acid	0.1665	-0.1344	-0.0541	-0.0879	0.0087	0.0124	-0.0134	0.0023	-0.0212	-0.0064
Vitamin B12	0.1004	-0.1153	0.0195	-0.0543	0.0146	0.0233	-0.0507	-0.0121	0.1481	-0.2273
Folic acid	0.1665	-0.1346	-0.0541	-0.0878	0.0094	0.0134	-0.0137	0.0021	-0.0175	-0.0081
Meso inositol	-0.0036	-0.0418	0.0929	0.0009	-0.0900	-0.0395	0.4718	-0.0019	0.0439	0.0569
Adenine	0.1610	-0.1322	-0.0534	-0.0886	0.0092	0.0134	-0.0147	0.0027	-0.0263	-0.0086
Guanine	0.1344	-0.1129	-0.0459	-0.0781	0.0086	0.0129	-0.0144	0.0027	-0.0267	-0.0100
Uracile	0.1610	-0.1322	-0.0534	-0.0886	0.0092	0.0134	-0.0147	0.0027	-0.0263	-0.0086
Xanthine	0.1610	-0.1322	-0.0534	-0.0886	0.0092	0.0134	-0.0147	0.0027	-0.0263	-0.0086
Thymidine	0.1665	-0.1344	-0.0541	-0.0879	0.0087	0.0124	-0.0134	0.0023	-0.0212	-0.0064
DL Aspartic acid	0.0788	0.0863	-0.0174	0.2632	-0.1889	0.0066	-0.0215	0.0000	0.0419	-0.0089
L-Methionine	0.1435	0.0855	-0.0167	0.2107	-0.0933	-0.0115	-0.0065	0.0063	0.0242	-0.0231
L-Glutamic acid	-0.0039	0.0267	-0.0136	0.0460	0.0689	0.2842	0.0319	0.0400	-0.0140	-0.0928
L-Alanine	0.1680	0.1529	0.0323	0.0205	-0.0453	-0.0173	-0.0013	-0.0095	-0.0102	-0.0065
L-Arginine (base)	0.0248	0.0733	-0.0268	0.0040	0.0330	-0.0603	0.0205	-0.0045	0.0017	-0.0205
L-Asparagine	0.1317	0.1122	0.0369	-0.0841	0.2027	-0.1259	0.0448	0.0030	-0.0878	0.0001
L-Cysteine HCl	0.1470	0.0282	-0.0360	0.1959	-0.1690	0.0126	-0.0255	0.0002	0.0290	-0.0109
L-Glutamine	0.0743	-0.0425	-0.0599	-0.0226	0.0797	-0.0894	0.0155	-0.0292	-0.1922	0.2942
Glycine	0.1609	0.1269	0.0069	0.1315	-0.0044	-0.0779	0.0127	0.0022	-0.0292	-0.0071
L-Histidine (base)	0.1458	0.1245	0.0007	0.1794	-0.0512	-0.0631	0.0053	0.0022	-0.0128	-0.0079
L-Isoleucine	0.1684	0.1060	0.0056	0.0882	-0.1469	0.0262	-0.0224	-0.0096	0.0229	-0.0095
L-Leucine	0.1895	0.0753	-0.0005	0.0354	0.0577	-0.0828	0.0171	0.0030	-0.0501	-0.0064
L-Lysine HCl	0.1901	0.0512	-0.0188	0.0997	-0.0008	-0.0667	0.0066	0.0045	-0.0324	-0.0084
L-Phenylalanine	0.1818	0.0483	-0.0179	0.0968	-0.1407	0.0226	-0.0243	-0.0054	0.0189	-0.0104
L-Proline	0.2024	0.0043	-0.0249	0.0195	0.0209	-0.0500	0.0037	0.0031	-0.0374	-0.0079
L-Serine	0.1112	0.0481	-0.0390	0.0478	0.0086	-0.0799	0.0089	-0.0313	-0.1641	0.2677
L-Threonine	0.1767	0.0777	-0.0135	0.1391	-0.0503	-0.0500	-0.0001	0.0022	-0.0151	-0.0090
L-Tryptophan	0.1247	0.1471	0.0088	0.1955	-0.0604	-0.0618	0.0058	0.0014	-0.0075	-0.0073
L-Tyrosine ethyl ester HCl	0.1840	0.0410	-0.0269	0.1349	-0.0466	-0.0487	-0.0019	0.0041	-0.0169	-0.0094
L-Valine	0.1907	0.0430	-0.0227	0.1071	-0.0432	-0.0423	-0.0027	0.0024	-0.0177	-0.0093
L-Cysteine	0.0303	0.0432	-0.0038	0.0975	0.3003	-0.2284	0.0738	0.0255	-0.1169	0.0030
Na ₂ α,β glycerophosphate	0.0677	0.2046	0.0912	-0.1711	-0.0023	0.0327	0.0011	-0.0224	-0.0019	0.0010
Ammonium citrate	0.1665	-0.1344	-0.0541	-0.0879	0.0087	0.0124	-0.0134	0.0023	-0.0212	-0.0064
Potassium phosphate TRIS	0.0182	0.0345	-0.0022	0.0940	0.3547	-0.1864	0.0674	0.0378	0.0268	-0.0720
MOPS acid	-0.0563	0.0297	-0.1631	-0.0590	-0.0915	-0.0738	0.0378	-0.1475	-0.2076	0.0689
YE	-0.0371	0.0191	-0.1047	-0.0402	-0.0700	-0.0443	0.0276	-0.1108	-0.1426	-0.0241
Tryptone	-0.0189	0.0098	-0.0514	-0.0186	-0.0289	-0.0172	0.0098	-0.0394	-0.0348	0.0164
Peptone	-0.0321	0.0165	-0.0911	-0.0354	-0.0626	-0.0399	0.0251	-0.1007	-0.1328	-0.0265
CA vf	-0.0121	-0.0341	0.0899	0.0127	-0.0263	-0.0242	-0.0980	-0.0067	-0.0416	-0.0996
Lipids	-0.0132	0.0056	-0.0361	-0.0147	-0.0248	-0.0140	0.0099	-0.0216	-0.0077	-0.0557

