N° d'Ordre : D.U. 1712

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
U.F.R. Sciences et Technologies

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES
N°178

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur d'UNIVERSITE

Par **Pierre AMATO**

Diplomé d'Etudes Approfondies en Climat et Physico-Chimie de l'Atmosphère (CPCA)

Les communautés microbiennes de l'eau des nuages : Implication dans la chimie atmosphérique

Soutenue publiquement le 11 décembre 2006 devant la commission d'examen

Président :
Cindy MORRIS (CR)

Rapporteurs :

Jean-Louis COLIN (Pr)	Laboratoire Interuniversitaire des Sciences Atmosphériques (LISA), Créteil, France
Jean-Jacques GODON (DR)	Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA, Narbonne, France

Examinateurs :

Cindy MORRIS (CR)	Unité de Pathologie Végétale, INRA, Montfavet, France
Enric ROBINE (Dr)	Responsable du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Intérieurs (LMEI) du Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB), Marne-la-Vallée, France
Anne-Marie DELORT (DR)	Laboratoire de Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB), Aubière, France
Paolo LAJ (Physicien)	Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP), Aubière, France

-Remerciements-

Je remercie d'abord Nadine Chaumerliac et Jean Bolte, directeurs respectifs du LaMP et du SEESIB, pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire depuis mon stage de DEA.

Je citerai ensuite en premier lieu mes directeurs de thèse, Anne-Marie Delort et Paolo Laj, ainsi que Gilles Mailhot, qui m'ont offert ce sujet de recherche passionnant. Je les remercie pour leur encadrement suivi, sans être oppressant, pour leur rigueur scientifique chacun dans son domaine, et pour leur aide et la confiance qu'il m'ont témoigné de façon générale.

Je remercie aussi particulièrement Martine Sancelme, pour les 8542 milieux préparés et coulés, les 165 autoclaves lancés à l'improviste…etc. Elle a veillé au bon déroulement pratique des manipulations au SEESIB, et je tiens à la remercier pour sa présence et son aide au quotidien, sa disponibilité et sa compréhension.

Merci aux équipes Ecotoxicologie et Cytosquelette du laboratoire de Biologie des protistes pour tout ce qui concerne la microscopie et les dosages d'ATP. Mes remerciements s'adressent particulièrement à Isabelle Batisson, Frédérique Bonnemoy, Clarisse Mallet, Stéphane Pesce et Gérard Coffe toujours prêts à m'aider les nombreuses fois où je les ai sollicité. Un grand merci aussi à Anne-Catherine Lehours pour son dévouement lorsqu'il s'agit d'aider pour les manipulations et de partager se compétences, ainsi que pour sa joie de vivre toujours agréable.

L'ensemble du personnel de l'équipe d'Evelyne Forano de l'INRA de Clermont-ferrand-Theix est également grandement remerciée pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire, et plus particulièrement Christel Béra-Maillet et Yves Ribot qui m'ont accueilli sur leurs paillasses de biologie moléculaire, et n'étaient jamais avares de conseils et de recommandations.

Pour tout un tas de choses que je ne pourrais pas résumer en quelques lignes, je remercie Marius Parazols et Matthieu Ménager. Depuis le bon vieux temps des nuits passées dans le chalet du puy de Dôme à chasser le nuage, à « se geler pour faire avancer la science mais on aime ça » (Qu'est-ce-que j'entends ? on tient des propos intolérables...ah si seulement on avais eu des sous-pulls de chez jeucépluki), aux week-ends à La Brousse (Calimucho !). En bref, je vous remercie pour l'« *ensemble de votre œuvre* ». Merci aussi à Angela Marinoni, notre prédécesseur dans les nuages, toujours très enthousiaste, qui m'a transmis son expérience concernant les prélèvements d'eau de nuage.

Je remercie également les stagiaires de DEA et de Master, Florence Demeer, Sébastien Raymond (qui était aussi là pour « se geler pour faire avancer la science mais on aime ça »),

Stéphane Fontanella, ainsi qu'Amina Melaouhi qui ont grandement contribué aux résultats présentés ici, pour tous les dimanches qu'ils ont passé sur le spectro pour passer les échantillons et leur travail souvent acharné.

Sans ordre particulier, je tiens aussi à remercier Pascale Besse-Hoggan, Bruno Combourieu et Mounir Traikia pour leur conseils avisés de spécialistes de la RMN et des biodégradations, Jean-Marc Pichon, Christophe Gourbeyre et Pierre Chausse du LaMP pour leur aide logistique au puy de Dôme, Elodie Canot, du SEESIB, pour ce qui est des manipulations de microbiologie, et Anne-Sophie Martin-Biesse pour son aide dans les analyses par RMN.

Je remercie évidemment l'ensemble des thésards des différents laboratoires, d'abord Paolo Villani (merci pour le temps passé à avoir essayé d'automatiser les prélèvements de nuage) et Rémi Lefevre avec qui je partage le bureau des étudiants du LaMP depuis le DEA. Merci également aux thésards du SEESIB, Stéphanie Durand, Marlène Goubert et Elisabeth Conchon et à ceux co-encadrés par le SEESIB et le LPMM, Charlène Chorao et Andreï Bunescu, tous toujours prêts à discuter 5 minutes au détour d'un couloir ou d'un labo, ou autour d'un café.

Enfin, je ne pourrais conclure ces remerciements sans m'adresser à Ptibibi : un grand merci pour ton soutien sans faille tout au long de cette thèse, ce qui je le conçois n'a pas dû être toujours facile. Je ne rentrerai pas dans les détails, qui feraient doubler le volume de ce manuscrit déjà épais… Pap' & Mam', Sylv', Raf', Seb' et Ewan, je vous remercie pour votre présence et vos efforts de compréhension lors des passages « de bourre ». Enfin, merci à tous les potes (en vrac, mais les femmes d'abord !) : Mag', Julie, Béa & Oliv', Polo, Fab', Mota, Tonton, Richard, Christian, et à tous ceux que j'ai cité déjà et qui sont aussi des amis qui m'ont soutenu de prêt ou de loin dans la réalisation de ce travail….

Table des matières

Table des matières **4**

Introduction Générale **9**

Synthèse Bibliographique **13**

I. DES MICRO-ORGANISMES PARMI LES AEROSOLS 14
I.1. Historique **14**
I.2. Les bioaérosols **16**
I.2.a) Définition 16
I.2.b) Contribution au contenu particulaire total 17
I.2.c) Composition chimique des bioaérosols 18
I.3. Les méthodes de prélèvement utilisées en aérobiologie **18**
I.3.a) Collecte des aérosols secs 18
I.3.a.(i) Les filtres *18*
I.3.a.(ii) Les impacteurs *18*
I.3.a.(iii) Les Impingers *21*
I.3.b) Collecte des gouttelettes de nuage 22
I.3.b.(i) Les string-collectors *22*
I.3.b.(ii) Les impacteurs à gouttelettes *22*
II. LE CONTENU MICROBIEN DE L'ATMOSPHERE 25
II.1. Les micro-organismes : des particules comme les autres ? **25**
II.1.a) Aérosolisation et transport 25
II.1.b) Association avec des particules 27
II.1.c) Propriétés de nucléation 28
II.1.d) Activité métabolique 29
II.2. Aspect quantitatif et facteurs de variabilité **29**
II.2.a) Abondance : méthodes et commentaires 29
II.2.a.(i) Cellules totales *29*
II.2.a.(ii) Cellules viables *30*
II.2.b) Variabilité spatiale 31
II.2.b.(i) Variabilité horizontale : effet de site *31*
II.2.b.(ii) Variabilité verticale : influence de l'altitude *33*
II.2.c) Variabilité temporelle 34
II.2.c.(i) Variabilité saisonnière *34*
II.2.c.(ii) Variabilité diurne *35*
II.2.c.(iii) Périodicité globale *36*
II.2.d) Facteurs météorologiques 37
II.2.d.(i) Température *37*
II.2.d.(ii) Vitesse du vent *39*
II.2.d.(iii) Humidité relative et précipitations *39*
II.2.e) Caractéristiques chimiques 40
II.2.f) Bilan 41
II.3. Aspect qualitatif : les groupes microbiens identifiés **41**

III. LES NUAGES : UN MILIEU EXTREME POUR LE VIVANT 45
III.1. Vie, mort et résistance microbiennes 46
III.1.a) Vie et mort microbiennes 46
III.1.b) La sporulation 46
III.1.c) L'état viable non-cultivable (VBNC) 47
III.1.d) Les ultramicrobactéries 48
III.2. Facteurs de stress et réponses bactériennes 49
III.2.a) Généralités sur la réponse au stress 49
III.2.b) Les différents facteurs de stress rencontrés dans l'atmosphère 51
III.2.b.(i) L'aérosolisation 51
III.2.b.(ii) Les oxydants 51
III.2.b.(iii) Le rayonnement solaire 52
III.2.b.(iv) L'humidité de l'air, la dessiccation et l'osmose 53
III.2.b.(v) Le stress nutritionnel 56
III.2.b.(vi) L'acidité du milieu 57
III.2.b.(vii) Le froid 57
III.3. Activité en milieu froid et métabolisme microbien 59
III.3.a) Les bactéries psychrophiles 59
III.3.b) Enzymes et basses températures 60
III.3.c) La multiplication cellulaire dans les nuages 61
III.4. Eléments de métabolisme microbien 62
III.4.a) Métabolisme central 62
III.4.b) Métabolisme des composés en C_1 65
III.4.b.(i) Généralités 65
III.4.b.(ii) Oxydation du méthane et du méthanol 66
III.4.b.(iii) Le formaldéhyde 67
III.4.b.(iv) Oxydation du formiate 71
III.4.c) Assimilation des autres éléments (N, P, S) 72
III.4.c.(i) Assimilation de l'azote 72
III.4.c.(ii) Assimilation du Phosphore 72
III.4.c.(iii) Assimilation du soufre 73
III.4.d) La spectroscopie par RMN et l'étude du métabolisme 73

Problématique 77

Résultats 83

I. PREMIERS RESULTATS 84
I.1. Contexte de l'étude 84
I.1.a) Laboratoires impliqués 84
I.1.b) Mise au point du protocole 84
I.1.b.(i) Gestion de l'échantillon 86
I.1.b.(ii) Dénombrement des cellules totales 86
I.1.b.(iii) Cultures 86
I.1.b.(iv) Identification des souches 86
I.1.b.(v) Tests de biodégradation 86
I.1.b.(vi) Analyse moléculaire 87
I.2. Premiers résultats 87
I.2.a) Problèmes rencontrés 87
I.2.b) Résumé et commentaires 88
I.2.c) Publication 88

I.3. Conclusion et perspectives à la suite de ces premiers résultats 100
II. INFLUENCES DES FACTEURS ABIOTIQUES SUR LE CONTENU MICROBIEN DES NUAGES COLLECTES AU SOMMET DU PUY DE DOME 101
II.1. Introduction 101
II.2. Principaux résultats 101
II.2.a) Remarques et commentaires 101
II.2.b) résumé 102
II.2.c) Publication 103
II.3. Résultats complémentaires et commentaires 116
II.3.a) Concentration en ATP 116
II.3.b) Influence des paramètres météorologiques 117
II.3.b.(i) Effet de la température 117
II.3.b.(ii) Effet de la vitesse du vent 118
II.3.c) Influence de l'origine de la masse d'air 119
II.3.d) Poids des facteurs de variabilité temporelle et chimique 121
II.3.e) Caractéristiques anthropiques 122
II.3.f) Suivi temporel d'un évènement nuageux 123
II.3.f.(i) Observations 123
II.3.f.(ii) Scénario du déroulement de l'évènement 125
II.4. Conclusion 126
III. LES GROUPES MICROBIENS IDENTIFIES DANS LES NUAGES 128
III.1. Principaux résultats 128
III.1.a) Contexte et résumé 128
III.1.b) Publication 129
III.2. Résultats complémentaires et commentaires 143
III.2.a) Observations microscopiques et identifications 143
III.2.a.(i) Observations microscopiques 143
III.2.a.(ii) Identification bactérienne 144
III.2.b) Comparaison entre les échantillons 146
III.2.c) Caractéristiques particulières de certaines souches 148
III.2.c.(i) Pigmentation 149
III.2.c.(ii) Propriétés de nucléation 149
III.2.c.(iii) Dégradation de xénobiotiques 150
III.3. Conclusion 151
IV. METABOLISME DES SOUCHES ISOLEES ET IMPLICATION DANS LA CHIMIE DES NUAGES 153
IV.1. Résultats généraux pour l'ensemble des souches (screenings) 153
IV.1.a) Introduction 153
IV.1.b) Publication 154
IV.1.c) Compléments de résultats : métabolites produits 171
IV.1.c.(i) Les acides carboxyliques 171
IV.1.c.(ii) Cas du formaldéhyde et du méthanol 173
IV.2. Influence de la température sur les efficacités de biodégradation 177
IV.2.a) Introduction 177
IV.2.b) Publication 177
IV.2.c) Complément de résultats 191
IV.2.c.(i) Calcul des temps de doublement 191
IV.2.c.(ii) Calcul des vitesses de dégradation 191

IV.3. Utilisation du formaldéhyde ^{13}C et cinétiques détaillées de dégradation des composés en C_1 par des souches sélectionnées 192
IV.3.a) Résultats 193
IV.3.b) Calcul des vitesses de transformation 195
IV.4. Transposition des résultats au nuage 196
IV.4.a) « Temps de vie » des composés dans le nuage 196
IV.4.b) Commentaires et critique générale 201
IV.4.b.(i) Souches testées 202
IV.4.b.(ii) Concentrations en cellules et en substrats 202
IV.4.b.(iii) Conditions de tests 203
IV.5. Conclusion 203

Conclusion générale 205

Perspectives 207

Références bibliographiques 209

Annexes 219

Table des illustrations 295

PUBLICATIONS ASSOCIEES A CETTE THESE

(*Voir reférences complètes dans la section références bibliographiques*)

Publiées ou sous presse :

Amato et al., 2005 (Premiers résultats)	page 89
Amato et al., 2007a (Description des souches isolées)	page 130
Amato et al., 2007b (Arctique)	page 285
Durand et al., 2006 (Biodégradation mésotrione)	Non présentée
Magand et al., 2006 (Radionucléides Arctique)	Non présentée
Parazols et al., 2006 (Chimie du fer dans les nuages)	Non présentée

Soumises ou à soumettre…:

Amato et al., soumis en décembre 2006 (Résultats PDD)	page 104
Amato et al., soumis en février 2007 (Biodégradations toutes souches)	page 155
Amato et al., soumis en février 2007 (Biodégradations basse température)	page 179
Deguillaume et al., à soumettre (Discussion implications aérobio)	Non présentée

Introduction Générale

Les nuages regroupent seulement 0,03% (~12000 km^3) de l'eau douce sur Terre, mais ils sont d'une importance capitale au niveau du climat terrestre dans son ensemble. Ils représentent d'une part des obstacles physiques aux rayonnements lumineux incidents et sortants, mais sont aussi considérés comme de véritables « réacteurs » de la chimie atmosphérique, où les différents constituants atmosphériques se retrouvent en solution dans les gouttelettes qui les compose. Les nuages résultent de la condensation de la vapeur d'eau sur les noyaux que constituent de nombreuses particules d'aérosols, appelés alors CCN (Cloud Condensation Nuclei) ou IN (Ice Nuclei), en grande partie produits par condensation de gaz précurseurs dans l'atmosphère, mais aussi par émission directe depuis le sol. Si une partie de l'aérosol se dissout dans la gouttelette, on trouve aussi parmi la matière non soluble présente dans les nuages des particules biologiques, ce qui inclut des débris végétaux et animaux et des pollens, mais aussi des micro-organismes. On sait depuis leur découverte en 1860 par Pasteur qu'ils sont présents et en vie dans l'atmosphère, et ils ont été relativement bien étudiés en air intérieur pour des raisons d'hygiène. Cependant, ils ne sont pourtant encore aujourd'hui que très peu connus en air libre et les études concernant spécifiquement les nuages se comptent sur les doigts d'une seule main. Leur présence dans ces milieux n'est pourtant pas négligeable, puisqu'on en dénombre plusieurs milliers, voire dizaines de milliers par millilitre d'eau de nuage, et qu'ils sont physiologiquement actifs malgré la température. Cela implique que des composés chimiques propices au développement des micro-organismes se trouvent dans l'eau de nuage, et que les cellules les utilisent comme substrats. Il est d'ailleurs bien connu des chimistes de l'atmosphère que les échantillons d'air (aérosols) doivent être stérilisés (en général par du chloroforme) pour être conservés. Cette composante microbiologique de la chimie atmosphérique est malgré cela encore totalement ignorée et négligée en chimie atmosphérique, sans savoir si elle peut effectivement l'être dans des modèles de prévision qui se veulent précis.

