



**HAL**  
open science

# Rôle des microorganismes des nuages dans la chimie atmosphérique. Comparaison avec la chimie radicalaire

Mickaël Vaïtilingom

► **To cite this version:**

Mickaël Vaïtilingom. Rôle des microorganismes des nuages dans la chimie atmosphérique. Comparaison avec la chimie radicalaire. Sciences de la Terre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22124 . tel-00783928

**HAL Id: tel-00783928**

**<https://theses.hal.science/tel-00783928>**

Submitted on 2 Feb 2013

**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.

N° d'Ordre : D. U. 2124

**UNIVERSITE BLAISE PASCAL**  
**(U.F.R. de Recherche Scientifique et Technique)**

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES**  
**N° : 670**

**THÈSE**

Présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**

Spécialité : Chimie Organique Biologique et Physique de l'atmosphère

Par

**Mickaël VAÏTILINGOM**

Master Recherche de l'Université Blaise Pascal

**Rôle des microorganismes des nuages dans la chimie atmosphérique.  
Comparaison avec la chimie radicalaire**

**Soutenue le 6 mai 2011, devant la commission d'examen :**

**Président :**

Patrick BACHELERY

Professeur d'Université  
Université Blaise Pascal - Clermont II

**Rapporteurs :**

Christian GEORGE

Directeur de Recherche – CNRS  
Université Claude Bernard Lyon 1

Richard SEMPERE

Directeur de Recherche - CNRS  
Université de la Méditerranée

**Examineurs :**

Gilles BERGAMETTI

Directeur de Recherche - CNRS  
Université Paris-Est Créteil

Nadine CHAUMERLIAC

Directeur de Recherche - CNRS  
Université Blaise Pascal - Clermont II

Anne-Marie DELORT

Directeur de Recherche - CNRS  
Université Blaise Pascal - Clermont II

Laurent DEGUILLAUME

Physicien-adjoint  
Université Blaise Pascal - Clermont I

## Résumé

Les nuages sont des systèmes multiphasiques (gaz, liquide, solide) dans lesquels la matière organique dissoute est soumise à de multiples transformations chimiques. Ces transformations en phase aqueuse de l'atmosphère sont supposées être uniquement le fait de processus abiotiques, majoritairement liés aux processus photochimiques et à la réactivité des radicaux libres ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{NO}_3\cdot$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ , etc.). De récentes études ont montré la présence de microorganismes (bactéries, champignons dont levures) métaboliquement actifs dans les nuages. Ceci soulève la question de leur activité, en tant que biocatalyseurs dans la transformation des molécules organiques comme alternative aux voies photochimiques. L'objectif de ce travail est d'estimer dans quelle mesure la biomasse active peut impacter la chimie du nuage.

Les analyses microbiologiques (ATP, cellules totales et cultivables, identifications taxonomiques) d'échantillons d'eau nuageuse collectés au sommet du puy de Dôme (1465 m) ont été réalisées de 2003 à 2010. Le contenu total en cellules microbiennes dans l'eau nuageuse est en moyenne de l'ordre de  $1 \times 10^5$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  pour les bactéries et de  $1 \times 10^4$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  pour les champignons (dont levures). Les mesures de la concentration en ATP indiquent que la majorité des cellules microbiennes de l'eau du nuage est dans un état viable (valeur moyenne:  $\sim 4 \times 10^{-6}$  pmol ATP cellule $^{-1}$ ).

Afin d'étudier l'influence biocatalytique de ces microorganismes dans le nuage, des solutions d'eau nuageuse naturelles et artificielles ont été incubées en présence de microorganismes et/ou d'irradiation UV (avec ou sans ajout de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Cela a permis d'évaluer la contribution des processus biocatalytiques et photo-induits (*via* la production de radicaux hydroxyle  $\cdot\text{OH}$ ) sur les transformations du méthanol, du formaldéhyde et des principaux acides carboxyliques présents dans l'eau nuageuse (acétate, formiate, oxalate, succinate et malonate). Les vitesses de bio- et de photo-transformation de ces composés organiques obtenues dans nos conditions expérimentales sont du même ordre de grandeur (excepté pour l'oxalate). L'acidité du milieu, ainsi que la présence d'irradiation UV et de radicaux  $\cdot\text{OH}$ , ne semblent pas inhiber l'activité métabolique des microorganismes du nuage; de plus, la biodégradation du  $\text{H}_2\text{O}_2$  présent dans l'eau nuageuse naturelle par sa microflore endogène a également été observée.

Cela implique que les microorganismes peuvent modifier le bilan carboné, mais aussi la capacité oxydante au sein de la phase aqueuse du nuage et par conséquent influencer sur la chimie atmosphérique.

**Mots clés:** Chimie atmosphérique, microorganismes, composés organiques, bio-transformation, photo-transformation.

## Abstract

Clouds are multiphase atmospheric systems in which the dissolved organic compounds, such as carboxylic acids, are subject to multiple chemical transformations in the aqueous phase. We investigated to which extent the active biomass (bacteria, yeasts and fungi) existing in cloud water represents an alternative route to the chemical reactivity of organic compounds.

Microbial analysis of cloud water sampled at the puy de Dôme Mountain (1465 m.a.s.l.; France) has been performed between 2003 and 2010. In average, the total microbial cells content in cloud water was  $1 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup> for bacteria, and  $1 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup> for fungi and yeasts. The ATP cell concentration values measured in cloud water samples prove the existence of a metabolic activity into cloud droplets.

To study the biocatalytic influence of viable microorganisms on organic compounds in cloud water, artificial and natural cloud water solutions were incubated in presence of cultivable cells in the dark or under UV irradiation (with and without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition). Contribution of biocatalytic and photo-induced processes (*via*  $\cdot$ OH radicals production) over transformation of methanol, formaldehyde and the main carboxylic acids present in cloud water (acetate, formate, oxalate, succinate and malonate) were determined from these experiments. Bio- and photo-transformation rates of these organic compounds obtained in our experimental conditions are in the same range of order (except for oxalate). Microorganisms present in the natural cloud samples are not damaged or metabolically inactivated by the acidity of the cloud water, and by the presence of UV radiation and  $\cdot$ OH radicals. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> present in the natural cloud water samples was also biodegraded during the incubation-time by the endogenous microflora.

This study shows that microorganisms could affect the carbon budget, but also the oxidative capacity of the cloud aqueous phase and consequently could influence the atmospheric chemistry.

**Keywords:** Atmospheric chemistry, microorganisms, organic compounds, bio-transformation, photo-transformation.



**Le puy de Dôme  
Auvergne**

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous les membres des laboratoires qui m'ont accueilli au cours de ma thèse : ceux du SEESIB (Laboratoire de Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique), du LaMP (Laboratoire de Météorologie Physique), de l'OPGC (Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand), et du LPMM (Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macro-moléculaire).

Je remercie les directeurs de ces laboratoires pour leur accueil dans leur unité : Anne-Marie Delort au SEESIB, Wolfram Wobrock au LaMP, Andrea Flossmann et Patrick Bachèlery à l'OPGC, et Claire Richard au LPMM.

Je remercie Richard Sempéré de l'Université de la Méditerranée et Christian George de l'Université Claude Bernard Lyon 1, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je remercie Gilles Bergametti de l'Université Paris-Est Créteil et Patrick Bachèlery de l'Université Blaise Pascal pour avoir accepté de siéger au sein de mon jury de thèse.

J'exprime toute ma gratitude à Anne-Marie Delort ma directrice de thèse, qui m'a soutenu et fait confiance tout au long de ma thèse. Je la remercie pour les connaissances pluridisciplinaires qu'elle m'a apportées, pour ses conseils, sa disponibilité et sa convivialité.

Je remercie Laurent Deguillaume pour son encadrement durant ma thèse, ses conseils (notamment en chimie atmosphérique), sa patience, et également pour nos agréables virées au puy de Dôme lors des « captures » de nuage.

Je remercie Martine Sancelme de m'avoir formé à la microbiologie et aux méthodes de travail en laboratoire, et aussi pour ses précieux conseils, sa présence et son soutien constant.

J'adresse mes remerciements à Nadine Chaumerliac et Gilles Mailhot pour l'expertise en sciences de l'atmosphère qu'ils ont apportée à ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à Marius Parazols qui m'a formé à la capture de nuage, à la photochimie, et pour le temps qu'il m'a consacré malgré sa fin de thèse.

J'adresse mes remerciements aux personnes qui ont contribué à ce travail de thèse : Virginie Vinatier, Pierre Amato, Nicolas Gaïani, Tiffany Charbouillot, Christophe Bernard et Eléonore Attard.

Pour leurs conseils et leurs apports, je remercie également les personnes suivantes : Jean-Marc Pichon, Mickaël Ribeiro, Karine Sellegri, Laetitia Bouvier, Evelyn Freney, Pascale Besse-Hoggan, Régis Egrot, Franck Charmantray, Stéphane Fontanella, Elodie Cano, Carole Turpin, Stéphanie Bonnefoy, Christophe Gourbeyre, David Picard, Christian Reymond, Aurélie Coulomb, Marcello Brigante, Ivan Wawrzyniak, Isabelle Batisson et Denis Sargos.

Merci à mes camarades et amis avec lesquels j'ai passé de bons moments : Anto', Fred', Les Céline, Chacha', Cécile, Yéyé', Carlos, Mumu', Ed', Nadia, Juliane, Aourell, Romain, Stéphane, Flora, Greg', Aurélien, Mohamed, Sido', Manue', Francis, Nanar', Slavka, Marielle, Mounir, Cyril, Marie, Anne-Sophie, les Nicolas, les Pierre, les Audrey, Les Laurent, José, Christian, Claire, Maxime, Yoann, Boris, Christelle, Carole, Zeinab, Nuno, Aurélie, Johan, Hervé, Guillaume et Boogie'.

Un grand merci à mon ami Lolo pour son soutien, ses encouragements, et pour les bons moments de détente et de folie (mur de briques, gobage de nuages, week-end à Orzilhac, ...).

Je remercie avec tendresse toute ma Famille, mes parents et ma petite sœur pour leur soutien sans faille et leur affection.

Je remercie affectueusement ma Saraline pour son soutien, ses encouragements, sa présence, sa patience lors des soirées et week-end annulés pour la bonne cause, et pour toutes les petites attentions qui font du bien.

Merci aux institutions et programmes de recherche qui ont financés ce travail :



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>6</b>
I.1. Composition du nuage .....	7
I.1.1. Composition chimique du nuage .....	8
I.1.1.1. Composés inorganiques .....	8
I.1.1.2. Oxydants : Fer, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	9
I.1.1.3. Composés organiques .....	11
I.1.1.3.1. Acides mono et di-carboxyliques.....	13
I.1.1.3.2. Formaldéhyde et méthanol.....	18
I.1.2. Les microorganismes dans le nuage .....	21
I.1.2.1. Aérosolisation et transport .....	23
I.1.2.2. Facteurs de stress (hydrique, UV, température, ...)	25
I.1.2.3. Concentrations dans le nuage.....	26
I.1.2.4. Viabilité des cellules microbienne dans l'eau du nuage .....	27
I.1.2.5. Identification des souches microbiennes du nuage.....	30
I.2. Processus multiphasiques dans les nuages.....	35
I.2.1. Chimie radicalaire et photo-transformation : acides carboxyliques, formaldéhyde et méthanol.....	36
I.2.1.1. La phase gaz comme source de radicaux et oxydants.....	36
I.2.1.2. Sources et puits en phase aqueuse des radicaux .....	37
I.2.1.3. Réactivité vis-à-vis des composés organiques.....	39
I.2.2. Biotransformation : Voies du métabolisme carboné et du stress oxydant.....	42
I.2.2.1. Quelques voies du métabolisme carboné.....	42
I.2.2.2. Potentiel de biotransformation des microorganismes issus de l'atmosphère... 41	
I.2.2.3. Activité métabolique et processus photochimique : comparaison.....	47
I.2.2.4. Voie du stress oxydant : influence sur la chimie radicalaire .....	49
I.3. Problématique .....	53
<b>PARTIE II : RESULTATS.....</b>	<b>56</b>
II.1. Analyse du contenu microbiologique d'eaux de nuages .....	57
II.1.1. Matériel et méthodes .....	57
II.1.1.1. Site de prélèvement et description de l'impacteur à nuage .....	57
II.1.1.1.1. Site de prélèvement .....	57
II.1.1.1.2. Impacteur à gouttelettes.....	60
II.1.1.2. Analyses biologiques.....	61
II.1.1.2.1. Dénombrement des cellules totales .....	62
II.1.1.2.2. Dosage de l'ATP .....	64
II.1.1.2.3. Cellules cultivables, isolement et identification des souches .....	64
II.1.2. Résultats.....	67
II.1.2.1. Valeurs brutes (2007-2010) .....	67
II.1.2.2. Variabilité saisonnière (2003-2010) .....	69
II.1.2.3. Variabilité en fonction de l'origine de la masse d'air (2003-2010) .....	71
II.1.2.4. Corrélation entre les paramètres microbiologiques et physico-chimiques (2003-2010).....	71
II.1.2.5. Souches isolées de l'eau de nuage (2007-2010): Identifications taxonomiques .....	73
II.1.2.6. Souches isolées de l'eau de nuage (2007-2010) : genres microbiens majeurs74	
II.1.2.7. Arbre phylogénétique des souches bactériennes isolées de l'eau de nuage (2003-2010).....	75
II.1.2.8. Les souches du genre Sphingomonas : particularité.....	79
II.1.3. Conclusions .....	81
II.2. Biotransformation de composés organiques : souches pures / substrat unique .....	84
II.2.1. Matériel et Méthodes .....	86



II.2.1.1. Préculture microbienne en milieu nutritif.....	86
II.2.1.2. Etalonnage de la population bactérienne.....	86
II.2.1.2.1. Mesure de la densité optique à 575 nm.....	86
II.2.1.2.2. Détermination de la phase de croissance exponentielle.....	87
II.2.1.2.3. Méthodes des dilutions successives.....	87
II.2.1.2.4. Courbe de calibration.....	88
II.2.1.3. Incubation.....	89
II.2.1.4. Analyses chimiques.....	91
II.2.1.4.1. RMN <sup>1</sup> H.....	91
II.2.1.4.2. RMN <sup>13</sup> C in vivo.....	91
II.2.1.4.3. Chromatographie ionique.....	92
II.2.1.5. Détermination des vitesses de biotransformation.....	93
II.2.2. Résultats.....	96
II.2.3. Conclusions.....	138
II.3. Photo- et biotransformation en « nuage artificiel ».....	141
II.3.1. Matériels et Méthodes.....	143
II.3.1.1. Photo-réacteur.....	143
II.3.1.2. Expériences d'irradiation.....	145
II.3.1.3. Dosage du peroxyde d'hydrogène.....	145
II.3.2. Résultats, publication en discussion à <i>Atmospheric Chemistry and Physics Discussion</i> .....	146
II.3.3. Conclusions.....	165
II.4. Photo et bio-transformation dans l'eau de nuage « naturelle ».....	167
II.4.1. Matériels et Méthodes.....	168
II.4.1.1. Formaldéhyde.....	168
II.4.1.2. Filtration des échantillons d'eau nuageuse.....	168
II.4.1.3. Photo-bioréacteurs.....	169
II.4.1.4. Incubation d'eau nuageuse.....	169
II.4.2. Résultats, publication non soumise.....	172
II.4.3. Conclusions.....	196
<b>PARTIE III : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>198</b>
III.1. Conclusion générale.....	199
III.2. Perspectives.....	203
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>206</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>224</b>
III.3. Données microbiologiques de l'eau nuageuse (2003-2010).....	226
III.4. Liste des souches isolées (2007-2010).....	227
III.4.1. Souches bactériennes.....	227
III.4.2. Souches de levures.....	229
III.5. Matériels et méthodes de prélèvements d'eau nuageuse.....	230
III.5.1. Matériels de collecte d'eau nuageuse.....	230
III.5.2. Précautions et manipulations lors de la collecte d'eau nuageuse.....	231
III.6. Dosage de l'ATP et de l'ADP.....	232
III.7. Identification des souches cultivées.....	234
III.7.1. Protocole d'extraction de l'ADN.....	234
III.7.2. Amplification par PCR.....	235
III.7.3. Migration sur gel et dosage de l'ADN.....	235
III.7.3.1. Migration sur gel d'agarose.....	235
III.7.3.2. Lecture du gel sur l'Imager.....	236
III.7.3.3. Dosage d'ADN.....	236
III.7.4. Purification de l'ADN.....	236
III.8. Publication Delort et al. (2010), <i>Atmospheric Research</i> .....	238

# **INTRODUCTION**

Vus de l'espace, les nuages couvrent en permanence plus de 50% de la surface du globe. Sur les images satellites, on observe de grands systèmes nuageux sur des milliers de kilomètres à côté de champs nuageux fractionnés ou isolés. En plus de la vision esthétique qu'ils nous offrent, ils participent à d'importants processus climatiques (Seinfeld and Pandis, 2006):

- Les nuages jouent un rôle déterminant dans le bilan radiatif planétaire, en réfléchissant une partie du rayonnement solaire incident. Pour les grandes longueurs d'onde, ils absorbent le rayonnement terrestre ;
- Les nuages sont un élément important du cycle hydrologique. Ils s'évaporent de la surface terrestre, transportent l'humidité et se condensent dans l'atmosphère et retombent sous forme de précipitations ;
- En dernier lieu, les nuages sont aussi importants pour la pollution atmosphérique.

Le rôle des nuages sur la composition chimique de l'atmosphère est encore sujet à de nombreuses incertitudes et va intervenir sur trois aspects importants de l'évolution de l'atmosphère planétaire : la modification de la capacité oxydante de l'atmosphère par un forçage chimique sur la concentration des espèces chimiques oxydants (radicaux...), la transformation de certaines espèces chimiques atmosphériques pouvant aboutir à la formation de composés secondaires et enfin le taux de lessivage et donc le temps de résidence des espèces solubles (Fowler et al., 2009). Les gouttelettes de **nuage**, de par leur facilité à capter et dissoudre de nombreux composés gazeux et particulaires, constituent l'un des milieux les plus concentrés et les plus réactifs de l'atmosphère. La gouttelette de nuage peut ainsi être considérée comme un **réacteur photochimique** extrêmement efficace qui sera le lieu de nombreuses transformations. Les nuages sont également des milieux « dynamiques » contrôlés par des processus **microphysiques** qui dirigent leur formation, leur durée de vie et leur dissipation et par conséquent redistribuent les espèces chimiques entre les différents réservoirs (eau nuageuse, pluie, phase particulière, phase gazeuse, phase solide glacée).

Dans ce cadre, et depuis environ une dizaine d'années, de nombreux travaux démontrent la présence parfois importante de **matière organique** dans l'eau atmosphérique. Concernant la chimie des composés organiques dans les nuages, de nombreuses études ont montré qu'ils avaient un impact sur la capacité oxydante de l'atmosphère à travers leurs interactions avec la chimie des radicaux, des métaux de transition, ou du soufre. A l'oxydation en phase gazeuse s'ajoute donc une oxydation en phase aqueuse modifiant le bilan chimique du nuage. Cette oxydation pourrait également aboutir à la formation de composés organiques de faible

volatilité qui sont des précurseurs, lorsque le nuage évapore, des Aérosols Organiques Secondaires (AOS) (Hallquist et al., 2009).

Cependant, peu de données existent sur les mécanismes de dégradation des composés organiques dans la phase liquide atmosphérique. En terme de **photochimie**, les composés chimiques peuvent, soit absorber la lumière solaire et donc subir une photolyse directe, soit absorber très peu ou pas du tout la lumière solaire, ces composés peuvent également subir une dégradation photo-induite par des espèces absorbantes présentes dans le milieu aqueux. En milieu nuageux, ces processus peuvent devenir très importants en raison du flux actinique plus élevé dans les gouttelettes nuageuses que dans l'air interstitiel. La présence d'espèces photochimiquement actives (fer, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nitrate) va contribuer de manière importante à la capacité oxydante de ce milieu (production de radicaux <sup>•</sup>OH et NO<sub>3</sub><sup>•</sup>) et, par conséquent, va intervenir dans la dégradation des composés organiques.

Très récemment, **une nouvelle question scientifique** est venue s'ajouter à la déjà grande complexité des mécanismes impliqués en chimie atmosphérique. **En effet, la découverte cette dernière décennie de microorganismes (bactéries, champignons dont levures) présents et métaboliquement actifs dans les nuages a soulevé la question de leur activité, en tant que biocatalyseurs, dans la transformation des molécules organiques comme alternative aux voies photochimiques (Delort et al., 2010).** Bien que le rôle des microorganismes dans les cycles biogéochimiques (carbone, azote, soufre, métaux...) soit connu depuis longtemps aussi bien dans les sols que dans les milieux aquatiques, leur activité dans le milieu atmosphérique a été très peu étudiée. Au delà même de leur métabolisme, la connaissance de leur nombre et de leur diversité taxonomique reste quasiment embryonnaire. Cette absence de données est sans doute due à plusieurs facteurs : i) la difficulté de prélèvements d'eau nuageuse sur des sites instrumentés, ii) la faible concentration en microorganismes (10<sup>5</sup> cellules/mL d'eau) qui limitait, il y a peu de temps encore, l'utilisation de méthodes moléculaires d'analyse de biodiversité microbienne, iii) la prépondérance d'experts en physique et chimie de l'atmosphère étudiant ce milieu, et leur faible interaction avec des biologistes.

Les études déjà publiées montrent que les microorganismes présents dans le milieu nuageux peuvent survivre à de faibles températures, en présence de peu de nutriments, à des pH acides, à une exposition aux UV et à la présence de nombreux composés chimiques. Un aspect spécifique de ces communautés microbiennes vient de leur temps de vie limité dans l'atmosphère (quelques jours à quelques mois); en effet après aérosolisation, elles

« voyagent » dans l'atmosphère et recolonisent le milieu terrestre par dépôt sec ou *via* les précipitations. D'autre part, bien que la notion de « biogéographie atmosphérique » ait été proposée en 2010 (Womack et al., 2010), l'atmosphère reste très peu compartimentée en comparaison d'autres milieux. Enfin, même si les études sont encore rares dans ce domaine, de nombreux arguments viennent étayer l'hypothèse d'une activité biologique dans l'eau atmosphérique des nuages et donc du rôle potentiel des microorganismes dans la chimie atmosphérique.

C'est dans ce contexte scientifique très exploratoire et novateur que s'inscrit cette thèse. L'objectif majeur est de documenter la composition microbienne des nuages mais surtout d'évaluer la contribution de l'activité microbienne aux mécanismes intervenant dans la chimie atmosphérique. Plus précisément, nous avons cherché à analyser **les processus de biodégradation des composés organiques en milieu nuageux à travers des mesures *in situ* et des études en laboratoire, et à les comparer aux processus photochimiques**. Ce travail de recherche est le fruit d'une collaboration très étroite entre le laboratoire de Synthèse Et Etudes de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB) et le Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP) au sein de l'Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand (OPGC). Dans ce cadre, des prélèvements d'eau nuageuse sont effectués à la station scientifique du **puy de Dôme** et leurs mesures permettent une caractérisation des propriétés chimiques et biologiques de la phase liquide nuageuse, associée à des observations détaillées des propriétés microphysiques du nuage. Ces prélèvements effectués pour différents types de masse d'air dans des conditions météorologiques très variées et à des échelles d'observation différentes permettent d'évaluer la susceptibilité du système nuageux aux conditions environnementales et plus particulièrement de documenter et de quantifier l'impact des modifications environnementales d'origine anthropique. En laboratoire, nous avons étudié « pas à pas » l'impact des microorganismes sur la dégradation de la matière organique en travaillant de la souche microbienne pure à la flore complexe du nuage, de solutions synthétiques de composition chimique simplifiée à de l'eau nuageuse réelle. Le pH et la température de nos milieux d'incubation ont également été modifiés afin de mimer des conditions anthropisées ou non des masses d'air, ou encore des conditions saisonnières. La stratégie globale de notre approche a été de se rapprocher de plus en plus des conditions environnementales.

Après une brève introduction générale, une première partie bibliographique présente en 3 chapitres l'état de l'art sur la composition chimique et microbiologique du nuage et la réactivité chimique de ce milieu.

Les résultats sont ensuite distribués en 4 chapitres :

Le premier chapitre concerne le suivi du contenu microbien et sa variabilité quantitative sous l'influence de paramètres environnementaux abiotiques.

Dans les trois chapitres suivants sont présentés l'étude du métabolisme des microorganismes et leurs implications sur la chimie des nuages. Chronologiquement, les processus de biotransformation sont suivis tout d'abord pour des souches pures et en substrat unique (deuxième chapitre), puis sur des souches pures en milieu nuageux artificiel (troisième chapitre), jusqu'à l'étude du nuage réel et de sa flore microbienne (quatrième chapitre). Ces résultats sont présentés sous la forme de publications soumises et/ou acceptées ou qui doivent être soumises très prochainement. Pour faciliter la lecture de ce document, pour chaque publication, le document est complété par un rappel des objectifs du travail, des précisions sur les conditions opératoires et les principales conclusions de l'étude.

Enfin une partie « conclusion générale et perspectives » clôt ce document de thèse.

# **PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I.1.Composition du nuage**

### *- Généralités-*

Les nuages couvrent approximativement 60% de la surface terrestre et même s'ils ne représentent que 7% du volume total de la troposphère et 15% de la basse troposphère (Lelieveld and Crutzen, 1991 ; Pruppacher and Jaenicke, 1995), ils ont une influence majeure sur l'ensemble de l'atmosphère en raison de la surface de contact importante offerte par les gouttes de nuage et de pluie (Ravishankara, 1997). Tout d'abord, les nuages sont des vecteurs de transport efficaces qui redistribuent les émissions de gaz en traces et de particules d'aérosols de la couche limite vers la troposphère libre où ils peuvent être transportés à grande échelle (Cotton et al., 1995). Ensuite, ils interagissent avec le rayonnement solaire incident et le rayonnement infrarouge modifiant à la fois la photochimie et le bilan radiatif de la planète (Ramanathan et al., 1989). De plus, leur formation et leur durée de vie sont gouvernées par les processus microphysiques qui redistribuent les espèces chimiques entre les différentes phases du nuage : solide, liquide et vapeur (Chaumerliac et al., 2000 ; Leriche et al., 2001 ; Tilgner et al., 2005 ; Leriche et al., 2007). Les nuages peuvent aussi être à l'origine de précipitations, puits efficaces pour les composés en trace dans l'atmosphère. Enfin, ils constituent un milieu réactionnel très efficace (Jacob et al., 1986 ; Möller et al., 1996 ; Laj et al., 1997).

On peut souligner deux aspects originaux de la réactivité chimique au sein du nuage : (1) Les processus photochimiques à l'intérieur des gouttes sont fortement amplifiés par rapport à l'air interstitiel (Mayer and Madronich, 2004). Les réactions chimiques au sein des nuages sont la plupart du temps plus rapides que les réactions équivalentes en phase gazeuse et certaines voies réactionnelles qui n'auraient pas pu se produire en phase gazeuse, comme les réactions impliquant les espèces ioniques, ont lieu au sein du nuage. (2) Des processus microbiologiques peuvent également avoir lieu dans ce milieu (Sattler et al., 2001 ; Amato et al., 2007a).

La suite de ce chapitre est dédiée à la description de la composition chimique du nuage en présentant successivement les composés inorganiques (les plus étudiés par le passé), puis organiques (au cœur de mes études). La réactivité chimique du système nuageux sera alors exposée dans ces grandes lignes. Les études décrivant la microbiologie du nuage seront



ensuite détaillées ainsi que les travaux préliminaires à la compréhension des processus de biodégradation.

### **I.1.1.Composition chimique du nuage**

#### ***I.1.1.1.Composés inorganiques***

D'après les nombreuses mesures de terrain, les ions inorganiques majeurs présents dans l'eau du nuage sont :  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . La proportion de chacun dépend bien évidemment de l'origine de la masse d'air dans lequel le nuage se forme. Ces composés chimiques sont le plus souvent analysés par chromatographie ionique (CI), ce qui ne renseigne pas sur leur formulation dans l'eau nuageuse. Ils peuvent être sous forme de sels ou d'acides, issus de sources particulières ou gazeuse. Généralement, les concentrations aqueuses en nitrate, ammonium et sulfate sont plus élevées dans les nuages provenant de zones d'activité anthropique par rapport aux autres types de nuage ; tandis que les nuages d'origine océanique contiennent les concentrations aqueuses les plus élevées en chlore et en sodium (Charbouillot et al., 2011).

Les premières études sur la chimie du nuage se sont mises en place afin de répondre à des situations de crise comme le problème des pluies acides. Parmi les acides forts produits, l'acide sulfurique est grandement responsable de l'acidification de la phase liquide atmosphérique. Le soufre en phase aqueuse se trouve sous la forme de sulfite (S(IV)) qui par oxydation se transforme en sulfate (S(VI)). Le S(IV) dans les gouttes provient du lessivage du dioxyde de soufre  $\text{SO}_2$  qui se dissocie en ions sulfites et bisulfites. En phase gaz, le dioxyde de soufre présent dans l'atmosphère est majoritairement d'origine anthropique (combustion de matières fossiles, notamment du charbon) et dans une moindre mesure d'origine naturelle (volcanisme). Dans l'eau, les différents oxydants possibles du S(IV) sont le peroxyde d'hydrogène, l'ozone, les peroxydes organiques et l'oxygène catalysé par le fer et le manganèse (Penkett et al., 1979 ; McArdle and Hoffmann, 1983 ; Leriche et al., 2003). Les études de modélisation montrent qu'environ 80% de l'oxydation totale en sulfate se déroulent dans la phase liquide atmosphérique en raison de l'efficacité de la conversion S(IV) en S(VI) (Warneck, 1999 ; Berglen et al., 2004).

L'azote en phase aqueuse se retrouve majoritairement sous la forme de nitrates et de nitrites également grandement responsables de l'acidification de la phase liquide atmosphérique. Ils proviennent en grande partie de la solubilisation des acides nitrique ( $\text{HNO}_3$ ), nitreux ( $\text{HNO}_2$ ) et pernitrique ( $\text{HNO}_4$ ) et du PAN (peroxy acétyl nitrates) produits en phase gazeuse. La présence de nuages peut donc perturber la chimie des  $\text{NO}_x$  en phase gazeuse *via* ces composés

azotés solubles. Il est à noter que la photolyse des ions nitrate et nitrite présents dans la goutte est une source de radicaux  $\text{NO}_3^\bullet$  et  $\text{NO}_2^\bullet$  (mais aussi de radicaux  $^\bullet\text{OH}$ ), qui jouent un rôle important sur l'oxydation de la matière organique dans le nuage (Herrmann et al., 1994 ; Mack and Bolton, 1999 ; Herrmann, 2003) (section I.2.1).

Le chlore en phase aqueuse est en grande partie issu de la dissolution de cristaux de sels de NaCl et dans une moindre mesure des sels de KCl,  $\text{MgCl}_2$  et de  $\text{CaCl}_2$ , ces sels sont majoritairement issus d'embruns marins. Le transfert du chlore gazeux en phase aqueuse contribue également à son bilan dans la goutte, notamment pour le HCl d'origine anthropique (combustibles fossiles et chlorofluorocarbures (CFC)) et naturelle (volcanisme) et le  $\text{CH}_3\text{Cl}$  d'origine biogénique (McCulloch et al., 1999 ; Shapiro et al., 2007). Le rôle du chlore dans la chimie des composés organiques est peu renseigné, les radicaux chlorés ( $\text{Cl}^\bullet$  et  $\text{Cl}_2^\bullet$ ) montrent une grande réactivité vis-à-vis des composés organiques présents dans le nuage, proche de celle des radicaux  $^\bullet\text{OH}$  (Herrmann, 2003). Ils sont produits à partir de la réaction du chlore libre avec les radicaux  $^\bullet\text{OH}$  et  $\text{NO}_3^\bullet$ , cependant la concentration des radicaux chlorés semble négligeable (Herrmann, 2003 ; Yu et al., 2003).

#### ***1.1.1.2. Oxydants : Fer, $\text{H}_2\text{O}_2$***

Le fer est le métal de transition le plus abondant dans les eaux atmosphériques, il s'y trouve principalement sous deux états d'oxydation : le Fer(II) et Fer(III). Son origine au sein de la goutte est essentiellement due à la dissolution du fer présent dans les particules solides, cette solubilité est dépendante de l'acidité du milieu et de la nature de l'aérosol (Deguillaume et al., 2005b ; Desboeufs et al., 2005 ; Mahowald et al., 2009). Les particules d'aérosols contenant du fer sont majoritairement issues des déserts (plus de 95%), le reste provient des aérosols émis lors de la combustion de matière fossile, et une part minime provient des panaches volcaniques (Mahowald et al., 2009).

Le fer joue un rôle direct et indirect sur la chimie des composés organiques au sein de la goutte puisque les études de modélisation semblent montrer qu'il contrôle le pouvoir oxydant de la phase liquide atmosphérique à travers son rôle dans la production de radicaux tels que  $^\bullet\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{O}_2^\bullet$ . Le rôle du fer dans la chimie du nuage varie selon sa spéciation, le rapport entre la teneur de Fe(II) et de Fe(III) peut informer sur sa réactivité potentielle, ce rapport est en partie lié à l'activité photochimique, comme l'indique les sorties de certains modèles de chimie multiphasique (teneur en Fe(II) plus importante le jour) (Ervens et al., 2003 ; Deguillaume et al., 2004), mais les quelques études de terrain n'ont pas permis de mettre en évidence un cycle diurne. Quelques valeurs de concentration en fer mesurées dans des

échantillons d'eau nuageuse sont présentées dans le Tableau I-1. Un bilan détaillé des concentrations dans l'eau atmosphérique est décrit dans Deguillaume et al. (2005). Les conclusions de cet article montrent également la réelle nécessité de décrire la spéciation du fer pour différentes conditions environnementales et de mieux caractériser la complexation entre le fer et la matière organique.

Sites d'échantillonnage	Concentrations ( $\mu\text{M}$ )		Références
	Min-Max		
	Fe(II)	Fe(III)	
Kleiner Feldberg (826 m.a.s.l <sup>1</sup> ), (Allemagne)	0,1 - 0,9	0,1 - 0,7	(Deutsch et al., 2001)
San Pedro Hill (450 m.a.s.l), (Californie, USA)	1,5 - 4,9	0,6 - 1,4	(Pehkonen et al., 1992)
San Pedro Hill (450 m.a.s.l), (Californie, USA)	0,3 - 18,7	0,0 - 4,2	(Erel et al., 1993)
Puy de Dôme (1465 m.a.s.l), (France)	0,1 - 6,8	0,0 - 5,1	(Parazols et al., 2007)

**Tableau I-1 :** Concentrations en  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{3+}$  mesurées dans l'eau nuageuse.

Le peroxyde d'hydrogène est un composé oxydant majeur au sein de la goutte d'eau nuageuse, compte-tenu de sa réactivité avec les radicaux libres, la matière organique, le fer, le soufre, etc.

Une part du  $\text{H}_2\text{O}_2$  en phase aqueuse provient de la solubilisation du  $\text{H}_2\text{O}_2$  gazeux, le reste est produit *in situ* au sein de la goutte (McElroy, 1986). En phase gaz, il provient de la combinaison bi-moléculaire des radicaux hydroperoxydes  $\text{HO}_2^\bullet$  (issus de la photolyse de l'ozone), ainsi que de la réaction des radicaux  $\text{HO}_2^\bullet$  avec ses hydrates (Lee et al., 2000 ; Valverde-Canossa et al., 2005). Les teneurs en  $\text{H}_2\text{O}_2$  gazeux, plus importantes durant le jour, attestent du rôle de l'activité photochimique, de plus sa concentration est également corrélée avec l'augmentation de la teneur en  $\text{O}_3$  troposphérique (Gnauk et al., 1997).

La production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en phase aqueuse est multiple et est imbriquée avec la chimie des radicaux, du fer et des composés organiques en phase liquide (cf section 2-1). Elle provient, entre autre, de la combinaison des radicaux  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{O}_2^\bullet$ , et de la photolyse des peroxydes organiques (notamment pour le méthyl-hydroperoxyde dont la photolyse entraîne la formation de formaldéhyde et de radicaux  $\text{HO}_2^\bullet$ ) (Lee et al., 2000 ; Monod et al., 2007 ; Möller, 2009). Le cycle catalytique du fer (conversion  $\text{Fe(II)} \leftrightarrow \text{Fe(III)}$ ) contribue également à la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  au sein de la goutte nuageuse (Zuo and Deng, 1997) à travers par

<sup>1</sup> m.a.s.l : meter above sea level

exemple la réaction  $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2$  et la photolyse des complexes Fer-oxalate. La photo-production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans l'eau nuageuse a été mise en évidence par Arakaki et al. (1995) qui indiquent que la photolyse des complexes Fer-oxalate n'est pas la source majeure de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en solution. Diverses voies de dégradation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ont également lieu au sein de la goutte : la photolyse, les phénomènes d'oxydation du S(IV) en S(VI) (McArdle and Hoffmann, 1983 ; Richards et al., 1983), l'effet Fenton (Arakaki and Faust, 1998), et aussi par les réactions avec la matière organique, les peroxydes organiques et les autres radicaux libres (cf section I.2.1).

Le peroxyde d'hydrogène est le peroxyde majeur présent dans la phase aqueuse du nuage (plus de 95%) (Kelly et al., 1985), et on le retrouve à des concentrations plus élevées dans les nuages sous influence continentale (Claiborn and Aneja, 1991 ; Marinoni et al., 2011). Un relevé non-exhaustif des concentrations en  $\text{H}_2\text{O}_2$  mesurées dans des échantillons d'eau nuageuse est présenté dans le Tableau I-2. Les concentrations sont très variables mais semblent plus élevées pour des masses d'air polluées.

Sites d'échantillonnage	Concentrations ( $\mu\text{M}$ ) Min-Max	Références
Whitetop Mountain (1689 m.a.s.l), (Virginie, USA)	0 - 247	(Olszyna et al., 1988)
Los Angeles, USA (par avion)	1 - 167	(Richards, 1995)
Schmücke Mountain (937 m.a.s.l), (Allemagne)	0 - 14	(Valverde-Canossa et al., 2005)
Mt Mitchell , (Caroline du Nord, USA)	0 - 219	(Claiborn and Aneja, 1991)
Mt Mitchell , (Caroline du Nord, USA)	8 - 103	(Rao and Collett, 1995)
Côte Atlantique des USA (par avion)	0 - 112	(Barth et al., 1989)
Terres de l'est des USA (par avion)	0 - 72	(Kelly et al., 1985)
La Jolla Peak (478 m.a.s.l), (Californie, USA)	13 - 72	(Rao and Collett, 1995)
Puy de Dôme (1465 m.a.s.l), (France)	0 - 19	(Marinoni et al., 2011)

**Tableau I-2** : Concentrations en  $\text{H}_2\text{O}_2$  mesurées dans l'eau nuageuse.

### ***I.1.1.3. Composés organiques***

Dans la phase homogène gazeuse troposphérique, il existe une myriade de composés organiques (COVs : composés organiques volatils) qui proviennent de sources dites primaires et secondaires. La diversité et la quantité de ces composés ont augmenté dans l'atmosphère en raison des modifications de nos modes de vie (utilisation de ces composés comme carburants, solvants organiques, pesticides, etc.). Goldstein et Galbally (2007) estiment qu'environ  $10^4$  à  $10^5$  molécules organiques auraient été mesurées, et qu'elles représenteraient seulement une

faible fraction des molécules organiques présentes dans l'atmosphère (Goldstein and Galbally, 2007). Les sources primaires de ces composés organiques sont le résultat de l'activité naturelle (émissions biogéniques, brûlage de biomasse, érosion des sols sous l'action du vent, ...) et de l'activité humaine (rejets industriels, combustion de carbone fossile, utilisation de solvants...). Ces composés présentent un intérêt scientifique majeur pour plusieurs raisons : ils représentent un risque sanitaire; ils modifient la capacité oxydante de l'atmosphère à travers leur réactivité chimique et photochimique; ils jouent un rôle primordial au niveau climatique en modifiant les propriétés physico-chimiques des aérosols. Ainsi, ils peuvent aboutir à la formation de nouvelles particules appelées aérosol organique secondaire (AOS) (Chung and Seinfeld, 2002 ; Limbeck et al., 2003 ; Takekawa et al., 2003 ; Claeys et al., 2004 ; Davidson et al., 2005 ; Kanakidou et al., 2005 ; Hallquist et al., 2009). Les recherches sont actuellement bien avancées dans le domaine de la chimie et de la photochimie des Composés Organiques Volatils (COVs) en phase gazeuse homogène (Atkinson and Arey, 2003 ; Atkinson et al., 2006). Ces composés subissent une oxydation progressive, mettant en jeu des composés organiques intermédiaires (COV secondaires) plus ou moins fonctionnalisés. En revanche, notre compréhension reste encore lacunaire en ce qui concerne (1) les transferts entre la phase gazeuse et les phases condensées (aérosols, gouttes, cristaux) ; (2) la réactivité multiphasique ; (3) la caractérisation de la matière organique dans le nuage.

La majeure fraction des COV secondaires en phase gaz est fortement hydrosoluble, en raison de la présence de groupements polaires. Il a été montré que la présence de deux fonctions «polaires» sur la chaîne carbonée est suffisante pour conduire à sa dissolution quasi-totale dans la phase aqueuse lors d'un épisode nuageux (Aumont et al., 2005). Par conséquent, à l'oxydation en phase gazeuse s'ajoute une oxydation en phase aqueuse.

En terme quantitatif, la matière organique dissoute représente une fraction significative de la matière soluble totale (Hadi et al., 1995 ; Saxena and Hildemann, 1996 ; Fuzzi et al., 2002). Le carbone organique dissous (COD) est constitué d'acides carboxyliques, d'aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde, glyoxal, etc.), d'alcools (méthanol, éthanol, 2-propanol, phénol, etc.), de composés aromatiques, d'alcanes, d'alcènes, d'alkyles, de composés hydrocarbonés, d'hydropéroxydes organiques, de cétones, de terpénoïdes, de sucres, et de composés de haut poids moléculaire comme les substances humiques, etc .

Ce travail de thèse est centré sur le devenir des acides carboxyliques majeurs de la phase aqueuse du nuage car ces composés représentent une part importante de la matière organique dans le nuage. Nous avons également suivi le formaldéhyde (l'aldéhyde le plus abondant dans l'eau nuageuse) et le méthanol (l'alcool le plus abondant en phase gazeuse). Dans la suite,

l'objectif est de présenter les quantités mesurées *in situ* de ces composés et de décrire leurs sources et puits sur la base d'une compilation d'études *in situ* et de modélisation du système nuageux.

#### *1.1.1.3.1. Acides mono et di-carboxyliques*

Les acides carboxyliques présents dans la phase aqueuse du nuage, peuvent provenir de différentes sources : (1) leur solubilisation depuis la phase gazeuse ; (2) leur dissolution depuis la phase particulaire se trouvant dans la phase aqueuse; ou (3) la réactivité chimique en phase aqueuse des composés organiques.

##### *- Production en phase gazeuse et solubilisation dans le nuage -*

Une partie des acides carboxyliques de la phase aqueuse du nuage proviendrait de leur solubilisation depuis la phase gaz (Keene and Galloway, 1986 ; Chebbi and Carlier, 1996 ; Sellegri et al., 2003). En phase gazeuse homogène, on retrouve essentiellement des acides carboxyliques de faible masse moléculaire (du C<sub>1</sub> au C<sub>10</sub>), principalement des acides mono-carboxyliques (formique, acétique, propanoïque, pyruvique, etc.) et quelques acides di-carboxyliques (oxalique, succinique, malonique, maléique, etc.). Dans la majorité des mesures sur le terrain sur la phase gazeuse, les acides formique et acétique sont les acides carboxyliques majoritaires, suivis des acides pyruvique et propanoïque en plus faible concentration (Keene and Galloway, 1986 ; Talbot et al., 1988 ; Chebbi and Carlier, 1996 ; Kumar et al., 1996 ; Sanhueza et al., 1996 ; Khare et al., 1999).

Une partie de ces acides carboxyliques sont émis directement en phase gazeuse troposphérique par des sources biogéniques (les océans, la végétation), naturelles (les incendies de forêts) et anthropiques (combustions fossiles ou non via l'industrie, le transport, etc.) (Talbot et al., 1988 ; Lacaux et al., 1992 ; Dibb et al., 1996 ; Kumar et al., 1996 ; Jaffrezo et al., 1998 ; Souza et al., 1999 ; Fornaro and Gutz, 2003).

Les émissions directes d'acides carboxyliques contribuent dans une moindre mesure au budget des composés carboxyliques volatils que les sources secondaires résultantes des diverses transformations photochimiques de COVs en phase gazeuse. Plusieurs études ont montré une augmentation diurne de la concentration du formiate et de l'acétate en phase gazeuse avec des maxima observés en milieu d'après-midi, cette évolution étant principalement liée à l'activité photochimique (Hartmann et al., 1991 ; Khwaja et al., 1995 ; Chebbi and Carlier, 1996 ; Khare et al., 1999). Une variation saisonnière de la concentration d'acides carboxyliques en phases gazeuse et aqueuse a aussi été mise en évidence, notamment dans des zones forestières et rurales, avec une augmentation des concentrations lors du

passage de la saison hivernale à la saison estivale (Keene and Galloway, 1986 ; Talbot et al., 1988 ; Andreae et al., 1990). Les variations diurnes et saisonnières sont liées aux évolutions de la concentration en isoprène et en monoterpènes (composés majoritairement issus de sources biogéniques (forêts)), leur photo-oxydation et leur réaction avec l'ozone en phase gazeuse génèrent des composés carboxyliques volatils (Jacob and Wofsy, 1988 ; Keene et al., 1995 ; Sanhueza et al., 1996 ; Kesselmeier et al., 2000 ; Winterhalter et al., 2003 ; Claeys et al., 2004 ; Kroll et al., 2006).

*- Solubilisation depuis la phase particulaire dans l'eau nuageuse -*

La dissolution de la part soluble des particules d'aérosols est également une source d'acides carboxyliques dans la phase aqueuse du nuage, notamment pour les acides di-carboxyliques ; la faible volatilité de ces composés explique le fait qu'ils soient peu présents en phase gazeuse (Ludwig and Klemm, 1988). Les masses d'air d'influence anthropique (combustion fossile, transport) sont celles ayant le plus de particules contenant ces diacides (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) (acides oxalique, succinique, malonique, maléique, adipique, phtalique, etc., (Kawamura and Kaplan, 1987 ; Souza et al., 1999 ; Legrand et al., 2005 ; Wang et al., 2006 ; Legrand et al., 2007). Les trois composés carboxyliques majeurs issus de la phase particulaire et dissous dans la goutte sont l'acide oxalique (le plus abondant, 64% des molécules d'acides dicarboxyliques en moyenne selon Legrand et al. (2005)), l'acide succinique et l'acide malonique (Kawamura and Ikushima, 1993 ; Sempère and Kawamura, 1994 ; Kawamura and Yasui, 2005 ; Legrand et al., 2005 ; Wang et al., 2006).

*- La réactivité chimique en phase aqueuse -*

Les acides carboxyliques de la phase aqueuse du nuage proviennent aussi des transformations chimiques de la matière organique au sein de la goutte par les radicaux oxydants ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{NO}_3\cdot$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ ), les radicaux anioniques ( $\text{O}_2\cdot^-$ ,  $\text{Cl}_2\cdot^-$ ,  $\text{Br}_2\cdot^-$ ,  $\text{SO}_4\cdot^-$ ) et aussi les réactifs non-radicalaires ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ) (Chebbi and Carlier, 1996 ; Kanakidou et al., 2005 ; Kroll and Seinfeld, 2008 ; Hallquist et al., 2009). Dans le cas de l'oxalate, sa concentration en phase aqueuse est liée en partie aux sources particulières, mais aussi à une production *in situ*, puisqu'elle est très peu liée à la source gazeuse de manière directe (compte-tenu de sa faible concentration sous forme gazeuse) (Legrand et al., 2005 ; Sorooshian et al., 2006). La réactivité en phase aqueuse des radicaux  $\cdot\text{OH}$  avec les composés phénoliques peut former de l'acide oxalique, mais aussi de l'acide acétique et de l'acide formique en plus faible quantité (Sun et al., 2010) ; le glyoxalate et le glyoxal sont également des précurseurs de la formation de l'acide oxalique en phase aqueuse (Ervens et al., 2004 ; Lim et al., 2005 ; Sorooshian et al., 2006 ; Carlton et al., 2007).

Les produits de l'oxydation en phase gazeuse de l'isoprène (métacroléine, acide méthacrylique) peuvent réagir avec  $H_2O_2$  en phase aqueuse et se transformer en composés polyalcoliques qui à leur tour peuvent se transformer en acides carboxyliques (Claeys et al., 2004 ; Warneck, 2005 ; Sorooshian et al., 2006 ; Sun et al., 2010). L'oxydation du formaldéhyde hydraté par le radical  $\cdot OH$  produit le radical hydraté formyl, qui par addition d'une molécule de dioxygène, conduit à la production d'acide formique ; cette voie peut être considérée comme une source secondaire en phase aqueuse de l'acide formique (Chameides and Davis, 1983 ; Khare et al., 1997) ; cependant elle reste minoritaire face à l'apport de la phase gazeuse (Jacob and Wofsy, 1988). La réactivité en phase aqueuse des radicaux  $\cdot OH$  avec le glyoxal et le méthylglyoxal est aussi une des sources d'acides carboxyliques (oxalique, pyruvique, acétique, formique, glycolique) (Altieri et al., 2008 ; El Haddad et al., 2009 ; Liu et al., 2009 ; Tilgner and Herrmann, 2010). Les sources secondaires d'acides carboxyliques en phase aqueuse présentées ci-dessus ne représentent qu'une partie de celles proposées dans la littérature ; qui elle-même ne présente qu'une partie des transformations chimiques possibles au sein de la goutte (compte-tenu de la grande diversité des composés organiques présents). Les mécanismes d'oxydation de la matière organique aboutissant à la production de ces acides seront présentés plus explicitement en section I.2.1.

*- Concentrations mesurées -*

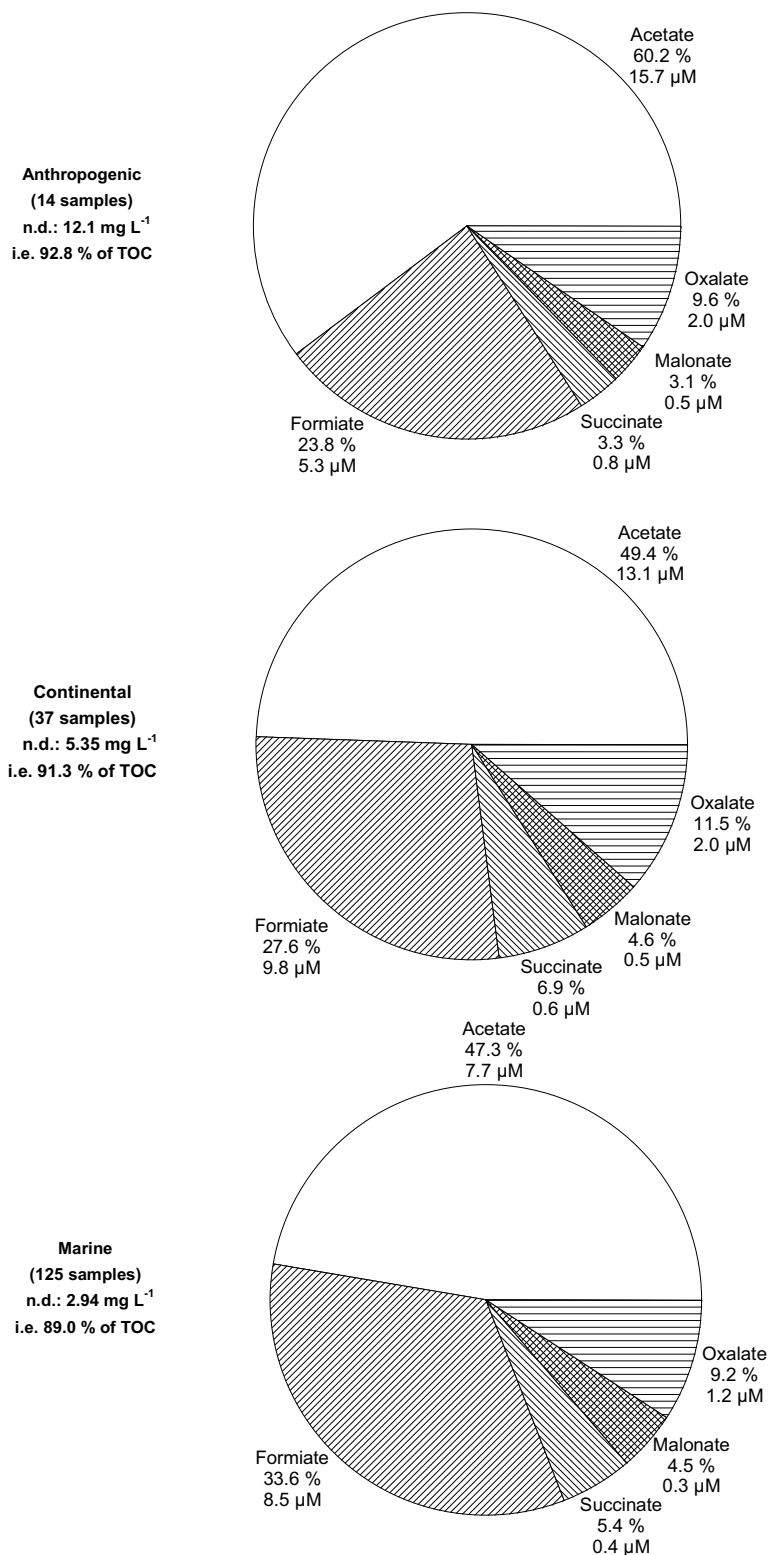
A titre d'illustration, quelques concentrations des principaux acides carboxyliques mesurés dans l'eau nuageuse prélevée sur différents sites sont présentées dans le Tableau I-3.



Référence		(Marinoni et al., 2004)	(Charbouillot et al., 2011)	(Löflund et al., 2002)	(van Pinxteren et al., 2005)	(Hegg et al., 2002)	
Site d'échantillonnage		Puy de Dôme (montagne), France	Puy de Dôme (montagne), France	Mont Rax, Autriche	Schmücke (montagne), Allemagne	Mer au sud de San Francisco (avion), USA	
Acide mono-carboxylique		MM (g mol <sup>-1</sup> )					
Formique	HCOOH	46	1 - 70	2 - 53	1 - 34	5 - 39	1 - 6
Acétique	CH <sub>3</sub> -COOH	60	1 - 48	2 - 47	5 - 38	2 - 41	0 - 11
Glycolique	CH <sub>2</sub> OH-COOH	76	0 - 10				
Glyoxylique	COOH-CHO	74	0 - 9				
Propionique	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	74	0 - 6			0 - 1	
Lactique	CH <sub>3</sub> -CHOH-COOH	90				0 - 1	
Acide di-carboxylique							
Oxalique	HOOC-COOH	90	0 - 14	0 - 15	1 - 13	1 - 6	1 - 4
Malonique	HOOC-CH <sub>2</sub> -COOH	104	0 - 4	0 - 3	0 - 3	0 - 1	0 - 1
Succinique	HOOC-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH	118	0 - 4	0 - 4	1 - 3	0 - 1	0 - 1
Maléique	HOOC-CH=CH-COOH	116	0 - 2				
Tartrique	HOOC-(CHOH) <sub>2</sub> -COOH	150	0 - 1				
Glutarique	HOOC-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COOH	132	0 - 3				0 - 1

**Tableau I-3:** Concentrations en acides carboxyliques mesurées dans l'eau nuageuse.

Les acides formique et acétique sont les acides carboxyliques les plus abondants dans l'eau de nuage, suivis des acides oxalique, succinique et malonique (Khwaja et al., 1995 ; Chebbi and Carlier, 1996 ; Khare et al., 1999 ; Löflund et al., 2002 ; Marinoni et al., 2004 ; Charbouillot et al., 2011). La contribution des acides mono- et di-carboxyliques au carbone organique dissous (COD) est estimée à 7-15 % dans l'eau nuageuse prélevée au Mont Whiteface (Khwaja et al., 1995) et à 11 % en moyenne dans l'eau nuageuse prélevée au sommet du puy de Dôme (Marinoni et al., 2004). La répartition des différentes concentrations en acides carboxyliques majeurs mesurées dans les eaux de nuage échantillonnées au sommet du puy de Dôme de 2001 à 2010 (Charbouillot et al., 2011) est présentée Figure I-1.



**Figure I-1:** Répartition molaire moyenne des 5 acides carboxyliques majeurs mesurés dans l'eau nuageuse collectée au sommet du puy de Dôme de 2001 à 2010 (Charbouillot et al., 2011).

Il est important de souligner que même si les principaux acides carboxyliques présentés ci-dessus sont présents en concentration significative, une grande partie de la matière organique en solution reste non déterminée.

#### *1.1.1.3.2. Formaldéhyde et méthanol*

##### *- Production en phase gazeuse et solubilisation dans le nuage -*

En phase gazeuse, les émissions directes de formaldéhyde sont surtout d'origine anthropique, principalement liées à la combustion de matière fossile (transport, énergie, industrie, etc.) (Lipari and Swarin, 1982 ; Satsumabayashi et al., 1995 ; Ferrari et al., 1998) mais il existe des émissions biogéniques de formaldéhyde principalement par la végétation (Seco et al., 2007, 2008) et les feux de biomasse (Holzinger et al., 1999). La photo-oxydation en phase gaz de l'isoprène, du méthane, et plus généralement des hydrocarbures est la principale source de formaldéhyde. Ceci est confirmé par plusieurs études *in situ* observant une augmentation diurne de sa concentration (Staffelbach et al., 1991 ; Foulds and Gray, 1995 ; Satsumabayashi et al., 1995 ; Kieber et al., 1999 ; Crutzen et al., 2000 ; Kesselmeier et al., 2000 ; Solberg et al., 2001 ; Trapp et al., 2001). Une variation saisonnière est également observée, notamment dans des zones rurales et forestières en période estivale (Trapp et al., 2001 ; Seco et al., 2008). Le formaldéhyde en phase gazeuse va alors se dissoudre dans la phase liquide atmosphérique en raison de sa forte constante de Henry ( $10^3 \text{ M atm}^{-1}$ ) (Sander, 1999) et participer à la chimie du nuage.

Le méthanol est l'un des composés organiques oxygénés le plus abondant dans la moyenne et basse troposphère, et le second composé organique volatil après le méthane (Singh et al., 2000 ; Singh et al., 2001). Les principales sources directes en phase gazeuse sont d'origine biogénique (végétation, océans (Heikes et al., 2002 ; Tie et al., 2003 ; Seco et al., 2007 ; Fowler et al., 2009), une partie provient des feux de biomasse (Holzinger et al., 1999 ; Tabazadeh et al., 2004 ; Holzinger et al., 2005 ; Maleknia et al., 2009) et de la combustion de fuel (Wei et al., 2010). En phase gaz, l'oxydation du méthane est une source secondaire du méthanol (Foulds and Gray, 1995). Son temps de vie est de une à deux semaines ce qui indique qu'il est transporté sur de longues distances (Dufour et al., 2007). Le méthanol est soluble dans l'eau (constante de Henry de l'ordre de  $2 \cdot 10^2 \text{ M atm}^{-1}$  (Sander, 1999)) et sa présence en phase aqueuse du nuage semble évidente, bien que les mesures de méthanol dans ce milieu soient rares.

##### *- Solubilisation depuis la phase particulaire dans l'eau nuageuse -*

La contribution de la phase particulaire au contenu en formaldéhyde aqueux est très faible par rapport au transfert depuis la phase gaz et la réactivité chimique aqueuse. On estime que moins de 1% du formaldéhyde présent au sein de la goutte est d'origine particulaire (sous forme d'hydrates) (Odabasi and Seyfioglu, 2005).

*- La réactivité chimique en phase aqueuse -*

Le formaldéhyde présent dans la phase aqueuse est aussi directement ou indirectement photo-produit à partir de la matière organique dissoute (Kieber et al., 1999 ; Southwell et al., 2010). Par exemple, l'oxydation du méthanol entraîne la formation du radical  $\cdot\text{OOCH}_2\text{OH}$  qui va se décomposer et former du formaldéhyde (Monod et al., 2000) (I-2-1). Le méthanol est lui produit en phase aqueuse à travers l'oxydation de l'éthanol et la formation de methylperoxide et de methylhydroperoxide (Deguillaume et al., 2010) cependant, cette voie est peu significative en comparaison du transfert de masse depuis la phase gaz.

*- Concentrations mesurées -*

Les principales mesures de concentrations en formaldéhyde dans les eaux nuageuses prélevées sur différents sites sont présentées dans le Tableau I-4.

Sites d'échantillonnage	Concentrations ( $\mu\text{M}$ ) Min-Max	Références
Henninger flat, Rural (Californie, USA)	0 - 36	(Grosjean and Wright, 1983)
San Pedro Hill, Côtier (Californie, USA)	14 - 37	(Igawa et al., 1989)
Henninger flat, Continental (Californie, USA)	46 - 62	(Igawa et al., 1989)
Sierra Nevada, Rural (USA)	8 - 14	(Collett Jr et al., 1990)
5 sites, Virginie, Rural (USA)	1 - 228	(Munger et al., 1995)
Los Angeles, Urbain (USA)	6 - 43	(Willard Richards, 1995)
Mt Mitchell, Eloigné des sources (Caroline du Nord, USA)	17 - 36	(Rao and Collett, 1995)
Schmüke mountain, Continental (Allemagne)	0 - 5	(van Pinxteren et al., 2005)
Puy de Dôme mountain, Eloigné des sources (France)	0 - 14	(Parazols, 2007)

**Tableau I-4 :** Concentrations en formaldéhyde mesurées dans l'eau nuageuse.

Les valeurs relevées ici montrent une grande variabilité, mais ne montrent pas de tendance liée à l'effet de site. Les concentrations dans des sites de fortes activités anthropiques sont généralement plus élevées, on observe par exemple des valeurs élevées en formaldéhyde,

allant jusqu'à 710  $\mu\text{M}$ , dans des eaux de brouillard en site pollué (San Joaquin Valley, California) (Jacob et al., 1984).

Concernant le méthanol, à notre connaissance la seule concentration relevée dans une « eau » atmosphérique, a été mesurée dans de l'eau de pluie à 0,6  $\mu\text{M}$  (Snider and Dawson, 1985).

Récemment, des mesures *in situ* de la phase liquide atmosphérique ont également démontré la présence de microorganismes viables. Il est donc primordial d'effectuer non seulement des mesures physiques et chimiques du nuage mais également biologiques afin de mieux caractériser ce milieu. La prochaine section va s'attacher à détailler les études s'intéressant aux microorganismes des nuages avec un accent fort sur leur concentration et leur viabilité dans ce milieu.

### **I.1.2. Les microorganismes dans le nuage**

#### *- Historique -*

La présence des microorganismes dans l'atmosphère a été suggérée en 1670 par Antonie van Leeuwenhoek (Gregory, 1971), et elle a été mise en évidence par Louis Pasteur qui a publié ses observations en 1861 dans son mémoire sur « Les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère » (Pasteur, 1861). C'est par l'échantillonnage et l'observation de prélèvements d'air qu'il a mis en évidence ces « corpuscules organisés ». Il a observé également une variabilité du nombre de ces « corpuscules » dans l'atmosphère pour différentes conditions : avant et après un événement pluvieux, en fonction de la force du vent, de l'altitude par rapport au sol et aussi des différences jour/nuit. Ces premières expériences d'aérobiologie ont permis à Louis Pasteur de montrer la pertinence et l'intérêt d'étudier la variabilité saisonnière et spatiale de la concentration de ces « corpuscules » dans l'air.

Ensuite, il a fallu attendre le début du 20<sup>ème</sup> siècle pour que de nouvelles études d'aérobiologie aient lieu. Fred C. Meier a constaté la présence de microorganismes viables<sup>2</sup> à haute altitude, à partir de l'observation de milieux de culture<sup>3</sup> exposés à l'air lors d'un vol au dessus de l'arctique (expériences réalisées par Charles et Anne Lindbergh) (Meier and Lindbergh, 1935). Les travaux de Imshenetsky publiés en 1978, montrent la présence de microorganismes viables (notamment de spores de champignons) à des altitudes allant jusqu'à 77 km (il a utilisé des missiles météorologiques munis de collecteurs préalablement stérilisés) (Imshenetsky et al., 1978).

La présence avérée de microorganismes viables et non-viables (bactéries, levures, champignons) dans l'atmosphère a soulevé de nombreuses questions scientifiques dans le domaine de l'écologie microbienne : transport, colonisation, suivi de pathogènes et de phytopathogènes, biogéographie, etc.

Dans le domaine de la météorologie, la présence de microorganismes est également étudiée, car ils peuvent participer au développement du nuage par leurs propriétés physiques et biologiques : comme noyaux de condensation nuageuse, de nucléation de la glace (Vali et al.,

---

<sup>2</sup> L'état viable se dit d'une cellule microbienne ayant la capacité de se multiplier lorsque les conditions sont favorables, un microorganisme viable peut être métaboliquement actif ou inactif.

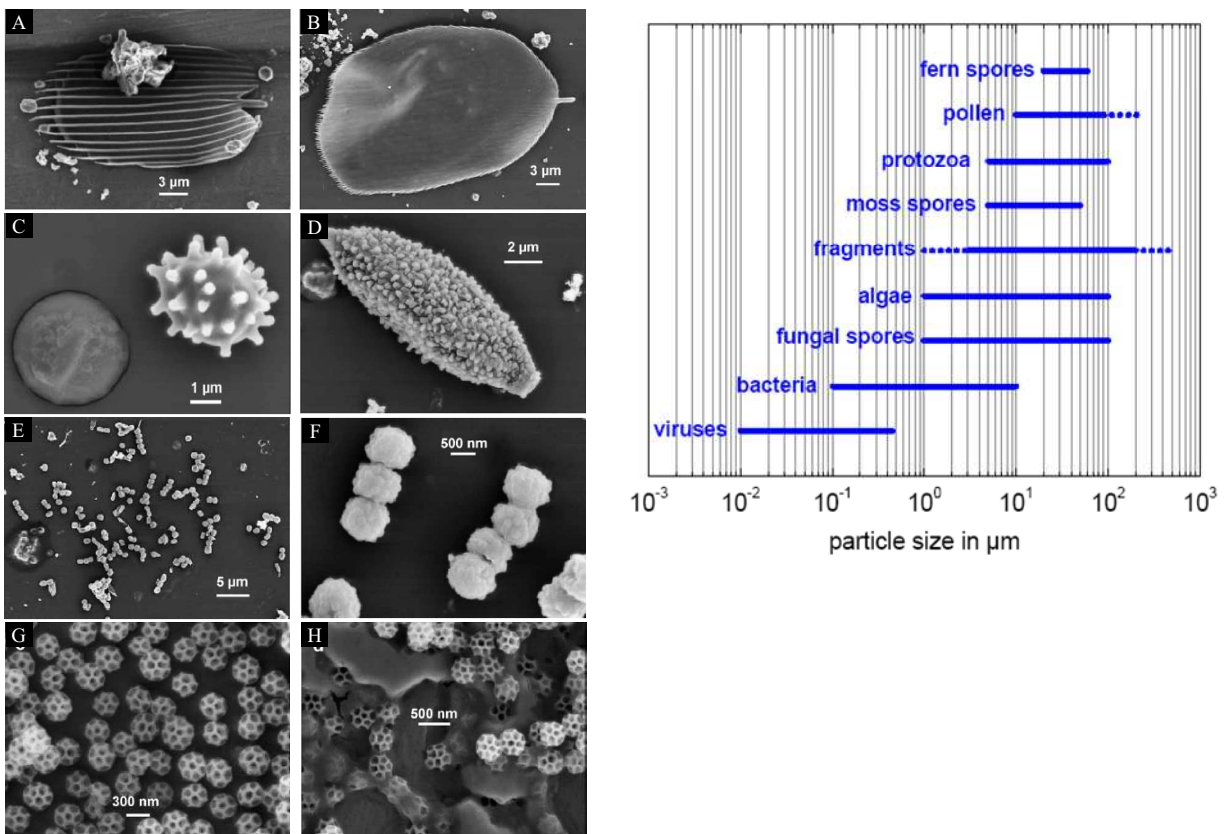
<sup>3</sup> Milieu nutritif permettant la croissance microbienne pouvant être sous forme solide ou liquide.

1976 ; Möhler et al., 2007) et par la production de molécules modifiant les propriétés de surface de l'eau tels que les biosurfactants (Ekström et al., 2010).

De nombreuses publications récentes montrent l'engouement de la communauté scientifique sur ce sujet, et sont résumées dans plusieurs revues : (Sun and Ariya, 2006 ; Möhler et al., 2007 ; Deguillaume et al., 2008 ; Burrows et al., 2009b ; Delort et al., 2010 ; Womack et al., 2010).

- *Aérosols biologiques primaires : bactéries, levures, champignons* -

Dans l'atmosphère on trouve des particules solides émises directement de la surface (des sols, des eaux de surface, de la végétation, de l'activité anthropique, etc.), parmi ces particules aériennes, on retrouve la catégorie des particules d'aérosols biologiques primaires (PBA : Primary Biological Particle), c'est le nom donné à toutes les particules solides vivantes ou mortes provenant d'organismes vivants (Matthias-Maser and Jaenicke, 1995). Dans cette catégorie d'aérosol on retrouve des fragments de végétaux et d'insectes, des pollens ( $r > \sim 5 \mu\text{m}$ ), des microorganismes : algues et champignons/levures ( $r > \sim 0,5 \mu\text{m}$ ), bactéries ( $r > \sim 0,2 \mu\text{m}$ ) et des virus ( $\sim 0,005 \mu\text{m} < r < \sim 0,25 \mu\text{m}$ ). Quelques photos de ces bioaérosols obtenues par microscopie électronique à balayage sont présentées dans la Figure I-2 (Wittmaack et al. (2005).



**Figure I-2 :** Gauche : Différents bioaérosols vus au microscope électronique à balayage. A et B : Ecailles d'insectes ; C et D : spores de champignons filamenteux ; E et F : Bactéries ; G et H : Brochosomes. (Wittmaack et al., 2005) ; droite : distribution en taille des bioaérosols ( $\mu\text{m}$ ).

On retrouve les bioaérosols dans les eaux atmosphériques (eau de brouillard, nuage, pluie, cristaux de glaces, etc.). Dans l'eau du nuage, leur concentrations par rapport aux autres particules solides est conséquente ; ils représentent 25 % en nombre et 12 % en volume des particules insolubles dans ce milieu (Matthias-Maser and Jaenicke, 1995).

### ***1.1.2.1. Aérosolisation et transport***

Avant de se retrouver dans l'atmosphère, les microorganismes sont d'abord aérosolisés de leurs milieux d'origine : les sols, les surfaces des eaux et des végétaux. Ce phénomène d'aérosolisation dépend de plusieurs facteurs : température, humidité, irradiation solaire, vitesse du vent, nature du milieu source, caractéristiques physiologiques et aérodynamisme des cellules microbiennes (bio-films, spores, filaments, pigmentations, etc.).

Une des sources d'émission majeure est constituée par les océans qui recouvrent 70% de la surface du globe et qui représentent l'un des trois grands réservoirs de biomasse microbienne (avec les sols et la végétation). Les teneurs en microorganismes sont plus élevées dans la microcouche de surface des mers par rapport à celles de l'eau sous-jacente (MacIntyre, 1974), l'interaction continue de ce milieu avec l'air assure de nombreux transferts de masse et donc de biomasse.

L'aérosolisation des microorganismes des eaux de surface se produit majoritairement par effet de bullage (« bubbling ») ; les bulles d'eau formées par l'action des vagues (crêtes des vagues, ressac) ou lors de l'impact des gouttes de pluie, éclatent en éjectant des microgouttes (« jet-drop » et « film-drop ») (Blanchard, 1989 ; Grammatika and Zimmerman, 2001). De plus, il a été montré par des expériences de laboratoire, que la concentration bactérienne est plus importante dans les microgouttes expulsées de la bulle que dans la bulle elle-même (d'un facteur d'enrichissement<sup>4</sup> de 1 à 1000). Ce phénomène d'enrichissement en contenu cellulaire des gouttes éjectées est lié à l'hydrophobicité de la surface cellulaire, l'épaisseur de la microcouche et la taille de la bulle, la composition chimique de la bulle, ainsi qu'à la concentration initiale en microorganismes. (Blanchard and Syzdek, 1982 ; Blanchard, 1989 ; Marks et al., 2001). Une étude en milieu naturel à l'interface air-mer a démontré que la concentration en bactéries et virus, dans l'air proche de la surface, était plus importante que

---

<sup>4</sup> Le facteur d'enrichissement (EF) est le rapport de la concentration en microorganismes dans la microcouche à celle trouvée dans l'eau sous-jacente.



celle de la micro-couche de la surface et que par rapport à ces deux milieux l'eau subsurfacique était la moins concentrée en microorganismes (Aller et al., 2005). L'étude de Burger et al (1985) montre que le phénomène d'enrichissement cellulaire dans les « jet-drop » et « film-drop » est en partie lié aux propriétés hydrophobes de la paroi cellulaire. Leurs expériences réalisées avec la bactérie *Serratia marcescens* montrent que le facteur d'enrichissement est dû à la présence d'un pigment rouge, la prodigiosine, qui est un composé hydrophobe (Burger and Bennett, 1985).

Concernant l'aérosolisation de la surface des sols et des feuilles, la force du vent est le facteur déterminant pour détacher les microorganismes de leur milieu, mais l'humidité et la température vont aussi déterminer la force de cohésion entre les cellules et leur site d'accroche et donc la probabilité qu'elles s'aérosolisent (Jones and Harrison, 2004).

L'effet de l'humidité est important pour la dissémination à partir de la surface des feuilles, par exemple lors de périodes à faible humidité et de température plus élevée. Les biofilms microbiens présents à la surface se déshydratent et se craquellent, ce qui les rend plus facilement aérosolisables sous l'effet du vent. L'impact des gouttes de pluie sur les feuilles provoque également l'émission de microgouttes en suspension. (Lindemann and Upper, 1985 ; Hirano and Upper, 2000).

L'activité humaine *via* l'agriculture et l'élevage est aussi une source de bioaérosols dans l'air (Boutin et al., 1988), bien qu'elle reste mineure face aux sources d'émissions précédemment citées.

Les microorganismes aérosolisés sont transportés dans l'air où ils peuvent séjourner pendant de longues périodes et parcourir de très longues distances avant leur retour par dépôt sec ou humide à la surface. Leur temps de résidence dans l'air dépend de la taille des cellules et/ou des particules associées (et donc de la nature de la source), de la température de l'air, de l'humidité, des courants de masse d'air, etc. (Williams et al., 2002 ; Burrows et al., 2009a). De récents travaux de modélisation concernant le transport des bactéries dans l'atmosphère estiment des temps de résidence variant entre 2.2 et 188.1 jours (Burrows et al., 2009a) ; ces estimations prennent en compte le potentiel en tant que noyau de condensation nuageuse (CCN<sup>5</sup>) et de nucléation de la glace (IN<sup>6</sup>) (Morris et al., 2004 ; Sun and Ariya, 2006 ; Möhler et al., 2007). Ces facteurs influencent la probabilité de déposition sous forme humide et donc leur temps de résidence dans l'atmosphère. Par exemple, dans cette même étude de Burrows

---

<sup>5</sup> CCN : Cloud Condensation Nuclei

<sup>6</sup> IN : Ice Nuclei

et al. (2009a), le temps de résidence de bactéries est de 3,4 jours pour les bactéries actives en tant que CCN de 7,5 jours pour celle inactives en tant que CCN (mais actives en tant IN), et de plusieurs mois pour celles étant inactives en tant que CCN et IN.

### I.1.2.2. Facteurs de stress (hydrique, UV, température, ...)

Lors de leur transport dans l'atmosphère, les microorganismes ne rencontrent pas des conditions optimales à leur développement (Figure I-3) (Jones and Harrison, 2004 ; Delort et al., 2010).

En atmosphère sèche, ils peuvent « souffrir » de la dessiccation, des basses températures, des radiations UV, de l'oxydation (i.e.  $O_3$ ,  $HO_2^\bullet$ ,  $O_2^\bullet$ ,  $^\bullet OH$ ). En atmosphère humide (nuage, brouillard) ils sont en présence d'un milieu parfois acide, avec des variations de la disponibilité en eau (dûes à la condensation/coalescence et l'évaporation), de basses températures (ils subissent également les effets du gel et du dégel), d'une salinité très variable (problème d'équilibre osmotique), d'une faible teneur en nutriments (mais aussi en fer et oligoéléments) et ils sont exposés à de nombreuses espèces oxydantes ( $H_2O_2$ ,  $^\bullet OH$ ,  $HO_2^\bullet$ ,  $O_2^\bullet$ ) qui peuvent être très concentrées pour des nuages « pollués ».

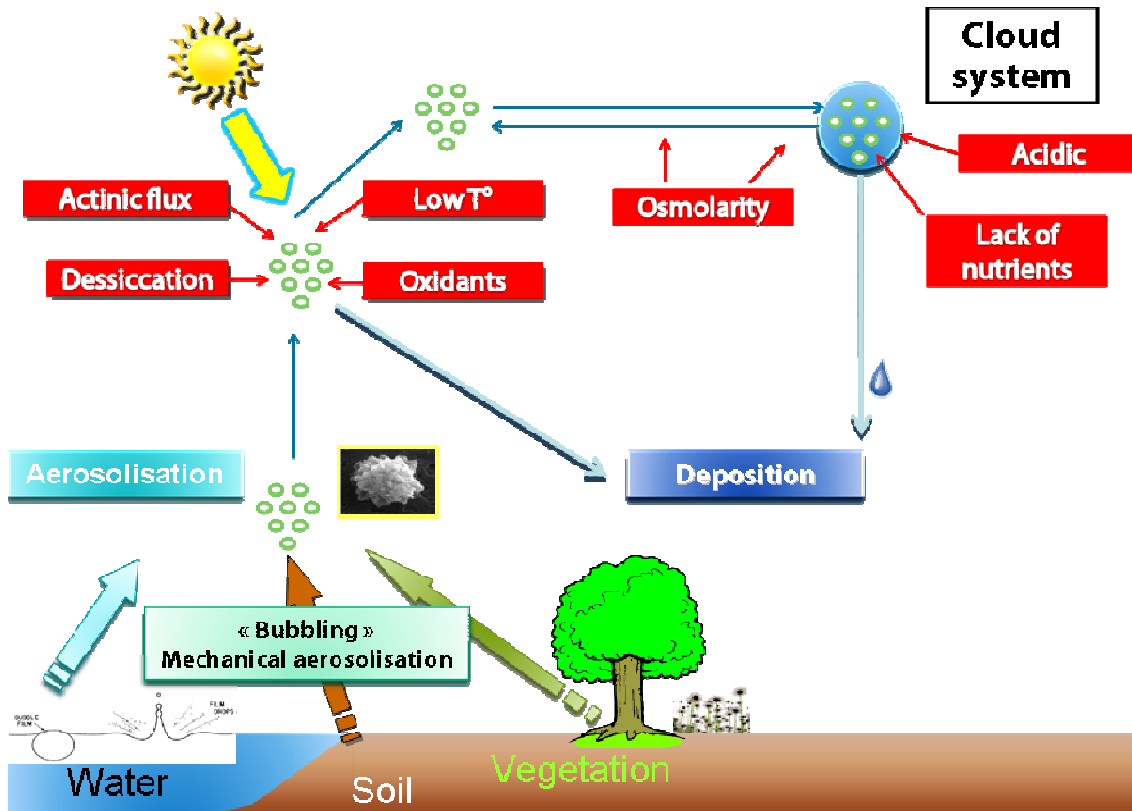


Figure I-3 : Représentation schématique du cycle de vie des microorganismes dans l'atmosphère (Delort et al., 2010).

**I.1.2.3. Concentrations dans le nuage**

Très peu d'études se sont attachées à dénombrer les microorganismes viables et non-viables (bactéries, levures et champignons) dans de l'eau de nuage. Ceci est lié au fait que peu d'équipes de recherche ont accès à des sites d'altitude souvent ennuagés et que peu d'équipes de biologistes se sont intéressées à la phase liquide atmosphérique. Un relevé exhaustif des concentrations microbiennes mesurées dans des échantillons d'eau nuageuse est présenté dans le Tableau I-5. Le dénombrement des cellules de microorganismes est réalisé par l'observation directe en microscopie à épifluorescence. Cela permet de recenser d'une part les bactéries et d'autre part les champignons (spores, filaments) et les levures. Les champignons et les levures sont comptabilisés ensemble, car il est parfois peu aisé de différencier une levure d'une petite spore de champignons (de plus, les levures sont classées dans le règne<sup>7</sup> des champignons ou Mycètes).

Sites d'échantillonnage	Concentrations (Cellules mL <sup>-1</sup> )		Références
	Bactéries	Champignons et levures	
Rax mountain (1644 m.a.s.l), (Autriche)	4,9 × 10 <sup>3</sup> - 8,1 × 10 <sup>4</sup> (2,0 × 10 <sup>4</sup> )	1,1 × 10 <sup>3</sup> - 1,1 × 10 <sup>4</sup> (5,9 × 10 <sup>3</sup> )	(Bauer et al., 2002)
Sonnblick mountain (3106 m.a.s.l), (Autriche)	7,9 × 10 <sup>2</sup> - 2,5 × 10 <sup>3</sup> (1,4 × 10 <sup>3</sup> )	/	(Sattler et al., 2001)
Puy de Dôme (1465 m.a.s.l), (France)	1,7 × 10 <sup>4</sup> - 2,4 × 10 <sup>5</sup> (8,1 × 10 <sup>4</sup> )*	8,9 × 10 <sup>2</sup> - 2,5 × 10 <sup>4</sup> (4,8 × 10 <sup>3</sup> )*	(Amato et al., 2007d)

**Tableau I-5:** Concentrations microbiennes mesurées dans l'eau nuageuse. \* valeur médiane.

Les différentes études sur le contenu microbien en air sec (aérosol) observent une variabilité spatiale et temporelle, mais dans le cas des eaux nuageuses, ces variabilités sont peu étudiées. Les études de Sattler et al. (2001) (12 événements nuageux échantillonnés entre Avril-Mai 1997) et de Bauer et al. (2002) (2 événements en Avril 1999 et 1 en Mars 2000) sont limitées dans le temps. Par contre, le suivi réalisé par Amato et al. (2007b) concerne une plus longue période : de juin 2004 à octobre 2005 (14 événements, 3 au printemps, 2 en été, 5 en automne et 4 en hiver). Ces auteurs n'observent pas de tendance nette concernant le nombre total de

<sup>7</sup> Le règne est le niveau 1, dans la classification taxonomique utilisé en biologie pour classer le vivant. Voici l'ordre taxonomique : le règne, l'embranchement, la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce.

cellules. Par contre la fraction de cellules bactériennes cultivables est plus importante en été, cependant compte-tenu de la faible proportion d'évènements nuageux concernés (2/14), on ne peut réellement valider cette observation bien qu'elle soit concordante avec celles effectuées en air sec.

En atmosphère sèche, un nombre plus important de cellules bactériennes cultivables est observé entre Avril et Octobre (pic d'abondance plus ou moins étendu sur cette période) (Bovallius et al., 1978 ; Di Giorgio et al., 1996). Une variabilité diurne de la concentration totale en microorganismes est également observée avec un pic au lever du jour et un autre en milieu de journée. La variabilité temporelle à courte échelle est très importante car pour des mesures espacées de 2 min, des différences de 4100% ont été observées (Lighthart and Shaffer, 1995).

L'existence de telles tendances dans les eaux nuageuses est difficilement observable d'un point de vue expérimental (présence ou pas de nuage sur un site, nuage précipitant ou non, froid ou chaud). De plus, le temps de résidence des microorganismes dans l'atmosphère humide dépend plus de leur rôle sur la microphysique du nuage et des conditions à l'intérieur du nuage que des conditions externes au système nuageux (bien qu'ils influent et déterminent les conditions du nuage).

#### ***1.1.2.4. Viabilité des cellules microbiennes dans l'eau du nuage***

Un aperçu des méthodes d'estimation de la « viabilité » des cellules microbiennes utilisées dans les études sur l'eau nuageuse est présenté ci-dessous.

Auparavant, la méthode la plus fréquemment utilisée pour déterminer la viabilité d'une cellule issue de l'air (études majoritaires en atmosphère sèche) consistait à observer sa capacité à croître sur un milieu nutritif, et à comptabiliser les unités formant une colonie microbienne (UFC<sup>8</sup>) sur un milieu nutritif solide. Cette méthode a l'avantage d'être facilement utilisable et de permettre d'isoler des souches microbiennes récoltées de l'environnement. Son inconvénient majeur est qu'elle entraîne la sélection des souches microbiennes les plus adaptées aux conditions de culture utilisées: milieu solide ou liquide, composition chimique, composition de l'air, température et hygrométrie pendant l'incubation, présence de lumière, durée de l'incubation, etc. De plus la présence de microcolonies et d'ultramicrocolonies peut-être ignorée (Torrella and Morita, 1981). Enfin cette technique ne permet pas de recenser les cellules se trouvant dans un état viable non cultivable (VBNC), la perte de cultivabilité apparaît chez des bactéries normalement cultivables lorsqu'elles sont

---

<sup>8</sup> UFC : Unité Formant Colonie.

soumises à un facteur stressant (comme le passage d'un milieu liquide pauvre en nutriments à un milieu de culture gélosé).

Le dénombrement des cellules viables peut également être réalisé par des techniques d'observation microscopique ou de cytométrie en flux<sup>9</sup> (Davey et al., 2001) en utilisant des marqueurs chimiques et/ou biologiques (colorants ou fluorochromes). Certaines cellules sont observables par les techniques utilisant la fluorescence, sans l'ajout de marqueur, c'est le cas des particules auto-fluorescentes comme la plupart des cellules chlorophylliennes : débris végétaux, cyanobactéries, microalgues etc.

La mesure de la concentration en ATP<sup>10</sup> dans un échantillon contenant des cellules permet d'estimer en partie la viabilité cellulaire via l'activité métabolique. La mesure de l'ATP est réalisée par bioluminescence, la réaction entre la luciférase (enzyme extraite des lucioles) et l'ATP produit des photons dont l'intensité est proportionnelle à leur concentration dans le milieu (Stanley and Williams, 1969 ; Lundin et al., 1986).

A partir d'échantillons d'eau nuageuse prélevés au mont Rax (1644 m.a.s.l, Autriche), Bauer et al. (2002) ont observé des fractions de cellules cultivables de 2,2% pour les bactéries et de 3,2% pour les champignons (voir Tableau I-5 pour les concentrations en microorganismes totaux). Des duplicats de ces échantillons ont été marqués (après décongélation de l'échantillon d'eau nuageuse) par une combinaison de fluorochromes (kit commercial de viabilité bactérienne LIVE/DEAD<sup>®</sup>) permettant d'observer les cellules viables par microscopie à épifluorescence. Pour deux échantillons testés, ils ont observé que 72% et 95% des cellules bactériennes sont viables dans ces échantillons d'eau nuageuse.

Dans l'étude d'Amato et al. (2007b) la fraction de cellules cultivables (à 15 et 27°C) est d'environ 10% pour les champignons (dont levures) et de moins de 1% pour les bactéries (milieu R2A préférentiellement pour la culture des bactéries (Reasoner and Geldreich, 1985) et Sabouraud pour les champignons). En considérant des concentrations en ATP théoriques pour des microorganismes viables ( $3 \times 10^{-6}$  pmol ATP bactérie<sup>-1</sup> et  $3 \times 10^{-5}$  pmol ATP spore de champignon<sup>-1</sup>) et le nombre total de microorganismes dans ces échantillons d'eau nuageuse, ils estiment à 0,37 pmol mL<sup>-1</sup> la concentration médiane en ATP. Sachant que la concentration médiane mesurée est de l'ordre de 0,40 pmol mL<sup>-1</sup>, ils supposent que la majorité des cellules

---

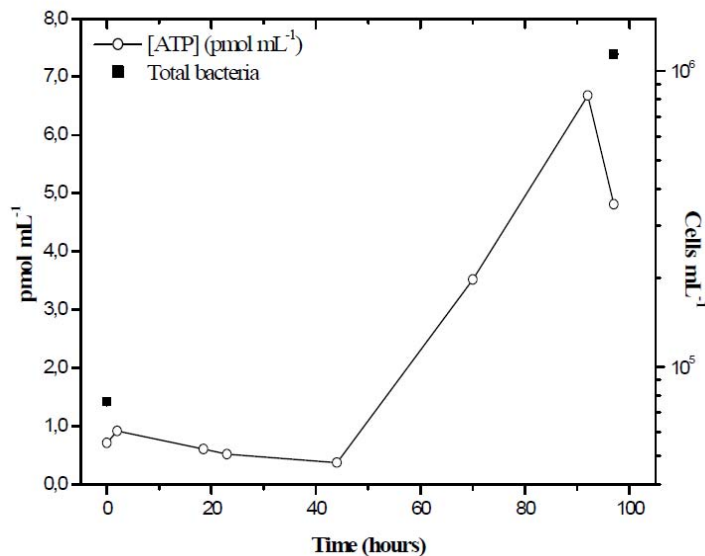
<sup>9</sup> La cytométrie en flux (CMF) est une technique consistant à détecter par réflexion laser, des cellules passant dans un flux rapide (liquide ou gazeux).

<sup>10</sup> Adenosine Tri-Phosphate, molécules nucléotidiques présentes dans les cellules vivantes, et impliquées dans le transfert d'énergie au sein de la cellule

sont dans un état viable, cela confirme les observations précédemment effectuées par Bauer et al. (2002).

La capacité de survie et de multiplication des microorganismes dans de l'eau de nuage incubée à une température de 0°C a été observée dans l'étude de Sattler et al. (2001). Dans ces expériences, deux marqueurs radioactifs, une base azotée marquée : la [<sup>3</sup>H] thymidine (entrant dans la constitution des acides nucléiques (ADN)) et un acide aminé : la [<sup>14</sup>C] leucine (entrant dans la composition des protéines) sont ajoutés aux échantillons d'eau nuageuse, la vitesse d'incorporation de ces molécules au sein de la cellule permet d'estimer un taux de croissance bactérienne (Simon and Azam, 1989 ; Simon, 1990). La multiplication effective des cellules microbiennes a été observée dans ces conditions de température (0°C) et nutritionnelles (eau de nuage sans adjonction de nutriments), les temps de génération<sup>11</sup> varient de 3,6 à 19,5 jours pour les 12 échantillons nuageux concernés.

Une autre étude en eau nuageuse montre la capacité des cellules microbiennes à s'y développer (Amato et al., 2007a). Un échantillon d'eau nuageuse est incubé à 17°C sous agitation en présence d'air ambiant (l'échantillon est placé dans un erlenmeyer pré-stérilisé avec un bouchon cotonné, assurant le transfert de gaz sans contamination), l'évolution de la concentration totale en ATP au cours du temps est présentée dans la Figure I-4.



**Figure I-4 :** Evolution de la concentration en ATP dans l'eau nuageuse au cours du temps d'incubation (200 rpm, 17°C) et les valeurs initiale et finale de la concentration totale en bactéries (Amato et al., 2007a).

Durant cette incubation d'eau nuageuse, la concentration en ATP diminue sur les premières 45 h d'incubation, puis augmente jusqu'à 90 h d'incubation (d'un facteur 7 par rapport à la

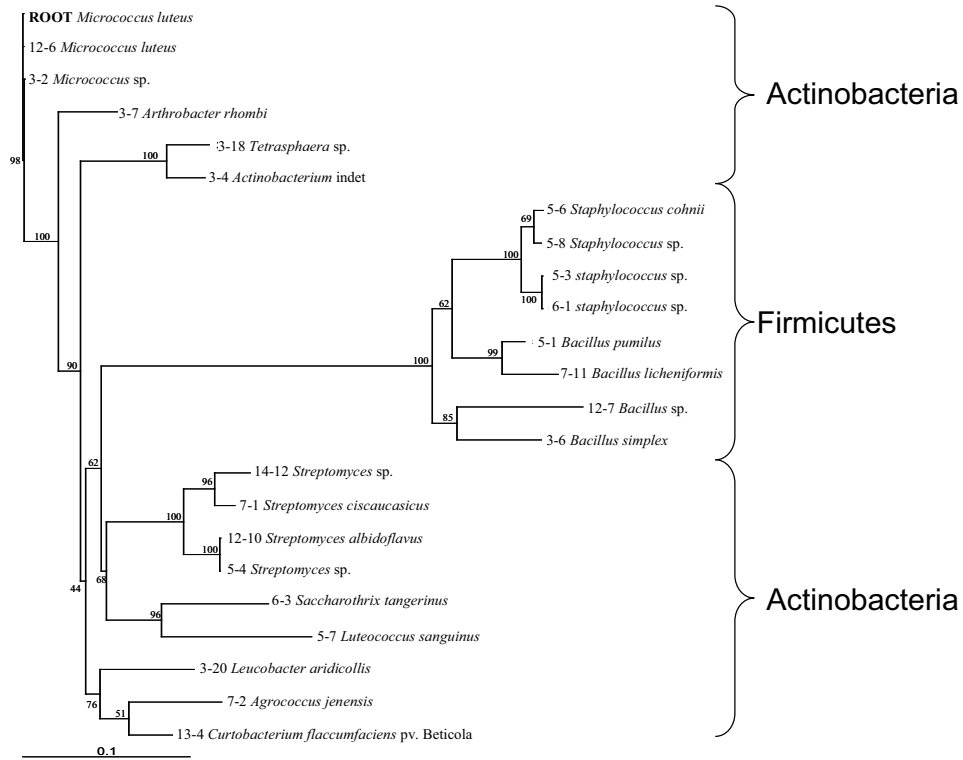
<sup>11</sup> Le temps de génération est la durée nécessaire pour qu'une cellule se duplique.

concentration initiale). La concentration totale en bactéries évolue d'environ  $8 \times 10^4$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  à  $\sim 1 \times 10^6$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  après 97 h d'incubation, ce résultat est en accord avec l'augmentation de la concentration en ATP. Le temps de latence avant l'augmentation de la concentration en ATP peut se justifier par une modification qualitative et quantitative du contenu microbien, dans le sens de la sélection de souches adaptées aux conditions de culture et aux contraintes nutritionnelles de l'eau du nuage (Amato et al., 2007a).

#### ***1.1.2.5. Identification des souches microbiennes du nuage***

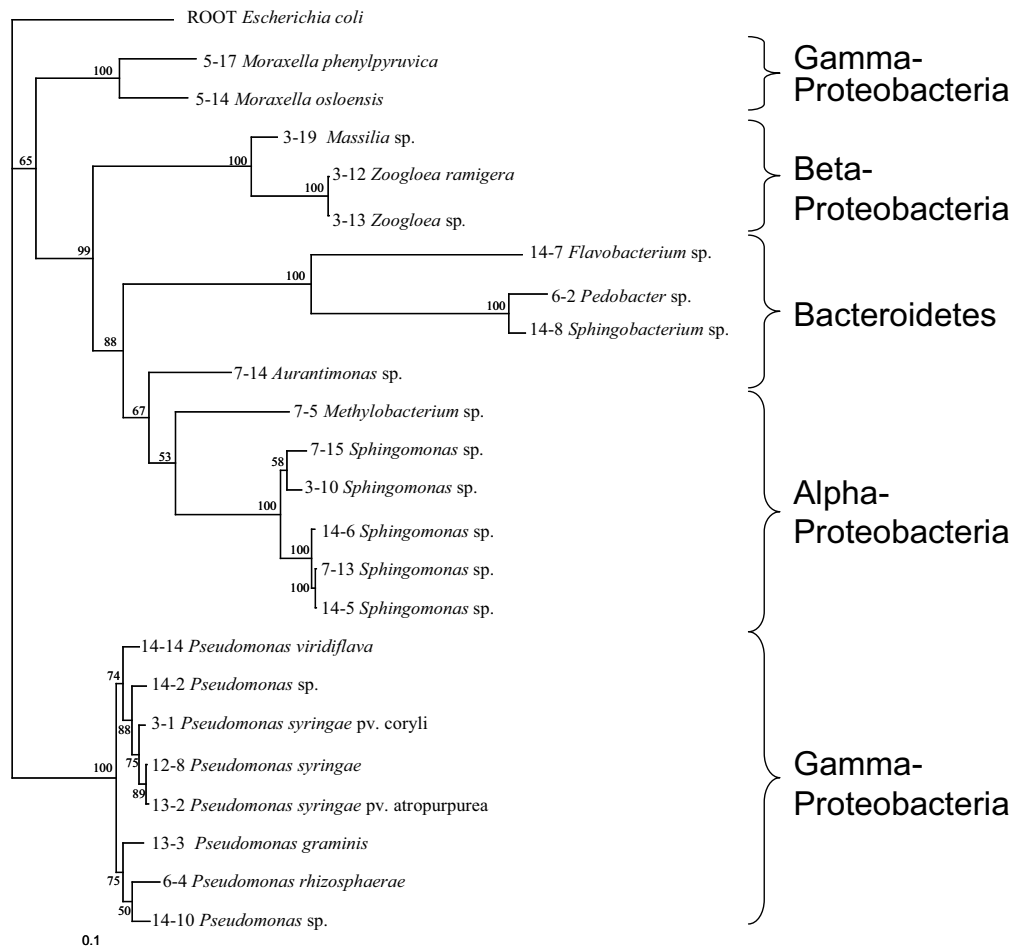
Les études sur l'identification des espèces microbiennes présentes dans l'eau du nuage proviennent des travaux effectués par Amato et al. (2005, 2007a,b) et Ahern et al. (2007).

