HAL
open science

Interactions microorganismes-nuage : activité glaçogène et survie

Muriel Mourguy Joly

To cite this version:

Muriel Mourguy Joly. Interactions microorganismes-nuage : activité glaçogène et survie. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2013. Français. NNT : 2013CLF22424 . tel-01136212

HAL Id: tel-01136212

https://theses.hal.science/tel-01136212

Submitted on 26 Mar 2015

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 : 2424

UNIVERSITE CLERMONT II – BLAISE PASCAL
(U.F.R. Sciences et Technologies)

ECOLE DOCTORALE DE SCIENCES FONDAMENTALES
N° 780

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE
Spécialités : Chimie Organique Biologique et Physique de l'Atmosphère

Par

Muriel JOLY

Master Recherche de l'Université Blaise Pascal

Interactions Microorganismes – Nuage : Activité Glaçogène et Survie

Soutenue le 18 Décembre 2013 devant la commission d'examen :

Rapporteurs :

Yves BRUNET	Directeur de Recherche - Unité de Recherche EPHYSE, INRA Bordeaux/Aquitaine (Villenave, France)
Maria KANAKIDOU	Professeur - Environmental Chemical Processes Laboratory, Université de Crète (Héraklion, Grèce)

Examinateurs :

Marina MOLETTA-DENAT	Chargée de projet - Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA Transfert Environnement (Narbonne, France)
Nadine CHAUMERLIAC	Directrice de Recherche - Laboratoire de Météorologie Physique, CNRS/Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand, France)
Anne-Marie DELORT	Directrice de Recherche - Institut de Chimie de Clermont-Ferrand/ ENSCCF, CNRS/Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand, France)
Laurent DEGUILLAUME	Physicien Adjoint - Laboratoire de Météorologie Physique, CNRS/Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand, France)

Invité

Pierre AMATO	Chargé de Recherche - Institut de Chimie de Clermont-Ferrand/ ENSCCF, CNRS/Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand, France)

Remerciements

Je tiens à remercier un certain nombre de personnes qui ont contribué de près ou loin à ces travaux de thèse.

Tout d'abord, j'aimerais adresser mes remerciements à Maria Kanakidou, Yves Brunet, Marina Moletta-Denat et Nadine Chaumerliac pour avoir accepté de juger ces travaux de thèses.

J'aimerais ensuite exprimer ma gratitude envers Anne-Marie Delort et Laurent Deguillaume, mes deux directeurs de thèse qui ont su trouver l'équilibre entre l'encadrement et mon besoin d'indépendance. J'aimerais également plus particulièrement remercier Anne-Marie pour avoir toujours pris le temps de m'écouter quand je le demandais et ce, malgré son emploi du temps chargé, ainsi que pour sa bonne humeur. J'aimerais aussi plus particulièrement remercier Laurent pour tous les bons moments passés ensemble au puy de Dôme et pour ceux où j'ai pu être pénible et bornée et pendant lesquels, il m'a supporté avec le sourire.

J'aimerais également exprimer ma gratitude envers Pierre Amato et Martine Sancelme qui ont tous les deux fortement participé à ces travaux de thèse que ce soit au niveau pratique, réflexion ou rédaction. Je remercie Pierre également pour les moments agréables passés en Allemagne et au Danemark qui m'ont permis de le découvrir sous un autre jour et j'adresse mes remerciements à Martine pour son soutien inébranlable et ses touchantes attentions au quotidien.

J'aimerais exprimer ma reconnaissance à Mickaël Vaïtilingom, mon prédécesseur, qui m'a formé aussi bien aux prélèvements nuageux et à leur traitement qu'à la réparation d'incubateurs, et à Nolwenn Wirgot, mon ex-stagiaire et successeur, qui a fourni un travail remarquable lors de son stage et mon seul regret est que notre cohabitation n'ait pas duré plus longtemps.

J'adresse également mes remerciements aux techniciens du service Microbiologie de l'ICCF : Nicolas Gaïani, Catherine Vatoux et Magali Abrantes ainsi qu'aux autres personnes qui m'ont aidé sur l'aspect pratique particulièrement Guillaume Voyard et sa grande patience envers moi, et Aurélie Job qui s'est démenée pour me débloquer quand j'en ai eu besoin.

Merci également aux personnes avec qui j'ai travaillé de façon plus ponctuelle. Je pense notamment à Eléonore Attard et à Virginie Vinatier de l'équipe SEESIB de l'ICCF, à Marcello Brigante, Tiffany Charbouillot, Gilles Mailhot et Monica Passananti de l'équipe Photochimie de l'ICCF, à Marie Monier et Andrea Flossmann du LaMP et à Ottmar Möhler, Caroline Oehm et Corinna Hoose du

Karlsruhe Institute of Technology. J'aimerais également adresser mes remerciements aux personnes de l'OPGC que j'ai côtoyé grâce aux montées au puy de Dôme : Jean-Marc Pichon, Aurélie Colomb, Mickaël Ribeiro, Christophe Gourbeyre, Laetitia Bouvier, Christophe Bernard, Clémence Rose et Christian Reymond et aux personnes du LMGE que j'ai pu embêter.

J'aimerais adresser mes remerciements à l'ensemble des personnes du SEESIB avec qui j'ai partagé de bons moments pendant ces trois dernières années, en particulier les étudiants (je ne vais pas faire de liste ici de peur d'en oublier).

Pour finir, j'aimerais remercier mes amis et ma famille qui m'ont réconforté quand j'ai eu des doutes et plus particulièrement mon Pierre, pour son soutien sans faille depuis que l'on s'est rencontré.

Sommaire

Introduction **1**

Chapitre I : Synthèse bibliographique **7**

1. Le système nuageux **9**

1.1. Généralités sur la formation des nuages 9

1.1.1. Les particules comme noyaux de condensation 10

1.1.2. Evolution microphysique des nuages 11

1.2. Le nuage, milieu de transformation des composés chimiques 13

1.2.1. Les sources des composés chimiques dans les nuages 13

1.2.2. Composition chimique des nuages 14

1.2.2.1. La fraction inorganique 14

1.2.2.2. La fraction organique 14

1.2.3. Les oxydants 16

1.3. La réactivité en phase aqueuse 17

2. Les microorganismes dans les nuages **18**

2.1. Historique 18

2.2. Emission et transport 19

2.3. Composition microbienne de l'eau des nuages 21

2.3.1. Description quantitative 21

2.3.2. Description qualitative 22

3. Impact des conditions physico-chimiques des nuages sur les microorganismes **26**

3.1. Lumière solaire et oxydants 27

3.2. Composition chimique 30

3.3. Evaporation et condensation 30

3.4. Basses températures et cycles de gel et de dégel 32

4. Rôles des microorganismes sur les processus microphysiques des nuages **35**

4.1. Rôle des bactéries dans la formation de gouttelettes de nuage - Activité de condensation 35

4.2. Rôle des bactéries dans la formation de glace dans les nuages et de précipitations - Activité glaçogène 37

4.2.1. Protéines glaçogènes bactériennes 38
4.2.2. Activité glaçogène et cycle de l'eau 40
4.2.3. Influence de l'activité glaçogène bactérienne sur la formation de précipitations : estimations par les modèles numériques 43
5. Rôle des microorganismes sur la chimie des nuages 45
5.1. Les voies métaboliques 46
5.1.1. Métabolisme des acides carboxyliques 46
5.1.2. Métabolisme du méthanol et du formaldéhyde 47
5.2. Comparaison de l'activité microbienne avec la chimie radicalaire dans la chimie des nuages 48
5.2.1. Expériences avec des substrats uniques et des souches microbiennes pures isolées de l'atmosphère 49
5.2.2. Expériences en microcosmes dans un milieu nuage artificiel 49
5.2.3. Expériences sur des échantillons réels d'eau de nuage 51
6. Problématique 54

Chapitre II : Analyse de la composition microbiologique et chimique de l'eau de nuage 57
1. Introduction 59
2. Site de prélèvement et description de l'échantillonnage 59
3. Composition chimique des nuages 62
3.1. Introduction 62
3.2. "Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) from 10-year monitoring: mean features of their physico-chemical properties", paru dans Atmospheric Chemistry and Physics 62
4. Composition microbiologique des nuages 96
4.1. Matériel et Méthodes 96
4.1.1. Prélèvements 96
4.1.2. Dénombrement des cellules totales 97
4.1.3. Dénombrement des cellules cultivables 97
4.1.4. Isolement, conservation et identification des cellules cultivables 98
4.1.5. Viabilité cellulaire 99
4.1.6. Analyses statistiques 99
4.2. Résultats 99

4.2.1. Concentration en cellules totales 101
4.2.2. Concentration en cellules cultivables et souches isolées 102
4.2.3. Viabilité cellulaire 106
5. Corrélations entre les propriétés physico-chimiques et microbiologiques 108
5.1. Introduction 108
5.2. Paramètres microbiologiques et influence de l'origine de la masse d'air 108
5.3. Paramètres microbiologiques et influence des paramètres physico-chimiques 109
6. Conclusion 112

Chapitre III : Résistance des microorganismes face aux facteurs de stress dans les nuages 115

1. Introduction 117
2. Matériel et Méthodes 118
2.1. Souches utilisées 118
2.2. Exposition à l'oxydant H_2O_2 119
2.3. Exposition à la lumière solaire 120
2.4. Chocs osmotiques 121
2.5. Cycles de gel et dégel 121
3. Résultats 123
3.1. Introduction 123
3.2. "Clouds as environmental filters: survival of microbial isolates to the main stress factors encountered in clouds", article en cours de préparation pour une soumission à FEMS Microbiology Ecology 124
4. Conclusion 146

Chapitre IV : Activité glaçogène des bactéries et des particules biologiques dans l'eau de nuage 147

1. Introduction 149
2. Matériel et Méthodes 150
2.1. Etude de l'activité glaçogène par la méthode de « drop-freezing » 150
2.1.1. Principe 150
2.1.2. Matériel et Méthodes 151
2.2. Etude de l'activité glaçogène en chambre à nuages 153

2.2.1. Principe 153
2.2.2. La chambre à nuage AIDA 153
3. Résultats 154
3.1. "Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water", article publié dans Atmospheric Environment 157
3.2. "Survival and ice nucleation activity of bacterial aerosols in cloud simulation chamber", article en cours de préparation pour une soumission à Aerobiologia 168
3.3. "Direct quantification of total and biological ice nuclei in cloud water", paru dans Atmospheric Chemistry and Physics Discussion 185
4. Conclusion 202

Chapitre V : Biotransformation de composés organiques dans l'eau de nuage Détermination de constantes cinétiques de biodégradation 205

1. Introduction 207
2. Matériel et Méthodes 208
2.1. Souches bactériennes 208
2.2. Substrats étudiés 208
2.3. Milieu nuage artificiel marin 209
2.4. Tests de biodégradation 210
2.5. Analyse des échantillons 210
2.6. Calculs de constantes cinétiques 211
2.7. Comparaison des vitesses de dégradation biologique et radicalaire 213
2.8. Analyses statistiques 214
3. Résultats 214
3.1. Dégradation des substrats 214
3.2. Détermination des vitesses de dégradation 217
3.3. Influence du pH du milieu d'incubation 219
3.4. Détermination des constantes cinétiques 220
3.5. Comparaison des taux de dégradation biologique aux taux d'oxydation par voie radicalaire 221
4. Conclusion 225

Conclusion générale et perspectives 227

1. **Conclusion générale 229**
2. **Perspectives.....232**

Références bibliographiques 237

Annexes 261

Introduction

Les nuages sont des milieux multiphasiques de l'atmosphère qui ont des effets majeurs à la fois sur le climat et sur la pollution. A l'échelle du climat, les nuages ont un impact sur le bilan radiatif terrestre car ils peuvent d'une part, diffuser les radiations de courtes longueurs d'ondes du soleil augmentant de ce fait, l'albédo du système terre/atmosphère et d'autre part, absorber et/ou diffuser les radiations infrarouges émises par la surface terrestre, participant ainsi à l'effet de serre (*IPCC*, 2013). L'importance de ces deux effets est dépendante des propriétés microphysiques du nuage (granulométrie, géométrie des hydrométéores) et de la phase des nuages (liquide, glace). Les nuages sont également le siège privilégié du développement d'une chimie multiphase atmosphérique (gaz, liquide, solide) perturbant les cycles chimiques de nombreux constituants atmosphériques. A titre d'exemple, on peut souligner que les réactions en phase liquide sont la plupart du temps très rapides, souvent plus efficaces que les réactions équivalentes en phase gazeuse et que les processus photochimiques sont amplifiés par rapport aux conditions « ciel clair ». Les composés incorporés dans les nuages sont alors transformés par réactivité chimique qui, elle-même, est perturbée par les processus microphysiques nuageux déterminant la formation, la durée de vie et la dissipation des nuages.

Dans ce cadre, la présence de microorganismes viables malgré des conditions environnementales hostiles (lumière solaire, faibles températures, pH acides, variations de concentration osmotique, présence d'oxydants, faibles concentrations en nutriments, *etc.*) a soulevé de nombreuses interrogations quant à leur effet sur les paramètres chimiques et microphysiques nuageux. Tout d'abord, ces microorganismes pourraient modifier les propriétés microphysiques nuageuses, du simple fait de leur présence, en agissant comme un support de condensation pour la production de gouttelettes d'eau (Cloud Condensation Nuclei ou CCN). Ils pourraient donc ainsi intervenir dans la formation des nuages. D'autre part, la congélation de l'eau dans les nuages ne peut survenir de façon spontanée qu'à partir de températures inférieures ou égales à -36°C (congélation homogène). Pour des températures supérieures, le gel de l'eau dans les conditions atmosphériques nécessite la participation de particules dites « glaçogènes » (ou Ice Nuclei, IN). L'identification de microorganismes appartenant à des genres microbiens potentiellement glaçogènes suggère que ces cellules pourraient favoriser la formation de cristaux de glace dans les nuages. Par ailleurs, les particules biologiques étant à ce jour les noyaux glaçogènes les plus efficaces connus (*i.e.* permettant le gel de l'eau surfondue dès -2°C), la présence de bactéries glaçogènes dans les nuages pourrait conduire à la formation de cristaux de glace à des températures auxquelles les autres noyaux glaçogènes seraient inactifs. Sachant que les précipitations sont principalement le résultat de la formation de glace dans les nuages, ces bactéries pourraient donc intervenir dans leur initiation. Plusieurs études s'appuyant de modélisation numérique simulant les processus microphysiques nuageux de l'atmosphère se sont penchées sur cette hypothèse. Cependant, l'absence de données

quantitatives directement puisées sur le milieu nuageux quant à l'activité glaçogène de ces organismes empêche d'en estimer pleinement l'importance.

Enfin, les microorganismes pourraient impacter la composition chimique des nuages en utilisant les ressources nutritives présentes ou en synthétisant d'autres composés chimiques. Plusieurs travaux ont montré que certains composés organiques présents dans les nuages (*e.g.* acides carboxyliques, aldéhydes) peuvent être dégradés par la microflore nuageuse, remettant en cause l'idée que la transformation de la matière organique dans les nuages est uniquement le résultat de sa réaction avec des radicaux (*e.g.* $^{\bullet}OH$, $NO_3^{\bullet}$). Depuis, plusieurs études en laboratoire ont cherché à quantifier l'importance relative des microorganismes et des radicaux dans les processus de transformation de la matière organique en cherchant à s'approcher de plus en plus de conditions réalistes de l'atmosphère. Cependant, les limites de l'exploration en laboratoire semblent avoir été atteintes et désormais, une approche par modélisation numérique apparaît comme essentielle pour accéder à l'estimation de l'importance de l'activité des microorganismes dans la chimie atmosphérique.

C'est dans ce cadre que mes travaux de thèse se sont donc intéressés à décrire plus précisément l'implication des microorganismes dans les processus physiques et chimiques de l'atmosphère et, réciproquement, à comprendre quels facteurs atmosphériques pouvaient influencer la survie de ces organismes dans les nuages. Cette démarche a été réalisée en associant des études sur le terrain permettant d'analyser des paramètres directement sur l'eau des nuages, à des études en laboratoire sur des microorganismes isolés au préalable de l'eau des nuages permettant d'explorer leur survie ou leur activité dans des conditions contrôlées. L'ensemble de ces expériences ont eu pour but de fournir des données pouvant être utilisées pour simuler *in silico* l'interaction des conditions atmosphériques et des microorganismes par des modèles numériques.

Le premier chapitre de ce manuscrit de thèse se focalise à dresser l'état de l'art des connaissances sur la composition chimique et microbiologique des nuages. Dans un deuxième temps, les conséquences que peuvent avoir les conditions physico-chimiques sur la survie des microorganismes sont décrites. Enfin, deux sections sont consacrées respectivement aux rôles des microorganismes sur les processus microphysiques et chimiques de l'atmosphère.

Les résultats de cette thèse sont présentés sous la forme de quatre chapitres.

Le premier d'entre eux relate une étude à long terme de la composition chimique et microbiologique des nuages prélevés au puy de Dôme.

Un deuxième chapitre s'intéresse à décrire la survie de microorganismes isolés d'eau de nuage face à quatre facteurs de stress majeurs rencontrés dans ce milieu.

Le troisième chapitre des résultats présente des travaux relatifs à l'activité glaçogène des bactéries dans les nuages : une première étude s'est intéressée à identifier des bactéries glaçogènes à partir d'eau nuageuse, une deuxième étude a cherché à décrire le comportement de souches bactériennes glaçogènes dans une chambre de simulation de nuages (AIDA, Allemagne) et une dernière étude s'est focalisée sur la quantification de l'activité glaçogène directement dans l'eau de nuage prélevée au puy de Dôme.

Le dernier chapitre des résultats s'est penché sur la détermination de constantes cinétiques pouvant être intégrées dans un modèle simulant la réactivité chimique atmosphérique afin de comparer l'importance relative des microorganismes et de la chimie radicalaire dans des conditions atmosphériques réalistes. Pour cela, la dégradation de trois composés organiques présents en relativement grande quantité dans les nuages par trois souches bactérienne a été suivie.

Enfin, une conclusion générale clôt ce manuscrit de thèse et ouvre de nouvelles perspectives d'étude.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Le système nuageux

1.1. Généralités sur la formation des nuages

L'atmosphère est un environnement multiphasique complexe constitué de gaz, de particules d'aérosol solides et d'hydrométéores liquides (gouttelettes de nuages et gouttes de pluie) et solides (cristaux de glace) en suspension.

Les aérosols primaires sont émis depuis la surface de la Terre par des processus naturels divers (par exemple, le soulèvement des poussières par le vent, la formation d'embruns marins, les éruptions volcaniques émettant des cendres, l'aérosolisation de particules d'origine biologique, *etc.*) ou par les activités anthropiques (activités industrielles, combustion des carburants, *etc.* ; **Figure 1**). Une fois dans l'atmosphère, ces particules d'aérosols peuvent ensuite être transformées par des processus à la fois physiques et chimiques ; on parle alors de vieillissement de ces particules. La réactivité chimique peut également générer des particules d'aérosols dits « secondaires » comme lors de la conversion de gaz en particules (*cf.* les articles de synthèse de *Raes et al.* (2000), *Kanakidou et al.* (2005), *Hallquist et al.* (2009) et *Ervens et al.* (2011)).

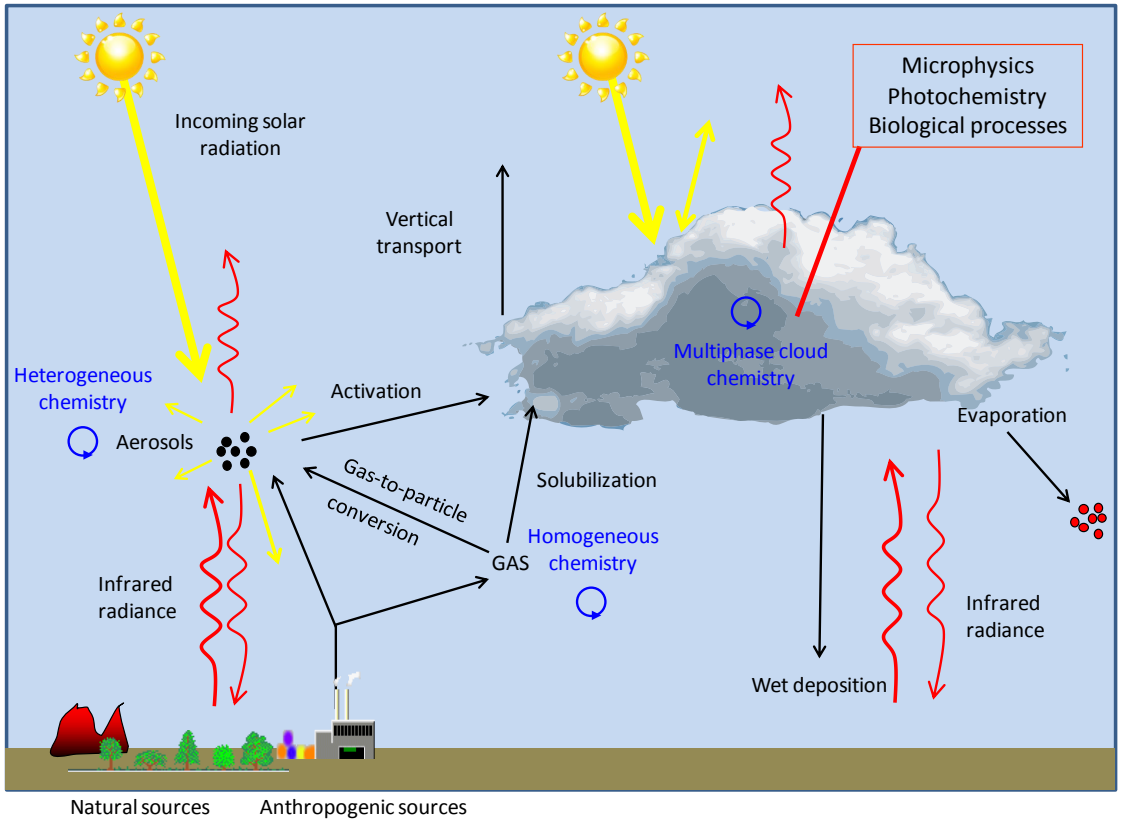


Figure 1 *: Interactions nuages-aérosols-chimie. Les flèches rouges correspondent aux rayonnements infrarouges émis par le sol et les flèches jaunes représentent les rayonnements solaires (*Joly et al.*, 2013a).*

Les aérosols jouent un rôle important sur le climat de la Terre en diffusant ou en absorbant la lumière solaire incidente et les rayonnements infrarouges (IR) telluriques (*Charlson et al.*, 1992). Ils peuvent également influencer le climat de façon indirecte grâce à leur capacité à former des nuages en agissant en tant que noyaux de condensation (Cloud Condensation Nuclei ou CCN). Les nuages formés ont alors un impact sur le bilan radiatif terrestre car ils interagissent avec le rayonnement solaire incident et le rayonnement IR tellurique. De plus, les caractéristiques physico-chimiques des aérosols déterminent les caractéristiques microphysiques du nuage et par conséquent, sa durée de vie. Les particules d'aérosols et les nuages jouent donc un rôle crucial dans la troposphère en raison de leur influence sur le bilan radiatif terrestre. Toutefois, de fortes incertitudes résident encore sur ces effets (*IPCC*, 2013).

1.1.1. Les particules comme noyaux de condensation

Les nuages sont constitués d'un ensemble de microgouttelettes d'eau liquide et/ou solide en suspension dans l'atmosphère. Leur formation à l'échelle macroscopique est dictée par les propriétés thermodynamiques (pression, température) de l'atmosphère et par la charge en eau (humidité relative) des masses d'air. En raison des conditions de sursaturations en vapeur d'eau excédant rarement 10 %, la condensation homogène, *i.e.* la formation spontanée de gouttelettes d'eau, est un phénomène extrêmement rare. En revanche, le seuil de sursaturation peut être abaissé par la présence de particules solides dites « noyau de condensation » ou « CCN » sur lesquelles la vapeur d'eau peut se condenser.

L'activité CCN d'une particule est dépendante de sa taille et de sa composition comme décrit par la théorie de Köhler : d'une part, l'humidité relative requise pour l'activation en gouttelette d'une particule augmente avec son rayon de courbure (effet Kelvin) et d'autre part, elle diminue avec sa solubilité (loi de Raoult) (*Köhler*, 1936). L'activité CCN dépend également d'autres propriétés physico-chimiques des particules d'aérosols : les particules à hygroscopicité élevée ont une activité CCN à partir de plus faibles sursaturations que les particules moins solubles (*Mészáros*, 1988).

Un grand nombre de particules présentes dans l'atmosphère sont connues pour être des CCN efficaces, qu'il s'agisse de particules inorganiques (les sulfates, les sels marins, *etc.*) ou organiques (acides carboxyliques, composés de haut poids moléculaire tels que les HULIS[1], *etc.*) (*Novakov et Corrigan*, 1996; *Ghan et al.*, 1998; *Hartz et al.*, 2006; *Sun et Ariya*, 2006; *Zhang et al.*, 2009). On estime qu'entre 0,4 et 14 % des particules agissent comme noyaux de condensation pour des sursaturations de l'ordre de 1 % (*Pruppacher et Klett*, 2010).

Les particules sulfatées sont réputées pour être d'excellents noyaux de condensation permettant la formation de gouttelettes à des sursaturations inférieures à 0,3 % (*Twomey*, 1971). Au-dessus des

[1] HULIS ou HUmic-LIke Substances : Composés retrouvés dans l'atmosphère ayant des ressemblances avec les acides humiques et fulviques.

océans, le chlorure de sodium (NaCl) joue également un rôle important comme noyau de condensation à partir de faibles sursaturations (inférieures à 0,03 %) (*Mészáros*, 1988).

Selon l'origine des masses d'air, la quantité de particules d'aérosol et leurs propriétés physico-chimiques varient fortement et impactent donc la concentration et la taille des hydrométéores formés. Par exemple, dans les zones polluées, le nombre de particules émises dans l'air est plus important et par conséquent, un plus grand nombre de CCN sont activés en gouttelettes d'eau. On recense plus de 10^3 particules CCN par cm^3 au-dessus des zones continentales polluées alors qu'au-dessus des régions océaniques, ces concentrations sont généralement inférieures à 200 particules cm^{-3} (*Mészáros*, 1988). Ces différences conduisent à une concentration en gouttes plus élevée et des gouttes plus petites au niveau des continents que dans les régions océaniques (*Twomey et al.*, 1984). Ces paramètres (le nombre et la taille des gouttes) contrôlent à la fois la durée de vie du nuage (c'est-à-dire sa probabilité de former des précipitations) (*Albrecht*, 1989) et ses propriétés optiques et donc radiatives (*Twomey*, 1977b).

En plus d'une variation spatiale, la concentration en CCN est soumise à une importante variation temporelle à l'échelle du jour et de l'année. Dans une même zone géographique, la concentration en CCN peut varier jusqu'à un facteur 10 en quelques heures (*Radke et Hobbs*, 1969; *Twomey*, 1977a).

1.1.2. Evolution microphysique des nuages

A l'échelle macroscopique, la durée de vie d'un nuage est relativement courte, de l'ordre de quelques heures. Par exemple, *Pruppacher et Jaenicke* (1995) ont estimé à ~3h le temps passé par une parcelle d'air dans un nuage. La disparition d'un nuage peut être le résultat de l'évaporation ou de la sédimentation des hydrométéores. Dans ce dernier cas, plusieurs processus interviennent. Il s'agit, par exemple, de phénomènes de collision-coalescence des hydrométéores liquides (« microphysique chaude ») lors desquels les gouttelettes d'eau de nuage et/ou les gouttes de pluie se rencontrent pour former des hydrométéores plus volumineux, ou plus fréquemment, la sédimentation fait intervenir en amont des processus de formation de glace (« microphysique froide »).

La congélation peut s'effectuer selon deux processus (**Figure 2**) : le premier, appelé « congélation homogène », correspond au gel spontané de l'eau surfondue (*i.e.* eau liquide malgré une température inférieure à 0°C) et intervient à partir de températures voisines de -36°C ; le second, dit « congélation hétérogène », fait intervenir des particules solides qui, par leur conformation particulière, déclenchent le réarrangement des molécules d'eau surfondue et catalysent ainsi la formation de cristaux de glace. Ces particules sont dénommées « noyaux glaçogènes » ou « IN » (Ice Nuclei). Dans l'atmosphère, la congélation hétérogène peut intervenir selon différents modes suivant que le gel survienne après formation d'une goutte d'eau (congélation par immersion ou par condensation), directement au moment du dépôt de vapeur (congélation par dépôt) ou par contact

du noyau glaçogène avec une gouttelette surfondue (congélation par contact) comme illustré sur la **Figure 2** (*Pruppacher et Klett*, 2010).

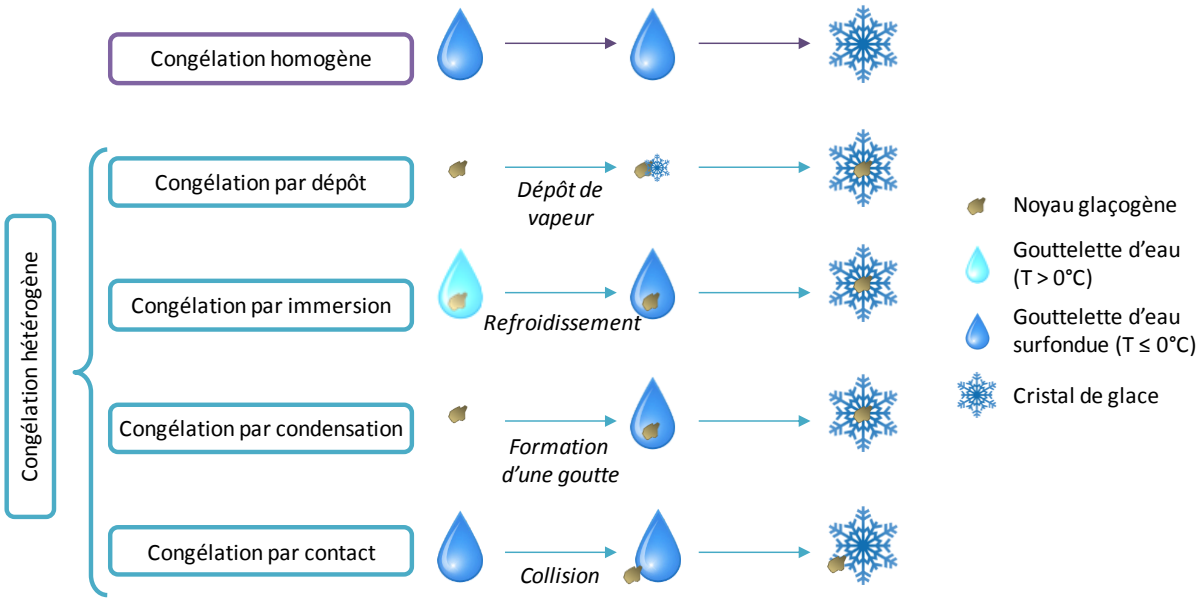


***Figure 2** : Modes d'initiation de la glace dans les nuages par un noyau glaçogène, adapté à partir du site web de l'Institute for Atmospheric and Climate Science (Zurich) : http://www.iac.ethz.ch/groups/lohmann/research/lab/in*

Selon les conditions thermodynamiques atmosphériques, les cristaux peuvent retourner à l'état liquide ou se maintenir dans un état solide. Leur masse peut alors s'accroître à mesure que le temps passe jusqu'à atteindre une masse critique à partir de laquelle les cristaux deviennent trop lourds pour rester en suspension. La croissance des cristaux peut survenir selon deux phénomènes. D'une part, puisque les pressions de vapeur des cristaux de glace sont inférieures à celle des gouttelettes d'eau liquide surfondue, les cristaux grossissent aux dépens des gouttelettes (effet Bergeron ; *Bergeron*, 1935). D'autre part, la collision de cristaux de glace entre eux ou avec des gouttelettes d'eau liquide permet la croissance de la phase glace des nuages par coalescence.

En général, il a été observé que le nombre de cristaux de glace rencontrés dans les nuages est largement supérieur au nombre de noyaux glaçogènes mesuré et ce, malgré des températures relativement élevées (entre 0 et -10°C) (*Hobbs*, 1969). Ceci suggère que les cristaux de glace peuvent à leur tour initier la congélation d'autres gouttelettes. C'est le cas par exemple lorsque les cristaux se fragmentent en réponse à leur congélation (*Hallett et Mossop*, 1974). Ces fragments peuvent alors servir de support pour initier la formation de nouveaux cristaux de glace. La présence d'un faible nombre de cristaux de glace peut donc entraîner la glaciation du nuage entier.

Un grand nombre de particules rencontré dans les nuages est connu pour avoir une activité glaçogène dont les poussières minérales, ces particules inorganiques primaires soulevées par l'action du vent (*Szyrmer et Zawadzki*, 1997). Les argiles (kaolinite, montmorillonite, *etc.*) sont considérées comme les principaux noyaux glaçogènes dans l'atmosphère. Cependant, la plupart des poussières

minérales perdent leur activité à des températures supérieures à -15°C (*Connolly et al.*, 2009; *Atkinson et al.*, 2013). Les résidus de composés carbonés après combustion (suies) sont également connus pour intervenir sur la formation de cristaux de glace et ce, à des températures proches de celles observées pour les particules minérales (*DeMott*, 1990). Enfin, les noyaux glaçogènes peuvent également provenir de systèmes biologiques dont les pollens et les microorganismes (*cf.* le paragraphe 4.2).

Les processus microphysiques ont donc un impact sur la formation de précipitation et sur la durée de vie des nuages. Au cours des différents cycles nuageux (liquide et/ou glacé), les espèces chimiques présentes dans la masse d'air subissent différentes modifications par réactivité chimique multiphasique et sont redistribuées entre les différentes phases du nuage.

1.2.Le nuage, milieu de transformation des composés chimiques

1.2.1. Les sources des composés chimiques dans les nuages

La phase aqueuse des nuages est un mélange complexe de composés chimiques organiques et inorganiques. Leur origine peut être variée comme présenté sur la **Figure 3**.

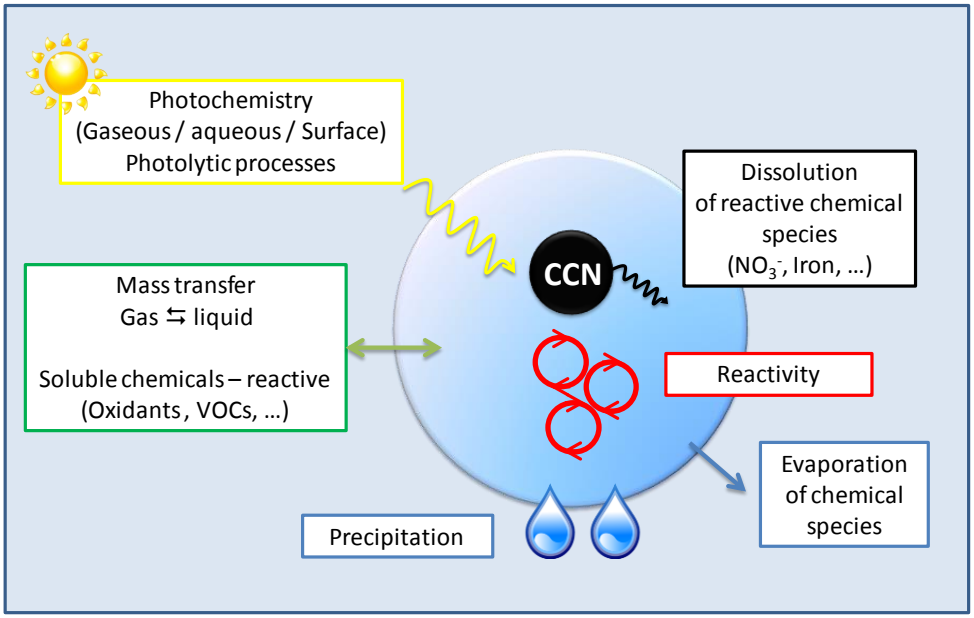


Figure 3 *: Processus multiphasiques dans les nuages. Les encadrés vert et noir correspondent aux sources de composés chimiques dans les gouttelettes. Les encadrés rouge et jaune représentent les voies de transformations chimiques. Les encadrés bleus correspondent aux processus microphysiques qui redistribuent les composés entre les différentes phases (*Joly et al.*, 2013a).*

Ils peuvent par exemple provenir de la dissolution d'une partie ou de la totalité du noyau de condensation lors de l'activation de la particule en gouttelette de nuage. En fonction de leur solubilité définie par la constante de Henry, certains gaz traces peuvent également être transférés à

l'interface air/gouttelette et dissous au sein de l'eau des nuages. D'autre part, la réactivité dans la phase aqueuse des nuages peut engendrer la formation de nouveaux composés chimiques.

1.2.2. Composition chimique des nuages

1.2.2.1. La fraction inorganique

Les principaux ions inorganiques présents dans l'eau des nuages sont les anions sulfate (SO_4^{2-}), chlorure (Cl^-) et nitrate (NO_3^-), les métaux alcalins et alcalino-terreux sodium (Na^+), potassium (K^+), magnésium (Mg^{2+}), calcium (Ca^{2+}) ainsi que les ions ammonium (NH_4^+). La proportion de chacun de ces ions est dépendante de l'origine géographique de la masse d'air. Les ions NO_3^-, SO_4^{2-} et NH_4^+ sont généralement reportés comme des marqueurs de l'anthropisation. Les ions nitrate et ammonium peuvent rejoindre l'eau des nuages en servant de noyaux de condensation ainsi que par le piégeage dans l'eau liquide de l'acide nitrique (HNO_3) ou de l'ammoniaque gazeux (NH_3) et les ions sulfates proviennent de l'oxydation de précurseurs gazeux dissous dans des gouttelettes de nuage tels que le dioxyde de soufre (SO_2). Dans les régions polluées, l'oxydation du SO_2 et du dioxyde d'azote (NO_2) est une source importante d'acides forts (acide sulfurique H_2SO_4 et nitrique HNO_3) qui contrôlent majoritairement l'acidité de l'eau du nuage. La majeure fraction des ions potassium, magnésium et calcium provient de la partie minérale des particules d'aérosol issues du sol et sont donc plutôt des indicateurs de masses d'air issues de régions continentales peu polluées. Quant aux ions Na^+ et Cl^-, ce sont plutôt des indicateurs de masse d'air d'origine océanique en raison de leur forte abondance dans les sels marins (*Charbouillot*, 2011).

1.2.2.2. La fraction organique

La matière organique représente également une part importante de la matière soluble dans des gouttelettes de nuage (*Saxena et Hildemann*, 1996; *Fuzzi et al.*, 2002). Selon *Goldstein et Galbally* (2007), environ 10^4 à 10^5 molécules organiques différentes ont été recensées dans l'atmosphère mais elles ne représenteraient qu'un faible pourcentage de la diversité organique présente.

Les acides carboxyliques représentent environ 10 % du carbone organique dissous dans les gouttelettes de nuage (*cf.* le **Tableau 1** pour les concentrations typiques). Ils peuvent être produits dans la phase gazeuse et dissous ensuite dans la phase aqueuse (source principale des acides acétique et formique). Ils peuvent aussi résulter de la dissolution de particules solubles (source principale des acides oxalique, succinique, malonique, maléique, *etc.*) ou être produits par des réactions en phase aqueuse (*Chebbi et Carlier*, 1996; *Ervens et al.*, 2004; *Goldstein et Galbally*, 2007). En raison de la présence de radicaux libres, l'oxydation de la matière organique conduit à la

formation d'acides carboxyliques. Ils représentent aussi l'un des principaux puits des radicaux (*Warneck*, 2003; *Herrmann et al.*, 2010; *Tilgner et Herrmann*, 2010).

***Tableau 1** : Concentrations des principaux acides carboxyliques et aldéhydes présents dans l'eau de nuage (*Joly et al.*, 2013a).*

Composé chimique	Concentrations (µM)	Références
Acide acétique $CH_3CO(OH)$	4,0 - 37,8	*Löflund et al.*, 2002
	28,3 - 79,0	*Decesari et al.*, 2005
	30,0 - 84,0	*Watanabe et al.*, 2001
	3,0 - 173,0	*Munger et al.*, 1989
	0,6 - 48,7	*Marinoni et al.*, 2004
Acide formique $CHO(OH)$	1,3 - 34,3	*Löflund et al.*, 2002
	36,0 - 51,2	*Decesari et al.*, 2005
	43,0 - 167,0	*Watanabe et al.*, 2001
	12,0 - 103,0	*Marinoni et al.*, 2004
	0,8 - 71,4	
Acide succinique $CO(OH)CH_2CH_2CO(OH)$	0,85 - 2,55	*Löflund et al.*, 2002
	0,1 - 4,1	*Marinoni et al.*, 2004
Acide malonique $CO(OH)CH_2CO(OH)$	0,70 - 2,85	*Löflund et al.*, 2002
Acide oxalique $CO(OH)CO(OH)$	0,65 - 12,65	*Löflund et al.*, 2002
	0,05 - 15,20	*Decesari et al.*, 2005
	0,1 - 17,4	*Marinoni et al.*, 2004
Formaldéhyde $HCHO$	8,0 - 14,0	*Collett Jr et al.*, 1990
	< 0,1 - 33,0	*Munger et al.*, 1995
	3,0 - 38,0	*Munger et al.*, 1989
	13,6 - 61,5	*Igawa et al.*, 1989
	3,3 - 7,0	*Houdier et al.*, 2011
	3,8 - 10,4	*Ervens et al.*, 2013
Acétaldéhyde CH_3CHO	1,2 - 5,1	*Igawa et al.*, 1989
	0,7 - 2,3	*Houdier et al.*, 2011
Glyoxal $CHOCHO$	< 0,15 - 27,0	*Munger et al.*, 1995
	1,2 - 55,0	*Igawa et al.*, 1989
	0,4 - 2,3	*Houdier et al.*, 2011
Méthylglyoxal CH_3COCHO	< 0,3 - 7,0	*Munger et al.*, 1995
	3,7 - 26,9	*Igawa et al.*, 1989
	0,02 - 1,1	*Houdier et al.*, 2011

Les composés carbonylés sont également présents dans l'eau des nuages. Ils résultent essentiellement de leur dissolution à partir de la phase gazeuse vers la phase aqueuse. Dans la phase aqueuse, l'oxydation des aldéhydes peut produire des acides carboxyliques mais aussi conduire éventuellement à la formation de molécules plus grosses par des phénomènes d'accrétion, aboutiisant par exemple à la formation d'oligomères (*Ervens et Volkamer*, 2010; *Ervens et al.*, 2011).

Les quantités de composés carbonylés tels que le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, le glyoxal et le méthylglyoxal dans l'eau des nuages ont été rapportées dans le **Tableau 1**. Dans la phase gazeuse, le formaldéhyde est produit par la combustion de la biomasse et des combustibles fossiles et par l'oxydation photochimique d'hydrocarbures. Ce composé est transféré efficacement dans la phase aqueuse en raison de sa constante de Henry, expliquant sa forte concentration dans l'eau des nuages.

La proportion de matière organique indéterminée dans l'eau des nuages reste encore élevée et représente près de 90 % de la matière organique totale dissoute. Parmi cette matière organique complexe, des HULIS ont été identifiées ainsi que des protéines, de la cellulose, des polyols, des acides aminés, des acides gras, des sucres, des polysaccharides, des hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques, *etc*. (*Saxena et Hildemann*, 1996; *Feng et Möller*, 2004; *Hoffer et al.*, 2004; *Graber et Rudich*, 2006).

Les composés organiques représentent une fraction importante en masse des particules d'aérosols dans la troposphère (*Saxena et Hildemann*, 1996; *Fuzzi et al.*, 2002). Une fois dans la phase aqueuse, ils peuvent subir des réactions d'oxydation. En effet, la phase aqueuse des nuages est le lieu d'une réactivité complexe, associée à la production de radicaux. Ces radicaux peuvent être reliés à la présence d'espèces oxydantes comme les métaux de transitions (TMI ou Transition Metal Ion) ou encore la présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'oxydation organique dans les nuages peut aboutir à une fragmentation des chaînes carbonées mais des phénomènes d'accrétion peuvent également se produire et former ainsi, par exemple, des oligomères. La réactivité nuageuse peut aussi être une source potentielle d'AOS (Aérosols Organiques Secondaires) dans l'atmosphère après l'évaporation des gouttelettes des nuages (*Blando et Turpin*, 2000; *Lim et al.*, 2005; *Altieri et al.*, 2006; *Ervens et al.*, 2011)

1.2.3. Les oxydants

Dans l'eau des nuages, les ions de métaux de transition (TMI) tels que le fer (Fe), le manganèse (Mn) et le cuivre (Cu) jouent un rôle important sur les capacités oxydatives de la phase liquide des nuages en produisant des radicaux $^{\bullet}OH$, $HO_2^{\bullet}$ et $O_2^{-\bullet}$ (*Graedel et al.*, 1986; *Faust et Zepp*, 1993).

Le peroxyde d'hydrogène participe également à la production de radicaux dans l'eau des nuages à travers, par exemple, sa dégradation par voie photochimique et par la réaction de Fenton avec le fer sous son état d'oxydation de type +II (*Parazols et al.*, 2006). Le peroxyde d'hydrogène se trouve en concentration importante dans l'eau des nuages (*Marinoni et al.*, 2011). Ce puissant oxydant provient de sa solubilisation depuis la phase gaz ainsi que de sa photo-production en phase aqueuse.

1.3.La réactivité en phase aqueuse

Les nuages sont des milieux réactionnels efficaces pour plusieurs raisons : (1) les processus photochimiques à l'intérieur des gouttelettes sont augmentés par rapport aux conditions en ciel clair; (2) certaines réactions chimiques homogènes dans les nuages sont plus rapides que les réactions équivalentes dans la phase gaz, et les réactions impliquant des espèces ioniques peuvent-être d'importance ; (3) les interactions entre la phase aqueuse et la phase solide particulaire peuvent également contribuer à des processus chimiques dans les nuages, comme lors de la dissolution d'espèces particulaires solubles.

La capacité oxydante de l'eau des nuages est liée principalement aux composés de type H_xO_y (radicaux hydroxyles $^{\bullet}OH$, hydroperoxyles $HO_2^{\bullet}$ et ions superoxydes $O_2^{\bullet-}$ et peroxyde d'hydrogène H_2O_2) qui résultent d'interactions chimiques diverses (photolyse et réactions chimiques) et d'échanges entre la phase gaz et la phase liquide.

Le radical $^{\bullet}OH$, l'oxydant atmosphérique le plus important, peut provenir soit d'un transfert depuis la phase gaz (*e.g.* production par photolyse de l'ozone ou de l'acide nitreux), soit de sa production *in situ* dans la phase aqueuse comme par exemple par réaction Fenton (*Zepp et al.*, 1992; *Deguillaume et al.*, 2004; *Herrmann et al.*, 2005). La photolyse de H_2O_2, NO_3^- et des complexes aqueux de Fe(III) sont également des sources importantes de radicaux $^{\bullet}OH$ (*Sedlak et Hoigné*, 1993; *Benkelberg et Warneck*, 1995). Toutefois, de nombreuses incertitudes demeurent sur le rôle du fer dans le bilan en oxydants du nuage. En effet, ce composé peut former de nombreux complexes avec la matière organique dissoute (*Long et al.*, 2013) et la photo-réactivité de ces complexes n'est pas encore totalement connue.

Les radicaux nitrés jouent également un rôle d'importance dans les phénomènes d'oxydation en milieu troposphérique. Les réactions chimiques liées aux radicaux $NO_3^{\bullet}$ ont majoritairement lieu de nuit en raison de la destruction rapide des radicaux $NO_3^{\bullet}$ par photolyse. Les radicaux $NO_3^{\bullet}$ sont principalement formés par réaction de l'ozone avec le dioxyde d'azote. Dans la phase aqueuse des nuages, les $NO_3^{\bullet}$ peuvent être produits par transfert d'électrons des ions nitrates vers un autre radical mais cette réaction est très minoritaire. Leur présence dans les nuages est principalement liée à leur transfert de la phase gaz vers la phase aqueuse. Dans les zones polluées, les radicaux $NO_3^{\bullet}$ peuvent devenir le principal oxydant de la phase aqueuse (*Herrmann et al.*, 2005).

L'ensemble des radicaux de la phase aqueuse des nuages ($^{\bullet}OH$, $NO_3^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$, $SO_4^{-\bullet}$, $Cl_2^{-\bullet}$, $Br_2^{-\bullet}$et $CO_3^{-\bullet}$) peut oxyder la matière organique présente (*Herrmann*, 2003; *Herrmann et al.*, 2010). Pour simuler la chimie organique dans les nuages, des mécanismes en phase aqueuse ont été développés. Ainsi, les études de modélisation ont montré l'importance des voies d'oxydation à l'intérieur des nuages, par exemple en ce qui concerne la formation d'acide oxalique, le composé organique le plus abondant dans les aérosols troposphériques, à partir de glyoxal (*Herrmann et al.*, 2005; *Lim et al.*,

2005). Cependant, en raison du grand nombre de composés et de voies chimiques, de nombreuses incertitudes demeurent sur les cinétiques et les mécanismes impliqués.

2. Les microorganismes dans les nuages

Environ 10 à 40 % de la totalité des aérosols présents dans l'atmosphère appartiennent à la classe des aérosols biologiques (*i.e.* des particules vivantes ou mortes qui sont ou qui dérivent d'organismes vivants) (*Morris et al.*, 2011). Parmi eux, on recense des bactéries et des champignons, ces êtres microscopiques tantôt appréciés pour leur potentiel biotechnologique et tantôt détestés pour leur pathogénicité. Les microorganismes ont été identifiés dans de nombreux compartiments de l'atmosphère, y compris dans les nuages où ils ont été décrits pour la première fois par *Sattler et al.* (2001). Cette section s'intéressera à décrire leur origine, leur diversité et leur nombre dans les nuages.

2.1.Historique

La présence de microorganismes vivants dans l'atmosphère est évoquée depuis plusieurs siècles. Leur existence a été suggérée pour la première fois en 1670 par Antonie van Leeuwenhoek qui émit l'hypothèse que certains organismes peuvent vivre dans l'air mais qu'ils sont trop petits pour être vus à l'œil nu. Un siècle plus tard, la thèse de la génération spontanée (hypothèse selon laquelle un être vivant peut apparaître sans ascendance) est réfutée par Lazzaro Spallanzani qui apporte ainsi la preuve que la contamination des aliments est due à de petits organismes présents dans l'air (1765). Au milieu du XIXe siècle, ces organismes sont enfin observés, d'abord par Charles Darwin sur des poussières transportées par l'air (*Darwin*, 1846) puis par Louis Pasteur qui décrit des bactéries et des moisissures viables dans l'air des rues de Paris et, à plus faible concentration, dans l'air des hautes montagnes (*Pasteur*, 1861).

Depuis cette époque, la présence de microorganismes dans l'atmosphère a attiré l'attention de la communauté scientifique en particulier pour ses implications dans des questions de santé publique (allergies, asthme, irritations, *etc.*) et de transmission d'agents pathogènes (*cf.* l'article de synthèse de *Polymenakou* (2012)). Plus récemment, les microorganismes de l'air ont été étudiés pour leurs impacts dans les domaines de la climatologie et de l'écologie ainsi que pour leurs rôles dans les processus physico-chimiques de l'atmosphère (*Deguillaume et al.*, 2008; *Delort et al.*, 2010; *Womack et al.*, 2010; *Després et al.*, 2012). Actuellement, des microorganismes vivants ont été identifiés dans la plupart des compartiments de l'atmosphère qu'il s'agisse de l'air sec ou de l'eau des nuages, des brouillards ou des précipitations (dont la pluie, la neige et les grêlons), du niveau de la mer jusqu'à la stratosphère ou la mésosphère (*Imshenetsky et al.*, 1978; *Wainwright et al.*, 2003).

2.2. Emission et transport

Les microorganismes sont omniprésents sur Terre que ce soit dans les eaux de surface, le sol ou sur la végétation. Ils peuvent connaître un cycle de vie *via* l'atmosphère comme illustré sur la **Figure 4** et ainsi coloniser de nouveaux environnements. Récemment, le concept d'une biogéographie dans l'atmosphère a été introduit décrivant ce milieu comme un écosystème spécifique, transitoire et ouvert (*Womack et al.*, 2010).

L'émission des microorganismes dans l'atmosphère est principalement liée à des processus météorologiques. Elle varie en fonction du lieu d'émission (selon le type de couverture de la surface par exemple) et en fonction du temps (selon la saison et le moment de la journée) (*Lighthart*, 1997).

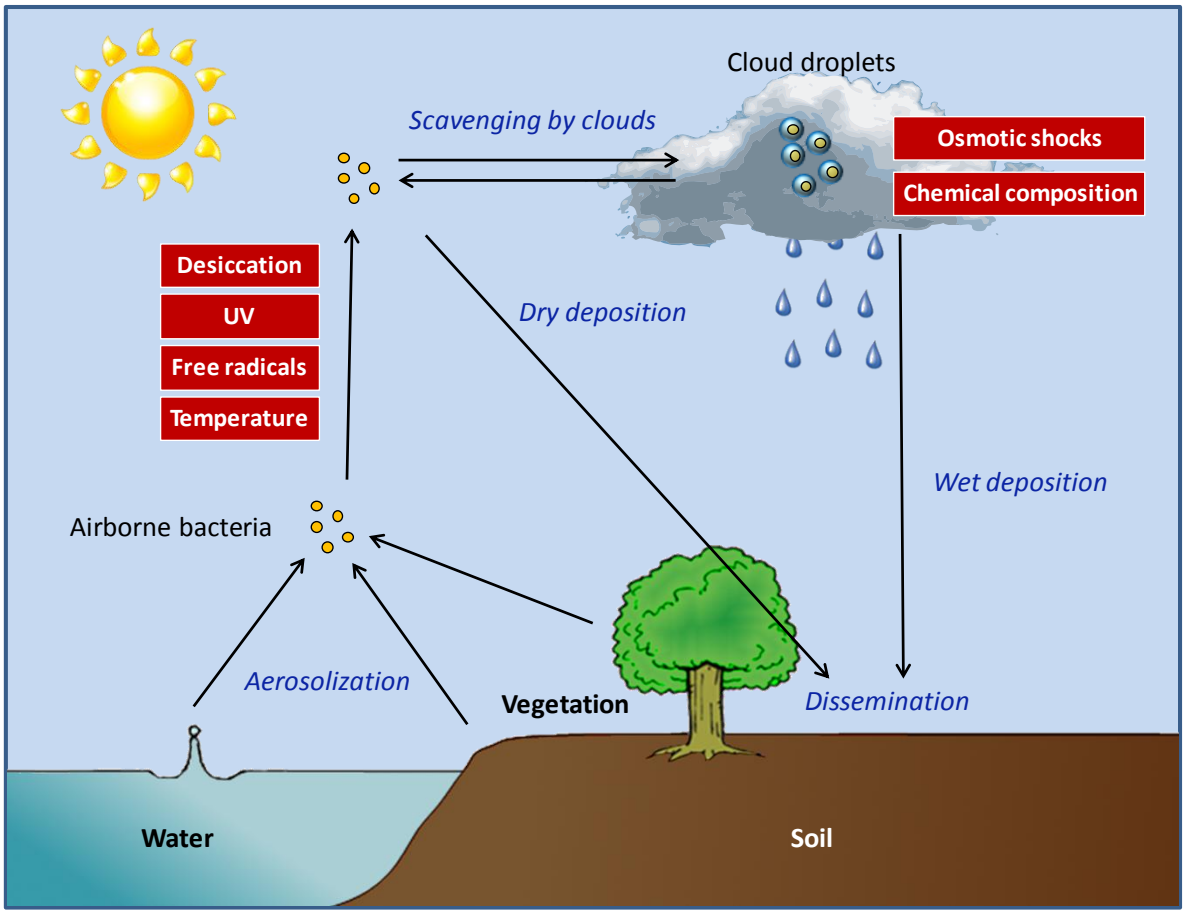


***Figure 4** : Représentation schématique du cycle de vie des microorganismes dans l'atmosphère. Les facteurs limitant leur survie et leur activité sont indiqués en rouge (*Joly et al.*, 2013a).*

Les océans sont une source importante de microorganismes non seulement en raison de l'énorme volume qu'ils représentent (70 % de la terre est recouverte d'eau de mer), mais aussi en raison de leur microcouche de surface qui peut être enrichie jusqu'à 10.000 fois en microorganismes par rapport à l'eau située en dessous (*Grammatika et Zimmerman*, 2001). L'interaction directe de cette couche avec l'air assure un transfert de biomasse important vers l'atmosphère. Lorsque les bulles d'air produites par le bris des vagues ou les précipitations éclatent à la surface de l'eau, les

aérosols dont les cellules microbiennes sont éjectés dans l'atmosphère en même temps que les microgouttelettes (*Blanchard*, 1989). En fonction de différents paramètres (la taille de la goutte, la longueur de trajet des bulles dans l'eau, le caractère hydrophobe de la surface des cellules, la composition chimique du liquide), la concentration de bactéries dans les gouttes éjectées peut être plusieurs centaines de fois supérieure à celle de l'eau à partir de laquelle l'aérosol a été formé (*Burger et Bennett*, 1985; *Aller et al.,* 2005).

Les microorganismes peuvent également être aérosolisés depuis la végétation et le sol. La surface des parties aériennes des plantes (les feuilles, les fleurs et les fruits) est le réservoir d'un grand nombre de microorganismes. On estime qu'à l'échelle planétaire, environ 10^{24} à 10^{26} bactéries colonisent la surface des feuilles (*Morris et Kinkel*, 2002) ce qui place la végétation comme une importante source d'émission de microorganismes vers l'atmosphère, de même que le sol, avec ses quelques 10^{29} bactéries (*Whitman et al.*, 1998). Le principal facteur responsable de leur émission depuis ces deux compartiments est la vitesse du vent qui permet de soulever directement les microorganismes ou les poussières sur lesquelles ils vivent. La formation d'aérosols peut également résulter de l'impact de gouttes de pluie sur les feuilles ou le sol (*Lindemann et Upper*, 1985; *Hirano et Upper*, 2000; *Huffman et al.*, 2013).Néanmoins, d'autres paramètres météorologiques peuvent également agir sur l'aérosolisation tels que l'humidité et la température qui interviennent en modifiant les forces de liaison entre les cellules et leur support (*Lindemann et Upper*, 1985; *Tong et Lighthart*, 2000; *Jones et Harrison*, 2004).

La plupart des microorganismes en suspension au dessus des terres sont associés à des particules de diamètre aérodynamique supérieur à 3 µm (*Shaffer et Lighthart*, 1997). Il peut s'agir de cellules agglomérées ou de microorganismes s'élevant dans l'air en étant accrochés à des fragments végétaux ou animaux, à des particules de sol, *etc.* (*Bovallius et al.*, 1978 ; *Donaldson et al.*, 1983 ; *Leck et Bigg*, 2005; *Huffman et al.*, 2010). Cette association des bactéries avec des particules leur permet d'augmenter leurs chances de survie dans l'atmosphère en se protégeant d'une partie des stress environnementaux (*e.g. Lighthart*, 2000).

En raison de leur taille, les bactéries font partie des particules ayant le temps de résidence dans l'atmosphère le plus long. Généralement, il est considéré que les microorganismes peuvent séjourner dans l'atmosphère plusieurs jours voire semaines (entre 2 et 15 jours selon les estimations numériques de *Burrows et al.*, 2009a) et par conséquent, ils peuvent être transportés sur de longues distances (des milliers de kilomètres) et ainsi coloniser de nouveaux habitats (*Prospero et al.*, 2005 ; *Kellogg et Griffin*, 2006 ; *Smith et al.*, 2013). Les microorganismes peuvent être éliminés de l'atmosphère soit par dépôt sec (adhésion à des bâtiments, des plantes, le sol ou toute autre surface en contact avec l'atmosphère), soit par dépôt humide (précipitations sous forme de pluie, de neige ou d'autres formes d'hydrométéores glacés). Par conséquent, leur temps de séjour dans l'atmosphère dépend des facteurs météorologiques (température, humidité, intensité du vent et transport horizontal et vertical des masses d'air, *etc.*), de leur source d'émission (des régions avec

peu de précipitations conduisent à des temps de résidence plus long) ainsi que de leur capacité à rejoindre un nuage (activité en tant que CCN ou IN) et à le faire précipiter (activité glaçogène ou Ice Nucleation Activity (INA)) (*Burrows et al.*, 2009b).

2.3.Composition microbienne de l'eau des nuages

Alors que les études sur la composition microbienne des écosystèmes terrestres et marins sont en constante augmentation, seules quelques études reportent la diversité microbienne dans l'atmosphère et moins encore se concentrent sur la phase aqueuse des nuages. D'après *Rothschild et Mancinelli* (2001), « l'air est l'une des dernières frontières de l'exploration biologique sur Terre ». Pourtant, ce compartiment joue un rôle majeur dans la dissémination des microorganismes à travers le globe. La détermination de la diversité et de la concentration en microorganismes est également une question importante car ils peuvent influer sur la formation des nuages et des précipitations.

Les données rassemblées ci-dessous résument l'état de nos connaissances sur la biodiversité de l'eau des nuages (pour la description de la diversité des microorganismes dans l'atmosphère, se référer aux articles de synthèse de *Burrows et al.* (2009), de *Després et al.* (2012) et de *Gandolfi et al.* (2013)).

2.3.1. Description quantitative

Les observations microscopiques d'échantillons d'eau des nuages ont révélé la présence de ~10^3 à ~10^5 bactéries par mL et ~10^2 à ~10^4 champignons par mL d'eau dans les nuages de basse altitude (les concentrations détaillées sont décrites dans le **Tableau 2**). Parmi la communauté totale des microorganismes, une très faible proportion d'entre eux sont cultivables : moins de 1 % à 2,2 % des bactéries et 3 % à 8 % des levures sont cultivables en laboratoire sur un milieu R2A, milieu destiné à la croissance des microorganismes dans l'eau potable (*Bauer et al.*, 2003; *Vaïtilingom et al.*, 2012). Ce ratio est similaire au pourcentage rencontré dans d'autres environnements tels que l'eau de mer ou les lacs (*Amann et al.*, 1995; *Bernard et al.*, 2000).

***Tableau 2** : Concentrations des microorganismes mesurées dans l'eau de nuages.*

Site	Altitude (m)	Concentration bactérienne (mL^{-1})	Concentration fongique (mL^{-1})	Etude
Puy de Dôme, France	1465	$3,3\ 10^3$ - $2,5\ 10^5$	$8,9\ 10^2$ - $3,2\ 10^4$	*Amato et al.*, 2007d; *Vaïtilingom et al.*, 2012
Mont Rax Autriche	1644	$4,9\ 10^3$ - $8,1\ 10^4$	$5,9\ 10^3$	*Bauer et al.*, 2002, 2003
Mont Sonnblick Autriche	3106	$7,9\ 10^2$ - $2,5\ 10^3$		*Sattler et al.*, 2001
Prélèvement par avion, Michigan, U.S.A	2240 - 3350	$9,2\ 10^4$ - $4,3\ 10^5$		*Kourtev et al.*, 2011

Les concentrations microbiennes dans l'atmosphère sèche sont connues pour avoir une variabilité temporelle (selon le moment du jour ou la saison (*Lighthart*, 1997; *Fahlgren et al.*, 2010; *Bowers et al.*, 2012)) et spatiale (verticale et horizontale ; *Fulton*, 1966). Dans l'eau des nuages, une tendance saisonnière de la concentration en microorganismes a été mise en évidence par *Amato et al.* (2007b) qui ont identifié une concentration totale en bactéries plus faible en été et plus importante en hiver. A l'inverse, le nombre de bactéries cultivables atteignait son maximum en été et son minimum en hiver, probablement en raison des conditions climatiques plus défavorables à la survie de la majorité des bactéries. Par la suite, *Vaïtilingom et al.* (2012) se sont également intéressés à étudier la variabilité saisonnière de la concentration en nuage mais sur un plus grand nombre de données (dont celles des travaux d'*Amato et al.* (2007b)) et n'ont pu mettre en avant aucune variation saisonnière significative.

En outre, l'origine de la masse d'air dans laquelle se situe le nuage influence la concentration en microorganismes. En effet, tout comme les concentrations en microorganismes dans l'atmosphère sèche sont plus importantes dans les zones urbaines et rurales par rapport aux sites côtiers (*Bovallius et al.*, 1978; *Di Giorgio et al.*, 1996), les nuages issus de masses d'air en provenance des zones continentales tendent à héberger davantage de microorganismes que celles originaires des régions océaniques (*Vaïtilingom et al.*, 2012). Bien que les études d'*Amato et al.* (2007b) aient identifié une corrélation positive entre la concentration en microorganismes et le pH, un marqueur de l'influence anthropique d'un nuage (*Marinoni et al.*, 2004), les travaux de *Vaïtilingom et al.* (2012) sur le long terme n'ont mis en évidence aucune corrélation significative entre les concentrations microbiennes et les caractéristiques physico-chimiques des nuages (pH, composition ionique, *etc*.).

A partir de mesures d'adénosine tri-phosphate (ATP), une molécule impliquée dans le métabolisme cellulaire énergétique, et de colorations permettant de différencier les cellules viables et les cellules mortes, il a été démontré qu'une grande majorité des cellules, pouvant aller jusqu'à 95 %, est métaboliquement active (*Bauer et al.*, 2002; *Amato et al.*, 2007c; *Hill et al.*, 2007). Par ailleurs, les microorganismes pourraient même se diviser malgré la basse température qui règne dans l'atmosphère, à condition que leur temps de résidence soit suffisant : dans un nuage persistant pendant 24h à 0°C, les microorganismes pourraient voir leur population augmenter de 20 % (*Sattler et al.*, 2001). Cette activité métabolique est à la source de nombreuses interrogations sur le rôle des microorganismes dans la composition chimique des nuages.

2.3.2. Description qualitative

Jusqu'à maintenant, les quelques études s'intéressant à la composition microbienne de l'eau des nuages se sont principalement basées sur des techniques culturales. Ces méthodes, en plus de fournir une information quantitative, permettent également d'isoler et de conserver des souches microbiennes issues des nuages dans le but de déterminer leurs caractéristiques (conditions de

croissances, sources de carbone utilisées, *etc*.) ou de les utiliser en laboratoire comme modèle pour des expériences. Cependant, ces méthodes sont soumises à un biais important puisque seule une faible proportion des microorganismes peut être cultivée sur un milieu donné. Les techniques de biologie moléculaire (*i.e.* basées sur les acides nucléiques des cellules) sont aujourd'hui une alternative de choix pour contourner les limitations des techniques culturales. Cependant, ces méthodes ont jusqu'à maintenant été très peu appliquées au milieu nuage, notamment à cause des faibles concentrations cellulaires présentes et par conséquent, des grandes quantités de volume nécessaires pour les analyses.

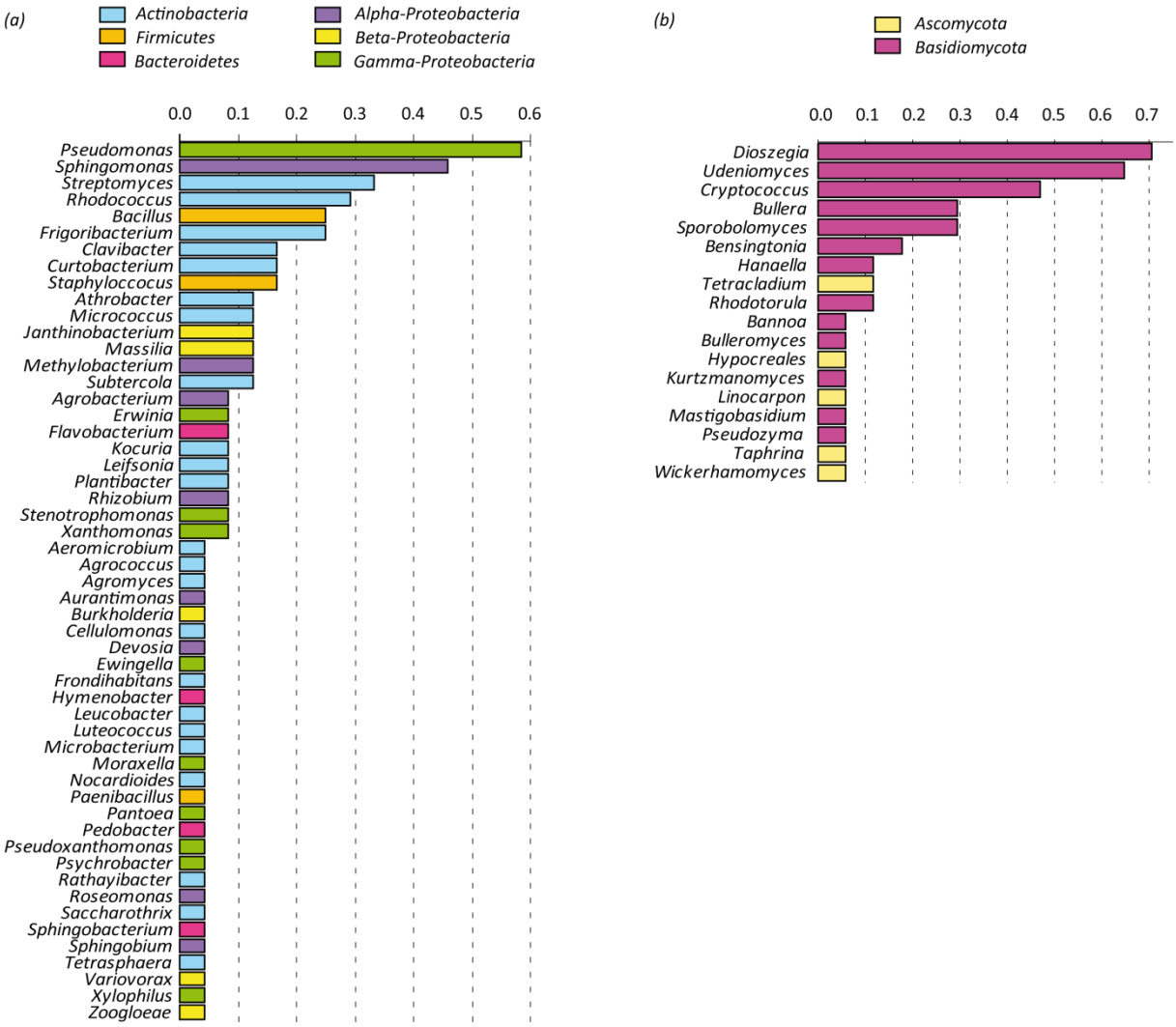


Figure 5 *: Fréquence d'observation des souches cultivables de bactéries (a) et de levures (b) dans l'eau de nuage prélevée au sommet du puy de Dôme entre 2003 et 2010 sur 24 et 17 prélèvements respectivement (*Joly et al.*, 2013a).*

Les souches bactériennes identifiées à partir de l'eau des nuages présentent des similitudes importantes avec celles rencontrées sur la végétation, dans les eaux de surface, les sols et les environnements froids.

Parmi les bactéries hétérotrophes cultivables, les espèces appartenant aux phyla des Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria (α-, β-, γ-) et Bacteroidetes sont prédominantes (**Figure 5**). A un niveau plus fin, les souches appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Streptomyces* et *Rhodococcus* sont les plus fréquemment rencontrées (**Figure 5**) (*Amato et al.,* 2007d; *Vaïtilingom et al.*, 2012). Les études basées sur l'ADN ont révélé la présence de ces mêmes groupes (*Ahern et al.*, 2007; *Bowers et al.*, 2009) ainsi que des espèces cyanobactériennes (bactéries photosynthétiques) (*Kourtev et al.*, 2011). Ces mêmes phyla ont également été décrits dans d'autres compartiments de l'atmosphère tels que l'air sec (*Després et al.*, 2007; *Fierer et al.*, 2008; *Bowers et al.*, 2012; *Zweifel et al.*, 2012), la neige (*Amato et al.*, 2007c; *Bowers et al.*, 2009), ainsi que les grêlons (*Šantl-Temkiv et al.*, 2012).

Les espèces appartenant au genre *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquistes capables d'utiliser une large gamme de sources de carbone. Sous certaines conditions, elles peuvent produire des sidérophores, molécules chélatant les métaux de transition, afin d'augmenter l'absorption de fer, un élément nécessaire dans de nombreuses réactions enzymatiques (*Cody et Gross*, 1987). Ces microorganismes pourraient ainsi modifier la chimie du nuage car le fer est un élément oxydant central dans la réactivité en phase aqueuse (*Deguillaume et al.*, 2005) En plus de ces propriétés, certaines bactéries phytopathogènes appartenant à l'espèce *Pseudomonas syringae* sont connues pour induire la formation de glace à partir de gouttes d'eau surfondue dans des conditions similaires à celles rencontrées dans les nuages (*cf.* le paragraphe 4.2).

Les espèces appartenant au genre *Sphingomonas* sont des bactéries pigmentées jaunes ou orange couramment rencontrées dans les milieux aquatiques ou en association avec des plantes. Elles sont souvent décrites comme un genre majeur dans l'air (*Maron et al.*, 2005; *Brodie et al.*, 2007; *Fierer et al.*, 2008; *Fahlgren et al.*, 2011) et dans des endroits très reculés et constamment gelés tels que l'Antarctique et les glaciers (*Christner et al.*, 2000; *Busse et al.*, 2003; *Foght et al.*, 2004; *Miteva et al.*, 2004). La prévalence des *Sphingomonas* dans ces environnements suggère que ces bactéries sont transportées de façon efficace sur de longues distances par l'air, les nuages et les précipitations. En outre, certaines souches ont été reportées comme extrêmement résistantes à de fortes concentrations d'oxydants comme le peroxyde d'hydrogène, l'une des principales sources de radicaux libres dans l'eau des nuages. Elles ont aussi la capacité de s'adapter rapidement à l'évolution des conditions nutritives (*Eguchi et al.*, 1996).

Les espèces du genre *Streptomyces* sont des bactéries communément rencontrées dans le sol, dans l'air et dans les glaciers et sont capables d'utiliser une grande variété de composés en tant que source de carbone. Elles ont été particulièrement étudiées en raison de leur capacité à former des molécules d'intérêt médical comme des antibiotiques et des médicaments contre le cancer (*Arias et al.*, 2011; *Solecka et al.*, 2012). Les bactéries du genre *Streptomyces* sont des bactéries sporulantes : les spores sont disséminées dans l'air par le mycélium aérien lorsque les conditions ne sont pas optimales pour leur survie. Parmi les autres genres rencontrés dans l'eau des nuages, les espèces du

genre *Bacillus* sont également des bactéries formant des spores. Elles produisent ces spores comme forme de résistance afin d'augmenter leurs chances de survivre à des conditions défavorables semblables à celles rencontrées dans les nuages (dessiccation, absence ou faible concentration de nutriments, lumière UV, composés toxiques) dans l'attente de conditions favorables.

Enfin, les espèces du genre *Rhodococcus* sont des bactéries ubiquistes, pigmentées rouges ou orange, fréquemment décrites dans l'air et dans les échantillons de glacier. Elles sont capables de dégrader une grande variété de polluants (par exemple, des hydrocarbures) et sont couramment utilisés dans les biotechnologies pour synthétiser des molécules d'intérêt (acrylamide, vitamines, antimicrobiens, *etc*.) (*Larkin et al.*, 2005).

La composition bactérienne de l'eau de nuage varie en fonction des saisons (**Figure 6**; *Amato et al.*, 2007d). La proportion relative de γ-Protéobactéries, par exemple, est multipliée par un facteur proche de 5 en été par rapport à l'hiver potentiellement en raison de leur plus forte résistance aux UV (*Agogué et al.*, 2005) ou d'une augmentation de ses sources d'émission, les γ-Protéobactéries étant un phylum fréquemment associé à la végétation.

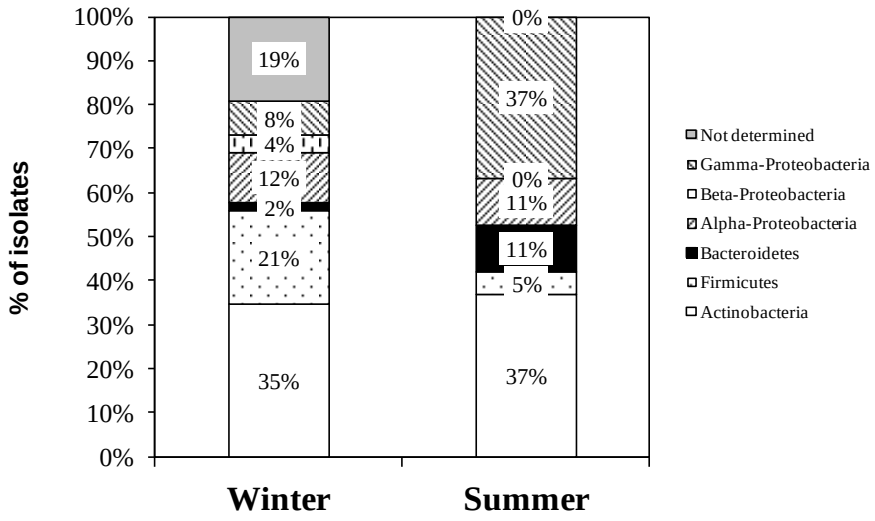


***Figure 6** : Composition de la microflore bactérienne cultivable en été et en hiver. Les données présentées sont les valeurs moyennées pour 4 évènements nuageux en hiver et pour 3 évènements nuageux en été (Amato et al., 2007d).*

En ce qui concernant les espèces de champignons, les levures cultivables isolées à partir de l'eau des nuages appartiennent principalement aux phyla des Ascomycètes et des Basidiomycètes avec une dominance des genres *Dioszegia*, *Udeniomyces* et *Cryptococcus* (*Amato et al.*, 2007d; *Vaïtilingom et al.*, 2012). Malgré le peu d'identification de champignons filamenteux dans les nuages, ils sont eux-aussi présents surtout sous forme de spores de dissémination (*Amato et al.*, 2005, 2007d).

Parmi les bactéries et les levures isolées à partir de l'eau des nuages, 55 % des souches cultivables présentent une pigmentation. La plupart d'entre elles sont de couleur orange (63 %) et les autres sont jaunes ou roses (27 % et 10 % respectivement) (*Vaïtilingom et al.*, 2012). Les pigments

sont connus pour agir en protégeant les cellules vivantes dans des conditions hostiles tels que les rayonnements UV (*Tong et Lighthart*, 1997b) ou les faibles températures (*Fong et al.*, 2001). De plus, ils améliorent les chances pour une bactérie d'être aérosolisée (*Burger et Bennett*, 1985). Ces deux raisons peuvent expliquer la proportion importante de cellules pigmentées dans l'eau des nuages.

En conclusion, l'eau des nuages héberge une microflore diversifiée montrant des similitudes avec celle présente dans les écosystèmes sources. Bien que la microflore cultivable ait été décrite, il serait maintenant nécessaire d'avoir accès à la composition de la microflore totale en utilisant les outils de biologie moléculaire.

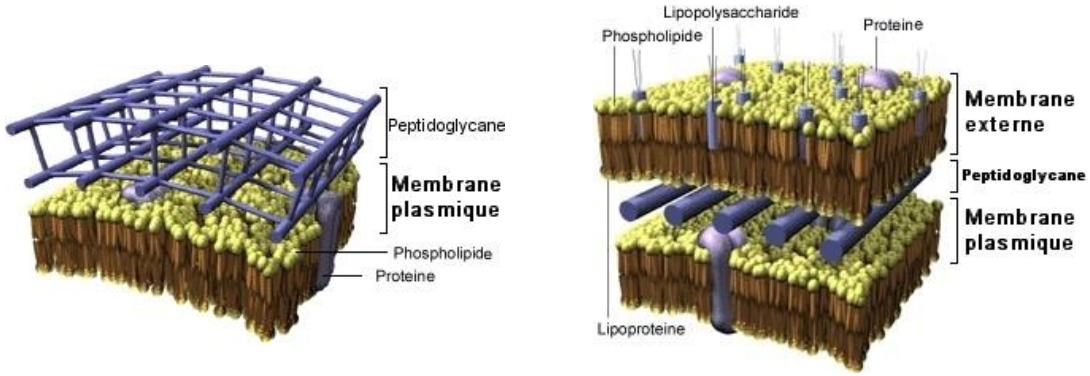
Il a été montré qu'une très large majorité des cellules microbiennes reste métaboliquement active dans les nuages. Ceci implique que malgré la difficulté des conditions atmosphériques, ces microorganismes peuvent vivre, ou au moins survivre, dans ce milieu. La partie suivante s'intéressera à décrire les conséquences des conditions physico-chimiques sur la survie des cellules microbiennes dans de telles conditions.

3. Impact des conditions physico-chimiques des nuages sur les microorganismes

D'un point de vue général, les nuages, et plus globalement l'atmosphère, sont des environnements hostiles pour les microorganismes (*Jones et Harrison*, 2004; *Delort et al.*, 2010; *Womack et al.*, 2010). En plus des faibles teneurs en nutriments, des brusques changements de température, des effets de la lumière solaire et des oxydants rencontrés dans une atmosphère sèche, les microorganismes doivent faire face dans les nuages à la présence possible de nombreux composés toxiques, à des changements de pression osmotique et à une phase liquide pouvant être acide (**Figure 4**).

Maintenir l'homéostasie cellulaire est alors crucial pour préserver la viabilité des cellules. Cet équilibre est notamment permis grâce à la présence d'une paroi cellulaire qui isole le contenu intracellulaire du milieu extérieur. Chez les bactéries, deux types de parois sont différenciées par la coloration de Gram (**Figure 7**). Chez les bactéries à Gram positif, la membrane cellulaire est recouverte à l'extérieur par une épaisse couche de peptidoglycane, une association de sucres N-acétyl-muramique et N-acétyl-glucosamine et de courts peptides. La paroi des bactéries à Gram négatif, par contre, est composée d'une couche fine de peptidoglycane insérée entre deux membranes phospholipidiques : l'une interne et l'autre externe. La capacité des bactéries à résister aux conditions environnementales dépend en partie de la capacité de leur paroi à maintenir le contenu intracellulaire à l'écart des stress et par conséquent, selon que les bactéries possèdent une paroi à Gram positif ou négatif, leur sensibilité peut varier.

Cette partie s'intéresse à décrire comment certains facteurs de l'atmosphère peuvent influencer la survie des cellules microbiennes ainsi que les réponses mises en place par les microorganismes pour se protéger de ces attaques.



Bactérie à Gram positif

Bactérie à Gram négatif

Figure 7 *: Composition de la paroi cellulaire chez les bactéries à Gram positif et négatif, http://stl_bjb.ac-dijon.fr/microbio/mparoibacterienne.htm*

3.1.Lumière solaire et oxydants

Dans les nuages comme dans de nombreux environnements terrestres, les microorganismes sont soumis au rayonnement solaire, qu'il s'agisse de lumière visible (longueurs d'ondes de 400 à 750 nm) ou des ultra-violets (longueurs d'ondes de 280 à 400 nm). Ces rayons sont connus pour créer des dommages potentiellement létaux sur les cultures bactériennes. L'exposition au rayonnement solaire est d'ailleurs un procédé de décontamination de l'eau utilisé dans de nombreux pays (*Sommer et al.*, 1997). Les travaux de *Tong et Lighthart* (1997a) ont montré que les bactéries de l'atmosphère présentent des sensibilités aux rayons solaires différentes selon le moment de la journée : les bactéries présentes la nuit sont plus sensibles aux rayonnements solaires que celles collectées à midi par temps ensoleillé. Ceci suggère qu'il existe une sélection des bactéries par les rayonnements solaires au cours de la journée et que par conséquent, la lumière solaire est un facteur déterminant pour la survie des microorganismes.

Les rayonnements solaires, plus particulièrement les UV, peuvent agir de façon directe sur la viabilité des cellules en créant des mutations ou des cassures dans l'ADN. Toutefois, les rayons associés à ces dommages correspondent à de faibles longueurs d'ondes, généralement inférieures à 300 nm (254 nm pour les lampes germicides utilisées en laboratoire pour stériliser). Comme le montre la **Figure 8**, ces rayons sont cependant très minoritaires : moins de 1 % des rayonnements solaires atteignant la surface de la Terre sont attribués à des longueurs d'onde inférieures à 320 nm (*Coohill et Sagripanti*, 2009).

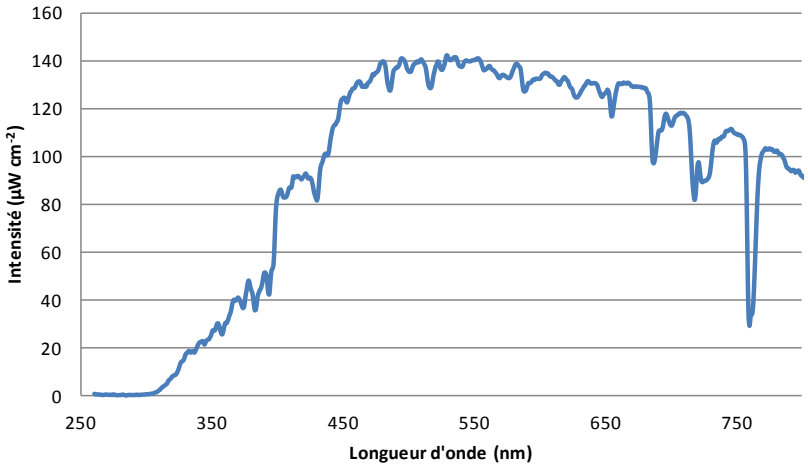


Figure 8 *: Spectre solaire reçu au niveau du sol par ciel clair, spectre mesuré le 23 Septembre2013 à 10h00 sur le campus des Cézeaux (Aubière ; altitude : ~400m).*

Par conséquent, la mortalité liée à la lumière solaire est principalement due à des longueurs d'onde supérieures. En effet, les rayonnements solaires peuvent agir indirectement en formant des espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) tels que les radicaux superoxydes $HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet -}$ et hydroxyles $^{\bullet}OH$ ainsi que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2. Ces radicaux peuvent alors oxyder l'ADN et les acides aminés des protéines causant de sévères dommages cellulaires (*Ames et al.*, 1993). De plus, ils sont responsables de la formation de radicaux secondaires *via* la peroxydation des lipides, une réaction qui multiplie l'effet toxique du stress oxydatif (**Figure 9)** (*Sigler et al.*, 1999).

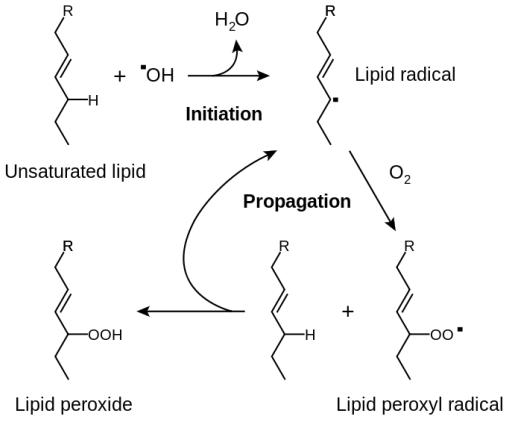


Figure 9 *: Chaîne réactionnelle conduisant à la peroxydation des lipides cellulaires (Young et McEneny, 2001).*

Les espèces radicalaires oxygénées ou nitrées présentes dans l'eau des nuages peuvent franchir les parois cellulaires. Une fois internalisés, ces composés peuvent interagir avec les métabolites cellulaires de façon identique à celle décrite précédemment.

Pour parer à ces effets néfastes, les microorganismes ont développés de nombreux mécanismes qui consistent à : (1) limiter la production de ROS ; (2) diminuer la concentration en ROS ; (3) réparer les dégâts subis par les bactéries (*Lushchak*, 2001). Le système de défense des microorganismes contre les ROS implique notamment des molécules antioxydantes telles que des vitamines (acide ascorbique ou vitamine C, α-tocopherol ou vitamine E, *etc.*), des polyamines ainsi que les pigments caroténoïdes (*Tong et Lighthart*, 1997b; *Dieser et al.*, 2010). Les pigments caroténoïdes ont la capacité de piéger les radicaux $HO_2^{\bullet}$ et l'oxygène singulet O_2 qui sont responsables de la peroxydation des lipides (*Stahl et Sies*, 2005) en transférant l' énergie d'excitation de ces radicaux vers les caroténoïdes qui la dissipent. Dans l'atmosphère, un grand nombre de bactéries pigmentées sont rencontrées : environ 55 % des bactéries dans les nuages et environ 80 % des bactéries en suspension dans l'atmosphère possèdent des pigments (*Amato et al.*, 2005; *Fahlgren et al.*, 2010; *Vaïtilingom et al.*, 2012; *Zweifel et al.*, 2012). L'un des genres dominant la composition microbienne des nuages, le genre *Sphingomonas*, est par ailleurs connu pour sa forte pigmentation orange ou jaune. Il est fortement probable que cette caractéristique lui confère un avantage pour la survie aux rayonnements solaires.

Un autre mécanisme de défense des cellules fait intervenir des enzymes spécifiques qui dégradent les oxydants (**Figure 10**). Il s'agit par exemple de superoxyde dismutases (SOD) et de catalases qui, par des réactions successives, permettent la transformation des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène en dioxygène et en eau (*Vorob'eva*, 2004). En ce qui concerne les oxydants nitrés, les bactéries peuvent intervenir sur les précurseurs des espèces hautement réactives : elles peuvent par exemple transformer le monoxyde d'azote en protoxyde d'azote, un composé plus stable *via* l'action d'une oxyde nitrique réductase (NOR).

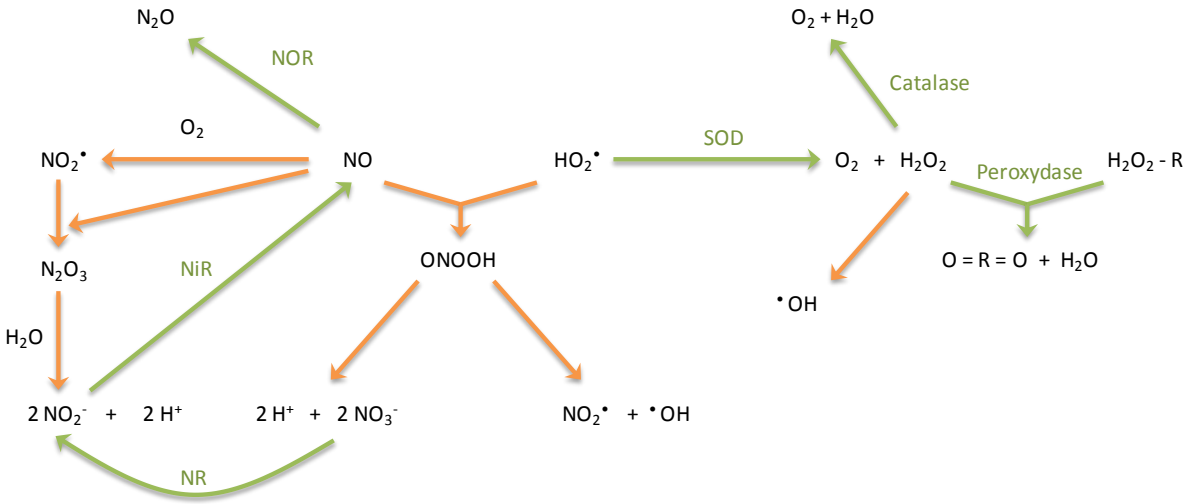


Figure 10 *: Schéma simplifié des voies de biotransformation des espèces oxydantes présentes dans les nuages. Les flèches vertes représentent les voies enzymatiques. Les flèches orange correspondent aux voies de transformation photochimique. NOR : Nitric Oxide Reductase ; NiR : Nitrite Reductase ; NR : Nitrate Reductase ; SOD : SuperOxyde Dismutase.*

Dans l'atmosphère, les microorganismes sont fréquemment rencontrés sous forme d'agglomérats de plusieurs cellules engluées dans une matrice d'exopolymères (EPS) ou en association avec des particules inertes (poussières du sol, fragments de feuilles, *etc.*). Ces particules peuvent alors jouer le rôle de bouclier en protégeant les cellules microbiennes des rayons incidents (*Örmeci et Linden*, 2002) augmentant ainsi les chances de survie des microorganismes. La formation de spores de résistance pour les champignons et certaines bactéries est également une stratégie pour améliorer les chances de survie aux rayonnements solaires.

3.2.Composition chimique

La composition chimique des nuages est fortement variable et dépend de l'origine de la masse d'air (*Charbouillot*, 2011). Selon les conditions, le pH peut varier entre 2,2 et 7,0 unités (*Marinoni et al.*, 2004; *Hill et al.*, 2007) ce qui, bien que très acide, est loin des limites connues de croissance des microorganismes qui peuvent se développer à des pH proches de 0 pour certaines espèces (*Schleper et al.*, 1995). Toutefois, la plupart des microorganismes ont des pH optimaux de croissance compris entre 5 et 9 (*Padan et al.*, 2005). Au-delà de ces limites, leur survie dépend de leur capacité à maintenir leur pH cytoplasmique à des valeurs compatibles avec leur métabolisme.

L'homéostasie du pH dans les cellules est d'importance puisque des variations trop importantes peuvent modifier la solubilité des protéines et l'activité enzymatique *via* la protonation de ces macromolécules. Même en conditions acides, les bactéries ont la capacité de maintenir le pH de leur cytoplasme à une valeur constante grâce à : (1) une faible perméabilité à l'entrée des protons et (2) une sortie importante d'ions H^+ *via* des pompes à protons intégrées dans leur membrane préservant de cette façon à la fois leur viabilité et leur activité métabolique (*Booth*, 1985). D'autre part, les cellules peuvent augmenter le pouvoir tampon de leur cytoplasme en produisant des protéines et du glutamate (*Booth et Kroll*, 1989). Elles peuvent également modifier la composition de leur membrane plasmique au profit d'acides gras saturés qui diminuent la fluidité de la membrane et protège la cellule plus efficacement (*Beales*, 2004).

En plus de l'acidité, les cellules microbiennes doivent faire face dans les nuages à de nombreux composés généralement considérés comme toxiques tels que les oxydants ou le formaldéhyde. Cependant, un grand nombre de microorganismes peuvent dégrader, voire utiliser ces substances « nocives » pour leur métabolisme comme présenté dans les paragraphes 3.1 et 5.1.2 de ce chapitre.

3.3.Evaporation et condensation

Les nuages sont des systèmes dynamiques où le temps de vie des gouttelettes, prises individuellement, est relativement court : l'eau se condense ou s'évapore autour des particules selon les conditions météorologiques rencontrées. Ces changements de phase causent des variations de concentration en solutés autour des particules en diluant les composés solubles des aérosols

(condensation) ou en concentrant les solutés dissous dans l'eau liquide autour des particules (évaporation).

Ces changements ne sont pas sans influence sur les microorganismes qui doivent s'adapter rapidement pour survivre. En effet, parce que les membranes cellulaires des bactéries sont perméables à l'eau mais pas à la plupart des solutés rencontrés dans les nuages, une variation d'osmolarité du milieu externe entraîne un choc hyper-osmotique (*i.e.* osmolarité supérieure dans le milieu externe) ou hypo-osmotique (*i.e.* osmolarité supérieure dans les cellules) pour les microorganismes. Les cellules répondent instantanément à ces changements par un flux d'eau entrant ou sortant pour équilibrer les concentrations intra- et extracellulaires (**Figure 11**). Ces échanges d'eau s'accompagnent de variations du volume cytoplasmique et se traduisent par une augmentation du volume cytoplasmique voire l'éclatement de la cellule lors d'un choc hypo-osmotique ou par un rétrécissement important lors d'un choc hyper-osmotique (*Csonka*, 1989). Le choc hyper-osmotique s'accompagne également d'une augmentation de la concentration des métabolites à l'intérieur de la cellule qui peut s'avérer toxique (*Gaxiola et al.*, 1992) et d'une diminution de l'eau disponible et donc de l'activité métabolique des cellules.

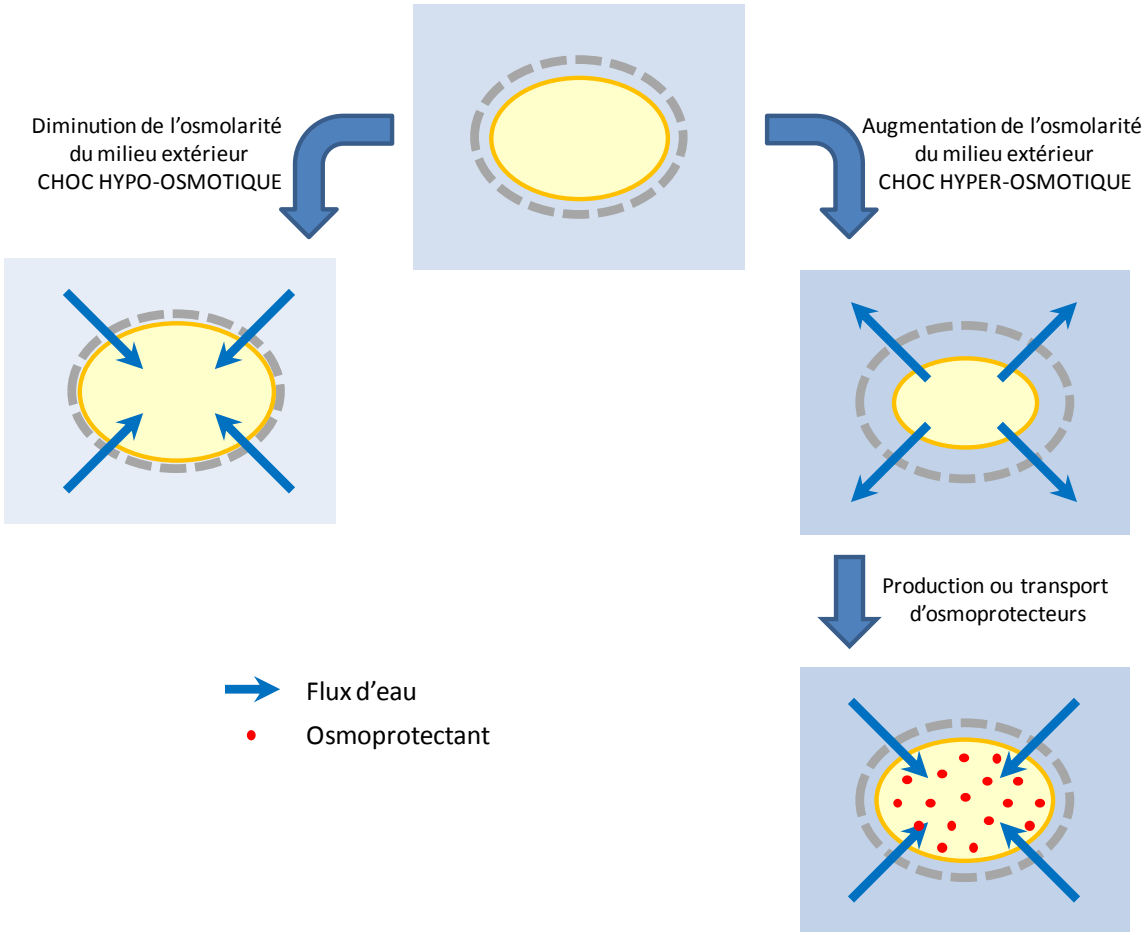


Figure 11 *: Changements cellulaires suite à un choc hypo-osmotique ou hyper-osmotique, adapté de Morbach et Krämer, (2002).*

Lors de faibles chocs hyper-osmotiques, le rétrécissement cellulaire peut être inversé par la production ou l'accumulation de composés appelés « solutés compatibles » ou « osmoprotecteurs ». Il s'agit d'ions K^+, d'acides aminés (glutamate, proline, alanine, *etc.*), de courts peptides ou de sucres (saccharose, tréhalose, *etc.*) qui n'interagissent pas avec l'activité métabolique des cellules mais qui permettent d'augmenter l'osmolarité du cytoplasme et donc de réhydrater la cellule (*Csonka*, 1989). Toutes ces molécules ont pour point commun d'être solubles même à forte concentration et d'avoir un flux à travers la membrane régulé par la cellule (transport actif) (*Gutierrez*, 1995).

L'une des causes de mortalité liée aux chocs osmotiques, en plus des variations du volume cytoplasmique, est liée au repliement des membranes lors du choc hyper-osmotique qui forment alors des vésicules. Lors de la réhydratation, ce déficit en membrane est responsable de fuites du cytoplasme et de ce fait, de la mort cellulaire (*Mille et al.*, 2005).

La sévérité des dégâts produits par les cycles d'évaporation et de condensation autour des microorganismes dépend de différents facteurs, en particulier du type de cellule microbienne sujette au stress. En effet, les bactéries à Gram positif et les levures sont généralement considérées comme plus résistantes à la dessiccation et aux stress osmotiques que les bactéries à Gram négatif en raison de leurs parois cellulaires (*Mille et al.*, 2005; *Nocker et al.*, 2012). Cependant, le regroupement en agrégats de plusieurs cellules constitue une forme de protection (*Monier et Lindow*, 2003). La concentration maximale en solutés atteinte impacte également la survie des cellules, de même que la vitesse à laquelle le choc osmotique est produit (*Marechal et Gervais*, 1994). La température de choc est d'importance puisque selon les espèces microbiennes, une faible température peut augmenter les effets du choc ou les atténuer (*Harrison et Morgan*, 1974; *Laroche et Gervais*, 2003; *Mille et al.*, 2005). De plus, le taux de survie des cellules peut varier avec la durée passée sous forme desséchée (*Nocker et al.*, 2012).

3.4. Basses températures et cycles de gel et de dégel

Dans les nuages, les microorganismes sont soumis à des brusques changements de températures, de l'ordre de la dizaine de degrés en quelques secondes, par exemple, en cas de forts vents verticaux, pouvant se traduire par la transformation de l'eau liquide en cristaux de glace ou inversement. Ces changements d'état sont connus pour être un facteur de stress important pour les cellules et leur succession est même utilisée dans certains cas en laboratoire pour lyser les bactéries et extraire les protéines (*Bakir et Hamamci*, 1997; *Benov et Al-Ibraheem*, 2002).

Les stress engendrés par les phénomènes de gel et de dégel sont de trois types principalement : thermique, physico-chimique et oxydatif. Avant que la formation de la glace ne soit initiée, les microorganismes sont uniquement soumis à une diminution de la température qui peut inhiber certaines fonctions ou structures cellulaires. Cette propriété bien connue est, par ailleurs, à la base de la conservation d'un grand nombre de produits, comme par exemple les produits alimentaires.

Toutefois, la diminution de la température n'est pas un facteur particulièrement létal pour les cellules comme l'ont montré certaines études dans un milieu surfondu (*Leibo et Mazur*, 1971; *Park et al.*, 1997). En général, les faibles températures impliquent des perturbations à l'échelle moléculaire et cellulaire. Elles se traduisent par une diminution de la fluidité des membranes, des activités enzymatiques et de l'efficacité du repliement des protéines (*D'Amico et al.*, 2006). En parallèle, les structures secondaires de l'ADN et de l'ARN sont augmentées ce qui conduit à une baisse de l'efficacité de la réplication, de la transcription ou de la traduction (*Yamanaka et al.*, 1998).

En ce qui concerne les dommages physiques infligés par le gel et le dégel, ils peuvent être différenciés selon que le gel se produit uniquement à l'extérieur ou s'il se propage à l'intérieur de la cellule. En effet, lors du gel extracellulaire, les cellules se retrouvent emprisonnées et comprimées entre les cristaux de glace. A partir de températures comprises entre -5°C et -10°C, le gel peut se propager jusqu'à l'intérieur de la cellule. Dans ces cas-là, le volume du cytoplasme augmente sous l'effet du changement de phase et distend la membrane plasmique ou la paroi cellulaire, endommageant ainsi les cellules qui ne sont extensibles que dans une certaine limite.

D'autre part, lorsque le gel est initié dans une solution aqueuse, seule une partie de l'eau passe de l'état liquide à l'état solide. Les gaz et les solutés alors contenus dans l'eau résiduelle se concentrent en soumettant les cellules à un stress hyper-osmotique. La cellule compense ce gradient chimique en transportant de l'eau vers l'extérieur entraînant des effets collatéraux tels que ceux décrits dans le paragraphe 3.3. A l'inverse, lors du réchauffement et de la fonte des cristaux de glace extracellulaire, les cellules sont soumises à une baisse de l'osmolarité externe et compensent ce gradient chimique par l'internalisation de molécules d'eau.

La formation en grande quantité de ROS est également fréquemment associée avec la formation de glace et le dégel. Il a été montré sur des bactéries microaérophiles[2] que l'inactivation de deux enzymes impliquées dans la résistance à l'oxydation par les ROS (catalase et superoxydase dismutase) réduit le taux de survie à un cycle de gel et de dégel d'un facteur 10 000 (*Stead et Park*, 2000).

En plus des mécanismes de protection contre les chocs osmotiques et les oxydants décrits dans les paragraphes 3.1 et 3.3, les bactéries ont développé des mécanismes spécifiques qui impliquent la production de protéines en réponse au froid (cold shock proteins ou CSP) (*Graumann et Marahiel*, 1996). Les CSP sont produites par les cellules en tout temps, en l'absence ou en présence de choc thermique, mais leur production est fortement induite par une diminution de la température, et ce malgré la baisse d'activité des ribosomes (*Ramos et al.*, 2001). La plupart des CSP identifiées sont des protéines chaperonnes (dont le rôle est d'aider au repliement tridimensionnel de l'ADN, de l'ARN ou des protéines dénaturées), des protéines associées aux ribosomes ou des protéines impliquées dans le métabolisme central ou la chimiotaxie (*Yamanaka et al.*, 1998; *Phadtare et al.*, 1999). D'autres

[2] Bactéries microaérophiles : bactéries nécessitant une concentration en O_2 inférieure à celle de l'atmosphère pour croître.

protéines peuvent intervenir en réponse au froid. Il s'agit de protéines antigel qui diminuent le point de congélation de l'eau sans affecter son point de fusion et régulent ainsi la croissance des cristaux et la recristallisation de la glace (*Duman et Olsen*, 1993).

En plus de ces protéines, les bactéries peuvent produire des cryoprotectants tels que des polysaccharides extracellulaires (*Marx et al.*, 2009) ou d'autres molécules également impliquées dans la résistance aux chocs osmotiques telles que le tréhalose (*De Antoni et al.*, 1989), le saccharose ou le glycérol (*Panoff et al.*, 2000).

Plusieurs facteurs interviennent pour déterminer la capacité de survie d'un microorganisme face au gel et au dégel. Le paramètre crucial est la vitesse à laquelle s'effectuent les changements de phase. En effet, lorsque la vitesse de refroidissement est lente, les cellules ont le temps de répondre au choc osmotique en transportant des molécules d'eau vers le milieu externe. Ce flux d'eau sortant limite la formation de gel intracellulaire et protège ainsi les organismes. A l'inverse, si la vitesse de gel est élevée, les microorganismes n'ont pas le temps d'établir un équilibre chimique et le milieu intracellulaire est soumis à la propagation des cristaux de glace (*Morris et al.*, 1988). Pour chaque souche microbienne, il est possible de définir une vitesse optimale de congélation pour assurer la survie des cellules : elle correspond à la vitesse pour laquelle la déshydratation est maximale et le gel intracellulaire minimal. De même, lors du dégel, la vitesse de réchauffement est essentielle puisque à faible vitesse, l'eau redevenue liquide peut de nouveau retourner sous forme de cristaux (phénomène de recristallisation) qui sont de taille supérieure et donc extrêmement dommageable pour les cellules. La vitesse critique à laquelle se forment des cristaux de glace dans le cytoplasme dépend du type de cellule en particulier de son ratio volume/surface et de sa perméabilité à l'eau.

La phase de croissance des cellules est également un facteur discuté puisque selon les études, les cellules en phase exponentielle de croissance sont plus, autant ou moins à même de résister au gel et au dégel que celles en phase stationnaire. Il apparaît par contre indiscutable que la composition du milieu est un paramètre déterminant : d'une part, elle définit la taille des veines où l'eau demeure liquide entre les cristaux (*Price*, 2000) et d'autre part, la présence à faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène ou de NaCl permet d'améliorer la résistance au gel et au dégel en induisant des voies de réponses communes (*Tanghe et al.*, 2003). La composition de la membrane influence également les chances de survie : une forte concentration en phospholipides insaturés permet d'améliorer la flexibilité de la membrane et donc sa résistance. D'autre part, il a été montré que la présence de pigments caroténoïdes dans les membranes améliore la survie des bactéries (*Dieser et al.*, 2010). De plus, certaines bactéries sont plus adaptées aux cycles de gel et de dégel : dans les sols, il a été montré que les espèces appartenant aux classes des α-Protéobactéries et des Bacteroidetes sont plus résistantes au gel/dégel tandis que les β-Protéobactéries sont plus sensibles (*Männistö et al.*, 2009).

En conclusion, bien que les nuages soient des environnements difficiles, les microorganismes ont développé des mécanismes physiologiques leur permettant de survivre dans de telles conditions. Ces mécanismes sont souvent une réponse générale aux facteurs de stress (pigmentation, regroupement en agrégats cellulaires, *etc.*) mais certains sont plus spécifiques aux conditions rencontrées. Comme décrit dans le paragraphe 2.3.2, l'étude de la composition microbiologique des nuages a montré la récurrence de certains groupes microbiens et ce, malgré des prélèvements dans des zones géographiques distinctes. D'après *Becking* (1934), « tout est partout mais l'environnement sélectionne ». La dominance de ces groupes microbiens laisse donc penser qu'ils sont favorablement sélectionnés pour vivre et survivre dans les conditions atmosphériques.

Du fait de leur activité métabolique ou de leur simple présence, les microorganismes interagissent avec le milieu nuageux et peuvent jouer différents rôles sur les processus microphysiques et chimiques comme décrit par *Ariya et Amyot* (2004), *Deguillaume et al.* (2008) et *Delort et al.* (2010). Ces interactions sont développées dans les sections suivantes.

4. Rôles des microorganismes sur les processus microphysiques des nuages

Les aérosols interviennent dans la formation des nuages et le déclenchement des précipitations. Par conséquent, ils peuvent avoir un rôle important sur le cycle de l'eau et sur le climat. Parmi ces aérosols, les microorganismes forment une classe à part grâce à leur capacité à initier la condensation malgré leur grande taille et leur capacité à transformer l'eau liquide en glace à des températures auxquelles les autres particules sont inactives. Ces différentes activités sont décrites dans cette partie.

4.1. Rôle des bactéries dans la formation de gouttelettes de nuage - Activité de condensation

Comme décrit précédemment, les nuages sont formés principalement par la condensation de la vapeur d'eau sur des particules d'aérosols (CCN) quand l'humidité relative dépasse le seuil de saturation. Parmi les CCN, on recense des particules biologiques dont les pollens et les microorganismes (*Möhler et al.*, 2007).

L'hygroscopicité[3] des bactéries est relativement faible en comparaison avec celles des particules de sels inorganiques tels que le NaCl (facteur de croissance[4] bactérien d'environ 1,2 à 98 % d'humidité relative et d'environ 1,6 pour le NaCl aux mêmes valeurs d'humidité relative) (*Lee et al.*, 2002). Les bactéries sont des particules relativement grosses par rapport aux CCN généralement

[3] Hygrospicité : capacité à absorber/adsorber l'humidité de l'air

[4] Facteur de croissance : variation de diamètre d'une particule suite à son exposition à une humidité donnée

décrits dans la littérature et de ce fait, elles devraient avoir une faible activité de condensation (théorie de Köhler). Elles compensent toutefois ce handicap par une surface « mouillable » (présence de solutés ou de processus physiques ou chimiques qui facilitent l'adsorption des molécules d'eau) comme le suggère leur activité à des humidités relatives inférieures à 100 % (*Snider et al.*, 1985; *Ko et al.*, 2000; *Peccia et al.*, 2001). Cette particularité leur permet d'être actives à des sursaturations proches de celles de plus petites particules solubles.

Les sursaturations nécessaires à l'activation des bactéries en gouttelettes ont été mesurées par *Franc et DeMott* (1998) et *Bauer et al.* (2003) qui ont reporté des valeurs comprises entre 0,07 % et 2 % ce qui correspond à une gamme de sursaturations réaliste pour l'atmosphère. *Franc et DeMott* (1998) ont étudié la capacité de plusieurs souches phytopathogènes de l'espèce *Erwinia carotovora* à agir en tant que CCN à 1 % de sursaturation : entre 25 et 30 % des cellules bactériennes servent de support à la formation de gouttelettes. Les souches isolées de nuage et de l'air par *Bauer et al.* (2003) (*Micrococcus agilis*, *Mycoplana bullata*, *Brevundimonas diminuta*) ont montré des capacités CCN supérieures aux souches d'*E. carotovora* puisque 88 à 100 % des cellules étaient activées en gouttes à des sursaturations de 0,07 à 0,11 %. De ce fait, il a été suggéré qu'une forte proportion de bactéries pouvait servir de CCN. Toutefois, au vu des concentrations en bactéries dans les nuages (environ 10^4 à 10^5 bactéries mL^{-1}) et du nombre de gouttelettes nécessaires pour former 1 mL (environ 2 10^8), il semblerait que les bactéries ne soient pas une source importante de CCN (*Sattler et al.*, 2001).

Il convient également de garder en mémoire que l'activité CCN d'une bactérie est fortement liée à l'hydrophilité de sa surface et donc, pour les bactéries à Gram négatif, à la composition de leur membrane externe : la présence, par exemple, de caroténoïdes ou d'acides gras insaturés va avoir pour effet d'augmenter l'hydrophobicité et donc de diminuer les propriétés hygroscopiques des bactéries tandis que la présence de polysaccharides et de structures protéiques augmentent l'hydrophilie de la surface. Par conséquent, la nature CCN des bactéries est fortement variable en fonction des espèces.

En plus du rôle direct des microorganismes en tant que support solide pour la formation des gouttelettes nuageuses, ils pourraient également influencer la formation de ces dernières indirectement en produisant des molécules organiques telles que des biosurfactants, des molécules organiques complexes amphiphiles constituées de composants hydrophiles (sucres, acides aminés, *etc.*) liés à des groupements hydrophobes (lipides, *etc.*). Du fait de leur amphiphilité, les biosurfactants modifient les tensions de surface permettant la formation de gouttelettes à des sursaturations moindres. Des biosurfactants ont été identifiés parmi les aérosols atmosphériques (*Ekström et al.*, 2010) ce qui suggère une production microbienne directement depuis les nuages ou une émission depuis la surface de la Terre par les microorganismes. *Ahern et al.* (2007) ont montré que sur 80 souches fluorescentes de Pseudomonads isolées d'eau de pluie ou de nuage, toutes produisaient des biosurfactants à différents degrés. D'autres souches bactériennes productrices

appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et *Bacillus* ont également été identifiées dans l'eau des nuages (*Delort et al.*, 2010).

L'activité CCN des bactéries est avantageuse pour leur survie puisqu'elle permet de condenser l'eau sur leur surface et évite donc de longues périodes de dessiccation ainsi que l'absence de nutriments. D'autre part, rejoindre un nuage est la meilleure chance de retourner sur la surface de la Terre pour les particules de la taille des bactéries *via* les précipitations : agir comme un noyau de condensation permettrait donc aux bactéries de réduire leur temps de séjour dans l'atmosphère (*Burrows et al.*, 2009b; *Sesartic et al.*, 2012).

4.2. Rôle des bactéries dans la formation de glace dans les nuages et de précipitations - Activité glaçogène

Un grand nombre de particules rencontrées dans l'atmosphère sont connues pour favoriser la formation de cristaux de glace. A ce jour, les particules les plus efficaces connues, *i.e.* celles induisant le gel aux températures négatives les plus élevées, ont été identifiées comme d'origine biologique avec une activité à partir de -1°C tandis que les particules non-biologiques (suies, poussières, *etc.*) sont généralement actives à partir de -15°C environ (**Figure 12**) (*cf.* l'article de synthèse de *Després et al.*, (2012)). On recense parmi les particules biologiques glaçogènes des champignons (*Iannone et al.*, 2011), des diatomées (*Knopf et al.*, 2010), des lichens (*Kieft*, 1988) et des bactéries (*Maki et al.*, 1974).

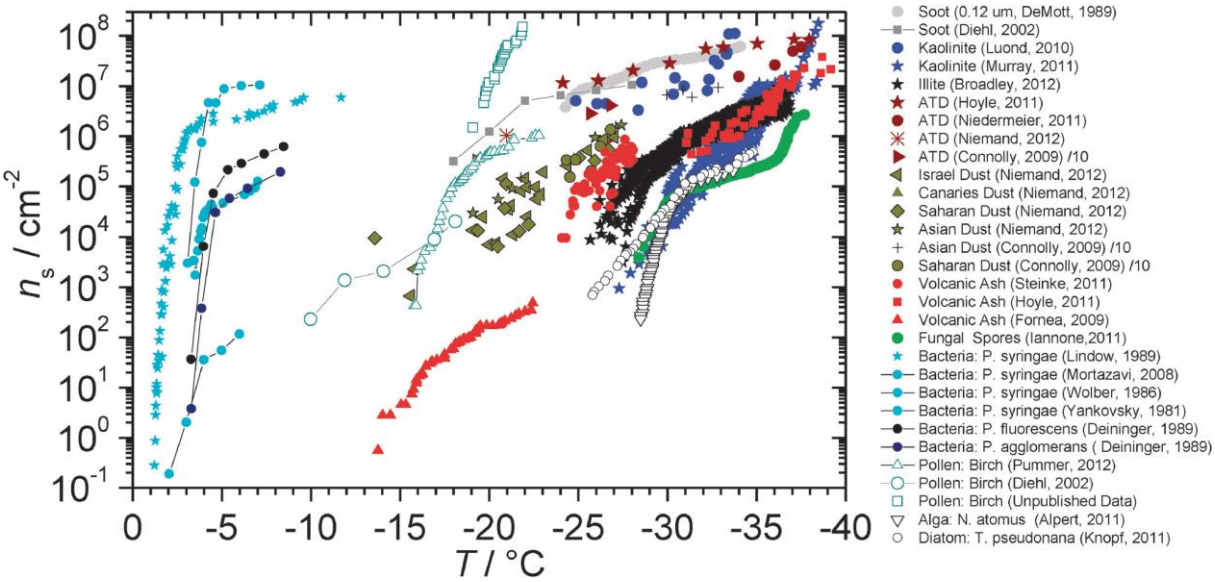


***Figure 12** : Récapitulatif des températures d'activité des différentes classes de particules glaçogènes rencontrées dans l'atmosphère (Murray et al., 2012).*

4.2.1. Protéines glaçogènes bactériennes

La capacité des bactéries à former de la glace est liée à la présence de structures protéiques ancrées dans leur membrane externe (*Wolber*, 1993). Il s'agit d'agrégats d'un seul type de protéine exprimée à partir d'un gène unique très conservé entre les différentes espèces glaçogènes (*Green et Warren*, 1985; *Warren et Wolber*, 1991). Selon les espèces bactériennes, ce gène est nommé InaZ, InaW, InaU, InaQ ou InaX. La protéine produite a une masse moléculaire d'environ 120 à 180 kDa et est composée de trois parties : (1) le domaine central (~80 % de la séquence) qui est constitué d'une répétition de 8 à 16 acides aminés riche en alanine, glycine, sérine, tyrosine, thréonine et leucine, (2) le domaine N-terminal (~15 % de la séquence) hydrophobe et permettant l'ancrage à la membrane et (3) le domaine C-terminal hydrophile (*Kawahara*, 2002; *Muryoi et al.*, 2003; *Garnham et al.*, 2011). Ces protéines forment un site de liaison avec les molécules d'eau et induisent leur réorientation dans une conformation similaire à celle d'un cristal de glace déclenchant ainsi le gel de la solution (**Figure 13**) (*Warren et Wolber*, 1991).