Notre but à travers cette étude est donc d'abord de décrire le contenu microbien des nuages, puis d'estimer son niveau d'implication dans la chimie en phase aqueuse des nuages. L'étude est centrée sur des échantillons collectés au sommet du puy de Dôme, où se trouve un observatoire privilégié pour l'étude des nuages. Il est en effet nécessaire d'aller échantillonner les nuages là où ils se trouvent pour comprendre les processus physiques et chimiques qui s'y déroulent. En effet, la majeure partie des nuages ne précipite pas et, d'autre part, la pluie est

plus facile à échantillonner mais sa chimie résulte de phénomènes multiples et est en conséquence beaucoup plus complexe à interpréter. La variabilité qualitative et quantitative du contenu microbien de l'eau de nuage pour ce site doit d'abord être décrite, avant de s'intéresser en laboratoire aux potentialités biochimiques des souches isolées. Il s'agit à long terme de collecter des informations pour alimenter les modèles informatiques de chimie atmosphérique. La problématique très interdisciplinaire de ce sujet a été abordée à travers différentes questions, articulées autour de deux thèmes principaux :

Communauté microbienne
de l'eau des nuages

Structure de la communauté

- Qui sont les populations microbiennes rencontrées?
- Existe-t-il des relations entre les compositions microbiennes et chimiques ?
- Quel est l'effet des activités humaines ?
- Quelle est l'influence des facteurs météorologiques ?

Fonctionnement des populations

- Quel est le niveau d'activité des micro-organismes dans l'eau des nuages ?
- Sont-ils capables de dégrader des composés d'intérêt en chimie atmosphérique?
- De tels processus enzymatiques sont-ils envisageables dans les nuages ?

Le sujet a dû être développé entre le Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP) et le Laboratoire de Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB), en se basant sur les quelques études publiées :

- Celle de Fuzzi et al. (1997), qui s'intéresse aux micro-organismes cultivables dans le brouillard, mais qui reste assez peu comparable (altitude, méthodes de prélèvement et d'analyse) ;

- Celle de Sattler et al. (2001), qui a démontré l'activité des micro-organismes des nuages à la température de 0°C, mais à partir d'un seul évènement et sans autre résultat ;

- Celle de Bauer et al (2002a), qui renseigne sur le contenu quantitatif microbien de l'eau de nuages, entre autres milieux, mais considère seulement 3 évènements nuageux ;

- Celle de Ariya et al. (2002), qui est la seule qui considère les micro-organismes comme des catalyseurs de la chimie du milieu, mais dont les conditions expérimentales restent relativement floues.

Cette liste de travaux plus ou moins comparables est exhaustive et témoigne du manque flagrant de connaissances dont nous disposons à l'heure actuelle. Seuls quelques échantillons d'eau de nuage ont jusqu'ici été analysés pour leur contenu microbiologique. Sans avoir la

prétention de combler ces lacunes, notre étude doit contribuer à améliorer notre niveau de connaissance en matière de microbiologie des nuages. Après une synthèse bibliographique récapitulant la littérature au sujet des micro-organismes de l'atmosphère de façon large, les résultats obtenus sont exposés en deuxième partie, essentiellement sous la forme des publications qui ont suivi ou qui doivent être soumises très prochainement. Cela concerne le contenu microbien et sa variabilité quantitative sous l'influence de paramètres abiotiques. L'aspect qualitatif est ensuite traité, avant de s'intéresser spécialement au métabolisme des micro-organismes isolés des échantillons et à l'estimation de leur implication dans la chimie des nuages.

Synthèse Bibliographique

[…*il y a toujours en suspension dans l'air ordinaire, des corpuscules organisés*…]
Louis Pasteur (1860)

« Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère,
Examen de la doctrine des générations spontanées »
Annales de Chimie et de Physique

Les différents aspects du transit des micro-organismes dans l'atmosphère sont synthétisés ici, depuis leur aérosolisation jusqu'à leur collecte par des expérimentateurs situés au sommet du puy de Dôme, en passant évidemment par les nuages. Les méthodes de collecte, puis le contenu quantitatif et qualitatif microbien de l'atmosphère lui-même sont d'abord abordés. Ensuite, il est plus largement question des implications de la vie dans les nuages, des points de vue physiologique et biochimique.

I. DES MICRO-ORGANISMES PARMI LES AEROSOLS

I.1. Historique

C'est par leur présence dans l'air que l'existence des bactéries a pu être mise en évidence. **Ce chapitre retrace l'historique de l'aérobiologie**, depuis les recherches ayant finalement mené à la découverte des bactéries telles que les rapporte Pasteur dans son « *Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère* » (1860), à aujourd'hui.

Avant la découverte des organismes microbiens, on assistait à une lutte d'influence des hommes de science par communications interposées, entre les partisans de l'existence des générations spontanées, et les autres, qui s'efforçaient de démontrer le contraire. Aristote disait en son temps que « *tout corps sec qui devient humide et tout corps humide qui se sèche, engendrent des animaux* », argumentant déjà en faveur des générations spontanées. Ce débat sur l'existence de générations spontanées réapparut au XVIIème siècle. Bon nombre de savants décrivaient le moyen de faire naître des souris ou des grenouilles à partir, par exemple, de limons de marais (Leewenhoeck, Epistola 75, 1692). On fit un peu plus tard le lien entre des mouches pondant dans un fruit et le ver qui en sort plus tard : ce dernier n'était pas « *engendré* » par la « *corruption* » du fruit mais en était la cause. En 1745, Needham, éminent prêtre catholique anglais, s'affairait à mettre en évidence l'existence de générations spontanées à l'aide de vases clos exposés à la chaleur et qui montraient l'apparition de germes. Cela lui valut d'être membre de la Société Royale de Londres, puis associé de l'Académie des Sciences. Il était soutenu par Buffon, mais remis en cause par l'abbé Spallanzani (Opuscules de physique animales et végétale, 1777), qui, en refaisant les expériences de Needham, n'observait rien qui pourrait ressembler au développement d'« animalcules » après avoir fait bouillir les vases clos pendant une heure et en les « *abandonnant à eux-mêmes* ». A cette époque, Lavoisier venait de découvrir la composition de l'air (1774), et Needham s'en servit pour mettre en cause ces contre-manipulations : la composition de l'air aurait changée pendant cette heure, ce qui empêcherait l'apparition de germes. Dans le même temps, Gay-Lussac et Appert appliquèrent ces expériences dans un but domestique et remarquèrent que des substances alimentaires (bœuf, mouton, poisson, petits pois) enfermées dans des bouteilles sont bien conservées après un long moment soumis à la température de l'eau bouillante. Ce sont les « *conserves d'Appert* » dans lesquelles, effectivement, on remarque l'absence d'oxygène, donnant raison à Needham quant à l'implication de la composition de l'air sur le développement de générations spontanées. Ce fut l'explication acceptée, jusqu'à ce que le Dr Schwann la remette en cause en reprenant les expériences de Spallanzani, mais en renouvelant continuellement l'air des vases grâce à un système de tubes, qui apportaient l'air après qu'il ait été chauffé à très haute température. Ses conclusions furent les mêmes que celles de Spallanzani, en précisant que l'air chauffé, puis refroidi, laissait intact un liquide organique précédemment porté à ébullition. L'absence d'oxygène n'était donc pas seul à l'origine de la conservation, dans les conserves d'Appert. Schwann alla encore plus loin, élargissant ses expériences à la fermentation alcoolique, alors connue : en faisant bouillir de la levure de bière mélangée à du sucre et en l'exposant à une entrée d'air directe pendant un mois, la fermentation avait lieu. Par contre, si cette entrée d'air apportait de l'air « *calciné* », rien ne se produisait. Cependant, les exigences de stérilité nécessaires à ces expériences étaient difficiles à respecter, et les conclusions n'allaient donc pas toujours dans le même sens et étaient parfois même contradictoires. Néanmoins, la grande conclusion, très prudente, de Schwann fut que « *pour la fermentation, comme pour la putréfaction, ce n'est pas l'oxygène, du moins l'oxygène seul, de l'air atmosphérique, qui les occasionne, mais un principe renfermé dans l'air ordinaire et que la chaleur peut détruire* ».

Bien plus tard, dans les années 1850, Schroeder et Dusch montrent, par leurs expériences consistant à amener de l'air filtré par du coton à une jarre préalablement chauffée et contenant une substance organique, qu' « *il y a des décompositions spontanées de substances organiques qui n'ont besoin pour commencer que de la présence d'oxygène* (lait, viande), *et d'autres qui nécessitent des choses inconnues mêlées à l'air atmosphérique* (moût de bière ou viande immergée dans l'eau) ».

Louis Pasteur, pour sa part, s'intéressait alors aux fermentations, et observa que toutes (visqueuse, lactique, butyrique,…) sont liées à la multiplication d'êtres organisés, comme dans le cas de la levure de bière, connu depuis 1836. Mais ces considérations demeuraient insuffisantes pour répondre à la question de savoir si la présence de ces êtres organisés était liée à celle de l'oxygène, ou si l'oxygène était seulement un *excitant* pour ces germes.

Devant les nombreux travaux plus ou moins contradictoires s'évertuant à fournir la preuve de l'existence (ou de la non-existence) des générations spontanées, l'Académie des Sciences demande en janvier 1860 des expériences claires : « *Essayer, par des expériences bien faites, de jeter un jour nouveau sur la question des générations spontanées* ».

Pasteur présente ses travaux et conclusions sur le sujet dès 1860 et prouve sans ambiguïté la présence de germes dans l'air, qui s'avèrent être à l'origine de ce que l'on croyait être des générations spontanées. Pour cela, il décide de s'appuyer sur les observations microscopiques, bien que controversées, de Pouchet (Traité de la génération spontanée, 1859), décrivant des « *œufs de Microzoaires* » et des spores de « *Cryptogames* » dans des poussières. Pour Pasteur, ce n'est cependant pas dans la poussière au repos qu'il convient de chercher, mais dans celle en suspension dans l'air. Il récupère donc par filtration sur du coton les poussières de l'air provenant de la rue, à plusieurs mètres du sol. Ses échantillonnages sont réalisés avec un très faible débit (~1 L min^{-1}), pendant 24 heures. Il dissout finalement le coton avec un mélange alcool/éther et observe les poussières de l'air récoltées au microscope : plusieurs milliers de corpuscules organisés sont présents dans l'échantillon, et c'est donc bien la preuve que l'air transporte des germes microscopiques. Ils sont de plus détruits par la chaleur, comme Pasteur le montrera, inventant ainsi la célèbre méthode de pasteurisation, ce qui permit alors de comprendre les résultats des expériences menées au siècle précédent (Spallanzani et Schwann).

La théorie des générations spontanées tomba donc avec la démonstration que des micro-organismes (*corpuscules organisés*) existent dans l'air. Il est intéressant de constater que les bactéries ont été mises en évidence pour la première fois par le biais de prélèvements d'air, alors que des études portant sur l'aérobiologie restent relativement peu nombreuses encore aujourd'hui. Déjà à cette époque, Pasteur pensait « *…qu'il y aurait un grand intérêt à multiplier les études sur ce sujet et à comparer dans un même lieu avec les saisons, dans des milieux différents à une même époque, les corpuscules organisés disséminés dans l'atmosphère* », dans un but surtout sanitaire. Il montra alors que leur nombre varie en fonction des conditions : avant/après la pluie, temps calme ou agité, jour/nuit ou encore distance du sol. Plus proche de notre sujet, il s'intéressa brièvement dès 1861 aux poussières et aux micro-organismes contenus dans le brouillard, montrant leur existence dans ces milieux.

Le développement de l'aviation a permis plus tard de réaliser des prélèvements à des altitudes élevées. En 1935, Meier décrit des micro-organismes cultivés à partir de l'exposition à l'air de milieux de cultures, depuis un vol au-dessus du sol subarctique nord américain. Les prélèvements ont été réalisés par l'aviateur Charles Lindbergh. Newman, en 1948, profite des vols commerciaux des avions de ligne pour réaliser ses études, et cultive également des micro-organismes depuis des altitudes élevées.

I.2. Les bioaérosols

I.2.a) Définition

Selon la définition des **particules d'aérosols biologiques primaires** (PBAP, pour primary biological aerosol particles) donnée au IGAP-workshop de Genève en juin 1993 (citée dans Matthias-Maser & Jaenicke, 1995), il s'agit de particules aériennes solides mortes ou vivantes, originaires d'organismes vivants. Cela inclut une large gamme de particules : virus (~0,005 µm < r < ~0,25 µm), bactéries (r > ~0,2 µm), algues et champignons/levures (r > ~0,5 µm), pollens (r > ~5 µm) et débris végétaux et animaux (toutes tailles). Ils sont donc présents sur l'ensemble du spectre de taille des aérosols totaux.

Un aperçu de ces bioaérosols observables par microscopie électronique à balayage (MEB) est donné par Wittmaack et al. (2005) (figure 1). Ils montrent notamment la présence de débris végétaux, d'écailles d'insectes, de spores fongiques, de bactéries et de brochosomes (produits de sécrétion de certains insectes Hémiptères).

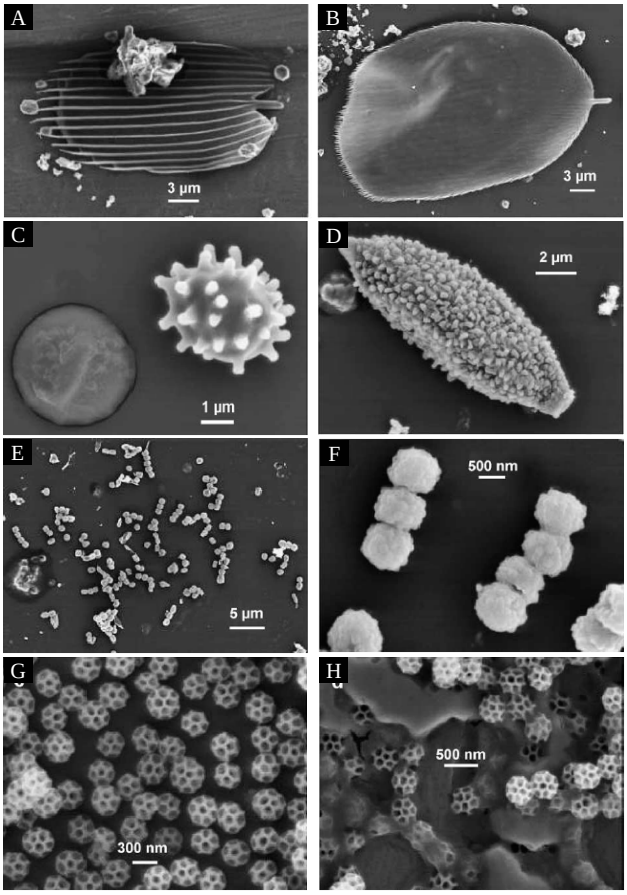


Figure 1 : Différents types de bioaérosols vus au microscope électronique à balayage. **A et B** : Ecailles d'insectes ; **C** : Conidie de *Penicillium* ou d'*Aspergillus* ; **D** : Conidie de *Cladosporium herbarum* ; **E et F** : Bactéries ; **G et H** : Brochosomes. (Wittmaack et al., 2005).

Les bioaérosols sont d'une grande importance au niveau de la santé humaine et de l'hygiène, souvent facteurs d'allergies (surtout dans le cas des pollens) et d'infections par inhalation de virus, de bactéries et de spores fongiques. Enfin, comme nous le verrons plus loin dans ce chapitre, certains possèdent des propriétés pouvant leur donner la possibilité d'influencer la physico-chimie des nuages.

I.2.b) Contribution au contenu particulaire total

On peut trouver des bioaérosols sur l'ensemble du spectre de taille des particules atmosphériques et ils peuvent occuper une place importante. En air sec, dans une zone semi urbaine d'Allemagne, Matthias-Maser & Jaenicke (1995) évaluent leur concentration à 1,9 cm^{-3} (1,9 x 10^6 m^{-3}), correspondant à environ 30% du nombre total de particules d'un diamètre aérodynamique compris entre 0,2 et 10 µm, ou encore à 15% du volume particulaire total. Une influence anthropogénique sur la masse d'air conduit à une augmentation de la concentration en bioaérosols (Matthias-Maser et al., 2000).

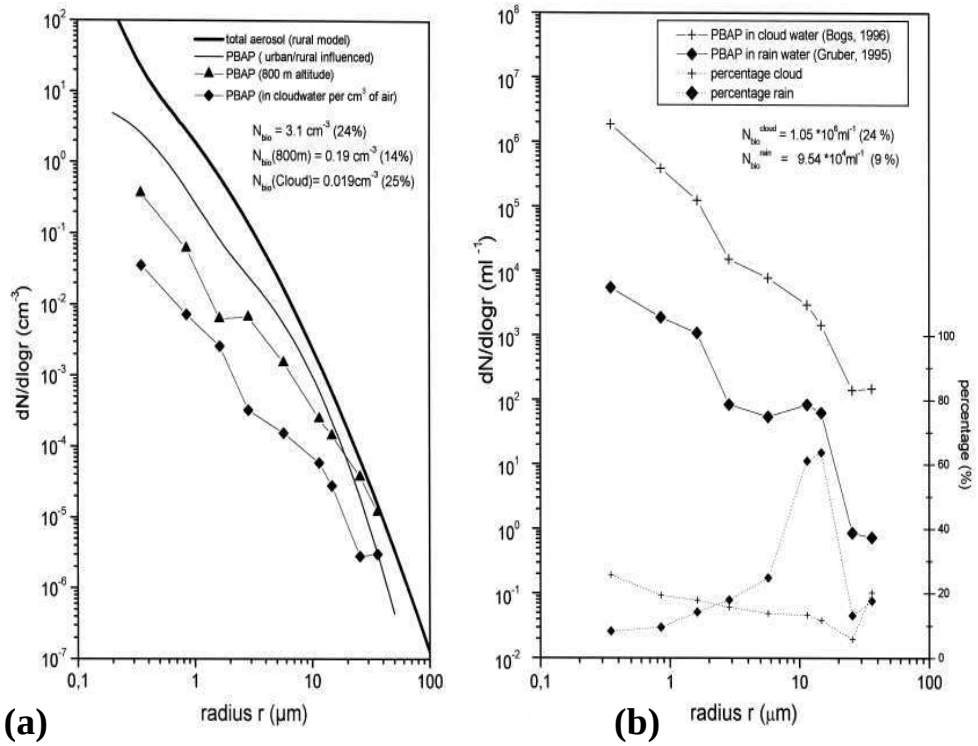


Figure 2 : Distribution du nombre de bioaérosols en fonction de leur taille. **(a)** au niveau du sol, à 800 m d'altitude et dans l'eau de nuage (N cm^{-3}); **(b)** dans l'eau de nuage et l'eau de pluie ($N.mL^{-1}$). L'unité utilisée en ordonnée correspond au nombre de particules normalisé par le log de leur rayon ; **PBAP** : Primary Biological Aerosol Particles. (Matthias-Maser et al., 2000).