La caractérisation taxonomique de souches isolées de l'eau nuageuse prélevée au sommet du puy de Dôme a été réalisée par Amato et al. (2005, 2007a,b). Les cultures sont effectuées sur les milieux gélosés R2A, Sabouraud et TS, incubés à 15 et 27°C à l'obscurité en condition d'aérobie. Environ 160 souches microbiennes (bactéries, levures et champignons) ont été isolées par P. Amato au cours de sa thèse (Amato, 2006) ; ces isolats proviennent de 14 événements nuageux indépendants prélevés de mars 2003 à septembre 2004. L'identification a été réalisée en comparant la séquence d'ADN codant pour l'ARNr 16S avec les séquences provenant des banques de données. Les souches bactériennes sont présentées ci-dessous sous la forme d'arbre phylogénétique, les Figure I-5 et Figure I-6 sont extraites de sa thèse (Amato, 2006).



**Figure I-5 :** Arbre phylogénétique intercomparant les séquences partielles (730 pb) de souches bactériennes à gram positif, construit selon la méthode du plus proche voisin. 100 arbres ont été générés par bootstrap et l’arbre consensus est présenté. Sur chacun des nœuds sont indiqués les nombres d’occurrences, et l’arbre est enraciné avec une souche type de *Micrococcus luteus*. (Amato, 2006).





**Figure I-6 :** Arbre phylogénétique intercomparant les séquences partielles (765 pb) de souches bactériennes à gram négatif, construit selon la méthode du plus proche voisin. 100 arbres ont été générés par bootstrap et l'arbre consensus est présenté. Sur chacun des nœuds sont indiqués les nombres d'occurrences, et l'arbre est enraciné avec une souche type d'*Escherichia coli*. (Amato, 2006).

Les souches bactériennes isolées appartiennent aux phyla (embranchements) suivants : *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* (des classes : *Alpha*, *Beta* et *Gamma*) et de *Bacteroidetes* ; la majorité des isolats fongiques est affiliée aux phyla *Ascomycota* et *Basidiomycota* (Amato et al., 2007c). Parmi les isolats bactériens, les souches des genres *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* et *Arthrobacter* sont les plus souvent rencontrées. On retrouve dans ces prélèvements nuageux des souches microbiennes présentant des similitudes avec des souches isolées de la végétation (principalement du genre *Pseudomonas*), des eaux de surface (*Micrococcus*), du sol (*Streptomyces* et *Bacillus*), des milieux froids (*Sphingomonas*).

L'étude taxonomique des bactéries du nuage par Ahern et al. (2007) concerne l'ensemble de la communauté bactérienne de leurs échantillons. L'amplification par PCR et le clonage de l'ADNr 16S sont réalisés directement sur les échantillons d'un événement nuageux pré-

enrichis en matériel biologique par centrifugation. Les résultats de l'identification taxonomique sont indiqués dans le Tableau I-6.

OTU	No. of Clones	Representative clone	Closest isolate/clone & accession no.	% 16S Similarity	Source
A	45	CBC44	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 (AF094725)	99	ATCC type strain – direct submission.
		CNR56	<i>Pz. antarctica</i> (DQ207731)	99	Antarctic.
		CNC59, CBC59	<i>Pseudomonas trivialis</i> type strain DSM (AJ492831)	99	Fluorescent pseudomonas associated with the phyllosphere.
C	19	CBC16, CBC55	<i>Pseudomonas putida</i> BCNU106 (DQ229315)	100	Toluene-tolerant bacterium.
		CNC33	<i>Acinetobacter</i> sp ANT9054 (AY167273)	99	Antarctic pack ice, Weddell sea, Southern ocean
			<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 23055 type strain (AJ888984)	99	ATCC type strain – direct submission.
			Glacial ice bacterium M3C1.8K-TD8 (AF479380)	99	Glacial ice
		CBC34	<i>Acinetobacter radiorestrictans</i> SW3-884 (AY568500)	99	Kennedy space centre spacecraft
B	15	CNR20, CNR53	<i>Acinetobacter</i> sp 18III/AO1/072 (AY576723)	99	Sea surface.
		CNC25	<i>Comamonas testosteroni</i> strain P6 (DQ356899)	99	Unpublished.
I	7	CNR8	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i> SRI 244 (AF127391)	93	Direct submission
			Uncultured eubacterium WD271 (AJ292602)	97	Polychlorinated bi-phenyl-polluted soil.
F	6	CBR21	Uncultured alphaproteobacteria clone BPU264 (AY250861)	97	Cryptoendolithic communities, Antarctica.
G	5	CNR30	Uncultured bacterium clone BPM15F07 (AY689863)	95	Subalpine stream sediment
H	5	CBC42	<i>Janthinobacterium</i> sp AN8 (AJ551147)	99	Lake sediments, Ardley island, Antarctica.
J	5	CBR7	Uncultured bacterial clone 1790-6 (AY425774)	91	Hawaiian volcanic deposits.
M	5	CBR38	Uncultured subbacterium clone WD228 (AJ292578)	99	Polychlorinated biphenyl polluted soil.
K	4	CNC40	<i>Brevibacterium aureum</i> (AY299093)	99	Bioreactor.
K	4	CNC40	Uncultured bacterial clone AK1W684 (DQ129573)	99	Texan air sample.
P	4	CNR57	Uncultured eubacterium clone WD272 (AJ292684)	94	Polychlorinated bi-phenyl polluted soil.
Q	4	CNC14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain E2 (AY841799)	99	Greenland ice core.
			Uncultured gamma proteobacterium clone SP_B22 (AY587200)	99	Coastal salt pond.
B4	3	CBC11	<i>Janthinobacterium</i> sp. J31 (AJ864846)	99	High mountain lake
L	3	CNR17	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> HA1 (AF530468)	99	Nodules of peanut.
			Uncultured <i>bradyrhizobium</i> sp. Clone YJQ-17 (AY569292)	99	Hotspring pink microbial mat, Rehai, China.
N	3	CNR40	Uncultured bacterium clone A30-30 (AY425777)	93	Hawaiian volcanic deposit.
O	3	CBR2	<i>Cryocolla antiquus</i> (AF505513)	97	Siberian permafrost.
			Glacial ice bacterium G200-C11 (AF479342)	97	200yr old glacial ice from Guliya China.
A1	2	CBR42	<i>Conexibacter woesei</i> (ACT440237)	95	Type strain
B1	2	CBC62	Uncultured bacterium clone (AM1624741)	98	From Sphagnum peat bog
			<i>Bosea thiooxidans</i> strain RpP13-V5 (AJ250798)	99	Rhizosphere
C1	2	CNC43	Uncultured bacterium clone BE27FW0327OKTS (DQ088743)	99	Continental crust
D1	2	CBR50, CNR2	<i>Aquaspirillum itersonii</i> subsp nipponicum (AB074520)	99	Unpublished
E1	2	CNR47	<i>Kaizobacter korensis</i> (AY785128)	93	Unpublished
			<i>Nostocoida limicola</i> III strain Ben225 (AF244752)	95	Activated sludge
F1	2	CNC51	Bacterium Ellin 5III (AY234528)	96	Soil bacteria
G1	2	CNR34	<i>Alcaligenes denitrificans</i> (ADY14907)	99	Type strain.
			<i>Riemerella columbina</i> (AF181448)	94	Unpublished.
R	2	CNR59	Uncultured bacterium clone EV818CF55AHH218 (DQ337018)	97	Subsurface water of Kalahari shield, S Africa
S	2	CBC32	Uncultured bacterium clone TLM11/TLMdgg04 (AF534435)	96	Toolik Lake, Arctic (3m depth).
T	2	CBR20	<i>Corynebacterium amycolatum</i> NCFB 2768 (X84244)	99	Type strain.
U	2	CBR9	<i>Rhodococcus erythropolis</i> Ph62 (AY833103)	99	Lake Baikal, Russia.
V	2	CBR30	<i>Methylocellatundraae</i> (AJ555244)	97	Acidic tundra peatlands (sphagnum).
V	2	CBR30	<i>Blastochloris sulfovivida</i> Top1 (AJ012089)	93	Unpublished.
V	2	CBR30	Uncultured alphaproteobacteria clone K11 (AB116390)	99	Marine sediment in areas of intensive shellfish aquaculture.
X	2	CBR17	<i>Sphingomonas elodea</i> ATCC 31461 (AF503278)	95	Freshwater pond.
			Uncultured bacterial clone 957 (AM085465)	95	Deep sea sediment-tropic western pacific warm pool.
Y	2	CNR48	Bacterium Ellin334 (AF498716)	96	Soil bacteria.
			Actinomycete sp. Clone Ep..T1.21 (BSPT121)	99	Temperate forest soil.
Z	2	CBC41	<i>Caulobacter henricii</i> (AJ007805)	97	Type strain.
			Uncultured bacterium clone ODP-92B-02 (DQ490042)	97	Ridge flank crustal fluids (old oceanic crust).

**Tableau I-6 :** Affiliation phylogénétique des espèces bactériennes retrouvées dans des échantillons d'eau nuageuse prélevée aux îles Hébrides (Ahern et al., 2007).

L'identification des espèces microbiennes présentes dans l'eau nuageuse par une méthode directe d'amplification d'ADN, représente une approche plus réaliste sur l'évaluation des communautés microbiennes présentes dans les nuages (bien que coûteuse, et présentant de nombreux biais liés aux choix des amorces d'amplification).

Cependant, les conditions des prélèvements nuageux soulèvent quelques interrogations qui peuvent affecter l'interprétation des résultats du séquençage génétique. Le prélèvement est continu sur deux jours avec une présence discontinue de nuage ; de plus les nuages prélevés sont précipitants et non-précipitants. Lors des périodes de précipitation, l'impact des gouttes de pluie sur le sol (2 m au dessous du collecteur) recouvert de végétaux (mélange de tourbières et d'herbes de pâture) favorise l'aérosolisation locale des microorganismes présents

dans cette zone. L'autre point discutable concerne la durée totale de prélèvement (~ 45 h) ; une modification qualitative et quantitative du contenu microbien a pu avoir lieu durant ce laps de temps. Cela a pu favoriser la multiplication de certaines espèces (augmentation quantitative de leur matériel génétique et donc de la probabilité d'être identifiée), ce qui aurait pour conséquence de les rendre plus facilement identifiables que d'autres espèces.

Cependant, la prédominance d'espèce du genre *Pseudomonas* est concordante avec les travaux d'Amato et al. (2005, 2007a,b). Les quelques études sur l'eau nuageuse (Amato et al., 2005 ; Amato, 2006 ; Ahern et al., 2007 ; Amato et al., 2007c ; Amato et al., 2007d) sont primordiales et nous informent sur la composante microbiologique des nuages.

## I.2. Processus multiphasiques dans les nuages

Le système nuageux est un milieu complexe en perpétuelle modification au cours de son évolution. Une masse d'air peut par exemple subir de nombreux cycles d'évapo-condensation au cours de son transport et les propriétés microphysiques, chimiques et microbiologiques du nuage sont grandement variables. Il peut-être intéressant de définir divers paramètres « clés » interconnectés les uns aux autres pour comprendre et suivre les processus contrôlant la chimie multiphasique du nuage :

(1) En suspension dans l'atmosphère, la taille des gouttelettes de nuage varie de 5 à 100  $\mu\text{m}$  et cette grandeur est un facteur pour la dissolution des composés chimiques. La taille de ces gouttes dépend du contenu en eau liquide de la masse d'air (LWC : Liquid Water Content) fonction de la pression de vapeur saturante ( $\text{mg m}^{-3}$ ), de la nature et de la taille du noyau de condensation (ou de nucléation) initiant la formation de la goutte, des conditions thermodynamiques (pression, température, etc.). Par exemple, les études *in situ* montrent que les concentrations chimiques, essentiellement des ions majoritaires, augmentent quand la taille diminue aussi bien dans les nuages de type orographique (Schell et al., 1997), de type strato-cumulus (Ogawa et al., 1999) mais surtout dans les brouillards (Collett Jr et al., 1998).

(2) La température est aussi un paramètre essentiel qui contrôle l'évolution microphysique du nuage à travers les phénomènes d'évapo-condensation, la formation des hydrométéores (cristaux, gouttelettes). La température modifie également la réactivité chimique en contrôlant les cinétiques de transformation et affecte l'activité biologique dans le nuage. Notre étude se limite au cas des nuages chauds (i.e. liquides) et sous conditions troposphériques, la température varie de quelques degrés à une vingtaine de degrés en fonction des conditions environnementales.

(3) Enfin, le pH est un paramètre physico-chimique qui contrôle la réactivité chimique au sein de la goutte. Il découle directement de la composition chimique de la phase aqueuse et est fortement dépendant des processus microphysiques (phénomène de concentration/dilution), de la réactivité chimique aqueuse elle-même (production secondaire d'acides forts comme  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{HNO}_3$  en phase aqueuse) et des sources primaires (transfert gaz / liquide).

Dans la suite, l'objectif est de présenter l'état de l'art sur la réactivité chimique et sur les voies potentielles de biodégradation dans le nuage. L'accent sera mis sur le rôle du nuage comme milieu oxydant et acteur important de la dégradation de la matière organique.

### **I.2.1.Chimie radicalaire et photo-transformation : acides carboxyliques, formaldéhyde et méthanol**

Concernant la chimie des composés organiques dans les nuages, depuis le début des années 90, de nombreux travaux ont porté sur l'étude de leur réactivité en solution. Ces études ont montré qu'ils avaient un impact sur la capacité oxydante de l'atmosphère à travers leurs interactions avec la chimie des  $H_xO_y$  (radicaux  $\cdot OH$ ,  $HO_2\cdot$  et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ ) (Herrmann et al., 2005), des métaux de transition (Fer, cuivre, manganèse) (Deguillaume et al., 2005a), ou du soufre (Olson and Hoffmann, 1989 ; Campolongo et al., 1999). A l'oxydation en phase gazeuse s'ajoute donc une oxydation en phase aqueuse entraînant une modification du bilan chimique du système nuageux (Campolongo et al., 1999 ; Monod and Carlier, 1999 ; Tabazadeh et al., 2004 ; Tilgner et al., 2005). L'objectif ici est de présenter la réactivité aqueuse du nuage en décrivant par quelles voies les composés organiques sont dégradés. Plus généralement, en chimie atmosphérique deux mécanismes de dégradation sont considérés: (1) la photolyse directe; (2) la chimie radicalaire (oxydation par les radicaux qui sont photo-produits).

#### ***I.2.1.1.La phase gaz comme source de radicaux et oxydants***

Le spectre solaire reçu dans les différentes couches de l'atmosphère est fonction de l'altitude et de la composition chimique qui joue le rôle de filtre. L'énergie lumineuse, l'eau, l'oxygène, l'azote, l'ozone et les nombreux autres composants chimiques de l'air, réagissent et engendrent la formation de molécules très réactives (appelées radicaux libres) capables de décomposer certaines substances (organiques et inorganiques) présentes dans l'atmosphère, le plus souvent *via* des réactions d'oxydation. On dit communément que l'atmosphère est un immense réacteur photochimique et un milieu fortement oxydant. En phase gazeuse, les radicaux libres les plus produits et les plus réactifs sont les radicaux  $\cdot OH$ ,  $HO_2\cdot$ ,  $NO_3\cdot$ . On rappelle brièvement dans le Tableau I-7 les sources majoritaires de radicaux  $\cdot OH$  en phase gaz (production par photolyse directe de composés tels  $H_2O_2$ ,  $O_3$  ou par réactivité de  $HO_2\cdot$  avec  $NO$  et  $O_3$ ).

Composés photolysés		Limite supérieure de longueur d'onde $\lambda$ (nm)	Réactions
Eau	H <sub>2</sub> O	200	H <sub>2</sub> O + hv $\rightarrow$ $\cdot$ OH + $\cdot$ H
Ozone	O <sub>3</sub>	320	O <sub>3</sub> + hv $\rightarrow$ O(1D) + O <sub>2</sub> O(1D) + H <sub>2</sub> O $\rightarrow$ HO $\cdot$ + HO $\cdot$
Acide Nitrique	HNO <sub>3</sub>	330	HNO <sub>3</sub> + hv $\rightarrow$ $\cdot$ OH + $\cdot$ NO <sub>2</sub>
Peroxyde d'hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	350	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + hv $\rightarrow$ $\cdot$ OH + $\cdot$ OH
Méthylhydroperoxyde	CH <sub>3</sub> OOH	350	CH <sub>3</sub> OOH + hv $\rightarrow$ $\cdot$ CH <sub>3</sub> O + $\cdot$ OH
Composés réactifs			Réactions
	HO <sub>2</sub> $\cdot$ et O <sub>3</sub>	/	HO <sub>2</sub> + O <sub>3</sub> $\rightarrow$ $\cdot$ OH + 2 O <sub>2</sub>
	HO <sub>2</sub> $\cdot$ et NO	/	HO <sub>2</sub> $\cdot$ + NO $\rightarrow$ NO <sub>2</sub> + $\cdot$ OH

**Tableau I-7 :** Quelques réactions photochimiques dans la troposphère et la limite supérieure de longueur d'onde  $\lambda$  (nm) associée (Warneck, 2000).

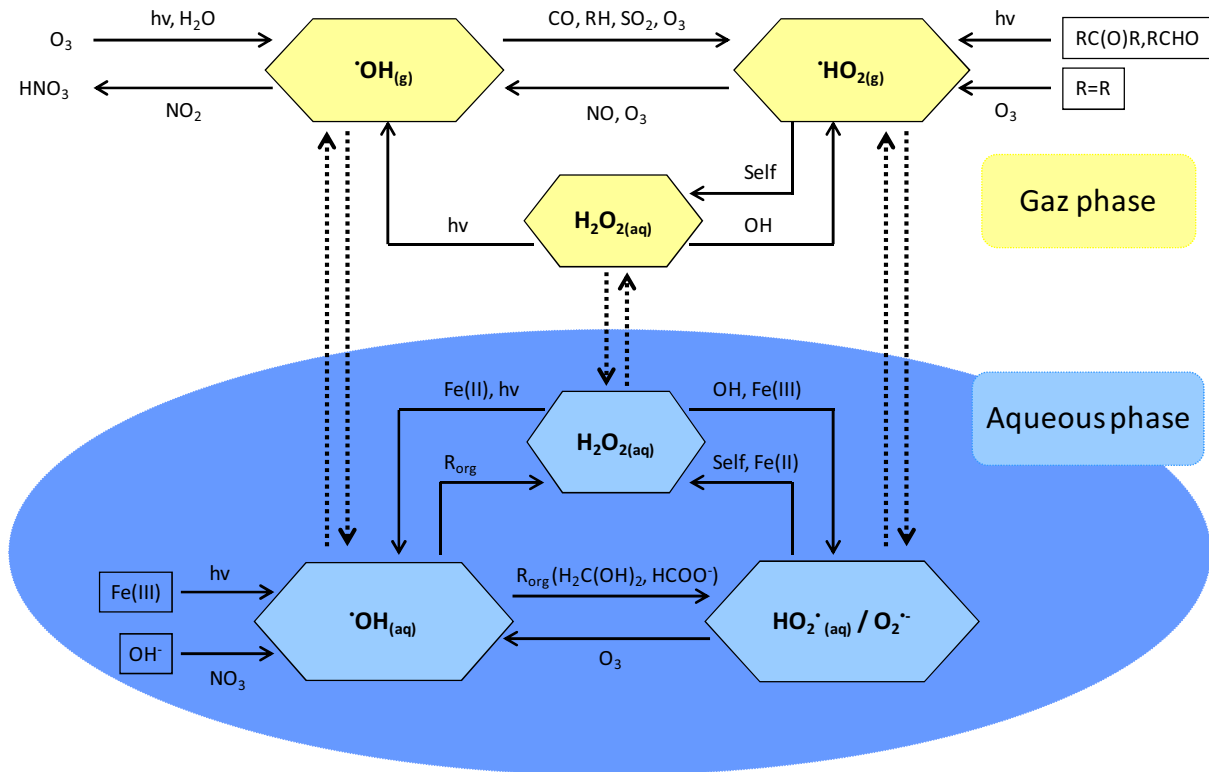
En ciel clair, la chimie des HO<sub>x</sub> ( $\cdot$ OH et HO<sub>2</sub> $\cdot$ ) est responsable de la production d'ozone à travers une chaîne catalytique d'oxydation du monoxyde de carbone et des hydrocarbures en présence de NO<sub>x</sub> (Jacob, 2000 ; Warneck, 2000). En présence de nuages, cette chimie va être perturbée directement par le lessivage des HO<sub>x</sub> par les gouttes et/ou les aérosols humides et indirectement par la réactivité dans la phase aqueuse. Une fois transférés dans la phase liquide atmosphérique, ces radicaux HO<sub>x</sub> participent à la dégradation de la matière organique directement ( $\cdot$ OH) ou indirectement (via HO<sub>2</sub> $\cdot$ /O<sub>2</sub> $\cdot^-$ ) (Barth, 2006 ; Herrmann et al., 2010). Les HO<sub>x</sub> sont également produits en phase aqueuse par réactivité chimique ou processus photochimiques.

Le radical nitrate NO<sub>3</sub> $\cdot$  est un oxydant présent dans tous les compartiments (gaz et eau atmosphérique). En phase gaz, il est formé principalement par la réaction entre l'ozone et le NO<sub>2</sub>. A la différence du radical  $\cdot$ OH, il n'existe pas de sources directes significatives de ce radical dans la phase liquide. De ce fait, le transfert du NO<sub>3</sub> $\cdot$  gazeux vers le liquide est la source principale de radical NO<sub>3</sub> $\cdot$  dans l'eau.

### ***1.2.1.2.Sources et puits en phase aqueuse des radicaux***

En phase liquide, en plus des radicaux HO<sub>x</sub>, sont également produits par réactivité des radicaux chlorés, sulfatés (Cl $\cdot^-$ , Cl<sub>2</sub> $\cdot^-$ , SO<sub>4</sub> $\cdot^-$  etc.) mais l'objectif de ce paragraphe est de présenter les voies de production/destruction des radicaux les plus significatifs, à savoir les HO<sub>x</sub> ( $\cdot$ OH, HO<sub>2</sub> $\cdot$ /O<sub>2</sub> $\cdot^-$ ). Les cycles redox des métaux de transition (Fer, cuivre, manganèse)

sont fortement imbriqués avec ces cycles radicalaires. Les concentrations en radicaux dans la phase liquide atmosphérique semblent donc fortement dépendantes de la teneur métallique (Deguillaume et al., 2005).



**Figure I-7 :** Schéma décrivant les principales voies de production et de destruction des  $\text{H}_x\text{O}_y$  en phase gaz et phase aqueuse (d'après Deguillaume et al., 2010 et adapté de Jacob et al., 2000).

Les principales sources de  $\text{OH}$  en phase aqueuse (Figure I-7) sont la réaction de l'ion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  avec l'ozone, les réactions de Fenton du peroxyde d'hydrogène avec le Fer(II) et le Cuivre(I) et la photolyse du peroxyde d'hydrogène, de l'ion nitrate et des complexes aqueux de fer ou des complexes fer-organique comme l'oxalate (Zuo and Hoigne, 1992 ; Faust and Zepp, 1993 ; Deguillaume et al., 2004 ; Tilgner and Herrmann, 2010). D'une façon générale, les métaux de transition sont impliqués dans un cycle catalytique avec les  $\text{HO}_x$ : les réactions de Fenton du peroxyde d'hydrogène avec le fer (II) et le cuivre (I) produisent des radicaux  $\text{OH}$  et les réactions de l'ion superoxyde avec le cuivre (II) et le fer (III) sont des puits nets d' $\text{HO}_x$ . Une de ces sources de  $\text{HO}_x$  dans les gouttes pourrait également provenir de la photolyse de complexes organiques mais le rôle de tels complexes reste pour l'instant incertain (Deguillaume et al., 2005). La présence de chromophores organiques dans les gouttes et les aérosols pourraient également être responsable de sources supplémentaires de peroxyde d'hydrogène et de  $\text{HO}_x$  (Cooper et al., 1988 ; Faust and Allen,

1992 ; Arakaki et al., 1995 ; Anastasio and Jordan, 2004). Le principal puits de ce radical  $\cdot\text{OH}$  est sa réactivité avec la matière organique (Herrmann et al., 2005).

Le radical  $\text{HO}_2\cdot$  est lessivé de façon efficace par les gouttes de nuage à cause de sa dissociation acide-base dans l'eau qui augmente sa solubilité. Il est donc présent en phase aqueuse sous sa forme basique, l'ion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Sa réactivité dans l'eau est dépendante de la valeur du pH car l'ion superoxyde est plus réactif que la forme aqueuse de  $\text{HO}_2\cdot$ . La self réaction de  $\text{HO}_2\cdot$  sous forme aqueuse avec sa base conjuguée pour produire du peroxyde d'hydrogène est beaucoup plus rapide que la réaction équivalente en phase gazeuse et peut donc induire selon le milieu environnemental une production de peroxyde d'hydrogène. En phase aqueuse, l'ion superoxyde détruit l'ozone de façon extrêmement efficace en produisant un radical  $\cdot\text{OH}$  (Lelieveld and Crutzen, 1991 ; Monod and Carlier, 1999). Le radical  $\cdot\text{OH}$  peut être alors reconverti en radical  $\text{HO}_2\cdot$  par l'oxydation des COVs (Arakaki et al., 1995 ; Arakaki and Faust, 1998 ; Monod and Carlier, 1999). L'autre puits significatif pour le radical  $\text{HO}_2\cdot$  en phase aqueuse est la réaction de l'ion superoxyde avec le Fer(II) et (III) et surtout avec le Cuivre (I) et (II) (Matthijssen et al., 1995 ; Walcek et al., 1997 ; Deguillaume et al., 2004) ; ces réactions aboutissent à la formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La contribution relative de ces différentes sources et puits en  $\text{HO}_x$  dépend bien entendu de la charge en métaux, en nitrate et en composés organiques. Le jour, les radicaux  $\text{HO}_x$  sont produits de façon importante et jouent le rôle d'oxydants, par exemple, de la matière organique. La nuit, le radical  $\text{NO}_3\cdot$  prend le relais car il n'est alors plus décomposé par voie photolytique. Ces concentrations dépendent principalement de la concentration en  $\text{NO}_x$  et il est donc fortement concentré dans le cas d'atmosphère polluée.

### ***1.2.1.3. Réactivité vis-à-vis des composés organiques***

Les composés organiques vont être oxydés en solution à travers les voies suivantes :

#### *- Réaction d'initiation -*



L'oxydation est initiée par l'arrachement d'un hydrogène sur la liaison C-H la plus faible par un radical comme  $\cdot\text{OH}$  ou  $\text{NO}_3\cdot$  (principalement).

#### *- Formation du radical peroxyde $\text{RO}_2\cdot$ -*

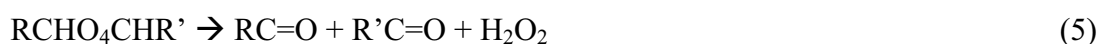
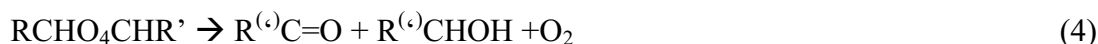


Le radical alkyle  $\text{R}\cdot$  réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxyde  $\text{RO}_2\cdot$ .

#### *- Décomposition bi-moléculaire du radical peroxyde -*



La réactivité des radicaux peroxyes est par contre différente dans la phase aqueuse par rapport à la phase gazeuse. Du fait de la faible solubilité du monoxyde d'azote, la réaction des  $\text{RO}_2^\bullet$  avec ce composé en phase aqueuse est négligeable. Les radicaux peroxyes vont réagir avec eux-mêmes par self réaction ou avec un autre radical peroxyde de façon similaire à ce qui se passe en phase gazeuse en formant un tetroxyde intermédiaire qui peut se décomposer suivant trois voies (von Sonntag et al., 1997) :



Selon la voie de décomposition du tetroxyde, les produits formés sont des composés carbonylés (voie 4 et 5), des composés avec une fonction alcool (voie 4), du peroxyde d'hydrogène (voie 5) et des radicaux alcoxy. Ces radicaux alcoxy peuvent conduire par décomposition à la formation d'un composé carbonylé et d'un radical alkyle ou par réarrangement à un radical centré sur un atome de carbone avec une fonction alcool (von Sonntag et al., 1997). On peut souligner que les mécanismes existants ne prennent pas en compte les réactions entre différents radicaux peroxyes ( $\text{RO}_2^\bullet + \text{R}'\text{O}_2^\bullet$ ).

- Décomposition uni-moléculaire du radical peroxyde -



Le radical peroxyde peut également se décomposer unimoléculairement pour former un radical  $\alpha$ -hydroxy-alkylperoxyde et provoquer une élimination d'un radical  $\text{HO}_2^\bullet$ .

Le processus d'oxydation présenté ci-dessus correspond à l'état des connaissances actuelles sur les voies d'oxydation de la matière organique en solution. Les données mécanistiques et cinétiques sont répertoriées par différentes équipes qui développent des mécanismes explicites de la chimie aqueuse du nuage (Deguillaume et al., 2004 ; Herrmann et al., 2005 ; Tilgner and Herrmann, 2010). L'objectif est d'étudier le devenir de la matière organique dans le nuage sous différentes conditions environnementales. Parmi les résultats marquants, on peut souligner que de nombreuses études de laboratoire et de modélisation démontrent l'importance de la production d'acide oxalique par l'oxydation en phase aqueuse du glyoxal via l'acide glyoxalique (Ervens et al., 2003 ; Warneck, 2003 ; Herrmann et al., 2005 ; Lim et al., 2005 ; Tan et al., 2010). Par ailleurs, il est extrêmement important de regarder comment la matière organique s'oxyde en phase aqueuse car on aboutit souvent à la production d'espèces

chimiques avec de faible pression de vapeur. L'oxydation aqueuse dans le nuage pourrait alors être considérée comme une source potentielle d'AOS (Aérosols Organiques Secondaires) lorsque le nuage évapore (Blando and Turpin, 2000 ; Ervens et al., 2004 ; Lim et al., 2005 ; Carlton et al., 2006).

## **I.2.2. Biotransformation : Voies du métabolisme carboné et du stress oxydant**

### ***I.2.2.1. Quelques voies du métabolisme carboné***

Le métabolisme est l'ensemble des réactions biochimiques catalysées par les enzymes, il existe deux types de métabolisme : l'anabolisme et le catabolisme. L'anabolisme concerne toutes les transformations biochimiques permettant la biosynthèse de molécules complexes (protéines, acides nucléiques etc.) à partir d'éléments plus simples extraits de l'environnement ; les réactions d'anabolisme sont endoénergétiques. Le catabolisme est un ensemble de voies de dégradation contrairement à l'anabolisme qui est un ensemble de voies de biosynthèse. Les voies de dégradation de molécules plus « grosses » et complexes en molécules plus simples sont exoénergétiques.

Les composés organiques comme les acides carboxyliques interviennent dans les deux types de métabolisme. Par exemple, dans les voies cataboliques des glucides, le pyruvate et d'autres composés organiques présents dans l'eau nuageuse, sont des intermédiaires ; le cycle du pyruvate est présenté dans la Figure I-8. Ce schéma métabolique est issu de la banque de données métaboliques KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>); il suffit de taper le nom d'un composé pour obtenir le ou les cycles métaboliques dans le(s)quel(s) ce composé est impliqué. Les enzymes (dans les encadrés rectangulaires) concernées par ces réactions sont aussi référencées, ainsi que les autres cycles (entourés et reliés par des lignes discontinues) liés au cycle visualisé. Le métabolisme du glyoxylate et des acides dicarboxyliques est illustré par la Figure I-9 et celui du méthane par la Figure I-10.

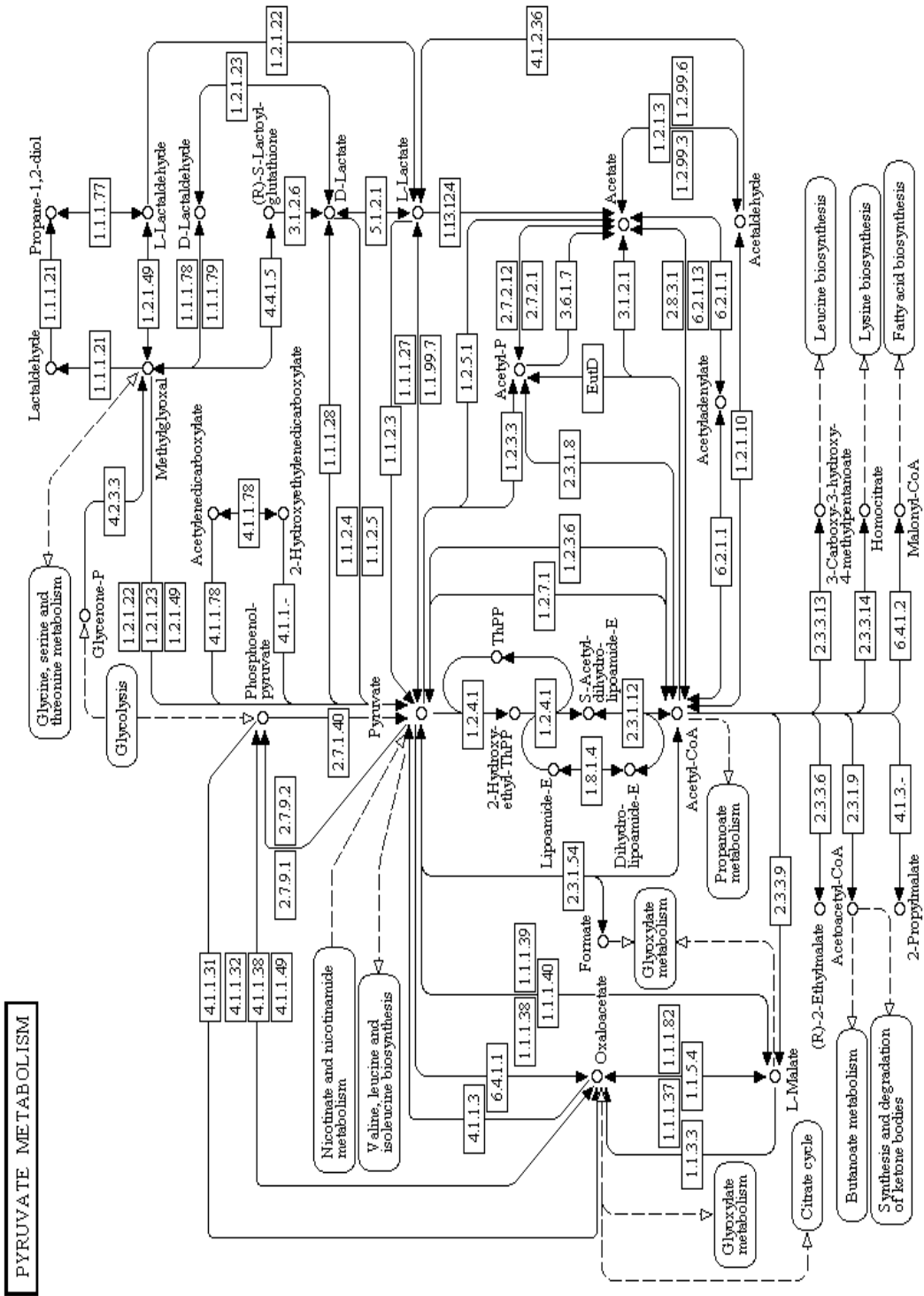
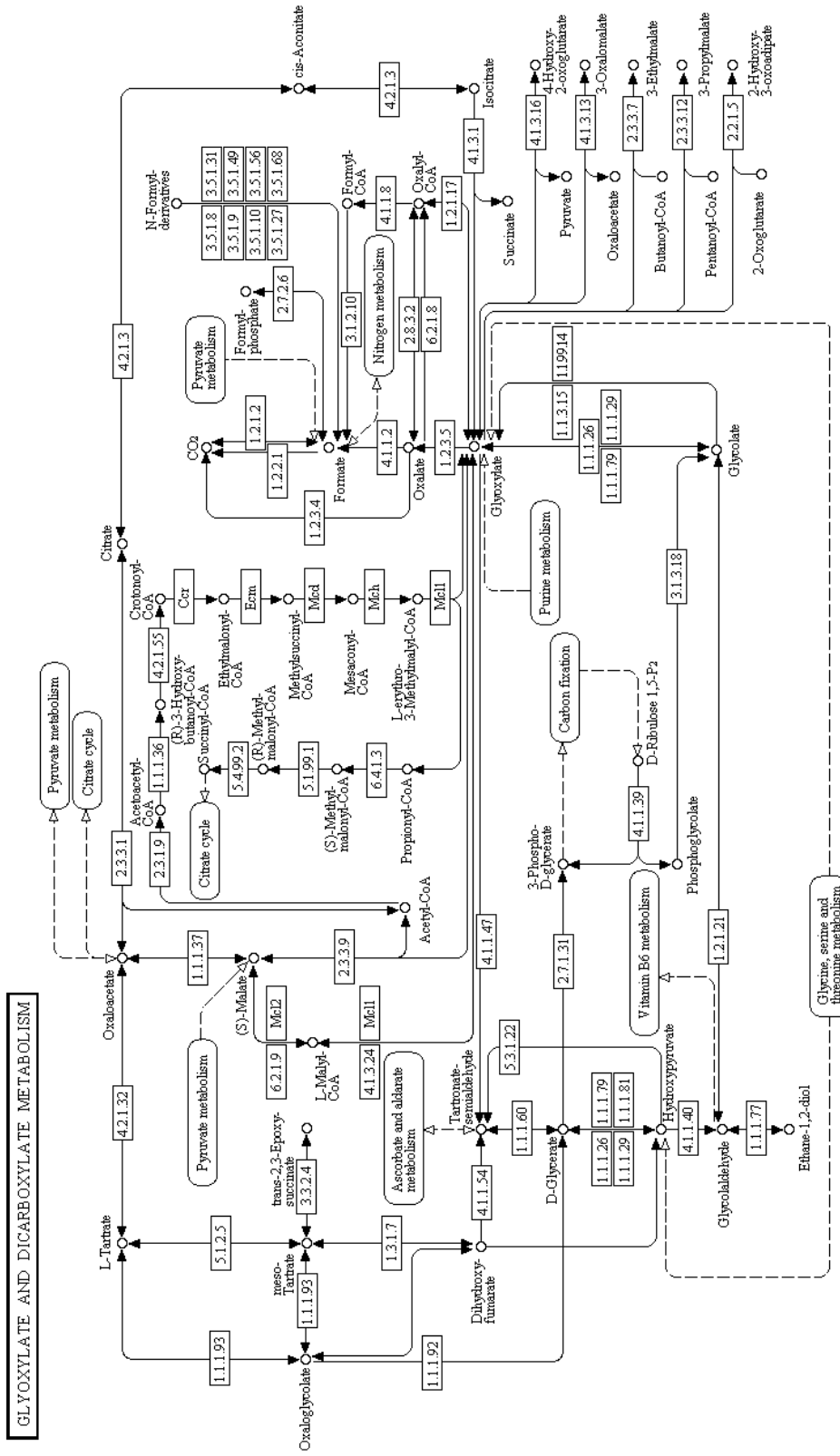


Figure I-8 : Métabolisme du pyruvate.



530 1031/11

Figure I-9 : Métabolisme du glyoxylate et des acides di-carboxyliques.

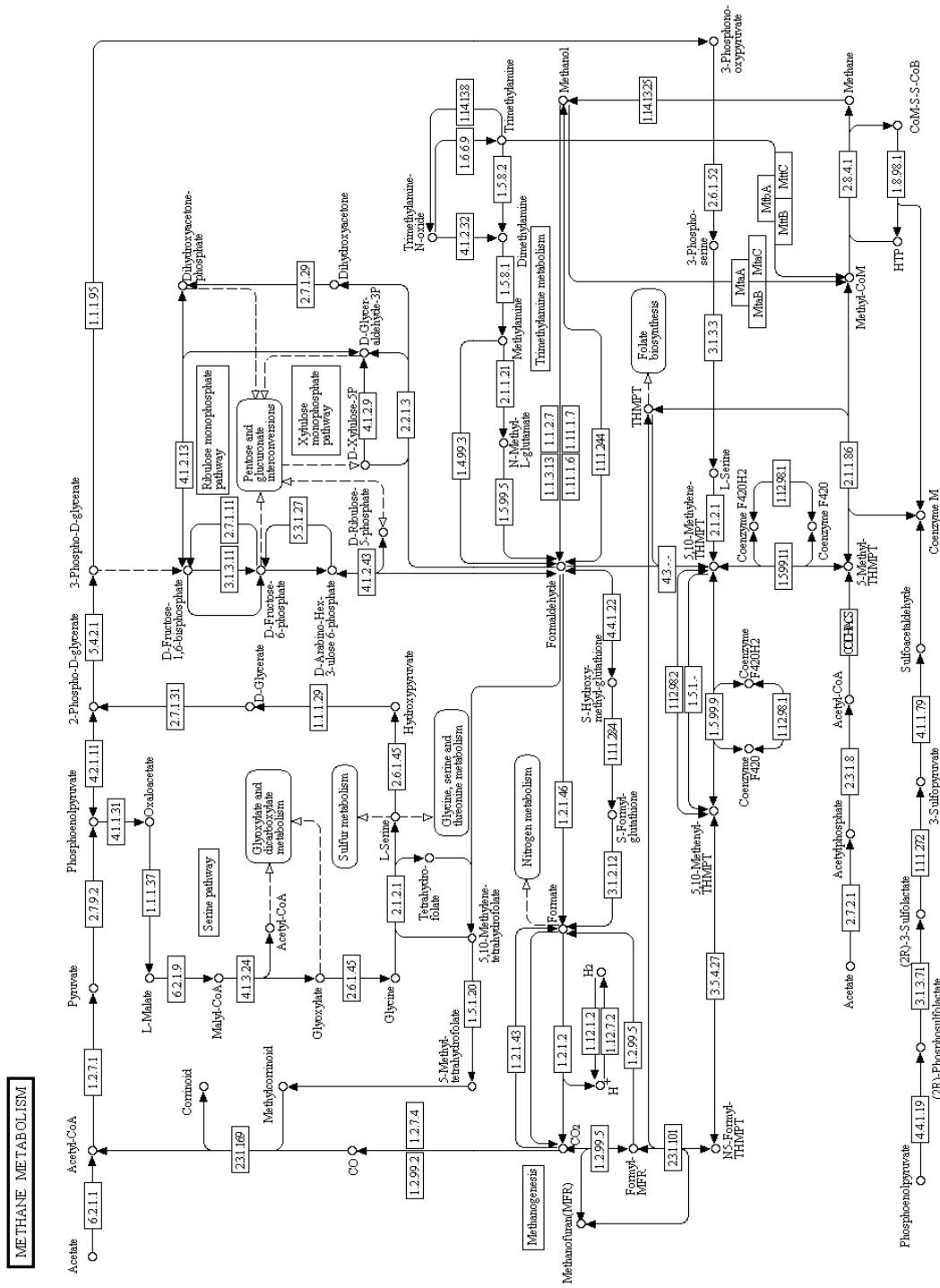


Figure I-10 : Métabolisme du méthane.

Ces exemples de cycles (Figure I-8, I-9, I-10), dans lesquels on retrouve quelques acides carboxyliques, des aldéhydes et des alcools présents dans l'eau nuageuse, permettent de se rendre compte de la complexité des différentes voies de biotransformation de ces composés. Les cycles décrits dans cette base de données sont complétés au fur à mesure des découvertes de nouvelles réactions enzymatiques, et ne représentent qu'une part des voies métaboliques possibles dans le vivant.

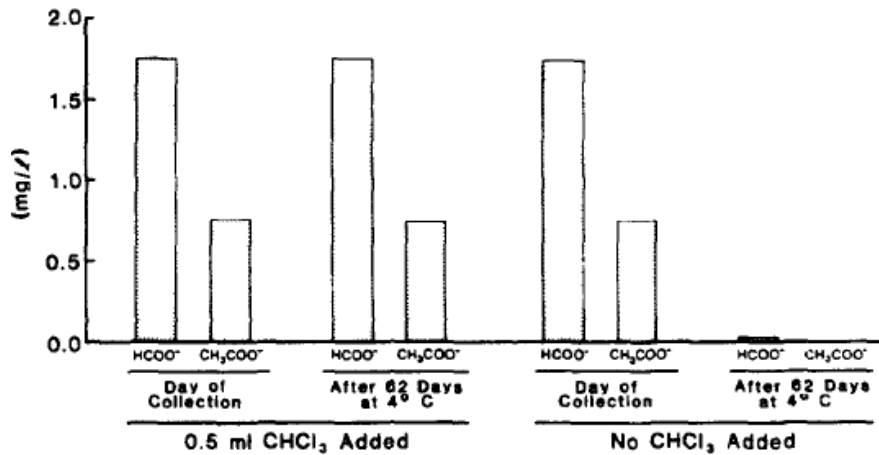
D'autres familles de composés chimiques présents dans le nuage sont des éléments essentiels du métabolisme microbien. Les composés inorganiques azotés, soufrés et phosphatés, sont intégrés dans le métabolisme et entrent dans la composition des protéines, des cofacteurs enzymatiques (NAD<sup>+</sup>, ...), des acides nucléiques (ADN, ARN), des nucléotides phosphatés (ATP, ADP, AMP, UDP, etc.), etc.

La présence de tous ces éléments chimiques organiques et inorganiques au sein du nuage indique que ce milieu aqueux peut-être considéré comme un milieu de culture oligotrophe pour les microorganismes.

#### ***1.2.2.2. Potentiel de biotransformation des microorganismes issus de l'atmosphère***

Dans la partie précédente, nous avons présenté un aperçu du potentiel enzymatique que possèdent les organismes vivants, dont les microorganismes. Quel est donc le potentiel de biotransformation chimique des microorganismes viables présents dans le nuage? Les travaux issus de la littérature sont présentés dans ce paragraphe, en respectant l'ordre chronologique de leur parution.

L'une des premières publications concernant la transformation de composés chimiques dans une eau atmosphérique par des microorganismes, est celle de Keene et al. (1983). Ils ont observé une diminution de l'acidité dans des échantillons de pluie conservés sur de longues durées, ces variations de pH étant dues à la disparition de l'acide acétique et de l'acide formique. Des échantillons de pluie traités et non-traités avec du chloroforme (bactéricide et fongicide) ont été conservés durant 62 jours à 4°C. L'analyse des échantillons à la fin de cette conservation, a montré que l'acétate et le formiate disparaissaient totalement dans les échantillons non traités (Figure I-11), alors que dans les échantillons traités les concentrations initiales étaient conservées (Keene et al., 1983 ; Keene and Galloway, 1984).



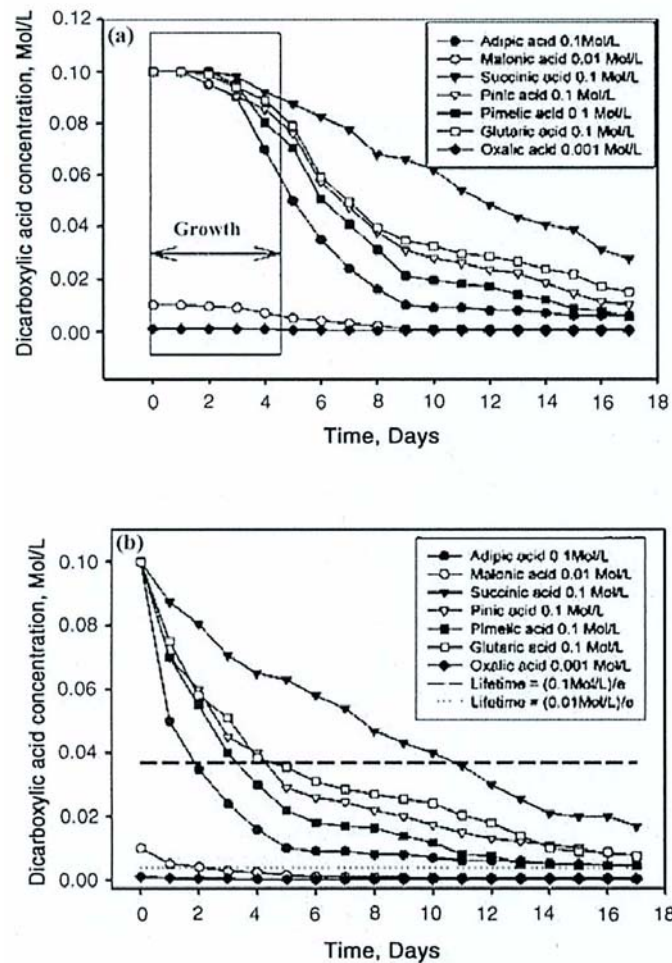
**Figure I-11** : Concentrations en acétate et en formiate mesurées dans des échantillons de pluie traités et non-traités avec du chloroforme. Mesures effectuées le jour de l'échantillonnage et après 62 jours de conservation à 4°C.

Herlihy et al. (1987) ont confirmé ces résultats en étudiant la capacité des microorganismes présents dans l'eau de pluie à utiliser l'acétate et le formate. De l'eau de pluie et un témoin contenant du chloroforme ont été incubés à température ambiante durant plusieurs jours en présence de  $^{14}\text{C}$ -formiate et de  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -acétate, dans le but de mesurer les taux d'assimilation par les microorganismes et de minéralisation. La différence entre les concentrations en carbone  $^{14}\text{C}$  : 1) transformé en  $^{14}\text{CO}_2$ , 2) assimilé par les cellules et 3) celui des substrats n'ayant pas réagi, leur a permis d'estimer des vitesses de biodégradation des composés marqués. La vitesse maximale de biodégradation mesurée pour le  $2\text{-}^{14}\text{C}$ -acétate est de  $24 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ jour}^{-1}$  et celle du  $^{14}\text{C}$ -formiate est de  $44 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ jour}^{-1}$  ; les concentrations moyennes en bactéries dans leurs échantillons d'eau de pluie étaient d'environ  $1.10^5 \text{ cellules mL}^{-1}$ . Les analyses du  $^{14}\text{C}$  ont permis d'observer qu'en moyenne 95% du C provenant du formiate marqué était rejeté sous forme de  $\text{CO}_2$  et que 5% était assimilé par les bactéries. Dans le cas de l'acétate, 40% était respiré et 60% assimilé par les cellules (Herlihy et al., 1987). Ces résultats démontrent que la capacité de biotransformation de ces composés organiques dans un milieu aqueux issu de l'atmosphère peut jouer un rôle sur le bilan carbone dans la phase aqueuse et dans la phase gazeuse de l'atmosphère.

Ariya et al (2002) ont utilisé des milieux contenant des acides di-carboxyliques (du  $\text{C}_2$  au  $\text{C}_9$  : oxalique, malonique, succinique, glutarique, adipique, pimélique et pinique) en présence de nitrate d'ammonium (source d'azote, dans le but de favoriser la croissance des champignons) ; ces solutions ont été exposées à l'air libre dans le centre-ville et dans la zone rurale périphérique de Montréal (Canada), afin qu'elles soient colonisées par les microorganismes aériens. Ils ont ensuite étudié l'évolution des concentrations (Figure I-12)



des milieux infectés et non infectés (non exposés à l'air libre) au cours de leur incubation (conditions d'incubation non définies).



**Figure I-12 :** Evolution de la concentration en acides di-carboxyliques au cours du temps dans des solutions en cours de colonisation fongique (a) et pré-colonisées (b) (Ariya et al., 2002).

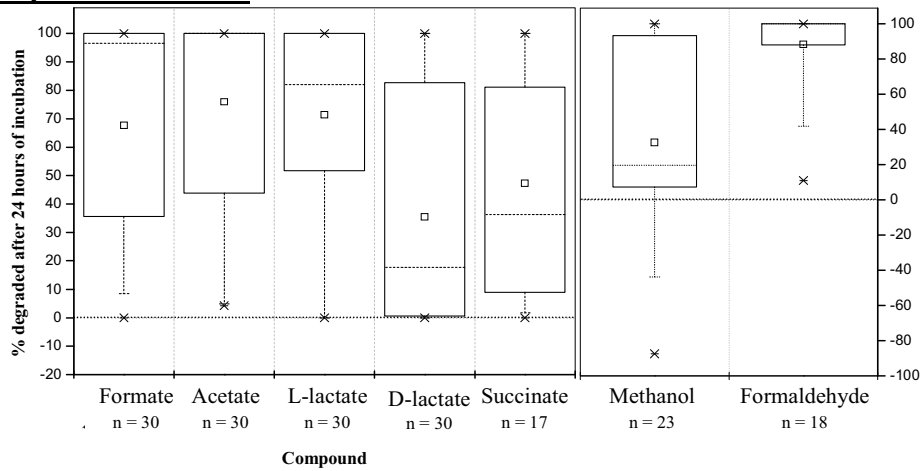
La dégradation des acides di-carboxyliques est effective dans les milieux « infectés » en majorité par des champignons, cependant de nombreuses informations concernant les conditions d'incubation ne sont pas précisées, comme le mode d'agitation, la température d'incubation et la quantité de matière microbiologique (au moins la valeur de la biomasse finale). Une autre partie de l'étude concerne la biotransformation du succinate (marqué au  $^{13}\text{C}$ ) en présence de la souche fongique *Geotrichum*. A partir du suivi par RMN, ils observent l'apparition de molécules marquées : des protéines, des hydrates de carbone (glucides) et des acides gras (Ariya et al., 2002). Cela démontre clairement l'assimilation et l'utilisation du succinate par cette souche fongique ; par contre l'utilisation d'un champignon pose problème, sachant que la plupart des champignons retrouvés dans l'air sont sous la forme de spores. Pour résumer, ce travail est intéressant, mais pose des problèmes d'extrapolation car les

conditions expérimentales restent floues. Une autre partie de ces travaux est la comparaison des temps de vie des composés carboxyliques en présence de microorganismes ou vis-à-vis d'oxydants présents en phase aqueuse (cf section I.2.3.3).

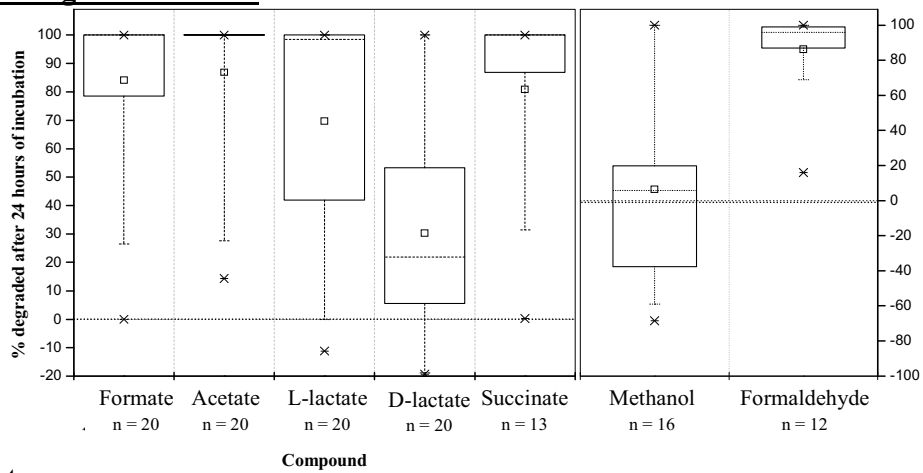
Amato et al. (2005, 2007a) ont étudié la capacité de biotransformation de souches isolées de l'eau nuageuse envers l'acétate, le formiate, le lactate (L et D), le méthanol et le formaldéhyde ; dans des conditions d'incubation aérobies à 17°C et 27°C (sous agitation à 200 rpm) dans des solutions tamponnées à pH 7 (tampon phosphate). Les Figures I-13 et I-14 présentent les pourcentages de biotransformation (dégradation ou production) enregistrés après 24h d'incubation. Ces valeurs sont obtenues à partir de l'analyse par RMN des concentrations initiales et finales, pour l'ensemble des souches : 60 souches microbiennes ont été testées avec un ou plusieurs substrats organiques (54 souches bactériennes et 6 de levures, isolées de 7 événements nuageux distincts).

L'ensemble des souches possède un fort potentiel enzymatique pour les composés testés ; les bactéries Gram(-) sont globalement plus actives que les bactéries Gram(+) (Figure I-13).

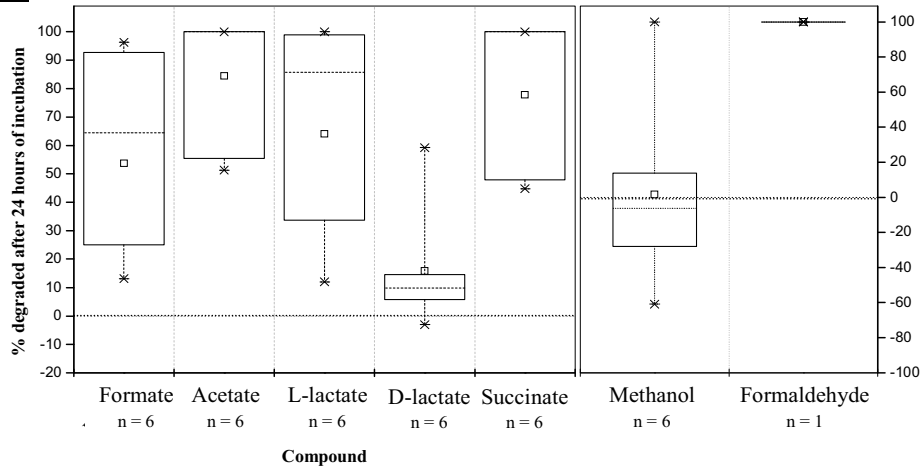
**Gram positive bacteria**



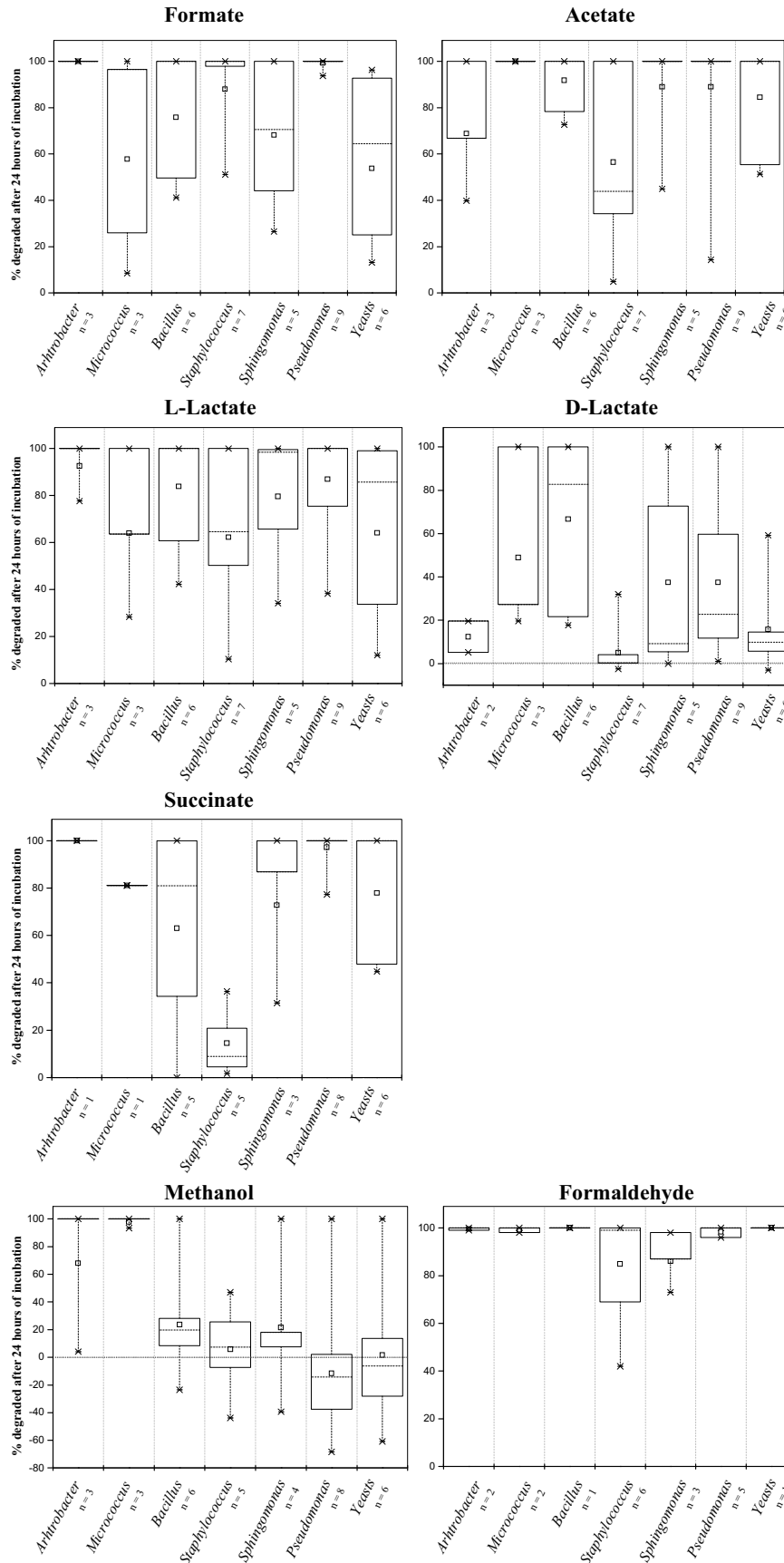
**Gram negative bacteria**



**Yeasts**



**Figure I-13 :** Pourcentages de biodégradation pour chaque composé par les bactéries à Gram positif et Gram négatif et les levures isolées de l'eau du nuage au puy de Dôme, après 24 heures d'incubation. Les boîtes représentent les valeurs médianes (---) et les limites du 1er et 3ème quartile (25% et 75%) ; □ moyenne; × minimum et maximum, n= nombre de souches considérées.(Amato et al., 2007a).



**Figure I-14 :** Pourcentages de biodégradation pour chaque composé par différents genres de bactéries et de levures isolées de l'eau du nuage au puy de Dôme, après 24 h d'incubation (Arthrobacter, Micrococcus, Bacillus, Staphylococcus, Sphingomonas et Pseudomonas et levures). Les boîtes représentent les valeurs médianes (---) et

les limites du 1er et 3ème quartile (25% et 75%) ; □ moyenne; × minimum et maximum, n= nombre de souches considérées. (Amato et al., 2007a).

Les composés efficacement dégradés par la plupart des souches testées sont le formiate, l'acétate et le formaldéhyde. Par exemple le formiate est dégradé par les bactéries à Gram négatif, Gram positif et les levures en moyenne à 100%, 97% et 65%, respectivement. Les souches du genre *Arthrobacter* et *Pseudomonas* ont un potentiel de biodégradation du formiate de 100% (Figure I-14). L'acétate et le formiate sont les acides carboxyliques majeurs de l'eau de nuage (Chebbi and Carlier, 1996), ils représentent 30% et 35% de la fraction molaire des acides carboxyliques détectés dans l'eau de nuage collecté au sommet du puy de Dôme (Marinoni et al., 2004).

La dernière étude recensée au sujet du rôle des microorganismes dans la chimie atmosphérique est parue en 2008. Les potentiels de biotransformation de 18 souches fongiques (isolées d'échantillon d'air de la zone urbaine de Montréal) ont été testés dans des solutions de malonate (1 mM) (Côté et al., 2008). Trois souches biodégradent rapidement le malonate, la moitié de sa concentration initiale est consommée en 4,5 jours pour deux souches et en 11,5 jours pour la troisième ; cependant certaines conditions d'incubation sont manquantes (température, agitation, et les valeurs initiales de biomasse). L'utilisation de malonate marqué ( $^{13}\text{C}$ ) a permis de mettre en évidence par RMN l'incorporation de  $^{13}\text{C}$  lors de la biosynthèse d'acides carboxyliques, de sucres et d'acides gras (Côté et al., 2008).

Ces différentes études montrent que la biodégradation des composés organiques par les microorganismes du nuage (et de l'atmosphère en général) est effective dans des conditions de laboratoire. Elles indiquent qu'une part des modifications chimiques de ces composés organiques, au sein de la phase aqueuse du nuage pourrait être attribuée aux microorganismes présents dans ce milieu.

### ***1.2.2.3. Activité métabolique et processus photochimique : comparaison***

Les radicaux libres sont des acteurs majeurs dans la chimie atmosphérique des composés organiques, aussi bien dans la phase gazeuse que dans la phase aqueuse du nuage. Les voies directes et indirectes de la photochimie sont utilisées pour la compréhension de la plupart des transformations chimiques se produisant dans le nuage. Il est donc impératif de comparer les transformations chimiques dues aux microorganismes à celles photo-induites, afin de valider l'intérêt des microorganismes en tant que catalyseur biochimique au sein de la goutte d'eau nuageuse.

L'étude d'Ariya et al. (2002) est la première utilisant cette approche. Les temps de vie de quelques acides di-carboxyliques en présence de microorganismes ont été déterminés (pour  $T = [X]_i/e$  ; avec  $T$  le temps de vie du composé X, et  $[X]_i$  la concentration initiale du composé X), et comparés au temps de vie de certains de ces composés vis-à-vis de leur réactivité aux espèces oxydantes  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2\cdot$  et  $\text{O}_3$  en phase aqueuse (Tableau I-8).

Acides di-carboxyliques	Oxydant	Constante d'avancement de la réaction $k$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	Temps de vie $T = 1/k[X]$ (jour)	Références
	$\cdot\text{OH}$ (aq)			
Oxalique		$1,0 \times 10^6$	16 - 64	(Getoff et al., 1971)
Malonique		$1,6 \times 10^7$	6 - 24	Walling et al. [1973]
Succinique		$3,1 \times 10^8$	3 - 12	(Cabelli and Bielski, 1985)
Glutarique		$8,3 \times 10^8$	1.3 - 5.2	(Cabelli and Bielski, 1985)
Adipique		$2,0 \times 10^9$	0,1 - 0,4	(Cabelli and Bielski, 1985)
Pimélique		$3,5 \times 10^9$	0,03 - 0,12	(Cabelli and Bielski, 1985)
	$\text{HO}_2\cdot$ (aq)			
Oxalique		<0,2	>964	
Malonique		<0,3	>643	(Scholes and Willson, 1967)
Succinique		<0,25	>771	
	$\text{O}_3$ (aq)			
Oxalique		$2,7 \times 10^{-2}$	428669	
Malonique		5,5	2104	
Succinique		$6,7 \times 10^{-4}$	17274737	(Nepotchatykh and Ariya, 2002)
Glutarique		$1,3 \times 10^{-3}$	8903134	
Adipique		$1,7 \times 10^{-3}$	6808279	
Pimélique		$4,4 \times 10^{-3}$	2630471	
Pinique		$2,5 \times 10^{-2}$	469963	
	<b>Microorganismes</b>		$T = [X]_i/e$ (jour)	
Oxalique			$\infty$	
Malonique			1,5	(Ariya et al., 2002)
Succinique			10	
Glutarique			5	

**Tableau I-8 :** Temps de vie de certains acides di-carboxyliques présents dans l'atmosphère, vis-à-vis de la réactivité des radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{HO}_2\cdot$ , de l'ozone et de l'activité métabolique de microorganismes atmosphériques (Ariya et al., 2002).

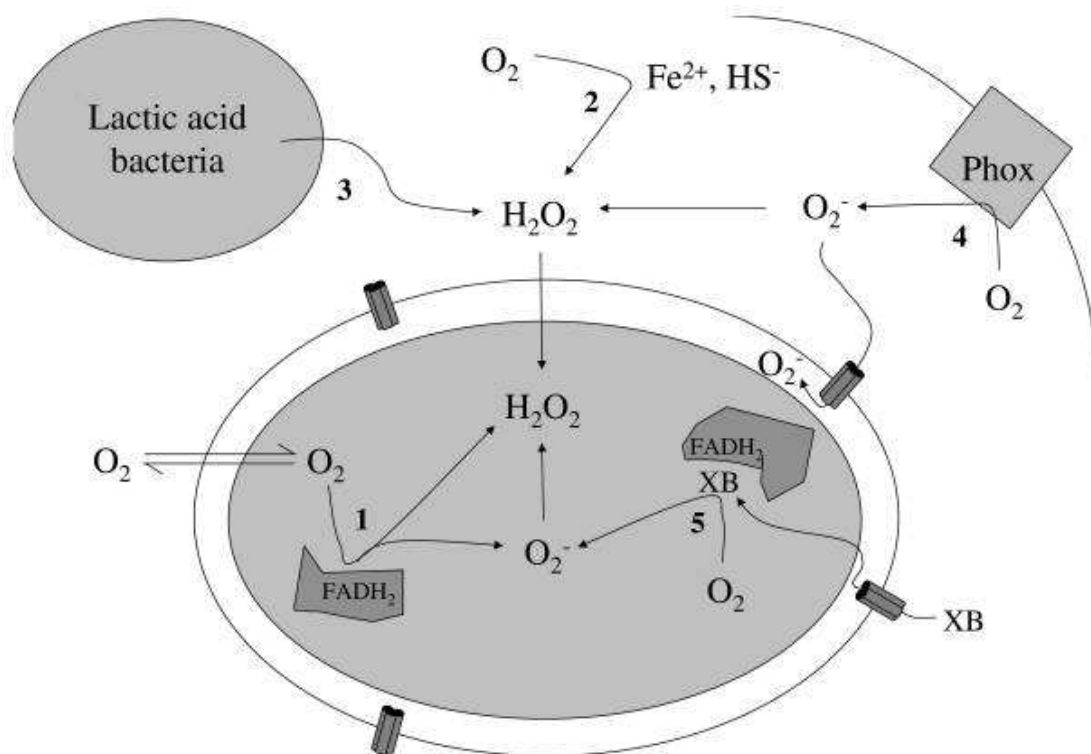
Les temps de vie de ces acides en présence des microorganismes de l'air sont généralement plus courts que ceux enregistrés en présence de radicaux libres, cependant il faut noter qu'on ne connaît pas les conditions d'incubation des expériences réalisées par Ariya et al (2002) Cette étude montre que les vitesses de biotransformation d'acides di-carboxyliques (malonique, succinique et glutarique) sont du même ordre de grandeur, voire supérieures à celles obtenues avec les espèces oxydantes  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2\cdot$  et  $\text{O}_3$  en phase aqueuse.

#### I.2.2.4. Voie du stress oxydant : influence sur la chimie radicalaire

Dans les sections précédentes, nous avons décrit comment les microorganismes des nuages pouvaient utiliser les voies du métabolisme carboné pour transformer des composés organiques et ceci de manière compétitive avec les mécanismes photochimiques impliquant des espèces oxydantes telles  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ , considérées comme les catalyseurs de la chimie troposphérique.

Les microorganismes pourraient également agir directement sur ces espèces oxydantes *via* leur métabolisme du stress oxydant et altérer ainsi la capacité oxydante du nuage. Cette hypothèse est basée sur la connaissance que nous avons des interactions possibles entre ces espèces oxydantes et les microorganismes. En effet, ces espèces ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) se retrouvent dans les organismes vivants et leur environnement, créant un stress oxydant (Imlay, 2008 ; Ziegelhoffer and Donohue, 2009).

La Figure I-15 présente de manière simplifiée les sources majeures du stress oxydant auxquels peuvent être soumises une bactérie. Ces sources conduisent à la formation des deux espèces clé du stress oxydant  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .



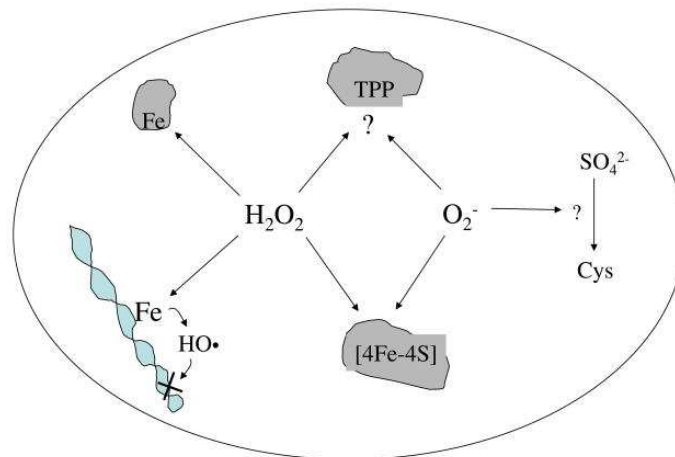
**Figure I-15** : Source de stress oxydatif pour les bactéries : (1) oxydation enzymatique intra-cellulaire ; (2) réactions redox dans l'environnement ; (3) libération de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par des bactéries en compétition (4) oxydase NADPH phagosomale, et (5) cycle redox des antibiotiques (Imlay, 2008).

Il existe d'abord plusieurs voies de production interne. Les microorganismes aérobies utilisent directement le dioxygène de l'air qui diffuse librement dans la cellule et va pouvoir réagir très

rapidement avec des cofacteurs enzymatiques (voie 1) quinoniques ou flaviniques du type FADH<sub>2</sub>, NADH et NADPH en les réduisant (par exemple NADH ↔ NAD<sup>+</sup> + H<sup>+</sup> + 2 e<sup>-</sup>). Certains antibiotiques peuvent aussi être réduits par le même mécanisme (voie 5). Ces systèmes conduisent à la production de l'ion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> qui peut se dismuter dans la cellule en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En ce qui concerne les sources externes du stress oxydant, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être produit par d'autres organismes comme les bactéries lactiques par exemple (voie 3), des réactions présentes dans l'environnement impliquant du fer ou des ions SH<sup>-</sup> (voie 2). Des réactions de phagocytose intervenant lors de l'infection d'une cellule hôte (voie 4) conduisent aussi à la production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

La Figure I-15 peut être extrapolée au cas de l'environnement nuageux où H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sont produits et peuvent diffuser aisément dans la cellule. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>•-</sup> sont des molécules toxiques pour les organismes vivants comme le montre la Figure I-16 de manière très simplifiée.



**Figure I-16** : Mécanismes connus dans lesquels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et O<sub>2</sub><sup>•-</sup> entraînent des lésions cellulaires: dommage aux protéines et ADN par réaction de Fenton (•OH) ; attaque des systèmes enzymatiques contenant des clusters Fer-Soufre dans leurs sites actifs ; inhibition de la transcétolase ou de la voie d'assimilation du soufre (Imlay, 2008).

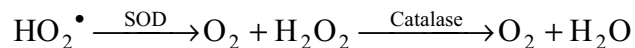
Le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène attaquent directement tous les systèmes enzymatiques contenant des clusters Fer-Soufre ([4Fe-4S]) dans leurs sites actifs, notamment des déshydratases, dioxygénases etc. Le Fe(II) présent dans le cluster est oxydé en Fe(III) qui devient labile, sort du site actif rendant ainsi l'enzyme totalement inactive. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de son côté peut réagir avec du fer non complexé par réaction de Fenton dans la cellule produisant alors des radicaux •OH extrêmement réactifs. Ces radicaux hydroxyles ont pour cible majeure les acides nucléiques (ADN) provoquant de nombreuses mutations ; ils peuvent agir aussi sur les lipides, protéines etc. Des radicaux •OH extracellulaires, produits par exemple dans la phase



aqueuse du nuage peuvent interagir de manière délétère sur les constituants cellulaires de la même manière.

D'autres mécanismes impliquant le TPP (Thiamine PyroPhosphate) cofacteur de la transcétolase (enzyme du métabolisme des sucres) ou encore la voie d'assimilation du soufre sont envisagés mais non totalement élucidés.

Pour lutter contre la production de ces espèces oxydantes, les organismes aérobies ont donc développé un arsenal de défense impliquant des enzymes détoxifiantes et des molécules antioxydantes. Les espèces oxydantes présentes dans le nuage seraient donc aussi des substrats pour de telles enzymes. Les enzymes superoxyde dismutase (SOD) (Keele et al., 1970) et catalase (Farr et al., 1988) constituent la première ligne de défense des bactéries contre le stress oxydant. Dans un premier temps, le superoxyde est dismuté par la SOD, puis le peroxyde d'hydrogène formé est à son tour dégradé par la catalase :



Ces enzymes sont des métalloprotéines contenant du Fer (ou Mn) dans leur site actif, cependant elles ne contiennent pas de cluster Fer-Soufre et ne sont donc pas désactivées par le superoxyde. Il est intéressant de noter que ces enzymes sont extrêmement efficaces car leurs vitesses de réactions sont très rapides. Ainsi par exemple chez *E. coli*, il a été mesuré une production  $5 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$  de  $\text{O}_2 \cdot^-$  et une concentration en SOD de  $50 \mu\text{M}$  ; au final l'état stationnaire de la concentration en  $\text{O}_2 \cdot^-$  est approximativement  $0,1 \text{ nM}$ . Pour  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la vitesse de production dans cette même bactérie est de  $15 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ . Après action de la catalase, la concentration interne de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est environ 10 fois moins élevée (Imlay, 2008). Enfin, il est important de remarquer que ces systèmes de défenses fonctionnent de manière classique avec des concentrations en espèces oxydantes qui sont compatibles avec celles rencontrées dans les nuages ( $\sim 19 \mu\text{M}$  de concentration maximale en  $\text{H}_2\text{O}_2$  mesuré dans une eau nuageuse échantillonnée au puy de Dôme, (Marinoni et al., 2011)).

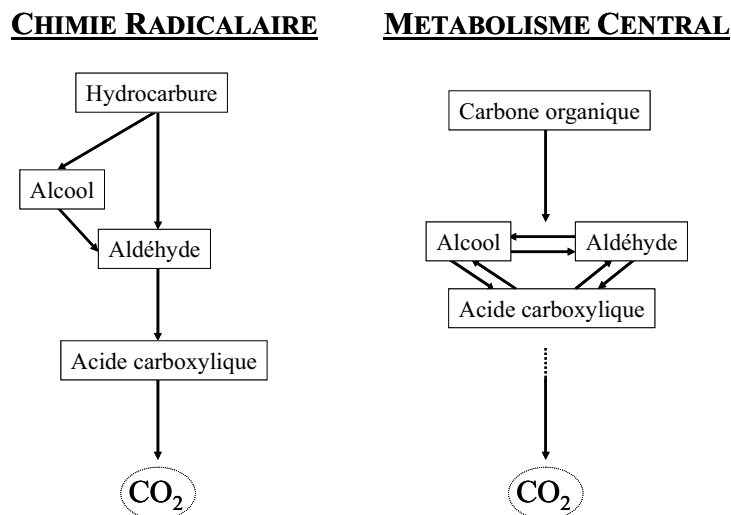
Enfin, outre la présence d'enzymes du stress oxydant, les microorganismes peuvent produire des molécules antioxydantes pour se protéger (Sigler et al., 1999). Ainsi des molécules soufrées comportant une fonction SH peuvent réagir avec  $\cdot\text{OH}$  pour redonner  $\text{H}_2\text{O}$  et la forme réduite comportant un pont disulfure. Citons par exemple le glutathion (GSH) qui passe sous sa forme réduite GS-SG. Il existe de nombreuses autres molécules antioxydantes soit hydrophiles (acide ascorbique, acide urique, N-acétylcysteine...) ou lipophiles (vitamine E, all-transrétinol, flavonoïdes,  $\beta$ -carotènes, lycopène...). Parmi ces molécules lipophiles

certaines se trouvent dans la membrane bactérienne et constituent la première barrière contre les agressions oxydantes externes.

### **I.3.Problématique**

Le contenu microbiologique de l'eau nuageuse est étudié depuis une dizaine d'années, et à notre connaissance seulement 4 publications parues de 2001 à 2007 concernent des analyses du contenu microbien de l'eau nuageuse (Sattler et al., 2001 ; Bauer et al., 2002 ; Amato et al., 2005 ; Amato et al., 2007d). L'étude d'Amato et al. (2007c) est la plus développée en terme d'évènements nuageux échantillonnés et en terme de répartition temporelle, soit 14 évènements nuageux prélevés sur le site du puy de Dôme (1465 m a.s.l.) et répartis sur 21 mois. Il est clair cependant que les connaissances dans ce domaine sont encore très embryonnaires et doivent largement être complétées pour que l'on puisse avoir une **description fiable** et statistiquement robuste des **communautés microbiennes** des nuages. Le premier objectif de notre thèse sera donc de poursuivre les analyses biologiques sur des échantillons d'eau nuageuse prélevés sur le même site. Nous pourrons ainsi acquérir de nouvelles données sur le contenu microbien de l'eau nuageuse et observer son évolution en fonction des saisons, de l'origine des masses d'air nuageuse, mais aussi des caractéristiques physico-chimiques des nuages.

Le second objectif de notre étude concerne le rôle des microorganismes dans la **chimie atmosphérique**, et plus précisément sur le bilan de la matière organique au sein de la goutte d'eau nuageuse. A l'heure actuelle et sur la base des études de la littérature, il semble que les transformations chimiques des composés organiques dans la phase aqueuse soient principalement associées à leur réactivité avec les radicaux libres (Herrmann et al., 2010). Cependant lorsque l'on compare des schémas très simplifiés de dégradation de composés organiques par voie radicalaire ou par voie biologique, on observe une grande similitude des intermédiaires de réaction (Figure I-17). Cette observation, ajoutée au fait qu'une grande partie des microorganismes présents dans l'eau nuageuse est viable et métaboliquement active (Sattler et al., 2001 ; Amato et al., 2007d), démontre l'intérêt d'étudier le rôle des microorganismes dans la chimie des composés organiques.



**Figure I-17** : Résumé des voies de dégradation des composés carbonés : chimie radicalaire et voies du métabolisme central.

Des études récentes ont permis d'évaluer d'un point de vue qualitatif les capacités de biotransformation des microorganismes isolés de l'eau nuageuse envers quelques uns des composés organiques majeurs présents dans ce milieu (Amato et al., 2005 ; Amato et al., 2007a).

L'enjeu scientifique de notre travail est poursuivre cet objectif afin tenter de mesurer **quantitativement la contribution des microorganismes sur le bilan des composés organiques** au sein du nuage et d'estimer ainsi la part relative des mécanismes de bio- et de photo-transformation dans la chimie des nuages.

Pour cela, nous allons déterminer des vitesses de biotransformation et les comparer avec les vitesses de transformation par les voies radicalaires. Notre stratégie sera de travailler avec des modèles expérimentaux de plus en plus proches des conditions environnementales, même si ces conditions seront toujours restreintes à des études en phase liquide.

L'obtention des vitesses de biotransformation sera réalisée en plusieurs étapes, nous débuterons nos expériences avec des solutions contenant un seul composé organique appelées « substrat unique », puis avec des solutions contenant plusieurs composés organiques en mélange dans une solution ionique appelées « nuages artificiels », en présence à chaque fois de souches pures de microorganismes isolés de l'eau nuageuse par culture.

L'aspect chimie radicalaire, sera estimé via des données issues de la littérature à partir de constantes de réaction entre les radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{NO}_3\cdot$  et les composés organiques, puis complété par des expériences d'irradiation des solutions « nuage artificiel » en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Ensuite, nous réaliserons des expériences en eau nuageuse « naturelle » afin de confirmer le potentiel de biotransformation de la matière organique par la microflore endogène de l'eau nuageuse. L'eau atmosphérique prélevée sera irradiée à l'aide de différents systèmes expérimentaux afin de confronter les processus de photo- et biodégradation des composés organiques.

Le dernier volet de notre étude sera très innovant puisqu'il concernera une question scientifique non encore abordée au plan international. Il s'agit de tester l'hypothèse de la mise en œuvre du **métabolisme du stress oxydant des microorganismes** dans un contexte nuageux. Nous avons vu dans la partie bibliographique que les microorganismes aérobies possédaient naturellement une batterie de défenses pour se protéger des espèces oxydantes très dangereuses pour l'organisme, comme  $H_2O_2$  et  $\cdot OH$ .

Notre stratégie est de réaliser des expériences sur des eaux de nuage réelles afin d'observer l'effet de ces espèces oxydantes sur l'activité métabolique des microorganismes, mais aussi de mesurer l'activité des catalases microbiennes, enzymes majeures du métabolisme du stress oxydant, qui utilisent  $H_2O_2$  comme substrat. Cette dernière activité microbienne, si elle est révélée, conduirait à envisager les **microorganismes comme influant directement sur la capacité oxydante du nuage**.

## **PARTIE II : RESULTATS**

## **II.1. Analyse du contenu microbiologique d'eaux de nuages**

Au cours de ce travail de thèse, des mesures biologiques ont été réalisées sur des échantillons d'eau nuageuse prélevés au sommet du puy de Dôme (1465 m a.s.l.) de décembre 2007 à septembre 2010.

Les mesures biologiques réalisées sont les suivantes :

- La quantification du contenu total en cellules bactériennes et fongiques ;
- La détermination de la concentration en ATP ;
- Le dénombrement des cellules microbiennes cultivées sur un milieu solide oligotrophe ;
- L'isolement et l'identification de souches bactériennes et de levures issues de la mise en culture de l'eau nuageuse à 5 et 17°C.

En parallèle et sur la même période, la caractérisation physico-chimique de chacun de ces prélèvements nuageux a été réalisée par l'équipe du SO BEAM qui inclut le LaMP/OPGC, le LPMM (Laboratoire de Photochimie Moléculaires et Macro-moléculaires) et notre équipe. Ceci a conduit à une publication commune qui décrit le monitoring de ces paramètres physico-chimiques depuis 10 ans au sommet du puy de Dôme : Charbouillot et al. 2011, soumise.

Dans ce chapitre, le site et les outils de prélèvement sont décrits, ainsi que les techniques d'analyses microbiologiques utilisées. Puis, les données biologiques de l'eau nuageuse échantillonnée au cours de cette thèse seront présentées et complétées par celles obtenues lors de la thèse de Pierre Amato. L'objectif est d'observer l'évolution de ces paramètres biologiques en fonction des saisons, de l'origine de la masse d'air nuageuse, et des caractéristiques physico-chimiques du nuage. En fin de chapitre, on s'intéressera à la caractérisation taxonomique des souches microbiennes isolées des cultures d'eau nuageuse.

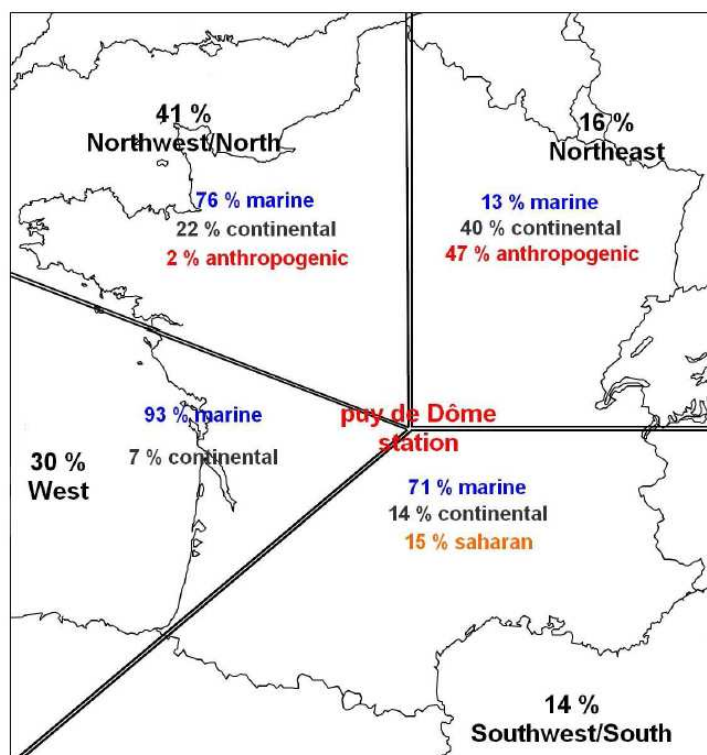
### **II.1.1. Matériel et méthodes**

#### ***II.1.1.1. Site de prélèvement et description de l'impacteur à nuage***

##### ***II.1.1.1.1. Site de prélèvement***

Le puy de Dôme (pdD) est un dôme volcanique culminant à 1465 m au dessus du niveau de la mer, il fait partie de la Chaîne des puys (Massif central). Il est situé dans la région Auvergne (peu industrialisée) ; la seule grande agglomération située à proximité du site est celle de Clermont-Ferrand à environ 10 km à l'Est. Les masses d'air provenant de l'Est sont rares, ce qui implique une faible influence de l'agglomération Clermontoise (~ 400 000 habitants) sur la qualité de l'air au sommet du pdD. Par ailleurs, lors des périodes d'échantillonnage (principalement l'hiver, l'automne et le printemps), le puy de Dôme se trouve dans la troposphère libre ou dans la couche résiduelle de la couche limite ce qui réduit l'influence locale.

La répartition des masses d'air nuageuses lors d'échantillonnage sur ce site (Figure II-1), indique qu'environ 30% d'entre elles proviennent de l'Ouest du site, 41% du Nord et du Nord-Ouest, 16% du Nord-est et 14% du Sud et Sud-ouest, ces masses d'air sont réparties en 3 catégories : continentale, urbaine (anthropisée) et océanique. La répartition des masses d'air est basée sur l'analyse des rétro-trajectoires, sur les paramètres physico-chimiques de l'eau (pH), sur le contenu en composés inorganiques (normalisé par le LWC) et sur le temps de parcours sur le continent (Charbouillot et al., 2011).



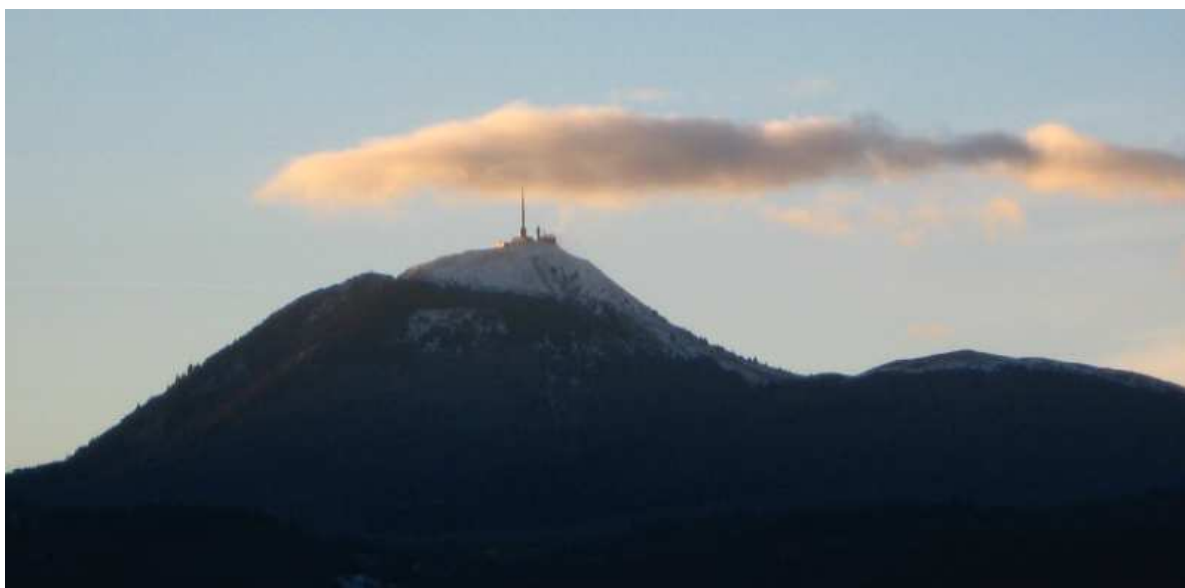
**Figure II-1** : Répartition des origines des masses d'air nuageuses échantillonnées de 2001 à 2010 en fonction de leur rétrotrajectoire. La proportion de masses d'air sous influence océanique, continentale, urbaine (anthropique) et Saharienne est indiquée pour chaque origine (Charbouillot et al., 2011).



De l'Ouest du site, les masses d'air provenant de l'Océan Atlantique parcourent environ 400 km sur les terres, et les principales zones urbaines et industrialisées situées en amont du site sont des agglomérations côtières (Bordeaux, Nantes, la Rochelle, etc.). Les principales études menées au sommet du pdD révèlent que les masses d'air provenant de l'Ouest sont essentiellement sous influence océanique et peu polluée.

Du Nord et du Nord-est, les masses d'air sont majoritairement anthropisées car sous l'influence de zones à forte activité industrielle (région parisienne, Nord-Est de la France, région de la Ruhr en Allemagne, etc.). La présence d'un vaste ensemble agricole entre les régions du Nord de la France et de l'Auvergne peut aussi influencer la composition biophysico-chimique des masses d'air provenant du Nord.

Les masses d'air nuageuses originaires du Sud sont rares, et sont majoritairement sous influence maritime notamment pour celles provenant du Sud-ouest.



**Figure II-2** : Sommet du puy de Dôme, le chalet d'observation est situé à gauche de l'antenne.

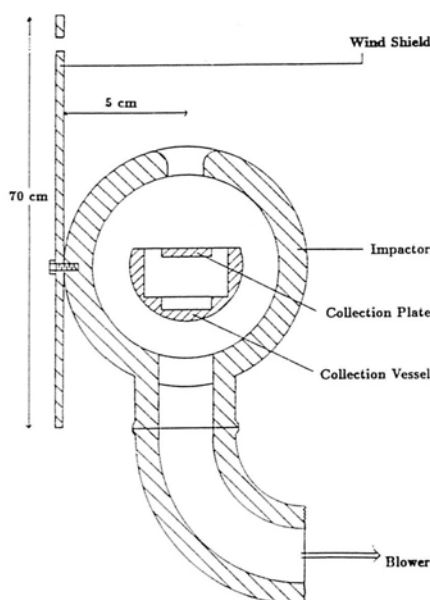
En plus de sa situation géographique, ce site présente l'avantage de dominer d'environ 800 m d'altitude les zones environnantes et d'avoir des pentes abruptes ; les nuages effleurant son sommet n'ont pas été directement en contact avec la surface du sol et le couvert végétal environnant (Figure II-2). Le site est accessible en voiture avec un accès restreint limitant le trafic. L'instrumentation météorologique permet d'anticiper les conditions de prélèvement sur le site en nous informant sur les conditions nuageuses : température, vitesse du vent, contenu en eau liquide (LWC : Liquid Water Content), présence de précipitation, diamètre des hydrométéores. De plus, la durée du trajet (~ 40 min) entre la station du pdD et nos

laboratoires, limite les modifications bio-physico-chimiques de l'eau nuageuse (transport en glacière) avant son analyse et utilisation.

L'observatoire météorologique de l'OPGC situé au sommet permet à différentes équipes de recherche locales (LaMP, LPMM et SEESIB de l'Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand) et externes de réaliser des mesures physico-chimiques en continu de l'atmosphère sèche (gaz, particules d'aérosol) ou de manière discontinue lors d'évènements nuageux. Une part de ces mesures est disponible sur le site web de l'OPGC (<http://www.obs.univ-bpclermont.fr/SO/mesures/>).