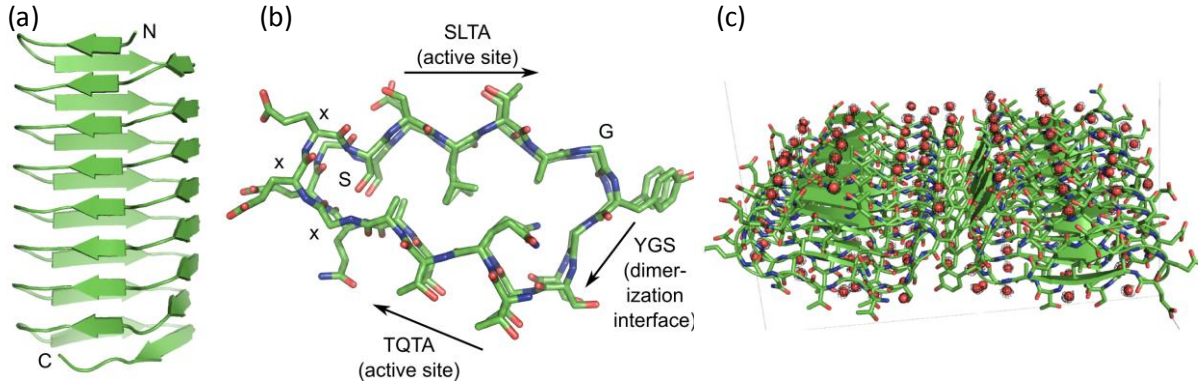


Figure 13 *: (a) Représentation de la structure 3D des protéines glaçogènes des bactéries. Les flèches vertes correspondent aux feuillets* β ; *(b) Vue du dessus de la structure. Les sites TQTA, YGS et SLTA correspondent aux feuillets* β ; (c) Alignement des molécules d'eau (sphères rouges) sur la surface des protéines (T : thréonine, Q : glutamine, A : alanine, Y : tyrosine, G : glycine, S : sérine, L : leucine) *(*Garnham et al.*, 2011).*

Selon la température seuil à partir de laquelle se produit la cristallisation, trois catégories de structures glaçogènes ont été déterminées : celles de type I (également appelée « classe A ») sont actives pour des températures supérieures à -4,5°C, celles du type II (ou classe B) à des températures comprises entre -6°C et -7°C et le type III (ou classe C) à des températures inférieures à -8°C (*Turner et al.*, 1990; *Kozloff et al.*, 1991a). La raison de la différence de température d'activité entre les types de structures ont été pendant longtemps controversée et plusieurs explications ont été avancées.

Une première hypothèse suggère que ce sont des composés non protéiques qui influencent la température d'activité maximale. D'une part, il a été mis en évidence des différences dans l'ancrage à la membrane pour les différents types : chez les bactéries ayant une activité de type I, *i.e.* les plus

actives, l'ancrage s'effectue par des molécules de phosphatidylinositol au niveau N-terminal de la protéine ce qui permettrait aux régions actives de la protéine de se retrouver loin de la membrane dans le milieu extracellulaire (*Kozloff et al.*, 1991a, 1991b; *Turner et al.*, 1991). De plus, la purification des protéines membranaires glaçogènes conduit à une baisse de la température maximale d'activité par rapport aux bactéries vivantes, suggérant que l'attachement à la membrane est un pré-requis à l'activité à haute température (*Govindarajan et Lindow*, 1988a). La viabilité cellulaire et l'intégrité membranaire ne sont, cependant, pas indispensables pour maintenir l'activité (*Hartmann et al.*, 2013). A titre d'exemple, le produit Snomax™, un additif pour canons à neige dans les stations de ski composé de fragments de *P. syringae* lyophilisés, permet l'initiation de la glace dès -2°C.

Une deuxième hypothèse suggère que la protéine de ~150 kDa correspondrait à l'unité de base glaçogène et pourrait être intégrée dans la membrane telle quelle pour former un noyau glaçogène de type III. Ces protéines pourraient ensuite être converties en protéines de type II ou I par des modifications post-traductionnelles telles que l'ajout de mannose, de glucosamine ou d'autres sucres sur différentes partie de la protéine (**Figure 14** ; *Kozloff et al.*, 1991a). Cette hypothèse est corroborée avec le fait que la sensibilité au pH du milieu dépend du type de structures et donc les différents types auraient des compositions chimiques diverses : les structures protéiques de type I sont dénaturées en présence de pH inférieurs ou égaux à 5,5 tandis que les types II et III sont résistantes jusqu'à des pH de 4,5 et 3,5 respectivement (*Turner et al.*, 1990).

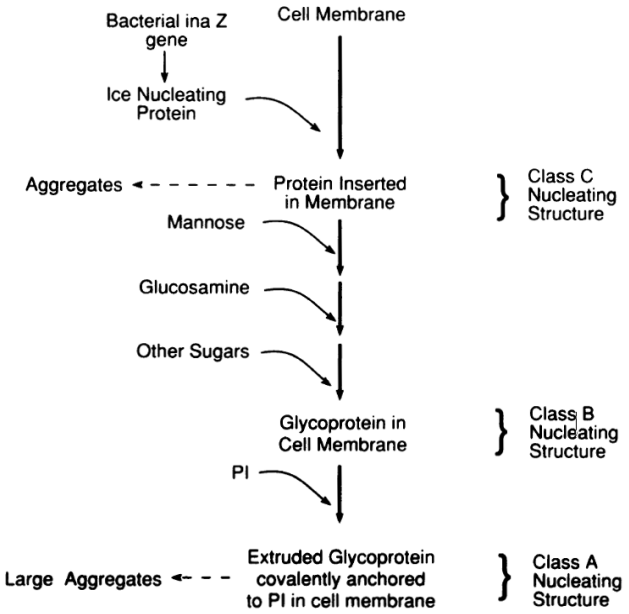


***Figure 14** : Formation séquentielle des structures glaçogènes de types III, II et I (classes C, B et A) proposée par Kozloff et al. (1991a).*

Enfin, une dernière hypothèse suppose que la taille de l'agrégat est déterminant dans la température maximale d'activité avec des températures d'activité plus chaudes pour les plus grands agrégats (*Wolber*, 1993). *Govindarajan et Lindow* (1988b) ont estimé la taille des agrégats glaçogènes

pour différentes températures et différentes souches glaçogènes : la taille de l'agrégat diminue de façon logarithmique avec la température maximale d'activité et varie de 19000 kDa à -2°C à 150 kDa à -12°C.

La fraction active de la population bactérienne varie généralement entre 10^{-8} et 1 selon les souches étudiées et les températures étudiées (*Després et al.*, 2012). Cependant, la proportion de bactéries actives au sein d'une même souche est très variable : les cellules peuvent exprimer une ou plusieurs structures protéiques différentes, voire aucune.

L'expression des protéines glaçogènes est dépendante de la température et de la concentration en nutriments du milieu comme l'ont démontré les travaux de *Nemecek-Marshall et al.* (1993) : lorsque la souche de *Pseudomonas syringae* qu'ils ont étudié est mise en culture à 32°C, seules des structures glaçogènes de type III sont exprimées. L'abaissement de la température de culture à 18°C induit rapidement la formation de structures protéiques de type I. L'expression des protéines glaçogènes est également modifiée selon le milieu d'incubation : elle est favorisée dans des conditions où les nutriments sont limités, en particulier le phosphore, l'azote, le fer ou le soufre (*Nemecek-Marshall et al.*, 1993). Il convient toutefois de noter que même en conditions identiques, la variabilité intrinsèque de la proportion de bactéries actives au sein d'une souche est forte et peut atteindre un facteur 10^4 (*Hirano et al.*, 1985).

4.2.2. Activité glaçogène et cycle de l'eau

La plupart des bactéries glaçogènes connues jusqu'à maintenant appartiennent à la classe des γ-Protéobactéries, un groupe fréquemment associé avec la végétation, et plus particulièrement aux genres *Pseudomonas*, *Erwinia* et *Xanthomonas*. Ces genres bactériens sont ubiquistes tant au niveau des espèces végétales sur lesquelles ils sont recensées (à l'exception des conifères) qu'au niveau de leur répartition géographique (*Lindow et al.*, 1978). Leur activité glaçogène leur confère un avantage indiscutable dans des conditions de froid puisqu'il leur permet d'initier le gel de l'eau surfondue sur les plantes et de créer des lésions dans les tissus végétaux, offrant ainsi un accès aux nutriments de la plante (*Lindow et al.*, 1978; *Zachariassen et Kristiansen*, 2000).

La présence de bactéries glaçogènes, en particulier celle de l'espèce *Pseudomonas syringae*, a également été observée dans des habitats variés, de l'eau de mer (*Fall et Schnell*, 1985) aux eaux douces (*Morris et al.*, 2008), de la végétation (*Lindemann et al.*, 1982) jusqu'aux endroits les plus reculés des régions polaires (*Obata et al.*, 1999). Cette répartition dans des habitats associés au cycle de l'eau appuie la théorie de « bioprécipitation » proposée il y a plus de 30 ans par *Vali et al.* (1976), *Lindow et al.* (1978) et *Sands et al.* (1982) qui proposèrent que des bactéries glaçogènes pourraient participer à la régulation des précipitations lorsque les conditions leur sont défavorables (absence de nutriments, froid, *etc.*) provoquant par la même occasion leur propre redéposition vers des environnements moins hostiles et leur dissémination dans le monde entier (*Morris et al.*, 2004).

Des bactéries glaçogènes ont également été observées dans l'air juste au dessus du sol (*e.g. Jayaweera et Flanagan*, 1982; *Lindemann et Upper*, 1985; *Garcia et al.*, 2012) et dans les précipitations (liquides et solides) dans des concentrations variables. Cependant, *Ahern et al.* (2007) n'ont détecté aucune bactéries glaçogènes parmi les 80 souches de *Pseudomonas* isolées de pluie et de nuages. *Christner et al.* (2008a, 2008b) ont étudié la composition des noyaux glaçogènes de 19 prélèvements de neige fraîchement tombée et 16 prélèvements de pluie. Pour cela, deux postulats ont été énoncés : (1) l'activité glaçogène biologique est due à la présence de protéines, par conséquent, le chauffage à haute température (95°C pendant 10 minutes) permet leur dénaturation et donc leur inactivation ; (2) les noyaux glaçogènes bactériens ont besoin d'être ancrés dans une membrane pour être actifs, par conséquent, la destruction de la paroi bactérienne par du lysozyme, une enzyme détruisant les liaisons entre le peptidoglycane, supprime l'activité glaçogène bactérienne. A partir de ces propositions, les auteurs ont mesuré le nombre de noyaux glaçogènes totaux, biologiques et bactériens des échantillons. Le nombre total de noyaux glaçogènes variait entre 4 L^{-1} (Antarctique) et 120 L^{-1} (France) à -9°C pour les échantillons de neige et entre 41 et 510 L^{-1} pour des températures supérieures à -10°C pour la pluie. Entre 69 et 100 % des noyaux glaçogènes totaux étaient sensibles à la chaleur et ont été déclarés comme biologiques. Parmi eux, la proportion de noyaux glaçogènes sensibles au lysozyme, *i.e.* considérés comme bactériens, variait de 0 à 100 % (42 % en moyenne). Il convient toutefois de noter que ces valeurs correspondent à des estimations basses. En effet, l'activité glaçogène de certains pollens peut être liée à la production de composés non-protéiques (*Pummer et al.*, 2012) et certaines bactéries peuvent résister au lysozyme. Par conséquent, les résultats présentés par *Christner et al.* (2008a, 2008b) sont probablement des sous estimations des populations glaçogènes biologiques et bactériennes.

Morris et al. (2008) se sont intéressés à l'activité glaçogène de souches de *Pseudomonas syringae* isolées d'échantillons de neige fraîchement tombée et ont mis en avant que l'ensemble des souches de *P. syringae* issues de la neige sont glaçogènes à des températures supérieures ou égales à -6°C, ce qui est significativement supérieur à la proportion de *P. syringae* glaçogènes recouvrées depuis la végétation. Par ailleurs, *Stephanie et Waturangi*, (2011) ont collecté de l'eau de pluie dans différentes région de l'Indonésie : entre 2,2 et 19,4 % des bactéries cultivables présentes dans l'eau de pluie se sont révélées glaçogènes à -10°C. Les auteurs ont également observé des proportions de bactéries glaçogènes plus importantes dans l'eau de pluie que dans l'air environnant suggérant que les bactéries glaçogènes sont préférentiellement incorporées dans les précipitations et qu'elles auraient donc un rôle important dans l'initiation des précipitations.

Enfin, environ 12 % des souches bactériennes isolées d'eau de pluie par *Šantl-Temkiv et al.* (2009) ont montré une activité glaçogène à -10°C (8 isolats sur 69) avec des profils s'apparentant aux types protéiques I et II et une activité dès -2 ou -5°C. Parmi ces souches, deux d'entre elles produisaient des particules glaçogènes extracellulaires dont les tailles étaient inférieures à 0,45µm. Dans certaines conditions, *Phelps et al.* (1986) ont observé la formation de vésicules à partir de la

membrane bactérienne qui portaient des structures protéiques glaçogènes actives dans la même gamme de température que les cellules entières (**Figure 15**). L'émission de ces vésicules dans le milieu extracellulaire est induit lorsque les bactéries se développent à de faibles températures (*Li et Lee*, 1998). Ces vésicules, principalement comprises entre 0,1 et 0,3 µm, seraient responsables de 10 à 30 % de l'activité glaçogène bactérienne pour certaines souches (*Phelps et al.*, 1986; *Li et Lee*, 1998). Ceci implique que pour une seule bactérie exprimant des protéines glaçogènes dans les nuages, plusieurs cristaux de glace pourraient être formés : les bactéries pourraient donc influencer la formation de précipitations *via* deux voies.

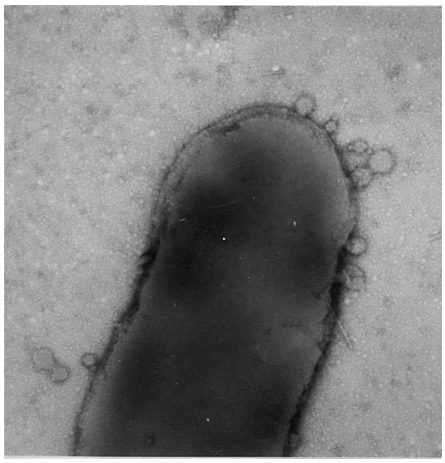


Figure 15 *: Observation des vésicules glaçogènes formées par Erwinia herbicola par microscopie électronique à transmission (Li et Lee, 1998).*

Dans la troposphère et dans les nuages, très peu d'études se sont consacrées à l'activité glaçogène biologique. Toutefois, *Xia et al.* (2013) ont mesuré des concentrations en noyaux glaçogènes comprises entre 0,4 et 3,8 m^{-3} d'air à environ 3500m d'altitude dans les Alpes suisses. Les auteurs ont estimé que comme la congélation s'effectue à haute température, *i.e.* supérieure à -10°C, seules des particules biologiques peuvent intervenir et de ce fait, environ 1 bactérie sur 10 000 aurait une activité glaçogène. De même, *Bowers et al.* (2009) ont mis en évidence la présence de 0 à 91 noyaux glaçogènes par m^3 à des températures supérieures ou égales à -10°C. Cependant, ces deux études ne prennent pas en compte la présence de particules glaçogènes actives à ces mêmes températures autres que des bactéries telles que les pollens et par conséquent, les valeurs sont probablement surestimées.

Deux études *in situ* dans les nuages ont été réalisées *via* des prélèvements par avion. *Pratt et al.* (2009) ont déterminé que 33 % des cristaux de glace collectés par avion dans un seul cirrus contiennent un résidu biologique. Cette proportion n'atteint même pas 1 % dans les travaux de *Cziczo et al.* (2013) qui se sont basés sur un plus grand nombre de cirrus. Ceci suggère que le rôle des particules biologiques dans la formation de glace n'est pas prépondérant pour ce type de nuages essentiellement formés en haute altitude et totalement glacés. De plus, ces observations ont été

réalisées à des températures très basses, proches de -30°C, où de nombreux composés sont connus pour leur activité glaçogène. A des températures plus élevées, *i.e*. pour des nuages mixtes[5] à plus faible altitude, il est probable que la proportion de résidus biologiques soit plus importante du fait de leur capacité unique à nucléer la glace à des températures proches de 0°C.

En raison de la difficulté d'étudier l'activité des noyaux glaçogènes bactériens directement dans les nuages, plusieurs études se sont déroulées dans des chambres de simulation permettant de reproduire des nuages de façon artificielle, dans des conditions proches de celles atmosphériques. C'est ainsi que *Maki et Willoughby* (1978) ont mis en évidence que l'activité glaçogène de *Pseudomonas fluorescens* perdurait quand ces bactéries étaient aérosolisées, et que *Ward et DeMott* (1989) ont montré que la fréquence des noyaux glaçogènes à -5°C dans l'additif pour canons à neige SNOMAX™ était plus importante que celle de l'iodure d'argent. Plus récemment, *Möhler et al.* (2008) ont injecté des souches bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Erwinia* dans la chambre à nuage AIDA (Aerosol Interaction and Dynamics in the Atmosphere) à Karlsruhe (Allemagne). Ces bactéries se sont révélées glaçogènes pour des températures comprises entre -7°C et -11°C avec des fractions actives inférieures à celles de SNOMAX™.

4.2.3. Influence de l'activité glaçogène bactérienne sur la formation de précipitations : estimations par les modèles numériques

Actuellement, il est primordial de pouvoir quantifier et prédire la formation de glace dans les nuages comme le montrent les études de *DeMott et Prenni* (2010) et de *DeMott et al.* (2011). En raison du caractère exclusif qu'ont les particules biologiques à initier le gel à des températures proches de 0°C, plusieurs modèles numériques ont été utilisés pour quantifier leur impact sur les propriétés microphysiques des nuages et sur l'induction des processus microphysiques aboutissant aux précipitations.

Une des premières études a été réalisée par *Phillips et al.* (2009) avec un modèle méso-échelle incluant les interactions entre les aérosols et les nuages. Les simulations ont été effectuées sur un intervalle de temps de 1 mois lors de la période estivale avec des concentrations en particules biologiques glaçogènes estimées à 100 fois supérieures à celles supposées dans les nuages. De ces premiers travaux, il ressort que, à des concentrations suffisamment élevées, les bioaérosols glaçogènes pourraient impacter à la fois le nombre et la taille des gouttelettes d'eau et des cristaux de glace, la couverture nuageuse et en conséquence, la quantité de précipitations.

A plus grande échelle, *Hoose et al.*, (2010) ont cherché à estimer l'importance de l'activité glaçogène biologique dans l'induction de précipitation *via* le modèle à échelle globale CAM-Oslo. A partir d'estimations des flux d'émissions des bactéries dans l'atmosphère (*Burrows et al.*, 2009b) et

[5] Nuage mixte : nuage composé à la fois de gouttelettes liquides et de cristaux de glace

des proportions de bactéries glaçogènes mesurées en laboratoire pour une souche de *P. syringae*, il a été mis en évidence que la contribution des particules biologiques dans l'induction des précipitations à l'échelle du globe est très faible, de l'ordre 10^{-5} % (88 % pour les poussières minérales et 12 % pour les suies). Elle peut atteindre 0,6 % dans les estimations les plus hautes, lorsque toutes les bactéries émises dans l'atmosphère sont supposées agir en tant que noyau glaçogène. Bien qu'irréaliste, cette dernière simulation invite à réfléchir sur les conséquences non pas d'une activité ubiquiste chez toutes les bactéries mais sur l'effet que pourraient avoir des émissions bactériennes locales ou régionales exceptionnellement hautes. Ces concentrations accrues pourraient alors impacter localement les précipitations en entraînant la formation de cristaux de glace pour des températures plus élevées et donc des altitudes plus faibles.

De même, *Sesartic et al.*, (2012) ont simulé par le modèle de climat global ECHAM5-HAM différentes proportions de bactéries glaçogènes actives à partir des mêmes émissions estimées par (*Burrows et al.*, 2009b) : 0, 1, 10 et 100 % des bactéries de l'atmosphère ont été considérées comme glaçogènes. Il apparaît que les bactéries agissent sur la formation de la glace dans les nuages dans de faibles contributions. Ceci est dû non pas à une activité glaçogène moindre mais à leur faible concentration dans les nuages en comparaison des valeurs simulées pour les autres particules glaçogènes telles que les particules minérales. Toutefois, lors de la simulation la plus probable (10 % des bactéries glaçogènes), des changements non négligeables sont observés dans les phases liquides et glacées des nuages.

Burrows et al. (2013) ont estimé l'importance des particules biologiques et de leurs émissions (substances exopolymériques) dans la population de noyaux glaçogènes rencontrés au dessus des eaux marines grâce au modèle global ECHAM5. Leurs conclusions mettent en avant une importance non négligeable des particules biogéniques au dessus des océans, en particulier dans les régions reculées où les autres noyaux glaçogènes (en particulier les poussières) sont peu retrouvés.

Diehl et Wurzler (2010) ont eux aussi étudié le rôle des bactéries glaçogènes dans un nuage à l'aide d'un modèle parcelle d'air plus petite échelle permettant de reproduire un système nuageux convectif. Dans ces simulations, les processus microphysiques paramétrés reproduisent le transport vertical des gouttelettes d'eau surfondue qui aboutit à la formation de glace lorsque la température refroidit. Plusieurs paramétrisations de concentrations en noyaux glaçogènes bactériens ont été introduites dans le modèle : la première se base sur les concentration de bactéries et de noyaux glaçogènes bactériens mesurés dans la neige par *Christner et al.* (2008b) (estimation dite « basse »), la deuxième s'appuie sur le contenu bactérien mesuré dans l'eau de nuage par *Amato et al.* (2005) (estimation intermédiaire) et la dernière repose sur les mesures de particules biologiques dans l'atmosphère qui peuvent représenter jusqu'à 25 % des aérosols totaux (*Matthias-Maser et Jaenicke*, 1995) (estimation haute). Si dans le cas « estimation basse » les bactéries ne sont impliquées que pour une part insignifiante de la formation de cristaux de glace (0.0003 %), dans le cas intermédiaire,

elles ont autant d'importance que les particules de suies (0.02 %) et dans le cas maximal, les bactéries sont les principaux acteurs de la formation de glace (77 %).

Ariya et al. (2009) se sont également penchés sur le rôle des particules biologiques dans un nuage convectif en simulant des concentrations actives inférieures à 1 particule L^{-1} : même dans de si faibles concentrations, les particules biologiques pourraient déclencher la congélation du nuage entier par des phénomènes de multiplication de la glace (*e.g.* fragmentation des cristaux).

Plus récemment, *Hazra* (2013) s'est intéressé au rôle des poussières, des suies et des bactéries dans la formation des nuages et des précipitations au dessus du sous-continent Indien en utilisant le modèle global ECHAM5. Les simulations ont montré que dans certaines régions, la formation de glace dans les nuages est principalement liée à la présence de bactéries, notamment entre Octobre et Décembre. A l'inverse, les simulations lancées par *Hummel et al.* (2013) basées sur des mesures d'activité glaçogène en chambre à nuage montrent que l'action des bactéries est d'importance mineure.

Les conclusions sur le rôle des microorganismes dans la formation de précipitations sont donc encore incertaines. L'une des raisons est que les informations sur les propriétés glaçogènes des bactéries dans l'atmosphère sont rares. Ces études se basent donc sur l'activité de quelques souches isolées de milieux tout autres et cultivées différemment par rapport aux conditions atmosphériques. Par conséquent, un grand biais existe dans ces études. Il est donc désormais essentiel de s'intéresser davantage aux noyaux glaçogènes bactériens, et plus globalement biologiques, directement dans l'air afin d'améliorer les paramètres et les hypothèses qui sont à la base de ces modèles, en particulier en ce qui concerne la fraction active des particules biologiques.

5. Rôle des microorganismes sur la chimie des nuages

Pendant longtemps, la transformation de la matière organique dans les nuages a été supposée du seul fait de processus abiotiques impliquant des radicaux et conduisant à des processus d'oxydation. Cependant, la découverte récente de microorganismes vivants et potentiellement actifs au sein de l'eau des nuages implique de les considérer comme d'éventuels catalyseurs de la transformation de la matière organique comme c'est le cas dans de nombreux environnement terrestres et aquatiques. Dans les nuages, ils pourraient donc constituer une voie alternative à la chimie radicalaire (*Ariya et Amyot*, 2004; *Deguillaume et al.*, 2008; *Delort et al.*, 2010).

Cette hypothèse assez récente a fait l'objet de peu d'études jusqu'alors. Pour démontrer l'activité des microorganismes des nuages sur les composés chimiques présents dans l'atmosphère, deux stratégies scientifiques ont été mises en œuvre : la première se base sur l'étude du potentiel enzymatique de souches pures quant à l'utilisation de composés organiques présents dans les

nuages et la seconde tente de quantifier et de comparer cette activité en laboratoire avec la chimie radicalaire en considérant des milieux d'études de plus en plus réalistes.

5.1.Les voies métaboliques

5.1.1. Métabolisme des acides carboxyliques

Les microorganismes peuvent métaboliser des acides carboxyliques *via* leur métabolisme central, en particulier par l'intermédiaire du cycle de Krebs ou cycle du citrate (TCA). Le métabolisme central est présent chez tous les microorganismes aérobies quel que soit leur genre car il est à la base de l'énergie nécessaire à la survie des cellules et aux fonctions cellulaires. Il produit également les composés intermédiaires nécessaires à la mise en place des protéines ou des acides nucléiques. Les microorganismes aérobies qui utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons pour la synthèse d'adénosine tri-phosphate (ATP) peuvent minéraliser la matière organique en dioxyde de carbone (CO_2) et eau. Les nuages étant des milieux très oxydants, il est généralement supposé que seuls les microorganismes aérobies sont actifs dans ces conditions.

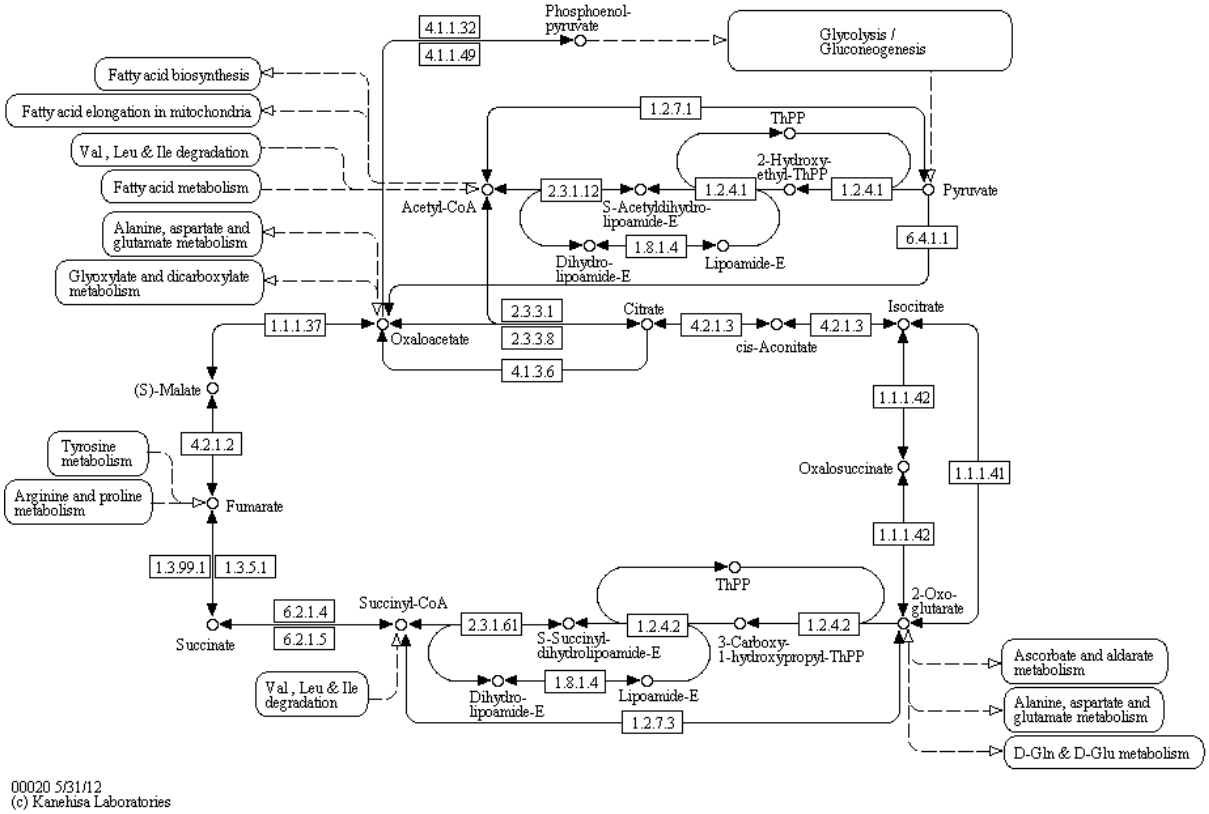


Figure 16 *: Réactions impliquées dans le cycle de Krebs, représentation issue de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), disponible à l'adresse http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00020&show_description=show*

En guise d'exemple, la **Figure 16** montre la complexité du métabolisme microbien ainsi que les divers intermédiaires et les enzymes impliquées dans le cycle de Krebs, une voie métabolique présente chez tous les microorganismes aérobies. Certains métabolites impliqués sont également présents dans l'atmosphère tels que des acides carboxyliques comme le citrate, le succinate, le malate, le fumarate, le pyruvate, l'acétate.

La biodégradation des acides carboxyliques dans les eaux atmosphériques a été étudiée pour la première fois par *Herlihy et al.* (1987) qui ont mis en évidence la dégradation de l'acide formique et l'acide acétique par les bactéries dans l'eau de pluie. De leur coté, *Ariya et al.* (2002) et *Côté et al.* (2008) ont observé que plusieurs des acides dicarboxyliques (malonique, succinique, glutarique, adipique, pimélique et pinique) détectés dans l'atmosphère peuvent être efficacement dégradés dans l'air par des champignons. En ce qui concerne l'eau des nuages, *Amato et al.* (2005, 2007a) ont montré que les souches microbiennes isolées de ce milieu contenait les équipements enzymatiques nécessaires à la dégradation de certains acides carboxyliques (le formiate, l'acétate, le lactate et le succinate) ainsi qu'à leur synthèse (pyruvate, fumarate, *etc.*). Plus récemment *Šantl-Temkiv et al.* (2012) ont mis en évidence que sept souches de *Methylobacterium* et une souche de *Bradyrhizobium* isolées de grêlons étaient en mesure d'utiliser plusieurs acides carboxyliques en tant que substrat (lactate, acétate, glycolate, propionate, formiate, glyoxylate, α-cétoglutarate, succinate, tartrate).

5.1.2. Métabolisme du méthanol et du formaldéhyde

Bien que le méthanol et le formaldéhyde soient des composés toxiques pour de nombreuses espèces microbiennes, certaines d'entre elles sont capables de les transformer *via* différentes voies métaboliques (**Figure 17**).

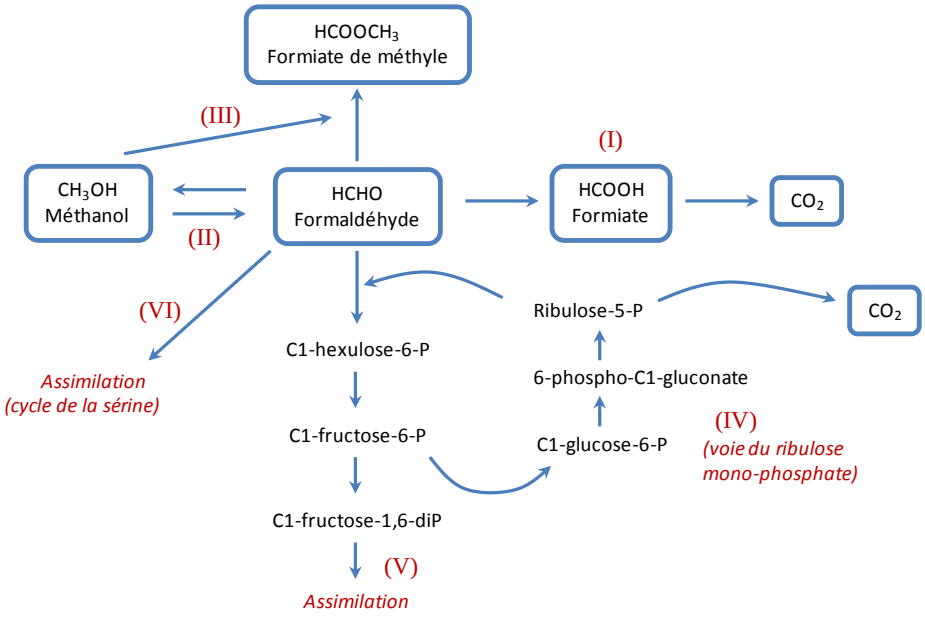


***Figure 17** : Principales voies métaboliques impliquées dans la biotransformation du formaldéhyde.*

Les voies I, II, III et IV conduisent à la transformation du formaldéhyde en produits finaux tels que le méthanol, le formiate de méthyle ou plus fréquemment le CO_2. Les voies I et II conduisent à des intermédiaires très similaire à la chimie des radicaux (*Monod et al.*, 2000). Cependant, la chimie radicalaire ne rend possible que des réactions d'oxydation, tandis que les voies métaboliques peuvent également conduire à la réduction du formaldéhyde en méthanol. Le méthanol peut également être transformé en formaldéhyde par oxydation. Grâce à ces voies de dégradation, les microorganismes peuvent éliminer ces composés toxiques.

A l'inverse, les voies V et VI sont des voies d'assimilation qui permettent aux microorganismes de produire de l'énergie et des molécules carbonées telles que des sucres ou des acides aminés. Ces voies sont présentes chez les microorganismes méthylotrophes[6] chez lesquels le métabolisme repose sur l'assimilation de composés en C1. La plupart d'entre eux sont des bactéries aérobies appartenant aux classes des α-, β-et γ-Protéobactéries et des bactéries à Gram positif.

De plus, de nombreux microorganismes sont des méthylotrophes facultatifs qui, selon les conditions environnementales, peuvent assimiler ces mêmes substrats. Bien que minoritaires dans les communautés bactériennes cultivables isolées dans les nuages (*Vaïtilingom et al.*, 2012), les analyses de biologie moléculaire ont pu mettre en évidence qu'une fraction non négligeable des bactéries dans les grêlons appartiennent au genre *Methylobacterium* (*Šantl-Temkiv et al.*, 2012, 2013). De même, *DeLeon-Rodriguez et al.* (2013) ont identifié par une approche de pyroséquençage des bactéries appartenant à la classe des *Methylobacteriaceae* dans différents compartiments de l'atmosphère dont les nuages.

La biodégradation du formaldéhyde et du méthanol a été étudiée sur de nombreuses souches microbiennes isolées à partir d'eau de nuages dans des conditions simplifiées, à savoir une souche et un substrat unique (*Amato et al.*, 2005; *Husárová et al.*, 2011). La plupart de ces souches sont capables de transformer ces composés en utilisant les routes I et II (**Figure 17**) et la formation d'intermédiaires de la voie de la sérine a pu être observée dans le cas de certaines souches bactériennes (*Husárová et al.*, 2011).

5.2. Comparaison de l'activité microbienne avec la chimie radicalaire dans la chimie des nuages

Il est désormais bien connu que les microorganismes présents dans les nuages possèdent l'équipement enzymatique requis pour transformer la matière organique. Il est désormais essentiel d'évaluer dans quelle mesure l'activité microbienne est responsable de la transformation de la matière organique dans les nuages.

[6] Organismes méthylotrophes : organismes capables de se développer en n'utilisant que des composés à 1 atome de carbone comme source de carbone et d'énergie. Les organismes méthylotrophes facultatifs peuvent également utiliser d'autres composés en plus de ceux à 1 atome de carbone

Dans ce cadre, plusieurs études se sont intéressées à quantifier la contribution du métabolisme microbien et de la chimie radicalaire dans la dégradation d'acides carboxyliques et de composés en C1, ces deux voies présentant de nombreux intermédiaires réactionnels communs (*Amato et al.*, 2007a). Au début dans des conditions très simples (*i.e*. un substrat en présence d'une souche bactérienne), les conditions expérimentales se sont peu à peu complexifiées jusqu'à l'utilisation d'eau de nuage dont les compositions chimique et microbienne ont été conservées.

5.2.1. Expériences avec des substrats uniques et des souches microbiennes pures isolées de l'atmosphère

Ariya et al. (2002) ont été les premiers à mesurer une vitesse de biodégradation d'acides dicarboxyliques (malonate, succinate, adipate, pimélate et pinate) par une levure isolée de l'air *Geotrichum* sp.. La durée de vie de ces composés a été estimée de l'ordre du jour (entre 1,5 et 10 jours), une durée comparable à celle calculée à partir de la réactivité du radical $^{\bullet}OH$ (comprises entre 0,03 et 24 jours) mais beaucoup plus courtes que celles calculées pour l'ozone (O_3) et le radical hydroperoxyle ($HO_2^{\bullet}$) (> 771 jours et > 2000 jours respectivement).

Plus tard, la biodégradation du méthanol et du formaldéhyde par quatre souches bactériennes (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* sp. et *Frigoribacterium* sp.) isolées d'eau de nuage au puy de Dôme et incubées dans un tampon phosphate à 5°C et 17°C a été étudiée (*Husárová et al.*, 2011). Ces deux températures correspondent respectivement à la valeur moyenne annuelle et au maximum observé lors des prélèvements nuageux au sommet du puy de Dôme (http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/mesures/pdd.php). Les taux de biodégradation mesurés ont été comparés à ceux résultant de la réactivité du méthanol et du formaldéhyde avec les radicaux libres $^{\bullet}OH$ (présents uniquement le jour) et $NO_3^{\bullet}$ en fonction du degré de pollution d'un nuage (scénario de type continental ou pollué). En ce qui concerne les taux de dégradation radicalaires, ils ont été évalués en prenant en compte des concentrations radicalaires issues de simulations numériques reproduisant la réactivité nuageuse et les constantes cinétiques d'oxydation des composés organiques ont été issues de la littérature. Les résultats ont montré que les microorganismes ont peu d'impact le jour mais pourraient être le puits principal de ces composés la nuit dans les nuages liquides.

5.2.2. Expériences en microcosmes dans un milieu nuage artificiel

Afin de s'approcher des conditions de l'eau de nuage, Vaïtilingom et al. (2011) ont conçu des microcosmes constitués d'eau de nuage artificielle imitant la composition chimique moyenne de l'eau des nuages réelle recueillie à la station du puy de Dôme. La dégradation d'acides carboxyliques a été suivie selon différents paramètres :

- deux températures d'incubation (5°C et 17°C) pour couvrir l'influence des variations de températures au cours des cycles diurnes et saisonniers
- deux types de composition chimique comme milieu d'incubation (marine et continentale) dont les principales différences concernent le pH et les concentrations en NO_3^-, NH_4^+ et SO_4^{2-}
- 17 souches bactériennes isolées à partir d'échantillons d'eau nuageuse couvrant une grande diversité microbienne (genres *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Frigoribacterium* et *Rhodococcus*)
- des expériences de photodégradation des composés ont été réalisées en parallèle selon les mêmes conditions dans des photoréateurs

Les résultats ont montré que le changement de température de 17°C à 5°C n'a pas un impact significatif sur les taux de biodégradation qui diminuent seulement d'un facteur 2 à 5. La composition de l'eau des nuages et plus particulièrement le pH, n'ont pas non plus d'influence sur l'efficacité de la biodégradation.

Les taux moyens de biodégradation mesurés ont ensuite été comparés à ceux obtenus pour des réactions photochimiques effectuées dans les mêmes conditions (mêmes milieux artificiels) dans deux systèmes d'irradiation présentant différents spectres lumineux à 17°C (**Figure 18**). Certains composés sont alors uniquement photodégradés (l'oxalate), d'autres uniquement biodégradés (l'acétate et le succinate) ou peuvent être dégradés à la fois par l'action de la lumière solaire ou des bactéries (le formiate). Le résultat marquant de cette étude est que les taux expérimentaux de photodégradation et la biodégradation se situent dans le même ordre de grandeur.

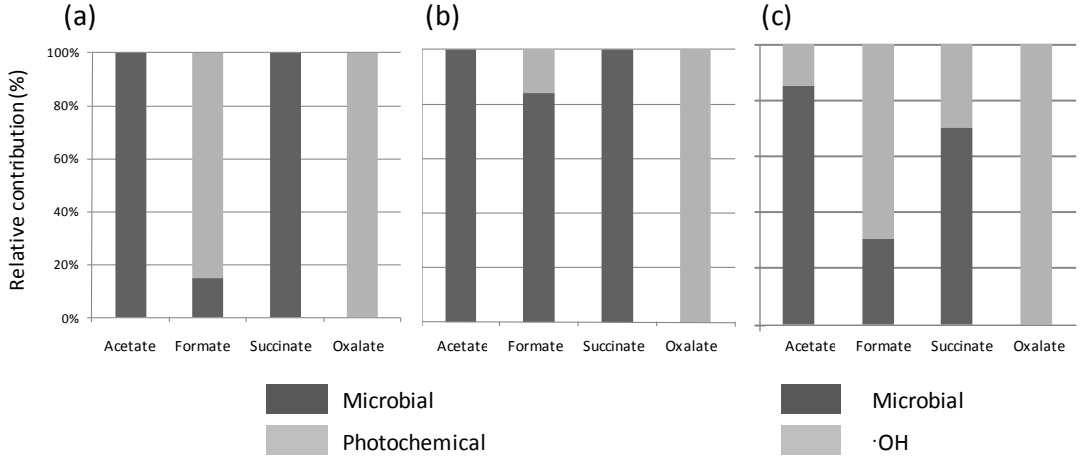


Figure 18 *: Comparaison de la contribution du métabolisme microbien et de la chimie radicalaire dans la dégradation d'acides carboxyliques. (a) et (b) correspondent à la comparaison entre des valeurs mesurées pour la photodégradation et la biodégradation dans un nuage artificiel marin dans deux systèmes d'irradiation différents; (c) correspond à la comparaison des valeurs de biodégradation mesurées à 17°C dans un milieu artificiel marin avec des valeurs théoriques de dégradation par les radicaux* $^{\bullet}OH$ *(10^{-14} M). Adapté à partir de* Vaïtilingom et al. *(2011).*

Une autre partie de cette étude a été réalisée en comparant la contribution de l'activité microbienne et de la chimie radicalaire pour la dégradation de composés carboxyliques en utilisant une concentration en phase aqueuse théorique en $^{\bullet}OH$ de 10^{-14} M. Cette valeur, à défaut d'avoir des mesures directes sur l'eau des nuages, correspond à la concentration estimée par des modèles de chimie multiphase simulant des scénario chimiques idéalisés d'évènements nuageux de type continentaux ou urbains (*Tilgner et Herrmann*, 2010). Ce choix semble cohérent au vu des résultats comparables entre les contributions relatives des voies métaboliques et radicalaires mesurées ou estimées (**Figure 18**).

Une autre étude effectuée avec une souche bactérienne de *Pseudomonas graminis* incubée dans de l'eau de nuage artificielle à 5°C et 17°C a montré que la biotransformation est le processus principal impliqué dans la transformation de l'acétate, du succinate et du formiate pendant la nuit (Vaïtilingom et al., 2010).

5.2.3. Expériences sur des échantillons réels d'eau de nuage

Ces dernières années, la complexification vers des conditions plus réalistes a franchi un nouveau pas en prenant comme milieu d'étude des prélèvements d'eau de nuages avec une composition chimique complexe et une microflore indigène. Dans les travaux de *Vaïtilingom et al.* (2011), les taux de biodégradation de l'acétate, du formiate, du succinate et de l'oxalate ont été mesurés expérimentalement à 12°C, température correspondant à celle de l'échantillonnage du nuage. Les données expérimentales obtenues pour l'activité microbienne ont été comparés aux calculs théoriques de l'activité des radicaux $^{\bullet}OH$ ($[^{\bullet}OH] = 10^{-14}$M) (**Figure 19**). A l'exception de l'oxalate qui n'est que photodégradé, les contributions de l'activité microbienne et de la chimie radicalaire sont du même ordre de grandeur en ce qui concerne la transformation des acides carboxyliques. De plus, les résultats obtenus avec des échantillons d'eau de nuages réelle contenant une grande biodiversité sont très similaires à ceux obtenus *via* des microcosmes de nuages artificiels avec 17 souches cultivables isolées (**Figure 18**).

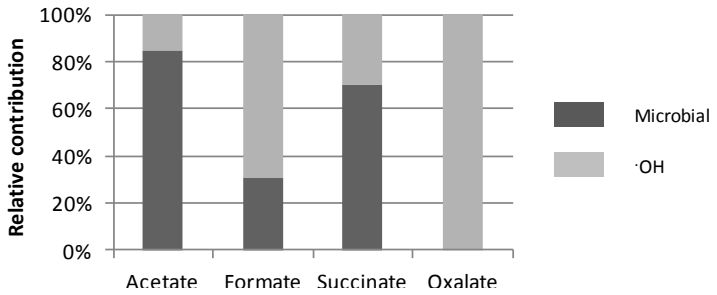


***Figure 19** : Comparaison de la contribution du métabolisme microbien et de la chimie radicalaire dans la dégradation d'acides carboxyliques. Les valeurs pour la biodégradation ont été mesurées en milieu d'incubation nuage réel à 12°C et les valeurs de dégradation par les radicaux ont été estimées ($[^{\bullet}OH] = 10^{-14}$ M). Adapté à partir de* Vaïtilingom et al. *(2011).*

Dans de récents travaux, *Vaïtilingom et al.* (2013) ont montré que l'importance des voies radicalaires dans la transformation de la matière organique pourrait également être largement surestimée en raison de l'action des microorganismes sur les radicaux ou sur leurs précurseurs tels que le peroxyde d'hydrogène. Bien que ces composés soient considérés comme extrêmement toxiques pour les cellules microbiennes, de nombreuses espèces ont développé des enzymes leur permettant de les dégrader (catalases, peroxydases, superoxyde dismutases ; *cf.* le paragraphe 3.1). Des incubations d'eau nuageuse en présence ou absence de lumière ont permis d'observer que la microflore endogène peut métaboliser le peroxyde d'hydrogène en O_2 et en H_2O dans ces conditions et donc agir comme un puits de radicaux. Durant la nuit, les microorganismes pourraient même être les principaux acteurs de la disparition de cet oxydant (**Figure 20**). Il a également été observé que, malgré la production de radicaux $^{\bullet}OH$ en présence de lumière, les cellules ont la capacité de maintenir leur activité métabolique et de dégrader divers acides carboxyliques et le formaldéhyde.

Tous ces résultats suggèrent que les microorganismes pourraient être actifs à la fois pendant la journée et pendant la nuit pour biodégrader des acides carboxyliques dans l'eau des nuages. En revanche, l'activité microbienne ne serait prépondérante que la nuit dans le cas de la dégradation du formaldéhyde et du méthanol. Ceci est cohérent avec le fait que le métabolisme des C1 est utilisé uniquement par certaines souches spécialisées, alors que le métabolisme central tel que le cycle de Krebs est plus répandu parmi les souches microbiennes.

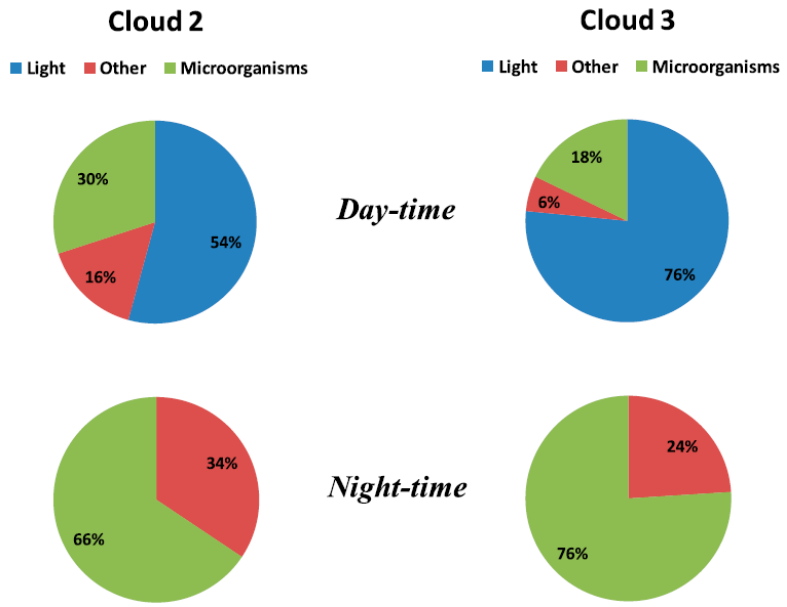


Figure 20 *: Contribution relative des processus biotiques ou abiotiques pour la dégradation de H_2O_2 dans l'eau de nuage naturelle. « Other » correspond à des processus de formation de radicaux n'impliquant ni la photolyse de H_2O_2, ni sa biodégradation (réaction de Fenton, etc.). Les contributions ont été calculées à partir des vitesses initiales de dégradation (Vaïtilingom et al., 2013).*

En conclusion, tous les résultats rapportés dans la littérature jusqu'à présent mettent en avant une contribution potentielle des microorganismes à la chimie atmosphérique. Cependant, les

quelques études traitant de ce sujet se sont focalisées uniquement sur la dégradation d'acides carboxyliques ou de composés à un seul atome de carbone et il serait maintenant intéressant d'obtenir une vue d'ensemble en observant l'impact des microorganismes sur d'autres types de molécules organiques rencontrées dans les nuages (sucres, acides aminés, *etc.*).

Au fur et à mesure du temps, les conditions expérimentales se sont approchées de plus en plus des conditions réelles, avec l'utilisation récemment d'eau de nuage naturelle pour les incubations. Cependant, la reproductibilité des conditions nuageuses a atteint ses limites : la dynamique des nuages est impossible à mimer en laboratoire. Afin de continuer cette approche vers les conditions réelles, l'étape suivante nécessaire est d'utiliser des modèles numériques simulant la complexité d'un nuage et permettant d'inclure plusieurs phases en interaction, des variations du flux actinique, de la température, une influence des processus microphysiques, *etc.*

En résumé, l'état des connaissances actuel suppose que les bactéries pourraient avoir différents rôles sur les compositions chimiques et microphysiques des nuages (**Figure 21**). D'une part, elles pourraient favoriser la formation de nuage de façon directe grâce à leurs propriétés de surface et de façon indirecte en produisant des métabolites avec un fort pouvoir de condensation tels que les biosurfactants. D'autre part, elles pourraient promouvoir le gel des gouttelettes d'eau en cristaux de glace et ainsi participer à la formation des précipitations. Enfin, elles pourraient impacter la composition de la matière organique des nuages en utilisant ces composés carbonés comme substrat pour leur métabolisme (action directe) ou en dégradant les oxydants présents dans la phase aqueuse des nuages et responsables de transformations de la matière organique (action indirecte).

L'importance de ces rôles demeure toutefois « nébuleuse ». Pour déterminer réellement l'impact des bactéries sur les nuages, il est désormais nécessaire de combiner des études sur le terrain et en laboratoire qui fournissent des observations *in situ* à une approche *in silico.*

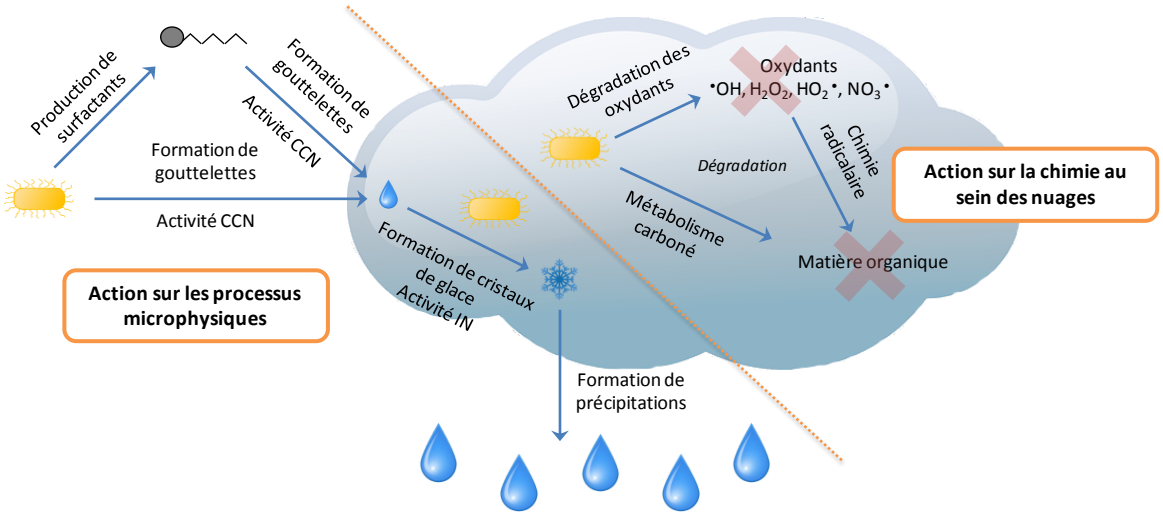


Figure 21 *: Récapitulatif des rôles potentiels des bactéries sur la chimie et la microphysique des nuages.*

6. Problématique

L'objectif principal de cette thèse est d'aborder sous les aspects biologiques, microphysiques et chimiques les interactions réciproques ayant lieu entre les microorganismes et les conditions présentes dans les nuages.

Le premier chapitre des résultats de ce travail (**Chapitre II**) s'intéresse à décrire la composition chimique et microbiologique de l'eau des nuages prélevée au sommet du puy de Dôme (1465 m d'altitude, France) en poursuivant une étude à long terme qui a été au cœur de plusieurs thèses précédemment. Alors que les rares publications rapportant la composition microbiologique des nuages se basent sur un nombre restreint d'évènements et sur des intervalles de temps relativement courts, la présence d'un site d'observation tel que celui du puy de Dôme a permis entre 2004 et 2010 l'étude microbiologique de 34 prélèvements de nuages. En parallèle, entre 2001 et 2010, la composition chimique de 73 évènements nuageux a été étudiée. Il est évident que décrire la complexité de la composition chimique et biologique des nuages ne peut se faire que par un très grand nombre d'observations. C'est pour cela que ce travail de « monitoring » chimique et biologique a été poursuivi durant les trois années de ma thèse dans le but de créer une base de données conséquente et plus robuste. En parallèle, les données physico-chimiques rassemblées précédemment ont été statistiquement analysées afin de classifier les masses d'air atteignant le puy de Dôme en fonction de leur origine et de définir la composition physico-chimique propre à chacune de ces origines.

Le deuxième objectif de cette thèse a été d'étudier les facteurs de stress pouvant être à l'origine de la sélection des microorganismes présents dans les nuages (**Chapitre III**). Récemment, *DeLeon-Rodriguez et al.* (2013) ont pointé le fait que la richesse en espèces microbiennes de la troposphère est plus faible que celle de n'importe quel autre écosystème ce qui suggère que la vie dans l'atmosphère est fortement gouvernée par les conditions environnementales. De plus, la présence de groupes microbiens récurrents dans la communauté cultivable des nuages suppose une meilleure adaptation aux conditions régnant dans ce milieu. Par conséquent, ce chapitre de la thèse se focalise sur la détermination de taux de survie de cinq souches microbiennes isolées d'eau de nuage à quatre stress majeurs rencontrés dans l'atmosphère : la lumière solaire, la présence d'oxydants, les changements osmotiques intervenant lors de la condensation de l'eau et de son évaporation autour des microorganismes et les changements de températures conduisant à la formation de glace autour des cellules. Le but de ce travail est de comprendre quels sont les facteurs limitant la survie des microorganismes dans les nuages.

Le troisième objectif de ce travail s'est focalisé sur la possibilité que les bactéries soient des acteurs de la formation de glace dans les nuages (**Chapitre IV**). Dans ce milieu, aucune souche ayant une activité glaçogène n'a pu être identifiée (*Ahern et al.*, 2007). Pourtant, plusieurs paramètres suggèrent fortement leur présence et leur activité :

- la présence en grand nombre de bactéries appartenant à des espèces connues pour leur activité glaçogène ;
- les conditions physico-chimiques des nuages compatibles avec l'expression des protéines glaçogènes (température, stress nutritif, *etc.*) ;
- la forte abondance de bactéries glaçogènes dans les précipitations ;
- l'observation par *Pratt et al.* (2009) et *Cziczo et al.* (2013) qu'une partie des cristaux de glace dans les cirrus ont une signature biologique ;
- l'activité glaçogène bactérienne démontrée en chambre à nuage.

La première sous-partie de ce travail a donc été d'identifier des bactéries glaçogènes parmi la banque de souches microbienne isolées des nuages réalisée à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand depuis 2004. Le criblage a été effectué selon des critères d'appartenance à des genres préalablement connus pour leur activité glaçogène. Après avoir identifié plusieurs souches bactériennes présentant une activité glaçogène, deux d'entre elles ont été choisies comme modèle pour étudier dans une chambre de simulation de nuages (Karlsruhe, Allemagne) d'une part, leur comportement glaçogène et d'autre part, leur survie une fois sous forme aérosolisée. Enfin, une dernière sous-partie de ce travail s'est intéressée à quantifier directement sur l'eau de nuage la concentration en noyaux glaçogènes totaux et biologiques. Ces données ont ensuite été intégrées à un modèle simulant les concentrations de bactéries glaçogènes à la surface du globe.

Enfin, le dernier chapitre de cette thèse s'intéresse à l'importance des microorganismes dans la transformation de la matière organique dans les nuages (**Chapitre V**). Plusieurs études ont établi le fait que les bactéries pouvaient intervenir dans les processus liés à la dégradation de la matière organique dans les nuages, et ce à des contributions équivalentes à celles de la chimie radicalaire. Toutefois, ces études ont été réalisées en laboratoire sur des milieux artificiels ou des échantillons de nuages en phase liquide (« bulk ») où l'ensemble des gouttelettes a été réuni dans un seul volume afin de pouvoir effectuer les analyses. Par conséquent, seule la réactivité des composés cibles en phase aqueuse est considérée et les transferts entre les différentes phases du nuage sont négligées. Afin de surmonter ces limites expérimentales, il est nécessaire de faire appel à des outils de modélisation simulant la chimie multiphase du nuage et permettant de considérer un grand nombre de paramètres physico-chimiques (transferts de masse entre les gouttelettes nuageuses et l'air interstitiel, variation du flux actinique, tests sur la taille des gouttelettes, composition chimique variable, *etc.*). Cependant, afin d'intégrer l'action des bactéries dans de tels modèles, il faut au préalable quantifier leur activité sur des composés cibles et déterminer des constantes réactionnelles qui pourront intervenir dans les simulations. C'est donc à ce travail qu'est consacré le dernier chapitre de cette thèse.

En conclusion, ce travail de thèse s'intègre à une interface pluridisciplinaire mêlant biologie, physique et chimie, et à une approche alliant des prélèvements sur le terrain et des expériences en

laboratoires pour fournir des données qui serviront à la modélisation des conditions physico-chimiques des nuages et du rôle des microorganismes dans les processus microphysiques et chimiques des nuages.

Chapitre II : Analyse de la composition microbiologique et chimique de l'eau de nuage

1. Introduction

En raison de leur caractère éphémère et de la difficulté à les prélever, les nuages sont encore aujourd'hui des systèmes dont la complexité chimique et microbiologique demeure mal connue. Pour remédier à cela, il est nécessaire de réaliser des études à très long terme d'un grand nombre de paramètres physiques, chimiques et biologiques permettant de créer des bases de données conséquentes et d'extraire des corrélations significatives entre les différents types de données.

La station d'observation du puy de Dôme est un site internationalement reconnu pour l'étude de l'atmosphère et plus particulièrement, de ses différents constituants (gaz, particules, nuages). Cette station est désormais reconnue comme une station du réseau GAW (« Global Atmosphere Watch » ; programme WMO : « World Meteorological Organization »). Le puy de Dôme fait également parti du réseau Européen EUSAAR/ACTRIS (« Aerosol, Cloud and Trace gases Research InfrastructureS ») qui a la volonté d'intégrer dans un réseau Européen des stations sol de mesures des aérosols, nuages et espèces gazeuses à court temps de vie. Plus spécifiquement, ce site permet l'analyse de la composition physico-chimique des nuages depuis 2001 et de la composition microbiologique depuis 2004. Les données sont présentées sur le site http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data.php.

Durant ma thèse, j'ai eu la possibilité de poursuivre ce travail de monitoring en perpétuant les prélèvements de nuages au sommet du puy de Dôme et leur analyse. Dans ce chapitre, le site de prélèvement du puy de Dôme ainsi que les conditions de prélèvement des nuages sont présentés. Les résultats concernant les analyses de la composition chimique des nuages durant la période 2001-2011 sont décrits dans la deuxième partie de ce chapitre sous la forme d'une publication. Dans la troisième partie, les résultats concernant les analyses microbiologiques durant la période 2004-13 sont présentés. Enfin, la dernière partie de ce chapitre est consacré à une étude statistique afin de déterminer les corrélations potentielles entre les conditions physico-chimiques nuageuses et les données microbiologiques de ce système.

2. Site de prélèvement et description de l'échantillonnage

Les prélèvements de l'eau des nuages ont été effectués au sommet du puy de Dôme, dôme volcanique du Massif Central culminant à 1465 m au dessus du niveau de la mer (**Figure 22**). Il est situé en Auvergne, à une quinzaine de kilomètres à l'Ouest de Clermont-Ferrand, la seule grande agglomération environnante (396 m d'altitude ; 460 000 habitants).

Figure 22 *: Le puy de Dôme vu de Clermont-Ferrand.*

L'influence de cette zone urbaine sur les mesures effectuées au puy de Dôme est limitée comme en témoignent les concentrations en composés primaires anthropiques mesurées (monoxyde d'azote, « black carbon », *etc.*) et la distribution en taille des aérosols (*Henne et al.*, 2010; *Asmi et al.*, 2012). De plus, les prélèvements sont principalement réalisés en automne, en hiver et au printemps, périodes où le sommet du puy de Dôme se situe souvent dans la troposphère libre (particulièrement en conditions hivernales et en conditions nocturne) ou dans la couche résiduelle de la couche limite ce qui réduit l'influence locale. De ce fait, les nuages affleurant le puy de Dôme sont originaires de zones éloignées et les masses d'air échantillonnées proviennent d'un transport à longue distance. Cette particularité permet d'étudier des nuages de compositions extrêmement diverses. En effet, le puy de Dôme dispose d'une situation géographique à l'interface entre plusieurs types de masses d'air. Principalement, les masses d'air proviennent de l'Ouest où elles sont soumises à l'influence de l'Océan Atlantique. De façon moins fréquente, elles peuvent être originaire de l'Est et du Nord-Est et ainsi refléter les pollutions engendrées par l'activité anthropique. Enfin, ponctuellement, les nuages peuvent provenir de régions situées au Sud de l'Europe et exprimer l'influence de la région Saharienne. Cette caractéristique fait du puy de Dôme un site de référence pour évaluer l'impact de l'anthropisation sur l'atmosphère.

L'Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand (OPGC) héberge au sommet du puy de Dôme une station d'observation regroupant un grand nombre d'équipements pour réaliser en continu des mesures météorologiques et physico-chimiques de l'atmosphère (température, contenu liquide en eau, mesures de gaz et d'aérosols, *etc.*) (**Figure 23**). A l'intérieur du chalet d'étude, trois laboratoires sont consacrés respectivement aux mesures physiques, chimiques et microbiologiques des prélèvements atmosphériques.

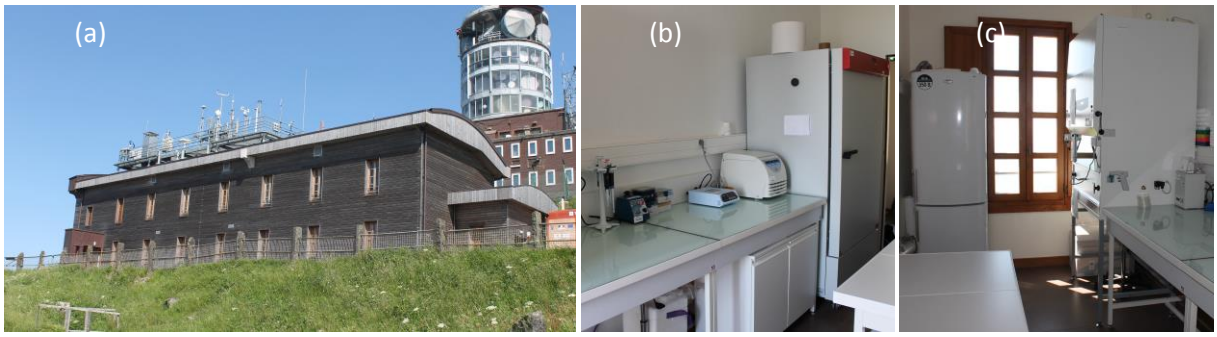


Figure 23 *: (a) Station d'observation de l'Observatoire du Globe de Clermont-Ferrand au sommet du puy de Dôme. La plateforme sur le toit regroupe des instruments permettant de mesurer les paramètres météorologiques et des préleveurs des différents compartiments de l'atmosphère (gaz, particules, eau nuageuse). (b) et (c) Laboratoire de microbiologie situé dans le chalet d'observation au sommet du puy de Dôme.*

Les prélèvements d'eau de nuage ont été réalisés à l'aide d'impacteurs à gouttelettes semblables à ceux décrits par *Kruisz et al.* (1992) (**Figure 24**). Ce système a été développé pour l'échantillonnage de nuages ou de brouillards en présence de vents importants comme c'est le cas au sommet des montagnes. Il est composé d'un coupe-vent qui ralentit les gouttelettes au dessus du système d'impaction. Les gouttelettes en suspension sont alors aspirées à travers la fente de l'enceinte cylindrique et, selon leur diamètre, percutent la plaque d'impaction ou suivent le flux de l'aspiration.

Lors des prélèvements, les impacteurs sont placés sur la plateforme au dessus du chalet d'observation à environ 5 m du sol, ce qui permet de limiter les contaminations provenant du sol.

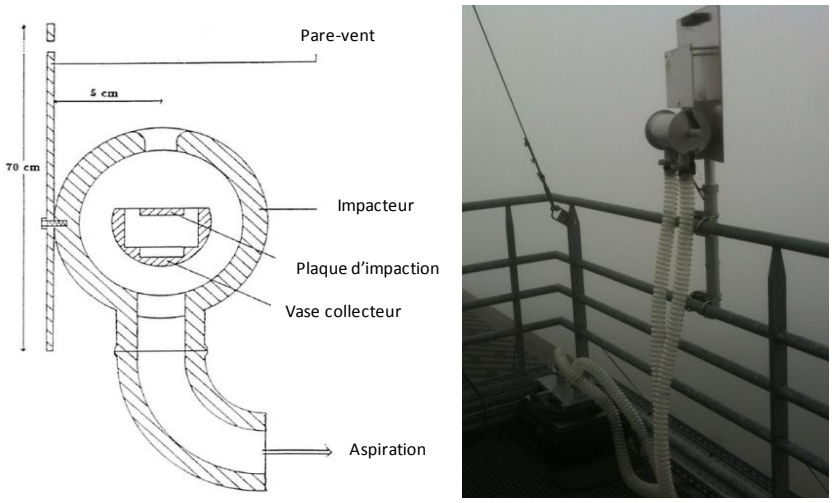


Figure 24 *: Impacteurs à gouttelettes (a) Vue en coupe du système, schéma traduit à partir de* Kruisz et al. *(1992); (b) Impacteur en fonctionnement sur le toit du chalet.*

Les impacteurs utilisés au puy de Dôme ont connu des modifications au cours du temps. En 2012, deux nouveaux impacteurs ont été conçus par le service technique du LaMP. Afin d'augmenter le volume de prélèvement, un double système d'aspiration a été conçu. Les pompes ont été placées dans des mallettes afin de pouvoir les transporter aisément dans le cadre de campagnes de mesures

dans d'autres sites. D'autre part, le système d'insertion du vase de collecte a été repensé afin de faciliter son retrait lors de prélèvements où la glace se forme à l'extérieur du système.

3. Composition chimique des nuages

3.1.Introduction

Depuis Février 2001, l'Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand, le laboratoire de Météorologie Physique et l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand effectuent régulièrement des prélèvements de nuages au sommet du puy de Dôme afin d'étudier leur composition chimique. Les données collectées jusqu'en 2011 (73 évènements nuageux) ont été rassemblées et analysées dans la publication présentée ci-après dans le but de définir les critères influençant la composition chimique nuageuse.

Pour cela, un traitement statistique a été appliqué sur l'ensemble des données : dans un premier temps une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été utilisée afin de définir (1) des facteurs expliquant la variabilité des données et (2) des groupes réunissant les évènements nuageux les plus semblables. D'après les rétro-trajectoires, ces groupes rassemblent les prélèvements selon l'origine de la masse d'air (origine hautement marine, marine, continentale ou polluée). Par la suite, les paramètres physico-chimiques analysés ont été décrits pour chacun des groupes dans l'objectif de fournir des données chimiques typiques. Ces données pourront ainsi servir à créer des scénarios chimiques caractéristiques des différentes masses d'air rencontrées dans un but de modélisation.

Mon implication dans cette étude a concerné le prélèvement des échantillons les plus récents ainsi que le traitement statistique des données récoltées avant mon arrivée.

Ces travaux ont été présentés sous forme de poster dans le cadre de l'European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC12) à Clermont-Ferrand en Décembre 2011 sous le titre « 10-year monitoring of cloud chemical composition at the puy de Dôme station ». (Présentateur : M. Joly).

Ces travaux ont également fait l'objet de la publication ci-après.

3.2. "Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) from 10-year monitoring: mean features of their physico-chemical properties", paru dans Atmospheric Chemistry and Physics

Atmos. Chem. Phys., 14, 1485–1506, 2014
www.atmos-chem-phys.net/14/1485/2014/
doi:10.5194/acp-14-1485-2014
© Author(s) 2014. CC Attribution 3.0 License.

Atmospheric Chemistry and Physics
Open Access

Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) based on 10 yr of monitoring of their physicochemical properties

L. Deguillaume[1,2], T. Charbouillot[1,2,3,4], M. Joly[1,2,3,4], M. Vaïtilingom[1,2,3,4], M. Parazols[1,2,3,4], A. Marinoni[1,2,*], P. Amato[3,4], A.-M. Delort[3,4], V. Vinatier[3,4], A. Flossmann[1,2], N. Chaumerliac[1,2], J. M. Pichon[1,2], S. Houdier[5,6], P. Laj[1,2,], K. Sellegri[1,2], A. Colomb[1,2], M. Brigante[3,4], and G. Mailhot[3,4]**

[1]Clermont Université, Université Blaise Pascal, OPGC, Laboratoire de Météorologie Physique, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France
[2]CNRS, UMR6016, LaMP/OPGC, BP80026, 63177 Aubière, France
[3]Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France
[4]CNRS, UMR6296, ICCF, BP 80026, 63177 Aubière, France
[5]Université Joseph Fourier-Grenoble 1, Laboratoire de Glaciologie et Géophysique de l'Environnement, 38041 Grenoble, France
[6]CNRS, UMR5183, 38041 Grenoble, France
[*]now at: the Institute for Atmospheric Science and Climate (ISAC), CNR, Bologna, Italy
[**]now at: Laboratoire de Glaciologie et Géophysique de l'Environnement (LGGE), CNRS/University of Grenoble, Grenoble, France

Correspondence to: L. Deguillaume (l.deguillaume@opgc.univ-bpclermont.fr)

Received: 23 July 2013 – Published in Atmos. Chem. Phys. Discuss.: 30 August 2013
Revised: 6 December 2013 – Accepted: 6 January 2014 – Published: 10 February 2014

Abstract. Long-term monitoring of the chemical composition of clouds (73 cloud events representing 199 individual samples) sampled at the puy de Dôme (pdD) station (France) was performed between 2001 and 2011. Physicochemical parameters, as well as the concentrations of the major organic and inorganic constituents, were measured and analyzed by multicomponent statistical analysis. Along with the corresponding back-trajectory plots, this allowed for distinguishing four different categories of air masses reaching the summit of the pdD: polluted, continental, marine and highly marine. The statistical analysis led to the determination of criteria (concentrations of inorganic compounds, pH) that differentiate each category of air masses. Highly marine clouds exhibited high concentrations of Na^+ and Cl^-; the marine category presented lower concentration of ions but more elevated pH. Finally, the two remaining clusters were classified as "continental" and "polluted"; these clusters had the second-highest and highest levels of NH_4^+, NO_3^-, and SO_2^{4-}, respectively. This unique data set of cloud chemical composition is then discussed as a function of this classification. Total organic carbon (TOC) is significantly higher in polluted air masses than in the other categories, which suggests additional anthropogenic sources. Concentrations of carboxylic acids and carbonyls represent around 10 % of the organic matter in all categories of air masses and are studied for their relative importance. Iron concentrations are significantly higher for polluted air masses and iron is mainly present in its oxidation state (+II) in all categories of air masses. Finally, H_2O_2 concentrations are much more varied in marine and highly marine clouds than in polluted clouds, which are characterized by the lowest average concentration of H_2O_2. This data set provides concentration ranges of main inorganic and organic compounds for modeling purposes on multiphase cloud chemistry.

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

1 Introduction

The atmospheric system is a complex, dynamical, and multiphase medium where chemical species can be transformed (Monks et al., 2009). Different phases (solid, gas, liquid and ice) are in permanent interaction; here, the multiphase cloud system holds a particular interest. It contains both organic and inorganic species that result from the mass transfer of soluble gases in the liquid phase and also from the dissolution of the soluble fraction of aerosol particles (Fuzzi et al., 2002; Sellegri et al., 2003). Modeling studies (e.g., Barth, 2006; Leriche et al., 2007; Lim et al., 2005; Tilgner and Herrmann, 2010; Tost et al., 2007), in situ measurements (e.g., Laj et al., 1997b; Möller et al., 1996; Moore et al., 2004) and laboratory investigations (e.g., Altieri et al., 2006; Vione et al., 2006) highlighted the fact that chemical reactions in clouds play an important role in atmospheric chemistry and strongly affect the homogeneous and heterogeneous gas-phase chemistry (Lelieveld and Crutzen, 1991). Depending on the physical and chemical characteristics of cloud droplets, aqueous-phase reactions potentially represent either a sink or a source for atmospheric trace compounds. In turn, the chemical transformations in the liquid phase control the fate of gaseous species and/or their reaction products upon cloud dissipation. Transport, distribution and removal of chemical species from the atmosphere are clearly influenced by physical and chemical processes in clouds.

The role of clouds in the atmospheric cycle of inorganic substances has been discussed in many publications in the past (see recent reviews from Fowler et al., 2009; Monks et al., 2009) focusing on the oxidation/transformation of sulfur and nitrogen compounds (Barth, 2006; Cape et al., 1997; Seinfeld and Pandis, 2006; Wells et al., 1997). The importance of the atmospheric liquid phase has been investigated for organic substances (Fuzzi et al., 2002; Herckes et al., 2013), in particular for the formation/transformation of carboxylic acids (Chebbi and Carlier, 1996; Laj et al., 1997a; Monod and Carlier, 1999) or, more recently, for the formation of secondary organic aerosol (SOA) after cloud evaporation (Blando and Turpin, 2000; Hallquist et al., 2009; Lee et al., 2012; Lim et al., 2010; Loeffler et al., 2006). Actually, although the formation of SOA has been largely studied in the gas phase, the contribution of clouds is still uncertain (Ervens et al., 2011). Complex chemical reactions can occur in aerosol water, forming accretion products such as oligomers. Recent laboratory studies demonstrated that small oxygenated compounds undergo these processes such as methylglyoxal (Altieri et al., 2008; Tan et al., 2010), hydroxyacetaldehyde (Perri et al., 2009) or glyoxal (Carlton et al., 2007; De Haan et al., 2009; Ervens and Volkamer, 2010); these alternative chemical pathways are assumed to represent an efficient process to transform volatile organic compounds into SOA (El Haddad et al., 2009).

Chemical reactions in clouds are driven by efficient oxidation processes due to the presence of photo-chemically produced oxidants such as hydroxyl and nitrate radicals (respectively, $HO^{\bullet}$ and $NO_3^{\bullet}$) as well as oxidants such as ozone (O_3) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Reactivity is also influenced by the partitioning between droplets and the other phases (particle, gas, ice) and is catalyzed by photochemical processes (Barth, 2006; Hoigné, 1994; Minero et al., 2007; Ruggaber et al., 1997; Vione et al., 2006). Recently, a number of studies also suggested that biological processes are potentially involved in the transformation of soluble organic material in cloud droplets, even at low temperatures (Deguillaume et al., 2008; Husárová et al., 2011; Vaïtilingom et al., 2010, 2011, 2013). An additional complexity derives from the presence of ice, which interferes with liquid/gas phase partitioning and modifies the photochemical equilibrium through feedbacks between ice, radiation and reactivity pathways (Long et al., 2010; Marécal et al., 2010; Voisin et al., 2000).

It is therefore crucial to study the chemical composition and reactivity of chemical species in clouds in order to understand and quantify their mechanisms of transformation in the atmosphere. Several in situ investigations of cloud chemistry have already been reported, and most of them are based on specific single campaigns (Bower et al., 2000; Choularton et al., 1997; Collett Jr et al., 1990; Decesari et al., 2005; Elbert et al., 2000; Ghauri et al., 2001; Gioda et al., 2009; Hegg et al., 2002; Hutchings et al., 2009; Kim et al., 2006a; Löflund et al., 2002; Moore et al., 2004; Sedlak et al., 1997; Watanabe et al., 2001; Weathers et al., 1988; Wieprecht et al., 2005; Wilkinson et al., 1997; Wobrock et al., 2001). All of these studies showed a high variability in the cloud chemical composition, which is driven by both source proximity and local microphysics. Integration studies considering different cloud experiments can be difficult, especially because cloud sampling methodologies are not standardized and not easily comparable (Laj et al., 2009). Some long-term field measurements using automated cloud water collection systems were conducted in the past; they mainly examined the inorganic chemical composition of clouds (Acker et al., 1998; Baumgardner et al., 2003; Guo et al., 2012; Kim et al., 2006b).

For modeling purposes, statistical information on the variability of cloud chemical composition and its relationship with environmental factors, such as source regions, is extremely useful. Long-term studies are required to derive statistically sound information. Due to the transient nature of clouds, monitoring cloud chemical composition is not trivial and is subject to difficulties such as sampling frequencies, samples' conservation, and quality homogeneity on a long-term basis. Here, we present chemical data of the condensed phase of a series of cloud events (73 cloud events representing 199 individual samples) sampled at the puy de Dôme (pdD) mountain, a high-altitude site (1465 m) that can generally be classified as "rural" (Henne et al., 2010; Joly and Peuch, 2012; Putaud et al., 2004). The observation of clouds and, more generally, of atmospheric variables at high-altitude, remote sites brings additional valuable information

on the extent of the anthropogenic influence. Usually, these sites are influenced by long-range transport rather than by local sources, and hence provide information on the physicochemical variability of air masses on a regional scale. More precisely, due to the high altitude of the station, the air mass composition is representative of the regional atmospheric background during the day and more representative of larger synoptic-scale air masses during nighttime (Asmi et al., 2011). The data set presented (pH, conductivity, redox potential, total organic content, concentrations of the most abundant inorganic and organic chemical species, concentrations of oxidants: iron and hydrogen peroxide) could be used as a reference for modeling work that simulates the chemical composition of tropospheric clouds in different scenarios.

2 Material and methods

2.1 Cloud sampling

Sampling was performed at the puy de Dôme (pdD) station (45°46′20″ N, 2°57′57″ E), which is part of the networks EMEP (the European Monitoring and Evaluation Programme), GAW (Global Atmosphere Watch), and ACTRIS (Aerosols, Clouds, and Trace gases Research Infrastructure). The observatory chalet is on top of a mountain rising notably above the surrounding area with an altitude of 1465 m a.s.l.; the pdD mountain is part of the Massif Central mountains, a topography that is north–south oriented. Clouds are frequently observed at the top of the site, either during advection of frontal systems or because of the orographic rising of moist air. The urban area of Clermont-Ferrand and its surrounding suburbs (≈ 280 000 inhabitants) is situated 16 km east of the station at 396 m a.s.l.; its influence on the pdD measurements is fairly limited (especially during nighttime) and air masses producing clouds at the pdD summit from eastern origin are extremely rare, as documented by primary anthropogenic tracers concentrations (NO, black carbon, etc.) and statistical studies on aerosol size distributions (Asmi et al., 2012; Henne et al., 2010). Most of the clouds are sampled during winter and spring and their corresponding air masses are representative of various geographical origins. A short summary of previous studies related to this site is given in the Supplement.

Cloud sampling was performed between 2001 and 2011, with an average sampling time of 2 h (corresponding to an average sampling volume of 50 mL). However, between 2006 and 2009, the observatory at the pdD summit has been renovated, which greatly limited the cloud sampling operations (only 16 cloud events were sampled during that period). Non-precipitating cloud droplets were sampled using a single-stage cloud collector similar to the one described by Kruisz (1993). Cloud droplets larger than 7 µm (cut-off diameter) (Brantner et al., 1994) were collected by impaction onto a rectangular aluminum plate. Droplets either froze upon impaction (supercooled conditions) or were collected directly as a liquid. The water was transferred at room temperature, either directly or after a short melting period into glass vials. Possible changes in the cut-off diameter due to the formation of ice on the impaction plate are expected to be negligible given the limited volume of the collected sample. The accumulation of ice leads to more efficient sampling by collecting smaller drops.

2.2 Physicochemical parameters and chemical analysis

Physicochemical parameters were measured immediately after sampling; pH, conductivity and redox potential were measured using a Consort® multi-parameter C830. Meteorological parameters were also monitored at the pdD station: wind speed and direction, temperature, pressure, and relative humidity. Measurements of liquid water content (LWC) and effective radius of droplets were obtained from a Gerber PVM-100 probe, which was regularly controlled and calibrated using a spinning optical disk.

After collection, cloud water samples were kept at 4 °C in the dark until the chemical and total organic carbon (TOC) analyses were conducted. TOC was obtained with a Shimadzu TOC 5050A analyzer. Potassium hydrogen phthalate and sodium carbonate aqueous solutions were used to calibrate the instrument for the total carbon content (TC) and the inorganic carbon content (IC). TOC quantification was then obtained by the difference between the measured TC and IC. The analytical method for ion chromatography analysis (material: Dionex DX320, column AS11 for anions, eluent KOH; Dionex ICS1500, column CS16 for cations, eluent hydroxymethanesulfonate) has been previously reported by Jaffrezo et al. (1998). Ion chromatography analysis of tenfold diluted samples was made in triplicate or more, and allowed for the measurement of the concentrations of the major organic and inorganic ions (acetic, formic, succinic, malonic and oxalic acids, Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-}, Na^+, K^+, NH_4^+, Mg^{2+} and Ca^{2+}). Total ion content (TIC) corresponds to the calculated sum of the concentrations of these species.

Measurements of H_2O_2 and iron concentrations by UV–visible spectroscopy were done in triplicate or more; the derivatization of these reactive species in the samples allowed for maintaining their concentrations until the analysis was performed in the laboratory; this was directly conducted after the end of the collection of cloud water. H_2O_2 concentration was measured by UV–visible spectroscopy at 551 nm, following the method developed by Bader et al. (1988). This method is based on the oxidation of N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) by H_2O_2 in the presence of horseradish peroxidase, leading to the radical cation of DPD with an absorbance (at 551 nm) of $21\,000 \pm 500\,M^{-1}\,cm^{-1}$ at equimolar rate. Fe(II) concentration was measured by UV–visible spectroscopy at 562 nm, using the method developed by Stookey (1970) based on the rapid complexation of iron with ferrozine. After reduction of Fe(II) by the addition of

hydroxylamine chlorhydrate, the total iron content Fe(tot) was detected. Fe(III) concentration was then calculated by deducing the concentration of Fe(II) from Fe(tot).

Measurements of carbonyl compounds were done by using a method that was specifically developed for the quantification of single aldehydes in environmental aqueous phases (Houdier et al., 2000). The method, which has been recently improved for the analysis of polyfunctional carbonyls (Houdier et al., 2011), is based on the derivatization of carbonyl compounds with an original oxyamino reagent, i.e., dansylacetamidooxyamine (DNSAOA). Oximes that form in solution are subsequently separated and detected by using high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. The method exhibits limits of detection below 1 nM for the compounds targeted here, i.e., formaldehyde (HCHO), acetaldehyde (CH_3CHO) and polyfunctional carbonyls glyoxal (CHOCHO), in addition to methylglyoxal (CH_3COCHO) and hydroxyacetaldehyde. $HOCH_2CHO$ and the analyses of the carbonyl content of cloud samples were tripled for a quantitative approach. Samples were frozen until quantification of carbonyls, which was done once a year. Previous works highlighted the full recovery of carbonyls after samples were frozen, since they are analyzed right after their thawing (Domine et al., 2010; Houdier et al., 2011). In cloud droplets, carbonyl compounds (in particular formaldehyde) form adducts with dissolved SO_2. For instance, significant amounts of hydroxymethanesulfonate (HMSA), the adduct of HCHO, have been measured in cloud or fog water where it constitutes a reservoir for both S(IV) species and HCHO (Ang et al., 1987; Munger et al., 1984). HMSA and more generally S(IV)-carbonyl adducts form rapidly and are stable towards dissociation in acidic media such as cloud droplets (Dasgupta et al., 1980; Munger et al., 1984). In this work, derivatization of carbonyls by DNSAOA was performed in an acidified (pH ~ 2) solution of the cloud sample. Dissociation of the carbonyl-S(IV) adducts in the course of the derivatization reaction is therefore unlikely, and carbonyl concentrations reported in this paper represent the free carbonyl concentrations ($[\text{carb}]_{\text{free}}$) and therefore lower estimates of the total carbonyl concentrations, with $[\text{carb}]_{\text{tot}} = [\text{carb}]_{\text{free}} + [\text{S(IV)-carb}]$.

2.3 Statistical analyses

Principal component analysis (PCA) was performed using Simca-P + software (Umetrics). Air mass categories were determined with a "hierarchical clustering analysis" (HCA) from PCA results: cloud events or groups of cloud events were lumped together in pairs based on their similarities. In our analysis, only one missing value from the six variables (pH and Na^+, Cl^-, NO_3^-, NH_4^+ and SO_4^{2-} concentrations) used for the PCA was permitted to limit artifacts.

To highlight significant differences between data groups, the Kruskal–Wallis nonparametric test was carried out with Past software (Hammer et al., 2001). Two air mass categories were declared different when the probability for the groups to have identical data distribution was lower than 5 % (p value < 0.05). This test was chosen due to the lack of normality of the data according to the Shapiro–Wilk normality test.

2.4 Back-trajectory plots

Seventy two-hour backward trajectories of the air masses collected at the puy de Dôme were calculated using the HYSPLIT (Hybrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory) model with the GDAS1 meteorological data archive and default settings (Draxler and Rolph, 2012).

3 Results

Seventy-three cloud events have been sampled at the top of the pdD between 2001 and 2011, representing 199 individual samples. The cloud chemical composition as well as the physicochemical parameters measured at the pdD station can be found on a website (http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data.php). Table S1 indicates the physicochemical analysis performed for each cloud event together with the origin of the air masses reaching the sampling site.

For this study, we decided to classify our cloud samples according to a statistical analysis that considers physicochemical parameters of the cloud samples. This approach is more robust than considering only the back-trajectories of the air masses that reach the puy de Dôme station. Nevertheless, the back-trajectories are drawn for each cloud samples to confirm the statistical classification. Cloud events corresponding to 4 individual samples (No. 19 and 27, Table S1) with air masses originating from the Sahara according to the corresponding back-trajectory plots were excluded due to their lack of representativeness of the data set.

3.1 Origin of air masses – climatology

Individual samples were classified by principal component analysis (PCA). This technique was previously applied to inorganic ion concentrations in cloud water and to the air mass origin (Deininger and Saxena, 1997; Kim et al., 2006b). Here, this statistical approach is used to distinguish the parameters that influence the cloud sample characteristics.

At first, 13 variables measured at the pdD station were considered in the analysis: major ion concentration (Na^+, Cl^-, NO_3^-, NH_4^+ and SO_4^{2-}), total ion content, cloud water loading, liquid water content, pH, conductivity, redox potential, iron concentration and total organic carbon. Only the six variables that discriminated between the different groups most were kept to perform a second PCA: pH and Na^+, Cl^-, NO_3^-, NH_4^+ and SO_4^{2-} concentrations. Among all cloud events, only 138 samples, corresponding to 56 events, presented sufficient data for the analysis (one missing value at maximum). The two first PCs (principle components) of

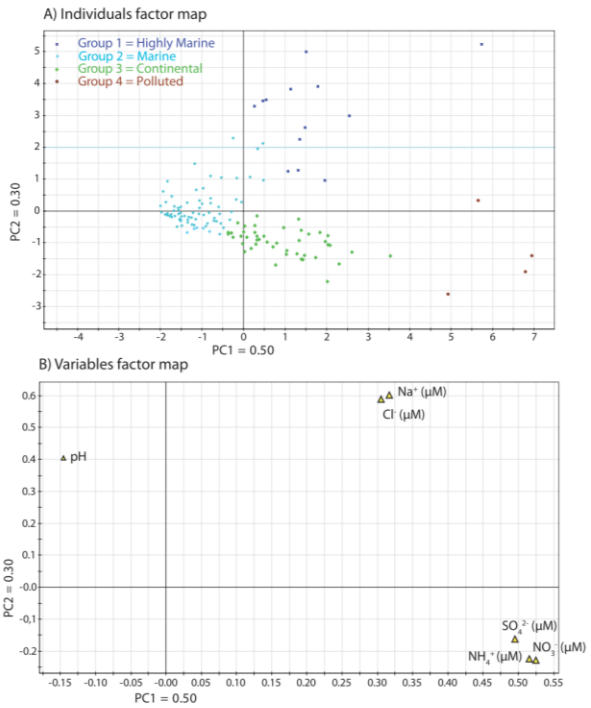


Fig. 1. (A) Individuals factor map: scores of the 138 cloud samples (i.e., 56 cloud events) on the plan PC1-PC2 obtained from the six selected variables. The different colors indicate the hierarchical classification using the Ward method. This led to the constitution of 4four clusters corresponding to polluted, continental, marine and highly marine categories. **(B)** Variables factor map: loadings of the 6 experimental variables (pH, $[Na^+]$, $[Cl^-]$, $[SO_4^{2-}]$, $[NO_3^-]$, $[NH_4^+]$).

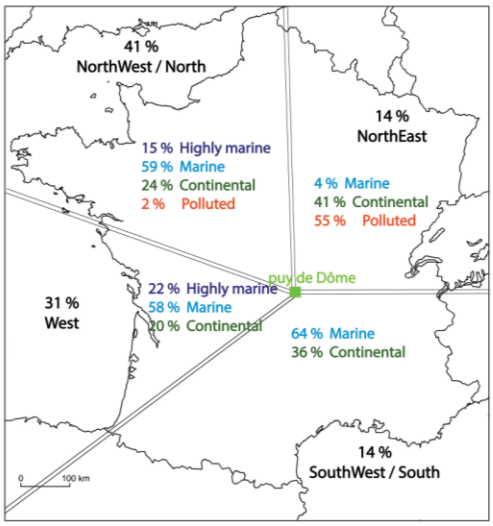


Fig. 2. Air masses reaching the puy de Dôme are divided into four distinct back-trajectory sectors: west (W), northwest/north (NW/N), northeast (NE) and south/southwest (S/SW). Percentages in black represent the occurrence of cloud events in each sector. Percentages in dark blue, light blue, green and red represent the occurrence of cloud events in each sector with highly marine, marine, continental and polluted influences, respectively.

this second analysis represented more than 80 % of the total variability of the samples (PC1: 50.41 %; PC2: 30.08 %) (Fig. 1a), i.e., 80 % of the disparity between groups is kept despite the fact that only two axes are used to represent six variables.

The hierarchical clustering analysis led to the constitution of 4four clusters. The first one, classified as "highly marine", is characterized by high concentrations of Na^+ and Cl^- (with means of 311 and 232 µM, respectively) while for the second group, classified as "marine", a low concentration of these ions is found. For both clusters ("marine" and "highly marine"), the pH range is elevated and similar. Finally, the two remaining clusters were classified as "continental" and "polluted"; these clusters had the second-highest and highest levels of NH_4^+, NO_3^-, and SO_2^{4-}, respectively. Despite the fact that the four categories are well separated, they partly overlap (Fig. 1a). Hence, air mass back-trajectories (not taken into account in the analysis presented on Fig. 1a) have also been considered for establishing this categorization. This also confirms that the tricky point for the selection is clearly determining the relevant criterion to distinguish marine and continental influence.

For each cluster, the mean, maximal and minimal values of the variables used for the statistical analysis were calculated; these values were used as criteria to classify cloud events that have not been considered in the PCA analysis. These criteria are summarized in Table 1. Among the last 57 samples not considered in this statistical analysis, 12 were classified as highly marine, 25 as marine, 7 as continental, and 13 as polluted.

In order to highlight the influence of the air mass origin on cloud droplet chemical composition, events were divided into four different sectors of origin according to the corresponding back-trajectory plots: west (W), northwest/north (NW/N), northeast (NE) and south/southwest (S/SW) (Fig. 2). Cloud events from the West and the northwest/north sectors were the most frequent ones, representing 72 % of the air masses sampled at the pdD station, the majority of which was categorized as "marine" or "highly marine". Air masses originating from west were mainly under Atlantic Ocean influence (80 % of the events from the west) while the air masses originating from the northwestern/northern sector could also be subject to continental effects from United Kingdom (UK) (24 % of the events from NW/N were classified as continental). The northeastern sector was characterized by air masses with high anthropogenic influence due to eastern Europe emissions (55 % of the events were polluted). Air masses from the southwest/south sector were dominated

Table 1. Mean, minimum and maximum values for each discriminating parameter (pH, concentrations of Cl^-, Na^+, NO_3^-, SO_4^{2-}, NH_4^+) for the different categories of cloud events (polluted, continental, marine and highly marine) determined by the PCA analysis.

			Concentrations ($\mu eq\,L^{-1}$)				
		pH	Cl^-	Na^+	NO_3^-	SO_4^{2-}	NH_4^+
Polluted	Mean	4.0	142	115	451	159	357
	Min	3.8	29	86	368	147	332
	Max	4.2	203	172	516	171	376
Continental	Mean	4.9	31	31	105	94	142
	Min	3.9	5	6	32	26	73
	Max	7.0	87	99	298	218	340
Marine	Mean	5.7	30	32	24	28	43
	Min	4.7	1	1	1	3	4
	Max	7.6	231	316	93	78	96
Highly marine	Mean	6.2	232	311	72	73	96
	Min	4.7	110	138	24	33	48
	Max	6.9	394	679	232	144	190

by a pronounced marine character (64 %) and a continental influence from Spain (36 %). During the past 10 yr, in total 13 % of the air masses sampled at the pdD station were under highly marine influence, 52 % were under marine influence, 26 % were under continental influence, and 9 % were under anthropogenic influence.

In the next part of this paper, we will focus on the variability of the chemical composition of cloud water as a function of air mass categories determined by our statistical analysis. Table S2 presents the physicochemical parameters (pH, redox potential, conductivity, liquid water content) and concentrations of measured chemical compounds (average, minimum, maximum) as a function of air mass origins together with data from recent studies describing chemical composition of clouds. Since the chemical makeup of clouds is sufficiently different from that of fog, primarily due to the environments in which they form (Collett et al., 2002; Straub et al., 2012; Weathers et al., 1988), data for fog have been excluded here. Although these studies featured a variety of cloud collection devices, different analytical techniques, and often a limited number of samples, some general comparisons can be made with our data set.

3.2 Physicochemical parameters

Table 2 summarizes the minimum, maximum, average and median values of TIC, pH, conductivity, redox potential, TOC and LWC for the whole data set; Table S2 shows the minimum, maximum and average values of the physicochemical parameters for each category of air mass, and Fig. 3 represents the distribution of these parameters as a function of air mass categories.

TIC values are relatively low and characteristic of European high-altitude sites, far from local pollution sources, such as Jungfraujoch (3450 m a.s.l., Switzerland, Baltensperger et al., 1998) or Sonnblick (3106 m a.s.l., Austria, Hitzenberger et al., 2000). Polluted air masses sampled at the pdD station are the most acidic (mean pH $= 4.3 \pm 1.1$) and present significantly higher conductivity than the other types of air mass. TIC values are also higher for polluted and highly marine conditions due to the higher amount of nitrate, sulfate and ammonium for polluted air masses and sodium and chloride for highly marine clouds. These observations are confirmed by other studies (Cini et al., 2002; Collett et al., 2002; Kim et al., 2006a; Möller et al., 1996). For example, Collett et al. (2002) sampled cloud water on the west coast of the USA and at Mount Whiteface and Mount Mitchell. The average pH on the west coast was around 6.0, because of the marine influence of the Pacific Ocean, while the pH at Mount Whiteface and Mount Mitchell, two sites located close to urban areas, was very acidic (up to 2.4) (Collett et al., 2002). Regarding the work of Aleksic et al. (2009) at the Whiteface mountain during 12 yr from 1994 to 2006, no significant pH variation (close to 4) was reported over this period. Our cloud water samples present naturally well-correlated conductivity and TIC ($R = 0.92$); polluted air masses are more acidic and have the highest amount of ionic species; consequently, they present a high conductivity and TIC (Kim et al., 2006a).

The redox potential of a water solution characterizes the average capacity of dissolved material to gain or lose electrons and reflects the reactivity. Many factors can limit the interpretation of the redox values measured in sampled cloud water such as temperature and pH. The redox potential also depends on the concentrations of reduced and oxidized forms of a large number of redox couples in solution, influencing their reactivity and equilibria in cloud water. However, if a direct interpretation of the redox potential data is not possible in natural environments, it is still

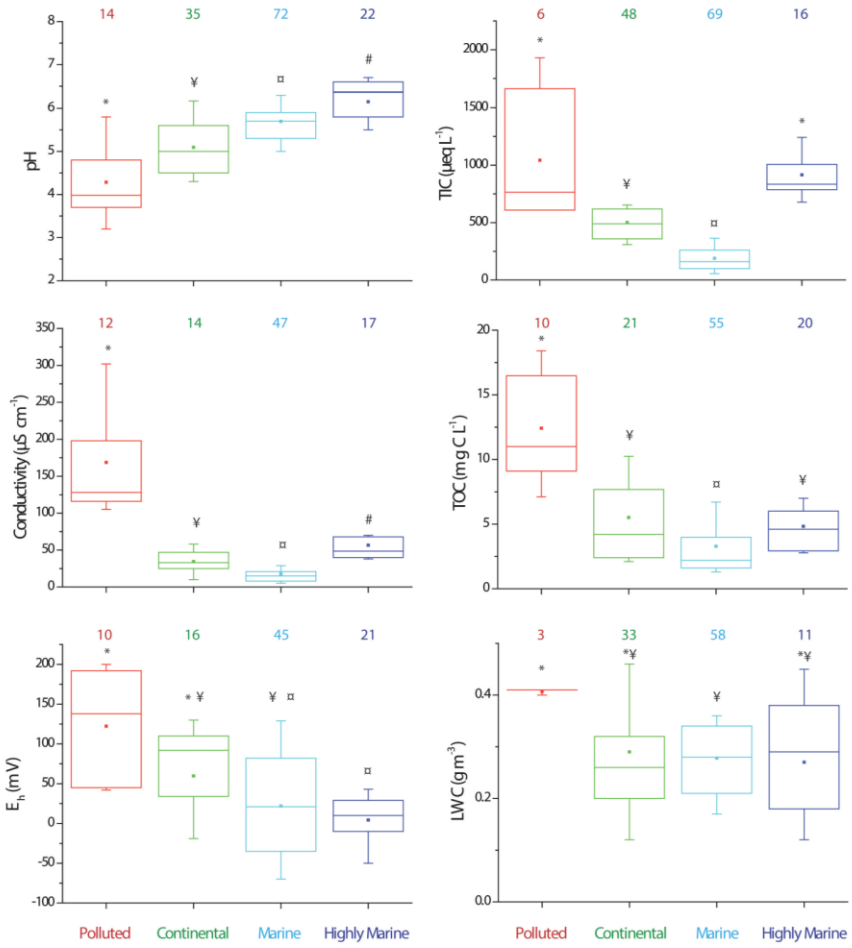


Fig. 3. Distribution of pH, total ion content (TIC), conductivity (C), redox potential (E_h), total organic carbon (TOC) and liquid water content (LWC) of the cloud water sampled at the pdD station for each air mass category. The number of samples analyzed is indicated above each box plot. The bottom and top lines correspond to 25th and 75th percentiles, respectively. The full line and the square symbol represent the median and mean values, respectively. The ends of whiskers are 10th and 90th percentiles. Statistical differences (Kruskal–Wallis test; p value < 0.05) between groups are indicated by symbols above box plots.

possible to compare the oxidative capacities of cloud water from one event to the other. Figure 3 shows that the average redox potential, E_h, of cloud water in polluted air masses (122.3 mV) was significantly higher than in marine and highly marine air masses (22.0 and 4.3 mV, respectively) (p values: polluted/marine $= 4 \times 10^{-3}$; polluted/highly marine $= 7.1 \times 10^{-5}$). It is also interesting to note that in polluted air masses, E_h is always positive, demonstrating that polluted clouds are oxidizing media in the atmosphere, while continental and marine cloud can be either an oxidizing or reducing medium. This observation could be the result of the higher abundance of transition metal ions (TMI) commonly measured in cloud water originating from polluted air mass. TMI, i.e., Fe, Mn, Cu, etc., present a higher standard redox potential than the species typically found in marine air such as Mg^{2+}, Na^{+} and Ca^{2+} for example. In these cases, a subsequent continental or anthropogenic component of metals can be due to their dissolution from anthropogenic particles (such as ashes emitted from power plants, from combustion engine exhaust or from industrial operations). The concentrations of dissolved iron at the pdD station confirm this general statement (see Sect. 4.5). Some authors have even proposed the use of the iron concentration as a parameter for determining the redox potential in hydrometeors, which would be feasible thanks to the limited range of pH and E_h in atmospheric aqueous samples (Sinner et al., 1994; Stumm and Morgan, 1996).

TOC is significantly higher in polluted air masses (with an average value of 12.4 mgC L^{-1}) than in continental, marine and highly marine ones (5.5, 3.3, and 4.8 mgC L^{-1},

Table 2. Minimum, maximum, mean, and median values of physicochemical parameters (pH, conductivity (C), total ion content (TIC), total organic content (TOC), redox potential (E_h), liquid water content (LWC)) for the whole data set.

	pH	C ($\mu S\,cm^{-1}$)	TIC ($\mu eq\,L^{-1}$)	TOC ($mgC\,L^{-1}$)	E_h (mV)	LWC ($g\,m^{-3}$)
Number of samples	143	90	140	106	93	105
Av	5.5	48	415	5	33	0.28
Min	3.1	2	19	1	−164	0.05
Max	7.6	348	1930	25	230	0.92
Med	5.6	25	335	3	35	0.27

respectively). In the case of polluted events, a further anthropogenic source of organic carbon can be superimposed on the background level. A few studies reported measurements of this parameter for cloud water (Table S3) and presented values within the same range as our data. A previous study at the pdD station from 2001 to 2002 reported DOC (dissolved organic carbon) values ranging from 1.2 to 15.5 $mgC\,L^{-1}$ (Marinoni et al., 2004). These values of DOC are quite close to the TOC values reported here for the same sampling site, suggesting a lower contribution of the water-insoluble organic carbon. Reyes-Rodriguez et al. (2009) measured the TOC and the DOC in cloud water from marine origin: the TOC ranged from 0.15 to 0.66 $mgC\,L^{-1}$ and the DOC from 0.13 to 0.65 $mgC\,L^{-1}$ (Reyes-Rodríguez et al., 2009) confirming that a significant fraction of TOC was composed of water-soluble organics (DOC/TOC = 0.79). Field measurements of fogs also reported that DOC constitutes about 80 % of the total organic carbon in the aqueous phase (Herckes et al., 2002a; Raja et al., 2008; Straub et al., 2012). A supplementary organic contribution is also observed in highly marine clouds, which presented significantly higher TOC values than marine clouds (p value $= 4 \times 10^{-4}$).

As already mentioned, the liquid water content (LWC) measured at the pdD station exhibits rather limited variation, with an average value of $0.28 \pm 0.12\,g\,m^{-3}$ (Fig. 3). Several studies discussed the relationship between LWC and solute inorganic concentrations (Aleksic and Dukett, 2010; Elbert et al., 2000) where nonlinear relationships were extracted and evaluated. These relationships reflect the fact that an increase in the LWC should lead to a dilution of the cloud solute content. In our study, we see no relationships between the LWC and the inorganic solute concentrations. Therefore, the variations observed in the solute concentrations are not due to variations in LWC ($R = -0.08$) and to dilution effect. For organic matter, we also observed no relationships between TOC and LWC (Fig. S1). The solute (both organic and inorganic) concentrations might be attributed to the various influences to which cloud droplets are subjected: microphysics, meteorology, gas-phase reactions, chemical reactions in the liquid phase, and sedimentation (Herckes et al., 2013).

In the next sections, concentrations of inorganic, organic and oxidant species are presented and discussed as functions of our classification. To facilitate the comparison with other studies, we will present their concentrations expressed in $\mu eq\,L^{-1}$ for the ions.

3.3 Inorganic ions

The relative distribution of inorganic ions was calculated for each single event; the average values of the different air mass categories are presented in Fig. 4. Only cloud events where all the inorganic ions have been quantified are considered (6, 46, 66, and 16 cloud samples for polluted, continental, marine and highly marine categories, respectively). For a direct comparison of the four air mass categories, a radar chart plot presenting the relative contributions of each ion is also drawn in this figure. Table S2 shows the minimum, maximum, and average concentration values of inorganic ions calculated for all cloud events.

The potential sources of nitrate, sulfate and ammonium in cloud water are multiple and include particles (ammonium sulfate and ammonium nitrate particles) and gases (from SO_2, HNO_3, NH_3, N_2O_5) (Leaitch et al., 1988; Sellegri et al., 2003). The concentrations of ammonium, nitrate and sulfate are significantly correlated within each category of air mass (R varies between 0.64 to 0.94, $n = 6$ to 70). This result can be attributed to the important contribution from nucleation scavenging of particles which prevails for nitrate, sulfate and ammonium to the overall cloud scavenging (Leriche et al., 2007). In our study, nitrate, sulfate and ammonium ions are abundant, as previously observed during studies at pdD (Sellegri et al., 2003) and during other field campaigns (Aleksic et al., 2009; Löflund et al., 2002); these represent an average contribution to the TIC of 65 % (marine), 76 % (continental) and 85 % (polluted). The highly marine clouds' contribution to the TIC is much lower (25 %), due to the high concentrations of sodium and chloride; however, the absolute average concentrations of nitrate (59 µM), sulfate (79 µM) and ammonium (88 µM) ions are still rather elevated in this category of air mass. Observations made at the pdD station for marine and highly marine air masses are in agreement with those of Gioda et al. (2009) and Reyes-Rodriguez et al. (2009) who sampled air masses from Atlantic Ocean in Puerto Rico and showed similar pH and concentrations of inorganic ions. Blas et al. (2008) sampled cloud water at the "Black Triangle",

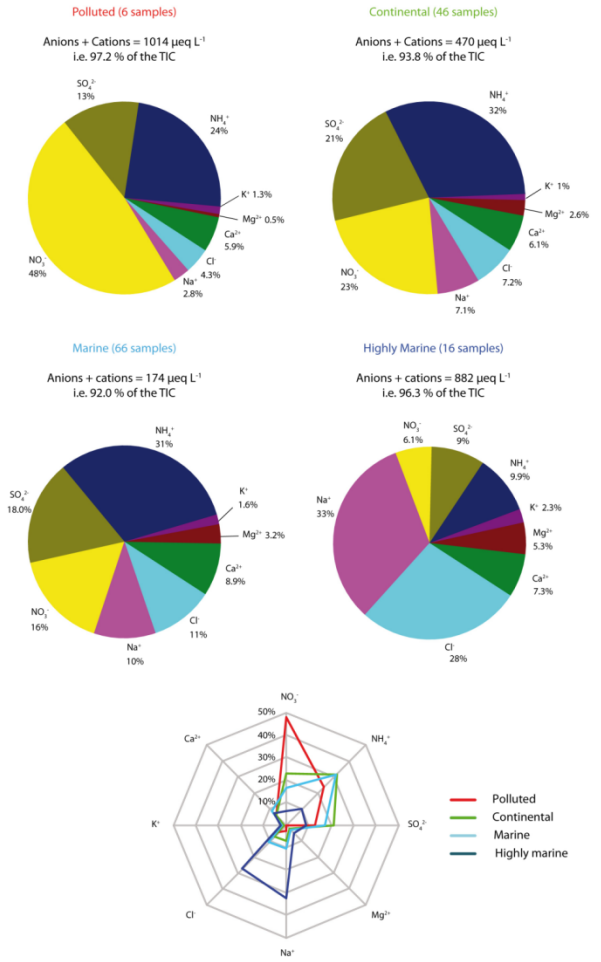


Fig. 4. Distribution of the major inorganic ions measured (Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-}, Na^+, K^+, NH_4^+, Mg^{2+} and Ca^{2+}) for each air mass category (percentages were calculated using the concentrations of ions in µeq L^{-1}). The sum of the concentrations of inorganic cations and anions in µeq L^{-1} is indicated, as well as its contribution to the TIC. The radar chart shows the relative contribution of each inorganic ion as a function of the air mass categories.

one of Europe's most industrialized regions; pH and inorganic ions concentrations in anthropogenic cloud water sampled at pdD were in the same range. In France, measurements of cloud chemical composition in the Vosges mountains show high sulfate and nitrate concentrations attributed to an anthropogenic additional source (Herckes et al., 2002b; Lammel and Metzig, 1991). Such data are comparable to inorganic concentrations reported for polluted air masses at the puy de Dôme station.

The contribution of nitrate to the TIC (from 6 % in highly marine cloud water to 48 % in polluted clouds) measured at the pdD site is higher than in field measurements at other locations. A possible explanation could be the remoteness of

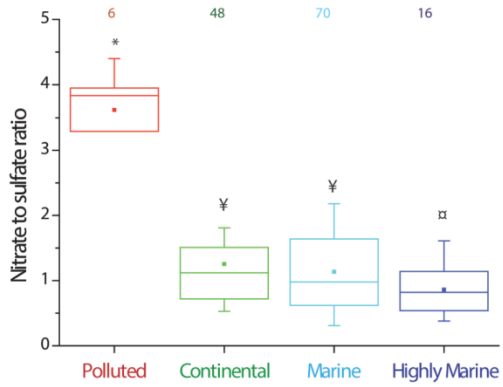


Fig. 5. Distribution of the ratio "nitrate to sulfate" concentrations (expressed in µeq L^{-1}) of the cloud water sampled at the pdD station as a function of air mass categories. Numbers above each box plot represent the number of samples analyzed. At least three data are required to represent a box plot. The bottom and top of box plots are 25th and 75th percentiles, respectively. The full line and the square symbol represent the median and mean values, respectively. The ends of whiskers are 10th and 90th percentiles. Statistical differences (Kruskal–Wallis test; p value < 0.05) between groups are indicated by symbols above box plots.

the pdD site from local sources and the efficient oxidation of NO_x compounds converted into nitric acid and then nitrate (Wang et al., 2011). The nitrate to sulfate equivalent ratio is shown on Fig. 5 for the four categories of clouds. This ratio is highest in polluted clouds (from 0.9 in highly marine air masses to 3.6 for polluted clouds) due to the high nitrate content in polluted air masses. Some studies showed that the NO_3^- / SO_4^{2-} ratio increases with the distance from the source of pollution, which makes this value an indicator of the remoteness of a site (Wang et al., 2011; Weathers et al., 1988). At the pdD sampling site, since the origin of the air masses is variable with high nitrate fractions for polluted air masses, this conclusion cannot be applied. Several values of this ratio reported elsewhere for cloud water samples were below 1 (Baltensperger et al., 1998; Bridges et al., 2002) but the observation of elevated NO_3^- relative to SO_4^{2-} in cloud water has been also reported in other studies (Brüggemann et al., 2005; Hayden et al., 2008; Hill et al., 2007; Leaitch et al., 1986; Lee et al., 2012). This could be related to high NO_x emission and the predominance of nitrate over sulfate in the acidification of aerosols.

Ammonium in cloud water results from the precursor aerosol particles or from the dissolution of gaseous ammonia. Its contribution to the TIC is relatively high in all air mass categories. Therefore, the pH of cloud water is influenced by ammonium related to emissions from agricultural activities. However, the sum of nitrate and sulfate concentrations is much higher than the ammonium concentration for polluted cases, resulting in partial acid neutralization and acidic cloud water. The concentration of calcium is higher in

polluted and continental air masses than in marine air masses, as a result of the higher contribution of its terrestrial source rather than its marine source. For polluted air masses, it is possible that the Ca^{2+} and/or Mg^{2+} may have been present as nitrate salts ($CaNO_3$, $MgNO_3$) ($R(Ca^{2+}/NO_3^-) = 0.47$; $R(Mg^{2+}/NO_3^-) = 0.78$) or sulfate salts ($CaSO_4$, $MgSO_4$) ($R(Ca^{2+}/SO_4^{2-}) = 0.67$; $R(Mg^{2+}/SO_4^{2-}) = 0.54$) as suggested by Leaitch et al. (1986). For highly marine clouds, the water is enriched by salts formed from the evaporation of sea spray, such as $CaCO_3$, leading to a high Ca^{2+} concentration. Ca^{2+} also contributes to the neutralization of the acidity, but to a smaller extent than ammonium. In marine air masses, the average ratio Cl^-/Na^+ is equal to 1.41 and reaches 1.06 for clouds defined as highly marine, a value that is below that of seawater (1.17; Holland, 1978). This loss of chlorine may be caused by the deposition of HCl gas to the sea surface before its absorption by cloud droplets (Watanabe et al., 2001). Another explanation could be that the aerosol ages during its transport: in the aerosol phase, the reaction $NaCl + HNO_3$ gives $NaNO_3$ and HCl, which volatilizes, leading to a depletion of Cl^- (Bourcier et al., 2012; Sørensen et al., 2005). For polluted air masses, this ratio is 2.54, resulting from the enrichment of chloride over polluted areas. In fact, chloride ions have a marine source from NaCl particles and also an anthropogenic source with the dissolution of gaseous HCl into the aqueous phase (McCulloch et al., 1999; Shapiro et al., 2007).

As the marine ratio for SO_4^{2-}/Na^+ is known (0.06 on a molar basis; Holland, 1978), the contribution of SO_4^{2-} from anthropogenic sources, i.e., non sea-salt sulfate (nss-SO_4^{2-}), can be inferred. The contribution of nss-SO_4^{2-} ranges from 86 to 100 % of the SO_4^{2-} dissolved in polluted clouds, whereas for marine clouds, this value is more varied and ranges from 5 to 99 %, with an average of 89 %. For highly marine clouds, the mean contribution of nss-SO_4^{2-} is much lower and reaches 47 %. This demonstrates that a significant natural source of sulfate exists in some clouds categorized as marine and highly marine. In fact, nss-SO_4^{2-} over the oceans derives principally from reduced sulfur gases, primarily dimethylsulfide (DMS), which is produced by biological activity in the oceans and from sulfur compounds, primarily SO_2, derived from anthropogenic sources on the continents (Savoie et al., 2002). Sulfate can also be produced in cloud water by oxidation of SO_2 (Ghauri et al., 2001), which tends to acidify cloud droplets and lead to the production of new aerosol mass by nonvolatile sulfate.

In this study, 17 cloud samples (i.e., 7 events) are classified as polluted clouds in comparison with the 52, 101 and 25 samples for continental, marine and highly marine air masses respectively. From Fig. 4, we can conclude that the relative distribution of inorganic ions does not differ strongly for continental and marine air masses, even if the concentrations of the quantified species were different (see Table S2). This observation is well illustrated by the radar chart presented in Fig. 4, showing that the relative contribution of each inorganic ion is very similar for marine and continental air masses. By contrast, the polluted air masses exhibit much higher concentrations of nitrate in the cloud water, and the cloud water samples in highly marine air are characterized by relatively high levels of chloride and sodium.

3.4 Carboxylic acids – carbonyl compounds

Field investigations including recent observations aimed to characterize and quantify individual organic compounds in cloud water during specific field campaigns with a focus on small chain organic compounds such as mono- and dicarboxylic acids and some carbonyls and dicarbonyls (Herckes et al., 2013). Here, we present the concentrations of 5 carboxylic acids and 5 carbonyls as a function of the air mass categories.