Dans l'eau de nuage, même si leur nombre est environ 10 fois moindre que celui rencontré à 800 mètres d'altitude hors nuage (figure 2a, respectivement ◆ et ▲), les particules biologiques occupent y une place relativement plus importante (25% du nombre total contre 14%) (Matthias-Maser et al., 2000). Dans les deux cas, les bioaérosols de la taille des bactéries (~1 µm) sont les plus nombreux, et leur nombre diminue quand la taille augmente. Comme pour l'ensemble des particules (Schütz & Krämer, 1987), ils sont moins concentrés dans l'eau de pluie que dans celle du nuage sous l'effet de la dilution (Figure 2b, respectivement + et ◆). Casareto et al. (1996) en dénombrent environ 2 x 10^4 mL^{-1} dans l'eau de pluie, ce qui représente entre 23% et 34% du nombre total de particules insolubles. Ils retrouvent essentiellement des bioaérosols de plus de 10 µm, très peu présents dans les gouttelettes de nuage, et provenant par conséquent du lessivage de l'air par la goutte avant d'atteindre le sol.

I.2.c) Composition chimique des bioaérosols

Les bioaérosols font partie du **carbone organique particulaire non soluble** dans l'eau. Différents types de ces particules insolubles présentes dans l'eau de pluie ont été observés par microscopie à énergie à dispersion des rayons X par Casareto et al. (1996). Dans leurs échantillons, une particule minérale apparaît avant tout caractérisée par la présence de silice Si, représentant généralement plus de 50 % de la masse des éléments détectés, et d'aluminium (Al). La présence de phosphore (P) est propre aux particules biologiques, les bactéries étant spécifiquement repérées par l'abondance de sodium (Na), en plus du phosphore (P). Cette technique permet d'établir une signature chimique des aérosols, et ainsi de détecter les différents types de particules et leurs associations (observation d'un pic de Si et de P en cas d'association entre matériel minéral et biologique par exemple).

I.3. Les méthodes de prélèvement utilisées en aérobiologie

Les moyens de prélèvement et d'analyses d'échantillons atmosphériques sont nombreux et dépendent évidemment de ce que l'on cherche. Ce paragraphe a pour objectif de donner un aperçu des méthodes existantes utilisées dans différents travaux ayant trait aux bioaérosols, et plus particulièrement aux microorganismes de l'air et des nuages.

Il est bien sûr possible, pour collecter des micro-organismes de l'air, d'ouvrir une boite de Pétri contenant un milieu de culture et de l'exposer à l'air, comme le faisaient les premiers expérimentateurs (Newman, en 1948, par exemple). Cependant, les problèmes posés par le caractère passif de cette méthode apparaissent rapidement (volume et nature réelle de l'échantillon collecté), la passivité entraînant un manque de significativité et de reproductibilité des résultats.

I.3.a) Collecte des aérosols secs

I.3.a.(i) Les filtres

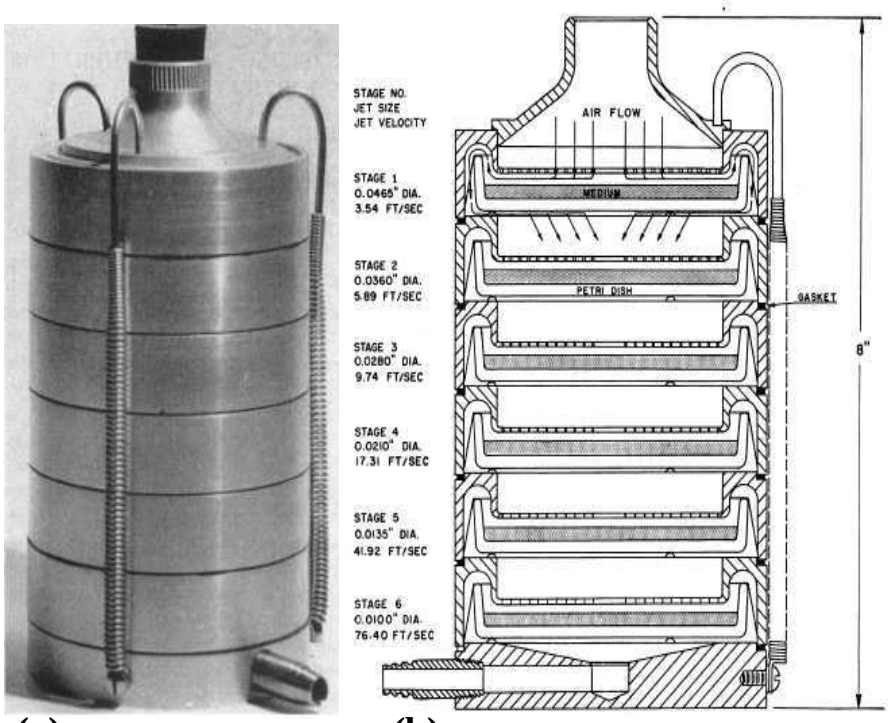
Les systèmes de filtration de l'air sont couramment utilisés en air sec pour la collecte d'aérosols, notamment biologiques. Ils sont en effet faciles et rapides à mettre en œuvre. L'air est simplement filtré par un filtre placé au travers du flux généré par une pompe en aval, dont le débit est mesuré pour connaître le volume considéré. Une tête de prélèvement peut être placée pour restreindre la gamme de taille des particules échantillonnées (comme une PM_{10}, pour ne prélever que les particules d'une taille inférieure à 10 µm). La nature du filtre peut varier en fonction des analyses que l'on veut effectuer, et une large gamme de matériaux est disponible. Les **filtres en gélatine soluble**, permettant la mise en culture des échantillons par étalement après dissolution du filtre (Mitchell et al., 1954 ; Timmons et al., 1966), étaient surtout utilisés avant que les filtres en **fibres de verre, acétate de cellulose ou polycarbonate**, de porosité définie, n'apparaissent sur le marché (en général 0,2 ou 0,45 µm) (Durand et al. 2002 ; Radon et al., 2002 ; Harrison et al., 2005 ; Wittmaack et al., 2005). Ceux-ci permettent de travailler directement sur le filtre grâce aux techniques d'analyse moléculaires, comme l'utilisation de sondes marquées (FISH par exemple) ou l'extraction de matériel génétique (pour DGGE par exemple). Ils peuvent également être employés pour la mise en culture par tamponnage ou après rinçage du filtre, ou encore pour des observations par microscopie optique ou électronique.

I.3.a.(ii) Les impacteurs

La technique d'impaction est basée sur le fait que plus une particule est grosse, plus son inertie dynamique est importante. Les impacteurs permettent donc la collecte sélective des

particules d'aérosol en fonction de leur diamètre aérodynamique. Ils sont souvent composés de plusieurs étages, pour accéder à plusieurs gammes de taille, et le débit d'air est mesuré. Les systèmes classiques de collecte des particules d'aérosol par impaction peuvent être utilisés pour les bioaérosols, et une tête de prélèvement limitant la taille des particules récupérées peut être ajoutée (une PM_{10} par exemple). Matthias-Maser & Jaenicke (1995) utilisent un impacteur à deux étages, pour discriminer les particules de 0,2 à 2 µm de celles de 2 à 10 µm. La surface d'impaction est une plaque de verre recouverte d'un mélange de glycérol et d'une solution de coloration des protéines, pour la détection des bioaérosols.

Une variante d'impacteur, l'Andersen, du nom de son inventeur, a été décrite en 1958 pour la collecte et la détection de la fraction cultivable des micro-organismes (figure 3). La surface d'impaction est remplacée par une boite de Pétri contenant un milieu de culture gélosé. Les aérosols sont donc prélevés et mis en culture simultanément, réduisant les manipulations et le temps de latence des échantillons avant la mise en culture. Les impacteurs commerciaux de type Andersen sont composés de un, deux ou six étages.



(a) **(b)**

Figure 3 : Impacteur Andersen à 6 étages. **(a)** Corps de l'appareil ; **(b)** Schéma en coupe montrant les boites de Pétri disposées sur les 6 étages de l'impacteur et le trajet de l'air aspiré. Gammes de tailles : étage 1 : > 8,2 µm ; étage 2 : de 5,0 à 10,4 µm ; étage 3 : 3,0 à 6,0 µm; étage 4 : 2,0 à 3,5 µm ; étage 5 : 1,0 à 2,0 µm; étage 6 : < 1,0 µm. (Andersen, 1958).

Les Andersen sont très utilisés pour la recherche des bactéries cultivables (Bovallius et al., 1978b ; Jones & Cookson, 1983 ; Shaffer & Lighthart, 1997) et constituent aujourd'hui de véritables références en matière de prélèvement des micro-organismes en air sec. Ils sont en effet très simples d'utilisation, facilement transportables, et le milieu de culture constituant les plaques d'impaction peut être choisi en fonction des besoins. Cependant, plusieurs critiques ont été faites et doivent être signalées. Premièrement, le choc mécanique induit par le principe d'impaction est un facteur de stress microbien qui peut altérer de manière importante la cultivabilité, d'autant plus que le débit d'air (et donc la vitesse d'impact) est élevé (Stewart et al., 1995). D'autre part, le diamètre de coupure des différents étages dépend de la distance entre la plaque d'impaction (le milieu gélosé) et l'entrée d'air. Une variation de l'épaisseur de milieu gélosé dans les boites de Pétri peut donc influer sur la gamme de taille

collectée. Cependant, cela ne semble pas occasionner de différence significative si la distance entre l'entrée d'air et la surface d'impaction vaut entre 1 et 10 fois le diamètre de l'entrée d'air, ce qui autorise de légères variations dans l'épaisseur des milieux préparés (Jones & Cookson, 1983). Enfin, les particules étant dirigées vers les milieux de culture à travers environ 400 orifices, cela provoque une sous-estimation du nombre de colonies sur le milieu. En effet, plusieurs micro-organismes peuvent se retrouver superposés, ou très proches, sur la boite de Pétri, et finalement former des colonies confondues. Avec un Andersen à 2 étages, perforés de 200 trous, dans une atmosphère contenant 2,8 x 10^5 micro-organismes cultivables par mètre cube, Thorne et al. (1992) ont par exemple calculé que les boites de Pétri étaient saturées en seulement 10 secondes.

Après avoir conçu la référence que constitue aujourd'hui l'impacteur Andersen, la société américaine *Andersen Samplers and Consulting Service* a tenté de développer un instrument capable d'effectuer un suivi temporel des micro-organismes de l'air (Andersen & Andersen, 1962). **L'Agar Drum Sampler** (figure 4) se compose d'une sorte de tambour placée dans un cylindre en métal hermétique sur lequel sont connectées une entrée et une sortie d'air, avec une bande de milieu gélosé coulée sur le tour sur la face extérieure. La rotation du cylindre assure le renouvellement du milieu d'impaction (la gélose), et donne donc un suivi de la concentration en cultivables au cours du temps. La vitesse de révolution du tambour est adaptable, de 1 minute à 48 heures.

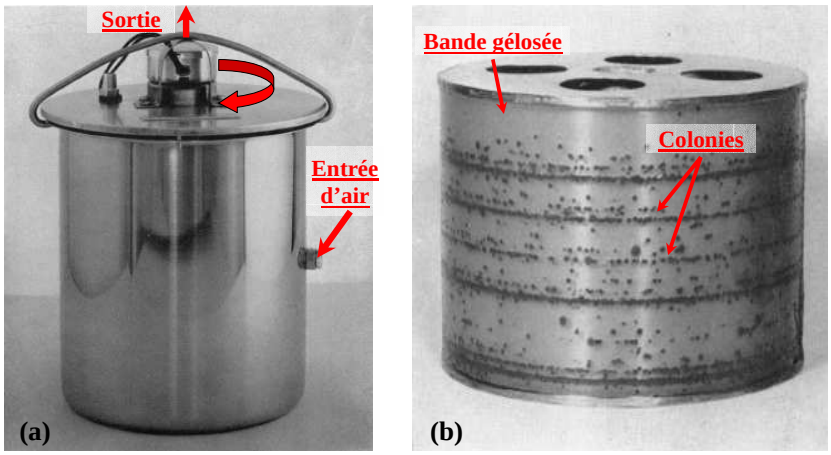


Figure 4 : L'Agar Drum Sampler conçu pour le suivi temporel des micro-organismes cultivables de l'air. **(a)** Corps de l'instrument, avec l'entrée d'air latérale et la sortie d'air sur le couvercle, ainsi que la pompe et le moteur entraînant la rotation du cylindre. **(b)** Cylindre de collecte enduit de milieu de culture gélosé, montrant, après incubation, un prélèvement de 26 minutes réalisé dans une pièce où ont été aérosolisées des cellules de *Serratia marcescens*. (D'après Andersen & Andersen, 1962).

Des inter-comparaisons menées avec un impacteur Andersen classique montrent une efficacité équivalente en terme de nombre total de micro-organismes cultivables récupérés. Pourtant, la publication décrivant l'appareil est la seule à notre connaissance qui l'utilise.

Des systèmes équivalents, dans lesquels une surface collante remplace la gélose, existent, notamment pour le suivi de la concentration en pollens.

Le principe d'impaction peut aussi être exploité avec un bras rotatif, et le flux d'air provoqué par la rotation remplace alors l'aspiration de la pompe. La surface d'impaction de ces instruments peut être adhésive. Certains modèles sont commercialisés, comme celui utilisé par Katial et al. (1997) pour la récolte de spores fongiques (Rotorod sampler model 85, *Sampling Technologies*, Californie), ou le Reuter Centrifugal Air Sampler (RCS+, Biotest), dont les plaques d'impaction sont des boites de Pétri, employé par Di Giorgio et al. (1996).

I.3.a.(iii) Les Impingers

Les Impingers (figure 5), dont le plus commun est **l'AGI-30** (AGI pour All-Glass Impinger), sont des systèmes en verre spécialement conçus pour la collecte des micro-organismes, et plus particulièrement les cultivables. L'air aspiré « bulle » dans un liquide (eau, liquide physiologique, tampon phosphate…), permettant la collecte « en douceur » des aérosols. Les micro-organismes ainsi collectés sont moins stressés par le choc mécanique que peuvent induire les systèmes de filtration ou d'impaction, et conservent mieux leur cultivabilité (Tyler et al. 1959). Ils sont donc largement utilisés (Dimmick et al., 1979 ; Terzieva et al., 1996 ; Andreeva et al., 2001), d'autant qu'ils sont simples d'utilisation et peu coûteux.

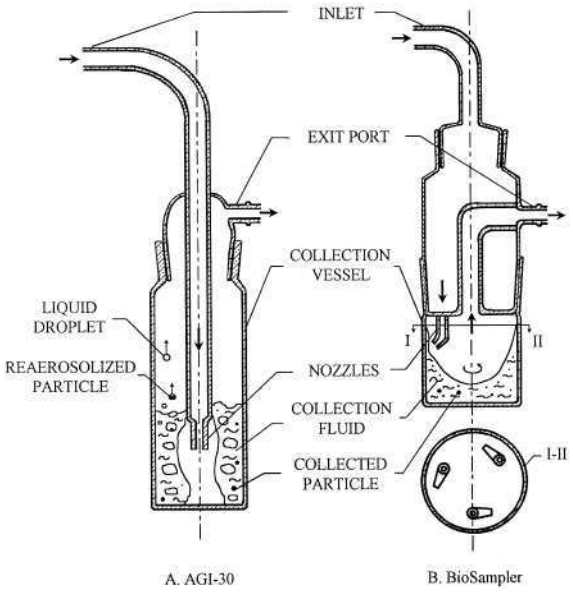


Figure 5 : Schémas d'un Impinger AGI-30 classique (**A**) et du modèle amélioré proposé (**B**). (Lin et al., 1999).

Le principe de l'« impingement » (littéralement « collision ») pose un certain nombre de problèmes. Premièrement, l'évaporation rapide du liquide dans lequel sont collectés les échantillons, rendant ces instruments utilisables seulement sur de courtes périodes de temps. Pour remédier à cela, Lin et al. (1999) proposent une amélioration du système, représentée en figure 5. Le brassage mécanique et la nébulisation que provoquent les Impingers ont aussi pour effet de fragmenter les cellules. Cela ne cause cependant pas de diminution sensible de la proportion en organismes viables (Terzieva et al., 1996).