	PC 11	PC 12	PC 13	PC 14	PC 15	PC 16	PC 17	PC 18	PC 19	PC 20
(NH4)2HPO4	0,0088	0,0018	-0,0035	0,0035	0,0072	-0,0019	-0,0019	0,0000	0,0000	0,0034
KH2PO4	-0,0805	0,1398	0,0102	0,0073	0,0834	-0,0909	-0,0150	0,0000	0,0000	-0,0156
K2HPO4	-0,0169	0,0627	-0,0462	0,0186	0,0454	-0,0407	-0,0048	0,0000	0,0000	-0,0082
NH4Cl	-0,0361	-0,0577	-0,1139	0,0379	0,0416	-0,1002	-0,0049	0,0000	0,0000	-0,0484
NaOH	0,0017	0,0040	-0,0771	0,0795	0,0954	-0,1213	-0,0214	0,0000	0,0000	-0,0252
KOH	0,0017	0,0040	-0,0771	0,0795	0,0954	-0,1213	-0,0214	0,0000	0,0000	-0,0252
Na2SO4	0,0017	0,0040	-0,0771	0,0795	0,0954	-0,1213	-0,0214	0,0000	0,0000	-0,0252
NaCl	-0,0404	0,0548	0,0090	0,0463	0,0848	-0,0889	-0,0196	0,0000	0,0000	-0,0084
(NH4)2SO4	-0,0776	0,1779	0,0074	0,0564	0,1328	-0,1327	-0,0181	0,0000	0,0000	-0,0233
Na2HPO4	0,0166	0,0113	-0,0140	0,0166	0,0256	-0,0221	-0,0050	0,0000	0,0000	-0,0007
Glucose	-0,2042	0,0501	0,1838	-0,2299	0,0943	-0,1248	0,0030	0,0000	0,0000	-0,0330
Fructose	0,2035	-0,2059	0,1714	-0,0377	-0,0484	-0,1009	-0,0132	0,0000	0,0000	-0,0545
Glycerol	0,0238	0,0010	0,0023	-0,0039	0,0101	-0,0088	-0,0015	0,0000	0,0000	0,0035
Sucrose	0,0497	0,0211	-0,1633	0,0887	-0,0553	0,2207	0,1663	-0,6209	-0,5303	-0,0424
Lactic acid	0,0497	0,0211	-0,1633	0,0887	-0,0553	0,2207	0,1663	0,7697	-0,2726	-0,0424
Acetic acid	0,0497	0,0211	-0,1633	0,0887	-0,0553	0,2207	0,1663	-0,1488	0,8028	-0,0424
Maltose	0,0190	0,0319	0,0131	0,0392	0,0702	-0,0766	-0,0156	0,0000	0,0000	-0,0117
L-malic acid	0,0238	0,0010	0,0023	-0,0039	0,0101	-0,0088	-0,0015	0,0000	0,0000	0,0035
Sodium acetate	0,0268	0,0032	-0,0291	-0,0058	0,0019	-0,0034	-0,0003	0,0000	0,0000	-0,0028
Potassium gluconate	0,0238	0,0010	0,0023	-0,0039	0,0101	-0,0088	-0,0015	0,0000	0,0000	0,0035
D gluconic acid sodium salt	-0,0072	-0,1785	-0,2933	0,3194	-0,1548	-0,2210	-0,1338	0,0000	0,0000	0,7287
Calcium succinate	0,0238	0,0010	0,0023	-0,0039	0,0101	-0,0088	-0,0015	0,0000	0,0000	0,0035
MgSO4	-0,0198	0,0497	0,0056	0,0431	0,0825	-0,0848	-0,0193	0,0000	0,0000	-0,0072
MnSO4	-0,0501	-0,0928	-0,0813	-0,0130	0,0074	-0,0989	-0,0063	0,0000	0,0000	-0,0579
FeSO4	0,0454	0,0697	-0,0114	0,0417	0,1079	-0,1077	-0,0214	0,0000	0,0000	-0,0108
Fe(NH4)2(SO4)2	0,0238	0,0010	0,0023	-0,0039	0,0101	-0,0088	-0,0015	0,0000	0,0000	0,0035
ZnSO4	0,0383	0,0207	-0,0129	0,0071	0,0219	-0,0153	-0,0041	0,0000	0,0000	0,0032
(NH4)6Mo7O24	0,2279	0,0490	-0,0543	-0,0045	0,0769	-0,0661	-0,0079	0,0000	0,0000	-0,0085
CuSO4	0,0185	0,0576	0,0471	0,0024	-0,0112	0,0320	0,0014	0,0000	0,0000	0,0144
CuCl2	0,0166	0,0113	-0,0140	0,0166	0,0256	-0,0221	-0,0050	0,0000	0,0000	-0,0007
NH4VO3	0,0238	0,0010	0,0023	-0,0039	0,0101	-0,0088	-0,0015	0,0000	0,0000	0,0035
CoSO4	0,0238	0,0010	0,0023	-0,0039	0,0101	-0,0088	-0,0015	0,0000	0,0000	0,0035
H3BO3	0,0146	0,0597	0,0469	0,0053	-0,0129	0,0348	0,0015	0,0000	0,0000	0,0141
CrKSO4	0,0238	0,0010	0,0023	-0,0039	0,0101	-0,0088	-0,0015	0,0000	0,0000	0,0035
NiSO4	0,0233	0,0021	0,0023	-0,0037	0,0108	-0,0095	-0,0016	0,0000	0,0000	0,0034
MgCl2	0,0120	0,0591	0,0483	0,0036	-0,0154	0,0368	0,0021	0,0000	0,0000	0,0140
CaCl2	0,0953	0,0667	-0,0436	0,0196	0,0793	-0,0799	-0,0115	0,0000	0,0000	-0,0168
Manganese (II) acetate	-0,2959	0,1084	-0,0212	0,0009	-0,0059	0,0538	0,0034	0,0000	0,0000	0,0539
CoCl2	0,0228	0,0299	-0,0035	0,0166	0,0204	-0,0105	-0,0043	0,0000	0,0000	0,0032
MnCl2	0,6146	-0,0383	-0,0534	-0,0076	0,1125	-0,1452	-0,0143	0,0000	0,0000	-0,0657
FeCl3	-0,0170	-0,0262	-0,1055	0,0752	0,0991	-0,1595	-0,0229	0,0000	0,0000	-0,0486
Na2MoO4	0,0166	0,0113	-0,0140	0,0166	0,0256	-0,0221	-0,0050	0,0000	0,0000	-0,0007
NaSeO4	-0,1169	0,2438	-0,0004	0,0444	0,1621	-0,1703	-0,0213	0,0000	0,0000	-0,0340
Biotin	0,0144	0,0021	-0,0201	0,0022	-0,0014	0,0019	0,0004	0,0000	0,0000	-0,0021
Pyridoxin	0,0101	-0,0168	0,0182	0,0299	-0,0108	0,0147	-0,0002	0,0000	0,0000	0,0047
Niacin	-0,0698	0,0046	0,3652	0,5485	0,1938	-0,1537	-0,0396	0,0000	0,0000	-0,0167
Thiamin HCl	0,0045	-0,0079	0,0206	0,0408	0,0047	-0,0014	-0,0030	0,0000	0,0000	0,0023
P-aminobenzoic acid	0,0223	0,0017	-0,0351	-0,0089	-0,0037	0,0018	0,0003	0,0000	0,0000	-0,0023
Inosin	0,0182	0,0038	-0,0304	-0,0058	-0,0007	-0,0006	0,0001	0,0000	0,0000	-0,0029
Orotic acid	0,0182	0,0038	-0,0304	-0,0058	-0,0007	-0,0006	0,0001	0,0000	0,0000	-0,0029
Calcium pantothenate	0,0241	-0,0103	-0,0294	-0,0176	-0,0157	0,0124	0,0009	0,0000	0,0000	0,0025
Pyridoxamine	0,0182	0,0038	-0,0304	-0,0058	-0,0007	-0,0006	0,0001	0,0000	0,0000	-0,0029
Riboflavine	0,0182	0,0038	-0,0304	-0,0058	-0,0007	-0,0006	0,0001	0,0000	0,0000	-0,0029
D,L 6-8 thioctic acid	0,0182	0,0038	-0,0304	-0,0058	-0,0007	-0,0006	0,0001	0,0000	0,0000	-0,0029
Vitamin B12	-0,0989	-0,0383	0,2991	0,3078	0,0348	0,0082	-0,0084	0,0000	0,0000	0,0110
Folic acid	0,0171	0,0024	-0,0289	-0,0078	-0,0035	0,0023	0,0004	0,0000	0,0000	-0,0021
Meso inositol	0,0225	-0,0106	-0,0268	-0,0171	-0,0156	0,0125	0,0009	0,0000	0,0000	0,0027
Adenine	0,0257	0,0055	-0,0479	-0,0109	-0,0014	-0,0013	0,0003	0,0000	0,0000	-0,0075
Guanine	0,0309	0,0067	-0,0615	-0,0153	-0,0020	-0,0019	0,0005	0,0000	0,0000	-0,0117
Uracile	0,0257	0,0055	-0,0479	-0,0109	-0,0014	-0,0013	0,0003	0,0000	0,0000	-0,0075
Xanthine	0,0257	0,0055	-0,0479	-0,0109	-0,0014	-0,0013	0,0003	0,0000	0,0000	-0,0075
Thymidine	0,0182	0,0038	-0,0304	-0,0058	-0,0007	-0,0006	0,0001	0,0000	0,0000	-0,0029
DL Aspartic acid	0,0670	-0,0101	0,0094	0,0085	0,0134	-0,0182	-0,0021	0,0000	0,0000	-0,0079
L-Methionine	0,0710	0,0067	-0,0059	0,0013	0,0192	-0,0177	-0,0030	0,0000	0,0000	-0,0020
L-Glutamic acid	-0,1000	-0,1250	-0,0276	-0,1328	0,2117	0,2078	0,0624	0,0000	0,0000	-0,0020
L-Alanine	-0,0001	0,0197	-0,0095	0,0002	0,0136	-0,0056	-0,0015	0,0000	0,0000	0,0083
L-Arginine (base)	-0,1841	-0,1535	-0,2884	0,1282	-0,0465	-0,3190	-0,0088	0,0000	0,0000	-0,5928
L-Asparagine	-0,1747	0,0746	-0,0247	-0,0043	0,0025	0,0299	0,0014	0,0000	0,0000	0,0373
L-Cysteine HCl	0,0701	-0,0076	-0,0046	0,0051	0,0123	-0,0172	-0,0019	0,0000	0,0000	-0,0084
L-Glutamine	-0,0035	-0,3383	0,3809	-0,0685	-0,0812	-0,0203	-0,0012	0,0000	0,0000	-0,0019
Glycine	-0,0650	0,0425	-0,0122	0,0030	0,0115	0,0063	-0,0007	0,0000	0,0000	0,0187
L-Histidine (base)	-0,0374	0,0322	-0,0069	0,0048	0,0126	0,0008	-0,0010	0,0000	0,0000	0,0133
L-Isoleucine	0,0724	-0,0058	-0,0050	0,0023	0,0151	-0,0188	-0,0023	0,0000	0,0000	-0,0059
L-Leucine	-0,0868	0,0499	-0,0237	-0,0010	0,0079	0,0125	0,0000	0,0000	0,0000	0,0219
L-Lysine HCl	-0,0529	0,0384	-0,0208	0,0010	0,0091	0,0061	-0,0004	0,0000	0,0000	0,0151
L-Phenylalanine	0,0698	-0,0052	-0,0104	0,0019	0,0130	-0,0170	-0,0020	0,0000	0,0000	-0,0068
L-Proline	-0,0435	0,0339	-0,0271	-0,0020	0,0065	0,0062	-0,0002	0,0000	0,0000	0,0126
L-Serine	0,0181	-0,3114	0,3547	-0,0604	-0,0673	-0,0260	-0,0021	0,0000	0,0000	-0,0021
L-Threonine	-0,0237	0,0283	-0,0140	0,0028	0,0115	-0,0004	-0,0010	0,0000	0,0000	0,0104
L-Tryptophan	-0,0347	0,0302	-0,0022	0,0058	0,0132	-0,0002	-0,0012	0,0000	0,0000	0,0129
L-Tyrosine ethyl ester HCl	-0,0221	0,0274	-0,0173	0,0023	0,0100	0,0002	-0,0008	0,0000	0,0000	0,0092
L-Valine	-0,0176	0,0261	-0,0184	0,0014	0,0101	-0,0005	-0,0009	0,0000	0,0000	0,0087
L-Cysteine	-0,2959	0,1084	-0,0212	0,0009	-0,0059	0,0538	0,0034	0,0000	0,0000	0,0539
Na2 α,β glycerophosphate	0,0238	0,0010	0,0023	-0,0039	0,0101	-0,0088	-0,0015	0,0000	0,0000	0,0035
Ammonium citrate	0,0182	0,0038	-0,0304	-0,0058	-0,0007	-0,0006	0,0001	0,0000	0,0000	-0,0029
Potassium phosphate	0,2279	0,0489	-0,0543	-0,0045	0,0769	-0,0661	-0,0079	0,0000	0,0000	-0,0085
TRIS	0,0670	-0,0101	0,0094	0,0085	0,0134	-0,0182	-0,0021	0,0000	0,0000	-0,0079
MOPS acid	0,1164	0,2274	0,2221	-0,0651	0,1987	0,1345	0,0167	0,0000	0,0000	0,0682
YE	0,1277	0,4547	0,1378	0,0264	-0,2280	-0,0256	-0,0154	0,0000	0,0000	0,0034
Tryptone	0,0025	-0,0695	-0,0864	0,0053	0,5884	0,4748	-0,4633	0,0000	0,0000	0,0027
Peptone	0,1227	0,4481	0,1419	0,0239	-0,2440	-0,0315	-0,0176	0,0000	0,0000	0,0031
CA vf	-0,0737	0,0385	-0,0128	-0,5414	0,0386	-0,3401	-0,3578	0,0000	0,0000	0,1622
Lipids	-0,0448	-0,0343	0,0096	-0,1953	0,4463	-0,1354	0,7380	0,0000	0,0000	0,2215