Figure 6 shows the mean relative contribution of five carboxylic acids (formic, acetic, oxalic, malonic and succinic acids) for each air mass category. Only the cloud events where all these compounds have been measured are considered (2, 23, 31 and 14 samples for polluted, continental and marine and highly marine categories, respectively). Table S2 indicates the minimum, maximum, and average values of carboxylic acid concentrations calculated for all events. Acetic and formic acids represent the most abundant of the five carboxylic acids, as previously observed (Khwaja, 1995; Löflund et al., 2002). Carboxylic acids, in the atmospheric aqueous phase, have different sources, such as anthropogenic and biogenic direct emissions in the gas and particulate phases, or chemical transformations from organic precursors (Charbouillot et al., 2012; Chebbi and Carlier, 1996; Khare et al., 1999). Formic acid can result from the oxidation of methanol by radicals (mainly $HO^\bullet$ during daytime conditions). Acetic acid can be produced in the aqueous phase by the oxidation of various alcohols, like ethanol, ethylene glycol or 2-propanol (Tilgner and Herrmann, 2010). The transfer from the gas phase is also an important source of formic and acetic acids in the atmospheric aqueous phase, whose Henry's law constants are equal to 5400 and 5300 $M\,atm^{-1}$ respectively (Johnson et al., 1996). Moreover, the presence of acetic and formic acids can also be potentially the result of their production by microorganisms as they are common intermediates in different metabolic pathways (Husárová et al., 2011). Oxalic acid is the most abundant carboxylic acid after acetic and formic acids (Sorooshian et al., 2006). Oxalic acid is produced through several steps of oxidation. In contrast to acetic and formic acids, oxalic acid in the aqueous phase does not originate from the gas phase, which can explain its lower concentration. Moreover, it efficiently creates metallic complexes with iron, which represent a sink through photolysis (Deguillaume et al., 2005). Finally, of the quantified acids, succinic and malonic acids are the least abundant in all air mass categories. Opposite to acetic and formic acids, succinic and malonic acids in the atmospheric aqueous

phase are supposed to come exclusively from the particle phase. At present, only a few studies have highlighted the production of succinic and malonic acids from oxidation processes in the cloud aqueous phase (Charbouillot et al., 2012; Perri et al., 2009). This lack of aqueous-phase reactivity as a potential source of succinic and malonic acids could explain the lower concentrations of these acids in cloud water. They are also much less concentrated in the particulate phase than acetic, formic and oxalic acids (Legrand et al., 2007). Globally, concentrations of carboxylic acids that were monitored at the pdD station are similar to those measured at the Raxalpe mountains in Austria (Löflund et al., 2002) or at the Schmücke mountains in Germany (van Pinxteren et al., 2005) (see Table S2), which are both removed from local pollution. The concentration of these organic acids is higher for polluted clouds, demonstrating the supplemental sources for air masses resulting from their passage over polluted area. For highly marine clouds, the amount of these acids is on the same order as the one for continental clouds, showing a marine input of organic matter as confirmed by TOC measurements (O'Dowd et al., 2004).

Only two cloud samples considered here are in the polluted category. Even though the amount of carboxylic acids was different for each category (see Table S2), the relative distributions for continental, marine and highly marine categories are similar and differ strongly from the polluted air masses, as illustrated by the radar chart presented in Fig. 6.

By comparison with the TOC measurements, we can estimate the presence of other organic species in cloud water, like alcohols, carbonyl compounds, larger multifunctional structures that contain a significant fraction of heteroatoms (S, N, O) (such as humic-like substances (HULIS), fulvic material, organosulfur species) (Feng and Möller, 2004; Graber and Rudich, 2006; LeClair et al., 2012), and also biologically derived material (Bauer et al., 2002; Delort et al., 2010; Ekström et al., 2010). The proportion of undetermined organic matter in cloud water is around 90 % for the four categories showing the large unidentified portion of organic matter in cloud water (Fig. 6, see text above each pie chart).

Carbonyl compounds have also been monitored at the pdD station: formaldehyde (F) was measured since 2000, and acetaldehyde (AC), glyoxal (GL), methylglyoxal (MGL) and hydroxyacetaldehyde (HA) were also quantified for 24 cloud samples between 2008 and 2011. Carbonyls in cloud water essentially result from their dissolution from the gas phase into the aqueous phase according to their Henry's law constants (Matsumoto et al., 2005). In the aqueous phase, the oxidation of carbonyls produces carboxylic acids (Legrand et al., 2007) and also potentially leads to the formation of oligomers (Ervens and Volkamer, 2010) which can contribute, upon cloud droplets' evaporation, to SOA. Particularly interesting, with this scope in mind, is the key role of α-oxygenated carbonyls GL, MGL and HA measured in this study. Oxidation by the $HO^{\bullet}$ radical of these highly water-soluble compounds (Henry 's law constant $H_{GL} = 3.6 \times 10^5$; $H_{MG} = 3.7 \times 10^3$, $H_{HA} = 4.1 \times 10^4\,M\,atm^{-1}$ at 25 °C) (Betterton and Hoffmann, 1988; Sander et al., 2006) was shown to yield formic and oxalic acids (Altieri et al., 2008; Carlton et al., 2007; Perri et al., 2009) but also, to a lesser extent, succinic and malonic acids (Perri et al., 2009). Concentration levels for F, AC, GL and MGL have already been measured concomitantly in rain or cloud water (Igawa et al., 1989; Munger et al., 1995; Li et al., 2008; van Pinxteren et al., 2005; Ervens et al., 2013), but only few studies have accounted for HA concentrations (see for instance, Matsumoto et al., 2005; Matsunaga and Kawamura, 2000). Figure 7 presents the relative contributions of these five carbonyls for the four air mass categories. The concentration (average, min, max) of the five carbonyl compounds for the whole data set are presented in Table 3.

The amount of carbonyls in cloud water is higher for polluted and continental clouds, reflecting the great variety of their possible primary (vehicle exhaust, biomass burning, industrial and plants emissions) and secondary (oxidation of hydrocarbons) sources (Altshuller, 1993; Hoekman, 1992; Possanzini et al., 2002). As expected, formaldehyde is the most abundant one in all cases, with concentrations ranging from 5.0 µM (for polluted clouds) to 1.8 µM (for marine ones). It is noteworthy that, except in marine samples, HA concentrations are higher than those of GL and subsequently those of MGL. Even if clouds form in rather different atmospheric environments, this result supports the observations by Matsunaga and Kawamura (2000) that HA was the main α-oxygenated carbonyl in snow and rain samples. These authors attributed the relatively high abundance of HA in their samples to the fact that this carbonyl compound could form a cyclic hemiacetal dimer much less reactive toward oxidation than the free HA molecule. Despite the relatively high gas-phase concentrations expected for this compound (> 1 ppbv) (Matsumoto et al., 2005), concentrations of AC are lower compared to other carbonyls. This can be explained by its low Henry's law constant ($11.4\,M\,atm^{-1}$, while the other Henry's law constant ranged from $2.97 \times 10^3\,M\,atm^{-1}$ for F to more than $3 \times 10^5\,M\,atm^{-1}$ for GL; Sander et al., 2006). These compounds are not well correlated, demonstrating the multiplicity of sources existing in the atmosphere and the different chemical transformations they can undergo once they are dissolved into cloud water.

Concentrations of carbonyls in cloud water represent only a small fraction of the organic matter in cloud water (from 0.8 to 1.8 % of the TOC depending on the air mass origins). However, quantifying their concentrations in other cloud samples at various sites would help for further investigations dedicated to the understanding of the in-cloud processes involved in the formation of SOA (Ervens et al., 2011, 2013; Tan et al., 2010). In particular, the importance of measuring HA when analyzing cloud water chemical composition should be highlighted due to HA's relatively high concentration.

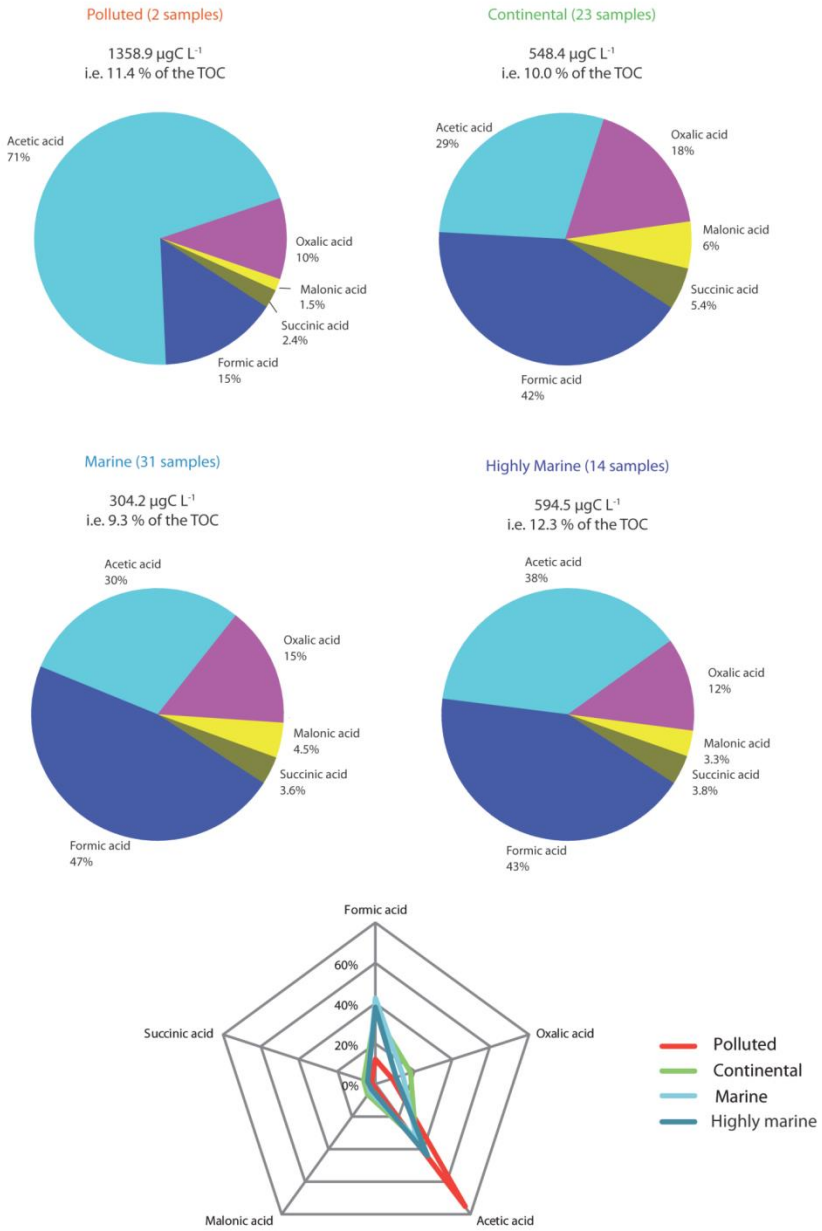


Fig. 6. Distribution of carboxylic acids (formic, acetic, oxalic, malonic and succinic acids) for each air mass category (percentages are calculated using concentration of individual ion in $\mu eq\,L^{-1}$). On the left-hand side, the sum of the concentrations of these compounds in $\mu gC\,L^{-1}$ is indicated as well as the percentage obtained by comparison with the TOC. The radar chart shows the relative contribution of each organic ion as a function of the air mass categories.

3.5 Oxidants: iron and hydrogen peroxide

Transition metal ions (TMI) are highly reactive in aqueous solutions and their reactivity is dependent on many factors (such as pH), so that their oxidation state and their concentrations are still prone to large uncertainties (Deguillaume et al., 2005). These compounds, especially iron, are supposed to drive the oxidative capacity of the cloud water through the production of $HO^{\bullet}$ radicals (Long et al., 2013) but also accelerate the conversion of sulfite to sulfate (Harris et al., 2013). Measurements of iron concentrations in its different oxidation states were conducted on 129 samples (Table S1). The range of concentrations measured at the pdD exhibits much lower values than measurements in clouds or fogs collected

Fig. 7. Distribution of carbonyls (formaldehyde, acetaldehyde, glyoxal, methylglyoxal, hydroxyacetaldehyde) as a function of air mass categories (percentages are calculated using concentration in µM). On the left-hand side, the sum of the concentrations of these compounds in µgC L^{-1} is indicated as well as the percentage obtained by comparison with the TOC. The radar chart shows the relative contribution of each compound as a function of the air mass category.

near sources of heavy pollution, such as big cities or industrial areas (Kotronarou and Sigg, 1993); but they are in the same range as field measurements carried out at free tropospheric and marine sites such as southern Germany (Sinner et al., 1994), Whiteface Mountain in the US (Arakaki and Faust, 1998), Great Dun Fell in the UK (Sedlak et al., 1997) or San Pedro Hill in the USA (Erel et al., 1993). However, the iron concentrations are significantly higher in polluted air masses where a significant anthropogenic component is added to the background level (Majestic et al., 2009).

Figure 8 shows the aqueous concentrations of soluble iron (Fe) in its two main oxidation states: Fe(II) and Fe(III). The ratio between the concentrations of Fe(II) and Fe(III) is a good indicator of the oxidizing capacity of hydrometeors. At the pdD station, Fe(II) is the predominant oxidation state of iron in the cloud water sampled: 83, 70, 54, and 77 %, respectively, for the polluted, continental, marine, and highly

Table 3. Minimum, maximum and mean values of concentrations (µM) of the 5 measured aldehydes measured for the different categories of cloud events. BDL: below detection limit (the limit of detection (LOD) is 0.1 nM for hydroxyacetaldehyde, acetaldehyde, glyoxal, and methylglyoxal, and 0.8 nM for formaldehyde).

		Concentrations (µM)				
		Hydroxyacetaldehyde	Formaldehyde	Acetaldehyde	Glyoxal	Methylglyoxal
Polluted	Av	1.24	4.97	0.42	0.89	0.19
	Min	0.44	1.75	0.05	0.38	0.07
	Max	1.77	9.83	0.96	1.87	0.39
Continental	Av	0.79	5.06	0.31	0.73	0.22
	Min	0.05	0.73	0.02	0.17	0.01
	Max	2.34	9.80	0.64	2.29	1.10
Marine	Av	0.13	1.76	0.23	0.13	0.01
	Min	0.02	0.13	0.05	0.01	BDL
	Max	0.30	14.25	0.44	0.74	0.03
Highly marine	Av	0.64	2.01	0.52	0.23	0.02
	Min	0.28	0.70	BDL	0.01	BDL
	Max	1.24	4.20	1.00	0.36	0.06

marine categories. This confirms the previous results obtained at the pdD by Parazols et al. (2006) who found an average Fe(II) / Fe(tot) ratio of 0.76 ± 0.25 (Parazols et al., 2006). Siderophores produced by microorganisms or macromolecules such as HULIS or exopolymeric substances (EPS) could play a role in stabilizing iron in its reduced oxidation state and preventing its further re-oxidation. This is supported by the correlation existing between TOC and Fe(II) for continental and marine categories ($R = 0.70$ and 0.61, respectively). Interestingly, no relationship is observed for polluted and highly marine air masses.

H_2O_2, like iron, is a strong oxidant of the cloud water; it originates from gas-to-liquid partitioning of H_2O_2 and $HO_2^{\bullet}$ radicals and from aqueous phase photo-production (Anastasio et al., 1994; Laj et al., 1997a). Measurements of the concentration of H_2O_2 were performed for 107 samples; it ranged from 0.1 to 57.7 µM (Table S2). Figure 8 shows the concentration of H_2O_2 for each air mass category. The concentrations of H_2O_2 are much more varied in marine and highly marine air masses (standard deviation = 7.12 and 6.31 µM for highly marine and marine categories, respectively) compared to polluted clouds (standard deviation = 1.57 µM) characterized by the lowest average concentration of H_2O_2 (~ 4.9 µM). Potential explanations are related to (1) efficient sinks of gaseous H_2O_2 by its reactions with NO_x and SO_2 present in large concentration and (2) to the efficient reduction of H_2O_2 in the aqueous phase by its reaction with sulfite leading to the sulfate production (Benedict et al., 2012; Shen et al., 2012). In addition, the study of Marinoni et al. (2011) presents a diurnal trend with higher day-time concentration of aqueous H_2O_2, and concludes that the dominant source of hydrogen peroxide is the mass transfer from the gas to the liquid phase (Marinoni et al., 2011).

4 Conclusions and recommendations

Clouds incorporate the local pollution when droplets nucleate and then transform pollutants during their lifetime. In this context, the impact of regional and long-range transport of chemical constituents at the puy de Dôme site is apparent and due to the remote (and elevated) geographical character. In this paper, a long-term database of the aqueous-phase chemical composition of clouds sampled at the puy de Dôme station between 2001 and 2011 is presented. The abundance of inorganic and organic chemical compounds as well as a series of physicochemical parameters permitted the identification of various influences corresponding to distinct air-mass histories. A classification was performed by principal component analysis that allows for defining the discriminating factors (pH and concentrations of Na^+, Cl^-, NO_3^-, NH_4^+ and SO_4^{2-}) for four different categories: polluted, continental, marine and highly marine.

As can be expected, highly marine clouds exhibited high concentrations of Na^+ and Cl^-; the marine category presented lower concentrations of ions but still elevated pH. Finally, the two remaining clusters were classified as "continental" and "polluted"; these clusters had the second-highest and highest levels of NH_4^+, NO_3^-, and SO_2^{4-}, respectively. Furthermore, it was found that total organic carbon (TOC) is significantly higher in polluted air masses than in the other categories, due to additional anthropogenic sources. Concentrations of carboxylic acids and carbonyls represented around 10 % of the organic matter in all categories of air masses. Acetic and formic acids were the most abundant of the five measured carboxylic acids, reflecting their multiple sources (gas phase, particle, aqueous reactivity) in the cloud aqueous phase. Oxalic acid, succinic and malonic acids were

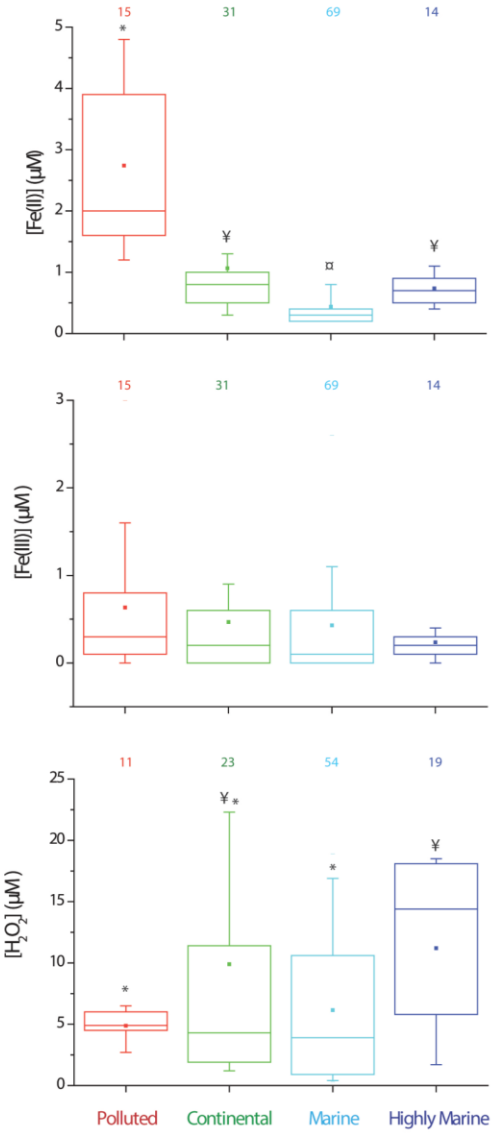


Fig. 8. Distribution of Fe(II), Fe(III) and H_2O_2 as a function of air mass categories. Numbers above each box plots represent the number of samples analyzed. At least 3 data are required to represent a box plot. The bottom and top of box plots are 25th and 75th percentiles, respectively. The full line and the square symbol represent the median and mean values, respectively. The ends of whiskers are 10th and 90th percentiles. Statistical differences (Kruskal–Wallis test; p value < 0.05) between groups are indicated by symbols above box plots.

less abundant in all categories of air masses. Carbonyl compounds were less abundant than carboxylic acids with a predominance of formaldehyde and unexpected high concentrations of hydroxyacetaldehyde. Iron concentrations were significantly higher for polluted air masses, and iron was mainly present in its oxidation state (+II) in all categories of air masses. This potentially indicates that iron could be stabilized in its reduced oxidation state by the presence of strong complexing agents. Finally, H_2O_2 concentrations were much more varied in marine and highly marine clouds than in polluted clouds, which were characterized by the lowest average concentration of H_2O_2.

As shown in this study, chemical speciation is a powerful tool for analyzing air mass history. For example, the presence of inorganic compounds such as nitrate and sulfate investigated in this study are due to anthropogenic emissions, such as those from automobiles or power production. However, it is difficult to differentiate the various sources of these measured chemicals in cloud water due to the various potential processes (transfer from the gas phase, dissolution of particles, aqueous chemical reactivity). In this context, some chemical compounds that are molecular markers of emissions (such as levoglucosan, a marker of biomass burning) should be followed in the future in order to correlate cloud features with emissions.

Our results also emphasize that, although this database is rather complete, the characterization of the organic matter is still incomplete, since around 10 % of the dissolved organic matter is characterized. The measurements of carbonyls in the cloud water should be also continued in the future since they are precursors of oligomers that are observed in secondary organic aerosols (SOA). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (Ehrenhauser et al., 2012), nitrosamines, phenols and nitrophenols (Hutchings et al., 2010), volatile aromatic compounds such as BTEX (i.e., benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene) (Hutchings et al., 2009), and pesticides (Millet et al., 1997) should be quantified for health reasons and their photosensitivity in clouds should be studied in natural and under controlled (i.e., in the laboratory) conditions. Important constituents of ambient atmospheric aerosols are also saccharides (Linuma et al., 2009) such as sugar alcohols mono-, di- and trisaccharides, anhydrosugars, and polysaccharides; they are released into the atmosphere by microorganisms, plants, and animals. For example, levoglucosan derives from cellulose; galactosans and mannosans derive from hemicelluloses during biomass burning (Medeiros et al., 2006; Schmidl et al., 2008). The intensity and the speciation of the sugar release into the atmosphere are dependent on the season (Fu et al., 2012), and vary with the diurnal cycle (Kundu et al., 2010). Until now, no quantitative measurements of sugar concentrations in cloud water have been performed. However, the presence of sugars in this aqueous compartment is likely due to their high solubility in water; their amount in cloud water should be evaluated.

The oxidizing capacity of the cloud aqueous phase should also be quantified for various cloud events. This can be done by the quantification of the photo-production of hydroxyl radicals ($HO^{\bullet}$) as a function of cloud chemical composition, allowing for the identification of the different sources and sinks of the most important oxidant of the atmosphere.

Dissolved oxygen should also be followed in cloud water because a recent study highlighted "its paradoxical role" in the aqueous formation of oligomers: O_2 seems to inhibit oligomerization reactions, but, on the other hand, it contributes to produce oligomerization initiator radicals (Renard et al., 2013).

Finally, even though they are theoretical, models allow one to study the chemical pathways, the complex interactions between microphysics, chemistry and dynamics (i.e., transport) and the influence of environmental parameters on cloud chemistry within the cloud system. The present study aims to provide statistically robust cloud chemical characterizations and its relationship with environmental factors, such as source regions. These data can be used for modeling natural free tropospheric conditions.

Supplementary material related to this article is available online at http://www.atmos-chem-phys.net/14/1485/2014/acp-14-1485-2014-supplement.pdf.

Acknowledgements. We would like to thank the Regional Council of Auvergne for PhD grants provided to T. Charbouillot, M. Joly and M. Parazols. M. Vaïtilingom acknowledges PhD scholarships from the French Ministry of Research. This work on the long-term analysis of the cloud water chemical composition was supported by the French Ministry and CNRS-INSU through the ORE/SO-BEAM project. Authors acknowledge additional financial support from the Regional Council of Auvergne, from the Observatoire de Physique du globe de Clermont-Ferrand (OPGC) and from the Fédération de Recherche en Environnement. The authors also thank C. Bernard for his technical support regarding the cloud sampling.

Edited by: B. Ervens

The publication of this article is financed by CNRS-INSU.

References

Acker, K., Möller, D., Wieprecht, W., Kalaß, D., and Auel, R.: Investigations of ground-based clouds at the Mt. Brocken, Fresen. J. Anal. Chem., 361, 59–64, doi:10.1007/s002160050834, 1998.

Aleksic, N., Roy, K., Sistla, G., Dukett, J., Houck, N., and Casson, P.: Analysis of cloud and precipitation chemistry at Whiteface Mountain, NY, Atmos. Environ., 43, 2709–2716, 2009.

Aleksic, N. and Dukett, J. E.: Probabilistic relationship between liquid water content and ion concentrations in cloud water, Atmos. Res., 98, 400–405, 2010.

Altieri, K. E., Carlton, A. G., Lim, H.-J., Turpin, B. J., and Seitzinger, S. P.: Evidence for oligomer formation in clouds: Reactions of isoprene oxidation products, Environ. Sci. Technol., 40, 4956–4960, 2006.

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.

Altshuller, A. P.: Production of aldehydes as primary emissions and from secondary atmospheric reactions of alkenes and alkanes during the night and early morning hours, Atmos. Environ. A.-Gen., 27, 21–32, 1993.

Anastasio, C., Faust, B. C., and Allen, J. M.: Aqueous phase photochemical formation of hydrogen peroxide in authentic cloud waters, J. Geophys. Res., 99, 8231–8248, doi:10.1029/94jd00085, 1994.

Ang, C. C., Lipari, F., and Swarin, S. J.: Determination of hydroxymethanesulfonate in wet deposition samples, Environ. Sci. Technol., 21, 102–106, 1987.

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, doi:10.1029/97jd02795, 1998.

Asmi, A., Wiedensohler, A., Laj, P., Fjaeraa, A.-M., Sellegri, K., Birmili, W., Weingartner, E., Baltensperger, U., Zdimal, V., Zikova, N., Putaud, J.-P., Marinoni, A., Tunved, P., Hansson, H.-C., Fiebig, M., Kivekäs, N., Lihavainen, H., Asmi, E., Ulevicius, V., Aalto, P. P., Swietlicki, E., Kristensson, A., Mihalopoulos, N., Kalivitis, N., Kalapov, I., Kiss, G., de Leeuw, G., Henzing, B., Harrison, R. M., Beddows, D., O'Dowd, C., Jennings, S. G., Flentje, H., Weinhold, K., Meinhardt, F., Ries, L., and Kulmala, M.: Number size distributions and seasonality of submicron particles in Europe 2008–2009, Atmos. Chem. Phys., 11, 5505–5538, doi:10.5194/acp-11-5505-2011, 2011.

Asmi, E., Freney, E., Hervo, M., Picard, D., Rose, C., Colomb, A., and Sellegri, K.: Aerosol cloud activation in summer and winter at puy-de-Dôme high altitude site in France, Atmos. Chem. Phys., 12, 11589–11607, doi:10.5194/acp-12-11589-2012, 2012.

Bader, H., Sturzenegger, V., and Hoigné, J.: Photometric method for the determination of low concentrations of hydrogen peroxide by the peroxidase catalyzed oxidation of N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD), Water Res., 22, 1109–1115, 1988.

Baltensperger, U., Schwikowski, M., Jost, D. T., Nyeki, S., Gäggeler, H. W., and Poulida, O.: Scavenging of atmospheric constituents in mixed phase clouds at the high-alpine site jungfraujoch part I: Basic concept and aerosol scavenging by clouds, Atmos. Environ., 32, 3975–3983, 1998.

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., Hitzenberger, 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.

Baumgardner, R. E., Isil, S. S., Lavery, T. F., Rogers, C. M., and Mohnen, V. A.: Estimates of cloud water deposition at mountain acid deposition program sites in the

Appalachian Mountains, JAPCA J. Air Waste Ma., 53, 291–308, doi:10.1080/10473289.2003.10466153, 2003.

Benedict, K. B., Lee, T., and Collett Jr, J. L.: Cloud water composition over the southeastern Pacific Ocean during the VOCALS regional experiment, Atmos. Environ., 46, 104–114, 2012.

Betterton, E. A. and Hoffmann, M. R.: Henry's law constants of some environmentally important aldehydes, Environ. Sci. Technol., 22, 1415–1418, doi:10.1021/es00177a004, 1988.

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.

Blas, M., Sobik, M., and Twarowski, R.: Changes of cloud water chemical composition in the Western Sudety Mountains, Poland, Atmos. Res., 87, 224–231, 2008.

Bourcier, L., Sellegri, K., Chausse, P., Pichon, J. M., and Laj, P.: Seasonal variation of water-soluble inorganic components in aerosol size-segregated at the puy de Dôme station (1,465 m a.s.l.), France, J. Atmos. Chem., 69, 47–66, doi:10.1007/s10874-012-9229-2, 2012.

Bower, K. N., Choularton, T. W., Gallagher, M. W., Beswick, K. M., Flynn, M. J., Allen, A. G., Davison, B. M., James, J. D., Robertson, L., Harrison, R. M., Hewitt, C. N., Cape, J. N., McFadyen, G. G., Milford, C., Sutton, M. A., Martinsson, B. G., Frank, G., Swietlicki, E., Zhou, J., Berg, O. H., Mentes, B., Papaspiropoulos, G., Hansson, H. C., Leck, C., Kulmala, M., Aalto, P., Väkevä, M., Berner, A., Bizjak, M., Fuzzi, S., Laj, P., Facchini, M. C., Orsi, G., Ricci, L., Nielsen, M., Allan, B. J., Coe, H., McFiggans, G., Plane, J. M. C., Collett, J. L., Moore, K. F., and Sherman, D. E.: ACE-2 HILLCLOUD. An overview of the ACE-2 ground-based cloud experiment, Tellus B, 52, 750–778, doi:10.1034/j.1600-0889.2000.00027.x, 2000.

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 Poll., 74, 363–384, doi:10.1007/BF00479800, 1994.

Bridges, K. S., Jickells, T. D., Davies, T. D., Zeman, Z., and Hunova, I.: Aerosol, precipitation and cloud water chemistry observations on the Czech Krusne Hory plateau adjacent to a heavily industrialised valley, Atmos. Environ., 36, 353–360, 2002.

Brüggemann, E., Gnauk, T., Mertes, S., Acker, K., Auel, R., Wieprecht, W., Möller, D., Collett Jr., J. L., Chang, H., Galgon, D., Chemnitzer, R., Rüd, C., Junek, R., Wiedensohler, A., and Herrmann, H.: Schmücke hillcap cloud and valley stations aerosol characterisation during FEBUKO (I): Particle size distribution, mass, and main components, Atmos. Environ., 39, 4291–4303, 2005.

Cape, J. N., Hargreaves, K. J., Storeton-West, R. L., Jones, B., Davies, T., Colvile, R. N., Gallagher, M. W., Choularton, T. W., Pahl, S., Berner, A., Kruisz, C., Bizjak, M., Laj, P., Facchini, M. C., Fuzzi, S., Arends, B. G., Acker, K., Wieprecht, W., Harrison, R. M., and Peak, J. D.: The budget of oxidised nitrogen species in orographic clouds, Atmos. Environ., 31, 2625–2636, 1997.

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.

Charbouillot, T., Gorini, S., Voyard, G., Parazols, M., Brigante, M., Deguillaume, L., Delort, A.-M., and Mailhot, G.: Mechanism of carboxylic acid photooxidation in atmospheric aqueous phase: Formation, fate and reactivity, Atmos. Environ., 56, 1–8, 2012.

Chebbi, A. and Carlier, P.: Carboxylic acids in the troposphere, occurrence, sources, and sinks: A review, Atmos. Environ., 30, 4233–4249, 1996.

Choularton, T. W., Colvile, R. N., Bower, K. N., Gallagher, M. W., Wells, M., Beswick, K. M., Arends, B. G., Möls, J. J., Kos, G. P. A., Fuzzi, S., Lind, J. A., Orsi, G., Facchini, M. C., Laj, P., Gieray, R., Wieser, P., Engelhardt, T., Berner, A., Kruisz, C., Möller, D., Acker, K., Wieprecht, W., Lüttke, J., Levsen, K., Bizjak, M., Hansson, H. C., Cederfelt, S. I., Frank, G., Mentes, B., Martinsson, B., Orsini, D., Svenningsson, B., Swietlicki, E., Wiedensohler, A., Noone, K. J., Pahl, S., Winkler, P., Seyffer, E., Helas, G., Jaeschke, W., Georgii, H. W., Wobrock, W., Preiss, M., Maser, R., Schell, D., Dollard, G., Jones, B., Davies, T., Sedlak, D. L., David, M. M., Wendisch, M., Cape, J. N., Hargreaves, K. J., Sutton, M. A., Storeton-West, R. L., Fowler, D., Hallberg, A., Harrison, R. M., and Peak, J. D.: The great dun fell cloud experiment 1993: An overview, Atmos. Environ., 31, 2393–2405, 1997.

Cini, R., Prodi, F., Santachiara, G., Porcù, F., Bellandi, S., Stortini, A. M., Oppo, C., Udisti, R., and Pantani, F.: Chemical characterization of cloud episodes at a ridge site in Tuscan Appennines, Italy, Atmos. Res., 61, 311–334, 2002.

Collett, J. L., Bator, A., Sherman, D. E., Moore, K. F., Hoag, K. J., Demoz, B. B., Rao, X., and Reilly, J. E.: The chemical composition of fogs and intercepted clouds in the United States, Atmos. Res., 64, 29–40, 2002.

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, Atmos. Environ., 24, 1741–1757, 1990.

Dasgupta, P. K., DeCesare, K., and Ullrey, J.: Determination of atmospheric sulfur dioxide without tetrachloromercurate(II) and the mechanism of the Schiff reaction, Anal. Chem., 52, 1912–1922, 1980.

Decesari, S., Facchini, M. C., Fuzzi, S., McFiggans, G. B., Coe, H., and Bower, K. N.: The water-soluble organic component of size-segregated aerosol, cloud water and wet depositions from Jeju Island during ACE-Asia, Atmos. Environ., 39, 211–222, 2005.

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, doi:10.1021/cr040649c, 2005.

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.

De Haan, D. O., Corrigan, A. L., Tolbert, M. A., Jimenez, J. L., Wood, S. E., and Turley, J. J.: Secondary organic aerosol formation by self-reactions of methylglyoxal and glyoxal in evaporating droplets, Environ. Sci. Technol., 43, 8184–8190, doi:10.1021/es902152t, 2009.

Deininger, C. K. and Saxena, V. K.: A validation of back trajectories of air masses by principal component analysis of ion concentrations in cloud water, Atmos. Environ., 31, 295–300, 1997.

Delort, A.-M., Vaïtilingom, 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., 98, 249–260, 2010.

Domine, F., Houdier, S., Taillandier, A.-S., and Simpson, W. R.: Acetaldehyde in the Alaskan subarctic snowpack, Atmos. Chem. Phys., 10, 919–929, doi:10.5194/acp-10-919-2010, 2010.

Draxler, R. R. and Rolph, G. D.: HYSPLIT (HYbrid Single-particle Lagrangian Integrated Trajectory) Model Access via NOAA ARL READY Website, available at: http://ready.arl.noaa.gov/HYSPLIT.php (last access: 7 June 2013), 2012.

Ehrenhauser, F. S., Khadapkar, K., Wang, Y., Hutchings, J. W., Delhomme, O., Kommalapati, R. R., Herckes, P., Wornat, M. J., and Valsaraj, K. T.: Processing of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons by fog in an urban environment, J. Environ. Monitor., 14, 2566–2579, doi:10.1039/c2em30336a, 2012.

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, doi:10.5194/bg-7-387-2010, 2010.

Elbert, W., Hoffmann, M. R., Krämer, M., Schmitt, G., and Andreae, M. O.: Control of solute concentrations in cloud and fog water by liquid water content, Atmos. Environ., 34, 1109–1122, 2000.

Erel, Y., Pehkonen, S. O., and Hoffmann, M. R.: Redox chemistry of iron in fog and stratus clouds, J. Geophys. Res., 98, 18423–18434, doi:10.1029/93jd01575, 1993.

Ervens, B. and Volkamer, R.: Glyoxal processing by aerosol multiphase chemistry: towards a kinetic modeling framework of secondary organic aerosol formation in aqueous particles, Atmos. Chem. Phys., 10, 8219–8244, doi:10.5194/acp-10-8219-2010, 2010.

Ervens, B., Turpin, B. J., and Weber, R. J.: Secondary organic aerosol formation in cloud droplets and aqueous particles (aqSOA): a review of laboratory, field and model studies, Atmos. Chem. Phys., 11, 11069–11102, doi:10.5194/acp-11-11069-2011, 2011.

Ervens, B., Wang, Y., Eagar, J., Leaitch, W. R., Macdonald, A. M., Valsaraj, K. T., and Herckes, P.: Dissolved organic carbon (DOC) and select aldehydes in cloud and fog water: the role of the aqueous phase in impacting trace gas budgets, Atmos. Chem. Phys., 13, 5117–5135, doi:10.5194/acp-13-5117-2013, 2013.

Feng, J. and Möller, D.: Characterization of water-soluble macromolecular substances in cloud water, J. Atmos. Chem., 48, 217–233, 2004.

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., Neirynck, 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.

Fu, P., Kawamura, K., Kobayashi, M., and Simoneit, B. R. T.: Seasonal variations of sugars in atmospheric particulate matter from Gosan, Jeju Island: Significant contributions of airborne pollen and Asian dust in spring, Atmos. Environ., 55, 234–239, doi:10.1016/j.atmosenv.2012.02.061, 2012.

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.

Ghauri, B. M., Ishaq Mirza, M., Richter, R., Dutkiewicz, V. A., Rusheed, A., Khan, A. R., and Husain, L.: Composition of aerosols and cloud water at a remote mountain site (2.8 kms) in Pakistan, Chemosphere, 3, 51–63, 2001.

Gioda, A., Mayol-Bracero, O., Morales-García, F., Collett, J., Decesari, S., Emblico, L., Facchini, M., Morales-De Jesús, R., Mertes, S., Borrmann, S., Walter, S., and Schneider, J.: Chemical composition of cloud water in the Puerto Rican tropical trade wind cumuli, Water Air Soil Pollut., 200, 3–14, 2009.

Graber, E. R. and Rudich, Y.: Atmospheric HULIS: How humic-like are they? A comprehensive and critical review, Atmos. Chem. Phys., 6, 729–753, doi:10.5194/acp-6-729-2006, 2006.

Guo, J., Wang, Y., Shen, X., Wang, Z., Lee, T., Wang, X., Li, P., Sun, M., Collett Jr, J. L., Wang, W., and Wang, T.: Characterization of cloud water chemistry at Mount Tai, China: Seasonal variation, anthropogenic impact, and cloud processing, Atmos. Environ., 60, 467–476, 2012.

El Haddad, I., Yao Liu, 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 – Part 2: Formation of secondary organic aerosol, Atmos. Chem. Phys., 9, 5107–5117, doi:10.5194/acp-9-5107-2009, 2009.

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.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., and Ryan, P. D.: PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis, Palaeontol. Electron., 4, 1–9, 2001.

Harris, E., Sinha, B., van Pinxteren, D., Tilgner, A., Fomba, K. W., Schneider, J., Roth, A., Gnauk, T., Fahlbusch, B., Mertes, S., Lee, T., Collett, J., Foley, S., Borrmann, S., Hoppe, P., and Herrmann, H.: Enhanced role of transition metal ion catalysis during in-cloud oxidation of SO_2, Science, 340, 727–730, doi:10.1126/science.1230911, 2013.

Hayden, K. L., Macdonald, A. M., Gong, W., Toom-Sauntry, D., Anlauf, K. G., Leithead, A., Li, S. M., Leaitch, W. R., and Noone, K.: Cloud processing of nitrate, J. Geophys. Res.-Atmos., 113, D18201, doi:10.1029/2007JD009732, 2008.

Hegg, D. A., Gao, S., and Jonsson, H.: Measurements of selected dicarboxylic acids in marine cloud water, Atmos. Res., 62, 1–10, 2002.

Henne, S., Brunner, D., Folini, D., Solberg, S., Klausen, J., and Buchmann, B.: Assessment of parameters describing representativeness of air quality in-situ measurement sites, Atmos. Chem. Phys., 10, 3561–3581, doi:10.5194/acp-10-3561-2010, 2010.

Herckes, P., Lee, T., Trenary, L., Kang, G., Chang, H., and Collett, J. L.: Organic matter in central California radiation fogs, Environ. Sci. Technol., 36, 4777–4782, doi:10.1021/es025889t, 2002a.

Herckes, P., Wendling, R., Sauret, N., Mirabel, Ph., and Wortham, H.: Cloudwater studies at a high elevation site in the Vosges Mountains (France), Environ. Poll., 117, 169–177, doi:10.1016/S0048-9697(02)00037-2, 2002b.

Herckes, P., Valsaraj, K. T., and Collett Jr, J. L.: A review of observations of organic matter in fogs and clouds: Origin, processing and fate, Atmos. Res., 132–133, 434–449, doi:10.1016/j.atmosres.2013.06.005, 2013.

Hill, K. A., Shepson, P. B., Galdavy, E. S., Anastasio, C., Kourtev, P. S., Konopka, A., and Stirm, B. H.: Processing of atmospheric nitrogen by clouds above forest environment, J. Geophys. Res., 112, D11301, doi:10.1029/2006JD008002, 2007.

Hitzenberger, R., Berner, A., Kromp, R., Kasper-Giebl, A., Limbeck, A., Tscherwenka, W., and Puxbaum, H.: Black carbon and other species at a high-elevation European site (Mount Sonnblick, 3106 m, Austria): Concentrations and scavenging efficiencies, J. Geophys. Res., 105, 24637–24645, doi:10.1029/2000jd900349, 2000.

Hoekman, S. K.: Speciated measurements and calculated reactivities of vehicle exhaust emissions from conventional and reformulated gasolines, Environ. Sci. Technol., 26, 1206–1216, doi:10.1021/es50002a610, 1992.

Hoigné, J., Zuo, Y. and Nowell, L.: Photochemical reactions in atmospheric waters: role of dissolved iron species, in: Aquatic and Surface Photochemistry, edited by: Helz, G. R., Zepp, R. G., and Crosby, O. G., Lewis Publishers, Boca Raton, 1994.

Holland, H. D.: The chemistry of the atmosphere and oceans, Wiley-interscience, New-York, Chap. 5, edited by: Wiley-interscience, N.-Y., 1978.

Houdier, S., Perrier, S., Defrancq, E., and Legrand, M.: A new fluorescent probe for sensitive detection of carbonyl compounds: sensitivity improvement and application to environmental water samples, Anal. Chim. Acta, 412, 221–233, doi:10.1016/S0003-2670(99)00875-2, 2000.

Houdier, S., Barret, M., Dominé, F., Charbouillot, T., Deguillaume, L., and Voisin, D.: Sensitive determination of glyoxal, methylglyoxal and hydroxyacetaldehyde in environmental water samples by using dansylacetamidooxyamine derivatization and liquid chromatography/fluorescence, Anal. Chim. Acta, 704, 162–173, 2011.

Husárová, S., Vaïtilingom, M., Deguillaume, L., Traikia, M., Vinatier, V., Sancelme, M., Amato, P., Matulová, M., and Delort, A.-M.: Biotransformation of methanol and formaldehyde by bacteria isolated from clouds. Comparison with radical chemistry, Atmos. Environ., 45, 6093–6102, 2011.

Hutchings, J., Robinson, M., McIlwraith, H., Triplett Kingston, J., and Herckes, P.: The chemistry of intercepted clouds in Northern Arizona during the North American monsoon season, Water Air Soil Pollut., 199, 191–202, doi:10.1007/s11270-008-9871-0, 2009.

Hutchings, J. W., Ervens, B., Straub, D., and Herckes, P.: N-Nitrosodimethylamine occurrence, formation and cycling in clouds and fogs, Environ. Sci. Technol., 44, 8128–8133, doi:10.1021/es101698q, 2010.

Igawa, M., Munger, J. W., and Hoffmann, M. R.: Analysis of aldehydes in cloud- and fogwater samples by HPLC with a post-column reaction detector, Environ. Sci. Technol., 23, 556–561, doi:10.1021/es00063a007, 1989.

Jaffrezo, J. L., Calas, N., and Bouchet, M.: Carboxylic acids measurements with ionic chromatography, Atmos. Environ., 32, 2705–2708, 1998.

Johnson, B. J., Betterton, E. A., and Craig, D.: Henry's law coefficients of formic and acetic acids, J. Atmos. Chem., 24, 113–119, 1996.

Joly, M. and Peuch, V.-H.: Objective classification of air quality monitoring sites over Europe, Atmos. Environ., 47, 111–123, 2012.

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.: Atmospheric concentrations of carboxylic acids and related compounds at a semiurban site, Atmos. Environ., 29, 127–139, 1995.

Kim, C.-H., Kreidenweis, S. M., Feingold, G., Anlauf, K. G., and Leaitch, W. R.: Measurement and interpretation of cloud effects on the concentrations of hydrogen peroxide and organoperoxides over Ontario, Canada, Atmos. Res., 81, 140–149, 2006a.

Kim, M.-G., Lee, B.-K., and Kim, H.-J.: Cloud/fog water chemistry at a high elevation site in South Korea, J. Atmos. Chem., 55, 13–29, doi:10.1007/s10874-005-9004-8, 2006b.

Kotronarou, A. and Sigg, L.: Sulfur dioxide oxidation in atmospheric water: role of iron(II) and effect of ligands, Environ. Sci. Technol., 27, 2725–2735, doi:10.1021/es00049a011, 1993.

Kruisz, C., Berner, A., and Brantner, B.: A cloud water sampler for high wind speeds, in: Proceeding of the EUROTRAC Symposium, The Hague, the Netherlands, EUROTRAC Symposium '94, 523–525, 1993.

Kundu, S., Kawamura, K., Andreae, T. W., Hoffer, A., and Andreae, M. O.: Diurnal variation in the water-soluble inorganic ions, organic carbon and isotopic compositions of total carbon and nitrogen in biomass burning aerosols from the LBA-SMOCC campaign in Rondônia, Brazil, J. Aerosol Sci., 41, 118–133, doi:10.1016/j.jaerosci.2009.08.006, 2010.

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, 1997a.

Laj, P., Fuzzi, S., Facchini, M. C., Orsi, G., Berner, A., Kruisz, C., Wobrock, W., Hallberg, A., Bower, K. N., Gallagher, M. W., Beswick, K. M., Colvile, R. N., Choularton, T. W., Nason, P., and Jones, B.: Experimental evidence for in-cloud production of aerosol sulphate, Atmos. Environ., 31, 2503–2514, 1997b.

Laj, P., Klausen, J., Bilde, M., Plaß-Duelmer, C., Pappalardo, G., Clerbaux, C., Baltensperger, U., Hjorth, J., Simpson, D., Reimann, S., Coheur, P. F., Richter, A., De Mazière, M., Rudich, Y., McFiggans, G., Torseth, K., Wiedensohler, A., Morin, S., Schulz, M., Allan, J. D., Attié, J. L., Barnes, I., Birmili, W., Cammas, J. P., Dommen, J., Dorn, H. P., Fowler, D., Fuzzi, S., Glasius, M., Granier, C., Hermann, M., Isaksen, I. S. A., Kinne, S.,

Koren, I., Madonna, F., Maione, M., Massling, A., Moehler, O., Mona, L., Monks, P. S., Müller, D., Müller, T., Orphal, J., Peuch, V. H., Stratmann, F., Tanré, D., Tyndall, G., Abo Riziq, A., Van Roozendael, M., Villani, P., Wehner, B., Wex, H., and Zardini, A. A.: Measuring atmospheric composition change, Atmos. Environ., 43, 5351–5414, 2009.

Lammel, G. and Metzig, G.: Multiphase chemistry of orographic clouds: Observations at subalpine mountain stations, Fresen. J. Anal. Chem., 340, 564–574, 1991.

Leaitch, W. R., Strapp, J. W., Wiebe, H. A., Anlauf, K. G., and Issac, G. A.: Chemical and microphysical studies of nonprecipitating summer clouds in Ontario, Canada, J. Geophys. Res., 91, 11821–11831, doi:10.1029/JD091iD11p11821, 1986.

Leaitch, W. R., Bottenheim, J. W., and Strapp, J. W.: Possible contribution of N_2O_5 scavenging to HNO_3 observed in winter stratiform cloud, J. Geophys. Res., 93, 12569–12584, doi:10.1029/JD093iD10p12569, 1988.

LeClair, J. P., Collett, J. L., and Mazzoleni, L. R.: Fragmentation analysis of water-soluble atmospheric organic matter using ultrahigh-resolution FT-ICR mass spectrometry, Environ. Sci. Technol., 46, 4312–4322, doi:10.1021/es203509b, 2012.

Lee, A. K. Y., Hayden, K. L., Herckes, P., Leaitch, W. R., Liggio, J., Macdonald, A. M., and Abbatt, J. P. D.: Characterization of aerosol and cloud water at a mountain site during WACS 2010: secondary organic aerosol formation through oxidative cloud processing, Atmos. Chem. Phys., 12, 7103–7116, doi:10.5194/acp-12-7103-2012, 2012.

Legrand, M., Preunkert, S., Oliveira, T., Pio, C. A., Hammer, S., Gelencsér, A., Kasper-Giebl, A., and Laj, P.: Origin of C_2-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, 2007.

Lelieveld, J. and Crutzen, P. J.: The role of clouds in tropospheric photochemistry, J. Atmos. Chem., 12, 229–267, 1991.

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, S.-M., Macdonald, A. M., Leithead, A., Leaitch, W. R., Gong ,W., Anlauf, K. G., Toom-Sauntry, D., Hayden, K., Bottenheim, J., and Wang, D.: Investigation of carbonyls in cloudwater during ICARTT, J. Geophys. Res., 113, D17206, doi:10.1029/2007JD009364, 2008.

Lim, H.-J., Carlton, A. G., and Turpin, B. J.: Isoprene forms secondary organic aerosol through cloud processing: Model simulations, Environ. Sci. Technol., 12, 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., 10, 10521–10539, doi:10.5194/acp-10-10521-2010, 2010.

Linuma, Y., Engling, G., Puxbaum, H., and Herrmann, H.: A highly resolved anion-exchange chromatographic method for determination of saccharidic tracers for biomass combustion and primary bio-particles in atmospheric aerosol, Atmos. Environ., 43, 1367–1371, doi:10.1016/j.atmosenv.2008.11.020, 2009.

Loeffler, K. W., Koehler, C. A., Paul, N. M., and De Haan, D. O.: Oligomer formation in evaporating aqueous glyoxal and methyl glyoxal solutions, Environ. Sci. Technol., 40, 6318–6323, doi:10.1021/es060810w, 2006.

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.

Long, Y., Chaumerliac, N., Deguillaume, L., Leriche, M., and Champeau, F.: Effect of mixed-phase cloud on the chemical budget of trace gases: A modeling approach, Atmos. Res., 97, 540–554, 2010.

Long, Y., Charbouillot, T., Brigante, M., Mailhot, G., Delort, A.-M., Chaumerliac, N., and Deguillaume, L.: Evaluation of modeled cloud chemistry mechanism against laboratory irradiation experiments: The HxOy/iron/carboxylic acid chemical system, Atmos. Environ., 77, 686–695, doi:10.1016/j.atmosenv.2013.05.037, 2013.

Majestic, B. J., Anbar, A. D., and Herckes, P.: Elemental and iron isotopic composition of aerosols collected in a parking structure, Sci. Total Environ., 407, 5104–5109, 2009.

Marécal, V., Pirre, M., Rivière, E. D., Pouvesle, N., Crowley, J. N., Freitas, S. R., and Longo, K. M.: Modelling the reversible uptake of chemical species in the gas phase by ice particles formed in a convective cloud, Atmos. Chem. Phys., 10, 4977–5000, doi:10.5194/acp-10-4977-2010, 2010.

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.

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., 101, 256–263, 2011.

Matsumoto, K., Kawai, S., and Igawa, M.: Dominant factors controlling concentrations of aldehydes in rain, fog, dew water, and in the gas phase, Atmos. Environ., 39, 7321–7329, 2005.

Matsunaga, S. and Kawamura, K.: Determination of alpha- and beta-hydroxycarbonyls and dicarbonyls in snow and rain samples by GC/FID and GC/MS employing benzyl hydroxyl oxime derivatization, Anal. Chem., 72, 4742–4746, 2000.

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, doi:10.1029/1999jd900025, 1999.

Medeiros, P. M., Conte, M. H., Weber, J. C., and Simoneit, B. R. T.: Sugars as source indicators of biogenic organic carbon in aerosols collected above the Howland Experimental Forest, Maine, Atmos. Environ., 40, 1694–1705, doi:10.1016/j.atmosenv.2005.11.001, 2006.

Millet, M., Wortham, H., Sanusi, A., and Mirabel, P.: Atmospheric contamination by pesticides: Determination in the liquid, gaseous and particulate phases, Environ. Sci. Pollut. R., 4, 172–180, doi:10.1007/bf02986327, 1997.

Minero, C., Maurino, V., Bono, F., Pelizzetti, E., Marinoni, A., Mailhot, G., Carlotti, M. E., and Vione, D.: Effect of selected organic and inorganic snow and cloud components on the photochemical generation of nitrite by nitrate irradiation, Chemosphere, 68, 2111–2117, 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.

Monks, P. S., Granier, C., Fuzzi, S., Stohl, A., Williams, M. L., Akimoto, H., Amann, M., Baklanov, A., Baltensperger, U., Bey, I., Blake, N., Blake, R. S., Carslaw, K., Cooper, O. R., Dentener, F., Fowler, D., Fragkou, E., Frost, G. J., Generoso, S., Ginoux, P., Grewe, V., Guenther, A., Hansson, H. C., Henne, S., Hjorth, J., Hofzumahaus, A., Huntrieser, H., Isaksen, I. S. A., Jenkin, M. E., Kaiser, J., Kanakidou, M., Klimont, Z., Kulmala, M., Laj, P., Lawrence, M. G., Lee, J. D., Liousse, C., Maione, M., McFiggans, G., Metzger, A., Mieville, A., Moussiopoulos, N., Orlando, J. J., O'Dowd, C. D., Palmer, P. I., Parrish, D. D., Petzold, A., Platt, U., Pöschl, U., Prévôt, A. S. H., Reeves, C. E., Reimann, S., Rudich, Y., Sellegri, K., Steinbrecher, R., Simpson, D., ten Brink, H., Theloke, J., van der Werf, G. R., Vautard, R., Vestreng, V., Vlachokostas, C., and von Glasow, R.: Atmospheric composition change – global and regional air quality, Atmos. Environ., 43, 5268–5350, 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.

Moore, K. F., Sherman, D. E., Reilly, J. E., and Collett, J. L.: Drop size-dependent chemical composition in clouds and fogs. Part I. Observations, Atmos. Environ., 38, 1389–1402, 2004.

Munger, J. W., Jacob, D. J., and Hoffmann, M. R.: The occurence of bisulfite-aldehyde addition products in fog- and cloudwater, J. Atmos. Chem., 1, 335–350, 1984.

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, doi:10.1029/95jd00508, 1995.

O'Dowd, C. D., Facchini, M. C., Cavalli, F., Ceburnis, D., Mircea, M., Decesari, S., Fuzzi, S., Yoon, Y. J., and Putaud, J.-P.: Biogenically driven organic contribution to marine aerosol, Nature, 431, 676–680, doi:10.1038/nature02959, 2004.

Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Abida, O., Laj, P., and Mailhot, G.: Speciation and role of iron in cloud droplets at the puy de Dôme station, J. Atmos. Chem., 54, 267–281, 2006.

Perri, M. J., Seitzinger, S., and Turpin, B. J.: Secondary organic aerosol production from aqueous photooxidation of glycolaldehyde: Laboratory experiments, Atmos. Environ., 43, 1487–1497, 2009.

Possanzini, M., Palo, V. D., and Cecinato, A.: Sources and photodecomposition of formaldehyde and acetaldehyde in Rome ambient air, Atmos. Environ., 36, 3195–3201, 2002.

Putaud, J.-P., Raes, F., Van Dingenen, R., Brüggemann, E., Facchini, M. C., Decesari, S., Fuzzi, S., Gehrig, R., Hüglin, C., Laj, P., Lorbeer, G., Maenhaut, W., Mihalopoulos, N., Müller, K., Querol, X., Rodriguez, S., Schneider, J., Spindler, G., Brink, H. t., Tørseth, K., and Wiedensohler, A.: A European aerosol phenomenology – 2: chemical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe, Atmos. Environ., 38, 2579–2595, 2004.

Raja, S., Raghunathan, R., Yu, X.-Y., Lee, T., Chen, J., Kommalapati, R. R., Murugesan, K., Shen, X., Qingzhong, Y., Valsaraj, K. T., and Collett Jr, J. L.: Fog chemistry in the Texas-Louisiana Gulf Coast corridor, Atmos. Environ., 42, 2048–2061, 2008.

Renard, P., Siekmann, F., Gandolfo, A., Socorro, J., Salque, G., Ravier, S., Quivet, E., Clément, J.-L., Traikia, M., Delort, A.-M., Voisin, D., Vuitton, V., Thissen, R., and Monod, A.: Radical mechanisms of methyl vinyl ketone oligomerization through aqueous phase OH-oxidation: on the paradoxical role of dissolved molecular oxygen, Atmos. Chem. Phys., 13, 6473–6491, doi:10.5194/acp-13-6473-2013, 2013.

Reyes-Rodríguez, G. J., Gioda, A., Mayol-Bracero, O. L., and Collett Jr, J.: Organic carbon, total nitrogen, and water-soluble ions in clouds from a tropical montane cloud forest in Puerto Rico, Atmos. Environ., 43, 4171–4177, 2009.

Ruggaber, A., Dlugi, R., Bott, A., Forkel, R., Herrmann, H., and Jacobi, H. W.: Modelling of radiation quantities and photolysis frequencies in the aqueous phase in the troposphere, Atmos. Environ., 31, 3137–3150, 1997.

Sander, S. P., Golden, D. M. ,Kurylo, M. J., Moortgat, G. K., Wine, P. H., Ravishankara, A. R., Kolb, C. E., Molina, M. J., Finlayson-Pitts, B. J., Huie, R. E., and Orkin, V. L.: Chemical kinetics and photochemical data for use in Atmospheric Studies Evaluation Number 15, Jet Propulsion Laboratory, National Aeronautics and Space Administration, Pasadena, CA, 2006.

Savoie, D. L., Arimoto, R., Keene, W. C., Prospero, J. M., Duce, R. A., and Galloway, J. N.: Marine biogenic and anthropogenic contributions to non-sea-salt sulfate in the marine boundary layer over the North Atlantic Ocean, J. Geophys. Res., 107, 4356, doi:10.1029/2001jd000970, 2002.

Schmidl, C., Bauer, H., Dattler, A., Hitzenberger, R., Weissenboeck, G., Marr, I. L., and Puxbaum, H.: Chemical characterisation of particle emissions from burning leaves, Atmos. Environ., 42, 9070–9079, doi:10.1016/j.atmosenv.2008.09.010, 2008.

Sedlak, D. L., Hoigné, J., David, M. M., Colvile, R. N., Seyffer, E., Acker, K., Wiepercht, W., Lind, J. A., and Fuzzi, S.: The cloudwater chemistry of iron and copper at Great Dun Fell, UK, Atmos. Environ., 31, 2515–2526, 1997.

Seinfeld, J. H. and Pandis, S. N.: Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change, 2nd revised Edn., in: Atmospheric Chemistry and Physics, John Wiley & Sons Inc, New York, 2006.

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.

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.

Shen, X., Lee, T., Guo, J., Wang, X., Li, P., Xu, P., Wang, Y., Ren, Y., Wang, W., Wang, T., Li, Y., Carn, S. A., and Collett Jr, J. L.: Aqueous phase sulfate production in clouds in eastern China, Atmos. Environ., 62, 502–511, 2012.

Sinner, T., Hoffmann, P., and Ortner, H. M.: Determination of pH-value, redox-potential, transition metals concentration and Fe(II)- and Fe(III)-content in cloud water samples, Contrib. Atmos. Phys., 67, 353–357, 1994.

Sorooshian, A., Varutbangkul, V., Brechtel, F. J., Ervens, B., Feingold, G., Bahreini, R., Murphy, S. M., Holloway, J. S., Atlas, E. L., and Buzorius, G.: 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, doi:10.1029/2005JD006880, 2006.

Sørensen, L. L., Pryor, S. C., de Leeuw, G., and Schulz, M.: Flux divergence of nitric acid in the marine atmospheric surface layer, J. Geophys. Res.-Atmos., 110, D15306, doi:10.1029/2004jd005403, 2005.

Stookey, L.: Ferrozine – a new spectrophotometric reagent for iron, Anal. Chem., 42, 779–781, doi:10.1021/ac60289a016, 1970.

Straub, D. J., Hutchings, J. W., and Herckes, P.: Measurements of fog composition at a rural site, Atmos. Environ., 47, 195–205, 2012.

Stumm, W. and Morgan, J. J.: Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters, 3rd Edn., John Wiley & Sons, New York, 1996.

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.

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, 2010.

Tost, H., Jöckel, P., Kerkweg, A., Pozzer, A., Sander, R., and Lelieveld, J.: Global cloud and precipitation chemistry and wet deposition: tropospheric model simulations with ECHAM5/MESSy1, Atmos. Chem. Phys., 7, 2733–2757, doi:10.5194/acp-7-2733-2007, 2007.

Vaïtilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Laj, P., Leriche, M., and Delort, A.-M.: Contribution of microbial activity to carbon chemistry in clouds, Appl. Environ. Microb., 76, 23–29, doi:10.1128/aem.01127-09, 2010.

Vaïtilingom, 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., 11, 8721–8733, doi:10.5194/acp-11-8721-2011, 2011.

Vaïtilingom, M., Deguillaume, L., Vinatier, V., Sancelme, M., Amato, P., Chaumerliac, N., and Delort, A.-M.: Potential impact of microbial activity on the oxidant capacity and organic carbon budget in clouds, P. Natl. Acad. Sci., 110, 559–564, doi:10.1073/pnas.1205743110, 2013.

van Pinxteren, D., Plewka, A., Hofmann, D., Müller, K., Kramberger, H., Svrcina, 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.

Vione, D., Maurino, V., Minero, C., Pelizzetti, E., Harrison, M. A., Olariu, R. I., and Arsene, C.: Photochemical reactions in the tropospheric aqueous phase and on particulate matter, Chem. Soc. Rev., 35, 441–453, doi:10.1039/b510796m, 2006.

Voisin, D., Legrand, M., and Chaumerliac, N.: Scavenging of acidic gases (HCOOH, CH_3COOH, HNO_3, HCl, and SO_2) and ammonia in mixed liquid-solid water clouds at the puy de Dôme mountain (France), J. Geophys. Res., 105, 6817–6835, 2000.

Wang, Y., Guo, J., Wang, T., Ding, A., Gao, J., Zhou, Y., Collett Jr, J. L., and Wang, W.: Influence of regional pollution and sandstorms on the chemical composition of cloud/fog at the summit of Mt. Taishan in northern China, Atmos. Res., 99, 434–442, 2011.

Watanabe, K., Ishizaka, Y., and Takenaka, C.: Chemical characteristics of cloud water over the Japan Sea and the Northwestern Pacific Ocean near the central part of Japan: airborne measurements, Atmos. Environ., 35, 645–655, 2001.

Weathers, K. C., Likens, G. E., Bormann, F. H., Bicknell, S. H., Bormann, B. T., Daube, B. C., Eaton, J. S., Galloway, J. N., Keene, W. C., Kimball, K. D., McDowell, W. H., Siccama, T. G., Smiley, D., and Tarrant, R. A.: Cloudwater chemistry from ten sites in North America, Environ. Sci. Technol., 22, 1018–1026, doi:10.1021/es00174a004, 1988.

Wells, M., Bower, K. N., Choularton, T. W., Cape, J. N., Sutton, M. A., Storeton-West, R. L., Fowler, D., Wiedensohler, A., Hansson, H. C., Svenningsson, B., Swietlicki, E., Wendisch, M., Jones, B., Dollard, G., Acker, K., Wieprecht, W., Preiss, M., Arends, B. G., Pahl, S., Berner, A., Kruisz, C., Laj, P., Facchini, M. C., and Fuzzi, S.: The reduced nitrogen budget of an orographic cloud, Atmos. Environ., 31, 2599–2614, 1997.

Wieprecht, W., Acker, K., Mertes, S., Collett, J. J., Jaeschke, W., Brüggemann, E., Möller, D., and Herrmann, H.: Cloud physics and cloud water sampler comparison during FEBUKO, Atmos. Environ., 39, 4267–4277, 2005.

Wilkinson, J., Reynolds, B., Neal, C., Hill, S., Neal, M., and Harrow, M.: Major, minor and trace element composition of cloudwater and rainwater at Plynlimon, Hydrol. Earth Syst. Sci., 1, 557–569, doi:10.5194/hess-1-557-1997, 1997.

Wobrock, W., Flossmann, A. I., Monier, M., Pichon, J.-M., Cortez, L., Fournol, J.-F., Schwarzenböck, A., Mertes, S., Heintzenberg, J., Laj, P., Orsi, G., Ricci, L., Fuzzi, S., Brink, H. T., Jongejan, P., and Otjes, R.: The Cloud Ice Mountain Experiment (CIME) 1998: experiment overview and modelling of the microphysical processes during the seeding by isentropic gas expansion, Atmos. Res., 58, 231–265, 2001.

Supplementary material

Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) from 10-year monitoring: Mean features of their physico-chemical properties

L. Deguillaume[1,2], T. Charbouillot[1,2,3,4], M. Joly[1,2,3,4], M. Vaïtilingom[1,2,3,4], M. Parazols[1,2,3,4], A. Marinoni[1,2,†], P. Amato[3,4], A.-M. Delort[3,4], V. Vinatier[3,4], A. Flossmann[1,2], N. Chaumerliac[1,2], J.M. Pichon[1,2], S. Houdier[5,6], P. Laj[1,2,‡], K. Sellegri[1,2], A. Colomb[1,2], M. Brigante[3,4], G. Mailhot[3,4]

[1] Clermont Université, Université Blaise Pascal, OPGC, Laboratoire de Météorologie Physique, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand (France)

[2] CNRS, UMR 6016, LaMP/OPGC, BP80026, F-63177 Aubière

[3] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand (France)

[4] CNRS, UMR 6296, ICCF, BP 80026, F-63177 Aubière

[5] Université Joseph Fourier-Grenoble 1, Laboratoire de Glaciologie et Géophysique de l'Environnement, F-38041 Grenoble (France)

[6] CNRS, UMR 5183, F-38041 Grenoble

[†] Now at the Institute for Atmospheric Science and Climate (ISAC), CNR, Bologna, Italy

[‡] Now at Laboratoire de Glaciologie et Géophysique de l'Environnement (LGGE), CNRS/University of Grenoble, Grenoble, France

Short summary of previous studies performed at the pdD station

During the past ten years, many studies have been done at the pdD station by scientists from various research fields such as atmospheric physic and chemistry, photochemistry and microbiology. Monitoring of the gas phase and aerosol particles was performed and several investigations were conducted on the physico-chemical processes occurring in the cloud medium. Major conclusions are briefly recalled below.

The physico-chemical characterization of aerosol particles was studied together with their ability to act as cloud condensation nuclei (CCN). A strong seasonal variability in aerosol concentrations overlapping with diurnal variations was highlighted, with maxima during summer and daytime and minima during winter and nighttime (Venzac et al., 2009). This diurnal increase was mainly attributed to the variation of the boundary layer height, which reaches the pdD summit more frequently during the warm season and under sunny conditions. The link between the chemical composition of aerosols and the air mass origin was also investigated, showing that higher SO_4^{2-}, NO_3^- and NH_4^+ mass contents were well correlated with an anthropogenic influence (Sellegri et al., 2003b). This was confirmed by a recent study using an Aerosol Mass Spectrometer that followed the particle chemical composition. It is strongly influenced by both the season and the origin of the air mass (Freney et al., 2011). This monitoring of aerosol particles at the pdD site contributed to the CARBOSOL campaign that focused on the variability of aerosol concentrations and sources over Europe (Pio et al., 2007). It showed that the organic carbon (from 50 to 80 %) contained in the solid particle was water-soluble, and 63 to 78 % was produced from secondary processes (Gelencsér et al., 2007).

Cloud water has been sampled and analyzed in the past at the pdD mountain. Particularly, the chemical composition of the cloud aqueous phase was characterized and a strong variability in the ionic species composition between cloud events with different regional influences (like anthropogenic or marine) was reported (Marinoni et al., 2004). Parazols *et al.* observed higher aqueous concentrations of dissolved iron (Fe) in anthropogenic air masses compared to marine ones (Parazols et al., 2006). The cloud water pH seemed to be the most significant factor controlling the total dissolved iron content. H_2O_2, another strong oxidant, was analyzed (Marinoni et al., 2011): higher differences between day and night of H_2O_2 concentrations were observed for air masses influenced by anthropogenic activities (mainly Northern directions) compared to those from remote areas (oceanic). The mass transfer from the gas phase seemed to prevail its photo-production in the aqueous phase.

Finally, cloud process models were developed and used to interpret these *in situ* measurements (Deguillaume et al., 2004; Leriche et al., 2001; Leriche et al., 2007). The partitioning of different

species between interstitial air and condensed phases in clouds was followed at the pdD mountain (Voisin et al., 2000; Sellegri et al., 2003a). For specific cloud events, SO_2/SO_4^{2-}, HNO_3/NO_3^- and NH_3/NH_4^+ were mainly found in the liquid phase while acetic and formic acids were predominant in the interstitial gas phase. A cloud chemistry model was applied to simulate clouds forming at the pdD (Leriche et al., 2007). Numerical results were in good agreement with measurements regarding the contribution of gas and aerosol phases to the concentrations of aqueous chemical species. The model allowed quantifying the contribution of in-cloud chemical reactivity to the concentrations of targeted chemical compounds that are significant for sulfate.

Table captions

- **Table S1.** Description of the physico-chemical analysis performed for each cloud event. The total number of samples is 199 corresponding to 73 cloud events. (IC: Ionic Chromatography: concentrations of organic and inorganic compounds). Air masses are divided into four different back-trajectory sectors: West (W), Northwest/North (NW/N), Northeast (NE) and South/Southwest (S/SW) based on their geographical origins. Cloud events are classified following the Principal Component Analysis (PCA) as Polluted (P), Continental (C), Marine (M) and Highly Marine (HM) and this classification is indicated in the column named "Categories".

- **Table S2.** Minimum, maximum and average value for parameters measured in the present study (chemical concentrations in μeqL^{-1} and physico-chemical data such as pH, liquid water content, conductivity, redox potential). The categories are defined as: P = polluted, C = continental, M = marine and HM = Highly Marine. Values determined in recent studies on the cloud water chemical composition are also reported for comparison. BDL: Below Detection Limit.

- **Table S3.** Total Organic Carbon (TOC) measurements (min, max, average) in cloud water performed during field campaigns at various sites. Air mass origins of the samples are also indicated ("Influence").

- **Figure S1.** TOC concentrations as a function of Liquid Water Content (LWC) for the categories (Continental, Marine, Highly Marine) following the ACP analysis.

Event number	Date	Number of sampling	Origin	Categories	pH	Conductivity	Redox potential	Iron speciation	H_2O_2	TOC	Ionic chromatography
1	08/02/2001	6	SW/W/NW	HM/M		■		■			■
2	12/02/2001	9	W/NW/N	M/C				■			■
3	17/02/2001	11	N/NE	M/C/P	■			■			■
4	22/02/2001	18	N	M/C	■			■			■
5	28/02/2001	12	W/NW	HM/M/C	■			■			■
6	02/03/2001	8	SW	M	■			■		■	■
7	08/03/2001	2	W	M/C	■			■			■
8	05/04/2001	1	SW	M				■		■	■
9	14/02/2002	1	SW	C	■			■	■	■	■
10	22/02/2002	1	SW	C	■			■			■
11	27/02/2002	1	SW	M	■			■	■	■	■
12	28/02/2002	1	W	HM	■			■	■	■	■
13	07/03/2002	1	NW	M	■			■	■	■	■
14	13/04/2002	1	N	C	■			■	■	■	
15	26/04/2002	1	W	M	■			■		■	
16	03/05/2002	1	W	C	■			■	■	■	■
17	11/05/2002	1	NW	C	■			■	■	■	■
18	30/04/2003	1	W	C	■			■	■		
19	06/05/2003	1	S	S	■			■	■		
20	10/05/2003	1	W	M	■			■	■		
21	14/01/2004	9	W	M	■			■	■	■	
22	20/01/2004	10	NW	m	■	■	■	■	■	■	
23	16/02/2004	2	NE	P	■	■	■	■	■	■	
24	17/02/2004	4	N/NE	C/P	■	■	■	■	■	■	
25	08/03/2004	5	NE	P	■	■	■	■	■	■	
26	06/04/2004	5	W	HM	■	■	■	■	■	■	
27	22/04/2004	3	SW	S	■	■	■	■	■	■	
28	25/06/2004	2	W	HM	■	■	■	■	■	■	
29	08/07/2004	1	W	M	■	■	■	■	■	■	
30	23/09/2004	4	NW	M	■	■	■	■	■	■	■
31	17/11/2004	3	NW	M	■	■	■	■	■	■	■
32	16/12/2004	4	SW/W	M/C	■	■	■	■	■	■	■
33	19/01/2005	4	NW	HM	■	■	■	■	■	■	■
34	18/04/2005	3	SW	M	■	■	■		■		■
35	22/05/2005	6	SW/W	M	■	■	■			■	■
36	06/06/2005	5	W/NW	M	■	■	■		■		■
37	28/09/2005	4	NW	HM	■	■	■		■	■	■
38	03/10/2005	6	NE	M/C	■	■	■		■	■	■
39	18/10/2005	2	S	M/C	■	■	■		■	■	■
40	18/09/2006	2	W	M	■		■			■	■
41	04/10/2006	4	W	HM/M	■		■		■	■	■
42	13/12/2007	1	NE	C	■		■		■		■
43	17/01/2008	1	W	HM	■		■				■
44	29/02/2008	1	W	M	■		■		■		■
45	21/04/2008	1	SW	M	■		■		■		■
46	09/10/2008	1	SW	M	■						■
47	17/11/2008	1	N	M	■						■
48	01/12/2008	1	NW	HM	■		■			■	■
49	27/01/2009	1	N	M						■	■
50	09/02/2009	1	W	M			■		■	■	■
51	17/02/2009	1	NW	M	■		■		■	■	■
52	24/02/2009	1	N	C	■		■		■	■	■
53	30/03/2009	1	NE	P	■				■		■
54	03/11/2009	1	W	M	■	■	■	■	■	■	■
55	23/11/2009	1	W	M	■	■	■	■	■	■	■
56	08/01/2010	1	NE	C	■	■	■	■		■	■
57	26/01/2010	1	NE	P	■	■	■	■		■	■
58	19/02/2010	1	NW	HM							■
59	04/03/2010	1	NE	C	■	■	■	■		■	■
60	31/03/2010	1	W	HM	■	■	■	■		■	■
61	31/05/2010	1	NW	M	■	■		■	■	■	■
62	01/06/2010	1	W	M	■	■		■	■		■
63	08/06/2010	1	S	C	■	■		■	■		■
64	16/06/2010	1	NE	M	■	■		■	■	■	■
65	18/06/2010	1	NE	C	■	■		■	■	■	■
66	16/09/2010	1	W	M	■	■			■		■
67	19/01/2011	1	N	C	■	■	■	■	■	■	■
68	02/02/2011	1	W	M	■	■	■	■	■	■	■
69	24/02/2011	1	W	M	■	■	■	■	■	■	■
70	28/03/2011	1	SW	M	■	■	■	■	■	■	■
71	31/03/2011	1	W	M	■	■	■	■	■	■	■
72	12/04/2011	1	NW	HM	■	■	■	■	■	■	■
73	28/04/2011	1	N	P	■	■	■	■	■	■	■
	Total number of samples	199									

Table S1

		Location	puy de Dôme, France				Cheeka Peak Obs., USA	Mt. Broken, Germany	Rax, Austria	Whiteface Mountain, USA	Schmücke, Germany
		Reference	This study				Vong et al., 1997	Acker et al., 1998	Löflund et al., 2002	Moore et al., 2004	Van Pinxteren et al., 2005
		Date	2001-2011				1993	1996	1999-2000	1998	2001-2002
		Number of samples	13	28	81	22	48	1234	45	49	3
		Types	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud
		Categories	P	C	M	HM	M	C	C	P	C
µM	H_2O_2	Av	**4.87**	**9.90**	**6.15**	**11.21**					
		Min	1.90	1.03	0.10	0.80					
		Max	7.30	57.70	20.80	19.00					
	Fe(II)	Av	**2.74**	**1.06**	**0.44**	**0.74**					
		Min	1.10	0.10	0.10	0.30					
		Max	5.30	6.80	4.00	1.60					
	Fe(III)	Av	**0.63**	**0.47**	**0.38**	**0.24**					
		Min	0.00	0.00	0.00	0.00				0.27	
		Max	3.00	2.40	4.90	1.00				20.75	
µeq L^{-1}	Acetate	Av	**17.74**	**10.97**	**4.94**	**12.02**	**2.90**		**15.49**		
		Min	3.42	0.00	0.31	1.80			4.00		1.60
		Max	50.74	41.58	22.24	57.61			37.80		41.40
	Formate	Av	**5.53**	**13.46**	**6.32**	**13.01**	**6.40**		**13.25**		
		Min	2.66	0.25	0.80	2.26			1.30		4.90
		Max	13.67	52.79	28.97	42.38			34.33		39.10
	Succinate	Av	**1.58**	**1.81**	**0.60**	**1.09**			**2.54**		
		Min	0.85	0.14	0.00	0.00			1.70		
		Max	2.31	7.60	3.50	4.48			5.08		1.80
	Malonate	Av	**0.98**	**1.62**	**0.74**	**1.10**			**3.84**		
		Min	0.71	0.34	0.31	0.32			1.54		0.40
		Max	1.24	7.00	2.86	3.88			5.76		1.80
	Oxalate	Av	**4.13**	**4.92**	**2.07**	**3.61**			**8.44**		
		Min	2.54	0.51	0.18	1.51			1.34		2.40
		Max	6.89	19.40	7.52	12.02			25.32		11.60
	Cl^-	Av	**69.41**	**34.95**	**25.28**	**238.20**	**432.90**	**101**	**16.08**		
		Min	3.85	4.76	0.49	81.37			0.85		
		Max	203.31	146.82	133.52	409.52			44.57		
	NO_3^-	Av	**416.65**	**110.88**	**24.84**	**59.30**	**15.10**	**360**	**136.45**		
		Min	309.98	31.89	0.80	9.71			16.29	66.30	
		Max	516.51	297.86	93.17	231.80			319.35	1909.00	
	SO_4^{2-}	Av	**119.77**	**97.93**	**28.27**	**79.30**	**63.50**	**312**	**163.40**		
		Min	70.43	26.42	3.88	18.76			22.90	180.60	
		Max	170.98	218.40	77.24	261.64			423.40	2193.00	
	Na^+	Av	**44.38**	**34.43**	**25.75**	**286.31**	**290.60**	**100**	**15.69**		
		Min	0.96	5.64	0.37	110.76			2.62		
		Max	171.86	122.83	127.50	678.56			49.26		
	NH_4^+	Av	**233.06**	**145.07**	**43.23**	**88.45**	**11.10**	**472**	**229.57**		
		Min	151.01	72.69	5.99	28.55			29.46	103.10	
		Max	376.29	339.64	96.17	219.63			490.83	1124.40	
	K^+	Av	**18.25**	**5.02**	**2.96**	**19.89**	**8.10**	**1.3**	**7.17**		
		Min	2.15	0.00	0.00	5.23			1.28		
		Max	71.57	35.26	20.51	159.42			19.46		
	Mg^{2+}	Av	**7.62**	**13.18**	**7.82**	**46.92**	**66.40**	**24**	**21.40**		
		Min	0.68	0.00	0.00	8.43			1.64	2.90	
		Max	27.01	78.40	64.89	95.84			82.28	241.50	
	Ca^{2+}	Av	**105.11**	**29.03**	**17.17**	**59.40**	**36.10**	**51**	**21.48**		
		Min	0.82	0.00	0.00	5.46			4.00	7.40	
		Max	519.37	155.47	123.20	110.32			76.96	1124.00	
	pH	Av	**4.29**	**5.09**	**5.70**	**6.15**	**4.45**		**3.84**		
		Min	3.10	3.90	4.60	4.70			3.36	2.73	
		Max	6.61	7.06	7.60	6.90			5.26	3.77	
mV	E_h	Av	**122.30**	**59.75**	**22.02**	**4.33**					
		Min	35.00	-162.00	-164.00	-63.00					
		Max	230.00	133.00	166.00	50.00					
µS cm^{-1}	C	Av	**168.63**	**34.51**	**17.79**	**56.64**					
		Min	93.70	7.51	2.00	27.00					
		Max	348.00	74.00	155.00	134.00					
g m^{-3}	LWC	Av	**0.41**	**0.29**	**0.28**	**0.27**	**0.30**	**0.34**	**0.28**		
		Min	0.40	0.07	0.06	0.05			0.15		
		Max	0.41	0.92	0.58	0.48			0.59		
mgC L^{-1}	TOC	Av	**12.42**	**5.51**	**3.28**	**4.83**					
		Min	4.80	2.00	0.30	2.50					
		Max	25.01	15.50	15.50	10.30					

Table S2

		Location	puy de Dôme, France				Daekwanreung, South Korea	Stog Izerski, Poland	Szrenica, Poland	East Peak, Puerto Rico				
		Reference	This study				Kim et al., 2006	Blas et al., 2008		Reyes-Rodriguez et al., 2009	Gioda et al., 2009		Gioda et al., 2011	
		Date	2001-2011				2002-2003	2003-2004		2007	2005	2005	2004-2007	2004-2007
		Types	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud/fog	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud	Cloud
		Categories	P	C	M	HM	M/C	P	P	M	M	C	M	P
µM	H_2O_2	Av	**4.87**	**9.90**	**6.15**	**11.21**								
		Min	1.90	1.03	0.10	0.80								
		Max	7.30	57.70	20.80	19.00								
	Fe(II)	Av	**2.7**	**1.1**	**0.4**	**0.7**								
		Min	1.1	0.1	0.1	0.3								
		Max	5.3	6.8	4.0	1.6								
	Fe(III)	Av	**0.6**	**0.5**	**0.4**	**0.2**								
		Min	BDL	BDL	BDL	BDL								
		Max	3.0	2.4	4.9	1.0								
µeq L^{-1}	Acetate	Av	**17.74**	**10.97**	**4.94**	**12.02**							**3.80**	**11.60**
		Min	3.42	BDL	0.31	1.80								
		Max	50.74	41.58	22.24	57.61								
	Formate	Av	**5.53**	**13.46**	**6.32**	**13.01**							**3.00**	**2.00**
		Min	2.66	0.25	0.80	2.26								
		Max	13.67	52.79	28.97	42.38								
	Succinate	Av	**1.58**	**1.81**	**0.60**	**1.09**								
		Min	0.85	0.14	BDL	BDL								
		Max	2.31	7.60	3.50	4.48								
	Malonate	Av	**0.98**	**1.62**	**0.74**	**1.10**								
		Min	0.71	0.34	0.31	0.32								
		Max	1.24	7.00	2.86	3.88								
	Oxalate	Av	**4.13**	**4.92**	**2.07**	**3.61**							**1.40**	**7.40**
		Min	2.54	0.51	0.18	1.51								
		Max	6.89	19.40	7.52	12.02								
	Cl^-	Av	**69.41**	**34.95**	**25.28**	**238.20**	**166.10**	**65.60**	**96.70**	**384.00**	**446.14**	**395.84**	**473.00**	**388.00**
		Min	3.85	4.76	0.49	81.37	6.20			151.00	166.29	235.35		
		Max	203.31	146.82	133.52	409.52	668.00			841.00	681.76	556.32		
	NO_3^-	Av	**416.65**	**110.88**	**24.84**	**59.30**	**493.80**	**172.60**	**177.40**	**28.00**	**11.16**	**66.24**	**16.00**	**40.00**
		Min	309.98	31.89	0.80	9.71	7.20			19.00	2.88	46.92		
		Max	516.51	297.86	93.17	231.80	2729.30			37.00	29.05	85.55		
	SO_4^{2-}	Av	**119.77**	**97.93**	**28.27**	**79.30**	**489.30**	**133.40**	**136.60**	**68.00**	**54.57**	**79.25**	**54.00**	**89.00**
		Min	70.43	26.42	3.88	18.76	34.00			46.00	28.95	59.34		
		Max	170.98	218.40	77.24	261.64	1838.60			101.00	84.14	99.16		
	Na^+	Av	**44.38**	**34.43**	**25.75**	**286.31**	**166.20**	**67.30**	**100.90**	**362.00**	**476.76**	**428.67**	**532.00**	**370.00**
		Min	0.96	5.64	0.37	110.76	1.20			158.00	174.56	255.46		
		Max	171.86	122.83	127.50	678.56	532.80			738.00	685.00	601.88		
	NH_4^+	Av	**233.06**	**145.07**	**43.23**	**88.45**	**610.70**	**166.60**	**189.50**	**7.00**	**5.29**	**6.49**	**5.80**	**24.00**
		Min	151.01	72.69	5.99	28.55	55.80			1.00	3.37	6.05		
		Max	376.29	339.64	96.17	219.63	2078.40			13.00	7.45	6.93		
	K^+	Av	**18.25**	**5.02**	**2.96**	**19.89**	**28.40**	**5.70**	**20.70**	**56.00**	**10.39**	**8.72**	**30.00**	**20.00**
		Min	2.15	BDL	BDL	5.23	0.80			27.00	7.22	4.84		
		Max	71.57	35.26	20.51	159.42	86.10			116.00	14.67	12.60		
	Mg^{2+}	Av	**7.62**	**13.18**	**7.82**	**46.92**	**68.10**	**20.60**	**27.20**	**10.00**	**109.04**	**92.99**	**89.00**	**68.00**
		Min	0.68	0.00	0.00	8.43	0.80			6.00	39.73	54.15		
		Max	27.01	78.40	64.89	95.84	180.50			17.00	155.40	131.82		
	Ca^{2+}	Av	**105.11**	**29.03**	**17.17**	**59.40**	**197.60**	**52.40**	**64.80**	**50.00**	**24.88**	**22.16**	**60.00**	**23.00**
		Min	0.82	BDL	BDL	5.46	6.60			44.00	13.66	19.64		
		Max	519.37	155.47	123.20	110.32	761.80			61.00	33.59	24.68		
	pH	Av	**4.3**	**5.1**	**5.7**	**6.2**	**4.40**	**4.25**	**4.44**	**6.00**	**6.14**	**4.85**	**5.80**	**4.50**
		Min	3.1	3.9	4.6	4.7	0.70			5.15	5.80	4.76		
		Max	6.6	7.1	7.6	6.9	6.50			7.37	6.39	4.94		
mV	E_h	Av	**122.3**	**59.8**	**22.0**	**4.3**								
		Min	35.0	-162.0	-164.0	-63.0								
		Max	230.0	133.0	166.0	50.0								
µS cm^{-1}	C	Av	**168.6**	**34.5**	**17.8**	**56.6**	**149.00**	**66.00**	**69.00**					
		Min	93.7	7.5	2.0	27.0	13.50							
		Max	348.0	74.0	155.0	134.0	530.00							
g m^{-3}	LWC	Av	**0.41**	**0.29**	**0.28**	**0.27**				**0.14**	**0.35**	**0.09**	**0.20**	**0.10**
		Min	0.40	0.07	0.06	0.05				0.06	0.13	0.07		
		Max	0.41	0.92	0.58	0.48				0.28	0.60	0.11		
mgC L^{-1}	TOC	Av	**12.4**	**5.5**	**3.3**	**4.8**				**0.45**			**0.70**	**1.30**
		Min	4.8	2.0	0.3	2.5				0.15				
		Max	25.0	15.5	15.5	10.3				0.66				

Table S2

		TOC (mgC L^{-1})		
	Influence	Av	Min	Max
Various sites, US (Anastasio et al., 1994) *	Continental	12.0	3.0	18.0
Whiteface moutain, US (Khwaja et al., 1995) *	Continental	7.6	5.1	11.0
Whiteface moutain, US (Arakaki and Faust, 1998)	Continental		2.4	26.8
Rax mountain, Austria (Löflund et al., 2002)	Continental	5.7	1.0	14.0
Schmücke, Germany (Brüggemann et al., 2005)	Continental	5.8		
Arizona, US (Hutchings et al., 2009)	Continental	9.2	2.9	18.6
East Peak, Puerto Rico (Reyes-Rodríguez et al., 2009)	Marine	0.4	0.1	0.7
Mount Tai, China (Wang et al., 2011)	Polluted	18.5	1.8	153.1
Mount Tai (Desyaterik et al., 2013 & Herckes et al., 2013)	Highly polluted		100.0	200.0
Whistler mountain, US Fresno, US (Wang et al., 2013)	Continental Polluted		2.0 12.0	11.0 35.0
Raven's nest, US Whistler Peak, US (Ervens et al., 2013) *	Continental Continental		1.8 3.1	5.8 8.1
PdD moutain, France (Marinoni et al., 2004) *	Marine/Continental	3.6	1.2	15.5
This study, pdD moutain, France	Polluted	12.4	4.8	25.0
	Continental	5.5	2.0	15.5
	Marine	3.3	0.3	15.5
	Highly marine	4.8	2.5	10.3

*This value corresponds to the Dissolved Organic Carbon (DOC).

Table S3

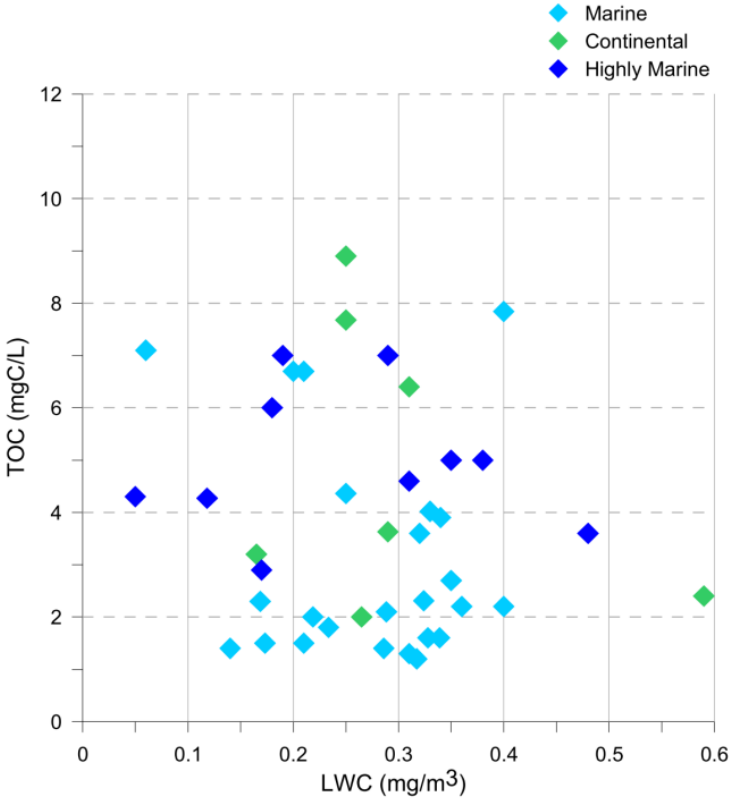

Marine
Continental
Highly Marine
TOC (mgC/L)
LWC (mg/m3)
0
2
4
6
8
10
12
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6

Figure S1.

References

Acker, K., Möller, D., Wieprecht, W., Kalaß, D., and Auel, R.: Investigations of ground-based clouds at the Mt. Brocken, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 361, 59-64, 10.1007/s002160050834, 1998.

Anastasio, C., Faust, B. C., and Allen, J. M.: Aqueous phase photochemical formation of hydrogen peroxide in authentic cloud waters, Journal of Geophysical Research, 99, 8231-8248, 10.1029/94jd00085, 1994.

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, Journal of Geophysical Research, 103, 3487-3504, 10.1029/97jd02795, 1998.

Blas, M., Sobik, M., and Twarowski, R.: Changes of cloud water chemical composition in the Western Sudety Mountains, Poland, Atmospheric Research, 87, 224-231, 2008.

Deguillaume, L., Leriche, M., Monod, A., and Chaumerliac, N.: The role of transition metal ions on HO_x radicals in clouds: a numerical evaluation of its impact on multiphase chemistry, Atmospheric Chemistry and Physics, 4, 95-110, 2004.

Desyaterik, Y., Sun, Y., Shen, X., Lee, T., Wang, X., Wang, T., and Collett, J. L.: Speciation of "brown" carbon in cloud water impacted by agricultural biomass burning in eastern China, Journal of Geophysical Research: Atmospheres, 10.1002/jgrd.50561, 2013.

Ervens, B., Wang, Y., Eagar, J., Leaitch, W. R., Macdonald, A. M., Valsaraj, K. T., and Herckes, P.: Dissolved organic carbon (DOC) and select aldehydes in cloud and fog water: the role of the aqueous phase in impacting trace gas budgets, Atmospheric Chemistry and Physics, 13, 5117-5135, doi:10.5194/acp-13-5117-2013, 2013.

Freney, E. J., Sellegri, K., Canonaco, F., Boulon, J., Hervo, M., Weigel, R., Pichon, J. M., Colomb, A., Prévôt, A. S. H., and Laj, P.: Seasonal variations in aerosol particle composition at the puy de Dôme research station in France, Atmospheric Chemistry and Physics, 11, 13047-13059, 10.5194/acp-11-13047-2011, 2011.

Gelencsér, A., May, B., Simpson, D., Sánchez-Ochoa, A., Kasper-Giebl, A., Puxbaum, H., Caseiro, A., Pio, C., and Legrand, M.: Source apportionment of PM2.5 organic aerosol over Europe: Primary/secondary, natural/anthropogenic, and fossil/biogenic origin, Journal of Geophysical Research, 112, D23S04, 10.1029/2006jd008094, 2007.

Gioda, A., Mayol-Bracero, O., Morales-García, F., Collett, J., Decesari, S., Emblico, L., Facchini, M., Morales-De Jesús, R., Mertes, S., Borrmann, S., Walter, S., and Schneider, J.: Chemical composition of cloud water in the Puerto Rican tropical trade wind cumuli, Water Air and Soil Pollution, 200, 3-14, 2009.

Gioda, A., Reyes-Rodríguez, G. J., Santos-Figueroa, G., Collett, J. L., Jr., Decesari, S., Ramos, M. d. C. K. V., Bezerra Netto, H. J. C., de Aquino Neto, F. R., and Mayol-Bracero, O. L.: Speciation of water-soluble inorganic, organic, and total nitrogen in a background marine environment: Cloud water, rainwater, and aerosol particles, Journal of Geophysical Research, 116, D05203, 10.1029/2010jd015010, 2011.

Herckes, P., Valsaraj, K. T., and Collett Jr, J. L.: A review of observations of organic matter in fogs and clouds: Origin, processing and fate, Atmospheric Research, In press, http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosres.2013.06.005, 2013.

Hutchings, J., Robinson, M., McIlwraith, H., Triplett Kingston, J., and Herckes, P.: The chemistry of intercepted clouds in Northern Arizona during the North American monsoon season, Water Air and Soil Pollution, 199, 191-202, 2009.

Khwaja, H. A.: Atmospheric concentrations of carboxylic acids and related compounds at a semiurban site, Atmospheric Environment, 29, 127-139, 1995.

Kim, M.-G., Lee, B.-K., and Kim, H.-J.: Cloud/fog water chemistry at a high elevation site in South Korea, Journal of Atmospheric Chemistry, 55, 13-29, 10.1007/s10874-005-9004-8, 2006.

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), Atmospheric Environment, 35, 5411-5423, 2001.

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, Journal of Atmospheric Chemistry, 57, 281-297, 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, Atmospheric Environment, 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, Atmospheric Chemistry and Physics, 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, Atmospheric Research, 101, 256-263, 2011.

Moore, K. F., Sherman, D. E., Reilly, J. E., and Collett, J. L.: Drop size-dependent chemical composition in clouds and fogs. Part I. Observations, Atmospheric Environment, 38, 1389-1402, 2004.

Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Abida, O., Laj, P., and Mailhot, G.: Speciation and role of iron in cloud droplets at the puy de Dôme station, Journal of Atmospheric Chemistry, 54, 267-281, 2006.

Pio, C. A., Legrand, M., Oliveira, T., Afonso, J., Santos, C., Caseiro, A., Fialho, P., Barata, F., Puxbaum, H., Sanchez-Ochoa, A., Kasper-Giebl, A., Gelencsér, A., Preunkert, S., and Schock, M.: Climatology of aerosol composition (organic versus inorganic) at nonurban sites on a west-east transect across Europe, Journal of Geophysical Research, 112, D23S02, 10.1029/2006jd008038, 2007.

Reyes-Rodríguez, G. J., Gioda, A., Mayol-Bracero, O. L., and Collett Jr, J.: Organic carbon, total nitrogen, and water-soluble ions in clouds from a tropical montane cloud forest in Puerto Rico, Atmospheric Environment, 43, 4171-4177, 2009.

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, Atmospheric Chemistry and Physics, 3, 1509-1522, 10.5194/acp-3-1509-2003, 2003a.

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, Journal of Geophysical Research, 108, 4333, 10.1029/2002jd002747, 2003b.

Venzac, H., Sellegri, K., Villani, P., Picard, D., and Laj, P.: Seasonal variation of aerosol size distributions in the free troposphere and residual layer at the puy de Dôme station, France, Atmospheric Chemistry and Physics, 9, 1465-1478, 2009.

Voisin, D., Legrand, M., Chaumerliac, and N.: Scavenging of acidic gases (HCOOH, CH_3COOH, HNO_3, HCl, and SO_2) and ammonia in mixed liquid-solid water clouds at the puy de Dôme mountain (France), Journal of Geophysical Research, 105, 6817-6835, 2000.

Vong, R. J., Baker, B. M., Brechtel, F. J., Collier, R. T., Harris, J. M., Kowalski, A. S., McDonald, N. C., and McInnes, L. M.: Ionic and trace element composition of cloud water collected on the Olympic Peninsula of Washington State, Atmospheric Environment, 31, 1991-2001, 1997.

Wang, Y., Chiu, C.-A., Westerhoff, P., Valsaraj, K. T., and Herckes, P.: Characterization of atmospheric organic matter using size-exclusion chromatography with inline organic carbon detection, Atmospheric Environment, 68, 326-332, 2013.

Wang, Y., Guo, J., Wang, T., Ding, A., Gao, J., Zhou, Y., Collett Jr, J. L., and Wang, W.: Influence of regional pollution and sandstorms on the chemical composition of cloud/fog at the summit of Mt. Taishan in northern China, Atmospheric Research, 99, 434-442, 2011.

4. Composition microbiologique des nuages

L'étude de la microflore des nuages au puy de Dôme a débuté en 2004, lors de la thèse de Pierre Amato puis a été poursuivie en 2007 lors de la thèse de Mickaël Vaïtilingom. Au total, ce sont 34 évènements nuageux qui été analysés durant leur thèse respective et dont les résultats quantitatifs (concentration en microorganismes cultivables et totaux) et qualitatifs (composition microbienne et viabilité cellulaire) sont présentés dans les publications suivantes : *Amato et al.*, (2007b, 2007d); et *Vaïtilingom et al.* (2012). Depuis 2010, j'ai réalisé 23 nouveaux prélèvements. L'ensemble des résultats collectés entre 2004 et aujourd'hui est présenté dans cette partie.

Ces travaux ont fait l'objet d'une présentation sur poster dans le cadre :

- des **Journées Internationales de Limnologie et d'Océanographie** (JILO) qui se sont tenues à Clermont-Ferrand (France) en Octobre 2012 sous le titre « Living microorganisms in cloud water » (Présentateur : M. Joly).
- de l'**European Meeting on Environmental Chemistry** (EMEC12) à Clermont-Ferrand en Décembre 2011 sous le titre « Living microorganisms in cloud water » (Présentateur : M. Joly).
- à la **conférence annuelle de l'American Association for Aerosol Research** (AAAR) qui s'est tenu en Octobre 2013 à Portland (U.S.A) sous le titre « Living microorganisms in cloud water » (Présentateur : A.-M.Delort)

Ils ont également fait l'objet d'une communication orale dans le cadre du congrès **MicrobAero 2013** qui s'est à La Bourboule (France) en Octobre 2013 sous le titre « Living microorganisms in cloud water » (Orateur : M. Joly).

4.1.Matériel et Méthodes

Le détail des protocoles jugé nécessaire est présenté en Annexe 1.

4.1.1. Prélèvements

Seuls les nuages étant non précipitant ont été collectés. Les prélèvements ont été réalisés autant que possible en conditions stériles : la partie amovible de l'impacteur (vase de collecte et plaque d'impaction) a été stérilisée par autoclave (20 min, 121°C) et la partie fixe (partie cylindrique et coupe-vent) a été nettoyée à l'alcool à 70° une fois installée sur le toit puis rincée à l'eau ultra pure stérile. La partie amovible a été extraite de son emballage stérile au dernier moment, juste avant son installation avec des gants stériles. Après deux heures d'échantillonnage, la phase aqueuse des nuages a été récoltée dans le vase de collecte et transvasée dans une bouteille en pyrex stérile dans le cas de nuages liquides ou en plaçant directement la plaque d'impaction dans un sac stérile pour les prélèvements congelés. Dans ces cas, la glace formée sur la plaque d'impaction a été laissée à

décongeler stérilement à température ambiante (**Figure 25**). L'ensemble des manipulations réalisées par la suite ont été effectué sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) pour éviter toute contamination.

4.1.2. Dénombrement des cellules totales

Le dénombrement des cellules totales dans l'eau de nuage a été réalisé par microscopie. Pour cela, les cellules présentes dans l'eau de nuage ont été fixées par du formaldéhyde (1:1 v/v) directement après le prélèvement afin d'inhiber la multiplication cellulaire et conserver l'intégrité cellulaire. La solution de formaldéhyde a été préparée à 4 % (v/v) dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,0. Le mélange a été agité délicatement et conservé au réfrigérateur pour une durée maximale de 3 semaines.

Le jour du dénombrement, les cellules ont été marquées par 2,5 µg mL^{-1} de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Le mélange a été gardé au noir pendant 20 min à température ambiante puis filtré sous vide sur une membrane de 0,22 µm de porosité (filtre GTPB noir). Ce filtre a ensuite été observé par microscopie à épifluorescence (excitation : 365 nm ; émission : 420 nm) (**Figure 25b**).

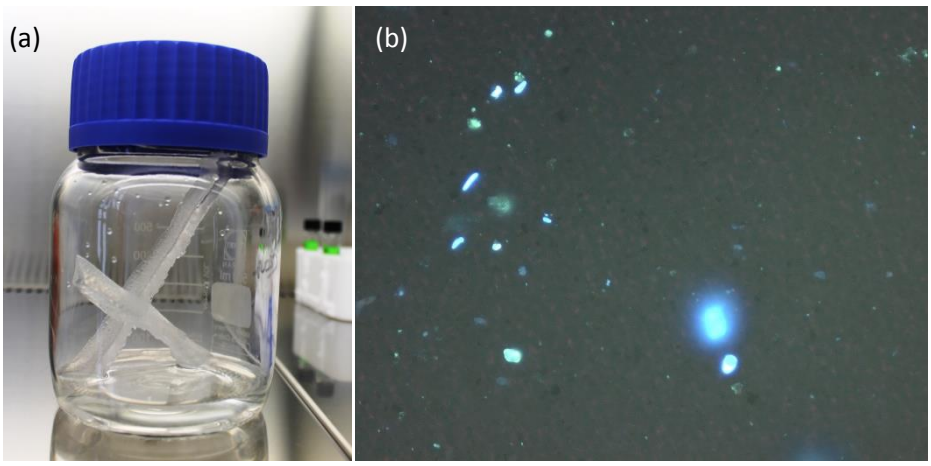


Figure 25 *: (a) Lors de prélèvements à des températures négatives, les gouttelettes d'eau surfondue gèlent sur la plaque d'impaction en la percutant. L'échantillon est alors décongelé stérilement à température ambiante, (b) Observation par microscopie à épifluorescence du contenu microbien de l'eau de nuage après marquage au DAPI (x 150).*

4.1.3. Dénombrement des cellules cultivables

Directement après le prélèvement, 100 µL d'eau de nuage ont été mis en culture par étalement sur du milieu R2A, un milieu utilisé généralement pour le dénombrement et l'identification des microorganismes dans l'eau potable (*Reasoner et Geldreich*, 1985). Les cultures ont été réalisées en aérobiose, en l'absence de lumière et à deux températures : 5°C et 17°C, qui correspondent

respectivement à la température moyenne annuelle et maximale des prélèvements de nuages au puy de Dôme. Trois réplicats ont été effectués pour chacune des températures.

Les colonies ont été dénombrées régulièrement au cours de l'incubation (entre 3 et 45 jours généralement). En raison de leur ressemblance au niveau macroscopique, les colonies bactériennes et les levures ont été dénombrées ensembles.

4.1.4. Isolement, conservation et identification des cellules cultivables

Les colonies bactériennes « d'intérêt » pour notre équipe ont été sélectionnées sur les milieux gélosés, *i.e.* les colonies potentiellement apparentées aux genres étudiés dans l'équipe (*Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas, etc.*) ou les colonies présentant un fort potentiel biotechnologique (production de surfactants, d'antibiotiques, *etc.*). Elles ont ensuite été isolées, conservées puis identifiées. Pour cela, la colonie a été prélevée à partir du milieu R2A initial puis étalée par la méthode de l'épuisement sur un nouveau milieu R2A gélosé stérile. Après croissance de la souche à 17°C et vérification de sa pureté, les bactéries ont été mises en culture dans du milieu R2A liquide à 17°C pendant environ 3 jours puis congelées à -80°C dans ce milieu en présence de glycérol (concentration finale : 10 % v/v).

En parallèle, les bactéries ont également été lyophilisées : les souches pures ont été mises en culture sur un milieu R2A en tubes inclinés à 17°C. Après leur croissance, les colonies ont été reprises stérilement dans une solution de lait écrémé. La suspension a alors été répartie dans deux microcupules de verre à l'intérieur de flacons à sertir avant lyophilisation.

L'identification des bactéries a été réalisée par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. L'ADN a été extrait au préalable en chauffant une colonie dans 100 µL d'eau stérile à 95°C pendant 3 min. Il a ensuite été amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) par les amorces universelles 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'). Le mélange réactionnel a été réalisé à partir du kit BioTaq DNA polymerase BIO 21040 et était composé de tampon (1X), de DMSO (2 %), de $MgCl_2$ (1,5 mM), de dNTP (0,2 mM), de chacune des amorces (0,4 µM) et de Taq polymérase (5 U). L'amplification s'est effectuée dans un thermocycleur TECHNE TC-5000 selon le programme suivant : (1) dénaturation initiale à 95°C pendant 3 min, (2) 30 cycles de dénaturation à 95°C pendant 45 s, hybridation des amorces à 53°C pendant 45 s et élongation à 72°C pendant 45 s, (3) élongation finale à 72°C pendant 7 min. La longueur des fragments d'ADN a ensuite été vérifiée par migration électrophorétique sur gel d'agarose 0,8 % (TAE 0,5X). Les produits de PCR ont été purifiés grâce au kit Minelute de Qiagen® selon les recommandations du fabricant. Ils ont ensuite été séquencés par l'entreprise Eurofins MWG Operon (Allemagne). Les résultats du séquençage ont ensuite été confrontés à la base de données BLAST pour déterminer le genre bactérien voire l'espèce.

4.1.5. Viabilité cellulaire

La viabilité des cellules dans l'eau de nuage a été estimée par la mesure de la concentration en adénosine triphosphate (ATP) et en adénosine diphosphate (ADP). Ce dosage a été adapté à partir du protocole du kit commercial ATP Biomass Kit HS (Biothema©) par *Koutny et al.* (2006) : l'ATP dans les cellules a été extrait et stabilisé dans la solution d'extractant du kit (1:1 v/v) directement après le prélèvement. Le mélange a été vortexé puis conservé à -25°C en attente de l'analyse.

Le dosage de l'ATP est basé sur la réaction enzymatique suivante :

$$\text{ATP + D-Luciférine + } O_2 \xrightarrow{luciférase} \text{AMP + PPi + oxyluciférine + CO2 + hv}$$

La quantité de lumière émise est alors proportionnelle à la quantité d'ATP dans le milieu. Pour le dosage de l'ADP, deux mesures d'ATP ont été réalisées : (1) directement sur l'échantillon, (2) après transformation de l'ADP en ATP par une pyruvate kinase en présence de phosphoenol pyruvate

$$\text{(PEP) : ADP + PEP} \xrightarrow{pyruvate\ kinase} \text{ATP + pyruvate}$$

La différence entre les deux mesures indique alors la concentration en ADP dans l'échantillon.

4.1.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel Past (*Hammer et al.*, 2001). En raison de l'absence de distribution normale des valeurs, les tests non paramétriques de Mann et Whitney et de Kruskal et Wallis ont été utilisés respectivement afin de déterminer des différences significatives entre 2 échantillons ou plus de 2 échantillons ($p < 0,05$).

4.2.Résultats

Durant ma thèse, 23 évènements nuageux ont été échantillonnés entre Décembre 2010 et Mai 2013. Leurs caractéristiques biologiques (concentration en cellules totales, cultivables et en ATP/ADP) sont présentées dans le **Tableau 3**. Les caractéristiques biologiques des prélèvements précédents ne sont pas présentées comme elles ont déjà fait l'objet de plusieurs publications (*Amato et al.*, 2007b, 2007d; *Vaïtilingom et al.*, 2012) et thèses. L'origine des masses d'air a été déterminée à partir des critères chimiques définis dans la section précédente (*Deguillaume et al.*, 2013)

Entre 2010 et 2013, 18 des 23 prélèvements réalisés ont été récoltés depuis des masses d'air provenant de l'Ouest, du Nord-Ouest ou du Nord, 4 provenaient du Sud ou du Sud-Ouest et seulement 1 échantillon de nuage a été prélevé depuis une masse d'air originaire du Nord-Est. Cette répartition se traduit par un grand nombre de prélèvements ayant subi une influence marine (78 %). Seuls 17 % des prélèvements ont été réalisés dans une masse d'air d'origine continentale et 4 % depuis une masse d'air polluée. En ce qui concerne la période 2004-2013, ces proportions sont très proches : les nuages ayant subi une influence marine sont toujours majoritaires (61 %) tandis que

***Tableau 3** : Caractéristiques microbiologiques des évènements nuageux prélevés entre Décembre 2010 et Mai 2013 au sommet du puy de Dôme ; b.d.l. : below detection limit, n.d. : not determined.*

N°	Date	Heure locale		Cellules totales (mL^{-1})		Cellules cultivables (mL^{-1})				(pmol L^{-1})		Origine	
				Bactéries	Champignons	Bactéries/Levures		Champignons		ATP	ADP		
						5°C	17°C	5°C	17°C				
42	08/12/2010	16:10	17:40	n.d.	n.d.	560	543	137	773	n.d.	n.d.	Océanique	SO
43	19/01/2011	9:30	13:05	9151	201	7	10	53	97	0.24	0.43	Continental	N
44	02/02/2011	9:25	11:25	5415	112	0	7	3	3	0.05	0.33	Océanique	O
45	24/02/2011	13:10	15:00	837	48	0	20	220	363	0.23	0.08	Océanique	O
46	28/03/2011	14:35	16:35	8021	45	110	216	240	663	1.15	0.45	Océanique	SO
47	31/03/2011	14:40	16:25	7954	64	243	320	97	737	1.11	0.16	Océanique	O
48	22/06/2011	15:15	18:34	n.d.	n.d.	780	727	540	367	2.42	2.92	Océanique	O
49	29/06/2011	8:30	13:45	n.d.	n.d.	317	911	168	564	1.58	3.72	Continental	NO
50	07/07/2011	15:50	17:00	n.d.	n.d.	933	1450	303	923	5.18	2.60	Continental	O
51	20/07/2011	9:30	11:10	12355	66	147	173	247	677	1.28	b.d.l.	Océanique	NO
52	07/11/2011	12:00	15:30	10825	600	23	20	63	83	0.62	b.d.l.	Océanique	SE
53	20/01/2012	13:45	16:00	17742	801	107	100	510	1037	1.03	0.18	Océanique	NO
54	23/01/2012	13:00	17:00	59954	820	50	73	468	990	2.29	0.27	Océanique	NO
55	19/03/2012	13:10	17:10	1648	171	163	140	133	433	0.49	0.06	Océanique	N
56	04/04/2012	8:10	11:20	14914	1318	300	170	n.d.	1617	5.62	1.43	Continental	NO
57	18/04/2012	10:10	14:15	3902	114	103	103	470	750	2.06	b.d.l.	Océanique	O
58	25/06/2012	15:34	19:00	4474	1085	540	543	540	850	2.07	5.89	Océanique	O
59	13/09/2012	9:50	11:50	5199	1960	193	217	240	363	0.64	0.03	Océanique	O
60	10/10/2012	8:45	10:40	19658	13565	547	710	547	710	1.55	0.74	Océanique	SO
61	28/11/2012	8:42	11:45	6504	128	43	57	43	57	1.71	b.d.l.	Anthropique	NE
63	29/01/2013	15:10	17:10	6335	541	50	97	327	357	0.60	0.26	Océanique	O
65	22/05/2013	9:40	12:55	11606	830	140	137	870	856	1.52	1.22	Océanique	N
66	29/05/2013	10:05	11:10	6644	157	157	133	n.d.	667	2.06	0.35	Océanique	NO

ceux ayant subi des influences continentales, hautement marine ou polluées représentent respectivement 23 %, 9 % et 7 % des prélèvements.

4.2.1. Concentration en cellules totales

Les résultats de la période 2004-13 concernant la concentration totale en bactéries et en champignons en fonction des saisons et des mois de prélèvement sont présentés sur la **Figure 26**. Sur cette période, la quantification des cellules totales a été réalisée sur 50 prélèvements individuels.

La concentration bactérienne dans les nuages prélevés au puy de Dôme varie entre 8,7 10^2 et 2,4 10^5 cellules par mL avec une moyenne de 4,1 10^4 cellules mL^{-1}. La concentration fongique est en moyenne plus faible d'un facteur ~50 et varie entre 45 et 2,5 10^4 cellules mL^{-1} (moyenne : 2,9 10^3 cellules mL^{-1}). Des concentrations semblables ont été retrouvées au Mont Rax (Autriche, *Bauer et al.*, 2002, 2003), au Mont Sonnblick (Autriche, *Sattler et al.*, 2001) et dans les nuages prélevés par avion au dessus des U.S.A. (*Kourtev et al.*, 2011) (**Tableau 2**).

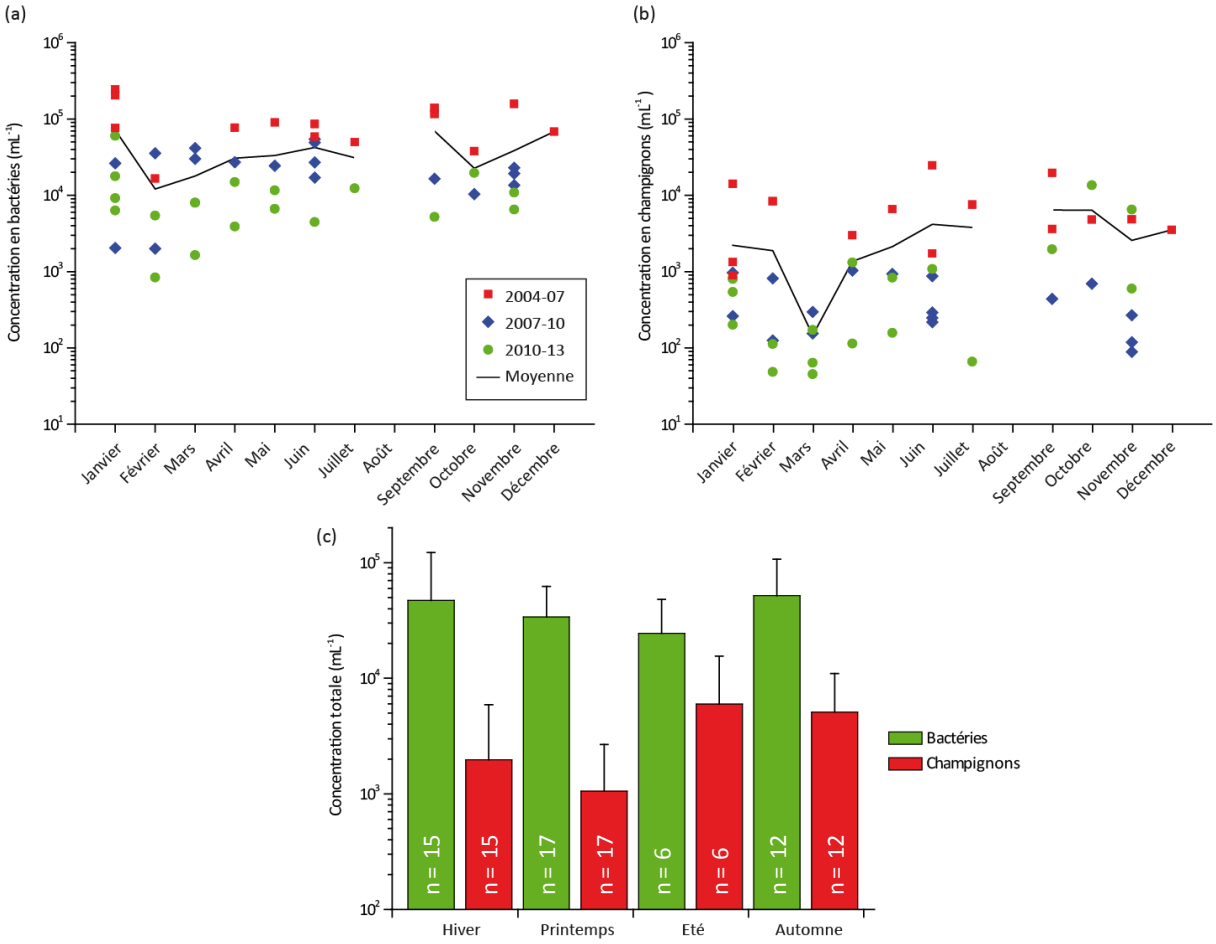


***Figure 26** : Variabilité mensuelle et saisonnière de la concentration **totale** en bactéries et en champignons dans l'eau de nuage prélevée au puy de Dôme. (a) et (b) Les périodes indiquées correspondent aux trois expérimentateurs différents. (c) Les barres d'erreurs représentent les écart-types et « n », le nombre d'évènements nuageux considérés.*

Trois expérimentateurs se sont succédés pour l'analyse de la composition microbiologique des nuages au puy de Dôme depuis 2004. Malgré des protocoles expérimentaux similaires, des différences significatives apparaissent dans les dénombrements totaux des microorganismes (test de Kruskal et Wallis, $p = 2,6\ 10^{-7}$ et $4,1\ 10^{-6}$ pour les bactéries et les champignons respectivement). En moyenne, $1,0\ 10^{5}$ bactéries mL^{-1} ont été dénombrées sur la première période (2004-07), $2,5\ 10^{4}$ bactéries mL^{-1} sur la deuxième (2007-10) et $1,1\ 10^{4}$ bactéries mL^{-1} sur la dernière période (2010-13). Il en est de même pour les champignons avec des moyennes de $7,5\ 10^{3}$; $6,4\ 10^{2}$ et $1,2\ 10^{3}$ champignons mL^{-1} de la période la plus ancienne à la plus récente.