Plusieurs études comparatives entre les impacteurs Andersen, les Impingers AGI-30, les filtres en gélatine et les filtres-membrane ont été réalisées pour la collecte des aérosols. Dans les expériences de laboratoire de Lundholm (1982) avec des souches connues, l'Andersen apparaît comme le système le plus efficace, alors que l'Impinger donne des résultats peu satisfaisants, surtout quand les micro-organismes sont associés avec des petites particules (< 2 µm), que les Impingers échantillonnent difficilement. Une conclusion complètement opposée est donnée à partir d'échantillons réels par Thorne et al. (1992), pour qui ce sont l'AGI-30 et les filtres qui révèlent la plus grande efficacité. Il est donc finalement difficile de conclure définitivement quant au meilleur système de collecte. Toutefois, on peut avancer que l'Andersen est moins polyvalent car limité aux micro-organismes cultivables, alors que les Impingers permettent l'étude de la communauté dans son ensemble par des méthodes de marquage / microscopie ou des techniques de biologie moléculaire.

I.3.b) Collecte des gouttelettes de nuage

I.3.b.(i) Les string-collectors

Les string-collectors sont des instruments de prélèvement passifs conçus pour la collecte de l'eau de nuage. Il s'agit de fils métalliques tendus sur lesquels se déposent les gouttelettes d'eau, comme la rosée sur une toile d'araignée, avant de s'écouler dans un récipient de collecte. Ils ont notamment été utilisés par Fuzzi et al. (1997) et Ahern et al. (2006).

Le caractère passif de ces appareils de prélèvements conduit à une non sélectivité des échantillonnages : les gouttelettes de nuages ne sont pas séparées des aérosols secs de l'air interstitiel et on ne connaît donc pas précisément l'origine de l'échantillon (aérosols interstitiels ou gouttelettes). De plus, le volume d'air échantillonné reste indéterminé. Pour ces deux raisons, les string-collectors paraissent mal adaptés à des prélèvements « propres » d'eau de nuage.

I.3.b.(ii) Les impacteurs à gouttelettes

Les gouttelettes de nuages peuvent être récupérées par des impacteurs, comme celui décrit par Kruisz et al. (1993) (figure 6). Il se compose d'un seul étage, et son diamètre de coupure, pour un débit d'aspiration réglé à 87 m^3 h^{-1}, est de 7 µm. Il est spécialement dédié aux prélèvements de nuage en conditions météorologiques difficiles (vent fort).

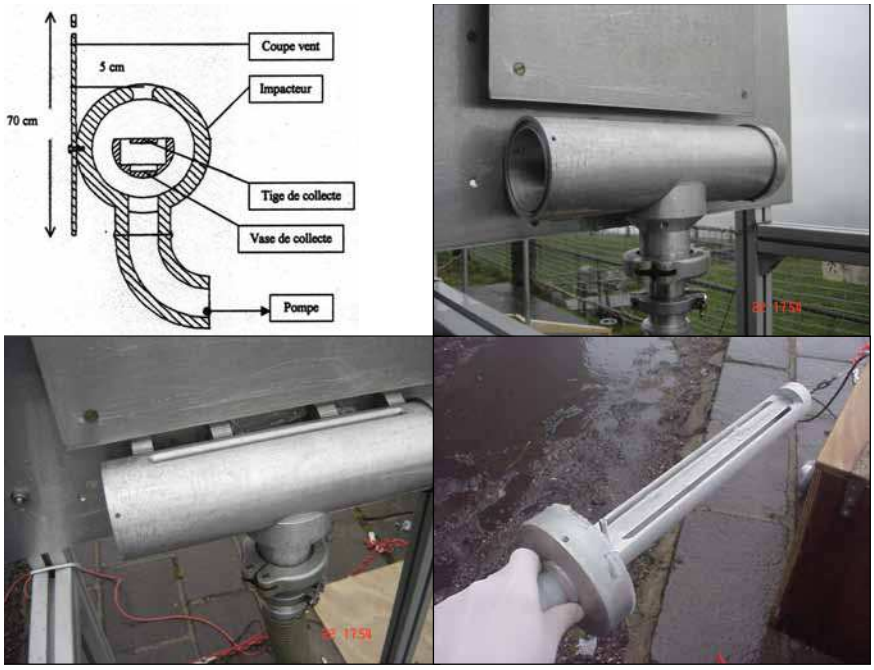


Figure 6 : Schéma en coupe et photographies sur site (corps et ensemble opérationnel tige/vase de collecte) de l'impacteur à gouttelette. (Schéma en coupe d'après Kruisz et al., 1993).

Les gouttelettes et autres hydrométéores en suspension dans l'air du nuage sont sélectivement collectés. Ils s'impactent sur la tige de collecte et s'écoulent dans le vase de collecte situé en dessous si la température est suffisamment élevée. Si la température est inférieure à 0°C, le nuage est en surfusion et les gouttelettes gèlent lors de leur impact dans l'instrument, où la glace peut être récupérée pour analyses. D'après notre expérience, un impacteur de ce type peut permettre de collecter 50 mL (volume approximatif du vase de collecte) d'eau de nuage en environ 1 heure 30, si la densité du nuage est suffisante. En moyenne, on peut considérer que de l'ordre de 25 mL d'eau peuvent être récupérés par heure de prélèvement. Ce genre d'impacteur est régulièrement utilisé pour l'étude de la phase

aqueuse des nuages (Sattler et al., 2001 ; Bauer et al., 2002a, Löflund et al., 2002) et à servi aux prélèvements réalisés lors de cette thèse.

Les hydrométéores peuvent également être ciblés par les impacteurs à bras rotatif dont il était question précédemment (Krämer & Schütz, 1994).

II. LE CONTENU MICROBIEN DE L'ATMOSPHERE

II.1. Les micro-organismes : des particules comme les autres ?

II.1.a) Aérosolisation et transport

Un grand nombre d'études se sont penchées sur la production d'aérosols à partir du **bullage** (« bursting bubbles »), lorsque les bulles d'air produites sous l'action des vagues ou des précipitations éclatent en atteignant la surface de l'eau. Comme le montre la figure 7, deux types de gouttelettes sont formées par le phénomène de bullage : les « jet-drops » et les « film-drops ». La gamme de taille des film-drops s'étend de 0,1 à plusieurs dizaines de µm, alors que les jet-drops ont classiquement un diamètre de 1/10ème celui de la bulle.

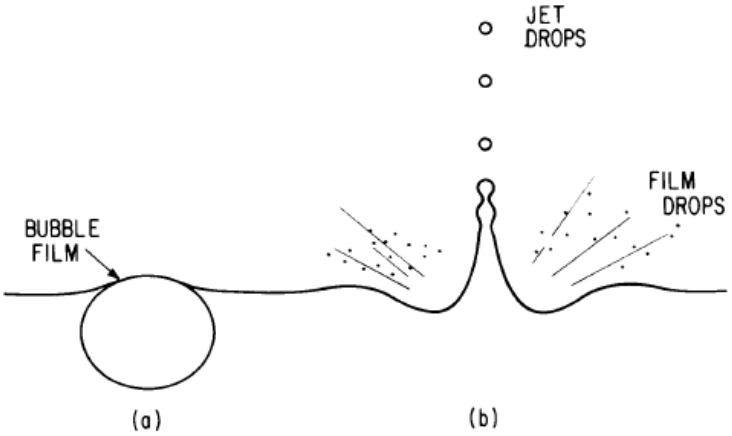


Figure 7 : Processus d'aérosolisation consécutif au phénomène de bullage. **(a)** Bulle d'air au contact de la surface d'un liquide ; **(b)** explosion de la bulle au contact de la surface et génération de gouttelettes. (Blanchard & Syzdek, 1982).

Une bulle de 1,7 mm de diamètre génère 10 à 20 gouttelettes de 2 à 30 µm de diamètre, dont la moitié a moins de 10 µm de diamètre. Il s'agit donc d'une source importante d'aérosols, dont la taille est directement influencée par celle de la bulle. Le nombre de film-drops augmente avec la taille de la bulle, alors que celui de jet-drops diminue : une bulle de 0,3 mm de diamètre produit en moyenne plus de 5 jet-drops et aucune film-drop, alors qu'une bulle de 6 mm produit une seule jet-drop et plus de 1000 film-drops (Blanchard et syzdek, 1982).

Ces gouttelettes sont formées à partir de la surface de l'eau, où les micro-organismes (bactéries) sont souvent concentrés, à l'interface air-eau. Le rapport entre la concentration microbienne mesurée dans les gouttelettes produites et dans le liquide qui en est à l'origine est appelé facteur d'enrichissement, ou **facteur de concentration** (CF). En laboratoire, il a été observé que la concentration en bactéries (*Serratia marcescens*) augmentait d'un facteur 1 à 1000 entre le liquide et les gouttelettes (Blanchard & Syzdek, 1982). De plus, les petites gouttes contiennent une plus grande proportion de matière en provenance de la couche de surface, et donc plus les gouttelettes sont petites (rapport surface / volume élevé), plus le CF est important (figure 8) (Hejkal et al., 1980).

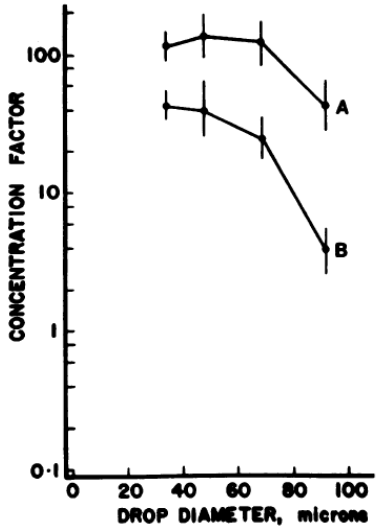


Figure 8 : Comparaison entre les facteurs de concentration (CF) obtenus pour deux souches bactériennes, en fonction de la taille des gouttes générées par bullage. **(A)** *Serratia marinorubra* et **(B)** *Micrococcus euryhalis*. (Hejkal et al., 1980).

Ce phénomène d'enrichissement a également été mis en évidence en milieu naturel, à la surface de la mer, pour les bactéries, mais aussi pour les virus (Aller et al., 2005) (figure 9).

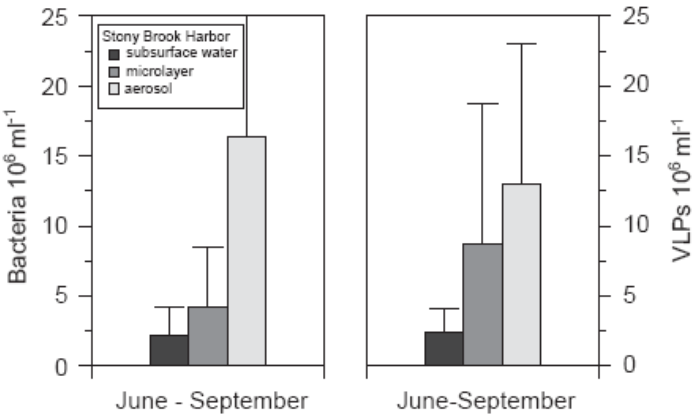


Figure 9 : Abondances bactériennes **(à gauche)** et virales **(à droite)** moyennes dans trois compartiments de l'interface air-mer : l'eau sub-surfacique, la microcouche de surface de l'eau et l'air. (Aller et al., 2005).

Plusieurs paramètres peuvent jouer sur le CF. D'abord et surtout la composition lipidique de la paroi cellulaire, qui va déterminer la concentration en cellules à l'interface air-eau. Plus celle-ci est élevée, plus la cellule aura tendance à « flotter » à la surface (Hejkal et al., 1980). Ainsi, **l'âge de la culture bactérienne** utilisée pour les manipulations en laboratoire est un paramètre important, la proportion de lipides dans la paroi augmentant avec celui-ci. De même, la présence d'un métabolite secondaire comme la **prodigiosine**, composé hydrophobe qui provoque une pigmentation rouge vif, améliore l'aérosolisation de la cellule d'un facteur 10 à 20. Une souche non pigmentée (sans production de prodigiosine) de *S. marcescens* est ainsi moins concentrée dans les gouttelettes que dans le liquide (CF < 1), alors qu'une souche pigmentée y est de 2 à 14 fois plus abondante (Burger & Bennett, 1985). Le CF varie aussi en fonction de l'espèce considérée : *Micrococcus euryhalis* et *Serratia marinorubra*, par exemple, sont 10 à 100 fois mieux aérosolisés par cette voie que *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ou *Pseudomonas bathycetes*. Par conséquent, l'aérosolisation est différente suivant les espèces, et la composition microbienne retrouvée dans les gouttelettes aérosolisées ne reflète pas celui du milieu liquide qui en est à l'origine.

Ce facteur de concentration fait que le phénomène de bullage est une source potentielle importante de micro-organismes dans l'air. Les gouttelettes émises, de taille micronique, peuvent traverser de longues distances sans s'évaporer si l'humidité reste supérieure à 70 % (Burger & Bennett, 1985), et les micro-organismes qui s'y trouvent peuvent donc rejoindre les nuages sans subir de dessiccation.

II.1.b) Association avec des particules

Dans l'air, les cellules bactériennes sont rarement isolées. Mancinelli & Shulls (1978) ont observé une corrélation positive entre le nombre de bactéries cultivées et la quantité de matière particulaire. Cela parait logique dans la mesure où les bactéries font elles-mêmes partie de la matière particulaire de l'air, mais des prélèvements permettant la ségrégation des particules suivant leur diamètre aérodynamique montrent que la grande majorité des bactéries se situe dans la gamme de taille des particules d'un diamètre supérieur à 3 µm pour un site non côtier, et 2,1 µm pour les sites côtiers. Cette taille se révèle plus élevée que celle des bactéries elles-mêmes, ce qui montre leur association, comme on vient de le voir, entre elles ou avec d'autres particules de natures diverses (figure 10) (Lighthart, 1997 ; Shaffer & Lighthart, 1997). Ce fait a été constaté *de visu* (microscope à dispersion des rayons X) dans l'eau de pluie, où la plupart des particules biologiques, comptant essentiellement des bactéries, sont associées à des particules minérales (Casareto et al., 1996).

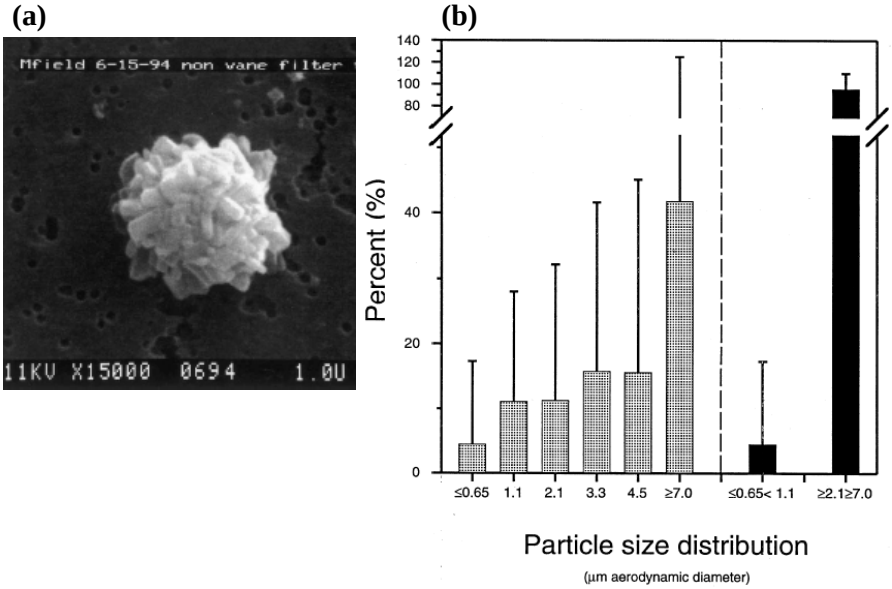


Figure 10 : **(a)** Agrégat bactérien provenant d'un prélèvement atmosphérique proche de l'océan (MEB). Le diamètre de cet amas est d'environ 2,8 µm. **(b)** Distribution relative des particules avec lesquelles sont associées les cellules bactériennes dans l'air (en % du nombre de bactéries cultivées dénombrées). Détail pour différentes classes de tailles (**à gauche**), et répartition entre les premières classes de tailles (D < 1,1 µm) et les plus grosses particules (2,1 µm < D < 7,0 µm) (**à droite**). (Lighthart, 1997).

Pour Jones & Cookson (1983), 34 % des bactéries sont associées à la fraction « respirable » (par l'Homme) des particules (D < 8 µm). Concernant les spores fongiques, ce pourcentage varie suivant les espèces, de 56% à 96%.

Les bactéries situées à l'intérieur des grosses particules survivraient mieux sur de longues distances, ainsi protégées de la dessiccation et de la lumière. Cette hypothèse, formulée par Lighthart & Kim (1989), expliquerait pourquoi la majorité des bactéries retrouvées comme étant cultivables (donc viables) sont associées avec des particules. Cela sous-entend, à l'inverse, que si une bactérie reste libre (non associée à une particule) dans l'air, son temps de survie est raccourci et ne lui permet pas de parcourir de grandes distances

tout en restant viable. En conséquence, elle n'est pas retrouvée dans les prélèvements atmosphériques en considérant seulement les micro-organismes cultivés.

Les bactéries colonisent les particules solides qui peuvent être émises en même temps qu'elles. Dans la mer, leur densité sur la particule est limitée par la diffusion de l'oxygène. De plus, il existe des interactions entre les espèces colonisatrices qui peuvent améliorer ou restreindre la colonisation par chacune des espèces (Grossart et al., 2003).

Il faut signaler ici que même si ces études menées en air sec montrent que les cellules sont associées à des particules, les observations microscopiques menées sur l'eau de nuage lors de cette thèse ne mettent pas ce fait en évidence.