	PC 21	PC 22	PC 23	PC 24	PC 25	PC 26	PC 27	PC 28	PC 29	PC 30
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.0070	-0.0410	0.0194	0.0065	-0.0019	0.0666	-0.0110	-0.0670	-0.0664	-0.0435
KH ₂ PO ₄	-0.0097	0.0546	-0.0850	-0.0428	0.0070	-0.0353	0.0633	-0.1614	0.0658	-0.0162
K ₂ HPO ₄	0.0407	0.0391	0.1489	-0.0444	-0.0033	0.0965	-0.0178	-0.0008	-0.0509	0.0244
NH ₄ Cl	0.0605	0.3494	0.1235	-0.0557	0.0147	-0.0168	0.0718	0.1643	0.0248	0.1535
NaOH	-0.0123	0.0396	0.0651	-0.0269	-0.0168	0.0412	-0.2057	0.0211	0.0136	-0.1496
KOH	-0.0123	0.0396	0.0651	-0.0269	-0.0168	0.0412	-0.2057	0.0211	0.0136	-0.1496
Na ₂ SO ₄	-0.0123	0.0396	0.0651	-0.0269	-0.0168	0.0412	-0.2057	0.0211	0.0136	-0.1496
NaCl	-0.0211	-0.0160	-0.0956	0.0086	0.0001	0.0271	-0.0233	0.0252	0.0282	0.0021
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0112	0.0956	0.0836	0.0007	0.0059	0.1294	-0.0484	0.2280	-0.0027	0.0180
Na ₂ HPO ₄	0.0090	-0.0200	0.0665	-0.0089	-0.0036	0.0824	-0.0378	0.0169	-0.0750	-0.0268
Glucose	0.0069	0.1347	-0.1637	-0.0033	0.0518	0.6269	0.0176	-0.1008	0.4456	0.0160
Fructose	0.7558	-0.1296	-0.0856	-0.0259	-0.0114	-0.1123	-0.0595	0.0161	0.4079	0.0208
Glycerol	-0.0007	0.0088	-0.0006	0.0090	0.0003	0.0123	-0.0093	0.0088	0.0096	-0.0031
Sucrose	-0.2034	0.0234	-0.0285	0.0012	0.0058	-0.0618	-0.0373	0.0203	0.3736	0.0171
Lactic acid	-0.2034	0.0234	-0.0285	0.0012	0.0058	-0.0618	-0.0373	0.0203	0.3736	0.0171
Acetic acid	-0.2034	0.0234	-0.0285	0.0012	0.0058	-0.0618	-0.0373	0.0203	0.3736	0.0171
Maltose	-0.0140	-0.0052	-0.0584	0.0360	0.0014	0.0284	-0.0174	0.0302	0.0281	0.0035
L-malic acid	-0.0007	0.0088	-0.0006	0.0090	0.0003	0.0123	-0.0093	0.0088	0.0096	-0.0031
Sodium acetate	0.0057	0.0029	-0.0113	-0.1101	-0.0031	-0.0126	0.0015	-0.0245	-0.0079	0.0042
Potassium gluconate	-0.0007	0.0088	-0.0006	0.0090	0.0003	0.0123	-0.0093	0.0088	0.0096	-0.0031
D gluconic acid sodium salt	-0.0013	-0.1449	0.0179	-0.0124	0.0434	0.2032	0.2317	0.0161	0.1129	0.1418
Calcium succinate	-0.0007	0.0088	-0.0006	0.0090	0.0003	0.0123	-0.0093	0.0088	0.0096	-0.0031
MgSO ₄	-0.0171	-0.0286	-0.0682	0.0099	-0.0006	0.0523	-0.0227	-0.0013	-0.0077	-0.0097
MnSO ₄	0.0542	0.5227	-0.4160	0.0748	0.0576	-0.2517	0.4139	0.0433	-0.0747	0.1759
FeSO ₄	-0.0433	0.0184	-0.0753	0.0048	0.0024	0.0498	-0.0199	0.0389	0.0271	0.0076
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	-0.0007	0.0088	-0.0006	0.0090	0.0003	0.0123	-0.0093	0.0088	0.0096	-0.0031
ZnSO ₄	0.0081	-0.0136	0.0424	-0.0493	-0.0032	0.0521	-0.0194	0.0080	-0.0509	-0.0107
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	-0.0642	0.0939	0.0403	-0.0091	0.0061	0.0648	0.0036	0.0502	0.0056	0.0173
CuSO ₄	-0.0010	-0.0285	0.0073	0.0080	0.0033	-0.0370	0.0634	0.0132	0.0023	0.0443
CuCl ₂	0.0090	-0.0200	0.0665	-0.0089	-0.0036	0.0824	-0.0378	0.0169	-0.0750	-0.0268
NH ₄ VO ₃	-0.0007	0.0088	-0.0006	0.0090	0.0003	0.0123	-0.0093	0.0088	0.0096	-0.0031
CoSO ₄	-0.0007	0.0088	-0.0006	0.0090	0.0003	0.0123	-0.0093	0.0088	0.0096	-0.0031
H ₃ BO ₃	0.0002	-0.0359	0.0150	0.0045	0.0028	-0.0334	0.0648	0.0128	-0.0100	0.0440
CrKSO ₄	-0.0007	0.0088	-0.0006	0.0090	0.0003	0.0123	-0.0093	0.0088	0.0096	-0.0031
NiSO ₄	-0.0007	0.0096	-0.0003	0.0090	0.0003	0.0126	-0.0092	0.0090	0.0101	-0.0030
MgCl ₂	-0.0008	-0.0331	0.0075	0.0051	0.0033	-0.0428	0.0691	0.0108	-0.0011	0.0471
CaCl ₂	-0.0091	0.0440	0.0812	-0.0762	-0.0004	0.0973	-0.0257	0.0233	-0.0478	-0.0108
Manganese (II) acetate	0.0339	0.0240	-0.0056	0.0279	-0.0059	-0.0055	-0.0322	0.0080	-0.0056	-0.0046
CoCl ₂	0.0094	-0.0298	0.0659	-0.0246	-0.0030	0.0655	-0.0154	0.0158	-0.0757	-0.0112
MnCl ₂	-0.1234	0.1087	0.0625	-0.0408	0.0145	0.0978	0.0282	0.0593	0.0182	0.0068
FeCl ₃	0.0079	0.2548	-0.0805	-0.0067	0.0061	-0.0585	-0.0462	0.0989	0.0062	-0.0518
Na ₂ MoO ₄	0.0090	-0.0200	0.0665	-0.0089	-0.0036	0.0824	-0.0378	0.0169	-0.0750	-0.0268
NaSeO ₄	0.0082	0.1758	0.0761	0.0063	0.0112	0.0596	0.0138	0.0452	0.1130	0.0270
Biotin	0.0043	-0.0066	-0.0214	-0.1129	-0.0031	-0.0061	-0.0128	0.0703	-0.0208	0.0152
Pyridoxin	-0.0143	-0.0174	0.0067	0.0033	-0.0040	-0.0720	-0.0166	0.0620	0.0494	0.0059
Niacin	-0.0555	0.1184	0.2989	0.0097	-0.0174	-0.2821	0.0511	-0.4354	0.1766	-0.0216
Thiamin HCl	-0.0170	-0.0161	0.0020	0.0150	-0.0038	-0.0632	-0.0224	0.0737	0.0471	0.0070
P-aminobenzoic acid	0.0041	0.0006	-0.0074	-0.1114	-0.0037	-0.0258	0.0037	-0.0359	-0.0016	0.0041
Inosin	0.0057	0.0008	-0.0123	-0.1157	-0.0033	-0.0158	0.0032	-0.0275	-0.0104	0.0046
Orotic acid	0.0057	0.0008	-0.0123	-0.1157	-0.0033	-0.0158	0.0032	-0.0275	-0.0104	0.0046
Calcium pantothenate	-0.0080	-0.0009	0.0239	0.0048	-0.0028	-0.0550	0.0029	-0.0480	0.0446	-0.0017
Pyridoxamine	0.0057	0.0008	-0.0123	-0.1157	-0.0033	-0.0158	0.0032	-0.0275	-0.0104	0.0046
Riboflavine	0.0057	0.0008	-0.0123	-0.1157	-0.0033	-0.0158	0.0032	-0.0275	-0.0104	0.0046
D,L 6-8 thioctic acid	0.0057	0.0008	-0.0123	-0.1157	-0.0033	-0.0158	0.0032	-0.0275	-0.0104	0.0046
Vitamin B12	-0.0408	-0.1004	-0.0884	-0.0079	-0.0077	-0.0980	-0.1364	0.7519	0.0531	0.0606
Folic acid	0.0053	-0.0024	-0.0182	-0.1138	-0.0032	-0.0202	0.0065	-0.0373	-0.0092	0.0027
Meso inositol	-0.0085	-0.0009	0.0250	0.0150	-0.0025	-0.0537	0.0026	-0.0457	0.0456	-0.0021
Adenine	0.0289	0.0107	0.0631	0.2961	0.0034	0.0061	0.0000	-0.0021	-0.0013	0.0011
Guanine	0.0511	0.0205	0.1392	0.7184	0.0105	0.0298	-0.0036	0.0265	0.0091	-0.0030
Uracil	0.0289	0.0107	0.0631	0.2961	0.0034	0.0061	0.0000	-0.0021	-0.0013	0.0011
Xanthine	0.0289	0.0107	0.0631	0.2961	0.0034	0.0061	0.0000	-0.0021	-0.0013	0.0011
Thymidine	0.0057	0.0008	-0.0123	-0.1157	-0.0033	-0.0158	0.0032	-0.0275	-0.0104	0.0046
DL Aspartic acid	0.0016	0.0087	0.0138	0.0418	0.0019	0.0127	-0.0010	0.0171	0.0111	0.0028
L-Methionine	-0.0039	0.0156	-0.0032	0.0114	0.0010	0.0025	0.0043	-0.0121	0.0066	-0.0003
L-Glutamic acid	0.1800	0.3364	0.6730	-0.1615	0.0179	0.0739	0.1190	0.1509	0.0392	0.0683
L-Alanine	0.0100	0.0169	0.0017	-0.0089	-0.0013	0.0088	-0.0129	0.0072	0.0081	0.0003
L-Arginine (base)	-0.0627	-0.4193	0.1378	-0.0313	0.0446	0.0772	0.3410	0.0503	0.0470	0.2035
L-Asparagine	0.0245	0.0223	-0.0090	-0.0213	-0.0051	-0.0017	-0.0264	0.0003	-0.0015	-0.0033
L-Cysteine HCl	0.0039	0.0086	0.0073	-0.0117	0.0003	0.0052	0.0001	0.0040	0.0060	0.0045
L-Glutamine	-0.2789	0.0310	0.0184	0.0098	0.0412	0.1171	0.1509	0.0173	-0.0086	-0.0821
Glycine	0.0180	0.0213	0.0032	0.0066	-0.0023	0.0068	-0.0181	0.0105	0.0063	0.0003
L-Histidine (base)	0.0150	0.0194	0.0064	0.0186	-0.0013	0.0089	-0.0149	0.0133	0.0080	0.0009
L-Isoleucine	0.0034	0.0114	0.0052	-0.0139	0.0001	0.0089	-0.0038	0.0055	0.0088	0.0028
L-Leucine	0.0203	0.0204	-0.0041	-0.0352	-0.0039	-0.0006	-0.0183	-0.0011	0.0007	0.0006
L-Lysine HCl	0.0177	0.0182	-0.0012	-0.0328	-0.0031	-0.0001	-0.0141	-0.0005	0.0014	0.0020
L-Phenylalanine	0.0044	0.0098	0.0030	-0.0348	-0.0005	0.0040	-0.0017	-0.0007	0.0052	0.0040
L-Proline	0.0161	0.0149	-0.0061	-0.0656	-0.0037	-0.0055	-0.0110	-0.0100	-0.0026	0.0026
L-Serine	-0.2552	0.0347	0.0224	0.0318	0.0386	0.1159	0.1351	0.0258	-0.0012	-0.0754
L-Threonine	0.0145	0.0175	0.0027	-0.0140	-0.0020	0.0041	-0.0122	0.0048	0.0047	0.0021
L-Tryptophan	0.0138	0.0193	0.0085	0.0357	-0.0007	0.0116	-0.0151	0.0176	0.0099	0.0004
L-Tyrosine ethyl ester HCl	0.0146	0.0161	0.0011	-0.0286	-0.0023	0.0009	-0.0105	0.0004	0.0024	0.0028
L-Valine	0.0141	0.0158	0.0000	-0.0353	-0.0024	0.0005	-0.0103	-0.0011	0.0022	0.0028
L-Cysteine	0.0339	0.0240	-0.0056	0.0279	-0.0059	-0.0055	-0.0322	0.0080	-0.0056	-0.0046
Na ₂ α,β glycerophosphate	-0.0007	0.0088	-0.0006	0.0090	0.0003	0.0123	-0.0093	0.0088	0.0096	-0.0031
Ammonium citrate	0.0057	0.0008	-0.0123	-0.1157	-0.0033	-0.0158	0.0032	-0.0275	-0.0104	0.0046
Potassium phosphate	-0.0642	0.0939	0.0403	-0.0091	0.0061	0.0648	0.0036	0.0502	0.0056	0.0172
TRIS	0.0016	0.0087	0.0138	0.0418	0.0019	0.0127	-0.0010	0.0171	0.0111	0.0028
MOPS acid	-0.0379	-0.1155	0.0648	0.0044	-0.0622	0.0472	-0.0421	-0.0598	-0.0442	0.8016
YE	0.0240	-0.0528	0.0272	-0.0044	-0.6150	0.0409	0.4359	0.1066	0.0693	-0.2429
Tryptone	0.0741	-0.1089	0.0399	-0.0197	0.0907	0.0395	0.3414	0.0812	0.0682	-0.1917
Peptone	0.0328	-0.0731	0.0425	-0.0218	0.7681	-0.0394	0.1856	0.0543	0.0212	-0.1383
CA vf	-0.2488	-0.1036	0.1833	-0.0110	-0.0306	-0.4441	-0.0623	0.0877	0.2824	0.0171
Lipids	0.0523	-0.1612	0.0970	-0.0133	0.0510	-0.1222	0.2422	0.0772	-0.0317	-0.1399