#### II.1.1.1.2. Impacteur à gouttelettes

On dispose de deux impacteurs à gouttelettes dont les collecteurs en acier inoxydable peuvent être stérilisés par autoclavage (20 min, 121°C). Ces impacteurs constitués d'un étage d'impaction sont des reproductions du modèle développé par l'équipe de Kruisz et al. (1993) et utilisé pour la première fois au Mont Sonnblick (3106 m a.s.l., Autriche) ; il est adapté aux conditions de prélèvement par vent fort grâce à l'utilisation d'un coupe-vent (Figure II-3).



**Figure II-3** : Schéma en coupe de l'impacteur à gouttelettes (Kruisz et al., 1993).

Le coupe-vent permet à l'air d'être ralenti en amont du système d'impaction, les microgouttes en suspension dans l'air sont aspirées à travers la fente de l'enceinte cylindrique, puis vont s'impacter sur la plaque de collecte et se retrouver dans le vase de collecte. Avec un débit de aspiration de  $86 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ , la limite inférieure du diamètre aérodynamique est d'environ  $7 \mu\text{m}$

(Brantner et al., 1994), ce qui permet de collecter une part majeure du volume aqueux des nuages (la taille des gouttes varie de 5 à 100  $\mu\text{m}$  dans un nuage).

De 2007 à mai 2010, durant la période d'inaccessibilité au chalet de l'observatoire (en travaux), les impacteurs étaient placés à 1,5 m au dessus du sol (herbes courtes) et à proximité du bâtiment de TDF (Télédiffusion De France). Ce bâtiment avait selon la direction du vent, l'effet d'un coupe-vent avec des perturbations locales de la direction des vents ; ce qui limitait fortement l'efficacité de collecte, car l'impacteur était fixé au début de la collecte face aux vents dominants.

Depuis la fin du mois de mai 2010, les impacteurs sont placés sur la plateforme se trouvant sur le toit du chalet du puy de Dôme (**Figure II-4**). Cette position est idéale car il n'existe aucun obstacle physique aux différents flux, et les impacteurs sont alors situés à 5 m au dessus du sol. De plus, les nouveaux pieds des impacteurs, permettent de les orienter régulièrement face au vent dominant.



**Figure II-4** : Aspirateurs à nuage sur leurs anciens (a) et nouveaux (c) emplacements de prélèvements à la station du puy de Dôme, (b) chalet scientifique du pdD après sa rénovation.

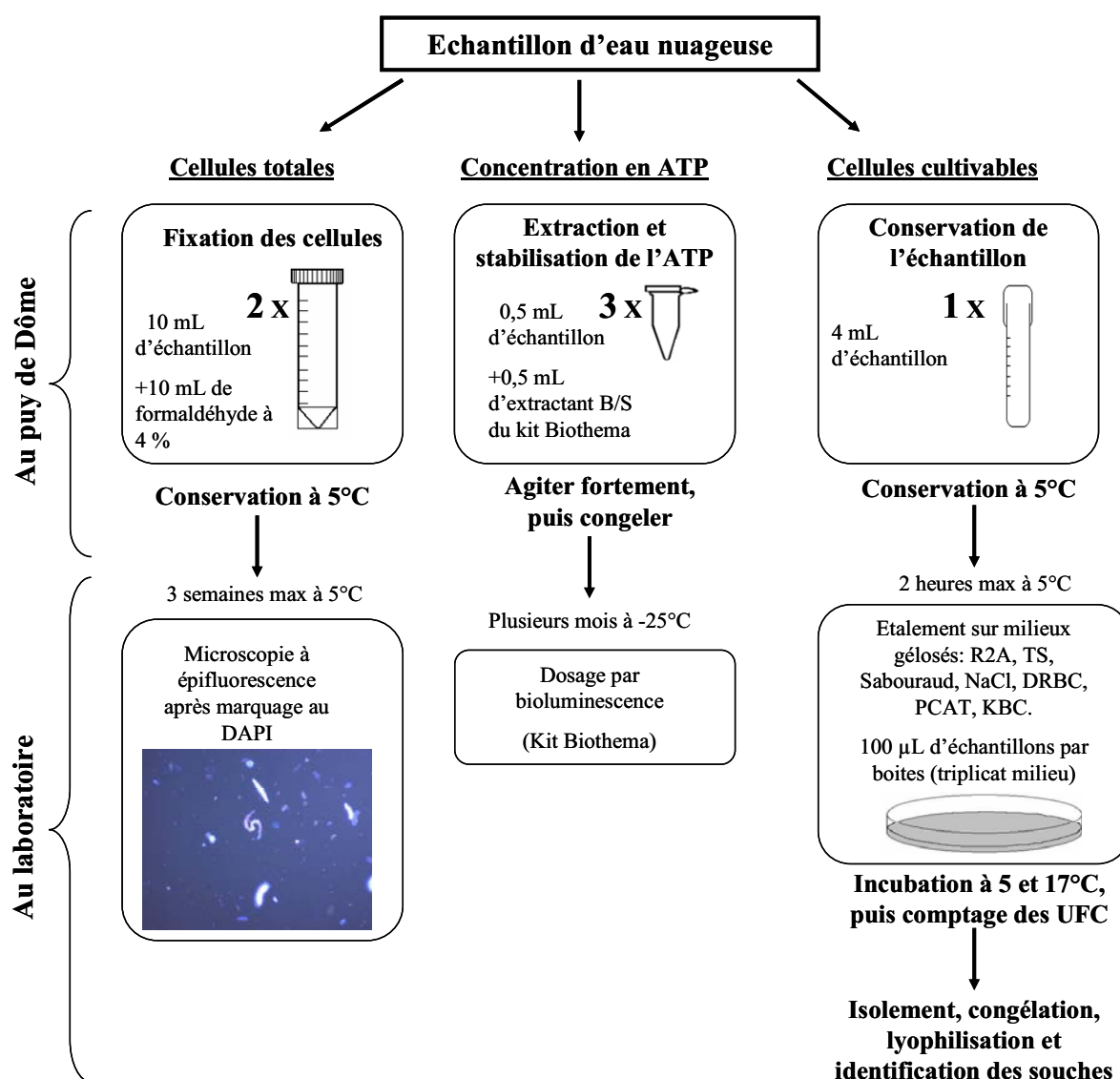
### ***II.1.1.2. Analyses biologiques***

Les analyses microbiologiques réalisées sur les échantillons d'eau nuageuse permettent de déterminer le contenu en cellules totales (viables et non-viables), la concentration en molécules d'ATP, le nombre de cellules cultivables sur différents milieux nutritifs solides et l'identification taxonomique des microorganismes isolés par culture.

Le prélèvement est réalisé en condition stérile afin d'éviter une contamination liée aux manipulations et aux manipulateurs. Les manipulations des échantillons d'eau nuageuse après collecte sont réalisées en conditions stériles : répartition des volumes à proximité de la flamme d'un bec bunsen pour les manipulations à la station du pdD, et sous une hotte à flux laminaire (poste de sécurité microbiologique) au laboratoire SEESIB. Tout le matériel en

contact avec les échantillons est stérile (tubes et microtubes, pipettes, cônes et anses de prélèvement, etc.); le port de gants stériles et d'un masque est indispensable pour le manipulateur (la respiration représente un risque important de contamination). Le mode opératoire et le matériel nécessaire lors de la collecte d'eau nuageuse sont détaillés en annexe IV.3.

Un volume minimum de 30 mL est nécessaire pour réaliser les mesures microbiologiques et celles du pH. Les analyses microbiologiques effectuées sur les échantillons d'eau nuageuse sont schématisées Figure II-5.



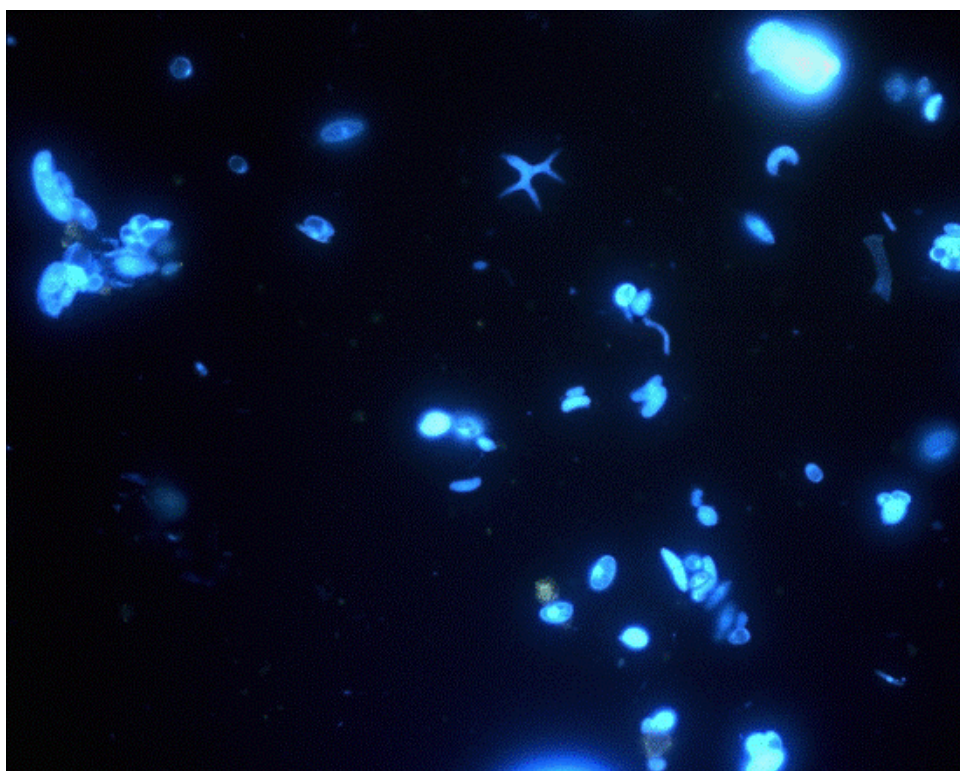
**Figure II-5 :** Schéma récapitulatif des mesures biologiques réalisées sur l'eau nuageuse récoltée ; les volumes d'échantillon utilisés sont également indiqués.

#### II.1.1.2.1. Dénombrement des cellules totales

Les échantillons d'eau nuageuse (en duplicat) sont fixés avec du formaldéhyde afin d'inhiber la multiplication des microorganismes et de conserver l'intégrité des cellules. Un volume de

10 mL d'échantillon est mélangé avec 10 mL d'une solution filtrée (porosité 0,22  $\mu\text{m}$ ) de formaldéhyde à 4% (v/v) tamponnée à pH 7 (tampon phosphate à 0,1 M). Le mélange est délicatement agité (sans utilisation du vortex, pour ne pas casser les biofilms, les filaments, etc.) et conservé au froid (5°C) sur une durée maximale de 3 semaines avant le dénombrement.

Peu de temps avant le comptage par microscopie à épifluorescence, les cellules sont marquées avec un intercalant de l'ADN : le DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindol (Porter and Feig, 1980)), à une concentration finale de 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  et incubées au noir durant 20 min à 20°C. Les échantillons sont ensuite filtrés sous vide à travers une membrane de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosité (filtre GTPB noir, 25 mm  $\varnothing$ ), les bactéries, champignons et levures restent à la surface du filtre. Ce filtre est ensuite observé au microscope sous lumière UV ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ), l'association ADN-DAPI fluoresce 20 fois plus que le fluorochrome seul, une lumière bleue est réémise après excitation ( $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ). Une illustration des observations en microscopie à fluorescence est présentée Figure II-6.



**Figure II-6 :** Vue au microscope ( $\times 945$ ) d'un filtre d'échantillon d'eau nuageuse marqué au DAPI.

Les cellules colorées en bleu par le DAPI sont les cellules vivantes et les cellules mortes non encore lysées (ADN non dégradé) au moment de la fixation par le formaldéhyde (Porter and Feig, 1980 ; Rebillard and Torre, 1993).

Les cellules observables sont comptabilisées par grille d'observation, les bactéries sont dénombrées avec un grossissement optique  $\times 945$ , et les champignons et levures sont dénombrées ensemble avec un grossissement optique  $\times 100$ . Il est souvent difficile de différencier les levures, les spores ou les fragments de champignon ; par conséquent, ce groupe de cellules microbiennes est dénombré ensemble. Avec la longueur d'onde utilisée ( $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ ), les cellules microbiennes marquées réémettent une lumière bleue, les particules inorganiques apparaissent en jaune et les cellules contenant des pigments chlorophylliens apparaissent en rouge.

#### II.1.1.2.2. Dosage de l'ATP

Le contenu en molécules d'ATP des cellules varie en fonction de leur activité métabolique ou physiologique. Afin de connaître sa concentration dans l'eau du nuage à l'instant du prélèvement, l'extraction et la fixation des molécules d'ATP est réalisée immédiatement après la récolte de l'eau nuageuse (en triplicat). Un volume égal d'échantillon et de solution d'extractant B/S du kit commercial Biothema<sup>®</sup> (ATP Biomass Kit HS), sont mélangés et fortement agité (1 min au vortex), puis le mélange est conservé sous congélation avant analyse.

Le dosage par bioluminescence est basé sur une réaction enzymatique entre l'ATP et la luciférine (Stanley and Williams, 1969 ; Lundin et al., 1986), selon la réaction suivante :



La lecture de l'intensité d'émission lumineuse est réalisée avec un luminomètre, le kit de mesure utilisé est d'une haute sensibilité. La concentration en ATP médiane mesurée par Amato et al. (2007c) dans des échantillons d'eau nuageuse est de  $0,37 \text{ pmol mL}^{-1}$ , cette valeur est supérieure à la limite de détection ( $2 \times 10^{-4} \text{ pmol mL}^{-1}$ ).

Le protocole est détaillé en annexe IV.4.

#### II.1.1.2.3. Cellules cultivables, isolement et identification des souches

Différents milieux de culture gélosés ont été utilisés au cours de cette étude : R2A (milieu oligotrophe<sup>12</sup>), TS (Trypcase soja, milieu généraliste), Sabouraud (milieu pour champignons), DRBC (Dichloran-Rose Bengal-Chloramphenicol, milieu sélectif des champignons, et

---

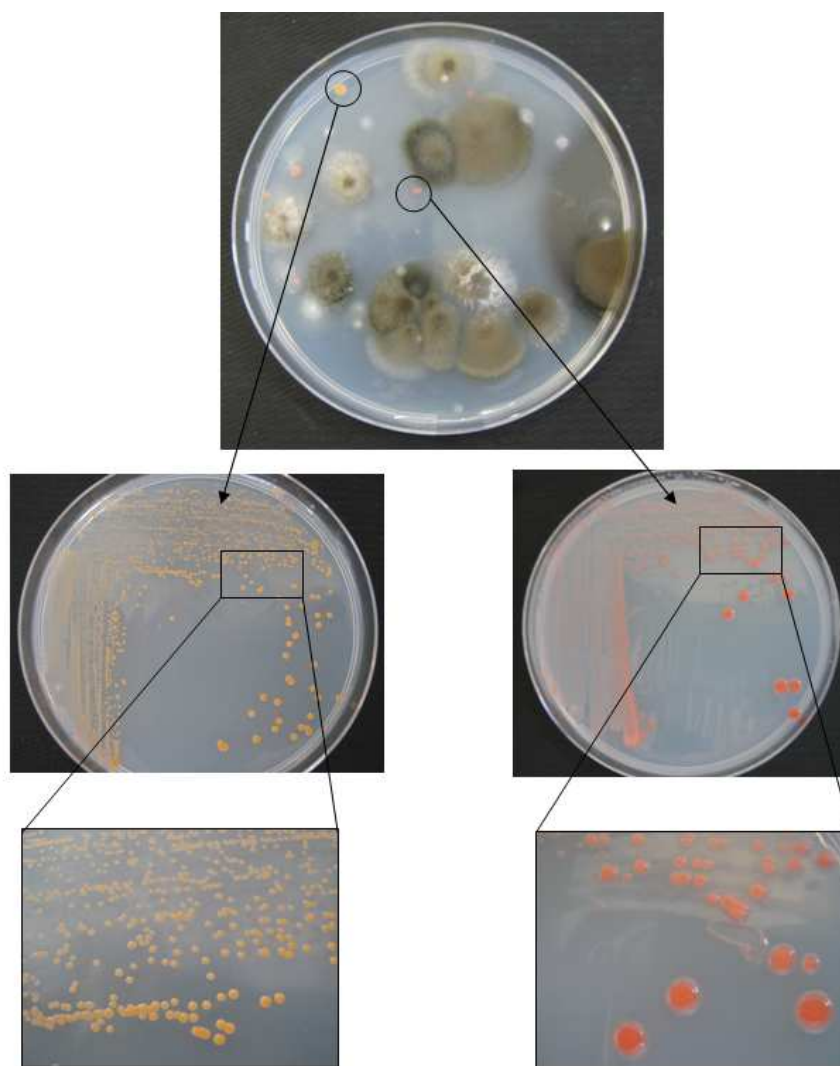
<sup>12</sup> Milieu pauvre en éléments nutritifs

permettant de limiter le diamètre des colonies), KBC (King B Cephalaxin, milieu sélectif des bactéries du genre *Pseudomonas*), R2A-NaCl (milieu privilégiant les souches issues des milieux marins).

L'échantillon d'eau nuageuse est placé après collecte dans un tube stérile et conservé à environ 5°C avant la mise en culture au laboratoire (< 2 h). La mise en culture est réalisée au laboratoire sous une hotte stérile, un volume de 100 µL d'eau nuageuse est étalé sur une boîte de pétri de chaque milieu de culture (en triplicat). Les milieux sont incubés en aérobiose et en absence de lumière à 5 et 17°C, le dénombrement des colonies (UFC : Unité Formant Colonie) est régulièrement effectué au cours de l'incubation (jusqu'à 2 mois pour les cultures à 5°C). Les concentrations en cellules cultivables sont exprimées en UFC mL<sup>-1</sup>. Les UFC de champignons sont comptées d'une part, tandis que celles de bactéries et de levures sont comptabilisées ensemble.

Au cours de notre étude nous avons isolé des colonies de bactéries et de levures, mais en raison de la difficulté de leur identification, les colonies de champignons n'ont pas été isolées. L'étape d'isolement est réalisée avant que les moisissures (champignons) ne recouvrent une grande partie des colonies de bactéries ou de levures, mais après un temps suffisamment long pour que la majorité d'entre-elles ait formé des colonies visibles (environ 2 semaines pour une incubation à 17°C et 6 semaines à 5°C). Une colonie est isolée du milieu initial de culture à l'aide d'une anse pasteur et étalée (par la technique dite de « l'épuisement ») sur un milieu R2A de façon à obtenir des colonies isolées (Figure II-7). Cette étape est répétée jusqu'à l'obtention d'une souche pure.





**Figure II-7** : Exemple de souches isolées à partir d'une culture d'eau nuageuse.

La souche isolée est ensuite mise en culture dans un milieu R2A liquide incubé à 17°C en aérobiose (200 rpm) durant 2 à 3 jours. Avant la conservation par congélation à -80°C, la culture liquide est incubée durant 15 min en présence de glycérol<sup>13</sup> stérile (concentration finale de 10% v/v) ; ensuite, plusieurs aliquots de 3 mL sont congelés (5 aliquots minimum). Plusieurs étapes sont nécessaires avant l'identification, il faut extraire l'ADN génomique, puis amplifier par PCR<sup>14</sup> la portion d'ADN codant pour les sous-unités 16S des ARN ribosomiques (pour les bactéries) et 26S (pour les levures). Puis l'ADN est purifié avant son envoi pour le séquençage. Par la suite, la séquence d'ADN obtenue est comparée avec les séquences d'ADNr 16S et 26S disponibles dans les banques de données en ligne, afin de retrouver les souches génétiquement apparentées ; le pourcentage de corrélation permet

<sup>13</sup> Le glycérol à un effet cryoprotecteur.

<sup>14</sup> PCR : Polymerase Chain Reaction



d'obtenir le genre et parfois l'espèce de la souche microbienne la plus proche. Le protocole détaillé de l'extraction à l'identification des souches est récapitulé en annexe IV.5.

## **II.1.2.Résultats**

### ***II.1.2.1.Valeurs brutes (2007-2010)***

Les analyses biologiques ont été réalisées sur 20 évènements nuageux indépendants, 14 de décembre 2007 à mars 2010 lorsque le chalet scientifique du pdD n'était pas disponible, et 6 de mai à septembre 2010 suite à la rénovation du chalet. Ces prélèvements s'inscrivent dans la continuité de ceux réalisés par Pierre Amato de mars 2003 à octobre 2005 (18 évènements présentés en annexe IV.1).

Le nombre relativement limité d'évènements nuageux échantillonnés ( $n = 20$ ) de 2007 à 2010, se justifie par les difficultés de prélèvements liées à l'indisponibilité du chalet : absence de local adapté, promiscuité, incidents suite aux chutes des impacteurs, défaillances de l'appareil de mesure du contenu en eau liquide, problèmes d'électricité, etc.

Les résultats des analyses biologiques ainsi que certaines caractéristiques physico-chimiques du nuage sont présentés dans le Tableau II-1.

Il n'a pas été possible de déterminer le pourcentage de cellules cultivables par rapport au nombre de cellules totales. En effet pour les cellules cultivables, le dénombrement se fait selon l'aspect des colonies et il n'est pas possible de différencier les colonies issues de bactéries de celles issues de levures. Le dénombrement des microorganismes cultivables différencie uniquement le nombre de colonies de champignons par rapport à l'ensemble bactéries plus levures. A l'inverse, les cellules totales sont dénombrées par microscopie à épifluorescence, et dans ce cas on comptabilise d'une part les cellules bactériennes et d'autre part l'ensemble levures plus champignons.

Echantillons d'eau nuageuse prélevés de décembre 2007 à septembre 2010 au sommet du puy de Dôme (1465 m.a.s.l.)																	
N° événement	Date	Heure	Origine	T°C	Etat de l'échantillon	LWC	pH	Cellules totales (cellules mL <sup>-1</sup> )		Cellules cultivables sur RZA (UFC mL <sup>-1</sup> )						ATP (pmol mL <sup>-1</sup> )	
								Bactéries	Champignons dont Levures	17°C		5°C		Bactéries et Levures	Champignons		Champignons
										Bactéries et Levures	Champignons	Bactéries et Levures	Champignons				
23	13/12/07	13:40 - 15:40	E	-6,5	gel		4,7			70	40	60	33	0,06			
24	17/01/08	12:00 - 14:00	O	-2,5	gel	0,5	5,9			57	523	27	247	0,43			
25	29/02/08	11:30 - 12:30	O	1,5	liq	0,2	5,2			60	227	57	50	0,30			
26	21/04/08	11:00 - 14:00	SO	2,8	liq	0,3	4,6	4,5E+04	1,07E+04	40	457	7	173	0,26			
27	09/10/08	10:50 - 11:30	NE	7,9	liq	0,1	5,0	1,7E+04	7,2E+03	153	530	113	440	0,24			
28	17/11/08	10:00 - 12:00	N	5	liq		5,4	3,2E+04	3,24E+04	7	680	27	597	0,21			
29	27/01/09	10:30 - 12:00	NO	-2	gel		6,5	3,3E+03	2,7E+03	4	113	10	90	0,30			
30	09/02/09	10:45 - 13:00	O	0	liq	0,3	4,9	3,3E+03	1,3E+03	13	80	7	4	0,02			
30'	24/02/09	10:30 - 12:30	N	0	gel	0,9	4,1	5,8E+04	8,4E+03	43	383	73	87	0,02			
31	30/03/09	10:15 - 12:00	NE	1	liq		4,0	6,8E+04	1,6E+03	20	107	7	67	0,01			
32	03/11/09	10:15 - 12:00	O	7	liq	0,3	5,2	2,2E+04	9,2E+02	176	360	133	307	0,19			
33	23/11/09	10:00 - 13:00	O	5,5	liq	0,4	5,8	3,8E+04	2,8E+03	13	58	20	447	0,15			
34	26/01/10	9:00 - 12:00	N	-5	gel		3,8	4,3E+04	1,0E+04	0	7	0	0	0,09			
35	31/03/10	10:00 - 12:00	O	-2	gel		5,5	4,9E+04	3,1E+03	103	537	70	467	0,33			
36	31/05/10	10:30 - 13:00	NO	10	liq		6,2	4,0E+04	9,6E+03	90	780	120	637	1,33			
37	01/06/10	20:20 - 02:30 (+1j)	NO	10	liq		6,1	2,8E+04	9,0E+03	60	457	53	560	0,20			
38	08/06/10	12:05 - 23:25	SO	13,5	liq		5,2	8,1E+04	2,6E+03	403	1023	357	450	0,95			
39	16/06/10	15:35 - 17:25	NE	9,5	liq		6,2	4,4E+04	2,2E+03	290	670	160	300	0,40			
40	18/06/10	11:15 - 07:00 (+1j)	NE	10	liq		3,9	8,9E+04	3,0E+03	86	1083	123	823	0,85			
41	16/09/10	8:25 - 16:45	O	11,5	liq	0,5	5,9	2,7E+04	4,5E+03	120	233	63	280	0,17			

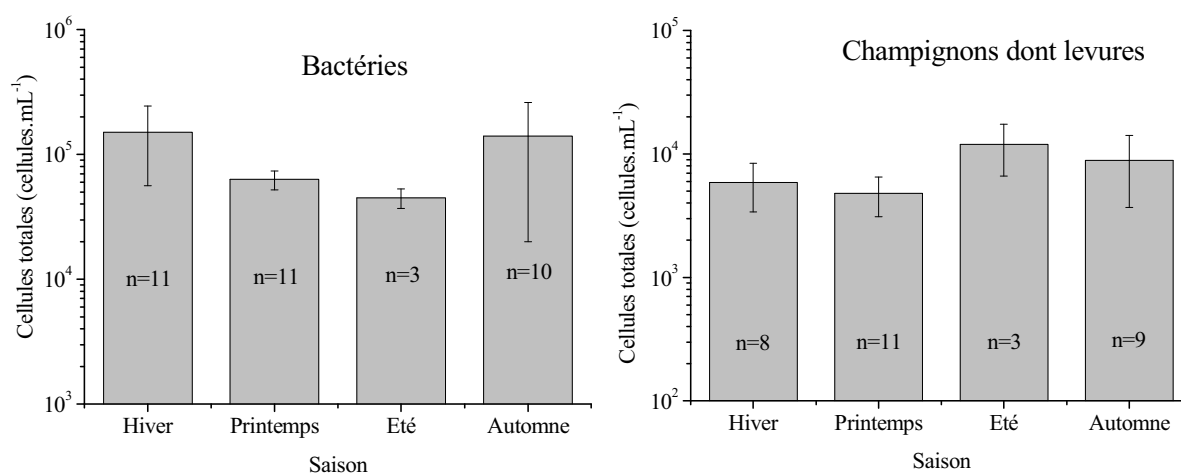
Tableau II-1 : Données microbiologiques et physico-chimiques mesurées dans les échantillons d'eau nuageuse prélevés de décembre 2007 à septembre 2010 au pdd

### II.1.2.2. Variabilité saisonnière (2003-2010)

L'ensemble des données biologiques issues des prélèvements nuageux de 2003 à 2010 est analysé en fonction de la saison. On dispose des analyses microbiologiques partielles ou totales, pour 38 évènements nuageux indépendants échantillonnés sur cette période ; les évènements sont numérotés jusqu'au n°41, mais il n'y a pas eu d'analyse biologique pour les évènements n°8, 9, 10 et 11.

Dans cette étude, nous avons considéré les quatre saisons dites « classiques » d'après les dates des solstices et des équinoxes, car les saisons météorologiques sont variables d'une année à l'autre. Nous avons échantillonné au total, 13 évènements en hiver, 11 au printemps, 3 en été et 11 en automne ; le faible nombre de prélèvements en été est lié au fait qu'il y a moins d'évènements nuageux durant cette période, et les quelques nuages effleurant le sommet du pdD sont souvent orageux.

La Figure II-8 présente les variations saisonnières observées pour le **nombre de cellules totales** en bactéries et en champignons (dont levures), pour les 35 évènements nuageux pour lesquels ces données sont disponibles.



**Figure II-8 :** Evolution saisonnière de la concentration en cellules bactériennes et fongiques totales d'échantillons d'eau nuageuse prélevés de 2003 à 2010.

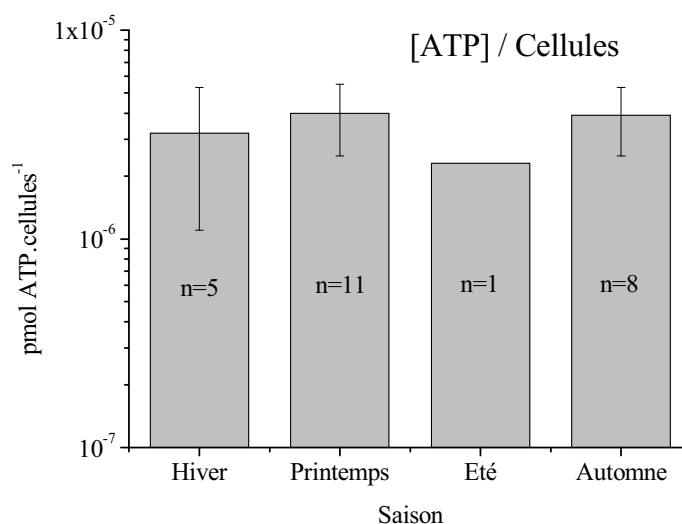
Il n'y a pas de différence saisonnière significative de la concentration en cellules bactériennes et fongiques totales dans les échantillons d'eau nuageuse prélevés de 2003 à 2010 ; cela confirme les premiers résultats d'Amato et al. (2007c) qui n'ont pas observé de tendance saisonnière sur la période de juin 2004 à octobre 2005.

Afin d'observer la variabilité de la **teneur en ATP** par cellule en fonction de la saison, nous avons utilisé la même approximation que Amato et al. (2007c) à savoir qu'une cellule

fongique possède 10 fois plus d'ATP qu'une cellule bactérienne. Le rapport R exprime le contenu en ATP par cellule bactérienne et fongique (exprimé en pmol ATP.cellules<sup>-1</sup>).

$$R = \frac{[\text{ATP}]}{[\text{bactéries}] + 10 \times [\text{champignons}]}$$

L'évolution moyenne de la concentration en ATP par cellule en fonction de la saison, pour les 25 évènements nuageux pour lesquels ces données sont disponibles, est présentée Figure II-9.



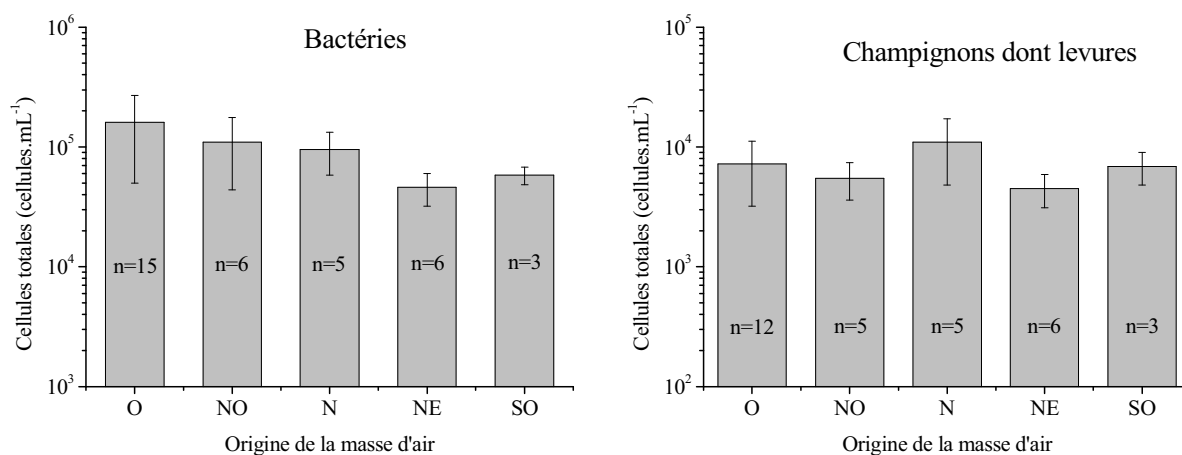
**Figure II-9 :** Evolution saisonnière du contenu en ATP par cellule bactérienne et fongique.

Le contenu en ATP par cellule bactérienne et fongique évolue peu en fonction de la saison, compte tenu des valeurs d'écart-type. Pour les 25 échantillons d'eau nuageuse dont on a calculé la concentration en ATP par cellule, on obtient une moyenne de  $3,9 \pm 1,6 \times 10^{-6}$  pmol ATP cellule<sup>-1</sup>. Pour des cellules de la bactérie *Escherichia coli* en phase de croissance, la concentration moyenne en ATP par cellule est estimée à  $3 \times 10^{-6}$  pmol ATP cellule<sup>-1</sup> (Franzen and Binkley, 1961). La valeur de référence considérée du kit de dosage d'ATP est de  $2 \times 10^{-6}$  pmol ATP cellule<sup>-1</sup>, notre rapport moyen de  $3,9 \times 10^{-6}$  pmol ATP cellule<sup>-1</sup> suggère donc que la majorité des cellules bactériennes et fongiques des échantillons d'eau nuageuse sont dans un état viable. Cette observation est en accord avec des travaux précédents de Bauer et al. (2002) et Amato et al. (2007c) sur l'estimation de la fraction de cellules viables dans l'eau nuageuse. La concentration médiane en ATP mesurée sur la totalité des échantillons d'eau nuageuse est de 0,29 pmol mL<sup>-1</sup> (pour 28 évènements), c'est une valeur proche de celle mesurée précédemment par Amato et al (2007c) de l'ordre de 0,37 pmol mL<sup>-1</sup> pour 8 évènements nuageux. Cependant, ces concentrations médianes ne peuvent être considérées comme des valeurs de référence, car l'étendue des valeurs est de 2,0 pmol mL<sup>-1</sup> (pour n=28).

### II.1.2.3. Variabilité en fonction de l'origine de la masse d'air (2003-2010)

Parmi les 38 événements nuageux étudiés, 17 proviennent de l'Ouest (O), 6 du Nord-Ouest (NO), 5 du Nord (N), 6 du Nord-Est (NE), 1 de l'Est (E) (correspondant au prélèvement n°23 pour lequel le contenu en cellules totales n'a pas été déterminé) et 3 du Sud-Ouest (S).

L'évolution du contenu cellulaire totale de l'eau nuageuse en fonction de son origine est présentée Figure II-10.

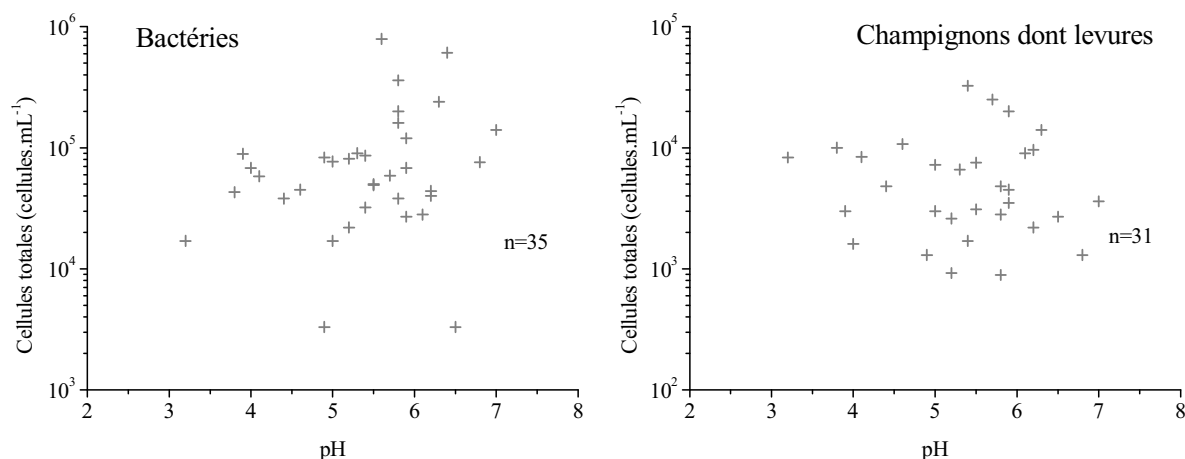


**Figure II-10** : Evolution saisonnière de la concentration en cellules bactériennes et fongiques totales dans les échantillons d'eau nuageuse prélevés de 2003 à 2010.

On n'observe pas de tendance du contenu en cellules totales de l'eau nuageuse en fonction de l'origine de la masse d'air nuageuse sur la période observée. On peut aussi indiquer qu'il n'y a pas de tendance en fonction de l'influence océanique, continentale ou urbaine de la masse d'air nuageuse.

### II.1.2.4. Corrélation entre les paramètres microbiologiques et physico-chimiques (2003-2010)

Dans une précédente étude de notre équipe, une faible corrélation ( $r^2=0,62$ ) entre la concentration en cellules bactériennes totales et le pH de l'eau nuageuse avait été observée. La concentration en cellules était plus importante dans les eaux nuageuses proches de la neutralité que dans celles avec un pH acide (Amato et al., 2007c). En réalisant la même comparaison sur la totalité des événements de 2003 à 2010, on n'observe plus de corrélation (voir Figure II-11).



**Figure II-11** : Concentration totale en cellules bactériennes et fongiques de l'eau nuageuse en fonction du pH, pour des échantillons collectés de 2003 à 2010 au pD.

L'absence de corrélation sur toute la période étudiée (2003-2010) entre le pH de l'eau nuageuse et sa concentration en cellules, peut s'expliquer par un changement de mode opératoire. Depuis 2007, la fixation des cellules microbiennes des échantillons d'eau nuageuse est effectuée avec une solution de formaldéhyde tamponnée (pH 7). Lors de tests préliminaires sur 2 échantillons d'eau nuageuse (événements indépendants) dont les valeurs de pH initiales étaient aux alentours de 5, nous avons dénombré au moins 50% de cellules bactériennes en plus dans les échantillons fixés avec des solutions de formaldéhyde tamponnées à pH 7, par rapport aux échantillons non tamponnés. Pour un pH neutre, l'efficacité relative de la fluorescence des cellules marquées au DAPI semble optimale, ce qui rend les petites cellules plus facilement visibles par l'expérimentateur. L'ajout de solution tampon lors de la fixation au formaldéhyde des cellules de l'eau nuageuse élimine l'erreur de mesure liée au pH de l'eau nuageuse.

D'autre part, le contenu cellulaire total de ces échantillons n'est pas corrélé à la teneur en Carbone Organique Total (COT), ni au Contenu Ionique Total (CIT) de l'eau nuageuse (valeurs disponibles sur le site web de l'OPGC). Et en ce qui concerne les concentrations en ATP par cellule bactérienne ou fongique, aucune corrélation n'a été observée avec les paramètres suivants : pH de l'eau nuageuse, température lors du prélèvement (ni d'effet du gel lors de l'impaction), le COT et le CIT. Cela suggère que la proportion de cellules viables dans l'eau nuageuse, n'est pas corrélée aux caractéristiques physico-chimiques du milieu. Ces conclusions doivent être validées en continuant les observations à long-terme à la station du puy de Dôme : grâce au nouveau chalet, les prélèvements pourront s'intensifier ce qui rendra encore plus robuste l'analyse des résultats et des corrélations.

### ***II.1.2.5.Souches isolées de l'eau de nuage (2007-2010): Identifications taxonomiques***

L'isolement de souches microbiennes a été réalisé sur la plupart des échantillons nuageux (17 sur 20). 348 souches microbiennes hétérotrophes<sup>15</sup> aérobies ont été isolées à partir des milieux de culture à 5 et 17°C, dont 184 (55%) bactéries et 150 levures (45%); 14 souches (moins de 5% du total) ont été perdues avant purification et identification.

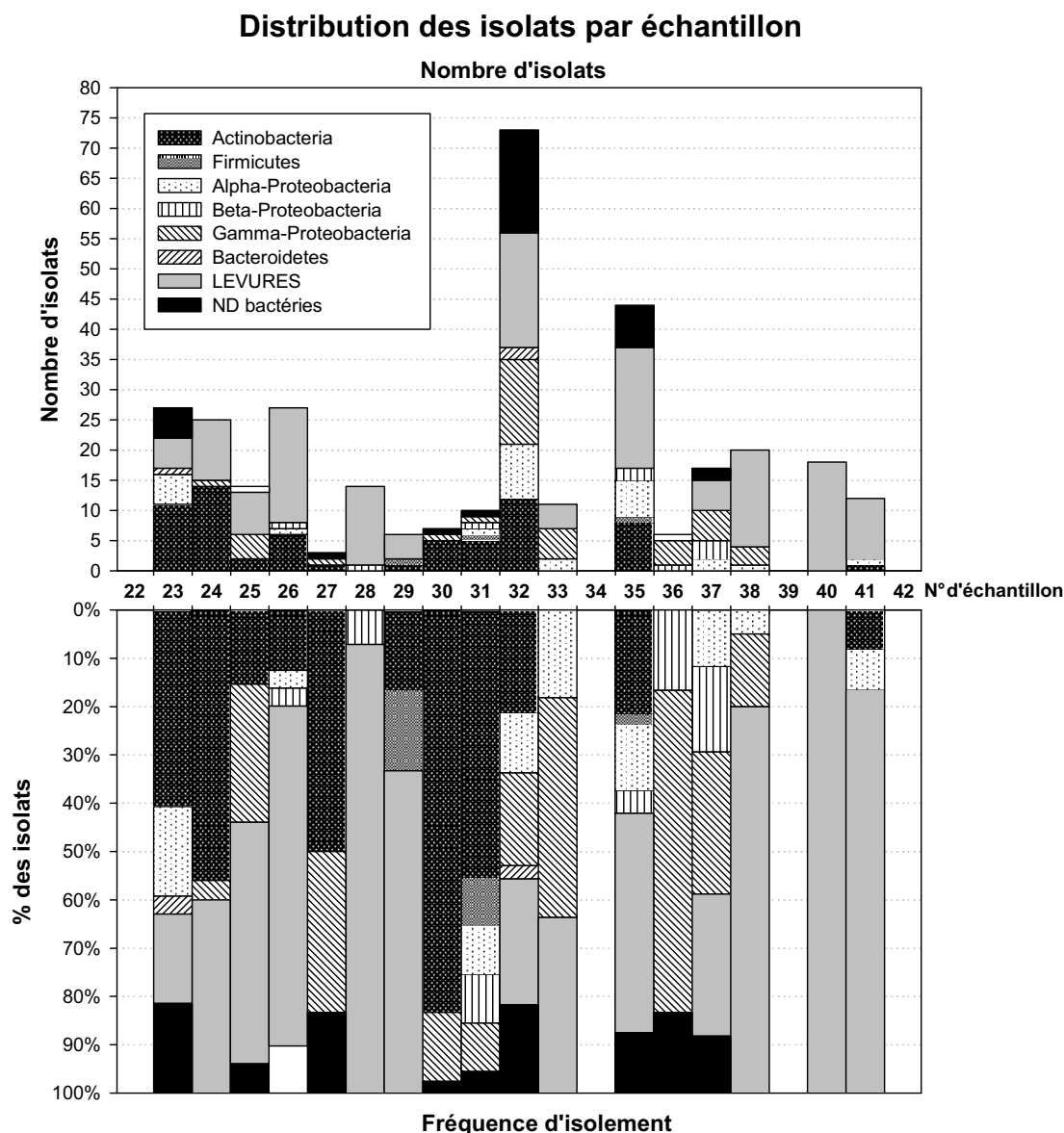
Les 334 souches de bactéries et de levures isolées au cours de cette thèse viennent enrichir la collection de souches microbiennes du service de microbiologie du laboratoire SEESIB géré par Martine Sancelme, et s'ajoutent aux 157 souches précédemment isolées de culture d'eau nuageuse (dont 89 de bactéries, 16 de levures et 52 de champignons).

Les souches sont conservées à -80°C et également sous forme lyophilisée. Les souches sont numérotées de la manière suivante : par exemple 23b- 1, le premier chiffre (23) correspond au n° de l'évènement nuageux et le dernier chiffre (1) au n° de l'isolat pour cet évènement. Le travail d'identification des souches a été réalisé au laboratoire par Nicolas Gañani, Pierre Amato et Eléonore Attard.

Les isolats ont été identifiés par confrontation de la séquence ADN de leur gène codant pour l'ARNr 16S (bactéries, ~1500 bp) ou 26S (levures ; ~600 bp) (BLAST) avec les séquences de la banque GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Les séquences ADN correspondantes ont été soumises à la banque GenBank, elles sont identifiées sous la forme « PDD-23b-1 » par exemple pour la souche 23b-1. Les différents groupes taxonomiques identifiés, pour chaque évènement sont présentés dans la Figure II-12.

---

<sup>15</sup> Se dit d'un organisme qui assimile des substances organiques pour vivre et qui est incapable de produire ces substances organiques à partir de matière minérale. Par opposition, aux organismes autotrophes (photosynthétique, etc.)



**Figure II-12:** Distribution des groupes taxonomiques isolés de chaque échantillon d'eau nuageuse collecté de 2007 à 2010 (17 évènements).

On peut noter chez les bactéries une bonne représentativité des Actinobacteria, des Alpha- et Gamma-Proteobacteria, présents dans 10 échantillons sur 17 ; des levures sont présentes dans 13 des 17 échantillons et constituent parfois la totalité des souches isolées. Sur la période 2007-2010, aucune corrélation entre la présence de différents groupes particuliers et les saisons, ou l'origine des masses d'air nuageuses n'a été mise en évidence.

#### **II.1.2.6. Souches isolées de l'eau de nuage (2007-2010) : genres microbiens majeurs**

Les genres les plus fréquemment rencontrés dans nos échantillons, avec nos conditions de culture (aérobiose, 5 et 17°C), sont les suivants, par ordre décroissant :

- *Pseudomonas* (Gamma-Proteobacteria ; 22 isolats ; présents dans 9 prélèvements/17) ;

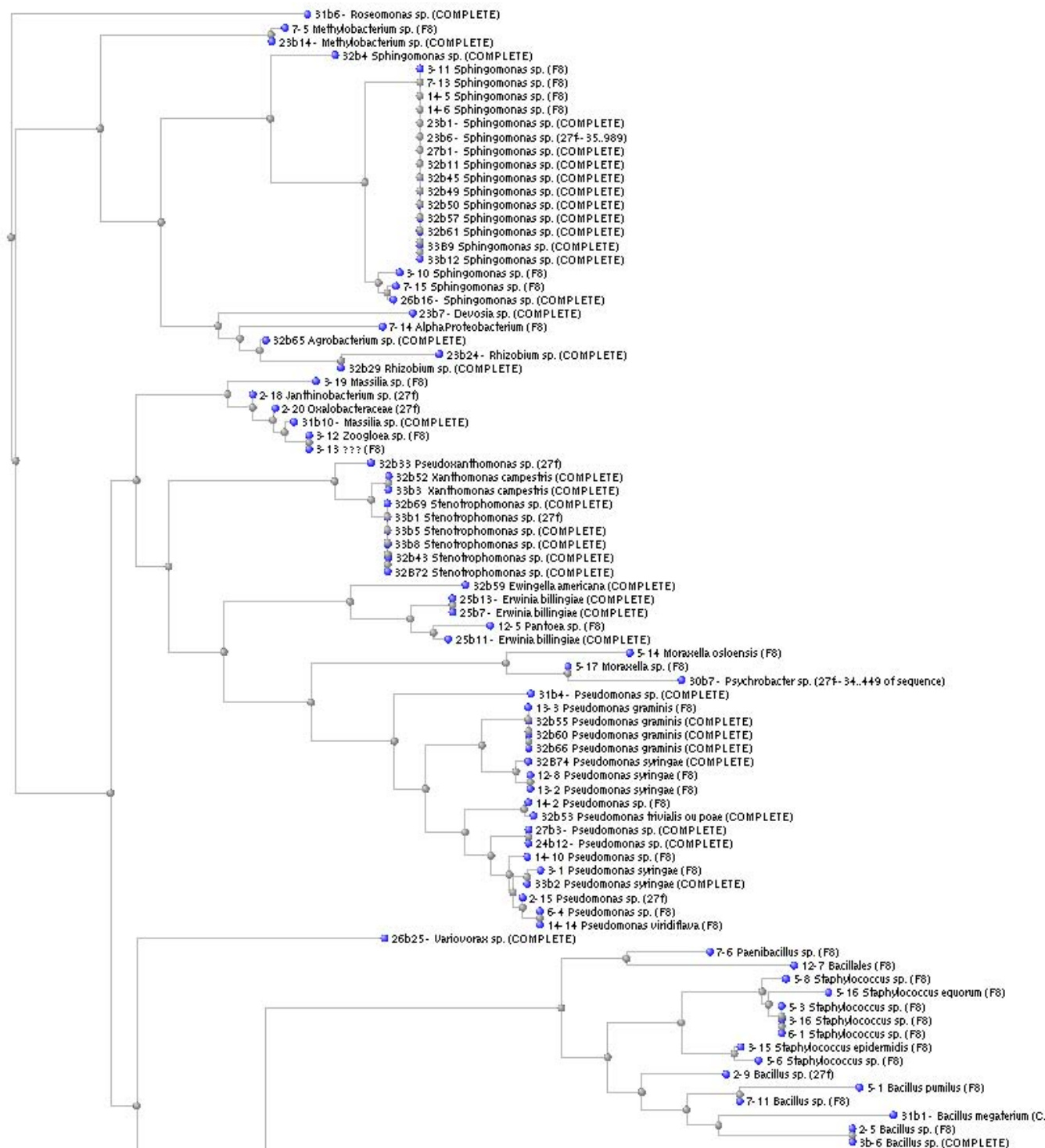


- *Sphingomonas* (Alpha-Proteobacteria ; 20 isolats ; présents dans 8 prélèvements/17) ;
- *Dioszegia* (levure ; 20 isolats ; présents dans 6 prélèvements/17) ;
- *Udeniomyces* (levure ; 14 isolats ; présents dans 6 prélèvements/17) ;
- *Rhodococcus* (Actinobacteria ; 16 isolats ; présents dans 7 prélèvements/17) ;
- *Streptomyces* (Actinobacteria ; 11 isolats ; présents dans 4 prélèvements/17).

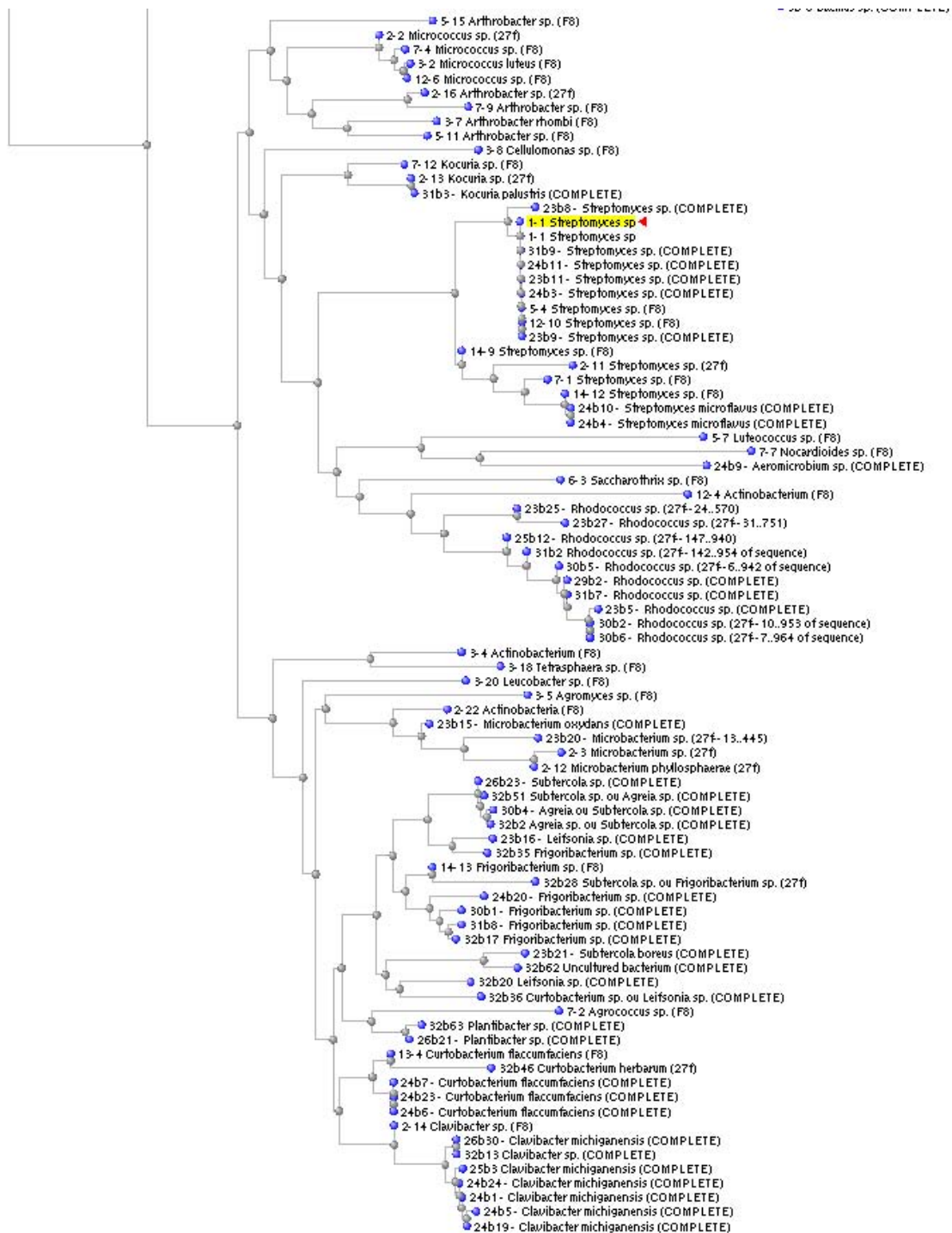
D'autres genres sont aussi fréquemment rencontrés, mais moins bien représentés : *Clavibacter*, *Frigoribacterium*, *Stenotrophomonas*, ou encore *Cryptococcus* pour les levures.

#### **II.1.2.7. Arbre phylogénétique des souches bactériennes isolées de l'eau de nuage (2003-2010)**

L'arbre phylogénétique présenté Figure II.13 et II.14 regroupe toutes les souches bactériennes issues de l'eau nuageuse collectée au sommet du puy de Dôme ; cet arbre a été réalisé par Pierre Amato à partir des séquences d'ADNr 16S avec l'outil de construction d'arbres de GenBank, enraciné avec la souche «1-1 *Streptomyces* sp.». L'arbre phylogénétique est donné de manière indicative ; il illustre la taxonomie relative des souches bactériennes isolées des échantillons de nuages.



**Figure II-13:** Arbre phylogénétique indicatif illustrant la taxonomie relative des souches bactériennes isolées des échantillons de nuages. Arbre réalisé à partir des séquences ADN du gène codant pour l'ARNr 16S avec l'outil de construction d'arbres de GenBank, enraciné avec la souche « 1-1 *Streptomyces* sp. ».



**Figure II-14 :** Suite de l’arbre phylogénétique indicatif illustrant la taxonomie relative des souches bactériennes isolées des échantillons de nuages.

Dans la banque de séquences GenBank, le milieu environnemental depuis lequel a été isolée la souche correspondante est généralement rapporté. La dominance des groupes communément associés à la végétation parmi les plus proches voisins taxonomiques des souches que nous avons isolées atteste que le couvert végétal représente vraisemblablement

une source importante de bioaérosols microbiens. Cela avait déjà été suggéré par nos résultats accumulés sur la période 2003-2006, la compilation des résultats sur la période 2003-2010 renforce cette constatation d'une origine majoritaire des microorganismes de la phyllosphère dans l'eau de nuage.

Les genres *Pseudomonas* souvent pathogènes ou commensaux de végétaux sont fréquemment isolés d'échantillons atmosphériques. Certaines de ces souches présentent la propriété intéressante d'initier la formation de la glace ; on parle alors de noyaux glaçogènes ou Ice Nuclei (IN) (Morris et al., 2008). Bien que suspectée d'après l'observation de précipitations, la présence d'organismes glaçogènes dans les nuages n'avait pas encore été rapportée. Des recherches portant sur l'implication d'une telle caractéristique au niveau de la formation des nuages et l'apparition de précipitations ont été menées au sein du laboratoire. Certaines des souches isolées de l'eau nuageuse ont montré une activité glaçogène importante, notamment celles des genres *Pseudomonas* et *Erwinia*. Par exemple, la souche *Pseudomonas syringae* (32b-74) possède une activité glaçogène supérieure à celle de la référence expérimentale couramment utilisée : le Snomax® (une poudre bactérienne lyophilisée servant à la fabrication de neige artificielle).

La production de biosurfactants par les isolats microbiens issus de l'eau nuageuse, est également en cours d'étude. La présence de biosurfactants<sup>16</sup> peut affecter les propriétés de surface de l'eau nuageuse et influencer sur la taille des gouttes en abaissant la tension de surface de l'eau, en altérant l'hygroscopicité des particules et en modifiant la limite de sursaturation de l'eau (Sun et al., 2010). Les premiers résultats montrent que parmi les isolats microbiens de l'eau nuageuse, environ un tiers des 120 souches testées produisent des biosurfactants. Cette observation est concordante avec les travaux d'autres équipes, et montre que l'implication des microorganismes dans la microphysique du nuage peut être plus importante que celle actuellement considérée (Sun and Ariya, 2006 ; Ahern et al., 2007 ; Möhler et al., 2007 ; Ekström et al., 2010).

N'étant pas directement impliqué sur les aspects de la production de biosurfactants et de propriétés de nucléation de la glace, ces sujets ne seront pas plus développés.

---

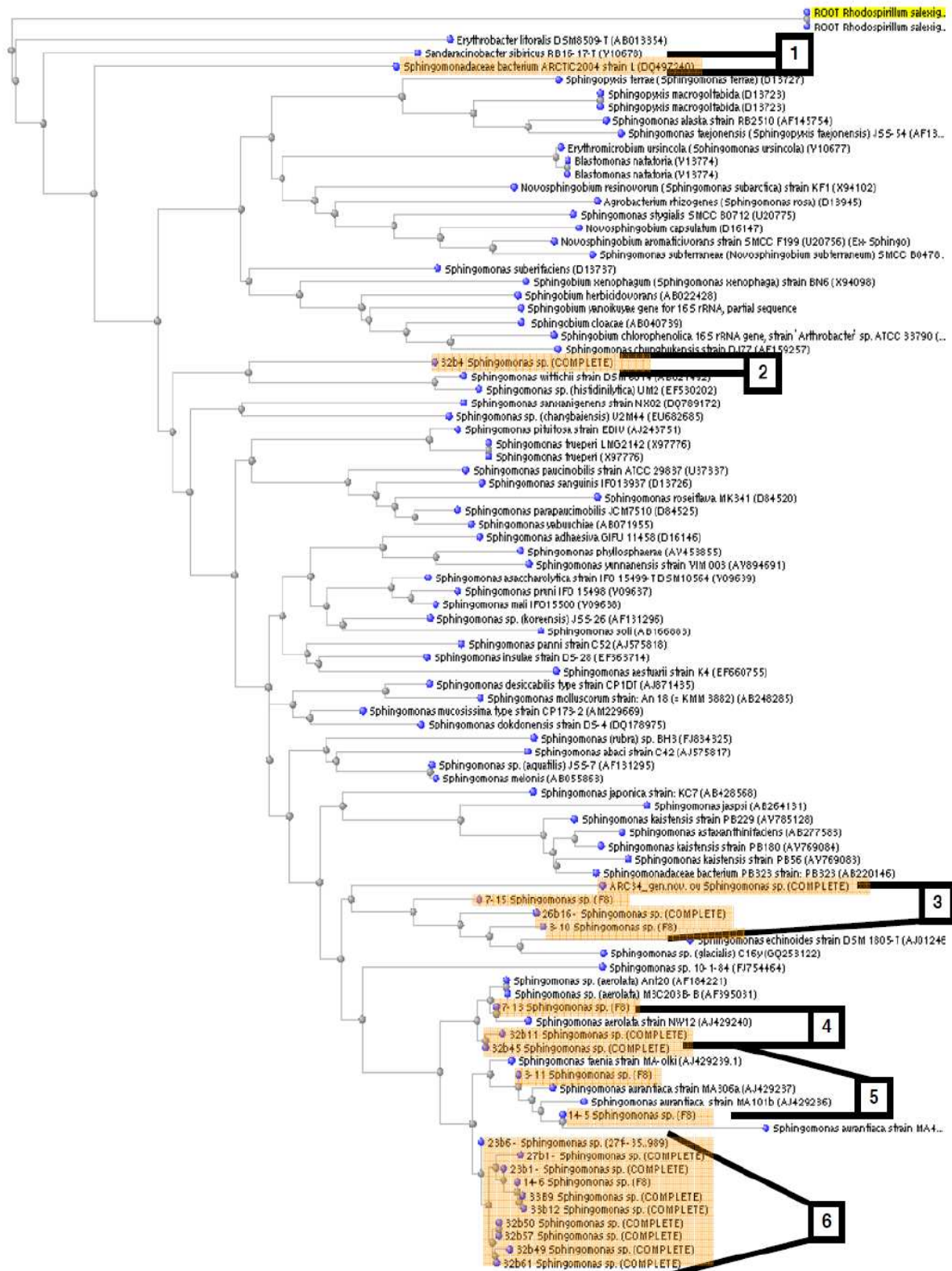
<sup>16</sup> Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par certains microorganismes, soit à leur surface soit à l'extérieur de la cellule.

#### ***II.1.2.8. Les souches du genre *Sphingomonas* : particularité***

Le genre *Sphingomonas* appartient aux Alpha-Proteobacteria, il regroupe des bactéries épiphytes<sup>17</sup> décrites pour la première fois en 1990 (Yabuuchi et al., 1990). Les souches appartenant à ce genre sont généralement pigmentées (orange vif) et capables de se développer à basse température. La représentativité importante de *Sphingomonas* à la fois dans les nuages et dans les milieux polaires (Christner et al., 2001) suggère une capacité particulière de ce genre à survivre dans des conditions extrêmes. Il semble que certaines souches de ce genre soient en fait particulièrement inféodées au milieu atmosphérique, comme le montre l'arbre phylogénétique présenté Figure II-15.

---

<sup>17</sup> Les bactéries épiphytes sont des bactéries qui se développent sur les végétaux.



**Figure II-15:** Arbre phylogénétique indicatif suggérant l'existence de groupes de *Spingomonas* particulièrement affiliés à l'atmosphère. Les souches isolées des nuages et de neige sont surlignées en orange. La souche ARC34 (groupe 3) a été isolée de neige arctique (Spitzberg) en 2010. La souche DQ497240 (groupe 1) a été isolée de neige arctique (Spitzberg) en 2004. L'ensemble des autres séquences proviennent de la banque GenBank et ont été choisies pour couvrir l'ensemble des sous groupes connus du genre *Spingomonas*.

Les 21 souches de *Sphingomonas* issues de cultures d'eau nuageuse et les 2 souches issues de neige provenant de l'île de Spitzberg en Arctique, peuvent être réparties en 6 sous-groupes arbitraires:

- le groupe 1, (vraisemblablement nouveau genre) dans lequel on trouve la souche isolée de l'Arctique en 2004 (94% d'homologie de séquence avec *Sandaracinobacter sibiricus* (Y10678) (Amato et al., 2007b) ;
- le groupe 2, (vraisemblablement nouvelle espèce) qui contient la souche 32b-4 (97% d'homologie de séquence avec le plus proche voisin) ;
- le groupe 3, (vraisemblablement *S. glacialis*) regroupant 3 souches des nuages (3b10, 7b15 et 26b10) et la souche ARC34 isolées de neige d'Arctique en 2010 (par Anne-Marie Delort lors de la campagne ARFAC) ;
- le groupe 4, (vraisemblablement *S. aerolata*), regroupant 3 souches des nuages (7b4, 32b4 et 32b45);
- le groupe 5, (vraisemblablement *S. faenia* ou *S. aurantiaca*), regroupant 2 souches des nuages (3b11 et 14b5);
- le groupe 6 regroupant 10 souches des nuages et formant un cluster d'espèces vraisemblablement *faenia* ou *aurantica* bien spécifique. Il pourrait s'agir d'un groupe particulièrement adapté aux conditions du nuage qui n'a pas encore été décrit.

Il est intéressant de constater que les espèces *aurantiaca*, *aerolata* et *faenia* (groupes 4, 5 et 6) ont été décrites en 2003 depuis des échantillons d'air et de glace en Antarctique (Busse et al., 2003). Il semble donc que ce groupe de souches du genre *Sphingomonas* soit particulièrement affilié au milieu atmosphérique. A l'avenir, on s'intéressera particulièrement aux souches du genre *Sphingomonas* afin de comprendre la survie microbienne dans le milieu nuageux.

### II.1.3. Conclusions

Des analyses microbiologiques de l'eau nuageuse ont été effectuées pour 20 événements nuageux indépendants collectés au sommet du puy de Dôme de 2007 à 2010. Ces mesures concernaient la détermination des concentrations en cellules microbiennes et en ATP de l'eau nuageuse, ainsi que les identifications taxonomiques des souches isolées de ce milieu. L'ensemble des données microbiologiques de l'eau nuageuse acquises au cours de cette thèse et de celle de Pierre Amato (2003-2007) sur un même site de prélèvement (puy de Dôme), avec 38 événements nuageux (de 2003-2010) constitue un relevé d'information conséquent dans le domaine de l'aérobiologie.

Le contenu total en cellules microbiennes dans l'eau nuageuse est en moyenne de l'ordre de  $1 \times 10^5$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  pour les bactéries et de  $1 \times 10^4$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  pour les champignons (dont levures). Les mesures de la concentration en ATP indiquent que la majorité des cellules microbiennes de l'eau du nuage peuvent être dans un état viable (valeur moyenne d'environ  $4 \times 10^{-6}$  pmol ATP cellule<sup>-1</sup>). Sur la période d'étude concernée (i.e. 8 ans), on n'observe pas de tendance saisonnière, ni de variation significative en fonction de l'origine de la masse d'air du contenu total en cellules bactériennes et fongiques de l'eau nuageuse. Ces observations permettent de considérer des valeurs « modèles » en concentrations microbiennes peu variables, ceci est un point important pour définir les différents scénarios nuageux étudiés lors d'étude de modélisation et/ou de laboratoire.

En comparant les données sur le nombre de cellules totales et les concentrations en ATP de l'eau nuageuse avec les données physico-chimiques (pH, COT, contenu total en ions), on ne constate pas de corrélations entre la « viabilité » des microorganismes et les paramètres abiotiques au sein de la phase aqueuse du nuage.

A partir de culture d'eau nuageuse, des souches de bactéries et de levures ont été isolées (334 souches) et identifiées. Parmi les isolats, certains phyla sont prépondérants, comme les phyla Actinobacteria et Beta-Proteobacteria. Sur l'ensemble des souches isolées de culture d'eau nuageuse (~500 souches de 2003 à 2010), les genres les plus fréquemment rencontrés chez les bactéries sont : *Pseudomonas*, *Sphingomonas* et *Rhodococcus*, et chez les levures : *Dioszegia* et *Udeniomyces*.

Les nouveaux isolats microbiens récoltés ont enrichi la collection de souches issue de l'eau nuageuse. Cette collection permet d'évaluer, *via* des expériences de laboratoire, l'implication des microorganismes dans le système nuageux. Du point de vue de la microphysique et du cycle de vie du nuage, ces souches sont étudiées pour leurs propriétés glaçogènes et leur capacité à produire des biosurfactants. Concernant la chimie atmosphérique, ces souches permettent d'étudier le potentiel de biotransformation des composés chimiques présents dans l'eau nuageuse afin de pouvoir évaluer leur rôle potentiel dans la chimie atmosphérique.

La caractérisation biologique de l'eau nuageuse doit se poursuivre afin d'avoir une étude plus étendue dans le temps pour infirmer ou confirmer les observations actuelles. L'ajout de nouvelles mesures biologiques est nécessaire afin de mieux déterminer les états physiologiques et la caractérisation taxonomique des microorganismes présents dans l'eau nuageuse. Les mesures complémentaires pouvant être ajoutées aux études déjà effectuées sont :

- la détermination de la charge énergétique via les dosages de l'ATP, l'ADP et de l'AMP ;



- l'utilisation de nouveaux marqueurs pour discriminer les cellules viables des non-viables ;
- l'utilisation de techniques de biologie moléculaire pour une caractérisation taxonomique des souches microbiennes non cultivables dans nos conditions.

## **II.2. Biotransformation de composés organiques : souches pures / substrat unique**

Dans de précédents travaux réalisés par notre équipe, les pourcentages de biodégradation et de bioproduction de composés organiques après 24 heures d'incubation à 27°C (et parfois à 17°C) ont été déterminés pour environ 60 souches (Amato et al., 2005 ; Amato et al., 2007a). Ces études ont montré le potentiel de biotransformation des souches microbiennes issues de la phase aqueuse du nuage vis-à-vis des composés organiques présents dans ce même milieu. L'objectif de ces travaux était d'évaluer le potentiel métabolique des microorganismes du nuage, et non pas de déterminer des vitesses de biotransformation extrapolables aux conditions réelles observées dans la phase aqueuse du nuage.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer d'une manière quantitative la contribution des microorganismes dans la chimie atmosphérique comparée aux processus photochimiques directs ou indirects. Ce chapitre présente les premières approches expérimentales et théoriques utilisées pour atteindre ce but.

Les trois objectifs de ce chapitre sont :

- De déterminer les vitesses de biodégradation à 5 et 17°C de composés organiques présents dans l'eau nuageuse en présence de souches microbiennes isolées du même milieu.
- D'observer la présence de métabolites suite à la biotransformation des composés organiques.
- De comparer les vitesses de biodégradation des composés organiques obtenues expérimentalement, avec les vitesses de dégradation de ces mêmes composés en présence des radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{NO}_3\cdot$  à partir de données de la littérature.

Dans ce travail, les conditions expérimentales sont contrôlées, afin de se rapprocher des conditions relevées en milieu naturel. Pour cela, les expériences sont réalisées avec des concentrations initiales en composés chimiques et en cellules microbiennes déterminées ; les vitesses de biotransformation seront ainsi exprimées en fonction du nombre de cellules microbiennes, ce qui permettra une extrapolation aux conditions réelles du nuage. La température est également un paramètre sensible et nos expériences sont menées à des températures proches de celles communes aux nuages de basse altitude soit 5°C, mais aussi à

17°C qui représente une valeur haute mesurée dans un nuage au sommet du puy de Dôme (<http://www.observatoire.univ-bpclermont.fr/SO/mesures/pdd.php>).

Les expériences de biotransformation sont effectuées à partir de cultures microbiennes pures inoculées dans des solutions contenant un ou plusieurs composés organiques. Les composés organiques étudiés sont choisis en fonction de leur représentativité dans la phase aqueuse du nuage et sont les suivants : formiate, acétate, succinate, L-lactate, D-lactate, oxalate, formaldéhyde et méthanol.

Afin d'évaluer la contribution des microorganismes sur le bilan des composés organiques au sein de la goutte d'eau nuageuse, nous avons choisi de comparer ces processus de biotransformation à la réactivité des radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{NO}_3\cdot$  avec ces mêmes composés. Ces deux radicaux sont les oxydants abiotiques majoritaires dans la phase aqueuse de l'atmosphère, respectivement le jour et la nuit (Barth, 2006 ; Herrmann et al., 2010).

Les résultats de ces expériences sont présentés sous la forme de deux publications : une publiée en 2010 (*Appl. Environ. Microbiol.*), et la suivante en cours de révision (*Atmos. Environ.*).

## **II.2.1. Matériel et Méthodes**

Une partie du matériel et du mode opératoire utilisés pour les expériences est présentée dans ce chapitre, en complément des informations indiquées de manière brève dans les publications.

### ***II.2.1.1. Préculture microbienne en milieu nutritif***

Les souches isolées de l'eau nuageuse sont conservées à -80°C en présence de 10% de glycérol (cryoprotecteur) sous forme d'aliquots de 3 mL.

On ensemence 2 mL de la souche pure décongelée (inoculum) dans 100 mL de milieu R2A liquide placé dans un erlenmeyer stérile de 250 mL fermé par un bouchon cotonné qui évite les contaminations microbiologiques, tout en laissant passer l'air. Les milieux de culture sont placés dans un incubateur à la température choisie sous agitation à 200 rotations par minute (rpm).

La pureté de la souche est contrôlée au niveau de l'inoculum et de la culture par la technique d'épuisement (voir Figure II-7). Ce contrôle est effectué à chaque transfert de souche.

Les pré-cultures sont utilisées pour inoculer les milieux dans lesquels on souhaite déterminer les vitesses de biotransformation.

### ***II.2.1.2. Etalonnage de la population bactérienne***

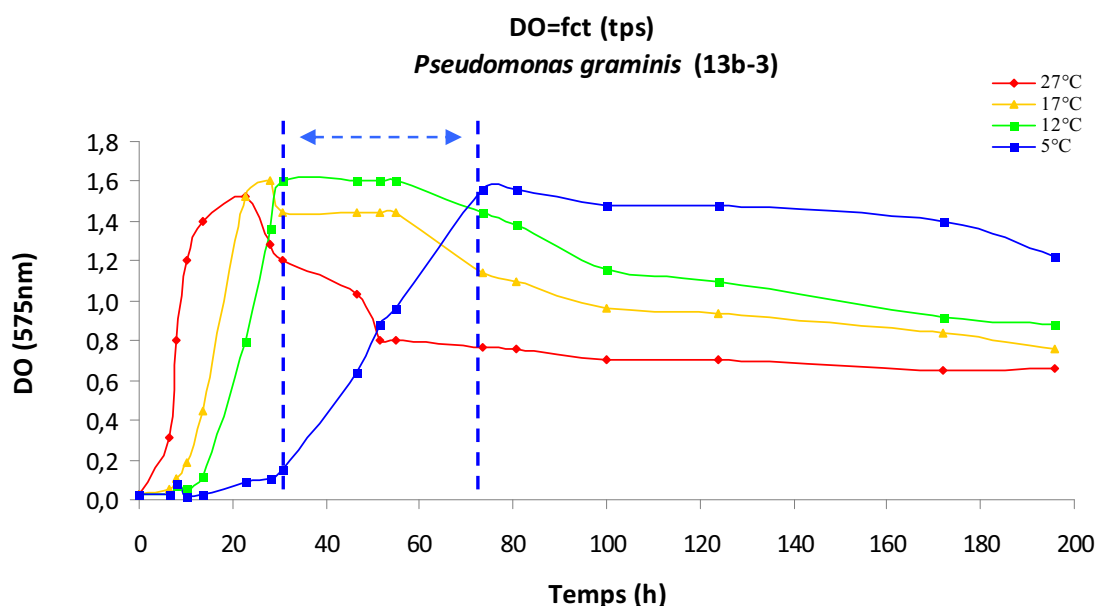
La méthode des « dilutions successives » permet d'évaluer le nombre de microorganismes cultivables présents dans la culture, mais cette technique ne permet l'obtention des résultats qu'après plusieurs jours d'incubation. En combinaison avec une méthode d'évaluation rapide comme la lecture de la densité optique (DO) à 575nm, on peut avoir une estimation rapide de la concentration en microorganismes de la préculture. Pour cela il est nécessaire d'effectuer une courbe d'étalonnage pour chaque souche étudiée, liant la valeur de DO avec la concentration en microorganismes viables et cultivables déterminée par la technique des dilutions successives.

#### ***II.2.1.2.1. Mesure de la densité optique à 575 nm***

La concentration en microorganismes (cellules viables et non viables, débris cellulaires) d'un milieu de culture est proportionnelle à sa turbidité. On utilise un spectrophotomètre, dans lequel on place une cuve en plastique de 1 cm de trajet optique contenant 1 mL de suspension bactérienne, la lecture de la DO s'effectue à 575 nm.

### II.2.1.2.2. Détermination de la phase de croissance exponentielle

La période d'incubation durant laquelle la croissance cellulaire est en phase exponentielle est déterminée pour chaque souche testée, dans les conditions de culture prédéfinies. Durant la phase exponentielle de croissance la majorité des cellules du milieu sont viables, métaboliquement actives et dans un état physiologique identique. Un exemple d'évolution de la densité optique du milieu de préculture en fonction de la durée d'incubation pour la souche bactérienne *Pseudomonas graminis* (13b-3) cultivée à différentes températures est présenté Figure II-16.



**Figure II-16 :** Evolution de la turbidité du milieu de préculture en fonction du temps pour chaque température d'incubation. Les traits bleus en pointillés délimitent la phase de croissance exponentielle pour la préculture à 5°C.

### II.2.1.2.3. Méthodes des dilutions successives

La méthode des dilutions successives permet, après l'étalement sur milieu gélosé d'une suspension bactérienne diluée, d'évaluer le nombre de bactéries viables formant une colonie par volume de préculture (exprimé en UFC mL<sup>-1</sup> ; Unité Formant Colonie).

On prépare une préculture de la souche microbienne choisie dont la période de croissance exponentielle des cellules a été déterminée, puis on prélève régulièrement du milieu de préculture:

- 2 × 1 mL pour mesurer la DO (575nm),
- 2 × 1 mL pour réaliser des dilutions décimales successives.

On dilue l'échantillon brut dans du NaCl 8‰ stérile, par des dilutions décimales successives (jusqu'à 10<sup>-9</sup> selon la valeur de la DO). On étale ensuite ces dilutions sur milieux R2A gélosés

100µL qui seront incubés à 17°C. Les colonies formées sont dénombrées plusieurs fois entre 24 et 72 h d'incubation ; les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies sont considérées pour estimer le nombre d'UFC des milieux d'incubation, voir Figure II-17.

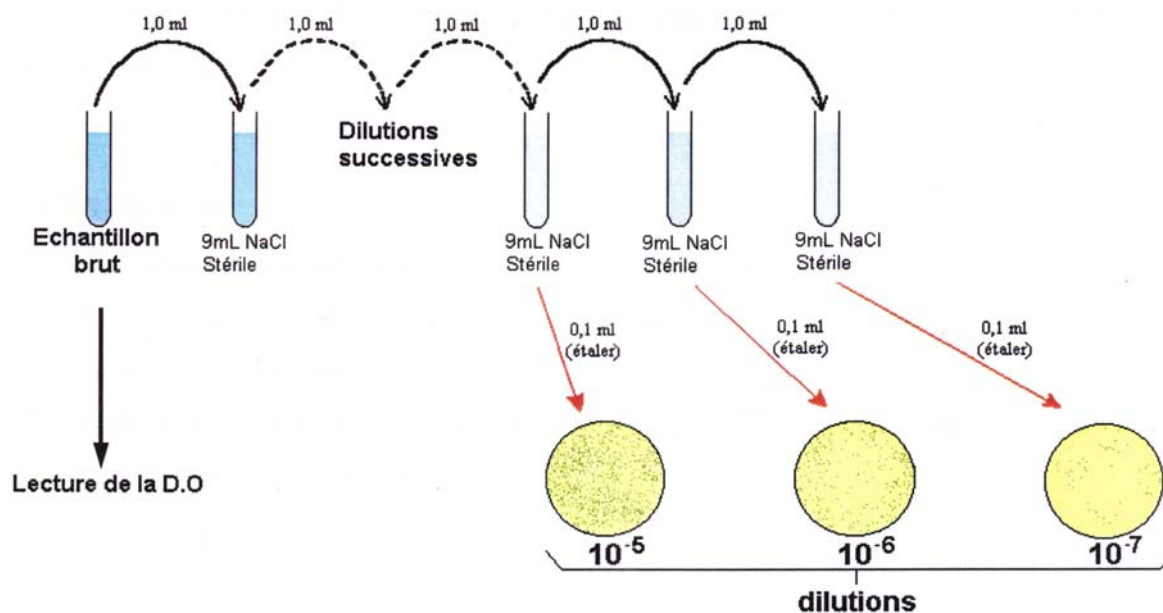


Figure II-17 : Schéma de la technique des dilutions successives.

On calcule la concentration en cellules cultivables ( $N_{Cellules}$ ) du milieu par la formule

suivante :

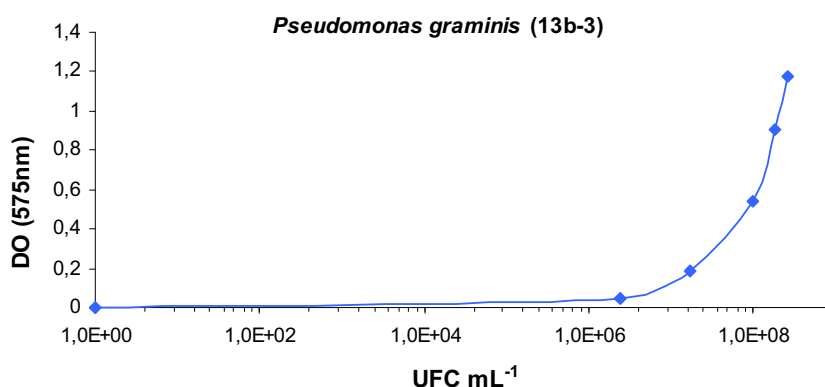
$$N_{Cellules} = \frac{n}{V \times F_d} \quad [\text{UFC mL}^{-1}]$$

Avec  $n$  le nombre moyen de colonies par boîte,  $F_d$  le facteur de dilution de la culture étalée (de  $10^{-3}$  à  $10^{-9}$ ) et  $V$  le volume de culture étalée (mL).

#### II.2.1.2.4. Courbe de calibration

A l'issue des étapes précédentes, on obtient une courbe de calibration qui permettra, après la mesure de la DO, de se rapprocher de façon optimale de la concentration cellulaire souhaitée.

Un exemple de courbe d'étalonnage est présenté Figure II-18.



**Figure II-18 :** Courbe de calibration de la concentration cellulaire du milieu de préculture en fonction de la densité optique ( $\lambda=575$  nm), pour la souche *Pseudomonas graminis* (13b-3).

### II.2.1.3. Incubation

La préculture estensemencée 18, 24 ou 36 heures avant son utilisation, afin que les cellules soient en phase exponentielle de croissance au moment de l'inoculation des milieux « test ». Les milieux tests sont préalablement stérilisés et conservés à 5°C, 30 min avant le début de l'expérience les solutions à tester sont réparties dans des erlenmeyers stériles (100 mL dans un erlenmeyer de 250 mL) et placées dans des incubateurs à 5 et 17°C sous agitation (200 r.p.m.).

Puis, les manipulations suivantes sont effectuées :

- Prélever et mesurer la DO (575nm) de la culture,
- Déterminer la concentration cellulaire à partir de la courbe de calibration,
- Prélever le volume de préculture nécessaire,
- Centrifuger (4000×g, 5°C, 15 min) et éliminer le surnageant,
- Reprendre le culot dans le milieu à tester,
- Répéter les deux opérations précédentes,
- Inoculer les milieux à tester et homogénéiser.

Des prélèvements de 1 mL sont effectués 5 min avant l'inoculation et à différents temps définis ( $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48$  et 72h). Les prélèvements sont centrifugés (13000×g, 2°C, 4 min) afin de séparer les cellules du surnageant, puis le surnageant est conservé à -25°C jusqu'à l'analyse chimique par chromatographie ionique ou par RMN (protocole décrit dans les publications). Un milieu stérile (témoin abiotique) est toujours incubé dans les mêmes conditions que les milieux tests. Pour tous les témoins utilisés, il n'y a pas eu de modification

des concentrations chimiques de plus ou moins 10% pour le temps maximal d'incubation testé (120h).

Deux types de milieux d'incubation ont été utilisés : les milieux appelés « substrat unique » et les milieux « nuage artificiel ». Les milieux dits « substrat unique » contiennent un seul composé organique dans une solution de tampon phosphate 0,1M à pH 7 ; les composés testés pour ce type de milieu sont : Formiate, acétate, succinate, L-lactate, D-lactate, formaldéhyde et méthanol.

Les milieux dits « nuage artificiel » sont des solutions qui contiennent les 4 acides carboxyliques ainsi que les 8 composés inorganiques majeurs retrouvés dans l'eau de nuage collectés au pdD (Marinoni et al., 2004 ; Charbouillot et al., 2011). Bien que le terme « nuage artificiel » soit utilisé, nous précisons qu'il s'agit de milieux **liquides**. Le Tableau II-1 présente la composition des deux milieux « nuage artificiel » mimant la composition chimique des nuages sous influence continentale et marine, ainsi que les valeurs minimales et maximales des concentrations en ions majeurs mesurées dans l'eau nuageuse collectée au pdD.

Composés	Milieux " nuage artificiel "		Eaux nuageuses échantillonnées au puy de Dôme (1465 m a.s.l.) (Marinoni et al., 2004 ; Charbouillot et al., 2011)	
	Marin	Continental	Min	Max
	Concentrations (µM)			
Acétate	20	20	0,6	48,7
Formiate	15	15	0,8	71,4
Succinate	1,5	1,5	0,1	4,1
Oxalate	3	3	0,1	17,4
Cl <sup>-</sup>	320	250	0,5	1948,9
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	70	200	3,4	766,8
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	35	50	1,9	369,5
Na <sup>+</sup>	310	250	0,4	681,0
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	70	200	6,3	1801,7
K <sup>+</sup>	10	10	0,1	124,1
Mg <sup>2+</sup>	10	10	0,2	45,6
Ca <sup>2+</sup>	40	40	0,3	74,8
pH	6 - 6,5	4,7 - 5,2	3,9	7,6

**Tableau II-2 :** Composition chimique des milieux dits « eau de nuage artificielle », et des valeurs de concentrations minimales et maximales mesurées dans des échantillons d'eau nuageuse prélevés au sommet du puy de Dôme.



#### **II.2.1.4. Analyses chimiques**

##### **II.2.1.4.1. RMN $^1H$**

Le dosage des acides carboxyliques et du méthanol dans les milieux « substrat unique » est effectué par la RMN du proton. Ce type d'analyse permet de détecter de nombreux composés en simultané et dans certains cas de pouvoir les identifier.

Avant l'analyse, il est nécessaire de préparer une solution de triméthylsilyl-propionate deutéré (TSPd<sub>4</sub>) dans de l'eau lourde (D<sub>2</sub>O), la concentration en TSPd<sub>4</sub> doit être identique à la concentration initiale du composé organique dans la solution « substrat unique ». Cette solution qui sert de référence interne doit être utilisée à une concentration environ 10 fois moindre que celle du composé à doser.

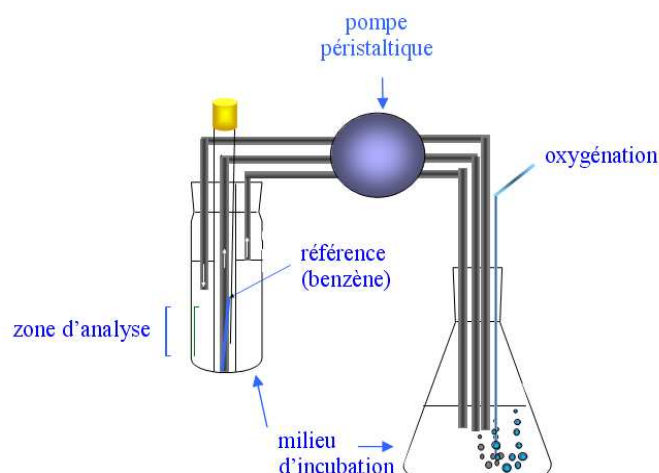
Un volume de 450  $\mu$ L d'échantillon est mélangé avec 50  $\mu$ L de la solution de TSPd<sub>4</sub>, le pourcentage finale en D<sub>2</sub>O dans le mélange est donc de 10%. Le mélange est introduit dans un tube d'analyse de 5 mm de diamètre, puis analysé. Le D<sub>2</sub>O est ajouté à l'échantillon pour permettre d'asservir le champ magnétique (lock) et de régler son homogénéité (shim).

Les analyses sont effectuées sur un spectromètre Bruker Avance 400 avec un passeur automatique d'échantillons. On utilise un programme de présaturation de l'eau « zgpresat » en ajustant le nombre de scans à 32. Les paramètres d'analyse sont les suivants : fréquence d'acquisition 400,13 MHz ; largeur spectrale 4789,2 Hz ; pulse 45° ; 65,536 points ; temps d'acquisition de 6,84 min. Les spectres sont intégrés avec le logiciel Topspin version 2.0.

##### **II.2.1.4.2. RMN $^{13}C$ *in vivo***

Le formaldéhyde ne peut être dosé par la RMN  $^1H$  car son signal est masqué par le pic de l'eau, c'est pour cette raison que nous avons utilisé du  $^{13}C$ -formaldéhyde qui peut être analysé par la RMN du  $^{13}C$  carbone. Les métabolites produits lors de la biotransformation du  $^{13}C$ -formaldéhyde seront observables par cette technique.

Le milieu d'incubation (avec les cellules) circule entre un erlenmeyer dans lequel s'effectue l'oxygénation et le tube RMN de 10 mm de diamètre placé dans le spectromètre, la circulation est assurée par une pompe péristaltique (Chorao et al., 2009). Le schéma descriptif du dispositif est présenté Figure II-19. L'erlenmeyer contenant le milieu de culture est plongé dans un bain-marie à 17°C et le débit de la pompe est de 20 mL min<sup>-1</sup>. Le milieu d'incubation « substrat unique » dans ces expériences contient 10% de D<sub>2</sub>O.



**Figure II-19** : Schéma du système de périfusion mis en place pour réaliser la RMN  $^{13}\text{C}$  *in vivo* (Chorao et al., 2009).

Les analyses sont effectuées sur un spectromètre Bruker Avance 500. Un capillaire contenant du benzène est placé au centre du tube RMN, c'est la référence interne pour la calibration des déplacements chimiques (128.39 ppm relatif au TMS (trimethylsilane)). Les paramètres d'analyse sont les suivants : nombre de scan : 1000 ; durée du pulse à  $30^\circ$  :  $20 \mu\text{s}$  ; délai de relaxation : 1s ; temps d'acquisition : 0,14 s ; largeur spectrale 30303 Hz ; séquence de découplage du  $^1\text{H}$  Waltz-16 . Les spectres sont intégrés avec les logiciels Topspin version 2.0. ou X-Win NMR.

#### II.2.1.4.3. Chromatographie ionique

Les analyses des milieux « nuage artificiel » sont réalisées par chromatographie ionique, car cette technique permet à la fois l'analyse des ions organiques et inorganiques avec des seuils de détection suffisants (voir Tableau II-3).

Deux appareils de chromatographie ionique Dionex© ont été utilisés :

- *anion* : DX 320, colonne AS 11, supprimeur ASRS, éluant : KOH,
- *cation* : ICS 1500, colonne CS 12, supprimeur CRSR, éluant : acide hydroxyméthylsulfonate.

Les fortes concentrations en ions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  dans les milieux « nuage artificiel » peuvent représenter un risque de saturation de la colonne de séparation. Par conséquent, les échantillons sont dilués avec de l'eau ultrapure (résistivité  $\geq 18,2 \text{ M}\Omega$ ).

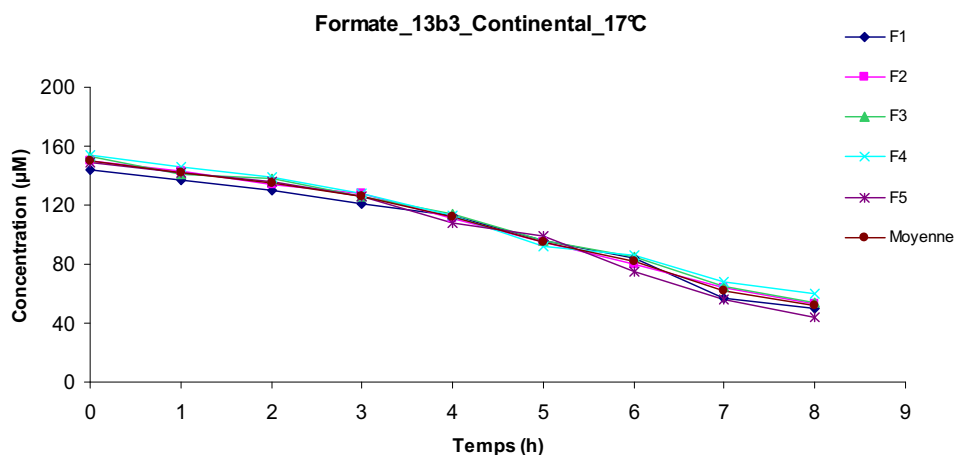
Composés	Limites de détection (µM)
Acétate	0,004
Formiate	0,007
Succinate	0,013
Oxalate	0,004
Cl <sup>-</sup>	0,046
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,006
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,002
Na <sup>+</sup>	0,180
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,209
K <sup>+</sup>	0,054
Mg <sup>2+</sup>	0,104
Ca <sup>2+</sup>	0,273

**Tableau II-3 :** Limite de détection pour les principaux ions étudiés par chromatographie ionique.

Les échantillons à analyser sont décongelés à température ambiante moins de 30 min avant d’être dilués ; les vials d’analyse sont préalablement rincés à l’eau ultrapure avant leur utilisation. Le gradient d’éluant en ions HO<sup>-</sup> utilisé dans la colonne de séparation des anions, permet une bonne séparation des ions organiques et inorganiques, pour une durée d’analyse totale de 28,5 min par échantillon.

### II.2.1.5. Détermination des vitesses de biotransformation

Lorsqu’un composé organique est dégradé ou produit, sa cinétique de biotransformation s’exprime en mol cellules<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Un exemple de transformation du formiate dans une solution « nuage artificiel » de type « continental » en présence de la souche bactérienne *Pseudomonas graminis* (13b3) lors d’une incubation avec 5 réplicats est présenté dans la Figure II-20.

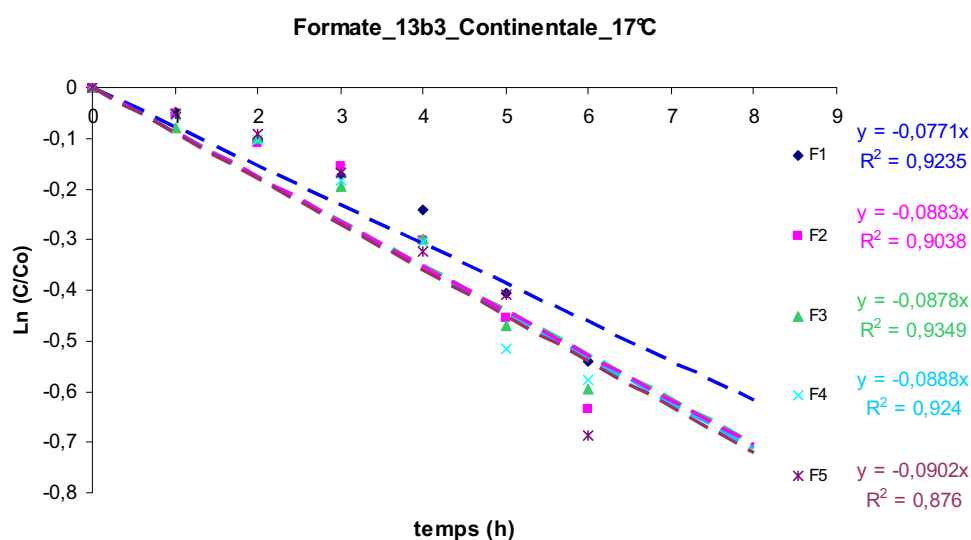


**Figure II-20 :** Evolution de la concentration en formiate lors de l’incubation à 17°C du milieu artificiel nuage « continental » en présence de la souche *Pseudomonas graminis* (13b3), les mesures sont réalisées par chromatographie ionique pour 5 réplicats.

Les expériences d'incubation sont réalisées avec un ratio (concentration de composés organiques) / (concentration cellulaire) proche de celui rencontré dans l'eau nuageuse.

Pour la détermination des vitesses de biotransformation, on détermine la constante de vitesse de pseudo-ordre 1 «  $k$  », de la manière suivante :  $\ln(C/C_0) = f(t) = -k \times t$

Par exemple, par la transformation graphique des courbes présentées Figure 1-4 avec la formule précédente, on obtient les coefficients «  $k$  » déterminés graphiquement par une droite de régression linéaire (voir Figure II-21).