II.1.c) Propriétés de nucléation

Les aérosols sont à la base de la formation des gouttelettes et cristaux de glace des nuages. Leur composition joue un rôle important sur la température à laquelle la nucléation de la vapeur d'eau en glace est induite. Cette capacité des aérosols à agir plus ou moins efficacement comme noyaux de nucléation à l'origine de la formation de gouttelettes (**Cloud Condensation Nuclei, CCN**) ou de cristaux de glace (**Ice-Nuclei, IN**) représente un paramètre primordial de la microphysique du nuage.

Certaines souches d'espèces bactériennes comme *Bacillus subtilis* (Gram-positive) ou *Escherichia coli* (Gram-négative) montrent des capacités **CCN** relativement importantes (Lee et al., 2002). A la surface de ces cellules, la vapeur d'eau se condense (point de déliquescence) à partir d'une humidité relative (RH) de 85 %. Entre 85 et 100 % d'humidité, la taille de la particule qu'elles représentent est multipliée par 1,34 pour *E. coli*, et 1,16 pour *B. subtilis*, sous l'effet de la condensation de la vapeur d'eau. La différence paraît provenir de de la composition de la paroi de ces deux types cellulaires. A titre de comparaison, la même étude a déterminé un point de déliquescence de RH = 70 % pour les particules de NaCl, et une taille multipliée par 1,65 entre 70 et 100 % d'humidité. Sun & Ariya (2006) proposent une revue sur les CCN organiques et biologiques.

Concernant les **IN**, plusieurs substances comme l'iodure d'argent ou la kaolinite sont connus pour leur efficacité. Concernant les particules biologiques, la capacité à agir en tant qu'IN pour des aérosols issus de végétaux en décomposition a été décrite par Schnell & Vali (1972). Ils remarquèrent que des débris de feuilles pouvaient avoir une activité à une température de l'ordre de -4°C à -2°C. Il s'agit d'une température élevée quand on considère que la nucléation homogène de l'eau pure en glace a lieu aux alentours de -40°C, et de -15°C sur un noyau minéral (Casareto et al., 1996). De nombreuses études font état de cette capacité, pour divers types de bioaérosols : pollens (Dingle, 1966), bactéries du sol et de la végétation (Maki & Wiloughby, 1978 ; Lindemann et al., 1982) et micro-organismes marins (virus, bactéries et phytoplancton) (Schnell & Vali, 1976). Concernant les bactéries, un gène codant pour une lipoglycoprotéine de la membrane cellulaire externe (**INaZ**) a été identifié. Les assemblages de cette protéine miment la structure d'un cristal de glace, et amorcent le phénomène de cristallisation de l'eau à une température dépendante de cet arrangement. L'intégrité structurale seule de la protéine et de ses ligands étant responsable de l'activité glaçogène, une cellule morte est aussi efficace qu'une cellule vivante. Les bactéries Ina^+ sont toutes des bactéries aérobies Gram négatives et comptent parmi les IN les plus actifs que l'on puisse trouver. On trouve des bactéries Ina^+ dans les genres *Erwinia* (espèces *ananas* et *herbicola*), *Pantoa* (espèce *ananas*), *Pseudomonas* (espèces *syringae* et *fluorescens*) et *Xanthomonas* (espèce *campestris*). L'espèce *P. syringae* regroupe la majorité et les plus actives de ces souches Ina^+. Il s'agit d'une espèce phytopathogène dont la protéine INaZ favorise le gel de l'eau à la surface de la plante, détériorant ainsi les parois végétales pour faciliter l'attaque bactérienne. Chez les champignons, l'espèce *Fusarium avenaceum* s'avère presque aussi efficace que les bactéries Ina^+ (Pouleur et al., 1992). La revue de Cochet et

Widehem (2000) sur l'activité IN des bactéries et la protéine INaZ est à consulter pour plus de détails.

Le rôle des bioaérosols dans la microphysique du nuage est souvent discuté, même si la présence de tels noyaux glaçogènes n'a pas encore été clairement observée dans les nuages. On peut toutefois s'attendre à les y retrouver comme acteurs de l'amorçage de la formation de gouttelettes et cristaux dans les nuages.

II.1.d) Activité métabolique

Plus que de simples particules parmi les aérosols, les micro-organismes ont une activité propre, qui leur confère la possibilité d'interagir chimiquement avec leur environnement. Il faut donc les considérer sur ce point comme des particules à part. Les cellules, « sacs à enzymes », constituent de véritables petites usines de **transformation biochimique**, dont l'activité est modulable et adaptable aux conditions du milieu. Les implications de la vie dans les nuages (stresses, physiologie et métabolisme) sont largement abordées dans le chapitre III.

II.2. Aspect quantitatif et facteurs de variabilité

Le sujet des micro-organismes de l'atmosphère est relativement peu documenté et la bibliographie traite le plus souvent des milieux intérieurs. En extérieur, la majorité des travaux porte sur l'air sec, et le plus souvent à proximité du sol. Les revues de Lighthart (1997) et de Jones & Harrison (2004) constituent de bons supports bibliographiques sur le sujet, ainsi que sur les paramètres qui peuvent influer sur le contenu en abordant les aspects quantitatifs et qualitatifs. Pour ce qui est des nuages, les données sont très rares et récentes, ce qui est certainement en partie dû à la difficulté d'échantillonnage. Les publications de Fuzzi et al. (1997), Sattler et al. (2001) et de Bauer et al. (2002a) sont les seules qui s'y attachent.

II.2.a) Abondance : méthodes et commentaires

II.2.a.(i) Cellules totales

L'abondance microbienne dans l'atmosphère est le plus souvent exprimée en cellules par m^3, en air sec, et en cellules par mL dans les nuages et les précipitations. Les deux sont peu comparables, mais il est possible de donner un ordre de grandeur. Des instruments, comme le Gerber PVM100 installé à l'Observatoire du puy de Dôme, mesurent le contenu en eau liquide (LWC) du nuage et permettent la conversion. On peut aussi estimer grossièrement une valeur en cellules par m^3 à partir de valeurs en cellules par mL quand on sait que le contenu en eau d'un nuage varie de environ 0,2 à 0,7 g m^{-3}. Le facteur de conversion varie donc entre approximativement 5 à 1,5. Pour les précipitations, cette conversion n'est pas possible.

Les méthodes de dénombrements des cellules totales utilisées sont diverses. Il s'agit toujours de méthodes de microscopie, après marquage des cellules avec un colorant ou un fluorochrome. Ainsi, le marquage spécifique des acides nucléiques par le DAPI (4', 6-diamino-2-phénylindole) ou l'acridine orange, composés fluorescents intercalants, est couramment utilisé et constitue la référence. Ces deux fluorochromes ne permettent cependant pas de distinguer les cellules non viables des autres.

La méthode de coloration utilisée et l'expérimentateur sont des **sources de variation** importantes dans les dénombrements cellulaires. Ainsi, Eduard et al. (2001) estiment que la méthode de marquage est responsable d'écarts de comptages de l'ordre de 2 à 35 % pour les bactéries, et de 15 à 35 % de celui des spores fongiques. De plus, si les écarts de comptage imputables à l'expérimentateur restent faibles dans le cas des spores de champignons (2 à 12

%), ils atteignent des valeurs importantes en ce qui concerne les bactéries (4 à 53 %). Même si l'on ne peut pas s'affranchir de ces différences, il est important d'en avoir conscience.

II.2.a.(ii) Cellules viables

La **viabilité** d'une cellule bactérienne correspond, selon Postgate (1969) (dans Roszak & Colwell, 1987), à la propriété de se multiplier quand les conditions sont optimales. La **cultivabilité** se définit comme sa capacité à se diviser sur un milieu de culture, à un instant t, jusqu'à former une colonie de taille visible. Dans les deux cas, la définition est vague, les « conditions optimales » et le « milieu de culture » étant des paramètres variables suivant les souches. Il n'existe pas de norme au sujet des organismes « cultivables », et la comparaison entre des concentrations en organismes cultivés provenant d'études distinctes est hasardeuse. Le terme de « cultivé » sera donc ici généralement préféré à celui de « cultivable ».

Pendant longtemps, les dénombrements des micro-organismes présents dans un échantillon se réduisaient à des méthodes culturales, en considérant qu'une cellule microbienne, si elle est viable, forme forcément une colonie sur un milieu de culture. Mais dès les années 1930 (Knaysi, 1935 ; Jennison, 1937 ; Heinmets et al., 1953) on observe que le nombre de colonies ne reflète pas le nombre de cellules dénombrées par microscopie, même en phase exponentielle de croissance. Les termes de viables et de cultivables ont pourtant conservé la même signification jusqu'au début des années 80, quand l'existence de cellules **viables mais non cultivables** a clairement pu être mise en évidence par des mesures de respiration de cellules privées de nutriments, comparées aux énumérations par étalements et par microscopie (Kurath & Morita, 1983). Les cellules viables non cultivables réduisent leur activité métabolique, mais elle est conservée pour assurer les fonctions vitales (homéostasie, réparation). La capacité de se diviser, et donc de former une colonie, est par contre temporairement bloquée. Les cellules viables ne se limitent donc pas aux cultivables, et les VBNC ont été détectées aussi bien dans l'eau douce que les environnements marins et les sols. Il s'agit donc très probablement d'un état très répandu dans l'environnement, où les facteurs de stress sont nombreux. Dans notre problématique, ces cellules sont à considérer comme effectives, même si leur activité est réduite. Ce sont des bactéries intactes, détectables par des mesures de l'activité enzymatique, respiratoire ou photosynthétique, charge énergétique…. Pour améliorer leur cultivabilité, une courte incubation en présence de pyruvate, d'acétate ou d'acide oxalique semble bénéfique. Le milieu de culture oligotrophe R2A (Reasoner & Geldreich, 1985) contient d'ailleurs du pyruvate en faible quantité. Sur des bactéries de l'air, la présence de catalase dans le tampon de collecte d'impingers ou dans le milieu de culture augmente de plus de 63 % la capacité des cellules à former des colonies en réduisant le stress dû aux oxydants. Cependant, elle n'a pas d'action si l'humidité relative est supérieure à 80-90% (Martin et al., 1976 ; Calabrese & Bissonnette, 1990 ; Marthi et al., 1991), et n'est donc pas utile dans le cas des nuages. La présence de bétaïne ou de peptone dans un milieu améliore aussi la cultivabilité des viables après leur aérosolisation (Heidelberg et al., 1997). Pour dénombrer l'ensemble des cellules viables, la première méthode mise au point fut l'utilisation conjointe d'extrait de levure et d'acide nalidixique (méthode appelée suivant les études **Direct Viable Count**, DVC, ou test de Kogure). Le premier composé a un but nutritif pour stimuler la croissance, alors que le second bloque la réplication de l'ADN. Les cellules conservent donc la capacité de l'ensemble des processus métaboliques requis pour se diviser (synthèse d'ARN, de protéines, de la paroi…) à l'exception de la réplication de l'ADN. Cela conduit, si la cellule est viable, à une augmentation du volume cellulaire sans possibilité de division et à une croissance de type filamenteux (Kogure et al. 1979 ; Byrd et al. 1991 ; Wilson & Lindow, 1992). Le dénombrement des grosses cellules se fait par microscopie optique. Plus récent, le **CTC** marque les cellules dont la chaîne respiratoire

fonctionne, en jouant le rôle de l'accepteur final d'électrons habituel. Enfin, un mélange de colorants commercial permettant distinguer les cellules dont l'intégrité membranaire n'est pas altérée et considérées comme viables, des autres (**Live/Dead BacLight** Bacterial Viability Assay) existe également (Boulos et al., 1999). Il s'agit d'une double coloration : un seul des deux colorants (le SYTO 9, vert) est capable de pénétrer dans la cellule si la membrane est intacte. Par contre, dans le cas contraire, les deux colorants pénètrent et la cellule apparaît rouge (complexe entre le SYTO 9 et le deuxième colorant, l'iodure de propidium).

De manière générale, **les milieux de culture** couramment utilisés contiennent plus de 1000 fois plus de carbone par unité de volume que l'on peut généralement en rencontrer dans la plupart des environnements naturels aquatiques à tendance oligotrophe (1-15 mg C L^{-1}) (Martin & MacLeod, 1984). Pour ces milieux nutritifs se pose donc la question de savoir ce qui est effectivement cultivé : la population réellement indigène du milieu prospecté ou une population transitoire, non adaptée au milieu oligotrophe dans lequel elle se trouve. Pour cette raison, des **milieux de cultures pour la recherche des organismes oligotrophes** ont été développés, notamment pour la recherche des micro-organismes de l'eau potable (milieu R2A) ou marins (milieu Difco Marine Agar). Ils sont de plus en plus utilisés en microbiologie de l'environnement, et remplacent progressivement les milieux Luria-Broth (LB) et Trypcase-Soja (TS). Ces milieux oligotrophes ont été utilisés dans diverses études portant sur des milieux aquatiques, depuis le brouillard (Fuzzi et al., 1997) jusqu'à la surface de la mer (Aguogué et al., 2005) et aux glaciers et milieux polaires (Christner, 2001 ; Foght et al., 2004 ; Pearce et al., 2005). Une alternative couramment employée consiste à utiliser une formule diluée de milieux classiques (Andreeva et al., 2001), et même de milieux de cultures déjà oligotrophes (R2A) (Foght et al., 2004 ; Miteva & Brenchley, 2005 ; Tyson & Banfield, 2005).

Etant donnée la variabilité du contenu quantitatif microbien dans l'air (de ~10^3 à ~10^9 bactéries m^{-3} et ~10^2 à ~10^8 spores fongiques m^{-3}), il est impossible de donner une valeur générale d'abondance. Un grand nombre des études se sont penchées sur les variations et ses causes et plusieurs éléments ressortent clairement. D'abord, les cellules bactériennes totales sont, sauf exceptions, plus nombreuses que les spores de champignons. Il existe ensuite une influence des paramètres spatiaux (site d'échantillonnage, altitude) et temporels (saison, moment de la journée) sur le contenu microbien global, auxquels s'ajoutent les conditions météorologiques (température, vent, humidité…) et la composition chimique (pH, présence de polluants).

Note : Dans ce chapitre, comme dans l'ensemble de ce manuscrit, il sera précisé à chaque fois si la valeur donnée concerne les micro-organismes cultivés. Par défaut, il s'agira des cellules totales, dénombrées par une méthode indépendante des cultures. De la même manière, si l'altitude du prélèvement d'air n'est pas donnée, cela concernera par défaut une zone à proximité directe du sol.

II.2.b) Variabilité spatiale

II.2.b.(i) Variabilité horizontale : effet de site

Le choix du site de prélèvement compte pour beaucoup dans les dénombrements microbiens de l'air. On les regroupe généralement en 3 classes, sous les latitudes moyennes, avec des variantes d'appellation : urbains, ruraux et côtiers. Dans le cas de prélèvements éloignés du sol, on parlera respectivement plutôt de masses d'air à influence anthropique, continentale « bruit de fond » et marine. Dans les tableaux 1 et 2 ci-dessous sont rapportées les concentrations en bactéries et champignons totaux et cultivés mesurées dans l'air sec, les nuages et les précipitations (pluie ou neige) pour les différents types de sites.

Echantillon	Site d'échantillonnage	Bactéries totales (Cell m^{-3} ou *Cell* mL^{-1})	Champignons totaux (Cell m^{-3} ou *Cell* mL^{-1})	Référence
URBAIN / ANTHROPIQUE				
Aérosols	Site urbain (Sud de l'Angleterre)	$3,2 \times 10^3$ - $1,7 \times 10^4$		Harrison et al. (2005)
Aérosols	Zone de retraitement des déchets, extérieur	10^7 - 10^9	10^5 - 10^8	Durand et al. (2002)
Aérosols	Zone urbaine, au dessus d'un champ irrigué par des eaux usées (Mexique)	10^7 - 10^9		Paez-Rubio et al. (2005)
Aérosols	Bâtiments agricoles, intérieur (Danemark, Suisse, Espagne)	$1,5 \times 10^7$ - $4,7 \times 10^9$	$1,1 \times 10^6$ - $2,0 \times 10^7$	Radon et al. (2002)
RURAL / BRUIT DE FOND				
Nuage	Mont Sonnblick, 3 106 m a.s.l. (Autriche)	*$7,9 \times 10^2$ - $2,5 \times 10^3$ (mL^{-1})*		Sattler et al. (2001)
Pluie	Mont Rax, 1644 m a.s.l. (Autriche)	*$6,0 \times 10^3$ - $1,5 \times 10^4$ (mL^{-1})*	*$2,4 \times 10^2$ - $1,3 \times 10^3$ (mL^{-1})*	Bauer et al. (2002a)
Neige (manteau)	Mont Sonnblick, 3 106 m a.s.l. (Autriche)	*$9,5 \times 10^3$ - $1,4 \times 10^4$ (mL^{-1})*		Sattler et al. (2001)
Aérosols	Rural (Sud de l'Angleterre)	$4,2 \times 10^3$ - $1,6 \times 10^4$		Harrison et al. (2005)
Aérosols	Mont Rax, 1644 m a.s.l. (Autriche)	$6,7 \times 10^3$ - $1,9 \times 10^4$	$1,7 \times 10^2$ - $3,2 \times 10^3$	Bauer et al. (2002a)
Nuage	Mont Rax, 1644 m a.s.l. (Autriche)	*$4,9 \times 10^3$ - $8,1 \times 10^4$ (mL^{-1})* $1,5 \times 10^3$ - $2,1 \times 10^4$	*$1,1 \times 10^3$ - $1,1 \times 10^4$ (mL^{-1})* $3,4 \times 10^2$ - $5,0 \times 10^3$	Bauer et al. (2002a) Bauer et al. (2002a)
Neige (manteau)	Mont Rax, 1644 m a.s.l. (Autriche)	*$2,0 \times 10^3$ - $3,3 \times 10^4$ (mL^{-1})*	*$1,5 \times 10^2$ - $1,4 \times 10^3$ (mL^{-1})*	Bauer et al. (2002a)
Neige (manteau)	Montagnes Tateyama, 2 700 m a.s.l. (Japon)	*$6,0 \times 10^3$ - $2,3 \times 10^5$ (mL^{-1})*		Segawa et al. (2005)
CÔTIER				
Pluie	5 Km de la côte (Japon)	*$8,0 \times 10^2$ - $1,1 \times 10^4$ (mL^{-1})*		Casareto et al. (1996)
Aérosols	Site côtier (Sud de l'Angleterre)	$2,8 \times 10^3$ - $1,4 \times 10^4$		Harrison et al. (2005)

Tableau 1 : Concentrations en cellules bactériennes et fongiques **totales** dans des prélèvements atmosphériques (aérosols, nuages et précipitations) pour différents sites, classés par concentration croissante pour chaque type de masses d'air.