	PC 31	PC 32	PC 33	PC 34	PC 35	PC 36	PC 37	PC 38	PC 39	PC 40
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.0422	0.8904	0.1004	0.1614	0.0952	0.0347	0.1918	0.0000	0.0000	0.0000
KH ₂ PO ₄	0.0114	0.0970	-0.2021	-0.2006	0.2359	0.5055	-0.1226	-0.1364	0.1756	0.0126
K ₂ HPO ₄	-0.1267	-0.0960	0.1676	-0.1205	-0.1824	0.2809	-0.0355	-0.0685	0.2930	0.1946
NH ₄ Cl	-0.1391	-0.0162	0.7028	-0.1032	0.0521	0.1166	0.0399	-0.0304	-0.0172	-0.0387
NaOH	0.0452	0.0557	-0.1889	0.0086	-0.2404	0.0542	0.0117	0.0531	0.1231	-0.0732
KOH	0.0452	0.0557	-0.1889	0.0086	-0.2404	0.0542	0.0117	-0.0758	-0.0353	-0.0632
Na ₂ SO ₄	0.0452	0.0557	-0.1889	0.0086	-0.2404	0.0542	0.0117	-0.0156	-0.0535	0.1278
NaCl	-0.0209	0.0072	0.0702	0.0038	-0.0618	-0.0959	0.0490	0.0675	0.1111	0.0044
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6592	-0.0703	0.1079	-0.0189	0.0067	-0.3937	0.0392	-0.0552	0.0970	0.0186
Na ₂ HPO ₄	-0.0740	-0.1213	-0.0658	-0.0223	0.0622	0.0319	-0.0319	-0.0599	-0.1799	-0.0318
Glucose	0.0080	-0.0144	-0.0182	0.0029	0.0033	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Fructose	0.0099	-0.0030	-0.0043	0.0027	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Glycerol	0.0037	0.0055	0.0002	-0.0054	0.0048	0.0093	0.0051	-0.2384	-0.2833	-0.2539
Sucrose	0.0093	-0.0027	-0.0042	0.0025	0.0006	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Lactic acid	0.0093	-0.0027	-0.0042	0.0025	0.0006	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Acetic acid	0.0093	-0.0027	-0.0042	0.0025	0.0006	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Maltose	-0.0122	0.0203	0.0468	0.0013	-0.0407	-0.0584	-0.0469	-0.1001	-0.1301	0.0662
L-malic acid	0.0037	0.0055	0.0002	-0.0054	0.0048	0.0093	0.0051	-0.0258	0.0995	0.1325
Sodium acetate	-0.0216	0.0013	0.0078	0.0359	-0.0132	-0.0746	0.0193	0.2894	-0.0671	0.1351
Potassium gluconate	0.0037	0.0055	0.0002	-0.0054	0.0048	0.0093	0.0051	-0.0677	0.0366	0.1107
D gluconic acid sodium salt	0.0084	0.0090	-0.0486	0.0047	-0.0002	0.0013	0.0010	-0.0001	0.0007	-0.0010
Calcium succinate	0.0037	0.0055	0.0002	-0.0054	0.0048	0.0093	0.0051	-0.0327	0.0623	0.1092
MgSO ₄	0.0022	-0.0373	0.0193	-0.0748	0.0181	0.0583	-0.0126	0.0315	-0.0928	-0.0261
MnSO ₄	0.0697	0.0250	-0.2706	0.0369	-0.2995	-0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
FeSO ₄	-0.0111	0.0197	0.0309	0.0000	-0.0249	-0.0746	0.0101	0.0150	0.0150	-0.0252
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	0.0037	0.0055	0.0002	-0.0054	0.0048	0.0093	0.0051	-0.0265	0.0774	0.0983
ZnSO ₄	-0.0564	-0.0777	-0.0433	-0.0025	0.0392	-0.0056	-0.0067	0.2353	0.0486	0.0349
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.0136	0.0393	-0.0872	0.0097	0.0741	0.0052	-0.0868	-0.0093	-0.0732	0.0227
CuSO ₄	0.0148	0.0259	-0.0039	0.0034	-0.0082	-0.0014	0.0050	0.0134	0.0404	-0.0011
CuCl ₂	-0.0740	-0.1213	-0.0658	-0.0223	0.0622	0.0319	-0.0319	-0.0029	-0.0189	-0.0250
NH ₄ VO ₃	0.0037	0.0055	0.0002	-0.0054	0.0048	0.0093	0.0051	-0.0080	-0.0005	0.2595
CoSO ₄	0.0037	0.0055	0.0002	-0.0054	0.0048	0.0093	0.0051	-0.0126	0.0703	0.1993
H ₃ BO ₃	0.0084	0.0109	-0.0115	0.0018	-0.0022	-0.0006	-0.0004	-0.0284	-0.0421	-0.0105
CrKSO ₄	0.0037	0.0055	0.0002	-0.0054	0.0048	0.0093	0.0051	-0.0789	-0.0793	-0.1623
NiSO ₄	0.0019	0.0058	0.0001	-0.0048	0.0043	0.0092	0.0054	0.0501	-0.0291	-0.1654
MgCl ₂	0.0155	0.0250	-0.0040	0.0049	-0.0098	-0.0046	0.0035	-0.0248	0.0266	0.0300
CaCl ₂	-0.1613	-0.0822	-0.0880	0.0336	0.0465	-0.0213	-0.0292	0.0503	0.0358	-0.0468
Manganese (II) acetate	0.0027	-0.0077	0.0259	-0.0202	-0.0310	0.0425	0.0479	-0.0874	0.0055	0.0075
CoCl ₂	-0.0715	-0.1119	-0.0647	-0.0148	0.0560	0.0183	-0.0263	-0.0041	-0.1061	-0.0749
MnCl ₂	0.0008	0.0231	0.0867	-0.0260	-0.1228	0.0682	0.0546	-0.0060	0.0369	-0.0564
FeCl ₃	-0.0253	-0.0045	-0.1743	0.0240	0.7430	-0.1169	-0.0379	0.0314	0.0206	0.0366
Na ₂ MoO ₄	-0.0740	-0.1213	-0.0658	-0.0223	0.0622	0.0319	-0.0319	-0.0769	-0.0389	-0.0499
Na ₂ SeO ₄	-0.4173	0.0742	-0.0243	0.1377	-0.1239	-0.0224	0.0706	0.1109	-0.2182	-0.0462
Biotin	0.4966	-0.0160	0.0994	-0.0202	0.0077	0.5310	-0.1139	0.1605	-0.2818	-0.0539
Pyridoxin	-0.0090	0.0171	-0.0207	-0.0500	0.0106	0.0154	-0.0056	-0.0149	0.0483	-0.0005
Niacin	0.0774	-0.0364	0.0451	0.0066	0.0044	-0.0513	-0.0084	0.0119	-0.0208	-0.0040
Thiamin HCl	0.0260	-0.1568	0.0467	0.7563	0.0383	0.1758	0.0370	-0.0374	0.1136	-0.0093
P-aminobenzoic acid	-0.0254	0.0121	0.0050	-0.0295	-0.0185	-0.0955	0.0234	0.4001	-0.1809	0.0251
Inosin	-0.0227	-0.0012	0.0082	0.0373	-0.0145	-0.0779	0.0268	-0.1922	-0.0163	0.1243
Orotic acid	-0.0227	-0.0012	0.0082	0.0373	-0.0145	-0.0779	0.0268	-0.2072	-0.0561	0.1339
Calcium pantothenate	-0.0179	0.0695	-0.0153	-0.3442	-0.0235	-0.1041	-0.0134	-0.0199	-0.0747	0.0170
Pyridoxamine	-0.0227	-0.0012	0.0082	0.0373	-0.0145	-0.0779	0.0268	-0.1734	-0.0633	0.0913
Riboflavine	-0.0227	-0.0012	0.0082	0.0373	-0.0145	-0.0779	0.0268	-0.1734	-0.0633	0.0913
D,L 6-8 thioctic acid	-0.0227	-0.0012	0.0082	0.0373	-0.0145	-0.0779	0.0268	-0.2157	-0.1010	0.1209
Vitamin B12	-0.1551	0.1030	-0.0971	-0.1233	-0.0179	0.0745	0.0137	-0.0181	0.0206	0.0104
Folic acid	-0.0156	0.0356	-0.0139	-0.1368	-0.0046	-0.0808	0.0091	0.0464	0.3091	-0.1836
Meso inositol	-0.0159	0.0697	-0.0160	-0.3478	-0.0222	-0.0974	-0.0158	-0.0139	-0.0348	-0.0090
Adenine	-0.0071	-0.0004	0.0026	0.0119	-0.0046	-0.0249	0.0085	0.0459	0.1140	-0.0785
Guanine	0.0112	0.0006	-0.0040	-0.0180	0.0070	0.0375	-0.0129	-0.0676	-0.1510	0.1090
Uracile	-0.0071	-0.0004	0.0026	0.0119	-0.0046	-0.0249	0.0085	0.0473	0.1078	-0.0750
Xanthine	-0.0071	-0.0004	0.0026	0.0119	-0.0046	-0.0249	0.0085	0.0412	0.0786	-0.0634
Thymidine	-0.0227	-0.0012	0.0082	0.0373	-0.0145	-0.0779	0.0268	-0.0733	-0.0601	0.1042
DL Aspartic acid	0.0039	0.0212	-0.0047	-0.0020	0.0049	0.0141	-0.1146	-0.1598	-0.0417	0.0186
L-Methionine	0.0495	-0.1758	-0.1004	-0.1125	0.0886	0.1508	0.8987	0.0012	-0.0073	0.0112
L-Glutamic acid	0.0465	0.0755	-0.2820	0.0261	-0.0014	0.0052	0.0042	-0.0005	0.0028	-0.0043
L-Alanine	-0.0035	0.0144	0.0063	0.0055	-0.0061	-0.0069	-0.0433	0.1373	-0.0018	-0.0894
L-Arginine (base)	0.0105	0.0162	-0.0667	0.0062	-0.0010	0.0018	0.0015	-0.0002	0.0010	-0.0015
L-Asparagine	-0.0048	-0.0019	0.0207	-0.0022	-0.0232	0.0036	0.0461	0.0784	0.0054	-0.2566
L-Cysteine HCl	-0.0062	0.0190	-0.0007	0.0141	-0.0017	-0.0206	-0.0929	-0.0440	0.1155	-0.0700
L-Glutamine	-0.0055	-0.0093	0.0057	0.0012	-0.0079	-0.0049	0.0219	0.0051	0.0200	-0.0744
Glycine	-0.0023	0.0143	0.0110	0.0003	-0.0131	0.0060	-0.0519	0.1765	0.1512	0.3174
L-Histidine (base)	-0.0004	0.0169	0.0077	-0.0011	-0.0093	0.0102	-0.0720	0.1006	0.0634	0.1092
L-Isoleucine	-0.0052	0.0189	0.0000	0.0124	-0.0003	-0.0189	-0.0765	0.1151	0.0269	-0.0123
L-Leucine	-0.0094	0.0084	0.0154	0.0103	-0.0193	-0.0175	-0.0126	-0.1875	-0.0087	-0.2641
L-Lysine HCl	-0.0097	0.0117	0.0123	0.0129	-0.0166	-0.0209	-0.0371	0.0063	0.2329	-0.0748
L-Phenylalanine	-0.0096	0.0173	0.0014	0.0192	-0.0035	-0.0332	-0.0704	0.1329	-0.1079	-0.1693
L-Proline	-0.0150	0.0075	0.0131	0.0217	-0.0183	-0.0416	-0.0106	-0.0592	0.0841	-0.2407
L-Serine	-0.0019	0.0008	0.0041	-0.0027	-0.0048	0.0069	-0.0227	-0.0057	-0.0121	0.0896
L-Threonine	-0.0064	0.0153	0.0087	0.0092	-0.0117	-0.0120	-0.0597	0.0476	-0.2967	0.2104
L-Tryptophan	0.0029	0.0178	0.0061	-0.0062	-0.0067	0.0211	-0.0791	0.0218	0.0415	0.0232
L-Tyrosine ethyl ester HCl	-0.0093	0.0140	0.0093	0.0139	-0.0133	-0.0220	-0.0540	0.1704	-0.1394	-0.0062
L-Valine	-0.0102	0.0135	0.0094	0.0156	-0.0133	-0.0260	-0.0482	-0.0637	0.1780	-0.1525
L-Cysteine	0.0027	-0.0077	0.0259	-0.0202	-0.0310	0.0425	0.0479	-0.0601	-0.1051	0.1388
Na ₂ α,β glycerophosphate	0.0037	0.0055	0.0002	-0.0054	0.0048	0.0093	0.0051	-0.0809	-0.0735	-0.0789
Ammonium citrate	-0.0227	-0.0012	0.0082	0.0373	-0.0145	-0.0779	0.0268	-0.1584	0.0428	0.0505
Potassium phosphate	0.0136	0.0393	-0.0872	0.0097	0.0741	0.0052	-0.0868	-0.0250	0.0468	0.0857
TRIS	0.0039	0.0212	-0.0047	-0.0020	0.0049	0.0141	-0.1146	-0.2705	-0.0569	0.0180
MOPS acid	0.0223	0.0381	-0.1451	0.0132	-0.0027	0.0040	0.0032	-0.0004	0.0022	-0.0033
YE	-0.0001	-0.0010	0.0005	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Tryptone	0.0002	-0.0012	-0.0001	0.0001	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Peptone	-0.0002	-0.0003	0.0007	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
CA vf	0.0091	0.0041	0.0022	0.0044	-0.0011	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Lipids	-0.0011	0.0013	0.0027	-0.0004	-0.0004	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