Afin d'éliminer le biais entre les expérimentateurs, les données ont été normalisées en exprimant pour chaque mois et chaque saison le pourcentage de cellules comptées par rapport à la moyenne annuelle de chaque manipulateur (données non montrées). Aucune différence significative entre les saisons n'a pu être mise en évidence, ni de tendances entre les mois de l'année.

La méthode utilisée repose sur l'observation microscopique d'échantillons marqués grâce à un fluorochrome qui se fixe sur l'ADN, le DAPI. La précision des résultats par cette méthode fastidieuse dépend du nombre de champs observés ainsi que du nombre de microorganismes par champ. Il a été montré que l'erreur humaine est importante dans les comptages microscopiques puisque les coefficients de variation entre deux expérimentateurs peuvent fluctuer entre 5 et 30 % (*Kirchman et al.*, 1982; *Kepner et Pratt*, 1994). Pour cette raison, un nouveau protocole basé sur la cytométrie en flux est en cours de développement et permettra d'exclure la variabilité humaine des comptages.

Aucune différence significative dans les concentrations bactériennes et fongiques totales n'ont pu être mises en évidence entre les saisons comme déjà observé par *Vaïtilingom* (2011) sur 34 échantillons (test de Kruskal et Wallis, p-value = 0,48 et 0,19). En ce qui concerne la concentration mensuelle en bactéries dans les nuages, aucune tendance nette n'apparaît non plus (**Figure 26 a** et **b**). Cependant, on peut noter que la variabilité est importante au sein d'un même mois : elle atteint par exemple un facteur 40 lors du mois de Février (n = 5).

4.2.2. Concentration en cellules cultivables et souches isolées

Les concentrations en cellules microbiennes cultivables sur le milieu R2A sont présentées sur la **Figure 27**. En raison des similitudes entre les levures et les bactéries à l'échelle macroscopique, ces deux types cellulaires ont été dénombrés ensemble. Par conséquent, aucune conclusion concernant la proportion de cellules cultivables ne sera émise puisque selon les méthodes employées, les levures sont comptabilisées soit avec les bactéries, soit avec les champignons.

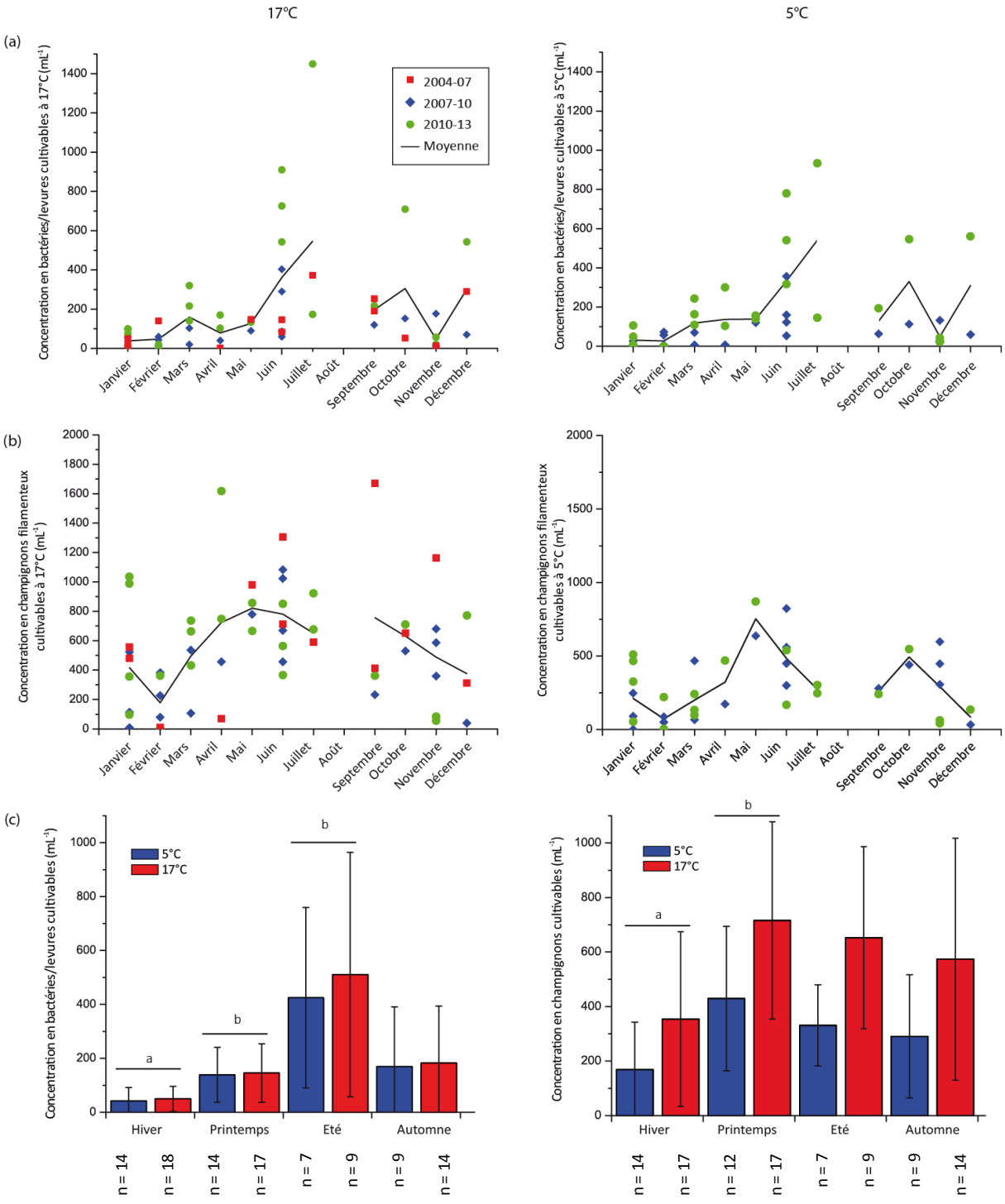


Figure 27 *: Variabilité mensuelle (a et b) et saisonnière (c) de la concentration en bactéries et levures et en champignons filamenteux* ***cultivables*** *dans l'eau de nuage prélevée au puy de Dôme à 5°C et 17°C (sauf pour les cultures entre 2004-07 qui ont été réalisées à 15°C). Les périodes indiquées correspondent aux trois expérimentateurs différents. (c) Les barres d'erreurs représentent les écart-types et « n », le nombre d'évènements nuageux considérés. Les lettres au-dessus des histogrammes correspondent à des différences significatives entre les saisons (p < 0,05).*

Sur l'ensemble des prélèvements réalisés, la concentration en bactéries et levures cultivables sur le milieu R2A à 17°C varie entre 0 et 1,5 10^3 UFC[7] mL^{-1} avec une moyenne de 1,8 10^2 UFC mL^{-1}. A 5°C, on recense entre 0 et 9,3 10^2 UFC mL^{-1} (moyenne : 1,6 10^2 UFC mL^{-1}). Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre ces deux températures suggérant que les températures d'incubation choisies n'ont pas d'effet sur le nombre de bactéries et levures recouvrées sur le milieu R2A (test de Mann et Whitney, p-value = 0,66). En revanche, elles jouent un rôle sur les temps de croissance puisque ~5 jours de croissances sont suffisants à 17°C pour que l'ensemble des colonies se développe sur le milieu R2A tandis que 30 à 45 jours sont nécessaires à 5°C.

En ce qui concerne les champignons filamenteux cultivables, leur concentration varie entre 0 et 8,7 10^2 UFC mL^{-1} à 5°C et entre 3 et 1,7 10^3 UFC mL^{-1} à 17°C. Les moyennes respectives à 5°C et à 17°C sont de 2,9 10^2 UFC mL^{-1} et de 5,6 10^2 UFC mL^{-1}. Lorsque les cellules sont incubées à 17°C, le nombre de champignons filamenteux recouvré est significativement plus élevé (test de Mann et Whitney, p-value = 1,8 10^{-4}) ce qui suggère que ces conditions sont plus favorables à leur croissance.

Au vu des concentrations en cellules totales et cultivables, il apparaît qu'une grande majorité des microorganismes retrouvés dans les nuages ne sont pas cultivables avec les protocoles employés. Il est généralement admis que la fraction cultivable des cellules est inférieure ou égale à 1 % dans l'environnement. Ceci est dû soit au stress des cellules, soit aux conditions de culture qui ne sont pas adaptées à leur croissance (température inadéquate, source de carbone inutilisable, absence de nutriments essentiels, *etc.*).

La concentration en microorganismes cultivables est dépendante de la saison : quelque soit le type cellulaire observé, la concentration en microorganismes cultivables est significativement plus faible en hiver qu'au printemps (test de Kruskal et Wallis, p-value < 0,05). De même, la concentration bactérienne est significativement plus élevée en été qu'en hiver. Ceci est également observable sur les **Figure 27a** et **b** qui montrent que les concentrations les plus faibles sont atteintes en Janvier, Février et Novembre pour les bactéries et levures et pour les mois de Février et Décembre pour les champignons filamenteux. En revanche, les concentrations maximales en bactéries et levures cultivables sont rencontrées lors des mois les plus chauds de l'année (Juin et Juillet). Il est possible que les conditions hivernales plus hostiles (faible température, gel et dégel des hydrométéores, *etc.*) limitent la survie des microorganismes. De plus, au printemps et en été, l'émission des microorganismes depuis la phyllosphère est augmentée. Même si l'abondance du couvert végétal en été et au printemps n'influe pas sur la concentration en cellules totales, il est possible que les microorganismes émis depuis ce milieu soient plus favorablement avantagés pour croître sur le milieu R2A. Ceci est confirmé par le pourcentage non négligeable de souches issues de la végétation et ayant été isolées depuis les nuages : parmi les souches isolées lors de la thèse de Mickaël

[7] UFC : Unité Formant une Colonie, unité de comptage en culture de microbiologie. On considère que chaque colonie s'étant développé sur le milieu de culture est originaire d'une seule cellule.

Vaïtilingom, environ 36 % des séquences ADN codant pour l'ARN 16S avaient au moins un des 3 plus proches voisins qui était issu de parties aériennes de plantes (hors racines).

Les cultures réalisées à partir des 23 nuages prélevés durant ma thèse ont permis d'isoler 234 nouvelles souches bactériennes qui ont été sélectionnées en fonction de leur phénotype (souches pigmentées, fluorescentes, productrices de surfactants, *etc.*). Parmi ces souches, 104 ont été identifiées par PCR (**Figure 28**). Elles appartiennent principalement aux genres *Pseudomonas* (30 % des souches identifiées) et *Sphingomonas* (27 % des souches identifiées), les deux genres majoritairement retrouvés dans les nuages (*Vaïtilingom et al.*, 2012).

Du fait de leur activité glaçogène et de leur production de sidérophores, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont au cœur de plusieurs thématiques de recherche dans notre équipe. Quant aux bactéries du genre *Sphingomonas*, il a pu être montré qu'une partie des représentants de ce genre identifiés dans les nuages appartient à un nouveau cluster jamais décrit auparavant (résultats non publiés). Il est donc possible que ce groupe rassemble des bactéries spécifiquement affiliées à l'atmosphère et par conséquent, étudier leurs caractéristiques permettrait de comprendre quels sont les pré-requis pour s'adapter à ce milieu.

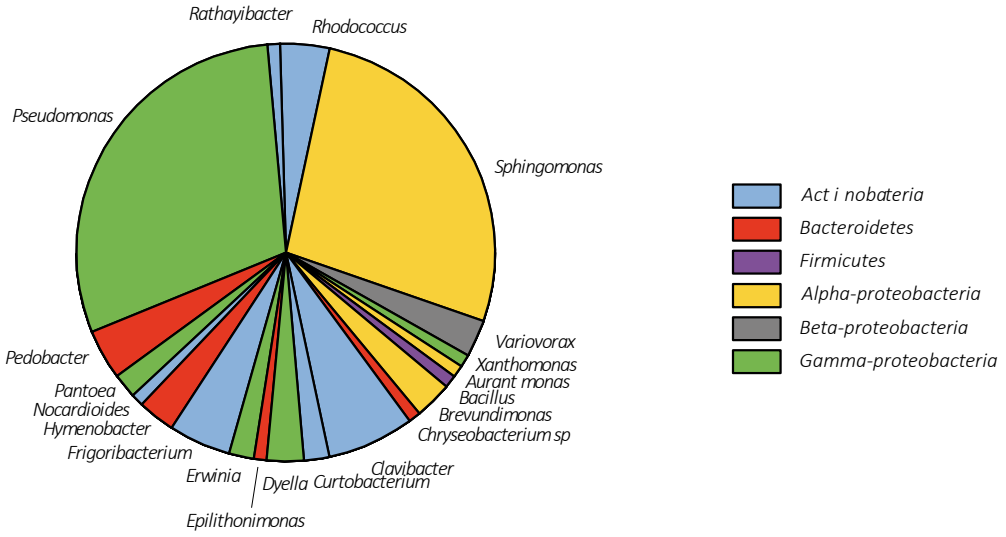
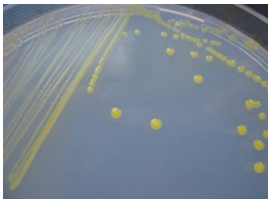


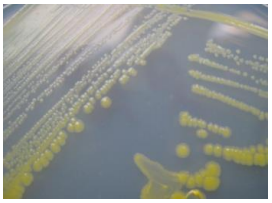
***Figure 28** : Répartition phylogénétique des souches identifiées dans l'eau de nuage durant la période 2010-13.*

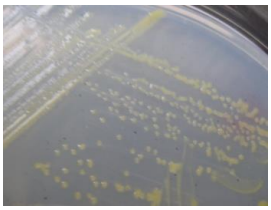
D'autre genres plus minoritaires ont également été isolés et identifiés : il s'agit par exemple de bactéries présentant une forte pigmentation (*e.g. Curtobacterium* spp., *Hymenobacter* spp. ou *Clavibacter* spp.), produisant des surfactants ou des EPS (*Rhodococcus* spp.) ou dont certaines souches sont connues pour avoir une activité glaçogène (*Xanthomonas* spp., *Erwinia* spp.). Des exemples de ces souches sont présentées **Figure 29**.

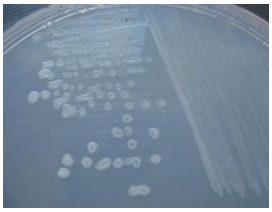
Pseudomonas sp. 59b-4

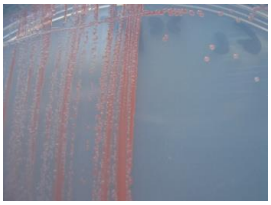
Sphingomonas sp. 63b-33


Clavibacter michiganensis 59b-30


Curtobacterium sp. 46b-8


Xanthomonas sp . 60b-10


Erwinia sp. 59b41


Hymenobacter sp. 58b-19

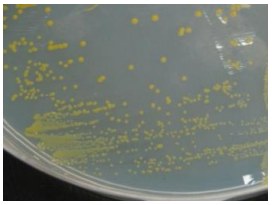

Rhodococcus sp. 54b-3

Figure 29 *: Exemple de souches appartenant aux principaux genres bactériens isolés d'eau de nuages entre 2010 et 2013. Ces photos ont été prises par Martine Sancelme ou Magali Abrantes.*

Comme les souches isolées ont été sélectionnées selon leur phénotype, il est impossible de conclure quant à l'influence de la saison ou des températures de cultures sur la diversité bactérienne.

4.2.3. Viabilité cellulaire

Plusieurs études ont montré que l'eau des nuages hébergeait une microflore métaboliquement active grâce à des colorations différentiant les cellules viables des cellules mortes ou par des mesures d'ATP, une molécule présente chez tous les organismes impliquée dans la production d'énergie cellulaire (Bauer et al., 2002; Amato et al., 2007b; Hill et al., 2007; Vaïtilingom et al., 2012).

Les concentrations d'ATP mesurées dans les nuages du puy de Dôme depuis 2004 sont rassemblées dans la **Figure 30**. En moyenne cette concentration est de 1,02 pmol mL^{-1} d'eau de nuage. Une corrélation positive avec la concentration en bactéries et en champignons cultivables a été identifiée (corrélation linéaire, p varie entre 0,01 et 3 10^{-7} selon le type de cellules et la température d'incubation). Cette corrélation explique le fait qu'en été, la concentration en ATP est significativement plus élevée qu'en hiver (test de Kruskal et Wallis, p-value = 0,009). Les concentrations minimales en ATP ont été mesurées pendant les mois de Février et Décembre, de même que les concentrations fongiques cultivables.

Depuis 2010, la concentration en ADP est également mesurée. Il s'agit d'un produit issu de l'utilisation de l'ATP qui renseigne sur l'état énergétique des cellules : des mesures sur des cultures bactériennes pures ont montré que chez les cellules en croissance, ce ratio est faible (proche de 0,25) tandis que pour les cellules mortes ce ratio tend vers des valeurs plus élevées (> 6) (*Koutny et al.*, 2006).

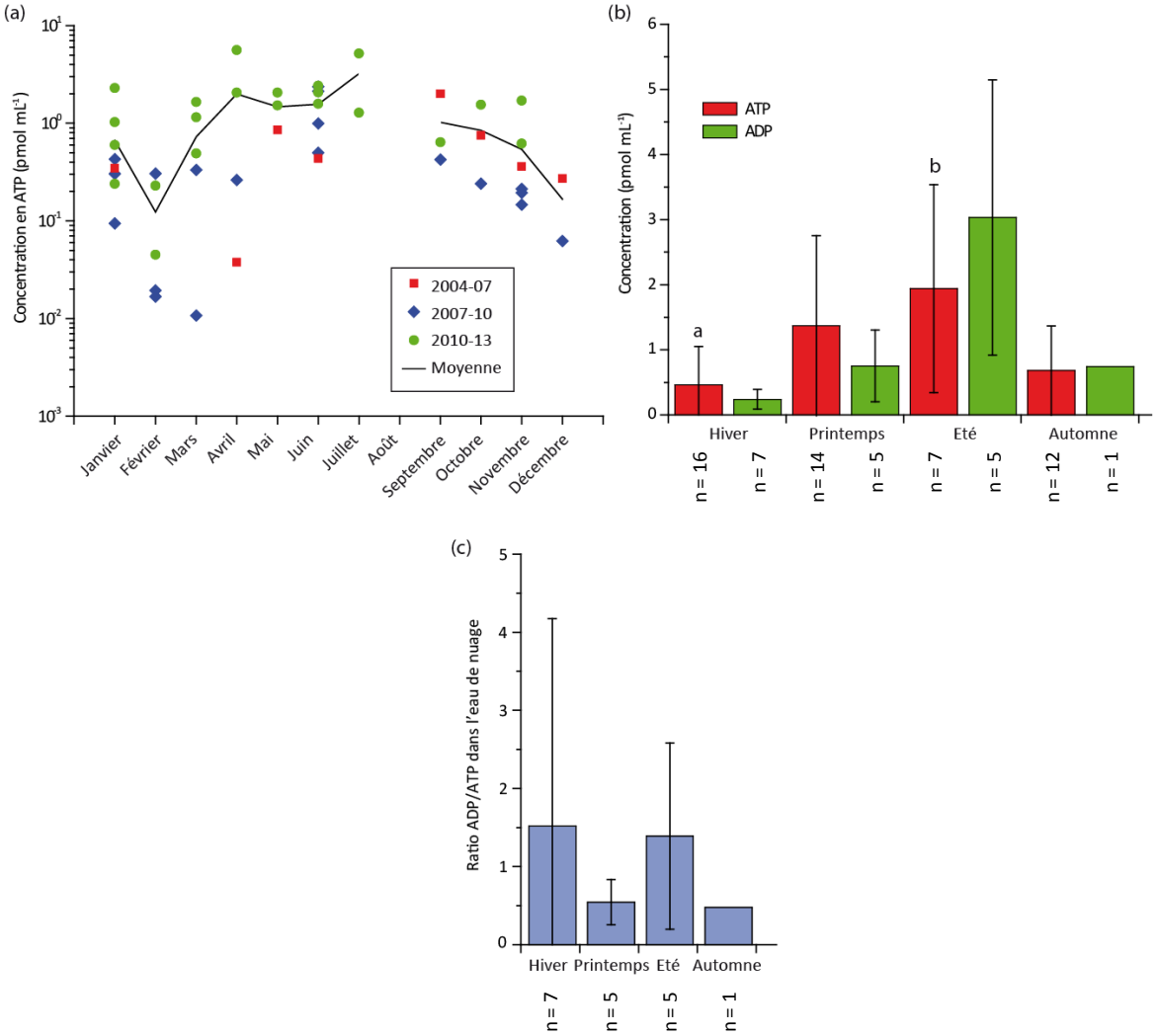


Figure 30 *: (a) Variabilité mensuelle de la concentration en ATP dans l'eau de nuage prélevée au puy de Dôme à 5°C et 17°C. Les périodes indiquées correspondent aux trois expérimentateurs différents. (b et c) Variabilité saisonnière de la concentration en ATP et ADP et de leur ratio sur l'ensemble des prélèvements. Les barres d'erreurs représentent les écart-types et « n », le nombre d'évènements nuageux considérés. Les lettres au-dessus des histogrammes correspondent à des différences significatives entre les saisons (p < 0,05).*

En moyenne, le rapport ADP/ATP dans les nuages est de 1,10 ± 1,77 ce qui suggère qu'une très grande partie des cellules est capable de se diviser. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence en fonction des saisons (test de Kruskal et Wallis, p-value = 0,52) et aucune corrélation n'a pu être identifiée avec les autres paramètres biologiques étudiés (concentration en cellules totales ou cultivables). Toutefois, il convient de noter que pour l'un des évènements nuageux hivernaux (le n°44, **Tableau 3**), le ratio ADP/ATP atteint son maximum avec une valeur de 7,33. A l'occasion de ce prélèvement, les concentrations en microorganismes cultivables étaient les plus faibles : seuls 3 champignons mL^{-1} et 7 bactéries mL^{-1} ont été recensés à 17°C.

5. Corrélations entre les propriétés physico-chimiques et microbiologiques

5.1. Introduction

Dans les précédentes études microbiologiques des nuages, l'influence de l'origine de la masse d'air sur les paramètres microbiologiques est apparue incertaine. *Amato et al.* (2007b) ont souligné une corrélation positive entre la concentration en microorganismes et la concentration en Na^+ et ont suggéré que les océans, en particulier l'océan Atlantique dans ce cas, serait une source importante de microorganismes. A l'inverse, la corrélation négative entre l'acidité du pH et la concentration en bactéries suppose que l'activité anthropique limiterait le contenu microbien des nuages. Plus récemment, *Vaïtilingom et al.* (2012) ont continué ce travail en prélevant de nouveaux nuages. Cette étude n'a pas permis de confirmer les premières constatations d'*Amato et al.* (2007b). A l'inverse, ils ont montré que dans les prélèvements de nuages issus de masses d'air d'origine marine, les concentrations bactériennes tendaient à être plus faibles que dans ceux issus de masses d'air polluées.

Dans cette partie, une analyse statistique a été réalisée sur l'ensemble des résultats microbiologiques depuis 2004 en incluant les principaux paramètres physico-chimiques décrits par *Deguillaume et al.* (2013) (pH, Na^+, Cl^-, NO_3^-, NH_4^+, SO_4^{2-}) ainsi que d'autres paramètres généralement moins variables entre les différentes origines de masse d'air (autres ions, conductivité, H_2O_2, formaldéhyde).

5.2. Paramètres microbiologiques et influence de l'origine de la masse d'air

Les moyennes des paramètres microbiologiques décrits auparavant (concentration en microorganismes totaux et cultivables, concentration en ATP) sont présentées en fonction de l'origine de la masse d'air sur la **Figure 31**.

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre ces paramètres et l'origine des masses d'air (test de Kruskal et Wallis, p-value varie de 0,06 à 1) à l'exception d'une concentration significativement supérieure en champignons cultivables à 17°C lorsque les masses d'air ont subi une influence marine en comparaison avec les masses d'air polluées (p-value = 0,02). Ceci peut être lié à un effet de source (émission plus modérée dans les zones anthropiques). Cependant, comme l'origine de la masse d'air n'a pas d'impact significatif sur les concentrations totales en microorganismes, il est plus vraisemblable que la cause soit liée à des conditions davantage favorables à la survie des cellules dans les nuages marins (pH peu acides, *etc*.).

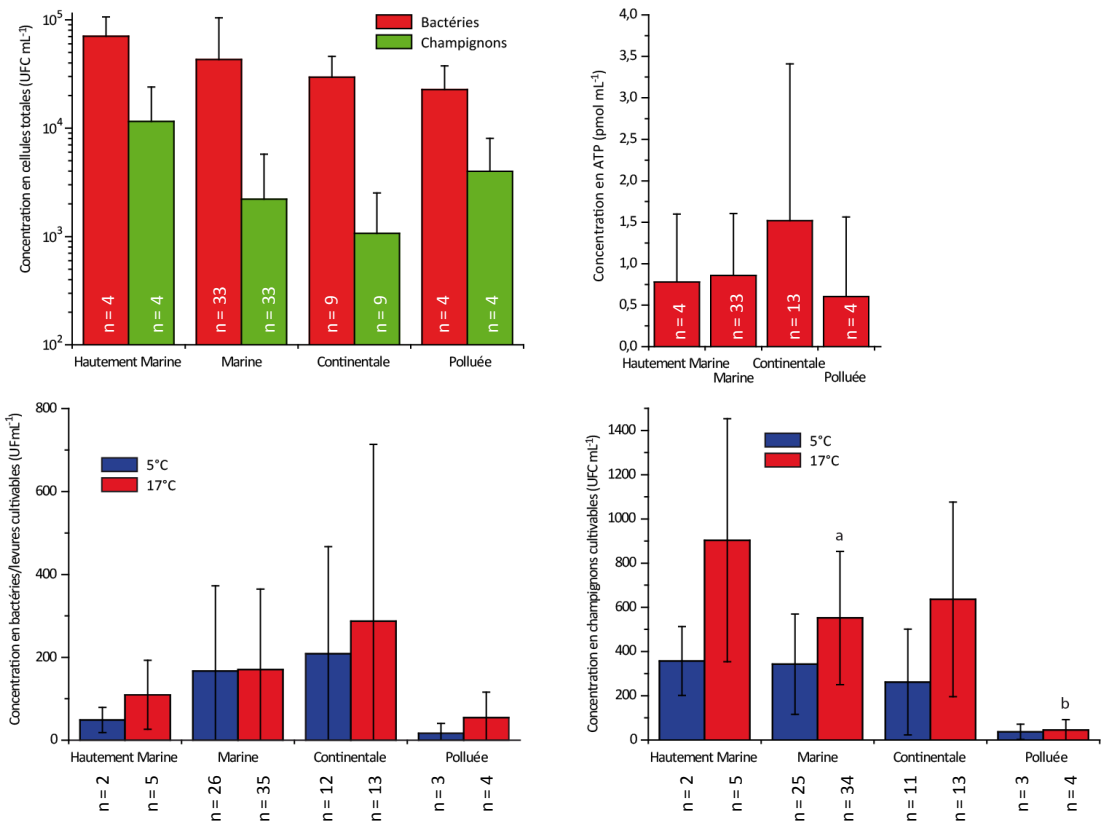


Figure 31 *: Variabilité des paramètres biologiques mesurés dans l'eau de nuage prélevée au puy de Dôme en fonction de l'origine de la masse d'air. Les barres d'erreurs représentent les écart-types et « n », le nombre d'évènements nuageux considérés pour chaque origine de masse d'air. Les lettres au-dessus des histogrammes correspondent à des différences significatives entre les saisons (p < 0,05).*

Même si l'influence de la masse d'air n'a que peu d'impact sur les microorganismes, à une échelle plus fine, certains paramètres physico-chimiques des nuages peuvent toutefois agir sur la composition microbienne des nuages. En effet, comme décrit précédemment dans les travaux de *Deguillaume et al.* (2013), de l'origine de la masse d'air dépendent un grand de nombre de paramètres physico-chimiques. Ces paramètres considérés individuellement peuvent avoir des effets antagonistes et ainsi cacher de réels impacts à une échelle plus large. Dans la partie suivante, les corrélations entre chacun des paramètres physico-chimiques et les paramètres microbiologiques ont été étudiés.

5.3. Paramètres microbiologiques et influence des paramètres physico-chimiques

Le **Tableau 4** récapitule les valeurs des coefficients de corrélation R entre les paramètres microbiologiques et physico-chimiques mesurés dans les nuages. Pour chaque valeur de R, la probabilité que la corrélation soit statistiquement pertinente a été calculée (p-value < 0,05).

***Tableau 4** : Coefficients de corrélation linéaire (R) entre les paramètres biologiques et physico-chimiques des nuages prélevés au puy de Dôme. Les corrélations significatives sont indiquées par les valeurs colorées en vert (p-value < 0,05) et prennent en compte le nombre d'évènements considérés.*

	Concentration en bactéries totales	Concentration en champignons totaux	Concentration en bactéries/levures cultivables à 5°C	Concentration en bactéries/levures cultivables à 17°C	Concentration en champignons cultivables à 5°C	Concentration en champignons cultivables à 17°C	Concentration en ATP	Ratio [ADP]/[ATP]
pH	0,18	0,06	0,22	0,21	0,05	0,21	0,11	0,11
Conductivité	-0,06	0,23	-0,21	-0,10	-0,29	-0,21	-0,13	0,06
Potentiel Redox	0,28	0,26	0,26	0,06	-0,14	0,14	-0,10	-0,59
Na^+	**0,36**	**0,46**	-0,09	0,00	-0,17	0,24	0,08	-0,03
Cl^-	0,21	0,26	-0,30	-0,19	-0,23	-0,07	-0,21	-0,03
NO_3^-	0,02	0,05	-0,21	-0,13	**-0,33**	**-0,28**	-0,10	0,28
SO_4^{2-}	0,15	0,19	-0,10	-0,01	-0,18	-0,11	0,02	0,05
NH_4^+	0,03	-0,03	0,31	**0,30**	-0,24	0,23	**0,59**	-0,20
K^+	-0,14	-0,02	-0,13	-0,06	**-0,42**	**-0,34**	-0,06	0,13
Mg^{2+}	0,11	0,22	0,16	0,19	-0,09	0,16	0,27	-0,29
Ca^{2+}	-0,10	-0,10	-0,01	0,09	**-0,40**	**-0,32**	-0,04	**0,52**
Acétate	-0,09	-0,08	**0,38**	**0,42**	-0,24	-0,02	**0,42**	-0,18
Formiate	0,04	0,10	**0,72**	**0,76**	0,14	**0,41**	**0,74**	-0,14
Oxalate	-0,07	-0,14	**0,32**	**0,37**	0,13	**0,28**	**0,55**	-0,28
Succinate	0,03	-0,01	**0,47**	**0,36**	0,27	**0,35**	**0,69**	-0,09
Malonate	-0,05	-0,03	0,41	0,27	**0,53**	0,35	**0,64**	-0,36
Fer total	-0,30	-0,06	-0,38	-0,15	-0,24	-0,33	-0,20	-0,49
H_2O_2	-0,03	0,02	**0,56**	**0,54**	**0,48**	**0,43**	**0,51**	-0,01
Formaldéhyde	-0,06	-0,06	-0,08	-0,04	0,12	-0,01	-0,08	0,04

Seule la concentration en Na^+ est significativement corrélée avec la concentration en cellules totales (R = 0,36 et 0,46) comme observé par *Amato et al.* (2007b). Ceci suggère que les sources atmosphériques de Na^+, principalement les océans, sont le siège d'une importante émission de microorganismes. La **Figure 31** montre également que, bien qu'il n'existe pas de différences significatives entre les différentes origines des masses d'air, la concentration en microorganismes tend à être la plus importante dans les nuages provenant des régions océaniques. L'étude d'*Amato et al.* (2007b) (14 évènements nuageux) soulignait également une corrélation négative entre l'acidité du pH et le nombre de bactéries totales qui n'est toutefois pas observée lorsque l'ensemble des prélèvements du puy de Dôme sont pris en compte (57 évènements nuageux).

Globalement, les concentrations en microorganismes cultivables sont positivement corrélées avec les concentrations en acides carboxyliques (acétate, formiate, oxalate, succinate et malonate ; **Tableau 4**). Ces composés représentent une source de carbone utilisable par les microorganismes comme l'ont montré les études dans des milieux simples ou artificiels de *Herlihy et al.* (1987), *Ariya*

et al. (2002), *Amato et al.* (2005, 2007a), *Côté et al.* (2008) et *Vaïtilingom et al.* (2010, 2011). Récemment, *Vaïtilingom et al.* (2013) ont même observé une biodégradation des acides carboxyliques présents dans l'eau de nuage par la microflore endogène. L'ammonium, dont la concentration est corrélée avec le contenu en bactéries cultivables, est une source d'azote facilement assimilable par une grande variété de bactéries. On peut supposer que, dans les nuages, les microorganismes peuvent utiliser ces composés pour se diviser ou pour leur métabolisme. Ceci est corroboré par la corrélation positive qui existe entre la concentration en ATP et ces composés.

Il est également intéressant de noter que des espèces chimiques telles que le formaldéhyde sont généralement considérées comme toxiques pour la plupart des microorganismes. Cependant, aucune corrélation n'apparaît entre la concentration en formaldéhyde et les différents paramètres microbiologiques. Ceci suppose que soit les concentrations rencontrées dans les nuages sont insuffisantes pour mettre en danger les cellules, soit les microorganismes présents sont particulièrement bien adaptés à ce composé chimique. Plusieurs souches appartenant à des genres méthylotrophes (obligatoires ou facultatifs) ont été isolées de nuages ou de grêlons et certaines se sont même avérées capables d'utiliser le formaldéhyde en tant que substrat pour leur métabolisme (bactéries des genres *Methylobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, par exemple) (*Amato et al.*, 2007a; *Husárová et al.*, 2011; *Šantl-Temkiv et al.*, 2013). Récemment, *Šantl-Temkiv et al.* (2012) et *DeLeon-Rodriguez et al.* (2013) ont montré par une approche moléculaire qu'une large fraction des bactéries dans les nuages est apparentée à des groupes méthylotrophes. Il est donc probable que la proportion de bactéries dans les nuages pouvant utiliser les composés à un atome de carbone comme le formaldéhyde soit fortement sous-estimée.

En ce qui concerne le peroxyde d'hydrogène, il existe une corrélation entre sa concentration et le nombre de microorganismes recouvrés par culture (R = 0,43 à 0,56). Contrairement à ce qu'on pourrait croire, cette corrélation est positive, *i.e.* des fortes concentrations en H_2O_2 sont corrélées avec de fortes concentrations en cellules cultivables. Il est cependant impossible de savoir si le peroxyde d'hydrogène est la cause ou la conséquence de cette augmentation de population. Par exemple, les enzymes superoxyde dismutases produites par les microorganismes, sont responsables de la transformation d'oxydants hautement réactifs en H_2O_2 et pourraient ainsi contribuer à augmenter sa concentration. Inversement, il a été montré qu'à faibles doses (telles que celles rencontrées dans les nuages), le peroxyde d'hydrogène permet d'activer l'expression de voies métaboliques destinées à protéger les cellules contre les stress (*Storz et al.*, 1990). De cette façon, les cellules augmenteraient leurs chances de survie face aux conditions des nuages.

Certaines corrélations restent cependant inexpliquées : la concentration en champignons cultivables est négativement impactée par les ions NO_3^- et Ca^{2+}, des marqueurs respectifs du degré de pollution anthropique et de l'origine continentale des nuages, et par les ions K^+, un composé plus ubiquiste. Cet impact négatif pourrait être le résultat d'une toxicité envers les champignons. Cependant, les concentrations reportées dans les nuages sont du même ordre de grandeur voire

inférieures que les concentrations qui peuvent être rencontrées dans les eaux douces ou dans l'eau de mer (*Barnes*, 1954; *Livingstone*, 1963). Il est possible également qu'il s'agisse non pas d'un effet direct de ces composés mais plutôt de l'impact d'un paramètre relié étroitement avec ces ions.

6. Conclusion

Les compositions chimiques et microbiologiques de 73 et 57 nuages respectivement ont été analysées entre 2001 et 2013. A ce jour et à ma connaissance, il s'agit de la plus grande base de données étudiant à la fois les propriétés physico-chimiques et celles microbiologiques de l'eau des nuages.

Dans un premier temps, les interactions entre les paramètres physico-chimiques et l'origine géographique des masses d'air ont été analysées. Quatre clusters différents ont été discriminés par une analyse en composantes principales et correspondent à des influences caractérisées comme hautement marine, marine, continentale ou polluée. Chacun de ces groupes possède une composition chimique qui lui est propre : les masses d'air ayant survolé pendant de longues périodes les zones océaniques (« nuages hautement marins ») présentent de fortes concentrations en Na^+ et Cl^- et un pH élevé, les masses d'air originaires de l'océan mais y ayant séjourné pendant de plus courtes périodes (« nuages marins ») ont de faibles concentrations en espèces ioniques et un pH élevé, les nuages ayant survolé les terres (« nuages continentaux ») ou ayant subi l'influence des activités anthropiques (« nuages pollués ») se différencient par des concentrations croissantes en NO_3^-, SO_4^{2-} et NH_4^+ et des valeurs décroissantes de pH. D'autres paramètres mesurés se sont avérés statistiquement différents entre ces groupes comme, par exemple, la conductivité et le contenu ionique total (qui sont directement dépendant de la concentration en ions Na^+, Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-} et NH_4^+), le potentiel rédox et le contenu en carbone organique total. La proportion relative de chacune des espèces ioniques et des composés carbonylés mesurés sont également caractéristiques des différents groupes attestant d'un effet de l'historique géographique de la masse d'air et non uniquement d'un phénomène de concentration ou de dilution des composés chimiques dans les gouttelettes de nuages.

Les valeurs de l'ensemble des paramètres mesurés pour chacun des groupes ont été rassemblées dans le but de décrire des compositions « typiques » de ces nuages. Ces données pourront désormais servir à créer des scénarios chimiques idéalisés, utilisés dans des modèles numériques simulant les processus multiphasiques physiques et/ou chimiques de l'atmosphère.

En parallèle, l'étude de la composition microbiologique des nuages sur le long terme a permis de quantifier la concentration en microorganismes totaux et cultivables sur le milieu de culture R2A. Environ $4{,}1\ 10^4$ bactéries et $2{,}9\ 10^3$ champignons sont présents dans l'eau des nuages. Les cellules cultivables se sont avérées moins nombreuses d'un facteur 10 pour les champignons d'un facteur

~100 pour les bactéries. Les concentrations en microorganismes totaux sont indépendantes de la saison pendant laquelle les prélèvements ont été réalisés ce qui témoigne que, quelle que soit la saison, le nombre de microorganismes émis reste le même. En revanche, la concentration en microorganismes cultivables est significativement variable en fonction des saisons ce qui suggère que selon la période de l'année, soit les conditions atmosphériques peuvent devenir plus ou moins favorables à la survie des microorganismes, soit la diversité microbienne change au cours de l'année et est plus ou moins capable de se développer sur le milieu utilisé. Enfin, les mesures d'ATP et d'ADP ont confirmé qu'une grande majorité des cellules microbiennes étaient métaboliquement actives.

Une dernière partie du travail de monitoring s'est focalisé sur les corrélations entre les compositions chimique et microbiologique. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les paramètres microbiologiques et l'influence subie par la masse d'air. Cependant, certains paramètres utilisés pour catégoriser les masses d'air agissent sur les caractéristiques microbiologiques. Seul le Na^+ a une influence significative sur le contenu microbien des nuages. Ceci témoigne de l'importance des milieux océaniques dans l'émission des microorganismes retrouvés dans les nuages au puy de Dôme. La concentration en microorganismes cultivables est fortement liée à la présence d'acides carboxyliques et de NH_4^+, des composés que les cellules peuvent assimiler pour maintenir leur métabolisme et donc, leur survie. En revanche, certaines corrélations demeurent inexpliquées et nécessitent des études supplémentaires dans le futur.

En résumé, la base de données présentée dans ce travail est, à ce jour, la plus large concernant à la fois les compositions chimique et microbiologique des nuages. Bien que conséquent, ce jeu de données ne permet pas d'accéder à toutes les zones d'ombres de la complexité nuageuse. Par exemple, à ce jour, moins de 10 % des composés carbonés ont été identifiés dans l'eau des nuages. De même, la biodiversité microbienne demeure relativement peu décrite. Il est donc encore essentiel de poursuivre ces études en diversifiant les analyses chimiques et microbiologiques.

Chapitre III : Résistance des microorganismes face aux facteurs de stress dans les nuages

1. Introduction

Récemment, *DeLeon-Rodriguez et al.* (2013) ont établi le fait que la richesse microbienne de la troposphère est plus faible que celle de la plupart des autres écosystèmes, ce qui suggère que la vie dans l'atmosphère est fortement gouvernée par les conditions environnementales. En effet, à partir du moment où les microorganismes sont aérosolisés, ils doivent faire face à de nombreux stress infligés par les facteurs météorologiques et les composés chimiques atmosphériques (**Figure 4**). Dans l'atmosphère sèche, les cellules microbiennes doivent lutter contre les rayonnements solaires, la faible teneur en nutriments, les basses températures, la dessiccation et la présence d'oxydants (radicaux hydroxyle, peroxyde d'hydrogène, *etc.*). En plus de ces stress, les microorganismes présents dans les nuages sont exposés à des variations osmotiques lorsque des cycles d'évaporation-condensation, à des composés toxiques et à des pH acides (*Hill et al.*, 2007; *Deguillaume et al.*, 2013).

Malgré ces conditions difficiles, les mesures d'adénosine tri-phosphate (ATP) et les colorations permettant de discriminer les cellules actives des cellules mortes ont montré qu'une large fraction des microorganismes présents dans les nuages est métaboliquement active (*Bauer et al.*, 2002; *Amato et al.*, 2007b; *Hill et al.*, 2007; *Vaïtilingom et al.*, 2013). Ceci suggère que les microorganismes possèdent des mécanismes de protection suffisants pour maintenir leur viabilité en dépit des conditions atmosphériques.

L'étude de la composition microbiologique des nuages a révélé la présence de genres microbiens récurrents parmi la microflore cultivable des nuages : les bactéries des genres *Pseudomonas* et *Sphingomonas* sont présentes dans 58 et 46% des prélèvements de nuages effectués au puy de Dôme respectivement et la microflore des levures est dominée par les genres *Dioszegia*, *Undeniomyces* et *Cryptococcus* (71, 65 et 47 % des prélèvements respectivement (*Vaïtilingom et al.*, 2012). La prédominance de ces groupes suggère qu'ils pourraient être particulièrement adaptés à la globalité des stress de cet environnement.

Il est intéressant de noter que l'analyse phylogénétique de gènes de ménage des bactéries appartenant à l'espèce *Pseudomonas syringae* présentes dans les nuages a mis en évidence l'absence de clades communément retrouvés dans l'environnement au profit de groupes plus rares (*Joly et al.*, 2013b). Cette répartition atypique peut être le reflet d'une biogéographie particulière autour de la zone de prélèvement (*Womack et al.*, 2010) mais peut également être la conséquence d'un processus de sélection lors de leur transport dans l'atmosphère et dans les nuages. Ceci implique que les souches recouvrées par culture seraient plus à même de résister au milieu atmosphérique.

Ce chapitre de la thèse s'est focalisé à suivre les taux de survie de cinq microorganismes isolés d'eau de nuage face à quatre stress majeurs rencontrés dans l'atmosphère : la lumière solaire, la présence de peroxyde d'hydrogène, les variations osmotiques et les cycles de gel et de dégel.

La lumière solaire peut agir sur la viabilité des microorganismes directement *via* la formation de mutations dans les molécules d'ADN, ou indirectement en créant des radicaux libres ($^{\bullet}OH$, $O_2^{\bullet-}$). Ces oxydants, en plus de ceux présents naturellement dans l'eau de nuage (*e.g.* H_2O_2, $^{\bullet}OH$), sont connus pour compromettre les chances de survie des cellules en interagissant avec de nombreuses biomolécules (ADN, lipides, protéines). D'autre part, il convient de garder en mémoire que les nuages sont des systèmes dynamiques à l'intérieur desquels l'eau change d'état en fonction des conditions thermodynamiques rencontrées (vapeur d'eau, gouttelette liquide ou cristal de glace). De ce fait, les microorganismes présents dans les nuages sont fréquemment soumis à des variations de concentration osmotique du milieu environnant lors de la condensation ou l'évaporation de l'eau. Ceci se traduit par des flux d'eau membranaires entrants (lors de la dilution du milieu extérieur par condensation ou choc hypo-osmotique) ou sortants (lors de la concentration du milieu extérieur par évaporation ou choc hyper-osmotique). Ainsi, un choc hyper-osmotique a pour conséquences de concentrer les solutés intracellulaires et de réduire la disponibilité en eau de la cellule, comme lors de phénomènes de dessiccation. Par ailleurs, les transitions de l'eau entre son état liquide et son état solide peuvent impacter les cellules par différentes actions : en effet, la formation de glace au niveau extra- et intracellulaire peut, d'une part, produire des stress collatéraux *via* la formation de radicaux libres et la concentration des solutés de l'eau des nuages dans des veines liquides et d'autre part, elle peut être à l'origine d'éclatements ou de compressions cellulaires.

Le but de ce travail a été de comprendre quels sont les facteurs les plus limitants pour la survie des microorganismes dans les nuages. Les cinq souches microbiennes d'étude ont été sélectionnées en raison d'une forte représentation de leur genre parmi la communauté cultivable des nuages ainsi que pour assurer une diversité microbienne.

2. Matériel et Méthodes

2.1.Souches utilisées

En raison d'expérimentations dont la durée est relativement longue, cinq souches microbiennes modèles ont été sélectionnées pour cette étude d'une part, afin de disposer d'une grande diversité des caractéristiques de la banque de souches microbiennes isolées de l'eau des nuages au puy de Dôme (bactéries, levures, cellules pigmentées ou non, *etc*.) et d'autre part, afin de représenter les genres microbiens majoritairement rencontrés dans l'eau de nuage (des cellules appartenant aux genres *Dioszegia, Pseudomonas*, *Sphingomonas* et *Arthrobacter* ont été isolées dans 71 ; 58 ; 46 et 12 % des prélèvements nuageux au puy de Dôme). Ces cinq souches sont présentées dans le **Tableau 5**.

***Tableau 5** : Récapitulatif des souches microbiennes de l'étude et de leurs caractéristiques.*

# souche	Espèce	Numéro d'accession GenBank	Type microbien	Coloration de Gram	Pigmentation	Activité glaçogène (Température max)
5b-11	*Arthrobacter* sp.	DQ512758	Bactérie	Positive	Jaune	Non
13b-2	*Pseudomonas syringae*	DQ512785	Bactérie	Négative	Sans	Oui (-5°C)
24b-2	*Dioszegia hungarica*	JF706549	Levure	-	Rose-Orange	Non
32b-11	*Sphingomonas* sp.	HQ256831	Bactérie	Négative	Orange	Non
32b-74	*Pseudomonas syringae*	HQ256872	Bactérie	Négative	Sans	Oui (-3°C)

Pour cette étude, les souches ont été cultivées dans du milieu R2A liquide (*Reasoner et Geldreich*, 1985) à 17°C. Les cellules en phase exponentielle de croissance ont été centrifugées pendant 3 min à 12000 x g et rincées 3 fois dans le milieu d'incubation respectif à chaque stress.

2.2.Exposition à l'oxydant H_2O_2

La concentration en cellules a été ajustée à 10^6 cellules mL^{-1} dans du milieu nuageux artificiel continental décrit par *Vaïtilingom et al.* (2011). La composition de ce milieu est décrite dans le **Tableau 6**. La concentration en peroxyde d'hydrogène a été ajustée à 0 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 mM dans un volume final de 5mL (peroxyde d'hydrogène 30%, Fluka). Les taux de survie ont été calculés en mesurant la concentration de cellules se développant sur un milieu R2A avant l'ajout d'H_2O_2 et après 90 min en présence de cet oxydant.

***Tableau 6** : Composition du milieu nuageux artificiel continental décrit par* Vaïtilingom et al. *(2011).*

	Concentration (µM)
Acétate	20
Formiate	15
Succinate	1,5
Oxalate	3
Cl^-	250
NO_3^-	200
SO_4^{2-}	50
Na^+	250
NH_4^+	200
K^+	10
Mg^{2+}	10
Ca^{2+}	40
pH	4,7-5,2

2.3. Exposition à la lumière solaire

Pour ces expériences, la concentration en cellules a été ajustée à 10^6 cellules mL^{-1} dans le milieu nuageux artificiel continental décrit auparavant et 30 mL de cette suspension ont été placés dans un erlenmeyer opaque à la lumière ou dans un photo-bioréacteur décrit par *Vaïtilingom et al.* (2013). Ces réacteurs ont été conçus afin d'une part de permettre à la lumière solaire de traverser les matériaux sur le trajet optique et d'autre part de permettre la croissance des microorganismes dans un milieu stérile et aéré.

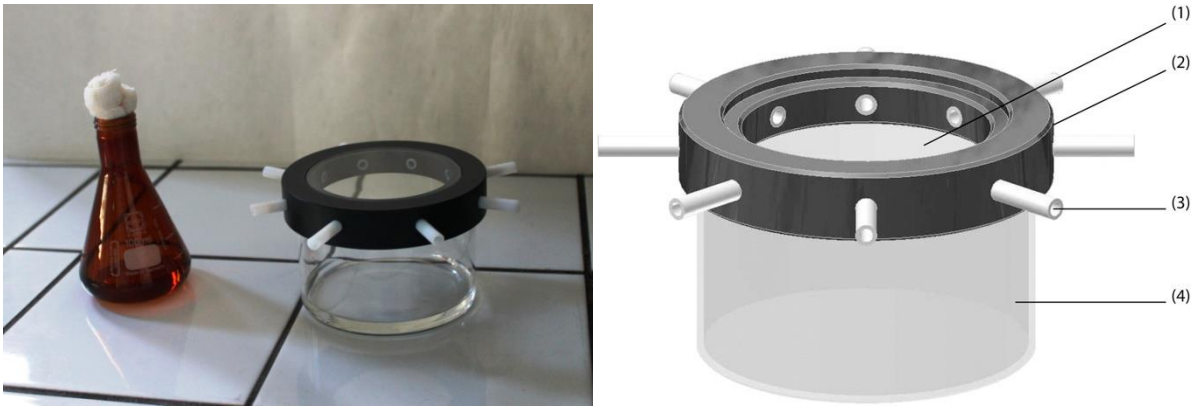


Figure 32 *: Photo-bioréacteur utilisés pour l'incubation des microorganismes sous la lumière solaire ; (1) filtre en pyrex, (2) couvercle en nylon, (3) tubes de téflon avec à l'intérieur du coton stérile afin de permettre le passage de l'air dans le réacteur et d'éviter la condensation, (4) cristallisoir en pyrex (*Vaïtilingom et al.*, 2013).*

Les cellules ont ensuite été agitées sous une lampe à émission solaire (Repti Glo 5.0, EXOTERRA®) à 5°C pendant 10 heures. Le spectre de la lampe ainsi que le spectre solaire mesuré au sein d'un nuage au sommet du puy de Dôme sont présentés sur la **Figure 33**.

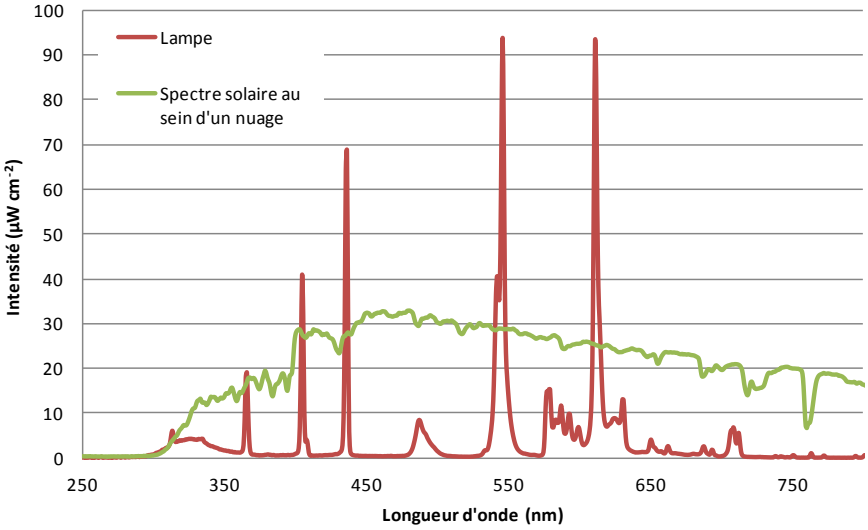


Figure 33 *: Spectre lumineux émis par la lampe utilisée dans cette étude. Le spectre solaire reçu au sein d'un nuage au sommet du puy de Dôme a été rajouté pour comparaison (spectre mesuré le 16 Octobre 2013 à ~15 :00).*

2.4.Chocs osmotiques

Les cultures cellulaires ont été centrifugées à 12000 x g pendant 3 min puis les culots ont été repris et lavés 3 fois dans une solution de NaCl à 0,1 M. Les concentrations cellulaires et de NaCl ont été ajustées afin d'obtenir des suspensions de 10^6 cellules mL^{-1} dans respectivement 0,1 ; 0,5 ; 1 et 2,5 M de NaCl (choc hyper-osmotique). Les suspensions ont été incubées à 5°C pendant 30 minutes, puis, les concentrations en NaCl ont été ajustées par dilution avec de l'eau déminéralisée à 0,1 M pour encore 30 minutes (choc hypo-osmotique). Les changements de concentration en NaCl représentés sur la **Figure 34**.

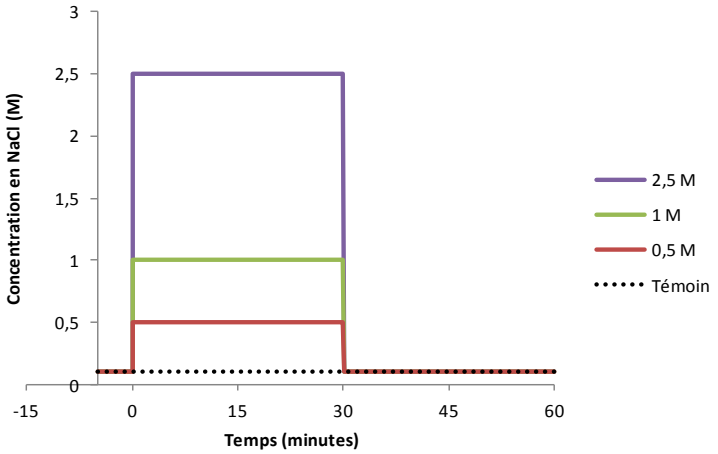


***Figure 34** : Variations de la concentration en NaCl pour chacun des chocs osmotiques réalisés.*

Afin de déterminer les pourcentages de survie, les suspensions cellulaires ont été étalées sur milieu R2A gélosé avant le choc hyper-osmotique et après le choc hypo-osmotique.

2.5.Cycles de gel et dégel

La concentration cellulaire a été ajustée à 10^4, 10^6 et 10^8 cellules mL^{-1} dans de l'eau déminéralisée et 150 µL de suspension cellulaire ont été placées dans des microtubes pour PCR (Polymerase Chain Reaction) conçus pour une grande conductivité thermique. Ces tubes ont été incubées pendant 15 min à 5°C puis ils ont été soumis à 6 cycles de gel et de dégel composé de 12 min dans un congélateur à -40°C et de 48 min à 5°C. Les variations de températures ont été suivies par un enregistreur de température (EBRO® EBI 20-TE1) et sont présentées sur la **Figure 35**. Ainsi, après 12 minutes passées à -40°C, les cellules se retrouvent à une température inférieure à -30°C. Une fois dans l'incubateur à 5°C, environ 15 minutes sont nécessaires pour que la suspension cellulaire atteigne la température ambiante.

En parallèle, 150 µL ont été maintenus à 5°C pendant tout le long de l'expérience (témoin).

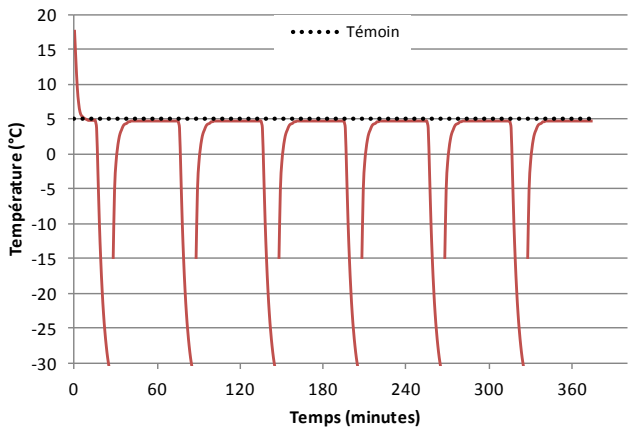


Figure 35 *: Variations de températures des cellules lors des 6 cycles de gel et de dégel. L'interruption de la courbe est causée par des températures mesurées inférieures aux limites de détection de l'enregistreur.*

Les taux de survie de chaque souche ont été déterminés par étalement sur milieu R2A après les 15 premières minutes à 15°C (temps initial de l'expérience) et après 1, 3 et 6 cycles de gel et de dégel. Un exemple de la variation du pourcentage de survie en fonction des cycles est présenté sur la **Figure 36**. Pour chacune des souches, le pourcentage de survie au long des cycles de gel et de dégel a été assimilée à une loi exponentielle (R^2 variait entre 0,735 et 0,999 avec une médiane de 0,958) de la forme :

$$S_x = \exp(a \times x) \qquad \text{Equation (1)}$$

où S_x est le pourcentage de survie après x cycles de gel et de dégel et a est une constante propre à chaque souche et à chaque concentration initiale en bactéries (**Figure 36**). Le pourcentage de survie des cellules par cycle (S) a alors été défini tel que :

$$S = \exp\ (a) \qquad \text{Equation (2)}$$

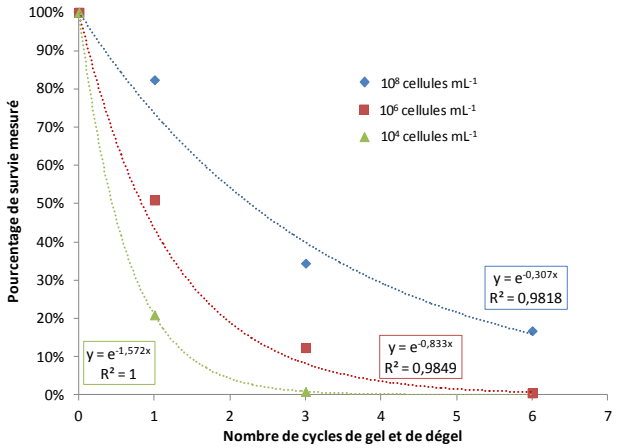


Figure 36 *: Exemple de pourcentage de survie de la souche* P. syringae *13b-2 après 1, 3 et 6 cycles de gel et de dégel.*

3. Résultats

3.1.Introduction

Dans cette section, les résultats sont présentés sous la forme d'une publication en cours de préparation dont le titre est « Clouds as environmental filters: survival of microbial isolates to the main stress factors encountered in clouds ». Cet article sera soumis pour une publication dans l'issue spéciale « Polar and Alpine Microbiology » de *FEMS Microbiology Ecology*. De ce fait, cette publication propose de considérer les nuages comme des filtres pré-sélectionnant les microorganismes avant leur dissémination vers les milieux froids.

Dans ces travaux, j'ai participé :

- à la réalisation des expériences en laboratoire ;
- à la rédaction de l'article avec Pierre Amato.

Ces résultats ont été présentés sous forme de poster dans les congrès suivants :

- au congrès ISME14 (**International Symposium on Microbial Ecology**) qui s'est déroulé à Copenhague (Danemark) en Août 2012 sous le titre « Survival of microorganisms to the main stress factors encountered in clouds » (Présentateur : M. Joly) ;
- au congrès EMEC13 (**European Meeting of Environmental Chemistry**) qui s'est tenu à Moscou (Russie) en Décembre 2012 sous le titre « Survival of microorganisms to the main stress factors encountered in clouds » (Présentateur : A.-M. Delort) ;
- au 9ème congrès de la **Société Française de Microbiologie** (SFM) à Lille (France) en Février 2013 sous le titre « Survival of microorganisms to the main stress factors encountered in clouds » (Présentateur : M. Joly) ;
- à la **conférence annuelle de l'American Association for Aerosol Research** (AAAR) qui s'est tenu en Octobre 2013 à Portland (U.S.A) sous le titre « Survival of microorganisms to the main stress factors encountered in clouds » (Présentateur : A.-M. Delort).

Ils ont également été présentés sous forme de communications orales dans les congrès suivants :

- à la 5ème **conférence internationale sur la Microbiologie Polaire et Alpine** qui s'est déroulée à Big Sky (U.S.A.) en Septembre 2013 sous le titre « Survival of microorganisms to the main stress factors encountered in clouds ». (Orateur : P. Amato) ;
- au congrès **MicrobAero 2013** qui s'est déroulé à la Bourboule (France) en Octobre 2013 sous le titre « Survival of microorganisms to the main stress factors encountered in clouds » (Orateur : P. Amato)

3.2. "Clouds as environmental filters: survival of microbial isolates to the main stress factors encountered in clouds", article en cours de préparation pour une soumission à FEMS Microbiology Ecology

Clouds as environmental filters: survival of microbial isolates to the main stress factors encountered in clouds

Muriel Joly[a,b,c,d*], Pierre Amato[a,b], Martine Sancelme[a,b], Virginie Vinatier[a,b], Magali Abrantes[a,b], Laurent Deguillaume[c,d] and Anne-Marie Delort[a,b]

[a] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

[b] CNRS, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), BP 80026, F-63171 Aubière, France.

[c] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand, Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

[d] CNRS, UMR 6016, Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP)/Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand (OPGC), BP 80026, F-63171 Aubière, France.

[*]Corresponding author. E-mail: Muriel.Mourguy@univ-bpclermont.fr

Phone: +33(0)4 73 40 52 84 Fax: +33(0)4 73 40 77 17.

Introduction

The low atmosphere carries in permanence around 5×10^{19} living bacteria (*Whitman et al.*, 1998). It is indeed annually loaded with ~10^{24} bacterial cells aerosolized from surface ecosystems (*Burrows et al.*, 2009b). Large spatial and temporal heterogeneities exist in the distribution of microorganisms in the air, notably in relation with the type of surface. For instance, emission fluxes of more than 500 viable bacteria m^{-2} s^{-1} were recorded over agricultural vegetated areas (*Lindemann et al.*, 1982), whereas emission rates from seas and glaciated ecosystems are believed to be minimal (~1 m^{-2} s^{-1}) based on near-surface concentration measurements (*Burrows et al.*, 2009b). Once aloft, micron-sized particles like bacterial cells can be transported thousands of kilometers away from their emission source (*Prospero et al.*, 2005; *Kellogg and Griffin*, 2006; *Smith et al.*, 2013), and eventually reach the most remote regions of the planet. The prominent manner to descend back to the surface for airborne microorganisms in the size range of bacteria (~1 µm) is wet deposition (*Renoux and Boulaud*, 1998). Falling rain drops are largely inefficient in scavenging particles of this size, so clouds are almost inevitable pathways to the ground for microbes disseminating by air means. Considering the harsh conditions encountered in the atmosphere, it is likely that only a proportion of the microorganisms aerosolized survive their journey in the air and clouds. Living airborne microbial cells probably have to cope with desiccation and high levels of solar and UV radiations before being incorporated into a cloud. There, the presence of condensed water probably protects cells against desiccation, but it exposes them to rapid variations of osmolarity due to repeated condensation-evaporation cycles. Indeed, in average, it was estimated that 10 condensation-evaporation cycles occur before atmospheric water precipitates (*Pruppacher and Jaenicke*, 1995). In addition, in cloud droplets, microorganisms have to deal with a mixture of chemical compounds including potentially toxic compounds and strong oxidants, and most of the time low pH (3.1 to 7.6; *Deguillaume et al.*, 2013). In addition, the temperature gradient existing in the troposphere associated with rapid vertical winds potentially expose cells to repeated freeze-thaw cycles.

Regarding the inhospitable conditions prevailing in the atmosphere and their resemblance with extreme cold environments (polar ice sheets, glaciers, snow mantle), clouds can certainly be regarded as extensions of the cryosphere, where probably only a few of the numerous entering microorganisms can survive and eventually develop. Both environments are exposed to temperatures around the freezing point and so to freeze-thaw cycles, associated or not with osmotic variations, presence of oxidants and high levels of sunlight. These were demonstrated to shape the structure of microbial communities at the surface of glaciers, for instance (*Stres et al.*, 2010). A number of studies actually pointed similarities between microbial communities in permanently cold environments and in the atmosphere and clouds. For instance, both harbour a high proportion of pigmented microorganisms able to develop at low temperature, with cultivable representatives affiliated to *Pseudomonas*, *Sphingomonas* and *Arthrobacter* species, notably (*Christner et al.*, 2001,

2003; *Zhang et al.*, 2002; *Busse et al.*, 2003; *Foght et al.*, 2004; *Miteva et Brenchley*, 2005; *Amato et al.*, 2007; *Vaïtilingom et al.*, 2012). Based on these statements, we propose that clouds could contribute to the evolution toward cold-adaptation, by acting as environmental filters fed with a large variety of microorganisms, and delivering a set of the most competitive, *i.e.* the most fitted for extreme cold environments. Five strains isolated from cloud water and affiliated to the most common genera in the 24 cloud analyzed between 2003 and 2010 (*Vaïtilingom et al.*, 2012) were selected from our bank of microorganisms originating from clouds: 2 *Pseudomonas*, 1 *Sphingomonas* and 1 *Arthrobacter* among bacteria, represented in 58%, 46% and 13%, respectively, and 1 Basidiomycota yeast related to the genus *Dioszegia*, representatives of which were found in 71% of the samples. Those strains were also selected to include a range of microbial phenotypes that could be related with increased survival to environmental stresses: presence of pigment or not, ice nucleation activity (INA) or not. In laboratory, the survival rates of these microorganisms toward atmospheric stresses caused by solar light, oxidants, osmotic shocks and freeze-thaw cycles were determined in microcosms, under conditions matching those encountered in clouds or under more extreme conditions.

Material and Methods

Microbial strains

Five microbial strains isolated from cloud water at the puy de Dôme station (1465 m a.s.l) were subjected to atmospheric stresses: one yellow-pigmented Actinobacterium (*Arthrobacter* sp. 5b-11, DQ512758), two fluorescent ice nucleation active (INA) Gamma-Proteobacteria (*Pseudomonas syringae* 13b-2 DQ512785, INA at -5°C and 32b-74 HQ256872, INA at -3°C), one orange-pigmented Alpha-Proteobacterium (*Sphingomonas* sp. 32b-11, HQ256831) and one pink-pigmented Basidiomycota yeast (*Dioszegia hungarica* 24b-2, JF706549) (*Amato et al.*, 2007d; *Vaïtilingom et al.*, 2012; *Joly et al.*, 2013b) (**Table 1**). For all experiments, pure cultures were grown aerobically in liquid R2 medium (*Reasoner and Geldreich*, 1985) at 17°C, 200 r.p.m. shaking, until exponential growth phase. Cells were then harvested by centrifugation (3 min; 12,000 x g) and cell pellets were rinsed three times in the incubation medium of the corresponding experiment.

H_2O_2 stress

Cells were suspended at a concentration of 10^6 cells mL^{-1} in 5 mL of artificial continental cloud water (final volume) (*Vaïtilingom et al.*, 2011) supplemented with 0, 0.1, 0.25, 0.5 or 1 mM hydrogen peroxyde (final concentration). In order to determine the survival rate to each of the H_2O_2 concentration, plate-counts were realized on R2A agar medium at the beginning of the experiment and after 90 min, and incubation for >2 days at 17°C. Three independent replicates were realized for each strain.

Solar radiations stress

Cells were suspended at a concentration of 10^6 cells mL^{-1} in 30 mL of artificial anthropogenic cloud water and placed in photobioreactors (*Vaïtilingom et al.*, 2013). These suspensions were exposed to artificial solar light (Repti Glo 5.0, EXOTERRA®, lamp spectrum is presented on **Figure S1**) at 5°C and under agitation (200 r.p.m.). Controls consisted of similar cell suspensions incubated in the dark for 10 hours. The survival rates were determined every 2 hours for a total 10 hours by plate-counts on R2A agar and incubation for >2 days at 17°C. Three independent replicates were done for each strain.

Osmotic stress

Cells from cultures were harvested by centrifugation and washed three times in 0.1 M NaCl. Cells were finally suspended at concentrations of 10^6 cells mL^{-1} in 0.1 mL of 0.1 M, 0.5 M, 1 M or 2.5 M NaCl solution and incubated at 5°C for 30 minutes. The concentration of NaCl was then adjusted back to 0.1 M by adding sterile water, and cell suspensions were incubated for another 30 minutes at 5°C. For determining the survival rates toward hyperosmotic and hypoosmotic shocks, cell suspensions were plated on R2A agar after rinsing in 0.1 M NaCl and after incubation following increase and decrease of NaCl concentration, and incubated at 17°C for >2 days. Three independent replicates were realized for each strain.

In parallel, the minimum inhibitory concentration (MIC) of each strain toward NaCl was measured in 5 mL of liquid R2 medium supplemented with NaCl at concentrations ranging from 0 to 2.5 M, at 0.1 M intervals. The presence or absence of growth was controlled visually after three weeks of incubation at 17°C.

Freeze-thaw stress

Cells were suspended at concentrations of 10^4, 10^6 and 10^8 cells mL^{-1} in deionized water and volumes of 0.1mL of the suspensions were distributed into 0.2 mL PCR microtubes designed for high thermal conductivity. These were incubated for 15 minutes at 5°C, and then subjected to six cycles of 12 minutes at -40°C followed by 48 minutes at 5°C (**Figure S3**). In parallel, controls were incubated at constant 5°C during the course of the experiment. To determine survival rates, plate-counts were realized on R2A agar at the beginning of the experiment and after 1, 3 and 6 freeze-thaw cycles and incubated at 17°C for >2 days. Three independent replicates were realized for each strain.

Statistical analysis

All data were analyzed using Past software (*Hammer et al.*, 2001). Shapiro-Wilk test was used to check the normal distribution of data and significant differences of survival between treatments were tested by variance analysis (Anova1).

Results and discussion

Exposition to hydrogen peroxide

With a redox potential of up to more than 200 mV (*Deguillaume et al.*, 2013), cloud water is a very oxidant environment, notably due to the presence of numerous radicals ($^{\bullet}OH$, $NO_3^{\bullet}$ …) and their precursors. Hydrogen peroxide is one of the main actors of $^{\bullet}OH$ radical formation *via* photochemistry. It has been detected in cloud water at concentrations ranging from 0 to 3.2 µM at Kleiner Feldberg (Germany; *Sauer et al.* (1996)), from 0.1 to 57.7 µM at the puy de Dôme, with an average of 7.8 µM (France; *Deguillaume et al.* (2013)), and extremely high concentrations (up to 247 µM) were reported from Whitetop Mountain (U.S.A.; *Olszyna et al.* (1988)).

As shown on **Figure 1**, the mortality rate of cells at high hydrogen peroxide concentration varied between strains. The three Gram-negative bacterial species were by far the most sensitive, with extrapolated LC50 values, *i.e.* concentrations killing 50% of the cells, around 0.5 mM, *versus* 3.3 and 9.8 mM for *Arthrobacter* and *Dioszegia*, respectively. Only 8.7% ± 1.9%, 17.1% ± 14.6 % and 22.9% ± 13.7% of *P. syringae* 32b-74, *Sphingomonas* sp. and *P. syringae* 13b-2 cells, respectively, were still viable after a 90 minutes exposure to 1 mM H_2O_2; the decrease of cell viability was significant (p value ≤ 0.01) only at that latter concentration for the 2 *Pseudomonas* species. On the opposite, the viability of *Sphingomonas* sp. was significantly altered at as low as 0.1 mM H_2O_2 (p value < 0.04).

Interestingly, at 0.25 mM, the highest H_2O_2 concentration measured in clouds by *Olszyna et al.* (1988), the viability of the strains studied here was not endangered, except for the most sensitive strain *Sphingomonas* sp., the population of which would be divided by 2 in 90 minutes due to oxidative stress (Figure 1). *Eguchi et al.* (1996) observed a strain of *Sphingomonas* isolated from marine environment capable of resisting exposition to as high as 25 mM H_2O_2 for up to 40 minutes, but its population was reduced by about 4 orders of magnitude after 60 minutes. At the lowest H_2O_2 concentration investigated here of 0.1 mM, which still largely exceeds the range measured in cloud water by *Sauer et al.* (1996) and *Deguillaume et al.* (2013), at least 70% of the cells survived for 90 minutes in all strains. This suggests that H_2O_2, at its concentration in cloud water and given the relatively short exposition time in clouds, has limited or no influence on the mortality of these microorganisms.

This is consistent with the fact that aerobic cells are used to cope with oxidant species such as free radicals ($^{\bullet}OH$, $O_2^{\bullet-}$) and H_2O_2. These compounds are naturally produced aerobically when oxygen is transported internally and reacts with enzymatic cofactors such as $FADH_2$, NADH and NADPH. When present in excess, reactive oxygen species (ROS) alter molecules like DNA, proteins, lipids and carbohydrates, and their action can be lethal. Microorganisms have developed mechanisms for protecting their structure against the deleterious effects of ROS. They tend to limit their production, decrease their presence and rapidly repair the damages caused (*Lushchak*, 2001). It involves anti-oxidants molecules like vitamins, glutathione and carotenoid pigments that dissipate excitation energy from $O_2^{\bullet}$ (*Stahl and Sies*, 2005). Three of the strains in this study exhibit strong pigmentation:

Arthrobacter sp., *Sphingomonas* sp. and *D. hungarica*. However, non-pigmented *Pseudomonas syringae* strains presented similar response to elevated H_2O_2 concentration as *Sphingomonas* sp., suggesting that although pigments may contribute to enhanced resistance, other mechanisms are also likely involved. For example, the high sensitivity of the Gram-negative species compared with the Gram-positive strain *Arthrobacter* sp. and with the yeast suggests that the composition of the cell wall could act as a protective agent against ROS. However, opposite conclusions were observed by *Dahl et al.* (1989) and *Valduga et al.* (1993) who indicated better defense mechanisms in Gram-negative species due to lipopolysaccharide coating and unsaturated fatty acids rich outer membrane preventing extracellular ROS from entering the cell. Another protection mechanism relies on enzymes responsible for the transformation of aggressive oxidants into non-toxic products. The enzyme peroxidase notably, forms H_2O from peroxide compounds. The combination of superoxide dismutases and catalases is also a well-known defense mechanism against ROS: it transforms superoxide radicals and hydrogen peroxide into water molecules (*Vorob'eva*, 2004). Hence, supplementing environmental samples with such enzymes in charge of detoxification against ROS significantly increases bacteria cultivability (*Marthi et al.*, 1991). Airborne aerobic microorganisms are undoubtedly equipped with such enzymes. *Vaïtilingom et al.* (2013) identified biological activity as one of the main sinks of H_2O_2 in cloud water.

Exposition to artificial solar light

Solar light can causes two types of damages in microorganisms. The first is linked to the presence of highly energetic wavelengths (UV-C, ~190 to 290 nm, and UV-B, ~290-320) that are responsible for DNA damages and eventual lethal mutations (maximum absorbance of DNA is 260 nm; see the review by *Witkin* (1976)). Nevertheless, UV-C radiations, the most damaging wavelengths, are mostly absorbed by stratospheric ozone, *i.e.* above the highest altitude of clouds **(Figure S1)**. Concerning UV-B radiations, their deleterious effects are limited and can be balanced by repair mechanisms. The second effect of sunlight is associated with the presence of longer UV wavelengths (UV-A, ~320 to 400 nm) and visible light (~400 to 800 nm). These can indirectly alter cell viability by producing intracellular ROS, which then damage cellular structures.

In our study, microorganisms were exposed to artificial light closely mimicking the spectrum of natural solar light (**Figure S1**). Experiments were realized at the temperature of 5°C corresponding to the mean annual temperature when clouds are present at our cloud water sampling site, the puy de Dôme station (*Vaïtilingom et al.*, 2010). As shown on **Figure 2**, artificial solar light radiation had no effect on the survival of the 4 bacterial strains investigated after 10 hours of incubation. Surprisingly, at shorter-term, significant increases in *P. syringae* 13b-2 cell concentrations were observed in suspensions exposed to light compared with controls incubated in the dark: after 2 hours and after 6 hours, there was 25% and 19%, respectively, more viable cells than in controls. On the opposite, viability of the yeast *D. hungarica* was negatively impacted by solar light; yet, the decrease was

significant only after 4 hours of exposition, but not later due to the elevated standard deviation that reached up to 76% after 10 hours. This absence of significant loss of viability after 10 hours of exposition to solar radiation suggested that microorganisms from cloud water were particularly well adapted to this stress.

As a large fraction of airborne microorganisms probably originates from vegetation and aquatic ecosystems where they were obviously subjected to solar radiations, they are potentially already pre-adapted when entering the atmosphere. Indeed, in the phyllosphere and in marine environments, solar light operates strong selection pressure on bacteria (*Jacobs and Sundin*, 2001; *Agogué et al.*, 2005). A large fraction (41%) of the Gamma-Proteobacteria isolated from a marine ecosystem was highly resistant to solar radiations (*Agogué et al.*, 2005). On the opposite, Alpha-Proteobacteria and Actinobacteria were highly sensitive, with only 14% and 9% of resistant strains, respectively. In parallel, *Joux et al.* (1999) studied five bacterial strains isolated from a marine environment and showed that *Sphingomonas* species (Alpha-Proteobacteria) were particularly resistant to UV-B radiations. In the atmosphere, the effect of sunlight have been highlighted by *Tong and Lighthart* (1997), who showed that airborne bacteria collected during nighttime were more sensible to sunlight than those collected during daytime. Cell aggregation or association with particles increased survival during the day due to a shielding effect (*Tong and Lighthart*, 1998). Pigments like carotenoids also seems to confer an advantage against solar light by scavenging ROS (*Jacobs et al.*, 2005; *Dieser et al.*, 2010). In our study, there was no difference in the survival of strains collected during the night (*Arthrobacter* sp. and *P. syringae* 13b-2) and those recovered during daytime, nor between pigmented and non-pigmented strains.

Osmotic shocks

In clouds, microorganisms are subject to osmotic variations when water condenses or evaporates. Assuming a cloud droplet of 20 µm that evaporates and reaches a diameter of 2 µm, in the absence of solute precipitation the shift in water volume would concentrate non-volatile chemical species by a factor of 10^3. As an example, ion species studies on a long term period at the puy de Dôme station pointed out a large range of concentrations of total ion content, from a few micromoles per liter to 1.9 mM (*Deguillaume et al.*, 2013). The transition described above would increase ion concentration to up to 1.9 M.

Figure 3 presents the influence of osmotic shocks on the viability of the microorganisms. Hyperosmotic shock consisted of a 5, 10, or 25-fold increase of NaCl concentration followed by a hypoosmotic shock of a similar extent. Neither the viability of *D. hungarica* nor that of *Arthrobacter* sp. was affected by any osmotic variations in the range of concentrations tested (up to 2.5M). Both strains were capable of growth at high salt concentrations: 2.3 M for *Arthobacter* sp. and 1.2 M for the yeast *Dioszegia hungarica*. The 2 *P. syringae* strains also tolerated elevated salt concentrations, with MIC of 1.0 and 1.2M. Their viability was significantly affected only by 2.5 M osmotic shocks,

conditions at which still 34% and 35% of the cells survived. *Sphingomonas* sp. was by far the strain the less tolerant to salt among the microorganisms studied; it had a MIC toward NaCl of only 0.5M. Consistently, its viability was strongly affected by small variations of salt concentrations: a shift from 0.1 M to 0.5 M NaCl decreased the fraction of viable *Sphingomonas* sp. cells to 50%, and only 7% of the cells survived a transition to 2.5 M.

Both increase of solute concentration and desiccation result in a decrease of water availability (or water activity), and thus have quite similar impacts on microorganisms. Indeed, to compensate hyperosmotic shock, microorganisms have to equilibrate internal and external osmolarities by immediate efflux of water molecules. This response leads to increased concentration of metabolites, decreased metabolic activity and shrinkage of the cell (*Csonka*, 1989; *Gaxiola et al.*, 1992). To reestablish influx of water, cells increase cytoplasm osmolarity by synthesizing or uptaking compounds known as “compatible solutes” or “osmoprotectants”: K^+ ions, amino acids (proline, glutamate…), sugars (trehalose, sucrose…) or peptides (*Csonka*, 1989; *De Antoni et al.*, 1989; *Panoff et al.*, 2000; *Marx et al.*, 2009).

In our study, the extent of the impact of osmotic shock on viability was dependent on the type of microorganisms: the three Gram negative bacteria were much less resistant to osmotic variations than the yeast and the Gram positive strain. *Nocker et al.* (2012) observed similar patterns in organisms subjected to desiccation, and concluded that thicker peptidogycan layer in Gram positive bacteria was related to improved viability. Nevertheless, *Mille et al.* (2005) studied survival rates of 2 yeasts, 2 Gram positive and 2 Gram negative bacteria after osmotic variations and pointed out that tolerance cannot be related only to specific cell types, but that intra-species characteristics like membrane composition have also be considered. In fact, fatty acids composition strongly influences viability in presence of osmotic stress as it defines membrane fluidity and its susceptibility to mechanical damages. In microorganisms adapted to frequent osmotic variations, high proportions of anionic phospholipids or glycolipids are present (see the review of *Beales* (2004)). On the opposite, carotenoid pigments increase membrane rigidity and their expression tends to be downregulated at high salinity (*Fong et al.*, 2001).

Interestingly, the five strains studied here behave similarly face to osmotic stress as when they were exposed to H_2O_2. This suggests common response pathways, as it is generally observed in the management of environmental stresses by cells (*Suzuki et al.*, 2001; *Mikami et al.*, 2002).

Freeze-thaw cycles

In clouds as in the rest of the cryosphere, microorganisms have often to cope with low temperatures and, particularly with freeze-thaw cycles that are known to be very damageable for cells. In the troposphere, temperature decreases in general with increasing altitude, by 0.6 to 1°C every 100 meters. This associated with vertical winds of up to 200 km h^{-1} (56 m s^{-1}) exposes airborne

cells to thermal variations of up to 1°C every about 2 seconds, and so potentially to rapid freeze-thaw cycles as well.

The proportions of cells remaining viable after 0, 1, 3 and 6 freeze-thaw cycles were determined for the 5 microorganisms at the concentrations of 10^4, 10^6 and 10^8 cells mL^{-1}, except for the yeast which was assayed only at 10^4 and 10^6 cells mL^{-1}. Interestingly, the decrease of survival in cells exposed to consecutive freeze-thaw cycles was exponential (see **Figure S3**). This indicated that the most resistant cells within populations were selected. Accumulation and rapid succession of stresses during freezing (and thawing) makes this phenomenon a potentially strong factor of selection in the environment, as suggested by the observations of *Stres et al.* (2010) at the surface of glaciers. Mean survival rates per cycle for each strain at the different cell concentrations were then calculated; these are shown on **Figure 4**. *D. hungarica* was the most resistant strain among the microorganisms tested, at both cell concentrations. On the opposite, *Arthrobacter* sp. was the most sensitive, with mortality rates reaching more than 80% of the cells per cycle independently of cell concentration between 10^4 and 10^8 cells mL^{-1}. For the 2 *P. syringae* strains and for *Sphingomonas* sp., higher cell concentrations led to greater survival as their aggregation probably protected each other against environmental stresses (*Monier and Lindow*, 2003). At 10^8 cell mL^{-1}, mortality rates were only 13% and 15% per cycle for *P. syringae* 13b-2 and 32b-74, respectively. Nevertheless, at cell concentrations closer to those observed in cloud water, *i.e.* 10^4 cells mL^{-1} (*Vaïtilingom et al.*, 2012), populations were strongly affected by water phase changes in the 2 strains: respectively 41% and 70% of the cells lost viability at each cycle.

Identical treatments as in the experiments presented here (same duration of cycles and same temperatures) were applied directly on cloud water samples collected at the puy de Dôme (data not shown). The results were very variable between samples, with a well-marked exponential decay in the cultivable microbial concentration in some samples but no noticeable effect on others. This may reflect cloud's history, with highly resistant populations in clouds that had already naturally been exposed to several freeze-thaw cycles.

The taxonomic affiliation of bacteria resistant to freeze-thaw in complex communities greatly varies between studies. For example, *Firmicutes* and *Proteobacteria* were found to be the most resistant bacteria phyla to freeze-thaw in lakes (*Wilson et al.*, 2012). On the opposite, *Actinobacteria* populations (*Arthrobacter* genus phylum), were greatly reduced. In soils, *Männistö et al.* (2009) observed that the most resistant species were related to Alpha-Proteobacteria and Bacteroidetes, while Beta-Proteobacteria were the most sensitive.

In theory, freezing is a combination of several shocks, the first of which is likely in most cases temperature drop. This is responsible for a decrease in membrane fluidity, protein refolding and enzymatic activity, and consequently DNA replication and transcription and RNA translation (*Yamanaka et al.*, 1998; *Aguilar et al.*, 2001; *Feller and Gerday*, 2003). Cell membrane composition

thus plays an essential role in the resistance to freezing: high proportions of unsaturated phospholipids increase membrane fluidity, which helps maintaining its functions. Following a temperature drop, the decrease in membrane fluidity induces the synthesis of proteins gathered under the term "cold shock proteins" (CSP) (*Suzuki et al.*, 2001; *Mikami et al.*, 2002). Some CSPs are chaperones protecting DNA, RNA and proteins and their folding, and some are enzymes implicated in central metabolism (*Graumann and Marahiel*, 1996; *Yamanaka et al.*, 1998; *Phadtare et al.*, 1999).

When ice actually starts forming, chemical solutes are excluded from water crystals and get concentrated at their junctions. This results in a supersaline liquid network of microveins where microbial cells are also concentrated and experience hyperosmotic shock (*Price*, 2000; *Mader et al.*, 2006; *Amato et al.*, 2009). For that reason, the regulation systems to cold and osmotic stresses present many similaries (*Suzuki et al.*, 2001; *Mikami et al.*, 2002), and osmoprotectant compatible solutes such as trehalose, glycerol and saccharose also serve as cryoprotectants (*De Antoni et al.*, 1989; *Panoff et al.*, 2000; *Marx et al.*, 2009). *Tanghe et al.* (2006) highlighted the importance of aquaporins, channel proteins devoted to the transport of water through the cell membrane, in the resistance to freezing. These proteins have been found in the most frequent bacterial genera isolated from clouds: *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* and *Rhodococcus* (NCBI database). In permafrost, a water activity of 0.9 was estimated (*Ponder et al.*, 2008), which corresponds to ~2.5 M NaCl, *i.e.* the highest concentration of salt tested in our experiments. No correlation was found though in our study between the survival rates to freeze-thaw and to osmotic shock.

Under our experimental conditions (*i.e.* in deionized water), cells also perhaps suffered from mechanic stress during freezing. Indeed, it was shown that the presence of solutes at low concentration, which results in wider microveins than in purer water (*Price*, 2000), was linked to enhanced cell survival to freeze-thaw (*Park et al.*, 1997; *Amato et al.*, 2009; *Wilson et al.*, 2012).

Cells have developed specific responses against the mechanical damages of ice crystal growth. Notably, antifreeze proteins are devoted to control the growth of ice crystals (*Duman and Olsen*, 1993). Ice nucleation active proteins may also protect cells from the damages caused by freezing, by catalyzing crystal formation outside the cell rather than inside. Nevertheless, the two INA strains studied here had similar intermediate sensitivity so no significant protective influence was observed.

Simultaneously to ice formation, reactive oxygen species are produced by electrons leaking from the electron transport chain of cells, exposing them to oxidative stress (*Stead and Park*, 2000). It was observed that low concentrations of hydrogen peroxide in the incubation medium increase freeze-thaw resistance, probably because it induces common response pathways (*Park et al.*, 1997; *Tanghe et al.*, 2003). For instance, carotenoid pigments, which were shown to increase survival to oxidants due to their action as ROS scavengers, also improve survival to freeze-thaw (*Dieser et al.*, 2010). This may be linked with the high proportion of pigmented microorganisms in clouds.

Conclusion

In this work, we studied the survival of five microbial strains representative of the cultivable communities of clouds collected at the puy de Dôme in France face to four atmospheric stresses: oxidants, sunlight, osmotic variations and repeated freeze-thaw. We investigated conditions much more drastic than those actually encountered in clouds, yet none of the strain population was devastated by any of the stresses. The yeast *Dioszegia hungarica* was almost insensitive to freeze-thaw cycles and oxidants, and it tolerated high osmotic variations. As a possible consequence, representatives of this genus were the most represented in cloud water samples, with 71% of the cloud events carrying at least one living individual detected. The Actinobacterium *Arthrobacter* was not affected by osmotic shock and solar light and it resisted to elevated concentrations of oxidants; in turn, it highly suffered from repeated freeze-thaw independently from cell concentration. It was detected as alive much less frequently (13% of the clouds). The Proteobacteria *Pseudomonas syringae* and *Sphingomonas* sp. survived freeze-thaw cycles and solar light but their populations were strongly affected by relatively low concentrations of oxidants and osmotic variations. They were the most represented bacterial genera, present in about 40-60% of the samples. The survival of *Pseudomonas* to freeze-thaw was not linked with ice nucleation activity.

Responses to stresses are known to share common pathways beside specific responses. More general protection mechanisms not directly related to the response to stress can also improve survival probability in airborne cells, like the presence of carotenoid pigments (*Fong et al.*, 2001) or cell aggregation (*Tong and Lighthart*, 1998). In our investigations, each stress was assayed independently from others but it is possible that accumulating or overlapping stresses actually result in better survival. For instance, oxidative stress resistance is improved after pre-exposition to low doses of oxidants. It is responsible for the induction of oxidative (*Storz et al.*, 1990) and general stress response pathways (*Tanghe et al.*, 2003) which could help cells fighting against unexpected stress. In clouds, oxidants concentration varies throughout the day (*Marinoni et al.*, 2011). Therefore depending on the time of the day when microorganisms are aerosolized, exposition to low levels of oxidants could be responsible for increased tolerance to stresses in general, preparing cells for their atmospheric journey and for rapid variations of environmental conditions.

In nature, most cells are exposed to environmental stresses and it is probable that microorganisms from the phyllosphere or soils exhibit a certain level of tolerance to solar light, osmotic shocks and eventually to freeze-thaw. The surface is constantly exchanging material from and to the atmosphere, so most outdoor environment microorganisms periodically experience aerosolization and atmospheric transit. The level of stress existing at the surface is exacerbated in the atmosphere and clouds, where spatial and temporal scales and the extent of variation differs and selects for the most resistant populations. Cycle after cycle, it is probable that this permanent mixing of microorganisms increasingly selects for the most performing of them. Ultimately, such a level of

tolerance is reached that, if they get transported to there, cells can survive and thrive in extreme cold environments.

Acknowledgements

M. Joly is grateful to Région Auvergne and FEDER for PhD scholarship. Authors particularly thank Marcello Brigante and Monica Passananti for recording lamp and solar spectra.

References

Agogué H., Joux F., Obernosterer I. and Lebaron P. (2005). Resistance of marine bacterioneuston to solar radiation, *Applied and Environmental Microbiology*, *71*: 5282‑5289.

Aguilar P. S., Hernandez-Arriaga A. M., Cybulski L. E., Erazo A. C. and de Mendoza D. (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*, *The EMBO Journal*, *20*: 1681‑1691.

Amato P., Parazols M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. and Delort A. M. (2007). Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the puy de Dome: major groups and growth abilities at low temperatures, *FEMS Microbiology Ecology*, *59*: 242-254.

Amato P., Doyle S. and Christner B. C. (2009). Macromolecular synthesis by yeasts under frozen conditions, *Environmental Microbiology*, *11*: 589-596.

De Antoni G. L., Pérez P., Abraham A. and Añón M. C. (1989). Trehalose, a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*, *Cryobiology*, *26*: 149‑153.

Beales N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *3*: 1-20.

Burrows S. M., Butler T., Jöckel P., Tost H., Kerkweg A., Pöschl U. and Lawrence M. G. (2009). Bacteria in the global atmosphere - Part 2: Modeling of emissions and transport between different ecosystems, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *9*: 9281-9297.

Busse H. J., Denner E. B. M., Buczolits S., Salkinoja-Salonen M., Bennasar A. and Kämpfer P. (2003). *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*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *53*: 1253-1260.

Christner B. C., Mosley-Thompson E., Thompson L. G. and Reeve J. N. (2001). Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice, *Environmental Microbiology*, *3*: 570-577.

Christner B. C., Mosley-Thompson E., Thompson L. G. and Reeve J. N. (2003). Bacterial recovery from ancient glacial ice, *Environmental Microbiology*, *5*: 433-436.

Csonka L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress, *Microbiological Reviews*, *53*: 121‑147.

Dahl T. A., Midden W. R. and Hartman P. E. (1989). Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen, *Journal of Bacteriology*, *171*: 2188‑2194.

Deguillaume L. and al. (2013). Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) from 10-year monitoring: mean features of their physico-chemical properties, *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, *13*: 22795‑22846.

Dieser M., Greenwood M. and Foreman C. M. (2010). Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses, *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, *42*: 396‑405.

Duman J. G. and Olsen T. M. (1993). Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants, *Cryobiology*, *30*: 322‑328.

Eguchi M., Nishikawa T., MacDonald K., Cavicchioli R., Gottschal J. C. and Kjelleberg S. (1996). Responses to stress and nutrient availability by the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256, *Applied and Environmental Microbiology*, *62*: 1287-1294.

Feller G. and Gerday C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation, *Nature Reviews Microbiology*, *1*: 200‑208.

Foght J., Aislabie J., Turner S., Brown C. E., Ryburn J., Saul D. J. and Lawson W. (2004). Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two southern hemisphere glaciers, *Microbial Ecology*, *47*: 329‑340.

Fong N., Burgess M., Barrow K. and Glenn D. (2001). Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress, *Applied Microbiology and Biotechnology*, *56*: 750‑756.

Gaxiola R., de Larrinoa I. F., Villalba J. M. and Serrano R. (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast, *The EMBO Journal*, *11*: 3157‑3164.

Graumann P. and Marahiel M. A. (1996). Some like it cold: response of microorganisms to cold shock, *Archives of Microbiology*, *166*: 293‑300.

Hammer Ø., Harper D. A. and Ryan P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeontologia electronica*, *4*. Available from: http://www.uv.es/pe/2001_1/past/past.pdf

Jacobs J. L. and Sundin G. W. (2001). Effect of solar UV-B Radiation on a phyllosphere bacterial community, *Applied and Environmental Microbiology*, *67*: 5488‑5496.

Jacobs J. L., Carroll T. L. and Sundin G. W. (2005). The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria, *Microbial Ecology*, *49*: 104‑113.

Joly M., Attard E., Sancelme M., Deguillaume L., Guilbaud C., Morris C. E., Amato P. and Delort A.-M. (2013). Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water, *Atmospheric Environment*, *70*: 392‑400.

Joux F., Jeffrey W. H., Lebaron P. and Mitchell D. L. (1999). Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation, *Applied and Environmental Microbiology*, *65*: 3820‑3827.

Kellogg C. A. and Griffin D. W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust, *Trends in Ecology & Evolution*, *21*: 638-644.

Lindemann J., Constantinidou H. A., Barchet W. R. and Upper C. D. (1982). Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation-active bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, *44*: 1059‑1063.

Lushchak V. I. (2001). Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria, *Biochemistry (Moscow)*, *66*: 476-489.

Mader H. M., Pettitt M. E., Wadham J. L., Wolff E. W. and Parkes R. J. (2006). Subsurface ice as a microbial habitat, *Geology*, *34*: 169‑172.

Männistö M. K., Tiirola M. and Häggblom M. M. (2009). Effect of freeze-thaw cycles on bacterial communities of Arctic tundra soil, *Microbial Ecology*, *58*: 621‑631.

Marinoni A., Parazols M., Brigante M., Deguillaume L., Amato P., Delort A.-M., Laj P. and Mailhot G. (2011). Hydrogen peroxide in natural cloud water: Sources and photoreactivity, *Atmospheric Research*, *101*: 256‑263.

Marthi B., Shaffer B. T., Lighthart B. and Ganio L. (1991). Resuscitation effects of catalase on airborne bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, *57*: 2775‑2776.

Marx J. G., Carpenter S. D. and Deming J. W. (2009). Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions, *Canadian Journal of Microbiology*, *55*: 63‑72.

Mikami K., Kanesaki Y., Suzuki I. and Murata N. (2002). The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Molecular Microbiology*, *46*: 905-915.

Mille Y., Beney L. and Gervais P. (2005). Compared tolerance to osmotic stress in various microorganisms: Towards a survival prediction test, *Biotechnology and Bioengineering*, *92*: 479-484.

Miteva V. I. and Brenchley J. E. (2005). Detection and isolation of ultrasmall microorganisms from a 120,000-year-old Greenland glacier ice core, *Applied and Environmental Microbiology*, *71*: 7806‑7818.

Monier J.-M. and Lindow S. E. (2003). Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*: 15977‑15982.

Nocker A., Fernández P. S., Montijn R. and Schuren F. (2012). Effect of air drying on bacterial viability: A multiparameter viability assessment, *Journal of Microbiological Methods*, *90*: 86‑95.

Olszyna K. J., Meagher J. F. and Bailey E. M. (1988). Gas-phase, cloud and rain-water measurements of hydrogen peroxide at a high-elevation site, *Atmospheric Environment (1967)*, *22*: 1699‑1706.

Panoff J.-M., Thammavongs B. and Guéguen M. (2000). Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T, *Cryobiology*, *40*: 264‑269.

Park J. I., Grant C. M., Attfield P. V. and Dawes I. W. (1997). The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway, *Applied and Environmental Microbiology*, *63*: 3818‑3824.

Phadtare S., Alsina J. and Inouye M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins, *Current Opinion in Microbiology*, *2*: 175‑180.

Ponder M. A., Thomashow M. F. and Tiedje J. M. (2008). Metabolic activity of Siberian permafrost isolates, Psychrobacter arcticus and Exiguobacterium sibiricum, at low water activities, *Extremophiles*, *12*: 481‑490.

Price P. B. (2000). A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*: 1247‑1251.

Prospero J. M., Blades E., Mathison G. and Naidu R. (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust, *Aerobiologia*, *21*: 1‑19.

Pruppacher H. and Jaenicke R. (1995). The processing of water vapor and aerosols by atmospheric clouds, a global estimate, *Atmospheric Research*, *38*: 283-295.

Reasoner D. and Geldreich E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Applied and Environmental Microbiology*, *49*: 1-7.

Renoux A. and Boulaud D. (1998). *Les aérosols: physique et métrologie*, Lavoisier Technique & Documentation.

Sauer F., Schuster G., Schäfer C. and Moortgat G. K. (1996). Determination of H_2O_2 and organic peroxides in cloud and rain water on the Kleiner Feldberg during FELDEX, *Geophysical Research Letters*, *23*: 2605‑2608.

Smith D. J., Timonen H. J., Jaffe D. A., Griffin D. W., Birmele M. N., Perry K. D., Ward P. D. and Roberts M. S. (2013). Intercontinental dispersal of bacteria and archaea by transpacific winds, *Applied and Environmental Microbiology*, *79*: 1134‑1139.

Stahl W. and Sies H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1740*: 101‑107.

Stead D. and Park S. F. (2000). Roles of Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze-thaw stress, *Applied and Environmental Microbiology*, *66*: 3110 ‑3112.

Storz G., Tartaglia L. A., Farr S. B. and Ames B. N. (1990). Bacterial defenses against oxidative stress, *Trends in Genetics*, *6*: 363‑368.

Stres B., Philippot L., Faganeli J. and Tiedje J. M. (2010). Frequent freeze-thaw cycles yield diminished yet resistant and responsive microbial communities in two temperate soils: a laboratory experiment, *FEMS Microbiology Ecology*, *74*: 323-335.

Suzuki I., Kanesaki Y., Mikami K., Kanehisa M. and Murata N. (2001). Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*, *Molecular Microbiology*, *40*: 235-244.

Tanghe A., Van Dijck P. and Thevelein J. M. (2003). Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance, and biotechnological applications, *Advances in Applied Microbiology*, *53*: 129‑176.

Tanghe A., Van Dijck P. and Thevelein J. M. (2006). Why do microorganisms have aquaporins?, *Trends in Microbiology*, *14*: 78‑85.

Tong Y. and Lighthart B. (1997). Solar radiation has a lethal effect on natural populations of culturable outdoor atmospheric bacteria, *Atmospheric Environment*, *31*: 897‑900.

Tong Y. and Lighthart B. (1998). Effect of simulated solar radiation on mixed outdoor atmospheric bacterial populations, *FEMS Microbiology Ecology*, *26*: 311-316.

Vaïtilingom M., Amato P., Sancelme M., Laj P., Leriche M. and Delort A.-M. (2010). Contribution of microbial activity to carbon chemistry in clouds, *Applied and Environmental Microbiology*, *76*: 23‑29.

Vaïtilingom M., Charbouillot T., Deguillaume L., Maisonobe R., Parazols M., Amato P., Sancelme M. and Delort A.-M. (2011). Atmospheric chemistry of carboxylic acids: microbial implication *versus* photochemistry, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *11*: 8721‑8733.

Vaïtilingom M., Attard E., Gaiani N., Sancelme M., Deguillaume L., Flossmann A. I., Amato P. and Delort A.-M. (2012). Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France), *Atmospheric Environment*, *56*: 88‑100.

Vaïtilingom M., Deguillaume L., Vinatier V., Sancelme M., Amato P., Chaumerliac N. and Delort A.-M. (2013). Potential impact of microbial activity on the oxidant capacity and organic carbon budget in clouds, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*: 559‑564.

Valduga G., Bertoloni G., Reddi E. and Jori G. (1993). Effect of extracellularly generated singlet oxygen on Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *21*: 81‑86.

Vorob'eva L. I. (2004). Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: A review, *Applied Biochemistry and Microbiology*, *40*: 217‑224.

Whitman W. B., Coleman D. C. and Wiebe W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*: 6578‑6583.

Wilson S. L., Frazer C., Cumming B. F., Nuin P. A. and Walker V. K. (2012). Cross-tolerance between osmotic and freeze-thaw stress in microbial assemblages from temperate lakes, *FEMS Microbiology Ecology*, *82*: 405-415.

Witkin E. M. (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*, *Bacteriological Reviews*, *40*: 869‑907.

Yamanaka K., Fang L. and Inouye M. (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation, *Molecular Microbiology*, *27*: 247-255.

Zhang X. J., Yao T. D., Ma X. J. and Wang N. L. (2002). Microorganisms in a high altitude glacier ice in Tibet, *Folia Microbiologica*, *47*: 241‑245.

Table/Figures caption:

Table 1: Strains investigated in this study and some of their physiological characteristics.

Figure 1: Survival rate of cells exposed to H_2O_2 for 90 min. Viability was assayed by culture on R2A medium at 17°C. Asterisks indicate significant differences between groups for each strain (p-value comprised between 0.002 and 0.041). Error bars represent standard deviations from the means (n = 3). LC50 values extrapolated from these results, *i.e.* the H_2O_2 concentration that would kill 50% of the cells, are presented on the top of the figure.

Figure 2: Survival rate of cells exposed to solar radiation for 0 to 10 hours at 5°C, relatively to controls incubated in the dark. Viability was assayed by culture on R2A medium at 17°C. Asterisks indicate significant differences between groups for each strain (p-value comprised between 0.007 and 0.023). Error bars represent standard deviations from the means (n = 3).

Figure 3: Survival rate of cells after hyperosmotic and hypoosmotic shocks. The concentration reached during hyperosmotic shock is indicated by the grayscale, and "0.1 M" corresponds to the experimental control. Viability was assayed by culture on R2A medium at 17°C. Asterisks correspond to significant differences between groups for each strain (p-values comprised between 0.0003 and 0.050). Error bars represent standard deviations from the means (n = 3). Numbers above the graph correspond to minimal inhibitory concentrations (MIC) of NaCl to the growth of pure cultures in R2 medium.

Figure 4: Per-cycle survival rate of cells subjected to freeze-thaw. Survival was determined over 6 cycles of freeze-thaw at maximum, and average survival rates per cycle are shown. Viability was assayed by culture on R2A medium at 17°C. Asterisks correspond to significant differences between groups for each strain (p-values comprised between 0.0003 and 0.027). Error bars represent standard deviations from the means (n = 3).

Table 1: Strains investigated in this study and some of their physiological characteristics.

Strain identifier	Taxonomic affiliation	GenBank Accession #	Phylum	Pigmentation of colonies	Ice nucleation activity in water	Proportion of clouds in which representatives of the genus were found*
5b-11	*Arthrobacter* sp.	DQ512758	Actinobacteria	Yellow	Inactive	13%
13b-2	*Pseudomonas syringae*	DQ512785	Gamma-Proteobacteria	None	Active at -5°C	58%
24b-2	*Dioszegia hungarica*	JF706549	Basidiomycota	Pink	Inactive	71%
32b-11	*Sphingomonas* sp.	HQ256831	Alpha-Proteobacteria	Orange	Inactive	46%
32b-74	*Pseudomonas syringae*	HQ256872	Gamma-Proteobacteria	None	Active at -3°C	58%

* *Vaïtilingom et al.* (2012)

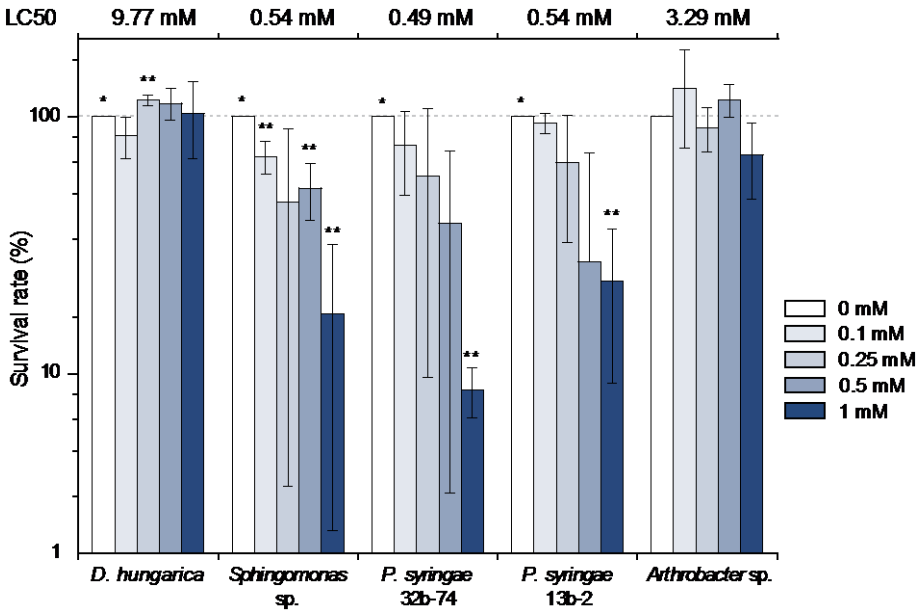


Figure 1: Survival rate of cells exposed to H_2O_2 for 90 min. Viability was assayed by culture on R2A medium at 17°C. Asterisks indicate significant differences between groups for each strain (p-value comprised between 0.002 and 0.041). Error bars represent standard deviations from the means (n = 3). LC50 values extrapolated from these results, *i.e.* the H_2O_2 concentration that would kill 50% of the cells, are presented on the top of the figure.

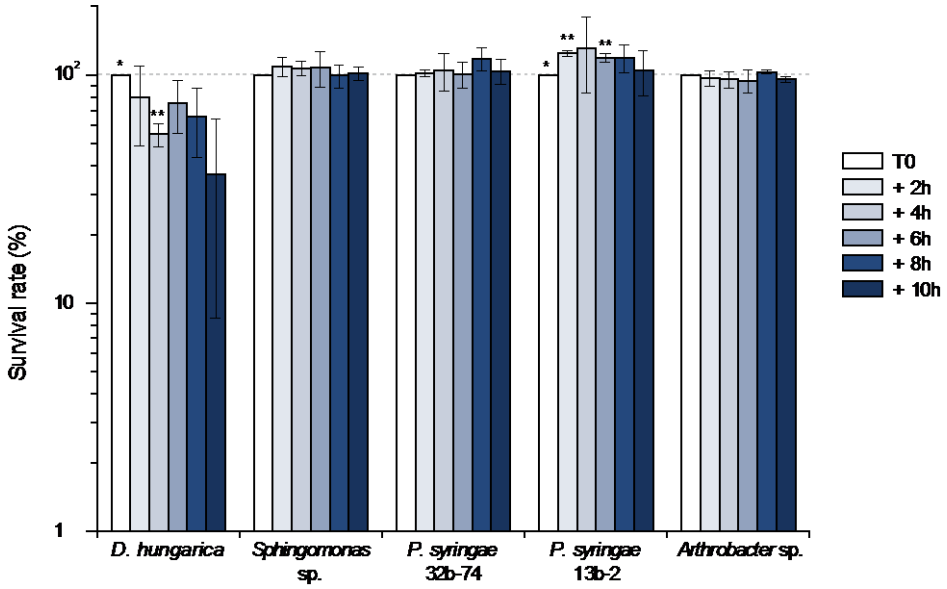


Figure 2: Survival rate of cells exposed to solar radiation for 0 to 10 hours at 5°C, relatively to controls incubated in the dark. Viability was assayed by culture on R2A medium at 17°C. Asterisks indicate significant differences between groups for each strain (p-value comprised between 0.007 and 0.023). Error bars represent standard deviations from the means (n = 3).

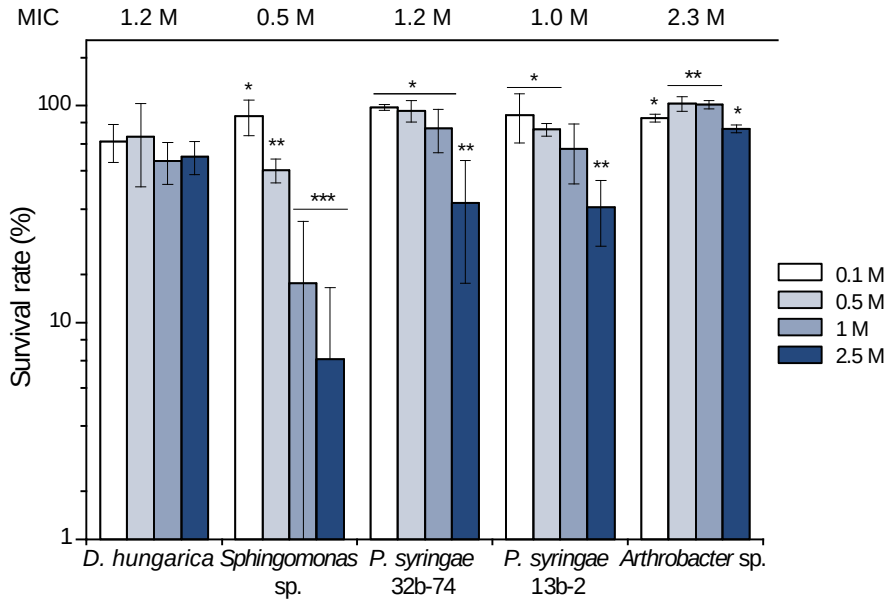


Figure 3: Survival rate of cells after hyperosmotic and hypoosmotic shocks. The concentration reached during hyperosmotic shock is indicated by the grayscale, and "0.1 M" corresponds to the experimental control. Viability was assayed by culture on R2A medium at 17°C. Asterisks correspond to significant differences between groups for each strain (p-values comprised between 0.0003 and 0.050). Error bars represent standard deviations from the means (n = 3). Numbers above the graph correspond to minimal inhibitory concentrations (MIC) of NaCl to the growth of pure cultures in R2 medium.

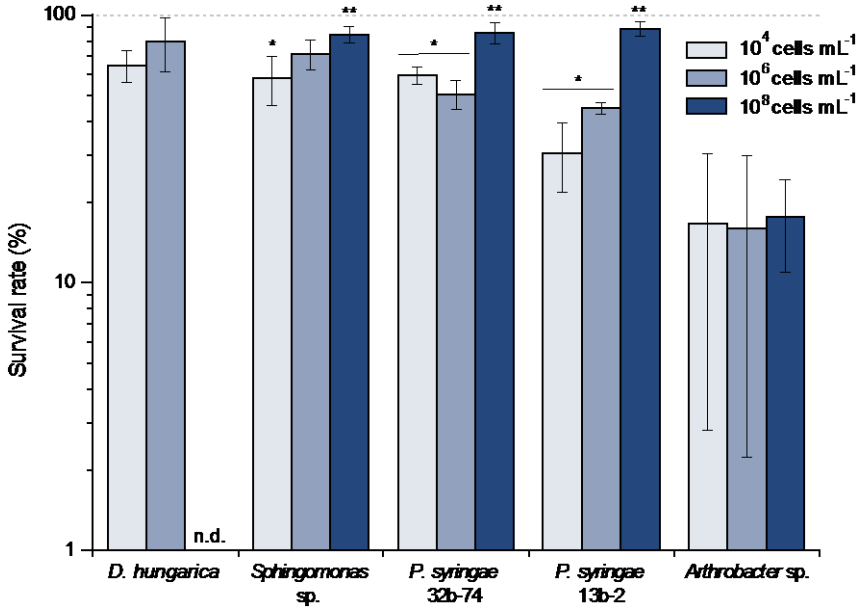


Figure 4: Per-cycle survival rate of cells subjected to freeze-thaw. Survival was determined over 6 cycles of freeze-thaw at maximum, and average survival rates per cycle are shown. Viability was assayed by culture on R2A medium at 17°C. Asterisks correspond to significant differences between groups for each strain (p-values comprised between 0.0003 and 0.027). Error bars represent standard deviations from the means (n = 3).

Supportive information to "Clouds as environmental filters: survival of microbial isolates to the main stress factors encountered in clouds" by Joly et al.

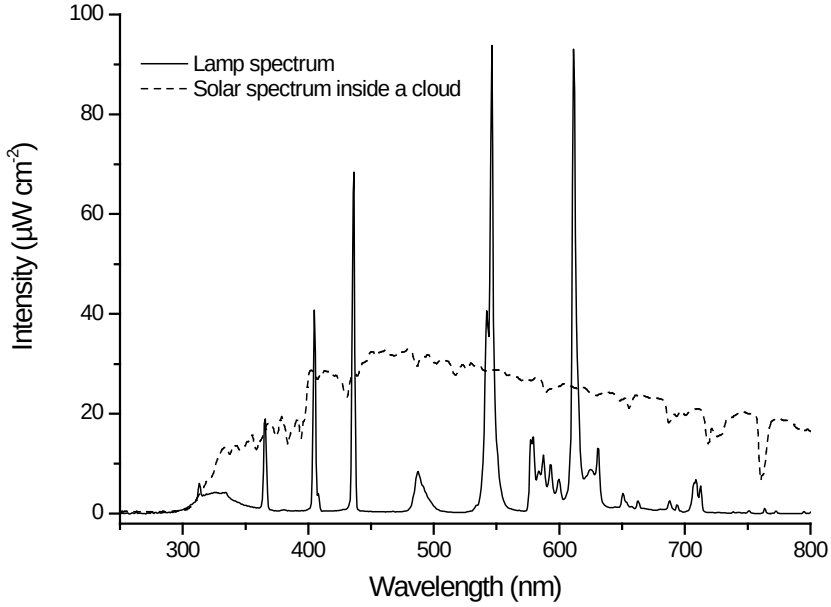


Figure S1: Light spectra emitted by the Repti Glo 5.0 lamp used for sunlight stress experiments and sun inside a cloud. Solar spectrum was measured in cloudy air the 16 October 2013 at 3:00 pm on the top of the puy de Dôme (1465 m.a.s.l., France).

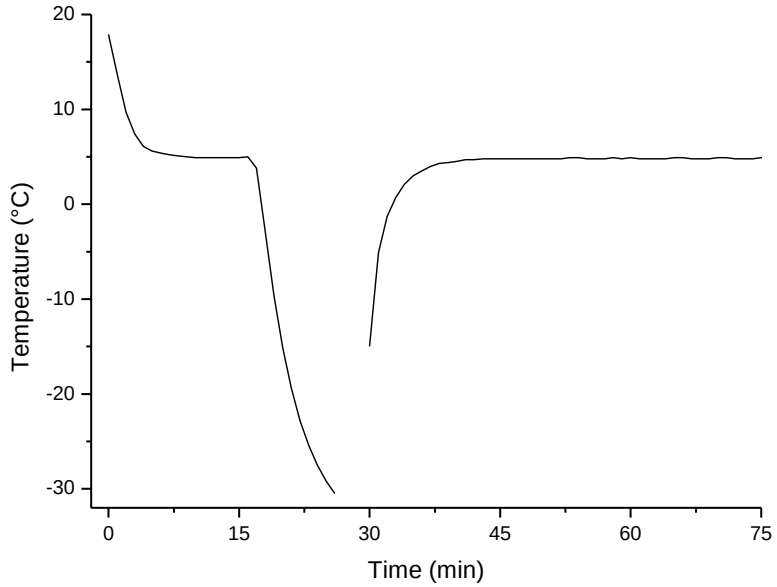


Figure S2: Temperature recording during the first freeze-thaw cycle (Ebro EBI 20-IF); cells were incubated 15 min at 5°C before being subjected to six cycles of 12 minutes at -40°C followed by 48 minutes at 5°C. Curve interruption is the result of temperature below detection limit (-30°C).