**Figure II-21** : Détermination graphique des constantes de vitesse de pseudo-ordre 1 (pente de la droite  $\ln(C/C_0) = f(t)$ )

Ensuite on détermine la vitesse de biotransformation dans les conditions expérimentales par le calcul suivant :  $V = (k \times [C]_0) / N_{Cellules}$  [mol cellules<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>]

Avec  $[C]_0$  la concentration initiale du composé  $C$  (mol L<sup>-1</sup>),  $k$  le coefficient de vitesse (s<sup>-1</sup>) et  $N_{Cellules}$  la concentration cellulaire dans le milieu d'incubation (cellules L<sup>-1</sup>).

Les incertitudes expérimentales sont difficiles à déterminer pour nos expériences de biotransformation en raison de l'utilisation de matériel biologique vivant. L'activité métabolique des cellules microbiennes dépend de nombreux facteurs, comme par exemple « l'état physiologique » des souches lors de la préculture, le stress induit lors des étapes de centrifugation et de lavage, mais aussi « l'âge moyen » des cellules.

Pour une même préculture microbienne utilisée à un instant donné, l'incertitude expérimentale sur la valeur de biotransformation est variable selon les composés testés. Par exemple, on a 10% d'incertitude relative pour la vitesse de biodégradation du formiate par la souche *Pseudomonas graminis* (13b3) à 17°C pour 5 réplicats (Figure II-20 et Figure II-21).

Par contre pour le même type d'expérience réalisé à des jours différents, et donc avec des précultures différentes, l'écart entre les vitesses de biotransformation est plus grand. Pour 5 expériences indépendantes réalisées avec la souche *Pseudomonas graminis* (13b3) incubée à 17°C dans le milieu nuage « continental », les incertitudes relatives des vitesses de biodégradations du formiate, de l'acétate et du succinate sont respectivement de 42%, 34% et 36%.

Ces variations dues à l'utilisation de matériel biologique vivant sont classiques, et déterminer les incertitudes sur la mesure des vitesses de biotransformation pour chacune des souches testées est difficilement réalisable. Par exemple, pour déterminer les incertitudes expérimentales pour 3 réplicats dépendants et 3 indépendants, 6 semaines sont nécessaires par souche et par milieu testé. Dans notre cas d'étude, nous avons choisi de diversifier le nombre de souches testées pour se rapprocher le plus possible de la variabilité en espèces microbiennes de l'eau nuageuse réelle. De plus, les états énergétiques des microorganismes présents dans les milieux naturels sont variables et dépendent de nombreux facteurs environnementaux. Les incertitudes sur ces grandeurs devront toutefois être considérées par les modélisateurs qui souhaiteraient simuler les processus de biodégradation. Ils devront considérer les valeurs extrêmes obtenues et effectuer des tests de sensibilité.

## II.2.2. Résultats

### 2.2.1. Biotransformation d'acides carboxyliques, publication AEM 2010

La première publication parue au journal « *Applied and Environmental Microbiology* » en 2010 concerne les résultats suivants :

- Les vitesses de biodégradation en substrat unique à 5 et 17°C, du formiate, de l'acétate, du succinate, du L- et D-lactate pour 4 souches bactériennes et une souche de levure.
- Les vitesses de biodégradation dans le milieu « nuage artificiel » contenant le formiate, l'acétate, le succinate et l'oxalate en mélange en présence d'une souche bactérienne à 5 et 17°C.
- La comparaison entre les vitesses de biodégradation des composés organique obtenues expérimentalement dans le milieu « nuage artificiel » et les vitesses de dégradation théoriques par voies radicalaires de ces même composés par les radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{NO}_3\cdot$ . Pour cela, nous avons utilisé des constantes de réaction de ces radicaux avec les molécules organiques et des concentrations « typiques » de ces radicaux issues de la littérature. Cette dernière comparaison permet d'évaluer la contribution relative de l'activité microbienne face aux réactions radicalaires effectives la nuit et le jour.

*Les collègues ayant contribué à la partie expérimentale sont :*

*- P. Amato pour les expériences en substrat unique qui sont présentées dans le Tableau 1 de la publication.*

## Contribution of Microbial Activity to Carbon Chemistry in Clouds<sup>∇</sup>

Mickaël Vaïtilingom,<sup>1,3</sup> Pierre Amato,<sup>1,2</sup> Martine Sancelme,<sup>1</sup> Paolo Laj,<sup>3,†</sup>  
Maud Leriche,<sup>4,5</sup> and Anne-Marie Delort<sup>1,2,\*</sup>

Clermont Université, UBP, Laboratoire SEESIB, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France<sup>1</sup>; CNRS, UMR 6504, F-63177 Aubière, France<sup>2</sup>; Clermont Université, UBP, LaMP, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France<sup>3</sup>; Laboratoire d'Aérodologie, Université Paul Sabatier, Observatoire Midi-Pyrénées, 14 Avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France<sup>4</sup>; and CNRS, UMR 5560, F-31400 Toulouse, France<sup>5</sup>

Received 15 May 2009/Accepted 19 October 2009

**The biodegradation of the most abundant atmospheric organic C<sub>1</sub> to C<sub>4</sub> compounds (formate, acetate, lactate, succinate) by five selected representative microbial strains (three *Pseudomonas* strains, one *Sphingomonas* strain, and one yeast strain) isolated from cloud water at the puy de Dôme has been studied. Experiments were first conducted under model conditions and consisted of a pure strain incubated in the presence of a single organic compound. Kinetics showed the ability of the isolates to degrade atmospheric compounds at temperatures representative of low-altitude clouds (5°C and 17°C). Then, to provide data that can be extrapolated to real situations, microcosm experiments were developed. A solution that chemically mimicked the composition of cloud water was used as an incubation medium for microbial strains. Under these conditions, we determined that microbial activity would significantly contribute to the degradation of formate, acetate, and succinate in cloud water at 5°C and 17°C, with lifetimes of 0.4 to 69.1 days. Compared with the reactivity involving free radicals, our results suggest that biological activity drives the oxidation of carbonaceous compounds during the night (90 to 99%), while its contribution accounts for 2 to 37% of the reactivity during the day, competing with photochemistry.**

The chemistry of organic compounds in the atmosphere is believed to be essentially driven by free radicals and oxidants generated by photochemical processes (e.g., see references 9 and 37). Recent investigations have raised the possibility that unexpected actors, i.e., living microbes, could also be involved (3, 5, 7–8, 13, 15).

Clouds play a major role in the transformation of atmospheric compounds (27) and influence the composition of the atmosphere through liquid-gas exchanges (26, 32). They are also considered atmospheric niches for microbial life. Cloud water is a complex mixture of organic and inorganic compounds originating from both the gas and the solid phases of the atmosphere. Organic species in the atmosphere either originate from direct sources such as automobile exhaust or are produced within the atmosphere by oxidation of hydrocarbons. Their concentrations are controlled by long-range transport and photochemical production (23, 30). The dissolved organic carbon concentration in cloud water generally ranges from 1 to 20 mg liter<sup>-1</sup> (35, 38). Low-weight carboxylic acids and aldehydes dominate the organic fraction, with formate, acetate, and formaldehyde being the most abundant (20, 29, 34, 41). The chemistry of these soluble organic compounds play a crucial role in the budget of volatile organic compounds in the troposphere and in the budget of secondary organic aerosol particles, which is a major uncertainty in the assessment of the

role of aerosol particles in climate change (21). Indeed, a number of studies have shown that chemical mechanisms in clouds contribute significantly to the formation of secondary organic aerosol particles (22). More specifically, a substantial fraction of organic species such as oxalic, formic, and acetic acids originates from aqueous phase oxidation processes, mainly by OH<sup>•</sup>, NO<sub>3</sub><sup>•</sup>, and HO<sub>2</sub><sup>•</sup> (17, 31).

Cloud droplets also host living bacteria (10<sup>3</sup> to 10<sup>5</sup> cells ml<sup>-1</sup>) (1, 6, 10, 40); the total bacterial C production at 0°C in clouds has been estimated to be 1 to 10 pg C year<sup>-1</sup> (40). Heterotrophic microorganisms can sustain growth in cloud water under laboratory conditions by using dissolved organic compounds as substrates, the concentration of which is presumably the limiting nutritive factor for cell multiplication in these environments (5). This activity toward organic compounds likely participates in carbon chemistry in clouds. In addition, nitrifying bacteria have been detected in clouds and they could be involved in the transformation of atmospheric nitrogenous species (25). One key objective now is to quantify the importance of the biological oxidation pathways compared to that of chemical and photochemical processes.

In previous work, we provided a description of the microbial content of low-altitude clouds (puy de Dôme summit, 1,465 m above sea level) and provided an overview of the capability of isolated bacteria and yeast to degrade atmospheric organic compounds under laboratory conditions (3–6). Here we present rates of biodegradation of atmospheric organic C<sub>1</sub> to C<sub>4</sub> compounds by five selected representative microbial strains isolated from cloud water. Experiments were performed with pure strains incubated in the presence of a single organic compound. We focused first on determining biodegradation rates at two different incubation temperatures (5°C and 17°C). The colder (5°C) corresponds to the mean annual temperature

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire SEESIB, UMR 6504, CNRS-UBP, Department of Chemistry, 24 Avenue des Landais, F-63177 Aubière, France. Phone: 33 473 40 77 14. Fax: 33 473 40 77 17. E-mail: A-Marie.DELORT@univ-bpclermont.fr.

† Present address: Laboratoire de Glaciologie et Géophysique de l'Environnement, Université Joseph Fourier—Grenoble 1/CNRS, 38400 St. Martin d'Hères, France.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 23 October 2009.

TABLE 1. Rates of biodegradation of carboxylic acids by pure strains at 5°C and 17°C<sup>a</sup>

Organism or parameter	Rate of biodegradation (mol h <sup>-1</sup> cell <sup>-1</sup> )			
	Formate		Acetate	
	5°C	17°C	5°C	17°C
<i>Sphingomonas</i> sp.	1.12 × 10 <sup>-16</sup>	3.32 × 10 <sup>-17</sup>	5.89 × 10 <sup>-19</sup>	9.84 × 10 <sup>-17</sup>
<i>Pseudomonas graminis</i>	3.44 × 10 <sup>-16</sup>	4.58 × 10 <sup>-16</sup>	1.07 × 10 <sup>-16</sup>	1.09 × 10 <sup>-15</sup>
<i>Pseudomonas</i> sp.	3.10 × 10 <sup>-17</sup>	1.65 × 10 <sup>-16</sup>	6.34 × 10 <sup>-17</sup>	9.40 × 10 <sup>-17</sup>
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	1.68 × 10 <sup>-16</sup>	5.86 × 10 <sup>-16</sup>	4.29 × 10 <sup>-17</sup>	2.02 × 10 <sup>-16</sup>
Avg bacterial rate	1.64 (± 1.14) × 10 <sup>-16</sup>	3.10 (± 2.21) × 10 <sup>-16</sup>	5.35 (± 3.83) × 10 <sup>-17</sup>	3.71 (± 4.17) × 10 <sup>-16</sup>
Yeast	3.06 × 10 <sup>-15</sup>	4.73 × 10 <sup>-15</sup>	6.80 × 10 <sup>-15</sup>	3.24 × 10 <sup>-14</sup>

<sup>a</sup> The incubation medium consisted of 3.14 (± 0.20) × 10<sup>9</sup> bacteria ml<sup>-1</sup> or 2.69 (± 0.67) × 10<sup>7</sup> yeast cells ml<sup>-1</sup> in the stationary phase of growth in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) containing the tested compound at 20 mM (L- and D-lactate were tested simultaneously at a mixing ratio of approximately 2.5:1). Rates were calculated at the first degree approximation and were assumed to be linear over time. Average bacterial rates correspond to means (± standard deviations) of the biodegradation rates measured with the four bacterial strains. The uncertainty for measurements is 5 to 10%.

<sup>b</sup> ND, not determined.

measured at the puy de Dôme summit, while 17°C is approximately the maximal temperature observed there when a cloud forms (see <http://www.obs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data.php>).

Then, with the objective to provide data that can be extrapolated to real situations, microcosm experiments in which a solution that chemically mimicked the composition of cloud water was used as an incubation medium were developed. Based on the results obtained under microcosm conditions, in-cloud lifetimes of mono- and dicarboxylic acids (formate, acetate, and succinate) were estimated in relation to their biotransformation by microorganisms at 5°C and 17°C. These lifetimes were finally compared to reactions with the free radicals OH<sup>•</sup> and NO<sub>3</sub><sup>•</sup> in the liquid phase, showing that microbial activity represents a real alternative route for the oxidation of organic species in cloud water.

#### MATERIALS AND METHODS

**Strains.** Four strains of bacteria and one yeast strain isolated from cloud water samples collected at the puy de Dôme summit were used. The bacterial strains, *Pseudomonas* sp. strain PDD-14b-2 (DQ512788), *Pseudomonas viridiflava* strain PDD-14b-14 (DQ512797), *Pseudomonas graminis* strain PDD-13b-3 (DQ512786), and *Sphingomonas* sp. strain PDD-7b-13 (DQ512776), have been described elsewhere (4); the yeast strain, PDD-14b-1, is still unidentified. They were selected for their representation in cloud water; for instance, *Pseudomonas* and *Sphingomonas* species were detected in 100% and 75%, respectively, of the samples collected at the puy de Dôme between December 2003 and September 2004. *Pseudomonas* strains have also been found in cloud water in Scotland (1) and in the Italian Pô valley (19).

**Biodegradation test conditions.** (i) **Cell preparation.** The investigated strain was grown aerobically (200 rpm) at 17°C or 27°C in tryptic soy (TS) or R2A (39) broth. Cells were harvested after 24 to 48 h of growth by centrifugation (4,000 × g, 15 min, 4°C), rinsed twice with 0.8% NaCl, and finally resuspended in the incubation medium. The cell concentration in the test medium was adjusted close to 10<sup>9</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup>, or 10<sup>6</sup> bacteria ml<sup>-1</sup> and around 10<sup>7</sup> yeast cells ml<sup>-1</sup> after measurement of the optical density at 575 nm. Serial dilutions of the suspension were also plated on R2A or tryptic soy agar (TSA) and incubated at 17°C or 27°C for exact CFU counts. The exact cell count was used to calculate the biodegradation rates expressed as mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup> (see the description of calculations of biodegradation rates and lifetimes below). The experimental blank consisted of cells suspended in the test medium. At defined time points ( $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48,$  and  $72$  h), samples were taken for measurement of the concentration of substrate; cells were pelleted (12,000 × g, 3 min) from 1 ml of the incubation medium, and the supernatants were kept frozen (-25°C) until analysis.

(ii) **Incubation with a unique substrate.** The test medium was composed as follows: 25 ml of 0.1 M phosphate buffer at pH 7.0 containing about 20 mM

sodium formate (Aldrich), lactic acid (L and D isomers, mixing ratio of approximately 2.5:1; Touzart and Matignon), or sodium succinate (Aldrich). The cell concentrations were around 10<sup>9</sup> bacteria ml<sup>-1</sup> and 10<sup>7</sup> yeast cells ml<sup>-1</sup>. Incubations were performed at 5°C and 17°C. In the specific case of *P. graminis*, an additional experiment was performed at 17°C using substrate/cell ratios of 20 mM/10<sup>8</sup> cells ml<sup>-1</sup>, 2 mM/10<sup>7</sup> cells ml<sup>-1</sup>, and 0.2 mM/10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>; these were obtained by diluting the solution containing the highest concentrations. Supernatant samples were subjected to <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) analysis.

(iii) **Incubation in a microcosm.** The artificial cloud water medium was obtained by diluting by a factor of 1,000 in ultrapure water a solution containing 0.2 M acetic acid (Acros), 0.145 M formic acid (Aldrich), 0.03 M oxalic acid (Fluka), 0.015 M succinic acid (Fluka), 0.1 M MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Fluka), 0.4 M CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Aldrich), 0.05 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fluka), 2.2 M NaCl (Aldrich), 2.0 M NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> (Fluka), 0.3 M NaOH (Merck), and 0.45 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Acros) (see Table 2 for the final composition). This solution was sterilized by autoclave and incubated with 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup> at 5°C or 17°C. Supernatant samples were analyzed by ion chromatography.

**Sample analyses.** (i) **Measurements by <sup>1</sup>H NMR.** A volume of 450 μl of supernatant from the samples collected at different time points was mixed with 50 μl of sodium tetradeuterated trimethylsilylpropionate (Eurisotop) in solution in D<sub>2</sub>O (2 mM final concentration). Analyses by <sup>1</sup>H NMR were made by following a protocol similar to that of Amato et al. (3) and using a Bruker Avance 400 spectrometer functioning at 400.13 MHz and 21°C.

(ii) **Analyses by ion chromatography.** All of the vials were rinsed three times with ultrapure water; experiments were performed under a hood and while wearing gloves to avoid any chemical contamination. Fifty-microliter samples were diluted by a factor of 100 in ultrapure water before analysis. Ions were measured by ionic chromatography (Dionex DX320, column AS11 for anions, eluant KOH; Dionex ICS1500, column CS16 for cations, eluant hydroxymethanesulfonate).

**Calculations of biodegradation rates and lifetimes.** The biodegradation rate ( $K_x$ ) of a compound,  $x$ , in mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup>, was determined by the linear regression equation  $K_x = (C_0 - C_t)/(t \times N_{\text{cells}})$ , with  $C_0$  and  $C_t$  the concentrations of  $x$  in mol liter<sup>-1</sup> after 0 and  $t$  minutes of incubation, respectively;  $t$  is the incubation time in minutes, and  $N_{\text{cells}}$  is the concentration, in cells liter<sup>-1</sup>, of the cells participating in biodegradation.

Lifetimes ( $T$ ) linked to biological activity were calculated by assuming no variation of the biodegradation rates with the concentration of substrates but direct proportionality to the number of cells involved. For a compound,  $x$ , the lifetime in days is given by the equation  $T_x = C_x/N_{\text{cell}} \times K_x \times 24$ , with  $C_x$  the concentration of compound  $x$  in cloud water in mol liter<sup>-1</sup> and  $N_{\text{cell}}$  the concentration of cells in cloud water in cells liter<sup>-1</sup>.

## RESULTS

**Biodegradation of atmospheric carboxylic acids as unique carbon sources.** The five microbial strains isolated from cloud water were incubated in the presence of formate, acetate, L- and D-lactate, and succinate at 5°C and 17°C in 0.1 M phos-



TABLE 1—Continued

Rate of biodegradation (mol h <sup>-1</sup> cell <sup>-1</sup> )					
L-Lactate		D-Lactate		Succinate	
5°C	17°C	5°C	17°C	5°C	17°C
ND <sup>b</sup>	2.76 × 10 <sup>-17</sup>	1.05 × 10 <sup>-17</sup>	8.61 × 10 <sup>-18</sup>	3.91 × 10 <sup>-17</sup>	9.37 × 10 <sup>-17</sup>
3.80 × 10 <sup>-16</sup>	2.96 × 10 <sup>-16</sup>	1.42 × 10 <sup>-16</sup>	1.37 × 10 <sup>-16</sup>	3.54 × 10 <sup>-16</sup>	3.77 × 10 <sup>-16</sup>
8.44 × 10 <sup>-17</sup>	1.74 × 10 <sup>-17</sup>	4.06 × 10 <sup>-17</sup>	ND	6.67 × 10 <sup>-17</sup>	5.08 × 10 <sup>-17</sup>
4.83 × 10 <sup>-17</sup>	6.73 × 10 <sup>-17</sup>	1.13 × 10 <sup>-17</sup>	2.56 × 10 <sup>-18</sup>	2.20 × 10 <sup>-16</sup>	1.05 × 10 <sup>-16</sup>
1.71 (± 1.71) × 10 <sup>-16</sup>	1.02 (± 1.13) × 10 <sup>-16</sup>	5.12 (± 5.39) × 10 <sup>-17</sup>	4.94 (± 7.15) × 10 <sup>-17</sup>	1.70 (± 1.26) × 10 <sup>-16</sup>	1.47 (± 1.11) × 10 <sup>-16</sup>
1.56 × 10 <sup>-14</sup>	7.38 × 10 <sup>-15</sup>	6.90 × 10 <sup>-15</sup>	1.87 × 10 <sup>-15</sup>	2.38 × 10 <sup>-15</sup>	4.73 × 10 <sup>-15</sup>

phate buffer at pH 7.0. Each reaction mixture consisted of a pure culture in the presence of a single organic compound at a given temperature. For technical reasons (low sensitivity of <sup>1</sup>H NMR), the experimental conditions involved cells and substrates at concentrations higher than those actually found in cloud water, i.e., 10<sup>9</sup> versus ~10<sup>5</sup> cells ml<sup>-1</sup> (6) and 20 mM versus ~2 μM (35), respectively; however, the ratio of cell to substrate concentrations was realistic compared to that in real clouds.

The measured rates of biodegradation of each compound by each isolate are reported in Table 1. For bacteria, they ranged from 2.56 × 10<sup>-18</sup> mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup> for D-lactate (*P. viridiflava*) to 1.09 × 10<sup>-15</sup> mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup> for acetate (*P. graminis*) at 17°C and from 5.89 × 10<sup>-19</sup> mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup> for acetate (*Sphingomonas* sp.) to 3.80 × 10<sup>-16</sup> mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup> for L-lactate (*P. graminis*) at 5°C. The highest rates of carboxylic acid transformation were generally measured for *P. graminis* at both 5°C and 17°C, while *Sphingomonas* sp. was often the least efficient. At 5°C, the average biodegradation rates ranged from 5.12 × 10<sup>-17</sup> mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup> (D-lactate) to 1.71 × 10<sup>-16</sup> mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup> (L-lactate). At 17°C, the average rate ranges are of the same of order magnitude, 1.02 × 10<sup>-16</sup> to 3.71 × 10<sup>-16</sup> mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup> for all of the substrates, except that for D-lactate, which is more difficult to degrade, the average rate is 1 order of magnitude lower (around 5 × 10<sup>-17</sup> mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup>). This lower degradation efficiency of D-lactate was shown before for a large number of strains when comparing the percentages of L- and D-lactate degradation after 24 h of incubation (5). This phenomenon is related to the different enzymes involved in this pathway. The highest rates of degradation were found for the yeast strain; it rapidly degraded the proposed substrates, particularly L-lactate at 5°C (1.56 × 10<sup>-14</sup> mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup>) and acetate at 17°C (3.24 × 10<sup>-14</sup> mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup>). The differences in biodegradation rate between bacteria and yeasts are probably due to the fact that yeast cells are about 10 times bigger than bacterial cells, resulting in higher rates in yeasts on a per-cell basis. In addition, they are eukaryotes and their metabolic pathways and regulations are probably different from those of bacteria.

**Biodegradation of atmospheric carboxylic acids under microcosm conditions.** Cloud water is generally an acidic complex mixture of organic and inorganic compounds, and its chemical composition may affect enzymatic reactions. To investigate the influence of the presence of major chemicals dissolved in cloud water on biodegradation kinetics, microcosm experiments were set up. The incubation medium was composed by a solu-

tion containing ions such as nitrate, chloride, sodium, and ammonium and some organic species like formate, acetate, succinate, and oxalate; this was not buffered, and the final medium was acidic (pH ~5) (Table 2). This mixture of organic and inorganic compounds was designed to have chemical characteristics that mimicked the typical composition of cloud water, in accordance with the measurements of samples collected at the puy de Dôme station (35, 38; M. Parazols et al., unpublished data). The solution was inoculated with *P. graminis* at a concentration of 10<sup>6</sup> cells ml<sup>-1</sup>, i.e., about 1 order of magnitude higher than the actual concentration of bacteria in cloud water (6). The concentrations of all of the organic and inorganic species in the incubation medium were also 10 times higher than in real cloud water. To check the possible influence of these shifts in concentration on the resulting rates of biodegradation, the linearity of the degradation rates was first tested. Suspensions of *P. graminis* at concentrations of 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, and 10<sup>8</sup> cells ml<sup>-1</sup> were incubated in 0.1 M phosphate buffer in the presence of 0.2, 2.0, and 20 mM carboxylic acid, respectively. Table 3 shows the biodegradation rates measured under these conditions; the results attested that there was no effect of the absolute cell and acid concentrations for a given ratio and the reaction rates were thus considered linear. Table 4

TABLE 2. Chemical composition and pH of the artificial cloud water solution that mimics the natural cloud water collected at the puy de Dôme station between 2001 and 2008<sup>a</sup>

Compound or parameter	Concn (μM)		
	Artificial cloud	Natural cloud water	
		Min	Max
Acetate	20	0.31	47.8
Formate	14.5	0.25	69.8
Succinate	1.5	0.02	4.1
Oxalate	3	0.10	16.9
Cl <sup>-</sup>	320	0.49	1,948.9
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	200	0.80	766.7
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	50	1.94	369.5
Na <sup>+</sup>	251	0.37	678.5
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	200	6.28	1,801.7
K <sup>+</sup>	10	0.13	124.1
Mg <sup>2+</sup>	10	0.03	47.9
Ca <sup>2+</sup>	40	0.30	74.8
pH	5–5.3	3.9	7.6

<sup>a</sup> Data are from references 35 and 38 and Parazols et al. (unpublished). Concentrations of the solution used as the incubation medium for microcosm experiments were 10 times more than those of the artificial cloud.

TABLE 3. Biodegradation rates of formate, acetate, lactate, and succinate as single carbon sources at 17°C by *P. graminis*<sup>a</sup>

Cell concn (cells ml <sup>-1</sup> )	Compound concn (M)	Rate of biodegradation (mol h <sup>-1</sup> cell <sup>-1</sup> )			
		Formate	Acetate	Lactate	Succinate
1 × 10 <sup>-8</sup>	2 × 10 <sup>-2</sup>	4.9 × 10 <sup>-14</sup>	6.9 × 10 <sup>-15</sup>	5.2 × 10 <sup>-15</sup>	2.3 × 10 <sup>-15</sup>
1 × 10 <sup>-7</sup>	2 × 10 <sup>-3</sup>	4.1 × 10 <sup>-14</sup>	7.2 × 10 <sup>-15</sup>	7.0 × 10 <sup>-15</sup>	4.8 × 10 <sup>-15</sup>
1 × 10 <sup>-6</sup>	2 × 10 <sup>-4</sup>	3.8 × 10 <sup>-14</sup>	8.6 × 10 <sup>-15</sup>	3.9 × 10 <sup>-15</sup>	2.2 × 10 <sup>-15</sup>

<sup>a</sup> Concentrations of cells and organic acids were adjusted to a ratio corresponding to that of natural cloud water (6, 35).

shows the reaction rates and inferred lifetimes of formate, acetate, and succinate in cloud water in relation to their transformation by either biological or chemical activity at 5°C and 17°C (see Table 4, footnote a, for details). Degradation rates were increased by 1 order of magnitude under microcosm conditions compared to simple conditions. Note that oxalate was not degraded by *P. graminis* under either microcosm conditions or during incubation with oxalate as the sole substrate at pH 7.0 and at 5°C or 17°C, suggesting that this strain lacks the necessary enzyme(s).

**Implication in atmospheric chemistry.** Microcosm experiments do not reflect the physical characteristic of clouds, i.e., the distribution of water in droplets which influences the exchanges at the air-water interface. However, this is thought not to affect biodegradation rates, which are probably more dependent on the chemical composition. From our measurements realized under microcosm conditions, we calculated lifetimes for the main organic species in cloud water, i.e., formate, acetate, and succinate (Table 4). In a cloud with typical biological and chemical contents and assuming a cell population that is as active under natural conditions as in the microcosm, the lifetimes of formate, acetate, and succinate due to biological activity are 2.0, 69.1, and 1.5 days at 5°C and 0.5, 4.4, and 1.5 days at 17°C, respectively. Oxidation processes in the atmosphere are largely catalyzed by free radicals, of which the principals ones are OH<sup>•</sup> and NO<sub>3</sub><sup>•</sup>. Hydroxyl radicals are generated by photochemical pathways and are implicated in the oxidation processes that occur during the day, while nitrate radicals play a role during the night (18). At 5°C (the average

temperature in warm clouds), lifetimes related to biological activity were 5 to 50 times longer than lifetimes linked to oxidation by OH<sup>•</sup> but about 10 times shorter than the lifetimes due to oxidation by NO<sub>3</sub><sup>•</sup>, with variations depending on the chemical species. At 17°C (the upper temperature limit in summer) during daytime, the lifetimes of acetate and succinate are of the same order of magnitude for microbial activity and for OH<sup>•</sup> activity (4.4 versus 1.6 and 0.4 versus 0.2, respectively) and only 17 times higher for OH<sup>•</sup> reactivity in the case of formate (Table 4). At this temperature, *P. graminis* was far more active than NO<sub>3</sub><sup>•</sup>, with lifetimes 35 to 86 shorter, showing that biological activity could predominate at night.

Figure 1 shows the relative participation of *P. graminis* and free radicals in catalyzing the oxidation of formate, acetate, and succinate during the day and during the night. At 5°C in the presence of sunlight, OH<sup>•</sup> radicals are present and bacterial activity would account for 2 to 15% of the degradation of organic acids (Fig. 1A); during the night, biological activity only competes with NO<sub>3</sub><sup>•</sup> radicals and its participation in the oxidation of carboxylic acids would reach 90% (Fig. 1B). At 17°C, the bacterial relative contribution to the oxidation of organic species would vary from 6 to 37% (Fig. 1C) of the total during daytime and from 97 to 99% during nighttime. These results suggest that biochemical pathways would have a relatively limited influence on the degradation of organic compounds during the day at 5°C but would become nonnegligible at the highest temperature. At both temperatures, microbial activity would be the dominant phenomenon during the night, at least for low-altitude clouds.

## DISCUSSION

The biodegradation of formate, acetate, and succinate by strains isolated from cloud water at puy de Dôme had been studied under optimal temperature conditions (3, 5). Here we provide evidence that biodegradation is possible under cold conditions such as those encountered in low-altitude clouds. This is consistent with their ability to grow at 5°C, which can thus be supported by atmospheric compounds, thanks to the presence of cold-tolerant enzymes (4). Furthermore, a number

TABLE 4. Inferred lifetimes in cloud water of formate, acetate, and succinate at 5°C and 17°C and rates of degradation by *P. graminis* in microcosm and by free radicals OH<sup>•</sup> and NO<sub>3</sub><sup>•</sup><sup>a</sup>

Organism or compound (temp [°C])	Formate			Acetate			Succinate		
	Reaction rate <sup>b</sup>	Rate in cloud water (10 <sup>-7</sup> mol liter <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Inferred lifetime (days)	Reaction rate <sup>b</sup>	Rate in cloud water (10 <sup>-7</sup> mol liter <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Inferred lifetime (days)	Reaction rate <sup>b</sup>	Rate in cloud water (10 <sup>-7</sup> mol liter <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Inferred lifetime (days)
<i>P. graminis</i> (5)	3.8 (± 1.3) × 10 <sup>-15</sup>	3.1	2.0	1.5 (± 0.2) × 10 <sup>-16</sup>	0.12	69.1	5.2 (± 2.6) × 10 <sup>-16</sup>	0.415	1.5
<i>P. graminis</i> (17)	1.4 (± 0.4) × 10 <sup>-14</sup>	11.3	0.5	2.4 (± 1.4) × 10 <sup>-15</sup>	1.88	4.4	2.1 (± 0.6) × 10 <sup>-15</sup>	1.71	0.4
OH <sup>•</sup> (5)	2.55 × 10 <sup>9</sup>	159.0	0.04	4.50 × 10 <sup>7</sup>	3.89	2.1	3.65 × 10 <sup>8</sup>	2.37	0.3
OH <sup>•</sup> (17)	3.04 × 10 <sup>9</sup>	190.6	0.03	5.90 × 10 <sup>7</sup>	5.10	1.6	4.43 × 10 <sup>8</sup>	2.87	0.2
NO <sub>3</sub> <sup>•</sup> (5)	3.00 × 10 <sup>7</sup>	0.324	18.7	1.16 × 10 <sup>6</sup>	0.013	665.2	5.50 × 10 <sup>7</sup>	0.045	14.0
NO <sub>3</sub> <sup>•</sup> (17)	4.20 × 10 <sup>7</sup>	0.329	18.4	2.04 × 10 <sup>6</sup>	0.022	378.2	5.50 × 10 <sup>7</sup>	0.045	14.0

<sup>a</sup> Lifetimes were calculated by using the following concentrations: [bacteria] = 8.4 × 10<sup>4</sup> cells ml<sup>-1</sup> (6), [OH<sup>•</sup>] = 1.2 × 10<sup>-13</sup> mol liter<sup>-1</sup>, [NO<sub>3</sub><sup>•</sup>] = 1.5 × 10<sup>-14</sup> mol liter<sup>-1</sup>, [formate] = 14.5 × 10<sup>-6</sup> mol liter<sup>-1</sup>, [acetate] = 20 × 10<sup>-6</sup> mol liter<sup>-1</sup>, and [succinate] = 1.5 × 10<sup>-6</sup> mol liter<sup>-1</sup>. Kinetic constants and concentrations of OH<sup>•</sup> and NO<sub>3</sub><sup>•</sup> were taken from Leriche et al. (33) and Herrmann et al. (24), respectively; organic acid concentrations are from Table 2.

<sup>b</sup> Values for organisms are in mol h<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup>, and values for compounds are in liters mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Reaction rates measured with *P. graminis* are the mean values of 3 replicates at 5°C and 5 replicates at 17°C.

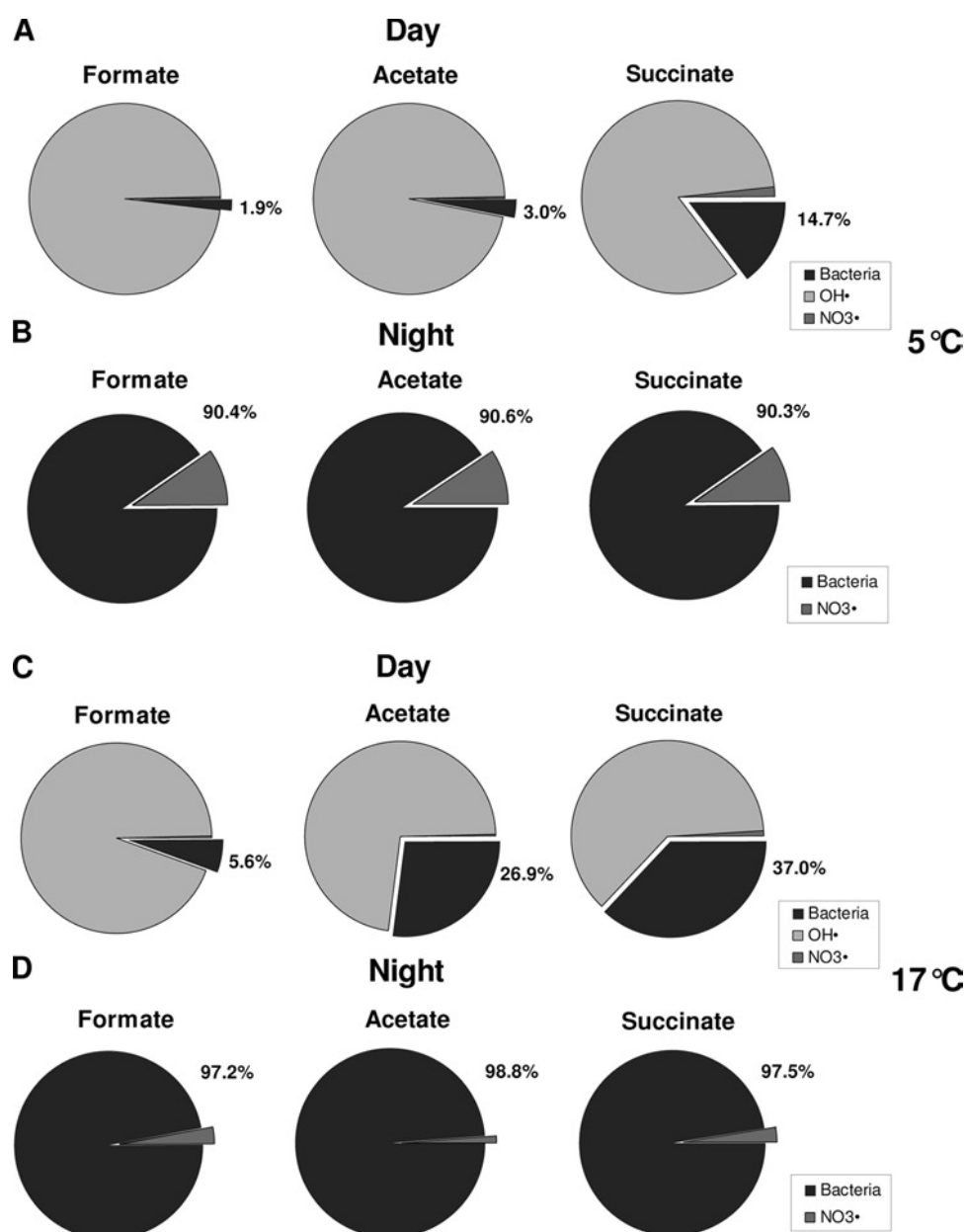


FIG. 1. Estimated relative influence of bacterial activity (in black) and free radicals (hydroxyl  $[\text{OH}^\bullet]$  and nitrate  $[\text{NO}_3^\bullet]$ ) on the degradation of formate, acetate, and succinate in cloud water at  $5^\circ\text{C}$  during the day (A) and night (B) and at  $17^\circ\text{C}$  during the day (C) and night (D). During nighttime (i.e., in the absence of photochemical reactivity),  $\text{OH}^\bullet$  radicals are considered not to be present. The following concentrations were used for calculations: [bacteria],  $8.4 \times 10^4 \text{ cell ml}^{-1}$  (6);  $[\text{OH}^\bullet]$ ,  $1.2 \times 10^{-13} \text{ mol liter}^{-1}$  (daytime);  $[\text{NO}_3^\bullet]$ ,  $1.5 \times 10^{-14} \text{ mol liter}^{-1}$ ; [formate],  $14.5 \times 10^{-6} \text{ mol liter}^{-1}$ ; [acetate],  $20 \times 10^{-6} \text{ mol liter}^{-1}$ ; [succinate],  $1.5 \times 10^{-6} \text{ mol liter}^{-1}$ . Kinetic constants and concentrations of  $\text{OH}^\bullet$  and  $\text{NO}_3^\bullet$  were taken from Leriche et al. (33) and Herrmann et al. (24), respectively; organic acid concentrations are from Table 2.

of studies have also demonstrated the existence of microbial activity under extreme cold conditions, including subzero temperatures (2, 11–12, 28, 40). Hence, the biodegradation of organic species likely also occurs in supercooled clouds. Moreover, the activity of microorganisms in degrading organic acids under conditions that mimic those found in clouds (acidic pH, mixture of organic and inorganic compounds, and low temperature) was also demonstrated.

Interestingly, the metabolic pathways of degradation of the organic compounds studied can be similar to those catalyzed

by photochemical processes. As an example, photochemistry, through the production of  $\text{OH}^\bullet$  radicals, is involved in the progressive oxidation of hydrocarbons and others organic compounds to  $\text{CO}_2$ . The final step is constituted by the oxidation of formate (14, 36), and this reaction is also possibly catalyzed by microbial metabolism (16). So, a part of the chemical transformations occurring in the atmosphere and attributed to photochemistry could, in fact, involve microbiological activity. To clarify this hypothesis, an attempted extrapolation of the biodegradation rates previously determined for organic acids to

cloud water was proposed and biological lifetimes were compared to typical lifetimes calculated for both daytime ( $\text{OH}^\cdot$ ) and nighttime ( $\text{NO}_3^\cdot$ ) chemistry. The time scales estimated for the degradation of organic compounds of cloud water, falling in the range of a few days, indicate that microbial activity could contribute to degrade organic compounds in the atmosphere, at least in low-altitude clouds. These time scales are consistent with those reported earlier by Ariya and Amyot (7) for the degradation of dicarboxylic acids as unique substrates by a fungal strain isolated from air (*Geotrichum* sp.). Lifetimes of 2 to 10 days were proposed for malonic, succinic, glutaric, adipic, pimelic, and pinic acids. Our results showed that biotransformation processes could even be the main sink for organic acids during nighttime, when the free radical load reaches its lowest concentration.

The implication of such results is clearly that the biological transformation of organic material in clouds needs to be accounted for to quantify the formation of secondary material in the atmosphere. Clearly, the calculated lifetimes are much longer than the typical lifetime of a single cloud event; they are comparable to the lifetime of airborne material in the temperate troposphere (up to several days). It is not unusual during the course of their atmospheric transport that atmospheric particles (including bacteria, fungi, and viruses) undergo several condensation-evaporation cycles, spending a significant fraction of their time in clouds. Quantifying the impact of biological activity on the global cycling of organic matter is beyond the scope of the present paper and would require advanced chemical transport modeling.

In clouds at a temperature of 5°C, which is the most representative temperature for low-altitude clouds, and assuming that 1% of the volume of the troposphere is occupied by clouds and that they carry a biomass as active as the cell populations used in microcosms, cloud-borne bacteria would be responsible for the degradation of nearly 6.5 million tons of organic compounds composed of carbon per year. Considering that these low-weight organic compounds are completely oxidized into carbon dioxide, this corresponds to an annual production of about 24 millions tons of  $\text{CO}_2$  by microbial activity in cloud water.

Clouds are very complex multiphase systems that cannot be reproduced in laboratories working under bulk conditions. Our long-term strategy is to create mathematical process models of both biological and radical reactions and use different parameters, such as degradation kinetic constants (such as those determined in this paper), number and type of cells, chemical composition, temperature, pH, light flux, etc., to simulate more realistic clouds which are in constant evolution. These cloud chemistry models take into account the exchanges existing between the interstitial phases (gases and particles) and cloud droplets and crystals (15). Modeling is the only way that will help us to know and quantify precisely the real contribution of microbiological processes, relative to photochemical processes, to cloud chemistry, depending on different scenarios. The way is still long; however, experimental data, especially biodegradation rate constants, collected by us and by other groups on microbial activity in cloud water will help to reach this goal.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the CNRS and the French Ministry of Research under the LEFE-CHAT and ORE-BEAM programs. Pierre Amato and Mickael Vaïtilingom acknowledge Ph.D. scholarships from the French Ministry of Research.

## REFERENCES

- Ahern, H., K. A. Walsh, T. C. J. Hill, and B. F. Moffett. 2007. Fluorescent pseudomonads isolated from Hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation. *Biogeosciences* **4**:115–124.
- Amato, P., and B. C. Christner. 2009. Energy metabolism response to low temperature and frozen conditions in *Psychrobacter cryohalolentis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:711–718.
- Amato, P., M. Ménager, M. Sancelme, P. Laj, G. Mailhot, and A.-M. Delort. 2005. Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds. *Atmos. Environ.* **39**:4143–4153.
- Amato, P., M. Parazols, M. Sancelme, P. Laj, G. Mailhot, and A.-M. Delort. 2007. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**:242–254.
- Amato, P., F. Demeer, A. Melouhi, S. Fontanella, A.-S. Martin-Biesse, M. Sancelme, P. Laj, and A.-M. Delort. 2007. A fate of organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by microorganisms. *Atmos. Chem. Phys.* **7**:4159–4169.
- Amato, P., M. Parazols, M. Sancelme, P. Laj, G. Mailhot, and A.-M. Delort. 2007. An important oceanic source of microorganisms for cloud water at the puy de Dôme (France). *Atmos. Environ.* **41**:8253–8263.
- Ariya, P. A., and M. Amyot. 2004. New directions: the role of bioaerosols in atmospheric chemistry and physics. *Atmos. Environ.* **38**:1231–1232.
- Ariya, P. A., O. Nepotchaykh, O. Ignatova, and M. Amyot. 2002. Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. *Geophys. Res. Lett.* **29**:2077–2080.
- Barth, M. C. 2006. The importance of cloud drop representation on cloud photochemistry. *Atmos. Res.* **82**:294–309.
- Bauer, H., A. Kasper-Giebl, M. Löflund, H. Giebl, R. Hitznerberger, F. Zibuschka, and H. Puxbaum. 2002. The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. *Atmos. Res.* **64**:109–119.
- Carpenter, E., S. Lin, and D. G. Capone. 2000. Bacterial activity in South Pole. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4514–4517.
- Christner, B. C. 2002. Incorporation of DNA and protein precursors into macromolecules by bacteria at  $-15^\circ\text{C}$ . *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:6435–6438.
- Côté, V., G. Kos, R. Mortazavi, and P. A. Ariya. 2008. Microbial and “de novo” transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi. *Sci. Total Environ.* **390**:530–537.
- Deguillaume, L., M. Leriche, and N. Chaumerliac. 2005. Impact of radical versus non-radical pathway in the Fenton chemistry on the iron redox cycle in clouds. *Chemosphere* **60**:718–724.
- Deguillaume, L., M. Leriche, P. Amato, P. A. Ariya, A.-M. Delort, U. Pöschl, N. Chaumerliac, H. Bauer, A. I. Flossmann, and C. E. Morris. 2008. Microbiology and atmospheric processes: chemical interactions of primary biological aerosols. *Biogeosciences* **5**:1073–1084.
- Delort, A.-M. 2006. Chapter 9. Use of NMR to study in situ bioconversion of gaseous compounds, p. 117–131. *In* P. Lens (ed.), *Gas resources for resource recovery*. IWA Publishing, London, United Kingdom.
- Ervens, B., G. Feingold, G. J. Frost, and M. Kreidenweiss. 2004. A modeling study of aqueous production of dicarboxylic acids: 1. Chemical pathways and speciated organic mass production. *J. Geophys. Res.* **109**:D15205.1–D15205.20.
- Finlayson-Pitts, B., and J. J. R. Pitts. 1997. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* **276**:1045–1051.
- Fuzzi, S., P. Mandrioli, and A. Perfetto. 1997. Fog droplets—an atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmos. Environ.* **31**:287–290.
- Fuzzi, S., M. C. Facchini, S. Decesari, E. Matta, and M. Mircea. 2002. Soluble organic compounds in fog and cloud droplets: what have we learned over the past few years? *Atmos. Res.* **64**:89–98.
- Fuzzi, S., M. O. Andreae, B. J. Huebert, M. Kulmala, T. C. Bond, M. Boy, S. J. Doherty, A. Guenther, M. Kanakidou, K. Kawamura, V.-M. Kerminen, U. Lohmann, L. M. Russell, and U. Pöschl. 2006. Critical assessment of the current state of scientific knowledge, terminology, and research needs concerning the role of organic aerosols in the atmosphere, climate, and global change. *Atmos. Chem. Phys.* **6**:2017–2038.
- Gelencsér, A., and Z. Varga. 2005. Evaluation of the atmospheric significance of multiphase reactions in atmospheric secondary organic aerosol formation. *Atmos. Chem. Phys.* **5**:2823–2831.
- Granby, K., C. S. Christensen, and C. Lohse. 1997. Urban and semi-rural observations of carboxylic acids and carbonyls. *Atmos. Environ.* **31**:1403–1415.



24. **Herrmann, H., A. Tilgner, P. Barzaghi, Z. Majdik, S. Gligorovski, L. Poulain, and A. Monod.** 2005. Towards a more detailed description of tropospheric aqueous phase organic chemistry: CAPRAM 3.0. *Atmos. Environ.* **39**:4351–4363.
25. **Hill, K. A., P. B. Shepson, E. S. Galdavy, C. Anastasio, P. S. Kourtev, A. Konopka, and B. H. Stirm.** 2007. Processing of atmospheric nitrogen by clouds above forest environment. *J. Geophys. Res.* **112**:D11301. doi:10.1029/2006JD008002.
26. **Jacob, D. J.** 1986. Chemistry of OH in remote clouds and its role in the production of formic acid and peroxymonosulfate. *J. Geophys. Res.* **91**:9807–9826.
27. **Jonson, J. E., and I. S. A. Isaksen.** 1993. Tropospheric ozone chemistry. The impact of cloud chemistry. *J. Atmos. Chem.* **16**:99–122.
28. **Junge, K., H. Eicken, and J. W. Deming.** 2004. Bacterial activity at  $-2$  to  $-20^{\circ}\text{C}$  in Arctic wintertime sea ice. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:550–557.
29. **Kawamura, K., S. Ng, L. Steinberg, and I. R. Kaplan.** 2001. Wet deposition of low molecular weight mono- and di-carboxylic acids, aldehydes and inorganic species in Los Angeles. *Atmos. Environ.* **35**:3917–3926.
30. **Kawamura, K., Y. Imai, and L. A. Barrie.** 2005. Photochemical production and loss of organic acids in high Arctic aerosols during long-range transport and polar sunrise ozone depletion events. *Atmos. Environ.* **39**:599–614.
31. **Legrand, M., S. Preunkert, T. Oliveira, C. A. Pio, S. Hammer, A. Gelencsér, A. Kasper-Giebl, and P. Laj.** 2007. Origin of  $\text{C}_2$ - $\text{C}_5$  dicarboxylic acids in the European atmosphere inferred from year-round aerosol study conducted at a west-east transect. *J. Geophys. Res.* **112**:D23S07. doi:10.1029/2006JD008019.
32. **Lelieveld, J., and P. J. Crutzen.** 1991. The role of clouds in tropospheric photochemistry. *J. Atmos. Chem.* **12**:229–267.
33. **Leriche, M., L. Deguillaume, and N. Chaumerliac.** 2003. Modeling study of strong acids formation and partitioning in a polluted cloud during winter-time. *J. Geophys. Res.* **108**:AAC14.1–AAC14.11. doi:10.1029/2002JD002950.
34. **Löflund, M., A. Kasper-Giebl, B. Schuster, H. Giebl, R. Hitznerberger, and H. Puxbaum.** 2002. Formic, acetic oxalic and succinic acid concentrations and their contribution to organic carbon in cloud water. *Atmos. Environ.* **36**:1553–1558.
35. **Marinoni, A., P. Laj, K. Sellegri, and G. Mailhot.** 2004. Cloud chemistry at the puy de Dôme: variability and relationships with environmental factors. *Atmos. Chem. Phys.* **4**:715–728.
36. **Monod, A., A. Chebbi, R. Durand-Jolibois, and P. Carlier.** 2000. Oxidation of methanol by hydroxyl radicals in aqueous solution under simulated cloud droplet conditions. *Atmos. Environ.* **34**:5283–5294.
37. **Neu, J. L., M. J. Prather, and J. E. Penner.** 2007. Global atmospheric chemistry: integrating over fractional cloud cover. *J. Geophys. Res.* **112**:D11306.
38. **Parazols, M., A. Marinoni, P. Amato, O. Abida, P. Laj, and G. Mailhot.** 2006. Speciation and role of iron in cloud droplets at the puy de Dôme station. *J. Atmos. Chem.* **54**:267–281.
39. **Reasoner, D. J., and E. E. Geldreich.** 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1–7.
40. **Sattler, B., H. Puxbaum, and R. Psenner.** 2001. Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophys. Res. Lett.* **28**:239–242.
41. **van Pinxteren, D., A. Plewka, D. Hofmann, K. Müller, H. Kramberger, B. Svrčina, K. Bächmann, W. Jaeschke, S. Mertes, J. L. Collett, Jr., and H. Herrmann.** 2005. Schmücke hill cap cloud and valley stations aerosol characterization during FEBUKO (II): organic compounds. *Atmos. Environ.* **39**:4305–4320.

### 2.2.2. Biotransformation du formaldéhyde et du méthanol, publication soumise à *Atmospheric Environment*

La seconde publication soumise en 2011 à « *Atmospheric Environment* » sur le formaldéhyde et le méthanol présente les résultats suivants :

- Les vitesses de biodégradation en substrat unique à 5 et 17°C du méthanol et du formaldéhyde pour 4 souches bactériennes.
- La comparaison entre les vitesses de biodégradation du méthanol et du formaldéhyde obtenues expérimentalement et les vitesses théoriques de dégradation par voies radicalaires de ces mêmes composés. Ces calculs suivent la même démarche que celle utilisée précédemment pour les acides carboxyliques. Plus particulièrement, nous avons envisagé deux scénarios distincts reflétant des contextes pollués et non pollués.
- L'indentification par la RMN  $^{13}\text{C}$  *in vivo* des métabolites produits durant la biodégradation du  $^{13}\text{C}$ -formaldéhyde avec la souche *Bacillus* sp 3B6.

L'originalité de ce travail réside dans l'utilisation de la technique de RMN *in vivo* qui permet d'observer les cinétiques de dégradation et d'identifier les métabolites produits de manière très fine grâce à une grande fréquence d'analyse.

*La partie expérimentale de cette publication (mesures par RMN) a été réalisée par S. Husarova (actuellement en thèse au SEESIB) en collaboration avec M. Traikia et M. Matulova. Ma participation à cette publication concerne l'analyse des données de biodégradation et leurs exploitations à travers les calculs des vitesses de biodégradation et de dégradation impliquant les radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{NO}_3\cdot$ . J'ai également participé à la rédaction de cet article.*

**“Biotransformation of methanol and formaldehyde by bacteria isolated from clouds. Comparison with radical chemistry”**

Slavomíra Husárová<sup>a,e</sup>, Mickaël Vaïtilingom<sup>a,c</sup>, Laurent Deguillaume<sup>c,d</sup>, Mounir Traikia<sup>a,b</sup>,  
Virginie Vinatier<sup>a,b</sup>, Martine Sancelme<sup>a,b</sup>, Pierre Amato<sup>a,b</sup>, Mária Matulová<sup>e</sup> and Anne-Marie  
Delort<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire SEESIB, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> CNRS, UMR 6504, Laboratoire SEESIB, F-63177 Aubière, France

<sup>c</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, OPGC/Laboratoire de Météorologie Physique LaMP, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>d</sup> CNRS, UMR 6016, LaMP, F - 63177 Clermont - Ferrand, France

<sup>e</sup> Institute of Chemistry, Centre for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovakia

\*Corresponding author: Tel: 00 33 473 40 77 14; Fax: 00 33 473 40 77 17

E-mail address: A-Marie.DELORT@univ-bpclermont.fr

**Running title:** Biotransformation of methanol and formaldehyde in clouds

**Abstract:** The kinetics of biodegradation of methanol and formaldehyde in phosphate buffer at pH 7 by 4 bacterial strains (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* sp. and *Frigoribacterium* sp.) isolated from cloud water at the puy de Dôme mountain have been investigated using  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. We showed that biodegradation occurred at 5 °C and 17 °C, respectively average and summertime temperature considered within the cloud system at this site. They ranged from  $10^{-19}$  to  $10^{-21}$  mol cell $^{-1}$  s $^{-1}$  both at 5 and 17 °C for formaldehyde, and from  $10^{-21}$  to  $10^{-23}$  mol cell $^{-1}$  s $^{-1}$  at 5 and 17 °C for methanol. Metabolic intermediates were identified, with notably production of C3 compounds (glycerol, 1,2- and 1,3-propanediol) from formaldehyde by the strain *Bacillus* sp. In order to evaluate to which extent microbiological oxidation of organic compounds has to be considered as an alternative route to radical chemistry in cloud water, the biodegradation rates measured were compared with rates related to the reactivity of organic species with free radicals  $\cdot\text{OH}$  (daytime chemistry) and  $\text{NO}_3\cdot$  (nighttime chemistry) under two cloud situations (urban and remote cases). Clearly, measured biological and chemical reaction rates were in the same range of magnitude and their relative contribution varies according to the scenarios we tested, including the temperature of the clouds (5 or 17 °C), the category of the clouds (urban and remote) and the diurnal cycle (day and nighttime). Except for the degradation of methanol at 5°C in remote clouds, our results show that biotransformation processes could be the main sink for C1 compounds in liquid clouds ( $T \geq 5$  °C  $\equiv$  “warm cloud”) during the night and both in polluted and non polluted clouds. **Keywords:** Cloud, atmospheric chemistry, microorganisms, biodegradation, radical chemistry, organic compounds.



## 1. INTRODUCTION

Large quantities of Volatile Organic Compounds (VOCs) are emitted into the atmosphere by natural and/or anthropogenic sources. Oxidation of VOCs leads to the formation of gaseous and particulate secondary products which, in turn, have significant impact on the atmospheric composition (Atkinson et al., 2006; Kawamura et al., 2005). In this context, secondary organic aerosols (SOA) are formed by gas-to-particle conversion of these low volatile organic products. These particles account for a significant fraction of ambient tropospheric aerosols and impact on atmospheric processes, climate and human health (Finlayson-Pitts and Pitts Jr., 2000; Hallquist et al., 2009).

Oxidation of VOCs occurs both in the atmospheric gas and liquid phases (cloud, rain). In the gas phase, VOCs are primarily transformed by photolysis and/or radical chemistry and reactions with other oxidants such as O<sub>3</sub>. In the presence of clouds and depending on their solubility, several VOCs (Van Pinxteren et al., 2005) are significantly transferred into the atmospheric liquid phase where they can be oxidized. Methanol (CH<sub>3</sub>OH) is a significant component of the volatile organic carbon in the atmosphere (Heickes et al., 2002) and is the predominant oxygenated compound in the mid to the upper troposphere (Singh et al., 2000, 2001); its life time in the atmosphere has been evaluated to 1 to 2 weeks (Dufour et al., 2007). The anthropogenic primary source and oxidation taking place in the atmosphere represent 11 to 20 % of the methanol while the biogenic contribution mainly issued from plant metabolism is the most significant part (80 to 90 %) (Galbally and Kirstine, 2002; Tie et al., 2003; Jacob et al., 2005; Brunner et al., 2007). Methanol plays an important role in atmospheric chemistry as it influences the oxidizing capacity of the atmosphere by reacting with hydroxyl radicals ( $\dot{\text{O}}\text{H}$ ) or by producing peroxy radical (RO<sub>2</sub>) and formaldehyde (HCHO). Formaldehyde is a key atmospheric VOC since it is an important tracer of Non-Methane Volatile Organic Compound (NMVOC) emissions and photochemical activity. HCHO is a primary emission product from biomass burning (Carlier et al., 1986) and fossil fuel combustion (Anderson et al., 1996; Holzinger et al., 1999). However, its major source in the atmosphere is the photochemical oxidation of methane and non-methane hydrocarbons (Altshuller, 1993).

Methanol and formaldehyde are soluble and efficiently transferred into atmospheric waters (Henry's law constants respectively equal to  $2.2 \cdot 10^2 \text{ M atm}^{-1}$  and  $10^3 \text{ M atm}^{-1}$ ) (Sander et al., 1999). Very few papers report methanol concentrations in atmospheric waters; it was found at

concentrations of 0.7  $\mu\text{M}$  in rain (Snider and Dawson, 1985). Formaldehyde concentration varies in a very wide range of values (see Table 1); from 0.001  $\mu\text{M}$  in rainwater in rural areas (Kieber et al., 1999) to 710  $\mu\text{M}$  in highly polluted fog (Jacob et al., 1984). The average concentration measured in cloud water at the puy de Dôme station is 2.9  $\mu\text{M}$  (Parazols, 2007) and depends on the air mass origins (6.5  $\mu\text{M}$  for “polluted” category and 2.0  $\mu\text{M}$  for “remote” category).

It is generally admitted that the reactivity of organic acids in clouds is driven by the presence of free radicals ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{NO}_3\cdot$ ) or oxidants such as  $\text{O}_3$  or  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Herrmann et al., 2005; Tilgner and Herrmann, 2010). However, recent studies raised the idea that microbial activity can play a significant role in the liquid phase transformation of some organic compounds (Ariya and Amyot, 2004; Deguillaume et al., 2008; Delort et al., 2010). It is now well established that living microorganisms are present in clouds (Ahern et al., 2007; Amato et al., 2005, 2007a, c; Bauer et al., 2002; Fuzzi et al., 1997; Sattler et al., 2001). They are active in clouds as shown by ATP (Adenine Tri Phosphate) measurements (Amato et al., 2007c) and CTC (5-Cyano-2,3-ditotyl Tetrazolium Chloride) staining (Hill et al., 2007), these two techniques describe the metabolic activity and the energetic state of the cells. This implies the uptake of nutrients from the liquid phase by cells and suggests that they can develop within cloud water. One key question for cloud chemistry now is to quantify biological oxidation as respect to chemical and photochemical processes. In the recent paper, from Vaïtilingom et al. (2010), it was shown that cloudborne microorganisms could indeed contribute to the transformation of atmospheric organic compounds (carboxylic acids: acetate, succinate and formate), particularly during the night.

The aim of this study is to extend this work to the transformation processes of two important atmospheric organic compounds in clouds: methanol and formaldehyde, considering both biological activity and photochemical reactivity. It is known that the metabolic pathway involving C1 compounds results in very similar intermediates as radical chemistry (Figure 1). However, contrarily to radical chemistry, only microorganisms can either reduce or oxidize compounds such as formaldehyde.

14 cloud samples have been collected between March 2003 and October 2004 at the puy de Dôme station (1465 m.a.s.l, 45°46' North, 2°57' West, France, see for more information: <http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/beam>) (Marinoni et al., 2004; Amato et al., 2005, 2007a). From these samples, we isolated by cultivation more than one hundred strains of bacteria, fungi and yeasts. These included a large proportion of non sporing bacteria able to grow at low temperature. Amato et al. (2005, 2007b) demonstrated their abilities to degrade

methanol and formaldehyde at 27 °C. Here, we examined the effect of temperature on biological activity by determining the rates of biodegradation at 5 °C and 17 °C; these temperatures correspond to the mean annual temperature and to the maximal temperature observed at the puy de Dôme summit when clouds form, respectively (see the database at: <http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/opgc/index.php>).

The results obtained with 4 bacterial strains belonging to the genera *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Frigoribacterium*, the most current microorganisms isolated from clouds, are presented. The metabolism of these strains was investigated using <sup>1</sup>H and/or <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. This provided indication about the pathways involved and allowed determining the rates of biotransformation under experimentally controlled conditions. Extrapolating to the conditions existing in the liquid phase of clouds issued from urban and remote air masses during daytime (high concentration of radicals, mainly <sup>•</sup>OH) and during nighttime (lower level of radicals, mainly <sup>•</sup>NO<sub>3</sub>), the contribution of microbial activity is compared to the degradation of methanol and formaldehyde with that from radical chemistry. The objective is to evaluate the extent to which microbiological processes of organic compounds can be considered as an “alternative” route to radical chemistry in cloud water.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### *2.1 Conditions of incubation for the biodegradation tests*

For each isolated strain, liquid pure pre-culture was incubated at 17 °C or 27 °C in either TSA (Trypcase Soy broth, Biomerieux, Marcy l’Etoile, France) or R2A broth culture media (Reasoner and Geldreich, 1985). A large volume (about 400 mL) of culture was then incubated under similar conditions and cells were harvested by centrifugation (4000 g, 15 min, 4 °C) after 24 or 48 h of growth and rinsed twice in NaCl 0.8 %. The cell pellet was then resuspended in the test medium composed of 25 mL of 0.1 M phosphate buffer at pH 7.0, supplemented with 20 mM <sup>13</sup>C-formaldehyde (H<sup>13</sup>CHO) (Eurisotop, solution at 20% v/v in water) or methanol (CH<sub>3</sub>OH) (Aldrich). The isotopic form of formaldehyde was used because the unlabelled commercial product contains methanol for stabilizing the solution. In addition, <sup>1</sup>H NMR could not detect the hydrated form of formaldehyde (see for more details Amato et al., 2007b) and <sup>13</sup>C NMR allowed to monitor the fate of <sup>13</sup>C and to identify metabolites. Incubations were carried out for 24 to 64 hours at 5 °C or 17 °C in the dark under aerobic conditions (200 rpm). Samples for analysis were taken at regular intervals of time. One millilitre of the incubation medium was centrifuged (12000 g, 3 min) to pellet cells; and

supernatants were kept frozen (-40 °C) until measurement. The experimental blank was made in parallel for each strain and consisted in cells suspended in phosphate buffer in the absence of carbon source.

In the case of *Bacillus* sp 3B6, incubations with <sup>13</sup>C-formaldehyde were performed using a perfusion system (see section 2.4) instead of agitation in flasks. <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded *in vivo* on the sample without separation of the cells.

Cell concentration in the test media was adjusted based on the optical density (OD<sub>575nm</sub>) to match the cell/substrate ratio existing in cloud water. In order to express the rates of degradation as [mol] [cell]<sup>-1</sup> [s]<sup>-1</sup>, the exact cell concentration was determined by standard dilution plating of the incubation medium on R2A or TSA and CFU (Colony Forming Units) counts after 2 days incubation at 17 °C or 27 °C.

## 2.2. Measurements by <sup>1</sup>H NMR

Supernatants from biodegradation test media were prepared for <sup>1</sup>H NMR by mixing a volume of 450 μL of the sample with 50 μL of sodium tetra deuterated trimethylsilyl propionate (TSPd<sub>4</sub>, Eurisotop) in solution in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O was used for locking and shimming, while TSPd<sub>4</sub> constituted a reference for chemical shifts (0 ppm) and quantification. Final volumes of 500 μL of prepared samples were put in 5 mm-diameter NMR tubes. Acquisition of spectra was made at 400.13 MHz, 21 °C, on a Bruker Avance 400 spectrometer, by collection of 32 scans (45° pulse, 4789.27 Hz SW, 65.536 data points, 6.84 min total acquisition time). Water signal was eliminated by presaturation, and no filter was applied before Fourier transformation. Using Bruker software (X-Win NMR), baseline was corrected before integration for quantification. The concentration of metabolites was calculated as following:

$$[m] = \frac{(9 \times A_o \times [TSPd_4])}{(b \times A_{ref})} \quad (E1)$$

where [m] is the concentration of the compound to quantify, *A<sub>o</sub>* is the area of *m* resonance; *A<sub>ref</sub>* is the area of TSPd<sub>4</sub> resonance; 9 and b respectively are the numbers of protons of TSPd<sub>4</sub>, resonating at 0 ppm, and of metabolite *m*.

## 2.3. Formaldehyde assay

Formaldehyde resonates at about 4.5 ppm in <sup>1</sup>H NMR, and so it was masked by the residual signal of water, making it undetectable by this technique at 21 °C. Because of this,

formaldehyde was assayed by a sensitive automatic analyser (Aerolaser AL4021). The principle is based on the reaction of formaldehyde with acetylacetone and ammonia, resulting in the formation of the detected fluorochrome complex ( $\lambda_{\text{excitation}} = 400\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{emission}} = 510\text{nm}$ ), for which light emission is directly proportional to formaldehyde concentration.

Alternatively  $^{13}\text{C}$  labelled formaldehyde was analysed by  $^{13}\text{C}$  NMR as described previously (Amato et al., 2007b) or by *in vivo*  $^{13}\text{C}$  NMR (see section 2.4).  $^{13}\text{C}$  NMR analysis allows following specifically the  $^{13}\text{C}$  labeled metabolites issued from the transformation of  $^{13}\text{C}$ -formaldehyde by the bacterium.

#### **2.4. *In vivo* $^{13}\text{C}$ NMR study**

*In vivo* NMR experiments were performed at 500 MHz on Bruker Avance NMR spectrometer using a perfusion system described in Choro et al. (2009). *Bacillus* sp. 3B6 cells were perfused with phosphate buffer containing 10 % of  $^2\text{H}_2\text{O}$  and saturated with air. The perfusion rate was controlled by peristaltic pump (flow rate  $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Bacterial suspension circulated continuously in the system. Benzene was used as an internal reference to calibrate chemical shifts (128.39 ppm relative to TMS (0 ppm)) in a sealed capillary placed in 10mm sample tube. Spectra were acquired with power-gated  $^1\text{H}$  decoupling WALTZ16 sequence. Acquisition parameters were as followed: 1000 scans (corresponding to 15min acquisition for each spectrum);  $30^\circ$  carbon pulse (7  $\mu\text{s}$ ); relaxation delay 1s; acquisition time 0.14 s; spectral window 30.303 Hz; data points 8 000 zero filled to 16 000.

#### **2.5. Calculation of degradation rates in cloud water**

The biodegradation rates of the compound  $C$  ( $k_c$ ) have been determined by linear regression fits as follows:

$$k_c = (k \times [C]_0) / N_{\text{cells}} \quad [\text{mol cells}^{-1} \text{ s}^{-1}] \quad (\text{E2})$$

With  $[C]_0$  the initial concentrations of selected compound  $C$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $k$  the pseudo-first order decays ( $\text{s}^{-1}$ ).  $N_{\text{cells}}$  the concentration of cells participating to the biodegradation and determined by CFU counts ( $\text{cells L}^{-1}$ ).

The calculations of the estimated degradation rates in cloud water have been determined by:

- for bacteria : 
$$R_c = k_c \times N_{cells (cloud)} \quad [\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}] \quad (\text{E3})$$

- for free radicals: 
$$R_c^\bullet = k_{c, radical} \times [\text{Radical}] \times [C]_{cloud} \quad [\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}] \quad (\text{E4})$$

With  $[C]_{cloud}$  the initial concentrations of selected compound  $C$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ) in the cloud water,  $k_c$  the biodegradation rate of compound  $C$  ( $\text{mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).  $N_{cells (cloud)}$  the bacterial concentration in cloud water ( $\text{cells L}^{-1}$ ),  $[\text{Radical}]$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ) the concentration of free radical  $\cdot\text{OH}$  or  $\text{NO}_3^\bullet$  from literature and  $k_{c, radical}$  ( $\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) is the 2<sup>nd</sup> order chemical rate constant between compound  $C$  and  $\cdot\text{OH}$  or  $\text{NO}_3^\bullet$  from the literature.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Four strains of bacteria, *Pseudomonas graminis* (DQ512786), *Pseudomonas syringae* (DQ512783), *Frigoribacterium* sp (DQ512796) and *Bacillus* sp 3B6 (DQ512741), isolated from cloud water samples collected at the puy de Dôme summit, were studied. Their isolations and identifications were described elsewhere (see Amato et al., 2007a); briefly pure strains were isolated from individual colonies on Petri dishes and were identified by DNA sequencing and comparison with known sequences in genomic data banks (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). These strains were selected as they belong to genera frequently encountered in atmospheric waters (Amato et al., 2005, 2007a; Fuzzi et al., 1997; Ahern et al., 2007). *Pseudomonas* strains are also usually found on vegetation, *Frigoribacterium* in cold environments and *Bacillus* are more ubiquitous (Amato et al., 2007a).

#### 3.1. Biotransformation of formaldehyde and methanol at 5 °C and 17 °C

Biotransformation of formaldehyde and methanol by the 4 selected strains was investigated using mainly  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy as previously described in Amato et al. (2007b) (see Table S1 in the supplementary data). Our experiments involved formaldehyde and methanol at concentrations higher than those in cloud water (20 mM instead of a few  $\mu\text{M}$ ) to allow analysis by NMR. However the substrate to cell ratios used in the incubation media were similar to those found in natural clouds. In a previous work (Vařtilingom et al., 2010) we showed that, at the concentrations used, the biodegradation rates did not depend on cell or substrate concentrations at given substrate to cell ratio.

### ***Biotransformation of methanol***

The biodegradation rates of methanol measured from  $^1\text{H}$  NMR experiments at both 5 °C and 17 °C by the four bacterial strains are reported in Table 2. They are expressed as mole of compound degraded per cell and per second. At 17 °C, all strains degraded methanol, at rates ranging from  $10^{-21}$  to  $10^{-23}$  mol cell $^{-1}$  s $^{-1}$ . At 5 °C, the rates of methanol transformation were lower and could be only measured for two strains, *P. syringae* and *Frigoribacterium* sp.; these were  $5.8 \times 10^{-22}$  and  $2.5 \times 10^{-23}$  mol cell $^{-1}$  s $^{-1}$ , respectively.

Considering the metabolic pathways involved in the transformation of C1 compounds, no intermediate was detected, suggesting that methanol was directly oxidized into formaldehyde, then formate and CO $_2$  as described in Figure 1.

### ***Biotransformation of formaldehyde***

The biotransformation of  $^{13}\text{C}$ -formaldehyde at 5 °C and 17 °C was studied by  $^1\text{H}$  NMR or  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. The degradation rates measured are reported in Table 1 for the four bacterial strains. Formaldehyde was efficiently degraded by all four studied bacterial strains, with values ranging between  $10^{-19}$  -  $10^{-21}$  mol cell $^{-1}$  s $^{-1}$  at both temperatures 17 °C and 5 °C. Thus, contrarily to methanol, low temperature was not a limiting factor for formaldehyde bacterial degradation.

In addition metabolites detected on NMR spectra allowed to confirm the metabolic routes described in Figure 1. First, the 4 strains were able to produce methanol by reduction of formaldehyde; in all cases methanol remained in the incubation medium and accumulated since its degradation was much slower (see above). Second, the 4 strains were also oxidizing formaldehyde into formate. In the case of *Bacillus* sp, *P. syringae* and *P. graminis*, formate concentration decreased with time as it was further transformed into CO $_2$ . This result is consistent with our previous observations showing that *P. syringae* and *P. graminis* were good formate degraders (Vaïtilingom et al., 2010). In the case of *Bacillus* sp, the formation of  $^{13}\text{CO}_2$  was clearly detected (see later Figure 2). In the case of *Frigobacterium* sp. formate originating from the oxidation of formaldehyde accumulated in the incubation medium. This later point was verified by incubating this strain in the presence of formate: its degradation was extremely slow and the measured degradation rates were  $0.2 \times 10^{-22}$  and  $1.2 \times 10^{-21}$  mol cell $^{-1}$  s $^{-1}$  at 5 °C and 17 °C, respectively.

Special attention was paid to the metabolism of *Bacillus* sp 3B6 for different reasons: first, although representatives of this genus are very frequently found in the atmosphere, few studies have linked their metabolism to atmospheric processes; second, this particular strain

was found to degrade herbicides (Durand et al., 2006), to synthesize oligosaccharides (Matulová et al., 2011) and was thought to be a good candidate having specific properties towards C1 compounds. Its metabolism was thus studied in details using a more sophisticated approach, namely *in vivo*  $^{13}\text{C}$ -NMR. The monitoring of  $^{13}\text{C}$ -formaldehyde biotransformation at 17 °C by *Bacillus* sp 3B6 is presented in Figure 2A. Methanol ( $\delta = 49.17$  ppm), formate ( $\delta = 170.24$  ppm) and  $\text{HCO}_3^-$  ( $\delta = 160.5$ ) are the metabolites of formaldehyde expected from the C1 metabolic pathway described in Figure 1. Figure 3 shows that the transformation of  $^{13}\text{C}$ -formaldehyde was completed after 200 min, that of formate after 300 min while methanol decreased very slowly after 200 min over time after its formation (this is consistent with the very low degradation rate of methanol by this strain, see Table 2). When *in vivo*  $^{13}\text{C}$  NMR is performed,  $^{13}\text{CO}_2$  is distributed between the aqueous phase ( $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ ) and the gas phase ( $^{13}\text{CO}_{2\text{gas}}$ ).  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  is in the measurement area of the spectrometer and can thus be detected by  $^{13}\text{C}$  NMR;  $^{13}\text{CO}_{2\text{gas}}$  is out of the measurement area and doesn't give any  $^{13}\text{C}$  NMR signal. As soon as  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  is formed, part of it goes to the gas phase ( $^{13}\text{CO}_{2\text{gas}}$ ), as a result the concentration of  $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$  seems to remain constant with time. Besides these main metabolites, other  $^{13}\text{C}$  NMR signals (Figure 2B) indicated the presence of glycerol ( $\delta = 72.37; 63.05$  ppm), propane-1,2-diol ( $\delta = 68.28, 67.75, 18.78$  ppm) and propane-1,3-diol ( $\delta = 61.76, 34.13$  ppm). The biotransformation of formaldehyde into propane-1,2- and 1,3-diol has been already described in *E. coli* (Hunter et al., 1984). These 3 metabolites were accumulating with time in the medium (see Figure 2A). In addition transient signals of low intensity corresponding to the carbons of serine could be identified ( $\delta = 60.65, 62.45$  and 174, 0 ppm). The presence of these metabolites demonstrated that formaldehyde can enter serine metabolism, which is connected to the metabolism of glycerophospholipid and then to that of glycerolipid involving glycerol. Glycerol can then be converted into propane-1,3-diol and propane-1,2-diol. (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>, see Figures S1, S2, S3 and S4 in the supplementary data). This complex metabolism, involving a large number of enzymes, shows that functionalisation and condensation to larger molecules (C3 compounds) from formaldehyde (C1 compound) is also possible.

### **3.2. Comparison with radical chemistry**

Oxidation processes in the atmosphere are largely catalyzed by free radicals, of which the principals are  $\cdot\text{OH}$  and  $\text{NO}_3\cdot$ . Radical hydroxyls are generated by photochemical pathways and are implicated in the oxidation processes existing in the atmosphere during the day, while nitrate radicals are the most efficient radical oxidants during the night (Finlayson-Pitts and



Pitts, 1997). Hence, in order to compare microbiological with radical chemistry processes on the transformation of methanol and formaldehyde, we have considered their reactivity with  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{NO}_3\cdot$  (Table 3). The rate constants of  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{NO}_3\cdot$  measured at 25 °C have been extrapolated at 5 °C and 17 °C by using the temperature dependency of the kinetic constants. For microbial activity the average rate between the four strains was used (Table 2).

We extrapolated our results to typical chemical and microbial concentrations measured in cloud waters at puy de Dôme: i) concentrations of 6.5  $\mu\text{M}$  and 2.0  $\mu\text{M}$  for formaldehyde as mean values for urban and remote clouds respectively (Parazols, 2007); ii) active biomass of  $8.1 \times 10^4$  bacteria  $\text{mL}^{-1}$  (Amato et al., 2007c). As no methanol was measured at the puy de Dôme station, we used the value of 0.7  $\mu\text{M}$  given by Snider and Dawson (1985).

For free radical concentrations, we have used the latest values published recently by Tilgner and Herrmann (2010) who considered clouds from urban origin ( $[\cdot\text{OH}] = 1 \times 10^{-14}$  mol  $\text{L}^{-1}$  and  $[\text{NO}_3\cdot] = 2 \times 10^{-13}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ); and clouds from remote origin ( $[\cdot\text{OH}] = 5 \times 10^{-14}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ;  $[\text{NO}_3\cdot] = 5 \times 10^{-15}$  mol  $\text{L}^{-1}$ ). These values are simulated by a cloud chemistry model that considers explicit multiphase chemistry. TMI (iron, manganese, copper),  $\text{H}_x\text{O}_y$ , nitrogen, sulphur and organic chemistry is taken into account and calculations are performed to simulate concentrations of radicals as a function of chemical scenarios (remote and polluted environments) and photochemical conditions (night vs. day).

These conditions were used to quantify the relative participation of bacterial activity and free radicals reactivity to the oxidation of methanol and formaldehyde during the day and during the night (Figure 4).

In clouds from urban origin (Figure 4A), at 5 °C, in the presence of sunlight,  $\cdot\text{OH}$  radicals are present and bacterial activity would account for 0 % and 5 % of the degradation of methanol and formaldehyde respectively; during the night, biological activity would only compete with  $\text{NO}_3\cdot$  radicals and its participation to the oxidation of methanol and formaldehyde would reach 32 % to 71 %. At 17 °C, the contribution of bacterial activity to the oxidation of methanol and formaldehyde would slightly increase (3 % and 7 %, respectively) during daytime and bacteria would become the major actors at night (79 % and 90 % respectively). In conclusion, in urban clouds, the contribution of bacteria is not negligible during the day under typical summer time conditions (17 °C); this is especially true for formaldehyde degradation. At night, bacteria are much more active than  $\text{NO}_3\cdot$  at both temperatures for formaldehyde degradation, and for methanol at high temperature. However the activity of  $\text{NO}_3\cdot$  is the most important factor for methanol degradation at low temperature, and remains important at 17 °C.

In clouds from remote origin (Figure 4B), during day time, the influence of bacterial activity is less important than that observed in urban case, its contribution varies from 0 % to 1 % for methanol degradation (at 5 and 17 °C respectively) and from 3 % to 5 % for formaldehyde degradation (at 5 and 17 °C respectively) and is thus very low compared to  $\cdot\text{OH}$  activity. However, the reverse situation is observed during night time, bacterial activity becomes almost the only actor compared to  $\text{NO}_3\cdot$  it accounts for 95 to 99 % of methanol degradation at 5 and 17 °C respectively and for 100 % of formaldehyde degradation at both temperatures. Clearly, these results show that  $\text{NO}_3\cdot$  have a very little influence on methanol and formaldehyde degradation in clouds from remote origin compared to enzymatic activity; as a consequence microbial activity would be driving the chemical reactivity of C1 compounds in warm clouds ( $\geq 5^\circ\text{C}$ ) during the night.

#### 4. CONCLUSIONS

The biodegradation of methanol and formaldehyde by strains from cloud water collected at puy de Dôme were already demonstrated to occur under optimal conditions of temperature (Amato et al., 2005, 2007b). Here we brought new evidences that biodegradation is also possible at *in situ* temperatures: 5 °C and 17 °C, corresponding to the annual average and maximum temperatures of clouds at puy de Dôme. This is consistent with their ability to grow at 5 °C (Amato et al., 2007a), and attests of the presence of cold tolerant enzymes. Also this study allowed the comparison between microbial transformations of methanol and formaldehyde with radical pathways.

The metabolic pathways of photo- and bio-degradation of methanol and formaldehyde presented some similarities. As an example, photochemistry, through the production of radicals, is involved in the progressive oxidation of organic compounds to  $\text{CO}_2$  in cloud water. The final step is constituted by the oxidization of formate (Monod et al., 2000; Herrmann et al., 2005), and this reaction can also be catalyzed by three out of the four microbial strains studied here (*P. graminis*, *P. syringae* and *Bacillus* sp). Methanol can be oxidized into formaldehyde by the four strains tested or by reactivity with free radicals (see Figure 1). The main difference between radical chemistry and biological activity is the ability of some microbes to catalyze the reduction of formaldehyde into methanol even under very oxidative conditions. In addition, we showed the ability of *Bacillus* sp strain to produce complex compounds such as propane-1,2-diol, propane-1,3-diol and glycerol. This last point is of importance concerning atmospheric chemistry as it suggests that not only successive

oxidations that lead to shorten molecules can occur in cloud water but also reactions that can result in compounds of larger molecular size. In our study, C3 molecules have been built from a C1 compound. It is of major importance to be aware that such functionalization processes in the atmosphere, identified as determining for atmospheric sciences (Hallquist et al., 2009; Blando and Turpin, 2000), can be catalyzed by microorganisms.

Second, the relative contributions of microbial and radical activities ( $\cdot\text{OH}$  and  $\text{NO}_3\cdot$ ) have been quantitatively evaluated. Clearly, measured biological and chemical reaction rates are in the same range of magnitude, and their relative contribution varies according to the scenarios we have tested, including the temperature of the clouds (5 or 17 °C), the origin of the clouds (urban and remote) and the diurnal cycle (day and nighttime). The general conclusions are the following: i) bacteria activity is always more favored at higher temperatures, therefore it will be limited to warm clouds; ii) during daytime,  $\cdot\text{OH}$  are obviously the preponderant actors. However biotransformation processes could be the main sink for C1 compounds during nighttime where the radical chemistry is less efficient than enzymatic reactions. This is explained by the kinetic constant of  $\text{NO}_3\cdot$  with these organic compounds that are lower than those with  $\cdot\text{OH}$  and by the lower  $\text{NO}_3\cdot$  concentration during the night compared to those of  $\cdot\text{OH}$  during the day. The same conclusions were reached in our previous study where we had considered organic acids such as formate, succinate and acetate (Vařtilingom et al., 2010); iii) the origin of air masses modulates the extent of the previous conclusion. Indeed  $\text{NO}_3\cdot$  reactivity which is negligible at night compared to bacteria in remote clouds becomes of some importance in urban clouds, this is due to the higher concentration of  $\text{NO}_3$  in polluted clouds compared to non polluted ones. However, we are aware that our experimental approach leads to some simplifications where some stressful factors for microorganisms are not considered (very acidic medium, presence of highly toxic chemical species that can characterized polluted clouds).

In conclusion, our results reinforce the hypothesis of the existence of a microbial activity in cloud droplets. It is therefore timely to consider biodegradation in parallel to free radicals oxidation among the processes catalyzing atmospheric transformation of organic matter in clouds and thus to complete cloud chemistry models integrating both chemical and biological components.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

The research is funded by CNRS and French Ministry of Research under LEFE-CHAT and SO-BEAM programs. Mickaël Vaïtilingom acknowledges Ph.D scholarship from the French Ministry of Research. Stephane Fontanella and Nicolas Gaiani are gratefully acknowledged for their technical contribution to these studies. Mária Matulová and Slavomíra Husárová were supported by Slovak Research and Development Agency APVV (Štefánik project N° 17947UE (SK-FR-0009-07), the French Government scholarship, (fellowship for S. Husárová), the Slovak Grant Agency VEGA No. 2/0116/10 and the Slovak state program 2003SP200280203.

## 6. REFERENCES

- Ahern H.E., Walsh K.A., Hill T.C.J., Moffett B.F., 2007. Fluorescent pseudomonads isolated from Hebridean cloud and rain water produce biosurfactants. *Biogeosciences* 4, 115-124.
- Altshuller A. P., 1993. Production of aldehydes as primary emissions and from secondary atmospheric reactions of alkenes and alkanes during the night and early morning hours. *Atmospheric Environment* 27, 21-31.
- Amato P., Ménager M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G., Delort A.-M., 2005. Microbial population in cloud water the Puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds. *Atmospheric Environment* 39, 4143-4153.
- Amato P., Parazols M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G., Delort A.-M., 2007a. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology* 59, 255-264.
- Amato P., Demeer F., Melaouhi A., Fontanella S., Martin-Biesse A.-S., Sancelme M., Laj P., Delort A.-M., 2007b. A fate of organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by microorganisms. *Atmospheric Chemistry and Physics* 7, 4159-4169.
- Amato P., Parazols M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G., Delort A.-M. 2007c., An important oceanic source of microorganisms for cloud water at the puy de Dôme (France). *Atmospheric Environment* 41, 8253-8263.
- Anderson L. G., Lanning J. A., Barrel R., Mityagishima J., Jones R. H., and Wolfe P., 1996. Sources and sinks of formaldehyde and acetaldehyde: An analysis of Denver's ambient concentration data. *Atmospheric Environment* 30, 2113-2123.
- Atkinson R., Baulch D.L., Cox R.A., Nrowley C.J., Hampson R.F., Hynes R.G., Jenkin M.E., Rossi M.J., Troe J., 2006. Evaluated kinetic and photochemical data for atmospheric chemistry: Volume II – gas phase reactions of organic species. *Atmospheric Chemistry and Physics* 6, 3625-4055.
- Ariya P. A., Amyot M., 2004. New directions: the role of bioaerosols in atmospheric chemistry and physics. *Atmospheric Environment* 38, 1231-1232.

- Bauer H., Kasper-Giebl A., Löflund M., Giebl H., Hitzenberger R, Zibuschka F., Puxbaum H., 2002. The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. *Atmospheric Research* 64, 109-119.
- Blando J.D., Turpin B.J., 2000. Secondary organic aerosol formation in cloud and fog droplets: a literature evaluation of plausibility. *Atmospheric Environment* 34, 1623-1632.
- Brunner A., Ammann C., Neftel A., Spirig C., 2007. Methanol exchange between grassland and the atmosphere. *Biogeosciences* 4, 395-410.
- Carlier P., Hannachi H., Mouvier G., 1986. The chemistry of carbonyl compounds in the atmosphere. *Atmospheric Environment* 20, 2079-2099.
- Chin M., Wine P.H., 1994. A temperature-dependent competitive kinetics study of the aqueous phase reactions of OH radicals with formate, formic acid, acetate, acetic acid and hydrated formaldehyde, in: Helz G. R. et al. (Eds) *Aquatic and Surface Photochemistry*, Lewis Publishers: Boca Raton, 85-96.
- Chorao C., Charmantray F., Besse-Hoggan P., Sancelme M., Cincilei A., Traïkia M., Mailhot G., Delort A.-M., 2009. 2-Aminobenzothiazole degradation by free and Ca-alginate immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous*. *Chemosphere* 75, 121-128.
- Collett Jr J.L., Daube Jr B.C., Gunz D., Hoffmann M.R., 1990. Intensive studies of Sierra Nevada cloudwater chemistry and its relationship to precursor aerosol and gas concentrations. *Atmospheric Environment* 24A-7, 1741-1757.
- Collett Jr. J.L., Hoag K.J., Sherman D.E., Bator A., Willard Richards L., 1999. Spatial and temporal variations in San Joaquin Valley fog chemistry. *Atmospheric Environment* 33-1, 129-140.
- Deguillaume L., Leriche M., Amato P., Ariya P.A., Delort A.-M., Pöschl U., Chaumerliac N., Bauer H., Flossmann A.I., Morris C.E., 2008. Microbiology and atmospheric processes: chemical interactions of primary biological aerosols. *Biogeosciences* 5, 1073-1084.
- Delort A.-M., 2006. Chapter 9. Use of NMR to study in situ bioconversion of gaseous compounds, *In* P. Lens, (Ed.), *Gas resources for resource recovery*, IWA Publishing, London; 117-131.
- Delort A.-M., Vaïtilingom M., Amato P., Sancelme M., Parazols M., Laj P., Mailhot G., Deguillaume L., 2010. A short overview of the microbial population in clouds: potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes. *Atmospheric Research*, 98, 249-260.
- Dufour G., Szopa S., Hauglustaine D.A., Boone C.D., Rinsland C.P., Bernath P.F., 2007. The influence of biogenic emissions on upper-tropospheric methanol as revealed from space. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions* 7, 6119-6129.
- Durand S., Amato P., Sancelme M., Delort A.-M., Combourieu B., Besse-Hoggan P., 2006. First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. *Letters in Applied Microbiology* 43, 222-228.
- Economou, C., Mihalopoulos N., 2002. Formaldehyde in the rainwater in the eastern Mediterranean: occurrence, deposition and contribution to organic carbon budget. *Atmospheric Environment* 36-8, 1337-1347.

- Elliot A.J., McCracken D.R., 1989. Effect of temperature on O reactions and equilibria: A pulse radiolysis study, *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry* 33, 69-74.
- Exner M., Herrmann H., Michel J.W., Zellner R., 1993. Laser pulse initiated measurements of NO<sub>3</sub> reactions with S(IV) and organic compounds in aqueous solutions, in: Borrell P.M. et al. (Eds), *Proceedings of EUROTRAC Symposium 92: Photo-oxydants: Precursors and Products*, SPB Academic Publishing, The Hague, 615-618.
- Finlayson-Pitts B., Pitts J.J.R., 1997. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* 276, 1045–1051.
- Finlayson-Pitts B.J., Pitts J.N., 2000. *Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere: Theory, Experiments and Applications*, Academic Press, San Diego.
- Fuzzi S., Mandrioli P., Perfetto A., 1997. Fog droplets – An atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmospheric Environment* 31, 287-290.
- Galbally I. E., Kirstine W., 2002. The Production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. *Journal of Atmospheric Chemistry* 43, 195–229.
- Grosjean D., Wright B., 1983. Carbonyls in urban fog, ice fog, cloudwater and rainwater. *Atmospheric Environment* 17, 2093–2096.
- Hallquist M., Wenger J.C., Baltensperger U., Rudich Y., Simpson D., Claeys M., Dommen J., Donahue N.M., George C., Goldstein A.H., Hamilton J.F., Herrmann H., Hoffmann T., Iinuma Y., Jang M., Jenkin M.E., Jimenez J.L., Kiendler-Scharr A., Maenhaut W., McFiggans G., Mentel Th.F., Monod A., Prévôt A.S.H., Seinfeld J.H., Surratt J.D., Szmigielski R., Wildt J., 2009. The formation, properties and impact of secondary organic aerosol: current and emerging issues, *Atmospheric Chemistry and Physics* 9, 5155-5236.
- Hanson R.S., Hanson T.E., 1996. Methanotrophic Bacteria. *Microbiological Reviews* 60, 439-471.
- Herrmann H., Zellner R., 1998. Reactions of NO<sub>3</sub> radical in aqueous solutions, in: Alfassi Z.B. (Ed.), *N-Centered Radicals*, John Wiley and Sons, Ltd, New York, 291-343.
- Herrmann H., Tilgner A., Barzagli P., Majdik Z., Gligorovski S., Poulain L., Monod A., 2005. Towards a more detailed description of tropospheric aqueous phase organic chemistry: CAPRAM 3.0. *Atmospheric Environment* 39, 4351-4363.
- Hill K.A., Shepson P.B., Galdavy E.S., Anastasio C., Kourtev P.S., Konopka A., Stirm B.H., 2007. Processing of atmospheric nitrogen by clouds above forest environment. *Journal of Geophysical Research* 112, D11301, doi:10.298/2006JD008002.
- Holzinger R., Warneke C., Jordan A., Hansel A., Lindinger W., 1999. Biomass burning as a source of formaldehyde, acetaldehyde, methanol, acetone, acetonitrile and hydrogen cyanid, *Geophysical Research Letters* 26(8), 1161–1164.
- Hunter B.K., Nicholls K.M., Sanders J.K.M., 1984. Formaldehyde metabolism by *Escherichia coli*. *In vivo* carbon, deuterium and two-dimensional NMR observations of multiple detoxifying pathways. *Biochemistry* 23, 508-514.
- Igawa M., Munger, J.W., Hoffmann, M. R., 1989. Analysis of aldehydes in cloud- and fogwater samples by HPLC with a postcolumn reaction detector. *Environmental Science and Technology* 23, 556–561.

- Jacob D.J., Waldman J.M., Munger J.W., Hoffmann M.R., 1984. A field investigation of physical and chemical mechanisms affecting pollutant concentrations in fog droplets. *Tellus* 36B, 272-285.
- Jacob D. J., Field B. D., Li Q., Blake D. R., de Gouw J., Warneke C., Hansel A., Wisthaler A., Singh H. B., Guenther A., 2005. Global budget of methanol: Constraints from atmospheric observations. *Journal of Geophysical Research* 110. 1-17.
- Kawamura K., Steinberg S., Ng L., Kaplan I. R., 2001. Wet deposition of low molecular weight mono- and di-carboxylic acids, aldehydes and inorganic species in Los Angeles. *Atmospheric Environment* 35, 3917-3926.
- Kawamura K., Imai Y., Barrie L.A., 2005. Photochemical production and loss of organic acids in high Arctic aerosols during long-range transport and polar sunrise ozone depletion events. *Atmospheric Environment* 39, 599-614.
- Kieber R.J., Rhines M.F., Willey J.D., Brooks G., Avery Jr., 1999. Rainwater formaldehyde: Concentration, deposition and photochemical formation. *Atmospheric Environment* 33, 3659-3667.
- Largiuni, O., Giacomelli M.C., Piccardi G., 2002. Concentration of peroxides and formaldehyde in air and rain and gas-rain partitioning. *Journal of Atmospheric Chemistry* 41-1, 1-20.
- Marinoni A., Laj P., Sellegri K., Mailhot G., 2004. Cloud chemistry at the puy de Dôme: variability and relationships with environmental factors. *Atmospheric Chemistry and Physics* 4, 715-728.
- Matulová M., Husárová S., Capek P., Sancelme M. and Delort A.-M., 2011. NMR structural study of fructans produced by bacillus sp. 3B6, bacterium isolated in cloud water, *Carbohydrate Research* 346, 501-507.
- Monod A., Chebbi A., Durand-Jolibois R., Carlier P., 2000. Oxidation of methanol by hydroxyl radicals in aqueous solution under simulated cloud droplet conditions. *Atmospheric Environment* 34, 5283-5294.
- Munger J.W., Jacob D.J., Daube B.C., Horowitz L.W., 1995. Formaldehyde, glyoxal, and methylglyoxal in air and cloudwater at a rural mountain site in central Virginia. *Journal of Geophysical Research* 100-D5, 9325-9333.
- Parazols M., 2007. Caractérisation physico-chimique et réactivité de la phase aqueuse des nuages prélevée au sommet du puy de Dôme. PhD Thesis, Université Blaise Pascal.
- Peña, M.R., García S., Herrero C., Losada M., Vázquez A., Lucas T., 2002. Organic acids and aldehydes in rainwater in a northwest region of Spain. *Atmospheric Environment* 36, 5277-5288.
- Polkowska Z., Skarzynska K., Gorecki T., and Namiesnik J., 2006. Formaldehyde in Various Forms of Atmospheric Precipitation and Deposition from Highly Urbanized Regions. *Journal of Atmospheric Chemistry* 53, 211-236.
- Reasoner D.J., Geldreich E.E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1-7.
- Richards L.W., 1995. Airborne chemical measurements in nighttime stratus clouds in the Los Angeles basin. *Atmospheric Environment* 29-1, 27-46.