	PC 91	PC 92	PC 93
(NH4)2HPO4	0,0000	0,0000	0,0000
KH2PO4	0,0366	0,0479	0,0474
K2HPO4	-0,0519	-0,0801	-0,0325
NH4Cl	0,0675	0,0729	0,0520
NaOH	0,1341	-0,0342	0,0310
KOH	-0,0349	-0,0422	0,1846
Na2SO4	-0,0505	0,1230	-0,1800
NaCl	-0,0430	-0,1827	-0,1115
(NH4)2SO4	0,0284	0,0242	0,0211
Na2HPO4	-0,1915	0,0458	0,0645
Glucose	0,0000	0,0000	0,0000
Fructose	0,0000	0,0000	0,0000
Glycerol	0,0908	-0,0813	0,1236
Sucrose	0,0000	0,0000	0,0000
Lactic acid	0,0000	0,0000	0,0000
Acetic acid	0,0000	0,0000	0,0000
Maltose	0,0040	-0,1315	-0,1593
L-malic acid	-0,0599	-0,1363	-0,0469
Sodium acetate	0,1741	-0,0220	-0,1807
Potassium gluconate	-0,1570	-0,1598	0,1219
D gluconic acid sodium salt	-0,0020	-0,0016	-0,0016
Calcium succinate	0,1131	0,3587	0,1147
MgSO4	0,2594	0,1113	0,1045
MnSO4	0,0000	0,0000	0,0000
FeSO4	-0,2285	0,1743	0,1188
Fe(NH4)2(SO4)2	-0,0423	-0,0668	-0,0527
ZnSO4	0,0733	-0,0276	0,0348
(NH4)6Mo7O24	0,1997	0,0675	0,0385
CuSO4	0,0240	-0,0610	-0,1098
CuCl2	-0,0837	-0,2129	-0,0234
NH4VO3	0,0088	-0,0071	0,0601
CoSO4	0,1336	0,2240	-0,1544
H3BO3	-0,0879	0,1246	-0,0159
CrKSO4	-0,1972	0,0446	-0,1360
NiSO4	0,0258	-0,2142	0,0431
MgCl2	-0,0204	0,0071	0,1185
CaCl2	-0,0553	0,2164	0,2050
Manganese (II) acetate	0,1315	0,0656	-0,0440
CoCl2	0,2443	-0,2146	-0,0035
MnCl2	-0,1060	-0,0870	-0,0866
FeCl3	-0,0780	-0,0824	-0,0605
Na2MoO4	-0,0209	0,2153	-0,2646
NaSeO4	-0,0125	-0,0661	-0,0734
Biotin	-0,0826	-0,0703	-0,0612
Pyridoxin	-0,0985	0,1221	-0,1088
Niacin	-0,0061	-0,0052	-0,0045
Thiamin HCl	0,0754	0,0006	0,0457
P-aminobenzoic acid	-0,1610	0,1078	0,0688
Inosin	-0,1047	0,0402	0,1621
Orotic acid	0,0835	-0,0707	0,0547
Calcium pantothenate	0,1036	-0,0202	0,0505
Pyridoxamine	-0,0527	0,0271	-0,0810
Riboflavin	-0,0527	0,0271	-0,0810
D,L 6-8 thioctic acid	0,0925	-0,1124	-0,0009
Vitamin B12	0,0171	-0,0078	0,0200
Folic acid	0,1595	0,1054	-0,0286
Meso inositol	-0,0458	-0,1171	0,0018
Adenine	0,0481	0,0858	-0,0698
Guanine	-0,1206	0,0696	0,0004
Uracile	-0,1163	-0,0578	0,0704
Xanthine	0,3082	-0,1665	-0,0013
Thymidine	0,0534	0,1107	-0,0480
DL Aspartic acid	0,0674	0,0786	-0,0252
L-Methionine	0,0210	0,0172	0,0171
L-Glutamic acid	-0,0081	-0,0067	-0,0066
L-Alanine	-0,0238	0,1230	0,1641
L-Arginine (base)	-0,0029	-0,0023	-0,0023
L-Asparagine	0,0728	-0,0636	-0,0206
L-Cysteine HCl	-0,1703	-0,0668	-0,1317
L-Glutamine	-0,0952	-0,1418	0,1297
Glycine	0,0724	-0,1801	0,2850
L-Histidine (base)	-0,1644	-0,0576	-0,0494
L-Isoleucine	-0,0643	0,1955	-0,0439
L-Leucine	-0,0002	0,1212	-0,0636
L-Lysine HCl	-0,2167	-0,0710	-0,0781
L-Phenylalanine	0,1199	-0,0349	-0,0033
L-Proline	-0,0802	-0,0638	-0,1446
L-Serine	0,1003	0,1493	-0,1436
L-Threonine	0,0350	-0,0452	-0,1741
L-Tryptophan	0,1924	-0,0647	-0,2505
L-Tyrosine ethyl ester HCl	-0,0647	0,0420	0,3296
L-Valine	-0,0484	0,0835	0,0805
L-Cysteine	-0,1935	-0,0275	-0,0189
Na2 α,β glycerophosphate	0,0113	-0,0025	-0,0300
Ammonium citrate	-0,0369	-0,1791	0,0464
Potassium phosphate	0,0506	-0,0688	-0,0177
TRIS	0,1287	0,0026	0,2789
MOPS acid	-0,0062	-0,0051	-0,0051
YE	0,0000	0,0000	0,0000
Tryptone	0,0000	0,0000	0,0000
Peptone	0,0000	0,0000	0,0000
CA vř	0,0000	0,0000	0,0000
Lipids	0,0000	0,0000	0,0000

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- A -

Adak S, Bilwes AM, Panda K, Hosfield D, Aulak KS, McDonald JF, Tainer JA, Getzoff ED, Crane BR, Stuehr DJ (2002) Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:107–112.