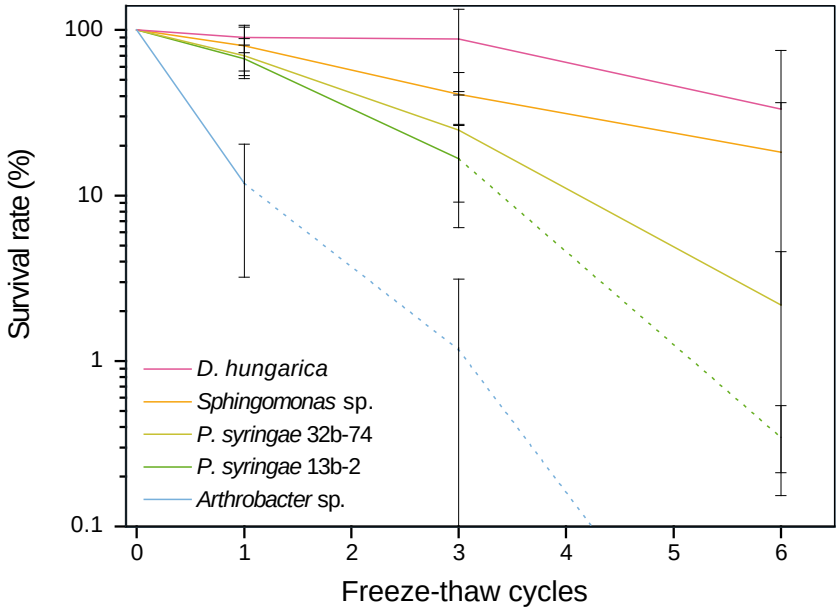


Figure S3: Survival rate of cells as a function of the number of freeze-thaw cycles they were subjected to (initial cell concentration: 10^6 cells mL^{-1}). Viability was assayed by culture on R2A medium at 17°C. Dotted lines correspond to upper estimates of cell concentration due to their absence of growth despite serial dilution.

4. Conclusion

Dans cette étude, la survie de cinq souches microbiennes isolées d'eau de nuage (*Dioszegia hungarica*, *Sphingomonas* sp., *Arthrobacter* sp. et deux *Pseudomonas syringae*) face à quatre facteurs de stress atmosphériques a été mesurée. Il a ainsi été mis en évidence que la lumière solaire n'a pas d'effet délétère sur les cinq populations microbiennes d'étude après 10 heures d'exposition. De même, dans des concentrations assimilables à celles rencontrées dans les nuages, voire surestimées, le peroxyde d'hydrogène n'a que peu d'impact sur la viabilité de ces microorganismes : au minimum, 70% des cellules demeurent viables après une exposition de 90 minutes à 0,1 mM de peroxyde d'hydrogène. En revanche, en fonction des souches, les taux de mortalité suite à un choc osmotique ou au gel et au dégel peuvent être plus importants : les trois souches de bactéries à Gram négatif présentent des taux de mortalités supérieurs à ceux de *Dioszegia hungarica* et *Arthrobacter* sp. aux variations d'osmolarité et, à l'inverse, *Arthrobacter* sp est la souche la plus sensible au gel et au dégel tandis que *Sphingomonas* sp et *D. hungarica* sont les plus résistantes.

De ces expérimentations, *D. hungarica* apparaît comme la souche la mieux adaptée aux différents stress de l'atmosphère. Ceci se confirme par sa forte présence parmi les microorganismes cultivables dans les nuages. En effet, il s'agit du genre microbien le plus fréquemment identifié dans les prélèvements de nuage au puy de Dôme avec des cellules affiliées à ce genre identifiées dans 71% des prélèvements (*Vaïtilingom et al.*, 2012).

Les cinq souches d'études ont été sélectionnées afin d'offrir une bonne représentation des caractéristiques phénotypes des souches cultivables issues de la phase aqueuse des nuages. Cependant, ni le caractère pigmenté des souches, ni leur activité glaçogène n'a été identifié comme un facteur favorisant la survie des cellules.

L'ensemble de ces résultats montrent que, globalement, dans des conditions proches de celles rencontrées dans l'atmosphère, les cinq souches d'étude sont relativement bien adaptées aux différents stress testés. Ceci est en accord avec les différentes mesures de viabilité qui ont été effectuées sur l'eau des nuages et qui ont mis en évidence que la majorité des microorganismes sont métaboliquement actifs. Les microorganismes rencontrés dans les nuages étant aérosolisés depuis différents milieux où ils sont également soumis à des stress semblables (par exemple, la lumière solaire pour les organismes à la surface des différents écosystèmes, les cycles de gel et de dégel, les chocs osmotiques lors de phénomène de pluie ou de dessiccation), il est possible que ces microorganismes aient déjà subi une première sélection avant même leur émission dans l'atmosphère.

Chapitre IV : Activité glaçogène des bactéries et des particules biologiques dans l'eau de nuage

1. Introduction

En raison de leur capacité à induire le gel de l'eau à des températures supérieures aux autres noyaux glaçogènes, les particules biologiques, et plus particulièrement les bactéries, pourraient jouer un rôle important sur la formation de cristaux de glace dans les nuages et par conséquent, sur les mécanismes de formation de précipitations. Cet impact potentiel est aujourd'hui au cœur des interrogations des physiciens de l'atmosphère comme en témoigne le nombre croissant de travaux récents simulant l'impact des microorganismes sur les processus microphysiques nuageux (*Phillips et al.*, 2009; *Hoose et al.*, 2010; *Sesartic et al.*, 2012; *Burrows et al.*, 2013; *Hazra*, 2013; *Hummel et al.*, 2013). Toutefois, en raison du manque actuel de données expérimentales sur le milieu nuageux, la plupart de ces modèles sont basés sur des observations de bactéries glaçogènes issues de cultures en laboratoire ou sur des mesures d'activité glaçogène d'autres milieux aqueux atmosphériques notamment les précipitations (neige, pluie). Seules deux études *in situ* ont mesuré une activité biologique dans des prélèvements de nuages (*Pratt et al.*, 2009; *Cziczo et al.*, 2013). Dans les deux cas, les prélèvements ont été effectués dans des cirrus à des températures voisines de -30°C et les conclusions de ces travaux mettent en avant des proportions en noyaux glaçogènes biologiques très variables : *Pratt et al.* (2009) ont identifié 33 % des noyaux glaçogènes comme biologiques tandis que les travaux de *Cziczo et al.* (2013) n'ont mis en évidence qu'une part moindre (< 1 %). Il convient cependant de noter qu'aux températures considérées, de nombreux composés sont connus pour avoir une activité glaçogène (minéraux, suies, *etc.*). Si les particules biologiques jouent un rôle dans la nucléation de la glace dans les nuages, il est probable que cette action se passe à haute température, *i.e.* supérieures à -10°C, en raison de leur activité unique à ces températures. Elles pourraient alors permettre d'induire le gel des gouttelettes d'eau à des altitudes moindres qu'en leur absence (*Hoose et al.*, 2010).

Jusqu'à maintenant les tentatives d'isoler des bactéries glaçogènes dans l'eau des nuages se sont soldées par un échec (*Ahern et al.*, 2007). Pourtant, leur identification dans les précipitations (grêlons, pluie et neige) laisse supposer qu'elles sont également présentes dans les nuages. Dans le but d'identifier des bactéries glaçogènes dans l'eau des nuages, la banque de souches microbiennes réalisée à l'ICCF depuis 2004 a été criblée. Les souches sélectionnées pour les tests d'activité ont été choisies selon leur appartenance à des genres préalablement connus pour être glaçogènes. Une fois identifiées, certaines de ces souches bactériennes ont été aérosolisées dans la chambre à nuage AIDA (Karlsruhe, Allemagne). Leur survie ainsi que leur comportement glaçogène a été suivi lorsqu'elles se retrouvent dans des conditions nuageuses (conditions multiphasiques).

Enfin, dans le but de décrire quantitativement et qualitativement les noyaux glaçogènes dans les nuages, des prélèvements ont été réalisés au sommet du puy de Dôme. Leur activité glaçogène totale et biologique a été étudiée entre -3°C et -14°C. Ces données ont ensuite été intégrées à un

modèle global simulant la concentration en bactéries afin d'estimer la quantité et la répartition spatial des bactéries glaçogènes en fonction de la latitude et de l'altitude.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Etude de l'activité glaçogène par la méthode de « drop-freezing »

2.1.1. Principe

Cette méthode a été décrite pour la première par *Vali* (1971) et consiste à exposer un ensemble de gouttes de volume connu à des températures négatives décroissantes. Pour chaque température la quantité de gouttes liquides et gelées est dénombrée et le nombre de noyaux glaçogènes actifs est estimé par l'équation suivante :

$$C_{IN} = \frac{Ln\, N_{total} - N_{liquides}}{V \times D_f} \quad \text{Equation (3)}$$

où C_{IN} est le nombre de noyaux glaçogènes à la température T, N_{total} est le nombre total de gouttes, $N_{liquides}$ est le nombre de gouttes liquides à la température T, V est le volume des gouttes (mL) et D_f est le facteur de dilution.

Deux conclusions peuvent être tirées de cette équation :

Pour calculer la concentration en noyaux glaçogènes d'une solution, il est nécessaire qu'au moins une des gouttes reste liquide. Dans le cas contraire, on peut conclure que la concentration en noyaux glaçogènes est supérieure à la limite de détection.

Le volume et le nombre de gouttes définissent d'une part, la limite haute de détection des noyaux glaçogènes, *i.e.* la concentration maximale mesurable, et d'autre part, la résolution des mesures. La **Figure 37a** illustre les limites de détection des noyaux glaçogènes en fonction du nombre total de gouttes et du volume des gouttes. Ainsi, plus le volume des gouttes est faible, plus la concentration maximale mesurable est grande. De même, plus le nombre de gouttes est important, plus la limite de détection est haute. La **Figure 37b** décrit les variations de résolutions des mesures en fonction du nombre de gouttes étudiées : plus le nombre de gouttes est important, plus la résolution des mesures est grande.

Récemment, il a été montré que la méthode du « drop freezing » présente peu d'artefacts pour l'étude de noyaux glaçogènes actifs à haute température comme les bactéries (pas d'influence du support des gouttelettes) et peut donc être considérée comme une méthode fiable (*Hartmann et al.*, 2013).

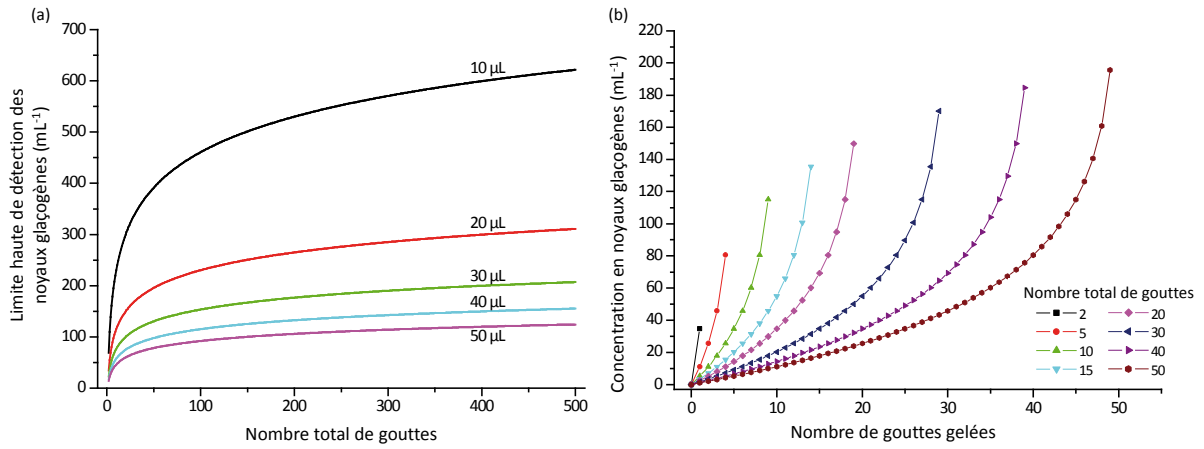


Figure 37 *: (a) Limite haute de détection des noyaux glaçogènes, i.e. concentration maximale mesurable, en fonction du nombre de gouttes étudiées et de leur volume ; (b) Résolution des mesures en fonction du nombre de gouttes étudiées, le volume a été considéré comme fixe et égal à 20 µL.*

De plus, cette méthode a de nombreux avantages. Tout d'abord, le matériel nécessaire est relativement restreint contrairement aux autres méthodes (prélèvements par avion, utilisation de chambre à nuages) et la mise en place expérimentale est aisée et rapide. De plus, cette technique permet de renseigner non pas sur l'activité à une seule température mais sur une gamme complète pouvant aller généralement de 0°C à environ -20°C.

2.1.2. Matériel et Méthodes

Afin de soumettre les gouttes à des températures négatives décroissantes, nous avons utilisé un cryostat (**Figure 38**) : il s'agit d'un bain rempli d'une solution demeurant liquide même à très basses températures (~ -15 à 20°C). Généralement, ce liquide est constitué d'éthylène glycol ou d'un mélange d'éthanol et de méthanol. Les gouttes sont alors déposées sur une surface en contact avec ce liquide.

Pour les étapes de criblage présentées dans cette thèse, les gouttes ont été déposées sur la surface d'un plateau en aluminium stérilisé par chaleur sèche (220°C, 90 min ; **Figure 39a**). Ce matériel permet d'étudier un grand nombre d'échantillons en parallèle. Toutefois, la présence d'impuretés sur le plateau ou le possible dépôt de poussières durant l'expérience augmentent le risque de gouttes faussement positives, *i.e.* gelées malgré l'absence de noyaux glaçogènes dans le liquide testé.

Pour cette raison, des microtubes pour PCR (Polymerase Chain Reaction) stérilisés par autoclave ont été préférés pour des mesures plus précises. Il s'agit de tubes d'une capacité de 0,2 mL ayant une excellente conductivité thermique (**Figure 39b**). Grâce à leur bouchon, les gouttes sont à l'abri d'une contamination par l'air. De plus, ces tubes sont à usage unique assurant une propreté optimale.

Figure 38 *: Cryostat utilisé lors de la méthode du « drop freezing » dans cette thèse. Le liquide à l'intérieur du cryostat est de l'éthylène glycol, un antigel utilisé dans les systèmes de refroidissements automobiles.*

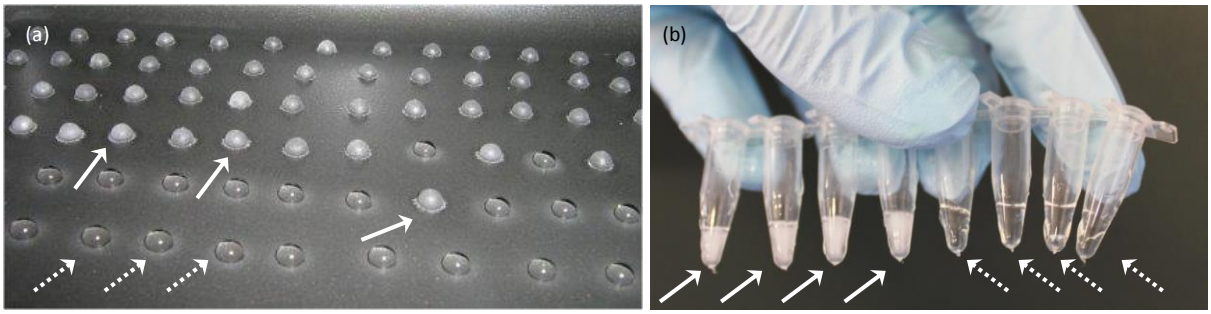


Figure 39 *: Observations des gouttes d'eau gelées durant la méthode du « drop freezing » (a) sur la surface d'un plateau en aluminium et (b) en microtubes pour PCR. Les flèches en trait plein indiquent des exemples de gouttes gelées tandis que celles en pointillés indiquent des gouttes liquides.*

Les conditions expérimentales choisies sont les suivantes :

- le volume des gouttes a été fixé à 20 µL ;
- le nombre de gouttes étudiées a été ajusté entre 24 et 160 selon les expériences pour offrir un compromis entre la précision obtenue et le nombre d'expérience effectuées en parallèle ;
- l'activité glaçogène a été déterminée entre -2 et -14°C avec un intervalle de température de 1°C ;
- les gouttes liquides et gelées ont été comptées après 8 minutes passées à chaque température.

Lors de l'étude de l'activité glaçogène de souches pures isolées des nuages, des dilutions en série ont été également effectuées afin de cibler des gammes plus larges de concentrations en noyaux glaçogènes. En général, les concentrations cellulaires s'étendaient de 10^2 à 10^9 bactéries mL^{-1} soit environ 2 à 2 10^7 bactéries par gouttes.

2.2. Etude de l'activité glaçogène en chambre à nuages

2.2.1. Principe

Les chambres à nuages sont des enceintes qui, en jouant sur les paramètres thermodynamiques (humidité relative proche de 100 %, variations de pression et de température) permettent de générer des nuages et d'étudier leur comportement dans des conditions contrôlées. Les chambres à nuages sont, par exemple, utilisées pour étudier les phénomènes de condensation et de congélation homogènes ainsi que l'activité de condensation ou glaçogène de particules rencontrés dans l'atmosphère (*e.g Garvey*, 1975; *Hagen et al.*, 1989; *Stratmann et al.*, 2004; *Benz et al.*, 2005; *Möhler et al.*, 2008).

2.2.2. La chambre à nuage AIDA

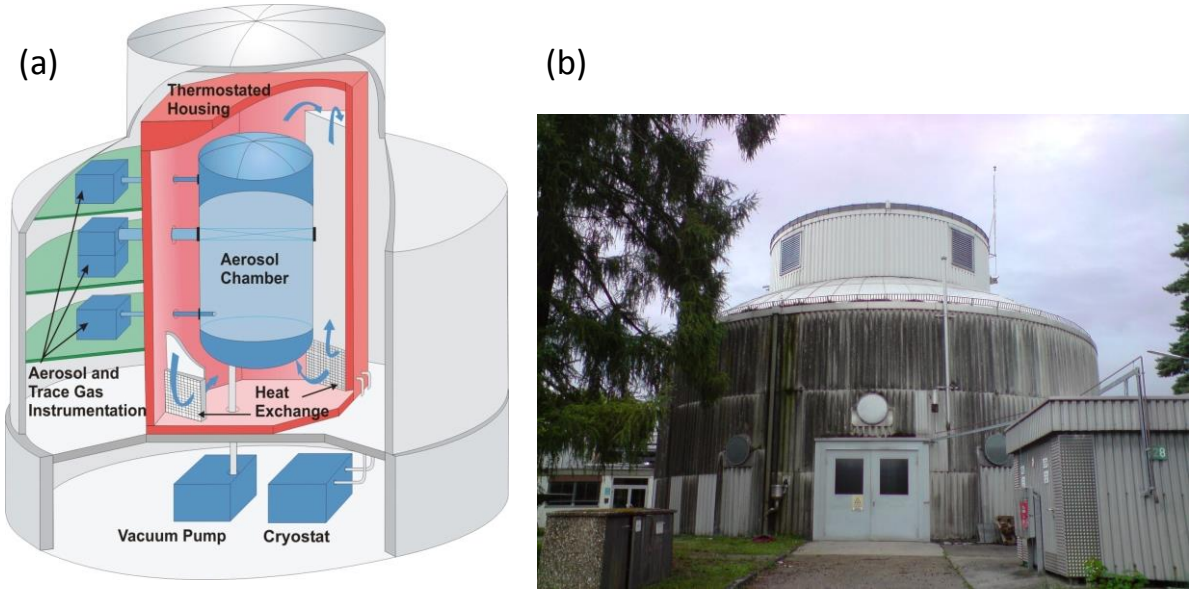


Figure 40 *: Chambre à nuage AIDA localisée à Karlsruhe (Allemagne). (a) Structure du bâtiment, schéma issu du site web http://www.imk-aaf.kit.edu ; (b) Bâtiment vu de l'extérieur.*

Durant cette thèse, les propriétés glaçogènes des bactéries isolées de nuage ont été étudiées dans la chambre à nuage AIDA (Aerosol Interaction and Dynamics in the Atmosphere) à Karlsruhe (Allemagne) dans le cadre de la campagne BIO-06 du projet BIOCLOUDS.

La chambre est constituée d'une enceinte cylindrique d'aluminium de 7 m de hauteur et de 4 m de diamètre pour un volume total de 84 m^3 (**Figure 40**). La pression, la température et l'humidité relative sont mesurées à tout moment. A l'intérieur de la chambre, la pression peut atteindre des valeurs comprises entre 1 hPa et 1000 hPa et la température peut varier entre -90°C et 60°C ce qui permet de recréer une vaste gamme de conditions thermodynamiques proches de celles relevées en conditions atmosphériques.

Durant la campagne de mesures, plusieurs instruments ont été raccordés à la chambre permettant de suivre la distribution en taille des particules, le nombre de gouttelettes d'eau formée, l'apparition de cristaux de glace, la composition des cristaux de glace, *etc*.

Avant l'injection dans la chambre, les bactéries ont été mises en suspension dans de l'eau déminéralisée et placées à 4°C pendant plusieurs heures afin de favoriser l'expression des protéines glaçogènes. Elles ont ensuite été aérosolisées dans la chambre puis le nuage a été généré par expansion volumique de la chambre, *i.e.* diminution de la pression. En général, durant cette campagne de mesures, les nuages ont été produits pour des températures supérieures ou égales à -20°C.

La concentration en bactéries à l'intérieur de la chambre a été suivie par des prélèvements d'air lorsque la pression interne était identique à la pression à extérieure de la chambre, c'est-à-dire avant ou après l'expansion volumique. Les prélèvements ont été effectués grâce à un impinger SKC Biosampler (**Figure 41**), un instrument spécialement conçu pour le prélèvement de bioaérosols dans l'air permettant le piégeage des aérosols dans un liquide et limitant la ré-aérosolisation. L'entrée de l'impinger était reliée à l'intérieur de la chambre et la sortie d'air était raccordée à une pompe à vide (débit : 12,5 L min^{-1} pendant 10 min).

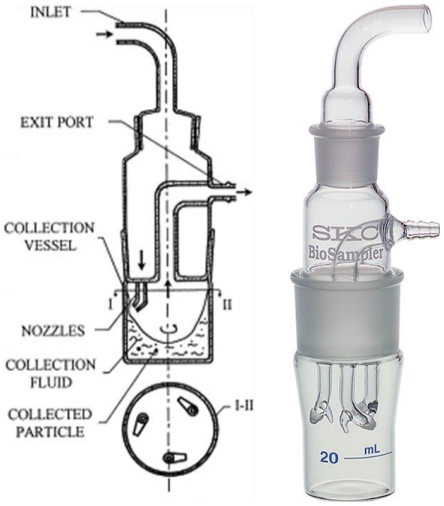


Figure 41 *: Principe et vue d'un impinger conçu pour le prélèvement de bioaérosols (*Lin et al.*, 1999).*

3. Résultats

Dans cette partie, les résultats sont présentés sous la forme de trois articles scientifiques. Le premier s'est intéressé à identifier des bactéries glaçogènes parmi la banque de souches établie à l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand. Le deuxième s'est penché sur l'étude du comportement des bactéries glaçogènes dans des conditions atmosphériques réalistes *via* l'utilisation de la chambre à nuages AIDA. Enfin, le dernier s'est attaché à quantifier l'activité glaçogène de l'eau de nuage

prélevée au sommet du puy de Dôme et à déterminer la composition de ces noyaux glaçogènes (biologiques ou non).

Dans ces travaux, j'ai participé :

- aux prélèvements sur le terrain avec L. Deguillaume ;
- aux expériences en laboratoire et en chambre à nuages avec P. Amato ;
- à la rédaction des articles avec P. Amato.

Ces résultats ont ou seront été présentés sous forme de poster :

- au 9ème congrès de la S**ociété Française de Microbiologie** (SFM) à Lille (France) en Février 2013 sous le titre « Biological ice nucleation activity in cloud water ». (Présentateur : M. Joly). Ce poster a été récompensé par un 1er prix de la part de la SFM.
- à l'**European Meeting on Environmental Chemistry** (EMEC14) qui se tiendra en Décembre 2013 à Budva (Montenegro) sous le titre « Biological ice nucleation activity in cloud water ». (Présentateur : A.-M. Delort) ;
- au meeting d'automne de **l'American Geosciences Union** (AGU) à San Fransisco (U.S.A.) en Décembre 2013 sous le titre « Biological ice nucleation activity in cloud water » (Présentateur : A.-M. Delort).

Ils ont également été présentés sous forme de communications orales dans les workshops suivants :

- au **workshop Bioaerosol Effects on Clouds** qui s'est déroulé à Steamboat Springs (Colorado, USA) en Août 2012 sous le titre « Microbial contribution to chemistry and ice-nucleation processes in cloud water at the puy de Dôme (France) » (Orateur invité : P. Amato) ;
- au **workshop BIOCLOUDS** qui s'est tenu à Karlsruhe (Allemagne) en Mars 2013 sous les titres « Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water at the puy de Dôme station » et « Survival and ice nucleation activity of bacterial aerosols in AIDA » (Orateurs : M. Joly et P. Amato) ;
- au **workshop Atmospheric Ice Nucleation** qui s'est tenu à Vienne (Autriche) en Avril 2013 sous le titre « Microbial ice nucleators in cloud water at the puy de Dôme (France) » (Orateurs : P. Amato).

Enfin, ces résultats ont été ou seront présentés sous forme de communications orales dans les congrès francophones ou internationaux suivants :

- à l'**assemblée générale de l'European Geosciences Union** (EGU) qui qui s'est tenu à Vienne (Autriche) en Avril 2013 sous le titre « Microbial ice nucleators in cloud water at the puy de Dôme (France) » (Orateurs : M. Joly) ;

- à la **conférence annuelle de l'American Association for Aerosol Research** (AAAR) qui s'est tenu en Octobre 2013 à Portland (U.S.A) sous le titre « Biological Ice Nucleation Activity in Cloud Water » (Orateur : A.-M.Delort) ;
- au congrès **MicrobAero 2013** qui s'est déroulé à la Bourboule (France) en Octobre 2013 sous le titre «Etude des noyaux glaçogènes microbiens dans l'eau de nuage au puy de Dôme (France) » (Orateur : M. Joly) :;
- au 6ème colloque de **l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne** (AFEM) qui se déroulera au mois d'Octobre 2013 à Parent (France) sous le titre « Microorganismes des nuages: acteurs des processus atmosphériques? » (Orateur invite : A.-M. Delort).

3.1. "Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water", article publié dans Atmospheric Environment

Atmospheric Environment 70 (2013) 392–400

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Atmospheric Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atmosenv

Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water

Muriel Joly [a,b,c,d], Eléonore Attard [a,b], Martine Sancelme [a,b], Laurent Deguillaume [c,d], Caroline Guilbaud [e], Cindy E. Morris [e], Pierre Amato [a,b,*], Anne-Marie Delort [a,b]

[a] Clermont University, Blaise Pascal University, Institute of Chemistry of Clermont-Ferrand (ICCF), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France
[b] CNRS, UMR 6296, ICCF, BP 80026, F-63171 Aubière, France
[c] Clermont University, Blaise Pascal University, Observatory of Physics of the Globe of Clermont-Ferrand (OPGC), Laboratory of Physical Meteorology (LaMP), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France
[d] CNRS, UMR 6016, LaMP/OPGC, BP 80026, F-63171 Aubière, France
[e] INRA, UR 407 Plant Pathology Research Unit, 84140 Montfavet, France

HIGHLIGHTS

- ► Ice nucleation active (INA) bacteria were recovered from cloud water.
- ► 16% of the *Pseudomonas*-like bacteria isolated from cloud water are INA.
- ► Active strains identified as *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas* sp. and *Pseudoxanthomonas* sp.
- ► The *P. syringae* strains from clouds belong to rare clades in the environment.
- ► The number of bacterial IN in cloud water was estimated to fall between 0 and 500/mL.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 September 2012
Received in revised form
11 January 2013
Accepted 14 January 2013

Keywords:
Cloud
Bacteria
Ice nucleation
Pseudomonas
Bioprecipitation

ABSTRACT

Some Gamma–Proteobacteria can catalyze ice formation thereby potentially contributing to the induction of precipitation in supercooled clouds and subsequently to bacterial deposition. Forty-four bacterial strains from cloud water were screened for their capacity to induce freezing. Seven strains (16%) were active at −8 °C or warmer and were identified as *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas* spp. and *Pseudoxanthomonas* sp. Phylogenetic analysis revealed that the *P. syringae* strains in clouds at the Puy de Dôme belonged to clades that are among the most infrequently detected in the environment, while widespread clades were absent suggesting some extent of selection or unusual biogeography of the bacteria at the sampling site. Three strains induced freezing at −3 °C while the others nucleated ice at −4 °C to −6 °C. The freezing profiles revealed that the peaks of activity were centered around −3.5 °C, −5 °C and/or −8.5 °C depending on the strain. The frequency of ice-nuclei (IN) per cell at −6 °C was generally below 0.5% and reached up to 4.2% in one strain. We estimated that clouds influenced by vegetated areas would carry between less than 1 and ~500 bacterial IN mL^{-1} of water active between −3 °C and −10 °C depending on the season. These data will contribute to modeling the impact of bacterial IN on precipitation at regional scales.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ice nucleation (IN) activity, *i.e.* the capacity to induce the crystallization of supercooled water (a metastable state whereby water is liquid at subzero temperatures), has been reported in a variety of microorganisms including diatoms (Knopf et al., 2011), pollen (Diehl et al., 2001), fungi (e.g. Iannone et al., 2011) and bacteria (e.g. Maki et al., 1974; Vali et al., 1976). In bacteria, this property is conferred by a single gene (for example, inaZ in *Pseudomonas syringae*; Green and Warren, 1985) coding for a membrane protein that acts as a template for the arrangement of water molecules in crystals. Gamma–Proteobacteria affiliated to the genera *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Erwinia* and *Xanthomonas* are the most efficient IN active (INA) bacteria described so far: some of them can catalyze freezing of supercooled water at a temperature as warm as −2 °C (e.g. Cochet and Widehem, 2000). These bacteria are wide-spread on plants, except for coniferous trees; they are often plant pathogens and can cause frost injury thereby

* Corresponding author. Clermont University, Blaise Pascal University, Institute of Chemistry of Clermont-Ferrand (ICCF), BP 10448, F-63171 Clermont-Ferrand, France. Tel.: +33 (0)4 73 40 52 84; fax: +33 (0)4 73 40 77 17.
E-mail address: pierre.amato@univ-bpclermont.fr (P. Amato).

1352-2310/$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.01.027

assuring entry into the leaf tissue (Lindow et al., 1978). Their presence and particularly that of the well-known epiphytic bacterium *P. syringae* has been reported in a variety of habitats associated with the water cycle, from vegetation to precipitation at concentrations ranging from $\sim 10^2$ to $\sim 10^5$ L^{-1} in freshwater environments (Constantinidou et al., 1990; Hirano et al., 1996; Morris et al., 2008; Šantl-Temkiv et al., 2009).

In the atmosphere as aerosols, such bacteria could play important roles by nucleating ice in supercooled clouds, which generally results in precipitation at mid-latitudes (Lohmann and Feitcher, 2005). Hence, it was proposed that INA bacteria in clouds could contribute to the induction of precipitation and cause at the same time their own redeposition (Sands et al., 1982; Morris et al., 2010). The capacity of INA bacteria to glaciate clouds was demonstrated in cloud chamber experiments (Maki and Willoughby, 1978; Möhler et al., 2008), but numerical simulations suggested that their presence in the atmosphere has probably no impact on the precipitation rate at the global scale, which does not exclude the existence of regional or local effects (Hoose et al., 2010; Sesartic et al., 2011). Within this context, there is still considerable debate about the extent of the importance of INA bacteria in the atmosphere and about the influence that the capacity to induce freezing could play on the distribution of bacteria between the different compartments of the water cycle. A substantial effort has been made over the last few years in order to detect, characterize and quantify INA particles and bacteria in the atmosphere. Observations indicated that about one third of the ice crystals sampled by aircraft at high altitude in a cloud event over Wyoming contained a solid residue with a biological signature (Pratt et al., 2009). In freshly-fallen snow collected worldwide, a large fraction (up to 100%) of the particles active as ice nuclei at temperatures of −7 °C or warmer were biological in origin, of which up to 85% were lysozyme-sensitive and assumed to be bacterial cells (Christner et al., 2008a). Moreover, rain invariably contained higher proportions of INA bacteria than air at the same locations (Stephanie and Waturangi, 2011), and contrarily to vegetation and water, all strains of *P. syringae* isolated from rain and fresh snow by Morris et al. (2008) were INA. Despite the fact that clouds are key components in the questions raised by the presence of INA bacteria in the atmosphere, to our knowledge only Ahern et al. (2007) targeted them in clouds collected in Scotland, but without success.

We reported in the past the presence of *Pseudomonads* species in cloud water samples collected at the Puy de Dôme summit, France (Amato et al., 2005, 2007; Vaïtilingom et al., 2012), but their ice nucleation activity was not investigated. Here, we tested 44 of these Gamma–Proteobacteria isolated from 14 individual cloud water samples for their capacity to catalyze the formation of ice. The ice nucleation frequency profiles of the 7 strains detected positive were established, thereby allowing us to estimate the concentration of INA cells in an average cloud over rural landscapes such as the Puy de Dôme.

2. Material and methods

2.1. Cloud water samples and microbial strains

A total of 257 bacteria isolated from 25 distinct cloud water samples collected at the Puy de Dôme site (1465 m a.s.l., Central France) were investigated: 71 strains reported in Amato et al. (2007), 185 strains reported in Vaïtilingom et al. (2012) and 1 strain not yet reported. Among them, we identified 44 *Pseudomonas*-like bacterial species potentially INA: 8 strains were isolated in 2003–2004 (reported in Amato et al., 2007), 35 strains were isolated in 2008–2010 and 1 additional strain was isolated later in 2011. These are listed in Table 1, along with the accession numbers of their 16S rRNA gene sequences when available; they were identified as *Pseudomonas* sp. (10 strains), *P. syringae* (9 strains), *Pseudomonas graminis* (5 strains), *Pseudomonas fluorescens* (3 strains), *Pseudomonas trivialis* (2 strains), *Pseudomonas poae* (1 strain), *Pseudomonas reactans* (1 strain), *Pseudomonas veronii* (1 strain), *Pseudomonas viridiflava* (1 strain), *Erwinia* spp. (5 strains), *Xanthomonas* spp. (5 strains) and *Pseudoxanthomonas* sp. (1 strain). Details concerning the procedures of sampling, the abiotic characteristics of the samples including chemical composition, and the isolation and identification of the strains are given in the corresponding references. Briefly, sterile cloud droplet impactors installed at the summit of the Puy de Dôme were used for sampling. Viable microorganisms were recovered by platting of 0.1 mL of the samples on R2A (Reasoner and Geldreich, 1985; DIFCO), R2A + NaCl 0.4%, King's B (King et al., 1954), Sabouraud (DIFCO) or TSA (DIFCO) medium and incubating at 17 °C or 5 °C until appearance of colonies (typically 5 days at 17 °C or 8 days at 5 °C). *Pseudomonas*-like colonies (yellowish and smooth colonies, eventually fluorescent under UV light), *i.e.* the bacteria that were presumably INA, were then isolated on R2A medium at 17 °C. Stock cell suspensions were made from pure cultures in their stationary phase of growth in R2 medium (17 °C, 200 r.p.m.), supplemented with 10% glycerol (final concentration) and kept at −80 °C. Cultures for further investigations were then grown from these stocks. The taxonomic affiliations of the isolates were determined according to their 16S rRNA gene sequences, the GenBank accession numbers of which are given in Table 1.

2.2. Phylogenetic analyses

The phylogenetic context of fluorescent pseudomonads isolated from clouds was determined according to the similarity of DNA sequences of three housekeeping genes: *gyrB*, *cts* (*glt*) and *gapA* (*gap1*). PCR amplifications of gene fragments and subsequent sequencing were conducted as previously described by Morris et al. (2010). Phylogenetic relationships of strains from clouds were determined relative to the most detailed phylogeny of *P. syringae* published to date (Morris et al., 2010). DNA sequences of each of the gene fragments from 16 cloud strains were aligned with the corresponding sequences of 48 strains of *P. syringae* from crops and non-agricultural habitats and 3 strains of *P. fluorescens* (Morris et al., 2010). Alignment was achieved with the ClustalW routine and sequences were cut to equal lengths with DAMBE version 5.1.1 (Xia and Xie, 2001). The phylogenetic tree was constructed from the concatenated sequences of the three genes (1493 bases) according to the neighbor-joining method in MEGA, version 5 (Kumar et al., 1994) based on the Tamura-Nei model with gamma correction and 3000 bootstrap replicates. Strains were grouped into clades according to the previously described criteria (Morris et al., 2010).

2.3. Ice nucleation assays

The *Pseudomonas*-like bacteria isolated were first screened for ice nucleation activity at −8 °C using the drop-freezing method described by Vali (1971). Cells were suspended in sterile distilled water ($OD_{575\ nm}$ of 0.3–1.9) from R2A cultures at 17 °C and incubated in ice for 1 h to allow the expression of the IN protein. Five droplets of 20 μL of these cell suspensions were deposited on the surface of an aluminum plate floating on a cooling bath (model F34-ED, Julabo Colmar France) set at −8 °C. Controls consisting of sterile distilled water droplets were tested in parallel. Strains for which at least one droplet was visually frozen after 8 min were considered INA positive, whereas those for which none of the

Table 1
List of the 44 Gamma–Proteobacteria isolated from cloud water (Amato et al., 2007; Vaïtilingom et al., 2012) and tested for ice nucleation activity at −8 °C.

Most probable identification[a]	Strain[b]	Date of sampling	Recovery medium	GenBank accession number	Ice nucleation activity[c]	Reference
Erwinia billingiae	25b-7	2008, February 29th	R2A	HQ256807	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Erwinia billingiae	25b-11	2008, February 29th	TSA	HQ256802	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Erwinia billingiae	25b-13	2008, February 29th	Sabouraud	HQ256804	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Erwinia rhapontici	37b-4	2010, June 1st	R2A	JF706534	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Erwinia sp.	37b-9	2010, June 1st	R2A	JF706537	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Putative *Pseudomonas* sp.	36b-4	2010, March 31st	R2A	–	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas sp.	6b-4	2004, January 21st	R2A	DQ512766	–	Amato et al. (2007)
Pseudomonas sp.	14b-2	2004, September 23rd	R2A	DQ512788	–	Amato et al. (2007)
Pseudomonas sp.	14b-10	2004, September 23rd	R2A	DQ512794	–	Amato et al. (2007)
Pseudomonas sp.	24b-12	2008, January 17th	KBC	HQ260323	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas sp.	25b-5	2008, February 29th	TSA	HQ256806	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas sp.	27b-3	2009, October 9th	KBC	HQ256813	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas sp.	31b-4	2009, March 30th	TSA	HQ256826	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas sp.	32b-42	2009, November 3rd	TSA	HQ256842	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas sp.	38b-2	2010, June 8th	R2A	JF706540	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas fluorescens	36b-3	2010, May 31st	R2A	JF706525	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas fluorescens	36b-5	2010, May 31st	R2A	JF706526	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas fluorescens	37b-5	2010, June 1st	R2A	JF706535	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas graminis	13b-3	2004, July 8th	R2A	DQ512786	–	Amato et al. (2007)
Pseudomonas graminis	32b-55	2009, November 3rd	R2A	HQ256853	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas graminis	32b-60	2009, November 3rd	R2A	HQ256858	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas graminis	32b-66	2009, November 3rd	R2A-NaCl	HQ256863	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas graminis	38b-9	2010, June 8th	R2A	JF706541	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas poae	37b-2	2010, June 1st	R2A	JF706533	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas reactans	47b-7	2011, March 31st	R2A	JN176591	–	This study
Pseudomonas syringae	3b-1	2003, December 12th	R2A	DQ512737	–	Amato et al. (2007)
Pseudomonas syringae	12b-8	2004, June 24th	R2A	DQ512783	–	Amato et al. (2007)
Pseudomonas syringae	13b-2	2004, July 8th	R2A	DQ512785	+	Amato et al. (2007)
Pseudomonas syringae	32b-31	2009, November 3rd	KBC	JN176585	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas syringae	32b-67	2009, November 3rd	R2A-NaCl	HQ256864	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas syringae	32b-74	2009, November 3rd	R2A-NaCl	HQ256872	+	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas syringae	33b-2	2009, November 23rd	R2A	HQ256867	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas syringae	36b-1	2010, March 31st	R2A	JF706523	+	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas syringae	38b-10	2010, June 8th	KBC	JF706539	+	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas trivialis	32b-53	2009, November 3rd	R2A	HQ256851	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas trivialis	36b-2	2010, May 31st	R2A	JF706524	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas veronii	37b-8	2010, June 1st	R2A	JF706536	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudomonas viridiflava	14b-14	2004, September 23rd	R2A	DQ512797	–	Amato et al. (2007)
Xanthomonas sp.	32b-24	2009, November 3rd	TSA	JN176583	+	Vaïtilingom et al. (2012)
Xanthomonas campestris	32b-22	2009, November 3rd	TSA	JN176582	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Xanthomonas campestris	32b-32	2009, November 3rd	KBC	JN176586	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Xanthomonas campestris	32b-52	2009, November 3rd	R2A	HQ256850	+	Vaïtilingom et al. (2012)
Xanthomonas campestris	33b-3	2009, November 23rd	R2A	HQ256868	–	Vaïtilingom et al. (2012)
Pseudoxanthomonas sp.	32b-33	2009, November 3rd	KBC	HQ256838	+	Vaïtilingom et al. (2012)

[a] Based on 16S rRNA gene sequences.
[b] Each strain is designated as follows: "number of the cloud sample from which it was isolated"b-"number of the isolate within this sample".
[c] For $\sim 10^7$ cells tested at −8 °C.

droplets froze were considered deficient. As we observed that either all or none of the droplets actually froze, there was no ambiguity of the results.

The frequency profiles of the IN positive strains were then determined between −2 °C and −12 °C. Cell suspensions were prepared in sterile distilled water ($OD_{575\ nm}$ of 0.4–1.5) from 2 to 3-day old cultures on KB-agar at 17 °C and incubated in ice for 4–6 h. Care was taken to avoid exposition to warm temperatures during the preparation of the experiments, by using pre-ice chilled liquids and tube holders. Twenty-four droplets of 20 μL of 6 serial 10-fold dilutions of the suspensions were distributed over 0.2 mL microtubes and exposed to decreasing temperatures from −2 °C to −12 °C in the cooling bath. The number of frozen droplets was counted every 1 °C after 8 min of exposition at the given temperature. Microtubes were preferred here to the aluminum coated plate because they protect suspensions from air contamination and they are designed for high thermal conductivity. The concentrations of cells in the suspensions were determined by standard dilution-platting on R2A and incubation for 3 days at 17 °C for CFU counts. Frequency profiles were made in triplicates for each strain from independent experiments.

The concentration of ice nuclei C_{IN} at the temperature T in the suspensions was calculated using the equation from Vali (1971):

$$C_{IN} = \left[\ln\left(N_{total}\right) - \ln\left(N_{liquid}\right)\right]_T \Big/ V \times \left(1/D_f\right) \quad (1)$$

where N_{total} the total number of droplets (24), N_{liquid} the number of liquid droplets after 8 min at temperature T, V the volume of the droplets (20 μL) and D_f the dilution factor. The concentrations of IN in the cell suspensions were then normalized to cell concentrations assuming 100% culturability and expressed as frequencies.

2.4. Backtrajectory plots

Ninety-six-hour backward trajectories plots of the air masses collected at the Puy de Dôme (45.772° N, 2.9655° E, 1465 m a.s.l.)

Table 2
Distribution of the capacity to nucleate freezing at −8 °C among the taxons studied.

	Number of strains tested	Number of INA+ strains	% of INA+ strains
Pseudomonas syringae	8	4	50%
Pseudomonas graminis	5	0	0%
Pseudomonas fluorescens	4	0	0%
Other *Pseudomonas* spp.	16	0	0%
Total *Pseudomonas* spp.	**33**	**4**	**12%**
Erwinia spp.	5	0	0%
Xanthomonas spp.	5	2	40%
Pseudoxanthomonas sp.	1	1	100%
Total	**44**	**7**	**16%**

were made using the HYSPLIT model with the GDAS1 meteorological data archive and default settings (Draxler and Rolph, 2012).

3. Results and discussion

3.1. Screening for ice nucleation activity

Among the 257 bacteria isolated from cloud water since 2003 (Amato et al., 2007; Vaïtilingom et al., 2012), 44 strains were identified as Gamma–Proteobacteria potentially INA and were screened for this capacity. This revealed 7 strains INA at −8 °C (representing 2.7% of the total number of isolates, 16% of the Gamma–Proteobacteria tested), of which 4 were *P. syringae*, 2 were *Xanthomonas* spp. and 1 was *Pseudoxanthomonas* sp. (Table 1). No other species of *Pseudomonas* or any strain of *Erwinia* isolated in our study were active at this temperature (Table 2). In the cloud water samples from which the INA strains were recovered, they represented from 0% to 33.3% of the number of bacterial isolates (1 strain out of 3 isolates in sample #13 collected on 8 July 2004). Four of the 7 IN positive strains were recovered from a single sample collected in November 2009 (sample #32), and the other three were isolated in July 2004 and March and June 2010 (Table 1). This demonstrates that INA bacteria are present in clouds across different seasons at mid-latitudes over continental areas such as at the Puy de Dôme site. These samples were collected at ambient temperatures ranging from 5 °C to 14 °C, *i.e.* they were neither supercooled nor frozen. Using an approach similar to ours to find INA bacteria in precipitation in Denmark, Šantl-Temkiv et al. (2009) randomly isolated 69 strains and tested them for INA; 8 strains (12%) were active at temperatures between −2 °C and −10 °C. Morris et al. (2007) isolated 31 distinct strains of *P. syringae*-like bacteria from river epilithon; they found 13 strains (42%) able to nucleate ice at −5 °C or warmer. This is very close to the proportion of positive *P. syringae* strains that we observed in clouds (4 strains out of 8; 50%; Table 2).

The cumulative temperature-dependent frequencies of INA cells within a population of cells of each strain detected positive at −8 °C are shown in Fig. 1. Three strains (*P. syringae* 32b-74, 38b-10 and 32b-33) were active at −3 °C, while the others induced freezing at −4 °C to −6 °C (Table 3). The frequency of ice nuclei per cell at −6 °C depended on the strain and it ranged from 4.3×10^{-2} IN cell^{-1} (or 1 IN every ~23 cells) for *P. syringae* 32b-74 to 5.9×10^{-7} IN cell^{-1} (1 IN every ~1.7×10^{6} cells) for *P. syringae* 13b-2. Except for strain 32b-74 which was particularly active, these frequencies fall within ranges typically observed in cultures of INA bacteria; nevertheless it is possible that cells behave differently in their natural environment. Yankofsky et al. (1981) observed a frequency of 1 IN for 300 cells between −8 °C and −10 °C for cultured bacteria, and 1 IN for every 10^4 cells at −2 °C to −4 °C. Šantl-Temkiv et al. (2009) found frequencies ranging from 1 IN for about every 10^7–10^9 cells at −6 °C in bacteria isolated from rain in Denmark.

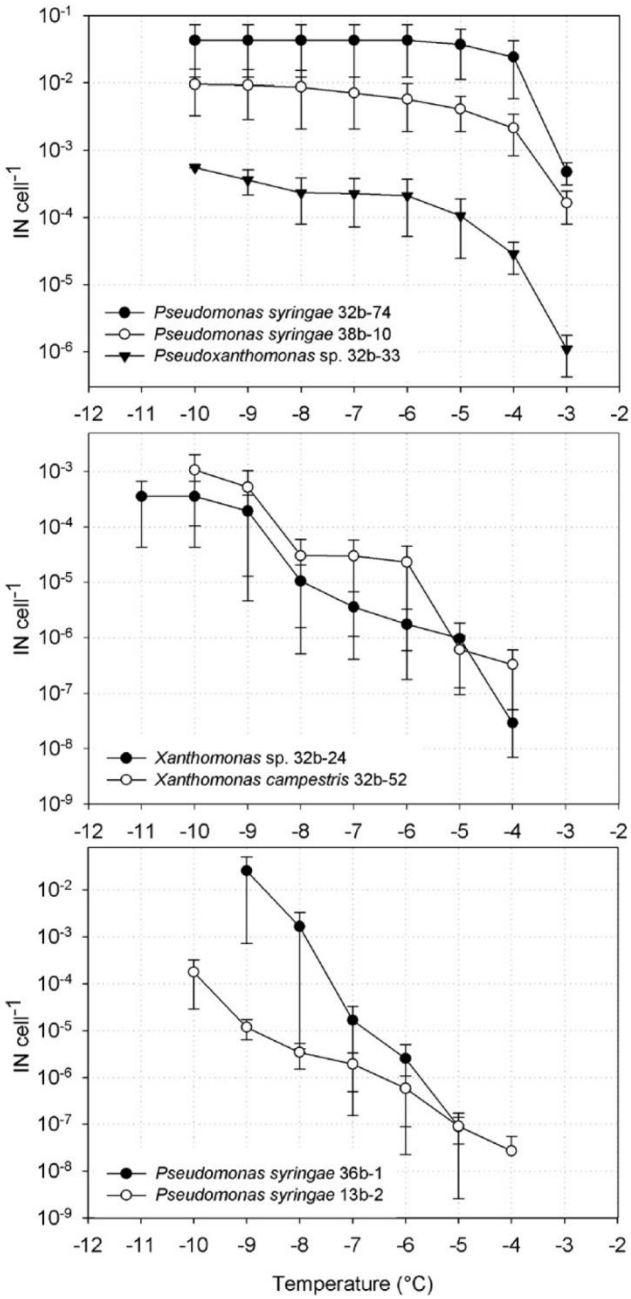


Fig. 1. Cumulative frequency of ice nuclei per cell of the 7 INA strains in distilled water. These are shown on three different figures for visual clarity. The data presented are means of independent triplicate experiments; errors bars are standard errors of the mean ($n = 3$).

The impact of airborne ice nucleating bacteria on precipitation was estimated by modeling by Hoose et al. (2010), who assumed a constant frequency of 0.1% of INA cells among *P. syringae*-like cell populations, without any dependence on temperature; at the global scale, no impact was found. However, we showed here that the proportion of INA cells obviously increases with decreasing temperature, and that this can reach values of up to 2.4% at −4 °C and 4.3% at −6 °C in the case of *P. syringae* 32b-74.

Two different profiles of ice nucleation activity were observed (Table 3 and Fig. 1): *P. syringae* 32b-74, 38b-10 and 32b-33 had

Table 3
Characteristics of ice nucleation active strains.

Strain		Temperature of freezing [(a)]	IN cell^{-1} at -6°C [(a)]	Maxima of freezing activity: Type I (> -4°C)	Type II (-4°C to -6°C)	Type III (< -7°C)
Pseudomonas syringae	32b-74	-3.0°C ± 0°C	4.3 ± 3.0 ×10^{-2}	■		
Pseudomonas syringae	38b-10	-3.0°C ± 0°C	5.8 ± 3.9 ×10^{-3}	■		
Pseudoxanthomonas sp.	32b-33	-3.0°C ± 0°C	2.1 ± 1.6×10^{-4}	■		
Xanthomonas campestris	32b-52	-4.3 ± 0.3°C	2.3 ± 2.3 ×10^{-5}		■	■
Xanthomonas sp.	32b-24	-4.3 ± 0.3°C	1.7 ± 1.6 ×10^{-6}		■	■
Pseudomonas syringae	36b-1	-5.3 ± 0.3°C	2.5 ± 2.5 ×10^{-6}		■	■
Pseudomonas syringae	13b-2	-5.0 ± 0.6°C	5.9 ± 5.0 ×10^{-7}		■	■

[(a)] Data presented are means ± standard errors (n = 3); -6°C corresponds to the warmest temperature allowing this calculation for all strains.

a peak of activity between −3 °C and −4 °C, while the activity of the other strains was maximal between −4 °C and −6 °C. The latter group also had a peak of activity below −7 °C, with a maximum centered around −8.5 °C to −9.5 °C (see Fig. A.2); this was also perhaps present in the most active strains but masked by the high efficiency at warmer temperature. In total, three ranges of temperature with peaks of ice nucleation activity were observed: warmer than −4 °C, −4 °C to −6 °C, and colder than −7 °C. These are consistent with the three domains of ice nucleation activity (named Type I, Type II and Type III) that have been described in bacteria and first attributed to different protein structures. These would be sequentially synthesized from the INA protein inserted in the membrane and exhibiting the lowest activity, to the INA protein linked to mannose, glucosamine and eventually to other sugars, and then to the protein anchored to the membrane through phosphatidylinositol (Turner et al., 1990; Kozloff et al., 1991; Turner et al., 1991). However, this model was later demonstrated to be invalid, or at least incomplete: the size of the protein aggregate is actually responsible for the differences in the temperature at which freezing occurs, the larger the protein the warmer the activity (Fletcher, 1969; Kajava and Lindow, 1993; Wolber, 1993; Schmid et al., 1997).

The shapes of the freezing profiles including freezing temperature and maxima of activity were very reproducible between experiments, but the coefficients of variation of the frequencies of INA cells for a given strain at given temperature often exceeded 100%, especially at the warmest temperatures of activity. For example, it varied from 2.7×10^{-4} to 8.0×10^{-8} IN cell^{-1} at −5 °C in populations of *Pseudoxanthomonas* sp. 32b-33, *i.e.* by a factor of more than 3000. The frequency of INA cells in bacteria is known to depend on many parameters such as the conditions of culture (temperature and composition of the culture medium, Nemecek-Marshall et al., 1993), the concentration of cells in the suspension and water availability (Cochet and Widehem, 2000). However, great care was taken during experiments to prevent such variations, and these appeared here to be related neither to the age of the culture (2 or 3 days) nor to the duration of incubation in the cold prior to ice nucleation assays (4–6 h). These variations likely corresponded to natural spontaneous variability in the expression of IN proteins.

3.2. Phylogeny and sources of INA Pseudomonas for clouds

Regarding the geographical origin of the four air masses from which INA bacteria were recovered, three originated from West, where vast rural wild and agricultural areas dominate, and one originated from South and crossed mostly over forested areas (see Fig. A1). This is consistent with previous observations that vegetation is the most probable source of airborne INA bacteria and of other biological ice nucleators in general (e.g. Lindow et al., 1978; Lindemann et al., 1982; Christner et al., 2008b).

Comparative phylogenetic analysis based on housekeeping gene sequences of the *P. syringae* strains from clouds to others isolated from natural habitats worldwide (Morris et al., 2010) revealed the presence of strains affiliated to several genetic ecotypes (Fig. 2). Strains 38b-10 and 36b-1 were affiliated to the USA032 and TA003 clades, respectively. To date, strains from these clades have only been found in freshwaters. Strains 12b-8 and 13b-2 belonged to the Group 4 clade commonly found on crops. Strain 3b-1 was in the Group 1 clade, which comprises strains from both agricultural and non-agricultural environments and that were previously detected in precipitation (Morris et al., 2010). Strain 32b-74 was not affiliated to any previously defined clade of *P. syringae*, and its closest relatives are strains from agricultural habitats (Group 4). Surprisingly, no strains related to the Groups 2a and 2b were detected in clouds in our study. Yet, these groups include most (54%) of the strains found in the natural habitats investigated by Morris et al. (2010). Although more investigations would be necessary to determine the effect of clouds on the affiliation of the *P. syringae* strains present in these environments, it seems that some widespread clades are absent or under-represented, while rare ones prevail. Indeed, the overall distribution of 7 *P. syringae* strains recovered from clouds in our study among the different clades defined by Morris et al. (2010) differed significantly ($p < 0.01$; Chi-square test) from the distribution of 112 strains isolated from lakes and rivers, precipitation, biofilms, plants and irrigation waters that they observed. This prevalence of rare clades in clouds could be caused to some extent by natural selection, *i.e.* differential integration of certain ecotypes of *P. syringae* into clouds relative to others. But, alternatively, it may also be the result of some unusual biogeography of these ecotypes, with a prevalence of rare ones in the regions surrounding our sampling site, the Puy de Dôme.

3.3. Potential implications for precipitation and bacterial dispersion

From a microbial ecological point of view, having a means to deposit back to Earth's surface would seem to be an advantage for a bacterium disseminating by air. Modeling studies showed that a bacterium remains aloft in the atmosphere in average 7.5 days in the absence of clouds, but this is considerably shortened, down to

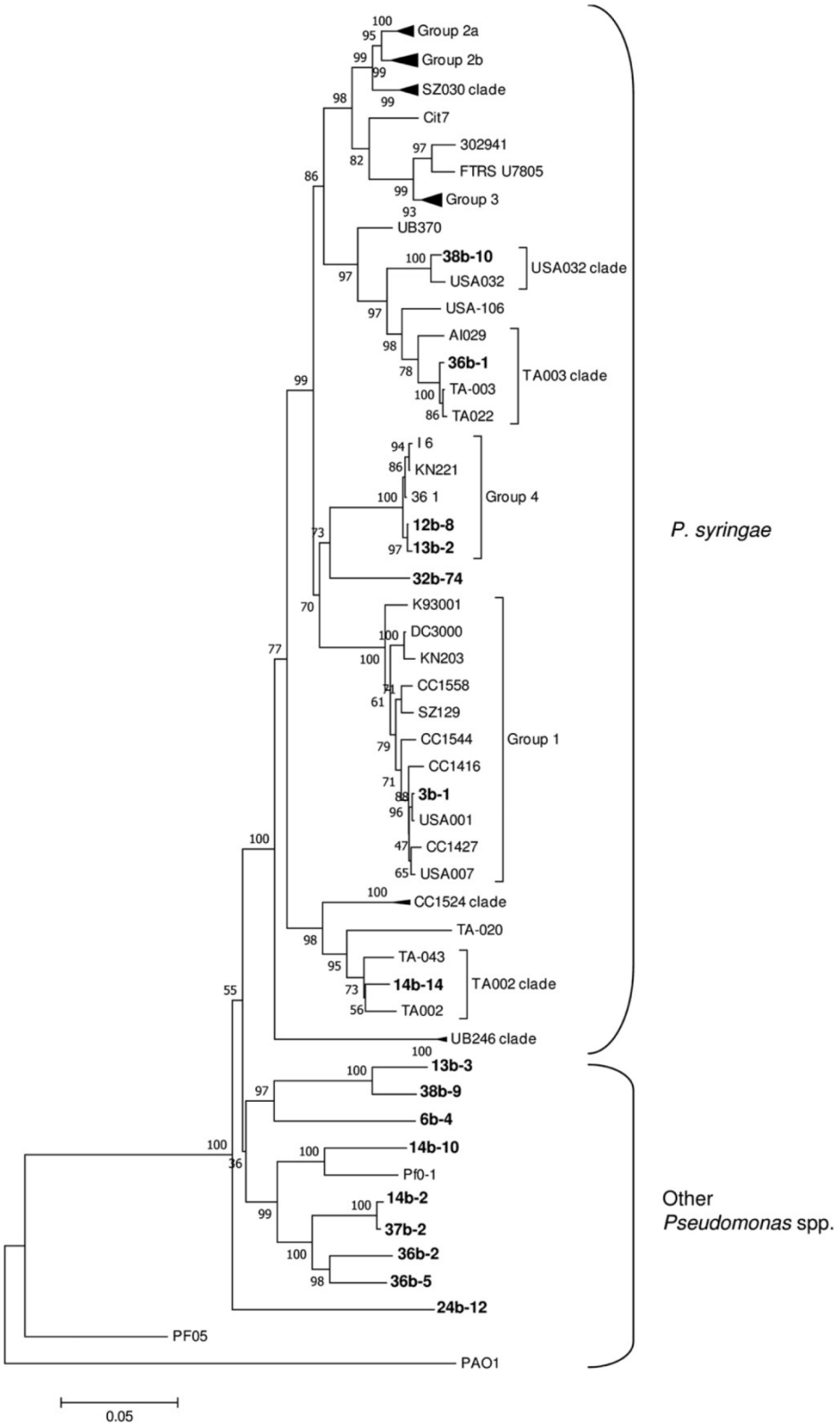


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree constructed on the basis of the concatenated sequence of the three housekeeping gene fragments *gapA*, *cts*, *gyrB* (1493 base pairs) for 16 strains of fluorescent pseudomonads from clouds (this study), 48 strains of *P. syringae* from crops and non agricultural habitats and three strains of *P. fluorescens* (from Morris et al., 2010). The tree was rooted on *P. aeruginosa* PAO1. Bootstrap scores are indicated at each node and a ruler for 5% dissimilarity of the concatenated sequences is presented below the tree. Branches of the tree that do not contain strains from clouds have been condensed and those that contain cloud strains are expanded. Names of branches are indicated to

3.4 days, when condensed water is present (Burrows et al., 2009). Wet deposition is indeed the main process of removal of aerosols of the size range of bacterial cells (~1 μm) (Renoux and Boulaud, 1998), but raindrops do not efficiently scavenge such particles (Gregory, 1961). Therefore it is highly probable that cells must be integrated into cloud droplets to precipitate. Ice nucleating proteins are triggered in bacteria at low temperatures and under nutrient limitations (Nemecek-Marshall et al., 1993; Cochet and Widehem, 2000). Bacteria thus probably express IN proteins in cloud water, and this could be responsible for the induction of precipitation through two concomitant physical processes: the Bergeron–Findeisen process implying that ice crystals grow at lower water saturation levels than liquid droplets, so at their expense, to a size large enough for precipitating (Möhler et al., 2008), and the Hallett–Mossop process involving a chain reaction in which the formation of a single ice crystal can propagate and result in the freezing of a significant portion of a cloud by colliding with surrounding supercooled droplets (Hallett and Mossop, 1974). This latter process is particularly relevant in the case of INA bacteria as it occurs within the temperature range at which only certain biological ice nucleators are active, *i.e.* from −3 °C to −8 °C; non-biological aerosols as well as many of the biological particles with so-called ice nucleation activity are not generally active at these temperatures. Hence, even limited numbers of INA bacterial cells in a cloud could initiate precipitation, and do it at temperatures at which non-biological IN, dominant among the total IN in the atmosphere, would have no impact. It is thus legitimate to wonder whether this property is linked to an evolutionary strategy of cells to disseminate aerially. If there is possibility that ice nucleating bacteria enhance the amount and/or frequency of rainfall regionally, and, as suggested by Sands et al. (1982), if this could lead to a positive feedback process involving plants, bacteria and rainfalls, then this would be beneficial to plant-associated INA bacteria. Rain would indeed promote the growth of plants, thus allowing epiphytic bacteria including INA species to proliferate; their release into the atmosphere would then be strengthened resulting in local increases in ice nucleators and then potentially more rainfall. In order to investigate these scenarios, it is essential to have data on the frequency of INA species among bacteria in clouds.

The stability of the ice nucleating structures existing in bacteria depends on pH (Turner et al., 1990; Attard et al., 2012). Type I, Type II and Type III ice nucleating structures were shown to be stable at pH above 4.5, 5.5 and 3.5, respectively (Turner et al., 1990). The INA strains isolated in our study were recovered from clouds at pH ranging from 5.2 to 6.2 and their IN activity, if expressed, was therefore probably not affected. However, the pH of cloud water generally ranges from 3 to 7, with acidic situations encountered when the air mass is exposed to the influence of anthropogenic emissions (Marinoni et al., 2004). About 20% of the clouds collected at the Puy de Dôme summit between 2007 and 2010 had pH below 4.5 (data not shown). In such clouds, only bacteria with Type III ice nucleation structures would have been able to induce freezing, *i.e.* at temperatures of −7 °C or colder.

Roughly extrapolating the concentration of IN bacteria in the air from the few data available for total bacteria, it was shown by numeric models that the presence of INA bacteria in clouds would not influence the amounts of rain at a global scale (Hoose et al., 2010; Sesartic et al., 2011). However, some effects at regional scales are still conceivable depending on the local abundance of IN bacteria. In order to provide realistic numbers and improve the accuracy of such models at local scales, we estimated the concentration of IN bacteria that we can expect in cloud water at a site such as the Puy de Dôme that is surrounded by vegetated areas, during winter and during summer, *i.e.* during the periods of minimum and maximum leaf area of local vegetation. Based on the proportions of Gamma–Proteobacteria observed among the culturable bacterial community (8% in winter and 37% in summer; Amato et al., 2007), considering that this distribution is valid for total bacteria and that the proportion of INA species among Gamma–Proteobacteria does not vary during the year (*i.e.* 7 positive strains among 44 tested, 16%), 1.3% and 5.9% of the total bacterial cells were affiliated to an INA species at these periods, respectively. This is up to 6-fold higher than the corresponding proportion of 1% assumed by Hoose et al. (2010) for atmospheric modeling purposes. Applying these proportions to the total concentration of bacteria in cloud water at the Puy de Dôme, ranging from 3.30×10^3 mL^{-1} to 2.44×10^5 mL^{-1} (Vaïtilingom et al., 2012) and considering the extreme lower and upper activities of IN observed among our isolates (strains 32b-74 and 13b-2, respectively), there would be between 3.8×10^{-6} and 115 INA cells per mL of cloud water during winter and between 1.7×10^{-5} and 534 INA cells per mL during summer at the temperature of −5 °C. For a population of cloud droplets distributed in a single mode of 10 μm in diameter, these cell concentrations would correspond to 1 INA cell every ~10^{15} droplets to ~10^7 droplets. Such estimations have been made for temperatures between −3 °C and −10 °C and these are presented in Fig. 3. Based on the relative number of INA species isolated from each sample and on their respective IN activity, the bacterial IN concentrations in the particular cases of samples #13, #32, #36 and #38 have also been estimated; these are shown in Fig. 3.

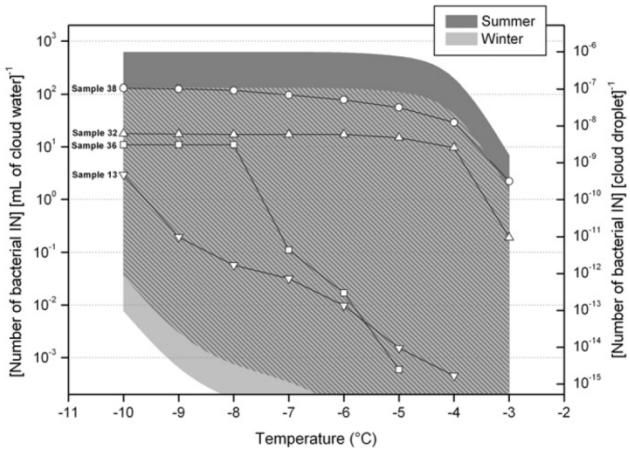


Fig. 3. Estimated temperature-dependent cumulative range of concentrations of bacterial ice-nuclei per milliliter of water in clouds (left *Y*-axis) during summer and during winter, in the cloud samples where INA species where detected, and corresponding frequency of cloud droplets carrying a bacterial IN (right *Y*-axis) assuming a droplet diameter of 10 μm.

4. Conclusions

We investigated bacteria isolated from cloud water and showed that they can represent a significant proportion of the culturable Gamma–Proteobacteria (16%) in this environment. The strains

correspond to clades as previously described by Morris et al. (2010). Strains of *P. syringae* from clouds include 38b-10 (in the USA032 clade), 36b-1 (TA003 clade), 12b-8 and 13b-2 (Group 4), 3b-1 (Group 1) and 14b-14 (TA002 clade). Strain 32b-74 is most closely related to strains in Group 4 but it is sufficiently dissimilar to be in a separated clade for which other strains have not yet been isolated from the environment. Strains outside of the *P. syringae* species complex and that were more closely related to *P. fluorescens* include 13b-3, 38b-9, 6b-4, 14b-10, 14b-2, 37b-2, 36b-2, 36b-5, and 24b-12.

presenting the capacity to nucleate ice were affiliated to species already known to exhibit this function (*P. syringae*, *Pseudoxanthomonas* sp. and *Xanthomonas* spp.) and that are generally present on vegetation where they likely originated from. Three strains were highly active and induced freezing at −3 °C; the frequency of ice nucleating cells in populations of IN positive strains reached values of up to more than 4% at −6 °C and colder for *P. syringae* 32b-74. Phylogenetic analysis of the *P. syringae* strains based on housekeeping gene sequences revealed that these were not affiliated to the most ubiquitous groups of this bacterium, but rather to groups detected in freshwaters or on crops worldwide (Morris et al., 2010). This prevalence of rare groups suggests that some extent of sorting may exist during the integration of *P. syringae* in clouds, with some clades favored compared to others, or that there is an effect of source related to the relative abundance of the different clades of *P. syringae* on the vegetation surrounding the Puy de Dôme site. Based on the microbiological data generated here and on others collected at the Puy de Dôme site, we estimated that the concentration of INA cells in cloud water at a rural site likely falls somewhere between 0 and about 500 per mL between −3 °C and −10 °C, with probable dependences on the period of the year and on the origin of the air mass. These data should allow more realistic parameterizations of the behavior of INA bacteria in atmospheric models for investigating the possibility of local impacts on precipitation.

Acknowledgments

This research was funded by the CNRS and French Ministry of Research under LEFE-CHAT and BEAM programs, and by the joint DFG-CNRS "Bioclouds" project. We particularly thank Mickaël Vaïtilingom for isolating the bacteria. Eléonore Attard acknowledges Blaise Pascal University and CNRS for postdoctoral fellowships. Muriel Joly is grateful to the Region Auvergne for PhD scholarship. We are also grateful to two anonymous reviewers for helping improving the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.01.027.

References

Ahern, H.E., Walsh, K.A., Hill, T.C.J., Moffett, B., 2007. Fluorescent pseudomonas isolated from Hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation. Biogeosciences 4, 115–124.

Amato, P., Ménager, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., Delort, A.-M., 2005. Microbial population in cloud water: implications for the chemistry of clouds. Atmospheric Environment 39, 4143–4153.

Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., Delort A-, M., 2007. 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, 242–254.

Attard, E., Yang, H., Delort, A.-M., Amato, P., Pöschl, U., Glaux, C., Koop, T., Morris, C.E., 2012. Effects of atmospheric conditions on ice nucleation activity of *Pseudomonas*. Atmospheric Chemistry and Physics Discussion 12, 9491–9516.

Burrows, S.M., Buttler, T., Jöckel, P., Tost, H., Kaherkweg, A., Pöschl, U., Lawrence, M.G., 2009. Bacteria in the global atmosphere – part 2: modeling of emissions and transport between different ecosystems. Atmospheric Chemistry and Physics 9, 9281–9297.

Christner, B.C., Morris, C.E., Foreman, C.M., Cai, R., Sands, D.C., 2008a. Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall. Science 319, 1214.

Christner, B.C., Cai, R., Morris, C.E., McCarter, K.S., Foreman, C.M., Skidmore, M.L., Montross, S.N., Sands, D.C., 2008b. Geographic, seasonal, and precipitation chemistry influence on the abundance and activity of biological ice nucleators in rain and snow. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 105, 18854–18859.

Cochet, N., Widehem, P., 2000. Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. Applied Microbiology and Biotechnology 54, 153–161.

Constantinidou, H.A., Hirano, S.S., Baker, L.S., Upper, C.D., 1990. Atmospheric dispersal of ice nucleation-active bacteria: the role of rain. Phytopathology 80, 934–937.

Diehl, K., Quick, C., Matthias-Maser, S., Mitra, S.K., Jaenicke, R., 2001. The ice nucleating ability of pollen. Part I: laboratory studies in deposition and condensation freezing modes. Atmospheric Research 58, 75–87.

Draxler, R.R., Rolph, G.D., 2012. HYSPLIT (HYbrid Single-particle Lagrangian Integrated Trajectory) Model Access via NOAA ARL READY Website. NOAA Air Resources Laboratory, Silver Spring, MD. http://ready.arl.noaa.gov/HYSPLIT.php.

Fletcher, N.H., 1969. Active sites and ice nucleation. Journal of Atmospheric Sciences 26, 1266–1271.

Green, R.L., Warren, G.J., 1985. Physical and functional repetition in a bacterial ice gene. Nature 317, 645–648.

Gregory, P.H., 1961. The Microbiology of the Atmosphere. Interscience Publishers, Inc., New York.

Hallett, J., Mossop, S.C., 1974. Production of secondary ice particles during the riming process. Nature 249, 26–28.

Hirano, S.S., Baker, L.S., Upper, C.D., 1996. Raindrop momentum triggers growth of leaf-associated populations of *Pseudomonas syringae* on field-grown snap bean plants. Applied and Environmental Microbiology 62, 2560–2566.

Hoose, C., Kristjánsson, J.E., Burrows, S.M., 2010. How important is biological ice nucleation in clouds on global scale? Environmental Research Letters 5, 1–7.

Iannone, R., Chernoff, D.I., Pringle, A., Martin, S.T., Bertram, A.K., 2011. The ice nucleation ability of one of the most abundant types of fungal spores found in the atmosphere. Atmospheric Chemistry and Physics 11, 1191–1201.

Kajava, A.V., Lindow, S.E., 1993. A model of the three-dimensional structure of ice nucleation proteins. Journal of Molecular Biology 232, 709–717.

King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 44, 301–307.

Knopf, D.A., Alpert, P.A., Wang, B., Aller, J.Y., 2011. Stimulation of ice nucleation by marine diatoms. Nature Geoscience 4, 88–90.

Kozloff, L.M., Turner, M.A., Arellano, F., 1991. Formation of bacterial membrane ice-nucleating lipoglycoprotein complexes. Journal of Bacteriology 173, 6528–6536.

Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 1994. MEGA – molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. Computer Applications in the Biosciences 10, 189–191.

Lindemann, J., Constantinidou, H.A., Barchet, W.R., Upper, C.D., 1982. Plants as sources of airborne bacteria, including ice-nucleation active bacteria. Applied and Environmental Microbiology 44, 1059–1063.

Lindow, S.E., Arny, D.C., Upper, C.D., 1978. Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. Applied and Environmental Microbiology 36, 831–838.

Lohmann, U., Feitcher, J., 2005. Global indirect aerosol effects: a review. Atmospheric Chemistry and Physics 5, 715–737.

Maki, L.R., Willoughby, K.J., 1978. Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei. Journal of Applied Meteorology 17, 1049–1053.

Maki, L.R., Galyan, E.L., Chang-Chien, M.-M., Caldwell, D.R., 1974. Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. Applied Microbiology 28, 456–459.

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.

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., Kinkel, L.L., Xiao, K., Prior, P., Sands, D.C., 2007. Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. Infection, Genetics and Evolution 7, 84–92.

Morris, C.E., Sands, D.C., Vinatzer, B.A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H., Thompson, B.M., 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. The ISME Journal 2, 321–334.

Morris, C.E., Sand, D.C., Vanneste, J.L., Montarry, J., Oakley, B., Guilbaud, C., Glaux, C., 2010. Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. mBio 1 (3). e00107-10.

Nemecek-Marshall, M., LaDuca, R., Fall, R., 1993. High-level expression of ice nuclei in *Pseudomonas syringae* strain is induced by nutrient limitation and low temperature. Journal of Bacteriology 175, 4062–4070.

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, 398–401.

Reasoner, D.J., Geldreich, E.E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Applied Environmental Microbiology 49, 1–7.

Renoux, A., Boulaud, D., 1998. Les aérosols – Physique et Métrologie. Tec & Doc Lavoisier (eds), Paris, ISBN 2-7430-0231-X, 300 pp.

Sands, D.C., Langhans, V.E., Scharen, A.L., de Smet, G., 1982. The association between bacteria and rain and possible resultant meteorological implications. Journal of the Hungarian Meteorological Service 86, 148–152.

Šantl-Temkiv, T., Gosewinkel Karlson, U., Finster, K., Munk Hansen, B., 2009. The diversity and proportion of ice nucleation active bacteria in rain and their ability to produce extracellular ice nucleation active particles. In: Smolik, J., O'Dowd, C. (Eds.), 18th International Conference on Nucleation and Atmospheric Aerosols (ICNAA). Prague, Czech Republic.

Schmid, D., Pridmore, D., Capitani, G., Battistutta, R., Neeser, J.-R., Jann, A., 1997. Molecular organisation of the ice nucleation protein InaV from *Pseudomonas syringae*. FEBS Letters 414, 590–594.

Sesartic, A., Lohmann, U., Storelvmo, T., 2011. Bacteria in the ECHAM5-HAM global climate model. Atmospheric Chemistry and Physics Discussion 11, 1457–1488.
Stephanie, Waturangi, D.E., 2011. Distribution of ice nucleation-active (INA) bacteria from rain-water and rain. HAYATI Journal of Biosciences 18, 108–112.
Turner, M.A., Arellano, F., Kozloff, L.M., 1990. Three separate classes of bacterial ice nucleation structures. Journal of Bacteriology 172, 2521–2526.
Turner, M.A., Arellano, F., Kozloff, L.M., 1991. Components of ice nucleation structures of bacteria. Journal of Bacteriology 173, 6515–6527.
Vaïtilingom, M., Attard, E., Gaiani, N., Sancelme, M., Deguillaume, L., Flossmann, A.I., Amato, P., Delort, A.-M., 2012. Long-term features of cloud microbiology at the Puy de Dôme (France). Atmospheric Environment 56, 88–100.
Vali, G., Christensen, M., Fresh, R.W., Galyan, E.L., Maki, L.R., Schnell, R.C., 1976. Biogenic ice nuclei. Part II: bacterial sources. Journal of Atmospheric Sciences 33, 1565–1570.
Vali, G., 1971. Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. Journal of Atmospheric Sciences 28, 402–409.
Wolber, P.K., 1993. Bacterial ice nucleation. Advances in Microbial Physiology 34, 203–237.
Xia, X., Xie, Z., 2001. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. Journal of Heredity 92, 371–373.
Yankofsky, S.A., Levin, Z., Bertold, T., Sandlerman, N., 1981. Some basic characteristics of bacterial freezing nuclei. Journal of Applied Meteorology 20, 1013–1019.

Supplementary data:

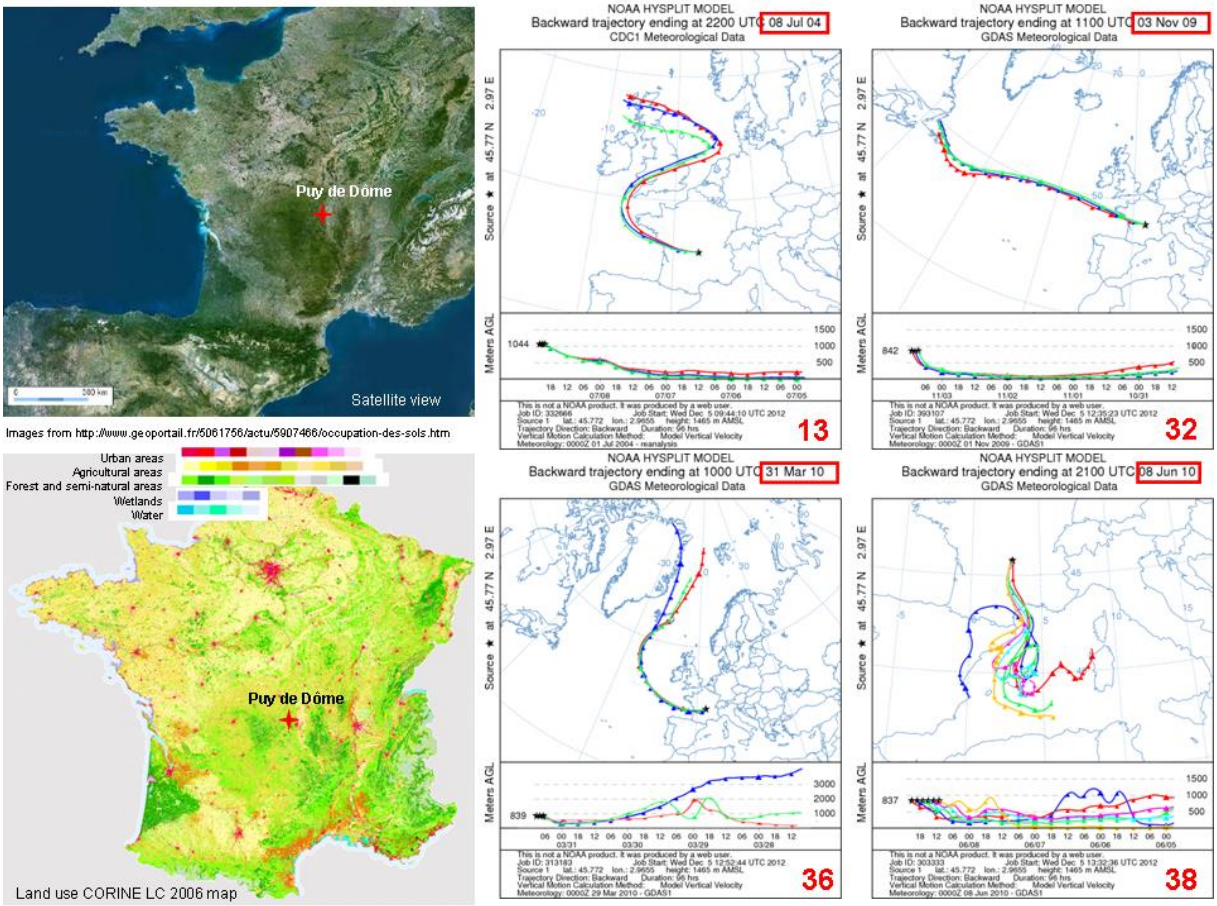


Figure A1: Bird's-eye view (upper left) and land-use CORINE map (lower left) of France (courtesy of the European Environment Agency; http://www.eea.europa.eu/data-and-maps) situating our sampling site, the Puy de Dôme, and 96h-backtrajectory plots of the air masses corresponding to the cloud samples in which INA strains were detected (samples #13, #32, #36 and #38).

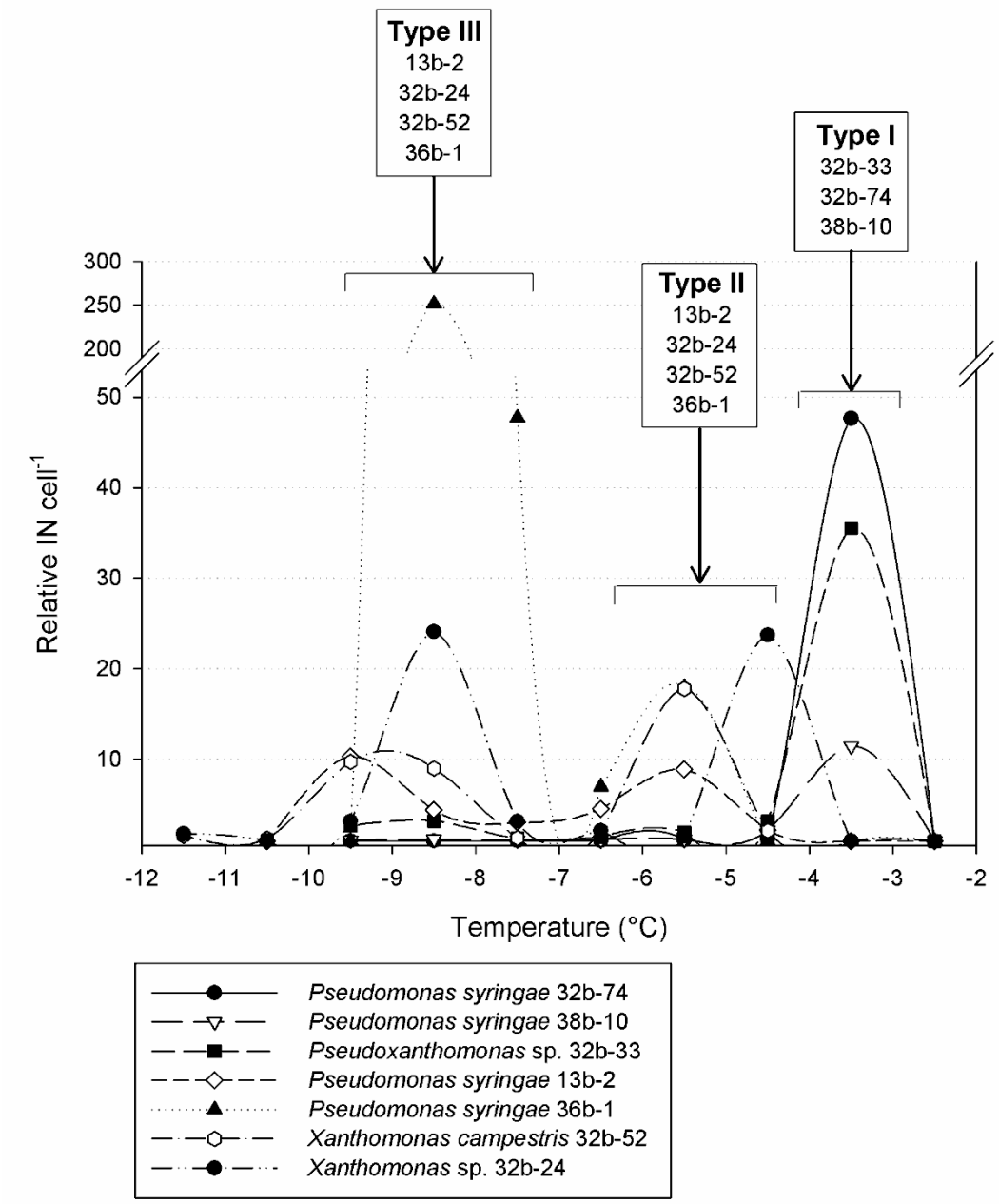


Figure A2: Relative activity of the INA strains between two successive temperatures and averaged from triplicates experiments for each strain. The activity at the temperature T relatively to that at the temperature T-1 was calculated as $(C_{IN})_{T-1} / (C_{IN})_T$, with $(C_{IN})_T$ the concentration of IN at the temperature T. This was intended to visualize the main temperature ranges of activity, as this calculation actually corresponds to the slope of the frequency profile between two consecutive temperatures.

3.2. "Survival and ice nucleation activity of bacterial aerosols in cloud simulation chamber", article en cours de préparation pour une soumission à Aerobiologia

Survival and ice nucleation activity of bacterial aerosols in cloud simulation chamber

Pierre Amato[1,2*], Muriel Joly[1,2,3,4], Caroline Oehm[5], Eléonore Attard[1,2], Ottmar Möhler[5], Cindy E. Morris[6], Anne-Marie Delort[1,2] and Andrea Flossmann[3,4]

[1] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France.

[2] CNRS, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), BP 80026, 63171 Aubière, France.

[3] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand (OPGC), Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP), BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France.

[4] CNRS, UMR 6016, Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand (OPGC)/Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP), BP 80026, 63171 Aubière, France.

[5] Karlsruhe Institute of Technology, Institute for Meteorology and Climate Research, Postfach 3640, 76021 Karlsruhe, Germany.

[6] INRA, UR 407 Plant Pathology Research Unit, 84140 Montfavet, France.

Phone: +33(0)4 73 40 52 84. Fax: +33(0)4 73 40 77 17. E-mail: pierre.amato@univ-bpclermont.fr

*Corresponding author

Keywords: Bacteria, ice nucleation, cloud simulation chamber, *Pseudomonas*

Abstract

Bacteria are disseminated by air means, and their residence time in the atmosphere is predictable by numeric models. However, a microorganism that does not survive its atmospheric journey actually fails to disseminate, and such models need to take this into account for reaching a realistic prediction of the dispersion of bacteria. Here we investigated the survival and ice nucleation activity (INA) of typical atmospheric bacteria in the cloud simulation chamber AIDA in Karlsruhe, Germany. Two strains of *Pseudomonas syringae* isolated from cloud water and one strain of *P. fluorescens* from glacier ice were injected as liquid suspensions in the chamber by spraying. Aerosol samples were collected by impingement at designated times while no cloud was generated, and the concentrations of total and cultivable cells were measured in experiments lasting for up to 18 hours. The airborne concentration of total cells and cultivable cells decreased over time at the exponential rates of 2.49×10^{-4} min^{-1} and 4.67×10^{-3} min^{-1}, respectively. The corresponding biological decay (*i.e.* the temporal loss of cultivability, a proxy for viability corresponding to the percentage of culturable cells among total cells) was $1.78\text{x}10^{-3}$ min^{-1}, *i.e.* 0.18 % min^{-1}. The INA of airborne bacteria assayed by droplet freezing at some experimental time points demonstrated that *P. syringae* cells remained INA for at least 17 hours after aerosolization, implying that this property does not necessarily need to be expressed within clouds for having microphysical impacts. Coating with sulfates markedly altered the INA of airborne *P. syringae*, especially at the warmest temperatures of activity, which pointed out the potential deleterious effect of anthropogenic emissions on the natural INA of bacteria. After cloud generation and dissipation, the frequency of INA cells still airborne in the chamber was drastically decreased, suggesting a partitioning of cells in the atmosphere in relation with their INA: the most efficient INA cells would be preferentially wet precipitated.

Introduction

Microorganisms disseminate over long distances by atmospheric means (*e.g. Bovallius et al.*, 1978; *Griffin et al.*, 2001; *Brodie et al.*, 2007; *Smith et al.*, 2013). This has obvious underlying implications in human, animal and plant epidemiology, as well as in microbial ecology, which motivated the development of numeric models intended to describe and predict the aerial dispersion of microorganisms. A consequent work in this area has been carried out by *Burrows et al.*, (2009a, 2009b), who constrained a model of general atmospheric circulation with data and estimates of fluxes and concentrations of microorganisms from literature. They evaluated that, at a global scale, ~10^{24} bacteria were emitted each year in direction of the atmosphere and that their residence time in the air varies from 2 and 10 days depending on the emission source and on meteorological conditions (~3 days on average). This is long enough for a bacterial cell (*i.e.* a particle of ~1 µm) to travel over thousands of kilometers and disseminate. However, a prerequisite for microorganisms for concretizing dissemination is to remain alive during atmospheric transport, while numerous shocks such as temperature, humidity, UV rates, osmotic pressure and freeze-thaw are probably experienced.

Most of the studies aiming at predicting the death rate of airborne bacteria were carried out in the late 1960's and early 70's, with particular emphasis on the influences of temperature and relative humidity (*Wright et al.*, 1969; *Ehrlich et al.*, 1970; *Cox and Goldberg*, 1972; *Lighthart*, 1973). The capacity to survive as an aerosol and the influence of abiotic parameters were shown to strongly depend on the microorganism (*Marthi et al.*, 1990); survival decreased with increasing temperature from -18°C to 49°C in *Mycoplasma pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Escherichia coli*, while this had no or little effect on the survival of the spore forming *Bacillus subtilis* within this temperature range (*Wright et al.*, 1969; *Ehrlich et al.*, 1970). The best survival rates were invariably observed at extreme low and high humidity (*Wright et al.*, 1969; *Cox and Goldberg*, 1972). In addition, the concentration of carbon monoxide had an inconstant impact on the survival of airborne bacteria, with protective to deleterious effects depending on humidity and on the species (*Lighthart*, 1973). *Lighthart* (1989) compiled these data and others and provided statistical models describing the death rate of airborne bacteria based on aerosol age, temperature, Gram reaction and humidity. Interestingly, a model taking only the age of the aerosols as explicative variable was also proposed; it explained more than 90 % of the variability observed. This attested that time is by far the strongest factor influencing the viability of airborne cells, independently of environmental conditions.

We investigated in cloud chamber the survival of airborne bacteria relevant for aerobiological questions: *Pseudomonas syringae* species. These are among the most frequent bacteria isolated from clouds (*Vaïtilingom et al.*, 2012). In addition, some *P. syringae* strains are known plant pathogens (*e.g. Morris et al.*, 2000) and some, of which those investigated here, have potential impacts on the microphysics of clouds due to ice nucleation activity (INA, also used for ice nucleation active) (*e.g.*, *Sands et al.*, 1982; *Cochet and Widehem*, 2000; *Morris et al.*, 2008). Indeed, studies involving INA

bacteria in cloud chambers showed that they can induce the formation of ice in clouds (*Maki and Willoughby*, 1978; *Möhler et al.*, 2008). Here cultivated cells of *P. syringae* strains isolated from cloud water and glacier ice were aerosolized into the cloud simulation chamber AIDA (Aerosol Interactions and Dynamics in the Atmosphere) and aged for up to 18 hours as aerosols. The time-dependent proportion of surviving cells was measured and an equation fitting the data is proposed, and the influences of sulfate-coating and cloud formation on their capacity to act as ice nuclei (IN) were briefly approached.

Material and Methods

Experimental setup and particle concentration measurements

The AIDA facility consists of a cylindrical aluminium vessel with a volume of 84 m^3.This vessel was used as a cloud simulation chamber for the spray of microbiological aerosols and cloud expansion experiments. The vessel is located in a thermally insulating box. An air ventilation, heating, and cooling system controls the temperature inside this box in the range from 60 to −90°C. During the experiments, the cooling system is operated at constant temperature control with temporal and spatial variability below ±0.3K throughout the cold box and the cloud chamber. After the experiments, the cloud chamber is cleaned by pumping to a pressure below 1hPa, flushing with dry synthetic air, and filling with particle free humid air. The particle background after filling to atmospheric pressure is normally below 0.1 cm^{-3}. The AIDA facility is equipped with a comprehensive set of water, aerosol, and cloud instruments (for a detailed description, please refer to *Möhler et al.*, 2005, 2006, 2008).

Bacterial strains, preparation of cell suspensions and spraying into the chamber

The following bacterial strains were investigated in the AIDA cloud chamber: *Pseudomonas syringae* 32b-74 and *P. syringae* 13b-2 isolated from cloud water samples collected from the puy de Dôme mountain in France (GenBank accession numbers of the 16S rRNA gene sequences: DQ512785 and HQ256872, respectively; *Amato et al.*, 2007; *Vaïtilingom et al.*, 2012), and *P. fluorescens* CGina-01 isolated from ice from Cotton Glacier in Antarctica (strain provided by C. Foreman, Montana State University). These were all previously demonstrated INA species by droplet-freezing assays. *P. syringae* 32b-74 nucleated ice from supercooled water at as warm as -3°C, with a frequency of IN per cell of more than 2% at -4°C and more than 4% at -6°C, positioning it among the most efficient bacterial ice nucleators described so far; *P. f.* CGina-01 was active at temperatures from -4°C, with a frequency 3 to 4 orders of magnitude lower than that of 32b-74; *P. s.* 13b-2 nucleated ice at -4°C to -5°C with a frequency of ~10^{-7} IN $cell^{-1}$ at -6°C (*Attard et al.*, 2012; *Joly et al.*, 2013).

For the experiments carried out here, bacteria were grown on King's B agar medium (*King et al.*, 1954) for two days at ambient room temperature (*i.e.*, 22°C-25°C). Cells were then scrapped out from the agar plate using sterile plastic loops, suspended into sterile deionized water to an optical

density at 600 nm of ~1.0 (*i.e.*, ~10^9 mL^{-1}), and incubated overnight at 4°C. For each experiment, a volume of ~50 mL of the cell suspension was sprayed into the cloud simulation chamber. The actual cell concentration in the suspensions were determined by flow cytometry (total cells) and standard dilution platting (CFU) as described in the corresponding Material and Methods sections. In some cases, in order to investigate the influence of sulfate coating on the survival and ice nucleation activity of bacterial aerosols, cells suspensions were prepared in a solution of $(NH_4)_2SO_4$ (50 g L^{-1}; 0.38 M).

Sampling from the cloud simulation chamber for microbiological analyses

Aerosols, including airborne bacteria, were collected from the chamber 30 min after spraying bacterial cells from suspensions into the chamber and also eventually after 120 min (2 h), 300 min (5 h), 420 min (7 h), 1020 min (17 h), 1080 min (18 h), and after the expansion cooling process performed to generate a cloud, when the pressure inside the chamber was back to ambient. Sampling was performed using an ethanol-washed impinger (SKC Biosampler) rinsed several times with sterile deionized water and filled up with ~20 mL of sterile deionized water just prior to use. These apparatus are specifically designed for bioaerosol sampling with minimal losses due to rebound/reaerosolization and evaporation. The water used as the impingement liquid served as blank for ice nucleation assays and cell counts. Sampling operations were realized at the constant air flow rate of 12.5 L min^{-1} for 10 min, with the inlet of the impinger connected to the chamber and the outlet branched to a membrane vacuum pump (KFC). The exact volume contained in the sampler before and after sampling was determined by weighting. This was used to link the concentration of total and cultivable cells present in the impingement liquid, which was obtained by flow cytometry (total cells) and colony forming unit (CFU) counts, respectively, to the concentration of cells in the corresponding volume of air sampled.

Total cells and CFU counts

The concentrations of cultivable and total cells in the impingement liquid were determined by CFU and flow cytometry counts, respectively. For CFU counts, volumes of 20 µL of serial ten-fold dilutions of the impingement liquid were spread on R2A medium (*Reasoner and Geldreich*, 1985) and incubated at 22-25°C for 2 to 3 days. For flow cytometry counts, triplicate samples of 450 µL of the impingement liquid were added with 50 µL of 5% glutaraldehyde (Sigma) (0.5% final concentration) and stored at -20°C until analysis. These were then mixed with one volume (500 µL) of Tris-EDTA buffer at pH 8.0 (25 mM Tris; 0.5 mM EDTA, final concentrations) and diluted in dH_2O in order to reach a range of cell concentration compatible with analysis. Finally, 10 µL of the DNA specific fluorochrome SYBR-Green (100X concentration; Invitrogen) were added to the samples before incubation in the dark for at least 20 min and injection in the flow cytometer (Becton-Dickinson FACScalibur). The particles fluorescing at 530 nm when excited at 488 nm were detected and

counted. Counts were performed for 2 min or 100,000 events at a flow rate of about 90 µL min^{-1}. The flow rate was precisely measured for each series of measurements by weighting a water sample before and after a 20 minute run in the instrument. All the solutions used for flow cytometry analyses were freshly filtered through polycarbonate syringe filters (0.22 µm porosity) before use to prevent the presence of contaminating particles. In each sample, a clear population of particles unambiguously attributed to bacterial cells based on their intensity of fluorescence and side-scattering was detected.

The proportion of viable cells at a given time was determined as the concentration of cultivable cells (CFU) divided by the concentration of total cells determined by flow cytometry, and expressed as a percentage.

Ice nucleation assays

The concentration of IN collected from the chamber in the impingement liquid was assayed by the drop-freezing method described in *Vali* (1971). Series of sixteen 0.2-mL microtubes containing 20 µL of the impingement liquid and of a 10-fold dilution were exposed to decreasing temperatures from -2°C to -10°C at 1°C steps in a cooling bath (Ecoline Staredition Lauda E200). The cumulative number of frozen tubes at each temperature was counted after 8 minutes of exposition. The concentration of IN C_{IN} at the temperature T in the suspensions was calculated as:

$$C_{IN} = [\ln (N_{total}) - \ln (N_{liquid})]_T / V \times (1 / D_f)$$

with N_{total} the total number of tubes of a dilution series (16), N_{liquid} the corresponding number of tubes still liquid after 8 minutes at the temperature T (0 to 16), V the volume of liquid in each tube (20 µL) and D_f the dilution factor (1 or 10). The concentrations of IN in the cell suspensions were normalized to the corresponding cell concentrations measured by flow cytometry.

Statistical analyses

All statistical analyses were realized using PAST software version 2.04 (*Hammer et al.*, 2001).

Results and Discussion

Temporal decays of total and cultivable cell concentrations

A total of 9, 3 and 2 experiments were carried out with the strains *P. s.* 32b-74, 2 *P. f.* CGina-01 and *P. s.* 13b-2, respectively. Cells were injected in the chamber at concentrations from 6.94×10^{8} to 8.53×10^{10} CFU m^{-3} (**Table 1**) as determined from their concentration in the suspensions sprayed. The concentrations of total micron-sized particles, total and cultivable cells, and IN at -3°C and -5°C measured 30 min and up to 18 h (1080 min) after aerosolization are presented in **Table 1**. Considering 100% viable cells at the time of injection, in average 39% ± 26% (n = 8), 21% ± 13% (n =

3) and 35% ± 14% (n = 2) of the cells died upon aerosolization, *i.e.* they were not recoverable by culture at t = 30 min, for *P.s.* 32b-74, *P.f.* CGina-01 and *P.s.* 13b-2, respectively. Consequently, for considering only bacteria once airborne and avoid any influence of the aerosolization step, we considered only results for t ≥ 30 min in the following data analysis.

Thirty minutes after spraying, the proportion of living cells was independent from the initial concentration at which cells were injected in the chamber (Spearman's rank correlation; $p = 0.501$; $n = 14$; $\alpha = 0.05$). The concentration of total airborne cells in the cloud chamber at this time ranged from $2.58 \pm 0.24 \times 10^8$ to $4.51 \pm 0.59 \times 10^8$ cells m^{-3} (experiments #9 and #10, respectively). There was in average 1.82 ± 0.40 cells per total micron-sized particle (t-test; $p < 0.01$; $n = 13$), which demonstrated the presence of cell aggregates at the beginning of the experiments; these probably originated from the procedure of preparation of the cell suspensions but mimicked well the bioaerosol clusters and the fractions of biofilms existing in natural air (*Shaffer and Lighthart*, 1997). This ratio tended to 1 over time and it reached 1.06 ± 0.06 (n = 2) seven hours (420 min) after spraying, indicating that the cell aggregates were removed from the aerosol phase, either by fractionation or by sedimentation/impaction within the chamber. The concentration of cultivable cells did not significantly differ from the concentration of total micro-sized particles at t = 30 min after aerosolization (t-test; $p = 0.15$; $n = 13$). However, 7 h (420 min) after spraying, there was only 0.26 ± 0.11 CFU per particle (n = 2) due to a loss of survival especially marked for the smallest cell aggregates and single airborne cells which remained aloft. In natural outdoor environment, a positive correlation was found between the amount of particulate matter and the number of cultivable bacteria in urban air (*Mancinelli and Shulls*, 1978). More precisely, it was observed that most (84%) airborne cultivable bacteria are generally associated with particles larger than 2.1 µm (*Shaffer and Lighthart*, 1997). The association with particles or the aggregation with other cells is thought to protect bacteria from the damages caused by desiccation, as observed on the surface of plant leaves (*Monier and Lindow*, 2003).

Experiments #7, #8, #10 and #11 allowed determining the temporal decay of airborne micron-sized particles, total cells and cultivable cells over up to 18 hours (**Figure 1**). The physical decay of micron-sized particles over time was exponential, with an time constant, *i.e.* the time at which the population is reduced to 1/e, of 1222 ± 121 min (n = 4). The concentration of total airborne cells decreased faster, with a time constant of 402 ± 53 min (n = 4). The decrease of cell concentration was maximal during the first 300 minutes of the experiments, but it was then very similar to that of micron-sized particle, which confirmed the sedimentation of largest cell aggregates at the beginning of the experiments. The concentration of cultivable cells decreased about 2 times faster than that of total cells, with a time constant of 214 ± 14 min (n = 4). (n = 4), as a result of a certain extent of loss of viability.

The biological decay rate, *i.e.* the temporal decrease of viability, corresponded to the time dependence of the proportion of cultivable cells amongst total airborne cells. Its time constant reach

561 ± 84 min (n = 4), meaning that 0.082% of the cells loss their viability each minutes (R^2 = 0.88) (**Figure 2**). This is in poor adequacy with the time-dependent model of biological decay proposed by *Lighthart* (1989) and shown on **Figure 2**; this fits our data with a Pearson's R^2 of only 0.27. Despite the fact that the bacteria investigated here, *Pseudomonas* species, are non spore-formers bacteria, they exhibited a survival as airborne which was almost as high as that of spores of *Bacillus subtilis*, the biological decay at the temperature of 4°C of which reached 0.10% min^{-1} (*Ehrlich et al.*, 1970). From experiments #9 and #12 in which cells were exposed to expansion cooling in the chamber for generating clouds or to ammonium sulfate, we can notice that these treatments seemed to alter the presence or the viability of airborne *P. s.* 32b-74 even though this is not statistically testable. However, the survival of *P. f.* CGina-01 seemed less affected by the formation of a cloud (experiment #6).

The methods employed for aerosolization and sampling were demonstrated to influence the survival of bacteria, notably that of *P. syringae* (*Marthi et al.*, 1990). Any effect of the aerosolization process was eliminated here by considering only the times after aerosolization, *i.e.* t ≥ 30 min. Furthermore, the influence of the sampling procedure was decreased to its maximum: first, sampling by impingement is considered as the most reliable method for collecting viable airborne microorganisms (*Thorne et al.*, 1992; *Lin et al.*, 1999), and this method was consistently employed at each time point thus diminishing the possible experimental bias to its minimum.

Considering time as the only explicative variable in the decrease of survival of airborne microorganisms, we can estimate from our data that ~7.7% of the cells of a population of microorganisms aerosolized viable would remain alive after 1 day aloft. The size of the viable population would reach 1% in ~1.8 days and 0.01% in ~2.7 days. A bacterial cell was estimated to have a residence time in the atmosphere of between 2.3 and 9.6 days (*Burrows et al.*, 2009b). The associated probability for a bacterial cell to survive its atmospheric transport, so to disseminate, would fall between about 0 and 0.28%. In other terms, the emission of a minimum of ~360 cells would be required to have a chance to bring 1 survivor to its endpoint by atmospheric dissemination.

Ice nucleation activity

Figure 3 shows freezing profiles of air samples from the cloud chamber at different times after injecting suspension of *P. syringae* strain 32b-74. The freezing profile of this strain in solution in dH_2O, with no step of aerosolization and reported in *Joly et al.* (2013) is also shown on the figure for comparison. Briefly, 32b-74 induces freezing of supercooled water at -3°C with a frequency of 1 IN every ~5×10^4 cells. At the temperature of -5°C and colder, about 4% of the cells acted as IN. Aerosolization immediately altered the capacity of this strain to nucleate ice: cells aerosolized for 30 minutes had an INA decreased by a factor of about 10 compared with non aerosolized cells, with ~2×10^{-5} IN $cell^{-1}$ at -3°C and ~3×10^{-3} IN $cell^{-1}$ at -5°C However, there was no significant further loss of INA by cells over time at temperatures of -4°C or below at 5% confidence (ANOVA), *i.e.* the frequency

of IN cell^{-1} did not vary with time after aerosolization. This implies that in INA strains emitted from vegetation, for example, the capacity of initializing the formation of ice remains for at least several hours after aerosolization. In previous studies of INA bacterial species in cloud simulation chambers, the INA of *P. syringae* was considerably decreased in cloud chamber compared with cells in solution, while other bacteria such as *P. fluorescens* retained activity (*Maki and Willoughby*, 1978). In the AIDA chamber, *Möhler et al.* (2008) showed that *P. viridiflava* and *P. syringae* cells actually acted as IN at temperatures around -10°C, after acting as cloud condensation nuclei (CCN).

In the natural atmosphere, phenomena such as coating with minerals could affect the INA of bacteria. For investigating the influence of coating with sulfate, cells suspended in a solution of ammonium sulfate rather than in dH_2O were sprayed in the chamber (experiment #12, **Table 1**). Thirty minutes after spraying, this treatment led to a decrease in the frequency of IN per cell of about 2 orders of magnitude at -4°C and of about one order of magnitude at -5°C (**Figure 3**). Sulfate coating was reported to deeply alter the INA of mineral particles such as soot or Arizona Test Dust, a material widely used in atmospheric studies (*Möhler et al.*, 2005; *Cziczo et al.*, 2009; *Eastwood et al.*, 2009; *Chernoff and Bertram*, 2010). However, no impact was detected on the INA of SNOMAX^{TM}, *i.e.* a commercial powder of lyophilized INA *P. syringae* cells (*Chernoff and Bertram*, 2010). Here we demonstrated that sulfate coating can have a negative influence on the INA of fresh bacterial cells, and that this is mostly marked at the warmest temperatures of activity. This implies that anthropogenic emissions linked with increased atmospheric sulfate concentrations could impact the natural capacity of certain bacterial strains to induce freezing in clouds. Such scenario was also suggested by *Attard et al.* (2012) who showed that acidic pH in cloud water such as those encountered under anthropogenic situations had negative impacts on the INA of this bacterial strain.

In order to investigate the impact of INA bacteria on cloud microphysics, clouds were formed in the chamber by expansion cooling (*i.e.* depressurization) (experiments #6 and #9, **Table 1**). After dissipation of the cloud, samples were collected for biological analyses. The bacteria remaining aloft in the chamber had an INA at -5°C markedly decreased (below the detection limit of the method). The strain 32b-74 initiated ice at -6°C rather than -3°C with a frequency decreased by 3 orders of magnitude compared to airborne cells not exposed to a cloud (**Figure 3**). It was already reported that a second expansion led in the presence of INA bacteria remaining aloft after a first expansion where freezing had occurred were unsuccessful in forming ice, and a possible "deactivation effect" was pointed (*Möhler et al.*, 2008). Our results, although they do not allow powerful statistical analyses, are based on a per cell frequency basis and suggest that, more likely, the most efficient INA bacteria were preferentially precipitated. This could explain the distribution of INA bacteria observed in clouds and in precipitations. Indeed, whereas 50% of the *P. syringae* isolated from cloud water were INA (8 strains) (*Joly et al.*, 2013), all of those isolated from fresh snow by *Morris et al.* (2008) presented this capacity (47 strains). These observations in natural environment suggested a partitioning of *P. syringae* strains in the atmosphere depending on their phenotype, with a greater

probability for INA strains to be wet precipitated; this hypothesis is now consolidated by our results in cloud chamber.

Conclusions

INA bacteria isolated from atmospheric samples were injected in the cloud simulation chamber AIDA. Their concentration and viability as airborne decreased over time, and we provide an experimental fit of the data that could be used in numeric models describing the physical dispersion of bacteria for predicting their survival along their atmospheric transport. Here we chose to focus on time as the only explicative variable as this was demonstrated to contribute to about 90% of the decrease in bacterial viability in the air (*Lighthart*, 1989). Nevertheless, from the literature, it is still unclear though whether or not and to what extent abiotic parameters such as relative humidity, temperature or gas concentrations can affect the survival of bacteria in the atmosphere, and more experiments would be needed in that direction.

Numeric models demonstrated that the impact of INA bacteria on precipitations is probably negligible at the global scale (*Hoose et al.*, 2010; *Sesartic et al.*, 2012); nevertheless precipitation patterns could be impacted at regional scale. We showed here that the INA of airborne bacteria can remain unchanged for hours after aerosolization. This is enough time for an INA cell present on the surface of plant leaves, for example, where most INA bacteria thrive (*e.g. Lindow et al.*, 1978), to be transported up to high altitudes, incorporated into a cloud and cause freezing, thus potentially causing rain and their own precipitation (*e.g. Constantinidou et al.*, 1990; *Möhler et al.*, 2008). This implies that INA proteins expressed even before bacteria get aerosolized may have impacts on cloud microphysical processes.

Acknowledgements

This research was funded by the joint DFG-CNRS "BIOCLOUDS" project and by the international program EUROCHAMP (Integration of European Simulation Chambers for Investigating Atmospheric Processes). We particularly thank Martine Sancelme, Catherine Glaux, and Jonathan Colombet for technical assistance in microbiology and flow cytometry; E. Attard acknowledges Blaise Pascal University and CNRS for postdoctoral fellowships. M. Joly is grateful to the Auvergne Region and the Fond Européen de Développement Régional (FEDER) for PhD scholarship.

References

Amato P., Parazols M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. and Delort A. M. (2007). Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dome: major groups and growth abilities at low temperatures, *FEMS Microbiology Ecology*, *59*: 242-254.

Attard E., Yang H., Delort A.-M., Amato P., Pöschl U., Glaux C., Koop T. and Morris C. E. (2012). Effects of atmospheric conditions on ice nucleation activity of *Pseudomonas*, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *12*: 10667-10677.

Bovallius A., Bucht B., Roffey R. and Anas P. (1978). Long-range air transmission of bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, *35*: 1231-1232.

Brodie E. L., DeSantis T. Z., Parker J. P. M., Zubietta I. X., Piceno Y. M. and Andersen G. L. (2007). Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*: 299-304.

Burrows S. M., Elbert W., Lawrence M. G. and Pöschl U. (2009a). Bacteria in the global atmosphere–Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *9*: 9263–9280.

Burrows S. M., Butler T., Jöckel P., Tost H., Kerkweg A., Pöschl U. and Lawrence M. G. (2009b). Bacteria in the global atmosphere–Part 2: Modeling of emissions and transport between different ecosystems, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *9*: 9281–9297.

Chernoff D. I. and Bertram A. K. (2010). Effects of sulfate coatings on the ice nucleation properties of a biological ice nucleus and several types of minerals, *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *115*: D20205.

Cochet N. and Widehem P. (2000). Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, *54*: 153–161.

Constantinidou H., Hirano S. S., Baker L. S. and Upper C. D. (1990). Atmospheric dispersal of ice nucleation-active bacteria: the role of rain, *Phytopathology*, *80*: 934–937.

Cox C. S. and Goldberg L. J. (1972). Aerosol survival of *Pasteurella tularensis* and the influence of relative humidity, *Applied Microbiology*, *23*: 1–3.

Cziczo D. J., Froyd K. D., Gallavardin S. J., Moehler O., Benz S., Saathoff H. and Murphy D. M. (2009). Deactivation of ice nuclei due to atmospherically relevant surface coatings, *Environmental Research Letters*, *4*: 044013.

Eastwood M. L., Cremel S., Wheeler M., Murray B. J., Girard E. and Bertram A. K. (2009). Effects of sulfuric acid and ammonium sulfate coatings on the ice nucleation properties of kaolinite particles, *Geophysical Research Letters*, *36*: L02811.

Ehrlich R., Miller S. and Walker R. L. (1970). Relationship between atmospheric temperature and survival of airborne bacteria, *Applied Microbiology*, *19*: 245–249.

Griffin D. W., Garrison V. H., Herman J. R. and Shinn E. A. (2001). African desert dust in the Caribbean atmosphere: Microbiology and public health, *Aerobiologia*, *17*: 203–213.

Hammer Ø., Harper D. A. and Ryan P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeontologia Electronica*, *4*: 9.

Hoose C., Kristjánsson J. E. and Burrows S. M. (2010). How important is biological ice nucleation in clouds on a global scale?, *Environmental Research Letters*, *5*: 024009.

Joly M., Attard E., Sancelme M., Deguillaume L., Guilbaud C., Morris C. E., Amato P. and Delort A.-M. (2013). Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water, *Atmospheric Environment*, *70*: 392–400.

King E. O., Ward M. K. and Raney D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *44*: 301-307.

Lighthart B. (1973). Survival of airborne bacteria in a high urban concentration of carbon monoxide, *Applied Microbiology*, *25*: 86–91.

Lighthart B. (1989). A statistical model of laboratory death rate measurements for airborne bacteria, *Aerobiologia*, *5*: 138–144.

Lin X., A. Reponen T., Willeke K., Grinshpun S. A., Foarde K. K. and Ensor D. S. (1999). Long-term sampling of airborne bacteria and fungi into a non-evaporating liquid, *Atmospheric Environment*, *33*: 4291–4298.

Lindow S., Arny D. and Upper C. (1978). Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature, *Applied and Environmental Microbiology*, *36*: 831.

Maki L. R. and Willoughby K. J. (1978). Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei, *Journal of Applied Meteorology*, *17*: 1049–1053.

Mancinelli R. L. and Shulls W. A. (1978). Airborne bacteria in an urban environment, *Applied and Environmental Microbiology*, *35*: 1095–1101.

Marthi B., Fieland V. P., Walter M. and Seidler R. J. (1990). Survival of bacteria during aerosolization, *Applied and Environmental Microbiology*, *56*: 3463–3467.

Möhler O. et al. (2005). Effect of sulfuric acid coating on heterogeneous ice nucleation by soot aerosol particles, *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *110*: D11210.

Möhler O. et al. (2006). Efficiency of the deposition mode ice nucleation on mineral dust particles, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *6*: 3007–3021.

Möhler O., Georgakopoulos D. G., Morris C. E., Benz S., Ebert V., Hunsmann S., Saathoff H., Schnaiter M. and Wagner R. (2008). Heterogeneous ice nucleation activity of bacteria: new laboratory experiments at simulated cloud conditions, *Biogeosciences*, *5*: 1425–1435.

Monier J.-M. and Lindow S. E. (2003). Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*: 15977–15982.

Morris C. E., Glaux C., Latour X., Gardan L., Samson R. and Pitrat M. (2000). The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France, *Phytopathology*, *90*: 636–646.

Morris C. E., Sands D. C., Vinatzer B. A., Glaux C., Guilbaud C., Buffière A., Yan S., Dominguez H. and Thompson B. M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle, *The ISME Journal*, *2*: 321–334.

Reasoner D. and Geldreich E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Applied and Environmental Microbiology*, *49*: 1–7.

Sands D., Langhans V., Scharen A. and de Smet G. (1982). The association between bacteria and rain and possible resultant meteorological implications, *Quarterly Journal of the Hungarian Meteorological Service*, *86*: 148–152.

Sesartic A., Lohmann U. and Storelvmo T. (2012). Bacteria in the ECHAM5-HAM global climate model, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *12*: 8645–8661.

Shaffer B. T. and Lighthart B. (1997). Survey of culturable airborne bacteria at four diverse locations in Oregon: urban, rural, forest, and coastal, *Microbial Ecology*, *34*: 167–177.

Smith D. J., Timonen H. J., Jaffe D. A., Griffin D. W., Birmele M. N., Perry K. D., Ward P. D. and Roberts M. S. (2013). Intercontinental dispersal of bacteria and archaea by transpacific winds, *Applied and Environmental Microbiology*, *79*: 1134–1139.

Thorne P. S., Kiekhaefer M. S., Whitten P. and Donham K. J. (1992). Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine, *Applied and Environmental Microbiology*, *58*: 2543–2551.

Vaïtilingom M., Attard E., Gaiani N., Sancelme M., Deguillaume L., Flossmann A. I., Amato P. and Delort A.-M. (2012). Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France), *Atmospheric Environment*, *56*: 88–100.

Vali G. (1971). Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids, *Journal of the Atmospheric Sciences*, *28*: 402–409.

