

This document describes preparation of defined media for the cultivation of *Clostridium phytofermentans*. **Medium M6M** contains nitrogen, phosphate, a carbon source, magnesium sulfate, and vitamins. In addition to the contents of Medium M6M, **Medium M6** contains amino acids (AA1 solution), nucleotides (XT2 solution), and trace metals (NTA).

### Preparation du milieu M6 et M6M

#### PREPARATION DU MILIEU M6 (complet) pour 100 ml

M6 base	93 ml
AA1 solution	1 ml
XT2 Solution	4 ml
NTA	100 µl
CPV4 Vitamin mix	1 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 30g/L	100 µl
Source de Carbone	0.3% (i.e 1.5 ml de 20 % glucose)

#### PREPARATION DU MILIEU M6M (minimal) pour 100 ml

M6 base	97 ml
CPV4 Vitamin mix	1 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 30g/L	100 µl
Source de Carbone	0.3% (i.e 1.5 ml de 20 % glucose)

###

#### M6 base : milieu de base (100 ml)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.00 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.10 g
Cysteine.HCl	0.10 g
H <sub>2</sub> O	100 mL
0.1% Resazurin	0.10 mL

Ⓢ Solution autoclavée, conservée à température ambiante

#### NTA : solution d'éléments traces préparée au Génoscope par Isabelle (4L)

1- Nitrilotriacetic acid (C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> )	7.64 g
2- Calcium Chloride dihydrate (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	1.80 g
3- Iron (III) Chloride hexahydrate (Cl <sub>3</sub> Fe.6H <sub>2</sub> O)	3.24 g
4- Manganèse(II) Chloride tetrahydrate (Cl <sub>2</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O)	0.80 g
5- Zinc Chloride (Cl <sub>2</sub> Zn)	0.16 g
6- Boric acid (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0.08 g
7- Chromium (III) Chloride hexahydrate (CrCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0.32 g
8- Cobaltous Chloride hexahydrate (CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0.28 g
9- Cupric Chloride dihydrate (CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0.20 g
10- Nickel (II) Chloride hexahydrate (Cl <sub>2</sub> Ni.6H <sub>2</sub> O)	0.28 g
11- Sodium Molybdate dihydrate (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0.28 g
12- Sodium Selenite pentahydrate (Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> . 5H <sub>2</sub> O)	0.32 g
H <sub>2</sub> O	3500 mL

⇒ pH~2.86

⇒ Ajuster pH à 7 avec 8ml NaOH 5M

Ⓢ Solution filtrée, conservée à température ambiante (aliquots à -20°C)

#### XT2 Solution : solution de bases (50ml)

Xanthine	0.125 g
Thymine	0.125 g
H2O	47 mL
1N NaOH	3 mL

Ⓢ Solution filtrée, conservée à 4°C

#### Solution MgSO4.7H2O à 30g/L

MgSO4.7H2O	3g
H2O	100 ml

Ⓢ Solution autoclavée, conservée à température ambiante

#### CPV4 Vitamin Mix : solution de vitamines (100ml)

p-Aminobenzoic Acid	4.0 mg
Biotin	0.1 mg
Folinic Acid	0.6 mg
Nicotinamide	8.0 mg
Pantethine	0.5 mg
Pyridoxal HCl	0.4 mg
Riboflavin	3.0 mg
Thiamine	1.0 mg

Ajouter 80 ml H2O

pH initial ≈ 5

Ajuster le pH à 7 avec 1N NaOH **Attention : commencer en ajoutant 50 ul**

Ajuster le volume avec H2O à 100 ml

Ⓢ Solution filtrée, conservée à 4°C

#### AA1 Solution : solution d'acides aminés (50ml)

Alanine	0.25 g
Arginine	0.25 g
Histidine	0.25 g
Isoleucine	0.25 g
Leucine	0.25 g
Methionine	0.25 g
Proline	0.25 g
Valine	0.25 g
H2O	50 mL

Ⓢ Solution filtrée, conservée à 4°C

###