- Sattler B., Puxbaum H., Psenner R., 2001. Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophysical Research Letters* 28, 239-242.
- Sander R., 1999. Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and 1044 Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry 1045 (Version 3). <http://www.henrys-law.org>.
- Singh H., Chen Y., Tabazadeh A., Fukui Y., Bey I., Yantosca R., Jacob D., Arnold F., Wohlfrom K., Atlas E., Flocke F., Blake D., Blake N., Heikes B., Snow J., Talbot R., Gregory G., Sachse G., Vay S., Kondo Y., 2000. Distribution and fate of selected oxygenated organic species in the troposphere and lower stratosphere over the Atlantic. *Journal of Geophysical Research* 105, 3795-3805.
- Singh H., Chen Y., Staudt A., Jacob D., Blake D., Heikes B. and Snow J., 2001. Evidence from Pacific troposphere for large global sources of oxygenated organic compounds. *Nature*. 410, 1078-1081.
- Snider J.R., Dawson G.A., 1985. Tropospheric light alcohols, carbonyls and acetonitrile: Concentrations in the southwestern United States and Henry's law data. *Journal of Geophysical Research* 90-D2, 3797-3805.
- Tie X., Guenther A., Holland E., 2003. Biogenic methanol and its impacts on tropospheric oxidants. *Geophysical Research Letters* 30-17, 1881, doi:10.1029/2003GL017167.
- Tilgner A., Herrmann H., 2010. Radical-driven carbonyl-to-acid conversion and acid degradation in tropospheric aqueous systems studied by CAPRAM, *Atmospheric Environment* 44-40, 5415-5422.
- Vaätilingom M., Amato P., Sancelme M., Laj P., Leriche M., Delort A.-M., 2010. Contribution of microbial activity to carbon chemistry in clouds. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 23-29.
- Van Pinxteren D., Plewka A., Hofmann D., Müller K., Kramberger H., Svrčina B., Bächmann K., Jaeschke W., Mertes S., Collett Jr J.L., Herrmann H., 2005. Schmücke hill cap cloud and valley stations aerosol characterisation during FEBUKO (II): organic compounds. *Atmospheric Environment* 39, 4305-4320.



## **Figure legends**

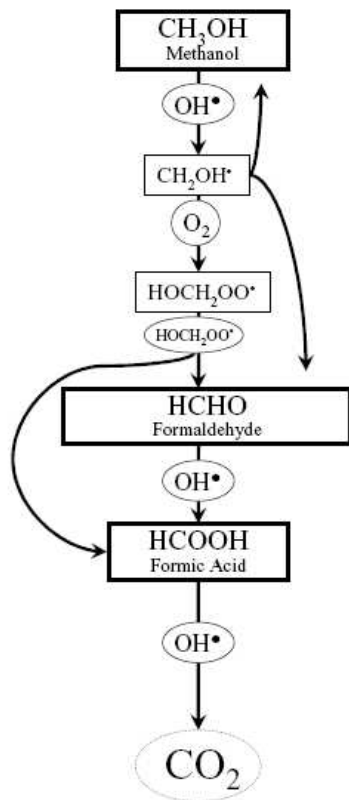
**Figure 1:** Non-exhaustive schemes of the ways of degradation of C<sub>1</sub> compounds by radical chemistry and by metabolism. The scheme corresponding to radical chemistry has been drawn from reactions given in Monod et al. (2000) and references therein. C<sub>1</sub> metabolism scheme was reconstructed from Hanson and Hanson (1996), and Delort (2006) and references therein. Known enzymes are described for each reaction in which they can be involved, as well as cofactors when required (the dot line in the case of Formate, dehydrogenase signifies the existence of several types of this enzyme, with and without a cofactor). NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide; H<sub>4</sub>F: Tetrahydrofolate; H<sub>4</sub>MPT: Dephospho-tetrahydromethanopterin; GSH: Glutathione; MySH: Mycothiol.

**Figure 2:** A) *in vivo* <sup>13</sup>C NMR spectra collected during the incubation of *Bacillus* sp 3B6 with <sup>13</sup>C formaldehyde; B) Example of *in vivo* <sup>13</sup>C NMR spectrum collected after 4 hours. Cell concentration was 10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup> and substrate concentration was 20 mM.

**Figure 3:** Time course of the concentrations of <sup>13</sup>C-formaldehyde (●), <sup>13</sup>C-methanol (■), <sup>13</sup>C-formate (▼) and H<sup>13</sup>CO<sub>3</sub><sup>-</sup> (▲) measured by *in vivo* <sup>13</sup>C NMR during the incubation by *Bacillus* sp 3B6 sp at 17 °C.

**Figure 4:** Estimated relative influence of bacterial activity and free radicals (<sup>•</sup>OH and NO<sub>3</sub><sup>•</sup>) on the degradation of methanol and formaldehyde in cloud water at 5°C and 17°C during the day and the night for both cloud air mass types: urban (A) and remote (B) cases. During nighttime (i.e. in the absence of photochemical reactivity), <sup>•</sup>OH radicals are considered not present. The rates of degradation for cloud conditions are those reported in Table 2.

## RADICAL CHEMISTRY



## C<sub>1</sub> METABOLISM

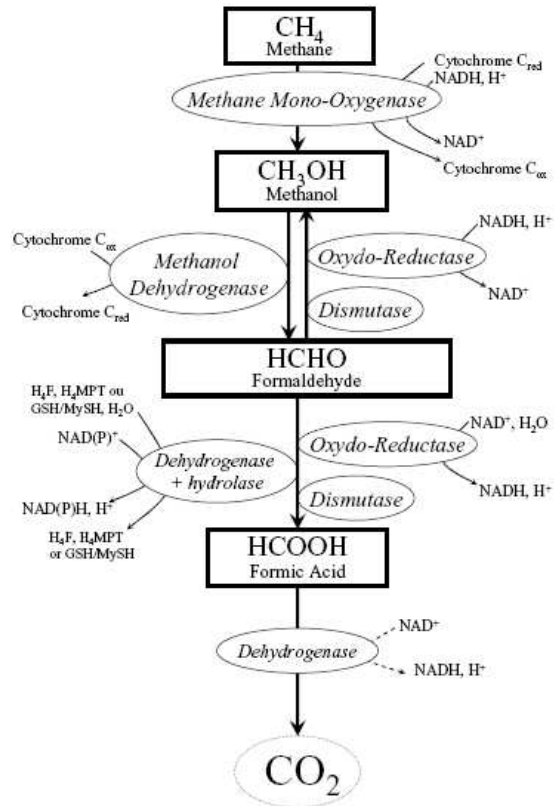


Figure 1

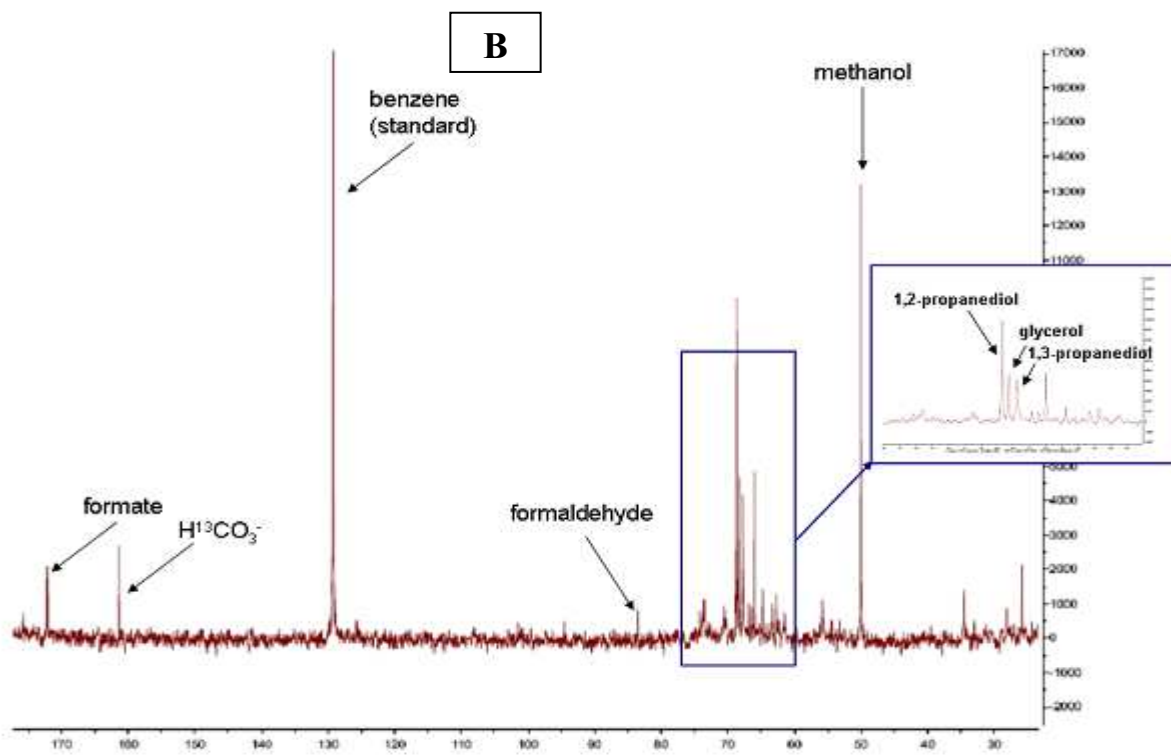
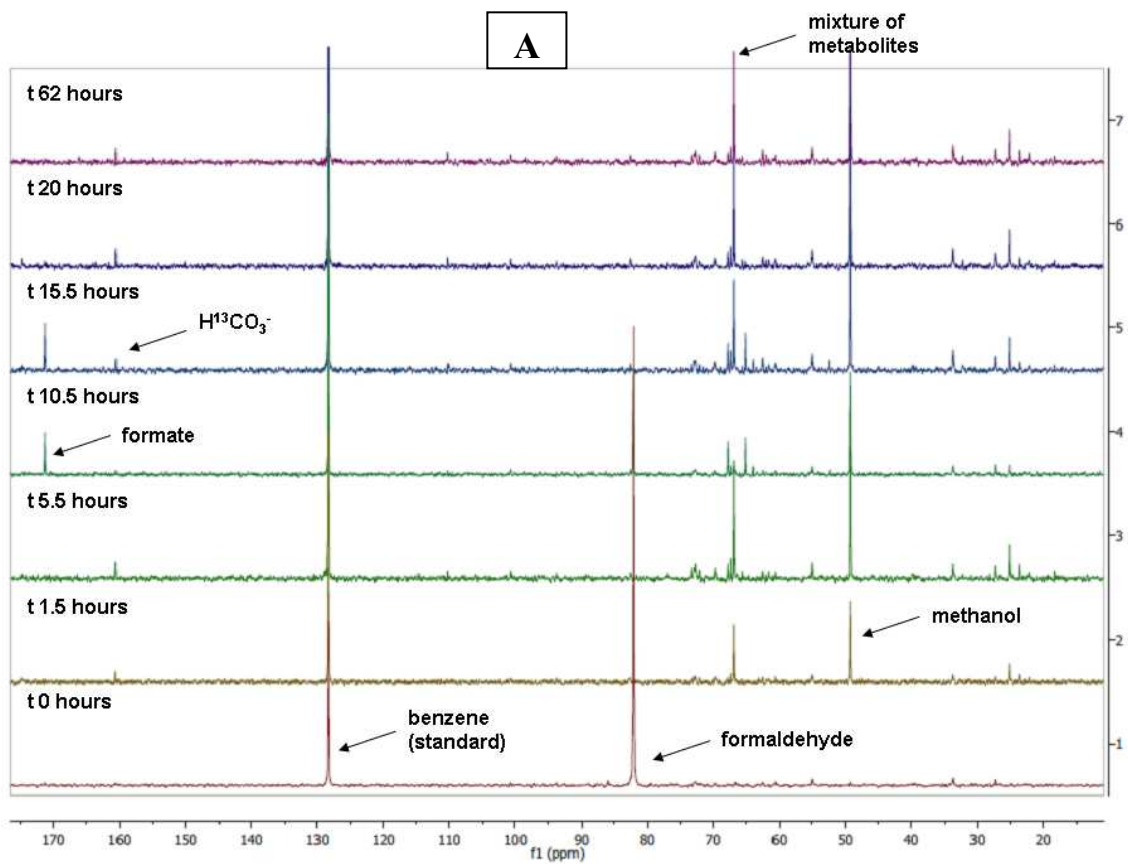


Figure 2

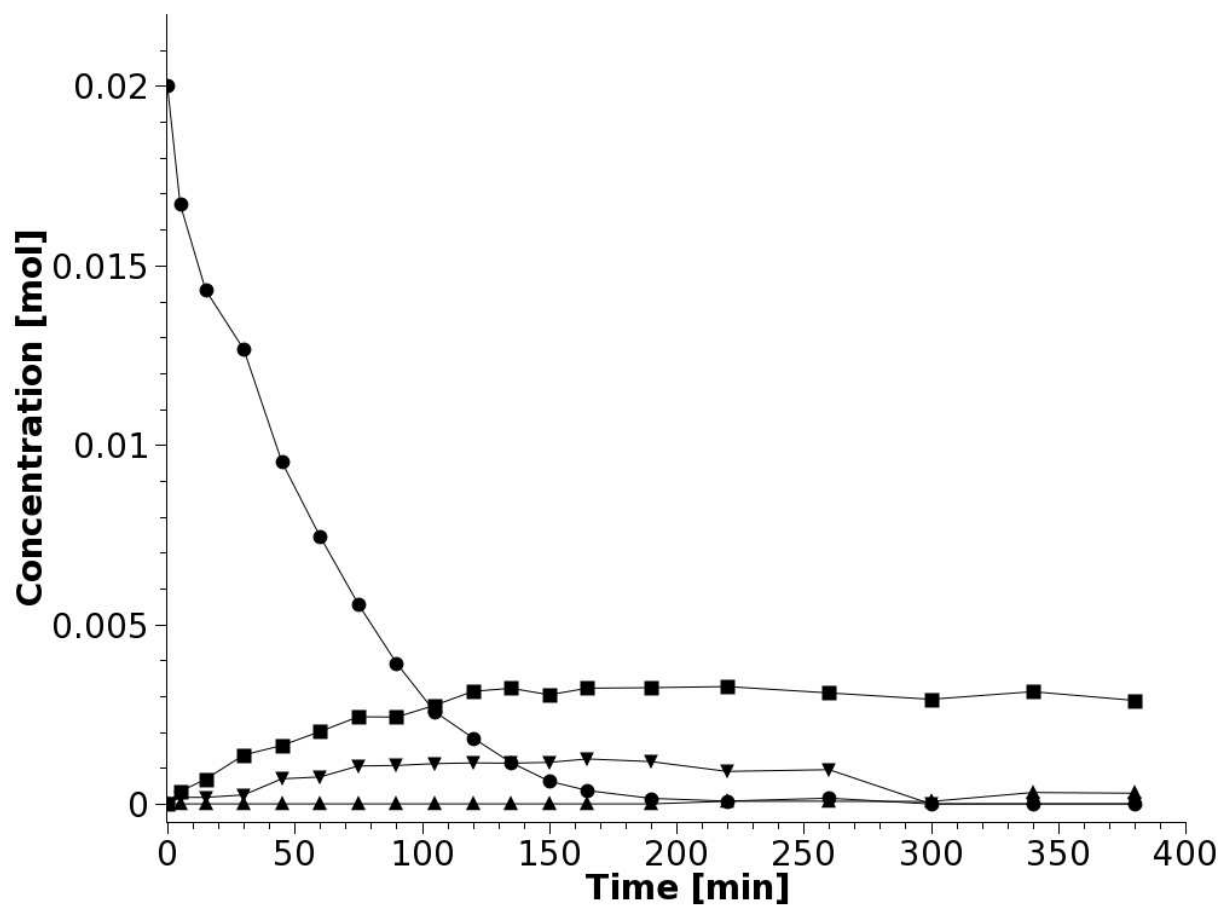
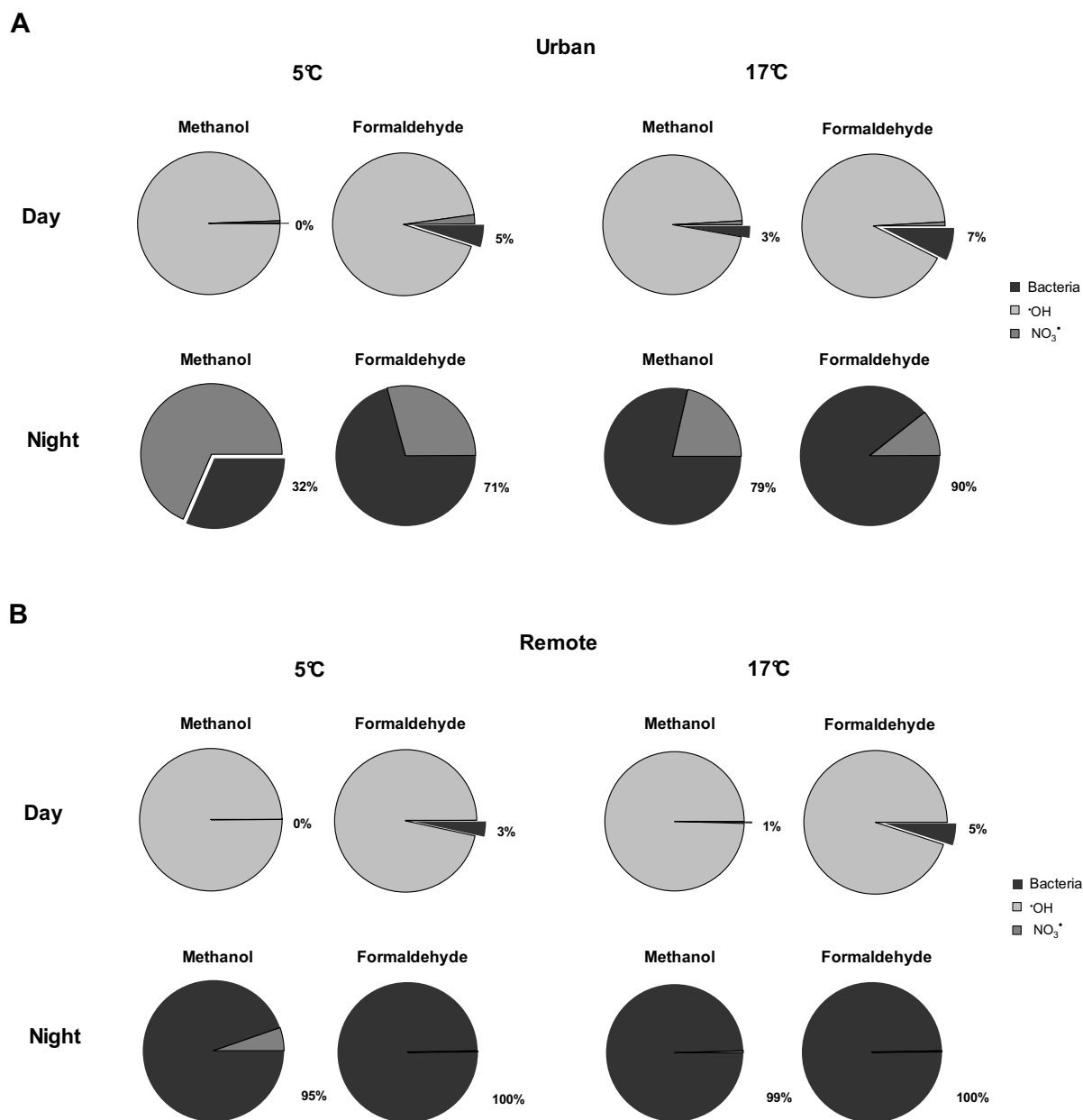


Figure 3



**Figure 4**

**Table 1:** Methanol and formaldehyde concentrations measured in atmospheric waters (rain, fog and cloud) at different sampling sites under various influence (continental, marine, urban, polluted).

Compound	Sites	Samples	Concentrations ( $\mu\text{M}$ )		References
			Min-Max or	(average)	
<b>HCHO</b>					
	Wilmington, Rural with maritime influence (NC, US)	rain	<0,001-13		Kieber et al., 1999
	San Rita, Rural (Arizona, US)	rain	(7.33)		Snider and Dawson, 1985
	Florence, Urban (Italy)	rain	0.16-14.8		Larguini et al., 2002
	Heraklion, Coastal Urban (Crete)	rain	0.4-11.1		Economou and Mihalopoulos, 2002
	Gdansk Wrzeszcz, Urban (Poland)	rain	1.7 – 44		Polkowska et al., 2006
	Los Angeles, Urban (California, US)	rain	0.85-45		Kawamura et al., 2001
	Los Angeles, Urban (California, US)	rain	0-20		Grosjean and Wright, 1983
	Galicia, rural with anthropogenic influence from a thermal power plant (Northwest Spain)	rain	0.2-2.1		Pena et al., 2002
	Sierra Nevada, Rural (US)	cloud	8-14		Collett, Jr. et al., 1990
	5 sites, Virginia, Rural (US)	cloud	0.8-228		Munger et al., 1995
	Los Angeles, Urban (US)	cloud	6-43		Richards, 1995
	Henninger flat, Rural (California, US)	cloud	0.3-36		Grosjean and Wright, 1983
	San Pedro Hill, Coastal (California, US)	cloud	13.6-37.3		Igawa et al., 1989
	Henninger flat, Inland Mountainous site (California, US)	cloud	45.9-61.5		Igawa et al., 1989
	puy de Dôme mountain (air masses from various origins) (Fr)	cloud	0.1-14.3 (2.0 - remote) (6.5 - polluted)		Parazols, 2007
	San Joaquin, Polluted (California, US)	fog	53-710		Jacob et al., 1984
	San Joaquin, Polluted (California, US)	fog	2.3-410.2		Collett, Jr. et al., 1999
	5 sites, Urban/remote/marine (California, US)	fog	0.3-76.7		Grosjean and Wright, 1983
	Fairbanks, Urban (Alaska, US)	ice fog	16.7-38.7		Grosjean and Wright, 1983
	Riverside campus, Polluted (California, US)	fog	4.1-228		Igawa et al., 1989
<b>CH<sub>3</sub>OH</b>					
	San Rita, Rural (US)	rain	0.7		Snider and Dawson, 1985

**Table 2:** Biodegradation rates ( $\text{mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) of methanol and formaldehyde at 5 °C and 17 °C by microbial strains isolated from cloud samples. Given values are results of first approximation calculations, in which degradation rates were assumed to be linear over time.

Compound	Methanol		Formaldehyde	
	Biodegradation rate ( $\text{mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )			
Strain and temperature	5°C	17°C	5°C	17°C
<i>Pseudomonas graminis</i>	0	$5.6 \times 10^{-22}$	$8.1 \times 10^{-21}$	$1.9 \times 10^{-20}$
<i>Pseudomonas syringae</i>	$5.8 \times 10^{-22}$	$5.7 \times 10^{-21}$	$8.6 \times 10^{-20}$	$1.4 \times 10^{-19}$
<i>Frigoribacterium</i> sp.	$2.5 \times 10^{-23}$	$3.5 \times 10^{-23}$	$6.4 \times 10^{-21}$	$6.4 \times 10^{-21}$
<i>Bacillus</i> sp.	0	$2.9 \times 10^{-21}$	$3.1 \times 10^{-21}$	$2.0 \times 10^{-20}$
<i>Average (<math>\pm</math> Standard deviation)</i>	$1.5 (\pm 2.9) \times 10^{-22}$	$2.3 (\pm 2.6) \times 10^{-21}$	$2.6 (\pm 4.0) \times 10^{-20}$	$4.6 (\pm 6.3) \times 10^{-20}$

**Table 3:** Degradation rates of methanol and formaldehyde extrapolated to cloud conditions (urban and remote) at 5 °C and 17 °C.

Cloud condition	Organism or compound (temp [°C])	Methanol		Formaldehyde	
		Reaction rate or Reaction rate constant *	Rate in cloud water ( $\times 10^{-14}$ mol L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	Reaction rate or Reaction rate constant *	Rate in cloud water ( $\times 10^{-14}$ mol L <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Urban and Remote	Bacteria (5°C)	$1.5 \times 10^{22}$	1.2	$2.6 \times 10^{-20}$	209.5
	Bacteria (17°C)	$2.3 \times 10^{21}$	18.6	$4.6 \times 10^{-20}$	376.0
Urban	·OH (5°C)	$8.7 \times 10^8$ <sup>(a)</sup>	607.3	$6.1 \times 10^8$ <sup>(b)</sup>	3974.5
	·OH (17°C)	$9.5 \times 10^8$ <sup>(a)</sup>	662.9	$7.1 \times 10^8$ <sup>(b)</sup>	4618.1
	NO <sub>3</sub> · (5°C)	$1.9 \times 10^5$ <sup>(c)</sup>	2.7	$3.4 \times 10^5$ <sup>(d)</sup>	85.7
	NO <sub>3</sub> · (17°C)	$3.6 \times 10^5$ <sup>(c)</sup>	5.1	$6.6 \times 10^5$ <sup>(d)</sup>	43.9
Remote	·OH (5°C)	$8.7 \times 10^8$ <sup>(a)</sup>	3036.6	$6.1 \times 10^8$ <sup>(b)</sup>	6114.6
	·OH (17°C)	$9.5 \times 10^8$ <sup>(a)</sup>	3314.5	$7.1 \times 10^8$ <sup>(b)</sup>	7104.8
	NO <sub>3</sub> · (5°C)	$1.9 \times 10^5$ <sup>(c)</sup>	0.1	$3.4 \times 10^5$ <sup>(d)</sup>	0.3
	NO <sub>3</sub> · (17°C)	$3.6 \times 10^5$ <sup>(c)</sup>	0.1	$6.6 \times 10^5$ <sup>(d)</sup>	0.7

\* Reaction rate values (mol s<sup>-1</sup> cell<sup>-1</sup>) are given for bacteria, and reaction rate constant values (L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) are given for free radicals.

The following values of concentrations have been used for calculations of rate in cloud water:

- [bacteria] =  $8.1 \times 10^4$  cell mL<sup>-1</sup> (Amato et al., 2007);

- for urban case [·OH] =  $1 \times 10^{-14}$  mol L<sup>-1</sup> and [NO<sub>3</sub>·] =  $2 \times 10^{-13}$  mol L<sup>-1</sup> (Tilgner and Herrmann, 2010); for remote case [·OH] =  $5 \times 10^{-14}$  mol L<sup>-1</sup>; [NO<sub>3</sub>·] =  $5 \times 10^{-15}$  mol L<sup>-1</sup> (Tilgner and Herrmann, 2010);

- [CH<sub>3</sub>OH] =  $7 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> (for urban and remote case);

- for urban case [HCHO] =  $6.5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> and for remote case [HCHO] =  $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>.

<sup>(a)</sup> (Elliot and McCracken, 1989), <sup>(b)</sup> (Chin and Wine, 1994), <sup>(c)</sup> (Herrmann and Zellner, 1998), <sup>(d)</sup> (Exner et al., 1993).



## Electronic supplementary material

---

### **Biotransformation of methanol and formaldehyde by bacteria isolated from clouds. Comparison with radical chemistry**

Slavomíra Husárová<sup>a,e</sup>, Mickaël Vaïtilingom<sup>a,c</sup>, Laurent Deguillaume<sup>c,d</sup>, Mounir Traikia<sup>a,b</sup>,  
Virginie Vinatier<sup>a,b</sup>, Martine Sancelme<sup>a,b</sup>, Pierre Amato<sup>a,b</sup>, Mária Matulová<sup>e</sup> and Anne-Marie  
Delort<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire SEESIB, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> CNRS, UMR 6504, Laboratoire SEESIB, F-63177 Aubière, France

<sup>c</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, OPGC/Laboratoire de Météorologie Physique LaMP, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>d</sup> CNRS, UMR 6016, LaMP, F - 63177 Clermont - Ferrand, France

<sup>e</sup> Institute of Chemistry, Centre for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovakia

\*Corresponding author: Tel: 00 33 473 40 77 14; Fax: 00 33 473 40 77 17

E-mail address: A-Marie.DELORT@univ-bpclermont.fr

**Table S1:** Summary of the various techniques used during the incubations with the 4 bacterial strains.

	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR	<i>In vivo</i> <sup>13</sup> C NMR	Aerolaser
Strains	(S) CH <sub>3</sub> OH (C) CHO <sub>2</sub> H (C) CH <sub>3</sub> OH	(S) <sup>13</sup> CH <sub>2</sub> O (C) <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> OH (C) <sup>13</sup> CHO <sub>2</sub> H (C) <sup>13</sup> CH <sub>2</sub> O	(S) <sup>13</sup> CH <sub>2</sub> O (C) <sup>13</sup> CH <sub>3</sub> OH (C) <sup>13</sup> CHO <sub>2</sub> H (C) <sup>13</sup> Cglycerol (C) <sup>13</sup> C propanediols (C) <sup>13</sup> CH <sub>2</sub> O	(S) CH <sub>3</sub> OH (P) CH <sub>2</sub> O
<i>Bacillus</i> sp 3B6	X	X	X	
<i>Pseudomonas</i> <i>graminis</i> <sup>1</sup>	X	X		X
<i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i>	X	X		X
<i>Frigobacterium</i> sp	X	X		X

(S): Initial substrates; (C): Compound analysed by the technique.

## Figure legends

**Figure S1: Methane metabolism.** Formaldehyde is transformed in L serine.  
(Adapted from <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

**Figure S2: Serine metabolism.** Serine is transformed in phosphatidyl-L-serine.  
(Adapted from <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

**Figure S3: Glycerophospholipid metabolism.** Connection between serine metabolism and glycolipid metabolism *via* glycerophospholipid metabolism.  
(Adapted from <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

**Figure S4: Glycerolipid metabolism.** Production of glycerol, propane-1,2-diol and propane-1,3-diol.  
(Adapted from <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

# Methane metabolism

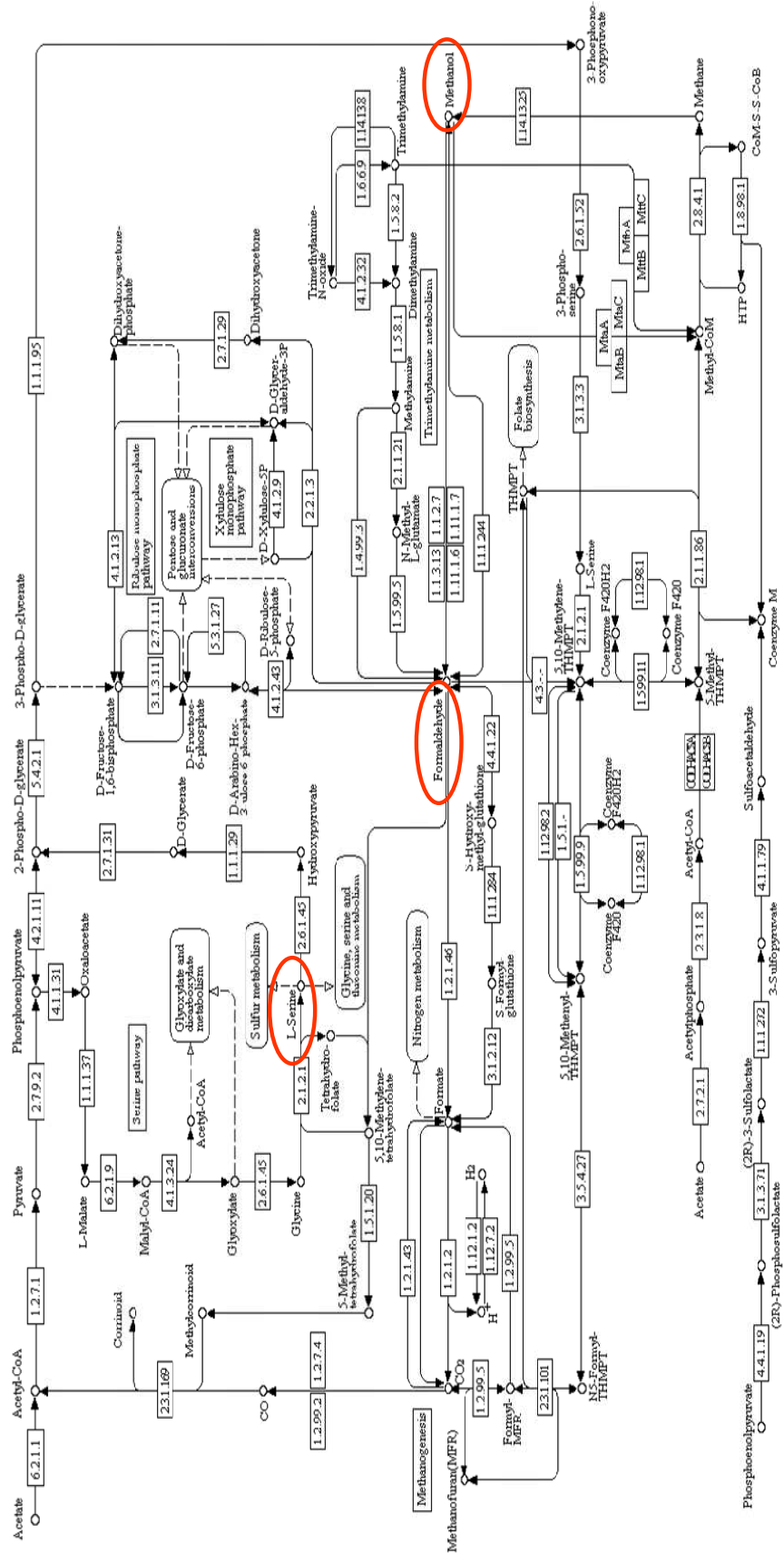


Figure S1



# Glycerophospholipid metabolism

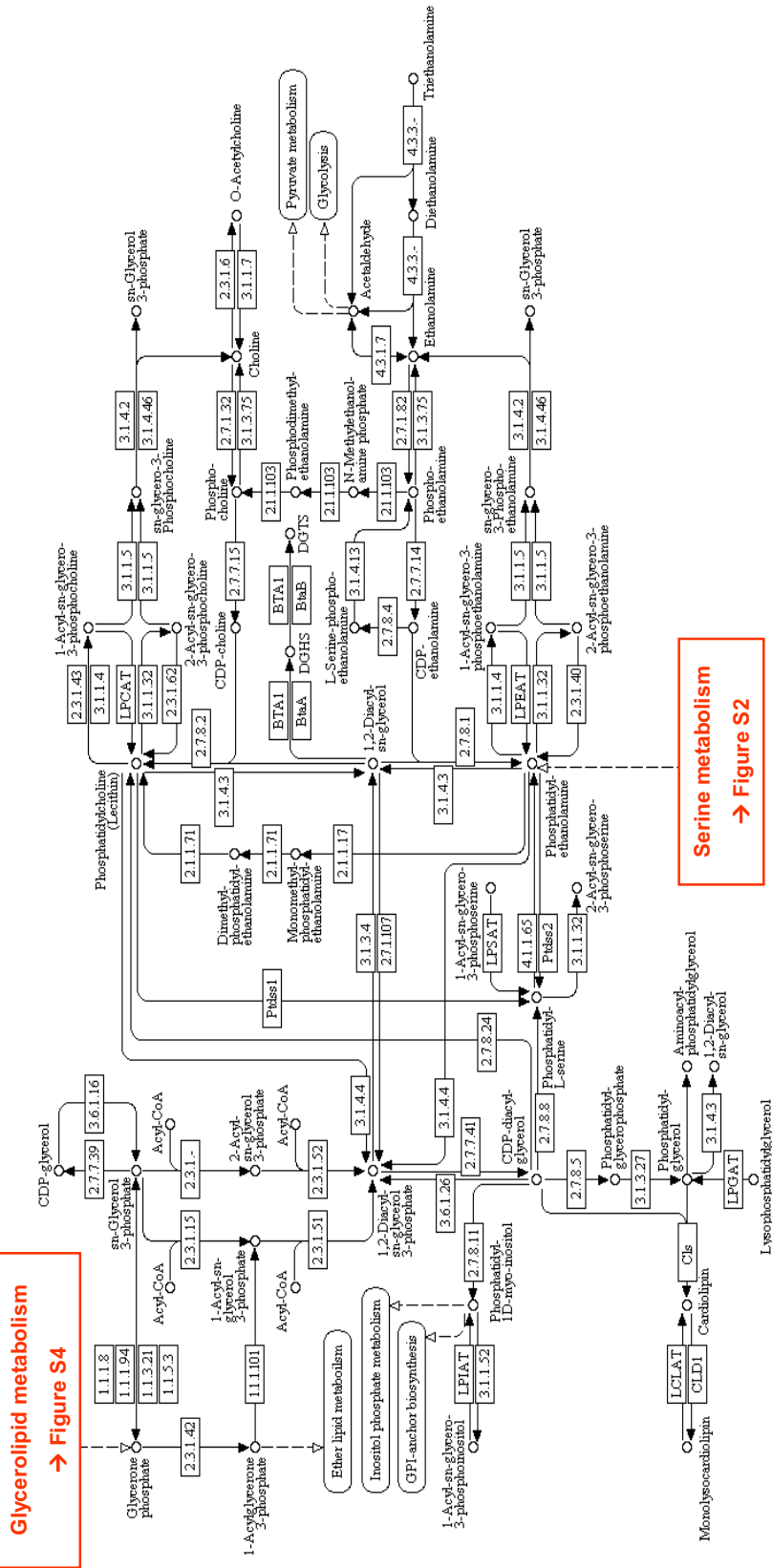
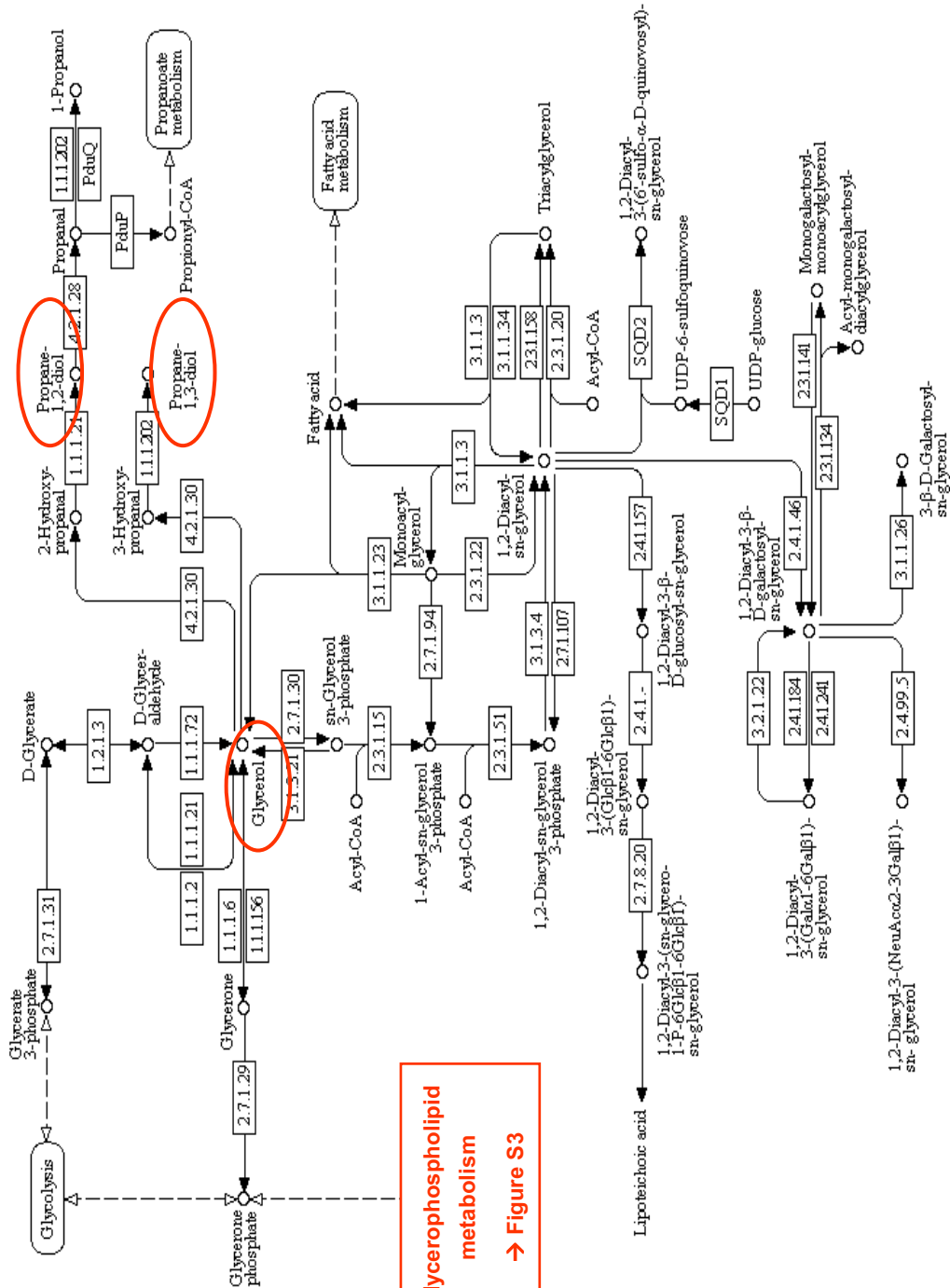


Figure S3

# Glycerolipid metabolism



Glycerophospholipid metabolism → Figure S3

Figure S4

### II.2.3.Conclusions

#### - Biodégradation en substrat unique –

Lors des incubations à 5 et 17°C des souches microbiennes en présence d'un seul substrat organique dans une solution tampon à pH 7, le formiate, l'acétate, le L- et le D-Lactate, le succinate, le formaldéhyde et le méthanol ont été dégradés par au moins deux des quatre souches bactérienne testées.

Le méthanol est le composé le moins rapidement dégradé, ses vitesses de biodégradation sont comprises entre  $10^{-19}$  et  $10^{-18}$  mol cellule<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Lorsque les incubations sont effectuées à 5°C, il n'est pas dégradé pour 2 des souches testées. Ces faibles vitesses doivent être analysées avec prudence car elles reflètent aussi le fait que le formaldéhyde produit peut être réduit à nouveau en méthanol. Les deux réactions, réduction et oxydation, ne sont pas catalysées par les mêmes enzymes dans la cellule. Pour le formiate, l'acétate, le L-lactate, le D-Lactate et le formaldéhyde, les vitesses de biodégradation sont en moyenne comprises entre  $10^{-17}$  et  $10^{-16}$  mol cellule<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> pour les souches bactérienne testées.

La dégradation des composés organiques présents dans l'eau nuageuse par des microorganismes issus de ce même milieu est donc effective à 5°C et à 17°C. Dans le cas de la biodégradation du formiate, du lactate, du succinate et du formaldéhyde, la différence de vitesse de dégradation entre les incubations à 5 et 17°C est faible. Pour cette gamme de températures caractéristique des nuages chauds troposphériques, le potentiel de biotransformation des souches testées semble donc conservé au moins jusqu'à 5°C.

#### - Biodégradation en milieu nuage artificiel -

Concernant les incubations réalisées dans le milieu « nuage artificiel » avec la souche *Pseudomonas graminis* (13b-3) à 5 et 17°C, parmi les 4 composés testés, seuls le formiate, l'acétate et le succinate sont dégradés alors que l'oxalate n'est pas un substrat utilisé par cette souche. Le formiate est dégradé au moins dix fois plus rapidement dans le milieu « nuage artificiel » par rapport au milieu « substrat unique », cela peut-être dû à la complémentarité des voies de dégradation dans le milieu contenant plusieurs sources de carbone.

Aux deux températures étudiées, les vitesses de dégradation sont plus importantes dans le milieu « nuage artificiel » que celle obtenues en substrat unique pour la même souche. Le pH initial du milieu « nuage artificiel » est d'environ 5, alors que pour les expériences en substrat



unique le pH était de 7, on peut donc conclure que l'activité métabolique de la souche étudiée n'est pas inhibée dans un milieu peu acide.

- Confrontation des vitesses de biotransformation à la chimie radicalaire -

Les vitesses de biotransformation des composés organiques obtenues dans nos conditions expérimentales, ont été comparées aux vitesses théoriques de transformation de ces mêmes composés par leurs réactivités avec les radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{NO}_3\cdot$ . Pour le formiate, l'acétate et le succinate, nous avons utilisé les vitesses de biodégradation obtenues dans le milieu « nuage artificiel », et pour le formaldéhyde et le méthanol, celles obtenues en moyenne dans les milieux « substrat unique ».

Pour des conditions diurnes, nous considérons trois « acteurs » aboutissant à la dégradation des composés organiques étudiés : les microorganismes, les radicaux  $\cdot\text{OH}$  et  $\text{NO}_3\cdot$ . Pour les conditions nocturnes, seuls les microorganismes et les radicaux  $\text{NO}_3\cdot$  sont pris en compte car le radical  $\cdot\text{OH}$  est principalement photo-produit. Les concentrations considérées pour les deux radicaux sont simulées par des modèles de chimie du nuage prenant en compte une réactivité complexe et explicite. Les constantes cinétiques de dégradation des composés organiques par ces radicaux sont également déduites des études de la littérature.

La contribution des microorganismes à la dégradation de formiate, de l'acétate et du succinate durant le *jour* varie de 2 à 15% à 5°C, et de 5 à 37% à 17°C. Durant la nuit, la contribution des microorganismes à la dégradation de ces composés carboxyliques est estimée à plus de 90% à 5 et 17°C.

Dans le cas du méthanol et du formaldéhyde, deux scénarios chimiques nuageux ont été considérés: un nuage de type pollué (type « urban ») avec une forte concentration en radicaux  $\text{NO}_3\cdot$  (concentration de  $\text{NO}_x$  élevée), et un nuage dont la masse d'air est éloignée des sources de pollution (type « remote »). La contribution des microorganismes dans la dégradation du méthanol à 5 et 17°C est considérée comme négligeable durant le *jour*, tandis que la *nuit* les microorganismes représentent 30 à 99% de la destruction du méthanol. Pour le formaldéhyde, la contribution des microorganismes à 5 et 17°C varie entre 3 et 7% durant le *jour* pour les deux scénarios nuageux, et ils le transforment à plus de 80% durant la *nuit*.

Par l'utilisation de ces modèles théoriques simplifiés, la part des microorganismes vis-à-vis des radicaux libres majeurs, sur le bilan *nocturne* des puits des acides carboxyliques, du méthanol et du formaldéhyde, peut être considérée comme majoritaire. Par contre, sur le bilan *diurne* en présence des radicaux  $\cdot\text{OH}$ , extrêmement réactifs, la contribution des microorganismes est en moyenne proche de 10%.

- Production de métabolites par les bactéries -

Un autre aspect de l'activité métabolique est également de considérer la production de métabolites et leur diffusion dans le milieu environnant. Dans les expériences de biodégradation du  $^{13}\text{C}$ -formaldéhyde en présence de la souche *Bacillus* sp. 3b-6, la production de méthanol et de formiate a été observée lors de l'analyse par RMN *in vivo*. La métabolisation du formiate a en partie conduit à la production de  $\text{CO}_2$ . Dans une moindre mesure, la métabolisation du formaldéhyde a conduit à la production de glycérol, de propane-1,2 et -1,3-diol *via* le cycle de la sérine. La production de méthanol et de composés à trois atomes de carbone (C3) à partir de composés à un atome de carbone (C1) montre de manière irréfutable que, contrairement aux schémas admis en chimie radicalaire, l'oxydation des composés en C1 jusqu'au  $\text{CO}_2$  n'est pas la seule voie possible. Les microorganismes peuvent réaliser des réductions même en milieu très oxydant ; ils peuvent aussi synthétiser et relarguer dans le milieu nuageux des composés de plus grande masse moléculaire polyfonctionnalisés. Cette dernière question est particulièrement d'actualité chez les photochimistes qui commencent à envisager des réactions de condensation et de fonctionnalisation à partir de monomères (« oligomérisations ») (Altieri et al., 2008 ; Lim et al., 2010).

En résumé, la contribution des microorganismes dans le bilan des puits de la matière organique dans la phase aqueuse atmosphérique, pourrait être mineure vis-à-vis des processus abiotiques ayant lieu dans la chimie de jour, mais majeure dans la chimie de nuit que l'on soit à 17 ou 5°C. Les dégradations de la matière organique par l'activité métabolique des microorganismes, est à la fois un puits et une source de divers composés, tout comme les processus photochimiques. Le rôle des microorganismes dans la chimie de jour sera étudié en priorité, pour préciser son rôle sur la dégradation de la matière organique vis-à-vis des radicaux  $\cdot\text{OH}$ . Les expériences et l'exploitation des résultats liés à ce projet sont présentées dans la partie suivante.

### II.3.Photo- et biotransformation en « nuage artificiel »

Dans l'étude précédente, nous avons observé une implication des microorganismes relativement faible vis-à-vis de la dégradation des composés organiques pendant le jour, les radicaux  $\cdot\text{OH}$  étant beaucoup plus réactifs. Cependant, l'interprétation de ces résultats et les contours de l'étude restent limités, car moins de 5 souches ont été étudiées dans des milieux contenant des substrats uniques et une seule souche dans le milieu dit « nuage artificiel ».

L'objectif dans cette partie est d'aller plus loin dans la comparaison des vitesses de transformation des composés organiques en présence de microorganismes et de radicaux hydroxyles en choisissant des conditions expérimentales ou des scénarios beaucoup plus réalistes et représentatifs de la phase aqueuse du nuage.

Afin de répondre à ses objectifs, nous avons eu à la démarche suivante :

- Déterminer les vitesses de biotransformation des composés carboxyliques avec plusieurs souches bactériennes (17 au total) dans deux milieux « nuage artificiel » : continental et marin.
- Déterminer les vitesses de photo-transformation dans les mêmes milieux en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sous irradiation UV (source de radicaux  $\cdot\text{OH}$  par photolyse de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ).
- Comparer les vitesses de bio- et de photo-transformation obtenues expérimentalement dans les milieux « nuage artificiel ».
- Compléter nos comparaisons entre biodégradation et chimie radicalaire en utilisant des valeurs de vitesses de transformation par les radicaux  $\cdot\text{OH}$  issues de données de la littérature. Cette dernière approche nous a permis d'envisager des scénarios extrêmes quant à la concentration en  $\cdot\text{OH}$  dans le nuage.
- Valider de façon « préliminaire » nos conditions expérimentales de biodégradation en comparant nos résultats en milieu artificiel (souche pure, milieu simplifié) avec ceux obtenus avec un nuage réel (microflore endogène et composition chimique complexe).

Les vitesses de biotransformation de 17 souches bactériennes dans deux solutions « nuage artificiel » ont été déterminées. Ces souches sont représentatives des souches bactériennes les plus souvent isolées par la culture d'eau nuageuse. Le choix d'étudier des bactéries et non des levures se justifie par le fait qu'elles sont en moyenne 10 fois plus concentrées que les cellules fongiques.

Les deux milieux « nuage artificiel » miment la composition chimique des nuages sous influence continentale et marine (voir Tableau II-2). La concentration en ions inorganiques est différente pour les deux milieux, mais leurs concentrations en formiate, acétate, succinate et oxalate sont identiques. En utilisant, la même concentration en composés carboxyliques des milieux « marin » et continental », on peut observer indépendamment de la composition organique l'influence du pH et des ions inorganiques sur les vitesses de bio- et de photo-transformation.

Les expériences d'irradiation de ces solutions en présence de peroxyde d'hydrogène ont été réalisées avec deux gammes d'irradiation UV.

Une expérience préliminaire d'incubation d'eau nuageuse « naturelle » est également présentée afin de comparer les biotransformation obtenues en milieu « nuage artificiel » avec celles obtenues dans un échantillon naturel.

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous la forme d'une publication qui est en cours de révision dans la revue « *Atmospheric Chemistry and Physics Discussion – ACPD* ».

### II.3.1. Matériels et Méthodes

Dans la suite, l'objectif est de présenter les éléments nouveaux au niveau expérimental par rapport au chapitre précédent.

#### II.3.1.1. Photo-réacteur

Pour réaliser les expériences sous irradiation, nous avons utilisé deux types de réacteur. Le premier système d'irradiation (S1) est celui du laboratoire LPMM, le schéma descriptif de l'enceinte d'irradiation est présenté Figure II-22 et celui du réacteur associé est schématisé Figure II-23.

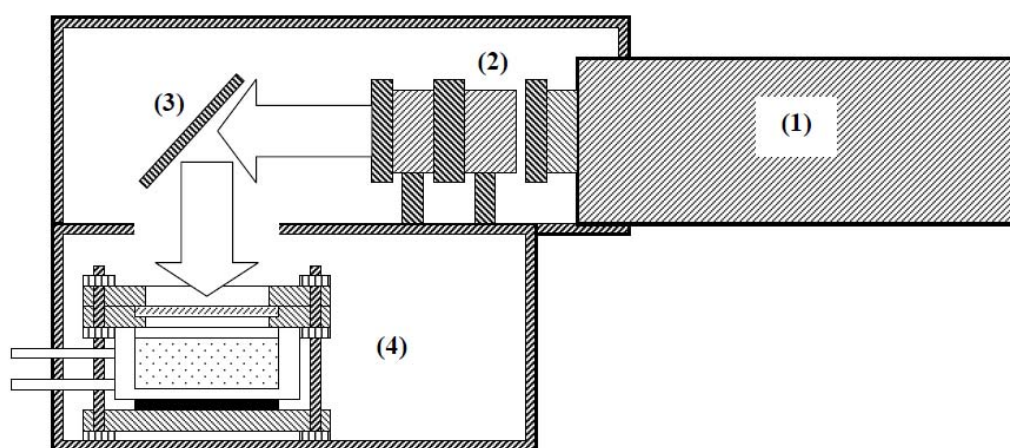


Figure II-22 : Schéma de l'enceinte d'irradiation S1, (1) lampe xénon 1000 W, (2) filtre IR à eau, (3) miroir, (4) réacteur (Parazols, 2007).

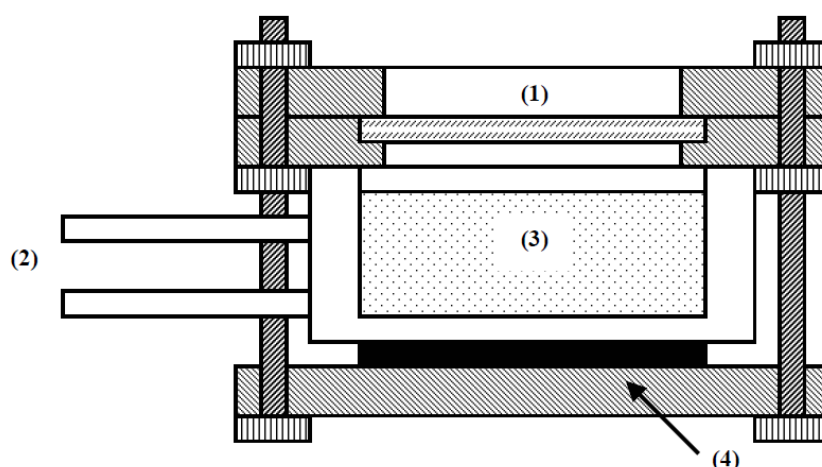
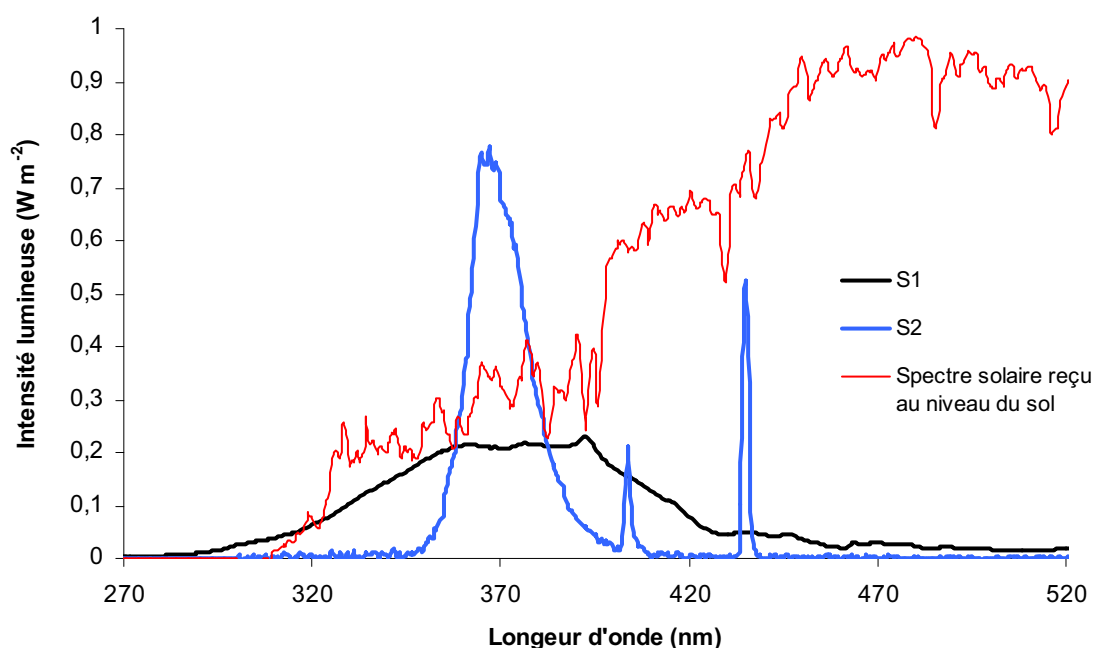


Figure II-23 : Schéma du réacteur du système S1, (1) vitre en Pyrex, (2) système de refroidissement, (3) solution à irradier, (4) agitateur magnétique (Parazols, 2007).

La vitre en Pyrex placée sur le réacteur joue le rôle d'un filtre en empêchant la transmission des rayonnements dont la longueur d'onde est inférieure à 290 nm, cela permet d'éviter la photolyse directe de la plupart des composés organiques présents dans nos solutions artificielles. L'agitation est effectuée à l'aide d'un barreau aimanté et est suffisante pour l'homogénéisation de la solution.

Le deuxième système d'irradiation (S2) est une enceinte d'incubation biologique complétée de tubes fluorescents de 15 W émettant dans la plage de longueurs d'onde de 340 à 420 nm. Des réacteurs spécifiques et adaptables à cette enceinte d'incubation ont été conçus ; ils permettent à la fois une irradiation correcte et une bonne oxygénation de la solution par agitation sur un plateau rotatif. Le descriptif de ce réacteur sera présenté dans la Figure II.25 du chapitre suivant (II.4).

Les spectres lumineux reçus à la surface des solutions placées dans les réacteurs des systèmes d'irradiation S1 et S2, sont présentés Figure II-24.



**Figure II-24 :** Spectres lumineux reçus à la surface des solutions placées dans les réacteurs des systèmes d'irradiation S1 et S2 et au niveau du sol sous rayonnement solaire.

Le système S1 est proche des conditions lumineuses observées au niveau du sol par ciel clair, alors que le S2 émet avec une bande spectrale dans l'UV moins représentative des conditions « réelles » atmosphériques. L'énergie reçue dans la gamme des UVA est plus intense dans le système S2 que celui reçu dans le système S1 ; elle est de  $18 W m^{-2}$  pour S1, de  $34 W m^{-2}$  pour S2, et de  $50 W m^{-2}$  pour l'intensité solaire reçue au niveau du sol.

### ***II.3.1.2. Expériences d'irradiation***

Les solutions « nuage artificiel » à irradier sont préparées une heure avant leur utilisation, et une solution d'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> préparée dans de l'eau ultrapure est ajoutée à la solution à irradier 5 min avant le début de l'irradiation. La concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des solutions à irradier est de 20 µM, cette valeur est proche de la concentration maximale mesurée dans les échantillons d'eau nuageuse collectés au pdD qui est de 18,8 µM (Marinoni et al., 2011).

Un prélèvement de 2 × 1 mL est réalisé avant le début de l'irradiation, puis à différents temps définis (t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 48 et 72h).

Les expériences réalisées dans le système S1 n'excèdent pas 24 h (pour des raisons techniques), et ne peuvent être répliquées en simultané. Alors que plusieurs solutions peuvent être irradiées en parallèle dans le système S2 qui dispose d'une grande surface d'irradiation (1 m<sup>2</sup>) et pour lequel nous disposons de 4 réacteurs. De plus, dans ce cas, les expériences peuvent être poursuivies pendant plusieurs jours. Les incubations ont lieu à une température de 17°C dans les systèmes S1 et S2 ; nous aurions également souhaité les réaliser à 5°C, mais aucun des deux systèmes ne permet d'atteindre cette température.

### ***II.3.1.3. Dosage du peroxyde d'hydrogène***

La concentration en peroxyde d'hydrogène est mesurée par un dosage fluorométrique. Le peroxyde d'hydrogène réagit avec l'acide 4-Hydroxy-phényl-acétique (HPAA) en présence de la peroxydase extraite de radis noir (HRP), la réaction de ces composés forme un dimère fluorescent (Lazrus et al., 1985). Ce dosage a été adapté et miniaturisé par Virginie Vinatier (ATER au SEESIB), le protocole qu'elle a mis au point est détaillé ci-dessous.

- (1) Les solutions de HRP et de HPAA sont préparées à l'avance et conservées à -25°C.
  - Solution HRP : la peroxydase lyophilisée est dissoute dans de l'eau ultrapure afin d'obtenir une solution à 380 unités mL<sup>-1</sup>, cette solution est aliquotée par volume de 10 µL dans des microtubes qui seront conservés à -25°C.
  - Solution HPAA : la solution de HPAA est préparée dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,4) à une concentration finale de 1,5 mM de HPAA, cette solution est aliquotée et conservé à -25°C.
- (2) La solution réactive est préparée avec 1,5 mL de la solution HPAA et 10 µL de la solution HRP. Un volume de 200 µL de la solution HRP+HPAA est mélangé avec 10, 50 ou 100 µL d'échantillon, selon la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> supposée de l'échantillon. Ce mélange est incubé à l'obscurité et à température ambiante durant 5 min, avant d'être congelé ou directement dosé.

(3) La mesure s'effectue dans un lecteur multiplaque à fluorescence (Safire<sup>II</sup> TECAN<sup>®</sup>). Le complexe fluorescent est excité à  $\lambda_{\text{ex}} = 320$  nm et réémet à  $\lambda_{\text{em}} = 390$  nm.

La limite de détection de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  par cette méthode de dosage est de 10 nM pour l'utilisation de 100  $\mu\text{L}$  d'échantillon, l'erreur de mesure est inférieure à 5%.

### II.3.2. Résultats, publication en discussion à *Atmospheric Chemistry and Physics*

#### *Discussion*

Les résultats sont présentés en quatre parties dans la publication soumise à ACPD :

- la partie 1 présente les vitesses de biotransformation des acides carboxyliques obtenues à 5 et 17°C dans les solutions « nuages artificiels » avec 17 souches bactériennes (expériences indépendantes).
- la partie 2 concerne les vitesses de photo-transformation des acides carboxyliques obtenues à 17°C par l'irradiation des solutions « nuage artificiel » de type « marin » et « continental » en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- la partie 3 est basée sur la comparaison des vitesses expérimentales de photo- et de biotransformation des composés carboxyliques. Cette partie est complétée d'une comparaison entre les vitesses de biotransformation des composés carboxyliques obtenues expérimentalement et les vitesses de transformation de ces mêmes composés en présence de radicaux  $\cdot\text{OH}$  issues des données de la littérature.
- la partie 4 concerne une expérience préliminaire d'évaluation des capacités de biotransformation dans l'eau nuageuse « naturelle » en présence de sa microflore autochtone.

quelques précisions sur les conditions expérimentales sont détaillées ci-dessous.

#### - Expérience d'incubation de bactéries dans les milieux « nuage artificiel » -

(1) La concentration en composés chimiques des milieux est 10 fois supérieure à celle indiquée dans le Tableau II-2 et la concentration en cellules suit également cette hausse ( $10^6$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  contre  $10^5$  cellules retrouvées en moyenne dans les nuages). Le rapport entre les concentrations en composés chimiques et en cellules bactérienne, est donc proche de celui observé dans les échantillons d'eau nuageuse prélevés au pdD.

Ce choix s'explique par le fait que ces conditions permettent une meilleure stabilisation du pH. En effet, suite à l'autoclavage, les valeurs de pH peuvent varier de  $\pm 1,2$  unité pour les solutions aux concentrations modèles ( $\times 1$ ), alors que dans celles 10 fois plus concentrées les variations maximales de pH sont de  $\pm 0,2$  unités. Il est à noter que la composition chimique du



milieu est peu modifiée ( $\pm 5\%$ ) suite à l'autoclavage. La valeur initiale en pH des solutions « marine » et « continentale » est une des caractéristiques physico-chimiques permettant de différencier les masses d'air nuageuses sous influence continentale et/ou urbaine de celles d'influence maritime. De plus, l'activité métabolique des microorganismes peut-être affectée par le pH du milieu, d'où l'importance du pH initial lors des expériences d'incubation. Le pH de la solution évolue vers la neutralité au cours du temps, lorsque les composés organiques sont dégradés ; dans le plus rapide des cas le pH est passé d'une valeur d'environ 5 à une valeur d'environ 7 en 6 heures d'incubation.

(2) Concernant la production de métabolites, aucun métabolite n'a été observé lors des incubations des milieux « nuage artificiel » pour les 17 souches testées.

- Expérience d'irradiation des solutions « nuage artificiel » -

(1) Les concentrations des solutions « nuages artificiels » sont les mêmes que celles du modèle ( $\times 1$ ) (Tableau II-2). Le pH des solutions reste stable dans ce cas, car les solutions sont préparées 1 heure avant le début de l'irradiation et ne sont pas stérilisées avant leur utilisation. Ces milieux sont irradiés en présence de 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

(2) Des expériences préliminaires d'irradiation de solutions « nuage artificiel » 10 fois plus concentrées chimiquement avec 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ont été réalisées, pour savoir s'il était possible de mener les expériences de bio et de photo-transformation dans les mêmes conditions. Nous avons observé que les vitesses de photo-dégradation des composés organiques et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  n'étaient pas proportionnelles à celles observées pour les mêmes solutions diluées d'un facteur 10. Les valeurs des pourcentages de dégradation des composés organiques et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont plus faibles lors de l'irradiation de solutions plus concentrées par rapport à ces mêmes solutions diluées. L'intensité lumineuse apparaît comme le paramètre limitant lors de l'irradiation, pour des expériences d'irradiation réalisées avec tous les composés chimique 10 fois plus concentrés.

(3) L'irradiation des solutions sans ajout de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les systèmes S1 et S2 a montré que seul l'oxalate était dégradé en l'absence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le système S1. Cependant, la dégradation de l'oxalate en absence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ne représente qu'environ 5% de celle observée en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

(4) Lors des différentes expériences sous irradiation lumineuse, la totalité du peroxyde d'hydrogène présent dans les solutions est dégradée en moins de 6 h avec le système S1 et en moins de 48 h avec le système S2. Les constantes de vitesse de pseudo-ordre 1 sont déterminées sur les 4 premières heures d'irradiation dans le système S1 et sur les 8 premières heures dans le système S2.

*Pour ces travaux, les collègues ayant contribué à la partie expérimentale sont :*

*- Marius Parazols (en thèse au LPMM/LaMP de 2004 à 2007) qui a mis au point le système d'irradiation S1 ; Tiffany Charbouillot (en cours de thèse au LPMM/LaMP depuis 2008) qui a réalisé les expériences de bio-transformation pour 2 souches, et les mesures des spectres lumineux ; Romain Maisonobe (en stage de Master II au SEESIB/LaMP) qui a réalisé les analyses chimiques pour les expériences de biotransformation de 4 souches.*

This discussion paper is/has been under review for the journal Atmospheric Chemistry and Physics (ACP). Please refer to the corresponding final paper in ACP if available.

## Atmospheric chemistry of carboxylic acids: microbial implication versus photochemistry

M. Vaïtilingom<sup>1,2,3,4</sup>, T. Charbouillot<sup>3,4,5,6</sup>, L. Deguillaume<sup>3,4</sup>, R. Maisonobe<sup>1,2</sup>, M. Parazols<sup>1,2,5,6</sup>, P. Amato<sup>1,2</sup>, M. Sancelme<sup>1,2</sup>, and A.-M. Delort<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire de Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB), BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>2</sup>CNRS, UMR 6504, 63177 Aubière, France

<sup>3</sup>Clermont Université, Université Blaise Pascal, OPGC, Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP), BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>4</sup>CNRS, UMR 6016, 63177 Aubière, France

<sup>5</sup>Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire (LPMM), BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>6</sup>CNRS, UMR 6505, 63177 Aubière, France

Received: 29 November 2010 – Accepted: 27 January 2011 – Published: 9 February 2011

Correspondence to: M. Vaïtilingom (mickael.vaïtilingom@univ-bpclermont.fr)

Published by Copernicus Publications on behalf of the European Geosciences Union.

4881

### Abstract

Clouds are multiphase atmospheric systems in which the dissolved organic compounds, dominated by carboxylic acids, are subject to multiple chemical transformations in the aqueous phase. Among them, solar radiation, by generating hydroxyl radicals ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), is considered as the main catalyzer of the reactivity of organic species in clouds. We investigated to which extent the active biomass existing in cloud water represents an alternative route to the chemical reactivity of carboxylic acids. Pure cultures of seventeen bacterial strains (*Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Frigoribacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* and *Rhodococcus*), previously isolated from cloud water and representative of the viable community of clouds were first individually incubated in two artificial bulk cloud water solutions at 17 °C and 5 °C. These solutions mimicked the chemical composition of cloud water from “marine” and “continental” air masses, and contained the major carboxylic acids existing in the cloud water (i.e. acetate, formate, succinate and oxalate). The concentrations of these carboxylic compounds were monitored over time and biodegradation rates were determined. In average, they ranged from  $2 \times 10^{-19}$  for succinate to  $1 \times 10^{-18} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for formate at 17 °C and from  $4 \times 10^{-20}$  for succinate to  $6 \times 10^{-19} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for formate at 5 °C, with no significant difference between “marine” and “continental” media. In parallel, irradiation experiments were also conducted in these two artificial media to compare biodegradation and photodegradation of carboxylic compounds. To complete this comparison, the photodegradation rates of carboxylic acids by  $^{\bullet}\text{OH}$  radicals were calculated from literature data. Inferred estimations suggested a significant participation of microbes to the transformation of carboxylic acids in cloud water, particularly for acetate and succinate (up to 90%). Furthermore, a natural cloud water sample was incubated (including its indigenous microflora); the rates of biodegradation were determined and compared to the photodegradation rates involving  $^{\bullet}\text{OH}$  radicals. The biodegradation rates in “natural” and “artificial” cloud water were in the same order

of magnitude; this confirms the significant role of the active biomass in the aqueous reactivity of clouds.

## 1 Introduction

A huge variety of chemical compounds exists in the atmosphere as solid particles, gas, and dissolved into cloud droplets or ice crystals. This includes very diverse organic species (between  $10^4$  and  $10^5$  different molecules as estimated by Goldstein and Galbally, 2007), which have primary and secondary sources. The chemical transformations of these species can lead to the formation of new particles known as Secondary Organic Aerosols (SOA) (Chung and Seinfeld, 2002; Limbeck et al., 2003; Takekawa et al., 2003; Claeys et al., 2004; Davidson et al., 2005; Hallquist et al., 2009).

Clouds play a key role in the transformation of chemical species through reactions between the gaseous and the aqueous phase (Jacob et al., 1986; Möller et al., 1996; Laj et al., 1997; Fowler et al., 2009). In cloud droplets the organic matter represents a significant fraction of the soluble matter (Hadi et al., 1995; Saxena and Hildemann, 1996; Fuzzi et al., 2002); 36% of which are carboxylic acids (Marinoni et al., 2004). The carboxylic acids are produced in the gas-phase and dissolved into the aqueous phase (main source of mono-carboxylic acids such as acetic and formic acids); they can also result from the dissolution of the soluble part of organic particles (main source of dicarboxylic acids like oxalic, succinic, malonic and maleic acids ...); they also derive from the aqueous phase reactivity (Chebbi and Carlier, 1996; Sellegri et al., 2003; Goldstein and Galbally, 2007; Kroll and Seinfeld, 2008; Hallquist et al., 2009; Sun et al., 2010). The oxidation of organic matter due to the presence of free radicals such as  $\cdot\text{OH}$  can be considered as an important source of carboxylic acids in the aqueous phase, but also as one of their main sinks (Karpel Vel Leitner and Doré, 1997; Herrmann, 2003; Warneck, 2003; Ervens et al., 2003a; Sun et al., 2010).

The aqueous phase of cloud also contains insoluble biological material such as bacteria, fungal spores, pollens, plant debris, etc. (Matthias-Maser et al., 2000; Bauer

4883

et al., 2002; Jaenicke, 2005; Burrows et al., 2009). Viable microorganisms have been recovered from rain (Casareto et al., 1996), cloud and fog samples (Fuzzi et al., 1997; Amato et al., 2005; Ahern et al., 2007; Amato, 2007c). The microbial strains isolated from the atmosphere were likely originating from vegetation, soil, aquatic environments (Amato, 2007c; Burrows et al., 2009), and most of these microorganisms were able to survive and develop under the specific conditions existing in cloud water (chemical composition, low temperature) (Sattler et al., 2001; Amato et al., 2007c). Possible C-sources for microorganisms in atmospheric waters are carboxylic acids, aldehydes and alcohols (Herlihy et al., 1987; Fuzzi et al., 1997; Ariya et al., 2002; Amato et al., 2005, 2007a; Côté et al., 2008; Deguillaume et al., 2008). Biological activity could therefore participate to the budget of the organic matter in cloud droplets.

Previous investigations of our group about a possible implication of microbes in cloud chemistry were reported in Amato et al. (2005, 2007a), in which the biodegradation ability of 60 microbial strains toward atmospheric organic compounds (formate, lactate (D and L), succinate, formaldehyde and methanol) were evaluated at 27 °C. Each strain consumed at least one of these compounds, and the highest efficiencies of biotransformation were observed toward acetate, formate, and formaldehyde. Using a similar approach we then measured the rates of biodegradation of the same compounds (except formaldehyde and methanol) at lower temperature (17 °C and 5 °C) (Vaitilingom et al., 2010), and compared them to reaction rates involving the major free radicals:  $\cdot\text{OH}$  and  $\text{NO}_3\cdot$  (Herrmann, 2003; Ervens et al., 2003a). This comparison showed that microorganisms would dominate the reactivity of certain organic compounds in clouds during the night.

The objective of the present study is to pursue our comparative approach between biodegradation and photodegradation processes occurring in cloud droplets. We developed a new experimental setup of biodegradation test in artificial cloud water media reflecting the chemical composition of natural cloud from “marine” and “continental” air-masses. These media are composed of the major inorganic ions and the main carboxylic acids detected in atmospheric water: acetate, formate, oxalate and succinate

4884

(Löflund et al., 2002; Marinoni et al., 2004). The biodegradation rates of these carboxylic acids in artificial cloud solution were determined at 17 °C and 5 °C for 17 pure strains representative of the viable community existing in clouds. Then, the photodegradation rates in these media were evaluated in the presence of light and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as a source of hydroxyl radicals in order to allow comparison with biodegradation efficiencies. Finally, the biodegradation rates of carboxylic compounds in a natural unmodified cloud water sample, including its indigenous microflora, incubated under controlled conditions were measured and validated our experimental model.

## 2 Material and methods

### 2.1 Bacterial strains

Seventeen bacterial strains isolated from cloud water were selected; they are among the genera the most frequently recovered by culture from cloud water sampled at the puy de Dôme station (1465 m a.s.l.) between December 2003 and March 2009 (see Amato et al., 2007b). The strains used are: 2 *Pseudomonas* sp. strains PDD-6b-4 (DQ512766) and PDD-14b-10 (DQ512794), 3 *Pseudomonas syringae* strain PDD-13b-1 (DQ512737), PDD-12b-8 (DQ512783) and PDD-13b-2 (DQ512785), 1 *Pseudomonas viridiflava* strains PDD-14b-14 (DQ512797), 1 *Pseudomonas graminis* strain PDD-13b-3 (DQ512786), 3 *Sphingomonas* sp. strains PDD-3b-10 (DQ512744), PDD-14b-5 (DQ512789) and PDD-14b-6 (DQ512790), 2 *Frigoribacterium* sp. stains PDD-14b-13 (DQ512796) and PDD-30b-1 (HQ256816), 1 *Rhodococcus* sp. strain PDD-23b-5 (HQ256785), 1 *Arthrobacter rhombi* strain PDD-3b-7 (DQ512742), 1 *Bacillus pumilus* strain PDD-5b-1 (DQ512749) and 1 *Bacillus* sp. PDD-16b-1 (not available in GenBank), and 1 *Clavibacter michiganensis* strain PDD-25b-3 (HQ256805).

4885

### 2.2 Biodegradation tests

Biodegradation experiments consisted in “marine” or “continental” artificial cloud water solutions inoculated with bacterial cells and incubated at 5 °C and 17 °C for 120 h under aerobic conditions. Incubation media consisted in “marine” and “continental” artificial cloud water solutions (see Table 1 for composition) made by diluting stock solutions in ultrapure water (resistivity  $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ). Stock solutions were prepared from the following products: acetic acid (Aldrich,  $\geq 99.99\%$ ), formic acid (Fluka,  $\sim 98\%$ ), oxalic acid (Fluka,  $\geq 99\%$ ), succinic acid (Fluka,  $\geq 99\%$ ), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Fluka,  $\geq 99\%$ ), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (Aldrich, 99%), K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fluka,  $\geq 99\%$ ), NaCl (Aldrich, 99.5%), NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> (Fluka,  $\geq 99.5\%$ ), NaOH (Merck, 99%) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Acros Organics,  $\geq 95\%$ ). The artificial cloud water solutions were sterilized by autoclave (20 min at 121 °C) and stored at 5 °C for less than 24 h. In the case of biodegradation experiments, in order to have a better stabilization of the chemical composition and pH after sterilization process, the cloud water solutions were prepared 10 times more concentrated than indicated in Table 1. In previous work (Vaïtilingom et al., 2010), we showed that, at constant ratio “cell concentration/degraded chemical compound concentration” and in the range of concentrations investigated, biodegradation rates are independent of the absolute cell and chemical concentrations.

Artificial cloud water solutions were inoculated with bacterial cells from pure cultures grown aerobically at 17 °C (200 rpm) in R2A broth (Reasoner and Geldreich, 1985). Cells were harvested by centrifugation (4000 × g, 15 min, 4 °C) after 18 h of growth (exponential phase), rinsed once in NaCl solution (8 g per liter) and twice in the incubation medium and finally resuspended in the incubation medium. The concentrations of cells in the test media were adjusted to 10<sup>6</sup> cells mL<sup>-1</sup> ( $\sim 10$  times higher than the average bacterial concentration found in clouds sampled at the pdD station, Amato et al., 2007b) based on the OD<sub>575 nm</sub> of the culture. Serial dilutions of the suspension were plated (0.1 mL) on R2A and incubated at 17 °C for Colony Forming Unit (CFU) counts. CFU counts were used to normalize the biodegradation rates and express them in mol

4886

cell<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

No chemical modification was observed during the time of incubation in the reference flask (cloud water solution without microorganisms). At defined time steps (every hour from 0 to 8 h and at times zero plus 24, 48, 72 and 120 h), samples were taken for analysis by ion chromatography: cells were pelleted (12 000 × *g*, 3 min) from 1 mL of the incubation medium, and the supernatants were kept frozen until analysis.

### 2.3 Photodegradation tests

For photodegradation experiments, artificial cloud water solutions were prepared as indicated in Table 1, supplemented with 20 μM of hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fluka, 30%), and exposed to controlled lights under agitation. The maximum concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measured in natural cloud water sampled at the puy de Dôme were in the same range (~ 19 μM) (Marinoni et al., 2011). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added for generating hydroxyl radicals in the solutions by photolysis reaction ( $\lambda < 380$  nm).

Two irradiation setups, characterized by different polychromatic light spectra were used:

The *Photochemical setup 1 (S1)*: Consisted in a light beam generated by a 1000 W Xenon lamp used on the top of a cylindrical reactor equipped by a Pyrex filter (thickness 3.3 mm, wavelength cut-off: 290 nm) containing 500 mL of magnetically stirred solution at 17 °C (by circulating temperature-regulated water through an outer jacket).

The *Photochemical setup 2 (S2)*: Consisted in a box equipped by 12 Philips Actinic BL 15 W fluorescent tubes emitting within the wavelength range 340–420 nm with a maximum emission at 365 nm and placed above the incubation flasks. The incubation flasks were cylindrical Pyrex crystallizer (100 mL) dishes covered with a Pyrex filter and incubated at 17 °C under agitation (110 r.p.m.).

The wavelength-dependent light fluxes reaching the solutions were measured by placing an optical fiber coupled to a spectrograph with a CCD detector (Ocean Optics SD 2000 CCD spectrophotometer) previously calibrated by using a DH-2000-CAL

4887

Deuterium Tungsten Halogen reference lamp inside chemical reactor. Emission spectra of both photochemical setups and the UV-Vis spectra of nitrate and hydrogen peroxide in water solution are displayed in Fig. 1.

Effective degradation of hydrogen peroxide was verified in both setups by fluorimetry assay involving a Horse Radish Peroxydase in 4-Hydroxyphenylacetic acid solution (Lazrus et al., 1985). At defined time points, two aliquots of 1 mL of the solution incubated at 17 °C (no experiment of photochemistry was made at 5 °C due to technical limitations) were taken and kept frozen until ion chromatography analysis.

### 2.4 Natural cloud water sample collection and conditions of incubation

Cloud water was collected at the puy de Dôme station using a sterilized cloud water sampler (Kruisz et al., 1993). The sampling method was identical to those described in Amato et al. (2005). Briefly, 50 mL of cloud water were collected and kept cold until laboratory investigations that were started within a few hours after sampling. Half of the sample was sterilized by filtration (nylon filter 0.22 μm) and the other half was kept intact (included its endogenous microflora). Filtered and intact cloud samples were then incubated at 12 °C under agitation (200 r.p.m.) during 120 h. Every 24 h, 1 mL was taken out and frozen until ion chromatography analyses.

### 2.5 Analyses by ion chromatography

Artificial solutions and the natural cloud water samples were analyzed using ion chromatography Dionex DX320 for anions (column AS11, eluent KOH) and Dionex ICS1500 for cations (column CS16, eluent hydroxymethanesulfonate acid). Vials were previously rinsed three times with ultrapure water.

### 2.6 Calculations of bio- and photodegradation rates

The degradation rates of the compound *C* ( $k_c$ ) have been determined by linear regression fits as follows:

4888

$$\text{– for biodegradation rates: } k_c = (k \times [C]_0) / N_{\text{cells}} \quad (\text{mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}) \quad (1)$$

$$\text{– for photodegradation rates: } k_c = k \times [C]_0 \quad (\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}) \quad (2)$$

– for estimated photodegradation rates resulting from the reactivity with free radicals and estimated from data from the literature:

$$k_c = k_{c,\text{radical}} \times [{}^{\bullet}\text{OH}] \times [C]_0 \quad (\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}) \quad (3)$$

With  $[C]_0$  the initial concentration of selected carboxylic acid  $C$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $k$  the pseudo-first order decays ( $\text{s}^{-1}$ ),  $N_{\text{cells}}$  the concentration of cells participating to the biodegradation and determined by CFU counts ( $\text{cells L}^{-1}$ ),  $[{}^{\bullet}\text{OH}]$  is the concentration of free radical  ${}^{\bullet}\text{OH}$  from literature and  $k_{c,\text{radical}}$  ( $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) is the reaction rate between the carboxylic acid  $C$  and  ${}^{\bullet}\text{OH}$  from the literature.

### 3 Results

#### 3.1 Biodegradation in artificial cloud media

The artificial cloud water media used in these experiments contained the 4 major carboxylic compounds dominating the soluble organic composition of clouds (acetate, formate, succinate, and oxalate) and 8 major inorganic ions (see composition in Table 1). The inorganic composition differed by higher concentrated chloride and sodium in “marine” than in “continental” medium and inversely for nitrate, ammonium, and sulfate. The continental medium was more acidic ( $\text{pH} \sim 5$ ) than the marine one ( $\text{pH} \sim 6.3$ ). The organic compositions in “marine” and in “continental” media were similar to allow comparisons of the biotransformation rates measured and to detect possible effects of the concentration of inorganic ion and of the pH on the metabolic activity of microorganisms.

4889

These media were incubated with a pure microbial culture at  $5^\circ\text{C}$  and  $17^\circ\text{C}$ . The colder temperature ( $5^\circ\text{C}$ ) corresponds to the mean annual value measured at the puy de Dôme summit, while  $17^\circ\text{C}$  is approximately the maximal temperature observed there when a cloud forms (see <http://www.observatoire.univ-bpclermont.fr/SO/mesures/pdd.php>).

During the incubation period, only the degradation of organic species was observed and no extracellular accumulation of metabolite was detected. The measured rates of biotransformation of each compound by each microbial strain are reported in Table 2. The value “zero” was considered when no degradation was detected and was taken into account in the calculation of the average biodegradation rate presented further. Nine and eight strains out of seventeen were able to degrade carboxylic acids at  $17^\circ\text{C}$  and  $5^\circ\text{C}$ , respectively. Although some of the microorganisms used could have the enzymatic material necessary for transforming oxalate (Sahin, 2003), none was degrading it under our incubation conditions. Biodegradation rates of acetate ranged from 0 to  $7 \times 10^{-18} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (strain 14b10, “continental” medium) at  $17^\circ\text{C}$ , and from 0 to  $2 \times 10^{-18} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (strains 14b10 and 23b5, continental) at  $5^\circ\text{C}$ . For formate, they reached  $1 \times 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (strain 6b4, continental) at  $17^\circ\text{C}$ , and  $5 \times 10^{-18} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (strain 12b8, marine) at  $5^\circ\text{C}$ . For succinate, biodegradation rates ranged 0 to  $1 \times 10^{-18} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (strains 3b1 and 13b2, marine) at  $17^\circ\text{C}$ , and from 0 to  $3 \times 10^{-19} \text{ mol cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (strain 13b2, marine) at  $5^\circ\text{C}$ .

Except in a few cases (*Pseudomonas* toward acetate at  $5^\circ\text{C}$ ), *Pseudomonas* strains and *Rhodococcus* were active towards all the tested compounds. On the contrary, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Clavibacter*, and *Frigoribacterium* strains were not able to degrade any of those under any of our experimental conditions. One of the three *Sphingomonas* strains tested was able to degrade formate and succinate at  $17^\circ\text{C}$ , but none at  $5^\circ\text{C}$ .

Regarding the influence of the chemical composition on the degradation rates, 5% of the measured biodegradation rates were higher in marine medium than in continental cloud water solution. However, no significant difference of the average rate of







formate, succinate and oxalate. For photochemistry, we considered results from both setups S1 and S2 and the theoretical reactivity of  $\cdot\text{OH}$  radicals at the highest and lowest concentrations extracted from the literature.

Considering the values of photodegradation rates obtained in S1 and S2, only microbial activity participated to the degradation of acetate and succinate, while oxalate was exclusively degraded by photochemical processes. For formate, microbial activity in the marine and continental medium contributes to 14% and 83% of its degradation in S1 and S2, respectively; in the continental medium, microbial contribution to the degradation of formate are equal to 16% and 48%, respectively.

At high  $\cdot\text{OH}$  concentration (i.e.  $1 \times 10^{-12}$  M), in both artificial cloud water solutions, we estimated from literature data for photochemistry that microbial activity would contribute to less than 4% of the degradation of acetate and succinate, and would be negligible ( $< 0.4\%$ ) for formate. However, at low OH concentration (i.e.  $1 \times 10^{-14}$  M), microbial degradation of acetate, formate, and succinate would reach 85%, 30%, and 70%, respectively, compared to photochemical activity. Oxalate in all cases would not be degraded by microbial activity.

### 3.4 Biodegradation in natural cloud water

In the biodegradation results presented above (Sect. 3.1), artificial cloud water media were incubated with 17 strains independently. In this experiment, natural cloud water was used without any chemical modification and in the presence of its own microflora. The cloud water sample was collected on 17 June 2008, during a North-Western flow air mass and the average temperature over the time of sampling was  $11^\circ\text{C}$ . Its chemical composition is given in Table 5; nitrate, sulfate, and ammonium concentrations and pH value show that this cloud event was under continental influence. Carboxylic acids concentrations are usual for such cloud.

Half of the volume of the cloud water sample was sterilized by filtration ( $0.22\ \mu\text{m}$  porosity) to be considered as the “reference sample” free of microorganisms. The other half was kept intact, so included indigenous microflora, and both subsamples

4893

were incubated at  $12^\circ\text{C}$ , very close to the in situ temperature during sampling. During incubation, carboxylic acid concentrations remained constant in the reference sample. In intact cloud water, acetate, formate and succinate were degraded at rates given in Table 6. These rates were very similar to the average biodegradation rates measured in continental artificial cloud water and given in Table 3 (in  $10^{-10}\ \text{M s}^{-1}$ : 1.2 and 0.7 for acetate; 0.9 and 1.4 for formate; 0.3 and 0.2 for succinate, respectively for natural and artificial cloud water), suggesting that the degradation observed in the intact natural cloud water sample was due to biological activity of its indigenous microorganisms (so named “microbial” in Table 6).

Biodegradation rates in natural cloud water were also compared with estimated photodegradation rates resulting from  $\cdot\text{OH}$  reactivity (see Fig. 3) using literature data as previously. At high  $\cdot\text{OH}$  concentration, microbial activity would contribute to up to 9%, 0%, and 2% of the degradation of acetate, formate and succinate, respectively; at low  $\cdot\text{OH}$  concentration, microbial activity would contribute to up to 90%, 8%, and 63% of the degradation of these species.

## 4 Discussion and conclusion

This paper brings new answers to the emerging scientific question related to the relative contribution of microbial activity vs. photochemistry to atmospheric chemistry. Atmospheric chemistry in the liquid water phase is very complex, and detailed experiments can only be performed in bulk media with simplified situations that allow understanding the mechanisms taking place. One of the main results of this study is the high similarity between the biodegradation rates observed in “artificial” and in “natural” cloud water. To constitute our microcosms of cloud water, a panel of strains representative of the bacteria usually encountered in cloud water was chosen along with typical chemical compositions and cell numbers in natural clouds. Using this very simplified setup, we were able to reproduce the results obtained with a natural cloud sample whose

4894

composition is usually much more complex (more diverse organic and inorganic compounds, presence of Humic Like Substances (HULIS), wider biodiversity ...).

In this work our strategy was to compare different conditions in order to explore different scenarios. We selected marine and continental air-mass types as chemical models for the artificial cloud water media, since they represent most of the clouds sampled at the puy de Dôme station. Among the 57 cloud events sampled between 2001 and 2010 at the puy de Dôme, based on their chemical composition and on their air mass origins, 71% were categorized as “marine” (mainly originating from West), 19% were “continental” (mainly originating from North), 8% were “anthropogenic” (mainly originating from North-east) and 2% were “Saharan” (mainly originating from South) (see for more details the database: <http://www.obs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data.php>).

Our investigations on the biodegradation of carboxylic acids in artificial cloud water showed that the reactivity was different depending on the organic compound considered. For instance oxalate was only degraded by radical reactions, while acetate and succinate were better degraded by microorganisms in most cases. In addition, the activity of the investigated microbial strains was more constrained by temperature than by chemical composition (“marine” and “continental”), in the range of concentrations used. This suggests that microbial contribution to atmospheric chemistry would be more important in warm clouds than in high altitude clouds, and that the chemical composition of cloud water itself has very little influence. On the contrary, photodegradation processes are less sensitive to temperature and tend to be higher in “continental” cloud medium, mainly due to differences in nitrate concentration.

For photochemistry experiments, we need to determine the best conditions to reproduce the amount of solar radiation normally found in clouds. Moreover, it has to be decided which is the more realistic  $\bullet\text{OH}$  concentration to be used in radical chemistry calculations. Actual  $\bullet\text{OH}$  concentration data available in the literature arise from atmospheric chemistry modelling and not from in situ measurements. However, as shown in Table 4, the concentrations reported in the literature can differ by two orders of magnitude depending on the chemical scenario (marine, remote, or urban) and on the model

4895

of cloud chemistry model. So, what should we consider a relevant  $\bullet\text{OH}$  concentration in cloud water? The discrepancy of the  $\bullet\text{OH}$  concentration evaluation can be explained by considering how models are conceived. Since the 80's, numerical models were developed (Graedel et al., 1986; Jacob et al., 1989) that allow evaluating concentrations of hydroxyl radicals in the aqueous phase. These cloud chemistry models are based on up-to-date chemical mechanisms that contained explicit chemical processes in the aqueous phase such as the CAPRAM mechanism (Herrmann et al., 2005; Tilgner and Herrmann, 2010). They also considered complex microphysical processes that redistribute chemical species among the various phases of the cloud (Leriche et al., 2001; Wolke et al., 2005). Simulated  $\bullet\text{OH}$  concentrations are dependant on the chemical scheme that is considered in the model and also on the cloud microphysical properties that control the mass transfer between the liquid and gas phases. In this work we have exemplified the consequence of considering the two extreme values ( $[\bullet\text{OH}] = 1 \times 10^{-12}$  and  $1 \times 10^{-14}$  M, see Table 4). Results showed that at low  $\bullet\text{OH}$  concentration, the microbial activity is of major relative importance, while it is not at high radical concentration. The day/night succession that was emphasized previously in Vaithilingom et al. (2010) must then be taken into account. In addition to  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{NO}_3\bullet$  also participates to the oxidation processes in the atmosphere. Hydroxyl radicals are generated by photochemical pathways and are mostly present during the day, while in comparison, the role of nitrate radicals is prevalent during the night (Finlayson-Pitts and Pitts, 1997). This work and the one from Vaithilingom et al. (2010) showed that microbial activity could be much more important than  $\text{NO}_3\bullet$  reactivity on the carboxylic acid degradation and that it could be considered as a relevant sink for organic compounds during the night. Hence, microorganisms can represent a significant actor of the reactivity of the atmosphere in its whole.

In conclusion, the hypothesis that biological activity would compete with radical reactivity in the chemistry of carboxylic compounds is the most likely scenario when considering night and day scenarios. To our opinion, future work should focus on the investigation of natural clouds of various chemical compositions, and include more

4896

parameters as descriptors of the processes going on in the reactivity of these environments, looking at both photo and biodegradation phenomena. In particular the evolution of microbial population and oxidants concentration such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during the incubation period seem to be relevant parameters to consider. Finally, the biological activity data experimentally determined should be used to parameterize cloud chemistry models integrating both chemical and biological components.

*Acknowledgement.* The research was funded by the CNRS and French Ministry of Research under LEFE-CHAT and ORE-BEAM programs. Mickael Vaïtilingom acknowledges Ph.D. scholarships from the French Ministry of Research. Tiffany Charbouillot and Marius Parazols acknowledge Ph.D. scholarships from the Auvergne region. Romain Maisonobe thanks the LaMP and the LPMM laboratories for their financial support. Marcello Brigante and Gilles Mailhot are gratefully acknowledged for their scientific contribution. Elodie Cano and Evelyn Freney are gratefully acknowledged for their technical contribution to this study.