Echantillon	Site d'échantillonnage	Bactéries cultivées (CFU m^{-3})	Champignons cultivés (CFU m^{-3})	Référence
URBAIN / ANTHROPISE				
Aérosols	Urbain, toit d'un bâtiment (Hong-Kong)	/	7 - 2 386	Lau et al. (2006)
Aérosols	Urbain, 1 à 2 m au dessus du sol d'une rue (Oregon)	539 - 688	/	Shaffer & Lighthart (1997)
Aérosols	Proximité d'une aire de retraitement des déchets (Washington)	4 - 1 640	0 - 7 220	Jones & Cookson (1983)
Aérosols	Urbain (Colorado)	13 - 1 880	/	Mancinelli & Shulls (1978)
Aérosols	Urbain (Marseille)	80 - 2 813	6 - 556	Di Giorgio et al. (1996)
Aérosols	Zone de retraitement des déchets, extérieur	10^4 - 10^6	10^3 - 10^8	Durand et al. (2002)
Aérosols	Bâtiments agricoles (Danemark, Suisse, Espagne)	$4,1 \times 10^4$ - $7,9 \times 10^7$	$8,3 \times 10^4$ - $4,4 \times 10^5$	Radon et al. (2002)
Aérosols	Zone urbaine, 1,5 m du sol d'un champ irrigué par des eaux usées (Mexique)	10^4 - 10^9	/	Paez-Rubio et al. (2005)
Brouillard	Brouillard, vallée du Pô (Italie), proximité du sol	143 - $4,7 \times 10^4$	783 - 3 840	Fuzzi et al. (1997)
RURAL / BRUIT DE FOND				
Aérosols	Rural (Hong-Kong)	/	50 - 1 540	Lau et al. (2006)
Aérosols	Continental (Suède)	74 - 144	/	Bovallius et al. (1978b)
Aérosols	Influence continentale (690 m d'altitude, Texas)	150 - 1 450 (champignons + bactéries)		Fulton and Mitchell (1966)
Aérosols	1-2 m au dessus du sol d'une forêt (Oregon)	410 - 665	/	Shaffer & Lighthart (1997)
Aérosols	Rural, 1-2 m au dessus du sol d'un pré (Oregon)	104 - 711	/	Shaffer & Lighthart (1997)
CÔTIER				
Aérosols	Site côtier (île de Porquerolles) (France)	0 - 508	0 - 266	Di Giorgio et al. (1996)
Aérosols	Site côtier (Suède)	39 - 245	/	Bovallius et al. (1978b)
Aérosols	Influence maritime (690 m d'altitude, Texas)	50 - 700 (champignons+ bactéries)		Fulton and Mitchell (1966)
Aérosols	Côtier, 1 à 2 m au dessus du sol (Oregon)	91 - 116	/	Shaffer & Lighthart (1997)

Tableau 2 : Concentrations en cellules bactériennes et fongiques **cultivées** à partir de prélèvements atmosphériques (aérosols et brouillard) pour différents sites, classés par concentration croissante pour chaque type de masse d'air.

Plusieurs des travaux présentés ici sont précisément consacrés à la comparaison entre plusieurs sites ou types de masses d'air (la zone traversée en amont du point de prélèvement). Il est désormais généralement admis que **les micro-organismes sont plus abondants en milieu urbain que rural, les plus faibles concentrations étant observées dans les sites côtiers**. Cependant, l'effet de site a surtout été discuté à partir de la fraction cultivée (Fulton & Mitchell, 1966 ; Fulton, 1966b ; Bovallius et al., 1978b ; Di Giorgio et al., 1996 ; Shaffer & Lighthart, 1997) et apparaît **beaucoup moins clairement au niveau des cellules totales**, pour lesquelles l'effet de site a seulement été abordé par Harrison et al. (2005). D'après leurs données, le nombre de micro-organismes totaux est surtout soumis à des écarts plus importants dans les sites urbains que dans les autres sites, avec des maxima plus élevés. En zone non urbaine, cette valeur reste relativement plus constante.

Pour les régions polaires, aucune donnée sur les micro-organismes de l'air n'a pu être trouvée, mais le nombre de particules d'aérosols mesuré (~10 cm^{-3}) laisse supposer qu'ils sont plus rares que partout ailleurs. Les valeurs dans la neige, que l'on peut considérer dans une certaine mesure comme un prélèvement atmosphérique « à retardement », montrent des concentrations de l'ordre de 0,2 à 5 x 10^3 bactéries mL^{-1} de neige (Carpenter et al., 2000).

II.2.b.(ii) Variabilité verticale : influence de l'altitude

Des micro-organismes ont été détectés par culture jusque dans la **mésosphère**, à 77 km d'altitude, à partir de prélèvements réalisés grâce à des obus (Imshenetsky et al., 1978). Plus récemment, des organismes cultivables ont été récupérés de prélèvements à 41 km d'altitude (Wainwright et al., 2003). **A moindre altitude**, dans la troposphère, Fulton (1966a) a réalisé des prélèvements en avion et a mesuré les concentrations en bactéries et champignons cultivés depuis des prélèvements d'air réalisés à trois altitudes (690, 1600 et 3127 m). Il a montré que **leur nombre diminue généralement avec l'altitude** (de 100 m^{-3} pour la plus basse à 10 m^{-3} pour la plus élevée), et qu'il est beaucoup moins variable à haute altitude que dans les basses couches. La concentration bactérienne diminue sensiblement moins rapidement que celle des champignons, puisque leur proportion passe de 50% du nombre de micro-organismes dénombrés au plus proche du sol à 90% en haute altitude. La différence de diamètre aérodynamique et donc de vitesse de sédimentation de chaque type cellulaire est sans doute à l'origine de la différence de profil vertical. Par ailleurs, les particules et les micro-organismes sont logiquement plus abondants en dessous des inversions de température qu'au dessus, ces zones de grande stabilité représentant de véritables barrières à la dissémination verticale des aérosols et, par extension, des micro-organismes de l'air. Dans une couche instable, la concentration en spores fongiques décroît de façon logarithmique avec l'altitude (Hirst et al., 1967a, dans Jones & Harrison, 2004).

Au sommet du Mont Rax (Autriche), à une altitude de 1644 m, Bauer et al. (2002a) se sont intéressés aux cellules totales et ont dénombré ~10^4 bactéries m^{-3} et ~10^3 spores de champignons m^{-3}. Plus haut, à 5620 m d'altitude, dans la glace d'un glacier tibétain, Zhang et al. (2002) dénombrent de 50 à 410 cellules mL^{-1}, dont seulement 0 à 85 mL^{-1} sont cultivées. Ces valeurs de concentration en mL^{-1} ne peuvent pas être comparées avec celles mesurées dans l'air, en m^{-3}, mais attestent de leur rareté à cette altitude si on les compare avec les plusieurs milliers par millilitre de micro-organismes retrouvés à 1644, 3106 ou 2700 mètres d'altitude par les équipes de Bauer, Sattler et Segawa, également dans la neige (voir tableau 1).

On peut signaler la publication de Andreeva et al. (2001), sur la variation du nombre de micro-organismes avec l'altitude. Cependant, leur conclusion va dans un sens opposé : leurs résultats ne montrent pas de différence entre des échantillons collectés à 500 m et à 7000 m d'altitude, avec de l'ordre de 10^3 CFU m^{-3}. Cette conclusion est très surprenante, mais aucune

valeur n'est donnée et les figures présentées en 3 dimensions ne sont guère lisibles. De plus, cet ordre de grandeur de 1000 colonies par mètre cube paraît très élevé en comparaison de valeurs observées par les autres études.

II.2.c) Variabilité temporelle

La concentration en bactéries de l'air peut varier très rapidement, comme le montrent des prélèvements d'air espacés de seulement 2 minutes, qui peuvent révéler des différences aussi élevées que 4100% (Lighthart & Shaffer, 1995b). Cependant, sur des périodes plus longues, les grandes tendances temporelles sont gouvernées par la saison et le moment de la journée.

II.2.c.(i) Variabilité saisonnière

La saison est un paramètre qui joue beaucoup sur les abondances microbiennes dans l'air. **Le minimum est généralement observé en hiver, avec des maxima en été et en automne**, comme le montre la figure 11. Les amplitudes entre les deux extrêmes sont très importantes : suivant les études, la concentration bactérienne dans l'air varie d'un facteur 3 à 100, et le nombre de spores de champignons est encore plus affecté par la saisonnalité avec des écarts pouvant atteindre un facteur 1000.

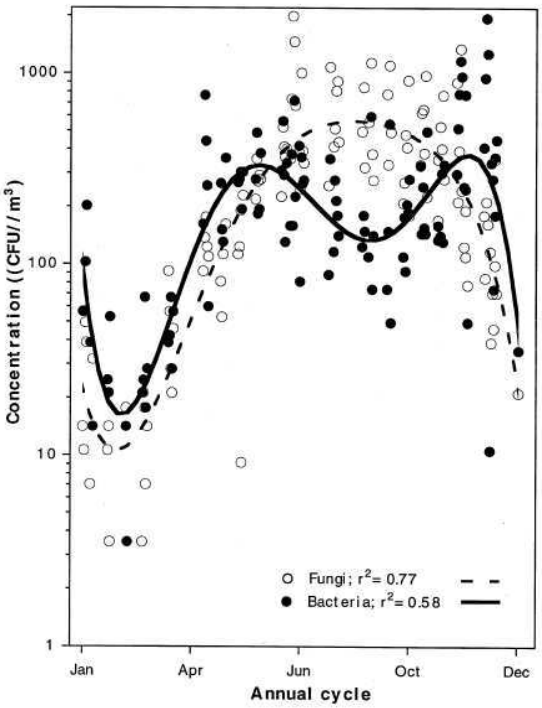


Figure 11 : Variation annuelle de concentration en bactéries et en champignons cultivés, dans une zone urbaine. (Lighthart, 1997).

Un seul pic d'abondance bactérienne est le plus souvent observé dans l'année (Bovallius et al., 1978b, Jones & Cookson, 1983 ; Di Giorgio et al., 1996), même si Lighthart (figure 11) en fait apparaître deux dans sa revue, dont la figure est tirée de Wright et al. (1969). Il a lieu entre avril et octobre, et est d'une durée plus ou moins longue, apparemment suivant le site considéré. Malheureusement, les équipes relatant des variations annuelles d'abondance bactérienne n'ont travaillé que sur la fraction cultivée. Pour les spores fongiques, par contre, un ou deux pics peuvent être observés. Par culture, près de Washington, Jones & Cookson (1983) remarquent une abondance maximale en septembre-octobre uniquement, alors que Di Giorgio et al. (1996), près de Marseille, observent en plus un pic en mai-juin. Concernant les

spores totales d'*Alternaria* et de *Cladosporium*, des genres communément retrouvés dans l'air, Sabariego et al. (2000) voient également 2 pics aux mêmes périodes, et en novembre et janvier pour le genre *Ustilago*. Enfin, l'étude des variations saisonnières du nombre total de spores fongiques la plus significative est sans doute celle de Katial et al. (1997), puisqu'elle porte sur une période de 8 ans. Il apparaît dans cette étude que la concentration en spores dans l'air décrit une courbe de forme Gaussienne, centrée sur juillet-août pour le genre *Cladosporium*, et sur septembre pour *Alternaria*.

Les variations annuelles de concentrations en micro-organismes dans l'air sont associées à des variations de la taille des sources, sous l'effet des paramètres météorologiques caractéristiques de chaque saison. Il n'y a pas de fait général : même si la plupart des micro-organismes sont favorisés pendant la saison chaude, d'autres (comme *Ustilago*, par exemple) préfèreront les conditions plus fraîches et seront donc moins abondants en été.

II.2.c.(ii) Variabilité diurne

Les variations jour/nuit de la concentration en micro-organismes dans l'air apparaissent comme très importantes dans plusieurs études, avec des **valeurs plus élevées durant la journée que pendant la nuit** (Lindemann & Upper, 1985 ; Shaffer & Lighthart, 1997). La figure 12 ci-dessous montre la variation moyenne de la concentration en bactéries cultivées dénombrées avec un pas de temps de 2 minutes sur une période de plusieurs jours (Lighthart & Shaffer, 1995b).

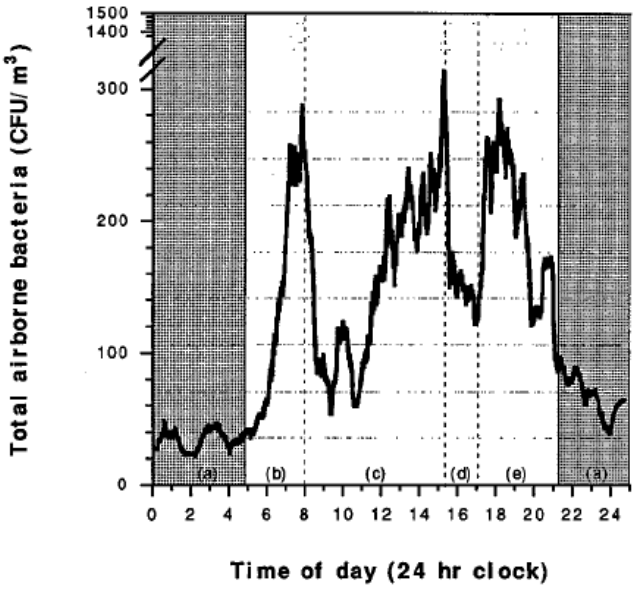


Figure 12 : Dénombrements des bactéries cultivées en été à 1,5 m du sol au dessus d'une prairie (moyenne sur 15 jours consécutifs). (Résultats dans Lighthart & Shaffer, 1995b, figure tirée de Lighthart & Shaffer 1995a).

On peut décrire 5 phases, selon les auteurs :

(a) Concentration minimale, observée durant la nuit, inférieure à 50 colonies m^{-3}

(b) Pic au lever du jour, qui serait dû à la dispersion de la couche résiduelle formée les jours précédents quand le temps est sec, sous l'effet du réchauffement du sol

(c) Accumulation dans la couche instable à proximité du sol au milieu de la journée, en dessous d'une couche d'inversion de température, jusqu'à 300 colonies m^{-3}

(d) Influence de l'apparition d'un vent de mer, moins chargé en bactéries cultivées

(e) Le soir, après arrêt du vent de mer, diminution progressive et retour au niveau nocturne

L'alternance jour/nuit peut donc être responsable de variations d'un facteur 10 du contenu bactérien dans l'air. Mais comme dans le phénomène de « spore plume », augmentation brutale et importante (également d'un facteur 10) du nombre de spores fongiques dans l'air en milieu de journée (Burch & Levetin, 2002), les conditions météorologiques occupent aussi une grande place dans l'explication des variations à courte échelle de temps.

D'un autre côté, **l'effet létal du rayonnement solaire** sur les micro-organismes de l'air a été démontré par Tong & Lighthart (1997). C'est comme ça que le présentent les auteurs, même s'ils n'ont en fait démontré son action seulement sur la cultivabilité. Après avoir réalisé des prélèvements d'air pendant la journée, de nuit et par temps couvert ou ensoleillé, ils ont exposé les échantillons au soleil de midi avant incubation. Dans chacun des cas, une exposition au rayonnement solaire diminue le nombre de colonies retrouvées dans les échantillons. Mais de façon plus précise, la proportion d'organismes résistants au rayonnement solaire est plus importante de jour que de nuit, et atteint des valeurs intermédiaires par temps nuageux. Cela laisse donc supposer qu'une sélection s'opère par le biais de l'exposition au soleil : de jour, seules, ou presque, les bactéries ayant la capacité de résister subsistent, alors que la nuit une grande partie de la communauté bactérienne est sensible.

La conclusion de cette étude contredit les variations jour/nuit précédemment exposées. **Les concentrations mesurées sont donc finalement décrites comme la résultante des flux positifs (émission) dus au jour et négatifs (perte de la cultivabilité) sous la pression du rayonnement solaire**. Si la pression de sélection est supérieure à l'émission, le nombre de colonies formées à partir de culture de prélèvements atmosphériques diminue avec le temps. Ce facteur de sélection augmente donc relativement, on peut le supposer, avec l'altitude. En effet l'éloignement de la source (le sol) s'accroît avec l'altitude et le flux positif de micro-organismes s'en trouve certainement réduit. De plus, le temps de transit depuis le sol allonge le temps d'exposition au rayonnement par rapport à des prélèvements réalisés à basse altitude.