Wright D. N., Bailey G. D. and Goldberg L. J. (1969). Effect of temperature on survival of airborne *Mycoplasma pneumoniae*, *Journal of Bacteriology*, *99*: 491–495.

Table 1: Detailed results of the experiments carried out in the chamber, expressed as the mean of triplicate analyses ± standard error from the mean when available.

Exp. #	Strain	Initial conditions in the chamber	Time after spraying (min)	CFU m^{-3} ($\times 10^7$)	Cells m^{-3} ($\times 10^7$)	% of cultivable cells	Particles m^{-3} ($\times 10^7$)	Cells/ particle	CFU/ particle	INA m^{-3} at -3°C	INA m^{-3} at -5°C
1	P.s. 32b-74	-5°C	0(a)	352 ± 214	-	-	-	-	-	-	-
			30	12.3 ± 6.28	29.3 ± 0.50	41.8% ± 21.4%	13.8	2.13	0.89	-	-
2	P.s. 32b-74	0°C	0(a)	109 ± 16.9	-	-	-	-	-	-	-
			30	32.8 ± 3.42	27.9 ± 23.2	117.7% ± 98.8%	17.3	1.61	1.9	1109	83177.7
3	P.s. 13b-2	-3°C	0(a)	69.4 ± 17.2	-	-	-	-	-	-	-
			30	31.4 ± 1.03	38.2 ± 0.76	82.3% ± 3.2%	21.6	1.77	1.46	< 25.8	< 25.8
4	P.s. 13b-2	-20°C	0(a)	69.4 ± 17.2	-	-	-	-	-	-	-
			30	21.7 ± 6.09	44.8 ± 0.48	48.5% ± 13.6%	20.4	2.2	1.06	-	-
5	P.f. CGina-01	-3°C	0(a)	134 ± 10.7	-	-	-	-	-	-	-
			30	24.9 ± 2.40	36.1 ± 4.87	68.9% ± 11.4%	26.9	1.34	0.92	< 25.8	669.6
6	P.f. CGina-01	-20°C	0(a)	134 ± 10.7	-	-	-	-	-	-	-
			30	26.4 ± 9.19	28.2 ± 3.55	93.7% ± 34.7%	18.6	1.51	1.42	< 25.8	53.4
		After expansion	150	8.3 ± 2.87	22.1 ± 1.88	37.8% ± 13.4%	-	-	-	< 25.8	< 24.8
7	P.s. 32b-74	Constant -2°C	0(a)	75.4 ± 9.57	-	-	-	-	-	-	-
			30	12.8 ± 2.14	43.6 ± 7.44	29.4% ± 7.0%	21.4	2.04	0.6	554.5	> 1.1×104
			120	7.9 ± 1.13	29.1 ± 3.50	27.2% ± 5.1%	18.4	1.58	0.43	-	-
			300	4.2 ± 0.37	17.1 ± 2.70	24.6% ± 4.4%	15.5	1.1	0.27	-	-
			420	2.6 ± 0.30	14.3 ± 1.84	18.2% ± 3.3%	14.1	1.01	0.18	25.8	4652.6

Exp. #	Strain	Initial conditions in the chamber	Time after spraying (min)	CFU m^{-3} ($\times 10^7$)	Cells m^{-3} ($\times 10^7$)	% of cultivable cells	Particles m^{-3} ($\times 10^7$)	Cells/ particle	CFU/ particle	INA m^{-3} at -3°C	INA m^{-3} at -5°C
8	P.s. 32b-74	Cooling from -2°C to -20°C	0[(a)]	135 ± 32.6	-	-	-	-	-	-	-
			30	23.7 ± 6.88	34.9 ± 2.40	68.0% ± 20.3%	18.5	1.88	1.28	115.1	> 1.1×10^5
			120	12.8 ± 1.54	26.1 ± 1.14	49.1% ± 6.3%	-	-	-	-	-
			300	6.9 ± 0.58	18.5 ± 1.31	37.2% ± 4.1%	-	-	-	-	-
			420	4.6 ± 0.23	15.4 ± 1.52	30.2% ± 3.3%	13.9	1.11	0.33	230.1	> 1.1×10^4
9	P.s. 32b-74	-17°C	0[(a)]	1303 ± 1210	-	-	-	-	-	-	-
			30	124 ± 0.72	25.8 ± 2.43	48.1% ± 5.3%	15.8	1.63	0.79	53.4	11534
		After expansion	150	0.83 ± 0.36	13.9 ± 1.89	5.7% ± 2.7%	-	-	-	< 25.8	< 24.8
10	P.s. 32b-74	-3°C	0[(a)]	157 ± 75.7	-	-	-	-	-	-	-
			30	27.6 ± 3.10	45.1 ± 5.90	61.2% ± 10.6%	17.2	2.62	1.6	2030.1	> 1.1×10^5
			1020	0.57 ± 0.07	10.1 ± 1.07	5.6% ± 0.9%	9.2	1.1	0.06	< 24.8	3923.3
11	P.f. CGina-01	0°C	0[(a)]	8530 ± 6590	-	-	-	-	-	-	-
			30	24.2 ± 4.26	32.1 ± 3.56	75.3% ± 15.7%	28.9	1.11	0.84	< 25.8	1498.8
			1080	0.23 ± 0.005	8.17 ± 0.20	2.9% ± 0.1%	12.1	0.68	0.02	< 25.8	53.4
12	P.s. 32b-74	-12°C	0[(a)]	1120 ± 1030	-	-	-	-	-	-	-
		Coating with sulfates	30	0.96 ± 0.34	31.8 ± 2.42	3.0% ± 1.1%	-	-	-	< 25.8	3923.3
13	P.s. 32b-74	-8°C	0[(a)]	1360 ± 1400	-	-	-	-	-	-	-
			30	22.7 ± 26.4	38.7 ± 2.19	58.6% ± 7.6%	18	2.15	1.26	239.4	57669.8
14	P.s. 32b-74	-15°C	0[(a)]	1360 ± 1400	-	-	-	-	-	-	-
			30	19.5 ± 3.69	30.6 ± 1.91	63.8% ± 12.7%	17.8	1.72	1.1	195.5	40802.5

(a) Deductions from the concentrations measured in the initial cell suspensions.

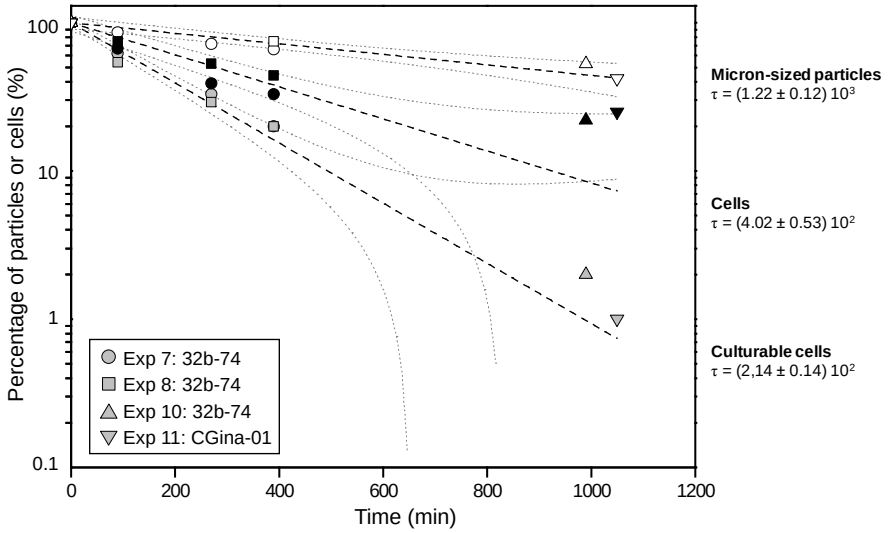


Figure 1: Airborne concentrations of total micron-sized particles (open symbols), total cells (black symbols) and cultivable cells (grey symbols) of *P. s.* 32b-74 and *P. f.* CGina-01 in the chamber. The initial determination of viabilbility, *i.e.* 30 min after aerosolization, was considered as the "time zero". The fits depict the temporal exponential decays (dashed lines: mean fit; dotted lines: 95%-confidence intervals); for total particles: $R^2 = 0.90$, n = 7; for total cells: $R^2 = 0.83$, n = 9; for CFU: $R^2 = 0.98$, n = 9. The time constants (τ) are indicated on the right of the graphic (mean ± standard error; n = 4).

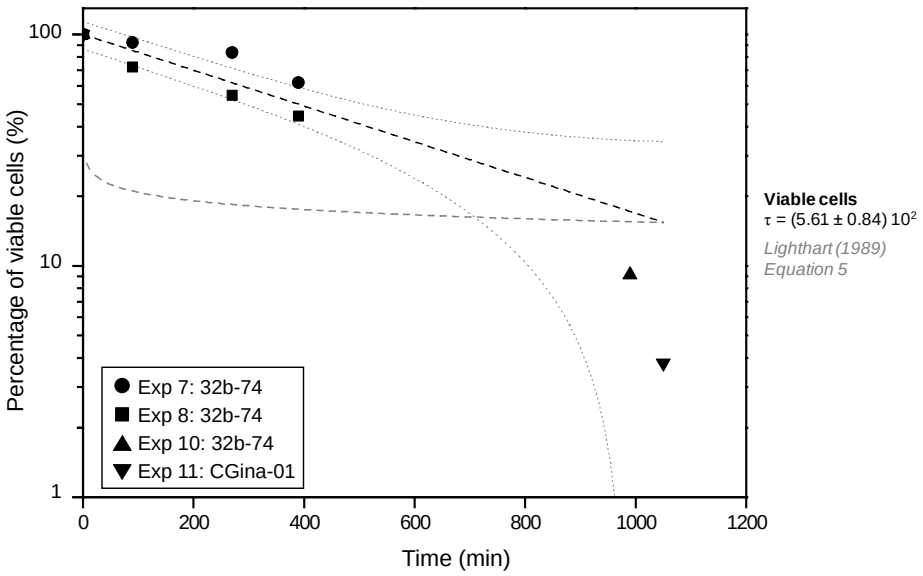


Figure 2: Proportion of viable (*i.e.* cultivable) cells among airborne cells of *P. s.* 32b-74 and *P. f.* CGina-01 in the chamber. The initial determination of viabilbility, *i.e.* 30 min after aerosolization, was considered as the "time zero". The fit depicts the temporal exponential decay (dashed black line: mean fit; dotted lines: 95%-confidence intervals); $R^2 = 0.88$, n = 9. The time constant (τ) is indicated on the right of the graphic (mean ± standard error; n = 4). The equation (5) from *Lighthart* (1989) is

also plotted for visual comparison (dashed grey line); this model fits the data with a Pearson's R^2 of 0.27 (n = 9).

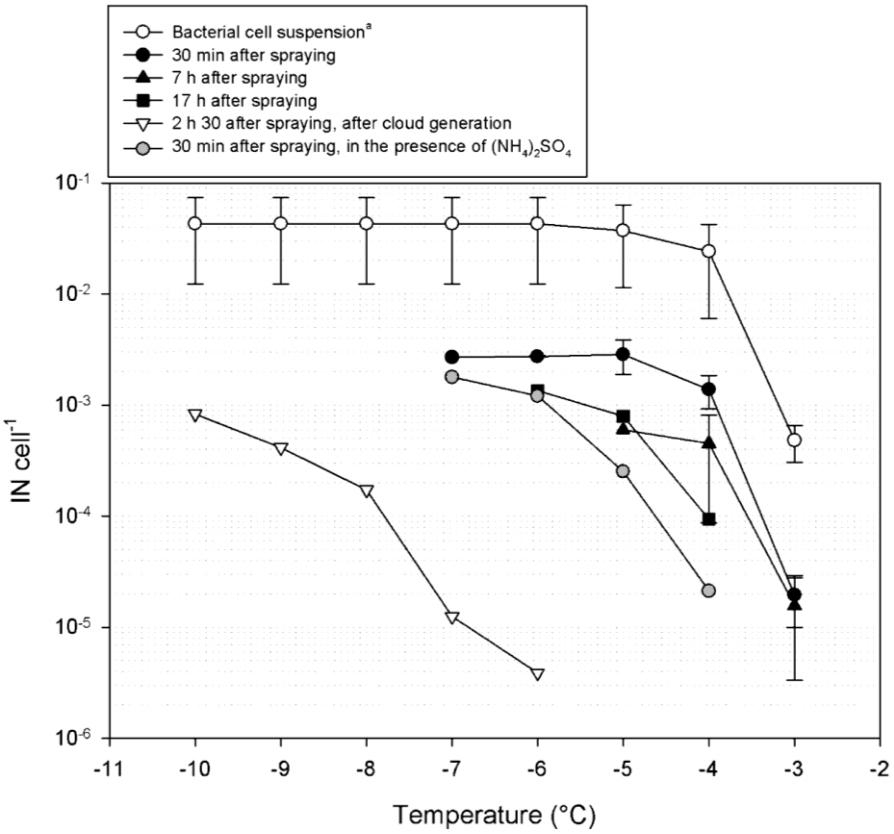


Figure 3: Cumulative frequencies of ice nuclei per cell in airborne *P. s.* 32b-74 cells within the chamber after 30 min, 7 h and 17 h following aerosolization (back symbols), 30 min in the presence of ammonium sulfate (grey symbols), and after 2 h aloft then expansion cooling of the air in the chamber for generating a cloud (open symbols). [a]The freezing profile of bacteria not subjected to aerosolization is also shown for comparison *Joly et al.* (2013)

3.3. "Direct quantification of total and biological ice nuclei in cloud water", paru dans Atmospheric Chemistry and Physics Discussion

Atmos. Chem. Phys. Discuss., 14, 3707–3731, 2014
www.atmos-chem-phys-discuss.net/14/3707/2014/
doi:10.5194/acpd-14-3707-2014
© Author(s) 2014. CC Attribution 3.0 License.

Atmospheric Chemistry and Physics Discussions
Open Access

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.

Direct quantification of total and biological ice nuclei in cloud water

M. Joly[1,2,3,4], P. Amato[1,2], L. Deguillaume[3,4], M. Monier[3,4], C. Hoose[5], and A.-M. Delort[1,2]

[1]Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France
[2]CNRS, UMR6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 80026, 63171 Aubière, France
[3]Clermont Université, Université Blaise Pascal, Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand, Laboratoire de Météorologie Physique, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France
[4]CNRS, UMR6016, Laboratoire de Météorologie Physique/Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand, BP 80026, 63171 Aubière, France
[5]Institute for Meteorology and Climate Research, Karlsruhe Institute of Technology, Wolfgang-Gaede-Weg 1, 76131 Karlsruhe, Germany

Received: 27 January 2014 – Accepted: 28 January 2014 – Published: 11 February 2014

Correspondence to: M. Joly (muriel.mourguy@univ-bpclermont.fr)
and P. Amato (pierre.amato@univ-bpclermont.fr)

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

Abstract

The distribution, abundance and nature of ice nucleation active particles in the atmosphere are major sources of uncertainty in the prediction of cloud coverage, precipitation patterns and climate. Some biological ice nuclei (IN) induce freezing at temperatures at which most other atmospheric particles exhibit no detectable activity (> −10 °C). Their actual contribution to the pool of IN in clouds remains poorly known, but numerical studies suggested their likely significance in atmospheric processes. In this study, cloud water was collected aseptically from the summit of puy de Dôme (1465 m a.s.l., France) within contrasted meteorological and physico-chemical conditions. Total and biological (i.e. heat sensitive) IN were quantified by droplet-freezing assay between −5 °C and −14 °C. Freezing was systematically induced by the presence of biological material, between −6 °C and −8 °C in 92 % of the samples. Its removal by heat treatment led to a decrease of the temperature of freezing by 3 °C to 4 °C. At −10 °C, there were 0 to ∼220 biological IN mL^{-1} of cloud water (i.e. 0 to ∼22 m^{-3} of cloudy air based on cloud liquid water content estimates) and these represented 65 % to 100 % of the total IN. Based on back-trajectory plots and on physico-chemical analyses, the high variability observed resulted probably from a source effect, with IN originating mostly from continental sources. Assuming that biological IN were all bacteria, at maximum 0.6 % of the bacterial cells present in cloud water samples could have acted as IN at −8 °C, 1.5 % at −10 °C, and 3.1 % at −12 °C. The dataset generated here will help elucidating the role of biological and bacterial IN on cloud's microphysics by numeric modelling, and their impact on precipitation at local scale.

1 Introduction

The formation of clouds and their evolution have global impacts on Earth's climate. Within the last decade, considerable efforts have been made in order to identify and quantify the particles acting as ice nuclei (IN) in the atmosphere. Those particles are

responsible for the heterogeneous nucleation of ice in supercooled clouds, leading to modifications of their radiative properties and initiating precipitation. At temperatures colder than about −15 °C, feldspar particles were recently demonstrated to account for a great part to the pool of IN in mixed-phase clouds at a global scale (Atkinson et al., 2013). However, at warmer temperatures, most of the mineral aerosols as well as metallic and soot particles exhibit only very low or undetectable IN activity (INA), and the best candidate ice nuclei are biological (bacteria, fungi), or biogenic (macromolecules derived from living organisms, such as proteins) (Conen et al., 2011; DeMott and Prenni, 2010). Hence, biological IN are thought to largely influence clouds' evolution within the upper range of temperatures around freezing (e.g. Möhler et al., 2007). Among those, the most efficient natural IN described so far are bacteria, with representatives active at temperatures as warm as −2 °C (Maki et al., 1974); other very active biological IN different from bacteria were also detected in the air, but their exact nature remains unknown (Garcia et al., 2012). Specimens of INA bacteria have been recovered from all the compartments of the water cycle: freshwaters (Maki and Willoughby, 1978; Morris et al., 2008), clouds (Joly et al., 2013) and precipitation at high altitude (Sands et al., 1982) or closer to the ground (Constantinidou et al., 1990; Maki and Willoughby, 1978; Šantl-Temkiv et al., 2009; Stephanie and Waturangi, 2011). This supports the hypothetical concept termed "bioprecipitation" that such bacteria could participate to hydrological cycles by triggering precipitation (Morris et al., 2004).

Figure 1 summarizes our current quantitative knowledge about high-temperature (> −15 °C) IN in the atmosphere and in the environmental compartments of the water cycle. The main results of the present study are also indicated. Most plants harbor relatively large populations of epiphytic ice nucleation active (INA) bacteria (Constantinidou et al., 1990; Lindemann et al., 1982; Lindow et al., 1978; Maki and Willoughby, 1978; Morris et al., 2008). So, despite low emission rates disconnecting the concentration of INA bacteria existing at the surface of plants from their concentration in the air above (Garcia et al., 2012), the main source of atmospheric biological IN is probably

vegetation (Pöschl et al., 2010). Recently, oceans were also cited as possible emitters of biogenic IN into the atmosphere (Burrows et al., 2013).

In the air at low altitude, Garcia et al. (2012) observed concentrations of 90 to 460 IN m^{-3} active at −10 °C over vegetated agricultural areas, most of which were classified as biological based on their sensitivity to heat. In the latter study, INA bacterial cells were estimated to represent only a small fraction of the total airborne bacteria (∼ 0.002 %). Nevertheless, some specimens of INA bacterial strains have been recovered by culture from atmospheric samples (e.g. Stephanie and Waturangi, 2011). At high altitude, notwithstanding their suspected importance in atmospheric processes, much less quantitative data of high-temperature IN are available. Their concentration there is in general much below 25 m^{-3}, but it can vary drastically between < 1 and ∼ 100 m^{-3} within very short timeframes (Bowers et al., 2009; Conen et al., 2012; Xia et al., 2013). Interestingly, the highest concentrations were observed at high relative humidity.

Airborne IN can be transported to regions very distant from the source of emission and affect rain patterns after being incorporated into clouds (Creamean et al., 2013). In the single orographic cirrus cloud event studied by Pratt et al. (2009), about half of the 46 ice crystals residues (140–700 nm in diameter; −31 °C ambient temperature) had a mass spectrometry signature typical of mineral dust, while about 33 % were biological particles. More recent and more extensive in situ observations of cirrus clouds at temperatures < −30 °C showed that biological particles are probably much more scarce among the solid residues of ice crystals (i.e. less than 1 %), but that rather mineral dust and metallic particles dominate (Cziczo et al., 2013). However, observing crystal residues does not guaranty the identification of the actual IN, nor does give information about its activity. A quantitative study of high-temperature atmospheric IN was led at the Jungfraujoch summit in the Alps (3450 m a.s.l.); concentrations of 0 to 3.8 m^{-3} were measured when clouds were present on the site (Xia et al., 2013). Albeit, as emphasized by authors, their "precision was low" due to a limited air sample volume of less than 3 m^3.

Fresh snow and rain collected at different locations over the planet, from poles to sub-equatorial regions, carried ~ 1 to ~ 100 IN active at −7 °C per liter of water. The large majority were altered by heat treatment and were thus categorized as biological; about half of these were probably bacteria (Christner et al., 2008a, b). INA bacteria were reported to be relatively more abundant in rainfall than in the air at the same site (Stephanie and Waturangi, 2011), and this may indicate that INA bacteria are preferentially incorporated into rainfall than other bacteria.

Based on these studies, biological IN are undoubtedly present all throughout the water cycle. They represent an important fraction of the pool of high-temperature IN where they were unambiguously quantified: in the air at low altitude, and in precipitation. However, our knowledge about their relative abundance in clouds is still scarce, which limits the evaluation of their impact on hydrological cycles through modeling approaches (Hoose et al., 2010; Phillips et al., 2008). As stressed by DeMott and Prenni (2010), it is technically not possible to provide any realistic concentration of airborne IN particles at the altitude of a cloud from measurements in precipitation, due to possible dilution/concentration effects and to non-nucleation particle scavenging. With the objective to provide quantitative data of IN concentration in clouds that could be utilized for modeling purposes, cloud water samples were collected throughout the year and under various meteorological situations from the summit of the puy de Dôme mountain in France (1465 m a.s.l). The concentrations of total and biological IN were then directly measured by the droplet-freezing method between −5 °C and −14 °C in 12 independent cloud water samples. From these, the maximum possible values of concentration of INA bacteria were then inferred.

2 Material and methods

2.1 Cloud water sampling

Twelve random cloud events were sampled from the puy de Dôme station (45°46′20″ N, 2°57′57″ E, 1465 m a.s.l.) between June 2011 and October 2012. These were numbered from #76 to #87 following numbering of the cloud events sampled at puy de Dôme since 2001 and for which chemical and microbiological datasets are publically available at http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data.php. Cloud droplets were collected with single-stage aluminum droplet impactors (cut-off diameter: ~ 7 µm) sterilized by autoclave, as in Vaïtilingom et al. (2012).

2.2 Physico-chemical characterization and total cell counts

Cloud water samples were recovered either liquid or frozen onto the impaction plate depending on ambient temperature during sampling. For each sample, pH and conductivity were measured (Consort multiparameters C830) and major inorganic and organic ions were examined by ion chromatography (Dionex DX320 for anions and Dionex ICS1500 for cations). As the liquid water content (LWC) was not available directly during our sampling, we assigned a theoretical value based on a 10 yr monitoring of cloud at the puy de Dôme (Deguillaume et al., 2013). The minimum, average or maximum value (0.1, 0.3 or 0.6 g m^{-3}) was attributed according to the volume of water collected over the duration of sampling. Finally, 72 h back-trajectories of the sampled air masses were computed using HYSPLIT model (HYbrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory) (Draxler and Rolph, 2010).

Total bacteria were counted by epifluorescence microscopy on DAPI stained samples as in Vaïtilingom et al. (2012). Directly after collection, samples were fixed by the addition of 2 % formaldehyde (final concentration; from 20 % stock solution prepared in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.0), and incubated in the presence of 2.5 µg mL^{-1} of DAPI (4',6-diamino-2-phenylindol) in the dark for at least 20 min before filtration

on GTBP black filters (0.22 µm porosity; Millipore). Filters were then mounted on microscope slides and observed under UV-epifluorescence microscopy (λ_{exc} = 365 nm; λ_{em} = 420 nm) (Leica DM-IRB).

2.3 Droplet-freezing assays

The ice nucleation activity (INA) of the cloud water samples was determined within 2 h after collection following the well-tried droplet-freezing method (Vali, 1971). Thirty-two to 160 drops of 20 µL were distributed in 0.2 mL microtubes designed for high thermal conductivity and preventing aerial contamination and evaporation (Stopelli et al., 2013). These were placed in a cooling bath (Julabo F34-ED) at decreasing temperatures from −5 °C to −14 °C, with 1 °C intervals for 8 min. The tubes were visually inspected at the end of each temperature step and those still liquid were counted. The concentration (mL^{-1}) of ice nuclei CIN at the temperature T in the suspensions was calculated using the equation in Vali (1971):

$$C_{IN} = [\ln(N_{total}) - \ln(N_{liquid})]_T / V \cdot (1/D_f)$$

where N_{total} is the total number of droplets, N_{liquid} the number of droplets still liquid after 8 min at the temperature T, V the volume of the droplets assayed (mL) and D_f the dilution factor of the suspension. Under our experimental conditions, the limits of quantification ranged from 1.59 to 173.3 IN mL^{-1} in the case where 32 droplets were assayed, and from 0.31 to 253.8 IN mL^{-1} in the case where 160 droplets were assayed. Negative controls consisted of ultrapure sterile water droplets and these remained liquid over all the range of temperatures investigated.

2.4 Biological IN quantification

For each sample, the concentration of biological IN (INA_{bio}) was calculated as the difference between the concentration of IN measured in untreated sample (INA_{total}) and the concentration of IN measured after heating for 10 min at 95 °C (INA_{heated}), as in

Christner et al. (2008a) and in Garcia et al. (2012). Heat denatures protein structures, so it eliminates at least a certain fraction of biological IN without altering non-biological material. When $[(INA_{heated})_{T-1} - (INA_{heated})_T]$ exceeded $[(INA_{total})_{T-1} - (INA_{total})_T]$, this calculation artificially led to a decrease in the concentration of INA_{bio} at $T-1$ compared to T and values of INA_{heated} were corrected for being consistent with the values of INA_{total}. Following this rule, three values of INA_{heated} were corrected: −12 °C in sample #79, −10 °C in sample #82 and −11 °C in sample #86.

2.5 Statistical analyses

All statistical analyses were made using the R software version 2.12.2 (R Core Team, 2011).

3 Results and discussion

3.1 Main characteristics of the cloud water samples

The main biological and physico-chemical characteristics of the 12 cloud samples studied are presented in Table 1. Ion composition is given in more details in Table S1 (data also available online at http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data.php). Ambient temperature during collection ranged from −1.5 °C to 13.3 °C, so, as indicated in Table 1, some samples consisted of ice formed upon impaction on the collectors (samples #80 through #84); others samples were collected as liquid. Most of the air masses sampled originated from west (Atlantic Ocean) and travelled over different continental areas in Europe before hitting the puy de Dôme, following different trajectories (Fig. S1). Consistently, the chemical composition varied greatly from one sample to another. The pH ranged from 4.5 to 6.2, which are typical values for cloud water (e.g. Deguillaume et al., 2013). Ammonium (16.8 to 531.1 µM), sodium (0.6 to 145.7 µM), nitrate (1.0 to 126.0 µM) and sulfate (0.5 to 52.2 µM) dominated among inorganic ions, and formate was the most abundant dissolved carboxylic acid (3.2 to 109.6 µM) (Table S1).

The chemical signature of the samples attested of mixed influences from oceanic and continental sources, the respective contributions to the global chemical composition of which were more or less marked depending on the origin of the air mass.

3.2 Quantification of total and biological ice nuclei

The total concentration of IN active between −5 °C and −14 °C was determined by direct droplet freezing assays. Eleven of the 12 cloud samples (92 %) froze at −8 °C or warmer, and none remained supercooled at temperatures below −11 °C (Table 2; Fig. 2). Ice initially formed due to the presence of 0.6 to 8.5 IN mL^{-1} (Table 2; Fig. 3a). Two samples (#81 and #83) were clearly outlying with much higher IN concentrations (∼ 70 mL^{-1} at −8 °C). After correction for LWC (Fig. 3b), the concentration of IN per volume of cloudy air ranged from 0.06 to more than 71.1 m^{-3} between −6 °C and −14 °C. This is in the range of concentrations typically observed in the air at high altitude (Fig. 1) (Bowers et al., 2009; Xia et al., 2013), and one order of magnitude lower than the concentrations measured at low altitude (Garcia et al., 2012).

Rain and surface snow samples analyzed using similar methods by Christner et al. (2008a, b) had total IN concentrations of about ∼ 1 to ∼ 300 per liter of water at −8 °C, i.e. 2 orders of magnitude fewer than in our cloud water samples. This probably resulted from the relative dilution of insoluble particles in precipitation compared to cloud water (Flossmann and Wobrock, 2010), and from differences in sample handling: Christner et al. filtered samples for concentrating particles larger than 0.22 µm, so smaller IN particles were missed, among which some could have originated from bacteria (Phelps et al., 1986). In addition, it is possible that a fraction of IN particles was not recovered from the filters.

Heating samples for 10 min at 95 °C invariably decreased the highest temperature of freezing (Fig. 2), in general by 3 °C to 4 °C, and by 1 °C to more than 5 °C in samples #81 and #77, respectively (Table 2). This indicated that heat sensitive IN (thereafter termed biological IN) were systematically responsible for freezing at the warmest temperature. As other IN were activated at lower temperature, the relative contribution of biological

IN decreased with decreasing temperature, from 97 % to 100 % of the total number of IN active at −8 °C to at least 77 % at −12 °C (Table 2). These are in accordance with observations of IN in the air (Garcia et al., 2012) and in precipitation (Christner et al., 2008a, b).

The average absolute concentrations of biological and non-biological IN are represented on Fig. 4. Since heat treatment does probably not inactivate every IN site of biological material such as fungi or pollen, the concentrations of biological IN reported here should be seen as conservative (i.e. lowest possible) values. Clearly, non-biological (i.e. heat resistant) particles contribution became significant only around −12 °C and colder. Principal component analysis (PCA) revealed 2 different groups of IN depending on their temperature of activity, with a net separation between −10 °C and −11 °C (Fig. S2). This demonstrated differences in the origin of the two sets of IN and so probably in their nature as well. The clear positive correlation existing between $IN_{T\leq-11°C}$ and soluble inorganic ions concentrations supports their inorganic composition (Fig. S2). $IN_{T>-11°C}$, i.e. biological IN, were not related to any of the chemical parameters measured, except a negative correlation with the concentration of chloride, which mostly originates from marine environment (Warneck, 1999). This tends to situate the sources of biological IN on the continent, for the puy de Dôme site.

3.3 Estimation of the contribution of bacteria to biological IN

Joly et al. (2013) proposed an estimation of the concentration of INA bacteria in clouds based on laboratory results. It was proposed that between 0 and ∼ 500 bacterial cells mL^{-1} could act as IN in cloud water at −10 °C. This very wide range needed clarification. In order to discriminate bacterial IN from others biological IN, Christner et al. (2008a, b) suggested treating samples with lysozyme. This was intended to alter bacterial cell wall and selectively eliminate bacterial IN. Lysozyme is indeed responsible for the lysis of peptidoglycans (hydrolysis of the 1,4-β-linkages between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine) and thus specifically targets Gram-positive bacteria. So far, all INA bacteria described in literature including those

encountered in clouds were Gram-negative species (Cochet and Widehem, 2000; Joly et al., 2013) and they are thus expected to be insensitive to lysozyme. This was verified on 2 of our cloud samples and on laboratory cultures of INA Gamma-Proteobacteria isolated from cloud water (those reported in Joly et al., 2013): lysozyme had no effect on the freezing profiles (not shown). So, this treatment was finally judged not relevant here and it was not further applied.

In our samples, bacteria concentration ranged from 1.6×10^3 to 3.4×10^4 mL^{-1}, which is within the range of concentrations typically observed in cloud water at the puy de Dôme site (Vaïtilingom et al., 2012) (Table 1). This was significantly correlated with the proportion of biological IN at −9 °C (Spearman correlation test; $p = 0.043$, $n = 8$), suggesting that either bacteria or some particles associated with the presence of bacteria contributed for a great part to heat-sensitive IN. Hence, in order to provide an estimation of the proportion of INA bacteria in our samples, biological IN concentration was normalized to bacteria concentration (Table 3 and Fig. 5). This has to be considered as an upper estimate as it obviously assumes only one IN site per cell, which is the most likely (Hartmann et al., 2013), and it ignores the fact that a certain but unknown fraction of biological materials other than bacteria could also have been inactivated by heat and contributed to the population of biological IN, such as cell fragments for example (Hartmann et al., 2013). At the temperature of −6 °C, a maximum of 0.1 % of the bacteria could have been responsible for freezing (sample #82). This proportion reached maxima of 1.24 % at −9 °C and 3.06 % at −12 °C (in samples #83 and #85, respectively), or about 200 INA cells mL^{-1}. In the air over vegetated areas, INA bacteria were estimated to contribute only ∼ 0.002 % of the total cells (Garcia et al., 2012), and this proportion falls to less than 0.001 % at high altitude (Xia et al., 2013). In snowfall, comparable estimations gave a very similar fraction of 0.4 % of bacterial cells acting as IN between −4 °C and −7 °C (Christner et al., 2008a) (Fig. 1). In laboratory cultures of INA bacteria, the proportion of individual cells actually acting as IN largely depends on the strain. Except in some exceptionally efficient microorganisms for which this can reach up to more than 4 %, this is often around 1 % at −9 °C, and in general well below

0.1 % at −6 °C (Joly et al., 2013; Šantl-Temkiv et al., 2009; Yankofsky et al., 1981). So, at temperatures below −6 °C, the proportion of INA bacterial cells in clouds basically matched laboratory cultures.

Low pH (i.e. pH ∼ 4) was shown to negatively impact bacterial INA (Turner et al., 1990). This suggested attenuation of bacterial IN efficiency in polluted clouds due to anthropogenic emissions responsible for acidification (Attard et al., 2012). Among the set of clouds investigated here, only sample #79, with a pH of 4.6, was clearly under influence of Human emissions. Yet its freezing profile was not different from others, and on the whole we found no significant relationship between pH and total or biological IN concentrations (Spearman correlation test; the p values ranged from 0.46 to 1 between −6 °C and −13 °C).

4 Conclusion

To our knowledge, this study constitutes the first quantitative dataset of biological IN measured directly in cloud water. A basic but straightforward experimental set up allowed to determine that the concentration of total IN varies in general between ∼ 1 and ∼ 200 mL^{-1} at −10 °C. As previously observed in the air (Garcia et al., 2012) and in precipitation (Christner et al., 2008a), heat-sensitive material, i.e. biological particles, were systematically responsible for freezing at the warmest temperatures and largely dominated the population of IN particles at temperatures down to −11 °C. These data support the possibility that biological material could contribute to the evolution of clouds by triggering precipitation at high temperatures.

A certain proportion of the biological IN detected in the cloud water samples were likely bacterial cells. Some specimens were indeed previously recovered by culture from several clouds collected at that site (Joly et al., 2013). Assuming that the biological IN observed were all bacterial cells, between 0 % and about 1.5 % of the total bacteria were IN at −10 °C. This extends to much higher values than the proportion of around 0.001 % and 0.4 % proposed for air (Garcia et al., 2012; Xia et al., 2013)

and precipitation, respectively (Christner et al., 2008b). If confirmed, such an over-representation of high-temperature INA cells in cloud water compared to other places in nature would raise the question of the existence of a particular link of ice nucleation active microorganisms with these environments.

Such estimates of in-cloud biological IN concentrations will allow the community of atmospheric scientists to explore, e.g. using cloud-resolving models, the extent to which these particles can contribute to cloud glaciation, to modification of cloud radiative properties and to regional precipitation patterns.

Supplementary material related to this article is available online at http://www.atmos-chem-phys-discuss.net/14/3707/2014/acpd-14-3707-2014-supplement.pdf.

Acknowledgements. MJ is grateful to Region Auvergne and FEDER for PhD scholarship. We thank Martine Sancelme and Guillaume Voyard for technical help on microbiology and ion chromatography respectively, and the OPGC staff, particularly Jean-Marc Pichon, for their excellent logistic support at the puy de Dôme mountain Observatory. We are also grateful to LMGE UMR 6023 CNRS-UBP for kindly providing access to microscopes.

References

Atkinson, J. D., Murray, B. J., Woodhouse, M. T., Whale, T. F., Baustian, K. J., Carslaw, K. S., Dobbie, S., O'Sullivan, D., and Malkin, T. L.: The importance of feldspar for ice nucleation by mineral dust in mixed-phase clouds, Nature, 498, 355–358, 2013.

Attard, E., Yang, H., Delort, A.-M., Amato, P., Pöschl, U., Glaux, C., Koop, T., and Morris, C. E.: Effects of atmospheric conditions on ice nucleation activity of *Pseudomonas*, Atmos. Chem. Phys., 12, 10667–10677, doi:10.5194/acp-12-10667-2012, 2012.

Bowers, R. M., Lauber, C. L., Wiedinmyer, C., Hamady, M., Hallar, A. G., Fall, R., Knight, R., and Fierer, N.: Characterization of airborne microbial communities at a high-elevation site and their potential to act as atmospheric ice nuclei, Appl. Environ. Microb., 75, 5121–5130, 2009.

Burrows, S. M., Hoose, C., Pöschl, U., and Lawrence, M. G.: Ice nuclei in marine air: biogenic particles or dust?, Atmos. Chem. Phys., 13, 245–267, doi:10.5194/acp-13-245-2013, 2013.

Christner, B. C., Cai, R., Morris, C. E., McCarter, K. S., Foreman, C. M., Skidmore, M. L., Montross, S. N., and Sands, D. C.: Geographic, seasonal, and precipitation chemistry influence on the abundance and activity of biological ice nucleators in rain and snow, P. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 18854–18859, 2008a.

Christner, B. C., Morris, C. E., Foreman, C. M., Cai, R., and Sands, D. C.: Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall, Science, 319, p. 1214, 2008b.

Cochet, N. and Widehem, P.: Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 54, 153–161, 2000.

Conen, F., Morris, C. E., Leifeld, J., Yakutin, M. V., and Alewell, C.: Biological residues define the ice nucleation properties of soil dust, Atmos. Chem. Phys., 11, 9643–9648, doi:10.5194/acp-11-9643-2011, 2011.

Conen, F., Henne, S., Morris, C. E., and Alewell, C.: Atmospheric ice nucleators active $\geq -12\,^{\circ}$C can be quantified on PM_{10} filters, Atmos. Meas. Tech., 5, 321–327, doi:10.5194/amt-5-321-2012, 2012.

Constantinidou, H., Hirano, S. S., Baker, L. S., and Upper, C. D.: Atmospheric dispersal of ice nucleation-active bacteria: the role of rain, Phytopathology, 80, 934–937, 1990.

Creamean, J. M., Suski, K. J., Rosenfeld, D., Cazorla, A., DeMott, P. J., Sullivan, R. C., White, A. B., Ralph, F. M., Minnis, P., Comstock, J. M., Tomlinson, J. M., and Prather, K. A.: Dust and biological aerosols from the Sahara and Asia influence precipitation in the Western US, Science, 339, 1572–1578, 2013.

Cziczo, D. J., Froyd, K. D., Hoose, C., Jensen, E. J., Diao, M., Zondlo, M. A., Smith, J. B., Twohy, C. H., and Murphy, D. M.: Clarifying the dominant sources and mechanisms of cirrus cloud formation, Science, 340, 1320–1324, 2013.

Deguillaume, L., Charbouillot, T., Joly, M., Vaïtilingom, M., Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Delort, A.-M., Vinatier, V., Flossmann, A., Chaumerliac, N., Pichon, J. M., Houdier, S., Laj, P., Sellegri, K., Colomb, A., Brigante, M., and Mailhot, G.: Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) from 10 yr monitoring: mean features of their physico-chemical properties, Atmos. Chem. Phys. Discuss., 13, 22795–22846, doi:10.5194/acpd-13-22795-2013, 2013.

DeMott, P. J. and Prenni, A. J.: New directions: need for defining the numbers and sources of biological aerosols acting as ice nuclei, Atmos. Environ., 44, 1944–1945, 2010.

Draxler, R. and Rolph, G.: HYSPLIT (HYbrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory model, available at: http://ready.arl.noaa.gov/HYSPLI~T.php (5 February 2014), 2010.
Flossmann, A. I. and Wobrock, W.: A review of our understanding of the aerosol–cloud interaction from the perspective of a bin resolved cloud scale modelling, Atmos. Res., 97, 478–497, 2010.
Garcia, E., Hill, T. C. J., Prenni, A. J., DeMott, P. J., Franc, G. D., and Kreidenweis, S. M.: Biogenic ice nuclei in boundary layer air over two US high plains agricultural regions, J. Geophys. Res.-Atmos., 117, D018209, doi:10.1029/2012JD018343, 2012.
Hartmann, S., Augustin, S., Clauss, T., Wex, H., Šantl-Temkiv, T., Voigtländer, J., Niedermeier, D., and Stratmann, F.: Immersion freezing of ice nucleation active protein complexes, Atmos. Chem. Phys., 13, 5751–5766, doi:10.5194/acp-13-5751-2013, 2013.
Hoose, C., Kristjánsson, J. E., and Burrows, S. M.: How important is biological ice nucleation in clouds on a global scale?, Environ. Res. Lett., 5, 024009, doi:10.1088/1748-9326/5/2/024009, 2010.
Joly, M., Attard, E., Sancelme, M., Deguillaume, L., Guilbaud, C., Morris, C. E., Amato, P., and Delort, A.-M.: Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water, Atmos. Environ., 70, 392–400, 2013.
Lindemann, J., Constantinidou, H. A., Barchet, W. R., and Upper, C. D.: Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation-active bacteria, Appl. Environ. Microb., 44, 1059–1063, 1982.
Lindow, S., Arny, D., and Upper, C.: Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature, Appl. Environ. Microb., 36, 831–838, 1978.
Maki, L. R., Galyan, E. L., Chang-Chien, M. M., and Caldwell, D. R.: Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*, Appl. Environ. Microb., 28, 456–459, 1974.
Maki, L. R. and Willoughby, K. J.: Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei, J. Appl. Meteorol., 17, 1049–1053, 1978.
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, doi:10.5194/bg-4-1059-2007, 2007.
Morris, C. E., Georgakopoulos, D. G., and Sands, D. C.: Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation, J. Phys. IV, 121, 87–103, 2004.

Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, 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.
Phelps, P., Giddings, T. H., Prochoda, M., and Fall, R.: Release of cell-free ice nuclei by *Erwinia herbicola*, J. Bacteriol., 167, 496–502, 1986.
Phillips, V. T. J., DeMott, P. J., and Andronache, C.: An empirical parameterization of heterogeneous ice nucleation for multiple chemical species of aerosol, J. Atmos. Sci., 65, 2757–2783, 2008.
Pöschl, U., Martin, S. T., Sinha, B., Chen, Q., Gunthe, S. S., Huffman, J. A., Borrmann, S., Farmer, D. K., Garland, R. M., Helas, G., Jimenez, J. L., King, S. M., Manzi, A., Mikhailov, E., Pauliquevis, T., Petters, M. D., Prenni, A. J., Roldin, P., Rose, D., Schneider, J., Su, H., Zorn, S. R., Artaxo, P., and Andreae, M. O.: Rainforest aerosols as biogenic nuclei of clouds and precipitation in the Amazon, Science, 329, 1513–1516, 2010.
Pratt, K. A., DeMott, P. J., French, J. R., Wang, Z., Westphal, D. L., Heymsfield, A. J., Twohy, C. H., Prenni, A. J., and Prather, K. A.: In situ detection of biological particles in cloud ice-crystals, Nat. Geosci., 2, 398–401, 2009.
R Core Team: R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, available at: http://ready.arl.noaa.gov/HYSPLIT.php (last access: 5 February 2014), 2011.
Sands, D., Langhans, V., Scharen, A., and de Smet, G.: The association between bacteria and rain and possible resultant meteorological implications, Quart. J. Hung Meteorol. Serv., 86, 148–152, 1982.
Šantl-Temkiv, T., Gosewinkel-Karlson, U., Finster, K., and Munk Hansen, B.: The diversity and proportion of ice nucleation active bacteria in rain and their ability to produce extracellular ice nucleation active particles, 18th International Conference on Nucleation and Atmospheric Aerosols (ICNAA), 1460–1466, Prague, Czech Republic, 10–14 August 2009.
Stephanie and Waturangi, D. E.: Distribution of Ice Nucleation-Active (INA) bacteria from rainwater and air, HAYATI, 18, 108–112, 2011.
Stopelli, E., Conen, F., Zimmermann, L., Alewell, C., and Morris, C. E.: Freezing nucleation apparatus puts new slant on study of biological ice nucleators in precipitation, Atmos. Meas. Tech. Discuss., 6, 9163–9180, doi:10.5194/amtd-6-9163-2013, 2013.
Turner, M. A., Arellano, F., and Kozloff, L. M.: Three separate classes of bacterial ice nucleation structures, J. Bacteriol., 172, 2521–2526, 1990.

Vaïtilingom, M., Attard, E., Gaiani, N., Sancelme, M., Deguillaume, L., Flossmann, A. I., Amato, P., and Delort, A.-M.: Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France), Atmos. Environ., 56, 88–100, 2012.

Vali, G.: Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids, J. Atmos. Sci., 28, 402–409, 1971.

Warneck, P.: Chemistry of clouds and precipitation, in: Chemistry of the natural atmosphere, edited by: Dmowska, R., Holton, J. R., and Rossby, H. T., Academic Press, San Diego, USA, 451–510, 1999.

Xia, Y., Conen, F., and Alewell, C.: Total bacterial number concentration in free tropospheric air above the Alps, Aerobiologia, 29, 153–159, 2013.

Yankofsky, S., Levin, Z., Bertold, T., and Sandlerman, N.: Some basic characteristics of bacterial freezing nuclei, J. Appl. Meteorol., 20, 1013–1019, 1981.

Discussion Paper | Discussion Paper | Discussion Paper | Discussion Paper |

Table 1. Meteorological, physico-chemical and biological parameters of the cloud water samples investigated in this study. The samples that were recovered as ice are indicated in italic. See detailed ion composition in Table SM1.

Cloud sample event #	Date	Temperature (°C)	pH	LWC ($g\,m^{-3}$)	Total bacteria (mL^{-1})
# 76	29 Jun 2011	11.5	5.88	0.6	n.d.*
# 77	7 Jul 2011	12.0	5.95	0.1	n.d.*
# 78	20 Jul 2011	8.3	5.50	0.3	12 355
# 79	7 Nov 011	7.0	4.57	0.6	10 825
# 80	*20 Jan 2012*	*−0.4*	*4.90*	*0.3*	*9980*
# 81	*23 Jan 2012*	*−1.2*	*5.82*	*0.1*	*33 724*
# 82	*19 Mar 2012*	*−1.5*	*5.25*	*0.1*	*1648*
# 83	*4 Apr 2012*	*−0.4*	*5.60*	*0.1*	*14 914*
# 84	*18 Apr 2012*	*0.2*	*5.47*	*0.1*	*3902*
# 85	25 Jun 2012	13.3	5.52	0.3	4474
# 86	13 Jun 2012	6.0	5.89	0.6	5199
# 87	10 Oct 2012	9.4	6.22	0.6	19 658

* n.d.: not determined.

Discussion Paper | Discussion Paper | Discussion Paper | Discussion Paper |

Table 2. Concentration of total IN and proportion of heat-sensitive IN in the cloud water samples between −5 °C and −14 °C. Values below the detection limit are presented as "0" for visual clarity, and a ">" indicates values higher than our detection limit.

	IN mL^{-1} [total (% heat sensitive)] Temperature (°C)									
Sample	−5 °C	−6 °C	−7 °C	−8 °C	−9 °C	−10 °C	−11 °C	−12 °C	−13 °C	−14 °C
# 76	0	0	0	4.92	18.73	31.63	45.04	118.36	n.d.*	n.d.*
	(– %)	(– %)	(– %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(99 %)		
# 77	0	0	0	4.92	12.34	14.38	92.81	138.63	n.d.*	n.d.*
	(– %)	(– %)	(– %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)		
# 78	0	0	0	1.59	8.49	16.51	26.06	69.31	n.d.*	n.d.*
	(– %)	(– %)	(– %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(94 %)	(88 %)		
# 79	0	0	0	3.23	8.49	12.34	16.51	16.51	n.d.*	n.d.*
	(– %)	(– %)	(– %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)		
# 80	0	0	0	4.92	12.34	16.51	18.73	53.39	n.d.*	n.d.*
	(– %)	(– %)	(– %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(92 %)	(91 %)		
# 81	0	0	8.49	63.43	> 173.3	> 173.3	> 173.3	> 173.3	n.d.*	n.d.*
	(– %)	(– %)	(100 %)	(97 %)	(< 99 %)	(< 97 %)	(< 95 %)	(< 92 %)		
# 82	0	1.59	6.68	10.38	18.73	21.06	28.77	53.39	n.d.*	n.d.*
	(– %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(74 %)	(66 %)	(70 %)	(77 %)		
# 83	0	0.63	7.40	73.21	184.44	217.51	> 253.8	> 253.8	n.d.*	n.d.*
	(– %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(99.3 %)	(< 97 %)	(< 93 %)		
# 84	0	1.59	2.40	11.35	16.51	18.73	30.18	41.33	110.65	> 207.9
	(– %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(90 %)	(92 %)	(95 %)	(88 %)	(66 %)	(< 55 %)
# 85	0	0	0	2.24	3.23	5.27	34.66	138.63	> 253.8	> 253.8
	(– %)	(– %)	(– %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(99 %)	(< 91 %)	(< 45 %)
# 86	0	0	1.59	3.23	8.49	14.38	14.38	18.73	49.04	> 173.3
	(– %)	(– %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(89 %)	(89 %)	(83 %)	(93 %)	(< 56 %)
# 87	0	0	0	0	0	0	3.23	28.77	83.70	> 173.3
	(– %)	(– %)	(– %)	(– %)	(– %)	(– %)	(100 %)	(100 %)	(72 %)	(< 46 %)
Min	0	0	0	0	0	0	3.23	18.10	49.04	> 173.3
	(– %)	(– %)	(– %)	(– %)	(– %)	(– %)	(100 %)	(91 %)	(93 %)	(< 46 %)
Max	0	1.59	8.49	73.21	184.44	217.51	> 253.8	> 253.8	> 253.8	> 253.8
	(– %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(99.3 %)	(< 97 %)	(< 93 %)	(< 91 %)	(< 45 %)

* n.d.: not determined.

Table 3. Inferred upper proportion of INA bacteria in the cloud water samples based on the concentration of heat-sensitive IN and on total bacteria counts. A ">" indicate values higher than our detection limit for heat-sensitive IN.

	IN/bacterial cell Temperature (°C)								
Sample	−6 °C	−7 °C	−8 °C	−9 °C	−10 °C	−11 °C	−12 °C	−13 °C	−14 °C
# 78	0.00 %	0.00 %	0.01 %	0.07 %	0.13 %	0.20 %	0.49 %	> 0.49 %	> 0.49 %
# 79	0.00 %	0.00 %	0.03 %	0.08 %	0.11 %	0.15 %	0.15 %	> 0.15 %	> 0.15 %
# 80	0.00 %	0.00 %	0.05 %	0.12 %	0.17 %	0.17 %	0.49 %	> 0.49 %	> 0.49 %
# 81	0.00 %	0.03 %	0.18 %	> 0.51 %	> 0.51 %	> 0.51 %	> 0.51 %	> 0.51 %	> 0.51 %
# 82	0.10 %	0.41 %	0.63 %	0.84 %	0.84 %	1.23 %	2.49 %	> 2.49 %	> 2.49 %
# 83	0.00 %	0.05 %	0.49 %	1.24 %	1.46 %	> 1.66 %	> 1.66 %	> 1.66 %	> 1.66 %
# 84	0.04 %	0.06 %	0.29 %	0.38 %	0.44 %	0.73 %	0.93 %	1.86 %	> 2.95 %
# 85	0.00 %	0.00 %	0.05 %	0.07 %	0.12 %	0.77 %	3.06 %	> 5.15 %	> 5.15 %
# 86	0.00 %	0.03 %	0.06 %	0.16 %	0.25 %	0.25 %	0.30 %	0.88 %	> 1.87 %
# 87	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.00 %	0.02 %	0.15 %	0.31 %	> 0.41 %
Mean	0.01 %	0.06 %	0.18 %	> 0.35 %	> 0.40 %	> 0.57 %	> 1.02 %	> 1.40 %	> 1.62 %

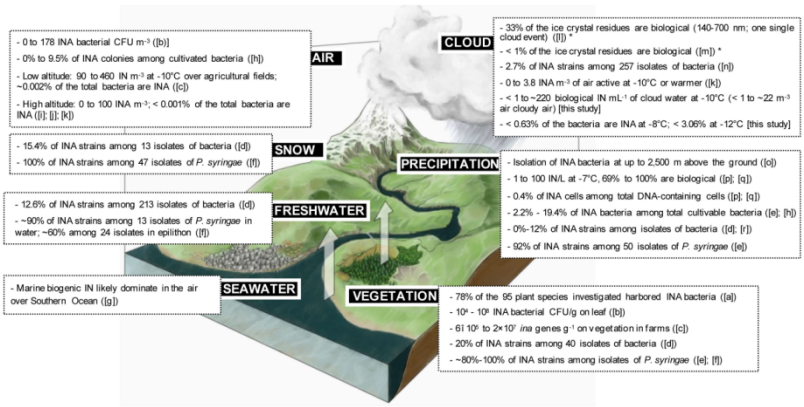


Fig. 1. Schematic summarizing our current knowledge about the abundance of biological IN active at temperatures $\geq -10\,^{\circ}C$ in the different environmental links of the water cycle. A "*" indicates data relative to ice crystal residues in clouds at much colder temperatures. [a] Lindow et al. (1978); [b] Lindemann et al. (1982); [c] Garcia et al. (2012); [d] Maki and Willoughby (1978); [e] Constantinidou et al. (1990); [f] Morris et al. (2008); [g] Burrows et al. (2013); [h] Stephanie and Waturangi (2011); [i] Bowers et al. (2009); [j] Conen et al. (2012); [k] Xia et al. (2013); [l] Pratt et al. (2009); [m] Cziczo et al. (2013); [n] Joly et al. (2013); [o] Sands et al. (1982); [p] Christner et al. (2008a); [q] Christner et al. (2008b); [r] Šantl-Temkiv et al. (2009).

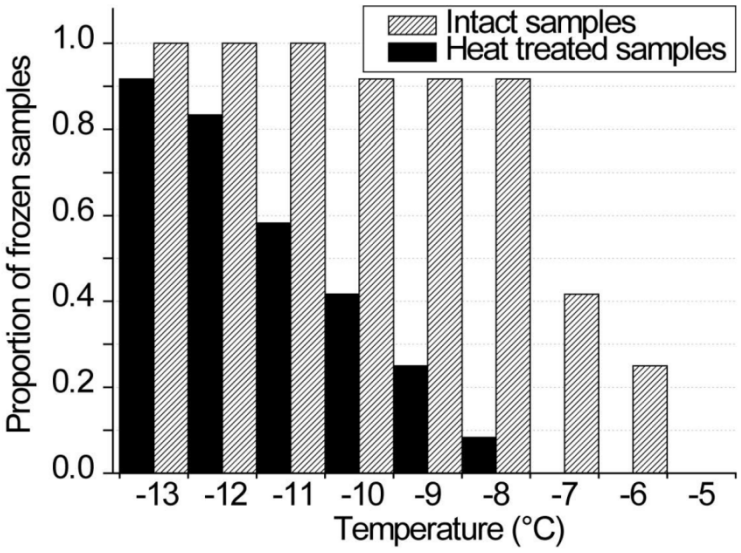


Fig. 2. Cumulative proportion of maximum freezing temperature of the 12 cloud water samples, in the absence of treatment (shaded bars) or after heating at 95 °C for 10 min (black bars).

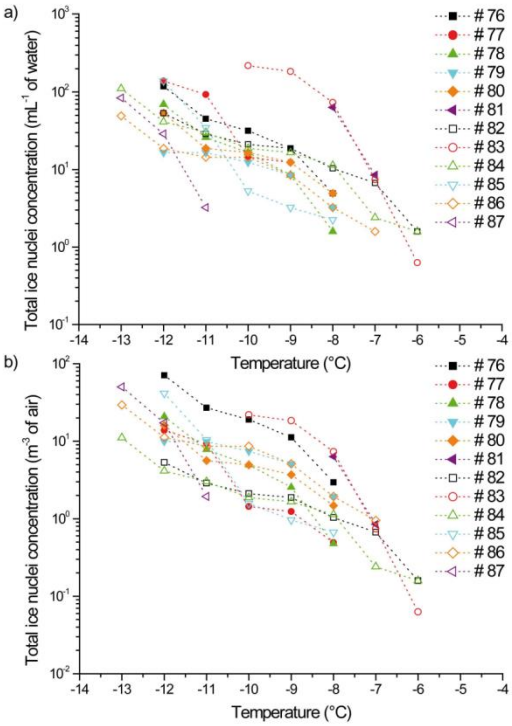


Fig. 3. Cumulative concentration of total IN in the cloud samples, **(a)** per volume of water sample (mL^{-1}) and **(b)** per corresponding volume of cloudy air (m^{-3}).

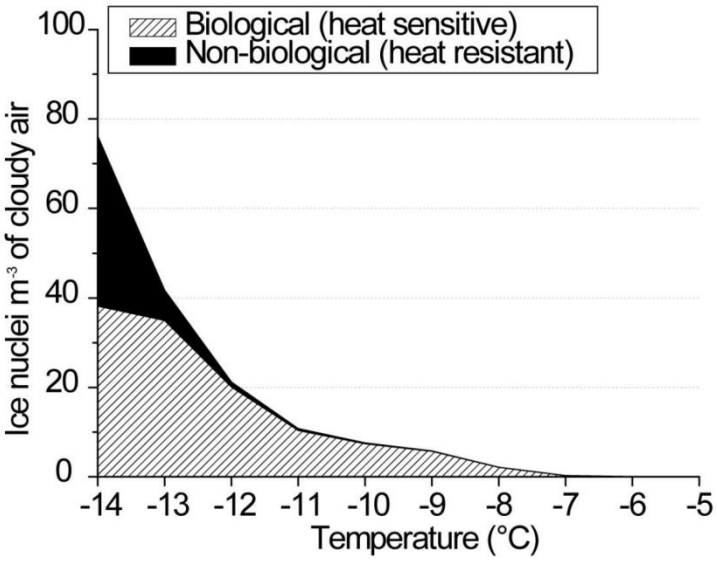


Fig. 4. Mean cumulative concentrations of biological (heat-sensitive, shaded area) and non-biological (heat-resistant, black area) IN in clouds (n = 12) per volume of air. The sum of the two categories corresponds to the mean concentration of total IN. The lower bound was considered for values below the detection limit.

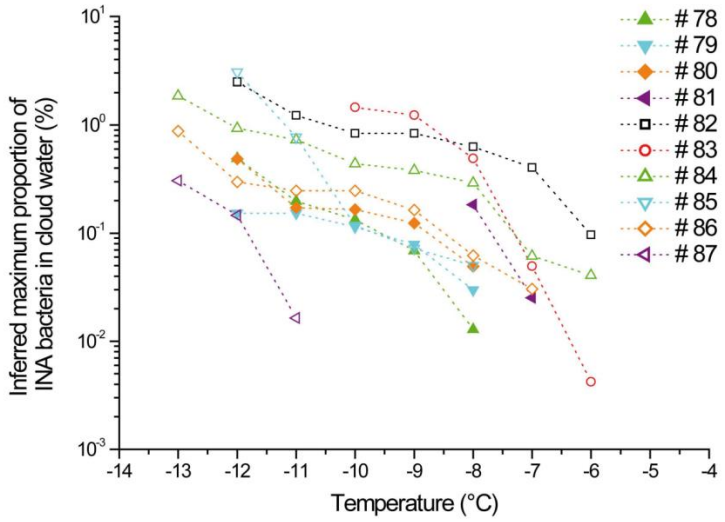


Fig. 5. Inferred upper proportion of INA bacteria in the cloud water samples based on the concentration of heat-sensitive IN and on microscopy counts.

3731

Discussion Paper | Discussion Paper | Discussion Paper | Discussion Paper |

Supporting Information to "Direct quantification of total and biological ice nuclei in cloud water" by Joly et al.

Table S1: Ion composition of the cloud water samples studied.

	Concentration (µM)										
Sample	**Na^+**	**NH_4^+**	**K^+**	**Mg^{2+}**	**Ca^{2+}**	**Cl^-**	**NO_3^-**	**SO_4^{2-}**	**Acetate**	**Formate**	**Oxalate**
# 76	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	16.9	126.0	52.2	n.a.	n.a.	n.a.
# 77	124.8	408.5	22.8	26.8	148.5	12.8	47.9	19.6	58.3	109.6	12.3
# 78	22.7	32.7	9.2	12.3	7.1	24.1	10.4	7.1	3.3	11.3	3.0
# 79	0.6	52.7	1.6	0.8	3.2	0.3	5.0	1.3	4.3	5.6	1.0
# 80	80.6	39.3	6.1	12.0	5.2	13.3	2.2	1.8	7.4	5.3	1.1
# 81	145.7	188.6	6.2	20.3	9.3	23.4	11.2	4.8	15.3	15.6	6.7
# 82	1.0	75.4	0.1	0.9	6.1	0.2	2.0	1.6	4.2	6.2	3.0
# 83	93.5	531.1	10.7	14.3	34.6	12.2	49.9	10.7	b.d.l.	39.0	6.5
# 84	36.0	38.1	1.4	6.0	5.2	5.9	1.9	1.6	3.9	7.7	1.2
# 85	6.0	77.8	4.0	2.2	4.3	0.9	3.0	1.1	b.d.l.	18.2	3.3
# 86	8.8	16.8	5.5	1.3	4.5	1.0	1.0	0.5	3.2	3.2	1.0
# 87	21.2	39.3	7.6	8.3	2.3	26.7	10.9	5.3	4.0	13.6	0.7

n.a.: not available

b.d.l.: below detection limit.

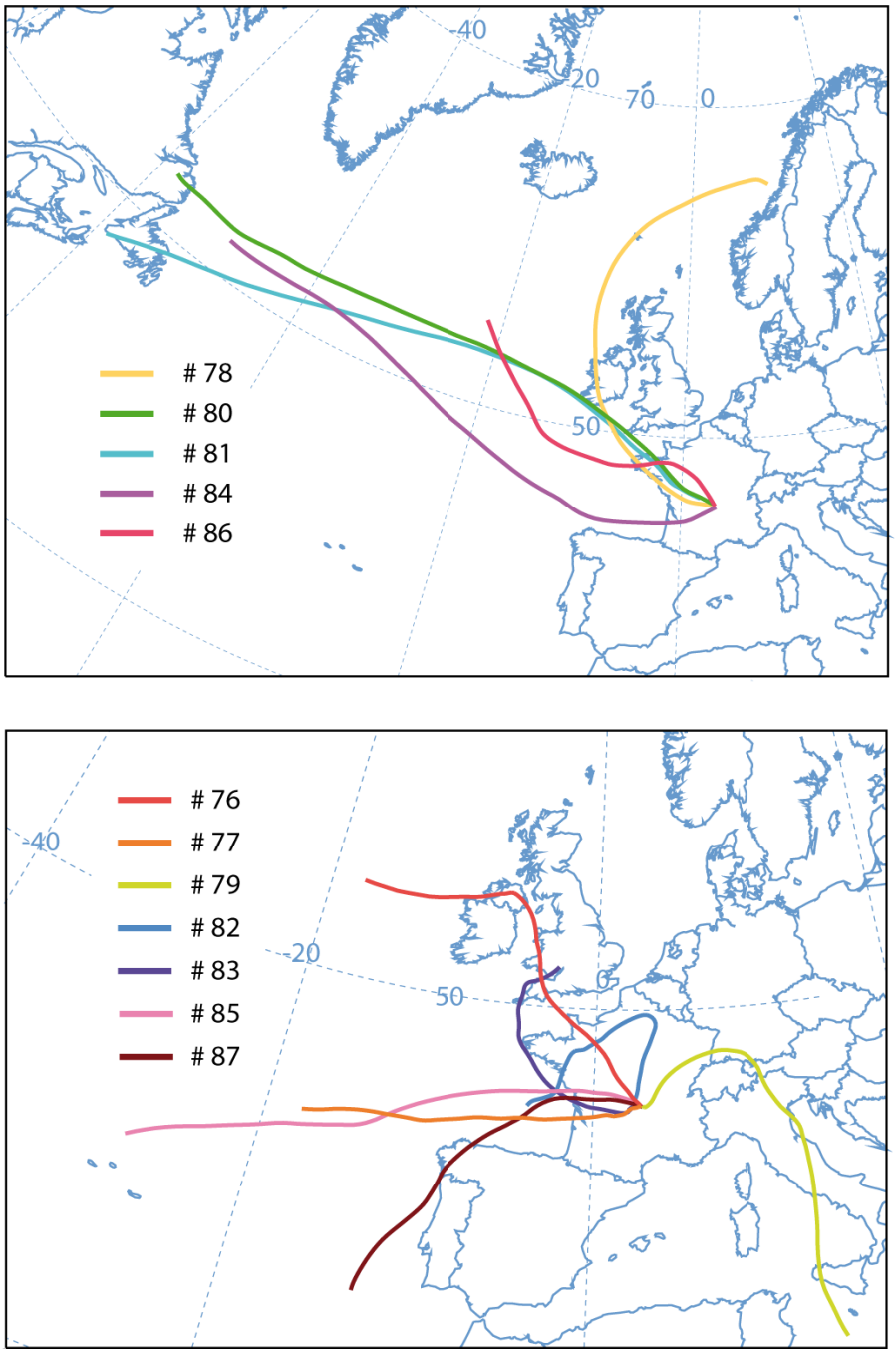


Figure S1: Composite images of seventy-two hours backtrajectory plots of the air masses analyzed. These are shown on 2 different maps for visual clarity. The plots were made using the HYSPLIT model with the GDAS1 meteorological data archive and default settings **(Draxler and Rolph, 2013)**.

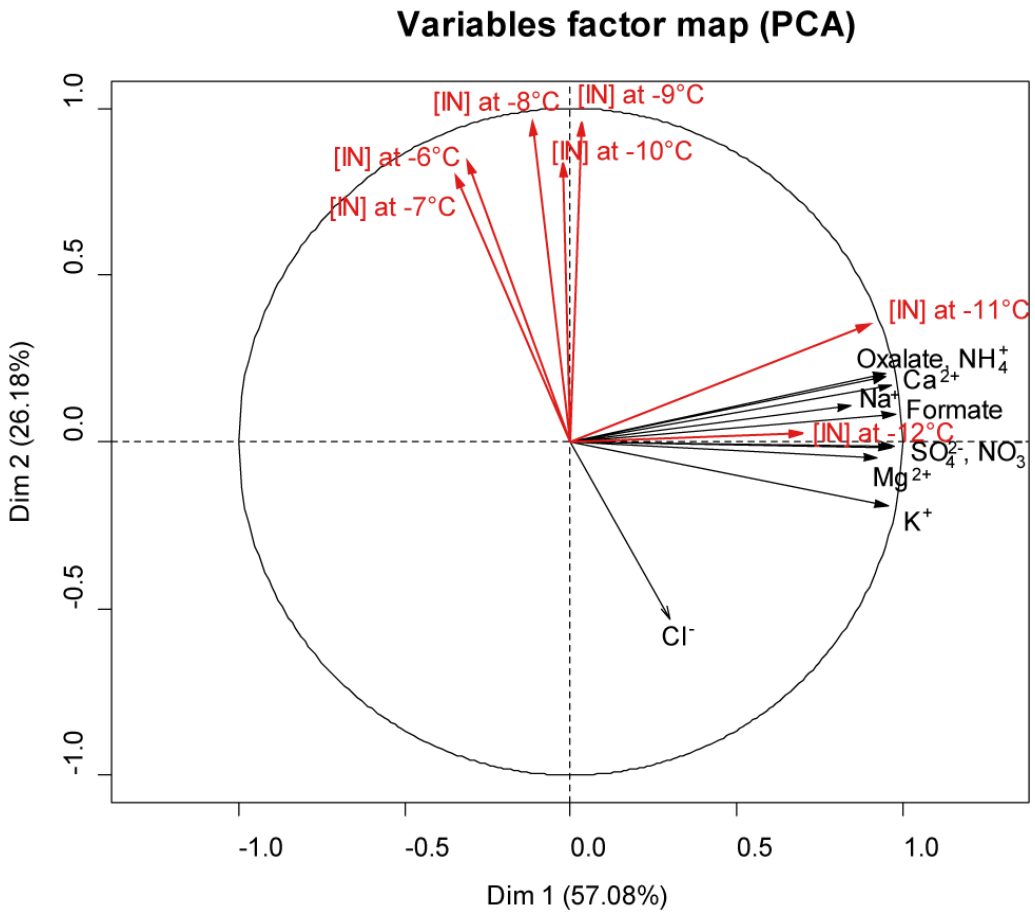


Figure S2: Principal component analysis map of the chemical variables (black vectors) and concentrations of IN active at -6°C to -12°C (red vectors). The analysis includes the samples for which all these data were available (n = 9).

4. Conclusion

Pour résumer, le criblage de la banque de souches bactériennes de l'ICCF a permis d'identifier pour la première fois 7 souches glaçogènes issues de l'eau des nuages. Ces bactéries ont une activité dès -3°C à -5°C et appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas* et *Xanthomonas.* Depuis la publication de cet article, 19 nouvelles souches glaçogènes ont été isolées et identifiées. La liste de ces souches est présentée en Annexe 3. Leurs profils d'activité glaçogène sont en cours de réalisation.

Le pourcentage de cellules glaçogènes parmi ces souches est très variable : pour la plus efficace, le ratio de cellules actives est proche de 1/23 à -6°C (*P. syringae* 32b-74) tandis que pour la souche *P. syringae* 13b-2, ce ratio est d'environ 1/1,7 10^6.

Une étude phylogénétique des γ-Protéobactéries isolées des nuages a révélé que ces souches sont apparentées principalement à des groupes considérés comme rares dont les représentants sont communément rencontrés dans les eaux douces et sur la végétation. Les clades les plus courants dans l'environnement sont absents dans les prélèvements de nuages observés. Cette répartition atypique suggère que soit les γ-Protéobactéries présentes dans les nuages ont été contraintes à une sorte de sélection naturelle, soit il existe une répartition géographique particulière de ces bactéries autour du puy de Dôme et dans ce cas, ces souches proviendraient d'une source locale. Des études sur des sites géographiquement éloignées permettraient de confirmer ou de réfuter cette hypothèse.

Les taux de survie de deux des bactéries glaçogènes isolées de nuage ainsi que d'une souche isolée d'un glacier ont été mesurés dans la chambre AIDA. En moyenne, 34 % des cellules bactériennes meurent lors de l'aérosolisation dans la chambre. Une fois dans la chambre, la population bactérienne totale (*i.e.* viable et non viable) en suspension dans l'air voit son effectif diminuer de moitié toutes les 6h en raison de la sédimentation des cellules ou de leur dépôt par impaction sur les parois de la chambre à nuages. La population bactérienne cultivable quant à elle diminue plus rapidement (temps de demi-vie d'environ 2h50) : cette réduction est due non seulement aux mécanismes physiques de déposition, mais également à une diminution de la viabilité au cours du temps des cellules en suspension dans la chambre.

La souche *Pseudomonas syringae* 32b-74 étant la plus active, elle a été choisie comme matrice pour étudier les variations de l'activité glaçogène après aérosolisation, avant et/ou après génération d'un nuage dans la chambre AIDA ainsi qu'en présence de sulfates. Il apparait que l'aérosolisation affecte négativement le pourcentage de cellules glaçogènes. Toutefois, une fois aérosolisées, l'activité glaçogène demeure stable au cours du temps et ce, jusqu'à 17h après l'injection ce qui suppose que dans les conditions réelles, les bactéries ne seraient pas obligées d'exprimer les protéines glaçogènes une fois en suspension dans l'atmosphère pour pouvoir initier la formation de glace dans les nuages mais que leur expression pourrait être induite avant même leur émission dans

l'air. En présence de sulfates, dont les sources dans les nuages sont révélatrices de l'activité anthropique, l'activité glaçogène des bactéries est également diminuée. Enfin, il a été souligné que la génération d'un nuage dans la chambre AIDA est responsable d'une forte diminution de l'activité glaçogène bactérienne, en particulier pour les plus hautes températures (-3°C à -6°C) : les bactéries glaçogènes seraient donc préférentiellement éliminées par les précipitations résultant de la formation cristaux de glace dans le nuage.

Le dernier point soulevé par ces articles s'est intéressé à fournir des données quantitatives pouvant être intégrées dans des modèles simulant les processus microhysiques de formation de glace dans les nuages.

Dans un premier temps, ces données ont été estimées à partir de la proportion de bactéries glaçogènes et de γ-Protéobactéries isolées de nuages parmi la population de bactérienne totale. Ces valeurs ont conduit à des estimations d'environ 10^{-6} à 500 cellules glaçogènes par mL d'eau de nuage pour des températures supérieures à -10°C.

Dans un deuxième temps, des prélèvements de nuages ont été effectués et les concentrations en noyaux glaçogènes biologiques et totaux ont été mesurées. Il apparaît que les concentrations réelles sont du même ordre de grandeur que les premières évaluations présentées : entre 0 et environ 200 noyaux glaçogènes biologiques ont été détectés à -10°C par mL d'eau de nuage.

En l'absence de noyaux glaçogènes biologiques, la congélation de l'eau de nuage débute à des températures plus froides (entre 1 et plus de 5°C plus bas) attestant que les particules biologiques sont responsables de l'activité glaçogènes aux plus hautes températures. A plus basse températures, la contribution des particules biologiques est amoindrie en raison de l'activation d'autres particules présentes. Ceci a également été confirmé par une analyse en composantes principales : dès -11°C, la concentration en noyaux glaçogènes totaux est corrélée avec la composition en ions inorganiques.

Enfin, une estimation haute de la proportion de bactéries glaçogènes dans les nuages a été intégrée dans le modèle CAM-OSLO afin d'estimer la répartition spatiale de leur concentration entre les pôles en fonction de l'altitude. Il apparaît que dans certaines zones, la concentration en bactéries glaçogènes peut atteidre des valeurs supérieures à 100 m^{-3} ce qui est plus élevé que les valeurs actuellement considérées dans les modèles numériques. Ces données sont les premières qui se basent sur des mesures directement issues des nuages. Elles pourront désormais être utilisées par les modélisateurs afin d'explorer l'impact des bactéries sur les processus microphysiques des nuages.

Chapitre V : Biotransformation de composés organiques dans l'eau de nuage – Détermination de constantes cinétiques de biodégradation

1. Introduction

Depuis une dizaine d'années, l'exclusivité supposée de la chimie radicalaire dans la dégradation de la matière organique dans les nuages a été remise en cause. En effet, après avoir montré que les bactéries isolées des nuages ont la capacité de dégrader certains acides carboxyliques en conditions expérimentales simples (substrat unique, souche unique, *etc.)* (*Amato et al.*, 2007a; *Vaïtilingom et al.*, 2010, 2011), il a été mis en évidence que dans l'eau de nuage réelle, la microflore endogène pouvait dégrader ces composés de façon aussi efficace voire plus que les voies d'oxydation de la photochimie (*Vaïtilingom et al.*, 2013).

Cependant, l'ensemble des expérimentations en laboratoire réalisées à ce jour sur ce sujet a été effectué dans des conditions éloignées de celles rencontrées dans les nuages. La principale différence repose sur les volumes étudiés. En effet, les nuages sont des milieux multiphasiques polydispersés et les microorganismes sont retrouvés au sein de microgouttelettes dont le volume est proche de 10^{-9} mL alors que les volumes liquides nécessaires en laboratoire pour observer une biodégradation sont de l'ordre de quelques dizaines de millilitres. En conditions réelles, la réactivité des composés chimiques est modifiée par les transferts dynamiques de composés chimiques ayant lieu entre la phase gazeuse et la phase liquide et également par le fait que le nuage est un milieu évoluant par les processus microphysiques. D'autre part, en raison de la complexité des manipulations à mettre en œuvre et du temps que cela requiert, seul un faible nombre de conditions peuvent être étudiées en parallèle (une à deux températures au maximum par exemple).

Afin de s'approcher des conditions réelles des nuages, il est maintenant essentiel de dépasser les limites de l'expérimentation en faisant appel aux outils de modélisation. L'outil M2C2 (Model of Multiphase Cloud Chemistry) est un modèle numérique développé au laboratoire de Météorologie Physique (LaMP) qui permet de simuler les réactions chimiques se déroulant dans la phase aqueuse et la phase gazeuse des nuages ainsi que les échanges entre ces deux phases. Il permet en outre, de faire varier certains paramètres environnementaux clés tels que l'intensité lumineuse (*i.e.* le flux actinique), la température, la taille des gouttelettes, le contenu en eau du nuage ainsi que le degré de pollution de la masse d'air dans laquelle se trouve le nuage.

L'objectif de cette partie de ma thèse était donc de fournir des données expérimentales quantitatives pouvant être prises en compte dans ce modèle et permettant, par la suite, de pouvoir comparer l'efficacité respective des radicaux et des microorganismes dans la dégradation de composés carbonés dans les nuages. Pour cela, des constantes cinétiques de biodégradation de trois composés organiques présents dans les nuages par trois souches bactériennes isolées de nuages ont été mesurées : il s'agit du formiate, de l'acétate et du formaldéhyde.

Dans ces travaux, j'ai participé à la réalisation des expérimentations avec Nolwenn Wirgot (stagiaire en Master 2).

2. Matériel et Méthodes

2.1. Souches bactériennes

Trois souches bactériennes isolées à partir d'eau de nuage prélevée au sommet du puy de Dôme (1465 m) ont été utilisées pour cette étude. Elles ont été sélectionnées parmi 17 souches pour leur capacité à dégrader rapidement les composés carbonés étudiés (*Vaïtilingom et al.*, 2011). Les couples souches/substrats associés sont présentés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 *: Souches utilisées dans les expériences de biodégradation*

Nom de la souche	Nom de l'espèce bactérienne	N° d'accession	Substrat étudié
13b-3	*Pseudomonas graminis*	DQ512786	Formiate
14b-10	*Pseudomonas* sp.	DQ512794	Acétate
12b-8	*Pseudomonas syringae*	DQ512783	Formaldéhyde

Les bactéries ont été cultivées dans 10 mL de milieu nutritif R2A liquide (*Reasoner et Geldreich*, 1985) sous agitation (200 rpm) à 17°C pendant environ 15h. Les cellules en phase exponentielle de croissance ont été centrifugées pendant 3 min à 12500 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot repris et lavé deux fois dans du milieu nuageux artificiel marin 100X. La concentration en cellules a été estimée par la mesure de la densité optique afin d'obtenir une concentration finale pour les tests de dégradation proche de 10^7 bactéries mL^{-1}. La concentration a, par la suite, été déterminée précisément par la méthode des dilutions successives en début et en fin d'expérience.

2.2. Substrats étudiés

Le choix des composés étudiés s'est porté sur le formiate et l'acétate, bases conjuguées respectives de l'acide formique et de l'acide acétique, ainsi que sur le formaldéhyde en raison de leur relativement forte concentration dans les nuages. Les concentrations moyennes mesurées au puy de Dôme sont reportées dans le **Tableau 8**. Les pKa respectifs des acides formique et acétique sont de 3,75 et 4,76 et par conséquent, ces composés sont majoritairement sous la forme de formiate et d'acétate dans les nuages.

Tableau 8 *: Concentrations moyennes mesurées au puy de Dôme des trois composés carbonés de cette étude en fonction de l'origine de la masse d'air (*Deguillaume et al.*, 2013)*

	Hautement Marine	Marine	Continentale	Polluée
Formiate (µM)	13,0	6,3	13,5	7,3
Acétate (µM)	12,0	4,9	11,0	16,8
Formaldéhyde (µM)	2,0	1,8	5,0	5,0

Dans le cadre des tests de biodégradation, ces composés ont été ajoutés sous la forme de formiate de sodium (HCOONa, Sigma Aldrich), d'acétate de sodium (CH_3OONa, Sigma Aldrich) et de formaldéhyde non stabilisé au méthanol (CHOH, solution à 16% (m/v), ThermoScientific).

2.3.Milieu nuage artificiel marin

Afin de s'approcher au maximum des réactions de biodégradation dans les nuages, les expériences ont été conduites sur un milieu nuageux artificiel de type « marin » en raison du fort pourcentage de nuages de cette origine prélevés au puy de Dôme (51%).

La composition du nuage artificiel marin a été déterminée d'après l'étude de 101 événements nuageux prélevés au Puy de Dôme (**Tableau 9**). Le milieu a été réalisé à partir de solutions mères de NH_4NO_3 (*Fluka*) ; $MgCl_2$, $6H_2O$ (*Sigma Aldrich*) ; K_2SO_4 (*Fluka*) ; $CaCl_2$, $2H_2O$ (*Sigma Aldrich*); $(NH_4)_2SO_4$ (*Fluka)* ; NaOH (*Merck*) ; H_2SO_4 (*Sigma Aldrich*). Les composés carbonés fréquemment mesurés dans l'eau de nuage (acides carboxyliques et aldéhydes) ont été supprimés du milieu artificiel afin que le substrat dont la dégradation est suivie soit la seule source de carbone disponible pour les bactéries. Avant utilisation, le milieu a été stérilisé par filtration à 0,22 µm à l'aide d'un filtre stérile hydrophile en polyéthersulfone (PES).

Dans le cadre de cette étude, le milieu nuage artificiel a été concentré par un facteur 100 pour stabiliser le pH. Il en a été de même pour les bactéries afin de conserver une proportion bactéries/substrats identique à celle des nuages.

***Tableau 9** : Composition chimique et pH du milieu nuageux artificiel marin utilisé pour les expériences de biodégradation et concentrations moyennes rencontrées dans l'eau de nuage prélevée au sommet du puy de Dôme (*Deguillaume et al.*, 2013)*

	Eau de nuage artificielle de type marine	**Eau de nuage réelle de type marine**
	Concentration (µM)	
Cl^-	24,0	25,3
NO_3^-	28,0	24,8
SO_4^-	14,5	14,1
Na^+	14,0	25,7
NH_4^+	38,0	43,2
K^+	3,0	3,0
Mg^{2+}	4,0	3,9
Ca^{2+}	8,0	8,6
pH	6,0	5,7

2.4.Tests de biodégradation

Toutes les manipulations ont été réalisées en conditions stériles sous un poste de sécurité microbiologique (PSM), à flux d'air laminaire et vertical, permettant d'assurer la protection de l'utilisateur, de la manipulation et de l'environnement. Le matériel utilisé a été au préalable stérilisé à l'autoclave. En outre, chacune des expériences de biodégradation a été réalisée en trois réplicats.

30 mL de milieu nuage artificiel 100X, *i.e.* concentré par un facteur 100, ont été placés dans 7 erlenmeyers afin de suivre la dégradation de six concentrations croissantes de substrat : 0 mM ; 0,1 mM ; 0,2 mM ; 0,4 mM ; 0,7 mM et 1 mM pour le formiate et l'acétate et 0 µM ; 50 µM ; 100 µM ; 200 µM ; 300 µM ; 400 µM pour le formaldéhyde. En parallèle, la concentration en substrat a également été suivie en l'absence de bactéries afin de s'assurer de la stabilité du composé carboné (concentration initiale : 1 mM pour l'acétate et le formiate, 400 µM pour le formaldéhyde). La dégradation de ces composés a été étudiée à deux températures : 5°C (température moyenne annuelle des prélèvements de nuages au puy de Dôme) et 17°C (température maximale relevée lors d'un prélèvement nuageux au puy de Dôme).

Au cours du temps, 1 mL de milieu a été prélevé dans chaque erlenmeyer et centrifugé 3 min à 12500 rpm. Entre 0,6 et 1 ml de surnageant ont été congelé à -25°C dans l'attente de l'analyse.

Par ailleurs, la biodégradation des plus fortes concentrations en acétate et en formiate, *i.e.* 1 mM, a également été suivie à pH 7,0 à 17°C.

2.5.Analyse des échantillons

L'analyse de la concentration des substrats a été effectuée par chromatographie ionique pour le formiate et l'acétate et par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) pour le formaldéhyde. Les conditions utilisées pour les analyses sont résumées dans le **Tableau 10**.

Dans le cas du formiate et de l'acétate, les échantillons ont été injectés directement dans l'analyseur. En revanche, dans le cas du formaldéhyde, le dosage a été adapté à partir de celui décrit par *Vander Heyden et al.* (2002) dans lequel l'aldéhyde est transformé en hydrazone par la réaction présentée **Figure 42**. Le produit alors mesuré correspond à l'hydrazone formée (formaldéhyde 2,4-dinitrophénylhydrazone) et est proportionnel à la concentration en formaldéhyde.

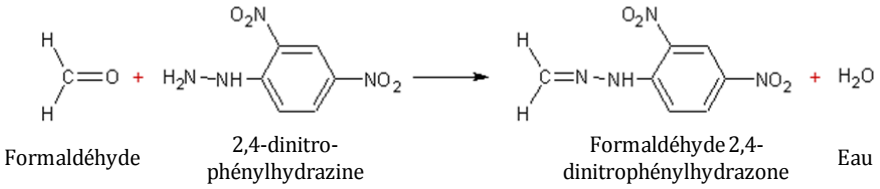


***Figure 42**: Réaction de dérivatisation du formaldéhyde par le 2,4-dinitrophénylhydrazine*

***Tableau 10** : Conditions d'analyses du formiate, de l'acétate et du formaldéhyde par chromatographie.*

	Formiate/Acétate	**Formaldéhyde**
Système utilisé	Dionex DX320	Dionex UV (UVD 340)
Type de colonne	IonPac AS11 (échangeuse d'anion) <10 Å ; 13 µm ; 4x25 mm	C18 Interchim Uptisphere Strategy 100 Å ; 5 µm ; 4,6x250 mm
Temps d'analyse total	18 min	15 min
Volume injecté	750 µL	20 µL
Débit	1 mL/min	0,8 mL/min
Solvants d'élution	KOH et eau ultra pure	Tampon phosphate 0,025 M (pH 4) et acétonitrile
Mode de travail	Gradient d'élution	Mode isocratique
Gradient	0 min : 0,2 mM 4,5 min : 0,43 mM 10 min : 5 mM 13 min : 33,5 mM 14 min : 33,5 mM 14,1 min : 0,2 mM	45% Tampon Phosphate/55% acétonitrile
Temps de rétention	Formiate : 7,5 min ; acétate : 7 min	10,5 min
Mode de détection	Conductivité	Absorbance à 345 nm

Pour dérivatiser le formaldéhyde, 1 mL d'échantillon a été additionné à 0,4 mL de 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) à 0,1 %. Le mélange a été vortexé pendant 1 min puis laissé à température ambiante pendant 5 min. La solution a été ensuite stabilisée par l'ajout de 0,4 mL de tampon phosphate 0,1 M (pH 6,8) et 0,7 mL de NaOH 1M. L'incertitude sur la mesure par dérivation est d'environ 7% (3 réplicats de mesure à 4 concentrations différentes).

2.6. Calculs de constantes cinétiques

Dans le but de calculer des constantes utilisables pour la modélisation, la cinétique de dégradation a été assimilée à une cinétique michaelienne. Ce type de cinétique est généralement appliqué à une enzyme à un seul site de fixation qui catalyse la transformation d'un substrat en produit. Ici, la cinétique michaelienne est appliquée à une cellule entière. La principale différence repose sur le fait que les enzymes sont intracellulaires et non en contact direct avec le substrat. Par conséquent, le substrat doit être transporté à travers la membrane avant d'être transformé en produit.

La cinétique michaelienne est régie par deux constantes (**Figure 43**) :

- la vitesse maximale (V_{max}) qui correspond à la vitesse maximale de dégradation qui intervient lorsque les cellules se trouvent en conditions saturantes de substrat ;

- le coefficient d'affinité (K_M ou constante de Michaelis) qui correspond à la concentration nécessaire en substrat pour que la vitesse de dégradation soit la moitié de la vitesse maximale. Plus le K_M est faible, plus l'affinité pour le substrat est grande.

Pour chaque concentration en substrat, la vitesse de dégradation est définie par l'équation de Michaelis-Menten telle que :

$$V_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \qquad \text{Equation (4)}$$

où V_i est la vitesse initiale, [S] est la concentration en substrat.

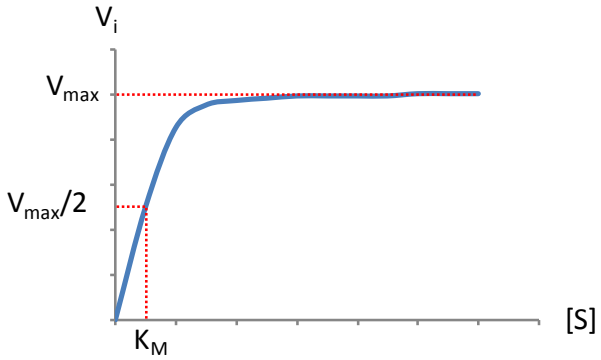


Figure 43 *: Représentation graphique de la cinétique de dégradation d'un substrat par une enzyme michaelienne. La vitesse est dépendante de la concentration jusqu'à une concentration seuil à partir de laquelle la vitesse est constante et maximale (V_{max}). Le coefficient d'affinité (K_M) est défini comme la concentration nécessaire pour que la vitesse soit la moitié de la vitesse maximale.*

Afin de déterminer les constantes cinétiques K_M et V_{max}, il est nécessaire de mesurer expérimentalement des vitesses de biodégradation pour différentes concentrations en substrat. Ces valeurs sont ensuite traitées par une méthode mathématique, comme par exemple par la linéarisation de Lineweaver-Burke. Il existe un grand nombre de méthodes de traitement de ces données. Celle offrant le meilleur compromis entre la facilité à la réaliser et la justesse des estimations est la méthode d'Eisenthal et Cornish-Bowden (*Eisenthal*, 1974; *Berges*, 1994).

Dans cette démarche, une droite est tracée pour chaque point expérimental ayant comme abscisse à l'origine l'opposé de la concentration en substrat (-[S]) et comme ordonnée à l'origine la vitesse de dégradation (V_i) (**Figure 44**). Autrement dit, pour chaque point expérimental, la droite tracée passe par les coordonnées (-[S];0) et (0;V_i). L'intersection de l'ensemble des droites détermine les deux constantes cinétiques. Dans le cas où plusieurs intersections sont définies, les constantes cinétiques sont alors déterminées par la médiane des valeurs des intersections.

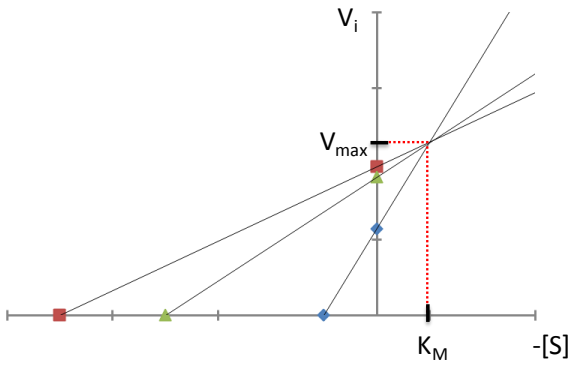


Figure 44 *: Détermination des constantes cinétiques K_M et V_{max} par la méthode d'Eisenthal et Cornish-Bowden. Pour chaque couple de mesure ([S];Vi), une droite est tracée et l'intersection de l'ensemble des droites détermine les valeurs des constantes.*

2.7.Comparaison des vitesses de dégradation biologique et radicalaire

Les constantes de biodégradation mesurées ont été confrontées à un calcul simple permettant d'estimer à la fois la vitesse de dégradation des composés cibles par les voies radicalaires et par celles biologiques.

Les vitesses de dégradation radicalaire ont été estimées à partir des constantes cinétiques d'oxydation par un radical R fournies par la littérature tel que :

$$V_{radicaux} = k \times [R^{\bullet}] \times [S] \qquad \text{Equation (5)}$$

où $V_{radicaux}$ est la vitesse de dégradation par la voie radicalaire (en M s^{-1}), k est la constante cinétique de dégradation du substrat d'ordre 2 (en M^{-1} s^{-1}), $[R^{\bullet}]$ est la concentration en radical $^{\bullet}OH$ ou $NO_3^{\bullet}$ (en M) et [S] est la concentration en substrat (en M).

Comme la concentration en radicaux suit une variation journalière et que les constantes cinétiques sont dépendantes de la température (loi d'Arrhénius), quatre scénarios environnementaux ont été considérés, à savoir à deux moments de la journée (midi et minuit) et à deux températures différentes (5°C et 17°C). Les valeurs des paramètres pris en compte dans ce modèle pour calculer les vitesses de dégradation radicalaire sont résumées dans le **Tableau 11**. Les valeurs des concentrations en radicaux ont été extraites des simulations proposées par *Herrmann et al.* (2010) à l'aide du modèle de chimie multiphase nuageuse SPACCIM utilisant le mécanisme en phase aqueux explicite CAPRAM3.0. Ce modèle prend en compte la réactivité chimique dans les différents compartiments (gaz/liquide) ainsi que les transferts entre ces phases. Différents scénarios chimiques nuageux ont été simulés correspondant à des cas pollués, continentaux et marins. Pour une comparaison avec les vitesses de biodégradation mesurées dans cette étude, les concentrations en $^{\bullet}OH$ et $NO_3^{\bullet}$ choisies sont celles simulées par le scénario continental (« remote »), la composition chimique de cette simulation étant la plus proche de celle du milieu nuageux artificiel dans lequel les bactéries ont été incubées.

Tableau 11 *: Paramètres utilisés pour calculer les vitesses de dégradation par la voie radicalaire. (a) (*Herrmann et al.*, 2010) (b)* Exner et al.*, 1994 ; (c)* Ervens et al.*, 2003 ; (d)* Chin and Wine*, 1994 ; (e)* Exner et al.*, 1993*

		Concentration en radicaux (M)		
$^{\bullet}OH$ [(a)]	**Jour**	$6{,}90\ 10^{-14}$		
	Nuit	$4{,}80\ 10^{-15}$		
$NO_3^{\bullet}$ [(b)]	**Jour**	$1{,}10\ 10^{-15}$		
	Nuit	$1{,}70\ 10^{-14}$		
		k (L mol^{-1} s^{-1})		
		Formiate [(b,c)]	**Acétate** [(b,d)]	**Formaldéhyde** [(d,e)]
$^{\bullet}OH$	**5°C**	$1{,}85\ 10^{9}$	$4{,}53\ 10^{7}$	$6{,}10\ 10^{8}$
	17°C	$2{,}17\ 10^{9}$	$5{,}92\ 10^{7}$	$7{,}10\ 10^{8}$
$NO_3^{\bullet}$	**5°C**	$3{,}00\ 10^{7}$	$1{,}16\ 10^{6}$	$3{,}40\ 10^{5}$
	17°C	$4{,}16\ 10^{7}$	$2{,}04\ 10^{6}$	$6{,}60\ 10^{5}$

Les concentrations en composés organiques utilisées sont les valeurs moyennes observées sur 101 évènements nuageux marins prélevés au sommet du puy de Dôme (**Tableau 8**).

2.8.Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisée par le logiciel PAST (*Hammer et al.*, 2001).

3. Résultats

3.1.Dégradation des substrats

Le suivi de la concentration en substrat a été réalisé par chromatographie. Des chromatogrammes types à différents temps d'analyse sont présentés sur la **Figure 45**. Pour chacun des substrats testés, les bactéries ont été capables de dégrader une partie ou la totalité du substrat proposé dans le temps imparti. La concentration en substrat a également été suivie en l'absence de bactéries : aucune dégradation n'a alors pu être mise en évidence attestant que ce sont bien les bactéries qui sont responsables de la disparition du substrat.

Les proportions minimales et maximales dégradées sont présentées dans le **Tableau 12**. Cette proportion est dépendante de la concentration initiale en substrat : pour les plus faibles concentrations, la totalité du formiate et de l'acétate a été dégradée alors qu'il aurait fallu un temps de manipulation plus important pour voir disparaître la totalité des plus fortes concentrations.

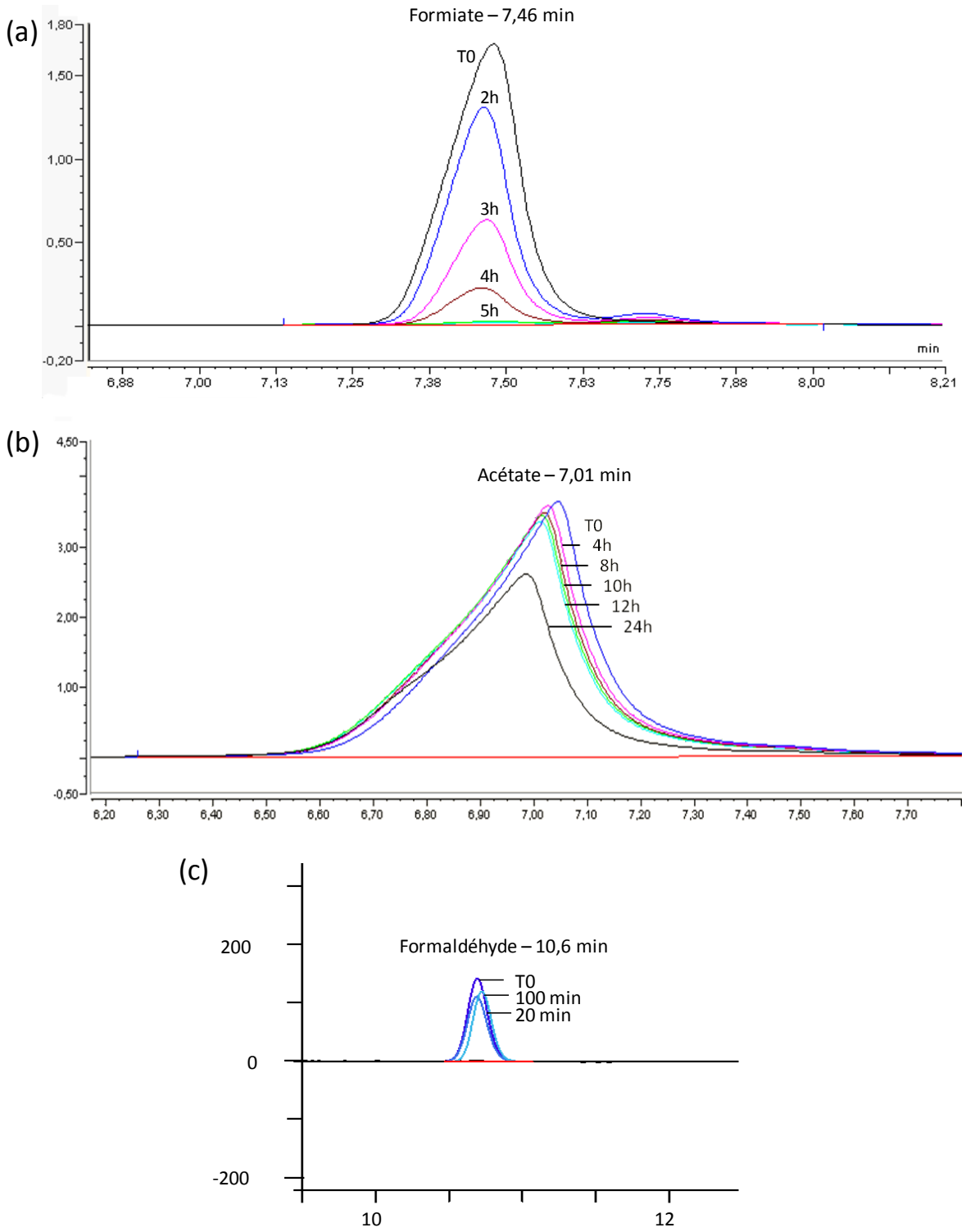


Figure 45 *: Exemple de suivi de la concentration des trois substrats étudiés au cours du temps par chromatographie ; (a) concentration initiale en formiate 0,1 mM, température : 5°C ; (b) concentration initiale en acétate : 0,7 mM, température : 5°C ; (c) concentration initiale en formaldéhyde 400 µM, température : 17°C .*

Tableau 12 *: Pourcentage de dégradation des substrats en fonction des conditions de températures testées. Le temps nécessaire à la dégradation est indiqué dans la dernière ligne.*

	Formiate		**Acétate**		**Formaldéhyde**	
	5°C	**17°C**	**5°C**	**17°C**	**5°C**	**17°C**
Minimum	21 %	15 %	13%	14 %	25%	15 %
Maximum	100 %	100 %	100 %	100 %	63 %	63 %
Temps	6 h	3 h	24 h	6 h	20 min	20 min

En ce qui concerne la dégradation de l'acétate et du formiate, il apparaît que les bactéries n'utilisent pas le substrat immédiatement mais connaissent auparavant un temps de latence de durée variable (0 à 60 min pour le formiate, 60 à 120 min et 180 à 480 min pour l'acétate à 17°C et 5°C respectivement). Ce décalage dans le temps est visible sur la **Figure 45** : pour le formiate par exemple, la dégradation entre 2h et la 3h est plus importante que pendant les deux premières heures cumulées. Il s'agit du temps nécessaire aux bactéries pour s'accoutumer au nouveau milieu qui leur est proposé.

La dégradation de l'acétate par la souche 14b-10 génère au cours du temps un produit de dégradation de type anionique qui se traduit par la présence d'un épaulement au pic d'acétate à un temps de rétention proche de 6,75 min. Deux métabolites anioniques peuvent résulter de la dégradation microbienne de l'acétate : le lactate et le pyruvate. Au vu des temps de rétention, la formation de pyruvate peut être exclue (temps de rétention : 8,0 min). En revanche, le lactate, dont l'élution est proche de 6,8 min, pourrait correspondre au métabolite formé. Une caractérisation plus précise par résonnance magnétique nucléaire (RMN) est en cours.

Lors de la dégradation du formiate, aucun nouveau métabolite n'apparaît sur les chromatogrammes. Il s'agit d'un composé terminal de dégradation dont la transformation par les enzymes bactériennes ne peut générer que du dioxyde de carbone (**Figure 46**).

Concernant l'utilisation du formaldéhyde par la souche 12b-8, deux phases distinctes sont mises en évidence. La première phase se caractérise par une dégradation du formaldéhyde qui se maintient pendant les 20 à 100 premières minutes (**Figure 45**). Après cela, une seconde phase apparaît se traduisant par une production de formaldéhyde qui perdure jusqu'à ce que sa concentration se stabilise. Cette dualité dégradation/production de formaldéhyde est probablement le résultat de réactions enzymatiques réversibles telles que, par exemple, la production de méthanol qui peut être ensuite re-converti en formaldéhyde jusqu'à ce qu'un équilibre s'installe entre ces deux composés (**Figure 46**). Pour vérifier cette hypothèse, une caractérisation par RMN des métabolites produits pendant l'incubation est en cours.

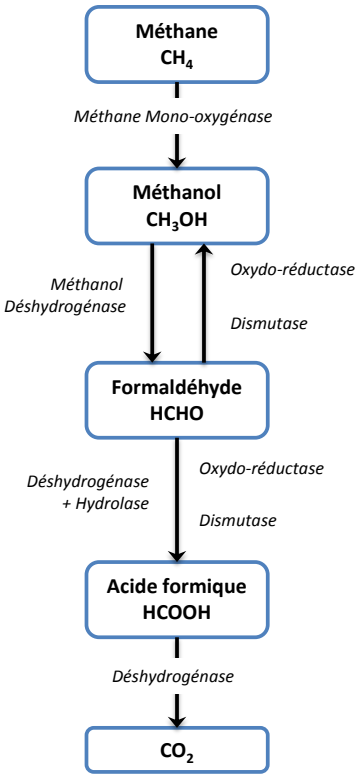


Figure 46 *: Voies de biodégradation des composés à 1 atome de carbone chez les bactéries (schéma simplifié à partir de* Husárová et al. (*2011)). Les enzymes impliquées dans les transformations sont indiquées en italique.*

3.2.Détermination des vitesses de dégradation

Les vitesses de dégradation de l'ensemble des substrats ont été quantifiées dans la période où les bactéries sont au maximum de leur activité, c'est-à-dire après la période de latence pour le formiate et l'acétate et dans les premières minutes pour le formaldéhyde. Les représentations graphiques de la vitesse de dégradation en fonction de la concentration en chacun des substrats sont présentées sur la **Figure 47**.

Deux types de courbes sont identifiables sur cette figure. Pour le formiate et l'acétate, la vitesse de dégradation augmente avec la quantité de substrat jusqu'à une certaine concentration à partir de laquelle la vitesse atteint un plateau maximal (aux environs de 0,4 mM et 0,3 mM pour le formiate à 17°C et à 5°C respectivement et aux environs de 0,5 et 0,3 mM pour l'acétate à 17°C et à 5°C respectivement). En ce qui concerne la dégradation du formaldéhyde, la vitesse est dépendante de la concentration en substrat quelles que soit les conditions testées.

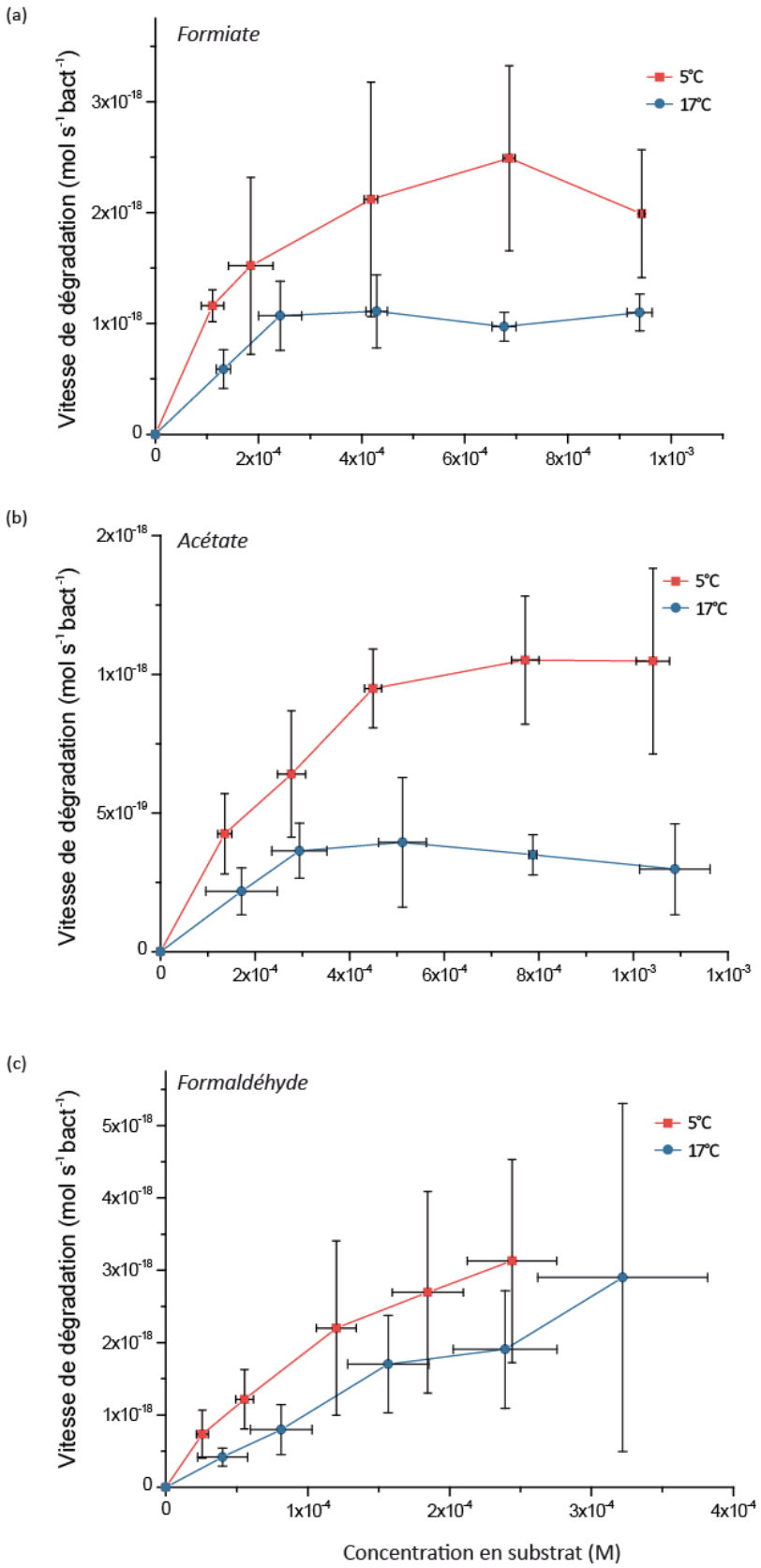


Figure 47 *: Représentations graphiques de la vitesse de dégradation en fonction de la concentration en (a) formiate ; (b) acétate ; (c) formaldéhyde. Les courbes correspondent aux moyennes des trois répicats réalisés à chaque température (5°C et 17°C). Les barres d'erreurs représentent les écart-types entre les trois réplicats.*

Ces cinétiques sont assimilables à celles décrites pour des enzymes michaeliennes (**Figure 43**). Dans le cas du formiate et de l'acétate, les concentrations saturantes en substrat sont atteintes ce qui permet d'observer une vitesse maximale de dégradation. En revanche, en ce qui concerne le formaldéhyde, les concentrations initiales en substrat proposées aux bactéries semblent trop faibles pour atteindre la vitesse maximale.

Il semblerait donc qu'assimiler une cellule entière à une cinétique généralement décrite pour des enzymes soit cohérent. La principale différence repose sur le fait que les enzymes sont intracellulaires et par conséquent, le substrat doit être transporté à travers la membrane avant d'être transformé en produit. Pour que les caractéristiques de la cinétique enzymatique soient maintenues, il est alors nécessaire que le transport soit plus rapide que la conversion du substrat en produit, ce qui semble être le cas ici.

3.3.Influence du pH du milieu d'incubation

Au cours de l'incubation des bactéries avec ou sans substrat, il a été noté que le pH du milieu d'incubation pouvait augmenter jusqu'à plus d'une unité. Cette basification n'est pas détectée lorsque les bactéries sont absentes du milieu. Ceci exprime donc non pas un effet collatéral de la biodégradation du substrat mais plutôt une réponse des bactéries en présence du milieu artificiel.

Sachant que l'activité enzymatique est dépendante du milieu dans lequel se situent les enzymes, les vitesses de dégradation du formiate et de l'acétate à un pH initial de 6,0 ou de 7,0 ont été comparées (**Figure 48**). Aucune différence significative entre les vitesses mesurées aux deux pH n'a pu être notée (test de Student, p-value > 0,05). Ceci s'explique par le fait que les enzymes bactériennes impliquées dans la biodégradation du formiate et de l'acétate sont intracellulaires et par conséquent, sont uniquement soumises au pH du milieu cellulaire interne.

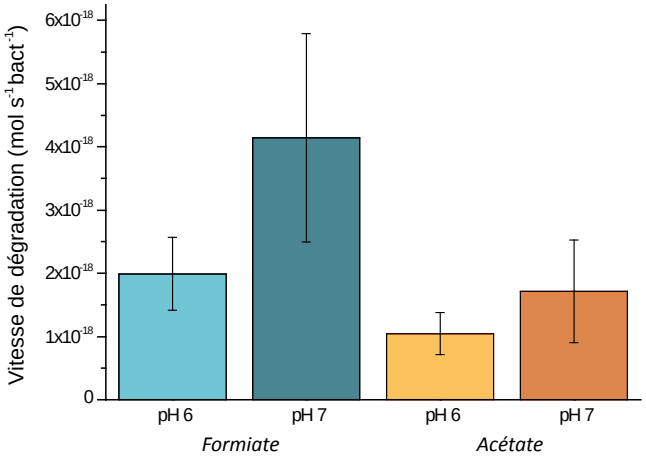


***Figure 48** : Comparaison de la vitesse de dégradation bactérienne dans un milieu artificiel nuageux marin à pH 6, 0 et 7,0. Les concentrations initiales en substrats ont été fixées à 1 mM.*

Dans les nuages, le pH peut varier entre 2,2 et 7,6 (*Hill et al.*, 2007; *Deguillaume et al.*, 2013). Toutefois, les cellules ont développé des systèmes permettant de maintenir à une valeur constante le pH intracellulaire (faible perméabilité aux protons, pompes à protons, pouvoir tampon du cytoplasme, *etc. ; Booth,* 1985). Par conséquent, malgré une gamme de pH variables dans les nuages, on peut supposer que les cellules sont capables de maintenir l'homéostasie et qu'il n'existe pas d'action directe du pH sur l'activité bactérienne de biodégradation des composés d'étude. La présence des enzymes à l'intérieur des cellules est donc particulièrement importante pour maintenir leur activité.

En plus d'une action protectrice, la présence des enzymes au niveau intracellulaire implique que les substrats doivent être internalisés avant leur dégradation. Par conséquent, lorsque les bactéries se retrouvent au sein d'une gouttelette de nuage, elles peuvent « ingérer » ces composés. Le substrat est alors prêt à être utilisé, et ce, même si la gouttelette s'évapore. Ceci permettrait aux bactéries de maintenir leur métabolisme même en dehors des nuages.

3.4. Détermination des constantes cinétiques

La détermination des constantes cinétiques a été réalisée par la méthode d'Eisenthal et Cornish-Bowden. Pour chacun des composés et chacune des températures, les constantes cinétiques K_M et V_{max} sont présentées dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 *: Constantes cinétiques mesurées par la méthode d'Eisenthal et Cornish-Bowden.*

		V_{max} (mol s^{-1} $bact^{-1}$)	K_M (M)
Formiate	17°C	(**2,64** ± 1,17) $\mathbf{10^{-18}}$	(**9,92** ± 10,6) $\mathbf{10^{-5}}$
	5°C	(**1,15** ± 0,17) $\mathbf{10^{-18}}$	(**6,24** ± 7,94) $\mathbf{10^{-5}}$
Acétate	17°C	(**1,13** ± 0,36) $\mathbf{10^{-18}}$	(**6,25** ± 6,88) $\mathbf{10^{-5}}$
	5°C	(**3,02** ± 1,88) $\mathbf{10^{-19}}$	(**5,45** ± 0,77) $\mathbf{10^{-5}}$
Formaldéhyde	17°C	(**3,61** ± 4,65) $\mathbf{10^{-18}}$	(**1,35** ± 1,64) $\mathbf{10^{-4}}$
	5°C	(**4,04** ± 1,55) $\mathbf{10^{-18}}$	(**1,25** ± 0,86) $\mathbf{10^{-4}}$

Les vitesses maximales calculées pour les six conditions expérimentales sont du même ordre de grandeur, comprises entre 3 10^{-19} et 4 10^{-18} mol s^{-1} $bact^{-1}$. En ce qui concerne les valeurs du coefficient d'affinité K_M, elles varient entre 5 10^{-5} et 10^{-4} M. Comme les valeurs des K_M sont supérieures aux concentrations des composés mesurées dans l'eau des nuages, on peut en conclure que les bactéries ne se situent pas en conditions saturantes de substrat dans ce milieu et que les vitesses maximales pour dégrader ces composés ne sont pas atteintes. Dans les nuages, les bactéries ne sont donc pas au maximum de leur efficacité pour dégrader ces composés et leur vitesse est, par conséquent, dépendante de la concentration en substrat.

A la température de 5°C, les coefficients d'affinité sont diminués par un facteur 1,1 à 1,6 et les vitesses maximales de dégradation sont modifiées par un facteur 0,9 à 3,8 par rapport à 17°C. Ces

différences ne sont toutefois pas significatives (test non paramétrique de Mann et Whitney, $p > 0,05$). Les deux températures n'ont donc pas d'impact sur la biodégradation dans les conditions testées.

La dégradation de composés carbonés par ces mêmes souches a déjà été étudiée dans les travaux de *Vaïtilingom et al.* (2010, 2011 et *Husárová et al.* (2011). Les vitesses de biodégradation mesurées dans leurs études respectives sont du même ordre de grandeur en ce qui concerne les acides carboxyliques (entre 10^{-19} et $5\ 10^{-18}$ mol s^{-1} $bact^{-1}$ pour le formiate, entre 10^{-18} et $2\ 10^{-18}$ mol s^{-1} $bact^{-1}$ pour l'acétate). Dans le cas du formaldéhyde, les vitesses de dégradation mesurées par *Husárová et al.* (2011) dans des conditions saturantes en substrat (20 mM) sont inférieures à celles mesurées ici (de l'ordre de 10^{-19} mol s^{-1} $bact^{-1}$). Toutefois, les conditions expérimentales diffèrent entre les deux études : les vitesses ont été mesurées dans deux milieux d'incubation différents, à savoir du tampon phosphate (0,1 M ; pH 7,0) pour *Husárová et al.* (2011) et un milieu mimant la composition de l'eau de nuage dans cette étude. On peut conclure que la composition du milieu d'incubation influe sur la vitesse de dégradation et que la souche bactérienne 12b-8 dégrade de façon plus efficace le formaldéhyde dans un milieu mimant la composition d'un nuage.

3.5. Comparaison des taux de dégradation biologique aux taux d'oxydation par voie radicalaire

Dans l'idée de comparer les contributions relatives des microorganismes et des radicaux dans la dégradation des composés organiques, les données obtenues précédemment ont été confrontées aux valeurs issues de la littérature concernant les voies de dégradation radicalaires.

Pour cela, des vitesses de dégradation biologique et radicalaire ont été calculées en prenant en compte les concentrations en formiate, en acétate et en formaldéhyde mesurées dans les nuages. Plusieurs scénarios ont été considérés dans ce modèle : les contributions relatives de la chimie radicalaire et de la microbiologie ont été calculées à deux températures (5°C et 17°C) et à deux moments extrême de la journée (midi et minuit).

- *Vitesses de dégradation bactérienne* -

La dégradation observée par les bactéries a été assimilée à une cinétique enzymatique de type michaelienne. La vitesse est donc définie pour chaque concentration en substrat par l'équation (4).