Anderson AW, Nordon HC, Cain RF, Parrish G, Duggan D (1956) Studies on a radio-resistant *Micrococcus*. I. Isolation, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. Food Technology 10:575–578.

- B -

Battista JR (1997) Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. Annual Review of Microbiology 51:203–24.

Battista JR, Earl AM, Park M-J (1999) Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? Trends in Microbiology 7:362–365.

Battista JR, Earl AM, White O (2000) The stress responses of *Deinococcus radiodurans*. In: Storz G, Hengge-Aronis R (eds) Bacterial stress responses, ASM Press. Washington D.C., pp 383–391

Bauermeister A, Hahn C, Rettberg P, Reitz G, Moeller R (2012) Roles of DNA repair and membrane integrity in heat resistance of *Deinococcus radiodurans*. Archives of Microbiology 194:959–966.

Blasius M, Sommer S, Hübscher U (2008) *Deinococcus radiodurans*: what belongs to the survival kit? Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 43:221–38.

Bouraoui H, Aissa M Ben, Abbassi F, Touzel JP, O'donohue M, Manai M (2012) Characterization of *Deinococcus sabariensis* sp. nov., a radiation-resistant bacterium isolated from a Saharan hot spring. Archives of Microbiology 194:315–22.

Brim H, McFarlan SC, Fredrickson JK, Minton KW, Zhai M, Wackett LP, Daly MJ (2000) Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. Nature Biotechnology 18:85–90.

Brim H, Venkateswaran A, Kostandarithes HM, Fredrickson JK, Daly MJ (2003) Engineering *Deinococcus geothermalis* for bioremediation of high-temperature radioactive waste environments. Applied and Environmental Microbiology 69:4575–4582.

Brooks BW, Murray RGE (1981) Nomenclature for “*Micrococcus radiodurans*” and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. International Journal of Systematic Bacteriology 31:353–360.

- Brooks BW, Murray RGE, Johnson JL, Stackebrandt E, Woese CR, Fox GE (1980) Red-pigmented *Micrococci*: a basis for taxonomy. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30:627–646.
- Brown MR, Barrett SM, Volkman JK, Nearhos SP, Nell JA, Allan GL (1996) Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. *Aquaculture* 143:341–360.

- C -

- Carbonneau MA, Melin AM, Perromat A, Clerc M (1989) The action of free radicals on *Deinococcus radiodurans* carotenoids. *Archives of biochemistry and biophysics* 275:244–51.
- Chou FI, Tan ST (1991) Salt-mediated multicell formation in *Deinococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology* 173:3184–3190.
- Chou FI, Tan ST (1990) Manganese(II) induces cell division and increases in superoxide dismutase and catalase activities in an aging deinococcal culture. *Journal of Bacteriology* 172:2029–2035.
- Christensen EA, Kristensen H, Hoborn J, Miller A (1991) Radiation resistance of microorganisms on unsterilized infusion sets. *Acta Pathologica Microbiologica and Immunologica Scandinavia* 99:620–626.
- Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Novak L, Lindley ND, Loublere P (1995) Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* 79:108–116.
- Confalonieri F, Sommer S (2011) Bacterial and archaeal resistance to ionizing radiation. *Cost Chemistry Cm0603-Melusyn Joint Meeting: Damages Induced In Biomolecules By Low And High Energy Radiations*. Iop Publishing Ltd, Bristol, pp 1–15
- Cox MM, Battista JR (2005) *Deinococcus radiodurans* - the consummate survivor. *Nature Reviews Microbiology* 3:882–892.
- Crane BR (2008) The enzymology of nitric oxide in bacterial pathogenesis and resistance. *Biochemical Society Transactions* 36:1149–1154.

- D -

- Daly MJ (2009) A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nature Reviews Microbiology* 7:237–245.
- Daly MJ (2000) Engineering radiation-resistant bacteria for environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 11:280–285.
- Daly MJ (2006) Modulating radiation resistance: Insights based on defenses against reactive oxygen species in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Clinics In Laboratory Medicine* 26:491–505.

Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Kiang JG, Fukumoto R, Lee D-Y, Wehr NB, Viteri GA, Berlett BS, Levine RL (2010) Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*. PLoS one 5:e12570.

Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Leapman RD, Lai B, Ravel B, Li S-MW, Kemner KM, Fredrickson JK (2007) Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. PLoS Biol 5:e92.

Daly MJ, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Venkateswaran A, Hess M, Omelchenko M V, Kostandarithes HM, Makarova KS, Wackett LP, Fredrickson JK, Ghosal D (2004) Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. Science 306:1025–1028.

Daly MJ, Ouyang L, Fuchs P, Minton KW (1994) In vivo damage and recA-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. Journal of Bacteriology 176:3508–3517.

Degryse E, Glansdorff N, Pierard A (1978) Comparative analysis of extreme thermophilic bacteria belonging to genus *Thermus*. Archives of Microbiology 117:189–196.

- E -

Egli T, Fiechter A (1981) Theoretical analysis of media used in the growth of yeasts on methanol. Journal of General Microbiology 123:365–369.

Embley TM, O'Donnell AG, Wait R, Rostron J (1987) Lipid and cell wall amino acid composition in the classification of members of the genus *Deinococcus*. Systematic and Applied Microbiology 10:20–27.

- F -

Ferreira AC, Nobre MF, Rainey FA, Silva MT, Wait R, Burghardt J, Chung AP, DaCosta MS (1997) *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. International Journal of Systematic Bacteriology 47:939–947.

- G -

Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos VE, Merchuk JC (2010) Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. Biochemical Engineering Journal 49:289–307.

De Groot A, Chapon V, Servant P, Christen R, Fischer-Le Saux M, Sommer S, Heulin T (2005) *Deinococcus deserti* sp nov., a gamma-radiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert. International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology 55:2441–2446.

- H -

Hansen MT (1978) Multiplicity of genome equivalents in radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*. Journal of Bacteriology 134:71–75.

- Harada K, Uchida A, Kadota H (1982) The effect of growth-rate of *Micrococcus radiodurans* on its heat sensitivity. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 48:415–419.
- Harsojo, Kitayama S, Matsuyama A (1981) Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans*. Journal of Biochemistry 90:877–80.
- He Y (2009) High cell density production of *Deinococcus radiodurans* under optimized conditions. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36:539–546.
- Hensel R, Demharter W, Kandler O, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E (1986) Chemotaxonomic and molecular-genetic studies of the genus *Thermus*: evidence for a phylogenetic relationship of *Thermus aquaticus* and *Thermus ruber* to the genus *Deinococcus*. International Journal of Systematic Bacteriology 36:444–453.
- Hirsch P, Gallikowski CA, Siebert J, Peissl K, Kroppenstedt R, Schumann P, Stackebrandt E, Anderson R (2004) *Deinococcus frigens* sp nov., *Deinococcus saxicola* sp nov., and *Deinococcus marmoris* sp nov., low temperature and draught-tolerating, UV-resistant bacteria from continental Antarctica. Systematic and Applied Microbiology 27:636–645.
- Holland A, Rothfuss H, Lidstrom M (2006) Development of a defined medium supporting rapid growth for *Deinococcus radiodurans* and analysis of metabolic capacities. Applied Microbiology and Biotechnology 72:1074–1082.
- Holt JG, Bergey DH (1994) Gram-positive cocci. In: William R. Henayl (ed) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams &. Baltimore, USA, p 527
- Hunt GR, Stieber RW (1986) Inoculum development. In: Demain AL, Solomon NA (eds) Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology, pp 32–40

- J -

- Jena SS, Joshi HM, Sabareesh KP V, Tata BVR, Rao TS (2006) Dynamics of *Deinococcus radiodurans* under controlled growth conditions. Biophysical Journal 91:2699–2707.
- Joshi HM, Toleti RS (2009) Nutrition induced pleomorphism and budding mode of reproduction in *Deinococcus radiodurans*. BMC research notes 2:123.

- K -

- Knivett VA, Cullen J, Jackson MJ (1965) Odd-numbered fatty acids in *Micrococcus radiodurans*. Biochemical Journal 96:2c–3c.
- Kolari M, Nuutinen J, Rainey FA, Salkinoja-Salonen MS (2003) Colored moderately thermophilic bacteria in paper-machine biofilms. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 30:225–238.
- Kolari M, Schmidt U, Kuismanen E, Salkinoja-Salonen MS (2002) Firm but slippery attachment of *Deinococcus geothermalis*. Journal of Bacteriology 184:2473–2480.