II.2.c.(iii) Périodicité globale

En résumé, les variations du nombre de micro-organismes en suspension dans l'air, à proximité du sol, semblent dans tous les cas liées à l'ensoleillement. La **périodicité est double** : une première période d'une durée de 24 heures, à laquelle se superpose une période annuelle dont le maximum se situe en été (figure 13) (Lighthart, 1999).

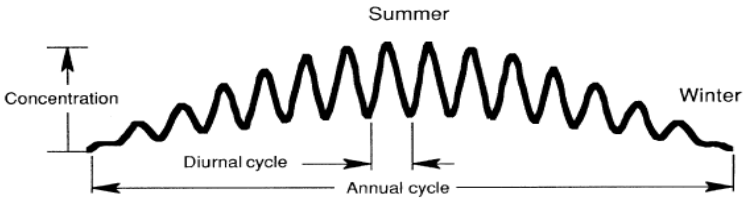


Figure 13 : Représentation schématique des variations diurnes et annuelles de la concentration en bactéries cultivées en air libre. (Lighthart, 1999).

Pour ce qui est de la périodicité annuelle, elle est liée à l'inclinaison du soleil (figure 14) par rapport à la Terre, qui détermine la taille des sources. La production biologique primaire étant plus importante en été en raison entre autres de l'ensoleillement plus important, les concentrations en bactéries, organismes détritivores, saprophytes ou parasites, suivent la même tendance (Lighthart, 1999).

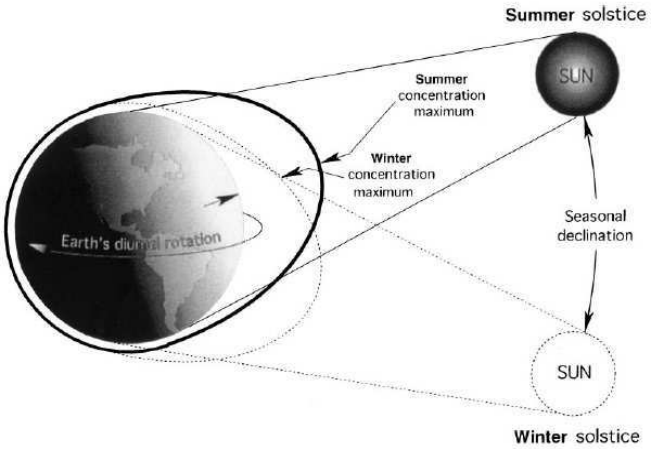


Figure 14 : Représentation schématique expliquant les variations saisonnières d'abondance des bactéries cultivées en air libre, aux deux périodes extrêmes de l'année, le solstice d'été et le solstice d'hiver. (Lighthart, 1999).

A ces variations temporelles cycliques et périodiques s'ajoutent des facteurs météorologiques, souvent identifiés comme également quantitativement responsables des variations de contenu microbien dans l'air. Il s'agit en quelque sorte d'une autre manière d'aborder la saisonnalité, quand on sait que les saisons présentent chacune des caractéristiques de température, d'humidité et de luminosité qui leur sont propres.

II.2.d) Facteurs météorologiques

Il a été montré que de manière générale, les fronts entre différentes masses d'air étaient des zones de fortes concentrations en micro-organismes, sous l'effet de la turbulence. D'un autre côté, les précipitations qui peuvent survenir dans une masse d'air vont la lessiver et font chuter ce nombre (Fulton, 1966c). Les caractéristiques météorologiques locales telles que la température, la vitesse du vent, l'humidité relative ou encore la quantité de lumière reçue, occupent également une place importante dans l'explication de la concentration en microorganismes de l'air.

II.2.d.(i) Température

De nombreuses études mettent en évidence des **corrélations entre le nombre de micro-organismes dans l'air et la température ambiante**. Ce paramètre représente certainement la caractéristique météorologique la plus documentée à ce sujet. Comme le montre la figure 15, la plupart du temps, la concentration en micro-organismes augmente avec la température, aussi bien pour les bactéries (Di Giorgio et al., 1996 ; Harrison et al., 2005) que pour les champignons (Katial et al., 1997 ; Sabariego et al., 2000 ; Burch & Levetin, 2002 ; Adhikari et al., 2006), et ceci de manière plus flagrante pour les sites continentaux que côtiers.

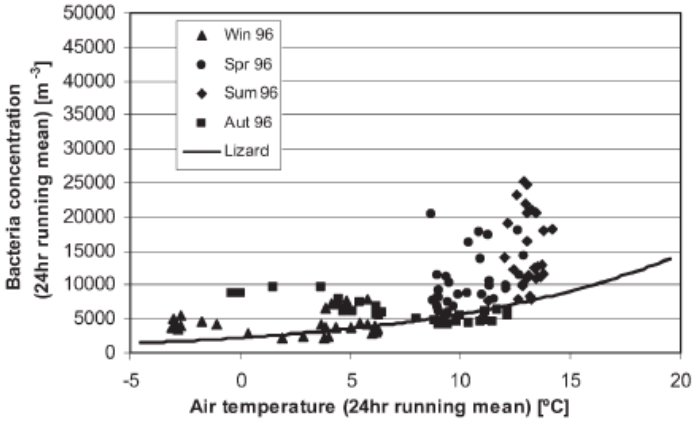


Figure 15 : Influence de la température sur la concentration en bactéries dans l'air, pour un site rural (points) et régression obtenue à partir des données d'un site côtier (ligne). (Harrison et al., 2005).

La même influence positive de la température sur l'abondance microbienne cultivée a été détectée dans le brouillard, dans une zone urbaine de l'Italie, par Fuzzi et al. (1997) (figure 16). Les variations sont de l'ordre de 1 x 10^4 cellules m^{-3} à plus de 5 x 10^4 cellules m^{-3} pour des températures respectives de 5°C et de 10°C.

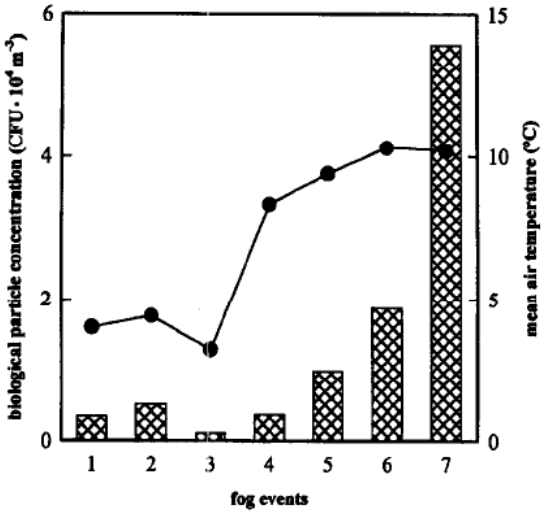


Figure 16 : Variations de la température (**courbe, échelle de droite**) et de la concentration en micro-organismes cultivés (bactéries + champignons) (**histogramme, échelle de gauche**) dans le brouillard. (Fuzzi et al. 1997).

Le contrôle de l'abondance microbienne dans l'air par la température peut aisément s'expliquer par les phénomènes de convection depuis le sol, entraînant des particules et augmentant ainsi le flux vertical de cellules. Une température relativement tempérée (~15°C) favorise également souvent la croissance d'un large éventail de micro-organismes et accroît donc la taille des sources. Il semble cependant que l'augmentation de la concentration avec la température peut ne plus être vraie lorsque cette dernière est trop élevée (> 15°C), et elle peut alors devenir défavorable (Rüden et al., 1978, Di Giorgio et al., 1996), notamment pour certains genres microbiens comme le champignon *Ustilago* (Sabariego et al., 2000).

L'influence du rayonnement solaire est peut-être aussi en cause dans ces dernier cas, car les hautes valeurs de concentrations en micro-organismes ne sont observées que pour des ensoleillements faibles (Rüden et al., 1978). Une quantité de lumière importante pourrait être liée à la limitation observée pour les plus hautes températures.

II.2.d.(ii) Vitesse du vent

Alors que l'on pouvait s'attendre à la retrouver parmi les paramètres les plus influents, la vitesse du vent est assez **rarement mise en cause dans les variations observées**. Le vent soulève en effet les particules et un vent de 5 m s^{-1} suffit à entraîner les spores de champignons se trouvant à la surface des feuilles d'une canopée. En France, à Marseille (zone urbaine) et dans sa région (île de Porquerolles, zone côtière), Di Giorgio et al. (1996) ont pu mettre en évidence une corrélation positive entre le nombre de micro-organismes cultivés et la vitesse du vent. Une même constatation a été faite sur la quantité de spores fongiques par Burch & Levetin en 2002 (figure 17), en relation aussi avec la température et l'humidité relative.

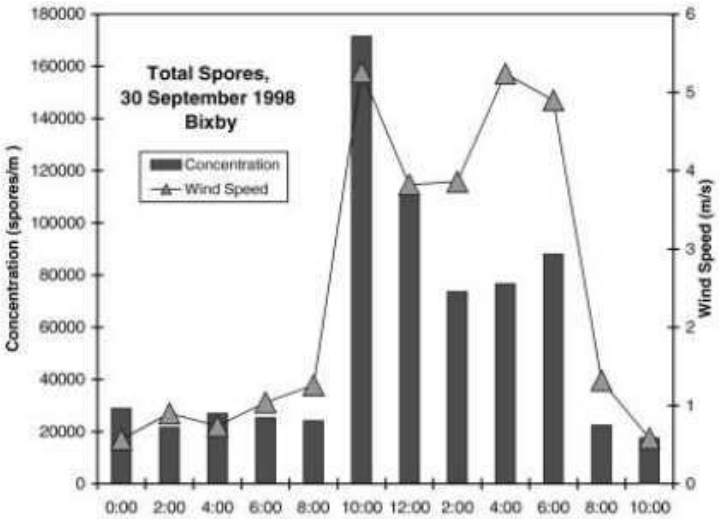


Figure 17 : Influence de la vitesse du vent sur la concentration en spores fongiques dans l'air (Burch & Levetin, 2002).

Pourtant, dans de nombreux travaux où la vitesse du vent est mesurée simultanément aux échantillonnages, aucune relation n'a été détectée (Jones & Cookson, 1983 ; Fuzzi et al., 1997; Harrison et al., 2005).

II.2.d.(iii) Humidité relative et précipitations

L'humidité relative est définie comme le rapport entre la quantité de vapeur d'eau effectivement présente dans un échantillon d'air sur la quantité maximale qu'il peut contenir à une température T. Pour Katial et al. (1997) et Burch & Levetin (2002), la teneur en vapeur d'eau affecte positivement le nombre de spores fongiques, alors que la relation est négative pour Rüden et al. (1978). La corrélation est également positive pour Mancinelli & Shulls (1978) concernant les bactéries cultivées. L'action de l'humidité est donc complexe, et est, semble t-il, dépendante du groupe microbien considéré (Sabariego et al., 2000). Aucune conclusion générale ne peut être donnée de façon définitive quant à son effet, car les influences déterminées dans des études distinctes sont effectivement significatives, mais de signes opposés, et l'incertitude demeure.

Quant aux précipitations, il est bien établi que les gouttes de pluie lessivent l'air de ses particules. Logiquement, les concentrations en micro-organismes dans l'air diminuent donc pendant les évènements pluvieux (Fulton, 1966c). Cependant, proche du sol ou au dessus de la végétation, le nombre de bactéries augmente brutalement au début de l'épisode de pluie, certainement car celle-ci disperse la couche de poussière déposée sur la surface du sol ou des feuilles (Lindemann & Upper, 1985). La même étude montre qu'un sol mouillé est lié à une

augmentation du nombre de bactéries dans l'air. Cela peut-être dû au fait que le développement microbien est favorisé sur les surfaces mouillées, ainsi que la production et l'émission de spores (Jones & Harrison, 2004). Le paramètre « sol mouillé » ou « sol sec » n'est pas précisé dans les études dont il était question pour l'humidité relative, et il pourrait être à l'origine des conclusions variables auxquelles elles aboutissent.

L'influence météorologique sur la charge microbienne de l'air existe donc bel et bien, mais il est difficile de conclure quant à un effet positif ou négatif général d'un paramètre. Les conclusions varient en effet suivant les études : un paramètre identifié comme hautement responsable des variations dans une étude ne montrera aucune corrélation dans une autre, et l'influence peut même se révéler contraire, et **l'influence des facteurs météorologiques reste globalement floue**.

II.2.e) Caractéristiques chimiques

Quelques études abordent le problème de l'abondance des micro-organismes dans l'air en l'expliquant aussi par des variables chimiques. Adhikari et al. (2006) ont observé que les pics de concentration en spores fongiques suivaient ceux d'ozone, apparemment sous l'effet de la température, positivement corrélée aux deux paramètres.

En 1978, Rüden et al. ont montré que les composés organiques peuvent avoir une action bactéricide importante et donc influer sur le nombre de cellules dénombrées par culture. Plus précisément, en environnement urbain le nombre de bactéries cultivées de l'air augmente significativement quand la concentration en NO_2 augmente et que celle en NO diminue (Mancinelli & Shulls, 1978). Même si les auteurs ne discutent pas là-dessus, ces corrélations sont peut être davantage dues à l'effet du rayonnement solaire. Si celui-ci est élevé, il va en effet avoir les actions conjointes de réduire NO_2 en NO (donc NO_2 va diminuer au profit de NO) et d'exercer une action létale sur les cellules. Les concentrations en cellules microbiennes cultivées et le rapport NO / NO_2 se retrouvent donc liées, mais il est plus vraisemblable qu'elles le sont de manière indirecte, ces deux paramètres étant dépendants du rayonnement solaire.

Enfin, dans le brouillard, également en zone urbaine, **la concentration en bactéries est négativement affectée par l'acidité du milieu et la concentration en plomb** (figure 18) (Fuzzi et al., 1997).

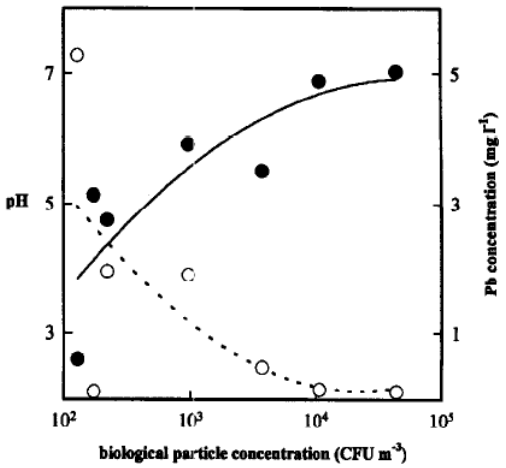


Figure 18 : Relations entre la concentration en bactéries non-sporulantes et le pH (●) et la concentration en plomb (○) mesurés dans l'eau de brouillard en zone urbaine. (Fuzzi et al., 1997).

Ces influences du pH et de la concentration en plomb sont surtout valables pour les bactéries non-sporulantes, qui doivent se maintenir en activité ne disposant pas de forme de

protection (Fuzzi et al., 1997). Les organismes sporulants, en dormance, sont peu touchés. Cela suggère également que l'eau atmosphérique non précipitante peut se révéler être un milieu où les cellules peuvent se diviser, mais que la présence de polluants limite cette prolifération et donc la concentration cellulaire dans le milieu. Il faut signaler que le lien de cause à effet entre la composition chimique et microbiologique des gouttelettes n'est pas clairement établi, et on pourrait tout aussi bien conclure à une co-évolution indépendante des deux paramètres.

II.2.f) Bilan

L'influence du site et de la période de la journée et de l'année à laquelle sont réalisés les prélèvements est donc décisive, et des effets météorologiques ainsi que des caractéristiques chimiques viennent s'y superposer. Les paramètres abiotiques influant sur les concentrations en cellules totales et cultivées dans des prélèvements atmosphériques sont récapitulés dans le tableau 3. La concentration microbienne mesurée à un instant t est la résultante de tous ces effets, cumulés, chevauchants ou antagonistes, rendant l'analyse des données complexe et souvent l'attribution d'une variation à un paramètre isolé plus qu'incertaine.

Paramètre	**Nombre de cellules**	
	Totales	**Cultivées**
Site / Influence	Urbain plus variable	Urbain > Rural > Côtier
Saison	?	Eté > Hiver
Jour / Nuit	?	Jour > Nuit
Altitude	↘ avec l'augmentation d'altitude	↘ avec l'augmentation d'altitude
Température	↗ avec la température	↗ avec la température
Vent	Variable	Variable
Humidité relative	Variable	Variable
Précipitations	↘ quand pluie	↘ quand pluie
Pollution anthropique	?	↘ avec le pH et l'augmentation des polluants anthropiques

Tableau 3 : Récapitulation des influences abiotiques connues sur le nombre de cellules totales et cultivées dans les échantillons atmosphériques.

II.3. Aspect qualitatif : les groupes microbiens identifiés

Peu d'équipes se sont intéressées à la diversité microbienne de l'air par des méthodes indépendantes de la cultivabilité. Les techniques actuelles de biologie moléculaire permettent par exemple d'établir des empreintes génétiques globales de la population bactérienne. Différentes empreintes peuvent être comparées entre elles pour suivre l'évolution de la population (figure 19).