A partir de cette équation, les vitesses de dégradation du formiate, de l'acétate et du formaldéhyde dans les nuages ont été calculées. Il a été considéré que la concentration en bactéries dans les nuages est de $6,81\ 10^{7}$ bact L^{-1} (*Vaïtilingom et al.*, 2012) et que toutes les bactéries ont la même efficacité pour dégrader ces composés. Les valeurs des vitesses calculées sont présentées dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 *: Vitesses de biodégradation calculées d'après l'équation de Michaelis-Menten ; concentration en bactéries = 6,81 10^{7} L^{-1} ; [formiate] = 6,3 10^{-6} M ; [acétate] = 4,9 10^{-6} M ; [formaldéhyde] = 1,8 10^{-6} M*

	Vitesse ($mol.L^{-1}.s^{-1}$)	
	5°C	**17°C**
Formiate	7,19 10^{-12}	1,07 10^{-11}
Acétate	1,70 10^{-12}	5,61 10^{-12}
Formaldéhyde	3,91 10^{-12}	3,24 10^{-12}

- Vitesses de dégradation radicalaire -

Deux radicaux sont connus pour être les principaux acteurs de la dégradation de la matière organique dans les nuages : les radicaux hydroxyles ($^{\bullet}OH$) dont l'action est majoritaire le jour et les radicaux nitrates ($NO_3^{\bullet}$) qui dominent la chimie radicalaire de nuit (*Bey et al.*, 2001; *Ervens et al.*, 2003a)

Les vitesses de dégradation radicalaire ont été calculées à partir de l'équation (5). Les valeurs des vitesses sont présentées dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 *: Vitesses de dégradation radicalaire calculées ; [formiate] = 6,3 10^{-6} M ; [acétate] = 4,9 10^{-6} M ; [formaldéhyde] = 1,8 10^{-6} M ; [$^{\bullet}OH$] = 6,9 10^{-14} M (le jour) ou 4,8 10^{-15} M (la nuit) ; [$NO_3^{\bullet}$] = 1,1 10^{-15} (le jour) ou 1,7 10^{-14} (la nuit)*

		Vitesse de dégradation par les radicaux $^{\bullet}OH$ ($mol.L^{-1}.s^{-1}$)		Vitesse de dégradation par les radicaux $NO_3^{\bullet}$ ($mol.L^{-1}.s^{-1}$)	
		5°C	**17°C**	**5°C**	**17°C**
Formiate	**Jour**	8,03 10^{-10}	9,43 10^{-10}	2,08 10^{-13}	2,88 10^{-13}
	Nuit	5,58 10^{-11}	6,57 10^{-11}	3,21 10^{-12}	4,46 10^{-12}
Acétate	**Jour**	1,53 10^{-11}	2,00 10^{-11}	6,24 10^{-15}	1,10 10^{-14}
	Nuit	1,07 10^{-12}	1,39 10^{-12}	9,64 10^{-14}	1,70 10^{-13}
Formaldéhyde	**Jour**	7,58 10^{-11}	8,82 10^{-11}	6,73 10^{-16}	1,31 10^{-15}
	Nuit	5,27 10^{-12}	6,13 10^{-12}	1,04 10^{-14}	2,02 10^{-14}

- Contributions des radicaux et des microorganismes -

Les contributions relatives de la voie radicalaire et de la voie microbienne pour la dégradation du formiate, de l'acétate et du formaldéhyde sont présentées sur la **Figure 49**.

De jour, les radicaux $^{\bullet}OH$ sont les principaux responsables de la dégradation des trois composés d'étude avec une participation comprise entre 78 % et 99 % pour la dégradation respective de l'acétate dans des nuages à 17°C et du formiate quelle que soit la température. Le reste de la dégradation est principalement due à la présence de microorganismes, les radicaux $NO_3^{\bullet}$ n'étant impliqués que dans 0,001 à 0,03 % de la dégradation.

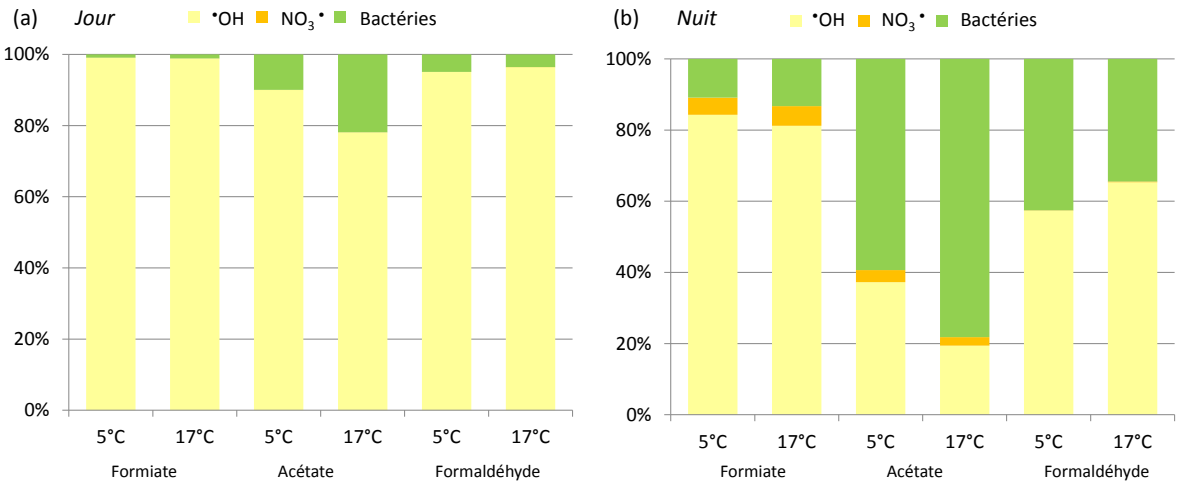


Figure 49 *: Contributions relatives de la biodégradation et de la photodégradation pour la dégradation des composés organiques étudiés (a) le jour ([•OH] = 6,9 10^{-14} M et [$NO_3^{\bullet}$] = 1,1 10^{-15} M) ; (b) la nuit ([•OH] = 4,8 10^{-15} M et [$NO_3^{\bullet}$] = 1,7 10^{-14} M).*

De nuit, en l'absence de photoproduction des radicaux hydroxyles, les contributions relatives des bactéries augmentent et s'équilibrent davantage. L'acétate et le formaldéhyde sont dégradés de façon plus équitable par les microorganismes et les radicaux •OH, voire majoritairement par les bactéries : 78 % de la dégradation de l'acétate est due à la présence des microorganismes. Les $NO_3^{\bullet}$ n'interviennent que pour de 0,1 à 0,2 % de la dégradation du formaldéhyde et pour environ 2 à 3 % de la dégradation de l'acétate. En ce qui concerne le formiate, de nuit, les radicaux hydroxyles demeurent les principaux acteurs de sa dégradation. Les bactéries et les radicaux $NO_3^{\bullet}$ ne sont alors responsables que d'environ 10 à 13 % et 5 à 6 % de sa dégradation respectivement.

La température n'a que peu d'effet sur les participations relatives des radicaux et des microorganismes pour la dégradation du formiate (moins de 3 % d'écart entre 5 et 17 °C) et du formaldéhyde (moins de 8 % d'écart entre 5 et 17°C). En revanche, l'acétate est environ 20 % plus dégradé par les bactéries à 17°C qu'à 5°C.

De tels résultats ont déjà été mis en avant par *Vaïtilingom et al.* (2010, 2011) et *Husárová et al.* (2011) avec toutefois quelques différences. En effet, dans les études précédentes, la vitesse a été calculée pour une concentration donnée en substrat puis a été considérée comme constante quelle que soit la quantité de substrat ce qui peut potentiellement conduire à des surestimations des voies bactériennes. Pour la première fois dans cette étude, il a été pris en compte, que la vitesse de dégradation des microorganismes est dépendante de la concentration en substrat du milieu. Cette correction confirme toutefois les résultats des précédentes études, à savoir que les bactéries peuvent intervenir sur la dégradation de composés carbonés dans les nuages à des contributions équivalentes voire supérieures aux radicaux •OH et $NO_3^{\bullet}$.

Toutefois, il est important de rappeler quelques limites concernant ces estimations. Tout d'abord, en ce qui concerne la biodégradation, les constantes cinétiques ont été mesurées sur une

seule souche bactérienne pour chacun des composés. Les trois souches d'étude appartiennent au genre *Pseudomonas*, le genre cultivable le plus fréquemment rencontré dans les nuages au sommet du puy de Dôme (*Vaïtilingom et al.*, 2012). Dans le modèle, la vitesse de l'ensemble des bactéries présentes dans les nuages a été considérée comme équivalente à ces trois souches. Cependant, ces souches ont été sélectionnées en raison de leur capacité à dégrader rapidement ces composés et extrapoler leur vitesse de dégradation entraîne certainement une surestimation de la participation biologique.

En outre, aucune mesure directe de la concentration en radicaux $^{\bullet}OH$ et $NO_3^{\bullet}$ n'a jamais été réalisée dans les nuages. C'est la raison pour laquelle les concentrations utilisées sont des valeurs théoriques simulées par un modèle de chimie nuageuse. Cependant, ces concentrations sont à utiliser avec précautions pour différentes raisons :

- Malgré le grand nombre de réactions et de composés chimiques considérés dans le modèle d'où ont été extraites les concentrations en radicaux (SPACCIM), une grande partie de la matière organique dans les nuages demeure inconnue est n'est donc pas actuellement prise en compte. Ces composés jouent pourtant un rôle d'importance dans la concentration radicalaire des nuages puisque qu'ils représentent un puits net de radicaux ;
- D'autre part, la concentration en radicaux $^{\bullet}OH$ et $NO_3^{\bullet}$ varie fortement en fonction de la concentration en matière organique présente. Les valeurs considérées dans cette étude sont issues d'une simulation basée sur une composition nuageuse de type continentale. Celle-ci s'apparente à la composition chimique utilisée dans le milieu nuageux artificiel d'incubation. Toutefois, les concentrations en $^{\bullet}OH$ et $NO_3^{\bullet}$ simulées sont fortement augmentées dans les scénarios mimant un nuage marin (jusqu'à près de 100 fois plus de radicaux $^{\bullet}OH$ sont présents en journée) et sont diminués dans le cas d'un nuage pollué (diminution d'un facteur 4). Les contributions relatives des radicaux et des bactéries risquent donc d'être modifiées.
- Il a récemment été mis en évidence que les bactéries peuvent dégrader une fraction non négligeable des oxydants présents dans les nuages (*Vaïtilingom et al.*, 2013) et donc agir comme un puits de radicaux. Toutefois, dans les modèles, cette activité bactérienne n'est pas considérée actuellement ;
- Les valeurs des concentrations en radicaux prises en compte dans cette étude sont issues de simulations estivales de nuages. En hiver, le flux actinique est diminué et par conséquent, la concentration en radicaux $^{\bullet}OH$ est moindre. Les contributions radicalaires relatives présentées ici peuvent donc être considérées comme des contributions maximales ;
- Enfin, l'estimation des contributions relatives de la biodégradation et de la chimie radicalaire par *Vaïtilingom et al.*, (2011) a été réalisée à la fois en considérant des valeurs de $^{\bullet}OH$ issues de la littérature et en mesurant directement des vitesses de photodégradation. Ainsi, les auteurs ont montré que les contributions radicalaires expérimentalement mesurées sont

inférieures à celles simulées par les modèles ce qui suggère que la participation des radicaux est surestimée quand on considère les valeurs de modélisation.

Il est donc maintenant crucial de quantifier les radicaux dans les nuages afin de déterminer si les concentrations employées sont cohérentes ou surestimées.

4. Conclusion

La dégradation de trois composés carbonés présents dans les nuages (le formiate, l'acétate et le formaldéhyde) par trois souches bactériennes isolées des nuages a été suivie. Des constantes cinétiques de biodégradation ont pu être mesurées à différentes températures. Il apparaît que la température d'étude (5°C et 17°C) n'a d'impact ni sur l'affinité des cellules envers le substrat, ni sur leur vitesse maximale de dégradation.

Un calcul théorique basé sur la comparaison de vitesses de dégradation radicalaire et biologique a permis d'appuyer le fait que, dans certaines conditions, les bactéries peuvent contribuer pour une part non négligeable de la dégradation de la matière organique dans les nuages, voire majoritaire.

Cette première estimation des contributions théoriques des voies biologiques et radicalaires sur la décomposition de composés organiques est simple, rapide à mettre en œuvre, facilement accessible et utilisée dans le cadre de plusieurs études (*Vaïtilingom et al.*, 2010, 2011; *Husárová et al.*, 2011). Cependant, comme les expériences en laboratoire, les paramètres pris en compte sont peu nombreux (pas d'impact des équilibres chimiques des acides/bases et des transferts de masse de composés entre le gaz et l'eau, pas d'influence de la microphysique des nuages). C'est pourquoi, dans un deuxième temps, il est essentiel de s'orienter vers un modèle plus réaliste simulant la variabilité temporelle et environnementale de paramètres sensibles tels que le modèle numérique M2C2 développé au LaMP. Il s'agit d'un outil qui permet de modéliser les réactions chimiques multiphasiques dans les nuages sous différentes conditions environnementales telles que l'intensité lumineuse ou le degré de pollution.

Ce modèle est constitué d'un premier module dit de « chimie multiphasique » qui considère différents mécanismes chimiques ayant lieu au sein de la phase gazeuse et aqueuse. Le mécanisme en phase gaz a été élaboré à partir du mécanisme de chimie atmosphérique en phase gazeuse MCM (Master Mechanism) développé initialement par *Madronich and Calvert* (1990) et décrit les transformations chimiques se déroulant au sein de la troposphère. Le mécanisme en phase aqueuse a été développé par *Leriche et al.* (2000, 2003, 2007), *Long et al.* (2013) et *Deguillaume et al.* (2004, 2010) sur la base des données mécanistiques de la littérature. Il est constamment remis à jour en fonction des nouvelles données expérimentales disponibles. Ce mécanisme permet de représenter explicitement la chimie du soufre, de l'azote, des métaux de transition, des composés de type H_xO_y (les radicaux comme $^{\bullet}OH$ et $HO_2^{\cdot}/O_2^{\cdot-}$, l'oxydant H_2O_2, *etc.*) et l'oxydation des composés organiques

jusqu'à trois atomes de carbone. Le mécanisme en phase aqueuse comprend 500 réactions dont environ 300 pour la réactivité des composés organiques. Enfin, le transfert entre la phase gazeuse et aqueuse est un processus dynamique paramétré dans le modèle M2C2 suivant la théorie de *Schwartz* (1986). Cette paramétrisation est contrainte par la constante de Henry qui définit la solubilité des composés chimiques et par le coefficient d'accommodation qui représente la probabilité qu'un composé chimique puisse passer l'interface air/goutte.

Le deuxième module est un module de microphysique des nuages liquides incluant les processus d'activation des particules d'aérosol en gouttelettes de nuage, de condensation/évaporation, de conversion de gouttelettes nuageuses en gouttes de pluie par les processus de collision/coalescence. Ainsi, le modèle représente la formation d'un nuage et sa modification par les processus microphysiques jusqu'à la formation de la pluie. Il prédit alors la concentration en nombre de gouttelettes nuageuses et de gouttes de pluie ainsi que le rapport de mélange de l'eau de nuage et de l'eau de pluie.

Jusqu'à maintenant, le modèle M2C2 s'est consacré à l'étude de l'influence de la réactivité chimique sur la composition chimique des nuages et de façon plus générale de l'atmosphère. Dans le but de définir l'importance des bactéries dans la chimie atmosphérique, il est désormais nécessaire d'intégrer des voies de dégradation biologiques dans ce modèle. Ce travail fera l'objet d'une thèse au Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP) à partir d'octobre 2014.

Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion générale

Ces travaux de thèse se sont intéressés à décrire les interactions réciproques entre les microorganismes et les conditions physico-chimiques dans les nuages en essayant de répondre à plusieurs questions scientifiques.

Dans un premier temps, l'objectif a été de d'apporter des éléments de réponse aux interrogations suivantes : **Quelle est la composition chimique et microbiologique de l'eau des nuages au puy de Dôme ? L'historique de la masse d'air peut-elle influencer la composition physico-chimique des nuages ? Peut-on ainsi différencier les masses d'air en fonction des influences qu'elles ont subi avant d'atteindre le sommet du puy de Dôme ? Existe-t-il des paramètres environnementaux influençant le nombre de microorganismes dans les nuages et/ ou leur viabilité ?** Dans ce cadre, les composantes physico-chimiques et microbiologiques des nuages ont été mieux définies en complétant une étude à long-terme basée sur des prélèvements nuageux au sommet du puy de Dôme. Ces 12 et 9 années respectives de suivi physico-chimique et microbiologique ont permis de créer une base de données unique en libre d'accès sur le site *http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data.php.*

Jusqu'à récemment, l'unique possibilité pour déterminer le parcours d'une masse d'air avant son arrivée au sommet du puy de Dôme reposait sur l'analyse de rétro-trajectoires *via* des modèles numériques (*e.g.* HYSPLIT). Cependant, cette méthode, bien qu'indiquant l'origine géographique, ne reflète pas l'importance des échanges possibles entre l'environnement et la masse d'air. Au cours de ces travaux de thèse, l'ensemble des données physiques et chimiques collectées au puy de Dôme sur les nuages ont été rassemblées et, à l'aide d'une analyse en composantes principales, 4 types de masses d'air différentes affleurant le puy de Dôme ont pu être identifiées : il s'agit de masses d'air ayant subi des influences hautement marines, marines, continentales ou polluées. Les particularités physico-chimiques de chacun de ces groupes ont été décrites afin de déterminer les caractéristiques propres à chaque groupe et afin de constituer une base de données pouvant être utilisée afin de créer des scénarios chimiques idéalisés pour les modèles simulant la réactivité chimique multiphasique de l'atmosphère ou les processus microphysiques.

Par ailleurs, le suivi microbiologique des nuages prélevés au puy de Dôme pendant la période 2004-2013 a permis de constituer la plus grande base de données sur la microflore nuageuse à ce jour. La présence en moyenne de ~4,1 10^4 bactéries et 2,9 10^3 champignons par mL d'eau nuageuse a été mise en évidence. Cette concentration ne présente pas de variabilité en fonction de la période de l'année pendant laquelle le prélèvement a été effectué, ni en fonction de l'origine de la masse d'air. Cependant, à une échelle plus fine, il a été montré que la concentration en microorganismes est corrélée avec la quantité de Na^+ présent ce qui suppose une importance des régions océaniques dans l'émission de ces organismes. Par ailleurs, la cultivabilité des microorganismes sur le milieu R2A a

montré une variabilité saisonnière suggérant que la période de l'année influence soit la viabilité cellulaire, soit la diversité microbienne présente dans les nuages. Des mesures d'ATP et d'ADP ont été réalisées afin d'estimer la viabilité des cellules dans les nuages et ont confirmé des résultats précédemment observés, à savoir que la majorité des microorganismes sont viables dans les nuages. Il a également été montré que la composition physico-chimique de l'eau nuageuse pourrait influencer la viabilité cellulaire : en effet, la présence en grande quantité d'acides carboxyliques et de NH_4^+ est liée à la présence d'un plus grand nombre de microorganismes cultivables et/ou de plus fortes concentration en ATP. Ceci appuie l'idée que les microorganismes sont effectivement capables d'utiliser ces composés comme source de nutriments et d'énergie dans les nuages. D'autres paramètres ont également été identifiés comme influençant la survie des microorganismes dans les nuages (H_2O_2, NO_3^-, Ca^{2+}, *etc*.) mais des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre l'effet de ces composés.

En plus de l'effet de ces composés chimiques sur la survie des microorganismes présents dans les nuages, d'autres facteurs peuvent également intervenir tels que la lumière solaire, les oxydants, les faibles températures et les variations de concentration osmotique lors des cycles d'évaporation et de condensation de l'eau atmosphérique. C'est pourquoi dans un deuxième temps, ces travaux de thèse se sont focalisés sur les questions suivantes : **Quelle importance ont ces facteurs de stress sur la viabilité des microorganismes ? Existe-t-il un facteur de stress particulièrement limitant pour la survie des cellules microbiennes dans les nuages ? La présence de souches récurrentes parmi la microflore des nuages est-elle liée à une meilleure adaptation à cet environnement ? Une fois aérosolisée, quelles sont les chances pour une bactérie de rester viable suffisamment longtemps pour coloniser de nouveaux environnements ?** Dans ce cadre, un chapitre de cette thèse s'est intéressé à décrire l'impact individuel de la lumière solaire, du peroxyde d'hydrogène, des chocs osmotiques et des cycles de gel et de dégel sur 5 souches microbiennes modèles isolées de l'eau des nuages au puy de Dôme. Ces souches ont été sélectionnées en raison de la présence de leur genre microbien dans une large proportion des nuages prélevés. Alors que la lumière solaire et l'exposition au peroxyde d'hydrogène dans des concentrations assimilables à celles rencontrées dans les nuages n'ont pas d'impact important sur la viabilité des cellules, les variations osmotiques et les cycles de gel et de dégel peuvent entraîner des pertes de viabilités non négligeables. Il semblerait que la souche de *Dioszegia hungarica* étudiée soit celle présentant la meilleure adaptation globale aux stress de l'atmosphère. Ceci est cohérent avec le fait qu'il s'agisse du genre microbien le plus fréquemment isolé de l'eau des nuages au puy de Dôme.

Une autre étude réalisée cette fois-ci en chambre à nuage (AIDA, Allemagne) a permis de suivre la survie de bactéries dans des conditions plus réalistes de l'atmosphère. Il a ainsi été montré que la population de cellules totales voit son effectif diminuer de moitié toutes les 6 heures par des phénomènes de sédimentation ou de dépôt sur les parois de la chambre de simulation. En ce qui

concerne la population bactérienne cultivable, elle est fortement impactée par les conditions rencontrées et décroit de moitié toutes les ~3h, cette diminution étant un cumul des effets de déposition et de mortalité au cours du temps.

Après avoir étudié le rôle des conditions physico-chimiques sur la survie des microorganismes, ces travaux de thèse se sont intéressés aux rôles que peuvent avoir ces organismes sur ces mêmes conditions, en particulier sur les processus microphysiques et sur la composition organique des nuages.

Dans une première étude, les questions scientifiques suivantes ont été posées : **Existe-t-il des bactéries glaçogènes dans l'eau des nuages ? Si oui, peuvent-elles influencer la formation de cristaux de glace dans les nuages ? Peuvent-elles également participer à l'initiation des précipitations ?** Jusqu'alors, des bactéries glaçogènes avaient été identifiées parmi de nombreux environnements associés au cycle de l'eau mais jamais dans les nuages. Au cours de cette thèse, sept souches bactériennes isolées de la phase aqueuse des nuages ont été identifiées comme glaçogènes à des températures auxquelles les autres types de noyaux glaçogènes (poussières minérales, suies, *etc*.) ne sont pas actifs. Les fractions cellulaires glaçogènes ont été mesurées et ont montré une grande variabilité entre les souches : entre 6 10^{-5} et 4 % des cellules se sont avérées effectivement glaçogènes à -6°C et cette proportion augmente lorsque la température décroit. En parallèle, il a été mis en évidence que par une analyse phylogénétique que les populations de *P. syringae* rencontrées dans les nuages appartiennent à des genres considérés comme rares dans l'environnement et pourraient donc avoir préférentiellement été sélectionnées dans les nuages.

L'activité glaçogène de l'une de ces souches a ensuite été étudiée dans une chambre à nuage simulant les conditions thermodynamiques de l'atmosphère en milieu fermé. Il a ainsi été observé qu'après aérosolisation, l'activité glaçogène des bactéries perdure pendant une période d'au moins 17h. Par conséquent, les bactéries exprimant les protéines glaçogènes avant même leur émission dans l'atmosphère pourraient avoir un impact sur la formation de glace dans les nuages. Enfin, il a été mis en avant qu'après la formation d'un nuage dans la chambre de simulation, l'activité glaçogène des bactéries est fortement diminuée, en particulier aux plus hautes températures, ce qui suggère que les populations bactériennes actives ont été préférentiellement éliminées par les précipitations résultant de la formation de glace dans les nuages.

Enfin, des mesures d'activité glaçogène totale et biologique ont été réalisées directement sur l'eau des nuages : entre <1 et 200 noyaux glaçogènes actifs à -10°C sont présents dans les nuages et ils sont majoritairement représentés par des particules biologiques. Pour chacun des prélèvements réalisés, les particules biologiques se sont révélées responsables de l'activité glaçogène aux plus hautes températures. Il a été mis en évidence grâce à une analyse en composantes principales une probable différenciation de la nature des noyaux glaçogènes à -10°C : l'activité à des températures plus chaudes serait principalement le résultat des noyaux glaçogènes biologiques tandis qu'à des

températures plus froides, elle serait le résultat d'autres types de particules (suies, poussières, *etc.*). Les données quantitatives obtenues à partir de l'eau des nuages ont été implémentées au modèle global CAM-OSLO (*Hoose et al.*, 2010) afin de simuler les concentrations bactériennes glaçogènes en fonction de la latitude considérée et de l'altitude (donc de la température). Les résultats ont montré dans certaines régions du monde des concentrations supérieures aux valeurs actuellement prises en compte dans les modèles et il pourrait être désormais intéressant de considérer ces nouvelles valeurs pour étudier le rôle des bactéries sur les processus de formation de glace dans les nuages.

Enfin, le dernier chapitre de cette thèse a cherché à apporter des éléments de réponses aux questions suivantes : **l'activité métabolique des microorganismes dans les nuages est-elle suffisante pour influencer la composition de ce milieu ? Quelle est l'importance de l'utilisation de la matière organique par les microorganismes sur la chimie atmosphérique ? Les microorganismes peuvent-ils concurrencer les voies de dégradation radicalaire dans la transformation de la matière organique dans les nuages ?** Plusieurs études en laboratoire ont déjà mis en avant une action non négligeable des bactéries dans la chimie atmosphérique, dans des ordres de grandeur comparables à ceux de la chimie radicalaire. Cependant, les conditions reproduites en laboratoire sont éloignées de celles rencontrées dans l'atmosphère. Afin d'estimer pleinement l'importance de l'activité microbienne, il est maintenant crucial d'utiliser des outils de modélisation numérique. Pour cela, il est nécessaire de définir au préalable les paramètres de la dégradation microbienne. Le dernier chapitre de cette thèse s'est donc concentré à déterminer des constantes cinétiques de biodégradation de 3 composés organiques majeurs dans les nuages (le formiate, l'acétate et le formaldéhyde) par 3 souches bactériennes isolées de cet environnement. La température d'étude (5°C ou 17°C) n'a révélé d'impact ni sur la vitesse maximale de dégradation, ni sur l'affinité des cellules pour le substrat. Une première estimation des vitesses radicalaires et microbiologiques de dégradation dans les nuages a permis de confirmer les résultats précédemment mis en évidence par l'équipe, à savoir une participation non négligeable des cellules dans la transformation de ces composés, en particulier en conditions nocturnes. Grâce à ces nouvelles données, une approche par un modèle plus complet va pouvoir être réalisée afin de comparer l'implication de ces deux catalyseurs de manière réaliste.

2. Perspectives

Le premier chapitre de résultats de cette thèse s'est focalisé à améliorer la description de la composition chimique et microbiologique de la phase aqueuse des nuages prélevés au puy de Dôme. Cependant, tant au niveau quantitatif (nombre de prélèvements) que qualitatif (diversité analytique), cette base de donnée ne permet pas de documenter de façon exhaustive la complexité nuageuse. Il est donc crucial de poursuivre cette étude à plus long terme. D'autre part, comme il l'a été précisé auparavant, seuls environ 10% des composés carbonés dans les nuages ont été identifiés. Il est

désormais essentiel d'essayer de caractériser les 90% restants en diversifiant les analyses chimiques. A titre d'exemple, un nouveau protocole a été mis au point durant ma thèse afin de quantifier les aldéhydes présents en phase aqueuse par HPLC. Ces analyses pourront donc désormais être réalisées sur le site clermontois lors de chaque prélèvement. En complément, il est envisagé de mettre au point de nouveaux protocoles expérimentaux pour compléter ou remplacer ceux actuellement utilisés. Par exemple, jusqu'à maintenant, les dénombrements de cellules totales s'effectuaient en marquant les cellules par un fluorochrome et en les observant par microscopie. Cependant, comme il a été pointé auparavant dans cette thèse, cette méthode fastidieuse, « gourmande » en eau nuageuse, est soumise à des biais importants entre les expérimentateurs. Actuellement, la mise au point d'un comptage par cytométrie en flux est en cours pour lequel les cellules seraient marquées par une coloration différentiant les cellules viables des cellules mortes ce qui permettrait d'avoir, d'une part, une information quantitative et d'autre part, une information qualitative sur la proportion de cellules viables, tout en réduisant les volumes d'eau nuageuse nécessaires.

Il serait également intéressant d'étudier les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des nuages à différents points du globe, par exemple, dans le cadre de campagnes d'étude, afin de relier les compositions physico-chimiques et microbiologiques à différents sites de prélèvements. Ceci permettrait d'étudier les mêmes paramètres que ceux présentés dans cette thèse dans des zones plus marquées par l'activité humaine ou au contraire dans des régions extrêmement reculées vis-à-vis des pollutions anthropiques. Les « améliorations » récentes des impacteurs à gouttelettes utilisés pour les prélèvements ont été conçues afin de permettre désormais un transport aisé de ces appareils lors de tels déplacements. Dans ce cadre, un rapprochement avec l'observatoire du Maïdo (Réunion, Océan Indien) est en cours, ce qui permettra de caractériser la microflore nuageuse dans des conditions très différentes de celles relevées au puy de Dôme (influence marine marquée, milieu tropical, *etc.*). D'autre part, il a été soulevé dans le Chapitre IV de cette thèse que certains groupes microbiens isolés des nuages au puy de Dôme appartiennent à des clades considérés comme rares dans l'environnement et sont rencontrés dans des proportions atypiques dans les nuages en comparaison d'autres écosystèmes. Il a été pointé que ceci pourrait être le résultat d'une biogéographie particulière autour du site de prélèvement. Des études de la microflore de l'eau de nuage autour du globe permettraient de réfuter ou de confirmer cette hypothèse.

Les modifications des impacteurs à gouttelettes ont également eu pour vocation d'augmenter les volumes d'eau de nuage prélevés par unité de temps. Jusqu'à maintenant, les faibles volumes récoltés (environ ~25 mL par heure de prélèvement et par impacteur) ont été un frein pour l'analyse simultanée de la composition chimique et microbiologique des nuages puisqu'il a été nécessaire de sélectionner un nombre restreint d'analyses et des méthodes analytiques peu coûteuses en matrice. Désormais, avec l'augmentation des volumes d'aspiration ainsi que du nombre d'impacteurs, de plus grands volumes vont pouvoir être collectés et de nouvelles études sont envisagées. A titre d'exemple, il s'agit d'analyses de biologie moléculaire permettant d'acquérir des données sur la

diversité microbienne totale (étude du métagénome) ou active (étude du transcriptome et plus spécifiquement des ARN ribosomaux) qui sont des méthodes nécessitant plusieurs centaines voire milliers de millilitres de matrice et qui ont jusqu'alors été très peu voire pas décrites en ce qui concerne les eaux atmosphériques. L'une des particularités de ces méthodes est d'étudier l'ensemble des acides nucléiques présents dans l'échantillon et, de ce fait, elles pourront éventuellement être utilisées afin de décrire des organismes ou des entités dont l'étude a été ignorée dans les nuages jusqu'à maintenant comme les archaebactéries ou les virus.

Jusqu'à maintenant, les cultures microbiennes réalisées sur les prélèvements d'eau nuageuse ont visé l'isolement d'organismes hétérotrophes aérobies *via* l'utilisation de milieux de culture tels que le milieu R2A. Cependant, toutes les conditions favorables à la présence d'organismes photosynthétiques sont réunies dans les nuages : présence de lumière, de CO_2, d'eau et de sels minéraux. Dans les nuages, de tels organismes pourraient influencer les bilans carbonés de l'eau des nuages en n'agissant plus uniquement comme un puits de carbone mais également comme une source. De plus, leur présence indiquerait une nouvelle forme d'implication des microorganismes dans la chimie des nuages en produisant cette fois-ci des molécules organiques à partir du CO_2 de l'air. Plusieurs tentatives dans notre équipe de cultiver des microorganismes photosynthétiques se sont avérées des réussites. Cependant, aucune identification n'a encore été effectuée mais elles pourraient être réalisées dans un avenir proche.

Le deuxième chapitre des résultats de cette thèse s'est consacré à décrire les taux de survie de 5 souches microbiennes face à 4 facteurs de stress rencontrés dans les nuages. Cependant, il s'agit d'une étude relatant uniquement l'impact de ces facteurs sur la viabilité cellulaire. A une échelle plus fine, par exemple, au niveau métabolique, de nombreux changements peuvent intervenir sans que la survie des organismes soit menacée. Un certain nombre de ces changements a été décrit auparavant dans cette thèse : il s'agit, par exemple, d'activation de voies de synthèse d'agents protecteurs (cryoprotectants, osmoprotectants, *etc*.) ou de protéines (cold shock proteins, catalases, superoxyde dismutases, *etc*.). Il serait désormais intéressant de décrire ces réponses en utilisant des outils tels que la métabolomique qui permettrait d'observer les différences entre les métabolites cellulaires présents dans des conditions de stress et en dehors de ces conditions. D'autres études pourraient également être envisagées afin de cibler des réponses au niveau transcriptionnel (ARNm) ou protéique. Ceci permettrait, par exemple, d'étudier l'impact des stress atmosphériques (pris individuellement ou en simultané) sur l'expression de protéines particulières telles que les protéines glaçogènes.

Dans le passé, plusieurs modèles se sont consacrés à étudier la survie de microorganismes types dans l'atmosphère. Cependant, ces modèles se sont principalement focalisés à décrire l'impact de l'humidité relative et de la température sur la survie de microorganismes pathogènes. Il pourrait être intéressant d'intégrer les résultats de cette étude dans de tels modèles afin de décrire les chances de survie d'une cellule microbienne émise depuis le sol, la végétation ou des eaux de surface en

fonction des conditions qu'elle rencontre lors de son voyage dans l'atmosphère (nombre de nuages qu'elle rencontre, le nombre de fois où elle est soumise à un cycle de gel et de dégel, *etc*.). Ceci permettrait d'améliorer nos connaissances sur la dissémination des microorganismes qui a un impact direct sur les risques sanitaires et dans le domaine de l'écologie.

Le troisième chapitre de résultats de cette thèse s'est intéressé à identifier des bactéries glaçogènes dans l'eau des nuages, à étudier leur comportement dans une chambre de simulation des conditions atmosphériques nuage et à estimer leur proportion dans l'eau des nuages. Depuis la publication de *Joly et al.*, (2013b), 19 nouvelles souches bactériennes ont été identifiées comme glaçogènes dans les nuages (Annexe 3). La réalisation de leur profil d'activité est en cours afin de déterminer leur température d'activité maximale et la proportion de cellules actives à chaque température. Ceci permettra peut-être d'identifier des groupes caractéristiques de l'eau des nuages ou de définir des capacités glaçogènes caractéristiques des bactéries de ce milieu.

Jusqu'alors, les modèles numériques simulant le rôle des bactéries dans les mécanismes d'initiation des précipitations se sont basés sur des proportions de bactéries glaçogènes mesurées dans d'autres compartiments environnementaux (pluie, neige) voire, à partir de souches pures cultivées en laboratoire. Ces proportions sont relativement éloignées de celles mesurées dans cette thèse directement sur l'eau des nuages. Il serait intéressant dans l'avenir d'utiliser ces données pour paramétrer de ces outils numériques simulant la microphysique nuageuse et ainsi évaluer plus précisément l'impact des bactéries sur l'initiation des précipitations.

Ce chapitre de la thèse s'est focalisé uniquement sur l'activité glaçogène des bactéries sur les processus microphysiques dans les nuages. Cependant, il existe d'autres voies d'actions des microorganismes sur ces processus, notamment *via* une action directe en tant que noyau de condensation. Les microorganismes peuvent également interagir en produisant des molécules modifiant les tensions de surface (biosurfactants) permettant ainsi la formation de gouttelettes à des sursaturations plus faibles. La banque de souches microbiennes isolées des nuages est actuellement en cours de criblage afin d'identifier la structure des biosurfactants produits.

Enfin, le dernier chapitre des résultats de cette thèse s'est focalisé sur le rôle des microorganismes dans la chimie atmosphérique. Des constantes cinétiques décrivant la biodégradation de trois composés carbonés ont été mesurées et seront intégrées dans le modèle M2C2 développé au LaMP. Jusqu'à maintenant, le modèle M2C2 s'est consacré à l'étude dans l'atmosphère des réactions chimiques uniquement. Dans le but de définir l'importance des bactéries dans la chimie atmosphérique, il est désormais nécessaire d'intégrer les voies de dégradation biologiques dans ce modèle. Ce travail fera l'objet d'une thèse au Laboratoire de Météorologie Physique à partir d'octobre 2014.

Dans le cadre de ce futur travail, plusieurs difficultés sont à souligner, en particulier, au niveau des « ajustements » du modèle. Premièrement, la concentration en catalyseur (les bactéries) devra rester constante au cours du temps. Deuxièmement, il va être nécessaire de paramétrer le modèle

M2C2 afin de pouvoir intégrer une « pseudo-constante » microbienne dépendante de la concentration en substrat. Enfin, il convient de garder en mémoire que la dégradation de composés organiques par des bactéries fait intervenir des voies métaboliques extrêmement complexe : si le formiate est un composé terminal de dégradation, ce n'est le cas ni de l'acétate, ni du formaldéhyde dont les produits de dégradation peuvent être impliqués dans de nouvelles voies métaboliques et conduire à la formation de composés de plus faible poids moléculaires, de macromolécules ou de biomasse. Il sera donc essentiel de décrire, dans un premier temps, les produits formés par la dégradation de ces composés et de définir les proportions de chacun des produits formés (la caractérisation par RMN des métabolites de dégradation de cette étude est en cours). Une fois ces contraintes dépassées, les voies métaboliques microbiennes pourront être simulées et le rôle des bactéries dans la chimie atmosphérique pourra être évalué dans un système nuageux plus réaliste que celui étudié en laboratoire.

Enfin, jusqu'à maintenant, l'activité de biodégradation des composés organiques ou des oxydants dans les nuages a été observée en laboratoire sur un nombre de molécules restreint en raison du temps d'étude nécessaire. Une analyse métatranscriptomique de l'eau des nuages pourrait constituer une approche complémentaire et permettrait de décrire l'ensemble des ARN messagers synthétisés dans ce milieu. Il serait ainsi possible de rapporter l'expression de gènes impliqués dans la dégradation de la matière organique dans les nuages, voire d'identifier des voies de dégradation insoupçonnées jusqu'à maintenant.

En conclusion, l'étude de la microflore des nuages et de ses interactions avec ce milieu est un sujet très récent, au cœur de peu d'équipes de recherches notamment en raison de la complexité à recueillir des échantillons naturels. Ces travaux de thèse ont permis d'apporter quelques éléments de réponse sur la survie des microorganismes dans le milieu nuageux et sur leur implication dans les processus microphysiques et chimiques des nuages mais de nombreuses questions scientifiques restent encore à explorer.

Références bibliographiques

Agogué H., Joux F., Obernosterer I. et Lebaron P. (2005). Resistance of marine bacterioneuston to solar radiation, *Applied and Environmental Microbiology*, *71*: 5282‑5289.

Aguilar P. S., Hernandez-Arriaga A. M., Cybulski L. E., Erazo A. C. et de Mendoza D. (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*, *The EMBO Journal*, *20*: 1681‑1691.

Ahern H., Walsh K., Hill T. et Moffett B. (2007). Fluorescent Pseudomonads isolated from hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation, *Biogeosciences*, *4*: 115-124.

Albrecht B. A. (1989). Aerosols, cloud microphysics, and fractional cloudiness, *Science*, *245*: 1227‑1230.

Aller J. Y., Kuznetsova M. R., Jahns C. J. et Kemp P. F. (2005). The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols, *Journal of Aerosol Science*, *36*: 801‑812.

Altieri K. E., Carlton A. G., Lim H. J., Turpin B. J. et Seitzinger S. P. (2006). Evidence for oligomer formation in clouds: reactions of isoprene oxidation products, *Environmental Science and Technology*, *40*: 4956‑4960.

Amann R. I., Ludwig W. et Schleifer K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiological Reviews*, *59*: 143‑169.

Amato P., Menager M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. et 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., Demeer F., Melaouhi A., Fontanella S., Martin-Biesse A. S., Sancelme M., Laj P. et Delort A. M. (2007a). 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. et Delort A. M. (2007b). An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the puy de Dôme (France), *Atmospheric Environment*, *41*: 8253-8263.

Amato P., Hennebelle R., Magand O., Sancelme M., Delort A. M., Barbante C., Boutron C. et Ferrari C. (2007c). Bacterial characterization of the snow cover at Spitzberg, Svalbard, *FEMS Microbiology Ecology*, *59*: 255-264.

Amato P., Parazols M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. et Delort A. M. (2007d). Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the puy de Dome: major groups and growth abilities at low temperatures, *FEMS Microbiology Ecology*, *59*: 242-254.

Amato P., Doyle S. et Christner B. C. (2009). Macromolecular synthesis by yeasts under frozen conditions, *Environmental Microbiology*, *11*: 589-596.

Ames B. N., Shigenaga M. K. et Hagen T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*: 7915‑7922.

De Antoni G. L., Pérez P., Abraham A. et Añón M. C. (1989). Trehalose, a cryoprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*, *Cryobiology*, *26*: 149‑153.

Arias A. A., Craig M. et Fickers P. (2011). Gram-positive antibiotic biosynthetic clusters: a review, in *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, vol. 2, p. 977‑986, A. Mendez-Vilas.

Ariya P. A. et Amyot M. (2004). New directions: The role of bioaerosols in atmospheric chemistry and physics, *Atmospheric Environment*, *38*: 1231-1232.

Ariya P. A., Nepotchatykh O., Ignatova O. et Amyot M. (2002). Microbiological degradation of atmospheric organic compounds, *Geophysical Research Letters*, *29*: 2077.

Ariya P. A., Sun J., Eltouny N. A., Hudson E. D., Hayes C. T. et Kos G. (2009). Physical and chemical characterization of bioaerosols - Implications for nucleation processes, *International Reviews in Physical Chemistry*, *28*: 1‑32.

Asmi E., Freney E., Hervo M., Picard D., Rose C., Colomb A. et Sellegri K. (2012). Aerosol cloud activation in summer and winter at puy-de-Dôme high altitude site in France, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *12*: 11589‑11607.

Atkinson J. D., Murray B. J., Woodhouse M. T., Whale T. F., Baustian K. J., Carslaw K. S., Dobbie S., O'Sullivan D. et Malkin T. L. (2013). The importance of feldspar for ice nucleation by mineral dust in mixed-phase clouds, *Nature*, *498*: 355‑358.

Bakir U. et Hamamci H. (1997). The effect of freeze-thawing on the release of intracellular proteins from *Escherichia coli* by means of a bead mill, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *13*: 475‑477.

Barnes H. (1954). Some tables for the ionic composition of sea water, *Journal of Experimental Biology*, *31*: 582‑588.

Bauer H., Kasper-Giebl A., Löflund M., Giebl H., Hitzenberger R., Zibuschka F. et 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., Hitzenberger R., Kasper-Giebl A., Reischl G., Zibuschka F. et Puxbaum H. (2003). Airborne bacteria as cloud condensation nuclei, *Journal of Geophysical Research*, *108*: 4658.

Beales N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *3*: 1-20.

Becking L. G. M. B. (1934). *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*, W.P. Van Stockum & Zoon N.V., Den Haag, La Haye (Pays-Bas).

Benkelberg H.-J. et Warneck P. (1995). Photodecomposition of iron(III) hydroxo and sulfato complexes in aqueous solution: wavelength dependence of OH and SO_4^- quantum yields, *The Journal of Physical Chemistry*, *99*: 5214‑5221.

Benov L. et Al-Ibraheem J. (2002). Disrupting *Escherichia coli*: a comparison of methods, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, *35*: 428-431.

Benz S., Megahed K., Möhler O., Saathoff H., Wagner R. et Schurath U. (2005). T-dependent rate measurements of homogeneous ice nucleation in cloud droplets using a large atmospheric

simulation chamber, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *176*: 208-217.

Bergeron T. (1935). On the physics of cloud and precipitation, in *Proc. 5th Assembly UGGI Lisbon*, vol. 2, p. 156-200.

Berges J. A. (1994). Fitting ecological and physiological data to rectangular hyperbolae: a comparison of methods using Monte Carlo simulations, *Marine ecology progress series*, *114*: 175-183.

Bernard L., Schfer H., Joux F., Courties C., Muyzer G. et Lebaron P. (2000). Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater, *Aquatic Microbial Ecology*, *23*: 1-11.

Bey I., Aumont B. et Toupance G. (2001). A modeling study of the nighttime radical chemistry in the lower continental troposphere: 1. Development of a detailed chemical mechanism including nighttime chemistry, *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *106*: 9959-9990.

Blanchard D. C. (1989). The ejection of drops from the sea and their enrichment with bacteria and other materials: a review, *Estuaries and Coasts*, *12*: 127-137.

Blando J. D. et Turpin B. J. (2000). Secondary organic aerosol formation in cloud and fog droplets: a literature evaluation of plausibility, *Atmospheric Environment*, *34*: 1623-1632.

Booth I. R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria, *Microbiological Reviews*, *49*: 359-378.

Booth I. R. et Kroll R. G. (1989). The preservation of foods by low pH, in *Mechanisms of action of food preservation procedures*, p. 119-160, Gould, G. W., Barking (Royaume-Uni).

Bovallius A., Bucht B., Roffey R. et Anas P. (1978). Long-range air transmission of bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, *35*: 1231-1232.

Bowers R. M., Lauber C. L., Wiedinmyer C., Hamady M., Hallar A. G., Fall R., Knight R. et 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.

Bowers R. M., McCubbin I. B., Hallar A. G. et Fierer N. (2012). Seasonal variability in airborne bacterial communities at a high-elevation site, *Atmospheric Environment*, *50*: 41-49.

Brodie E. L., DeSantis T. Z., Parker J. P. M., Zubietta I. X., Piceno Y. M. et Andersen G. L. (2007). Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*: 299-304.

Burger S. R. et Bennett J. W. (1985). Droplet enrichment factors of pigmented and nonpigmented *Serratia marcescens*: possible selective function for prodigiosin, *Applied and Environmental Microbiology*, *50*: 487-490.

Burrows S. M., Elbert W., Lawrence M. G. et Pöschl U. (2009a). Bacteria in the global atmosphere - Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *9*: 9263-9280.

Burrows S. M., Butler T., Jöckel P., Tost H., Kerkweg A., Pöschl U. et Lawrence M. G. (2009b). Bacteria in the global atmosphere - Part 2: Modeling of emissions and transport between different ecosystems, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *9*: 9281-9297.

Burrows S. M., Hoose C., Pöschl U. et Lawrence M. G. (2013). Ice nuclei in marine air: biogenic particles or dust?, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *13*: 245‑267.

Busse H. J., Denner E. B. M., Buczolits S., Salkinoja-Salonen M., Bennasar A. et Kämpfer P. (2003). *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*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *53*: 1253-1260.

Charbouillot T. (2011). Physico-chimie de la phase aqueuse des nuages prélevée au sommet du puy de Dôme: caractérisation et réactivité photochimique, Université de Clermont-Ferrand II, Clermont-Ferrand (France). Disponible à l'adresse : http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00697018

Charlson R. J., Schwartz S. E., Hales J. M., Cess R. D., Coakley J. A., Hansen J. E. et Hofmann D. J. (1992). Climate Forcing by Anthropogenic Aerosols, *Science*, *255*: 423‑430.

Chebbi A. et Carlier P. (1996). Carboxylic acids in the troposphere, occurrence, sources, and sinks: A review, *Atmospheric Environment*, *30*: 4233‑4249.

Chin M. et 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 *Aquatic and Surface Photochemistry*, p. 85‑98, CRC, Boca Raton (U.S.A.).

Christner B. C., Mosley-Thompson E., Thompson L. G., Zagorodnov V., Sandman K. et Reeve J. N. (2000). Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice, *Icarus*, *144*: 479-485.

Christner B. C., Mosley-Thompson E., Thompson L. G. et Reeve J. N. (2001). Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice, *Environmental Microbiology*, *3*: 570-577.

Christner B. C., Mosley-Thompson E., Thompson L. G. et Reeve J. N. (2003). Bacterial recovery from ancient glacial ice, *Environmental Microbiology*, *5*: 433-436.

Christner B. C., Cai R., Morris C. E., McCarter K. S., Foreman C. M., Skidmore M. L., Montross S. N. et Sands D. C. (2008a). Geographic, seasonal, and precipitation chemistry influence on the abundance and activity of biological ice nucleators in rain and snow, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*: 18854-18859.

Christner B. C., Morris C. E., Foreman C. M., Cai R. et Sands D. C. (2008b). Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall, *Science*, *319*: 1214.

Cody Y. S. et Gross D. C. (1987). Characterization of pyoverdinpss, the fluorescent siderophore produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Applied and Environmental Microbiology*, *53*: 928-934.

Collett Jr J. L., Daube Jr B. C., Gunz D. et Hoffmann M. R. (1990). Intensive studies of Sierra Nevada cloudwater chemistry and its relationship to precursor aerosol and gas concentrations, *Atmospheric Environment*, *24*: 1741‑1757.

Connolly P. J., Möhler O., Field P. R., Saathoff H., Burgess R., Choularton T. et Gallagher M. (2009). Studies of heterogeneous freezing by three different desert dust samples, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *9*: 2805-2824.

Coohill T. P. et Sagripanti J.-L. (2009). Bacterial inactivation by solar ultraviolet radiation compared with sensitivity to 254 nm radiation, *Photochemistry and Photobiology*, *85*: 1043-1052.

Côté V., Kos G., Mortazavi R. et Ariya P. A. (2008). Microbial and « *de novo* » transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi, *Science of The Total Environment*, *390*: 530-537.

Csonka L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress, *Microbiological Reviews*, *53*: 121-147.

Cziczo D. J., Froyd K. D., Hoose C., Jensen E. J., Diao M., Zondlo M. A., Smith J. B., Twohy C. H. et Murphy D. M. (2013). Clarifying the dominant sources and mechanisms of cirrus cloud formation, *Science*, *340*: 1320-1324.

D'Amico S., Collins T., Marx J.-C., Feller G. et Gerday C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life, *EMBO Reports*, *7*: 385-389.

Dahl T. A., Midden W. R. et Hartman P. E. (1989). Comparison of killing of gram-negative and gram-positive bacteria by pure singlet oxygen, *Journal of Bacteriology*, *171*: 2188-2194.

Darwin C. (1846). An account of the fine dust which often falls on vessels in the Atlantic ocean, *Quarterly Journal of the Geological Society*, *2*: 26-30.

Decesari S., Facchini M. C., Fuzzi S., McFiggans G. B., Coe H. et Bower K. N. (2005). The water-soluble organic component of size-segregated aerosol, cloud water and wet depositions from Jeju Island during ACE-Asia, *Atmospheric Environment*, *39*: 211-222.

Deguillaume L., Leriche M., Monod A. et Chaumerliac N. (2004). The role of transition metal ions on HOx radicals in clouds: a numerical evaluation of its impact on multiphase chemistry, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *4*: 95-110.

Deguillaume L., Leriche M. et Chaumerliac N. (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., Leriche M., Amato P., Ariya P. A., Delort A. M., Pöschl U., Chaumerliac N., Bauer H., Flossmann A. I. et Morris C. E. (2008). Microbiology and atmospheric processes: chemical interactions of primary biological aerosols, *Biogeosciences*, *5*: 1073-1084.

Deguillaume L., Desboeufs K. V., Leriche M., Long Y. et Chaumerliac N. (2010). Effect of iron dissolution on cloud chemistry: from laboratory measurements to model results, *Atmospheric Pollution Research*, *1*: 220-228.

Deguillaume L. et al. (2013). Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) from 10-year monitoring: mean features of their physico-chemical properties, *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, *13*: 22795-22846.

DeLeon-Rodriguez N., Lathem T. L., Rodriguez-R L. M., Barazesh J. M., Anderson B. E., Beyersdorf A. J., Ziemba L. D., Bergin M., Nenes A. et Konstantinidis K. T. (2013). Microbiome of the upper

troposphere: Species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*: 2575‑2580.

Delort A.-M., Vaïtilingom M., Amato P., Sancelme M., Parazols M., Mailhot G., Laj P. et 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.

DeMott P. J. (1990). An exploratory study of ice nucleation by soot aerosols, *Journal of Applied Meteorology*, *29*: 1072‑1079.

DeMott P. J. et Prenni A. J. (2010). New directions: need for defining the numbers and sources of biological aerosols acting as ice nuclei, *Atmospheric Environment*, *44*: 1944-1945.

DeMott P. J. et al. (2011). Resurgence in ice nuclei measurement research, *Bulletin of the American Meteorological Society*, *92*: 1623‑1635.

Després V. R., Nowoisky J. F., Klose M., Conrad R., Andreae M. O. et 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.

Després V. R. et al. (2012). Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review, *Tellus B*, *64*: 15598.

Diehl K. et Wurzler S. (2010). Air parcel model simulations of a convective cloud: Bacteria acting as immersion ice nuclei, *Atmospheric Environment*, *44*: 4622‑4628.

Dieser M., Greenwood M. et Foreman C. M. (2010). Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses, *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, *42*: 396‑405.

Donaldson A. I., Wardley R. C., Martin S. et Ferris N. P. (1983). Experimental Aujeszky's disease in pigs: excretion, survival and transmission of the virus, *Veterinary Record*, *113*: 490‑494.

Duman J. G. et Olsen T. M. (1993). Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants, *Cryobiology*, *30*: 322‑328.

Eguchi M., Nishikawa T., MacDonald K., Cavicchioli R., Gottschal J. C. et Kjelleberg S. (1996). Responses to stress and nutrient availability by the marine ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256, *Applied and Environmental Microbiology*, *62*: 1287-1294.

Eisenthal R. (1974). The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters, *Biochemical Journal*, *139*: 715‑720.

Ekström S., Nozière B., Hultberg M., Alsberg T., Magnér J., Nilsson E. D. et Artaxo P. (2010). A possible role of ground-based microorganisms on cloud formation in the atmosphere, *Biogeosciences*, *7*: 387-394.

Ervens B. et Volkamer R. (2010). Glyoxal processing by aerosol multiphase chemistry: towards a kinetic modeling framework of secondary organic aerosol formation in aqueous particles, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *10*: 8219‑8244.

Ervens B., George C., Williams J. E., Buxton G. V., Salmon G. A., Bydder M., Wilkinson F., Dentener F., Mirabel P. et Wolke R. (2003a). CAPRAM 2.4 (MODAC mechanism): An extended and condensed tropospheric aqueous phase mechanism and its application, *Journal of Geophysical Research: Atmospheres (1984-2012)*, *108*: 4426.

Ervens B., Gligorovski S. et Herrmann H. (2003b). Temperature-dependent rate constants for hydroxyl radical reactions with organic compounds in aqueous solutions, *Physical Chemistry Chemical Physics*, *5*: 1811‑1824.

Ervens B., Feingold G., Clegg S. L. et Kreidenweis S. M. (2004). A modeling study of aqueous production of dicarboxylic acids: 2. Implications for cloud microphysics, *Journal of Geophysical Research*, *109*: D15206.

Ervens B., Turpin B. J. et Weber R. J. (2011). Secondary organic aerosol formation in cloud droplets and aqueous particles (aqSOA): a review of laboratory, field and model studies, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *11*: 11069‑11102.

Ervens B., Wang Y., Eagar J., Leaitch W. R., Macdonald A. M., Valsaraj K. T. et Herckes P. (2013). Dissolved organic carbon (DOC) and select aldehydes in cloud and fog water: the role of the aqueous phase in impacting trace gas budgets, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *13*: 5117‑5135.

Exner M., Herrmann H., Michel J. W. et Zellner R. (1993). Laser pulse initiated measurements of NO_3 reactions with S(IV) and organic compounds in aqueous solutions, in *Photo-oxidants: Precursors and Products: Proceedings of EUROTRAC Symposium '92*, p. 615‑618, SPB Academic Publishing.

Exner M., Herrmann H. et Zellner R. (1994). Rate constants for the reactions of the NO_3 radical with $HCOOH/HCOO^-$ and CH_3COOH/CH_3COO^- in aqueous solution between 278 and 328 K, *Journal of Atmospheric Chemistry*, *18*: 359‑378.

Fahlgren C., Hagström Å., Nilsson D. et Zweifel U. L. (2010). Annual variations in the diversity, viability, and origin of airborne bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, *76*: 3015‑3025.

Fahlgren C., Bratbak G., Sandaa R.-A., Thyrhaug R. et Zweifel U. (2011). Diversity of airborne bacteria in samples collected using different devices for aerosol collection, *Aerobiologia*, *27*: 107‑120.

Fall R. et Schnell R. C. (1985). Association of an ice-nucleating Pseudomonad with cultures of the marine dinoflagellate, *Heterocapsa niei*, *Journal of Marine Research*, *43*: 257‑265.

Faust B. C. et Zepp R. G. (1993). Photochemistry of aqueous iron(III)-polycarboxylate complexes: roles in the chemistry of atmospheric and surface waters, *Environmental Science and Technology*, *27*: 2517‑2522.

Feller G. et Gerday C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation, *Nature Reviews Microbiology*, *1*: 200‑208.

Feng J. et Möller D. (2004). Characterization of water-soluble macromolecular substances in cloud water, *Journal of Atmospheric Chemistry*, *48*: 217‑233.

Fierer N., Liu Z., Rodriguez-Hernandez M., Knight R., Henn M. et 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. et Lawson W. (2004). Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two southern hemisphere glaciers, *Microbial Ecology*, *47*: 329-340.

Fong N., Burgess M., Barrow K. et Glenn D. (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. et DeMott P. J. (1998). Cloud activation characteristics of airborne *Erwinia carotovora* cells, *Journal of Applied Meteorology*, *37*: 1293‑1300.

Fulton J. D. (1966). Microorganisms of the upper atmosphere III. Relationship between altitude and micropopulation, *Applied Microbiology*, *14*: 237‑240.

Fuzzi S., Facchini M. C., Decesari S., Matta E. et Mircea M. (2002). Soluble organic compounds in fog and cloud droplets: what have we learned over the past few years?, *Atmospheric Research*, *64*: 89‑98.

Gandolfi I., Bertolini V., Ambrosini R., Bestetti G. et Franzetti A. (2013). Unravelling the bacterial diversity in the atmosphere, *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*: 4727‑4736.

Garcia E., Hill T. C. J., Prenni A. J., DeMott P. J., Franc G. D. et Kreidenweis S. M. (2012). Biogenic ice nuclei in boundary layer air over two U.S. high plains agricultural regions, *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *117*: D018209.

Garnham C. P., Campbell R. L., Walker V. K. et Davies P. L. (2011). Novel dimeric β-helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites, *BMC Structural Biology*, *11*: 36.

Garvey D. M. (1975). Testing of cloud seeding materials at the cloud simulation and aerosol laboratory, 1971-1973, *Journal of Applied Meteorology*, *14*: 883‑890.

Gaxiola R., de Larrinoa I. F., Villalba J. M. et Serrano R. (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast, *The EMBO Journal*, *11*: 3157‑3164.

Ghan S. J., Guzman G. et Abdul-Razzak H. (1998). Competition between sea salt and sulfate particles as cloud condensation nuclei, *Journal of the Atmospheric Sciences*, *55*: 3340‑3347.

Di Giorgio C., Krempff A., Guiraud H., Binder P., Tiret C. et Dumenil G. (1996). Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles, *Atmospheric Environment*, *30*: 155-160.

Goldstein A. H. et Galbally I. E. (2007). Known and unexplored organic constituents in the Earth's atmosphere, *Environmental Science and Technology*, *41*: 1514‑1521.

Govindarajan A. G. et Lindow S. E. (1988a). Phospholipid requirement for expression of ice nuclei in *Pseudomonas syringae* and *in vitro*, *Journal of Biological Chemistry*, *263*: 9333‑9338.

Govindarajan A. G. et Lindow S. E. (1988b). Size of bacterial ice-nucleation sites measured *in situ* by radiation inactivation analysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*: 1334-1338.

Graber E. R. et Rudich Y. (2006). Atmospheric HULIS: How humic-like are they? A comprehensive and critical review, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *6*: 729-753.

Graedel T. E., Mandich M. L. et Weschler C. J. (1986). Kinetic model studies of atmospheric droplet chemistry: 2. Homogeneous transition metal chemistry in raindrops, *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *91*: 5205-5221.

Grammatika M. et Zimmerman W. B. (2001). Microhydrodynamics of flotation processes in the sea surface layer, *Dynamics of Atmospheres and Oceans*, *34*: 327-348.

Graumann P. et Marahiel M. A. (1996). Some like it cold: response of microorganisms to cold shock, *Archives of Microbiology*, *166*: 293-300.

Green R. L. et Warren G. J. (1985). Physical and functional repetition in a bacterial ice nucleation gene, *Nature*, *317*: 645-648.

Gutierrez C. (1995). Physiology of the osmotic stress response in microorganisms, *International journal of food microbiology*, *28*: 233.

Hagen D. E., Schmitt J., Trueblood M., Carstens J., White D. R. et Alofs D. J. (1989). Condensation coefficient measurement for water in the UMR cloud simulation chamber, *Journal of the Atmospheric Sciences*, *46*: 803-816.

Hallett J. et Mossop S. C. (1974). Production of secondary ice particles during the riming process, *Nature*, *249*: 26-28.

Hallquist M. et al. (2009). The formation, properties and impact of secondary organic aerosol: Current and emerging issues, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *9*: 5155-5236.

Hammer Ø., Harper D. A. et Ryan P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeontologia electronica*, *4*. Disponible à l'adresse : http://www.uv.es/pe/2001_1/past/past.pdf

Harrison A. P. et Morgan R. F. (1974). The effect of abrupt changes in sodium chloride concentration upon the viability of gram-negative bacteria at 2 and 40 °C, *Cryobiology*, *11*: 423-429.

Hartmann S., Augustin S., Clauss T., Wex H., Šantl-Temkiv T., Voigtländer J., Niedermeier D. et Stratmann F. (2013). Immersion freezing of ice nucleation active protein complexes, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *13*: 5751-5766.

Hartz K. E. H., Tischuk J. E., Chan M. N., Chan C. K., Donahue N. M. et Pandis S. N. (2006). Cloud condensation nuclei activation of limited solubility organic aerosol, *Atmospheric Environment*, *40*: 605-617.

Hazra A. (2013). Role of mineral dust, soot, and bacteria in cloud and precipitation formation processes over Indian subcontinent using an atmospheric general circulation model, *Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics*, *98*: 74-85.

Henne S., Brunner D., Folini D., Solberg S., Klausen J. et Buchmann B. (2010). Assessment of parameters describing representativeness of air quality *in-situ* measurement sites, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *10*: 3561‑3581.

Herlihy L. J., Galloway J. N. et Mills A. L. (1987). Bacterial utilization of formic and acetic acid in rainwater, *Atmospheric Environment*, *21*: 2397‑2402.

Herrmann H. (2003). Kinetics of aqueous phase reactions relevant for atmospheric chemistry, *Chemical Reviews*, *103*: 4691‑4716.

Herrmann H., Tilgner A., Barzaghi P., Majdik Z., Gligorovski S., Poulain L. et Monod A. (2005). Towards a more detailed description of tropospheric aqueous phase organic chemistry: CAPRAM 3.0, *Atmospheric Environment*, *39*: 4351‑4363.

Herrmann H., Hoffmann D., Schaefer T., Bräuer P. et Tilgner A. (2010). Tropospheric aqueous-phase free-radical chemistry: Radical sources, spectra, reaction kinetics and prediction tools, *ChemPhysChem*, *11*: 3796‑3822.

Hill K. A., Shepson P. B., Galbavy E. S., Anastasio C., Kourtev P. S., Konopka A. et Stirm B. H. (2007). Processing of atmospheric nitrogen by clouds above a forest environment, *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *112*: D11301.

Hirano S. S. et Upper 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*: 624‑653.

Hirano S. S., Baker L. S. et Upper C. D. (1985). Ice nucleation temperature of individual leaves in relation to population sizes of ice nucleation active bacteria and frost injury, *Plant Physiology*, *77*: 259‑265.

Hobbs P. V. (1969). Ice multiplication in clouds, *Journal of the Atmospheric Sciences*, *26*: 315‑318.

Hoffer A., Kiss G., Blazsó M. et Gelencsér A. (2004). Chemical characterization of humic-like substances (HULIS) formed from a lignin-type precursor in model cloud water, *Geophysical Research Letters*, *31*: L06115.

Hoose C., Kristjánsson J. E. et Burrows S. M. (2010). How important is biological ice nucleation in clouds on a global scale?, *Environmental Research Letters*, *5*: 024009.

Houdier S., Barret M., Dominé F., Charbouillot T., Deguillaume L. et Voisin D. (2011). Sensitive determination of glyoxal, methylglyoxal and hydroxyacetaldehyde in environmental water samples by using dansylacetamidooxyamine derivatization and liquid chromatography/fluorescence, *Analytica Chimica Acta*, *704*: 162‑173.

Huffman J. A., Treutlein B. et 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.

Huffman J. A. et al. (2013). High concentrations of biological aerosol particles and ice nuclei during and after rain, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *13*: 6151‑6164.

Hummel M., Hoose C., Möhler O., Oehm C., Steinke I. et Vogel H. (2013). The contribution of biological aerosols to atmospheric ice nucleation, *AIP Conference Proceedings*, *1527*: 899‑902.

Husárová S., Vaïtilingom M., Deguillaume L., Traikia M., Vinatier V., Sancelme M., Amato P., Matulová M. et Delort A.-M. (2011). Biotransformation of methanol and formaldehyde by bacteria isolated from clouds. Comparison with radical chemistry, *Atmospheric Environment*, *45*: 6093‑6102.

Iannone R., Chernoff D., Pringle A., Martin S. et Bertram A. (2011). The ice nucleation ability of one of the most abundant types of fungal spores found in the atmosphere, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *11*: 1191-1201.

Igawa M., Munger J. W. et 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.

Imshenetsky A., Lysenko S. et Kazakov G. (1978). Upper boundary of the biosphere, *Applied and Environmental Microbiology*, *35*: 1‑5.

IPCC (2013). *Working Group I contribution to the IPCC fifth assessment report climate change 2013: The physical science basis*.

Jacobs J. L. et Sundin G. W. (2001). Effect of solar UV-B radiation on a phyllosphere bacterial community, *Applied and Environmental Microbiology*, *67*: 5488‑5496.

Jacobs J. L., Carroll T. L. et Sundin G. W. (2005). The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria, *Microbial Ecology*, *49*: 104‑113.

Jayaweera K. et Flanagan P. (1982). Investigations on biogenic ice nuclei in the Arctic atmosphere, *Geophysical Research Letters*, *9*: 94-97.

Joly M., Deguillaume L., Vaïtilingom M., Long Y., Vinatier V., Matulová M., Chaumerliac N., Sancelme M. et Delort A.-M. (2013a). Cloud microorganisms and their potential implication in atmospheric chemistry, in *Clouds: Classification, Microbiology and Environmental Effects*, p. 1‑46, Nova Publisher, New York (U.S.A.).

Joly M., Attard E., Sancelme M., Deguillaume L., Guilbaud C., Morris C. E., Amato P. et Delort A.-M. (2013b). Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water, *Atmospheric Environment*, *70*: 392‑400.

Jones A. M. et Harrison R. M. (2004). The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations-a review, *Science of the Total Environment*, *326*: 151-180.

Joux F., Jeffrey W. H., Lebaron P. et Mitchell D. L. (1999). Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation, *Applied and Environmental Microbiology*, *65*: 3820‑3827.

Kanakidou M. et al. (2005). Organic aerosol and global climate modelling: a review, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *5*: 1053‑1123.

Kawahara H. (2002). The structures and functions of ice crystal-controlling proteins from bacteria, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *94*: 492‑496.

Kellogg C. A. et Griffin D. W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust, *Trends in Ecology & Evolution*, *21*: 638-644.

Kepner R. L. et Pratt J. R. (1994). Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present, *Microbiological Reviews*, *58*: 603‑615.

Kieft T. L. (1988). Ice nucleation activity in lichens, *Applied and Environmental Microbiology*, *54*: 1678 ‑1681.

Kirchman D., Sigda J., Kapuscinski R. et Mitchell R. (1982). Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria., *Applied and Environmental Microbiology*, *44*: 376‑382.

Knopf D., Alpert P., Wang B. et Aller J. (2010). Stimulation of ice nucleation by marine diatoms, *Nature Geoscience*, *4*: 88-90.

Ko G., First M. W. et Burge H. A. (2000). Influence of relative humidity on particle size and UV sensitivity of *Serratia marcescens* and *Mycobacterium bovis* BCG aerosols, *Tubercle and Lung Disease*, *80*: 217‑228.

Köhler H. (1936). The nucleus in and the growth of hygroscopic droplets, *Transactions of the Faraday Society*, *32*: 1152‑1161.

Kourtev P. S., Hill K. A., Shepson P. B. et Konopka A. (2011). Atmospheric cloud water contains a diverse bacterial community, *Atmospheric Environment*, *45*: 5399-5405.

Koutny M., Sancelme M., Dabin C., Pichon N., Delort A.-M. et Lemaire J. (2006). Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives, *Polymer Degradation and Stability*, *91*: 1495‑1503.

Kozloff L., Turner M. et Arellano F. (1991a). Formation of bacterial membrane ice-nucleating lipoglycoprotein complexes, *Journal of bacteriology*, *173*: 6528‑6536.

Kozloff L. M., Turner M. A., Arellano F. et Lute M. (1991b). Phosphatidylinositol, a phospholipid of ice-nucleating bacteria, *Journal of Bacteriology*, *173*: 2053‑2060.

Kruisz C., Berner A. et Brantner B. (1992). A cloud water sampler for high wind speeds, in *Proceedings of the EUROTRAC Symposium*, vol. 92, p. 523‑525.

Larkin M. J., Kulakov L. A. et Allen C. C. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus* - masters of catabolic versatility, *Current Opinion in Biotechnology*, *16*: 282‑290.

Laroche C. et Gervais P. (2003). Achievement of rapid osmotic dehydration at specific temperatures could maintain high *Saccharomyces cerevisiae* viability, *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*: 743‑747.

Lazrus A. L., Kok G. L., Gitlin S. N., Lind J. A. et McLaren S. E. (1985). Automated fluorimetric method for hydrogen peroxide in atmospheric precipitation, *Analytical Chemistry*, *57*: 917‑922.

Leck C. et Bigg E. K. (2005). Source and evolution of the marine aerosol—A new perspective, *Geophysical Research Letters*, *32*: L19803.

Lee B. U., Kim S. H. et Kim S. S. (2002). Hygroscopic growth of *E. coli* and *B. subtilis* bioaerosols, *Journal of Aerosol Science*, *33*: 1721-1723.

Leibo S. P. et Mazur P. (1971). The role of cooling rates in low-temperature preservation, *Cryobiology*, *8*: 447-452.

Leriche M., Voisin D., Chaumerliac N., Monod A. et Aumont B. (2000). A model for tropospheric multiphase chemistry: application to one cloudy event during the CIME experiment, *Atmospheric Environment*, *34*: 5015-5036.

Leriche M., Deguillaume L. et Chaumerliac N. (2003). Modeling study of strong acids formation and partitioning in a polluted cloud during wintertime, *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, *108*: 4433.

Leriche M., Curier R. L., Deguillaume L., Caro D., Sellegri K. et 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*: 281-297.

Li J. et Lee T.-C. (1998). Enhanced production of extracellular ice nucleators from *Erwinia herbicola*, *The Journal of General and Applied Microbiology*, *44*: 405-413.

Li Q., Sritharathikhun P. et Motomizu S. (2007). Development of novel reagent for Hantzsch reaction for the determination of formaldehyde by spectrophotometry and fluorometry, *Analytical Sciences*, *23*: 413-417.

Lighthart B. (1997). The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere, *FEMS Microbiology Ecology*, *23*: 263-274.

Lighthart B. (2000). Mini-review of the concentration variations found in the alfresco atmospheric bacterial populations, *Aerobiologia*, *16*: 7-16.

Lim H.-J., Carlton A. G. et Turpin B. J. (2005). Isoprene forms secondary organic aerosol through cloud processing: Model simulations, *Environmental Science and Technology*, *39*: 4441-4446.

Lin X., A. Reponen T., Willeke K., Grinshpun S. A., Foarde K. K. et Ensor D. S. (1999). Long-term sampling of airborne bacteria and fungi into a non-evaporating liquid, *Atmospheric Environment*, *33*: 4291-4298.

Lindemann J. et Upper C. (1985). Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants, *Applied and Environmental Microbiology*, *50*: 1229-1232.

Lindemann J., Constantinidou H. A., Barchet W. R. et Upper C. D. (1982). Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation-active bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, *44*: 1059-1063.

Lindow S., Arny D. et Upper C. (1978). Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature, *Applied and Environmental Microbiology*, *36*: 831-838.

Livingstone D. A. (1963). Chapter G. Chemical composition of rivers and lakes, in *Data of Geochemistry*, Michael Fleischer, Washington (U.S.A.).

Löflund M., Kasper-Giebl A., Schuster B., Giebl H., Hitzenberger R. et Puxbaum H. (2002). Formic, acetic, oxalic, malonic and succinic acid concentrations and their contribution to organic carbon in cloud water, *Atmospheric Environment*, *36*: 1553-1558.

Long Y., Charbouillot T., Brigante M., Mailhot G., Delort A.-M., Chaumerliac N. et Deguillaume L. (2013). Evaluation of modeled cloud chemistry mechanism against laboratory irradiation experiments: The H_xO_y/iron/carboxylic acid chemical system, *Atmospheric Environment*, *77*: 686-695.

Lushchak V. I. (2001). Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria, *Biochemistry (Moscow)*, *66*: 476-489.

Mader H. M., Pettitt M. E., Wadham J. L., Wolff E. W. et Parkes R. J. (2006). Subsurface ice as a microbial habitat, *Geology*, *34*: 169-172.

Madronich S. et Calvert J. G. (1990). Permutation reactions of organic peroxy radicals in the troposphere, *Journal of Geophysical Research*, *95*: 5697-5715.

Maki L. R. et Willoughby K. J. (1978). Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei, *Journal of Applied Meteorology*, *17*: 1049-1053.

Maki L. R., Galyan E. L., Chang-Chien M. M. et Caldwell D. R. (1974). Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*, *Applied and Environmental Microbiology*, *28*: 456-459.

Männistö M. K., Tiirola M. et Häggblom M. M. (2009). Effect of freeze-thaw cycles on bacterial communities of Arctic tundra soil, *Microbial Ecology*, *58*: 621-631.

Marechal P. A. et Gervais P. (1994). Yeast viability related to water potential variation: influence of the transient phase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, *42*: 617-622.

Marinoni A., Laj P., Sellegri K. et Mailhot G. (2004). Cloud chemistry at the Puy de Dôme: variability and relationships with environmental factors, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *4*: 715-728.

Marinoni A., Parazols M., Brigante M., Deguillaume L., Amato P., Delort A.-M., Laj P. et Mailhot G. (2011). Hydrogen peroxide in natural cloud water: Sources and photoreactivity, *Atmospheric Research*, *101*: 256-263.

Maron P.-A., Lejon D. P. H., Carvalho E., Bizet K., Lemanceau P., Ranjard L. et Mougel C. (2005). Assessing genetic structure and diversity of airborne bacterial communities by DNA fingerprinting and 16S rDNA clone library, *Atmospheric Environment*, *39*: 3687-3695.

Marthi B., Shaffer B. T., Lighthart B. et Ganio L. (1991). Resuscitation effects of catalase on airborne bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, *57*: 2775-2776.

Marx J. G., Carpenter S. D. et Deming J. W. (2009). Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions, *Canadian Journal of Microbiology*, *55*: 63-72.

Matthias-Maser S. et Jaenicke R. (1995). The size distribution of primary biological aerosol particles with radii > 0.2 µm in an urban/rural influenced region, *Atmospheric Research*, *39*: 279-286.

Mészáros E. (1988). Cloud condensation nuclei, in *Atmospheric Aerosols and Nucleation*, édité par P. E. Wagner et G. Vali, p. 549‑562, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Germany. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-50108-8_1127

Mikami K., Kanesaki Y., Suzuki I. et Murata N. (2002). The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Molecular Microbiology*, *46*: 905-915.

Mille Y., Beney L. et Gervais P. (2005). Compared tolerance to osmotic stress in various microorganisms: Towards a survival prediction test, *Biotechnology and Bioengineering*, *92*: 479-484.

Miteva V. I. et Brenchley J. E. (2005). Detection and isolation of ultrasmall microorganisms from a 120,000-year-old Greenland glacier ice core, *Applied and Environmental Microbiology*, *71*: 7806‑7818.

Miteva V. I., Sheridan P. P. et Brenchley J. E. (2004). Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core, *Applied and Environmental Microbiology*, *70*: 202-213.

Möhler O., DeMott P. J., Vali G. et 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. et Wagner R. (2008). Heterogeneous ice nucleation activity of bacteria: new laboratory experiments at simulated cloud conditions, *Biogeosciences*, *5*: 1425‑1435.

Monier J.-M. et Lindow S. E. (2003). Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*: 15977‑15982.

Monod A., Chebbi A., Durand-Jolibois R. et Carlier P. (2000). Oxidation of methanol by hydroxyl radicals in aqueous solution under simulated cloud droplet conditions, *Atmospheric Environment*, *34*: 5283‑5294.

Morbach S. et Krämer R. (2002). Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria, *ChemBioChem*, *3*: 384-397.

Morris C. E. et Kinkel L. L. (2002). Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields., in *Phyllosphere Microbiology*, p. 353‑375, S.E. Lindow, E.I. Hecht-Poinar, V. Elliot, Minneapolis (U.S.A).

Morris C. E., Georgakopoulos D. G. et Sands D. C. (2004). Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation, *Journal de Physique IV*, *121*: 87‑103.

Morris C. E., Sands D. C., Vinatzer B. A., Glaux C., Guilbaud C., Buffière A., Yan S., Dominguez H. et Thompson B. M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle, *The ISME Journal*, *2*: 321-334.

Morris C. E., Sands D. C., Bardin M., Jaenicke R., Vogel B., Leyronas C., Ariya P. A. et Psenner R. (2011). Microbiology and atmospheric processes: research challenges concerning the impact of airborne micro-organisms on the atmosphere and climate, *Biogeosciences*, *8*: 17-25.

Morris G. J., Coulson G. E. et Clarke K. J. (1988). Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: The effect of growth conditions, *Cryobiology*, *25*: 471‑482.

Munger J. W., Collett J., Daube B. C. et Hoffmann M. R. (1989). Carboxylic acids and carbonyl compounds in southern California clouds and fogs, *Tellus B*, *41B*: 230‑242.

Munger J. W., Jacob D. J., Daube B. C., Horowitz L. W., Keene W. C. et Heikes B. G. (1995). Formaldehyde, glyoxal, and methylglyoxal in air and cloudwater at a rural mountain site in central Virginia, *Journal of Geophysical Research*, *100*: 9325‑9333.

Murray B. J., O'Sullivan D., Atkinson J. D. et Webb M. E. (2012). Ice nucleation by particles immersed in supercooled cloud droplets, *Chemical Society Reviews*, *41*: 6519‑6554.

Muryoi N., Kawahara H. et Obata H. (2003). Properties of a novel extracellular cell-free ice nuclei from ice-nucleating *Pseudomonas antarctica* IN-74, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *67*: 1950‑1958.

Nemecek-Marshall M., LaDuca R. et Fall R. (1993). High-level expression of ice nuclei in a *Pseudomonas syringae* strain is induced by nutrient limitation and low temperature, *Journal of Bacteriology*, *175*: 4062‑4070.

Nocker A., Fernández P. S., Montijn R. et Schuren F. (2012). Effect of air drying on bacterial viability: A multiparameter viability assessment, *Journal of Microbiological Methods*, *90*: 86‑95.

Novakov T. et Corrigan C. E. (1996). Cloud condensation nucleus activity of the organic component of biomass smoke particles, *Geophysical Research Letters*, *23*: 2141-2144.

Obata H., Muryoi N., Kawahara H., Yamade K. et Nishikawa J. (1999). Identification of a novel ice-nucleating bacterium of Antarctic origin and its ice nucleation properties, *Cryobiology*, *38*: 131‑139.

Olszyna K. J., Meagher J. F. et Bailey E. M. (1988). Gas-phase, cloud and rain-water measurements of hydrogen peroxide at a high-elevation site, *Atmospheric Environment (1967)*, *22*: 1699‑1706.

Örmeci B. et Linden K. G. (2002). Comparison of UV and chlorine inactivation of particle and non-particle associated coliform, *Water Supply*, *2*: 403‑410.

Padan E., Bibi E., Ito M. et Krulwich T. A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1717*: 67‑88.

Panoff J.-M., Thammavongs B. et Guéguen M. (2000). Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CIP 101027T, *Cryobiology*, *40*: 264‑269.

Parazols M., Marinoni A., Amato P., Abida O., Laj P. et Mailhot G. (2006). Speciation and role of iron in cloud droplets at the puy de Dôme station, *Journal of atmospheric chemistry*, *54*: 267-281.

Park J. I., Grant C. M., Attfield P. V. et Dawes I. W. (1997). The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway, *Applied and Environmental Microbiology*, *63*: 3818‑3824.

Pasteur L. (1861). *Mémoire sur les corpuscles organisés qui existent dans l'atmosphère, examen de la doctrine des générations spontanées*, Mallet-Bachelier.

Peccia J., Werth H. M., Miller S. et Hernandez M. (2001). Effects of relative humidity on the ultraviolet induced inactivation of airborne bacteria, *Aerosol Science and Technology*, *35*: 728‑740.

Phadtare S., Alsina J. et Inouye M. (1999). Cold-shock response and cold-shock proteins, *Current Opinion in Microbiology*, *2*: 175‑180.

Phelps P., Giddings T. H., Prochoda M. et Fall R. (1986). Release of cell-free ice nuclei by *Erwinia herbicola*, *Journal of Bacteriology*, *167*: 496‑502.

Phillips V. T. J., Andronache C., Christner B., Morris C. E., Sands D. C., Bansemer A., Lauer A., McNaughton C. et Seman C. (2009). Potential impacts from biological aerosols on ensembles of continental clouds simulated numerically, *Biogeosciences*, *6*: 987-1014.

Polymenakou P. N. (2012). Atmosphere: A source of pathogenic or beneficial microbes?, *Atmosphere*, *3*: 87-102.

Ponder M. A., Thomashow M. F. et Tiedje J. M. (2008). Metabolic activity of Siberian permafrost isolates, Psychrobacter arcticus and Exiguobacterium sibiricum, at low water activities, *Extremophiles*, *12*: 481‑490.

Pratt K. A., DeMott P. J., French J. R., Wang Z., Westphal D. L., Heymsfield A. J., Twohy C. H., Prenni A. J. et Prather K. A. (2009). *In situ* detection of biological particles in cloud ice-crystals, *Nature Geoscience*, *2*: 398-401.

Price P. B. (2000). A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*: 1247‑1251.

Prospero J. M., Blades E., Mathison G. et Naidu R. (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust, *Aerobiologia*, *21*: 1‑19.

Pruppacher H. et Jaenicke R. (1995). The processing of water vapor and aerosols by atmospheric clouds, a global estimate, *Atmospheric Research*, *38*: 283-295.

Pruppacher H. R. et Klett J. D. (2010). *Microphysics of clouds and precipitation*, Atmospheric and Oceanographic Sciences Library, Springer Netherlands, New York (U.S.A).

Pummer B. G., Bauer H., Bernardi J., Bleicher S. et Grothe H. (2012). Suspendable macromolecules are responsible for ice nucleation activity of birch and conifer pollen, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *12*: 2541‑2550.

Radke L. F. et Hobbs P. V. (1969). Measurement of cloud condensation nuclei, light scattering coefficient, sodium-containing particles, and Aitken nuclei in the Olympic Mountains of Washington, *Journal of the Atmospheric Sciences*, *26*: 281‑288.

Raes F., Dingenen R. V., Vignati E., Wilson J., Putaud J. P., Seinfeld J. H. et Adams P. (2000). Formation and cycling of aerosols in the global troposphere, *Atmospheric Environment*, *34*: 4215‑4240.

Ramos J. L., Gallegos M.-T., Marqués S., Ramos-González M.-I., Espinosa-Urgel M. et Segura A. (2001). Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors, *Current Opinion in Microbiology*, *4*: 166‑171.

Reasoner D. et Geldreich E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Applied and Environmental Microbiology*, *49*: 1-7.

Renoux A. et Boulaud D. (1998). *Les aérosols: physique et métrologie*, Lavoisier Technique & Documentation.

Rothschild L. J. et Mancinelli R. L. (2001). Life in extreme environments, *Nature*, *409*: 1092-1101.

Sands D., Langhans V., Scharen A. et de Smet G. (1982). The association between bacteria and rain and possible resultant meteorological implications, *Quarterly Journal of the Hungarian Meteorological Service*, *86*: 148-152.

Šantl-Temkiv T., Gosewinkel-Karlson U., Finster K. et Munk Hansen B. (2009). The diversity and proportion of ice nucleation active bacteria in rain and their ability to produce extracellular ice nucleation active particles, p. 1460-1466, Smolik, J., and O'Dowd, C., Prague (République Tchèque).

Šantl-Temkiv T., Finster K., Hansen B. M., Nielsen N. W. et Karlson U. G. (2012). The microbial diversity of a storm cloud as assessed by hailstones, *FEMS Microbiology Ecology*, *81*: 684-695.

Šantl-Temkiv T., Finster K., Dittmar T., Hansen B. M., Thyrhaug R., Nielsen N. W. et Karlson U. G. (2013). Hailstones: A window into the microbial and chemical inventory of a storm cloud, *PLoS ONE*, *8*: e53550.

Sattler B., Puxbaum H. et Psenner R. (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets, *Geophysical Research Letters*, *28*: 239-242.

Sauer F., Schuster G., Schäfer C. et Moortgat G. K. (1996). Determination of H_2O_2 and organic peroxides in cloud and rain water on the Kleiner Feldberg during FELDEX, *Geophysical Research Letters*, *23*: 2605‑2608.

Saxena P. et Hildemann L. M. (1996). Water-soluble organics in atmospheric particles: A critical review of the literature and application of thermodynamics to identify candidate compounds, *Journal of Atmospheric Chemistry*, *24*: 57‑109.

Schleper C., Puehler G., Holz I., Gambacorta A., Janekovic D., Santarius U., Klenk H. P. et Zillig W. (1995). *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0, *Journal of Bacteriology*, *177*: 7050‑7059.

Schwartz S. E. (1986). Mass-transport considerations pertinent to aqueous phase reactions of gases in liquid-water clouds, *Chemistry of Multiphase Atmospheric System*, *G6*: 415‑471.

Sedlak D. L. et Hoigné J. (1993). The role of copper and oxalate in the redox cycling of iron in atmospheric waters, *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, *27*: 2173‑2185.

Sesartic A., Lohmann U. et Storelvmo T. (2012). Bacteria in the ECHAM5-HAM global climate model, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *12*: 8645‑8661.

Shaffer B. T. et Lighthart B. (1997). Survey of culturable airborne bacteria at four diverse locations in Oregon: urban, rural, forest, and coastal, *Microbial Ecology*, *34*: 167-177.

Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N. et Höfer M. (1999). Oxidative stress in microorganisms, *Folia Microbiologica*, *44*: 587-624.

Smith D. J., Timonen H. J., Jaffe D. A., Griffin D. W., Birmele M. N., Perry K. D., Ward P. D. et Roberts M. S. (2013). Intercontinental dispersal of bacteria and archaea by transpacific winds, *Applied and Environmental Microbiology*, *79*: 1134‑1139.

Snider J. R., Layton R. G., Caple, G. et Chapman G. (1985). Bacteria as condensation nuclei, *Journal de recherches atmosphériques*, *19*: 139‑145.

Solecka J., Zajko J., Postek M. et Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes, *Central European Journal of Biology*, *7*: 373-390.

Sommer B., Marino A., Solarte Y., Salas M. L., Dierolf C., Valiente C., Mora D., Rechsteiner R., Setter P. et Wirojanagud W. (1997). SODIS- an emerging water treatment process, *Journal of Water - Aqua*, *46*: 127-137.

Stahl W. et Sies H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1740*: 101‑107.

Stead D. et Park S. F. (2000). Roles of Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze-thaw stress, *Applied and Environmental Microbiology*, *66*: 3110 ‑3112.

Stephanie et Waturangi D. E. (2011). Distribution of Ice Nucleation-Active (INA) bacteria from rain-water and air, *HAYATI Journal of Biosciences*, *18*: 108‑112.

Storz G., Tartaglia L. A., Farr S. B. et Ames B. N. (1990). Bacterial defenses against oxidative stress, *Trends in Genetics*, *6*: 363‑368.

Stratmann F., Kiselev A., Wurzler S., Wendisch M., Heintzenberg J., Charlson R. J., Diehl K., Wex H. et Schmidt S. (2004). Laboratory studies and numerical simulations of cloud droplet formation under realistic supersaturation conditions, *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology*, *21*: 876‑887.

Stres B., Philippot L., Faganeli J. et Tiedje J. M. (2010). Frequent freeze-thaw cycles yield diminished yet resistant and responsive microbial communities in two temperate soils: a laboratory experiment, *FEMS Microbiology Ecology*, *74*: 323-335.

Sun J. et Ariya P. A. (2006). Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review, *Atmospheric Environment*, *40*: 795‑820.

Suzuki I., Kanesaki Y., Mikami K., Kanehisa M. et Murata N. (2001). Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*, *Molecular Microbiology*, *40*: 235-244.

Szyrmer W. et Zawadzki I. (1997). Biogenic and anthropogenic sources of ice-forming nuclei: A review, *Bulletin of the American Meteorological Society*, *78*: 209‑228.

Tanghe A., Van Dijck P. et Thevelein J. M. (2003). Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance, and biotechnological applications, *Advances in Applied Microbiology*, *53*: 129-176.

Tanghe A., Van Dijck P. et Thevelein J. M. (2006). Why do microorganisms have aquaporins?, *Trends in Microbiology*, *14*: 78-85.

Tilgner A. et Herrmann H. (2010). Radical-driven carbonyl-to-acid conversion and acid degradation in tropospheric aqueous systems studied by CAPRAM, *Atmospheric Environment*, *44*: 5415-5422.

Tong Y. et Lighthart B. (1997a). Solar radiation has a lethal effect on natural populations of culturable outdoor atmospheric bacteria, *Atmospheric Environment*, *31*: 897-900.

Tong Y. et Lighthart B. (1997b). Solar radiation is shown to select for pigmented bacteria in the ambient outdoor atmosphere, *Photochemistry and Photobiology*, *65*: 103-106.

Tong Y. et Lighthart B. (1998). Effect of simulated solar radiation on mixed outdoor atmospheric bacterial populations, *FEMS Microbiology Ecology*, *26*: 311-316.

Tong Y. et Lighthart B. (2000). The annual bacterial particle concentration and size distribution in the ambient atmosphere in a rural area of the Willamette Valley, Oregon, *Aerosol Science and Technology*, *32*: 393-403.

Turner M., Arellano F. et Kozloff L. (1991). Components of ice nucleation structures of bacteria, *Journal of bacteriology*, *173*: 6515-6527.

Turner M. A., Arellano F. et Kozloff L. M. (1990). Three separate classes of bacterial ice nucleation structures, *Journal of Bacteriology*, *172*: 2521-2526.

Twomey S. (1971). Composition of cloud nuclei, *Journal of Atmospheric Sciences*, *28*: 377-381.

Twomey S. (1977a). *Atmospheric aerosols*, Developments in Atmospheric Science 7, Elsevier Scientific Publishing Co., New York (U.S.A).

Twomey S. (1977b). The influence of pollution on the shortwave albedo of clouds, *Journal of the Atmospheric Sciences*, *34*: 1149-1152.

Twomey S. A., Piepgrass M. et Wolfe T. L. (1984). An assessment of the impact of pollution on global cloud albedo, *Tellus B*, *36B*: 356-366.

Vaïtilingom M. (2011). Rôle des microorganismes des nuages dans la chimie atmosphérique. Comparaison avec la chimie radicalaire, Blaise Pascal, Clermont-Ferrand (France). Disponible à l'adresse : http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00783928

Vaïtilingom M., Amato P., Sancelme M., Laj P., Leriche M. et Delort A.-M. (2010). Contribution of microbial activity to carbon chemistry in clouds, *Applied and Environmental Microbiology*, *76*: 23-29.

Vaïtilingom M., Charbouillot T., Deguillaume L., Maisonobe R., Parazols M., Amato P., Sancelme M. et Delort A.-M. (2011). Atmospheric chemistry of carboxylic acids: microbial implication *versus* photochemistry, *Atmospheric Chemistry and Physics*, *11*: 8721-8733.

Vaïtilingom M., Attard E., Gaiani N., Sancelme M., Deguillaume L., Flossmann A. I., Amato P. et Delort A.-M. (2012). Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France), *Atmospheric Environment*, *56*: 88‑100.

Vaïtilingom M., Deguillaume L., Vinatier V., Sancelme M., Amato P., Chaumerliac N. et Delort A.-M. (2013). Potential impact of microbial activity on the oxidant capacity and organic carbon budget in clouds, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*: 559‑564.

Valduga G., Bertoloni G., Reddi E. et Jori G. (1993). Effect of extracellularly generated singlet oxygen on Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *21*: 81‑86.

Vali G. (1971). Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids, *Journal of the Atmospheric Sciences*, *28*: 402-409.

Vali G., Christensen M., Fresh R., Galyan E., Maki L. et Schnell R. (1976). Biogenic ice nuclei. Part II: Bacterial sources, *Journal of Atmospheric Sciences*, *33*: 1565-1570.

Vander Heyden Y., Nguyen Minh Nguyet A., Detaevernier M. R., Massart D. L. et Plaizier-Vercammen J. (2002). Simultaneous determination of ketoconazole and formaldehyde in a shampoo: liquid chromatography method development and validation, *Journal of Chromatography A*, *958*: 191‑201.

Vorob'eva L. I. (2004). Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: A review, *Applied Biochemistry and Microbiology*, *40*: 217‑224.

Wainwright M., Wickramasinghe N., Narlikar J. et Rajaratnam P. (2003). Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km, *FEMS Microbiology Letters*, *218*: 161-165.

Ward P. J. et DeMott P. J. (1989). Preliminary experimental evaluation of Snomax™ snow inducer, *Pseudomonas syringae*, as an artificial ice nucleus for weather modification, *J. Weather Modification*, *21*: 9-13.

Warneck P. (2003). In-cloud chemistry opens pathway to the formation of oxalic acid in the marine atmosphere, *Atmospheric Environment*, *37*: 2423‑2427.

Warren G. et Wolber P. (1991). Molecular aspects of microbial ice nucleation, *Molecular Microbiology*, *5*: 239-243.

Watanabe K., Ishizaka Y. et Takenaka C. (2001). Chemical characteristics of cloud water over the Japan Sea and the Northwestern Pacific Ocean near the central part of Japan: airborne measurements, *Atmospheric Environment*, *35*: 645‑655.

Whitman W. B., Coleman D. C. et Wiebe W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*: 6578‑6583.

Wilson S. L., Frazer C., Cumming B. F., Nuin P. A. et Walker V. K. (2012). Cross-tolerance between osmotic and freeze-thaw stress in microbial assemblages from temperate lakes, *FEMS Microbiology Ecology*, *82*: 405-415.

Witkin E. M. (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*, *Bacteriological Reviews*, *40*: 869‑907.

Wolber P. K. (1993). Bacterial ice nucleation, *Advances in Microbial Physiology*, *34*: 203-237.

Womack A. M., Bohannan B. J. M. et Green J. L. (2010). Biodiversity and biogeography of the atmosphere, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*: 3645‑3653.

Xia Y., Conen F. et Alewell C. (2013). Total bacterial number concentration in free tropospheric air above the Alps, *Aerobiologia*, *29*: 153‑159.

Yamanaka K., Fang L. et Inouye M. (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation, *Molecular Microbiology*, *27*: 247-255.

Young I. S. et McEneny J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis, *Biochemical Society Transactions*, *29*: 358‑362.

Zachariassen K. E. et Kristiansen E. (2000). Ice nucleation and antinucleation in nature, *Cryobiology*, *41*: 257‑279.

Zepp R. G., Faust B. C. et Hoigne J. (1992). Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron(II) with hydrogen peroxide: the photo-Fenton reaction, *Environmental Science and Technology*, *26*: 313‑319.

Zhang H., McFarquhar G. M., Cotton W. R. et Deng Y. (2009). Direct and indirect impacts of Saharan dust acting as cloud condensation nuclei on tropical cyclone eyewall development, *Geophysical Research Letters*, *36*: L06802.

Zhang X. J., Yao T. D., Ma X. J. et Wang N. L. (2002). Microorganisms in a high altitude glacier ice in Tibet, *Folia Microbiologica*, *47*: 241‑245.

Zweifel U. L., Hagström Å., Holmfeldt K., Thyrhaug R., Geels C., Frohn L. M., Skjøth C. A. et Karlson U. G. (2012). High bacterial 16S rRNA gene diversity above the atmospheric boundary layer, *Aerobiologia*, *28*: 481‑498.

Annexes

Liste des annexes

Annexe 1 : Suivi chimique et biologique des prélèvements d'eau nuageuse i

1. Dosage de l'ATP et de l'ADP i
2. Quantification des cellules par microscopie iii
3. Culture sur milieu R2A iii
4. Chromatographie ionique iv
5. Dosage du formaldéhyde v
6. Dosage du peroxyde d'hydrogène vi

Annexe 2 : Identification des souches isolées vii

1. Extraction d'ADN vii
2. Amplification de l'ADN par PCR vii
3. Vérification de l'amplification sur gel d'électrophorèse viii
4. Purification des produits PCR et dosage de l'ADN viii
5. Séquençage viii
6. Identification ix

Annexe 3 : Souches bactériennes glaçogènes isolées d'eau de nuages x

Annexe 4 : "Cloud Microorganisms and their Potential Implication in Atmospheric Chemistry", chapitre tire du livre *Clouds: Classification, Microbiology and Environmental Effects. Edition : NOVA Publisher, New York (U.S.A.)* xi

Annexe 1 : Suivi chimique et biologique des prélèvements d'eau nuageuse

L'ensemble des analyses est réalisée à partir d'un seul échantillon de nuage afin de pouvoir étudier les corrélations entre les différents paramètres mesurés. Par conséquent, le volume minimal nécessaire est d' environ 45 mL. En règle générale, le volume présent dans le collecteur des impacteurs à gouttelettes est récolté toutes les 2 heures lors de nuages chauds (prélèvements liquides) ou toutes les 45 minutes à 1 heure pour les nuages froids (prélèvements gelés).

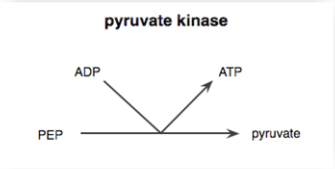
L'échantillon est réparti dans l'ordre comme présenté dans le tableau suivant :

Analyse	Volume nécessaire
Dosage de l'ATP et de l'ADP	3 x 0,2 mL
Quantification des cellules totales par microscopie	10 mL
Quantification des cellules totales par cytométrie en flux	3 x 0,45 mL
Culture sur milieu R2A	6 x 0,1 mL
Mesure pH, conductivité et potentiel rédox	10 mL
Chromatographie ionique	10 mL
Dosage du fer	5 mL
Dosage du carbone organique total	5 mL
Dosage du formaldéhyde	0,6 mL
Dosage du peroxyde d'hydrogène	3 x 0,01 mL et 3 x 0,05 mL

Les protocoles détaillés des analyses présentées dans cette thèse jugés nécessaires (italiques) sont décrits ci-après.

1. Dosage de l'ATP et de l'ADP

Ce dosage a été adapté du protocole du kit commercial Biothema© (ATP Biomass Kit HS) par Marek Koutny (post-doctorant à l'ICCF) (*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 et, en parallèle, on dose l'ATP total produit par la transformation de l'ADP en ATP par une phosphoenol pyruvate kinase en présence de son substrat (phosphoenol pyruvate). La différence entre les deux mesures indique la concentration en ADP dans l'échantillon.



Avant l'échantillonnage, la solution d'extractant du kit est répartie en aliquots de 200 µL dans des microtubes de 1,5 mL stériles en portant des gants pour éviter toute contamination par l'expérimentateur. Ces tubes sont conservés à 4°C pendant plusieurs mois.

Le jour de l'échantillonnage, un volume de 200 µL d'eau nuageuse est ajouté stérilement aux 200 µL d'extractant. Cette opération est effectuée en 3 réplicats. Les tubes sont ensuite vortexés et congelés à 25°C jusqu'à l'analyse.

Le jour de l'analyse, plusieurs solutions sont à préparer. Toutes doivent être manipulées avec précaution en respectant des règles de stérilité.

- Solution de DiluentB : 10 mL diluent du kit de dosage + 200 µL de KCl à 1 M filtré sur 0,22 µm + 10 µL de $MgSO_4$ à 1 M filtré sur 0,22 µm ;
- Phosphoenolpyruvate (PEP) : 120 mg de PEP + 5 mL de TRIS-HCl à 0,05 M pH 7,2 filtré sur 0,22 µm ; ajuster le pH à 7 avec du KOH concentré ;
- PEP + Phosphoenolpyruvate kinase (PK) : 5 mg PK sont dissous dans 1 mL de solution de PEP. Des aliquots de 200 µL sont préparés et conservés à -40°C. Une fois décongelés, le reste de solution non utilisé est jeté ;
- Solution ATP reagent HS du kit : elle doit être reconstituée avec 2,5 mL d'eau ultrapure stérile à la place du diluentB comme indiqué dans la notice du kit.

<u>Procédure :</u>

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 :

$$[ATP] = 2 \times \frac{I_{éch}}{(I_{éch+std} - I_{éch}) \times V_{mix}}$$

où $I_{éch}$ et $I_{smp+std}$ sont les mesures d'intensité lumineuse exprimées en RLU et V_{mix} (mL) le volume utilisé de mélange extractant/échantillon.

Un dosage de l'eau ultrapure utilisée est toujours effectué et cette valeur est soustraite aux mesures d'ATP ou d'ADP des échantillons.

2. Quantification des cellules par microscopie

Avant le prélèvement d'eau de nuage, la solution de fixation est préparée. Il s'agit d'une solution de formaldéhyde à 4 % préparée par dilution d'une solution commerciale à 37 % (Sigma Aldrich, stabilisé par 10 à 15 % de méthanol) dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,0. L'ensemble est filtré sur 0,22 µm. et des aliquots de 10 mL sont répartis dans des tubes de 50 mL de type Falcon®. Cette solution est conservée à 4°C pendant 4 à 6 mois.

Le jour du prélèvement, 10 mL d'eau nuageuse sont ajoutés à cette solution. Le mélange est agité délicatement à la main et est ensuite conservé pendant un maximum de 3 semaines à 4°C.

Le marquage est réalisé par une solution 250 µg mL^{-1} de 4'-6-diamino-2-phénylindole (DAPI), un intercalant de l'ADN. Les cellules sont mises en présence de 2,5 µg mL^{-1} de DAPI puis elles sont agitées délicatement à la main et incubées pendant 20 min à l'obscurité. Pendant ce temps, la colonne de filtration en verre est stérilisée en la recouvrant d'alcool à 96° et en la flambant. Elle est ensuite montée sur un filtre GTPB noir de 0,22 µm. En parallèle, environ 100 mL d'eau déionisée sont filtrés avec des filtres seringues de porosité 0,22 µm en prévision du lavage du filtre. Après la fin de l'incubation, l'échantillon est filtré sur la rampe avec une pression maximale de -50 kPa et autant que possible dans l'obscurité. Le contenant de l'échantillon est rincé avec de l'eau déionisée stérilisée par filtration et la solution de rinçage est versée à la suite de l'échantillon. L'excès de DAPI est éliminé en filtrant environ 80 mL d'eau déionisée stérile.

Les filtres sont ensuite montés entre lame et lamelle en présence d'une goutte d'huile de montage et sont maintenus à l'obscurité jusqu'à l'observation au microscope à épifuorescence (Leica DM-IRB ; excitation : 365 nm et émission : 420 nm) dans les heures qui suivent. Le comptage s'effectue sur une grille, au grossissement x150 pour les champignons et x960 pour les bactéries. Les cellules d'environ 30 à 50 champs d'observations sont ainsi dénombrées.

La concentration dans l'échantillon initial est alors déterminée par la formule suivante :

$$[cellules] = \frac{S_f}{S_g} \times \frac{N_{cell}}{N_{champs} \times F_d \times V}$$

où [cellules] est la concentration en cellules (bactéries ou champignons) en mL^{-1}, S_f est la surface de filtration en mm² (176,71 mm² pour un diamètre de filtration de 7,5 mm), S_g est la surface de la grille en mm² (0,42 mm² pour les champignons et 0,0105 mm² pour les bactéries), N_{cell} est le nombre de cellules comptées, N_{champs} est le nombre de champs observés, F_d est le facteur de dilution (0,5) et V est le volume d'échantillon en mL (10 mL).

3. Culture sur milieu R2A

Après l'échantillonnage, 100 µL d'eau nuageuse sont étalées à l'aide d'un râteau sur le milieu gélosé R2A (*Reasoner et Geldreich*, 1985) dont la composition est détaillée ci-après :

- Proteose peptone : 0,5 g L^{-1}

- Casamino acids : 0,5 g L^{-1}
- Extrait de levure : 0,5 g L^{-1}
- Glucose : 0,5 g L^{-1}
- Amidon soluble : 0,5 g L^{-1}
- Phosphate de dipotassium : 0,3 g L^{-1}
- Sulfate de magnésium $7H_2O$: 0,5 g L^{-1}
- Pyruvate de sodium : 0,3 g L^{-1}
- Agar : 15 g L^{-1}
- pH 7,2 ± 0,2

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 5°C (moyenne annuelle de la température de prélèvement des nuages du puy de Dôme) et 17°C (température maximale de prélèvement des nuages au puy de Dôme).

4. Chromatographie ionique

L'eau des nuages récoltée est analysée par chromatographie ionique afin de déterminer les ions majoritairement présents. Les caractéristiques de l'appareil et de l'analyse sont présentées dans le tableau ci-après :

	Anions	**Cations**
Système utilisé	Dionex DX320	Dionex ICS1500
Type de colonne	IonPac AS11 <10 Å ; 13 µm ; 4x250 mm	IonPac CS16 5 µm ; 3x250 mm
Temps d'analyse total	30 min	30 min
Débit	1 mL min^{-1}	1 mL min^{-1}
Solvant d'élution	KOH	Hydroxy-méthane-sulfonate
Mode de travail	Gradient d'élution	Isocratique
Gradient	0 min : 0,2 mM 4,5 min : 0,43 mM 10 min : 5 mM 13 min : 33,5 mM 14 min : 33,5 mM 14,1 min : 0,2 mM	30 mM
Mode de détection	Conductivité	Conductivité

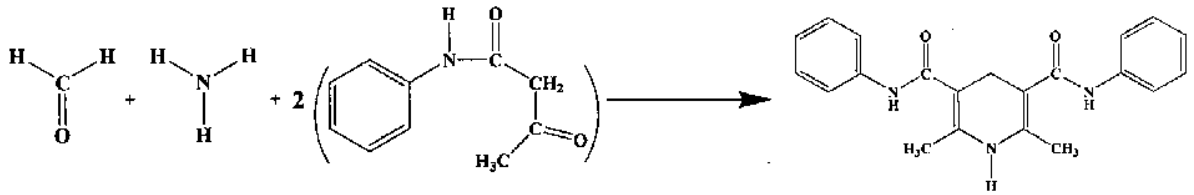
Dans ces conditions, les temps de rétentions des différents composés d'intérêt sont les suivants :

- Anions :
  - Acétate : 7,0 min
  - Formiate : 7,5 min
  - Cl^- : 9,3 min
  - NO_3^- : 12,0 min
  - SO_4^{2-} : 17,3 min
  - Oxalate : 18,3 min
- Cations :
  - Na^+ : 7,7 min
  - NH_4^+ : 9,5 min
  - K^+ : 14,0 min
  - Mg^{2+} : 19,2 min
  - Ca2+ : 26,8 min

Des courbes étalons sont effectuées régulièrement à partir de standards commerciaux (Solution Multi-Element CaPurAn, CPAChem).

5. Dosage du formaldéhyde

La détermination de la concentration en formaldéhyde est réalisée par un dosage fluorométrique basé sur la réaction de Hantzsch. Lors de cette réaction, le formaldéhyde est cyclisé avec l'acétoacétanilide (AAA) en présence d'ammoniaque et produit un complexe fluorescent stable (*Li et al.*, 2007).



Ce protocole a été miniaturisé et adapté dans le but de mesurer la concentration en formaldéhyde dans des échantillons d'eau nuageuse de faible volume.

Lors de l'échantillonnage, 580 µL d'eau nuageuse sont placés dans un microtube de 650 µL de contenance puis sont congelés à -25°C en l'attente de l'analyse. Le faible volume mort dans le microtube limite les échanges de formaldéhyde entre l'eau prélevée et l'air.

Toutes les solutions pour le dosage doivent être préparées extemporanément. Il s'agit de :

- Solution d'acétoacétanilide (AAA) de concentration 0,2 M : la poudre commerciale (Aldrich, 99,5 %) est reprise dans un volume d'éthanol à 96° puis elle est diluée dans un volume d'eau ultrapure ;
- Solution d'acétate d'ammonium (AA, Sigma, 98 %) de concentration 4 M préparée dans de l'eau ultrapure.

Ces solutions peuvent être conservées pendant environ 12h à température ambiante.

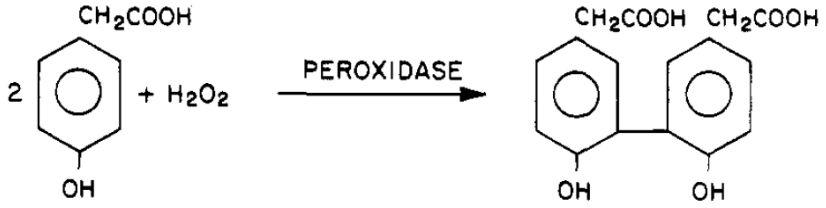
La réaction de Hantzsch est effectuée en microplaque opaques noires, en mélangeant dans l'ordre 60 µL d'acétate d'ammonium, 60 µL d'acétoacétanilide et 60 µL d'éthanol à 96° auxquels sont

rajoutés après agitation 120 µL d'échantillon (ou de standard pour la réalisation de courbes étalons). Après agitation, le mélange est incubé au noir durant 25 minutes à température ambiante. Pour chaque dosage, une gamme étalon est préparée.

La lecture s'effectue dans un lecteur de microplaque à fluorescence (SafireII, TECAN®) sous excitation à 375 nm et l'émission est mesurée à 490 nm.

6. Dosage du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est dosé grâce à sa réaction avec une peroxydase de raifort (Horse Radish Peroxidase ou HRP) en présence d' acide 4-hydroxy-phenylacétique (HPAA) selon la réaction décrite par *Lazrus et al.* (1985) :



Quand il est excité à une longueur d'onde de 320 nm, le dimère formé-émet une lumière à 400 nm. Le dosage a été miniaturisé par Virginie Vinatier à l'ICCF.

Les réactifs sont préparés au préalable. La solution de HRP est obtenue par dissolution d'une poudre commerciale (Sigma) dans de l'eau ultrapure pour une concentration finale de 400 unités par mL. Cette solution est répartie en aliquots de 10 µL dans des microtubes de 2 mL de contenance et est congelée à -25°C jusqu'au jour de prélèvement. D'autre part, l'acide 4-hydroxy-phenylacétique (Alfa Aesen, 99%) est dissous dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 pour obtenir une solution de concentration finale 1,5 mM. Cette solution est répartie en aliquots de 1,7 mL et est congelée à -25°C jusqu'au jour du prélèvement.

Le jour du prélèvement, 1,5 mL de tampon HPAA sont ajoutés au 10 µL de HRP. Ce mélange doit être conservé à 5°C et doit être éliminé après quelques heures. La réaction enzymatique est effectuée en additionnant 200 µL du mélange HRP/HPAA à 10 ou 50 µL d'eau nuageuse. Ce mélange est ensuite vortexé et mis à incuber à température ambiante au noir pendant 10 min. Après ce temps, l'échantillon est conservé à -25°C jusqu'à lecture par fluorescence.

La lecture s'effectue sur un volume de 200 µL avec un lecteur de plaque (Safire$_{II}$ TECAN©, λ_{ex} = 320 nm, $\lambda_{ém}$ = 390 nm).

Annexe 2 : Identification des souches isolées

Parmi les microorganismes cultivables, seules certaines bactéries ont été isolées puis conservées dans la souchothèque. L'identification des espèces s'est déroulée selon le protocole suivant :

7. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée sur un volume de 100 µL d'eau ultra-pure stérilisée par autoclavage puis filtrée sur 0,22 µm et traitée aux ultraviolets (λ=254 nm) pendant 15 min. L'équivalent d'une colonie bactérienne est mis en suspension dans ce volume puis la suspension est chauffée pendant 3 min dans un bain-marie à 95°C afin de casser les membranes cellulaires et libérer l'ADN.

8. Amplification de l'ADN par PCR

L'identification des bactéries est effectuée à partir du gène codant pour l'ARNr 16S avec le kit BioTaq DNA polymerase BIO 21040. Les amorces employées sont les amorces universelles 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3').

Avant la préparation du mélange réactionnel, l'ensemble du matériel (tubes, gants et produits hormis les amorces, les dNTPs et la Taq polymérase) est placé sous rayons UV (λ=254 nm) pendant 15 minutes.

La composition du mélange réactionnel est la suivante :

Produit	Volume (µL)
H_2O	34.2
Tampon (10X)	5
$MgCl_2$ (50mM)	2.5
dNTPs (10mM)	1
Primer1: 27f (10pmol/µL)	2
Primer2: 1492r (10pmol/µL)	2
DMSO (100%)	1
Taq	0.3

48µL du mix réactionnel sont distribués dans des microtubes PCR auxquels sont rajoutés ensuite 2 µL de l'ADN extrait au préalable ou 2 µL d'eau ultra-pure stérile (témoin négatif).

L'amplification par PCR est réalisée dans un thermocycleur TECHNE TC-5000 selon les étapes suivantes :

- 3 min à 95°C
- 30 cycles de :
  - 45 sec à 95°C
  - 45 sec à 53°C
  - 45 sec à 72°C
- 7 min à 72°C (élongation finale)

Les produits d'amplification sont ensuite conservés à 4°C.

9. Vérification de l'amplification sur gel d'électrophorèse

La taille des amplicons de PCR est vérifiée par migration électrophorétique sur gel d'agarose (0,8% dans tampon TAE 0,5X) en présence de SybrSafe. L'électrophorèse s'effectue dans une cuve EmbiTec RunOne™. La migration est réalisée à 100V pendant 20 à 25 minutes.

La taille et le nombre de fragments amplifiés sont ensuite révélés sur une table UV Uvitec (λ=312 nm). Un seul fragment d'ADN est attendu d'une taille approximative de 1450 pb.

10.Purification des produits PCR et dosage de l'ADN

La purification des produits de PCR est réalisée avec le kit Illustra™ ExoProStar One-step qui utilise une exonucléase I afin de dégrader les fragments d'ADN simple brin. Les produits de PCR sont purifiés selon les consignes du fabricant : 2 µL de la solution d'exonucléase I sont ajoutés à 5 µL de produits de PCR. Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur en suivant un programme de 15 min à 37°C (dégradation de l'ADN simple brin) puis 15 min à 80°C (inactivation de l'enzyme).

Après cette étape, l'ADN est dosé avec un spectrophotomètre microvolume (BioSpecNano®, Shimadzu) et les rapports d'absorbance 260nm/280nm (rapport indicateur de la présence de contaminants de type protéique ou phénol) et 260nm/230nm (rapport indicateur de la présence de contaminants tels que l'EDTA, le phénol ou certains sucres) sont mesurés afin de déterminer la pureté des produits purifiés. Lorsque ces rapports sont respectivement supérieurs à 1,8 et 2, les ADN sont conservés à -40°C en attente du séquençage.

11.Séquençage

Les fragments d'ADN sont séquencés par l'entreprise Eurofins MWG Operon (Allemagne). Pour cela, les produits de PCR purifiés sont dilués pour obtenir une concentration finale de 10 ng d'ADN μL^{-1} en plaque 96 puits (volume final de 15 µL). Pour chacune des souches, l'ADN est séquencé deux fois : la première, à partir de l'amorce 27f et la seconde, à partir de l'amorce 1492r.

12.Identification

Une fois que le séquençage effectué, l'identification est réalisée à partir du site BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Les séquences obtenues sont ensuite enregistrées sur la base de données du NCBI (GenBank).

Annexe 3 : Souches bactériennes glaçogènes isolées d'eau de nuages

N° de la souche	Espèce
13b-2	*Pseudomonas syringae*
32b-33	*Pseudoxanthomonas campestris*
32b-52	*Xanthomonas campestris*
32b-74	*Pseudomonas syringae*
36b-1	*Pseudomonas syringae*
38b-10	*Pseudomonas syringae*
47b-7	*Pseudomonas reactans*
48b-5	*Pseudomonas syringae*
50b-5	Non identifiée
50b-7	Non identifiée
50b-9	Non identifiée
51b-1	Non identifiée
51b-5	Non identifiée
51b-6	Non identifiée
51b-7	Non identifiée
51b-10	Non identifiée
57b-1	Non identifiée
58b-2	Non identifiée
58b-28	*Pseudomonas syringae*
59b-1	*Pseudomonas* sp.
59b-3	*Pseudomonas syringae*
59b-5	*Pseudomonas syringae*
59b-7	*Pseudomonas* sp.
59b-12	*Pseudomonas* sp.
59b-14	*Pseudomonas syringae*
60b-10	*Xanthomonas* sp.

Annexe 4 : "Cloud Microorganisms and their Potential Implication in Atmospheric Chemistry", chapitre du livre *Clouds: Classification, Microbiology and Environmental Effects. Edition : NOVA Publisher*, New York (U.S.A.)