## References

- Ahern, H. E., Walsh, K. A., Hill, T. C. J., and Moffett, B. F.: Fluorescent pseudomonads isolated from Hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation, *Biogeosciences*, 4, 115–124, doi:10.5194/bg-4-115-2007, 2007.
- Amato, P., Ménager, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., and Delort, A.-M.: Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds, *Atmos. Environ.*, 39, 4143–4153, 2005.
- Amato, P., Demeer, F., Melaouhi, A., Fontanella, S., Martin-Biesse, A.-S., Sancelme, M., Laj, P., and Delort, A.-M.: A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by micro-organisms, *Atmos. Chem. Phys.*, 7, 4159–4169, doi:10.5194/acp-7-4159-2007, 2007a.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., and Delort, A.-M.: An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the Puy de Dôme (France), *Atmos. Environ.*, 41, 8253–8263, 2007b.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., and Delort, A.-M.: Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59, 242–254, 2007c.
- Ariya, P. A., Nepotchaykh, O., Ignatova, O., and Amyot, M.: Microbiological degradation of atmospheric organic compounds, *Geophys. Res. Lett.*, 29, 2077–2081, 2002.
- Bauer, H., Kasper-Giebl, A., Löflund, M., Giebl, H., Hitznerberger, R., Zibuschka, F., and Puxbaum, H.: The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols, *Atmos. Res.*, 64, 109–119, 2002.
- Burrows, S. M., Elbert, W., Lawrence, M. G., and Pöschl, U.: Bacteria in the global atmosphere – Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems, *Atmos. Chem. Phys.*, 9, 9263–9280, doi:10.5194/acp-9-9263-2009, 2009.
- Casareto, B. E., Suzuki, Y., Okada, K., and Morita, M.: Biological micro-particles in rain water, *Geophys. Res. Lett.*, 23, 173–176, 1996.
- Chebbi, A. and Carlier, P.: Carboxylic acids in the troposphere, occurrence, sources, and sinks: a review, *Atmos. Environ.*, 30, 4233–4249, 1996.
- Chin, M. and Wine, P. H.: A temperature-dependent competitive kinetics study of the aqueous phase reactions of OH radicals with formate, formic acid, acetate, acetic acid and hydrated formaldehyde, in: *Aquatic and Surface Photochemistry*, edited by: Helz, G. R., Zepp, R. G., and Crosby, D. G., Lewis Publishers, Boca Raton, 85–96, 1994.
- Chung, S. H. and Seinfeld, J. H.: Global distribution and climate forcing of carbonaceous aerosols, *J. Geophys. Res.*, 107, 4407–4439, 2002.
- Claeys, M., Wang, W., Ion, A. C., Kourtchev, I., Gelencsér, A., and Maenhaut, W.: Formation of secondary organic aerosols from isoprene and its gas-phase oxidation products through reaction with hydrogen peroxide, *Atmos. Environ.*, 38, 4093–4098, 2004.
- Côté, V., Kos, G., Mortazavi, R., and Ariya, P. A.: Microbial and “de novo” transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi, *Sci. Tot. Env.*, 390, 530–537, 2008.
- Davidson, C., Phalen, R., and Solomon, P.: Airborne particulate matter and human health: a review, *Aerosol Sci. Technol.*, 39, 737–749, 2005.
- Deguillaume, L., Leriche, M., Monod, A., and Chaumerliac, N.: The role of transition metal ions on HO<sub>x</sub> radicals in clouds: a numerical evaluation of its impact on multiphase chemistry, *Atmos. Chem. Phys.*, 4, 95–110, doi:10.5194/acp-4-95-2004, 2004.
- Deguillaume, L., Leriche, M., Amato, P., Ariya, P. A., Delort, A.-M., Pöschl, U., Chaumerliac, N., Bauer, H., Flossmann, A. I., and Morris, C. E.: Microbiology and atmospheric processes: chemical interactions of primary biological aerosols, *Biogeosciences*, 5, 1073–1084,

- doi:10.5194/bg-5-1073-2008, 2008.
- Deguillaume, L., Desboeufs, K. V., Leriche, M., Long, Y., and Chaumerliac, N.: Effect of iron dissolution on cloud chemistry: from laboratory measurements to model results, *Atmos. Pol. Res.*, 1, 220–228, 2010.
- 5 Ervens, B., Gligorovski, S., and Herrmann, H.: Temperature-dependent rate constants for hydroxyl radical reactions with organic compounds in aqueous solutions, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5, 1811–1824, doi:10.1039/b300072a, 2003a.
- Ervens, B., George, C., Williams, J. E., Buxton, G. V., Salmon, G. A., Bydder, M., Wilkinson, F., Dentener, F., Mirabel, P., Wolke, R., and Herrmann, H.: CAPRAM 2.4 (MODAC mechanism):  
10 An extended and condensed tropospheric aqueous phase mechanism and its application, *J. Geophys. Res.*, 108, 4426, doi:10.1029/2002jd002202, 2003b.
- Finlayson-Pitts, B. J. and Pitts Jr., J. N.: Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles, *Science*, 276, 1045–1051, doi:10.1126/science.276.5315.1045, 1997.
- 15 Fowler, D., Pilegaard, K., Sutton, M. A., Ambus, P., Raivonen, M., Duyzer, J., Simpson, D., Fagerli, H., Fuzzi, S., Schjoerring, J. K., Granier, C., Neftel, A., Isaksen, I. S. A., Laj, P., Maione, M., Monks, P. S., Burkhardt, J., Daemmgen, U., Neiryneck, J., Personne, E., Wichink-Kruit, R., Butterbach-Bahl, K., Flechard, C., Tuovinen, J. P., Coyle, M., Gerosa, G., Loubet, B., Altimir, N., Gruenhage, L., Ammann, C., Cieslik, S., Paoletti, E., Mikkelsen, T. N.,  
20 Ro-Poulsen, H., Cellier, P., Cape, J. N., Horváth, L., Loreto, F., Niinemets, Ü., Palmer, P. I., Rinne, J., Misztal, P., Nemitz, E., Nilsson, D., Pryor, S., Gallagher, M. W., Vesala, T., Skiba, U., Brüggemann, N., Zechmeister-Boltenstern, S., Williams, J., O'Dowd, C., Facchini, M. C., de Leeuw, G., Flossman, A., Chaumerliac, N., and Erismann, J. W.: Atmospheric composition change: ecosystems-atmosphere interactions, *Atmos. Environ.*, 43, 5193–5267, 2009.
- 25 Fuzzi, S., Mandrioli, P., and Perfetto, A.: Fog droplets – an atmospheric source of secondary biological aerosol particles, *Atmos. Environ.*, 31, 287–290, 1997.
- Fuzzi, S., Facchini, M. C., Decesari, S., Matta, E., and Mircea, M.: Soluble organic compounds in fog and cloud droplets: what have we learned over the past few years?, *Atmos. Res.*, 64, 89–98, 2002.
- 30 Goldstein, A. H. and Galbally, I. E.: Known and unexplored organic constituents in the Earth's atmosphere, *Environ. Sci. Technol.*, 41, 1514–1521, 2007.
- Graedel, T. E., Mandich, M. L., and Weschler, C. J.: Kinetic model studies of atmospheric droplet chemistry. 2. Homogeneous transition metal chemistry in raindrops, *J. Geophys.*

4899

- Res.*, 91, 5205–5221, doi:10.1029/JD091iD04p05205, 1986.
- Hadi, D. A., Crossley, A., and Cape, J. N.: Particulate and dissolved organic carbon in cloud water in Southern Scotland, *Environ. Pollut.*, 88, 299–306, 1995.
- Hallquist, M., Wenger, J. C., Baltensperger, U., Rudich, Y., Simpson, D., Claeys, M., Dommen, J., Donahue, N. M., George, C., Goldstein, A. H., Hamilton, J. F., Herrmann, H., Hoffmann, T., Iinuma, Y., Jang, M., Jenkin, M. E., Jimenez, J. L., Kiendler-Scharr, A., Maenhaut, W., McFiggans, G., Mentel, Th. F., Monod, A., Prévôt, A. S. H., Seinfeld, J. H., Surratt, J. D., Szmigielski, R., and Wildt, J.: The formation, properties and impact of secondary organic aerosol: current and emerging issues, *Atmos. Chem. Phys.*, 9, 5155–5236, doi:10.5194/acp-9-5155-2009, 2009.
- 10 Herlihy, L. J., Galloway, J. N., and Mills, A. L.: Bacterial utilization of formic and acetic acid in rainwater, *Atmos. Environ.*, 21, 2397–2402, 1987.
- Herrmann, H.: Kinetics of aqueous phase reactions relevant for atmospheric chemistry, *Chem. Rev.*, 103, 4691–4716, 2003.
- 15 Herrmann, H., Tilgner, A., Barzaghi, P., Majdik, Z., Gligorovski, S., Poulain, L., and Monod, A.: Towards a more detailed description of tropospheric aqueous phase organic chemistry: CAPRAM 3.0, *Atmos. Environ.*, 39, 4351–4363, 2005.
- Jacob, D. J., Munger, J. W., Waldman, J. M., and Hoffmann, M. R.: The H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub> system at high humidities and in fogs. 1. Spatial and temporal patterns in the San Joaquin Valley of California. *J. Geophys. Res.*, 91, 1073–1088, 1986.
- 20 Jacob, D. J., Gottlieb, E. W., and Prather, M. J.: Chemistry of a polluted cloudy boundary layer, *J. Geophys. Res.*, 94, 12975–13002, doi:10.1029/JD094iD10p12975, 1989.
- Jaenicke, R.: Abundance of cellular material and proteins in the atmosphere, *Science*, 308, 73, doi:10.1126/science.1106335, 2005.
- 25 Karpel Vel Leitner, N. and Doré, M.: Mechanism of the reaction between hydroxyl radicals and glycolic, glyoxylic, acetic and oxalic acids in aqueous solution: consequence on hydrogen peroxide consumption in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV and O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems, *Water Res.*, 31, 1383–1397, 1997.
- Kroll, J. H. and Seinfeld, J. H.: Chemistry of secondary organic aerosol: formation and evolution of low-volatility organics in the atmosphere, *Atmos. Environ.*, 42, 3593–3624, 2008.
- 30 Krusiz, C., Berner, A., and Brandner, B.: A cloud water sampler for high wind speeds, *Proceedings of the EUROTRAC Symposium 92 SPB Academic Publishing bv, Den Haag*, 523–525, 1993.

4900

- Laj, P., Fuzzi, S., Facchini, M. C., Lind, J. A., Orsi, G., Preiss, M., Maser, R., Jaeschke, W., Seyfer, E., Helas, G., Acker, K., Wieprecht, W., Möller, D., Arends, B. G., Mols, J. J., Colvile, R. N., Gallagher, M. W., Beswick, K. M., Hargreaves, K. J., Storeton-West, R. L., and Sutton, M. A.: Cloud processing of soluble gases, *Atmos. Environ.*, 31, 2589–2598, 1997.
- 5 Lazrus, A. L., Kok, G. L., Gitlin, S. N., Lind, J. A., and McLaren, S. E.: Automated fluorimetric method for hydrogen peroxide in atmospheric precipitation, *Anal. Chem.*, 57, 917–922, 1985.
- Leriche, M., Chaumerliac, N., and Monod, A.: Coupling quasi-spectral microphysics with multi-phase chemistry: a case study of a polluted air mass at the top of the Puy de Dôme mountain (France), *Atmos. Environ.*, 35, 5411–5423, 2001.
- 10 Leriche, M., Curier, R., Deguillaume, L., Caro, D., Sellegri, K., and Chaumerliac, N.: Numerical quantification of sources and phase partitioning of chemical species in cloud: application to wintertime anthropogenic air masses at the Puy de Dôme station, *J. Atmos. Chem.*, 57, 281–297, 2007.
- 15 Limbeck, A., Kulmala, M., and Puxbaum, H.: Secondary organic aerosol formation in the atmosphere via heterogeneous reaction of gaseous isoprene on acidic particles, *Geophys. Res. Lett.*, 30, 1996–1999, 2003.
- Löflund, M., Kasper-Giebl, A., Schuster, B., Giebl, H., Hitenberger, R., and Puxbaum, H.: Formic, acetic, oxalic, malonic and succinic acid concentrations and their contribution to organic carbon in cloud water, *Atmos. Environ.*, 36, 1553–1558, 2002.
- 20 Lurmann, F. W., Lloyd, A. C., and Atkinson, R.: A chemical mechanism for use in long-range transport/acid deposition computer modeling, *J. Geophys. Res.*, 91, 1905–1936, 1986.
- Mack, J. and Bolton, J. R.: Photochemistry of nitrite and nitrate in aqueous solution: a review, *J. Photochem. Photobiol. A*, 128, 1–13, 1999.
- 25 Madronich, S. and Calvert, J. G.: Permutation reactions of organic peroxy radicals in the troposphere, *J. Geophys. Res.*, 95, 5697–5715, 1990.
- Marinoni, A., Laj, P., Sellegri, K., and Mailhot, G.: Cloud chemistry at the Puy de Dôme: variability and relationships with environmental factors, *Atmos. Chem. Phys.*, 4, 715–728, doi:10.5194/acp-4-715-2004, 2004.
- 30 Marinoni, A., Parazols, M., Brigante, M., Deguillaume, L., Amato, P., Delort, A.-M., Laj, P., and Mailhot, G.: Hydrogen peroxide in natural cloud water: sources and photoreactivity, submitted, *Atmos. Res.*, 2011.
- Matthias-Maser, S., Bogs, B., and Jaenicke, R.: The size distribution of primary biological

4901

- aerosol particles in cloud water on the mountain Kleiner Feldberg/Taunus (FRG), *Atmos. Res.*, 54, 1–13, 2000.
- Möller, D., Acker, K., and Wieprecht, W.: A relationship between liquid water content and chemical composition in clouds, *Atmos. Res.*, 41, 321–335, 1996.
- 5 Reasoner, D. J. and Geldreich, E. E.: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1985.
- Sahin, N.: Oxalotrophic bacteria, *Res. Microbiol.*, 154, 399–407, 2003.
- Sattler, B., Puxbaum, H., and Psenner, R.: Bacterial growth in supercooled cloud droplets, *Geophys. Res. Lett.*, 28, 239–242, 2001.
- 10 Saxena, P. and Hildemann, L. M.: Water-soluble organics in atmospheric particles: a critical review of the literature and application of thermodynamics to identify candidate compounds, *J. Atmos. Chem.*, 24, 57–109, 1996.
- Sellegri, K., Laj, P., Marinoni, A., Dupuy, R., Legrand, M., and Preunkert, S.: Contribution of gaseous and particulate species to droplet solute composition at the Puy de Dôme, France, *Atmos. Chem. Phys.*, 3, 1509–1522, doi:10.5194/acp-3-1509-2003, 2003.
- 15 Sun, Y. L., Zhang, Q., Anastasio, C., and Sun, J.: Insights into secondary organic aerosol formed via aqueous-phase reactions of phenolic compounds based on high resolution mass spectrometry, *Atmos. Chem. Phys.*, 10, 4809–4822, doi:10.5194/acp-10-4809-2010, 2010.
- Takekawa, H., Minoura, H., and Yamazaki, S.: Temperature dependence of secondary organic aerosol formation by photo-oxidation of hydrocarbons, *Atmos. Environ.*, 37, 3413–3424, 2003.
- 20 Tilgner, A. and Herrmann, H.: Radical-driven carbonyl-to-acid conversion and acid degradation in tropospheric aqueous systems studied by CAPRAM, *Atmos. Environ.*, 44, 5415–5422, doi:10.1016/j.atmosenv.2010.07.050, 2010.
- 25 Vaithilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Laj, P., Leriche, M., and Delort, A.-M.: Contribution of Microbial Activity to Carbon Chemistry in Clouds, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 23–29, doi:10.1128/aem.01127-09, 2010.
- Warneck, P.: In-cloud chemistry opens pathway to the formation of oxalic acid in the marine atmosphere, *Atmos. Environ.*, 37, 2423–2427, 2003.
- 30 Wolke, R., Sehili, A. M., Simmel, M., Knoth, O., Tilgner, A., and Herrmann, H.: SPACCIM: A parcel model with detailed microphysics and complex multiphase chemistry, *Atmos. Environ.*, 39, 4375–4388, 2005.

4902



**Table 1.** Chemical composition of the artificial cloud water media used for photodegradation experiments, and range of values observed in natural cloud water collected at the puy de Dôme station. For technical reasons, the artificial cloud water media prepared for biodegradation experiments were similar but 10 times more concentrated than indicated here. Photodegradation experiments were carried out using the concentrations indicated in the table.

Compounds	Artificial cloud water media		Natural cloud water <sup>a</sup>	
	Marine	Continental	Min	Max
Concentration ( $\mu\text{M}$ )				
Acetate	20	20	0.6	48.7
Formate	15	15	0.8	71.4
Succinate	1.5	1.5	0.1	4.1
Oxalate	3	3	0.1	17.4
$\text{Cl}^-$	320	250	0.5	1948.9
$\text{NO}_3^-$	70	200	3.4	766.8
$\text{SO}_4^{2-}$	35	50	1.9	369.5
$\text{Na}^+$	310	250	0.4	281.0
$\text{NH}_4^+$	70	200	6.3	1801.7
$\text{K}^+$	10	10	0.1	124.1
$\text{Mg}^{2+}$	10	10	0.2	45.6
$\text{Ca}^{2+}$	40	40	0.3	74.8
pH	6–6.5	4.7–5.2	3.9	7.6

<sup>a</sup> from the OPGC database on cloud chemical composition at the puy de Dôme station: <http://www.obs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data.php>.

4903

**Table 2.** Measured rates of biodegradation of carboxylic acids by pure strains at 5 and 17 °C.

	Marine			Continental		
	Acetate	Formate	Succinate	Acetate	Formate	Succinate
Rates of biodegradation ( $\text{mol cell}^{-1} \text{s}^{-1}$ )						
17 °C						
3b-10 <i>Sphingomonas</i> sp.	0	0	0	0	0	0
14b-5 <i>Sphingomonas</i> sp.	0	$2 \times 10^{-19}$	$2 \times 10^{-19}$	0	$2 \times 10^{-19}$	$3 \times 10^{-19}$
14b-6 <i>Sphingomonas</i> sp.	0	0	0	0	0	0
6b-4 <i>Pseudomonas</i> sp.	$7 \times 10^{-19}$	$1 \times 10^{-18}$	$1 \times 10^{-19}$	$5 \times 10^{-19}$	$1 \times 10^{-17}$	$6 \times 10^{-19}$
14b-10 <i>Pseudomonas</i> sp.	$2 \times 10^{-18}$	$2 \times 10^{-18}$	$2 \times 10^{-19}$	$7 \times 10^{-18}$	$7 \times 10^{-18}$	$3 \times 10^{-19}$
3b-1 <i>Pseudomonas syringae</i>	$1 \times 10^{-18}$	$2 \times 10^{-18}$	$1 \times 10^{-18}$	$5 \times 10^{-19}$	$1 \times 10^{-18}$	$4 \times 10^{-19}$
12b-8 <i>Pseudomonas syringae</i>	$6 \times 10^{-19}$	$8 \times 10^{-18}$	$4 \times 10^{-20}$	$2 \times 10^{-18}$	$2 \times 10^{-18}$	$5 \times 10^{-19}$
13b-2 <i>Pseudomonas syringae</i>	$1 \times 10^{-18}$	$3 \times 10^{-18}$	$1 \times 10^{-18}$	$4 \times 10^{-19}$	$2 \times 10^{-18}$	$6 \times 10^{-19}$
13b-3 <i>Pseudomonas graminis</i>	$4 \times 10^{-19}$	$5 \times 10^{-18}$	$5 \times 10^{-19}$	$5 \times 10^{-19}$	$4 \times 10^{-18}$	$4 \times 10^{-19}$
14b-14 <i>Pseudomonas viridiflava</i>	$9 \times 10^{-19}$	$2 \times 10^{-18}$	$6 \times 10^{-19}$	$9 \times 10^{-20}$	$7 \times 10^{-19}$	$1 \times 10^{-19}$
16b-1 <i>Bacillus</i> sp.	0	0	0	0	0	0
5b-1 <i>Bacillus pumilus</i>	0	0	0	0	0	0
3b-7 <i>Arthrobacter rhombi</i>	0	0	0	0	0	0
14b-13 <i>Clavibacter michiganensis</i>	0	0	0	0	0	0
30b-1 <i>Frigoribacterium</i> sp.	0	0	0	0	0	0
14b-13 <i>Frigoribacterium</i> sp.	0	0	0	0	0	0
23b-5 <i>Rhodococcus</i> sp.	$5 \times 10^{-18}$	$8 \times 10^{-19}$	$5 \times 10^{-20}$	$4 \times 10^{-18}$	$1 \times 10^{-18}$	$7 \times 10^{-20}$
Microbial average rate	$7 \times 10^{-19}$	$1 \times 10^{-18}$	$2 \times 10^{-19}$	$8 \times 10^{-19}$	$2 \times 10^{-18}$	$2 \times 10^{-19}$
5 °C						
3b-10 <i>Sphingomonas</i> sp.	0	0	0	0	0	0
14b-5 <i>Sphingomonas</i> sp.	0	0	0	0	0	0
14b-6 <i>Sphingomonas</i> sp.	0	0	0	0	0	0
6b-4 <i>Pseudomonas</i> sp.	$5 \times 10^{-19}$	$6 \times 10^{-19}$	$3 \times 10^{-20}$	$2 \times 10^{-19}$	$2 \times 10^{-18}$	$1 \times 10^{-19}$
14b-10 <i>Pseudomonas</i> sp.	$7 \times 10^{-19}$	$1 \times 10^{-18}$	$9 \times 10^{-21}$	$2 \times 10^{-18}$	$3 \times 10^{-18}$	$8 \times 10^{-21}$
3b-1 <i>Pseudomonas syringae</i>	0	$4 \times 10^{-19}$	$2 \times 10^{-19}$	0	$2 \times 10^{-19}$	$4 \times 10^{-20}$
12b-8 <i>Pseudomonas syringae</i>	$2 \times 10^{-19}$	$5 \times 10^{-18}$	$3 \times 10^{-20}$	$2 \times 10^{-19}$	$9 \times 10^{-19}$	$1 \times 10^{-19}$
13b-2 <i>Pseudomonas syringae</i>	0	$1 \times 10^{-18}$	$3 \times 10^{-19}$	0	$6 \times 10^{-19}$	$2 \times 10^{-19}$
13b-3 <i>Pseudomonas graminis</i>	$1 \times 10^{-19}$	$1 \times 10^{-18}$	$1 \times 10^{-19}$	$5 \times 10^{-20}$	$7 \times 10^{-19}$	$7 \times 10^{-20}$
14b-14 <i>Pseudomonas viridiflava</i>	0	$6 \times 10^{-19}$	$7 \times 10^{-20}$	0	$9 \times 10^{-20}$	$1 \times 10^{-20}$
16b-1 <i>Bacillus</i> sp.	0	0	0	0	0	0
5b-1 <i>Bacillus pumilus</i>	0	0	0	0	0	0
3b-7 <i>Arthrobacter rhombi</i>	0	0	0	0	0	0
25b-3 <i>Clavibacter michiganensis</i>	0	0	0	0	0	0
14b-13 <i>Frigoribacterium</i> sp.	0	0	0	0	0	0
30b-1 <i>Frigoribacterium</i> sp.	0	0	0	0	0	0
23b-5 <i>Rhodococcus</i> sp.	$1 \times 10^{-18}$	$4 \times 10^{-19}$	$4 \times 10^{-20}$	$2 \times 10^{-18}$	$8 \times 10^{-19}$	$4 \times 10^{-20}$
Microbial average rate	$2 \times 10^{-19}$	$6 \times 10^{-19}$	$5 \times 10^{-20}$	$2 \times 10^{-19}$	$4 \times 10^{-19}$	$4 \times 10^{-20}$

Global experimental uncertainties are evaluated from 30 to 35%.

4904

**Table 3.** Estimated rates of photo and biodegradation in artificial cloud water at 17 °C.

Medium/compounds	17 °C	Rates in artificial cloud water (Ms <sup>-1</sup> )			
		Acetate	Formate	Succinate	Oxalate
Marine	S1	0	$7.1(\pm 2.2) \times 10^{-10}$	0	$2.7(\pm 1.2) \times 10^{-10}$
	S2	0	$2.4(\pm 0.1) \times 10^{-11}$	0	$2.2(\pm 0.4) \times 10^{-11}$
	Microbial <sup>*</sup>	$5.3 \times 10^{-11}$	$1.1 \times 10^{-11}$	$1.9 \times 10^{-11}$	0
Continental	S1	0	$7.4(\pm 2.5) \times 10^{-10}$	0	$3.4(\pm 0.9) \times 10^{-10}$
	S2	0	$1.5(\pm 0.8) \times 10^{-10}$	0	$1.9(\pm 0.9) \times 10^{-10}$
	Microbial <sup>*</sup>	$6.7 \times 10^{-11}$	$1.4 \times 10^{-10}$	$1.5 \times 10^{-11}$	0
Marine and continental	*OH ( $1 \times 10^{-12}$ M)	$1.2 \times 10^{-9a}$	$3.2 \times 10^{-8b}$	$6.6 \times 10^{-10b}$	$3.2 \times 10^{-10b}$
	*OH ( $1 \times 10^{-14}$ M)	$1.2 \times 10^{-11a}$	$3.2 \times 10^{-10b}$	$6.6 \times 10^{-12b}$	$3.2 \times 10^{-12b}$

Photodegradation rates ( $\pm$  absolute uncertainties for 3 replicates)

\* Cellular concentration is equal to  $8 \times 10^7$  cells L<sup>-1</sup> (mean value observed in natural cloud water sampled at the puy de Dôme station, Amato et al., 2007b)

<sup>a</sup> Chin and Wine, 1994; <sup>b</sup> Ervens et al., 2003a.

4905

**Table 4.** Maximal aqueous \*OH concentrations simulated by various multiphase cloud chemistry models. These models consider different explicit chemical mechanism and simulate clouds with different microphysical properties (monodisperse to polydisperse).

Chemical mechanisms	Cloud simulation	Chemical scenario	Simulated *OH concentration (max) (M)	References
<i>Aqueous:</i> Chemistry of some inorganic and organic compounds	Permanent Monodisperse	Polluted cloud	$2 \times 10^{-13}$	Graedel et al. (1986)
<i>Gas phase:</i> Lurmann et al. (1986) <i>Aqueous:</i> Chemistry of some inorganic and organic compounds	Permanent Polydisperse	Polluted cloud	$1.6 \times 10^{-14}$	Jacob et al. (1989)
<i>Gas phase:</i> RACM	Permanent Monodisperse	Remote Urban Marine	$2 \times 10^{-13}$ $1 \times 10^{-13}$ $4.5 \times 10^{-13}$	Ervens et al. (2003b)
<i>Aqueous:</i> CAPRAM 3.0	Permanent Polydisperse	Remote	$1.4 \times 10^{-13}$	Herrmann et al. (2005)
Chemistry of inorganic and organic compounds (up to 5 carbon atoms)	Non-permanent Polydisperse	Remote Urban	$5 \times 10^{-14}$ $1 \times 10^{-14}$	Tilgner and Herrmann (2010)
<i>Gas:</i> Madronich and Calvert (1990)	Permanent Monodisperse	Polluted cloud	$2 \times 10^{-14}$	Leriche et al. (2001)
	Permanent Monodisperse	Remote Urban	$1.7 \times 10^{-12}$ $1 \times 10^{-12}$	Deguillaume et al. (2004)
<i>Aqueous:</i> Chemistry of inorganic and organic compounds (up to 2 carbon atoms)	Non-permanent Polydisperse	Polluted cloud	$7 \times 10^{-14}$	Leriche et al. (2007)
	Permanent Monodisperse	Remote	$3.5 \times 10^{-13}$	Deguillaume et al. (2010)

4906

**Table 5.** Ionic composition and pH of the natural cloud water sampled at the puy de Dôme station.

Compounds	Concentrations ( $\mu\text{M}$ )
Acetate	24.3
Formate	48.1
Succinate	4.7
Oxalate	9.8
$\text{Cl}^-$	60.4
$\text{NO}_3^-$	192.1
$\text{SO}_4^{2-}$	78.2
$\text{Na}^+$	46.4
$\text{NH}_4^+$	287.6
$\text{K}^+$	11.7
$\text{Mg}^{2+}$	31.3
$\text{Ca}^{2+}$	45.9
pH	5.1

4907

**Table 6.** Comparison between biodegradation rates in the natural cloud water at  $12^\circ\text{C}$  measured in this work and theoretical degradation rates for extreme  $\bullet\text{OH}$  concentrations.

$12^\circ\text{C}$	Degradation rates ( $\text{M s}^{-1}$ )			
	Acetate	Formate	Succinate	Oxalate
Microbial activity* (Natural cloud water)	$1.2(\pm 0.4) \times 10^{-10}$	$9.1(\pm 1.9) \times 10^{-11}$	$3.3(\pm 0.9) \times 10^{-11}$	0
$\bullet\text{OH}$ ( $1 \times 10^{-12}$ M)	$1.3 \times 10^{-9\text{a}}$	$9.8 \times 10^{-8\text{b}}$	$1.9 \times 10^{-9\text{b}}$	$8.0 \times 10^{-10\text{b}}$
$\bullet\text{OH}$ ( $1 \times 10^{-14}$ M)	$1.3 \times 10^{-11\text{a}}$	$9.8 \times 10^{-10\text{b}}$	$1.9 \times 10^{-11\text{b}}$	$8.0 \times 10^{-12\text{b}}$

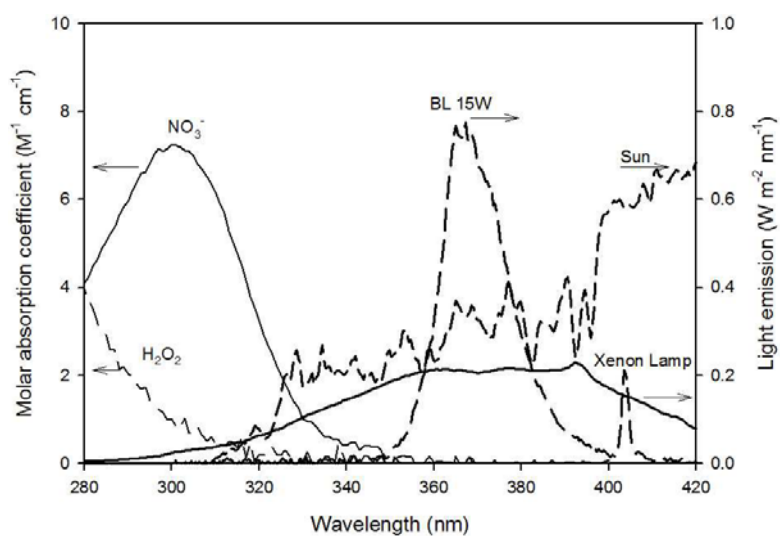
Biodegradation rates ( $\pm$ measurement uncertainties).

No variation of concentrations over time was detected in filter-sterilized natural cloud water taken as reference sample.

<sup>a</sup> Chin and Wine, 1994; <sup>b</sup> Ervens et al., 2003a.

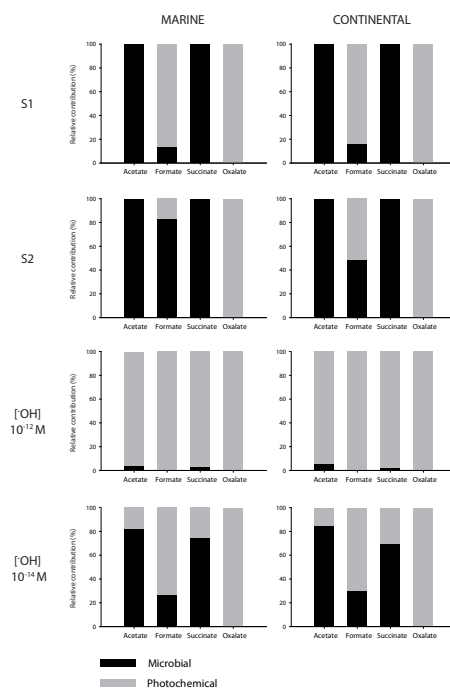
4908





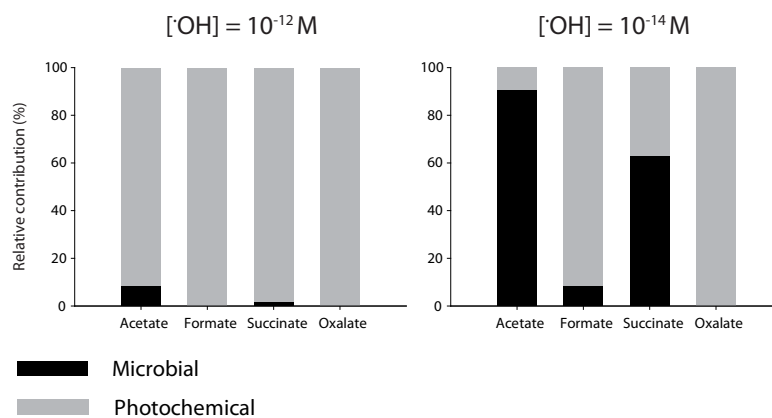
**Fig. 1.** Emission spectra of the 1000 W xenon lamp (S1), of the Philips Actinic BL 15 W lamps (S2), of the sun at Earth's surface and molar absorption coefficients of nitrate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aqueous solutions.

4909



**Fig. 2.** Microbial and photochemical relative contributions to the degradation of carboxylic compound in “marine” (left side) and “continental” (right side) artificial cloud water. S1 and S2 correspond to the 2 irradiation setups.  $[^*OH] 10^{-12} M$  and  $[^*OH] 10^{-14} M$  are calculations based on data in the literature: simulated standard  $^*OH$  concentrations in cloud water ( $10^{-12}$  and  $10^{-14} M$ , respectively) and reaction rates with the respective acids (see Tables 3 and 4 for the references).

4910



**Fig. 3.** Relative contribution of microbial activity (measured) and of photochemical reactivity (estimated from literature) to the degradation of carboxylic acids in natural cloud water at 12 °C. These calculations are based on the rates of degradation measured in unfiltered natural cloud water, taking filtered subsample as an abiotic reference.

### II.3.3. Conclusions

#### *- Biodégradation des composés organiques en milieu « nuage artificiel » -*

Pour les expériences de biodégradation, les incubations des milieux « continental » et « marin » en présence de bactéries ont montré que le formiate, l'acétate et le succinate sont dégradés par un peu plus de la moitié des 17 souches étudiées à 5 et 17°C et que l'oxalate n'est dégradé par aucune des 17 souches. Les conclusions majeures de cette étude mimant différents scénarios (nuage pollué ou non, conditions de température été /hiver) sont les suivantes :

- (1) l'activité métabolique des souches testées est peu influencée par les différences d'acidité entre ces deux milieux, donc par l'origine des masses d'air, anthropisées ou non ;
- (2) les vitesses de biodégradations sont en moyenne 2 à 5 fois plus rapides à 17°C qu'à 5°C. La température est sans doute le facteur limitant majeur pour l'activité microbienne, la contribution microbienne à la chimie atmosphérique n'aurait alors de sens que dans des nuages dits « chauds » (température supérieure à 0°C).

#### *- Expérience d'irradiation des solutions « nuage artificiel » -*

Pour les expériences d'irradiation de l'eau nuageuse en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contrairement aux résultats attendus et rapportés dans la littérature, nous n'avons pas observé de dégradation de l'acétate et du succinate, seul l'oxalate et le formiate ont été dégradés. On peut quand même indiquer, que pour la plupart des études sur la détermination des constantes de réaction de ces composés carboxyliques vis-à-vis des radicaux  $\cdot\text{OH}$ , les irradiations en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont réalisées sous des rayonnements UV de longueur d'onde inférieure à 290 nm. Dans ces conditions, les vitesses de dégradation attribuées aux radicaux  $\cdot\text{OH}$  peuvent être en partie imputées à de la photolyse directe. Les études sur la chimie radicalaire devraient être effectuées dans des conditions plus proches de celles rencontrées dans le milieu nuageux.

#### *- Confrontation des vitesses de biotransformation à la chimie radicalaire -*

En utilisant la moyenne des vitesses de biodégradation obtenues pour les 17 souches, on obtient une contribution de la dégradation du formiate par la voie biotique d'environ 10% et 60%, par rapport à celles photo-induites dans les systèmes S1 et S2, respectivement. En comparant ces valeurs expérimentales, on attribue la totalité de la dégradation de l'oxalate aux voies photo-induites, et la totalité de la dégradation de l'acétate et du succinate aux voies métaboliques.

En utilisant les constantes de dégradation des composés carboxyliques vis-à-vis des radicaux  $\cdot\text{OH}$  de la littérature, et la plus basse concentration maximale en radicaux  $\cdot\text{OH}$  simulée pour différents scénarios nuageux, soit  $1 \times 10^{-14}$  M, on constate que les vitesses de dégradation obtenues sont plus proches de celles observées expérimentalement avec le système S1. Cela suggère que cette concentration en radicaux est probablement la plus réaliste. En conservant le même scénario, la contribution des microorganismes dans la chimie de jour est alors estimée à 85%, 30% et 70%, respectivement sur le bilan des puits de l'acétate, du formiate et du succinate.

Ces résultats montrent que la contribution des microorganismes sur le bilan des puits de l'acétate, du formiate et du succinate peut, dans certains cas, être majoritaire face à la contribution des radicaux  $\cdot\text{OH}$ . Ces premiers résultats confirment l'intérêt d'étudier les microorganismes comme acteurs de la chimie des composés organiques au sein de la phase aqueuse du nuage même sous condition diurne. De plus, l'étude des processus photochimiques directs et indirects se produisant dans l'eau nuageuse doit se poursuivre par la même approche expérimentale que celle utilisée pour l'étude des microorganismes. En clair il faut aller vers une complexification des milieux d'irradiation et l'utilisation de concentrations chimiques en oxydants proches de celles mesurées dans le milieu réel. Il faut également combiner les processus biotiques et abiotiques dans les mêmes conditions expérimentales puisqu'ils coexistent dans les conditions atmosphériques réelles.

Pour conclure, l'expérience préliminaire d'incubation de l'eau nuageuse réelle en présence de ses microorganismes endogènes valide notre modèle expérimental ; en effet les vitesses moyennes de biotransformation obtenues en milieux « nuage artificiel » sont très proches de celles obtenues dans l'eau nuageuse « naturelle ».

## II.4.Photo et bio-transformation dans l'eau de nuage « naturelle »

Précédemment, nous avons utilisé des solutions mimant de manière simplifiée la composition chimique de l'eau nuageuse. Les expériences d'incubation en présence de microorganismes ont été réalisées en culture pure, et pour un nombre limité de souches compte-tenu de la diversité des espèces microbienne présentes dans l'eau nuageuse. Les expériences d'irradiation sont également simplifiées d'un point de vue des sources et des puits de radicaux, compte-tenu de la faible diversité des composés organiques présents dans nos milieux « nuage artificiel », de l'absence de fer, etc.

Ce dernier chapitre des résultats concerne l'étude des processus biologiques et/ou photochimiques observés lors d'incubation d'eau nuageuse « naturelle », en présence ou en absence de lumière et/ou de la flore microbienne autochtone.

Les objectifs de ces incubations d'eau nuageuse « naturelle » sont de deux ordres:

- Compléter nos études sur le devenir des composés organiques dans le nuage en déterminant leurs vitesses de bio- et de photo-transformation et ceci sur des échantillons de nuage réels. L'objectif ici est de se rapprocher au plus près des conditions atmosphériques, même si on est limité à une étude en phase liquide « bulk » uniquement.
- Aborder une question scientifique nouvelle liée aux conditions de stress oxydant imposées aux microorganismes par la présence de  $H_2O_2$  et de radicaux  $\cdot OH$ .
  - 1) Il s'agira tout d'abord d'analyser l'influence de ce stress sur l'activité du métabolisme carboné des microorganismes. En clair, y a-t-il inhibition ou non de ce métabolisme ?
  - 2) D'autre part, il s'agira d'évaluer l'impact des microorganismes sur la capacité oxydante du nuage en compétition directe avec les mécanismes abiotiques *via* le métabolisme du stress oxydant. En d'autre terme,  $H_2O_2$  est-il transformé par les microorganismes *via* l'activité de leurs catalases endogènes?

Nous avons réalisé les expériences d'incubation pour trois échantillons d'eau nuageuse collectée en juin 2010 et provenant d'évènements nuageux indépendants, significatifs des diverses masses d'air habituellement observées au puy de Dôme.

### II.4.1. Matériels et Méthodes

Cette partie prend en compte les nouveaux éléments du matériel et des méthodes utilisés dans les expériences présentées dans ce chapitre.

#### II.4.1.1. Formaldéhyde

La détermination de la concentration en formaldéhyde est réalisée par un dosage fluorométrique basé sur la réaction de Hantzsch, la cyclisation du formaldéhyde avec l'acétoacétanilide (AAA) en présence d'ammoniaque produit un complexe fluorescent stable (Li et al., 2007). Ce protocole proposé par Li et al. (2007) a été miniaturisé et adapté dans le but de mesurer la concentration en formaldéhyde dans des échantillons d'eau nuageuse. Les étapes du dosage sont détaillées ci-dessous :

(1) Les solutions sont préparées quelques heures avant le dosage et conservées à température ambiante.

- Solution AAA : la poudre d'AAA est diluée dans une solution d'éthanol à 96°, puis complétée avec de l'eau pour obtenir une solution d'éthanol à 50% (v/v) et de 0,2 M de concentration finale en AAA.
- Solution AA (Acétate d'Ammonium): la poudre d'acétate d'ammonium (AA) est diluée dans de l'eau à 4 M.

(2) Le mélange des réactifs est réalisé directement dans les puits de la microplaque utilisée pour la lecture de la fluorescence. On ajoute dans chaque puits les solutions suivantes : 60  $\mu$ L d'AA, 60  $\mu$ L d'AAA et 60  $\mu$ L d'éthanol à 96°. Le mélange réactionnel est agité avant l'ajout de 120  $\mu$ L de la solution à doser. Après agitation, le mélange est incubé au noir durant 25 min à température ambiante. Une gamme étalon est préparée pour chaque dosage.

(3) La mesure s'effectue dans un lecteur multiplaque à fluorescence (Safire<sup>II</sup> TECAN<sup>®</sup>), le complexe fluorescent est excité à  $\lambda_{ex} = 375$  nm et réémet à  $\lambda_{em} = 490$  nm.

La limite de détection du formaldéhyde par cette méthode de dosage est de 0,1  $\mu$ M, avec une erreur de mesure inférieure à 5%. L'effet de la congélation et de la décongélation sur la concentration en formaldéhyde est de  $\pm 5\%$  pour les cas où l'échantillon est congelé dans un microtube avec moins d' $\frac{1}{4}$  de volume d'air.

#### II.4.1.2. Filtration des échantillons d'eau nuageuse

La méthode d'élimination des microorganismes indigènes de l'eau de nuage par filtration a été préférée à la stérilisation par autoclavage car elle modifie moins la composition en matière

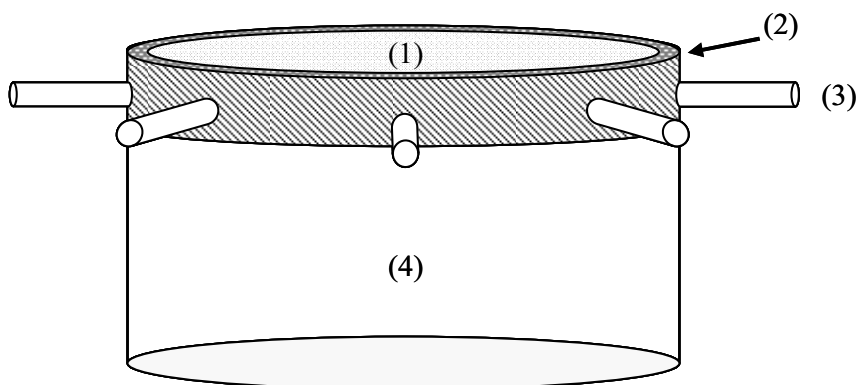
dissoute des échantillons d'eau nuageuse. On utilise des filtres à seringue en nylon de 0,2  $\mu\text{m}$  de porosité, pré-rincés par le passage de 20 mL d'eau ultrapure stérile et des seringues stériles en plastique de 50 mL préalablement rincées avec de l'eau ultrapure stérile. Le volume maximum d'eau nuageuse filtré est de 100 mL pour chaque filtre.

La concentration des composés chimiques dissous dans nos échantillons d'eau nuageuse n'a pas été modifiée par la filtration ; cette observation est valable pour nos conditions de filtration et d'analyses chimiques.

#### **II.4.1.3.Photo-bioréacteurs**

Nous avons effectué des tests préliminaires dans les systèmes d'irradiation S1 et S2. Lors d'irradiation de solutions contenant des bactéries aérobies avec le système S1, nous avons constaté que l'oxygénation était insuffisante et entraînait une asphyxie des cellules. De plus le système S1, ne permet pas de réaliser plusieurs expériences en simultanément.

Cela nous a amené à mettre au point un autre réacteur adaptable aux conditions de culture microbiologique. Quatre photo-bioréacteurs identiques ont été conçus, ils permettent à la fois une irradiation correcte et une bonne oxygénation de la solution par agitation sur un plateau rotatif. Le descriptif de ce photo-bioréacteur est présenté Figure II-25.

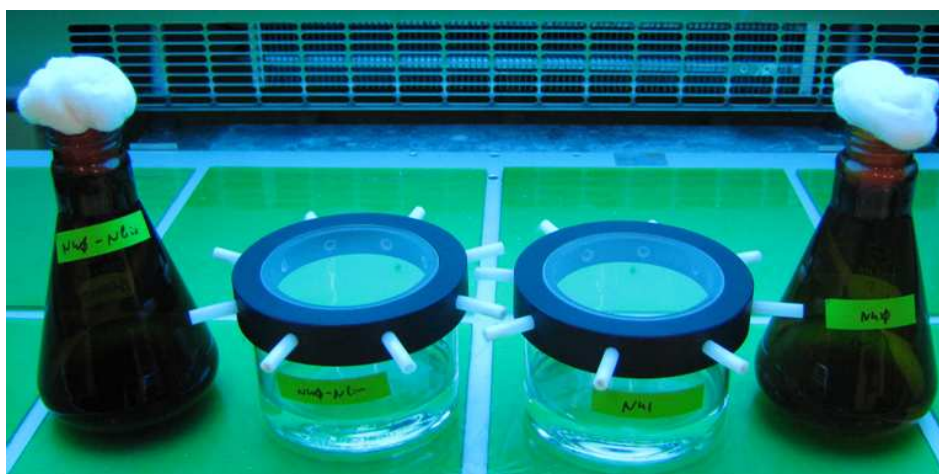


**Figure II-25 :** Schéma du réacteur n°2 utilisé dans système S2, (1) verre en Pyrex, (2) pièce de maintien en nylon, (3) tube d'aération en téflon équipé de filtre en coton (8 au total), (4) cristallin dans lequel est placée la solution à irradier.

#### **II.4.1.4.Incubation d'eau nuageuse**

L'incubation des échantillons d'eau nuageuse a été réalisée dans le système d'irradiation S2. Les échantillons filtrés et non-filtrés sont incubés à l'obscurité et sous irradiation lumineuse à 17°C et sous agitation rotative à 110 r.p.m. Les échantillons à incuber à l'obscurité sont placés dans des erlenmeyers brun, et ceux à incuber sous irradiation lumineuse dans les photo-

bioréacteurs, voir Figure II-26. Nous avons montré qu'il n'y avait pas de différence liée à la forme des récipients (erlens ou cristallisoirs) pour les incubations à l'obscurité.



**Figure II-26** : Echantillons d'eau nuageuse filtrée et non-filtrée incubés en présence et en absence de lumière dans le système d'irradiation S2.

L'incubation dure 7 jours et des analyses chimiques et biologiques sont effectuées régulièrement, le Tableau II-4 résume l'ensemble des analyses réalisées.

	Volume utile (mL)	A la fin de la collecte d'eau nuageuse	Incubation				Fin
			10 min avant	à 0, 2 et 6 h d'incubation	Toutes les 12 h	Toutes les 24 h	
pH	0,5	■	■	■		■	■
Conductivité	8	■	■				■
TOC	10	■	■				■
Fe(II) et Fe(III)	2	■	■				■
Analyses ioniques	1	■	■	■	■	■	■
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,2	■	■	■	■	■	■
Formaldéhyde	0,5	■	■	■		■	■
ATP et ADP	0,3	■	■	■	■	■	■
Dénombrement des cellules totales	20	■	■				■
Dénombrement des cellules cultivées sur R2A	0,5	■	■				■
Volume totale requis pour toutes les analyses (mL)	43	43	43	2,5	1,5	2,5	43

**Tableau II-4** : Tableau récapitulatif des analyses chimiques et biologiques réalisées lors de la collecte d'eau nuageuse et de son incubation.



Le volume minimum d'eau nuageuse nécessaire pour l'expérience est d'environ 600 mL, dont 4×120 mL pour les incubations. Suite aux 16 prélèvements effectués durant l'incubation sur 168 h, il reste environ 75% du volume initial d'eau nuageuse dans chaque récipient en fin d'expérience. Nous avons contrôlé la stérilité de nos échantillons filtrés en début et en fin d'incubation par le dosage de l'ATP et le dénombrement des cellules totales.

#### **II.4.2.Résultats, publication non soumise**

Les expériences d'incubation d'eau nuageuse ont été réalisées en juin 2010, pour trois évènements nuageux indépendants dont on a pu collecter le volume d'eau nécessaire. Ces trois évènements nuageux sont représentatifs des trois types de masse d'air majoritairement rencontrés au sommet du pdD. Les nuages « Cloud » 1, 2 et 3 sont respectivement sous influence océanique, continentale et urbaine.

*Les collègues ayant contribué à la partie expérimentale sont :*

- *L. Deguillaume (Physicien-adjoint au LaMP/OPGC) lors des prélèvements d'eau nuageuse et des mesures physico-chimiques réalisées au sommet du pdD.*
- *V. Vinatier (ATER au SEESIB) pour la mise au point du protocole de dosage du peroxyde d'hydrogène.*

# **“Microbial activity in natural cloud water: contribution to organic carbon balance and oxidant capacity of clouds”**

M. Vaïtilingom<sup>1,2,3,4</sup>, L. Deguillaume<sup>3,4</sup>, V. Vinatier<sup>1,2</sup>, M. Sancelme<sup>1,2</sup>, P. Amato<sup>1,2</sup>, N. Chaumerliac<sup>3,4</sup> and A.-M. Delort<sup>1,2</sup> \*

[1] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire de Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[2] CNRS, UMR 6504, F-63177 Aubière

[3] Clermont Université, Université Blaise Pascal, OPGC, Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[4] CNRS, UMR 6016, F-63177 Aubière

[5] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire (LPMM), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[6] CNRS, UMR 6505, F-63177 Aubière

[\*] Corresponding author: A.-M. Delort

Tel: 00 33 473 40 77 14; Fax: 00 33 473 40 77 17

E-mail address: a-marie.delort@univ-bpclermont.fr

## 1 Introduction

Microorganisms are a part of Primary Biological Aerosol particles (PBA) and the dominant life aerosols present in the dry and wet atmosphere (Jaenicke, 2005 ; Burrows et al., 2009 ; Womack et al., 2010). This environment is stressful for airborne microorganisms; low temperature, desiccation, oxidation, UV radiation, acidic pH in aqueous phase, etc.; and can affect the cell survival (Jones and Harrison, 2004 ; Deguillaume et al., 2008). Microbial cells in cloud droplets suffer in a less extent from desiccation and UV damage, oxidative conditions, but the low temperatures remain the major hindrance for cell activity. However, bacteria can grow in cloud water at temperature at or below 0°C (Sattler et al., 2001) and have metabolic activity at sub-zero temperature, up to -20°C (Rivkina et al., 2000 ; Christner, 2002 ; Junge et al., 2006). Cultivable microorganisms (fungal spores, yeasts, bacteria) were found in fog and cloud water (Fuzzi et al., 1997 ; Bauer et al., 2002 ; Amato et al., 2005 ; Amato et al., 2007a). Bauer et al. (2002) showed that a majority of bacteria present in cloud water were viable (up to 95% on two samples). ATP measurements in cloud water by Amato et al. (2007b) suggested that a major part of microorganisms were metabolically active in this medium.

The cloud system is an ideal medium for the development of complex multiphase chemistry where chemical species from the gas, solid and aqueous phases are transformed. This perturbs the homogeneous gas phase chemistry and also modifies physico-chemical properties of aerosol particles that are scavenged by the cloud system (nucleation or impaction). During last decade, the amount of chemical components discharged in the atmosphere has increased significantly and continuously due to human activities. Among these pollutants, oxygenated organic compounds are efficiently dissolved into cloud droplets (Hadi et al., 1995 ; Saxena and Hildemann, 1996 ; Facchini et al., 1999) and carboxylic acids (CAs) could represent a significant part of the soluble matter. Formic and acetic acids are the most abundant (mainly produced in the gaseous phase), oxalic acid is the third dominant species and the main di-carboxylic acid followed by succinic, malonic, maleic acids (mainly dissolved from organic particles) (Chebbi and Carlier, 1996 ; Löflund et al., 2002 ; Marinoni et al., 2004 ; Legrand et al., 2007). The reactivity of CAs in cloud water is largely thought to be linked to the oxidative action of solar radiation (photochemistry), which generates free radicals such as  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{HO}_2^{\cdot}$  and  $\text{NO}_3^{\cdot}$  (Herrmann et al., 2010).

The presence of viable microorganisms that maintain and develop in clouds implies the uptake of organic compounds by cells and the elimination of metabolic waste and toxic compounds present in the environment. Among those, reactive oxygenated species (ROS) such as hydrogen peroxide  $\text{H}_2\text{O}_2$  and free radicals trigger oxidative stress in cells; their detoxification involves specialized enzymes (catalases, peroxidases, superoxide dismutase) and non-enzymatic compounds (Sigler et al., 1999; Kreiner et al., 2002).

The discovery of microbial activity in clouds suggested a possible implication in the chemistry of clouds. In the past, several studies investigated the microbial activity in the atmospheric waters. For example, (Herlihy et al., 1987) first demonstrated the ability of microbes to degrade formic and acetic acids in rainwater. (Ariya et al., 2002) observed the degradation of several dicarboxylic acids in aqueous solutions colonized by airborne fungi. (Côté et al., 2008) tested airborne fungi to decompose dicarboxylic acids and observed the effective biodegradation of malonic acid. (Amato et al., 2005; Amato et al., 2007c) isolated bacteria and yeast from cloud water and showed their ability to degrade acetate, formate, L- and D-lactate, succinate, methanol and formaldehyde. More recently, Vaïtilingom et al. (2010, 2011) compared bio- and photo-degradations of organic species in solutions mimicking cloud waters, inoculated with microorganisms originating from clouds, or exposed to UV light. The activity of microorganisms was high enough to affect the chemistry of CAs in warm clouds, and inferred estimations showed that it would even drive the reactivity of CAs during the night.

Though all these studies were pertinent for the question, none of them has clearly demonstrated that microbial activity in “natural clouds” actually participates to the chemistry of organic compounds in clouds. Here we followed the biodegradation of organic matter in natural cloud water samples (as opposed to “artificial” in Vaïtilingom et al. (2011)) collected at the puy de Dôme (pdD) Mountain. These samples were sterilized or not and incubated in the dark or under UV radiation. Complementary biological and chemical analyses were performed along the incubation time. The fate of the carboxylic acids and formaldehyde present in these cloud waters was followed and linked with the microbial and photochemical processes. The second interest deals with the microbial metabolism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> which is one of the major source of photo-produced <sup>•</sup>OH radicals. We propose to investigate this new scientific question: do microorganisms interact with reactive oxygenated species?; how they can for example impede the production of free radicals from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thus contribute to shunt photochemical reactions?

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Cloud water collection**

Cloud water was sampled at the top of the pdD Mt (1465 m.a.s.l, 45°46' North, 2°57' Est, France), see for more information: <http://www.obs.univ-bpclermont.fr/SO/beam>. This sampling-site is frequently covered by clouds and is disconnected from local pollution. Two Cloud Water Samplers (CWS) developed by (Kruisz et al., 1993) were used with an estimated cut-off diameter of 7 μm for an approximately debit rate of 80 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> (Marinoni et al., 2004). The collection parts of CWS were sterilized by autoclave (20 min at 121°C) before sampling, while the body parts were sterilized on site by washing with ethanol (70% v/v) and profusely rinsing with sterile ultrapure water. During sampling, the cloud water was recovered from the collector under sterile conditions, when the volume in each collector reached 100 mL. A minimum volume of 600 mL of cloud water was necessary for bio- and

chemical analyses listed in Table 1. At the end of the collection, a part of sample was immediately frozen for future laboratory analyses, and the other part was kept cold until laboratory experiment (less than 3 h after the end of sampling).

## 2.2 Cloud water incubation

The required cloud water volume for incubation was 600 mL. Half of the sample was sterilized by filtration (filter porosity at 0.22  $\mu\text{m}$ , nylon filter) to eliminate microorganisms. The filtered and unfiltered samples were incubated during 7 days in the dark or under light emission. Experiments were carried out at 17°C, a temperature slightly different from cloud water temperature due to technical restrictions. The incubator chamber was equipped with a stirring plate (aerobic condition, 110 rpm) under fluorescent tube emitting within the wavelength range 340-420 nm ( $\lambda_{\text{max}}=365$  nm and total light energy: 33 J s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>). For incubation in darkness, two black Erlenmeyer flasks of 250 mL were used. For incubation under light emission, two photo-bioreactors were used. These photo-bioreactors consisted of a cylindrical Pyrex crystallizer (300 mL, 95 mm of diameter) covered with a transparent Pyrex<sup>®</sup> glass filter (thickness: 3.3 mm, diameter: 80 mm), mounted on a nylon lid equipped with 8 vents (8 mm diameter; clogged with sterile cotton against microbial contamination) in Teflon<sup>®</sup> for preventing water condensation on the filter. Preliminary tests attested that there was no effect of the incubation flask type on the transformation rates (not shown). Bio- and chemical analyses were carried out after cloud water collection and at various times of incubation and are listed in **Table 1**.

## 2.3 Chemical analyses

### 2.3.1 Conductivity, pH, Total organic carbon (TOC) and Dissolved organic carbon (DOC)

The conductivity and pH were measured on-site with a portable multi-parameter pH-meter equipped with a temperature sensor. Total Organic Carbon (TOC) and Dissolved Organic Carbon (DOC) were measured with a TOC analyser (TOC 5050A, Shimadzu<sup>®</sup>), 5 mL of filtered (filter porosity at 0.22  $\mu\text{m}$ ) and non-filtered samples were used, respectively, for DOC and TOC measurements such as described by (Parazols et al., 2007).

### 2.3.2 Fe(II), Fe(III)

The iron (Fe) concentrations (Fe(II) and Fe(III)) were measured by a spectrophotometric assay involving a colorimetric complexant (Ferrozine) following the method from (Stookey, 1970) and adapted for cloud water samples by (Parazols et al., 2007). To determine Fe(II) and Fe(Total) concentration, 2×1 mL of samples were necessary. Uncertainty of measurement is less than 10%, and the Detection Limit (DL) is 0.1  $\mu\text{M}$  (calculated as three times the standard deviation of field blanks).

### 2.3.3 *Ionic species*

Ion concentrations were determined using ion chromatographs: Dionex DX320 for anions (column AS11, eluent KOH) and Dionex ICS1500 for cations (column CS16, eluent hydroxymethanesulfonate acid).

### 2.3.4 *Formaldehyde*

The formaldehyde concentration was measured using a miniaturised fluorimetric assay adapted from (Li et al., 2007). Reaction medium was composed of 60  $\mu\text{L}$  of ammonium acetate solution (4 M), 60  $\mu\text{L}$  of AAA (0.2 M in a ethanol solution 50% v/v), 60  $\mu\text{L}$  of ethanol (96°) and 120  $\mu\text{L}$  of cloud water sample. This solution were mixed and incubated in a ninety-six wells black flat bottomed plate at room temperature during 25 min before reading ( $\lambda_{\text{ex}}= 375 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}}= 490 \text{ nm}$ ). Uncertainty of measurement is less than 5%, and the DL is 0.1  $\mu\text{M}$  (calculated as three times the standard deviation of field blanks).

### 2.3.5 *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

The hydrogen peroxide concentration was measured using an enzymatic fluorimetric assay involving Horse Radish Peroxydase (HRP) and 4-Hydroxyphenylacetic acid (HPAA) producing a fluorescent dimeric compound with hydrogen peroxide (Lazrus et al., 1985). 1.5 mL of a solution of HPAA (1.5mM) in PBS 0.1M, pH 7.4) were mixed with 10  $\mu\text{L}$  of a HRP solution (380 units  $\text{mL}^{-1}$ ) to constitute the reagent solution; this solution was kept at 5°C for less than 12h. After sampling (less than 5 min), 10 and 50  $\mu\text{L}$  of cloud water sample were mixed on-site with 200  $\mu\text{L}$  of reagent solution in duplicates, and incubated at room temperature (>17°C) during 5 min before freezing at -25°C. Fluorescence readings ( $\lambda_{\text{ex}}= 320 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}}= 390 \text{ nm}$ ) were made in a 96 wells format, Uncertainty of measurement was less than 5% and the limit of detection was close to 0.1  $\mu\text{M}$ . For the determination of organic peroxides concentrations, samples were previously treated with catalase. After 30 seconds, 200  $\mu\text{L}$  of reagent solution were added and the previous protocol was applied. For all cloud waters sampled in this work, organic peroxide concentrations were lower than the limit of detection.

## 2.4 **Biological analyses**

Direct enumeration of cells (duplicates, 10 mL) was performed with epifluorescence microscopy as described by Amato et al. (2005). The only change was the use of a phosphate buffering solution (pH = 7) improving the fluorescence efficiency. For cultivable cell counting, triplicates of 0.1 mL were plated on solid R2A media (Reasoner and Geldreich, 1985) and incubated at 5 and 17°C. Colony Forming Units (CFUs) were counted after 2 and 3 weeks of incubation, at 17°C and 5°C respectively.

ATP and ADP concentrations were measured on-site in cloud water samples (0.2 mL) using the ATP Biomass Kit HS (Biothema<sup>®</sup>) and a Biolumineter (Lumac Biocounter M2500). The analytical protocol used was described in (Koutny et al., 2006).

## 2.5 Calculations of transformation rates

The degradation rates of the compound  $C$  ( $k_c$ ) have been determined by linear regression fits as follows:

$$k_c = k \times [C]_t \quad [M^{-1} s^{-1}] \quad (E1)$$

With  $[C]_t$  the concentrations of selected carboxylic acid  $C$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ) at determined time  $t$ ,  $k$  the pseudo-first order decays ( $\text{s}^{-1}$ ).

## 3 Results and discussions

Three cloud events named 1, 2 and 3 were sampled during the 1-2<sup>nd</sup>, the 8-9<sup>th</sup> and the 18-19<sup>th</sup> of June 2010 respectively at the pdD station. Backward trajectories of sampled air masses are displayed in **Figure S1** (ESM). Cloud 1 from a North-Western air mass flux has a marine origin; cloud 2 from a South-Western flux is considered as a continental one and cloud 3 from a North-Eastern flux was also from continental origin but modified by urban areas. Marine, continental and urban air-masses represent respectively, 71%, 19% and 8% of cloud events sampled at the pdD station between 2001 and 2010 (<http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data>). Average temperatures during sampling-time were around 10°C for Cloud 1 and 3, and 13.5°C for Cloud 2.

### 3.1 Chemical and biological content of cloud water samples

Chemical and biological data from these cloud events are summarized in **Table 2**. pH values of each cloud samples were usual for these air-mass types, respectively 6.1, 5.2 and 3.9 for clouds 1, 2 and 3. TOC content of cloud 1 was low ( $1.1 \text{ mg L}^{-1}$ ), but usual for cloud from marine origin (Parazols et al., 2007), and more important for clouds 2 and 3 under continental influence ( $\sim 7 \text{ mg L}^{-1}$ ). DOC values were very close to the TOC ones. These data indicate that the majority of organic matter present in these cloud waters was dissolved. In clouds 2 and 3, the five most significant CAs (Chebbi and Carlier, 1996 ; Löflund et al., 2002 ; Marinoni et al., 2004) are present (formate, acetate, oxalate, succinate and malonate). In cloud 1, only formate, acetate and oxalate were detected in much lower values. Formaldehyde concentrations were 1.5, 2.5 and 6.3  $\mu\text{M}$ , for clouds 1, 2 and 3, respectively. Contribution of CAs and formaldehyde to the DOC in these cloud waters was approximately of 19%, 25% and 23%, for clouds 1, 2 and 3, respectively.

Inorganic ion content was very low for cloud 1, especially for sodium and chloride concentrations, usually higher for marine cloud. The composition of inorganic ions of clouds 2 and 3 were coherent with their air-mass origins. Iron concentrations were  $\sim 1 \mu\text{M}$  for all cloud waters; the initial  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{Total}}$  ratios were  $\sim 0.4$  for all samples, the levels of iron speciation were different with those usually found in cloud waters (ratio close to 0.75) (Parazols et al., 2007). Hydrogen peroxide concentration in cloud 1 ( $3.6 \mu\text{M}$ ) exhibits much lower concentration than continental clouds ( $33.4$  and  $57.7 \mu\text{M}$  for clouds 2 and 3,



respectively). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration values are highly variable (concentrations between ~0 – 247 μM at various other sampling sites) (Richards et al., 1983 ; Kelly et al., 1985 ; Olszyna et al., 1988 ; Barth et al., 1989 ; Claiborn and Aneja, 1991 ; Valverde-Canossa et al., 2005). Commonly, higher level of concentrations in cloud waters is noted for clouds from continental origin (Richards et al., 1983; Clairborn et al., 1991; Marinoni et al., 2011).

Total cell numbers are in the same order than those measured by (Amato et al., 2007b) at the same sampling site and by Bauer et al. (2002) at Mt. Rax (1644 m.a.s.l., Austria). It is worth noting that cloud 1 contains a lower amount of bacteria and a higher content of fungi and yeasts compared to clouds 2 and 3. ATP concentrations were 0.8, 2.3 and 2.1 pmol mL<sup>-1</sup> for clouds 1, 2 and 3, respectively in the same range than values from (Amato et al., 2007b). ADP concentrations were 1.1, 0.7 and 1.1 pmol mL<sup>-1</sup> for clouds 1, 2 and 3, respectively. A more precise evaluation of the energetic state of the cells can be given by the ratio ADP/ATP (**Table 2**). The smaller is this ratio, the higher is the energetic state. Basically, growing bacteria present a ratio of 0.25 (Koutny et al., 2006). The high ADP/ATP ratio (1.4) for cells present in cloud 1 suggest a low energetic state while for clouds 2 and 3, the lower values (0.3, 0.5, respectively) indicate a high metabolic activity.

In conclusion, bio-physico-chemical analyses of these 3 cloud water samples indicate that they are representative of most of cloud events sampled at the PdD Mountain and at other sampling-site.

### **3.2 Bio- and photo-transformation of carboxylic acids and formaldehyde in incubated cloud samples**

Fates of formate, acetate, succinate, oxalate, malonate and formaldehyde in the 3 cloud water samples were investigated at 17°C under 4 incubation conditions: - unfiltered cloud water and light radiation (“*Microorganisms / Light*”), - filtered cloud water and light radiation (“*Light*”), - unfiltered cloud water in the darkness (“*Microorganisms / Dark*”) and - filtered cloud water in darkness (“*Dark*”). The case study of cloud 2 is presented as an example in **Figure 1** and the observed tendencies are analyzed below. Incubation experiments for Clouds 1 and 3 are shown in the SM (**Figures S2 and S3**).

Acetate, formate and succinate are only degraded in the presence of microorganisms while oxalate is only degraded in the presence of light. Malonate and formaldehyde were photo-produced during the experiment and degraded in the presence of microorganisms. The biotransformation is instantaneous for acetate, succinate, malonate and formaldehyde while in the case of formate, we observed a lag time (up to 48h) until the biodegradation starts. The degradation of oxalate by light without microbes indicates that photochemical reactions take place. This is confirmed by the simultaneous photo-degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (see section 3.3). The production and degradation rates of CAs for the 3 cloud events are indicated in **Table 3**.

Under dark conditions with the endogenous microbial population, the biodegradation rates of acetate and formate are much higher than those of succinate, malonate and formaldehyde for the 3 cloud events (up to  $17.5 \cdot 10^{-11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for formate, cloud 2). For formate, a lag time is observed in clouds 1 and 2 as already noticed for cloud 2. For malonate, 2 kinetic steps take place in clouds 2 and 3: until 36h, the rates are slow and increase dramatically after. Oxalate is not biodegraded in any of the samples; this was also observed with selected bacterial strains isolated from cloud water.

Under light conditions with filtered cloud water, only succinate concentrations do not evolve. Formaldehyde was continuously photo-produced and this seems to be due to  $\cdot\text{OH}$  production from the  $\text{H}_2\text{O}_2$  photolysis. Malonate is photo-produced until a stationary concentration (60h) (clouds 2 and 3); oxalate is photo-degraded until a stationary state (60h) (clouds 2 and 3); formate is slowly degraded in cloud 3 up to 48h and not degraded in cloud 2. Behaviour of cloud 1 is somehow different as a slow photo-production of acetate and formate is observed while oxalate is degraded continuously up to the end of the experiment. Variations in rates of CAs photo-transformation are related to the initial  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations in the 3 cloud waters (see **Table 2**) and ending of these transformations was consequently linked to the total consumption of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . To summarize observations made for incubations under light, time evolutions of CAs concentrations are very variable and result from photo-production and photo-degradation processes. For cloud 1, the photo-degradation rate is very low since  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration is from 10 to 20 times less important compared to clouds 2 and 3 respectively.

In presence of light and microbes, we observed the sum of photochemistry and microbial activity without noticing any synergy or inhibition. In clouds 2 and 3, degradation rates of acetate, formate and succinate, are similar with and without light since these compounds are not involved in any photochemical process. For oxalate, the observation that with light degradation rates are the same with and without microorganisms is in agreement with the non biodegradability of this compound (clouds 2 and 3). Finally, for malonate, the production and destruction are competitive (clouds 2 and 3): during the first part of the kinetic (up to 48h), the photo-production is dominating then after 36h; the biodegradation is starting and becomes dominant. A similar behaviour for degradation of acetate was noticed for cloud 1: a first photo-production occurred before 72h and biodegradation takes the relay afterwards. Formaldehyde was photo-produced and biodegraded, and the apparent non-transformation of formaldehyde in the cloud waters in presence of light and microbes (especially for cloud 2 and 3) reveal the competition between these two processes.

In order to evaluate the energetic states of microbes under different incubation conditions, ADP/ATP ratios were measured during incubation (see **Table 4**). Microorganisms present in clouds 2 and 3 present similar initial energetic states (ADP/ATP ratios 0.3 and 0.5) that improve along the incubation time (0.1 and 0.2). The initial energetic state of bacteria from cloud 1 is lower (ADP/ATP ratio 1.4) compared to other cloud samples. It is dramatically increasing with time and reaching similar energetic state

compared to clouds 2 and 3 after 72h. Interestingly, biodegradation of CAs (acetate, formate and formaldehyde) present in cloud 1 are effectively degraded after the same period. Cells seem to reach a certain level of energy to be able to degrade efficiently these compounds. Comparisons of ADP/ATP ratios during microbial incubations under dark and light conditions present no significant differences. Clearly, photo-degradation in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, notably by the production of <sup>•</sup>OH radicals, does not affect cell metabolism. This result is in agreement with the fact that photochemical and biological processes are additive. No inhibition is therefore observed.

### 3.3 Hydrogen peroxide transformation

The concentrations of hydrogen peroxide in cloud water samples were followed during the incubation and are plotted in **Figure 2**; the corresponding degradation rates are reported in **Table 5**. Filtered and unfiltered (with its endogenous microflora) samples were incubated aerobically at 17°C in dark and under UV light emission (340-420 nm,  $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$  and total light energy:  $33 \text{ J s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ). Under dark condition in filtered cloud water, a slow degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is observed in clouds 2 and 3. This is explained by its reaction with iron (so called Fenton), with sulphite and the organic matter (Gunz and Hoffmann, 1990). In cloud 1, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration remains constant. This can result from lower iron or sulfur concentration in this cloud (**Table 2**). When the cloud waters are exposed to light, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is clearly photolyzed producing <sup>•</sup>OH radicals: in clouds 2 and 3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has completely disappeared after 60h.. This explains why oxalate is no longer degraded by <sup>•</sup>OH after that time (see previous section). In cloud 1, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is still present at the end of the incubation since its degradation rate is much lower than in clouds 2 and 3. Oxalate is therefore continuously degraded along the whole experiment. Interestingly, in the presence of microorganisms, without light, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is also efficiently degraded up to 100h for cloud 2 and 120h for cloud 3. For cloud 1, microbial degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is very slow until 72h and then increases rapidly and is completely consumed after 168h. This 72h delay can be correlated to the ADP/ATP ratio (**Table 4**). After 72h, the bacterial cells recover a high energetic state allowing them to degrade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The same phenomenon was observed for acetate and formate (**Table 3**). Combining light and microbes leads to even higher degradation rates of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than with the individual condition. The degradation rates of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reported in **Table 5** seem to be additive (light + microbes under dark conditions  $\approx$  microbes under light), except for cloud 1 which has special properties (low degradation rates). It is clear that the production of <sup>•</sup>OH radicals is not toxic for cloud microflora and that bio-degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is competitive with photo-degradation. This statement is consistent with oxidative stress metabolism of microorganisms. This type of metabolism involves enzymes such as catalases, peroxidases and superoxide dismutase and non-enzymic antioxidants (Sigler et al., 1999).

## 4 Conclusions

In this work, we studied microbial activity in real cloud samples, representative of the three main types of air masses reaching the top of the pdD mountain (from marine, continental and urban origin). Their physico-chemical compositions represent thus varied experimental scenarios; in addition the endogenous microflora in each sample represents a large biodiversity. Using filtered and unfiltered samples, we investigated the activities of microorganisms alone, photochemistry alone and the combination of both. The main results of our study are the following:

First, microbial contribution to organic carbon balance in cloud water seems rather important compared to photodegradation, this is particularly true for 3 major atmospheric carboxylic acids: acetate, formate and succinate. On the contrary, oxalate is exclusively transformed abiotically. These results confirm our previous investigations using isolated strains and artificial cloud water (Vařtilingom et al., 2010; Vařtilingom et al., 2011). This is of major importance for atmospheric chemistry modelling since we could use basically model bacteria and incubation conditions to measure kinetic constants or study basic mechanisms which can not be elucidated under too complex conditions.

Second, microorganism present in cloud samples exposed to light are not inactivated neither damaged by the presence of  $\cdot\text{OH}$  radicals photo-produced from  $\text{H}_2\text{O}_2$ . This is clearly shown looking at the degradation rates under combined conditions (light + microorganisms) where photo-degradation and bio-degradation are additive processes. This is confirmed by the similar ADP/ATP measurements when microbes are exposed or not to light, demonstrating that the microbial energetic state is unchanged.

Finally, and this is our major result, we shown that  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a precursor of oxidant species in clouds, is biodegraded by the endogenous microflora thanks to its oxidative stress metabolism. To our knowledge this is the first report of such an effect in the atmospheric environment. More, the biodegradation process is significant compared to the photochemical one, although this latter can be higher.

This finding has a major consequence considering atmospheric chemistry because it shows that microorganisms may have an impact on the oxidant capacity of clouds. This concept is clearly new and should be considered as an open novel scientific question.

To conclude microorganisms could play a double role in atmospheric chemistry, and more specifically on the carbon budget of the atmosphere: First they can directly metabolize organic carbon species thanks to their carbon metabolism, second they can destroy part of the sources of radicals thanks to their oxidative metabolism, and as a results these molecules such as  $\text{H}_2\text{O}_2$  are no longer available for photochemical or other chemical reactions.

## 5 References

- Amato, P., Ménager, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., and Delort, A.-M.: Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: Implications for the chemistry of clouds, *Atmos. Environ.*, 39, 4143-4153, 2005.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., and Delort, A.-M.: Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures., *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59, 242-254, 2007a.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., and Delort, A.-M.: An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the Puy de Dôme (France), *Atmos. Environ.*, 41, 8253-8263, 2007b.
- Amato, P., Demeer, F., Melaouhi, A., Fontanella, S., Martin-Biesse, A. S., Sancelme, M., Laj, P., and Delort, A. M.: A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by microorganisms, *Atmos. Chem. Phys.*, 7, 4159-4169, 2007c.
- Ariya, P. A., Nepotchaykh, O., Ignatova, O., and Amyot, M.: Microbiological degradation of atmospheric organic compounds, *Geophys. Res. Lett.*, 29, 2077-2081, 2002.
- Barth, M. C., Hegg, D. A., Hobbs, P. V., Walega, J. G., Kok, G. L., Heikes, B. G., and Lazrus, A. L.: Measurements of atmospheric gas-phase and aqueous-phase hydrogen peroxide concentrations in winter on the east coast of the United States, *Tellus B*, 41B, 61-69, 1989.
- Bauer, H., Kasper-Giebl, A., Löflund, M., Giebl, H., Hitzemberger, R., Zibuschka, F., and Puxbaum, H.: The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols, *Atmos. Res.*, 64, 109-119, 2002.
- Burrows, S. M., Elbert, W., Lawrence, M. G., and Pöschl, U.: Bacteria in the global atmosphere - Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems, *Atmos. Chem. Phys.*, 9, 10777-10827, 2009.
- Chebbi, A., and Carlier, P.: Carboxylic acids in the troposphere, occurrence, sources, and sinks: A review, *Atmos. Environ.*, 30, 4233-4249, 1996.
- Christner, B. C.: Incorporation of DNA and Protein Precursors into Macromolecules by Bacteria at -15°C, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 6435-6438, 10.1128/aem.68.12.6435-6438.2002, 2002.
- Claiborn, C. S., and Aneja, V. P.: Measurements of Atmospheric Hydrogen Peroxide in the Gas Phase and in Cloud Water at Mt. Mitchell, North Carolina, *J. Geophys. Res.*, 96, 18771-18787, 1991.
- Côté, V., Kos, G., Mortazavi, R., and Ariya, P. A.: Microbial and "de novo" transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi, *Sci. Tot. Env.*, 390, 530-537, 2008.
- Deguillaume, L., Leriche, M., Amato, P., Ariya, P. A., Delort, A. M., Pöschl, U., Chaumerliac, N., Bauer, H., Flossmann, A. I., and Morris, C. E.: Microbiology and atmospheric processes: chemical interactions of primary biological aerosols, *Biogeosciences*, 5, 1073-1084, 2008.
- Facchini, M. C., Fuzzi, S., Zappoli, S., Andracchio, A., Gelencsér, A., Kiss, G., Krivácsy, Z., Mészáros, E., Hansson, H.-C., Alsberg, T., and Zebühr, Y.: Partitioning of the organic aerosol component between fog droplets and interstitial air, *J. Geophys. Res.*, 104, 26821-26832, 1999.
- Fuzzi, S., Mandrioli, P., and Perfetto, A.: Fog droplets-An atmospheric source of secondary biological aerosol particles, *Atmos. Environ.*, 31, 287-290, 1997.
- Gunz, D. W., and Hoffmann, M. R.: Atmospheric chemistry of peroxides: a review, *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 24, 1601-1633, 1990.
- Hadi, D. A., Crossley, A., and Cape, J. N.: Particulate and dissolved organic carbon in cloud water in southern Scotland, *Environ. Pollut.*, 88, 299-306, 1995.
- Herlihy, L. J., Galloway, J. N., and Mills, A. L.: Bacterial utilization of formic and acetic acid in rainwater, *Atmos. Environ.*, 21, 2397-2402, 1987.

- Herrmann, H., Hoffmann, D., Schaefer, T., Bräuer, P., and Tilgner, A.: Tropospheric Aqueous-Phase Free-Radical Chemistry: Radical Sources, Spectra, Reaction Kinetics and Prediction Tools, *ChemPhysChem*, 11, 3796-3822, 2010.
- Jaenicke, R.: Abundance of Cellular Material and Proteins in the Atmosphere, *Science*, 308, 73-, 10.1126/science.1106335, 2005.
- Jones, A. M., and Harrison, R. M.: The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations: a review, *Sci. Tot. Env.*, 326, 151-180, 2004.
- Junge, K., Eicken, H., Swanson, B. D., and Deming, J. W.: Bacterial incorporation of leucine into protein down to -20 °C with evidence for potential activity in sub-eutectic saline ice formations, *Cryobiology*, 52, 417-429, 2006.
- Kelly, T. J., Daum, P. H., and Schwartz, S. E.: Measurements of Peroxides in Cloudwater and Rain, *J. Geophys. Res.*, 90, 7861-7871, 1985.
- Koutny, M., Sancelme, M., Dabin, C., Pichon, N., Delort, A.-M., and Lemaire, J.: Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives, *Polym. Degrad. Stab.*, 91, 1495-1503, 2006.
- Kreiner, M., Harvey, L. M., and McNeil, B.: Oxidative stress response of a recombinant *Aspergillus niger* to exogenous menadione and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition, *Enzyme Microb. Technol.*, 30, 346-353, 2002.
- Kruisz, C., Berner, A., and Brandner, B.: A cloud water sampler for high wind speeds, *Proceedings of the EUROTRAC Symposium 1992 SPB Academic Publishing bv, Den Haag*, 1993, 523-525,
- Lazrus, A. L., Kok, G. L., Gitlin, S. N., Lind, J. A., and McLaren, S. E.: Automated fluorimetric method for hydrogen peroxide in atmospheric precipitation, *Anal. Chem.*, 57, 917-922, 1985.
- Legrand, M., Preunkert, S., Oliveira, T., Pio, C. A., Hammer, S., Gelencsér, A., Kasper-Giebl, A., and Laj, P.: Origin of C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> dicarboxylic acids in the European atmosphere inferred from year-round aerosol study conducted at a west-east transect, *J. Geophys. Res.*, 112, D23S07, 2007.
- Li, Q., Sritharathikhun, P., and Motomizu, S.: Development of Novel Reagent for Hantzsch Reaction for the Determination of Formaldehyde by Spectrophotometry and Fluorometry, *Anal. Sci.*, 23, 413-417, 2007.
- Löflund, M., Kasper-Giebl, A., Schuster, B., Giebl, H., Hitzenberger, R., and Puxbaum, H.: Formic, acetic, oxalic, malonic and succinic acid concentrations and their contribution to organic carbon in cloud water, *Atmos. Environ.*, 36, 1553-1558, 2002.
- Marinoni, A., Laj, P., Sellegri, K., and Mailhot, G.: Cloud chemistry at the Puy de Dôme: variability and relationships with environmental factors, *Atmos. Chem. Phys.*, 4, 715-728, 2004.
- Olszyna, K. J., Meagher, J. F., and Bailey, E. M.: Gas-phase, cloud and rain-water measurements of hydrogen peroxide at a high-elevation site, *Atmospheric Environment (1967)*, 22, 1699-1706, 1988.
- Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Abida, O., Laj, P., Mailhot, G., Delort, A.-M., and Sergio, Z.: Speciation and role of iron in cloud droplets at the puy de Dôme station, *J. Atmos. Chem.*, 57, 299-300, 2007.
- Reasoner, D. J., and Geldreich, E. E.: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1985.
- Richards, L. W., Anderson, J. A., Blumenthal, D. L., McDonald, J. A., Kok, G. L., and Lazrus, A. L.: Hydrogen peroxide and sulfur (IV) in Los Angeles cloud water, *Atmospheric Environment (1967)*, 17, 911-914, 1983.
- Rivkina, E. M., Friedmann, E. I., McKay, C. P., and Gilichinsky, D. A.: Metabolic Activity of Permafrost Bacteria below the Freezing Point, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3230-3233, 10.1128/aem.66.8.3230-3233.2000, 2000.
- Sattler, B., Puxbaum, H., and Psenner, R.: Bacterial growth in supercooled cloud droplets, *Geophys. Res. Lett.*, 28, 239-242, 2001.

- Saxena, P., and Hildemann, L. M.: Water-soluble organics in atmospheric particles: A critical review of the literature and application of thermodynamics to identify candidate compounds, *J. Atmos. Chem.*, 24, 57-109, 1996.
- Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanová, J., Stadler, N., and Höfer, M.: Oxidative stress in microorganisms — I. Microbial vs. higher cells-damage and defenses in relation to cell aging and death, *Folia Microbiologica*, 44, 587-624, 1999.
- Stookey, L. L.: Ferrozine - A new spectrophotometric reagent for iron, *Anal. Chem.*, 42, 779-781, 1970.
- Vařtilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Laj, P., Leriche, M., and Delort, A.-M.: Contribution of Microbial Activity to Carbon Chemistry in Clouds, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 23-29, 10.1128/aem.01127-09, 2010.
- Vařtilingom, M., Charbouillot, T., Deguillaume, L., Maisonobe, R., Parazols, M., Amato, P., Sancelme, M., and Delort, A.-M.: Atmospheric chemistry of carboxylic acids: microbial implication versus photochemistry, *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*, 11, 4881-4911, 2011.
- Valverde-Canossa, J., Wieprecht, W., Acker, K., and Moortgat, G. K.: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic peroxide measurements in an orographic cloud: The FEBUKO experiment, *Atmos. Environ.*, 39, 4279-4290, 2005.
- Womack, A. M., Bohannon, B. J. M., and Green, J. L.: Biodiversity and biogeography of the atmosphere, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365, 3645-3653, 10.1098/rstb.2010.0283, 2010.

Table 1: List of the bio-physico-chemical measurements of cloud water samples.

	Immediately after sampling	During incubation time			
		Start	Every 12 h	Every 24 h	End
pH	■	■		■	■
Conductivity	■	■			■
TOC	■	■			■
Ionic chromatography	■	■	■	■	■
Fe(II)/Fe(III) concentrations	■	■			■
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration	■	■	■	■	■
Formaldehyde concentration	■	■	■	■	■
ATP/ADP*	■	■	■	■	■
Total cells counts	■	■			■
Cultivable cells counts		■			■

\*Made only at the beginning and at the end of incubation for the filtered-sterilized samples.



Table 2: Initial bio-physico-chemical characteristics for the 3 cloud events sampled at the pdD station.

	Cloud 1	Cloud 2	Cloud 3
Air-mass origin	North-wertern	South-wertern	North-eastern
Air-mass type	Marin	Continental	Urban
Date of sampling	6/1/10 8:20 PM	6/8/10 12:05 PM	6/18/10 11:15 AM
Duration of sampling	6:30	11:20	19:45
Temperature	10 °C	13.5 °C	10 °C
pH	6.1	5.2	3.9
Conductivité ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	3.5	37.6	78.6
TOC ( <i>DOC</i> ) ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1.1 (1.1)	6.8 (6.7)	6.9 (6.8)
Compounds	Concentrations ( $\mu\text{M}$ )		
Acetate	4.5	25.4	23.2
Formate	4.9	42.7	33.2
Succinate	-	3.1	3.8
Oxalate	1.0	9.7	9.3
Malonate	-	3.1	3.5
Cl <sup>-</sup>	3.0	7.7	11.3
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4.5	70.6	228.7
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.8	46.1	64.0
Na <sup>+</sup>	2.2	10.1	8.8
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	8.5	100.3	122.3
K <sup>+</sup>	-	1.5	2.2
Mg <sup>2+</sup>	1.0	2.1	2.7
Ca <sup>2+</sup>	1.7	3.8	3.8
Fe(total)	0.9	1.1	1.3
Fe(II)	0.3	0.5	0.5
Formaldehyde	1.5	2.7	6.1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.6	33.4	57.7
ATP ( $\text{pmol mL}^{-1}$ )	0.8	2.3	2.1
ADP ( $\text{pmol mL}^{-1}$ )	1.1	0.7	1.1
ADP/ATP ratio	1.4	0.3	0.5
Total fungal spores and yeasts ( $\text{cells mL}^{-1}$ )	$9 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	$3 \times 10^3$
Total bacteria ( $\text{cells mL}^{-1}$ )	$3 \times 10^4$	$8 \times 10^4$	$9 \times 10^4$

Table 3: Production and degradation rates of carboxylic acids in absence and presence of UV-light and/or microorganisms during incubation of “natural” cloud waters. In case of two step of transformation, the initial time used for linear regression was indicated in brackets.

		Acetate	Formate	Succinate	Oxalate	Malonate	Formaldehyde
		Rate of transformation ( $\times 10^{-11} \text{M}^1 \text{s}^{-1}$ )					
Cloud 1	Light	<b>0.5</b>	<b>0.7</b>	-	-0.4	-	0.2
	Microbes / Dark	-2.3 (72h)	-13.9 (72h)	-	0	-	-0.3 (66h)
	Microbes / Light	<b>0.7</b> (0-84h) - 0.9 (84h)	0	-	-0.4	-	<b>0.3</b> (0-96h) -0.2 (96h)
Cloud 2	Light	0	0	0	-4.0 (0-60h)	<b>0.3</b> (0-60h)	<b>0.2</b>
	Microbes / Dark	-15.5	-17.5 (48h)	-4.5	0	-4.2 (36h)	-0.3
	Microbes / Light	-15.6	-16.1 (48h)	-3.5	-2.7 (0-60h)	-4.3 (36h)	0
Cloud 3	Light	0	-2.6 (0-48h)	0	-8.5 (0-48h)	<b>0.5</b> (0-48h)	<b>0.9</b>
	Microbes / Dark	-5.8	-12.5	-3.4	0	-3.5 (36h)	-1.0
	Microbes / Light	-4.4	-8.5	-2	-8.0 (0-48h)	<b>0.6</b> (0-36h) -2.4 (36h)	0

Table 4: ADP/ATP ratio of the 3 cloud events as a function of incubation time.

Time (h)	ADP/ATP ratio					
	Cloud 1		Cloud 2		Cloud 3	
	light	dark	light	dark	light	dark
0	1.4		0.3		0.5	
48	0.9	1.0	0.2	0.2	0.4	0.4
72	0.7	0.8	0.1	0.1	0.3	0.3
96	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	0.3
168	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2

Table 5: Degradation rates of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in absence and presence of UV-light and/or microorganisms during incubation of “natural” cloud waters.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Cloud 1	Cloud 2	Cloud 3
	Rate of transformation ( × 10 <sup>-11</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		
Microbes / Light	-0.9	-68.4	-126.9
Light	-0.6	-48.6	-105.1
Microbes / Dark	-2.9	-28.5	-30.0
Dark	0.0	-9.8	-7.2

Figure 1: Monitoring of carboxylic acids in absence and presence of UV-light and/or microorganisms during incubation of “natural” cloud water (cloud 2).

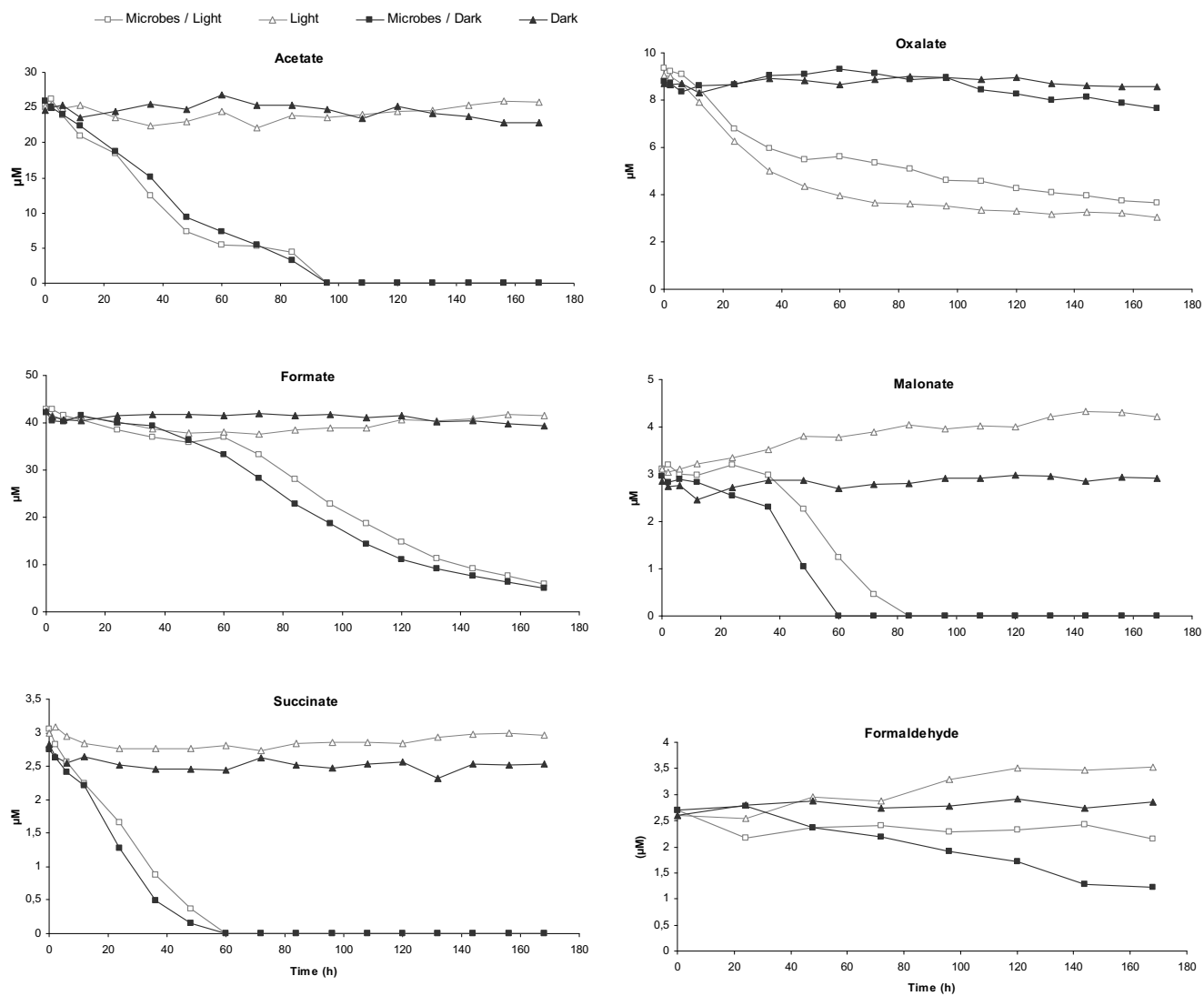
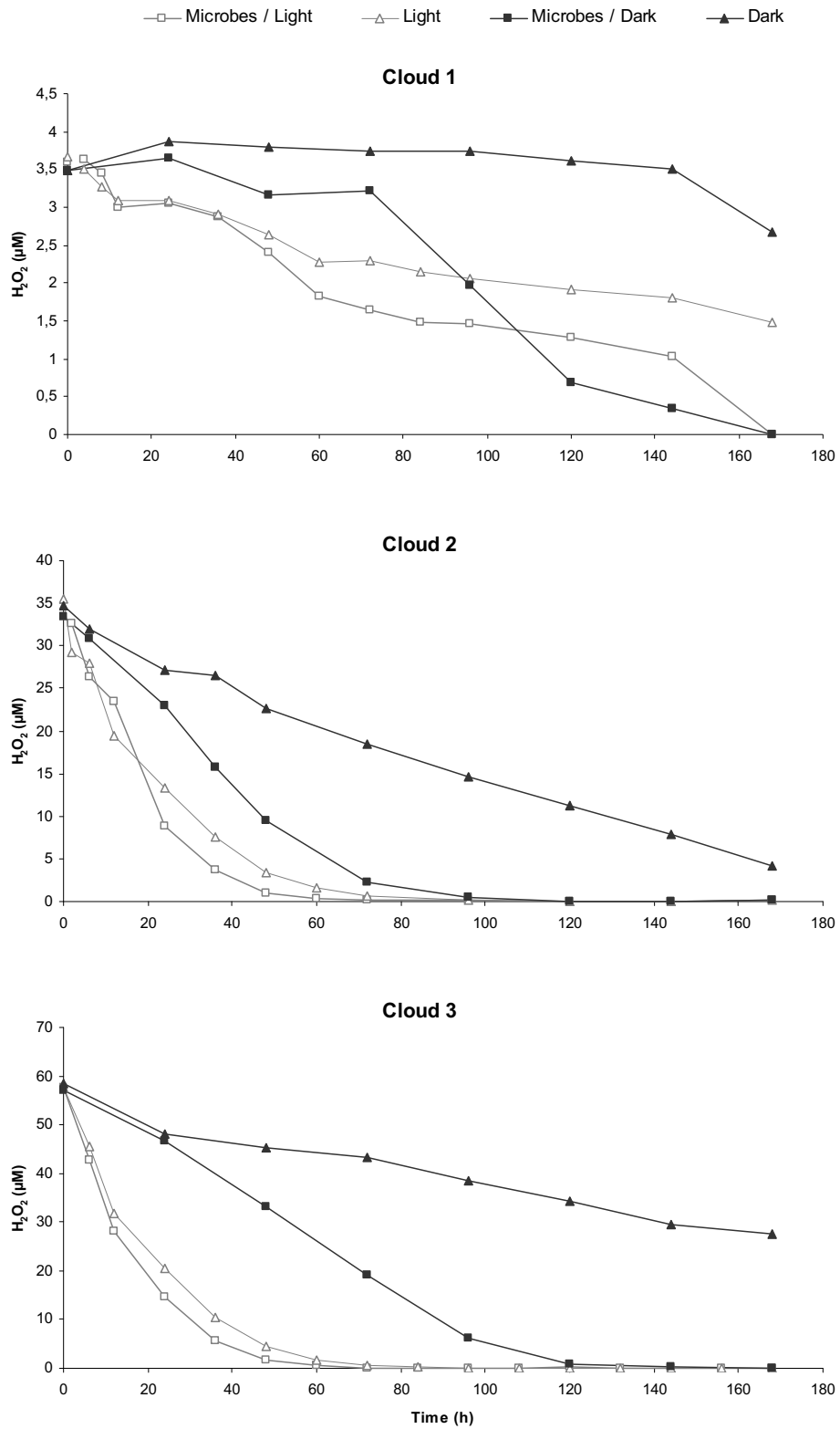


Figure 2 : Monitoring of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in absence and presence of UV-light and/or microorganisms during incubation of “natural” cloud waters (clouds 1, 2, 3).



# ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1: Backtrajectories of clouds 1, 2, 3.

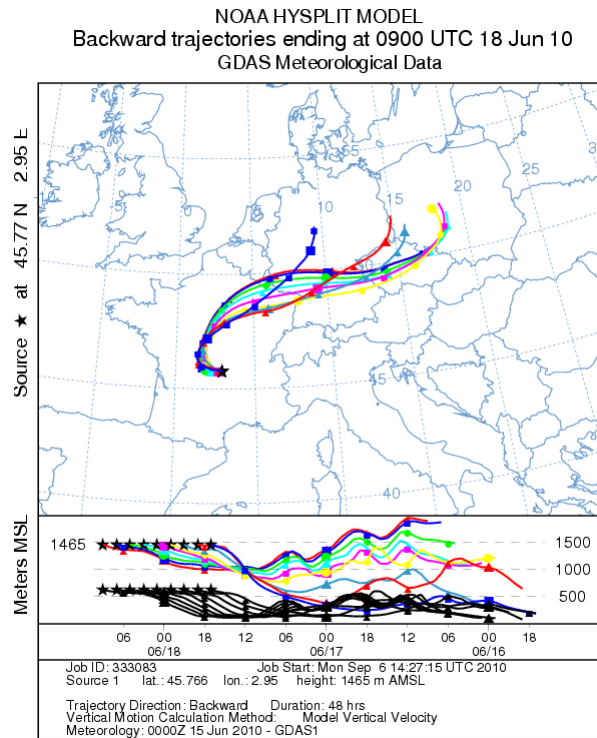
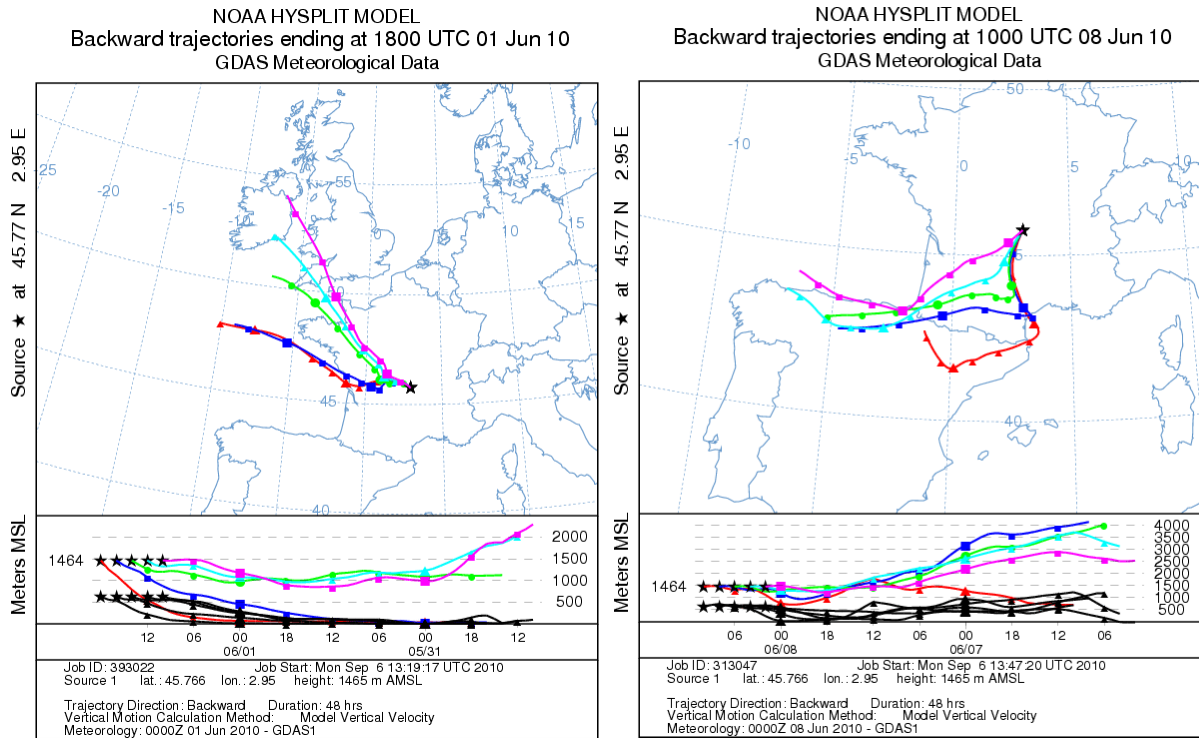


Figure S2: Monitoring of carboxylic acids in absence and presence of UV-light and/or microorganisms during incubation of “natural” cloud water (cloud 1).

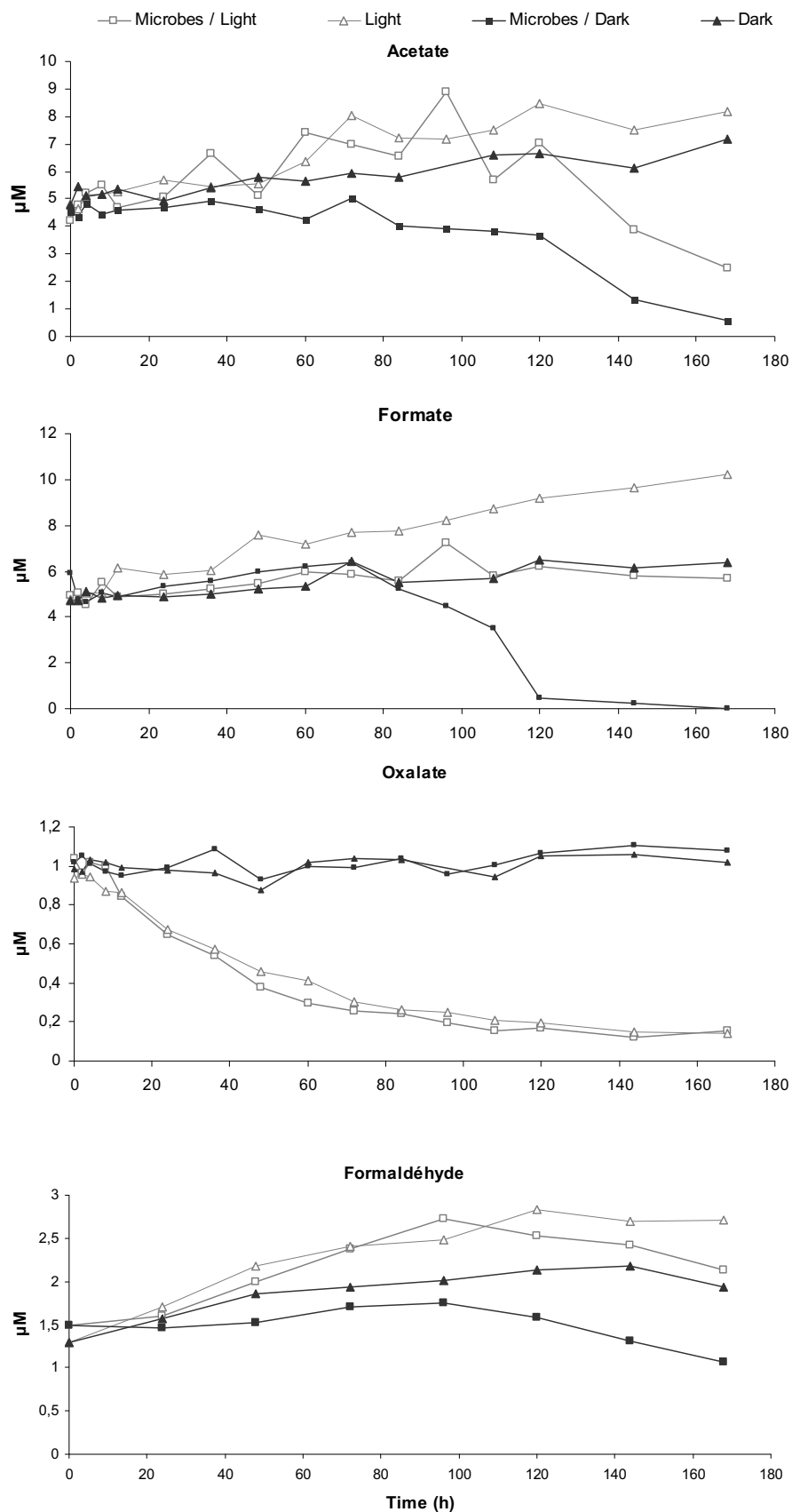
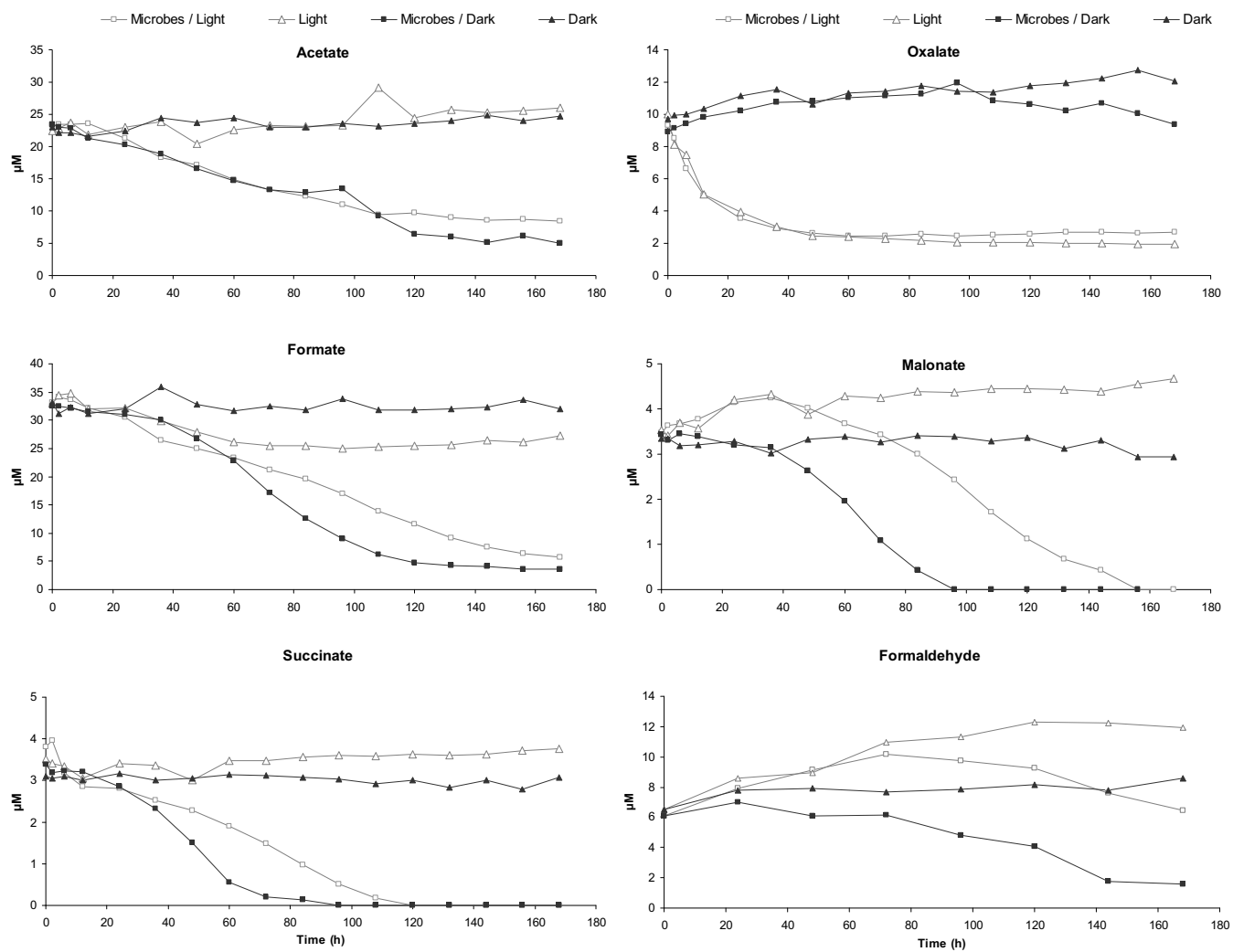




Figure S3: Monitoring of carboxylic acids in absence and presence of UV-light and/or microorganisms during incubation of “natural” cloud water (cloud 3).



### II.4.3. Conclusions

Nous avons réalisé des expériences d'incubation d'eau nuageuse « naturelle » en laboratoire, en présence ou en absence de lumière et/ou de sa flore microbienne autochtone. Le volume d'eau nuageuse requis pour ces expériences (600 mL) a été atteint lors de 3 collectes d'eau nuageuse en juin 2010 au sommet du puy de Dôme. Les trois événements nuageux collectés étaient d'origine et de composition chimique typiques des nuages sous influence marine, continentale et urbaine (pollué).

Les résultats de ces expériences en eau nuageuse « naturelle », montrent une réelle aptitude des microorganismes à modifier chimiquement la phase aqueuse du nuage. De plus, ils confirment les résultats obtenus jusqu'à présent sur des souches pures dans des milieux synthétiques très simplifiés. Nous validons ainsi nos méthodes de travail en laboratoire qui sont nécessaires pour étudier des mécanismes plus fins qu'en nuages réels.

L'absence de biotransformation de l'oxalate a été observée lors de ces incubations, ce qui confirme nos résultats précédents. Nous pouvons donc suggérer que les microorganismes présents dans l'eau nuageuse n'utilisent pas l'oxalate comme source de carbone. Par contre, le formiate, l'acétate, le succinate, le formaldéhyde, mais aussi le malonate présents dans les échantillons, sont effectivement dégradés par les microorganismes de l'eau nuageuse. Nous avons mesuré les vitesses de biotransformations de ces composés organiques à 17°C, et déterminé qu'elles sont de l'ordre de  $10^{-11}$  à  $10^{-10}$  M s<sup>-1</sup>. Ces vitesses sont globalement proches, voire supérieures à celles obtenues en milieux « nuage artificiel » pour le formiate, l'acétate et le succinate avec les souches pures.

Les mesures du rapport ADP/ATP ont permis de déterminer l'état énergétique des cellules microbiennes, au début et au cours de l'incubation. On a pu constater que les microorganismes présents dans l'échantillon Cloud 1, avaient un rapport ADP/ATP initial de 1,4 indiquant un état énergétique faible, ceci est cohérent avec l'absence de biodégradation au cours des premières heures d'incubation. Dans les échantillons Cloud 2 et 3, où les rapports initiaux étaient respectivement de 0,3 et 0,5 correspondant à des états énergétiques moyens, les biotransformations ont débuté immédiatement lors de l'incubation. Cela implique que les cellules microbiennes présentes dans ces échantillons, étaient « métaboliquement actives »

dans l'environnement nuageux avant l'échantillonnage. Nous pouvons également observer l'absence d'inhibition de l'activité métabolique liée à l'acidité de l'eau nuageuse ; par exemple, dans l'eau nuageuse Cloud 3 de pH 3,9, l'état énergétique des cellules était correct.

Bien que notre système d'irradiation ne mime pas parfaitement le spectre solaire, nous observons la photo-dégradation (directe et indirecte) de l'oxalate, et la photo-production du formaldéhyde et du malonate dans les solutions d'eau nuageuse irradiées pour les 3 échantillons. Dans les échantillons Cloud 2 et 3, la photo-production et la biodégradation du formaldéhyde se complètent au point d'observer une absence d'évolution de sa concentration au cours de l'incubation. Le malonate est également photo-produit et biodégradé, mais en l'absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la transformation biotique devient majoritaire.

Notre résultat majeur concerne la mise en évidence de l'expression des voies du stress oxydant chez les microorganismes présents dans l'eau nuageuse.

Tout d'abord, au cours des incubations d'eau nuageuse non-filtrée sous irradiation lumineuse et à l'obscurité, nous n'avons pas observé d'inhibition ou de ralentissement de l'activité métabolique en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de radicaux <sup>•</sup>OH produits par la photolyse du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (effectivement photolysé dans notre système d'irradiation). Les vitesses de biotransformation des composés organiques, ainsi que l'évolution positive de l'état énergétique au cours de l'incubation (certainement liés à l'utilisation des sources de carbone) sont inchangées en présence ou en absence d'irradiation UV. Ceci démontre que les microorganismes se défendent efficacement contre les espèces oxydantes présentes dans l'eau de nuage.

Par ailleurs, il est clair d'après nos expériences que les microorganismes utilisent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat et influent directement sur le bilan du peroxyde d'hydrogène. Ceci implique que non seulement les microorganismes jouent un rôle potentiel sur le bilan des composés organiques *via* leur métabolisme carboné, mais encore qu'ils peuvent aussi diminuer la capacité oxydante du nuage *via* leur métabolisme oxydant. Cette constatation est d'un intérêt majeur quant au rôle des microorganismes dans la chimie nocturne et diurne du nuage.

**PARTIE III : CONCLUSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES**

### III.1. Conclusion générale

**Le premier objectif de ce travail de thèse était de documenter la composition microbienne des nuages au sommet du puy de Dôme.** Pour cela, nous avons complété les données déjà existantes (2003-2005) par 18 prélèvements au cours de la période 2007-2010, correspondant à des masses d'air nuageuses d'origine océanique et continentale, et ceci au cours des quatre saisons. L'ensemble de ces données qui sont mises en ligne sur la base SO BEAM (<http://www.obs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data.php>) constitue à ce jour la seule base d'information sur le contenu microbiologique des nuages. Les conclusions majeures de cette étude sont les suivantes :

- Le nombre de microorganismes est relativement constant quels que soient les événements nuageux, et se situe en moyenne autour de  $1 \times 10^5$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  pour les bactéries et  $4 \times 10^3$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  pour les levures-champignons ;
- Il n'y a pas d'influence significative, ni sur le nombre, ni sur la composition microbienne, des saisons, ni de la composition chimique et donc de l'origine des masses d'air ;
- Une collection d'environ 500 souches cultivées est maintenant disponible au laboratoire, cette souchothèque est unique en son genre et riche de nombreuses possibilités de valorisation ;
- Parmi les colonies de bactéries et de levures isolées par culture, on observe une biodiversité relativement importante mais certains genres majeurs sont plus souvent présents : *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Dioszegia* et *Udeniomyces* ;
- On retrouve un cluster intéressant de *Sphingomonas* qui semble spécifique de l'eau atmosphérique ;
- Enfin, les mesures *in situ* en ATP montrent que la majorité des cellules sont métaboliquement actives.

Au delà de ces informations tout à fait intéressantes pour ce milieu très méconnu en termes de contenu microbiologique que constitue l'eau nuageuse, certains de ces résultats nous ont été particulièrement utiles pour aborder la suite de nos travaux. En effet, des conditions « modèles » de nuage type ont pu être définies en considérant un nombre de bactéries fixe et une activité métabolique maximale pour toutes ces cellules. Enfin, des souches ont été sélectionnées pour nos études en laboratoire en fonction de leur représentativité *in situ*.

**L'objectif du second volet de la thèse était d'évaluer la contribution de l'activité microbienne aux mécanismes intervenant dans la chimie atmosphérique.** Plus précisément, nous avons cherché à analyser de manière **quantitative** les processus de biodégradation des composés organiques en milieu nuageux à travers des mesures *in situ* et des études en laboratoire et de les comparer aux processus photochimiques.

Notre stratégie pour aborder cette problématique a été d'élaborer des modèles d'étude expérimentaux de plus en plus complexes : tout d'abord, nous avons étudié la biodégradation de composés purs par des souches pures, puis nous sommes passés à des microcosmes mimant le milieu nuage en termes de composition chimique, toujours avec des souches pures, enfin nous avons utilisé des eaux nuageuses « naturelles » contenant leur microflore endogène et leur composition chimique originelle.

Par ailleurs, nous avons cherché à simuler différents scénarios soit en variant la température (5°C ou 17°C), soit en variant la composition chimique, et donc l'origine de la masse d'air nuageuse (polluée, non polluée). Enfin pour comparer l'action des microorganismes avec les processus photo-induits, nous avons choisi de comparer les vitesses de biodégradation dans un premier temps avec l'activité de radicaux  $\cdot\text{OH}$  ou  $\text{NO}_3$  issue de la littérature, puis dans un deuxième temps avec des valeurs expérimentales obtenues en photoréacteurs.

Les conclusions majeures de cette étude sont les suivantes :

- L'activité des microorganismes peut varier beaucoup d'une souche à l'autre. Cependant les expériences menées sur nuage réel montrent une activité effective vis-à-vis des substrats testés, tout à fait cohérente avec la moyenne obtenue sur un panel de souches isolées représentatives de la flore cultivable.
- Le métabolisme microbien semble peu sensible à la composition chimique en ions inorganiques et au pH des eaux de nuages et donc à l'origine des masses d'air. Par contre, son efficacité est dépendante de la température. Clairement, la contribution des microorganismes à la chimie atmosphérique sera limitée aux nuages « chauds » ( $T > 0^\circ\text{C}$ ).
- Les réactions d'oxydation biocatalysées sont relativement comparables aux réactions radicalaires et conduisent au final à la production de  $\text{CO}_2$ . De plus, le métabolisme microbien peut même conduire à des réductions dans le milieu oxydant, ce qui n'est pas possible en photochimie. Nous avons montré le potentiel des microorganismes à synthétiser des molécules de plus haut poids moléculaire et polyfonctionnalisées. Par exemple, nous avons observé la synthèse de méthanol et de molécules en  $\text{C}_3$  (glycérol, propane-1,2-diols, etc.) à partir de la biotransformation du formaldéhyde.

- Globalement les vitesses de biodégradation des acides carboxyliques majoritairement présents dans les nuages (formiate, acétate, lactate et succinate) ainsi que le formaldéhyde et méthanol sont du même ordre de grandeur que celles de photodégradation, les variantes observées sont plus liées aux scénarios choisis.
- Les microorganismes seraient des acteurs majeurs de la chimie des organiques au sein de la phase aqueuse pendant la nuit car l'activité biocatalytique est plus efficace que l'activité des radicaux  $\text{NO}_3^\bullet$  seuls présents pendant la nuit.
- L'activité de jour des microorganismes est plus limitée face à la réactivité très importante des radicaux  $^\bullet\text{OH}$ . Cependant, nous avons observé des variations importantes en fonction des scénarios choisis pour la photochimie. Une étude extensive de la littérature a mis en évidence la variabilité importante des concentrations en  $^\bullet\text{OH}$  à considérer, ainsi pour les concentrations les plus faibles ( $10^{-14}$  M) les microorganismes deviennent compétitifs, ce qui n'est pas le cas pour les concentrations les plus fortes ( $10^{-12}$  M). De même, les vitesses des réactions photocatalysées en laboratoire ont donné des résultats proches de celles biocatalysées et finalement beaucoup plus faibles que celles attendues d'un point de vue théorique. En fait, si on considère les constantes de vitesses publiées, on constate qu'elles ont été mesurées dans des conditions expérimentales très éloignées de conditions environnementales : pH très acide, irradiation à des longueurs d'onde  $< 290$  nm, donc peu représentatives du spectre solaire. Au final, il est difficile de conclure définitivement quant à l'efficacité relative du métabolisme microbien vis-à-vis des radicaux  $^\bullet\text{OH}$ , plus de données seront nécessaires, y compris en photochimie.

Enfin nos dernières expériences en eaux nuageuses naturelles ont apporté des informations totalement nouvelles puisqu'elles concernent l'interaction d'espèces oxydantes avec des microorganismes. Lorsque la flore microbienne d'eau de nuage réel a été exposée à la présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et/ou de lumière, nous avons pu observer deux points majeurs :

- Les microorganismes résistent bien à la présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de  $^\bullet\text{OH}$  puisque leur activité métabolique n'est pas modifiée. Nous n'avons pas observé de différence de biotransformations des composés organiques, ni du rapport ADP/ATP qui est un indicateur de l'état énergétique de la cellule, en présence d'irradiation UV générant des radicaux  $^\bullet\text{OH}$ .

- Ils utilisent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat *via* l'activité de leur catalase. Au final nous avons démontré que le métabolisme du stress oxydant était effectif dans ces conditions ce qui permet aux microorganismes de survivre et d'être actifs dans les nuages mais aussi de modifier la capacité oxydante du nuage. Cette question scientifique n'avait jamais été abordée jusqu'à présent dans la communauté des sciences de l'atmosphère.

En conclusion de cette partie, nos travaux ont largement conforté l'hypothèse d'une contribution des microorganismes à la chimie atmosphérique. D'une part, les microorganismes dégradent directement les composés organiques présents dans le nuage en utilisant leur métabolisme carboné de manière compétitive avec la photochimie. D'autre part, ils agissent sur les molécules oxydantes ou sources de radicaux.



## III.2.Perspectives

Les travaux de cette thèse ont permis de consolider nos connaissances sur la description du contenu microbien des nuages et le rôle des microorganismes dans la chimie atmosphérique. Nos résultats nous permettent d'envisager des perspectives pour notre travail futur.

### **Pour la connaissance des populations microbiennes des nuages :**

#### *- Monitoring : dénombrement, viabilité, activité métabolique -*

Nous manquons encore de données sur le long terme et nous devons continuer nos analyses microbiologiques sur l'eau nuageuse pendant plusieurs années, en augmentant les fréquences d'analyses. Ceci sera grandement facilité grâce à la réhabilitation du chalet du puy de Dôme. Les nouvelles installations permettront également d'effectuer des campagnes de mesures intensives couplant microbiologie et données chimiques et microphysiques détaillées. Nous pourrions aussi augmenter cette fréquence en améliorant nos protocoles expérimentaux qui sont pour l'heure très lourds. Ainsi, nous mettrons au point une autre méthode de dénombrement plus rapide et nécessitant moins de volume, comme la cytométrie en flux qui est actuellement utilisée pour des analyses d'eau de surface. Cette méthode pourrait remplacer le dénombrement par microscopie à épifluorescence (diminution de 80% du volume utilisé).

Un point très important concerne l'évaluation de la viabilité et de l'activité métabolique des microorganismes dans les nuages qui jusqu'à présent a été faite en mesurant l'ATP. Nos derniers résultats sur les incubations d'eau de nuage ont montré que le rapport ADP/ATP était fortement lié au potentiel de biodégradation des microorganismes. Ce rapport pourrait donc servir d'indicateur et être mesuré systématiquement dans tous les prélèvements d'eau de nuage. Il serait également intéressant d'utiliser des techniques de marquage permettant de différencier les cellules viables des non-viables. Cependant, les marqueurs commerciaux actuels ne sont pas encore totalement adaptés au milieu nuage par manque de sélectivité.

#### *- Biodiversité -*

L'étude de la biodiversité des populations microbiennes reste encore très mal connue, d'une part car le sujet d'étude est très récent, d'autre part car nous avons utilisé jusqu'alors des techniques culturelles forcément réductrices. La possibilité de prélever de grands volumes d'eau nuageuse ouvre de nouvelles perspectives car nous pourrions à l'avenir utiliser des méthodes de biologie moléculaire pour mieux identifier l'ensemble des communautés

microbiennes de l'eau nuageuse. En parallèle, les souches microbiennes seront isolées pour étoffer notre souchothèque qui reste unique en son genre et qui peut être fortement valorisée. De plus, l'accès à des souches microbiennes isolées de l'eau nuageuse conserve tout son intérêt pour l'étude des processus atmosphériques, que ce soit en chimie comme en microphysique atmosphérique. Ceci permet d'étudier en laboratoire les potentiels de biotransformation, de production de biosurfactants, d'initialisation de la glace (IN), de résistance aux conditions environnementales, etc. Nous allons également poursuivre nos investigations sur le genre *Sphingomonas* dont on a découvert des espèces encore méconnues à ce jour et qui semble particulièrement adapté aux conditions atmosphériques.

### **Pour l'étude du rôle des microorganismes dans la chimie atmosphérique :**

Notre hypothèse concernant le rôle des microorganismes dans la chimie des nuages a été grandement confortée par nos résultats expérimentaux. Cependant, il reste encore énormément de pistes à explorer avant de conclure définitivement sur cette problématique.

#### *- Voies du métabolisme carboné -*

En termes de bilan carboné, nous avons maintenant une vision assez claire des voies métaboliques impliquées. Nos résultats sur flore totale endogène du nuage réel ont validé nos modèles expérimentaux en microcosme avec des souches isolées. Ceci va nous permettre d'aller plus loin pour mesurer des constantes de vitesse de biodégradation et non plus des vitesses de dégradation. Ces constantes seront mesurées avec une souche pure et un seul substrat. Au vu de la lourdeur de telles expériences, dans un premier temps, nous choisirons trois composés clés qui sont des marqueurs de la chimie multiphase atmosphérique : l'acétate, le formiate et le formaldéhyde ainsi que la souche la plus efficace (parmi les 17 testées dans cette thèse) pour chacun de ces substrats. Ces constantes pourront alors être utilisées pour paramétrer le modèle de chimie atmosphérique développé par le LaMP. Seule la modélisation nous permettra de quantifier la part relative jouée par la photochimie et par la biocatalyse dans la chimie atmosphérique. En effet, seuls les modèles peuvent représenter les processus multiphasiques du milieu du nuageux, selon différents scénarios chimiques et microphysiques des nuages. L'idée est d'avoir les constantes de biodégradation correspondant aux conditions optimales de leur métabolisme dans les nuages pour chercher dans un premier temps la limite « haute » de l'impact des microorganismes. Notons que nos études bibliographiques nous ont montré, que contrairement à l'ordre établi, les constantes de photodégradation ne sont pas forcément fiables. Elles ont été déterminées à des longueurs d'onde non représentatives du spectre solaire et à des pH très éloignés de ceux des nuages. De

même, les concentrations réelles en radicaux  $\bullet\text{OH}$  ne sont pas connues, ce qui fausse totalement les comparaisons entre chimie radicalaire et biocatalyse. Nous envisageons donc de collaborer avec nos collègues photochimistes du LPMM pour compléter ces données manquantes. Ce travail permettra également de réduire les incertitudes sur les voies photochimiques utilisées dans les modèles de chimie atmosphérique.

*- Voies du stress oxydant -*

Les derniers résultats de la thèse concernant le métabolisme oxydant et son impact sur la chimie atmosphérique ouvrent des perspectives intéressantes et non explorées. Nous avons déjà commencé à évaluer la capacité des microorganismes à métaboliser  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Il nous faut maintenant développer d'autres outils pour mesurer le métabolisme d'autres espèces oxydantes comme le radical hydroxyle  $\bullet\text{OH}$  ou l'ion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Outre les études sur nuage réel, il est important d'étudier aussi des mécanismes fins avec des systèmes simplifiés. Nous chercherons, comme dans le cas du métabolisme carboné à mesurer des constantes de biotransformation des espèces oxydantes qui pourront être intégrées aux modèles de chimie atmosphérique. On pourra également évaluer la résistance des microorganismes face aux espèces oxygénées réactives grâce aux molécules antioxydants qu'elles produisent. Une des pistes sera d'étudier l'influence de la présence de pigments de type carotènes. Nous avons pour cela un grand nombre de souches très pigmentées en orange dans notre souchothèque des nuages.

*- Interactions fer-microorganismes -*

Enfin, le métabolisme du stress oxydant est intimement lié à celui du fer. Nous orienterons nos recherches sur l'influence de la présence de fer dans le milieu sur l'activité des enzymes du stress oxydant. Nous considèrerons particulièrement la spéciation redox du Fer ou sa complexation organique qui reste encore incertaines dans le milieu nuageux. Ce fer va jouer à la fois sur les mécanismes abiotiques (Photochimie, Fenton) de formation de radicaux mais aussi sur le métabolisme des cellules qui vont réguler l'activité de leurs metallo-enzymes (SOD, catalases...) en fonction de la concentration et spéciation du fer intracellulaire. Les microorganismes peuvent eux aussi produire des sidérophores (complexes organiques de Fer) qui vont être exportés vers le milieu extracellulaire (donc nuageux) et interférer avec les réactions abiotiques. Il est donc très intéressant d'étudier les interactions Fer-Microorganismes-Chimie radicalaire.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Ahern, H. E., Walsh, K. A., Hill, T. C. J., and Moffett, B. F.: Fluorescent pseudomonads isolated from Hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation, *Biogeosciences*, 4, 115-124, 2007.
- Aller, J. Y., Kuznetsova, M. R., Jahns, C. J., and Kemp, P. F.: The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols, *J. Aerosol Sci*, 36, 801-812, 2005.
- Altieri, K. E., Seitzinger, S. P., Carlton, A. G., Turpin, B. J., Klein, G. C., and Marshall, A. G.: Oligomers formed through in-cloud methylglyoxal reactions: Chemical composition, properties, and mechanisms investigated by ultra-high resolution FT-ICR mass spectrometry, *Atmos. Environ.*, 42, 1476-1490, 2008.
- Amato, P., Ménager, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., and Delort, A.-M.: Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: Implications for the chemistry of clouds, *Atmos. Environ.*, 39, 4143-4153, 2005.
- Amato, P.: Les communautés microbiennes de l'eau des nuages: Implication dans la chimie atmosphérique, *Sciences et Technologies*, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 304 pp., 2006.
- Amato, P., Demeer, F., Melaouhi, A., Fontanella, S., Martin-Biesse, A. S., Sancelme, M., Laj, P., and Delort, A. M.: A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by microorganisms, *Atmos. Chem. Phys.*, 7, 4159-4169, 2007a.
- Amato, P., Hennebelle, R., Magand, O., Sancelme, M., Delort, A.-M., Barbante, C., Boutron, C., and Ferrari, C.: Bacterial characterization of the snow cover at Spitzberg, Svalbard, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59, 255-264, 2007b.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., and Delort, A.-M.: Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures., *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59, 242-254, 2007c.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., and Delort, A.-M.: An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the Puy de Dôme (France), *Atmos. Environ.*, 41, 8253-8263, 2007d.
- Anastasio, C., and Jordan, A. L.: Photoformation of hydroxyl radical and hydrogen peroxide in aerosol particles from Alert, Nunavut: implications for aerosol and snowpack chemistry in the Arctic, *Atmos. Environ.*, 38, 1153-1166, 2004.
- Andreae, M. O., Talbot, R. W., Berresheim, H., and Beecher, K. M.: Precipitation Chemistry in Central Amazonia, *J. Geophys. Res.*, 95, 16987-16999, 1990.
- Arakaki, T., Anastasio, C., Shu, P. G., and Faust, B. C.: Aqueous-phase photoproduction of hydrogen peroxide in authentic cloud waters: Wavelength dependence, and the effects of filtration and freeze-thaw cycles, *Atmos. Environ.*, 29, 1697-1703, 1995.
- Arakaki, T., and Faust, B. C.: Sources, sinks, and mechanisms of hydroxyl radical OH photoproduction and consumption in authentic acidic continental cloud waters from Whiteface Mountain, New York: The role of the Fe(r) (r = II, III) photochemical cycle, *J. Geophys. Res.*, 103, 3487-3504, 1998.

- Ariya, P. A., Nepotchatykh, O., Ignatova, O., and Amyot, M.: Microbiological degradation of atmospheric organic compounds, *Geophys. Res. Lett.*, 29, 2077-2081, 2002.
- Atkinson, R., and Arey, J.: Atmospheric Degradation of Volatile Organic Compounds, *Chem. Rev.*, 103, 4605-4638, 2003.
- Atkinson, R., Baulch, D. L., Cox, R. A., Crowley, J. N., Hampson, R. F., Hynes, R. G., Jenkin, M. E., Rossi, M. J., and Troe, J.: Evaluated kinetic and photochemical data for atmospheric chemistry: Volume II - gas phase reactions of organic species, *Atmos. Chem. Phys.*, 6, 3625-4055, 2006.
- Aumont, B., Szopa, S., and Madronich, S.: Modelling the evolution of organic carbon during its gas-phase tropospheric oxidation: development of an explicit model based on a self generating approach, *Atmos. Chem. Phys.*, 5, 2497-2517, 2005.
- Barth, M. C., Hegg, D. A., Hobbs, P. V., Walega, J. G., Kok, G. L., Heikes, B. G., and Lazrus, A. L.: Measurements of atmospheric gas-phase and aqueous-phase hydrogen peroxide concentrations in winter on the east coast of the United States, *Tellus B*, 41B, 61-69, 1989.
- Barth, M. C.: The importance of cloud drop representation on cloud photochemistry, *Atmos. Res.*, 82, 294-309, 2006.
- Bauer, H., Kasper-Giebl, A., Löflund, M., Giebl, H., Hitzemberger, R., Zibuschka, F., and Puxbaum, H.: The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols, *Atmos. Res.*, 64, 109-119, 2002.
- Berglen, T. F., Berntsen, T. K., Isaksen, I. S. A., and Sundet, J. K.: A global model of the coupled sulfur/oxidant chemistry in the troposphere: The sulfur cycle, *J. Geophys. Res.*, 109, D19310, 2004.
- Blanchard, D.: The ejection of drops from the sea and their enrichment with bacteria and other materials: A review, *Estuaries and Coasts*, 12, 127-137, 1989.
- Blanchard, D. C., and Syzdek, L. D.: Water-to-Air Transfer and Enrichment of Bacteria in Drops from Bursting Bubbles, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1001-1005, 1982.
- Blando, J. D., and Turpin, B. J.: Secondary organic aerosol formation in cloud and fog droplets: a literature evaluation of plausibility, *Atmos. Environ.*, 34, 1623-1632, 2000.
- Boutin, P., Torre, M., Serceau, R., and Rideau, P. J.: Atmospheric bacterial contamination from landspreading of animal wastes: Evaluation of the respiratory risk for people nearby, *Journal of Agricultural Engineering Research*, 39, 149-160, 1988.
- Bovallius, A., Bucht, B., Roffey, R., and Anas, P.: Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in Sweden., *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 847, 1978.
- Brantner, B., Fierlinger, H., Puxbaum, H., and Berner, A.: Cloudwater chemistry in the subcooled droplet regime at Mount Sonnblick (3106 m a.s.l., Salzburg, Austria), *Water, Air, & Soil Pollution*, 74, 363-384, 1994.
- Burger, S. R., and Bennett, J. W.: Droplet enrichment factors of pigmented and nonpigmented *Serratia marcescens*: possible selective function for prodigiosin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 487-490, 1985.

- Burrows, S. M., Butler, T., Jöckel, P., Tost, H., Kerkweg, A., Pöschl, U., and Lawrence, M. G.: Bacteria in the global atmosphere - Part 2: Modelling of emissions and transport between different ecosystems, *Atmos. Chem. Phys.*, 9, 10829-10881, 2009a.
- Burrows, S. M., Elbert, W., Lawrence, M. G., and Pöschl, U.: Bacteria in the global atmosphere - Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems, *Atmos. Chem. Phys.*, 9, 10777-10827, 2009b.
- Busse, H.-J., Denner, E. B. M., Buczolits, S., Salkinoja-Salonen, M., Bennasar, A., and Kampfer, P.: *Sphingomonas aurantiaca* sp. nov., *Sphingomonas aerolata* sp. nov. and *Sphingomonas faeni* sp. nov., air- and dustborne and Antarctic, orange-pigmented, psychrotolerant bacteria, and emended description of the genus *Sphingomonas*, *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 1253-1260, 10.1099/ijs.0.02461-0, 2003.
- Cabelli, D. E., and Bielski, B. H. J.: A pulse radiolysis study of some dicarboxylic acids of the citric acid cycle. The kinetic and spectral properties of the free radicals formed by reaction with the OH radical, *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 1731-1737, 1985.
- Campolongo, F., Saltelli, A., Jensen, N. R., Wilson, J., and Hjorth, J.: The Role of Multiphase Chemistry in the Oxidation of Dimethylsulphide (DMS). A Latitude Dependent Analysis, *J. Atmos. Chem.*, 32, 327-356, 1999.
- Carlton, A. G., Turpin, B. J., Lim, H.-J., Altieri, K. E., and Seitzinger, S.: Link between isoprene and secondary organic aerosol (SOA): Pyruvic acid oxidation yields low volatility organic acids in clouds, *Geophys. Res. Lett.*, 33, L06822, 2006.
- Carlton, A. G., Turpin, B. J., Altieri, K. E., Seitzinger, S., Reff, A., Lim, H.-J., and Ervens, B.: Atmospheric oxalic acid and SOA production from glyoxal: Results of aqueous photooxidation experiments, *Atmos. Environ.*, 41, 7588-7602, 2007.
- Chameides, W. L., and Davis, D. D.: Aqueous-phase source of formic acid in clouds, *Nature*, 304, 427-429, 1983.
- Charbouillot, T., Parazols, M., Vaïtilingom, M., Marinoni, A., Amato, P., Delort, A. M., Flossman, A., Chaumerliac, N., Laj, P., Sellegri, K., Brigante, M., Mailhot, G., and Deguillaume, L.: What have we learned from 10-year monitoring of cloud chemical composition at the puy de Dôme station ?, submitted to *Journal of Environmental Monitoring*, 2011.
- Chaumerliac, N., Leriche, M., and Audiffren, N.: Modeling of scavenging processes in clouds: some remaining questions about the partitioning of gases among gas and liquid phases, *Atmos. Res.*, 53, 29-43, 2000.
- Chebbi, A., and Carlier, P.: Carboxylic acids in the troposphere, occurrence, sources, and sinks: A review, *Atmos. Environ.*, 30, 4233-4249, 1996.
- Chorao, C., Charmantray, F., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., Cincilei, A., Traïkia, M., Mailhot, G., and Delort, A.-M.: 2-Aminobenzothiazole degradation by free and Ca-alginate immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous*, *Chemosphere*, 75, 121-128, 2009.
- Christner, B. C., Mosley-Thompson, E., Thompson, L. G., and Reeve, J. N.: Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice, *Environ. Microbiol.*, 3, 570-577, 2001.

- Chung, S. H., and Seinfeld, J. H.: Global distribution and climate forcing of carbonaceous aerosols, *J. Geophys. Res.*, 107, 4407-4439, 2002.
- Claeys, M., Wang, W., Ion, A. C., Kourtchev, I., Gelencsér, A., and Maenhaut, W.: Formation of secondary organic aerosols from isoprene and its gas-phase oxidation products through reaction with hydrogen peroxide, *Atmos. Environ.*, 38, 4093-4098, 2004.
- Claiborn, C. S., and Aneja, V. P.: Measurements of Atmospheric Hydrogen Peroxide in the Gas Phase and in Cloud Water at Mt. Mitchell, North Carolina, *J. Geophys. Res.*, 96, 18771-18787, 1991.
- Collett Jr, J. L., Daube Jr, B. C., Gunz, D., and Hoffmann, M. R.: Intensive studies of Sierra Nevada cloudwater chemistry and its relationship to precursor aerosol and gas concentrations, *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 24, 1741-1757, 1990.
- Collett Jr, J. L., Hoag, K. J., Sherman, D. E., Bator, A., and Richards, L. W.: Spatial and temporal variations in San Joaquin Valley fog chemistry, *Atmos. Environ.*, 33, 129-140, 1998.
- Cooper, W. J., Zika, R. G., Petasne, R. G., and Plane, J. M. C.: Photochemical formation of hydrogen peroxide in natural waters exposed to sunlight, *Environ. Sci. Technol.*, 22, 1156-1160, 1988.
- Côté, V., Kos, G., Mortazavi, R., and Ariya, P. A.: Microbial and "de novo" transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi, *Sci. Tot. Env.*, 390, 530-537, 2008.
- Cotton, W. R., Alexander, G. D., Hertenstein, R., Walko, R. L., McAnelly, R. L., and Nicholls, M.: Cloud venting -- A review and some new global annual estimates, *Earth-Science Reviews*, 39, 169-206, 1995.
- Crutzen, P. J., Williams, J., Pöschl, U., Hoor, P., Fischer, H., Warneke, C., Holzinger, R., Hansel, A., Lindinger, W., Scheeren, B., and Lelieveld, J.: High spatial and temporal resolution measurements of primary organics and their oxidation products over the tropical forests of Surinam, *Atmos. Environ.*, 34, 1161-1165, 2000.
- Davey, H. M., Kell, D. B., Weichart, D. H., and Kaprelyants, A. S.: Estimation of Microbial Viability Using Flow Cytometry, *Current Protocols in Cytometry*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- Davidson, C., Phalen, R., and Solomon, P.: Airborne particulate matter and human health: a review, *Aerosol Sci. Technol.*, 39, 737-749, 2005.
- Deguillaume, L., Leriche, M., Monod, A., and Chaumerliac, N.: The role of transition metal ions on HO<sub>x</sub> radicals in clouds: a numerical evaluation of its impact on multiphase chemistry, *Atmos. Chem. Phys.*, 4, 95-110, 10.5194/acp-4-95-2004, 2004.
- Deguillaume, L., Leriche, M., Desboeufs, K., Mailhot, G., George, C., and Chaumerliac, N.: Transition Metals in Atmospheric Liquid Phases : Sources, Reactivity, and Sensitive Parameters, *Chem. Rev.*, 105, 3388-3431, 2005a.
- Deguillaume, L., Leriche, M., Desboeufs, K., Mailhot, G., George, C., and Chaumerliac, N.: Transition Metals in Atmospheric Liquid Phases: Sources, Reactivity, and Sensitive Parameters, *Chem. Rev.*, 105, 3388-3431, 10.1021/cr040649c, 2005b.
- Deguillaume, L., Leriche, M., Amato, P., Ariya, P. A., Delort, A. M., Pöschl, U., Chaumerliac, N., Bauer, H., Flossmann, A. I., and Morris, C. E.: Microbiology and



- atmospheric processes: chemical interactions of primary biological aerosols, *Biogeosciences*, 5, 1073-1084, 2008.
- Delort, A.-M., Vařtilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Parazols, M., Mailhot, G., Laj, P., and Deguillaume, L.: A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes, *Atmos. Res.*, doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071, 2010.
- Desboeufs, K. V., Sofikitis, A., Losno, R., Colin, J. L., and Auset, P.: Dissolution and solubility of trace metals from natural and anthropogenic aerosol particulate matter, *Chemosphere*, 58, 195-203, 2005.
- Deutsch, F., Hoffmann, P., and Ortner, H. M.: Field experimental investigations on the Fe(II)- and Fe(III)-content in cloudwater samples, *J. Atmos. Chem.*, 40, 87-105, 2001.
- Di Giorgio, C., Krempff, A., Guiraud, H., Binder, P., Tiret, C., and Dumenil, G.: Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles, *Atmos. Environ.*, 30, 155-160, 1996.
- Dibb, J. E., Talbot, R. W., Whitlow, S. I., Shipham, M. C., Winterle, J., McConnell, J., and Bales, R.: Biomass burning signatures in the atmosphere and snow at Summit, Greenland: An event on 5 August 1994, *Atmos. Environ.*, 30, 553-561, 1996.
- Dufour, G., Szopa, S., Hauglustaine, D. A., Boone, C. D., Rinsland, C. P., and Bernath, P. F.: The influence of biogenic emissions on upper-tropospheric methanol as revealed from space, *Atmos. Chem. Phys.*, 7, 6119-6129, 2007.
- Ekström, S., Nozière, B., Hultberg, M., Alsberg, T., Magnér, J., Nilsson, E. D., and Artaxo, P.: A possible role of ground-based microorganisms on cloud formation in the atmosphere, *Biogeosciences*, 7, 387-394, 2010.
- El Haddad, I., Liu, Y., Nieto-Gligorovski, L., Michaud, V., Temime-Roussel, B., Quivet, E., Marchand, N., Sellegri, K., and Monod, A.: In-cloud processes of methacrolein~under simulated conditions &ndash; Part 2: Formation of Secondary Organic Aerosol, *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*, 9, 6425-6449, 2009.
- Erel, Y., Pehkonen, S. O., and Hoffmann, M. R.: Redox Chemistry of Iron in Fog and Stratus Clouds, *J. Geophys. Res.*, 98, 18423-18434, 1993.
- Ervens, B., George, C., Williams, J. E., Buxton, G. V., Salmon, G. A., Bydder, M., Wilkinson, F., Dentener, F., Mirabel, P., Wolke, R., and Herrmann, H.: CAPRAM 2.4 (MODAC mechanism): An extended and condensed tropospheric aqueous phase mechanism and its application, *J. Geophys. Res.*, 108, 4426, 10.1029/2002jd002202, 2003.
- Ervens, B., Feingold, G., Frost, G. J., and Kreidenweis, S. M.: A modeling study of aqueous production of dicarboxylic acids: 1. Chemical pathways and speciated organic mass production, *J. Geophys. Res.*, 109, D15205, 2004.
- Farr, S. B., Touati, D., and Kogoma, T.: Effects of oxygen stress on membrane functions in *Escherichia coli*: role of HPI catalase, *J. Bacteriol.*, 170, 1837-1842, 1988.
- Faust, B. C., and Allen, J. M.: Aqueous-Phase Photochemical Sources of Peroxyl Radicals and Singlet Molecular Oxygen in Clouds and Fog, *J. Geophys. Res.*, 97, 12913-12926, 1992.

- Faust, B. C., and Zepp, R. G.: Photochemistry of aqueous iron(III)-polycarboxylate complexes: roles in the chemistry of atmospheric and surface waters, *Environ. Sci. Technol.*, 27, 2517-2522, 1993.
- Ferrari, C. P., Kaluzny, P., Roche, A., Jacob, V., and Foster, P.: Aromatic hydrocarbons and aldehydes in the atmosphere of Grenoble, France, *Chemosphere*, 37, 1587-1601, 1998.
- Fornaro, A., and Gutz, I. G. R.: Wet deposition and related atmospheric chemistry in the São Paulo metropolis, Brazil: Part 2--contribution of formic and acetic acids, *Atmos. Environ.*, 37, 117-128, 2003.
- Foulds, G. A., and Gray, B. F.: Homogeneous gas-phase partial oxidation of methane to methanol and formaldehyde, *Fuel Process. Technol.*, 42, 129-150, 1995.
- Fowler, D., Pilegaard, K., Sutton, M. A., Ambus, P., Raivonen, M., Duyzer, J., Simpson, D., Fagerli, H., Fuzzi, S., Schjoerring, J. K., Granier, C., Neftel, A., Isaksen, I. S. A., Laj, P., Maione, M., Monks, P. S., Burkhardt, J., Daemmgen, U., Neiryneck, J., Personne, E., Wichink-Kruit, R., Butterbach-Bahl, K., Flechard, C., Tuovinen, J. P., Coyle, M., Gerosa, G., Loubet, B., Altimir, N., Gruenhage, L., Ammann, C., Cieslik, S., Paoletti, E., Mikkelsen, T. N., Ro-Poulsen, H., Cellier, P., Cape, J. N., Horváth, L., Loreto, F., Niinemets, Ü., Palmer, P. I., Rinne, J., Misztal, P., Nemitz, E., Nilsson, D., Pryor, S., Gallagher, M. W., Vesala, T., Skiba, U., Brüggemann, N., Zechmeister-Boltenstern, S., Williams, J., O'Dowd, C., Facchini, M. C., de Leeuw, G., Flossman, A., Chaumerliac, N., and Erisman, J. W.: Atmospheric composition change: Ecosystems-Atmosphere interactions, *Atmos. Environ.*, 43, 5193-5267, 2009.
- Franzen, J. S., and Binkley, S. B.: Comparison of the Acid-soluble Nucleotides in *Escherichia coli* at Different Growth Rates, *J. Biol. Chem.*, 236, 515-519, 1961.
- Fuzzi, S., Facchini, M. C., Decesari, S., Matta, E., and Mircea, M.: Soluble organic compounds in fog and cloud droplets: what have we learned over the past few years?, *Atmos. Res.*, 64, 89-98, 2002.
- Getoff, N., Schwoerer, F., Markovic, V. M., Sehested, K., and Nielsen, S. O.: Pulse radiolysis of oxalic acid and oxalates, *J. Phys. Chem.*, 75, 749-755, 1971.
- Gnauk, T., Rolle†, W., and Spindler, G.: Diurnal Variations of Atmospheric Hydrogen Peroxide Concentrations in Saxony (Germany), *J. Atmos. Chem.*, 27, 79-103, 1997.
- Goldstein, A. H., and Galbally, I. E.: Known and Unexplored Organic Constituents in the Earth's Atmosphere, *Environ. Sci. Technol.*, 41, 1514-1521, 2007.
- Grammatika, M., and Zimmerman, W. B.: Microhydrodynamics of flotation processes in the sea surface layer, *Dynamics of Atmospheres and Oceans*, 34, 327-348, 2001.
- Gregory, P. H.: The Leeuwenhoek Lecture, 1970: Airborne Microbes: Their Significance and Distribution, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 177, 469-483, 10.1098/rspb.1971.0043, 1971.
- Grosjean, D., and Wright, B.: Carbonyls in urban fog, ice fog, cloudwater and rainwater, *Atmospheric Environment (1967)*, 17, 2093-2096, 1983.
- Hadi, D. A., Crossley, A., and Cape, J. N.: Particulate and dissolved organic carbon in cloud water in southern Scotland, *Environ. Pollut.*, 88, 299-306, 1995.
- Hallquist, M., Wenger, J. C., Baltensperger, U., Rudich, Y., Simpson, D., Claeys, M., Dommen, J., Donahue, N. M., George, C., Goldstein, A. H., Hamilton, J. F., Herrmann, H., Hoffmann, T., Iinuma, Y., Jang, M., Jenkin, M., Jimenez, J. L., Kiendler-Scharr, A.,

- Maenhaut, W., McFiggans, G., Mentel, T. F., Monod, A., Prévôt, A. S. H., Seinfeld, J. H., Surratt, J. D., Szmigielski, R., and Wildt, J.: The formation, properties and impact of secondary organic aerosol: current and emerging issues, *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*, 9, 3555-3762, 2009.
- Hartmann, W. R., Santana, M., Hermoso, M., Andreae, M. O., and Sanhueza, E.: Diurnal cycles of formic and acetic acids in the northern part of the Guayana shield, Venezuela, *J. Atmos. Chem.*, 13, 63-72, 1991.
- Hegg, D. A., Gao, S., and Jonsson, H.: Measurements of selected dicarboxylic acids in marine cloud water, *Atmos. Res.*, 62, 1-10, 2002.
- Heikes, B. G., Chang, W., Pilson, M. E. Q., Swift, E., Singh, H. B., Guenther, A., Jacob, D. J., Field, B. D., Fall, R., Riemer, D., and Brand, L.: Atmospheric methanol budget and ocean implication, *Global Biogeochem. Cycles*, 16, 1133, 2002.
- Herlihy, L. J., Galloway, J. N., and Mills, A. L.: Bacterial utilization of formic and acetic acid in rainwater, *Atmos. Environ.*, 21, 2397-2402, 1987.
- Herrmann, H., Exner, M., and Zellner, R.: Reactivity trends in reactions of the nitrate radical ( $\text{NO}_3$ ) with inorganic and organic cloudwater constituents, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58, 3239-3244, 1994.
- Herrmann, H.: Kinetics of Aqueous Phase Reactions Relevant for Atmospheric Chemistry, *Chem. Rev.*, 103, 4691-4716, 2003.
- Herrmann, H., Tilgner, A., Barzaghi, P., Majdik, Z., Gligorovski, S., Poulain, L., and Monod, A.: Towards a more detailed description of tropospheric aqueous phase organic chemistry: CAPRAM 3.0, *Atmos. Environ.*, 39, 4351-4363, 2005.
- Herrmann, H., Hoffmann, D., Schaefer, T., Bräuer, P., and Tilgner, A.: Tropospheric Aqueous-Phase Free-Radical Chemistry: Radical Sources, Spectra, Reaction Kinetics and Prediction Tools, *ChemPhysChem*, 11, 3796-3822, 2010.
- Hirano, S. S., and Upper, C. D.: Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 624-653, 10.1128/mmbr.64.3.624-653.2000, 2000.
- Holzinger, R., Warneke, C., Hansel, A., Jordan, A., Lindinger, W., Scharffe, D. H., Schade, G., and Crutzen, P. J.: Biomass burning as a source of formaldehyde, acetaldehyde, methanol, acetone, acetonitrile, and hydrogen cyanide, *Geophys. Res. Lett.*, 26, 1161-1164, 1999.
- Holzinger, R., Williams, J., Salisbury, G., Klüpfel, T., de Reus, M., Traub, M., Crutzen, P. J., and Lelieveld, J.: Oxygenated compounds in aged biomass burning plumes over the Eastern Mediterranean: evidence for strong secondary production of methanol and acetone, *Atmos. Chem. Phys.*, 5, 39-46, 2005.
- Igawa, M., Munger, J. W., and Hoffmann, M. R.: Analysis of aldehydes in cloud- and fogwater samples by HPLC with a postcolumn reaction detector, *Environ. Sci. Technol.*, 23, 556-561, 1989.
- Imlay, J. A.: Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide, *Annu. Rev. Biochem.*, 77, 755-776, doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055, 2008.
- Imshenetsky, A. A., Lysenko, S. V., and Kazakov, G. A.: Upper boundary of the biosphere, *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 1-5, 1978.

- Jacob, D. J., Waldman, J. M., Munger, J. W., and Hoffmann, M. R.: A field investigation of physical and chemical mechanisms affecting pollutant concentrations in fog droplets, *Tellus B*, 36B, 272-285, 1984.
- Jacob, D. J., Munger, J. W., Waldman, J. M., and Hoffmann, M. R.: The H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,HNO<sub>3</sub>,NH<sub>3</sub> System at High Humidities and in Fogs 1. Spatial and Temporal Patterns in the San Joaquin Valley of California *J. Geophys. Res.*, 91, 1073-1088, 1986.
- Jacob, D. J., and Wofsy, S. C.: Photochemistry of biogenic emissions over the Amazon forest, *J. Geophys. Res.*, 93, 1477-1486, 1988.
- Jacob, D. J.: Heterogeneous chemistry and tropospheric ozone, *Atmos. Environ.*, 34, 2131-2159, 2000.
- Jaffrezo, J. L., Davidson, C. I., Kuhns, H. D., Bergin, M. H., Hillamo, R., Maenhaut, W., Kahl, J. W., and Harris, J. M.: Biomass burning signatures in the atmosphere of central Greenland, *J. Geophys. Res.*, 103, 31067-31078, 1998.
- Jones, A. M., and Harrison, R. M.: The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations: a review, *Sci. Tot. Env.*, 326, 151-180, 2004.
- Kanakidou, M., Seinfeld, J. H., Pandis, S. N., Barnes, I., Dentener, F. J., Facchini, M. C., Van Dingenen, R., Ervens, B., Nenes, A., Nielsen, C. J., Swietlicki, E., Putaud, J. P., Balkanski, Y., Fuzzi, S., Horth, J., Moortgat, G. K., Winterhalter, R., Myhre, C. E. L., Tsigaridis, K., Vignati, E., Stephanou, E. G., and Wilson, J.: Organic aerosol and global climate modelling: a review, *Atmos. Chem. Phys.*, 5, 1053-1123, 2005.
- Kawamura, K., and Kaplan, I. R.: Motor exhaust emissions as a primary source for dicarboxylic acids in Los Angeles ambient air, *Environ. Sci. Technol.*, 21, 105-110, 1987.
- Kawamura, K., and Ikushima, K.: Seasonal changes in the distribution of dicarboxylic acids in the urban atmosphere, *Environ. Sci. Technol.*, 27, 2227-2235, 1993.
- Kawamura, K., and Yasui, O.: Diurnal changes in the distribution of dicarboxylic acids, ketocarboxylic acids and dicarbonyls in the urban Tokyo atmosphere, *Atmos. Environ.*, 39, 1945-1960, 2005.
- Keele, B. B., McCord, J. M., and Fridovich, I.: Superoxide Dismutase from *Escherichia coli* B, *J. Biol. Chem.*, 245, 6176-6181, 1970.
- Keene, W. C., Galloway, J. N., and Holden, J. D., Jr.: Measurement of Weak Organic Acidity in Precipitation From Remote Areas of the World, *J. Geophys. Res.*, 88, 5122-5130, 1983.
- Keene, W. C., and Galloway, J. N.: Organic acidity in precipitation of North America, *Atmospheric Environment (1967)*, 18, 2491-2497, 1984.
- Keene, W. C., and Galloway, J. N.: Considerations Regarding Sources for Formic and Acetic Acids in the Troposphere, *J. Geophys. Res.*, 91, 14466-14474, 1986.
- Keene, W. C., Mosher, B. W., Jacob, D. J., Munger, J. W., Talbot, R. W., Artz, R. S., Maben, J. R., Daube, B. C., and Galloway, J. N.: Carboxylic acids in clouds at a high-elevation forested site in central Virginia, *J. Geophys. Res.*, 100, 9345-9357, 1995.
- Kelly, T. J., Daum, P. H., and Schwartz, S. E.: Measurements of Peroxides in Cloudwater and Rain, *J. Geophys. Res.*, 90, 7861-7871, 1985.

- Kesselmeier, J., Kuhn, U., Wolf, A., Andreae, M. O., Ciccioli, P., Brancaleoni, E., Frattoni, M., Guenther, A., Greenberg, J., De Castro Vasconcellos, P., de Oliva, T., Tavares, T., and Artaxo, P.: Atmospheric volatile organic compounds (VOC) at a remote tropical forest site in central Amazonia, *Atmos. Environ.*, 34, 4063-4072, 2000.
- Khare, P., Satsangi, G. S., Kumar, N., Maharaj Kumari, K., and Srivastava, S. S.: HCHO, HCOOH and CH<sub>3</sub>COOH in air and rain water at a rural tropical site in North Central India, *Atmos. Environ.*, 31, 3867-3875, 1997.
- Khare, P., Kumar, N., Kumari, K. M., and Srivastava, S. S.: Atmospheric formic and acetic acids: An overview, *Rev. Geophys.*, 37, 227-248, 1999.
- Khwaja, H. A., Brudnoy, S., and Husain, L.: Chemical characterization of three summer cloud episodes at whiteface mountain, *Chemosphere*, 31, 3357-3381, 1995.
- Kieber, R. J., Rhines, M. F., D. Willey, J., and Brooks Avery Jr, G.: Rainwater formaldehyde: concentration, deposition and photochemical formation, *Atmos. Environ.*, 33, 3659-3667, 1999.
- Koutny, M., Sancelme, M., Dabin, C., Pichon, N., Delort, A.-M., and Lemaire, J.: Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives, *Polym. Degrad. Stab.*, 91, 1495-1503, 2006.
- Kroll, J. H., Ng, N. L., Murphy, S. M., Flagan, R. C., and Seinfeld, J. H.: Secondary Organic Aerosol Formation from Isoprene Photooxidation, *Environ. Sci. Technol.*, 40, 1869-1877, 2006.
- Kroll, J. H., and Seinfeld, J. H.: Chemistry of secondary organic aerosol: Formation and evolution of low-volatility organics in the atmosphere, *Atmos. Environ.*, 42, 3593-3624, 2008.
- Kruisz, C., Berner, A., and Brandner, B.: A cloud water sampler for high wind speeds, *Proceedings of the EUROTRAC Symposium 1992* SPB Academic Publishing bv, Den Haag, 1993, 523-525,
- Kumar, N., Kulshrestha, U. C., Khare, P., Saxena, A., Kumari, K. M., and Srivastava, S. S.: Measurements of formic and acetic acid levels in the vapour phase at Dayalbagh, Agra, India, *Atmos. Environ.*, 30, 3545-3550, 1996.
- Lacaux, J. P., Lomba-Ndembi, J., Lefeuvre, B., Cros, B., and Delmas, R.: Biogenic emissions and biomass burning influences on the chemistry of the fogwater and stratiform precipitations in the African equatorial forest, *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 26, 541-551, 1992.
- Laj, P., Fuzzi, S., Facchini, M. C., Lind, J. A., Orsi, G., Preiss, M., Maser, R., Jaeschke, W., Seyffer, E., Helas, G., Acker, K., Wieprecht, W., Möller, D., Arends, B. G., Mols, J. J., Colvile, R. N., Gallagher, M. W., Beswick, K. M., Hargreaves, K. J., Storeton-West, R. L., and Sutton, M. A.: Cloud processing of soluble gases, *Atmos. Environ.*, 31, 2589-2598, 1997.
- Lazrus, A. L., Kok, G. L., Gitlin, S. N., Lind, J. A., and McLaren, S. E.: Automated fluorimetric method for hydrogen peroxide in atmospheric precipitation, *Anal. Chem.*, 57, 917-922, 1985.
- Lee, M., Heikes, B. G., and O'Sullivan, D. W.: Hydrogen peroxide and organic hydroperoxide in the troposphere: a review, *Atmos. Environ.*, 34, 3475-3494, 2000.

- Legrand, M., Preunkert, S., Galy-Lacaux, C., Liouise, C., and Wagenbach, D.: Atmospheric year-round records of dicarboxylic acids and sulfate at three French sites located between 630 and 4360 m elevation, *J. Geophys. Res.*, 110, D13302, 2005.
- Legrand, M., Preunkert, S., Oliveira, T., Pio, C. A., Hammer, S., Gelencsér, A., Kasper-Giebl, A., and Laj, P.: Origin of C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> dicarboxylic acids in the European atmosphere inferred from year-round aerosol study conducted at a west-east transect, *J. Geophys. Res.*, 112, D23S07, 2007.
- Lelieveld, J., and Crutzen, P. J.: The role of clouds in tropospheric photochemistry, *J. Atmos. Chem.*, 12, 229-267, 1991.
- Leriche, M., Chaumerliac, N., and Monod, A.: Coupling quasi-spectral microphysics with multiphase chemistry: a case study of a polluted air mass at the top of the Puy de Dôme mountain (France), *Atmos. Environ.*, 35, 5411-5423, 2001.
- Leriche, M., Deguillaume, L., and Chaumerliac, N.: Modeling study of strong acids formation and partitioning in a polluted cloud during wintertime, *J. Geophys. Res.*, 108, 4433, 2003.
- Leriche, M., Curier, R., Deguillaume, L., Caro, D., Sellegri, K., and Chaumerliac, N.: Numerical quantification of sources and phase partitioning of chemical species in cloud: application to wintertime anthropogenic air masses at the Puy de Dôme station, *J. Atmos. Chem.*, 57, 281-297, 2007.
- Li, Q., Sritharathikhun, P., and Motomizu, S.: Development of Novel Reagent for Hantzsch Reaction for the Determination of Formaldehyde by Spectrophotometry and Fluorometry, *Anal. Sci.*, 23, 413-417, 2007.
- Lighthart, B., and Shaffer, B.: Viable bacterial aerosol particle size distributions in the midsummer atmosphere at an isolated location in the high desert chaparral, *Aerobiologia*, 11, 19-25, 1995.
- Lim, H.-J., Carlton, A. G., and Turpin, B. J.: Isoprene Forms Secondary Organic Aerosol through Cloud Processing: Model Simulations, *Environ. Sci. Technol.*, 39, 4441-4446, 2005.
- Lim, Y. B., Tan, Y., Perri, M. J., Seitzinger, S. P., and Turpin, B. J.: Aqueous chemistry and its role in secondary organic aerosol (SOA) formation, *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*, 10, 14161-14207, 2010.
- Limbeck, A., Kulmala, M., and Puxbaum, H.: Secondary organic aerosol formation in the atmosphere via heterogeneous reaction of gaseous isoprene on acidic particles, *Geophys. Res. Lett.*, 30, 1996-1999, 2003.
- Lindemann, J., and Upper, C. D.: Aerial Dispersal of Epiphytic Bacteria over Bean Plants, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 1229-1232, 1985.
- Lipari, F., and Swarin, S. J.: Determination of formaldehyde and other aldehydes in automobile exhaust with an improved 2,4-dinitrophenylhydrazine method, *J. Chromatogr. A*, 247, 297-306, 1982.
- Liu, Y., El Haddad, I., Scarfogliero, M., Nieto-Gligorovski, L., Temime-Roussel, B., Quivet, E., Marchand, N., Picquet-Varrault, B., and Monod, A.: In-cloud processes of methacrolein under simulated conditions- Part 1: Aqueous phase photooxidation, *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*, 9, 6397-6424, 2009.

- Löflund, M., Kasper-Giebl, A., Schuster, B., Giebl, H., Hitzenberger, R., and Puxbaum, H.: Formic, acetic, oxalic, malonic and succinic acid concentrations and their contribution to organic carbon in cloud water, *Atmos. Environ.*, 36, 1553-1558, 2002.
- Ludwig, J., and Klemm, O.: Organic acids in different size classes of atmospheric particulate material, *Tellus B*, 40B, 340-347, 1988.
- Lundin, A., Hasenson, M., Persson, J., Pousette, Å., and Marlene A. DeLuca, W. D. M.: Estimation of biomass in growing cell lines by adenosine triphosphate assay, in: *Methods Enzymol.*, Academic Press, 27-42, 1986.
- MacIntyre, F.: The top millimeter of the ocean, *Sci. Am.*, 230, 62-77, 1974.
- Mack, J., and Bolton, J. R.: Photochemistry of nitrite and nitrate in aqueous solution: a review, *J. Photochem. Photobiol.*, A, 128, 1-13, 1999.
- Mahowald, N. M., Engelstaedter, S., Luo, C., Sealy, A., Artaxo, P., Benitez-Nelson, C., Bonnet, S., Chen, Y., Chuang, P. Y., Cohen, D. D., Dulac, F., Herut, B., Johansen, A. M., Kubilay, N., Losno, R., Maenhaut, W., Paytan, A., Prospero, J. M., Shank, L. M., and Siefert, R. L.: Atmospheric Iron Deposition: Global Distribution, Variability, and Human Perturbations\*, *Annual Review of Marine Science*, 1, 245-278, doi:10.1146/annurev.marine.010908.163727, 2009.
- Maleknia, S. D., Bell, T. L., and Adams, M. A.: Eucalypt smoke and wildfires: Temperature dependent emissions of biogenic volatile organic compounds, *Int. J. Mass spectrom.*, 279, 126-133, 2009.
- Marinoni, A., Laj, P., Sellegri, K., and Mailhot, G.: Cloud chemistry at the Puy de Dôme: variability and relationships with environmental factors, *Atmos. Chem. Phys.*, 4, 715-728, 2004.
- Marinoni, A., Parazols, M., Brigante, M., Deguillaume, L., Amato, P., Delort, A.-M., Laj, P., and Mailhot, G.: Hydrogen peroxide in natural cloud water: Sources and photoreactivity, *Atmos. Res.*, In Press, Corrected Proof, 2011.
- Marks, R., Kruczalok, K., Jankowska, K., and Michalska, M.: Bacteria and fungi in air over the Gulf of Gdansk and Baltic sea, *J. Aerosol Sci.*, 32, 237-250, 2001.
- Matthias-Maser, S., and Jaenicke, R.: The size distribution of primary biological aerosol particles with radii > 0.2  $\mu\text{m}$  in an urban/rural influenced region, *Atmos. Res.*, 39, 279-286, 1995.
- Matthijssen, J., Builtjes, P. J. H., and Sedlak, D. L.: Cloud model experiments of the effect of iron and copper on tropospheric ozone under marine and continental conditions, *Meteorology and Atmospheric Physics*, 57, 43-60, 1995.
- Mayer, B., and Madronich, S.: Actinic flux and photolysis in water droplets: Mie calculations and geometrical optics limit, *Atmos. Chem. Phys.*, 4, 2241-2250, 2004.
- McArdle, J. V., and Hoffmann, M. R.: Kinetics and mechanism of the oxidation of aquated sulfur dioxide by hydrogen peroxide at low pH, *The Journal of Physical Chemistry*, 87, 5425-5429, 1983.
- McCulloch, A., Aucott, M. L., Benkovitz, C. M., Graedel, T. E., Kleiman, G., Midgley, P. M., and Li, Y.-F.: Global emissions of hydrogen chloride and chloromethane from coal combustion, incineration and industrial activities: Reactive Chlorine Emissions Inventory, *J. Geophys. Res.*, 104, 8391-8403, 1999.

- McElroy, W. J.: Sources of hydrogen peroxide in cloudwater, *Atmospheric Environment* (1967), 20, 427-438, 1986.
- Meier, F. C., and Lindbergh, C. A.: Collecting Micro-Organisms from the Arctic Atmosphere: With Field Notes and Material, *The Scientific Monthly*, 40, 5-20, 1935.
- Möhler, O., DeMott, P. J., Vali, G., and Levin, Z.: Microbiology and atmospheric processes: the role of biological particles in cloud physics, *Biogeosciences*, 4, 1059-1071, 2007.
- Möller, D., Acker, K., and Wieprecht, W.: A relationship between liquid water content and chemical composition in clouds, *Atmos. Res.*, 41, 321-335, 1996.
- Möller, D.: Atmospheric hydrogen peroxide: Evidence for aqueous-phase formation from a historic perspective and a one-year measurement campaign, *Atmos. Environ.*, 43, 5923-5936, 2009.
- Monod, A., and Carlier, P.: Impact of clouds on the tropospheric ozone budget: Direct effect of multiphase photochemistry of soluble organic compounds, *Atmos. Environ.*, 33, 4431-4446, 1999.
- Monod, A., Chebbi, A., Durand-Jolibois, R., and Carlier, P.: Oxidation of methanol by hydroxyl radicals in aqueous solution under simulated cloud droplet conditions, *Atmos. Environ.*, 34, 5283-5294, 2000.
- Monod, A., Chevallier, E., Durand Jolibois, R., Doussin, J. F., Picquet-Varrault, B., and Carlier, P.: Photooxidation of methylhydroperoxide and ethylhydroperoxide in the aqueous phase under simulated cloud droplet conditions, *Atmos. Environ.*, 41, 2412-2426, 2007.
- Morris, C. E., Georgakopoulos, D. G., and Sands, D. C.: Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation, *J. Phys. IV France*, 121, 87-103, 2004.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffiere, A., Yan, S., Dominguez, H., and Thompson, B. M.: The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle, *ISME J*, 2, 321-334, 2008.
- Munger, J. W., Jacob, D. J., Daube, B. C., Horowitz, L. W., Keene, W. C., and Heikes, B. G.: Formaldehyde, glyoxal, and methylglyoxal in air and cloudwater at a rural mountain site in central Virginia, *J. Geophys. Res.*, 100, 9325-9333, 1995.
- Nepotchatykh, O. V., and Ariya, P. A.: Degradation of dicarboxylic acids (C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>) upon liquid-phase reactions with O<sub>3</sub> and its atmospheric implications, *Environ. Sci. Technol.*, 36, 3265-3269, 2002.
- Odabasi, M., and Seyfioglu, R.: Phase partitioning of atmospheric formaldehyde in a suburban atmosphere, *Atmos. Environ.*, 39, 5149-5156, 2005.
- Ogawa, N. R., Kikuchi, T., Okamura, T., Adzuhata, M., Kajikawa, M., and Ozeki, T.: Cloud droplet size dependence of the concentrations of various ions in cloud water at a mountain ridge in northern Japan, *Atmos. Res.*, 51, 77-80, 1999.
- Olson, T. M., and Hoffmann, M. R.: Hydroxyalkylsulfonate formation: Its role as a S(IV) reservoir in atmospheric water droplets, *Atmospheric Environment* (1967), 23, 985-997, 1989.
- Olszyna, K. J., Meagher, J. F., and Bailey, E. M.: Gas-phase, cloud and rain-water measurements of hydrogen peroxide at a high-elevation site, *Atmospheric Environment* (1967), 22, 1699-1706, 1988.



- Parazols, M.: Caractérisation physico-chimique et réactivité de la phase aqueuse des nuages prélevée au sommet du puy de Dôme, Sciences et Technologies, Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 296 pp., 2007.
- Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Abida, O., Laj, P., Mailhot, G., Delort, A.-M., and Sergio, Z.: Speciation and role of iron in cloud droplets at the puy de Dôme station, *J. Atmos. Chem.*, 57, 299-300, 2007.
- Pasteur, L.: Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent en suspension dans l'atmosphère. Examen de la doctrine des générations spontanées, *Compte Rendu de l'Academie des Sciences*, 2, 1861.
- Pehkonen, S. O., Erel, Y., and Hoffmann, M. R.: Simultaneous spectrophotometric measurement of iron(II) and iron(III) in atmospheric water, *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1731-1736, 1992.
- Penkett, S. A., Jones, B. M. R., Brich, K. A., and Eggleton, A. E. J.: The importance of atmospheric ozone and hydrogen peroxide in oxidising sulphur dioxide in cloud and rainwater, *Atmospheric Environment (1967)*, 13, 123-137, 1979.
- Porter, K. G., and Feig, Y. S.: The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnology & Oceanography*, 25, 943-948, 1980.
- Pruppacher, H. R., and Jaenicke, R.: The processing of water vapor and aerosols by atmospheric clouds, a global estimate, *Atmos. Res.*, 38, 283-295, 1995.
- Ramanathan, V., Cess, R. D., Harrison, E. F., Minnis, P., Barkstrom, B. R., Ahmad, E., and Hartmann, D.: Cloud-Radiative Forcing and Climate: Results from the Earth Radiation Budget Experiment, *Science*, 243, 57-63, 10.1126/science.243.4887.57, 1989.
- Rao, X., and Collett, J. L., Jr.: Behavior of S(IV) and Formaldehyde in a Chemically Heterogeneous Cloud, *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1023-1031, 1995.
- Ravishankara, A. R.: Heterogeneous and Multiphase Chemistry in the Troposphere, *Science*, 276, 1058-1065, 10.1126/science.276.5315.1058, 1997.
- Reasoner, D. J., and Geldreich, E. E.: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1985.
- Rebillard, J. P., and Torre, M.: Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode couplée DAPI-INT : application à un cas concret, *Revue des Sciences de l'Eau*, 6, 153-174, 1993.
- Richards, L. W., Anderson, J. A., Blumenthal, D. L., McDonald, J. A., Kok, G. L., and Lazrus, A. L.: Hydrogen peroxide and sulfur (IV) in Los Angeles cloud water, *Atmospheric Environment (1967)*, 17, 911-914, 1983.
- Richards, L. W.: Airborne chemical measurements in nighttime stratus clouds in the Los Angeles Basin, *Atmos. Environ.*, 29, 27-46, 1995.
- Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry (Version 3): <http://www.henrys-law.org> 1999.
- Sanhueza, E., Santana, M., Trapp, D., de Serves, C., Figueroa, L., Romero, R., Rondón, A., and Donoso, L.: Field measurement evidence for an atmospheric chemical source of formic and acetic acids in the tropic, *Geophys. Res. Lett.*, 23, 1045-1048, 1996.

- Satsumabayashi, H., Kurita, H., Chang, Y.-S., Carmichael, G. R., and Ueda, H.: Photochemical formations of lower aldehydes and lower fatty acids under long-range transport in central Japan, *Atmos. Environ.*, 29, 255-266, 1995.
- Sattler, B., Puxbaum, H., and Psenner, R.: Bacterial growth in supercooled cloud droplets, *Geophys. Res. Lett.*, 28, 239-242, 2001.
- Saxena, P., and Hildemann, L. M.: Water-soluble organics in atmospheric particles: A critical review of the literature and application of thermodynamics to identify candidate compounds, *J. Atmos. Chem.*, 24, 57-109, 1996.
- Schell, D., Wobrock, W., Maser, R., Preiss, M., Jaeschke, W., Georgii, H. W., Gallagher, M. W., Bower, K. N., Beswick, K. M., Pahl, S., Facchini, M. C., Fuzzi, S., Wiedensohler, A., Hansson, H. C., and Wendisch, M.: The size-dependent chemical composition of cloud droplets, *Atmos. Environ.*, 31, 2561-2576, 1997.
- Scholes, G., and Willson, R. L.: Radiolysis of aqueous thymine solutions, Determination of relative reaction rates of OH radicals, *Trans. Faraday Soc.*, 63, 2983-2993, 1967.
- Seco, R., Peñuelas, J., and Filella, I.: Short-chain oxygenated VOCs: Emission and uptake by plants and atmospheric sources, sinks, and concentrations, *Atmos. Environ.*, 41, 2477-2499, 2007.
- Seco, R., Peñuelas, J., and Filella, I.: Formaldehyde emission and uptake by Mediterranean trees *Quercus ilex* and *Pinus halepensis*, *Atmos. Environ.*, 42, 7907-7914, 2008.
- Seinfeld, J. H., and Pandis, S. N.: *Atmospheric chemistry and physics*, 2 ed., Wiley, New York, 2006.
- Sellegri, K., Laj, P., Peron, F., Dupuy, R., Legrand, M., Preunkert, S., Putaud, J. P., Cachier, H., and Ghermandi, G.: Mass balance of free tropospheric aerosol at the Puy de Dôme (France) in winter, *J. Geophys. Res.*, 108, 4333, 2003.
- Sempéré, R., and Kawamura, K.: Comparative distributions of dicarboxylic acids and related polar compounds in snow, rain and aerosols from urban atmosphere, *Atmos. Environ.*, 28, 449-459, 1994.
- Shapiro, J. B., Simpson, H. J., Griffin, K. L., and Schuster, W. S. F.: Precipitation chloride at West Point, NY: Seasonal patterns and possible contributions from non-seawater sources, *Atmos. Environ.*, 41, 2240-2254, 2007.
- Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanová, J., Stadler, N., and Höfer, M.: Oxidative stress in microorganisms — I. Microbial vs. higher cells-damage and defenses in relation to cell aging and death, *Folia Microbiologica*, 44, 587-624, 1999.
- Simon, M., and Azam, F.: Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 51, 201-213, 1989.
- Simon, M.: Improved assessment of bacterial production: Combined measurements of protein synthesis via leucine and cell multiplication via thymidine incorporation *Ergebnisse der Limnologie ERLIA6*, 34, 151-155, 1990.
- Singh, H., Chen, Y., Tabazadeh, A., Fukui, Y., Bey, I., Yantosca, R., Jacob, D., Arnold, F., Wohlfrom, K., Atlas, E., Flocke, F., Blake, D., Blake, N., Heikes, B., Snow, J., Talbot, R., Gregory, G., Sachse, G., Vay, S., and Kondo, Y.: Distribution and fate of selected oxygenated organic species in the troposphere and lower stratosphere over the Atlantic, *J. Geophys. Res.*, 105, 3795-3805, 2000.

- Singh, H., Chen, Y., Staudt, A., Jacob, D., Blake, D., Heikes, B., and Snow, J.: Evidence from the Pacific troposphere for large global sources of oxygenated organic compounds, *Nature*, 410, 1078-1081, 2001.
- Snider, J. R., and Dawson, G. A.: Tropospheric light alcohols, carbonyls, and acetonitrile: Concentrations in the southwestern United States and Henry's law data, *J. Geophys. Res.*, 90, 3797-3805, 1985.
- Solberg, S., Dye, C., Walker, S.-E., and Simpson, D.: Long-term measurements and model calculations of formaldehyde at rural European monitoring sites, *Atmos. Environ.*, 35, 195-207, 2001.
- Sorooshian, A., Varutbangkul, V., Brechtel, F. J., Ervens, B., Feingold, G., Bahreini, R., Murphy, S. M., Holloway, J. S., Atlas, E. L., Buzorius, G., Jonsson, H., Flagan, R. C., and Seinfeld, J. H.: Oxalic acid in clear and cloudy atmospheres: Analysis of data from International Consortium for Atmospheric Research on Transport and Transformation 2004, *J. Geophys. Res.*, 111, D23S45, 2006.
- Southwell, M. W., Smith, J. D., Avery, G. B., Kieber, R. J., and Willey, J. D.: Seasonal variability of formaldehyde production from photolysis of rainwater dissolved organic carbon, *Atmos. Environ.*, 44, 3638-3643, 2010.
- Souza, S. R., Vasconcelos, P. C., and Carvalho, L. R. F.: Low molecular weight carboxylic acids in an urban atmosphere: Winter measurements in São Paulo City, Brazil, *Atmos. Environ.*, 33, 2563-2574, 1999.
- Staffelbach, T., Neftel, A., Stauffer, B., and Jacob, D.: A record of the atmospheric methane sink from formaldehyde in polar ice cores, *Nature*, 349, 603-605, 1991.
- Stanley, P. E., and Williams, S. G.: Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme, *Anal. Biochem.*, 29, 381-392, 1969.
- Sun, J., and Ariya, P. A.: Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review, *Atmos. Environ.*, 40, 795-820, 2006.
- Sun, Y. L., Zhang, Q., Anastasio, C., and Sun, J.: Insights into secondary organic aerosol formed via aqueous-phase reactions of phenolic compounds based on high resolution mass spectrometry, *Atmos. Chem. Phys.*, 10, 4809-4822, 2010.
- Tabazadeh, A., Yokelson, R. J., Singh, H. B., Hobbs, P. V., Crawford, J. H., and Iraci, L. T.: Heterogeneous chemistry involving methanol in tropospheric clouds, *Geophys. Res. Lett.*, 31, L06114, 2004.
- Takekawa, H., Minoura, H., and Yamazaki, S.: Temperature dependence of secondary organic aerosol formation by photo-oxidation of hydrocarbons, *Atmos. Environ.*, 37, 3413-3424, 2003.
- Talbot, R. W., Beecher, K. M., Harriss, R. C., and Cofer, W. R., III: Atmospheric Geochemistry of Formic and Acetic Acids at a Mid-Latitude Temperate Site, *J. Geophys. Res.*, 93, 1638-1652, 1988.
- Tan, Y., Carlton, A. G., Seitzinger, S. P., and Turpin, B. J.: SOA from methylglyoxal in clouds and wet aerosols: Measurement and prediction of key products, *Atmos. Environ.*, 44, 5218-5226, 2010.
- Tie, X., Guenther, A., and Holland, E.: Biogenic methanol and its impacts on tropospheric oxidants, *Geophys. Res. Lett.*, 30, 1881, 2003.

- Tilgner, A., Majdik, Z., Sehili, A. M., Simmel, M., Wolke, R., and Herrmann, H.: SPACCIM: Simulations of the multiphase chemistry occurring in the FEBUKO hill cap cloud experiments, *Atmos. Environ.*, 39, 4389-4401, 2005.
- Tilgner, A., and Herrmann, H.: Radical-driven carbonyl-to-acid conversion and acid degradation in tropospheric aqueous systems studied by CAPRAM, *Atmos. Environ.*, 44, 5415-5422, doi:10.1016/j.atmosenv.2010.07.050, 2010.
- Torrella, F., and Morita, R. Y.: Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 518-527, 1981.
- Trapp, D., Cooke, K. M., Fischer, H., Bonsang, B., Zitzelsberger, R. U., Seuwen, R., Schiller, C., Zenker, T., Parchatka, U., Nunes, T. V., Pio, C. A., Lewis, A. C., Seakins, P. W., and Pilling, M. J.: Isoprene and its degradation products methyl vinyl ketone, methacrolein and formaldehyde in a eucalyptus forest during the FIELDVOC'94 campaign in Portugal, *Chemosphere - Global Change Science*, 3, 295-307, 2001.
- Vali, G., Christensen, M., Fresh, R. W., Galyan, E. L., Maki, L. R., and Schnell, R. C.: Biogenic Ice Nuclei. Part II: Bacterial Sources, *Journal of the Atmospheric Sciences*, 33, 1565-1570, doi:10.1175/1520-0469(1976)033<1565:BINPIB>2.0.CO;2, 1976.
- Valverde-Canossa, J., Wieprecht, W., Acker, K., and Moortgat, G. K.: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and organic peroxide measurements in an orographic cloud: The FEBUKO experiment, *Atmos. Environ.*, 39, 4279-4290, 2005.
- van Pinxteren, D., Plewka, A., Hofmann, D., Müller, K., Kramberger, H., Svrčina, B., Bächmann, K., Jaeschke, W., Mertes, S., Collett Jr, J. L., and Herrmann, H.: Schmücke hill cap cloud and valley stations aerosol characterisation during FEBUKO (II): Organic compounds, *Atmos. Environ.*, 39, 4305-4320, 2005.
- von Sonntag, C., Dowideit, P., Xingwang, F., Mertens, R., Xianming, P., Schuchmann, M. N., and Schuchmann, H.-P.: The fate of peroxy radicals in aqueous solution, *Water Sci. Technol.*, 35, 9-15, 1997.
- Walcek, C. J., Yuan, H.-H., and Stockwell, W. R.: The influence of aqueous-phase chemical reactions on ozone formation in polluted and nonpolluted clouds, *Atmos. Environ.*, 31, 1221-1237, 1997.
- Wang, H., Kawamura, K., and Yamazaki, K.: Water-Soluble dicarboxylic acids, ketoacids and dicarbonyls in the atmospheric aerosols over the southern ocean and western pacific ocean, *J. Atmos. Chem.*, 53, 43-61, 2006.
- Warneck, P.: The relative importance of various pathways for the oxidation of sulfur dioxide and nitrogen dioxide in sunlit continental fair weather clouds, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 1, 5471-5483, 1999.
- Warneck, P.: Chemistry of the Natural Atmosphere, Chapter 2: Photochemical processes and elementary reactions, in: *International Geophysics*, Second ed., Academic Press, 54-98, 2000.
- Warneck, P.: In-cloud chemistry opens pathway to the formation of oxalic acid in the marine atmosphere, *Atmos. Environ.*, 37, 2423-2427, 2003.
- Warneck, P.: Multi-Phase Chemistry of C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub> Organic Compounds in the Marine Atmosphere, *J. Atmos. Chem.*, 51, 119-159, 2005.

- Wei, Y., Liu, S., Liu, F., Liu, J., Zhu, Z., and Li, G.: Direct measurement of formaldehyde and methanol emissions from gasohol engine via pulsed discharge helium ionization detector, *Fuel*, 89, 2179-2184, 2010.
- Willard Richards, L.: Airborne chemical measurements in nighttime stratus clouds in the Los Angeles Basin, *Atmos. Environ.*, 29, 27-46, 1995.
- Williams, J., de Reus, M., Krejci, R., Fischer, H., and Ström, J.: Application of the variability-size relationship to atmospheric aerosol studies: estimating aerosol lifetimes and ages, *Atmos. Chem. Phys.*, 2, 133-145, 2002.
- Winterhalter, R., Van Dingenen, R., Larsen, B. R., Jensen, N. R., and Hjorth, J.: LC-MS analysis of aerosol particles from the oxidation of alpha-pinene by ozone and OH-radicals, *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*, 3, 1-39, 2003.
- Wittmaack, K., Wehnes, H., Heinzmann, U., and Agerer, R.: An overview on bioaerosols viewed by scanning electron microscopy, *Sci. Tot. Env.*, 346, 244-255, 2005.
- Womack, A. M., Bohannon, B. J. M., and Green, J. L.: Biodiversity and biogeography of the atmosphere, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365, 3645-3653, 10.1098/rstb.2010.0283, 2010.
- Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., and Yamamoto, H.: Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*, *Microbiol. Immunol.*, 34, 99-119, 1990.
- Yu, X.-Y., Bao, Z.-C., and Barker, J. R.: Free Radical Reactions Involving  $\text{Cl}^\bullet$ ,  $\text{Cl}_2^\bullet$ , and  $\text{SO}_4^\bullet$  in the 248 nm Photolysis of Aqueous Solutions Containing  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$  and  $\text{Cl}^-$ , *The Journal of Physical Chemistry A*, 108, 295-308, 2003.
- Ziegelhoffer, E. C., and Donohue, T. J.: Bacterial responses to photo-oxidative stress, *Nat Rev Micro*, 7, 856-863, 2009.
- Zuo, Y., and Hoigne, J.: Formation of hydrogen peroxide and depletion of oxalic acid in atmospheric water by photolysis of iron(III)-oxalato complexes, *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1014-1022, 1992.
- Zuo, Y., and Deng, Y.: Iron(II)-catalyzed photochemical decomposition of oxalic acid and generation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in atmospheric liquid phases, *Chemosphere*, 35, 2051-2058, 1997.

# **ANNEXES**

*Nota Bene :*

Nous avons reporté dans ces annexes les informations suivantes :

- des informations quantitatives et exhaustives concernant les prélèvements d'eau nuageuse (dénombrements microbiens, liste des souches identifiées),
- des protocoles précis permettant de reproduire certaines mesures ou manipulations,
- une revue publiée dans *Atmospheric Research* ciblée sur le rôle des microorganismes dans la chimie atmosphérique et la microphysique des nuages.

## III.3. Données microbiologiques de l'eau nuageuse (2003-2010)

Evénements nuageux	Date	Heure	Origine	T°C	LWC	pH	Cellules totales (cellules mL <sup>-1</sup> )		ATP (pmol mL <sup>-1</sup> )
							Bactéries	Champignons dont Levures	
1	04/03/03		O	5		4,9	8,3E+04		
2	06/03/03		NO	-2		5,8	3,6E+05		
3	11/12/03	17:30 - 05:00 (+1j)	O	1		5,6	7,9E+05		
4	09/01/04	14:30 - 16:00	O	1		6,4	6,1E+05		
5	20/01/04	17:00 - 06:00 (+1j)	O	-5		6,3	2,4E+05	1,4E+04	
6	16/02/04	13:30 - 18:30 21:30 - 05:30 (+1j)	N	0		5,8	2,0E+05	8,9E+02	
7	16/02/04	13:30 - 14:30	NE	-4		3,2	1,7E+04	8,3E+03	
12	24/06/04	10:00 - 02:45 (+1j)	O	7		5,7	5,9E+04	2,5E+04	
13	07/06/04	23:45 - 01:00 (+1j)	SO	5	0,4	5,5	5,0E+04	7,5E+03	
14	23/09/04	19:00 - 02:45 (+1j)	N	10		7,0	1,4E+05	3,6E+03	
15	17/11/04	9:15 - 15:15	NO	1		5,8	1,6E+05	4,8E+03	0,36
16	16/12/04	15:30 - 22:00 8:30 - 11:00 (+1j)	O	-1		5,9	6,8E+04	3,5E+03	0,27
17	19/01/05	11:15 - 18:15	NO	-3		6,8	7,6E+04	1,3E+03	0,35
18	17/04/05	7:30 - 13:00	O	3	0,2	5,0	7,7E+04	3,0E+03	0,04
19	22/05/05	17:30 - 05:15 (+1j)	O	3	0,3	5,3	9,0E+04	6,6E+03	0,85
20	06/05/05	19:30 - 06:30 (+1j)	O	7	0,4	5,4	8,6E+04	1,7E+03	0,44
21	28/09/05	21:15 - 06:00 (+1j)	O	5		5,9	1,2E+05	2,0E+04	2,01
22	03/10/05	16:00 - 05:15 (+1j)	NE	3		4,4	3,8E+04	4,8E+03	0,75
23	13/12/07	13:40 15:40	E	-7		4,7			0,06
24	17/01/08	12:00 14:00	O	-3	0,5	5,9			0,43
25	29/02/08	11:30 12:30	O	2	0,2	5,2			0,30
26	21/04/08	11:00 14:00	SO	3	0,3	4,6	4,5E+04	1,07E+04	0,26
27	09/10/08	10:50 11:30	NE	8	0,1	5,0	1,7E+04	7,2E+03	0,24
28	17/11/08	10:00 12:00	N	5		5,4	3,2E+04	3,24E+04	0,21
29	27/01/09	10:30 12:00	NO	-2		6,5	3,3E+03	2,7E+03	0,30
30	09/02/09	10:45 13:00	O	0	0,3	4,9	3,3E+03	1,3E+03	0,02
30'	24/02/09	10:30 12:30	N	0	0,9	4,1	5,8E+04	8,4E+03	0,02
31	30/03/09	10:15 12:00	NE	1		4,0	6,8E+04	1,6E+03	0,01
32	03/11/09	10:15 12:00	O	7	0,3	5,2	2,2E+04	9,2E+02	0,19
33	23/11/09	10:00 13:00	O	6	0,4	5,8	3,8E+04	2,8E+03	0,15
34	26/01/10	9:00 12:00	N	-5		3,8	4,3E+04	1,0E+04	0,09
35	31/03/10	10:00 12:00	O	-2		5,5	4,9E+04	3,1E+03	0,33
36	31/05/10	10:30 13:00	NO	10		6,2	4,0E+04	9,6E+03	1,33
37	01/06/10	20:20 2:30 (+1j)	NO	10		6,1	2,8E+04	9,0E+03	0,20
38	08/06/10	12:05 23:25	SO	14		5,2	8,1E+04	2,6E+03	0,95
39	16/06/10	15:35 17:25	NE	10		6,2	4,4E+04	2,2E+03	0,40
40	18/06/10	11:15 7:00 (+1j)	NE	10		3,9	8,9E+04	3,0E+03	0,85
41	16/09/10	8:25 16:45	O	12	0,5	5,9	2,7E+04	4,5E+03	0,17
					Mediane		5,9E+04	4,5E+03	0,29
					Moyenne		1,1E+05	7,0E+03	0,41
					Minimum		3,3E+03	8,9E+02	0,01
					Maximum		7,9E+05	3,2E+04	2,01

Tableau 0-1 : Données microbiologiques et physico-chimiques mesurées dans les échantillons d'eau nuageuse prélevés de mars 2003 à septembre 2010 au pdD.