- Kongpol A, Kato J, Vangnai AS (2008) Isolation and characterization of *Deinococcus geothermalis* T27, a slightly thermophilic and organic solvent-tolerant bacterium able to survive in the presence of high concentrations of ethyl acetate. *FEMS Microbiology Letters* 286:227–235.
- Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD (1995) Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 39:59–65.
- Koser SA, Saunders F (1938) Accessory growth factors for bacteria and related microorganisms. *Bacteriological Reviews* 2:99–160.
- Krabbenhof KL, Anderson AW, Elliker PR (1967) Influence of culture media on the radiation resistance of *Micrococcus radiodurans*. *Applied and Environmental Microbiology* 15:178–185.
- Krisko A, Radman M (2013) Biology of Extreme Radiation Resistance: The Way of *Deinococcus radiodurans*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5:a012765–a012765.
- Kristensen H, Christensen EA (2009) Radiation-resistant micro-organisms isolated from textiles. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology* 89B:303–309.
- L -
- Lancy P, Murray RGE (1978) Envelope of *Micrococcus-Radiodurans* - Isolation, purification, and preliminary-analysis of wall layers. *Canadian Journal of Microbiology* 24:162–176.
- Lange CC, Wackett LP, Minton KW, Daly MJ (1998) Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments. *Nature Biotechnology* 16:929–933.
- Lee J, Lee SY, Park S, Middelberg AP (1999) Control of fed-batch fermentations. *Biotechnology Advances* 17:29–48.
- Leibowitz PJ, Schwartzberg LS, Bruce AK (1976) The in vivo association of manganese with chromosome of *Micrococcus radiodurans*. *Photochemistry and Photobiology* 23:45–50.
- Lemee L, Peuchant E, Clerc M, Brunner M, Pfander H (1997) Deinoxanthin: A new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron* 53:919–926.
- Leonetti J-P, Matic I, Biton J, Pouletty P (2011) Use of bacteria for the production of bioenergy. Patent US 2011/0104766 A1
- Lewis NF (1971) Studies on a Radio-resistant Coccus Isolated from Bombay Duck (*Harpodon nehereus*). *Journal of General Microbiology* 66:29–35.
- Liedert C, Peltola M, Bernhardt J, Neubauer P, Salkinoja-Salonen M (2012) Physiology of resistant *Deinococcus geothermalis* bacterium aerobically cultivated in low-manganese medium. *Journal of Bacteriology* 194:1552–1561.
- Little JG, Hanawalt PC (1973) Thymineless death and ultraviolet sensitivity in *Micrococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology* 113:233–240.

- M -

- Makarova KS, Aravind L, Wolf YI, Tatusov RL, Minton KW, Koonin E V, Daly MJ (2001) Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65:44–79.
- Makarova KS, Omelchenko M V, Gaidamakova EK, Matrosova VY, Vasilenko A, Zhai M, Lapidus A, Copeland A, Kim E, Land M, Mavrommatis K, Pitluck S, Richardson PM, Detter C, Brettin T, Saunders E, Lai B, Ravel B, Kemner KM, Wolf YI, Sorokin A, Gerasimova A V, Gelfand MS, Fredrickson JK, Koonin E V, Daly MJ (2007) *Deinococcus geothermalis*: the pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *PLoS ONE* 2:e955.
- Marsili-Libelli S, Vaggi A (1997) Estimation of respirometric activities in bioprocesses. *Journal of Biotechnology* 52:181–192.
- Mattimore V, Battista JR (1996) Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *Journal of Bacteriology* 178:633–637.
- McDonald IJ (1960) A minimal synthetic medium supporting growth of a *Micrococcus* species. *Canadian Journal of Microbiology* 6:251–256.
- McDonald IJ (1963) Methionine requirement for growth of a species of *Micrococcus*. *Revue Canadienne de Microbiologie* 9:415–416.
- Minton KW (1994) DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Molecular Microbiology* 13:9–15.
- Murray RG, Hall M, Thompson BG (1983) Cell division in *Deinococcus radiodurans* and a method for displaying septa. *Canadian journal of microbiology* 29:1412–23.

- O -

- Oliveira CS, Ordaz A, Ferreira EC, Alves M, Thalasso F (2011) In situ pulse respirometric methods for the estimation of kinetic and stoichiometric parameters in aerobic microbial communities. *Biochemical Engineering Journal* 58-59:12–19.
- Orlowski J, Barford J (1987) The effect of inoculum preparation on the fully aerated growth of *Saccharomyces cerevisiae* with a glucose substrate. *Journal of General and Applied Microbiology* 33:113–121.
- Oyaizu H, Stackebrandt E, Schleifer KH, Ludwig W, Pohla H, Hirata A, Oyaizu Y, Komagata K (1987) A radiation-resistant rod-shaped bacterium *Deinobacter grandis* gen. nov., sp. nov., with peptidoglycan containing ornithine. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:62–67.

- P -

- Paca J, Kosteckova A, Pacova L, Prell A, Halecky M, Paca Jr. J, Stiborova M, Kozliak E, Soccol CR (2010) Respirometry kinetics of phenol oxidation by *Comamonas testosteroni* Pb50 under various conditions of nutritional stress. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53:1519–1528.
- Parton C, Willis P (1990) Strain preservation, inoculum preparation and development. In: McNeil B, Harvey LM (eds) *Fermentation: a practical approach*. Oxford University Press, pp 39–64
- Patel BA, Moreau M, Widom J, Chen H, Yin LF, Hua YJ, Crane BR (2009) Endogenous nitric oxide regulates the recovery of the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* from exposure to UV light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:18183–18188.
- Peltola M (2011) Adhesion, presence and antifouling of *Deinococcus geothermalis* in paper machine environment. Dissertation, Department of Food and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture and Forestry University of Helsinki, Helsinki, Finland. 86.
- Peltola M, Kuosmanen T, Sinkko H, Vesalainen N, Pulliainen M, Korhonen P, Partti-Pellinen K, Rasanen JP, Rintala J, Kolari M, Rita H, Salkinoja-Salonen M (2011) Effects of polarization in the presence and absence of biocides on biofilms in a simulated paper machine water. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38:1719–1727.
- Peltola M, Neu TR, Raulio M, Kolari M, Salkinoja-Salonen MS (2008) Architecture of *Deinococcus geothermalis* biofilms on glass and steel: a lectin study. *Environmental Microbiology* 10:1752–1759.

- R -

- Rainey FA, Ferreira M, Nobre MF, Ray K, Bagaley D, Earl AM, Battista JR, Gómez-Silva B, McKay CP, da Costa MS (2007) *Deinococcus peraridilitoris* sp. nov., isolated from a coastal desert. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1408–12.
- Rainey FA, Nobre MF, Schumann P, Stackebrandt E, DaCosta MS (1997) Phylogenetic diversity of the *deinococci* as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:510–514.
- Rainey FA, Ray K, Ferreira M, Gatz BZ, Nobre F, Bagaley D, Rash BA, Park M-J, Earl AM, Shank NC, Small AM, Henk MC, Battista JR, Kampfer P, da Costa MS (2005) Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from sonoran desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Applied and Environmental Microbiology* 71:7630–7630.
- Raj HD, Duryee FL, Deeney AM, Wang CH, Anderson AW, Elliker PR (1960) Utilization of carbohydrates and amino acids by *Micrococcus radiodurans*. *Canadian Journal of Microbiology* 6:289–298.
- Reece SY, Woodward JJ, Marletta MA (2009) Synthesis of nitric oxide by the NOS-like protein from *Deinococcus radiodurans*: a direct role for tetrahydrofolate. *Biochemistry* 48:5483–5491.

Riesenberg D, Guthke R (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51:422–430.

Roels JA (1983) Energetics and kinetics in biotechnology. 330.

- S -

Saarimaa C, Peltola M, Raulio M, Neu TR, Salkinoja-Salonen MS, Neubauer P (2006) Characterization of adhesion threads of *Deinococcus geothermalis* as type IV pili. *Journal of Bacteriology* 188:7016–7021.

Schneebeil R, Egli T (2013) A defined, glucose-limited mineral medium for the cultivation of *Listeria* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 79:2503–2511.

Shapiro A, Dilello D, Loudis MC, Keller DE, Hutner SH (1977) Minimal requirements in defined media for improved growth of some radio-resistant pink tetracocci. *Applied and Environmental Microbiology* 33:1129–1133.

Shashidhar R, Bandekar JR (2009) *Deinococcus piscis* sp. nov., a radiation-resistant bacterium isolated from a marine fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:2714–7.

Shuryak I, Brenner DJ (2010) Effects of radiation quality on interactions between oxidative stress, protein and DNA damage in *Deinococcus radiodurans*. *Radiation and Environmental Biophysics* 49:693–703.

Shuryak I, Brenner DJ (2009) A model of interactions between radiation-induced oxidative stress, protein and DNA damage in *Deinococcus radiodurans*. *Journal of Theoretical Biology* 261:305–17.

Slade D, Radman M (2011) Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 75:133–191.

Sun HX, Xu GZ, Zhan HD, Chen HA, Sun ZT, Tian B, Hua YJ (2010) Identification and evaluation of the role of the manganese efflux protein in *Deinococcus radiodurans*. *BMC Microbiology* 10:319–327.

Sun Z, Shen S, Tian B, Wang H, Xu Z, Wang L, Hua Y (2009) Functional analysis of gamma-carotene ketolase involved in the carotenoid biosynthesis of *Deinococcus radiodurans*. *FEMS microbiology letters* 301:21–7.

Sung JY, Yun N-R, Lee YN (2006) Central glycolytic pathways in the mesophilic *Deinococcus* spp. *Bulletin of the Natural Sciences* 20:115–120.

Sunya S, Gorret N, Delvigne F, Uribelarrea J-L, Molina-Jouve C (2012) Real-time monitoring of metabolic shift and transcriptional induction of *yciG::luxCDABE* *E. coli* reporter strain to a glucose pulse of different concentrations. *Journal of Biotechnology* 157:379–390.

- T -

- Tabares LC, Un S (2013) In situ determination of manganese (II) speciation in *Deinococcus radiodurans* by high magnetic-field EPR: detection of high levels of Mn(II) bound to proteins. *Journal of Biological Chemistry* 288:5050-5055.
- Thompson BG, Anderson R, Murray RGE (1980) Unusual polar lipids of *Micrococcus radiodurans* strain Sark. *Canadian Journal of Microbiology* 26:1408-1411.
- Thornley MJ, Horne RW, Glauert AM (1965) Fine structure of *Micrococcus radiodurans*. *Archiv Fur Mikrobiologie* 51:267-289.
- Tian B, Sun Z, Shen S, Wang H, Jiao J, Wang L, Hu Y, Hua Y (2009) Effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* on protein oxidation. *Letters in Applied Microbiology* 49:689-694.
- Tian B, Wu Y, Sheng D, Zheng Z, Gao G, Hua Y (2004) Chemiluminescence assay for reactive oxygen species scavenging activities and inhibition on oxidative damage of DNA in *Deinococcus radiodurans*. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence* 19:78-84.
- Tian B, Xu Z, Sun Z, Lin J, Hua Y (2007) Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770:902-911.
- Di Trapani D, Capodici M, Cosenza A, Di Bella G, Mannina G, Torregrossa M, Viviani G (2011) Evaluation of biomass activity and wastewater characterization in a UCT-MBR pilot plant by means of respirometric techniques. *Desalination* 269:190-197.
- Tremier A, De Guardia A, Massiani C, Paul E, Martel JL (2005) A respirometric method for characterising the organic composition and biodegradation kinetics and the temperature influence on the biodegradation kinetics, for a mixture of sludge and bulking agent to be co-composted. *Bioresource Technology* 96:169-80.