Chapter

CLOUD MICROORGANISMS AND THEIR POTENTIAL IMPLICATION IN ATMOSPHERIC CHEMISTRY

M. Joly[1,2,3,4], L. Deguillaume[3,4], M. Vaïtilingom[1,2,3,4], Y. Long[3,4], V. Vinatier[1,2], M. Matulová[5], N. Chaumerliac[3,4], M. Sancelme[1,2] and A. M. Delort[*1,2]

[1]Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF),BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France
[2]CNRS, UMR 6296, ICCF, BP 80026, F-63171 Aubière, France
[3]Clermont Université, Université Blaise Pascal, Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand (OPGC), Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP), BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France
[4]CNRS, UMR 6016, LaMP/OPGC, BP 80026, F-63171 Aubière, France
[5]Institute of Chemistry, Centre for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

ABSTRACT

Clouds can be considered as very complex reactors where multiphase chemistry takes place. Understanding these processes is crucial since they impact cloud formation and precipitation and thus the climate.

Up to very recently only abiotic processes leading to the transformation of organic matter in clouds were studied by atmospheric scientists, they involved radical chemistry and particularly photochemistry. New actors have been now highlighted with the discovery of metabolically active microorganisms in cloud water. A new scientific question has been raised: are microorganisms able to biotransform organic compounds thanks to their metabolism? Are these biological processes competitive compared to abiotic processes? The aim of this chapter is to give updated information related to this emerging topic.

The first part of this chapter introduces the cloud system, where a complex multiphase chemistry takes place leading to the transformation of chemical species in the

[*] E-mail address: a-marie.delort@univ-bpclermont.fr, Tel: 00 33 473 40 77 14 ; Fax: 00 33 473 40 77 17

gas, solid and aqueous phases. In this frame, during the cloud lifetime, cloud chemistry can lead to the formation of new low volatile compounds that will modify the physical and chemical properties of aerosols after cloud evaporation and can also contribute to the formation of secondary aerosols.

The second part describes the cloud microbial population. About 10^5 bacteria and 10^3 fungi are present per mL of cloud water. The biodiversity is dominated by *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Dioszegia*, *Udeniomyces* and *Cryptococcus* genera and shows similarities with the one found in dry atmosphere and precipitation. As a large fraction of the microbial cells is metabolically active, microorganisms could transform chemical species in atmospheric waters.

The last part of this chapter focuses on the implication of microbial activity in cloud chemistry. Most of the studies concern the biodegradation pathways of mono- and dicarboxylic acids, methanol and formaldehyde. The quantitative comparison of microbial activity vs radical chemistry suggests that microorganisms could be active both during the day and during the night to biodegrade organic compounds in cloud water, while their activity will be only dominant at night in the case of methanol and formaldehyde. Moreover, very recent investigations are related to the biosynthesis of various compounds such as biosurfactants, and exopolymeric substances (EPSs) that could modify the physico-chemical properties of aerosols.

Although the results reported in the literature up to now are consistent with a potential contribution of microorganisms to atmospheric chemistry, some more work is needed to fully demonstrate and accurately quantify this contribution; new routes could be explored (macromolecules synthesis, oxidative stress metabolism).

INTRODUCTION

Clouds are a very special medium of the atmosphere since they present substantial amounts of condensed-phase water (liquid or solid) that can dissolve gases, and permit reactions to occur that would not occur in the gas phase or would be much slower. In this frame, clouds can be considered to serve as "catalysts" of atmospheric reactions. Understanding these processes is of interest as they impact cloud formation and precipitation and thereby the climate.

Up to very recently, only abiotic processes leading to the transformation of organic matter in clouds were studied by atmospheric scientists. These processes involve radical chemistry leading to oxidation processes.

New actors have been now highlighted with the discovery of metabolically active microorganisms in cloud waters. A new scientific question has arisen: are microorganisms able to biotransform organic compounds thanks to their metabolism? Are these biological processes competitive with abiotic processes?

The aim of this chapter is to give updated information related to this emerging topic. The first part of this chapter will introduce the cloud system, including its composition and its reactivity. The second part will detail quantitatively and qualitatively the cloud microbial population.

The last part of this chapter will focus on the implication of microbial activity in cloud chemistry. More precisely the metabolic pathways and the comparison of microbial activity *vs* radical chemistry will be described.

THE CLOUD SYSTEM: CHEMICAL COMPOSITION AND REACTIVITY

1. Tropospheric Aerosol Processing

The troposphere is a complex multiphase and multi-component environment that consists of gases and dispersed solid and aqueous particles including hydrometeors such as fog drops, cloud droplets and ice crystals. The gaseous molecules and the dispersed inside particles refers to the term of "tropospheric aerosol" [1]. Primary aerosol particles are emitted to the troposphere by anthropogenic activities (as for example fuel combustion) and natural processes (such as dust, sea spray and biogenic activity). A considerable amount of aerosol particles results from anthropogenic activities and significantly contributes to air pollution especially in urban areas. Secondary particles are also formed by gas-to-particle conversion (see Raes *et al.* [2] and Hallquist *et al.* [3] for an overview). The physical and chemical properties of the aerosol particles strongly depend on both their origin and the transformations they undergo throughout their atmospheric transport.

During their residence time in the atmosphere, they are modified in size and composition through for example the condensation of less volatile gaseous compounds or by coagulation with other particles, by evaporation and by chemical reactions inside and at the surface of the particles.

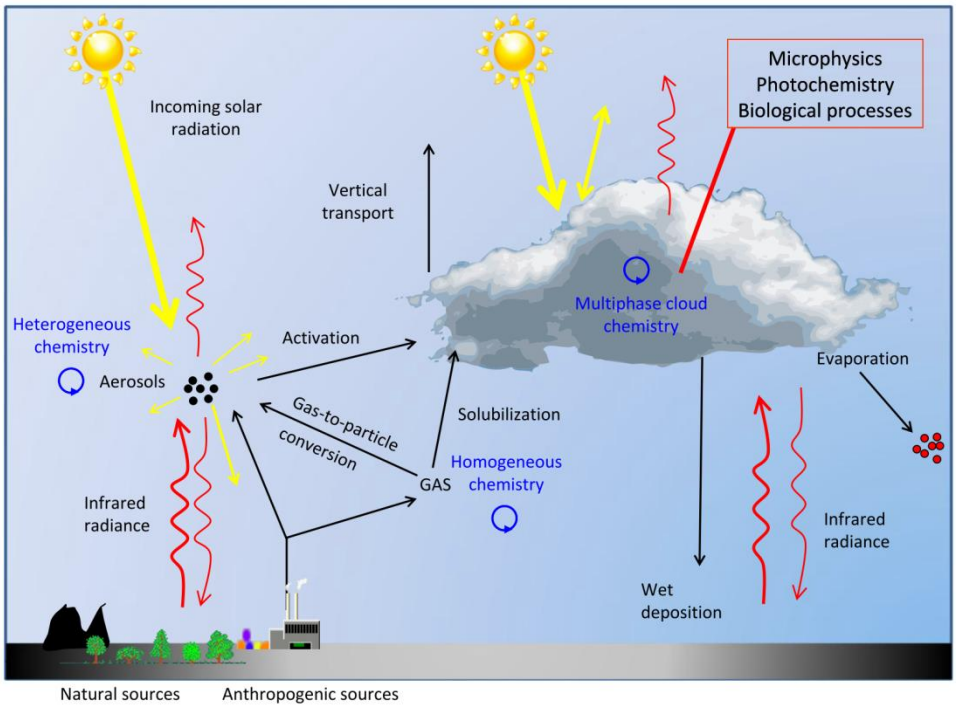


Figure 1. Cloud/aerosol/chemistry interactions. Red arrows correspond to infrared radiation emitted by the ground and yellow arrows represent the solar radiation.

These aerosol particles directly interact with incoming solar radiation by scattering and light absorption but they also have an indirect effect on the earth's radiative budget [4] (Figure 1). This effect is linked to the ability of aerosol particles to act as cloud condensation nuclei (CCN) when they are activated into cloud droplets.

The physico-chemical properties of the CCN will control the properties of the formed clouds such as their reflectivity (optical properties) [5] and their lifetime (precipitation capability) [6]. Consequently, aerosol particles and clouds play a crucial role in the troposphere due to their influence on the earth radiative budget but this negative climate forcing is still subject to strong uncertainties [7] (Figure 1).

When aerosol particles are activated and form cloud droplets, their physico-chemical properties are strongly modified [8]. Chemical aqueous phase interactions contribute to the aerosol cycling as well as the microphysical processes that are able to modify the size distribution and the chemical composition of aerosol particles. Particles that have been processed in clouds generally contain a larger soluble fraction after evaporation and they consequently become activated into cloud droplets at lower supersaturation. This leads to the formation of clouds that are optically brighter and that are composed by smaller droplets increasing the cloud/particle lifetime and reducing their precipitation potential. This effect has been highlighted through the formation of atmospheric sulfate by in-cloud chemistry [9].

While many works have been carried on the in-cloud chemistry of inorganic species such as sulfur [10], the aqueous phase chemistry of organic aqueous phase compounds and their effects have been studied to a much smaller extent. The troposphere contains numerous VOCs from secondary formation and many of them are water soluble, *i.e.* associated with high Henry's law constants [11–13]. Additionally, organic compounds represent a significant mass fraction of the tropospheric aerosol particles and can undergo aqueous phase oxidation reactions. Thus, the dissolved organic matter is directly or indirectly linked to the aqueous chemistry of radicals, radical anions, non-radical oxidants and transitional metal ions (TMIs). Organic oxidation inside clouds can also be a potential source of SOAs (Secondary Organic Aerosols) in the atmosphere after the evaporation of cloud droplets [14–17].

2. Aqueous Particle and Cloud Processing

a. Sources of Chemical Compounds

Chemical compounds are found in deliquescent particles and cloud droplets and they originate from various sources: from the soluble fraction of the aerosol particles which can also act as cloud condensation nuclei (CCN), from the dissolution of soluble trace gases as well as from scavenging processes. Cloud reactivity will also lead to the formation of new chemical compounds (Figure 2).

The partitioning of chemical compounds between the gas and the aqueous atmospheric phases is usually described on the basis of Henry's law [18–23] which expresses the relationship between the solubility of a gas in a liquid and its partial pressure above the liquid:

$$S = H \times P$$

where S is the solubility (M), P is the partial pressure (atm) and H is the Henry's law constant (M atm^{-1}) at a given temperature.

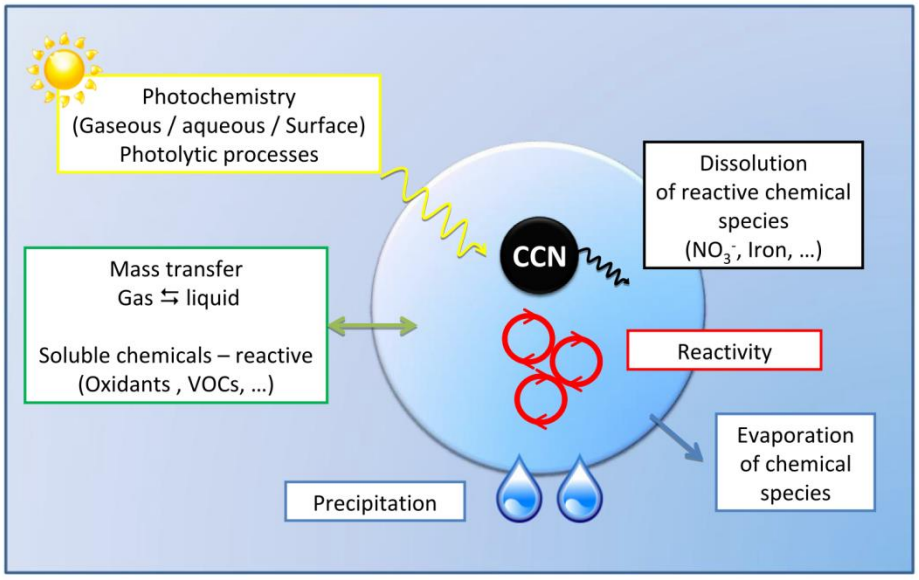


Figure 2. Multiphase cloud processes. Black and green boxes correspond to the sources of chemical compounds in droplets. Red and yellow boxes represent the homogeneous chemical pathways. Blue boxes correspond to the microphysical processes that redistribute chemical compounds among the different phases.

However, Henry's law provides a limiting rate that strictly applies to ideally dilute solutions [24]. The mass transfer between gas and liquid phases should be dynamically described and strongly depends on the drop surface and its properties linked to the size of hydrometeors [25-27].

b. Chemical Composition of Clouds

The aqueous phase of clouds is a very complex mixture of inorganic and organic chemical compounds. The major inorganic ions commonly found in cloud water are the sulfate (SO_4^{2-}), chloride (Cl^-) and nitrate (NO_3^-) anions and the alkali and alkaline earth metals cations (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}), in addition to ammonium (NH_4^+). These chemical compounds result from various sources. For example, the major fraction of the potassium, magnesium and calcium ions comes from the mineral part of aerosol particles originating from soil; nitrate and ammonium can enter into cloud water as constituents of condensation nuclei as well as by gas-to-liquid scavenging of gaseous HNO_3 and NH_3; sulfate arises from the oxidation of gaseous precursors that are dissolved into cloud droplets such as SO_2. In polluted region, the oxidation of SO_2 and NO_2 is a major source of strong acids H_2SO_4 and HNO_3 that control cloud water acidity *i.e.* the pH. In coastal regions and over the ocean, sodium chloride (NaCl) constitutes the largest part of all ions. To illustrate this, Table 1 presents the average concentrations of main inorganic compounds present in cloud waters collected at the puy de Dôme summit (France) [28]. The top of the mountain is often cloudy and it offers the possibility to sample air masses from various origins. Clouds are classified as a function of their origins and present significant differences in their chemical composition.

Table 1. Chemical composition of clouds sampled at the puy de Dôme station (France). Clouds are classified as a function of their origin in 4 categories: Polluted, continental, marine and highly marine. Average concentrations are in µeq.L^{-1}. Data are available on the website http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data.php

Location	puy de Dôme, France			
Date	2001-2011			
Number of samples	13	28	81	22
Categories	Polluted	Continental	Marine	Highly marine
Cl^-	69.41	34.95	25.28	238.20
NO_3^-	416.65	110.88	24.84	59.30
SO_4^{2-}	119.77	97.93	28.27	79.30
Na^+	44.38	34.43	25.75	286.31
NH_4^+	233.06	145.07	43.23	88.45
K^+	18.25	5.02	2.96	19.89
Mg^{2+}	7.62	13.18	7.82	46.92
Ca^{2+}	105.11	29.03	17.17	59.40

Table 2. Major carboxylic acid concentrations measured in cloud samples

Chemical compounds	Concentrations (µM)
Acetic acid $CH_3CO(OH)$	4.0 - 37.8 [29] 28.3 - 79.0 [30] 30.0 - 84.0 [31] 3.0 - 173.0 [32] 0.6 - 48.7 [28]
Formic acid CHO(OH)	1.3 - 34.3 [29] 36.0 - 51.2 [30] 43.0 - 167.0 [31] 12.0 - 103.0 [32] 0.8 - 71.4 [28]
Succinic acid $CO(OH)CH_2CH_2CO(OH)$	0.85 - 2.55 [29] 0.1 - 4.1 [28]
Malonic acid $CO(OH)CH_2CO(OH)$	0.70 - 2.85 [29]
Oxalic acid CO(OH)CO(OH)	0.65 - 12.65 [29] 0.05 - 15.20 [30] 0.1 - 17.4 [28]

We present here 4 distinct categories (polluted, continental, marine and highly marine). The pH is lower for higher NO_3^-, NH_4^+, and SO_4^{2-} concentrations in polluted air masses; highly marine air masses are characterized by high Na^+ and Cl^- concentrations due to their abundance in sea salt.

The organic matter also represents a significant fraction of the soluble matter in cloud droplets [33,34]. Carboxylic acids represent around 10% of the dissolved organic carbon in the cloud droplets (see Table 2 for "typical" concentrations of carboxylic acids).

Table 3. Major aldehyde concentrations measured in cloud samples

Chemical compounds	Concentrations (μM)
Formaldehyde CH_2O	8.0 – 14.0 [35] < 0.1 – 33.0 [36] 3.0 – 38.0 [32] 13.6 – 61.5 [37] 3.3 – 7.0 [38]
Acetaldehyde CH_3CHO	1.2 – 5.1 [37] 0.7 – 2.3 [38]
Glyoxal CHOCHO	< 0.15 – 27.0 [36] 1.2 – 55.0 [37] 0.4 – 2.3 [38]
Methylglyoxal CH_3COCHO	< 0.3 – 7.0 [36] 3.7 – 26.9 [37] 0.02 – 1.1 [38]

Carboxylic acids can be produced in the gaseous phase and dissolved in the aqueous phase (main source of acetic and formic acid); they can also result from the dissolution of soluble particles (main source of oxalic, succinic, malonic, and maleic acids, ...); or produced *via* the aqueous phase reactions [39–41]. Due to the presence of free radicals, the oxidation of organic matter leads to the formation carboxylic acids; they also represent one of their main sinks [42–44]. Carbonyl compounds are also present in cloud water and they essentially result from their dissolution from the gas phase into the aqueous phase. In the aqueous phase, the oxidation of aldehydes can produce carboxylic acids but also lead potentially to the formation of oligomers [17,45]. Concentration levels of carbonyl compounds such as formaldehyde, acetaldehyde, glyoxal and methylglyoxal have been reported in cloud water (see Table 3 for "typical concentrations"). Formaldehyde in the gas phase is produced by biomass burning and fossil fuel combustion, and also by photochemical oxidation of methane and non-methane hydrocarbons. This compound is efficiently transferred into the aqueous phase due to its efficient Henry's law constant, explaining its higher concentration in cloud water.

However, the proportion of undetermined organic matter in cloud water is still high and represents more than 90% of the total dissolved organic matter. Among this complex organic matter in cloud water, HUmic LIke Substances (HULIS) have been identified and correspond to large multifunctional compounds such as proteins, cellulose, dicarboxylic acids, polyols, amino acids, fatty acids, sugars, polysaccharides or aliphatic and aromatic hydrocarbons etc. [33,46–48]. These molecules are emitted from both primary and secondary sources in the atmosphere and are surface active and water soluble. Hence, it is expected that they could affect activation of organic aerosols into cloud droplets [49].

Many *in situ* measurements also underscore significant concentrations of transition metals such as iron (Fe), manganese (Mn) or copper (Cu) in cloud water [50]. The only source of these metals is the dissolution of the soluble fraction of aerosols in the aqueous phase. Their reactivity, dependent on many factors such as pH, their oxidation state, and their concentration, is still prone to large uncertainties. In cloud water, transition metal ions (TMI) are supposed to drive the oxidative capacity of cloud water by producing the $^{\bullet}OH$ radicals.

Hydrogen peroxide participates also to the production of radicals in cloud water and is found in significant concentration in cloud water [51]. This strong oxidant originates from its gas-to-liquid partitioning and from its aqueous-phase photo-production.

c. Aqueous Phase Chemistry

In the atmosphere, deliquescent particles and hydrometeors provide a medium and surfaces for homogeneous aqueous phase and also for heterogeneous chemical reactions [52]. Deliquescent particles and cloud droplets represent sinks for reactive species such as free radicals but also an oxidizing medium in the troposphere. These chemical interactions with the particle/cloud phase can significantly differ from gas phase processes. They can lead to other products and can initiate new pathways for atmospheric chemical reactions. More specifically, cloud droplets are an ideal reaction medium since: (1) photochemical processes inside droplets are enhanced; (2) some homogeneous chemical reactions within clouds are usually faster than the equivalent reactions in the gas phase, and reactions such as those involving ionic species, may be of importance; (3) finally, interactions between the aqueous phase and the solid phase such as the dissolution of soluble particulate species can additionally contribute to chemical processes in clouds (for example dissolution of soluble particulate species) (Figure 2).

The oxidative capacity of cloud water is linked to H_xO_y radicals ($^{\bullet}OH$ and $HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$ radicals and H_2O_2) budget that results from both various chemical interactions (photolysis processes and chemical reactions) and from the phase transfer exchange between the gas and aqueous phase. H_xO_y chemistry directly interacts with TMI chemistry through atmospheric chemical redox processes. $^{\bullet}OH$ radicals, which represent the most important tropospheric oxidant, can be either taken up from the gas phase or *in situ* produced in the aqueous phase. One of the most relevant *in situ* sources of $^{\bullet}OH$ in the aqueous phase is the so-called "Fenton" reaction that was first revealed by Zepp *et al.* [53] for iron(II). The $^{\bullet}OH$ radicals are formed by the reaction of iron(II)/copper(I) and H_2O_2. The photolysis of H_2O_2, NO_3^- and iron(III)-hydroxy complexes [54,55] are also effective sources of $^{\bullet}OH$ in the aqueous phase together with the phase transfer from the gas phase [20,56]. Additionally, the reactions of oxidized TMIs with H_2O_2 and the photolysis of metal-organic acid complexes such as iron(III)-oxalate complexes can act as source for $HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$ in the aqueous phase [57]. TMIs such as iron(II)/iron(III), manganese(II)/manganese(III) and particularly copper(I)/copper(II) are also known to react effectively with HO_2/O_2^- radicals by both oxidizing and reducing the interacting transition metal.

NO_x (= NO + NO_2) and NO_y (NO_x + HONO + HNO_3 + HNO_4 + N_2O_5 + $NO_3^{\bullet}$ + N-organics) chemistry plays a key role for tropospheric oxidations and also for acidity formation. $NO_3^{\bullet}$ radical chemistry is predominant during the night because during the day it is rapidly destroyed by photolysis. $NO_3^{\bullet}$ radical plays the role of the nighttime counterpart of the daytime $^{\bullet}OH$ radical. The main pathway for its formation in the atmosphere is the reaction of NO_2 with O_3. Under high NO_x concentrations (*i.e.* polluted area), $NO_3^{\bullet}$ could even become the main oxidant in the aqueous phase [20]. According to model simulations, the phase transfer represents the major source for the $NO_3^{\bullet}$ radical in the aqueous phase. *In situ* aqueous phase sources of the $NO_3^{\bullet}$ radical such as the electron transfer reaction of NO_3^- with other aqueous radicals is not significant. Nitric acid (HNO_3) is efficiently transferred into the aqueous phase and participates to the acidity of cloud water.

In the gas phase, sulfur compounds such as H_2S, DMS and SO_2 can be oxidized into sulfuric acid (H_2SO_4) and contribute thus to the secondary inorganic aerosol mass and acidity production. About 80 % of the total sulfur oxidation occurs in the atmospheric aqueous phase due to the higher efficiency of the aqueous phase reactions [10,58]. S(IV) can be oxidized into S(VI) by various reaction pathways such as the reactions with hydroperoxides (hydrogen peroxide H_2O_2, methyl hydroperoxide CH_3OOH, peroxyacetic acid CH_3COOOH) that stronglydepend on the pH. S(IV) is also oxidized by ozone as shown by Penkett *et al.* [59].

Compared to the hydroperoxide reaction, the total reaction rate of the ozone with S(IV) is increasing with higher pH values. The oxidation by ozone becomes consequently more important for less acidic conditions and dominates under alkaline solutions. The reaction of sulfite (SO_3^{2-}) with ozone is faster than the reaction of hydrogen sulfite (HSO_3^-). Amels *et al.* [60] and Dentener *et al.* [61] have shown that peroxynitric acid (HNO_4) plays also a role as an oxidant for S(IV) under low H_2O_2 conditions. Laboratory studies of Amels *et al.* [60] indicated that reaction rate constants of HNO_4 are comparable with the H_2O_2 rate constants and that the stability of HNO_4 increases with decreasing temperatures. Therefore, significant contributions of HNO_4 to the S(IV) oxidation can be expected under anthropogenic polluted winter conditions [62]. Multi-step S (IV) oxidation chains also exist and lead to the conversion of S(IV) to S(VI) [63] and these oxidation sequences can be catalyzed by transition metal ions [50]. However, the efficiency of this indirect production of S(VI) is less efficient than the direct oxidation by O_3 and H_2O_2 for example.

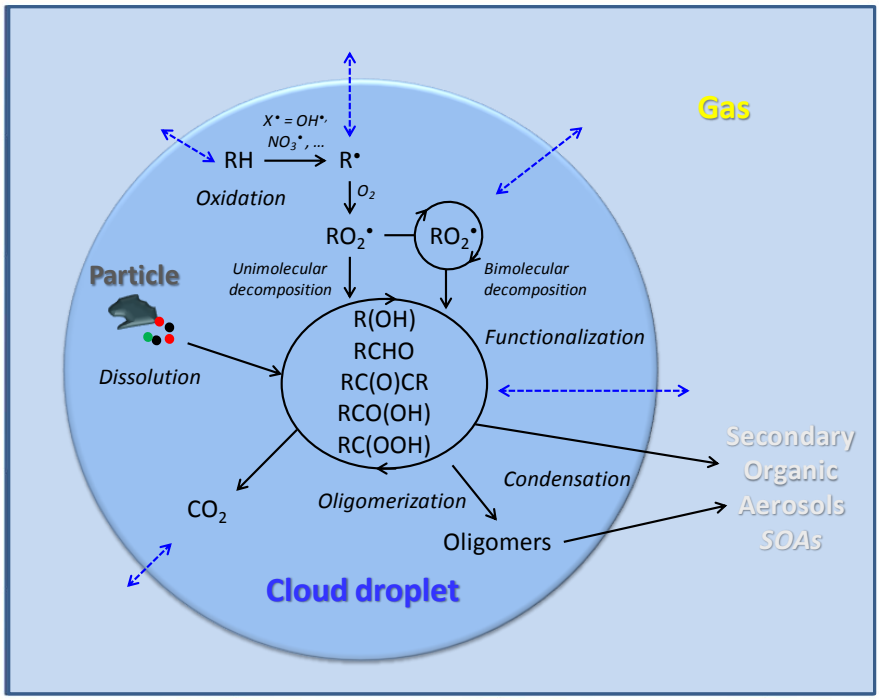


Figure 3. Processing of the organic matter in cloud. Dashed blue arrows represent the mass transfer.

Organic compounds are oxidized by $^{\bullet}OH$, $HO_2^{\bullet}$, $NO_3^{\bullet}$, $SO_4^{\bullet-}$, $Cl_2^{\bullet-}$, $Br_2^{\bullet-}$ and $CO_3^{\bullet-}$ radicals in the atmospheric aqueous phase [42,64]. Most of the above-mentioned organics are oxidized by an H-abstraction, a subsequent peroxyl radical formation ($RO_2^{\bullet}$), followed by uni-molecular or bimolecular composition, as indicated in Figure 3.

Atmospheric aqueous phase mechanisms have been developed in the past to simulate organic chemistry under cloud conditions (such as the CAPRAM mechanism, see for more details: *http://projects.tropos.de/capram/*) but there are still uncertainties on the kinetics and mechanisms due to the huge number of chemical compounds and chemical pathways [65].

Model studies [15,20] have shown the importance of the in-cloud oxidation pathway of glyoxal for the formation of oxalic acid, the most abundant and an ubiquitous organic compound in tropospheric aerosol particles [66–68]. The aqueous phase photooxidation of organic species systematically leads to low volatile compounds (such as dicarboxylic, hydroxy-dicarboxylic and long chain carboxylic acids, α-dicarbonyls, esters, aromatic alcohols…) [69]. These reactions are very fast [70,71]; the $^{\bullet}OH$ oxidation of dihydroxy-aromatic acids can lead to the formation of HULIS [47,72].

These chemical compounds are not volatile and are present in cloud water [73,74] and aerosols [48]. Very recently, some laboratory studies have shown that oligomers are also produced in the liquid phase after aqueous phase hydration and/or photooxidation of organic compounds, *i.e.* glyoxal [75,76], methylglyoxal [77], pyruvic acid [16,78], methacrolein [79,80], and glycolaldehyde [81]. Some authors proposed molecular addition mechanisms [77,82]. Alternatively, radical processes may also contribute to the formation of oligomers in the aqueous phase that can participate together with other low volatile organic compounds to the formation of SOAs (Figure 3) [17]. It is also well known that mono-carboxylic and particularly di-carboxylic acids are effective ligands for transition metal ions such as iron(III) forming metal-organic acid complexes [50]. These complexes are quite photochemical reactive and modify the oxidative budget of the cloud medium.

d. Impact of Microphysical Processes on Cloud Chemistry

Cloud lifetime is controlled by the dynamics of the atmosphere at the synoptic scale and, in close interaction, by microphysical processes (*i.e.* nucleation of cloud droplets, condensation and evaporation, collision/coalescence processes, sedimentation of hydrometeor, etc.) at small scale. Chemical species that are dissolved into cloud droplets will be redistributed by these processes.

For instance, chemical compounds attached to cloud droplets will be transfered into raindrops by collision/coalescence processes. The change in cloud droplets size through microphysical processes will also alter the partitioning of chemical compounds between the gas phase and the aqueous phases (Figure 4). For mixed-phase clouds (*i.e.* composed by liquid droplets and ice crystals), microphysical processes will also modify cloud chemistry. There are various iced hydrometeors (pristine, snow, graupel...) with a large range of size and with various complex shapes. Ice-chemistry interactions include gas-ice transfer, partitioning during freezing and riming of liquid hydrometeors, during vapor deposition on ice crystals, surface and bulk reactions in/on iced hydrometeors (Figure 4). Experimental studies have shown that the amount of gases taken up by iced hydrometeors is dependent on the type of gas, the temperature, the crystalline structure of the ice and on whether the uptake takes place on a growing or non-growing ice surface [83]. Modeling studies have found that they may significantly impact chemical distributions and deposition [84–87].

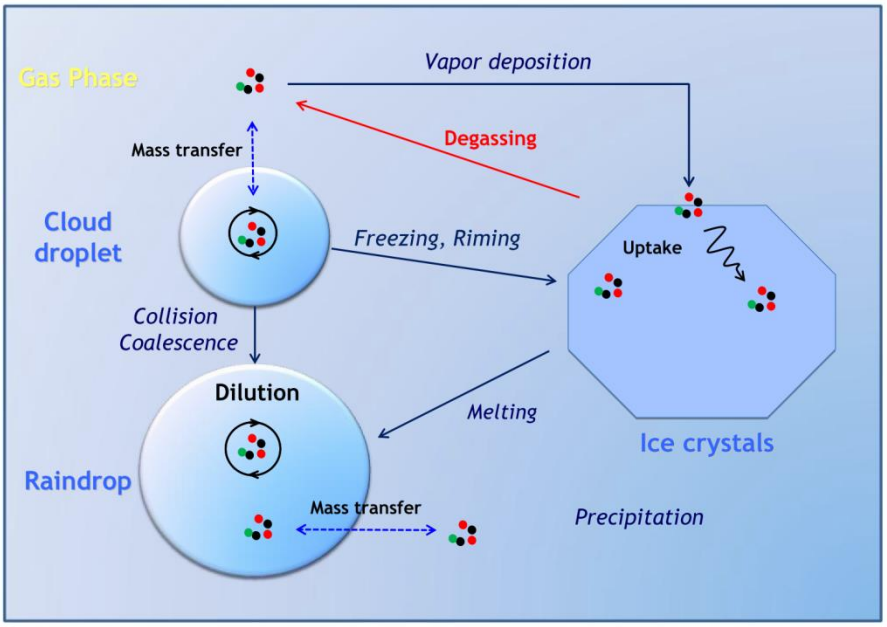


Figure 4. Interactions of microphysical processes and cloud chemistry. Colored balls represent chemical compounds.

MICROBIAL POPULATION IN CLOUDS

The presence of microorganisms in the atmosphere was supposed for centuries. Antonie van Leeuwenhoek first suggested their existence in 1641 hypothesizing that some organisms may live in the air but were too small for human sights.

Decades later, the evidence of microbial cells was demonstrated by Pasteur who observed viable bacteria and molds in the air of Paris streets and, at a lower concentration, in the air in the high mountains [88]. Progressively, the presence of microorganisms in the atmosphere interested the scientific community notably for its relevance in health questions and pathogen transmission and more recently in ecology, climatology and atmospheric processes [89,90]. Nowadays, living microorganisms have been identified in all compartments of the atmosphere from dry air to cloud water, from fog to precipitation, from sea level up to the mesosphere [91].

1. Emission and Transport

a. Emission

Microorganisms are ubiquitous on earth in water, soil and vegetation, and they can experience a life cycle *via* the atmosphere as illustrated in Figure 5. Their release to the atmosphere depends on the type of surface cover.

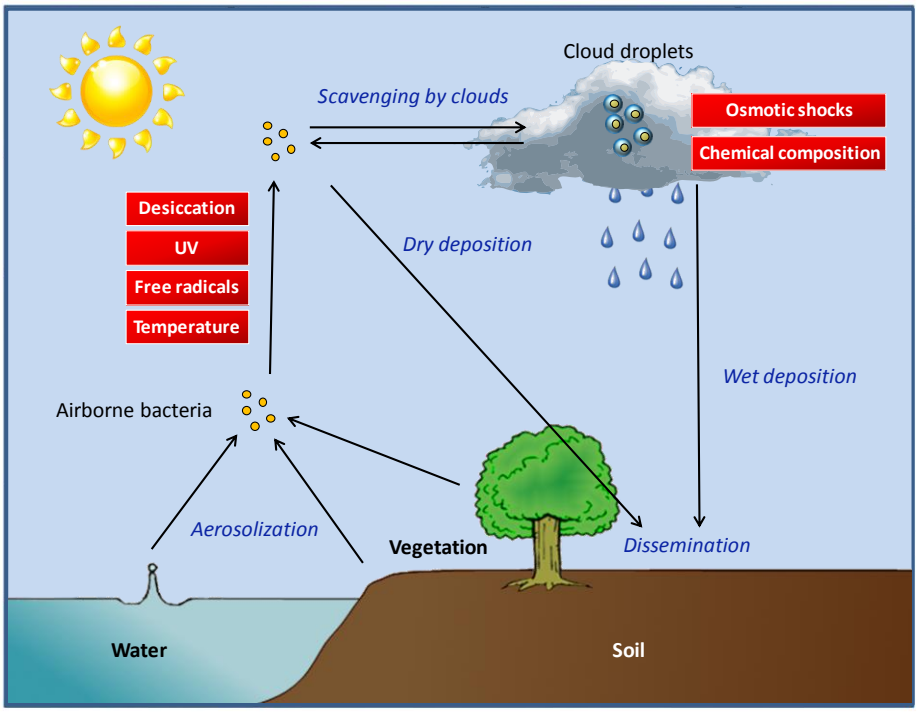


Figure 5. Schematic representation of the life cycle of microorganisms in the atmosphere, summarizing the factors that likely limit their survival and activity.

Oceans are one of the most important sources not only due to the huge volume they represent (70% of the earth is covered by seawater) but also due to the surface layer which is enriched in microorganisms up to 10.000 times compared to the water below [92]. The direct interaction of this layer with air ensures important biomass transfer into the atmosphere: when air bubbles produced by breaking waves or precipitation burst at the water surface, aerosols including microbial cells are ejected into the atmosphere with jet drops or film drops [93].

Depending on the size of the drop, the length of bubble path through the liquid, the hydrophobicity of cells surface and chemical composition of the liquid, concentration of bacteria within jet drops can be hundreds of time greater than the concentration in the water from which the aerosol is produced [94,95].

Regarding microorganisms on leaf surfaces and soil, the wind speed is the main parameter responsible for their emission into the atmosphere. Nevertheless, other meteorological factors can also influence the aerosolization such as humidity and temperature by determining boundary forces between cells and their support [96]. Aerosols can result from dried leaves or dried biofilms on leaf surface that may be fragmented and easily join the atmosphere [97,98].

Airborne bacteria may occur as individual cells but they are more frequently encountered as agglomerates of many bacterial cells or in association with other particles such as soil and leaf fragments they were attached to when they were lifted up in the air [99,100].

b. Transport through the Atmosphere

Microorganisms have a relatively long residence time in the atmosphere, in the order of several days or weeks [101] and therefore are carried over long distances up to thousands of kilometres and colonize new habitats. Residence time of particles in the atmosphere depends on several factors in particular their size and their ability to act as cloud condensation nuclei (CCN) or ice nuclei (IN). Microorganisms, due to the presence of lipopolysaccharides and exopolymeric substances (polysaccharides and proteic structures) on their surface, are known to be efficient CCN. Thus, they can serve as a support to form droplets and easily join clouds.

Clouds are harsh environments for microorganisms, even more hostile than the atmosphere [89,96,102] (Figure 5). In addition to desiccation, low nutrient content and the effects of solar light and radicals encountered in dry atmosphere, microorganisms have to deal with toxic compounds, changes in osmotic pressure, pH ranging between 3 to 7 in cloud water [28] and freeze-thaw cycles of the cloud water.

2. Microbial Composition of Cloud Water

While studies about microbial composition of terrestrial and marine ecosystems are constantly increasing, only a few ones report microbial diversity in atmosphere and even fewer are focused on cloud water. However, these two compartments play a major role in the dissemination of microorganisms across the globe. Recently, the concept of an existing biogeography in the atmosphere has been introduced describing it as a specific, transitory and open ecosystem [89]. From a microphysical point of view, determining the diversity and the concentration of microorganisms is also an important question as they may impact the formation of clouds and precipitation.

Data summarized below are focused on the cloud water compartment (for the description of microorganisms diversity in the atmosphere, please refer to the review of Després *et al.* [90] and references therein).

a. Quantitative Description

Microscopic observations of cloud water samples have revealed the presence of $\sim 10^3$ to $\sim 10^5$ bacteria per mL and $\sim 10^2$ to $\sim 10^4$ yeasts per mL inside low level clouds (detailed concentrations are described in Table 4). Among the total community of microorganisms, less than 1% of bacteria and around 8% of the yeasts are culturable in laboratory on a typical medium designed for drinking water [103] which is similar to ratio encountered in other environment such as seawater.

Adenosine Tri-Phosphate (ATP) measurements, a molecule involved in energetic cell metabolism, and differential labelling demonstrated that a large majority of the cells (up to 95%) is metabolically active [104–105]. Furthermore, studies have highlighted that microorganisms are able to divide despite the low temperature that prevails in the atmosphere [106].

In dry atmosphere, several studies observed a seasonal and spatial variation of microbial content with higher concentrations in summer and autumn and in urban/rural areas compared to costal sites [99,107,108].

Table 4. Concentration of microorganisms in the different studies based on cloud water samples. m a. s. l.: meters above sea level

Site	Altitude (m a. s. l.)	Bacterial Concentration (mL^{-1})	Fungal Concentration (mL^{-1})
Puy de Dôme mountain France [103,105]	1465	$3.3\ 10^3$ - $2.5\ 10^5$	$8.9\ 10^2$ - $3.2\ 10^4$
Rax mountain Austria [104,109]	1644	$2\ 10^4$	$5.9\ 10^3$
Sonnblick mountain Austria [108]	3106	$1.5\ 10^3$	
Lower peninsula of Michigan U.S.A (aircraft sampling) [110]	2240 - 3350	$9.2\ 10^4$ - $4.3\ 10^5$	

In cloud water, no significant seasonal variations have been observed but culturable cells reach their maxima in summer [103]. Nevertheless, the origin of the air mass seems to influence the bacterial concentration with a maxima for clouds that were mainly transported over lands compared to those originating from oceans [103].

The comparison of microbial concentrations with the physico-chemical characteristics of clouds (pH, ionic composition, etc.) did not reveal any significant correlation between these parameters.

b. Qualitative Description

Bacterial strains isolated from cloud water show important similarities with those found on vegetation, surface waters, soil and cold environments.

Among heterotrophic culturable bacteria, *i.e.* organisms feeding on organic compounds, species belonging to *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Beta*- and *Gamma*-) and *Bacteroidetes* phyla are predominant. At a genera level, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Streptomyces* and *Rhodococcus* are the most frequently encountered [103,105] (Figure 6). DNA-based studies revealed the presence of the same groups [111,112] in addition to *Cyanobacteria* species (photosynthetic bacteria) [110]. Similar phyla were also described in dry atmosphere [107,113,114], snow samples [112,115] and hailstones [116].

Pseudomonas species are ubiquitous Gamma-Proteobacteria accepting a large panel of carbon sources. Under certain conditions, they can produce siderophores, *i.e.* molecules chelating transition metals, to improve their uptake of iron required for various enzymatic reactions [117] and thus they may be capable of metabolic activity. In addition to these properties, some of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* are known to nucleate freezing of supercooled water droplets under conditions similar to those of cloud water (limited nutrient content and low temperature).

These bacteria are the most efficient ice nuclei described initiating freezing for temperature as warm as -2°C for some of the *Pseudomonas syringae* strains [118]. Since the formation of ice crystals is involved in a large part of precipitation [119], ice nucleation active bacteria might be a major actor in precipitation. Furthermore, cloud water isolated *Pseudomonads* were shown to favour cloud droplets formation by the production of surface active molecules (biosurfactants) [111].

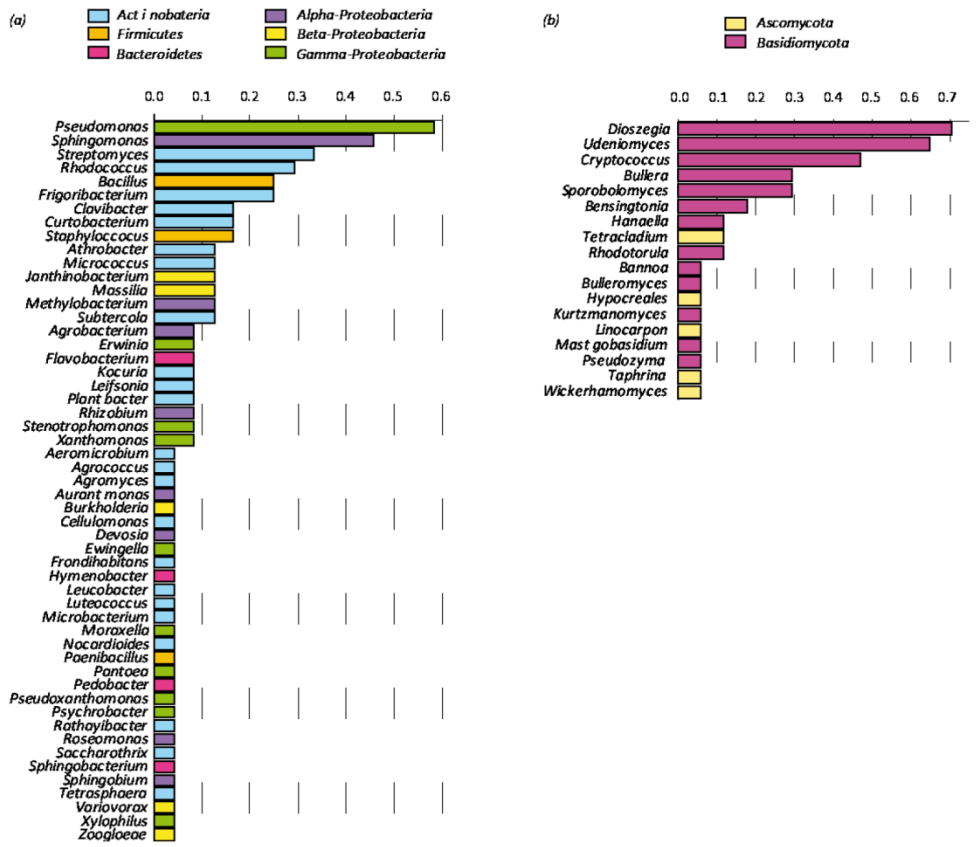


Figure 6. Frequency of cloud events in which the different genera of bacteria (a) and yeasts (b) were detected by culture over the period 2003-2010 at the puy de Dôme station [103], 24 and 17 cloud events respectively for bacteria and yeasts. Adapted from Vaïtilingom *et al.* [103].

Sphingomonas species are yellow or orange-pigmented bacteria commonly encountered in aquatic environments or in association with plants. They are often described as a major genera in the air [113,120–122] and in very remote permanently cold places like Antarctica and glaciers [123–126]. The prevalence of *Sphingomonas* species in these environments suggests that they are efficiently carried over long distances by the air, clouds and precipitation. Moreover, some strains were reported to be extremely resistant to high concentrations of oxidants as hydrogen peroxide, one of the major sources of free radicals in cloud water. They also have the capacity to rapidly adapt to changing nutritive conditions [127].

Streptomyces species are bacteria commonly found into the soil, in the air and in glaciers feeding on a large variety of carbon source. They were particularly studied due to their capacity to form molecules of medical interest like antibiotics and anti-cancer drugs [128,129]. *Streptomyces* are spore-forming bacteria: spores are disseminated in the air by aerial mycelia when conditions are not optimal for their survival. Among other genera encountered in cloud water, *Bacillus* species are also common spore-forming bacteria producing spore as resistance forms to increase their probability to survive to unfavourable

conditions similar with those in clouds (desiccation, absence or low concentrations of nutrients, UV light, chemical damages) waiting for beneficial conditions.

Finally *Rhodococcus* are ubiquitous red or orange-pigmented bacteria frequently described in the air and in glacier samples. They are able to degrade a large variety of environmental pollutants (hydrocarbons for example) and are commonly used in biotechnologies to synthesize molecules of interest (acrylamide, vitamins, antimicrobial etc…) [130].

Concerning fungal species, culturable yeasts isolated from cloud water belong mainly to *Ascomycota* and *Basidiomycota* phyla with a dominance of *Dioszega*, *Udeniomyces* and *Cryptococcus* genera [103,105] (Figure 6). Despite the absence of identification of filamentous fungi in clouds, they are present too, especially due to the formation of spores, their resistance form.

Among bacterial and yeast strains isolated from cloud water, 55% of the colonies exhibit pigmentation, most of them are orange pigmented (63%) and the others are yellow or pink (27% and 10% respectively) [103].The use of pigments is known to act as a protection for cells living in hostile conditions (UV radiation or low temperature) and it improves the chances to be aerosolized [94]. These two reasons may explain the important proportion of pigmented cells in cloud water.

In conclusion, cloud water hosts a diversified microflora showing similarities with the one present in the ecosystems releasing it. The presence of microorganisms plays a role on microphysical processes due to their ability to act as CCN or IN. Nevertheless, since they are metabolically active, they may as well impact the chemical composition of cloud water.

IMPLICATION OF MICROBIAL ACTIVITY IN CLOUD CHEMISTRY

The presence of living microorganisms in clouds indicates that they can uptake chemicals from cloud waters and biocatalyze chemical transformations thanks to their enzymes organized in complex metabolism. This suggests their potential implication in cloud chemistry as an alternative route to radical chemistry, and particularly photochemistry [102,131,132].

This hypothesis is rather recent and few studies tried to analyze biodegradation efficiency under cloud conditions. To demonstrate the activity of cloud microorganisms on chemicals present in the atmosphere (biodegradation or biosynthesis) two scientific strategies were used: i) to investigate their enzymatic equipment, *i.e.* to test the activity of their metabolic pathways; ii) to quantify this activity and compare it with radical chemistry.

1. Metabolic Pathways

Most of the studies describe the biodegradation pathways of mono- and dicarboxylic acids, methanol and formaldehyde which are present in cloud water. However, very recent investigations are related to the biosynthesis pathways of various compounds such as biosurfactants and exopolymeric substances (EPSs).

a. Carboxylic Acid Metabolism

Microorganisms can metabolize carboxylic acids *via* their central metabolism, particularly *via* the Tricarboxylic Acid Cycle or citrate cycle (TCA). Central metabolism is present in all microorganisms whatever their genus because it generates all the energy necessary for the cell survival and functions (ATP: Adenosine Tri Phosphate) as well as the intermediates necessary for building up their proteins or nucleic acids. Aerobic microorganisms that use oxygen as final electron acceptor for the synthesis of ATP can mineralize organic matter into CO_2 and H_2O. Because cloud environment is highly oxidant, we presume that only aerobic microorganisms are active under these conditions.

As an example, Figure 7 shows the various intermediates and the enzymes involved in TCA pathway which is present in aerobic microorganisms; metabolites of interest for atmospheric chemistry are citrate, succinate, malate, fumarate, pyruvate, acetate.

Microbial metabolism is extremely complex and involves hundreds of reactions which are all interconnected as shown in Figure 7 (for instance TCA cycle is connected to pyruvate metabolism, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, glycolysis, amino acid metabolism etc.).

Herlihy *et al.* [133] were the first who studied the degradation of formic and acetic acid by bacteria in rainwater. Ariya *et al.* [134] and Côté *et al.* [135] observed that several dicarboxylic acids (malonic, succinic, glutaric, adipic, pimelic and pinic) detected in the atmosphere can be efficiently degraded by airborne fungi.

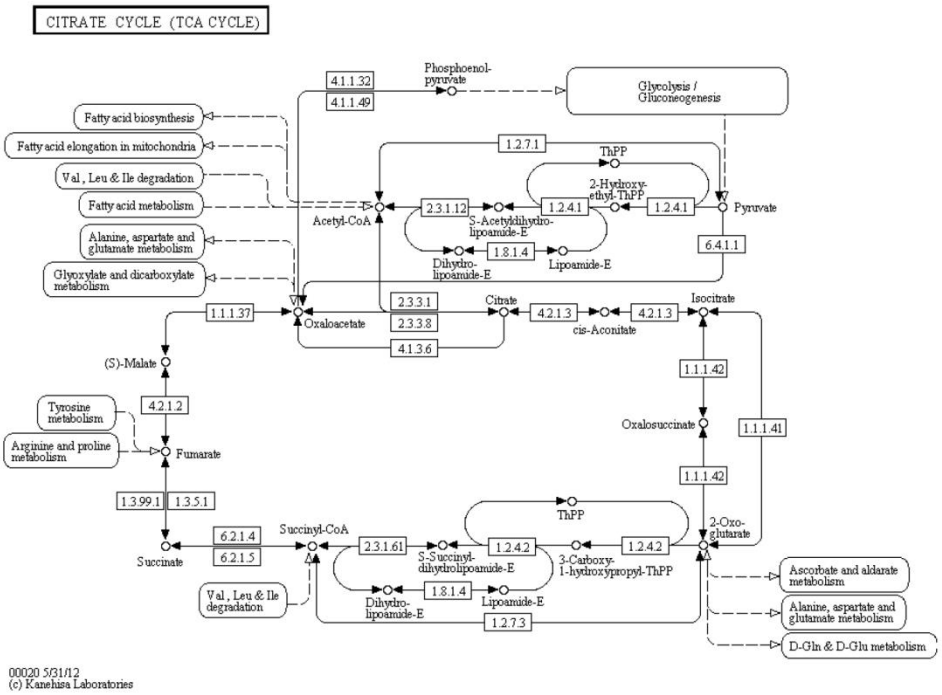


Figure 7. TriCarboxylic Acid (TCA) cycle from KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) data available on the web: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?rn00020+R00342.

Solid state ^{13}C NMR was used to show that ^{13}C-succinate could be integrated in *Geotrichum* sp. macromolecules [134]. On the contrary, oxalic acid was not, or very slowly, biotransformed. This last result was confirmed by other studies performed with cloud bacteria [136,137]. Amato *et al.* [138,139] showed that microbial strains present in cloud water contained the enzymatic equipments required for the degradation of some carboxylic acids including formate, acetate, lactate and succinate. This study was based on 60 microbial strains incubated at 27°C as pure cultures with one single substrate. In this work, some intermediates of the metabolic pathways could be detected using *in situ* ^{1}H NMR such as pyruvate and fumarate demonstrating that microbial metabolism can be a sink but also a source of organic compounds for the atmospheric chemistry. Recently Temkiv *et al.* [116] have shown that seven strains of *Methylobacterium* and one strain of *Bradyrhizobium* isolated from hailstones were able to use between 2 and 9 carboxylic acids (lactate, acetate, glycolate, propionate, formate, glyoxylate, α-keto-glutarate, succinate, tartrate).

b. Methanol and Formaldehyde Metabolism

Although methanol and formaldehyde (C1 compounds) are toxic for many microbial species, some of them are able to transform them using various metabolic routes (Figure 8). For more details about the enzymes involved in these routes, the reader is referred to (*http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?rn00680+R01146*).

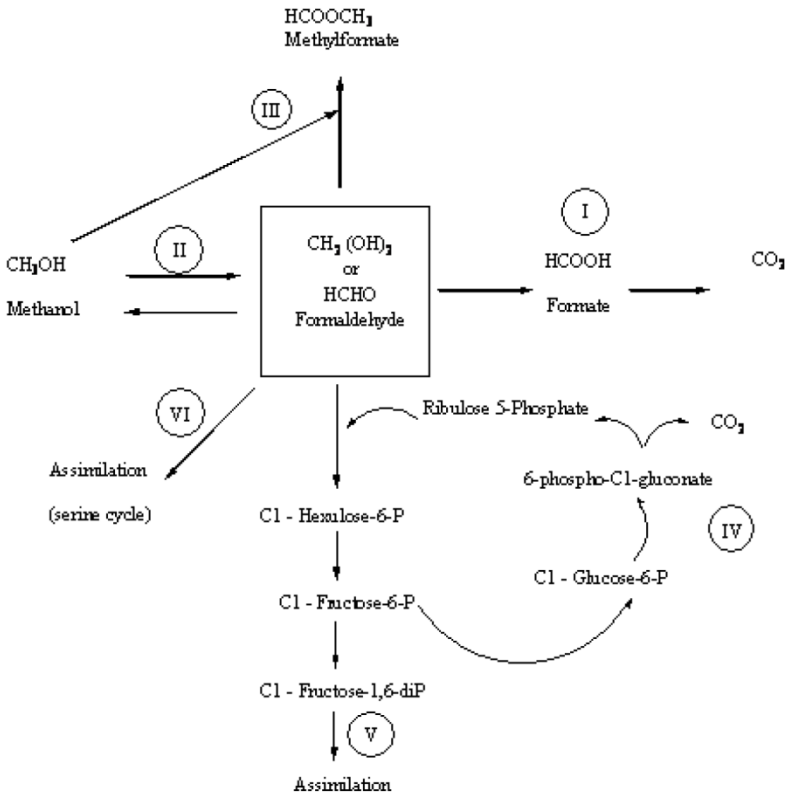


Figure 8. Main metabolic routes for the bioconversion of formaldehyde. Adapted from Delort [140].

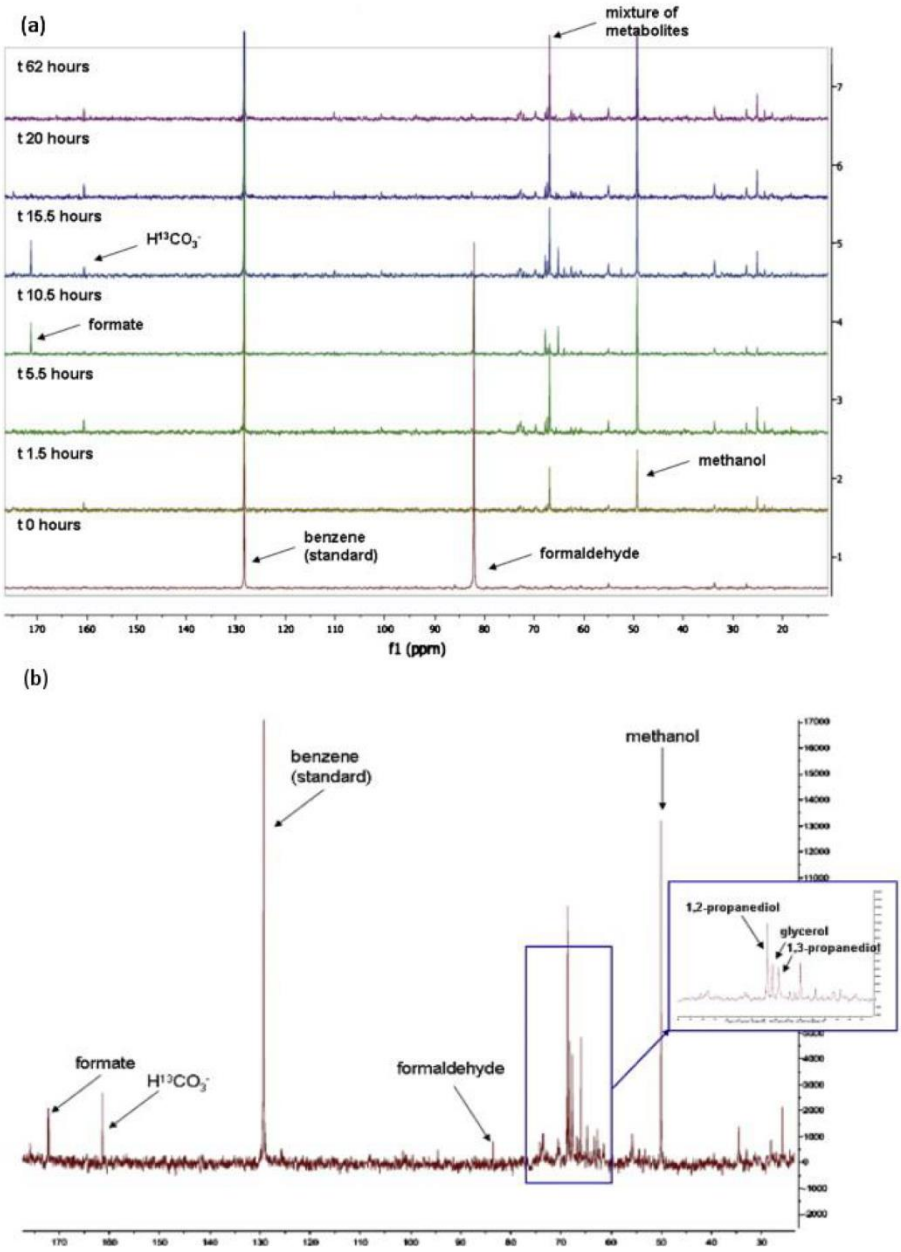


Figure 9. (a) in vivo 13C NMR spectra collected during the incubation of *Bacillus* sp. 3B6 with 13C formaldehyde; (b) Example of in vivo 13C NMR spectrum collected after 4 hours. From Husárová *et al.* [141].

Routes I, II, III and IV lead to the dissimilation of formaldehyde into final products such as methanol, methylformate or CO2; methanol can be converted in formaldehyde by oxidation.

The formation of CO2 is the most frequent way of dissimilation. It should be noted that routes I and II lead to intermediates very similar to radical chemistry [142]. However, in radical chemistry, only oxidation occurs, while in biochemical pathway formaldehyde can also be reduced to methanol. Routes I, II and III are "linear dissimilation" while route IV is a "cyclic dissimilation". Thanks to these dissimilation routes microorganisms can eliminate these toxic compounds. Routes V and VI, on the contrary, are assimilation pathways; in that case the microorganisms use methanol and formaldehyde to produce energy and carbon molecules such a sugars, amino-acids etc. These routes are present in methylotrophs which metabolism is based on the assimilation of C1 compounds. Most of them are aerobic and compatible with droplets in clouds, they can be found among to the Alpha-, Beta- and Gamma-Proteobacteria and among Gram-positive bacteria. In addition, many microorganisms are facultative methylotrophs, and therefore depending on environmental conditions they can operate on the same substrates as obligatory methylotrophs. Such facultative methyloptroph strains, belonging to the genus Methylobacterium, have been isolated from cloud water [103] and from hailstones [116].

Biodegradation of formaldehyde and methanol has been tested on many microbial strains isolated from cloud waters under simplified conditions (one strain and one single substrate) [138,141]. Most of the strains were able to transform these compounds using routes I and II (Figure 8). A more detailed study was performed with *Bacillus* sp. 3B6 by monitoring the biotransformation of ^{13}C-formaldehyde by *in vivo* ^{13}C NMR [141]. Figure 9a shows the disappearance of ^{13}C-Formaldehyde with time and the appearance of ^{13}C-methanol, ^{13}C-formate and $^{13}CO_2$ on the ^{13}C NMR spectra, demonstrating the activity of routes I and II in this strain. In addition the detection of glycerol and end-products such as 1,2- and 1,3-propanediols showed that the serine pathway (route VI) allowed formaldehyde assimilation (Figure 9b).

2. Biosynthesis of ExoPolymeric Substances (EPSs) and Biosurfactants

The previous metabolic pathways were biodegradation pathways resulting in the production of shorter molecules, mainly by oxidation processes. However microorganisms are able to synthesize higher molecular weight molecules using various substrates present in the atmosphere. We present here the case of biosurfactants and EPSs that may have some importance in atmospheric processes.

a. ExoPolymeric Substances (EPSs)

Microorganisms can convert nutriments into exopolymeric substances (EPSs) very effectively and thus create a stock of carbon and energy. These EPSs can be polysaccharides (PSs) but also other polymers such as proteic structures or polyhydroxyalkanoates (PHAs) for instance. Bacterial PSs represent a wide range of chemical structures. Chemically, they may have homo- or heteropolymeric composition of high molecular weight (10 to 30 kDa).

EPSs are known to surround the bacterial cells and to form biofilms. Actually the formation of biofilms seems to be the typical way how bacterial cells grow in nature as it confers many ecological advantages [143–145].

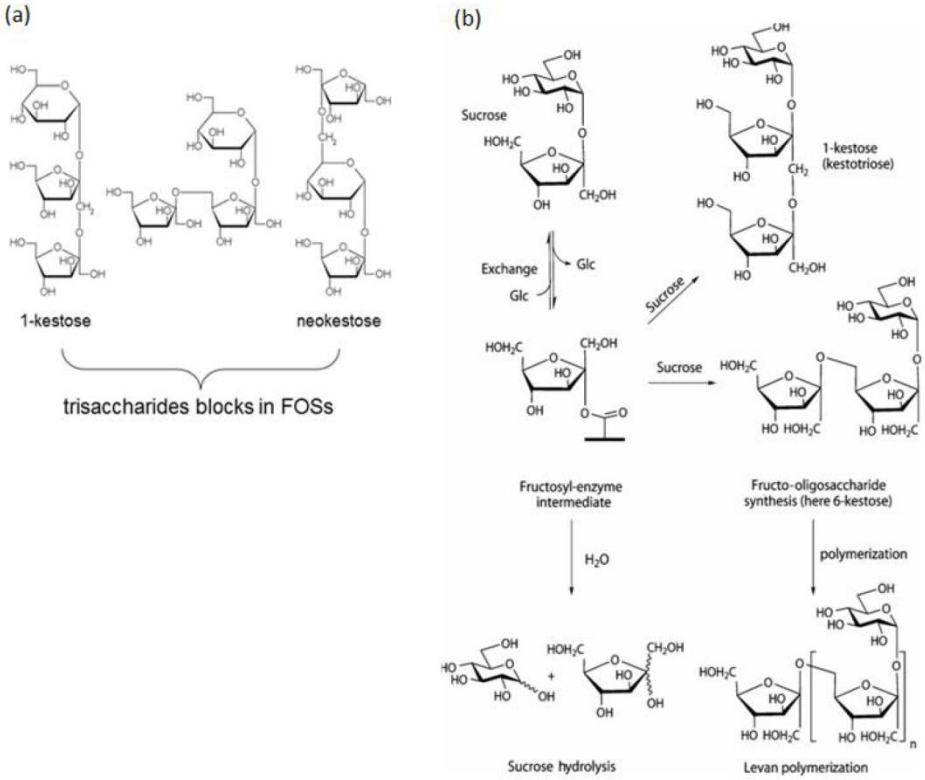


Figure 10. (a) Structures of trisaccharides blocks in Fructo-Oligo-Saccharides (FOSs) identified during the incubation of *Bacillus* sp. 3B6, a strain isolated from clouds with sucrose. (b) Metabolic pathway involved in the synthesis of FOSs.

These compounds have been shown to protect microorganisms to various environmental stresses (low temperatures, desiccation and UV exposure), by forming biofilms when a solid surface is available or by forming aggregates. EPSs could thus contribute to the survival of microorganisms in the atmosphere, and particularly in clouds. Because many sugars are present in aerosols, we have investigated the potential synthesis of EPSs by a bacterial strain isolated from clouds, *Bacillus* sp. 3B6. NMR experiments showed that this strain was quite efficient in degrading most of the sugars tested and was able to synthesize EPSs on some of them [146]. For instance in the presence of sucrose, which is one of the major disaccharide present in aerosols during summertime [147–149], *Bacillus* sp. 3B6 could synthesize FructoOligoSaccharides (FOSs) of levan type [150] (Figure 10).

b. Biosurfactants

Biosurfactants are complex organic structures based on hydrophilic components (sugar or amino-acids etc.) linked to hydrophobic groups (lipids,...) as a consequence there are amphiphilic. Microorganisms can produce this type of structures; some examples are given in Figure 11.

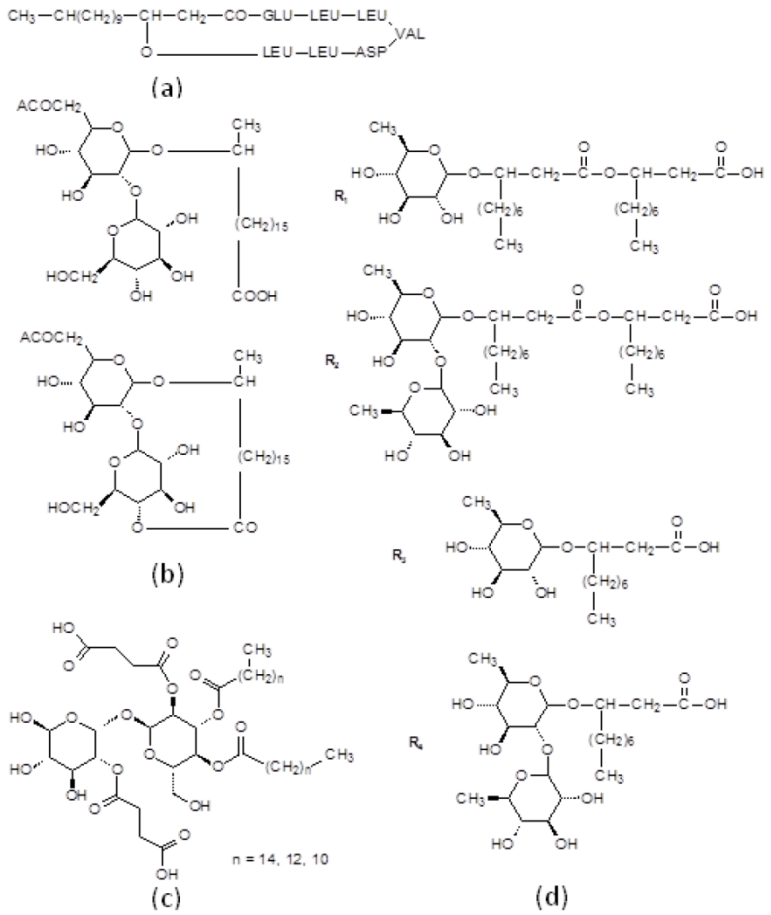


Figure 11. Molecular structure of some biosurfactants: (a) surfactin produced by *Bacillus subtilis*; (b) sophorolipids produced by *Candida bombicola*; (c) succinoyl-trehalose lipid produced by *Rhodococcus erythropolis*; (d) rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* (from Delort *et al.* [102]).

These compounds are very useful for microorganisms to solubilize and uptake compounds with a low solubility in the aquatic environment such as derivatives of petroleum (PHA), lipids… etc. Ahern *et al.* [111] have shown that all of the fluorescent pseudomonads strains (80 isolates, representing 55% of the total isolates) collected from 4 cloud and rain samples in the Hebridean were biosurfactant producers to varying degrees.

Rather recently, our group screened part of its microbial bank issued from cloud sampling at the puy de Dôme station and found a much wider variety of strains able to produce biosurfactants. These isolates included bacterial strains belonging to *Bacillus, Rhodococcus, Clavibacter, Microbacterium, Frigobacterium, Pseudomonas, Erwinia and Pantoea* genera as well as yeast strains belonging to *Diozegia*, *Undeniomyces* and *Bullera* genera (unpublished data). Biosurfactants were also identified in the composition of atmospheric aerosols [151].

These findings raised a new scientific hypothesis: do biosurfactants produced by microorganisms could change the surface tension of aerosols and thus the mode of precipitation?

3. Microbial Activity *vs* Radical Chemistry: Impact on Cloud Chemistry

It is now well established that microbial strains have the enzymatic equipment to transform organic compounds in clouds.

In order to evaluate their effective contribution to atmospheric chemistry a quantitative comparison of the contribution of this microbial activity with that of radical chemistry is necessary.

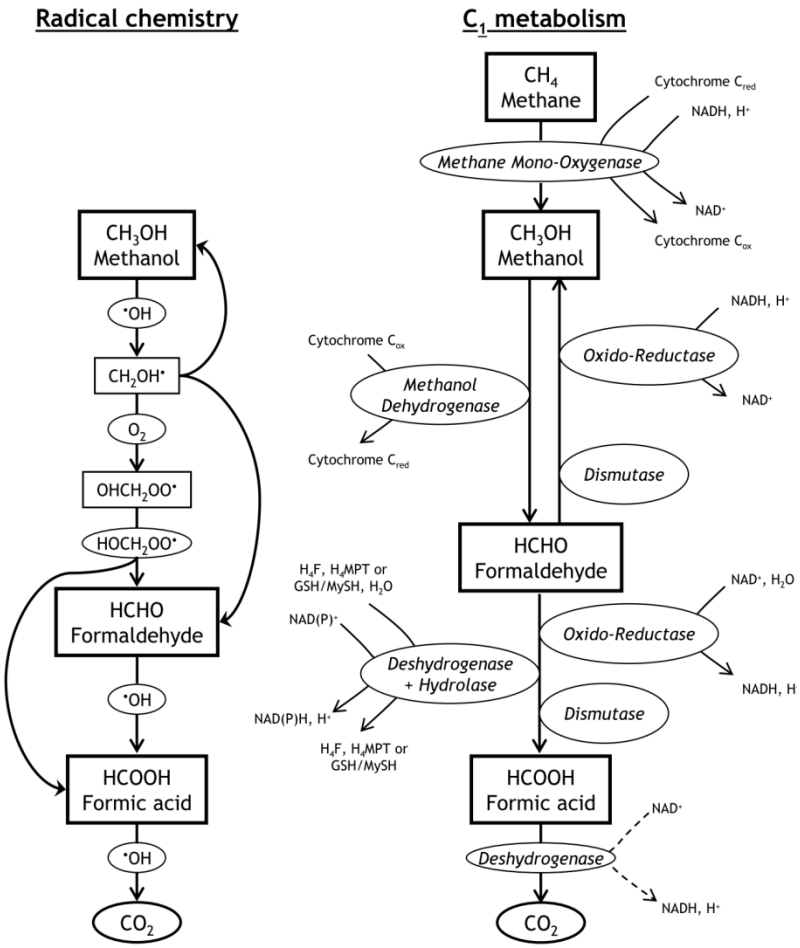


Figure 12. Non-exhaustive schemes of the ways of degradation of C1 compounds by radical chemistry and by metabolism. The scheme corresponding to radical chemistry has been drawn from reactions given in Monod *et al.* [142] and references therein. C1 metabolism scheme was reconstructed from Delort [140] 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; H4F: Tetrahydrofolate; H4MPT: Dephospho-tetrahydromethanopterin; GSH: Glutathione; MySH: Mycothiol. From Husárová *et al*. [141].

Published studies have been focused on the degradation of carboxylic acids and C1 compounds, as it was shown that metabolic pathways presented high similarities with radical chemistry reactions [139].

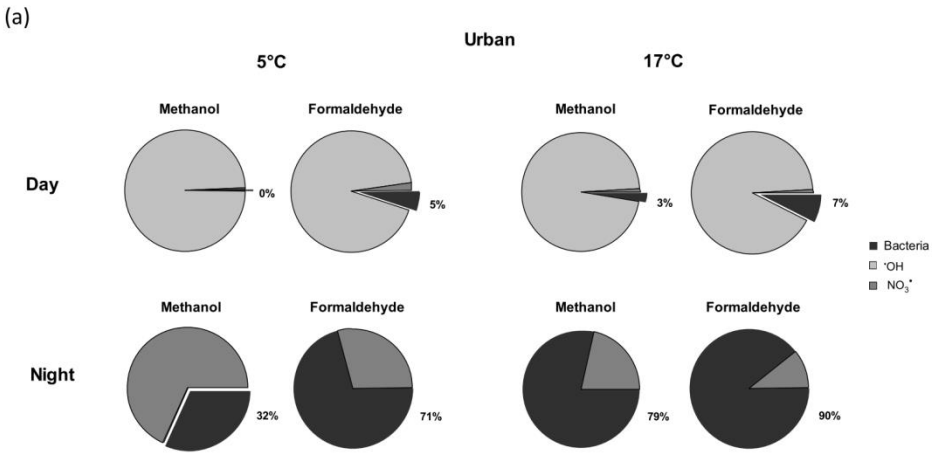
Figure 12 shows the example of the pathways involved in C1 compound transformation, these pathways present very similar intermediates (methanol, formaldehyde, formic acid and CO_2).

The strategy was to set up more and more complex experimental conditions aiming to get closer and closer to cloud environment: first pure strains were incubated with a single substrate, then microcosms were designed with artificial cloud water mimicking cloud water composition and finally incubations were performed in real cloud water samples.

a. Experiments with Single Substrates and Pure Microbial Strains

Ariya *et al.* [134] measured the biodegradation rates of dicarboxylic acids (malonate, succinate, adipate, pimelate and pinate) by *Geotrichum* sp. isolated from the air and calculated their lifetimes which were in the range of days (1.5 to 10 days). They were comparable to the lifetimes calculated from the reactivity of $^{\bullet}OH$ (0.03 to 24 days) but much shorter that those calculated with O_3 (> 771 days) and $HO_2^{\bullet}$ (> 2000 days). It should be noted that the experimental conditions used by Ariya *et al.* [134] were rather far from real cloud environment: the temperature was close to room temperature and the exact concentration of the fungal cells was not specified. However it was the first demonstration of the potential competition of microbial activity *vs* radical reactions in cloud chemistry.

Husárová *et al.* [141] investigated the biodegradation of methanol and formaldehyde by 4 strains (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* sp. and *Frigoribacterium* sp.) isolated from cloud samples at the puy de Dôme, incubated in a phosphate buffer at 5°C and 17°C. The colder temperature (5°C) corresponds to the mean annual temperature measured at the Puy de Dôme site, while 17°C is approximately the maximal temperature observed there when a cloud forms (see *http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/mesures/pdd.php*). The measured biodegradation rates were compared with those resulting from to the reactivity of methanol and formaldehyde species with free radicals $^{\bullet}OH$ and $NO_3^{\bullet}$.



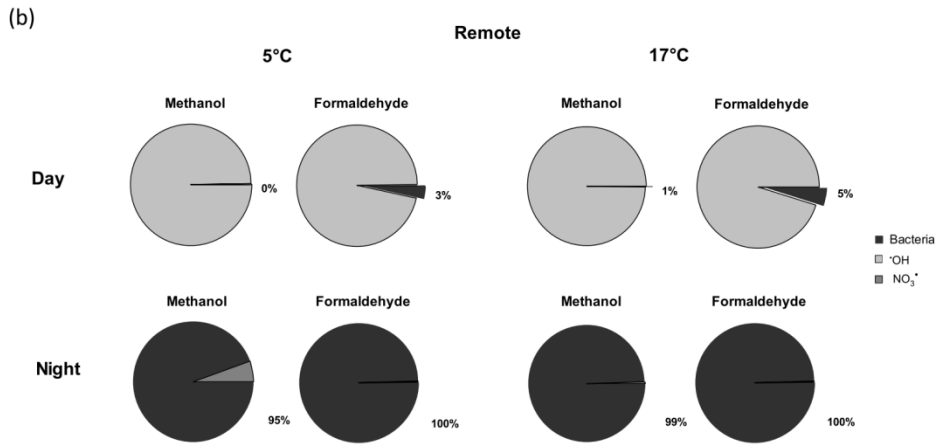


Figure 13. Estimated relative influence of bacterial activity and free radicals ($^{\bullet}OH$ and $NO_3^{\bullet}$) on the degradation of methanol and formaldehyde in cloud water at 5°C and 17°C during the day and the night for both cloud air mass types: urban (a) and remote (b) cases. During night-time (*i.e.* in the absence of photochemical reactivity), $^{\bullet}OH$ radicals are considered not present. From Husárová *et al.* [141]. Calculations have been made considering typical chemical and microbial concentrations measured in cloud waters at puy de Dôme: i) concentrations of 6.5 µM and 2.0 µM for formaldehyde as mean values for urban and continental clouds repectively [152]; ii) active biomass of 8.1 10^4 bacteria mL^{-1} [153]. As no methanol was measured at the puy de Dôme station, the value of 0.7 µM given by Snider and Dawson [154] was used. Free radical concentrations were based on the values published by Tilgner and Herrmann [44] who considered clouds from urban origin ($[^{\bullet}OH] = 1\ 10^{-14}$ mol L^{-1} and $[NO_3^{\bullet}] = 2\ 10^{-13}$ mol L^{-1}); and clouds from remote origin ($[^{\bullet}OH] = 5\ 10^{-14}$ mol L^{-1}; $[NO_3^{\bullet}] = 5\ 10^{-15}$ mol L^{-1}).

This gave access to the contribution of microorganisms to cloud chemistry during the day where both $^{\bullet}OH$ and $NO_3^{\bullet}$ radicals are active and during the night where $NO_3^{\bullet}$ radicals only are present. Two cloud situations were also considered mimicking polluted and non-polluted air-masses: in urban cases $NO_3^{\bullet}$ concentrations were much higher compared to those of remote cases due to the higher NO_x concentration, while $^{\bullet}OH$ concentrations were slightly lower in urban cases due to higher VOCs concentration that scavenged this radical. The results showed that biotransformation processes had a small impact during the day but could be the major sink for C1 compounds during the night in liquid clouds, except in the case of methanol at 5° C in remote clouds (Figure 13).

b. Experiments in Artificial Cloud Water Microcosms

In order to be closer to cloud water conditions, Vaïtilingom *et al.* [137] designed microcosms constituted of artificial cloud water that mimicked the composition of real cloud water collected at the puy de Dôme station. Different types of scenarios were chosen:

1. Both 5°C and 17°C were studied to cover the influence of temperature change during diurnal and season cycles;
2. The composition of artificial water was mimicking both marine and continental clouds. The main differences between marine and continental cloud compositions concern the pH, the concentrations of NO_3^-, NH_4^+ and SO_4^{2-};

3. 17 strains isolated from cloud samples were tested, covering a wide variety of bacterial strains belonging to *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Clavibacter, Frigoribacterium* and *Rhodococcus* genera;
4. In parallel to biodegradation, photodegradation experiments were conducted in two photoreactors (S1 and S2) mimicking solar light with different radiation spectra;
5. Finally theoretical calculations were also made in the same way as in the case of C1 compounds.

The results showed that the change of temperature from 17°C to 5°C was not drastic for the biodegradation rates as they only decreased from a factor 2 to 5. The composition of cloud water and more specifically the pH had no influence on the biodegradation efficiency.

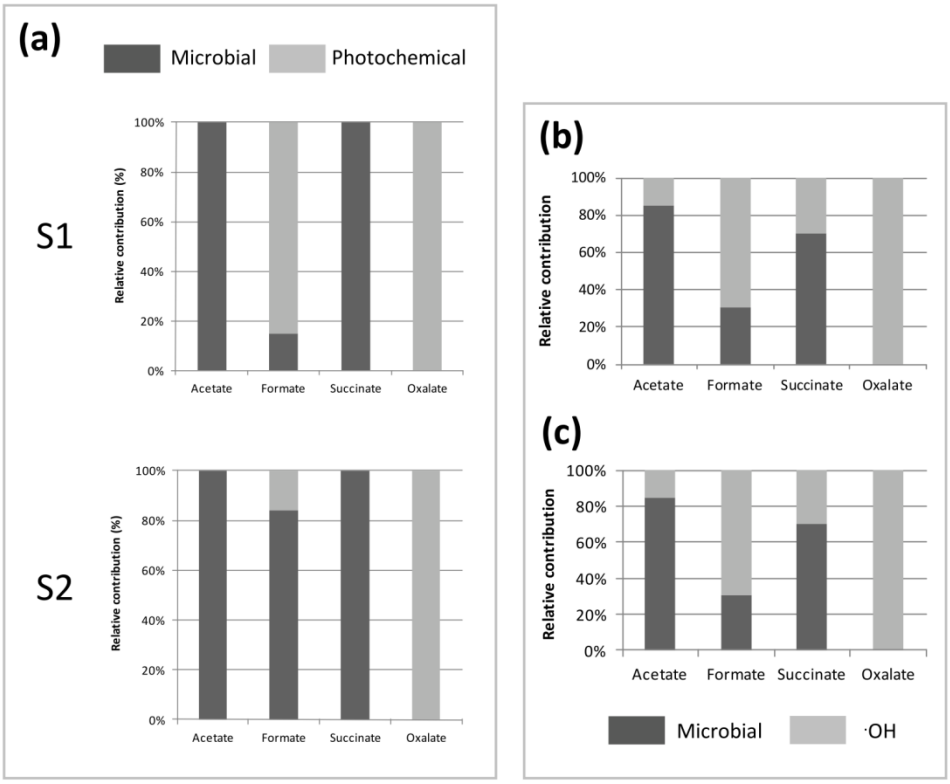


Figure 14. Comparisons of the contribution of microbial activity *vs* radical chemistry to the degradation of carboxylic compounds. (a) Photodegradation in S1 and S2 systems *vs* biodegradation in marine artificial cloud water at 17°C, (b) Theoretical contribution of radical chemistry *vs* biodegradation in marine artificial cloud water at 17°C, (c) Theoretical contribution of radical chemistry *vs* biodegradation in real cloud medium at 12°C. Relative contributions of each process were determined by comparison of biodegradation and photodegradation rates. Biodegradation rates per cell were measured experimentally. Photodegradation rates were measured in photoreactors S1 and S2. Theoretical contribution of radical chemistry was calculated using simulated standard $^{\bullet}OH$ concentrations in cloud water and reaction rates of $^{\bullet}OH$ towards the respective acids ($[^{\bullet}OH] = 10^{-14}$ M). Adapted from Vaïtilingom *et al.* [137].

The average measured biodegradation rates were then compared with those obtained from photochemical reactions performed in the same artificial media in two different irradiation systems at 17°C. Figure 14a presents this comparison for the case study of a marine cloud. Oxalate was only photodegraded, while acetate and succinate were only degraded by microorganisms; formate was both photo and biodegraded. The main result was that the experimental rates of photodegradation and biodegradation were in the same range of order. This study was completed by comparing the contribution of microbial activity *vs* radical chemistry to the degradation of carboxylic compounds using a theoretical $^{\bullet}OH$ concentration of 10^{-14} M. This value corresponds to a concentration that is estimated by cloud chemistry models for continental and urban conditions [44] (see Figure 14b). This theoretical comparison was consistent with the previous experimental comparison (photodegradation *vs* biodegradation Figure 14a), as it showed that biodegradation contribution was comparable to that of radical chemistry.

Another study performed with *Pseudomonas graminis,* incubated in artificial cloud water at 5°C and 17°C, showed that biotransformation was the main process involved in acetate, succinate and formate transformation during the night [136].

In conclusion, all these results suggest that microorganisms could be active both during the day and during the night to biodegrade carboxylic acids in atmospheric waters, while their activity will be only dominant at night in the case of methanol and formaldehyde. This is consistent with the fact that C1 metabolism is operating in specialized strains, while central metabolism such as TCA cycle is more generalized among microbial strains.

c. Experiments with Real Cloud Samples

In their most recent study, Vaïtilingom *et al.* [137] conducted experiments using real cloud water with complex chemical composition containing the whole endogenous microflora without any strain selection and cultivation. The biodegradation rates of acetate, formate, succinate and oxalate were measured experimentally at 12°C; this temperature corresponded to that of the cloud sampling. The experimental data obtained for microbial activity were compared to the theoretical calculations of $^{\bullet}OH$ radical activity ($[^{\bullet}OH] = 10^{-14}$ M) (Figure 14c). Except for oxalate which was only photodegraded, the contributions of microbial activity and radical chemistry to the transformation of organic acids were in the same range of order. More the results obtained in real cloud water (Figure 14c) containing a large biodiversity were very similar to those obtained in artificial cloud microcosms with the 17 cultivated isolates (Figure 14b).

CONCLUSION

All the results reported in the literature up to now are consistent with a potential contribution of microorganisms to atmospheric chemistry. However some more work is needed to fully demonstrate and accurately quantify this contribution and new routes could be also explored.

First, the biodegradation of carboxylic acids and C1 compounds were the only atmospheric chemicals studied. It could be very interesting to extend these studies to other carbon compounds such as sugars and amino acids for instance which are good substrates for

microorganisms. Also more experiments should be made with real cloud water samples, exploring air- masses with various origins, in particular the degree of anthropisation could be tested on the relative efficiency of microbial degradation *vs* photodegradation. Other sampling sites should also be studied to explore the biogeography of microorganisms.

Secondly, the reported experiments were performed under bulk conditions (liquid phase) which are not representative of the real cloud environment. To evaluate the contribution of microbiological processes relative to photochemical processes in real cloud chemistry, use of numerical process models is required [132]. These process models will take into account pollutant exchanges existing between the interstitial phase (gases and particles), cloud droplets and crystals. To simulate more realistic clouds, these models will introduce both biological and radical reactivity and study the sensitivity of various parameters (kinetic constants of degradation, number of cells, chemical composition, temperature, pH, light, flux, …) [155–156].

Third, all these previous studies were conducted under conditions where the presence of reactive oxygenated species (ROS) such as hydrogen peroxide H_2O_2, $HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$ and $^{\bullet}OH$ radicals were ignored. These compounds are toxic for cell life but aerobic microorganisms host very powerful detoxifying enzymes (superoxide dismutases and catalases) and antioxidant molecules (membrane pigments and thiol antioxidants) to fight against these very oxidant species [157,158]. It is thus very likely that cloud microorganisms can interact with these ROS, and in particular with H_2O_2; this means that microorganisms could degrade H_2O_2 in cloud waters. It will be very important to quantify this biodegradation process compared to the abiotic processes (Fenton reaction, phototransformation).

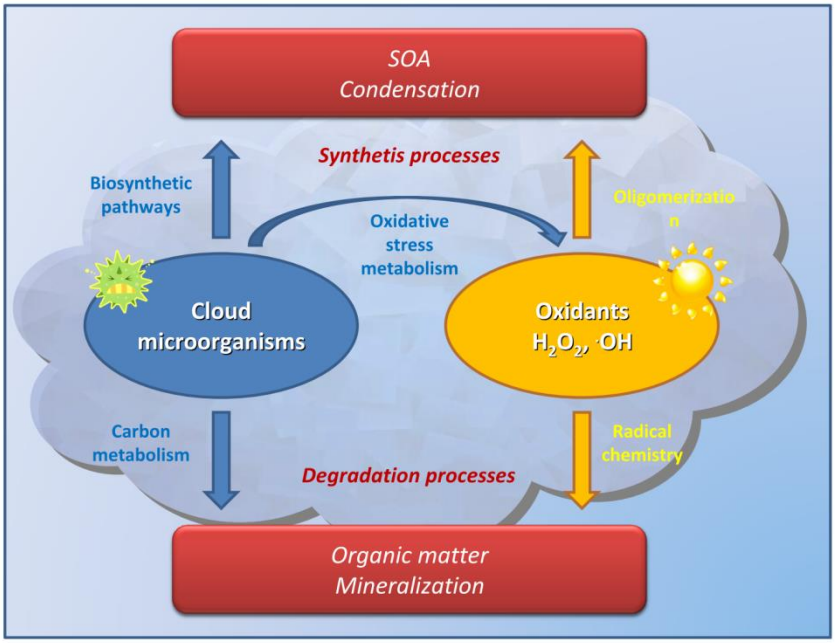


Figure 15. Schematic representation of the respective contributions of microbial activity *vs* radical chemistry to cloud chemistry.

This would have major consequences for atmospheric chemistry as H_2O_2 is known to be a major source of $^{\bullet}OH$ radicals in clouds. Consequently, H_2O_2 molecules would be no longer available for photochemical or other chemical reactions. This potential impact of microorganisms on the oxidant capacity of clouds is clearly a new concept and should be considered as an open novel scientific question.

Finally, beside biotransformations leading to the degradation into smaller molecules, including CO_2 and H_2O, few studies have reported the microbial potential to synthesize more complex structures such as EPSs and biosurfactants from small compounds.

Biosynthetic routes should be explored in more details in the future because they could have major importance in atmospheric processes: they could impact microphysics but also atmospheric chemistry. They could be an alternative route to the synthesis of SOAs (Secondary Organic Aerosols) in the liquid phase of the atmosphere, this later point is a crucial point studied by photochemists and modelers at the moment [3,17]. To conclude cloud microorganisms could play three roles in atmospheric chemistry: first, they could directly mineralize organic matter thanks to their carbon metabolism; second they could destroy part of the sources of radicals thanks to their oxidative metabolism, and finally they could be the source of SOAs thanks to their synthetic pathways. These metabolic activities could be complementary to radical chemistry (see Figure 15).

REFERENCES

[1] Seinfeld J.H.; Pandis S.N. *Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change*; John Wiley & Sons: New York, 2006.

[2] Raes F.; Dingenen R.V.; Vignati E.; Wilson J.; Putaud J.P.; Seinfeld J.H.; Adams P. *Atmos. Environ.* 2000, *34*, 4215‑4240.

[3] 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 T.F.; Monod A.; Prévôt A.S.H.; Seinfeld J.H.; Surratt J.D.; Szmigielski R.; Wildt J. *Atmos. Chem. Phys.* 2009, *9*, 5155‑5236.

[4] Charlson R.J.; Schwartz S.E.; Hales J.M.; Cess R.D.; Coakley J.A.; Hansen J.E.; Hofmann D.J. *Science* 1992, *255*, 423‑430.

[5] Twomey S. *J. Atmos. Sci.* 1977, *34*, 1149‑1154.

[6] Albrecht B.A. *Science* 1989, *245*, 1227‑1230.

[7] IPCC. *Intergovernmental Panel on Climate Change, Climate Change 2007: Working Group I: The Physical Science Basis*; 2007.

[8] Ravishankara A.R. *Science* 1997, *276*, 1058‑1065.

[9] Lelieveld J.; Heintzenberg J. *Science* 1992, *258*, 117‑120.

[10] Warneck P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1999, *1*, 5471‑5483.

[11] Facchini M.C.; Mircea M.; Fuzzi S.; Charlson R.J. *Nature* 1999, *401*, 257‑259.

[12] Zappoli S.; Andracchio A.; Fuzzi S.; Facchini M.C.; Gelencsèr A.; Kiss G.; Kriva¡csy Z.; Molnar A.; Masza¡ros E.; Hansson H.C.; Rosman K.; Zebahr Y. *Atmos. Environ.* 1999, *33*, 2733‑2743.

[13] Sander R. *Henry's Law Constants*, 1999. NIST Chemistry WebBook. Eds Linstrom P.J.; Mallard W.G. (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD). Available at http://webbook.nist.gov. Accessed on December 13, 2012.

[14] Blando J.D.; Turpin B.J. *Atmos. Environ.* 2000, *34*, 1623-1632.
[15] Lim H.-J.; Carlton A.G.; Turpin B.J. *Environ. Sci. Tech.* 2005, *39*, 4441-4446.
[16] Carlton A.G.; Turpin B.J.; Lim H.-J.; Altieri K.E.; Seitzinger S. *Geophys. Res. Lett.* 2006, *33*, L06822.
[17] Ervens B.; Turpin B.J.; Weber R.J. *Atmos. Chem. Phys.* 2011, *11*, 11069-11102.
[18] Leriche M.; Voisin D.; Chaumerliac N.; Monod A.; Aumont B. *Atmos. Environ.* 2000, *34*, 5015-5036.
[19] Herrmann H.; Ervens B.; Jacobi H.W.; Wolke R.; Nowacki P.; Zellner R. *J. Atmos. Chem.* 2000, *36*, 231-284.
[20] Herrmann H.; Tilgner A.; Barzaghi P.; Majdik Z.; Gligorovski S.; Poulain L.; Monod A. *Atmos. Environ.* 2005, *39*, 4351-4363.
[21] Pun B.K.; Griffin R.J.; Seigneur C.; Seinfeld J.H. *J. Geophys. Res.* 2002, *107*, 4333-4347.
[22] Griffin R.J.; Nguyen K.; Dabdub D.; Seinfeld J.H. *J. Atmos. Chem.* 2003, *44*, 171-190.
[23] Raventos-Duran T.; Camredon M.; Valorso R.; Mouchel-Vallon C.; Aumont B. *Atmos. Chem. Phys.* 2010, *10*, 7643-7654.
[24] Boethling R.S.; Mackay D. *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals*; Environmental Health Sciences; CRC Press LLC: Washington, DC, USA, 2000.
[25] Audiffren N.; Renard M.; Buisson E.; Chaumerliac N. *Atmos. Res.* 1998, *49*, 139-161.
[26] Chaumerliac N.; Leriche M.; Audiffren N. *Atmos. Res.* 2000, *53*, 29-43.
[27] Donaldson D. J.; Vaida V. *Chem. Rev.* 2006, *106*, 1445–1461
[28] Marinoni A.; Laj P.; Sellegri K.; Mailhot G. *Atmos. Chem. Phys.* 2004, *4*, 715-728.
[29] Löflund M.; Kasper-Giebl A.; Schuster B.; Giebl H.; Hitzenberger R.; Puxbaum H. *Atmos. Environ.* 2002, *36*, 1553-1558.
[30] Decesari S.; Facchini M.C.; Fuzzi S.; McFiggans G.B.; Coe H.; Bower K.N. *Atmos. Environ.* 2005, *39*, 211-222.
[31] Watanabe K.; Ishizaka Y.; Takenaka C. *Atmos. Environ.* 2001, *35*, 645-655.
[32] Munger J.W.; Collett J.; Daube B.C.; Hoffmann M.R. *Tellus B* 1989, *41B*, 230-242.
[33] Saxena P.; Hildemann L.M. *J. Atmos. Chem.* 1996, *24*, 57-109.
[34] Fuzzi S.; Facchini M.C.; Decesari S.; Matta E.; Mircea M. *Atmos. Res.* 2002, *64*, 89-98.
[35] Collett Jr J.L.; Daube Jr B.C.; Gunz D.; Hoffmann M.R. *Atmos. Environ.* 1990, *24*, 1741-1757.
[36] Munger J.W.; Jacob D.J.; Daube B.C.; Horowitz L.W.; Keene W.C.; Heikes B.G. *J. Geophys. Res.* 1995, *100*, 9325-9333.
[37] Igawa M.; Munger J.W.; Hoffmann M.R. *Environ. Sci. Tech.* 1989, *23*, 556-561.
[38] Houdier S.; Barret M.; Dominé F.; Charbouillot T.; Deguillaume L.; Voisin D. *Anal. Chim. Acta* 2011, *704*, 162-173.
[39] Chebbi A.; Carlier P. *Atmos. Environ.* 1996, *30*, 4233-4249.
[40] Goldstein A.H.; Galbally I.E. *Environ. Sci. Tech.* 2007, *41*, 1514-1521.
[41] Ervens B.; Feingold G.; Frost G.J.; Kreidenweis S.M. *J. Geophys. Res.* 2004, *109*, D15205.
[42] Herrmann H.; Hoffmann D.; Schaefer T.; Bräuer P.; Tilgner A. *ChemPhysChem.* 2010, *11*, 3796-3822.
[43] Warneck P. *Atmos. Environ.* 2003, *37*, 2423-2427.
[44] Tilgner A.; Herrmann H. *Atmos. Environ.* 2010, *44*, 5415-5422.
[45] Ervens B.; Volkamer R. *Atmos. Chem. Phys.* 2010, *10*, 8219-8244.

[46] Feng J.; Möller D. *J. Atmos. Chem.* 2004, *48*, 217-233.
[47] Hoffer A.; Kiss G.; Blazsó M.; Gelencsér A. *Geophys. Res. Lett.* 2004, *31*, L06115.
[48] Graber E.R.; Rudich Y. *Atmos. Chem. Phys.* 2006, *6*, 729-753.
[49] Dinar E.; Taraniuk I.; Graber E.R.; Katsman S.; Moise T.; Anttila T.; Mentel T.F.; Rudich Y. *Atmos. Chem. Phys.* 2006, *6*, 2465-2482.
[50] Deguillaume L.; Leriche M.; Desboeufs K.; Mailhot G.; George C.; Chaumerliac N. *Chem. Rev.* 2005, *105*, 3388-3431.
[51] Marinoni A.; Parazols M.; Brigante M.; Deguillaume L.; Amato P.; Delort A.-M.; Laj P.; Mailhot G. *Atmos. Res.* 2011, *101*, 256-263.
[52] Pöschl U. *Angew. Chem. Inr. Ed.* 2005, *44*, 7520-7540.
[53] Zepp R.G.; Faust B.C.; Hoigne J. *Environ. Sci. Tech.* 1992, *26*, 313-319.
[54] Benkelberg H.J.; Warneck P. *J. Phys. Chem.* 1995, *99*, 5214-5221.
[55] Sedlak D.L.; Hoigné J. *Atmos. Environ. Part A.* 1993, *27*, 2173-2185.
[56] Deguillaume L.; Leriche M.; Monod A.; Chaumerliac N. *Atmos. Chem. Phys.* 2004, *4*, 95-110.
[57] Faust B.C.; Zepp R.G. *Environ. Sci. Tech.* 1993, *27*, 2517-2522.
[58] Berglen T.F.; Berntsen T.K.; Isaksen I.S.A.; Sundet J.K. *J. Geophys. Res.* 2004, *109*, D19310.
[59] Penkett S.A.; Jones B.M.R.; Brich K.A.; Eggleton A.E.J. *Atmos. Environ.* 1979, *13*, 123-137.
[60] Amels T.; Elias H.; Götz U.; Steingens U.; Wannowius K.J. *EUROTRAC* 1996, *3*.
[61] Dentener F.; Williams J.; Metzger S. *J. Atmos. Chem.* 2002, *41*, 109-133.
[62] Leriche M.; Deguillaume L.; Chaumerliac N. *J. Geophys. Res.* 2003, *108*, 4433-4443.
[63] Ziajka J.; Beer F.; Warneck P. *Atmos. Environ.* 1994, *28*, 2549-2552.
[64] Herrmann H. *Chem. Rev.* 2003, *103*, 4691-4716.
[65] Charbouillot T.; Gorini S.; Voyard G.; Parazols M.; Brigante M.; Deguillaume L.; Delort A.-M.; Mailhot G. *Atmos. Environ.* 2012, *56*, 1-8.
[66] Kawamura K.; Steinberg S.; Kaplan I.R. *Atmos. Environ.* 1996, *30*, 1035-1052.
[67] Narukawa M.; Kawamura K.; Li S.M.; Bottenheim J.W. *Atmos. Environ.* 2002, *36*, 2491-2499.
[68] Pinxteren D. van; Plewka A.; Hofmann D.; Müller K.; Kramberger H.; Svrcina B.; Bächmann K.; Jaeschke W.; Mertes S.; Collett Jr J.L.; Herrmann H. *Atmos. Environ.* 2005, *39*, 4305-4320.
[69] Aumont B.; Madronich S.; Bey I.; Tyndall G.S. *J. Atmos. Chem.* 2000, *35*, 59-75.
[70] Monod A.; Poulain L.; Grubert S.; Voisin D.; Wortham H. *Atmos. Environ.* 2005, *39*, 7667-7688.
[71] Monod A.; Doussin J.F. *Atmos. Environ.* 2008, *42*, 7611-7622.
[72] Gelencsér A.; Hoffer A.; Kiss G.; Tombácz E.; Kurdi R.; Bencze L. *J. Atmos. Chem.* 2003, *45*, 25-33.
[73] Mancinelli V.; Decesari S.; Emblico L.; Tozzi R.; Mangani F.; Fuzzi S.; Facchini M. *Water, Air, Soil Pollut.* 2006, *174*, 303-320.
[74] Altieri K.E.; Turpin B.J.; Seitzinger S.P. *Atmos. Chem. Phys.* 2009, *9*, 2533-2542.
[75] Hastings W.P.; Koehler C.A.; Bailey E.L.; Haan D.O. De. *Environ. Sci. Tech.* 2005, *39*, 8728-8735.
[76] Carlton A.G.; Turpin B.J.; Altieri K.E.; Seitzinger S.; Reff A.; Lim H.-J.; Ervens B. *Atmos. Environ.* 2007, *41*, 7588-7602.

[77] Altieri K.E.; Seitzinger S.P.; Carlton A.G.; Turpin B.J.; Klein G.C.; Marshall A.G. *Atmos. Environ.* 2008, *42*, 1476-1490.
[78] Guzmán M.I.; Colussi A.J.; Hoffmann M.R. *J. Phys. Chem. A* 2006, *110*, 3619-3626.
[79] Yao L.; El Haddad I.; Scarfogliero M.; Nieto-Gligorovski L.; Temime-Roussel B.; Quivet E.; Marchand N.; Picquet-Varrault B.; Monod A. *Atmos. Chem. Phys.* 2009, *9*, 5093-5105.
[80] El Haddad I.; Yao L.; Nieto-Gligorovski L.; Michaud V.; Temime-Roussel B.; Quivet E.; Marchand N.; Sellegri K.; Monod A. *Atmos. Chem. Phys.* 2009, *9*, 5107-5117.
[81] Perri M.J.; Seitzinger S.; Turpin B.J. *Atmos. Environ.* 2009, *43*, 1487-1497.
[82] Loeffler K.W.; Koehler C.A.; Paul N.M.; Haan D.O. De. *Environ. Sci. Tech.* 2006, *40*, 6318-6323.
[83] Huthwelker T.; Ammann M.; Peter T. *Chem. Rev.* 2006, *106*, 1375-1444.
[84] Barth M.C.; Stuart A.L.; Skamarock W.C. *J. Geophys. Res.* 2001, *106*, 12381-12400.
[85] Yin Y.; Carslaw K.S.; Parker D.J. *Atmos. Chem. Phys.* 2002, *2*, 293-306.
[86] Salzmann M.; Lawrence M.G.; Phillips V.T.J.; Donner L.J. *Atmos. Chem. Phys.* 2007, *7*, 2027-2045.
[87] Long Y.; Chaumerliac N.; Deguillaume L.; Leriche M.; Champeau F. *Atmos. Res.* 2010, *97*, 540-554.
[88] Pasteur L. *Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère, examen de la doctrine des générations spontanées*; Masson, 1861.
[89] Womack A.M.; Bohannan B.J.M.; Green J.L. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2010, *365*, 3645-3653.
[90] Després V.R.; Huffman J.A.; Burrows S.M.; Hoose C.; Safatov A.S.; Buryak G.; Fröhlich-Nowoisky J.; Elbert W.; Andreae M.O.; Pöschl U. *Tellus* 2012, *64*, 15598-15655.
[91] Imshenetsky A.; Lysenko S.; Kazakov G. *Appl. Environ. Microbiol.* 1978, *35*, 1-5.
[92] Grammatika M.; Zimmerman W.B. *Dyn. Atmos. Oceans* 2001, *34*, 327–348.
[93] Blanchard D.C. *Estuar. Coast.* 1989, *12*, 127–137.
[94] Burger S.R.; Bennett J.W. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, *50*, 487–490.
[95] Aller J.Y.; Kuznetsova M.R.; Jahns C.J.; Kemp P.F. *J. Aerosol Sci.* 2005, *36*, 801-812.
[96] Jones A.M.; Harrison R.M. *Sci. Tot. Environ.* 2004, *326*, 151–180.
[97] Hirano S.S.; Upper C.D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, *64*, 624-653.
[98] Lindemann J.; Upper C. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, *50*, 1229-1232.
[99] Bovallius A.; Bucht B.; Roffey R.; Anas P. *Appl. Environ. Microbiol.* 1978, *35*, 1231-1232.
[100] Lighthart B. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1997, *23*, 263–274.
[101] Burrows S.M.; Butler T.; Jöckel P.; Tost H.; Kerkweg A.; Pöschl U.; Lawrence M.G. *Atmos. Chem. Phys.* 2009, *9*, 9281–9297.
[102] Delort A.-M.; Vaïtilingom M.; Amato P.; Sancelme M.; Parazols M.; Mailhot G.; Laj P.; Deguillaume L. *Atmos. Res.* 2010, *98*, 249-260.
[103] Vaïtilingom M.; Attard E.; Gaiani N.; Sancelme M.; Deguillaume L.; Flossmann A.I.; Amato P.; Delort A.-M. *Atmos. Environ.* 2012, *56*, 88-100.
[104] Bauer H.; Kasper-Giebl A.; Löflund M.; Giebl H.; Hitzenberger R.; Zibuschka F.; Puxbaum H. *Atmos. Res.* 2002, *64*, 109-119.
[105] Amato P.; Parazols M.; Sancelme M.; Laj P.; Mailhot G.; Delort A.-M. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007, *59*, 242-254.
[106] Sattler B.; Puxbaum H.; Psenner R. *Geophys. Res. Lett.* 2001, *28*, 239–242.

[107] Després V.R.; Nowoisky J.F.; Klose M.; Conrad R.; Andreae M.O.; Pöschl U. *Biogeosciences* 2007, *4*, 1127–1141.
[108] DiGiorgio C.; Krempff A.; Guiraud H.; Binder P.; Tiret C.; Dumenil G. *Atmos. Environ.* 1996, *30*, 155–160.
[109] Bauer H.; Giebl H.; Hitzenberger R.; Kasper-Giebl A.; Reischl G.; Zibuschka F.; Puxbaum H. *J. Geophys. Res.* 2003, *108*, 4658‑4662.
[110] Kourtev P.S.; Hill K.A.; Shepson P.B.; Konopka A. *Atmos. Environ.* 2011, *45*, 5399–5405.
[111] Ahern H.; Walsh K.; Hill T.; Moffett B. *Biogeosciences* 2007, *4*, 115–124.
[112] Bowers R.M.; Lauber C.L.; Wiedinmyer C.; Hamady M.; Hallar A.G.; Fall R.; Knight R.; Fierer N. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, *75*, 5121‑5130.
[113] Fierer N.; Liu Z.; Rodríguez-Hernández M.; Knight R.; Henn M.; Hernandez M.T. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, *74*, 200‑207.
[114] Zweifel U.L.; Hagström Å.; Holmfeldt K.; Thyrhaug R.; Geels C.; Frohn L.M.; Skjøth C.A.; Karlson U.G. *Aerobiologia* 2012, *28*, 481‑498.
[115] Amato P.; Hennebelle R.; Magand O.; Sancelme M.; Delort A.M.; Barbante C.; Boutron C.; Ferrari C. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2007, *59*, 255–264.
[116] Temkiv T.Š.; Finster K.; Hansen B.M.; Nielsen N.W.; Karlson U.G. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2012, *81*, 684–695.
[117] Cody Y.S.; Gross D.C. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, *53*, 928–934.
[118] Lindow S.; Arny D.; Upper C. *Appl. Environ. Microbiol.* 1978, *36*, 831‑838.
[119] Lohmann U.; Feichter J. *Atmos. Chem. Phys.* 2005, *5*, 715–737.
[120] Brodie E.L.; DeSantis T.Z.; Parker J.P.M.; Zubietta I.X.; Piceno Y.M.; Andersen G.L. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2007, *104*, 299‑304.
[121] Fahlgren C.; Bratbak G.; Sandaa R.-A.; Thyrhaug R.; Zweifel U. *Aerobiologia* 2011, *27*, 107‑120.
[122] Maron P.A.; Lejon D.P.H.; Carvalho E.; Bizet K.; Lemanceau P.; Ranjard L.; Mougel C. *Atmos. Environ.* 2005, *39*, 3687–3695.
[123] Busse H.J.; Denner E.B.M.; Buczolits S.; Salkinoja-Salonen M.; Bennasar A.; Kämpfer P. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003, *53*, 1253–1260.
[124] Christner B.C.; Mosley-Thompson E.; Thompson L.G.; Zagorodnov V.; Sandman K.; Reeve J.N. *Icarus* 2000, *144*, 479–485.
[125] Foght J.; Aislabie J.; Turner S.; Brown C.E.; Ryburn J.; Saul D.J.; Lawson W. *Microbial Ecol.* 2004, *47*, 329–340.
[126] Miteva V.I.; Sheridan P.P.; Brenchley J.E. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, *70*, 202–213.
[127] Eguchi M.; Nishikawa T.; MacDonald K.; Cavicchioli R.; Gottschal J.C.; Kjelleberg S. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, *62*, 1287–1294.
[128] Arias A.A.; Craig M.; Fickers P. In *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*; A. Mendez-Vilas, 2011; Vol. 2, pp. 977‑986.
[129] Solecka J.; Zajko J.; Postek M.; Rajnisz A. *Cent. Eur. J. Biol.* 2012, *7*, 373–390.
[130] Bell K.S.; Philp J.C; Aw D.W.J; Christofi N. *J. Appl. Microbiol.* 1998, *85*, 195–210.
[131] Ariya P.A.; Amyot M. *Atmos. Environ.* 2004, *38*, 1231–1232.
[132] Deguillaume L.; Leriche M.; Amato P.; Ariya P.; Delort A.M.; Pöschl U.; Chaumerliac N.; Bauer H.; Flossmann A.; Morris C. *Biogeosciences* 2008, *5*, 841–870.
[133] Herlihy L.J.; Galloway J.N.; Mills A.L. *Atmos. Environ.* 1987, *21*, 2397–2402.
[134] Ariya P.A.; Nepotchatykh O.; Ignatova O.; Amyot M. *Geophys. Res. Lett.* 2002, *29*, 2077‑2080.

[135] Côté V.; Kos G.; Mortazavi R.; Ariya P.A. *Sci. Tot. Environ.* 2008, *390*, 530–537.
[136] Vaïtilingom M.; Amato P.; Sancelme M.; Laj P.; Leriche M.; Delort A.-M. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, *76*, 23‑29.
[137] Vaïtilingom M.; Charbouillot T.; Deguillaume L.; Maisonobe R.; Parazols M.; Amato P.; Sancelme M.; Delort A.M. *Atmos. Chem. Phys.* 2011, *11*, 8721‑8733.
[138] Amato P.; Menager M.; Sancelme M.; Laj P.; Mailhot G.; Delort A.M. *Atmos. Environ.* 2005, *39*, 4143–4153.
[139] Amato P.; Demeer F.; Melaouhi A.; Fontanella S.; Martin-Biesse A.S.; Sancelme M.; Laj P.; Delort A.M. *Atmos. Chem. Phys.* 2007, *7*, 4159‑4169.
[140] Delort A.-M. In *Gas Resources for Resource Recovery*; IWA Publishing: London, 2006; pp. 117‑131.
[141] Husárová S.; Vaïtilingom M.; Deguillaume L.; Traikia M.; Vinatier V.; Sancelme M.; Amato P.; Matulová M.; Delort A.M. *Atmos. Environ.* 2011, *45*, 6093–6102.
[142] Monod A.; Chebbi A.; Durand-Jolibois R.; Carlier P. *Atmos. Environ.* 2000, *34*, 5283‑5294.
[143] Davey M.E.; O'Toole G.A. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 2000, *64*, 847–867.
[144] Marvasi M.; Visscher P.T.; Casillas Martinez L. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010, *313*, 1–9.
[145] Sutherland I.W. *Trends Microbiol.* 2001, *9*, 222–227.
[146] Husárová S. PhD thesis. NMR study of C1 compound and saccharide metabolism of *Bacillus sp*. 3B6, a bacterial strain isolated from cloud water. Potential implication for atmospheric processes. Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France, 2011.
[147] Jia Y.; Clements A.L.; Fraser M.P. *J. Aerosol Sci.* 2010, *41*, 62–73.
[148] Jia Y.; Bhat S.; Fraser M.P. *Atmos. Environ.* 2010, *44*, 724–732.
[149] Wang G.; Chen C.; Li J.; Zhou B.; Xie M.; Hu S.; Kawamura K.; Chen Y. *Atmos. Environ.* 2011, *45*, 2473–2479.
[150] Matulová M.; Husárová S.; Capek P.; Sancelme M.; Delort A.M. *Carbohyd. Res.* 2011, *346*, 501–507.
[151] Ekström S.; Nozière B.; Hultberg M.; Alsberg T.; Magnér J.; Nilsson E.D.; Artaxo P. *Biogeosciences Disc.* 2009, *6*, 10035–10056.
[152] Parazols M. Ph-D thesis. Caractérisation physico-chimique et réactivité de la phase aqueuse des nuages prélevée au sommet du puy de Dôme. Blaise Pascal University, Clermont-Ferrand, France, 2007.
[153] Amato P.; Parazols M.; Sancelme M.; Mailhot G.; Laj P.; Delort A.M. *Atmos. Environ.* 2007, *41*, 8253–8263.
[154] Snider J.R.; Dawson G.A. *J. Geophys. Res.* 1985, *90*, 3797–3805.
[155] Leriche M.; Curier R.; Deguillaume L.; Caro D.; Sellegri K.; Chaumerliac N. *J. Atmos. Chem.* 2007, *57*, 281‑297.
[156] Deguillaume L.; Desboeufs K.V.; Leriche M.; Long Y.; Chaumerliac N. *Atmos. Poll. Res.* 2010, *1*, 220‑228.
[157] Imlay J.A. *Annu. Rev. Biochem.* 2008, *77*, 755‑776.
[158] Valko M.; Rhodes C.J.; Moncol J.; Izakovic M.; Mazur M. *Chem.-Biol. Interact.* 2006, *160*, 1–40.

SCH

Résumé

Pendant longtemps, les microorganismes présents dans l'atmosphère n'ont été considérés qu'en tant que particules inertes subissant les conditions hostiles de cet environnement. Cependant, de récentes études mettant en évidence la présence de microorganismes métaboliquement actifs dans la phase aqueuse des nuages incitent à s'interroger sur le rôle que ces organismes pourraient avoir sur les processus physiques et chimiques des nuages. En effet, la formation de gouttelettes de nuage ou de cristaux de glace à des températures supérieures à -36°C nécessite la présence de particules dites « noyaux de condensation » ou « noyaux glaçogènes », dont les bactéries pourraient être des représentantes. De plus, plusieurs travaux ont révélé une importance potentielle des microorganismes dans la transformation de la matière organique dans les nuages. L'objectif de ces travaux de thèse a donc été d'étudier les interactions réciproques entre les microorganismes et les conditions physico-chimiques des nuages.

Dans un premier temps, les composantes physico-chimiques et microbiologiques ont été caractérisées au moyen de prélèvements nuageux au sommet du puy de Dôme (1465 m, France) et des études statistiques ont permis de mettre en avant des corrélations entre les différents paramètres physico-chimiques et/ou biologiques.

Puis, cinq souches microbiennes appartenant à des genres microbiens cultivables majeurs dans les nuages ont été soumises à quatre stress rencontrés dans les nuages : la lumière solaire, la présence de peroxyde d'hydrogène, les variations de chocs osmotiques intervenant lors de la formation et de la dissipation des gouttelettes d'eau et les cycles de gel et de dégel. Il a ainsi été mis en évidence que la lumière solaire et le peroxyde d'hydrogène dans des conditions nuageuses n'ont que peu ou pas d'impact sur la viabilité des cellules. A l'inverse, les chocs osmotiques et le gel-dégel peuvent être hautement délétères selon les souches considérées.

La troisième partie de ce travail s'est focalisé à mettre en évidence la présence de souches bactériennes glaçogènes dans l'eau de nuage. Sept souches ont ainsi ont été identifiées et décrites, et l'une d'entre elles a été choisie comme modèle pour étudier le comportement de bactéries (survie et activité glaçogène) dans une chambre de simulaion de nuage (AIDA, Allemagne). En parallèle, l'activité glaçogène biologique de l'eau de nuage a été mesurée à partir de prélèvements au puy de Dôme et l'activité glaçogène bactérienne a été estimée. L'ensemble de ces travaux met en avant une sous-estimation jusqu'alors des proportions de bactéries glaçogènes dans les modèles numériques simulant les processus microphysiques d'initiation de la glace et des précipitations dans les nuages. Ces données vont désormais pouvoir être considérées dans de tels modèles.

Enfin, afin d'estimer l'étendue de l'importance des microorganismes dans la chimie atmosphérique, il est nécessaire d'avoir recours à des modèles numériques. La dernière étude de cette thèse s'est consacrée à déterminer des constantes cinétiques de biodégradation de trois composés organiques majeurs des nuages par trois souches bactériennes isolées de cet environnement qui pourront servir à paramétrer des modèles numériques. Une première approche simple a permis de confirmer les résultats précédents de l'équipe en mettant en avant une contribution non négligeable des microorganismes dans leur dégradation.

Mots clés : Composition physico-chimique des nuages, microflore nuageuse, activité glaçogène, survie, biotransformation, chimie atmosphérique.

Abstract

Airborne microorganisms have long been considered as inert, passive particles dealing with hostile conditions. Recent studies highlighting metabolic activity in cloud water raised questions about the role these organisms may play on physical and chemical processes in clouds. Indeed, cloud droplets and ice crystals formation at temperature warmer than -36°C need the presence of particles called "cloud condensation nuclei" or "ice nuclei". Bacteria could be one of them. In addition, several works revealed a potential importance of microorganisms in organic matter transformation in clouds. The objective of this thesis was to study the reciprocal interactions between microorganisms and physico-chemical conditions in clouds.

First, cloud physico-chemical and microbiological compositions were described by cloud sampling at the puy de Dôme station (1465 m, France) and statistical analyses were performed to highlight correlations between physico-chemical and/or biological parameters.

Secondly, five microbial strains belonging to genera frequently isolated from cloud water were subjected to four atmospheric stresses: sunlight, hydrogen peroxide, osmotic shocks occurring when water droplets condensate or evaporate and freeze-thaw cycles. Thus, it was pointed that sunlight and hydrogen peroxide at cloud concentration have no or little impact on cell viability. On the opposite, osmotic shocks and freeze-thaw can be highly deleterious depending on the considered strain.

The third part of this thesis focused on the detection of ice nucleating bacterial strains in cloud water. Seven strains were thus identified and described, and one of them was selected as a model to study its behavior (survival and ice nucleation activity, INA) in a cloud simulation chamber (AIDA, Germany). In parallel, biological ice nucleation activity was measured directly on cloud samples and bacterial INA was estimated. All these experiments highlighted underestimations of ice nucleation active bacteria in models simulating microphysical processes in clouds. This new dataset may be used as new parameterization in this kind of models.

Finally, in order to estimate the bacterial contribution in cloud chemistry, numerical means are needed. Therefore, the last study of this thesis focused on the determination of biological kinetic constants that may be implemented in atmospheric chemistry models. The biodegradation of three major organic compounds encountered in cloud water by three bacterial strains isolated from clouds was measured. A first approach confirmed precedent team results highlighting a considerable contribution of microorganisms on the transformation of these compounds.

Keywords: Physico-chemical cloud composition, cloud microflora, ice nucleation activity, survival, biotransformation, atmospheric chemistry.