### III.4. Liste des souches isolées (2007-2010)

#### III.4.1. Souches bactériennes

N° souche	Identification	N° souche	Identification
23b-1	<i>Sphingomonas</i> sp.	26b-14	<i>Streptomyces</i> sp.
23b-5	<i>Rhodococcus</i> sp.	26b-16	<i>Sphingomonas</i> sp.
23b-6	<i>Sphingomonas</i> sp.	26b-21	<i>Plantibacter</i> sp.
23b-7	<i>Devosia</i> sp.	26b-23	<i>Subtercola</i> sp.
23b-8	<i>Streptomyces</i> sp.	26b-25	<i>Variovorax</i> sp.
23b-9	<i>Streptomyces</i> sp.	26b-30	<i>Clavibacter michiganensis</i>
23b-11	<i>Streptomyces</i> sp.	27b-1	<i>Sphingomonas</i> sp.
23b-14	<i>Methylobacterium</i> sp.	27b-3	<i>Pseudomonas</i> sp.
23b-15	<i>Microbacterium oxydans</i>	28b-14	<i>Burkholderia</i> sp.
23b-16	<i>Leifsonia</i> sp.	29b-2	<i>Rhodococcus</i> sp.
23b-17	<i>Hymenobacter</i> sp.	29b-3	<i>Bacillus</i> sp.
23b-20	<i>Microbacterium</i> sp.	30b-1	<i>Frigoribacterium</i> sp.
23b-21	<i>Subtercola boreus</i>	30b-2	<i>Rhodococcus</i> sp.
23b-24	<i>Rhizobium</i> sp.	30b-4	<i>Agreia</i> sp.
23b-25	<i>Rhodococcus</i> sp.	30b-5	<i>Rhodococcus</i> sp.
23b-27	<i>Rhodococcus</i> sp.	30b-6	<i>Rhodococcus</i> sp.
23b-29	<i>Rhodococcus</i> sp.	30b-7	<i>Psychrobacter</i> sp.
24b-1	<i>Clavibacter michiganensis</i>	31b-1	<i>Bacillus megaterium</i>
24b-3	<i>Streptomyces</i> sp.	31b-2	<i>Rhodococcus</i> sp.
24b-4	<i>Streptomyces microflavus</i>	31b-3	<i>Kocuria palustris</i>
24b-5	<i>Clavibacter michiganensis</i>	31b-4	<i>Pseudomonas</i> sp.
24b-6	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	31b-6	<i>Roseomonas</i> sp.
24b-7	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	31b-7	<i>Rhodococcus</i> sp.
24b-9	<i>Aeromicrobium</i> sp.	31b-8	<i>Frigoribacterium</i> sp.
24b-10	<i>Streptomyces microflavus</i>	31b-9	<i>Streptomyces</i> sp.
24b-11	<i>Streptomyces</i> sp.	31b-10	<i>Massilia</i> sp.
24b-12	<i>Pseudomonas</i> sp.	32b-2	<i>Agreia</i> sp.
24b-17	<i>Clavibacter michiganensis</i>	32b-3	<i>Rathayibacter</i> sp.
24b-19	<i>Clavibacter michiganensis</i>	32b-4	<i>Sphingomonas</i> sp.
24b-20	<i>Frigoribacterium</i> sp.	32b-6	<i>Flavobacterium</i> sp.
24b-23	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	32b-11	<i>Sphingomonas</i> sp.
24b-24	<i>Clavibacter michiganensis</i>	32b-13	<i>Clavibacter</i> sp.
25b-3	<i>Clavibacter michiganensis</i>	32b-17	<i>Frigoribacterium</i> sp.
25b-5	<i>Pseudomonas</i> sp.	32b-20	<i>Leifsonia</i> sp.
25b-7	<i>Erwinia billingiae</i>	32b-28	<i>Fronidhabitans</i> sp.
25b-11	<i>Erwinia billingiae</i>	32b-29	<i>Rhizobium</i> sp.
25b-12	<i>Rhodococcus</i> sp.	32b-32	<i>Xanthomonas campestris</i>
25b-13	<i>Erwinia billingiae</i>	32b-33	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.
26b-1	<i>Streptomyces</i> sp.	32b-35	<i>Frigoribacterium</i> sp.
26b-7	<i>Streptomyces</i> sp.	32b-36	<i>Curtobacterium</i> sp.

Tableau 0-2 : Souches bactériennes isolées de l'eau nuageuse prélevée au sommet du puy de Dôme (1465 m a.s.l.) de 2007 à 2010, et identifiées.

N° souche	Identification	N° souche	Identification
32b-39	<i>Sphingomonas</i> sp.	35b-1	<i>Frigoribacterium</i> sp.
32b-42	<i>Pseudomonas</i> sp.	35b-2	<i>Rhodococcus</i> sp.
32b-43	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	35b-7	<i>Staphylococcus</i> sp.
32b-45	<i>Sphingomonas</i> sp.	35b-8	<i>Sphingomonas</i> sp.
32b-46	<i>Curtobacterium herbarum</i>	35b-9	<i>Sphingobium</i> sp.
32b-47	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	35b-13	<i>Frigoribacterium</i> sp.
32b-49	<i>Sphingomonas</i> sp.	35b-15	<i>Sphingomonas</i> sp.
32b-50	<i>Sphingomonas</i> sp.	35b-18	<i>Curtobacterium herbarum</i>
32b-51	<i>Subtercola</i> sp.	35b-20	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>
32b-52	<i>Xanthomonas campestris</i>	35b-27	<i>Methylobacterium</i> sp.
32b-53	<i>Pseudomonas trivialis</i>	35b-32	<i>Sphingomonas</i> sp.
32b-54	<i>Rathayibacter</i> sp.	35b-33	<i>Massilia</i> sp.
32b-55	<i>Pseudomonas graminis</i>	35b-34	<i>Rhodococcus</i> sp.
32b-56	<i>Flavobacterium</i> sp.	35b-37	<i>Rhodococcus</i> sp.
32b-57	<i>Sphingomonas</i> sp.	35b-38	<i>Sphingomonas</i> sp.
32b-58	<i>Ewingella americana</i>	35b-40	<i>Janthinobacterium</i> sp.
32b-59	<i>Ewingella americana</i>	35b-43	<i>Rhodococcus</i> sp.
32b-60	<i>Pseudomonas graminis</i>	36b-1	<i>Pseudomonas syringae</i>
32b-61	<i>Sphingomonas</i> sp.	36b-2	<i>Pseudomonas trivialis</i>
32b-62	Uncultured bacterium	36b-3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
32b-63	<i>Plantibacter</i> sp.	36b-5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
32b-65	<i>Agrobacterium</i> sp.	36b-6	<i>Janthinobacterium</i> sp.
32b-66	<i>Pseudomonas graminis</i>	37b-2	<i>Pseudomonas poae</i>
32b-67	<i>Pseudomonas syringae</i>	37b-4	<i>Erwinia rhapontici</i>
32b-69	<i>Pseudomonas</i> sp.	37b-5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
32b-72	<i>Pseudomonas</i> sp.	37b-8	<i>Pseudomonas veronii</i>
32b-74	<i>Pseudomonas syringae</i>	37b-9	<i>Erwinia</i> sp.
33b-1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	37b-10	<i>Sphingomonas</i> sp.
33b-2	<i>Pseudomonas syringae</i>	38b-2	<i>Pseudomonas</i> sp.
33b-3	<i>Xanthomonas campestris</i>	38b-9	<i>Pseudomonas graminis</i>
33b-5	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	38b-10	<i>Pseudomonas syringae</i>
33b-8	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	41b-2	<i>Rhodococcus</i> sp.
33b-9	<i>Sphingomonas</i> sp.	41b-5	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
33b-12	<i>Sphingomonas</i> sp.		

**Tableau 0-3 :** Souches bactériennes isolées de l'eau nuageuse prélevée au sommet du puy de Dôme (1465 m a.s.l.) de 2007 à 2010, et identifiées (suite).

## III.4.2.Souches de levures

N° souche	Identification	N° souche	Identification
23b-2	<i>Unidentified Ascomycota</i>	28b-10	<i>Udeniomyces panonicus</i>
23b-3	<i>Unidentified Ascomycota</i>	28b-11	<i>Udeniomyces panonicus</i>
23b-13	<i>Dioszegia sp.</i>	28b-12	<i>Udeniomyces sp.</i>
23b-18	<i>Cryptococcus victoriae</i>	28b-13	<i>Cryptococcus sp.</i>
23b-22	<i>Cryptococcus victoriae</i>	28b-15	<i>Rhodotorula sp.</i>
24b-2	<i>Bullera armeniaca</i>	29b-1	<i>Bensingtonia yuccicola</i>
24b-8	<i>Bullera armeniaca</i>	29b-4	<i>Sporobolomyces roseus</i>
24b-13	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	29b-5	<i>Udeniomyces panonicus</i>
24b-14	<i>Dioszegia sp.</i>	29b-6	<i>Udeniomyces panonicus</i>
24b-15	<i>Dioszegia fristingensis</i>	32b-1	<i>Udeniomyces sp.</i>
24b-16	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	32b-5	<i>Udeniomyces sp.</i>
24b-18	<i>Udeniomyces pannonicus</i>	32b-9	<i>Dioszegia hungarica</i>
24b-21	<i>Udeniomyces pannonicus</i>	32b12	<i>Udeniomyces pannonicus</i>
24b-22	<i>Bullera armeniaca</i>	32b-15	<i>Dioszegia sp.</i>
24b-25	<i>Udeniomyces sp.</i>	32b-21	<i>Udeniomyces sp.</i>
25b-1	<i>Bullera globispora</i>	32b-37	<i>Dioszegia sp.</i>
25b-2	<i>Udeniomyces sp.</i>	32b-40	<i>Udeniomyces sp.</i>
25b-4	<i>Udeniomyces sp.</i>	32b-41	<i>Dioszegia sp.</i>
25b-6	<i>Dioszegia butyracea</i>	32b-44	<i>Dioszegia hungarica</i>
25b-8	<i>Dioszegia butyracea</i>	32b-48	<i>Bullera globispora</i>
25b-9	<i>Udeniomyces sp.</i>	32b-64	<i>Udeniomyces sp.</i>
25b-10	<i>Dioszegia sp.</i>	32b-68	<i>Udeniomyces sp.</i>
26b-3	<i>Cryptococcus sp.</i>	32b-70	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>
26b-4	<i>Dioszegia sp.</i>	33b-6	<i>Udeniomyces sp.</i>
26b-5	<i>Cryptococcus sp.</i>	33b-7	<i>Cryptococcus victoriae</i>
26b-6	<i>Dioszegia sp.</i>	33b-11	<i>Dioszegia hungarica</i>
26b-8	<i>Cryptococcus sp.</i>	35b-5	<i>Linocarpon sp.</i>
26b-9	<i>Dioszegia buhagiarri</i>	35b-6	<i>Dioszegia crocea</i>
26b-11	<i>Cryptococcus sp.</i>	35b-12	<i>Sporobolomyces roseus</i>
26b-18	<i>Udeniomyces sp.</i>	38b-5	<i>Udeniomyces pannonicus</i>
26b-19	<i>Bullera globispora</i>	38b-6	<i>Sporobolomyces roseus</i>
26b-20	<i>Dioszegia sp.</i>	38b-7	<i>Dioszegia crocea</i>
26b-22	<i>Dioszegia sp.</i>	38b-8	<i>Udeniomyces pannonicus</i>
26b-24	<i>Dioszegia sp.</i>	38b-11	<i>Dioszegia sp.</i>
26b-26	<i>Dioszegia sp.</i>	38b-12	<i>Hannaella oryzae</i>
26b-27	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	40b-1	<i>Dioszegia sp.</i>
26b-29	<i>Kurtzmanomyces tardus</i>	40b-2	<i>Udeniomyces pannonicus</i>
26b-31	<i>Taphrina deformans</i>	40b-3	<i>Dioszegia sp.</i>
26b-32	<i>Tetracladium sp.</i>	40b-4	<i>Cryptococcus sp.</i>
26b-33	<i>Dioszegia sp.</i>	40b-5	<i>Dioszegia hungarica</i>
26b-34	<i>Dioszegia xingshanensis</i>	40b-6	<i>Udeniomyces pannonicus</i>
28b-1	<i>Dioszegia crocea</i>	40b-7	<i>Dioszegia sp.</i>
28b-3	<i>Cryptococcus victoriae</i>	40b-8	<i>Cryptococcus sp.</i>
28b-4	<i>Bensingtonia yuccicola</i>	40b-9	<i>Dioszegia crocea</i>
28b-5	<i>Diogeszia crocea</i>	40b-10	<i>Dioszegia sp.</i>
28b-6	<i>Dioszegia crocea</i>	41b-1	<i>Bullera unica</i>
28b-7	<i>Cryptococcus sp.</i>	41b-4	<i>Udeniomyces pyricola</i>
28b-9	<i>Dioszegia hungarica</i>	41b-6	Uncultured Hypocreales
		41b-7	<i>Dioszegia fristingensis</i>

**Tableau 0-4 :** Souches de levures isolées de l'eau nuageuse prélevée au sommet du puy de Dôme (1465 m a.s.l.) de 2007 à 2010, et identifiées (suite)

### III.5. Matériels et méthodes de prélèvements d'eau nuageuse

#### III.5.1. Matériels de collecte d'eau nuageuse

La liste du matériel est donnée de manière indicative, elle est extraite de la thèse de Pierre Amato (2006) et mise à jour.

- La partie amovible de l'impacteur à gouttelettes, nettoyée et autoclavée sous 2 sacs à autoclave stériles
- Une glacière pour le transport des échantillons
- Becs bunsen et briquet
- Vortex
- Pipettes automatiques (P1000, P200, P10)
- Cônes stériles à filtres de 10, 200 et 1000  $\mu$ L
- Pipeteur automatique et alimentation
- Pipettes stériles de 10 mL et 2 mL à emballage unique
- Tubes stériles de 50 mL et de 15 mL
- Filtres pour seringues stériles (porosité 0,22  $\mu$ m (Millipore)) et seringues stériles de 50 mL
- Gants stériles
- Microtubes Ependorf stériles de 1,5 mL et 2 mL
- Flacons (Schott) stériles de différents volumes
- Eau ultrapure stérile
- Ethanol 96 % pour utilisation directe et préparation de solution à 70 % v/v
- Tube de 10 mL de formaldéhyde 4% en solution tampon (pH 7)
- Microtube contenant 200  $\mu$ L de l'« Extractant B/S » du kit Biothema utilisé pour le dosage de l'ATP, conservée au congélateur
- Divers récipients de tailles variées (bêchers, cristallisoirs)
- Portoir
- Rouleau de papier absorbant
- Sacs à autoclave stériles et élastiques
- Cutter et ciseaux
- Marqueurs
- Pissettes
- Parafilm et élastiques
- En l'absence de hotte de microbiologie et de paillasse adaptée, prévoir de quoi se faire une paillasse surélevée, lisse et pouvant être nettoyée facilement, comme un bac chirurgical en métal émaillé ou en Inox préalablement autoclavé.

**III.5.2. Précautions et manipulations lors de la collecte d'eau nuageuse**

Une fois les systèmes d'aspiration en place, la partie supérieure proche de l'embouchure et l'embouchure elle-même, ainsi que l'intérieur de la partie fixe de l'impacteur sont minutieusement nettoyés avec de l'alcool 70% v/v. Puis après plus de 15 min d'attente, l'ensemble est rincé à l'eau ultrapure stérile. La partie amovible de l'impacteur est déballée au dernier moment de ses sacs à autoclave, immédiatement avant d'être mise en place.

Pour le blanc de l'instrument, de l'eau ultrapure stérile est versée dans le vase de collecte avant le début des échantillonnages, puis traitée comme les échantillons pour effectuer des dénombrements des cellules totales et cultivables. Quand chacune des tiges de collecte est en place, débiter les prélèvements (allumer les aspirateurs) et noter l'heure de début.

L'eau collectée est récupérée avec un pas de temps variant de 1 à 3 heures. L'heure est notée, les aspirateurs sont arrêtés, puis le matériel nécessaire aux prélèvements (pipeteur, tube stérile) est préparé, avant d'enfiler des gants stériles. Si les échantillons sont liquides, un pipeteur automatique avec une pipette de 10 mL sert à transvaser l'eau de nuage dans un tube stérile de 50 mL, quasiment sans sortir la tige de collecte du corps de l'impacteur ce qui limite au maximum les risques de contamination. En cas d'échantillon congelé, la tige de collecte est amenée à l'intérieur du chalet, dans un sac à autoclave stérile ou un grand tube à essai stérilisé. La glace se décolle de la plaque d'impaction en commençant à fondre, et peut alors être récupérée avec pince stérile, entre 2 becs Bunsen.

### III.6. Dosage de l'ATP et de l'ADP

Ce dosage a été adapté du protocole du kit commercial Biothema<sup>®</sup> (ATP Biomass Kit HS) par Marek Koutny (Post-doc au SEESIB 2005/2006) (Koutny et al., 2006). Le luminomètre utilisé est un LUMAC Biocounter M2500. Pour le dosage de l'ADP, on effectue d'abord un dosage de l'ATP pour un échantillon, et avec un duplicat on dose l'ATP total après la transformation de l'ADP en ATP par l'utilisation de phosphoenolpyruvate kinase en présence de phosphoenolpyruvate, la différence entre les deux mesures indique la concentration en ADP dans l'échantillon.

#### Solutions :

##### **- Diluant B+K+Mg solution**

10 ml diluant B (du kit ATP) + 200 µl 1M KCl + 10 µl 1M MgSO<sub>4</sub>

##### **- Solution de PEP (phosphoenolpyruvate)**

120 mg PEP + 5ml 0.05M TRIS-HCl pH 7,2

Après l'ajout du PEP, la solution devient très acide, on ajuste le pH à 7, avec une solution concentrée de KOH.

##### **- Solution de PEP + PK (phosphoenolpyruvate kinase)**

5 mg PK est dissous dans 1 ml de solution PEP, puis aliquoté par 200 µL dans des microtubes congelés à -40°C.

**- Solution "ATP reagent HS"** du kit doit être reconstituée avec 2,5 mL d'eau ultrapure sterile à la place du "**diluentB**" comme indiqué dans la notice du kit.

#### Protocole:

ATP	ATP + ADP
Décongeler le mélange extractant/échantillon (mix) Ajouter au tube du luminomètre: 30 µl du mix ( $V_{mix}$ ) 240 µl DiluantB+K+Mg	
+20 µl eau  Couvrir les tubes de parafilm 10 min d'incubation à 37°C +60 µl ATP reagent Mesure d'intensité lumineuse $L_1$ ( $I_{smp}$ ) +10 µl ATP standard Mesure d'intensité lumineuse $L_2$ ( $I_{smp + std}$ )	+10 µl PEP+PK +10 µl eau Couvrir les tubes de parafilm 10 min d'incubation à 37°C +60 µl ATP reagent Mesure d'intensité lumineuse $L_1$ ( $I_{smp}$ ) +10 µl ATP standard Mesure d'intensité lumineuse $L_2$ ( $I_{smp + std}$ )

La concentration en ATP est calculée de la manière suivante :

$$[\text{ATP}] = 2 \times (I_{\text{smp}} / (I_{\text{smp} + \text{std}} - I_{\text{smp}})) / V_{\text{mix}} [\text{pmol mL}^{-1}] ;$$

avec  $I_{\text{smp}}$  et  $I_{\text{smp} + \text{std}}$  (RLU) les mesures d'intensité lumineuse et  $V_{\text{mix}}$  (mL) le volume utilisé de mélange extractant/échantillon.

On réalise toujours un dosage de l'eau ultrapure utilisée (blanc), et cette valeur est soustraite aux mesures d'ATP des échantillons.

Pour chaque dosage: on réalise 2 dosages d'ATP de l'échantillon (ou mix) et 2 dosages du blanc.

### III.7. Identification des souches cultivées

A partir de cultures de souches pures, l'identification se déroule en plusieurs étapes :

- Extraction de l'ADN génomique.
- Amplification de la séquence 16S pour les bactéries et 26S pour les levures.
- Contrôle de l'ADN extrait (migration sur gel d'agarose et dosage).
- Purification de l'ADN.
- Séquençage.

#### III.7.1. Protocole d'extraction de l'ADN

Le Kit **MoBio Ultraclean** a été utilisé pour l'extraction de l'ADN génomique microbien.

1. Suspendre les colonies dans 300  $\mu$ L de solution tampon **MicroBead** et mélanger au vortex.
2. Transférer la suspension dans un tube **Microbead**.
3. Ajouter 50  $\mu$ L de solution **MD1** dans le tube.
4. Laisser 10 min à 65°C pour permettre une meilleure lyse des cellules.
5. Passer les tubes au BeadBeater pendant 10 min à une fréquence de 20Hz.
6. Transférer dans des tubes de 2 mL et centrifuger à 10000 g pendant 30 s à température ambiante.
7. Transférer le surnageant dans un nouveau tube collecteur 2 mL (entre 300 et 350  $\mu$ L).
8. Ajouter 100  $\mu$ L de solution **MD2** au surnageant. Mélanger au vortex 5 s puis incubé à 4°C pendant 5 min.
9. Centrifuger les tubes pendant 1 min à 10000 g à température ambiante
10. Transférer le surnageant dans un nouveau tube collecteur 2 mL
11. Ajouter 900  $\mu$ L de solution **MD3** et mélanger au vortex 5 s.
12. Prélever 700  $\mu$ L et verser dans un tube **spinfilter**, puis centrifuger les tubes à 10000 g pendant 30 sec à température ambiante. Jeter le liquide qui a traversé et ajouter le surnageant restant dans le spin filter.
13. Ajouter 300  $\mu$ L de solution **MD4** et centrifuger à température ambiante à 10000 g pendant 30 s. Jeter le surnageant.
14. Refaire une centrifugation dans les mêmes conditions pendant une minute pour être sûr d'éliminer tout le surnageant.
15. Placer le **spinfilter** dans un nouveau tube collecteur 2 mL.
16. Ajouter 50  $\mu$ l de solution **MD5** sur la membrane du spinfilter.
17. Centrifuger à température ambiante à 10000 g pendant 30 s.
18. Jeter le spinfilter, conserver les tubes de 2 mL avec l'ADN au congélateur à -40°C.



### III.7.2. Amplification par PCR

#### Préparation PCR :

Avant toute manipulation, placer le matériel et les consommables sous UVgermicide ( $\lambda=245$  nm) pendant 15min.

Composant	Volume ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O	35
Tampon 10x	5
MgCl <sub>2</sub> (1,5mM final)	2,5
dNTP 10mM	1
Primers (10 pmol/ $\mu$ L)	2
Taq BioLine	0,5
DMSO 100%	1
ADN 100ng	1 ou < 1 colonie

Distribuer dans les tubes à PCR pour un volume de 49 $\mu$ L + 1 $\mu$ g d'ADN. Prévoir un tube pour le témoin négatif (eau distillée stérile).

#### Programme PCR :

Bactéries (primers 16S 27f et 1492r) :

95°C (3min)	} 30x
<b>94°C (45sec)</b>	
<b>53°C (45sec)</b>	
<b>72°C (45sec)</b>	
72°C (7min)	
10°C (infini)	

Levures (primers 26S NL1 et NL4) :

95°C (3min)	} 36x
<b>94°C (1min)</b>	
<b>52°C (2min)</b>	
<b>72°C (2min)</b>	
72°C (10min)	
10°C (infini)	

### III.7.3. Migration sur gel et dosage de l'ADN

#### *III.7.3.1. Migration sur gel d'agarose*

Bactéries : gel d'agarose à 0,8% dans tampon TAE 0,5x

	Grand gel (17 puits)	Petit gel (13 puits)
Quantité d'agarose (mg)	240	120
Volume de TAE 0,5x (mL)	30	15
Volume de SyBr Safe 10000x ( $\mu$ L)	3	1,5

Levures : gel d'agarose à 1,5% dans tampon TAE 0,5x

	Grand gel (17 puits)	Petit gel (13 puits)
Quantité d'agarose (mg)	450	225
Volume de TAE 0,5x (mL)	30	15
Volume de SyBr Safe 10000x (µL)	3	1,5

- 5 µL de produit PCR sont ajoutés à 1 µL de colorant bleu dans chaque puit.
- Le 1<sup>er</sup> puits sert à ajouter l'échelle (ladder 1kb) en même quantité que les produits PCR.
- Laisser migrer entre 20 et 25 min à 100 V.
- Eliminer les déchets souillés dans la poubelle BET.

### ***III.7.3.2.Lecture du gel sur l'Imager***

- Allumer PC et démarrer le logiciel d'acquisition.
- Choisir SyBr gold/green.
- Mettre sur lumière UV.
- Preview.
- Temps d'exposition 1sec.
- Capture.
- Nom fichier : date + numéro de souche.

### ***III.7.3.3.Dosage d'ADN***

- Utilisation du Nanodrop en mode [nucleic acid]. Les quantités d'ADN sont mesurées à 260 nm et les quantités de protéines à 280 nm.
- Le rapport 260/280 doit être compris entre 1,8 et 2.
- Avant de faire les mesures, la lentille est nettoyée à l'eau distillée puis un blanc est fait avec de l'eau distillée.
- Les volumes utilisés sont de 2 µL.
- Noter les concentrations ADN en µg/µL et les rapports 260/280 pour tous les échantillons.

### **III.7.4.Purification de l'ADN**

Le kit Qiagen Minelute est utilisé pour l'étape de purification

1. Ajout de 5 volumes de tampon PB pour un volume de produit PCR (ex : 215 µl de tampon pour 43 µl de produit PCR).
2. Transfert sur colonne contenue dans un tube collecteur 2 ml.
3. Centrifuger 1 min à 13000 rpm.
4. Eliminer le liquide contenu dans le fond du tube et remettre la colonne dans le même tube collecteur.
5. Ajouter 750 µl de tampon PE et centrifuger 1 min à 13000 rpm.
6. Eliminer le liquide du fond et centrifuger à nouveau 1 min à 13000 rpm.

7. Placer la colonne dans un nouveau tube eppendorf 1,5 ml.
8. Ajouter 10  $\mu$ l d'eau distillée stérile, laisser reposer 1 min, puis centrifuger 1 min à 13000 r.p.m.
9. Dosage au nanodrop.
10. Dilution pour obtenir une concentration finale à 10 ng/ $\mu$ l.
11. Stokage au congélateur à -25°C en attendant le séquençage.

L'ADN purifié est envoyé en séquençage à la société Eurofins MWG Operon (Eberseberg, Allemagne) ; les résultats du séquençage sont ensuite disponibles en ligne sur leur site web.

**III.8.Publication Delort et al. (2010), Atmospheric Research**



Contents lists available at ScienceDirect

## Atmospheric Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/atmos](http://www.elsevier.com/locate/atmos)

## A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes

Anne-Marie Delort<sup>a,b,\*</sup>, Mickael Vähtilingom<sup>a,e</sup>, Pierre Amato<sup>a,b</sup>, Martine Sancelme<sup>a</sup>,  
Marius Parazols<sup>c,e</sup>, Gilles Mailhot<sup>c,d</sup>, Paolo Laj<sup>e,1</sup>, Laurent Deguillaume<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire SEESIB, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> CNRS, UMR 6504, Laboratoire SEESIB, F-63177 Aubière, France

<sup>c</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>d</sup> CNRS, UMR 6505, Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire, F-63177 Aubière, France

<sup>e</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire de Météorologie Physique, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 November 2009

Received in revised form 5 July 2010

Accepted 6 July 2010

#### Keywords:

Microorganisms

In cloud processes

Atmospheric chemistry

Nucleation processes

### ABSTRACT

Recent studies showed that living microorganisms, including bacteria, fungi and yeasts, are present in the atmospheric water phase (fog and clouds) and their role in chemical processes may have been underestimated. At the interface between atmospheric science and microbiology, information about this field of science suffers from the fact that not all recent findings are efficiently conveyed to both scientific communities. The purpose of this paper is therefore to provide a short overview of recent work linked to living organisms in the atmospheric water phase, from their activation to cloud droplets and ice crystal, to their potential impact on atmospheric chemical processes. This paper is focused on the microorganisms present in clouds and on the role they could play in atmospheric chemistry and nucleation processes. First, the life cycle of microorganisms *via* the atmosphere is examined, including their aerosolization from sources, their integration into clouds and their wet deposition on the ground. Second, special attention is paid to the possible impacts of microorganisms on liquid and ice nucleation processes. Third, a short description of the microorganisms that have been found in clouds and their variability in numbers and diversity is presented, emphasizing some specific characteristics that could favour their occurrence in cloud droplets. In the last section, the potential role of microbial activity as an alternative route to photochemical reaction pathways in cloud chemistry is discussed.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Biological material is ubiquitous in the atmospheric environment. Until recently, most aerobiology studies have focused on pollens and vegetal or animal debris, in particular in relation to public health issues. Biological particles also contain microorganisms (virus, bacteria and fungi), a fraction

of which is able to survive and develop under conditions such as those encountered in the atmosphere. The presence of living organisms has been documented in almost all atmospheric compartments, from indoor air to the stratosphere. While the role of living organisms in biogeochemical cycles is clearly established in soils and waters, much less information is available about their behaviour in the atmosphere, in particular in the atmospheric waters (clouds, rain).

Microorganisms are present in the atmospheric water phase including fogs and clouds (Alfreider et al., 1996; Fuzzi et al., 1997; Sattler et al., 2001; Bauer et al., 2002; Segawa et al., 2005; Amato et al., 2005, 2007b; Ahern et al., 2007; Bowers et al., 2009). It should be stressed that the majority of

\* Corresponding author. Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire SEESIB, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

E-mail address: [A-Marie.Delort@univ-bpclermont.fr](mailto:A-Marie.Delort@univ-bpclermont.fr) (A.-M. Delort).

<sup>1</sup> Present address: Laboratoire de Glaciologie et Géophysique de l'Environnement, Université de Grenoble 1-CNRS, Grenoble, France.

the papers focusing on the microbiological content of the atmosphere has provided a description of the microbial population found in the air (Di Giorgio et al., 1996; Lighthart, 1997; Jones and Harrison, 2004; Fierer et al., 2008; Maron et al., 2005; Brodie et al., 2007; Després et al., 2007; Fröhlich-Nowoisky et al., 2009), while only a few of them discussed about their global distributions and their importance in atmospheric physico-chemical processes. The objective of this paper is to present a short review of our knowledge about the microorganisms present in clouds and their potential role in atmospheric chemistry and nucleation processes.

## 2. Cycling of microorganisms *via* the atmosphere

Microorganisms are ubiquitous on Earth including water, soil and vegetation, and they can experience a life cycle *via* the atmosphere as illustrated in Fig. 1. The first step consists of the aerosolization of microorganisms into the air. During their emission into the atmosphere, microorganisms are subject to a wide range of conditions: from climatic factors (temperature, relative humidity, wind, solar radiation, etc.) to atmospheric composition (trace gases, pH, presence of chemicals, etc.). Their release to the atmosphere depends on the type of surface cover (rural, urban, forest, ocean, etc.) and varies temporally with seasonal and daily periodicities (Lighthart, 1997). The mechanisms involved in these processes remain still poorly known; in the case of water, especially oceans, microorganisms are thought to be emitted by bubble bursting. In an interesting review, Blanchard (1989) reported that bubbles are produced at the surface of the sea by whitecaps and breaking waves and rainfalls. It was

shown under laboratory conditions that the bubbles existing in water volume collect bacteria; when the bubble bursts, the cells are ejected upward with jet drops. Depending on several factors like the size of the drop, the length of the bubble path through the liquid, the hydrophobicity of the cell surface and the chemical composition of the liquid, the concentration of the bacteria within jet drops can be increased by several orders of magnitude compared with their concentration in the bulk liquid. Wind speed has been identified as the major factor responsible for the aerosolization of microorganisms from solid surfaces (soil, vegetation); bacteria are present on soil particles and are lifted by the wind, eventually along with dust (Griffin, 2007). Spores of some fungal conidia can be aerosolized by wind bursts depending on meteorological factors including wind speed, temperature, humidity, etc (Jones and Harrison, 2004). The microorganisms present in the phyllosphere (up to  $10^7$  bacteria per  $\text{cm}^2$  of the leaf surface) are thought to be ejected in the air by the action of wind, under the influence on factors such as humidity and temperature which allow leaves to dry and be fragmented into fine particles (Hirano and Upper, 2000; Morris et al., 2004). Aerosols can also result from the fragmentation of dried biofilms at the surface of leaves on which bacteria are established. Also, rain drops impacting the vegetation are probably responsible for the aerosolization of epiphytic bacteria. Biological emission of virus, fungi and bacteria organisms is very difficult to assess and was considered much lower than other primary aerosol sources. Jaenicke (2005) proposed that the source intensity of the biogenic aerosol in general must be corrected and should be estimated in the same order of magnitude than other major aerosol sources.

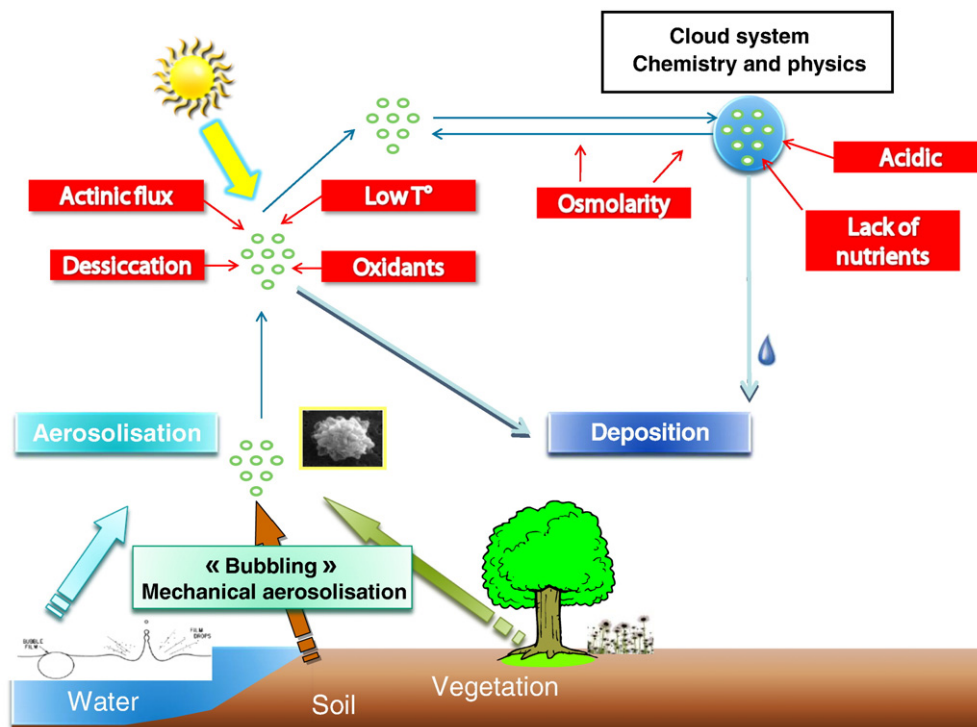


Fig. 1. Schematic representation of the life cycle of microorganisms in the atmosphere, summarizing the factors that likely limit their survival and activity. Adapted from Amato, 2006.

Recently, mechanisms of emission to the atmosphere and estimates of bacteria concentrations for some ecosystems (natural and human-influenced) have been evaluated by Burrows et al. (2009a).

The source origins of bacteria have been discussed by Amato et al. (2007d) for specific conditions observed in cloud at the puy de Dôme. This study suggested that the ocean is an important source of microorganisms and that the microorganisms emitted from seawater could be preferentially included into cloud droplets. This is to be connected to the study of Burrows et al. (2009b) in which the transport of microorganisms in the atmosphere has been simulated with investigations on the factors influencing their residence time including the type of surface of emission, and the CCN (Cloud Condensation Nuclei) and IN (Ice Nuclei) activities.

The variation of microbial abundance in clouds at the puy de Dôme with seasons was also investigated by Amato et al., (2007b,d). A seasonal dependence was observed, with a general increase of the concentrations of cultivable microorganisms and of the total fungal cells during summer and autumn. Additional sources (such as development of vegetation in spring/summer) could also explain the higher concentration of the representatives of epiphytic genera such as *Pseudomonas*. Another hypothesis is linked to the changing atmospheric conditions impacting on the nature of living microorganisms in the atmosphere.

Once aloft, living cells are in fact exposed to hostile conditions including solar radiation (especially UV), desiccation, low temperatures, interactions with oxidants ( $H_2O_2$ ,  $O_3$ ,  $HO^{\bullet}$ , etc.), low nutrient availability, acidity and rapid variations of salinity. So, specific physiological characteristics seem necessary for surviving in the atmosphere. In fact, seasonal dependency of physiologic properties was also found by Amato et al. (2007b) with psychrotolerant microorganisms more numerous during winter than summer at the puy de Dôme station. During summer instead, the proportion of Gram-positive cultivable bacteria (42.1% of the isolates) was lower than that of Gram-negative (57.9% of the isolates). From summer to winter, the relative proportion of each group (Gram-positive and Gram-negative) changed, and the Gram-negative group became dominant. A more detailed analysis of the bacterial composition for the two periods (Fig. 2) showed that the observed difference between winter and summer is in great part the result of a decrease in the proportion of Firmicutes from 21% to 5%, combined with an increase in the proportion of Gamma-Proteobacteria from 8% to 37%. Such a fact can be supported by the higher resistance of Gamma-Proteobacteria to solar radiation.

### 3. Role of microorganisms in cloud droplet and ice crystal activation

Microorganisms can be incorporated into cloud droplets by nucleation processes: by offering a surface condensation to water vapour and acting as CCN (Cloud Condensation Nuclei) or by inducing ice formation and act as IN (Ice Nuclei). First, microorganisms can be considered as CCN, as a particular case of aerosol particles presenting some specific physico-chemical properties due to their biological nature (Ariya et al., 2009). Second, the properties of microorganisms able to initiate the formation of ice (Ice Nucleation Active) concern

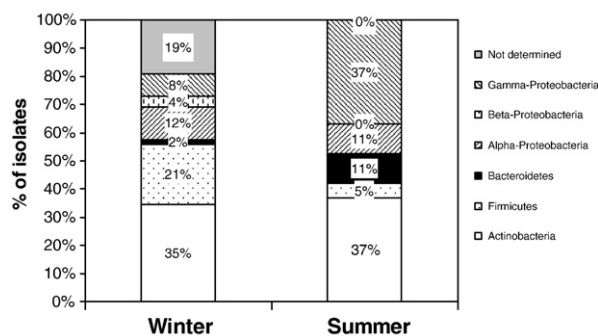


Fig. 2. Typical relative composition of the cultivable bacterial community during winter and summer in cloud water collected at the puy de Dôme (France). Figure from Amato et al. (2007b).

notably bacteria belonging to the genus *Pseudomonas*. The precise mechanisms involved are still under controversy in the scientific community (Möhler et al., 2007; Sun and Ariya 2006).

#### 3.1. Microorganisms as Cloud Condensation Nuclei (CCN)

Bacteria are spherical or rod-shaped particles of 1  $\mu\text{m}$  and as so they can participate in the formation of clouds by offering a surface for the condensation of water vapour when the relative humidity exceeds saturation with respect to the pertinent phase over the particle surface. This kinetic process is controlled by the size, composition and surface properties of the particle (Köhler's theory – Köhler, 1936). Considering bacteria, their surface are characterized by a specific negative charge and hydrophilicity/hydrophobicity balance which depends on the strain. Even the small presence of a hygroscopically active material onto the particle surface can substantially increase its ability to activate to cloud droplets. For instance, the presence of lipopolysaccharides or the production of EPS (ExoPolymeric Substances) composed of polysaccharidic and proteic structures can enhance the hydrophilicity of the cell surface and thus its "wettability" and hygroscopy. These bacterial surface properties are important considering the processes of CCN activation as it was shown that the critical supersaturation (RH-100%), the hygroscopicity and the dry diameter of the particles are correlated (Möhler et al., 2007; Petters and Kreidenweis, 2007). Only a few papers reported experimental data using bacterial cells. A fairly large fraction of bacterial strains of the phyllosphere belonging to the *Erwinia carotovora* species was shown to be activated at 1% supersaturation (Franc and DeMott, 1998). Bauer et al. (2003) found that *Micrococcus agilis*, *Mycoplana bullata* or *Brevundimonas diminuta* were activated at <0.1% supersaturation.

These experiments showed that the results obtained for bacteria are highly variable and depend on the surface properties of these organisms but they are consistent with values expected for the aerosol particle of the same size (around 1  $\mu\text{m}$ ) (Möhler et al., 2007). However, extrapolating such data to natural conditions remains a challenge.

In addition to the direct role that microorganisms could play as bioaerosols, they could also contribute or modify the formation of CCN by producing organic compounds that will

enhance the formation of cloud droplets. This is the case of biosurfactants, produced by many microorganisms which can modify very efficiently surface tension due to their amphiphilic nature. Organic surfactants present in droplet solutions can lower surface tension and lead to a significant decrease of critical supersaturations when present in sufficient quantities (Prisle et al., 2009). Examples of microbial biosurfactant structures are presented in Fig. 3. Very recently, Ekström et al. (2009) suggested the presence of bioaerosols in the atmosphere sampled at different locations. These biosurfactants could be emitted by microorganisms present at the Earth's surface or directly in cloud water. Ahern et al. (2007) showed that 70 fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from Hebridean cloud and rain samples were biosurfactant producers.

Various strains of *Pseudomonas*, *Rhodococcus* and *Bacillus* producing biosurfactants, were also found in cloud water sampled at the puy de Dôme station (unpublished results). Other compounds could also play a role in the CCN formation such as organic acids, sugars, and polysaccharides (Ariya et al., 2009).

### 3.2. Microorganisms as Ice Nuclei (IN)

The history of the ice nucleation activity of bacteria started with the pioneering work of Soulage in 1957 who found bacteria cells in ice crystals and that of Vali et al. (1976) who made a link between ice nucleation processes and epiphytic bacteria. It was understood later that the bacteria living on the

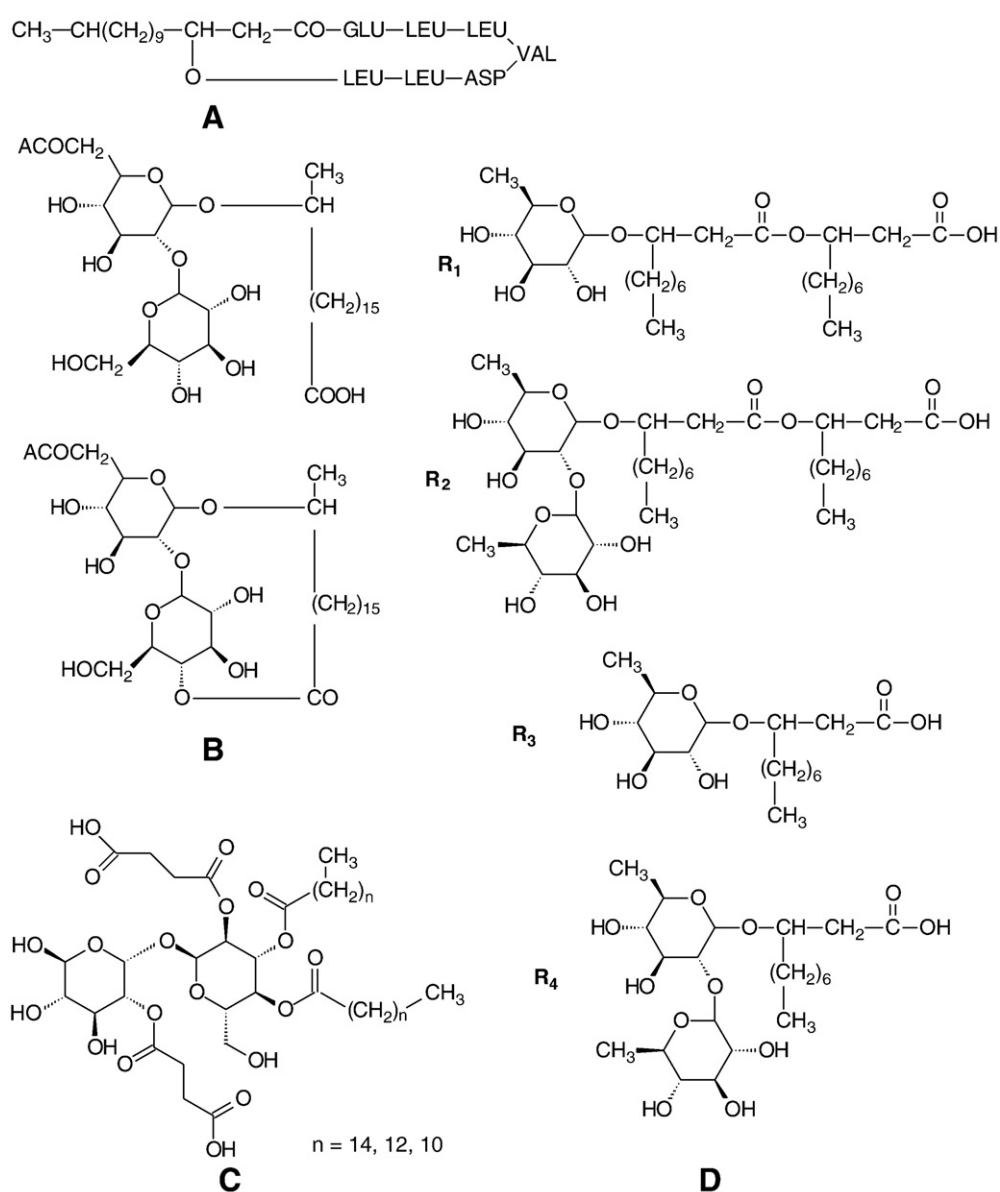


Fig. 3. Molecular structure of some biosurfactants (A) surfactin produced by *Bacillus subtilis*, (B) sophorolipids produced by *Candida bombicola*, (C) succinoyl-trehalose lipid produced by *Rhodococcus erythropolis*, (D) rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*.



surface of leaves (mainly *Pseudomonas*, and more particularly *Pseudomonas syringae*), were responsible for inducing ice nucleation at a temperature warmer than the usual (see for review Morris et al., 2004; Hirano and Upper, 2000; Möhler et al., 2007). Indeed, laboratory experiments showed, using cultured bacteria that ice formation in pure water could occur at  $T \geq -10$  °C instead of  $-39$  °C for homogeneous ice nucleation processes. In parallel, biologists showed that the same type of bacteria is damaging plants by freezing plant leaves. In some cases, ice nucleation occurred at  $-2$  °C which was a several degrees warmer than for other ice nuclei such as silver iodide ( $-5$  °C) under the same conditions. In addition to *P. syringae*, some other bacteria from the phyllosphere were shown to be INA (Ice Nucleation Active) bacteria, including *P. fluorescens*, *P. viriflava*, *Pantoea agglomerans* (former called *Erwinia herbicola*) and *Xanthomonas campestris*. Also the phytopathogen fungi of the genus *Fusarium* can exhibit IN properties. The development of molecular biology and biochemistry tools allowed understanding the molecular basis of the ice nucleation activity in bacteria: IN is due to the expression of a protein of 150 to 180 kD anchored on the outer part of the cell membrane (and thus exposed to the extracellular medium). This protein (INP) acts as a template for ice formation by orienting water molecules at the surface of the cell. The amount and type of anchor of the INA proteins forming aggregates in the membrane can modulate the freezing efficiency: Bacterial ice nucleation efficiency has been classified into three groups according to the temperature of freezing: Type I ( $-5$  °C  $\geq T^{\circ} \geq -2$  °C), Type II ( $-7$  °C  $\geq T^{\circ} \geq -5$  °C) and Type III ( $T^{\circ} \leq -7$  °C) (Morris et al., 2004). It was also demonstrated that the purified protein can initiate ice nucleation but in a less efficient way that embedded in the membrane of bacteria.

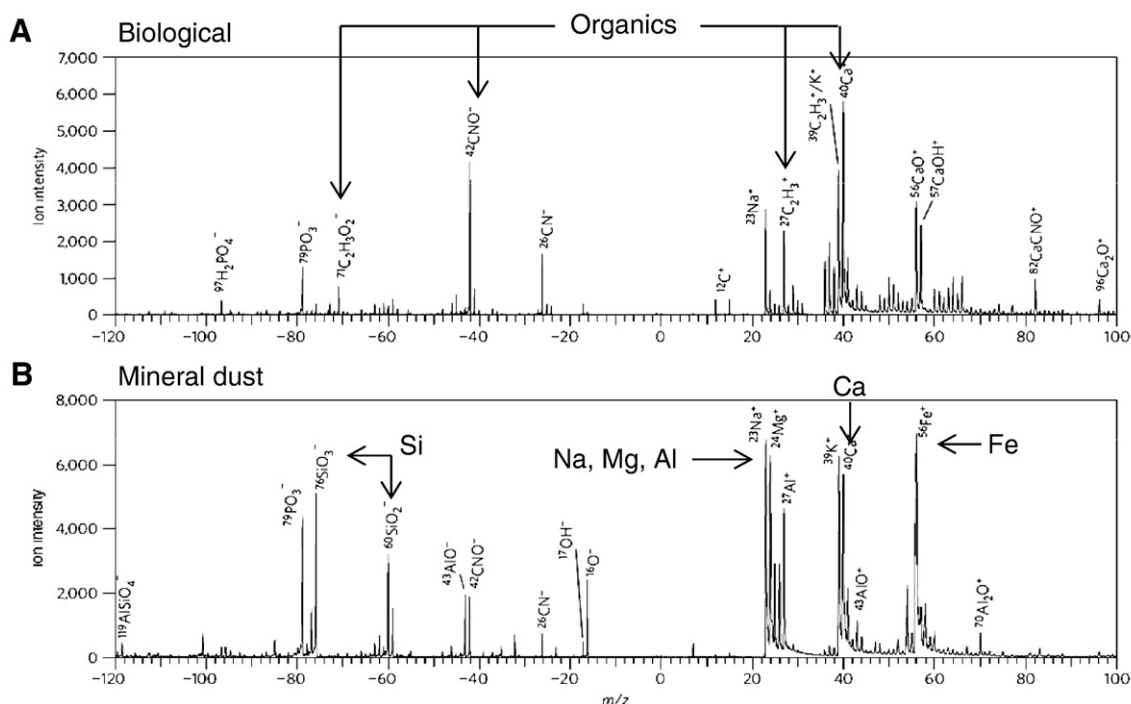
Although the molecular basis of ice nucleation activity is now established, the main question remains: do these bacteria really play a role in atmospheric microphysics, i.e. in cloud and precipitation formation? To answer this question, scientists have tested different strategies.

The first strategy is based in creating “artificial clouds” using bacterial isolate sprays and observing the formation of ice crystals. Some experiments were conducted with the commercial product Snomax™ derived from *P. syringae*, largely used in ski resorts to make artificial snow. Simulations of cloud forming conditions were carried out in a cloud chamber at Colorado State University (Ward and DeMott, 1989) as well as in the AIDA (Aerosol Interaction and Dynamics in the Atmosphere) chamber in Karlsruhe (Möhler et al., 2008). A droplet fall tower experiment was also conducted at the University of Washington (Wood et al., 2002). Results obtained with Snomax™ in these three installations were in good agreement: strong ice nucleation efficiency was found between  $-7$  and  $-9$  °C, a few % of the cells were active around  $-5$  °C. However, experiments performed with five different *P. syringae*, *P. viriflava* and *E. herbicola* bacterial species in the AIDA facility (Möhler et al., 2008) showed only ice nucleation activity at temperatures between  $-7$  and  $-11$  °C with an ice nucleation active fraction of about one nucleus for every  $10^4$  cells. It can be noticed in these experiments that bacterial cells first acted as CCN, then induced freezing. However we should not conclude that bacterial cells are not candidates for IN processes. In particular, it was shown that INA protein expression is very dependant on

bacterial metabolism, culture medium, growth phase, bacterial genome, bacterial origin, etc. (Morris et al., 2004); therefore many parameters must be tested before final conclusions.

The second strategy is not based on laboratory experiments but on the direct study of cloud and precipitation samples. The idea is to look at the presence of INA bacteria in these natural environments, especially in remote places far from agricultural contexts; and thus to track dissemination of bacteria via the water cycle. Ahern et al. (2007) did not find any IN gene or activity in any of the numerous isolates of *Pseudomonas* using both PCR and DSC (Differential Scanning Calorimetry) in Hebridean cloud and rainwater. Also Junge and Swanson (2008) did not detect any INA in several representative Arctic and Antarctic sea-ice bacterial isolates using a free-fall freezing tube technique; this study was carried out to support the role that marine psychro-active bacteria could play in the formation of sea-ice and ice in polar clouds. However, positive results were obtained with cloud water isolates sampled from the puy de Dôme summit. Indeed our group found two cultivable microbial strains of *Fusarium avenaceum* and *Pseudomonas pv atropurpurea* with ice nucleation activity at  $-5$  °C and  $-6$  °C respectively using immersion freezing testing (unpublished data). Bowers et al. (2009) compared total microbial and IN counts in clear air, cloudy air and snow samples collected in Colorado. They showed that for similar abundances within these samples, the number of IN was increasing with relative humidity. Also the microbial communities were quite different in the air compared to snow. Surprisingly the abundance of *Pseudomonads* (known for its INA properties) in all samples was very low. However, the genus *Psychrobacter* was one of the dominant groups and it was shown that some isolates of this genus could be INA bacteria (Ponder et al., 2005). Even though these results were found using molecular tools and that no test on cultivated bacteria could be made, these results demonstrate the presence of INA bacteria in the atmosphere. Very interesting results were obtained by Christner et al. (2008a,b) who examined the concentration and nature of IN over a large number of rain and snow samples collected in various locations: Montana and Louisiana (USA), the Alps and Pyrenees (France), Ross Island (Antarctica) and Yukon (Canada). They found that half of the samples were ice nucleation active at temperatures  $-5$  °C based on an immersion freezing test. In addition, they showed the influence of geographic, seasonal and precipitation chemistry on IN abundance and activity. To prove the biological, and more precisely the bacterial and/or proteinaceous, nature of these ice nuclei, samples were treated with lysozyme (enzyme that hydrolyses the bacterial cell wall) or by heat (denaturation of all proteins). These treatments greatly reduced the amount of INA in all samples demonstrating their biological and bacterial nature.

Pratt et al. (2009) detected *in situ* biological particles in ice crystals in clouds sampled by aircraft at a high altitude in Wyoming (7 to 8 km;  $T^{\circ} -31$  to  $-34$  °C). The chemical composition of individual CVI (Counterflow Virtual Impactor) ice residual particles was measured by A-ATOFMS (Aircraft Aerosol Time of Flight Mass Spectrometry). This technique allowed to record the representative mass spectra of biological (Fig. 4A) and dust particles (Fig. 4B) which can be differentiated by the presence of some specific ions:



**Fig. 4.** Mass spectra of individual CVI (Counterflow Virtual Impactor) residual particles measured by A-ATOFMS (Aircraft Aerosol Time of Flight Mass Spectrometry). A) Biological particles. B) Mineral dust particles. Figure adapted from Pratt et al. (2009).

phosphorus and organics ions can be considered as a biological signature while silicon, sodium, calcium, magnesium and iron ions are of mineral origin. Biological particles accounted for 33% of the residues and mineral dust particles for 55%. In addition, the spectra of the biological aerosols were rather close to those measured on *P. syringae*. This is consistent with the presence of bacterial cells in cloud ice crystals present at a high altitude.

Finally, in order to quantify the actual role of microorganisms as IN, the experimental data obtained with INA bacteria need to be considered in cloud process models that simulate mixed-phase clouds (Leroy et al., 2006; Phillips et al., 2007). The objective is to consider in numerical models the activation of microorganisms into ice crystals through parameterizations that are developed based on laboratory investigations. The study carried out by Levin et al. (1987) was the first to evaluate biological particles as effective immersion IN that can freeze larger droplets. They used a time dependent one and a half dimensional model that treats cloud microphysics in detail, but assumes a constant cloud radius and allows entrainment. When they considered the data of biogenic ice nucleation from their laboratory study, their simulations resulted in even larger amounts of rain on the ground. Larger scale models that couple emissions, transports and microphysical processes of microorganisms should be developed on the basis of *in situ* measurements (quantifications and characterization of sources), of laboratory investigations (which microorganisms are efficient IN?) and results obtained with the cloud process model (development of parameterizations for IN activity of microorganisms). Recent simulations from Phillips et al. (2009) were performed with an aerosol-cloud model that doubles moment bulk microphysics for a

month-long period of summertime convective activity over Oklahoma. This study is the first attempt at evaluating the impacts from biological aerosols on mesoscale cloud and demonstrated that INA bacteria modify the extent and properties of clouds. Very recently, Hoose et al. (2010) reported that the role of bacterial IN in inducing precipitation is likely negligible on the global scale, but may impact the behaviour of clouds on the local scale.

#### 4. Microorganisms in clouds

##### 4.1. Number, activity and type of microorganisms

Table 1 summarizes some of the major sampling sites where the numbers of microorganisms were determined for cloud water and rainwater. This is very heterogenic and strongly depends on a wide range of factors listed in the introduction. Total bacterial concentration in atmospheric waters varies from  $10^3$  to  $10^5$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ; this is basically decreasing with increasing altitude. In cloud water, the concentration of fungi and yeasts is one order of magnitude lower than that of bacteria ( $10^2$  to  $10^4$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ); however, the difference in size between eukaryotic cells and bacteria (the former being in general about 10 times larger) results in equivalent biomasses.

Less than 1% of the bacteria and less than 50% of the fungi and yeasts collected from clouds sampled at the puy de Dôme station could be cultivated in non selective media. However, it was shown by the measures of the concentration in adenosine triphosphate (ATP) in cloud samples that a large majority of the cells counted by microscopy were likely alive (Amato et al., 2007d).

**Table 1**  
Concentrations of microorganisms in atmospheric water samples.

Localization	Type of atmospheric water sample	Concentration of bacteria	Concentration of fungi and yeasts	References
puy de Dôme mountain – France 1464 m.a.s.l.	Cloud	$1.7 \times 10^4$ – $2.4 \times 10^5$ mL <sup>-1</sup> §	$8.9 \times 10^2$ – $2.5 \times 10^4$ mL <sup>-1</sup> §	Amato et al., 2007d
Rax mountain – Austria 1644 m.a.s.l.	Cloud	$2 \times 10^4$ mL <sup>-1</sup> +	$5.9 \times 10^3$ mL <sup>-1</sup> +	Bauer et al., 2002, 2003
Sonnblick mountain – Austria, 3106 m.a.s.l.	Cloud	$1.5 \times 10^3$ mL <sup>-1</sup> §	/	Sattler et al., 2001
Kleiner Feldberg mountain – Germany, 857 m.a.s.l.	Cloud	$1.05 \times 10^8$ mL <sup>-1</sup> <sup>a</sup>	/	Matthias-Maser et al., 2000
Po valley – Italy	Fog	$3.57 \times 10^3$ mL <sup>-1</sup> <sup>a</sup>	$30$ – $60$ mL <sup>-1</sup> <sup>b</sup>	Fuzzi et al., 1997
Shizuoka and Tsukuba – Japan	Rain	$30$ – $150$ mL <sup>-1</sup> <sup>b</sup>	/	Casareto et al., 1996
Charlottesville – Virginia, USA	Rain	$1.6 \times 10^4$ – $2.4 \times 10^4$ mL <sup>-1</sup> <sup>a</sup>	$2 \times 10^5$ – $6 \times 10^5$ mL <sup>-1</sup> <sup>a</sup>	Herlihy et al., 1987

<sup>a</sup> Total number of Primary Biological Aerosol Particle (PBAP).

<sup>b</sup> CFU (colony forming units), i.e. cultivable microorganisms.

<sup>+</sup> Average from 3 cloud events.

<sup>§</sup> Average from 12 cloud events.

<sup>§</sup> Average from 14 cloud events.

So far, very few data have provided a detailed description of the microbial species found in water droplets. Three studies reported the identification of cultivable microorganisms: Fuzzi et al. (1997) reported the presence of three bacterial genera including *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Acinetobacter* in fog droplets sampled in the Pô Valley, an area highly polluted by industrial activities. Amato et al. (2005, 2007b) observed a more diversified population distributed among various phyla or sub-phyla (*Alpha*-, *Beta*- and *Gamma*-*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Firmicutes*), and belonging mainly to the genera *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* and *Arthrobacter*. They also found an important diversity among various fungal phyla (*Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Deuteromycota*). Only one paper reports the description of a bacterial population present in clouds collected in Scotland using direct analysis of DNA by PCR (polymerase chain reaction) amplification and cloning the 16 S rDNA genes. They found many strains belonging to the *Pseudomonas* and *Acinetobacter* genera (Ahern et al., 2007).

#### 4.2. Some specificities for living in clouds

Concerning cloud water, Amato et al. (2007b) observed that about half of the isolated microorganisms (20 over 40 tested isolates) was able to develop at a low temperature (5 °C). It included Gram-negative bacteria, among which some of them were psychrophiles (faster growth at 5 °C than at 17 °C or 27 °C). Sattler et al. (2001) showed that microorganisms could develop in cloud water at 0 °C. The presence of microorganisms active at low temperatures encountered in clouds is not surprising since psychrophilic microbial strains have been recovered and demonstrated to be active in many cold environments like glacier, polar snow and ice, permafrost (Carpenter et al., 2000; Christner et al., 2001, 2003; Junge et al., 2004; Foght et al., 2004; Groudieva et al., 2004; Amato et al., 2007a; Steven et al., 2006).

In these studies, many pigmented bacteria (about 60% of the cultivated fraction) were observed in cloud water (Amato et al., 2005; 2007b). Red, orange and yellow pigments are

probably carotenoids and could protect organisms in the atmosphere: first, it was shown that pigmented bacteria were more hydrophobic and better aerosolized than non pigmented bacteria (Blanchard, 1989). Second, the fluidity of the membranes was increased by the presence of such pigments and this balanced the low temperature effects; pigmented microorganisms have notably been isolated from polar areas (Fong et al., 2001; Mueller et al., 2005). They are also known to protect cells against free radicals (Gourmelon et al., 1994) and low osmotic pressures (Fong et al., 2001). Interestingly, these pigments are also present in bacteria exposed to UV light on the plant leaf surface and they are “prepared” to cloud conditions.

Finally, spore forming microorganisms have been found in a large number in the atmosphere: Elbert et al. (2007) and Heald and Spracklen (2009) estimate the spore concentrations from  $10^4$  to  $10^6$  m<sup>-3</sup> with a huge spatial and temporal variability. Elbert et al. (2007), based on measurements in the Amazon region, attributed an average of 35% of the total aerosol mass to be fungal spores. At a continental background site in the Austrian Alps, Bauer et al. (2002) quantified biological components in atmospheric samples and estimated that bacteria contributed to 0.03% and fungal spores 0.9% of the total OC (Organic Carbon) mass. However, at a suburban site, Bauer et al. (2008) showed that the contribution of fungal spores to OC was 6% and 14% of the OC mass concentration observed in spring and summer, respectively. More recently, Huffman et al. (2010) used an ultraviolet aerodynamic particle sizer (UV-APS) to measure the concentrations of biological particle and size distribution in the air in Central Europe. They found a peak of abundance at around 3 μm corresponding to fungal spores or agglomerated bacteria; this peak exhibited a low absolute concentration ( $<2.10^{-3}$  cm<sup>-1</sup>). In addition, there was a pronounced diel cycle (24-h) in the abundance of bioaerosols in the air, with a maximum intensity during early/mid morning. In cloud and fog water, yeast and fungi as well as spore forming bacteria such as *Bacillus* strains have been found in a relatively higher concentration when the water pH was lower (Fuzzi et al., 1997; Amato et al., 2005). One of the reasons could be a

selection of the resistant forms, i.e. the spores, by the hostile conditions encountered in the atmosphere under an anthropogenic influence.

## 5. Role of microorganisms in atmospheric chemistry

The detection of microorganisms in cloud water raised a fundamental and innovative scientific question brought to attention very recently by Ariya et al. (Ariya et al., 2002; Ariya and Amyot, 2004; Côté et al., 2008), Amato et al. (Amato et al., 2005, 2007c; Vaitilingom et al., 2010) and Deguillaume et al., 2008: do microorganisms play a role in atmospheric chemistry? Since cloud droplets are a liquid solution which contains carbon and nitrogen sources, it could be thus a privileged medium for microbial activity in the atmosphere.

### 5.1. Biotransformation of organic compounds by microorganisms isolated from the atmosphere

A few research groups have investigated the enzymatic potential of microorganisms isolated from the atmosphere to biotransform organic compounds of the atmosphere water phase. In cloud water, the more remarkable point is the high concentration of carboxylic acids and aldehydes with a short carbonaceous chain of which concentrations can reach more than  $1 \text{ mg L}^{-1}$  (Marinoni et al., 2004). Carboxylic acids are produced by the oxidation of the organic matter in clouds (Herrmann et al., 2005). They contribute to the acidification of the aqueous phase and this in cloud organic mass production by oxidation processes represents a new route for Secondary Organic Aerosol (SOA) formation (Blando and Turpin, 2000). Therefore, these latter compounds have been chosen for biodegradation studies.

The first study showing a possible impact of microorganisms on atmospheric multiphase chemistry was the degradation of formic and acetic acids by bacteria from rainwater (Herlihy et al., 1987). Ariya and collaborators isolated fungal strains of *Geotrichum*, *Penicillium*, *Eupenicillium* and *Thysanophora* from air samples and showed that four of these strains rapidly degraded some of the major dicarboxylic acids of the atmospheric aqueous phase. This included malonic, succinic, glutaric, adipic, pimelic, oxalic and pinic acids (Ariya et al., 2002; Côté et al., 2008). Amato et al. (2005, 2007c) showed that most of the bacterial strains isolated from cloud water sampled at the puy de Dôme Mountain had the enzymatic equipment necessary for degrading monoacid and diacid compounds (acetic, lactic, formic and succinic acids) as well as formaldehyde and methanol. Those compounds are present in relatively large concentrations in cloud water (Marinoni et al., 2004) and play a major role in atmospheric chemistry (Ervens et al., 2005).

### 5.2. Comparison between biological pathways and photochemical reaction pathways

Solar light is considered as the predominant catalyser for chemical reactions occurring in the atmosphere, so called photochemistry. It induces the formation of free radicals, like  $\text{HO}^\bullet$  and  $\text{HO}_2^\bullet$ , which mainly result from the presence of hydrogen peroxide  $\text{H}_2\text{O}_2$ . They at their turn oxidize organic compounds, notably those emitted by human activities.

Hydrocarbons are oxidized into alcohols, aldehydes, carboxylic acids and, as a final step, into  $\text{CO}_2$ . Oxygen, metals (especially iron) and ions like nitrate and chloride also contribute to the oxidation of organic compounds in the atmosphere.

Most of the intermediate photoproducts are very similar to metabolites produced by microorganisms. This is depicted in Fig. 5 with the degradation of lactic acid by photo- and biodegradation (Amato et al., 2007d; Parazols, 2007). In the two processes, acetic and pyruvic acids are formed via the degradation of lactic acid. Methylglyoxal can only result from biological degradation of lactic acid, but not from its photochemical transformation, which leads instead to the formation of pyruvic acid. The main differences observed between photo and biodegradation are i) the reversibility of some biologically driven reactions and ii) the stoichiometry of the by-products: in biodegradation processes the main intermediate is pyruvic acid, while photochemical processes mainly involve acetic acid as intermediate species, iii) contrary to photochemical reactions, enzymatic reactions depend on the chirality of the substrates, for instance different enzymes are involved in the transformation of L and D lactate. The similarity of by-products is not only observed with the degradation of lactic acid but can be generalised to other carboxylic acids found in the cloud aqueous phase of the atmosphere. Hence, this raises the question: does microbial degradation of organic compounds compete with radical chemistry (photochemistry) in cloud water? To answer this problem, two different approaches are currently in progress.

The first consists of comparing experimentally the chemical and biological kinetic constants measured under bulk conditions and estimating the corresponding lifetimes of the studied compounds (Table 2). Ariya et al. (2002), while studying the degradation of dicarboxylic acids by *Geotrichum* sp. isolated from air samples, showed that most of the lifetimes related to biodegradation were comparable to the lifetimes related to the presence of  $\text{HO}^\bullet$ ; these were much shorter than other major atmospheric oxidants such as  $\text{O}_3$  and  $\text{HO}_2^\bullet$  (Table 2). Vaitilingom et al. (2010) measured the biodegradation rates at  $5^\circ\text{C}$  of acetic, formic, and succinic acids by *Pseudomonas graminis* isolated from cloud water. Biodegradation related lifetimes were compared with the reactions taking place in clouds during daytime and night, involving the presence of  $\text{OH}^\bullet + \text{NO}_3^\bullet$  and of  $\text{NO}_3^\bullet$ , respectively. This showed that although photochemistry is the most efficient process during daytime, microorganisms could be driving the reactivity of cloud water at night (Table 2). For instance *P. graminis* degraded formic acid about ten times faster than  $\text{NO}_3^\bullet$  and fifty times slower than  $\text{HO}^\bullet$ . The results obtained for *Geotrichum* sp and *P. graminis* were consistent with each other, with estimated lifetimes in the range of a few days.

The second approach is part of a long-term strategy, but seems actually to be the method that will allow evaluating the impact of the microbiological process in cloud chemistry. The idea is to introduce both biological and radical reactions into numerical models and perform sensitivity tests on different parameters such as metabolic kinetic constants, number of cells, temperature, pH, light flux, etc. Cloud chemistry models take into account the exchanges existing between the interstitial phases (gases and particles) and cloud droplets and crystals (Leriche et al., 2007; Long et al., 2010). Numerous simulations

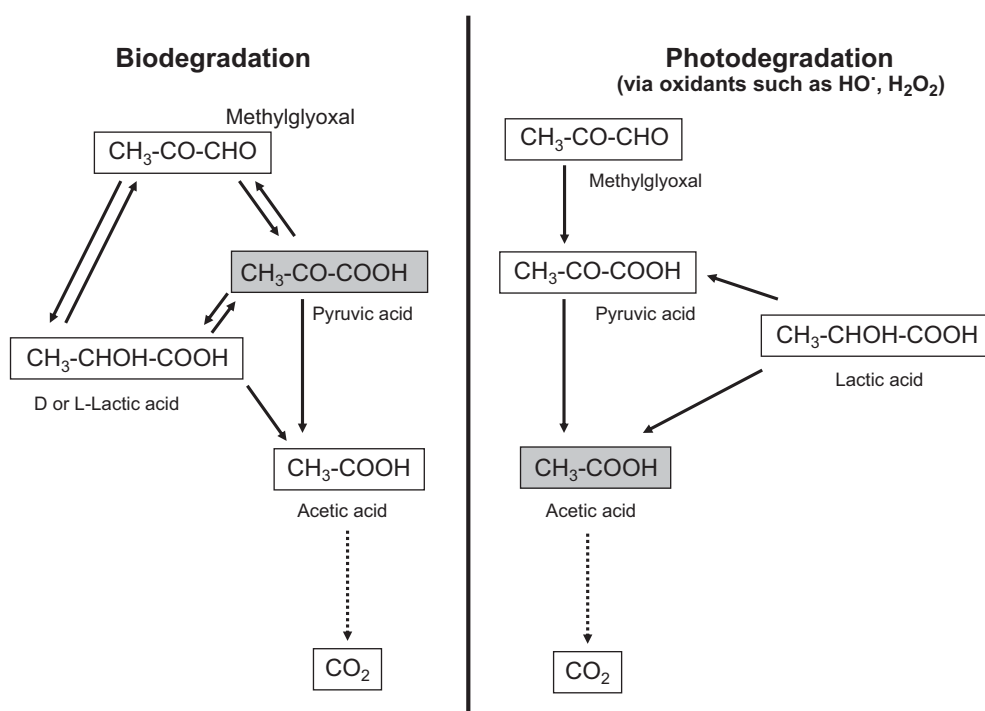


Fig. 5. Comparison of the photochemical and biochemical degradation pathways of lactic acid. Grey squares indicate the main intermediates observed under laboratory conditions (Data from Amato et al., 2007c; Parazols 2007).

under various environmental conditions (different cloud types, air-masses, meteorological conditions, seasons, etc.) will be required in order to evaluate the relative contribution of microbial activity and photochemical pathways.

## 6. Perspectives

The atmospheric life cycle of microorganisms has been under the scope of numerous recent studies. It appears that the characterization of the sources and strengths of airborne microorganisms would be useful notably for the numeric investigations of their dissemination. A major limitation in proposing reliable fluxes is linked to limited understanding of emission mechanisms and the effect of meteorological variables (Jones and Harrison, 2004; Burrows et al., 2009a). These should be studied in more detail in order to build inventories of the emission of airborne microorganisms.

Because clouds offer very specific living conditions in the atmosphere, a number of recent studies have investigated the behaviour of microorganisms in cloud water. Again, many questions remain unanswered and would be investigated in the future. Additional information is needed to better characterize the microbial population in clouds and precipitations. Up to now only a few samples have been analyzed, and the choice of the methods used can be discussed: i) On the one hand, molecular tools avoid culture problems and are thought to provide a better view of the actual biodiversity existing in a sample. A great number of techniques are now available (DNA/RNA isolation, PCR, ARDRA, T-RFLP, RISA, qPCR, etc.) (for review see Georgakopoulos et al., 2009). Nevertheless, even molecular technologies cannot describe all the species: because of the very low concentration of microorganisms in atmospheric waters, a large number of PCR cycles are needed to amplify DNA and false positive can occur or minor groups

Table 2

Estimated lifetimes of some organic acids in cloud water, considering rates of degradation related to the presence of either  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{O}_3$  or of microorganisms. Data are adapted from Ariya et al., 2002<sup>(a)</sup> or Vaitilingom et al., 2010<sup>(b)</sup>.

Organic acid	Estimated lifetime (days)					
	$\text{NO}_3^-$	$\text{HO}^\bullet$	$\text{HO}_2^\bullet$	$\text{O}_3$	<i>Geotricum</i> sp	<i>Pseudomonas graminis</i>
• Malonic acid	–	<sup>a</sup> 6–24	<sup>a</sup> >643	<sup>a</sup> $2.1 \times 10^3$	<sup>a</sup> 1.5	–
• Glutaric acid	–	<sup>a</sup> 1.3–5.2	–	<sup>a</sup> $8.9 \times 10^6$	<sup>a</sup> 5.0	–
• Adipic acid	–	<sup>a</sup> 0.1–0.4	–	<sup>a</sup> $6.8 \times 10^6$	<sup>a</sup> 2.0	–
• Pimelic acid	–	<sup>a</sup> 0.03–0.12	–	<sup>a</sup> $2.6 \times 10^6$	<sup>a</sup> 3.5,0	–
• Pinic acid	–	–	–	<sup>a</sup> $4.6 \times 10^5$	<sup>a</sup> 4.0	–
• Succinic acid	<sup>b</sup> 14.0	<sup>a</sup> 3–12/ <sup>b</sup> 0.3	<sup>a</sup> >771	<sup>a</sup> $17.3 \times 10^6$	<sup>a</sup> 10.0	<sup>b</sup> 1.5
• Formic acid	<sup>b</sup> 18.7	<sup>b</sup> 0.04	–	–	–	<sup>b</sup> 2.0
• Acetic acid	<sup>b</sup> 665.2	<sup>b</sup> 2.1	–	–	–	<sup>b</sup> 69.1



cannot be detected. ii) On the other hand, cultivable bacteria represent less than 1% of the total population but the viability of the isolates in the atmospheric environment is indubitable. In addition, isolated strains can be used for laboratory investigations. In conclusion, both approaches (culture and molecular) are complementary and should be used in parallel. These combined approaches notably allowed the detection of two separate clusters of *Pseudomonads* in cloud water samples (Georgakopoulos et al., 2009).

More experiments should be performed in laboratories with a great variety of microbial isolates from clouds to get qualitative and quantitative data. Concerning atmospheric chemistry, biodegradation (and photodegradation) pathways and kinetic constants must be investigated under conditions closer to cloud conditions, for instance using real cloud water. For nucleation processes, basic knowledge is needed to understand the relationships between: i) the bacterial surface hygroscopy and CCN properties, ii) the conditions of bacterial IN protein expression and nucleation properties, and iii) the production of bacterial metabolites (biosurfactants, saccharides, and alcohols) and aerosol properties. More generally, there is a current need for characterizing bioaerosol particles using various methods; these have been reviewed by Georgakopoulos et al. (2009) and Ariya et al. (2009).

The main issue for evaluating the influence of microorganisms in atmospheric physico-chemical processes is actually the practical impossibility to describe the exact physiology and metabolism of microorganisms *in situ*, i.e. while they are in clouds. There is also an extreme difficulty to reproduce a cloud environment under laboratory conditions, so most of the work that has been done so far is based on bulk conditions, which are very far from being realistic because: i) multiphase systems (solid/liquid/gas) are in constant exchange and ii) microbial population and physical and chemical conditions are different from one cloud event to another. Numeric models developed to study physical and chemical processes within clouds need to be improved to consider biological processes in the complex multiphase cloud system. Clearly, this will require improved integration of expertise from different fields of science that have historically been working independently.

## Acknowledgments

This work is supported by the LEFE-CHAT program of the French CNRS, the BIOCLOUD joint CNRS-DFG project and the SO-BEAM program of the French ministry of research. Dr A.-M. Delort is very grateful to the organizing committee for the invitation at the 18th ICNAA in Prague.

## References

- Ahern, H.E., Walsh, K.A., Hill, T.C.J., Moffett, B.F., 2007. Fluorescent pseudomonads isolated from Hebridean cloud and rain water produce biosurfactants. *Biogeosciences* 4, 115–124.
- Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glockner, F.O., Wille, A., Psenner, R., 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (6), 2138–2144.
- Amato, P. 2006. Les communautés microbiennes de l'eau des nuages: implication dans la chimie atmosphérique. PhD thesis, n° D.U. 1712, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Amato, P., Ménager, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., Delort, A.-M., 2005. Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds. *Atmospheric Environment* 39, 4143–4153.
- Amato, P., Hennebelle, R., Magand, O., Sancelme, M., Delort, A.-M., Barbante, C., Boutron, C., Ferrari, C., 2007a. Bacterial characterization of the snow cover at Sptizberg, Svalbard. *FEMS Microbiology Ecology* 59, 255–264.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., Delort, A.-M., 2007b. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures. *FEMS Microbiology Ecology* 59, 242–254.
- Amato, P., Demeer, F., Melauoui, A., Martin-Biesse, A.-S., Sancelme, M., Laj, P., Delort, A.-M., 2007c. A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by micro-organisms. *Atmospheric Chemistry and Physics* 7, 4159–4169.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., Delort, A.-M., 2007d. An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the puy de Dôme (France). *Atmospheric Environment* 41, 8253–8263.
- Ariya, P.A., Amyot, M., 2004. New directions: the role of bioaerosols in atmospheric chemistry and physics. *Atmospheric Environment* 38, 1231–1232.
- Ariya, P.A., Nepotchayikh, O., Ignatova, O., Amyot, M., 2002. Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. *Geophysical Research Letters* 29, 2077–2080.
- Ariya, P., Sun, J., Eltouny, N., Hudson, E., Hayes, C., Kos, G., 2009. Physical and chemical characterization of bioaerosols— implications for nucleation processes. *International Review of Physiology and Chemistry* 28, 1–32. doi:10.1080/01442350802597438.
- Bauer, H., Kasper-Giebl, A., Loflund, M., Giebl, H., Hitenberger, R., Zibuschka, F., Puxbaum, H., 2002. The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. *Atmospheric Research* 64, 109–119.
- Bauer, H., Giebl, H., Hitenberger, R., Kasper-Giebl, A., Reischl, G., Zibuschka, F., Puxbaum, H., 2003. Airborne bacteria as cloud condensation nuclei. *Journal of Geophysical Research (Atmosphere)* 108 (D21) AAC 2/1-AAC 2/5.
- Bauer, H., Schueller, E., Weinke, G., Berger, A., Hitenberger, R., Marr, I.L., Puxbaum, H., 2008. Significant contributions of fungal spores to the organic carbon and to the aerosol mass balance of the urban atmospheric aerosol. *Atmospheric Environment* 42, 5542–5549.
- Blanchard, D.C., 1989. The ejection of drops from the sea and their enrichment with bacteria and other materials: a review. *Estuaries* 12 (3), 127–137.
- Blando, J.D., Turpin, B.J., 2000. Secondary organic aerosol formation in cloud and fog droplets: a literature evaluation of plausibility. *Atmospheric Environment* 34, 1623–1632.
- Bowers, R.M., Lauber, C.L., Wiedinmyer, C., Hamady, M., Hallar, A.G., Fall, R., Knight, R., Fierer, N., 2009. Characterization of airborne microbial communities at a high-elevation site and their potential to act as atmospheric ice nuclei. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5121–5130.
- Brodie, E.L., DeSantis, T.Z., Moberg Parker, J.P., Zubletta, I.X., Piceno, Y.M., Andersen, G.L., 2007. Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (1), 299–304.
- Burrows, S.M., Elbert, W., Lawrence, M.G., Pöschl, U., 2009a. Bacteria in the global atmosphere — Part 1: review and synthesis of literature data for different ecosystems. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussion* 9 (3), 10777–10827.
- Burrows, S.M., Butler, T., Jöckel, P., Tost, H., Kerkweg, A., Pöschl, U., Lawrence, M.G., 2009b. Bacteria in the global atmosphere — Part 2: modelling of emissions and transport between different ecosystems. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussion* 9 (3), 10829–10881.
- Carpenter, E., Lin, S., Capone, D.G., 2000. Bacterial activity in South Pole. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4514–4517.
- Casareto, B.E., Suzuki, Y., Okada, K., Morita, M., 1996. Biological micro-particles in rain water. *Geophysical Research Letters* 23 (2), 173–176.
- Christner, B.C., Mosley-Thompson, E., Thompson, L.G., Reeve, J.N., 2001. Isolation of bacteria and 16 S rDNAs from Lake Vostok accretion ice. *Environmental Microbiology* 3, 570–577.
- Christner, B.C., Mosley-Thompson, E., Thompson, L.G., Reeve, J.N., 2003. Bacterial recovery from ancient glacial ice. *Environmental Microbiology* 5, 433–436.
- Christner, B.C., Cai, R., Morris, C., Mc Carter, K.S., Foreman, C.M., Skidemore, M.L., Montross, S.N., Sands, D.C., 2008a. Geographic, seasonal, and precipitation chemistry influence on the abundance and activity of biological ice nucleators in rain and snow. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 105, 18854–18859.
- Christner, B.C., Morris, C., Foreman, C.M., Cai, R., Sands, D.C., 2008b. Ubiquity of Biological Ice Nucleators in Snowfall. *Science* 319 (5867), 1214.
- Côté, V., Kos, G., Mortazavi, R., Ariya, P.A., 2008. Microbial and “de novo” transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi. *The Science of the Total Environment* 390 (2–3), 530–537.
- Deguillaume, L., Leriche, M., Amato, P., Ariya, P.A., Delort, A.-M., Pöschl, U., Chaumerliac, N., Bauer, H., Flossmann, A.I., Morris, C.E., 2008.

- Microbiology and atmospheric processes: chemical interactions of primary biological aerosols. *Biogeosciences* 5, 1073–1084.
- Després, V.R., Nowojsky, J.F., Klose, M., Conra, R., Andreae, M.O., Pöschl, U., 2007. Characterization of primary biogenic aerosol particles in urban, rural, and high-alpine air by DNA sequence and restriction fragment analysis of ribosomal RNA genes. *Biogeosciences* 4, 1127–1141.
- Di Giorgio, C., Krempff, A., Guiraud, H., Binder, P., Turet, C., Dumenil, G., 1996. Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseille. *Atmospheric Environment* 30 (1), 155–160.
- Ekström, S., Nozière, B., Hultberg, M., Alsberg, T., Magnér, J., Nilsson, E.D., Artaxo, P.A., 2009. Possible role of ground-based microorganisms on cloud formation in the atmosphere. Submitted to *Biogeosciences*.
- Elbert, W., Taylor, P.E., Andreae, M.O., Pöschl, U., 2007. Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions. *Atmospheric Chemistry and Physics* 7, 4569–4588.
- Ervens, B., Feingold, G., Kreidenweis, S.M., 2005. The influence of water soluble organic carbon on cloud drop number concentration. *Journal of Geophysical Research (Atmosphere)* 110 (D18) D18211/1–D18211/14.
- Fierer, N., Liu, Z., Rodriguez-Hernandez, M., Knight, R., Henn, M., Hernandez, M.T., 2008. Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 200–207.
- Foght, J., Aislabie, J., Turner, S., Brown, C.E., Ryburn, J., Saul, D.J., Lawson, W., 2004. Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two southern hemisphere glaciers. *Microbial Ecology* 47, 329–340.
- Fong, N.J.C., Burgess, M.L., Barrow, K.D., Glenn, D.R., 2001. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 750–756.
- Franc, G.D., DeMott, P.J., 1998. Cloud activation characteristics of airborne *Erwinia carotovora* cells. *Journal of Applied Meteorology* 37, 1293–1300.
- Fröhlich-Nowojsky, J., Pickersgill, D.A., Després, R.V., Pöschl, U., 2009. High diversity of fungi in air particulate matter. *Proceedings of National Academy of Sciences* 106, 12814–12819.
- Fuzzi, S., Mandrioli, P., Peretto, A., 1997. Fog droplets – an atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmospheric Environment* 31, 287–290.
- Georgakopoulos, D.G., Després, V., Fröhlich-Nowojsky, J., Psenner, R., Ariya, P.A., Pósfai, M., Ahern, H.E., Moffett, B.F., Hill, T.C.J., 2009. Microbiology and atmospheric processes: biological, physical and chemical characterization of aerosol particles. *Biogeosciences* 6, 721–737.
- Gourmelon, M., Cillard, J., Pommepuy, M., 1994. Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *The Journal of Applied Bacteriology* 77, 105–112.
- Griffin, D.W., 2007. Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health. *Clinical Microbiology Reviews* 20 (3), 459–477.
- Groudieva, T., Kambourova, M., Yusef, H., Royter, M., Grote, R., Trinks, H., Antranikian, G., 2004. Diversity and cold-active hydrolytic bacterial characterization of an Arctic snow cover 9 enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. *Extremophiles* 8, 475–488.
- Heald, C.L., Spracklen, D.V., 2009. Atmospheric budget of primary biological aerosol particles from fungal spores. *Geophysical Research Letters* 36. doi:10.1029/2009gl0137493.
- Herlihy, L.J., Galloway, J.N., Mills, A.L., 1987. Bacterial utilization of formic and acetic acid in the rainwater. *Atmospheric Environment* 21, 2397–2402.
- Herrmann, H., Tilgner, A., Barzaghi, P., Majdik, Z., Gligorovski, S., Poulain, L., Monod, A., 2005. Towards a more detailed description of tropospheric aqueous phase organic chemistry: CAPRAM 3.0. *Atmospheric Environment* 39, 4351–4363.
- Hirano, S.S., Uppel, C.D., 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (3), 624–653.
- Hoese, C., Kristjánsson, J.E., Burrows, S.M., 2010. How important is biological ice nucleation in clouds on a global scale? *Environmental Research Letters* 5, 024009.
- Huffman, J.A., Treutlein, B., Pöschl, U., 2010. Fluorescent biological aerosol particle concentrations and size distributions measured with an Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer (UV-APS) in Central Europe. *Atmospheric Chemistry and Physics* 10, 3215–3233.
- Jaenicke, R., 2005. Abundance of cellular material and proteins in the atmosphere. *Science* 308 (5718), 73.
- Jones, A.M., Harrison, R.M., 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations – a review. *The Science of the Total Environment* 326, 151–180.
- Junge, K., Swanson, B.D., 2008. High-resolution ice nucleation spectra of sea-ice bacteria: implications for cloud formation and life in frozen environments. *Biogeosciences* 5, 865–873.
- Junge, K., Eicken, H., Deming, J.W., 2004. Bacterial activity at  $-2$  to  $-20$  °C in Arctic wintertime sea ice. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 550–557.
- Köhler, H., 1936. The nucleus in the growth of hygroscopic droplets. *Transactions of the Faraday Society* 32, 1152–1161.
- Leriche, M., Curier, R.L., Deguillaume, L., Caro, D., Sellegri, K., Chaumerliac, N., 2007. Numerical quantification of sources and phase partitioning of chemical species in cloud: application to wintertime anthropogenic air masses at the puy de Dôme station. *Journal of Atmospheric Chemistry* 57 (3), 281–297.
- Leroy, D., Monier, M., Wobrock, W., Flossmann, A.I., 2006. A numerical study of the effects of the aerosol particle spectrum on the development of the ice phase and precipitation formation. *Atmospheric Research* 80–1, 15–45.
- Levin, Z., Yankofsky, S.A., Pardes, D., Magal, N., 1987. Possible application of bacterial condensation freezing to artificial rainfall enhancement. *Journal of Climate and Applied Meteorology* 26, 1188–1197.
- Lighthart, B., 1997. The ecology of bacteria in the al fresco atmosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 23 (4), 263–274.
- Long, Y., Chaumerliac, N., Deguillaume, L., Leriche, M., Champeau, F., 2010. Effect of mixed phase cloud on the chemical budget of trace gases: a modelling approach. Under press to *Atmospheric Research*.
- Marinoni, A., Laj, P., Sellegri, K., Mailhot, G., 2004. Cloud chemistry at puy de Dôme: variability and relationships with environmental factors. *Atmospheric Chemistry and Physics* 4, 715–728.
- Maron, P.A., Lejon, D.P.H., Carvalho, E., Bizet, K., Lemanceau, P., Ranjard, L., Mougél, C., 2005. Assessing genetic structure and diversity of airborne bacterial communities by DNA fingerprinting and 16S rDNA clone library. *Atmospheric Environment* 39, 3687–3695.
- Matthias-Maser, S., Bogs, B., Jeanicke, R., 2000. The size distribution of primary biological aerosol particles in cloud water on the mountain Kleiner Feldberg/Taunus (FRG). *Atmospheric Research* 54, 1–13.
- Möhler, O., DeMott, P.J., Vali, G., Levin, Z., 2007. Microbiology and atmospheric processes: the role of biological particles in cloud physics. *Biogeosciences* 4, 1059–1071.
- Möhler, O., Georgakopoulos, D.G., Morris, C.E., Benz, S., Ebert, V., Hunsmann, S., Saathoff, H., Schnaiter, M., Wagner, R., 2008. Heterogeneous ice nucleation activity of bacteria: new laboratory experiments at simulated cloud conditions. *Biogeosciences* 5, 1425–1435.
- Morris, C.E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., 2004. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *Journal de Physique IV France* 121, 87–103.
- Mueller, D.R., Vincent, W.F., Bonilla, S., Laurion, I., 2005. Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* 53, 73–87.
- Parazols, M., 2007. PhD thesis N° D.U. 1809, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Petters, M.D., Kreidenweis, S.M., 2007. A single parameter representation of hygroscopic growth and cloud condensation nucleus activity. *Atmospheric Chemistry and Physics* 7, 1961–1971.
- Phillips, V.T.J., Andronache, C., Sherwood, S.C., Bansemmer, A., Conant, W.C., Demott, P.J., Flagan, R.C., Heymsfield, A., Jonsson, H., Poellot, M., Rissman, T.A., Seinfeld, J.H., Vanreken, T., Varutbangkul, V., Wilson, J.C., 2007. Anvil glaciation in a deep cumulus updraught over Florida simulated with the Explicit Microphysics Model. I: impact of various nucleation processes. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* 131, 2019–2046.
- Phillips, V.T.J., Andronache, C., Christner, B., Morris, C.E., Sands, D.C., Bansemmer, A., Lauer, A., McNaughton, C., Seman, C., 2009. Potential impacts from biological aerosols on ensembles of continental clouds simulated numerically. *Biogeosciences* 6, 987–1014.
- Ponder, M.A., Gilmour, S.J., Bergholz, P.W., Mindock, C.A., Hollingsworth, R., Thomashow, M.F., Tiedje, J.M., 2005. Characterization of potential stress responses in ancient Siberian permafrost psychroactive bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 53, 103–115.
- Pratt, K.A., DeMott, P.J., French, J.R., Wang, Z., Westphal, D.L., Heymsfield, A.J., Twohy, C.H., Prenni, A.J., Prather, K.A., 2009. *In situ* detection of biological particles in cloud ice-crystals. *Nature Geoscience* 2 (6), 398–401.
- Prisle, N.L., Raatikainen, T., Laaksonen, A., Bilde, M., 2009. Surfactants in cloud droplet activation: mixed organic–inorganic particles. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions* 9, 24669–24715. doi:10.5194/acpd-9-24669-2009.
- Sattler, B., Puxbaum, H., Psenner, R., 2001. Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophysical Research Letters* 28, 239–242.
- Segawa, T., Miyamoto, K., Ushida, K., Agata, K., Okada, N., Kohshima, S., 2005. Seasonal change in bacterial flora and biomass in mountain snow from Tateyama mountains, Japan, analyzed by 16S rRNA gene sequencing and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 123–130.
- Soulaige, G., 1957. Les noyaux de congélation de l'atmosphère. *Annales de Géophysique* 13 (103–134), 167–185.
- Steven, B., Léveillé, R., Pollard, W.H., Whyte, L.G., 2006. Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles* 10 (4), 259–267.
- Sun, J., Ariya, P.A., 2006. Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): a review. *Atmospheric Environment* 40, 795–820.

- Vaïtilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Laj, P., Leriche, M., Delort, A.-M., 2010. Contribution of microbial activity to carbon chemistry in clouds. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 23–29.
- Vali, G., Christensen, M., Fesh, R.W., Galyan, L.R., Maki, L.R., Schnell, R.C., 1976. Biogenic ice nuclei. Part II: bacterial sources. *Journal of the Atmospheric Sciences* 33, 1565–1570.
- Ward, P.J., DeMott, P.J., 1989. Preliminary experimental evaluation of Snomax, *Pseudomonas syringae*, as an artificial ice nucleus for weather modification. *Journal of Weather Modification* 21, 9–13.
- Wood, S.E., Baker, M.B., Swanson, B.D., 2002. Instrument for studies of homogeneous and heterogeneous ice nucleation in free-falling supercooled water droplets. *The Review of Scientific Instruments* 73 (11), 3988–3996.