- V -

- Väisänen OM, Weber A, Bennisar A, Rainey FA, Busse H-J, Salkinoja-Salonen MS (1998) Microbial communities of printing paper machines. *Journal of Applied Microbiology* 84:1069-1084.
- Venkateswaran A, McFarlan SC, Ghosal D, Minton KW, Vasilenko A, Makarova K, Wackett LP, Daly MJ (2000) Physiologic determinants of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2620-2626.

- W -

- Weisburg WG, Giovannoni SJ, Woese CR (1989) The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of ribosomal-rna composition on phylogenetic tree construction. *Systematic and Applied Microbiology* 11:128-134.

White O, Eisen JA, Heidelberg JF, Hickey EK, Peterson JD, Dodson RJ, Haft DH, Gwinn ML, Nelson WC, Richardson DL, Moffat KS, Qin HY, Jiang LX, Pamphile W, Crosby M, Shen M, Vamathevan JJ, Lam P, McDonald L, Utterback T, Zalewski C, Makarova KS, Aravind L, Daly MJ, Minton KW, Fleischmann RD, Ketchum KA, Nelson KE, Salzberg S, Smith HO, Venter JC, Fraser CM (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* 286:1571–1577.

Wolin HL, Naylor HB (1957) Basic nutritional requirements of *Micrococcus lysodeikticus*. *Journal of Bacteriology* 74:163–167.

Work E (1964) Chemical structure of bacterial cell walls: Amino-acids of walls of *Micrococcus radiodurans*. *Nature* 201:1107–1109.

Work E, Griffiths H (1968) Morphology and chemistry of cell walls of *Micrococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology* 95:641–657.

- Y -

Yang Y, Itoh T, Yokobori S, Itahashi S, Shimada H, Satoh K, Ohba H, Narumi I, Yamagishi A (2009) *Deinococcus aerius* sp. nov., isolated from the high atmosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:1862–6.

Yang Y, Itoh T, Yokobori S-I, Shimada H, Itahashi S, Satoh K, Ohba H, Narumi I, Yamagishi A (2010) *Deinococcus aetherius* sp. nov., isolated from the stratosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:776–9.

Yuan M, Zhang W, Dai S, Wu J, Wang Y, Tao T, Chen M, Lin M (2009) *Deinococcus gobiensis* sp. nov., an extremely radiation-resistant bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:1513–7.

- Z -

Zhang YM, Liu JK, Shouri MR, Wong TY (2006) Characterization of a Mn-dependent fructose-1,6-bisphosphate aldolase in *Deinococcus radiodurans*. *Biometals* 19:31–37.

Zhang YM, Liu JK, Wong TY (2003) The DNA excision repair system of the highly radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* is facilitated by the pentose phosphate pathway. *Molecular Microbiology* 48:1317–1323.

Zhang YM, Wong TY, Chen LY, Lin CS, Liu JK (2000) Induction of a futile Embden-Meyerhof-Parnas pathway in *Deinococcus radiodurans* by Mn: possible role of the pentose phosphate pathway in cell survival. *Applied and Environmental Microbiology* 66:105–112.

Abréviations

Abréviations

Eléments - Composés

C	Carbone
H	Hydrogène
N	Azote
O	Oxygène
P	Phosphore
S	Soufre
YE	Extrait de levure - Yeast extract

- A -

A^E	Concentration de l'espèce A dans les gaz d'entrée du bioréacteur
A^S	Concentration de l'espèce A dans les gaz de sortie du bioréacteur
$A_{dissous}$	Concentration de l'espèce A dans la phase liquide du bioréacteur
A_{gaz}	Concentration de l'espèce A dans la phase gaz du bioréacteur
ACP	Analyse en composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique

- B -

BWA	Burrows-Wheeler Aligner
-----	-------------------------

- C -

[C]	Concentration de l'élément carbone dans le milieu de culture
C^*	Solubilité maximale de l'oxygène
CFU	Colony forming unit
CI	Carbone inorganique
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CMG	Milieu complexe glucose - Complex medium glucose
CO_2	Dioxyde de carbone
CO_3^{2-}	Ion carbonate
CO_2^E	Fraction molaire de dioxyde de carbone dans le flux de gaz d'entrée du bioréacteur
CO_2^S	Fraction molaire de dioxyde de carbone dans le flux de gaz de sortie bioréacteur

$CO_{2dissous}$	Concentrations en dioxyde de carbone dissous dans le milieu de culture
COT	Carbone organique total
CT	Carbone total
- D -	
DCU	Digital central unit
DCW	Dry cell weight
ddp	Différence de potentiel
Dgeo extract	<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300 extract
DM	Milieu défini - Defined medium
DMG	Milieu défini glucose – Defined medium glucose
DO _{600nm}	Densité optique à 600 nm
DO	Dissolved oxygen
DSMZ	Deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen
- E -	
[E]	Concentration de l'élément E dans le milieu de culture
- F -	
f YE	Fraction of yeast extract
F	Facteur d'excès
- G -	
g	Accélération
Glc	Glucose
- H -	
H_{CO_2}	Constante de Henry pour le dioxyde de carbone
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
H ₃ PO ₄	Acide ortho-phosphorique
H ₂ CO ₃	Acide carbonique
HCO ₃ ⁻	Ion hydrogénocarbonate
HPLC	High performance liquid chromatography
- I -	
ICP-AES	Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry
ISA	Ionic strenght adjustor

- K -

$k_L a_{O_2}$	Coefficient global de transfert de l'oxygène dans la phase liquide
K1	Constante d'équilibre pour la dissociation du dioxyde de carbone dissous en ions hydrogénocarbonates
K2	Constante d'équilibre pour la dissociation des ions hydrogénocarbonates en carbonates
KDPG	2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate

- L -

LPS	Lipopolysaccharides
-----	---------------------

- M -

m	Moyenne des variables xi
MS	Masse sèche
MCD	Milieu chimiquement défini
MM	Milieu minimal – Minimal medium
MOPS	Acide morpholino-3-propane sulfonique

- N -

N_2^E	Fraction molaire d'azote dans les gaz d'entrée du bioréacteur
N_2^S	Fraction molaire d'azote dans les gaz de sortie du bioréacteur
NAG	N-acétyl-glucosamine
NAM	Acide N-acétyl-muramique
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase - Oxyde nitrique synthase
NT	Azote total

- O -

O ₂	Dioxygène
O_2^E	Fraction molaire de dioxygène dans le flux de gaz d'entrée du fermenteur
O_2^S	Fraction molaire de dioxygène dans le flux de gaz de sortie du fermenteur
$O_{2dissous}$	Concentration en dioxygène dissous dans le milieu de culture
OD _{600nm}	Optical density at 600 nm
OUR	Oxygen uptake rate

- P -

P	Produit
P_{atm}	Pression atmosphérique
P_{ferm}	Surpression dans le fermenteur
p_i	Pression partielle du gaz i (% de la saturation)
$P_{O_2}^*$	Pression partielle maximale en oxygène dissous dans le milieu
PCA	Principal component analysis
PCR	Polymerase chain reaction
6PGDH	6-phosphogluconate déshydrogénase
PGY	Peptone glucose extrait de levure
PGYA	Peptone glucose extrait de levure agar
Pol	Polymérase

- Q -

$Q_{(t)}$	Débit d'alimentation en substrat
Q_g^E	Débit gazeux à l'entrée du fermenteur
Q_g^S	Débit gazeux à la sortie du fermenteur
q_{CO_2}	Vitesse spécifique de production du dioxyde de carbone
q_{O_2}	Vitesse spécifique de consommation du dioxygène
QR	Coefficient respiratoire
qsp	Quantité suffisante pour

- R -

r_A	Vitesse de production/consommation du composé A
r_{CO_2}	Vitesse de production du dioxyde de carbone – Carbon dioxide production rate
r_{O_2}	Vitesse de consommation de l'oxygène – Oxygen uptake rate
RI	Indice de réfraction
ROS	Reactive oxygen species - Espèces réactives oxygénées
RQ	Respiratory quotient

- S -

s	Ecart type des variables Xi
S	Concentration du substrat dans le fermenteur
S_{alim}	Concentration de la solution d'alimentation
S_{max}	Concentration maximale en substrat dans le bioréacteur

S_t	Concentration en substrat à l'instant t
SAB	Sérum albumine bovine
SOD	Superoxyde dismutase
- T -	
T	Température
t_{max}	Durée maximale d'obtention de la concentration maximale en substrat
TGY	Tryptone glucose yeast extract – Tryptone glucose extrait de levure
- U -	
UV	Ultra-violets
- V -	
V_L	Volume de phase liquide
V_g	Volume de phase gaz
V_0	Volume initial
V_{sels}	Volume de sels
V_{pH}	Volume de liquides correcteurs de pH
V_{evap}	Volume d'eau évaporée
V_{prel}	Volume prélevé
V_{alim}	Volume de solution de substrat
- W -	
WCW	Wet cell weight
- X -	
X	Biomasse
X_i	Variable
X_{MS}	Biomasse sèche
- Y -	
$Y_{C,X}$	Rendement de production de biomasse à partir du carbone
$Y_{E,X}$	Rendement de production de biomasse à partir de l'élément E
Y_{S,CO_2}	Rendement de conversion du substrat en CO_2
$Y_{S,X}$	Rendement de production de biomasse à partir du substrat
Y_i	Variable centrée réduite
YE	Yeast extract - Extrait de levure

YEGM	Yeast extract glucose medium
YPD	Yeast extract peptone dextrose

Variables grecques

α	Coefficient correcteur
ψ_j	Degré de réduction du composé j
μ	Taux de croissance de la biomasse
Φ_A	Flux de transfert global
ρ_{alim}	Masse volumique de la solution d'alimentation

Unités

%	Pourcentage
Ω -cm	Ohm par centimètre
°C	Degré Celsius
bars	Bars
Da	Daltons
g	Gramme
Gy	Gray
h	Heure
Hz	Hertz
J.m ⁻²	Joule par mètre carré
L	Litre
m	Mètre
M	Moles par litre
min	Minute
mmHg	Millimètre de mercure
mol	Mole
N	Equivalents par litre
Osm.kg ⁻¹	Osmole par kilogramme
ppm	Partie par million
psi	Pound per square inch – livre par pouce carré
Rd	Rad
rep	Röntgen equivalent physical
rpm	Rotations par minute
s	Seconde
V	Volts