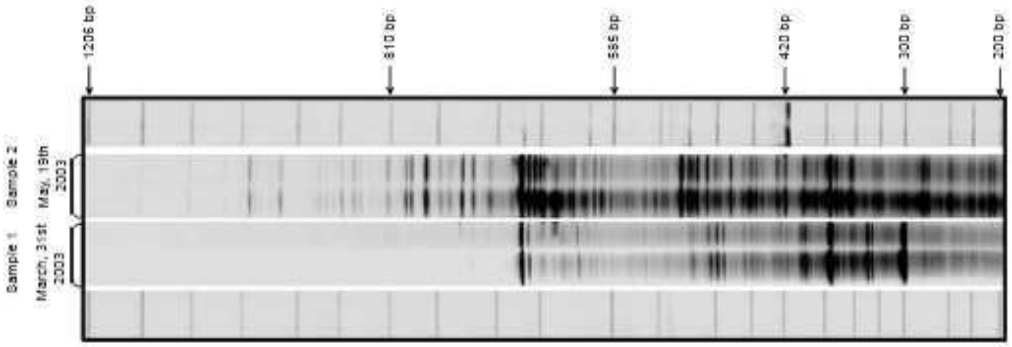


Figure 19 : Empreinte génétique ADN de la séquence intergénique située entre les gènes *rrs* et *rrl* pour 2 échantillons d'air de la région de Nancy (France) obtenus par fingerprinting (Maron et al., 2005).

Maron et al. (2005) ont effectué des prélèvements d'air en zone rurale dans la région de Nancy (France) et ont étudié la biodiversité bactérienne par fingerprinting et élaboration d'une banque de clones. La diversité apparaît élevée, et après avoir supprimé les signaux chloroplastiques (32 % des séquences clonées) liés à la présence de débris végétaux, la population bactérienne se compose comme présentée en figure 20, ci-dessous.

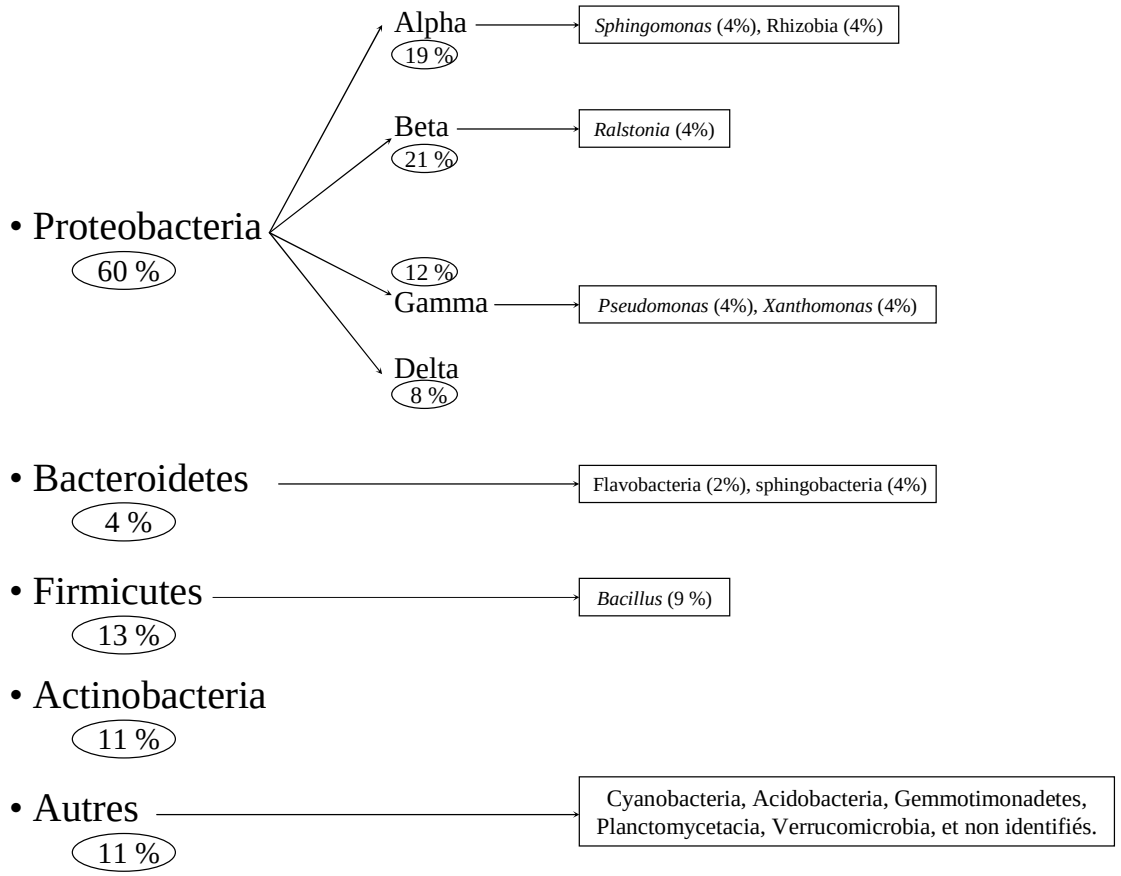


Figure 20 : Composition de la population bactérienne d'un échantillon d'air (d'après Maron et al., 2005).

La population est très largement **dominée par les bactéries Gram-négatifs** (64%). Certains genres sont très représentés, comme les Gram positifs *Bacillus*, et les Gram négatifs *Pseudomonas*, *Xanthomonas* (genres souvent associés à la végétation), *Sphingomonas* ou *Ralstonia*. Harrisson et al., (2005), par une méthode moléculaire, identifient également *Bacillus* et *Pseudomonas* comme étant les genres dominants.

La faible cultivabilité (~1 %) des bactéries de l'atmosphère (par exemple Di Giorgio et al., 1996) fait que la diversité évaluée par méthode culturale est très différente des valeurs obtenues par voies moléculaires. Les milieux de culture influencent vraisemblablement de façon importante le contenu d'un échantillon en organismes cultivés. Pour les organismes cultivés, la revue de Lighthart (1997) rapporte que 70 à 90% concerne les Gram-positifs, avec une représentation élevée du genre *Bacillus*. Parmi les Gram-négatifs, les genres *Pseudomonas* et *Xanthomonas* sont les plus souvent isolés, et représentent respectivement entre 5 et 10% et entre 0 et 8% de la population bactérienne cultivée.

Les résultats obtenus par culture au cours de cette thèse montrent une composition plus proche de celle donnée ici, obtenue par méthode moléculaire, que des études s'intéressant aux cultivables. Les milieux de culture que nous avons utilisés (R2A) paraissent donc bien adaptés aux échantillons de nuage. Les tableaux 4 et 5 recensent les genres bactériens et fongiques retrouvés dans des échantillons atmosphériques (sauf [18] : glace de glacier d'altitude).

Phylum	Genre (espèces)	Références
Actinobacteria	*Actynomyces*	[6]
	Arthrobacter	[16], [18]
	Aureobacterium	[16]
	Brevibacterium	[17], [18]
	Cellulomonas	[16]
	Clavibacter	[16]
	Corynebacterium	[4], [6], [16], [17]
	Curtobacterium	[16]
	Methylobacterium	[6]
	Microbacterium	[16]
	Micrococcus (dont *albus*)	[4], [7], [11], [16], [17], [18]
	Mycobacterium (dont *luteum*)	[7]
	Nocardia	[18]
	Propionibacterium	[6]
	Rhodococcus	[6], [16]
	Streptococcus	[11]
	Streptomyces	[14], [18]
Firmicutes	*Bacillus* (dont *alvei*, *circulans*, *firmus*, *subtilis*)	[4], [5], [6], [11], [12], [13], [15], [16], [17]
	Aerococcus	[11]
	Clostridium	[6], [11]
	Lactobacillus	[11]
	Leuconostoc	[11]
	Listeria	[17]
	Pediococcus	[11]
	Peptococcus	[11]
	Peptostreptococcus	[6], [11]
	Sarcina	[11]
	Sporobacillus	[11]
	Sporosarcina	[11]
	Staphylococcus	[6], [11], [17]
Proteobacteria (Alpha-)	*Ochrobactrum*	[16]
	Paracoccus	[11]
	Phyllobacterium	[6]
	Sphingomonas	[12]
Proteobacteria (Beta-)	*Achromobacter*	[18]
	Acidovorax	[6]
	Alcaligenes	[16], [18]
	Burkholderia	[6]
	Delftia	[6]
	Neisseria	[11]
	Ralstonia	[6], [12]
	Variovorax	[6]
Proteobacteria (Gamma-)	*Acinetobacter*	[5], [6], [16], [18]
	Enterobacter	[16]
	Erwinia	[6]
	Klebsiella	[16]
	Pseudomonas	[5], [6], [11], [12], [16], [18]
	Rahnella	[6]
	Serratia	[11], [16]
	Shewanella	[6]
	Shigella	[6]
	Stenotrophomonas	[6]
	Xanthomonas	[11], [12], [16]
Bacteroidetes	*Cytophaga*	[6]
	Flavobacterium	[18]
	Prevotella	[6]
Cyanobacteria	*Microcystis*	[6]

Tableau 4 : Genres bactériens retrouvés dans des échantillons atmosphériques (les espèces sont précisées quand elles sont connues). Références : [1] Angulo-Romero et al. (1999) ; [2] Ariya et al. (2002); [3] Burch & Levetin (2002) ; [4] Fulton (1966a ; b ; c) ; [5] Fuzzi et al. (1997) ; [6] Harrisson et al. (2005) ; [7] Imshenetsky et al. (1978) ; [8] Jones & Cookson (1983) ; [9] Juozaitis et al. (1998) ; [10] Katial et al. (1997) ; [11] Mancinelli & Shulls (1978) ; [12] Maron et al. (2005) [13] Newman (1948) ; [14] Radon et al. (2002) ; [15] Sabariego et al. (2000) ; [16] Shaffer & Lighthart (1997) ; [17] Tong et al. (1993); [18] Zhang et al. (2002). (Toutes les études utilisent des méthodes culturales sauf [6] et [12]. [18] concerne un glacier d'altitude).

Genre (espèces)	Références		
Alternaria	[1], [3], [4], [10], [14], [15]	*Conyothyrium*	[4]
Aspergillus (dont *duricaulis*, *fischeri*, *fumigatus*, *niger*)	[4], [5], [7], [8], [9], [14]	*Curvularia*	[3]
Cladosporium (dont *cladosporioides* et *herbarum*)	[3], [10], [13], [14], [15]	*Drechslera*	[3]
Penicillium (dont *canescens*, *commune*, *chrysogenum*, *decumbens*, *implicatum*, *notatum*, *oxalicum*, *variabile*, *spinulosum*)	[4], [5], [9], [14]	*Eurotium*	[14]
		Fusarium	[4]
Candida	[5], [9], [14]	*Hormodendron*	[4]
Epicoccum	[3], [10]	*Mucor*	[4]
Ustilago	[4], [15]	*Papularia*	[4]
Pythium	[5], [9]	*Papulaspora* (*anomata*)	[7]
Phoma	[4], [9]	*Pithomyces*	[3]
Geotrichum	[2], [5]	*Pullularia*	[4]
Aureobasidium	[9]	*Rhizopus*	[4]
Botrytis	[14]	*Rhodotorula*	[5]
Chaetomella	[4]	*Stachybotrys*	[4]
Chaetomium	[4]	*Tricellula* (*aquatica*)	[9]
Circinella (*muscae*)	[7]	*Trichoderma*	[4]

Tableau 5 : Genres fongiques (champignons et levures) retrouvés dans des échantillons atmosphériques. Voir la légende du tableau 4 pour le détail des références.

III. LES NUAGES : UN MILIEU EXTREME POUR LE VIVANT

L'eau, sous forme de gouttelettes ou de cristaux dans les nuages, représente un lieu où peuvent subsister des micro-organismes viables. Le contraire aurait été surprenant aux regards des milieux extrêmes divers que sont capables de coloniser les bactéries et champignons, et cette présence est aujourd'hui irréfutablement démontrée. Pourtant, **de nombreux facteurs à effet potentiellement létal pour les micro-organismes sont rencontrés avant, pendant et après leur intégration dans le nuage**. Pour que les microorganismes soient métaboliquement actifs dans les nuages, ils doivent résister face à ces pressions abiotiques diverses, et une certaine sélection pourrait s'opérer par cette voie. Les nuages sont en effet des milieux toujours acides (pH 2 à 7), très oxydants, froids et où les conditions physco-chimiques sont extrêment variables sur de courtes périodes de temps. Ce chapitre recense les facteurs de stress que les micro-organismes sont susceptibles de rencontrer le long de leur transit aérien, depuis l'aérosolisation jusqu'aux conditions du nuage. Il sera essentiellement question des bactéries, car pour la plupart d'entre elles, elles ne présentent pas de forme de résistance leur permettant de rester « en dormance », à l'inverse de la majorité des champignons.

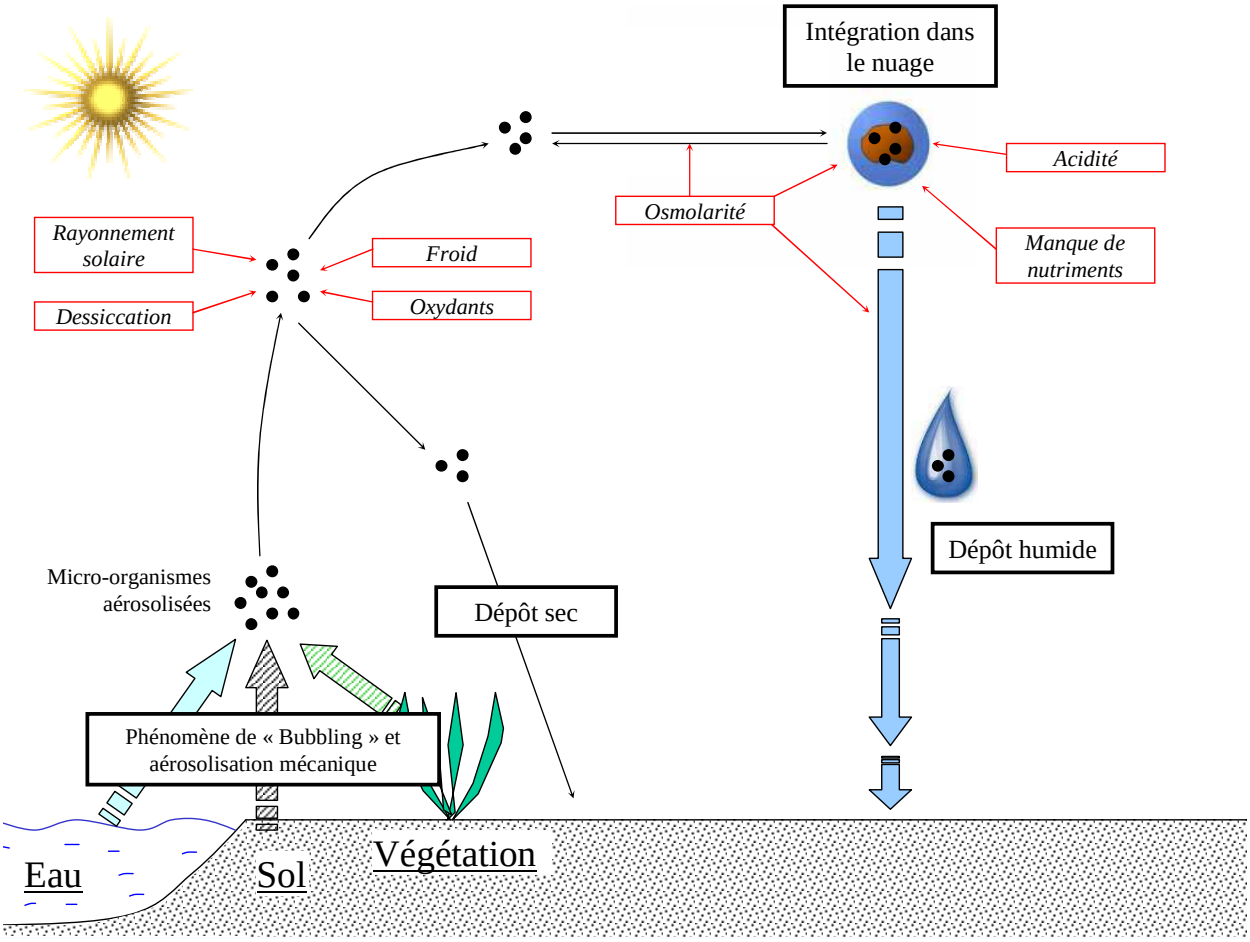


Figure 21 : Schéma récapitulatif des facteurs de stress et de mortalité microbienne dans l'atmosphère.

Les différents facteurs de stress que peut rencontrer une cellule lors de son transit depuis la zone d'émission jusqu'à sa présence dans le nuage sont répertoriés sur la figure 21. Ils sont détaillés un à un dans cette section.

III.1. Vie, mort et résistance microbiennes

La revue de Roszak & Colwell (1987) sur les états physiologiques des bactéries et leurs moyens de résistance face aux conditions environnementales constitue un bon support bibliographique, intéressant et bien documenté. Elle est parue à une période où la distinction entre cellules viables et cultivables était admise depuis peu, grâce à l'apparition de méthodes d'investigation indépendantes des cultures.

III.1.a) Vie et mort microbiennes

Sans rentrer dans des débats philosophiques, il s'agit ici de donner des précisions quant aux termes de vie et de mort des cellules bactériennes, souvent utilisés abusivement. A la différence des cellules des organismes eucaryotes pluricellulaires, il ne parait pas y avoir de limitation dans le temps à la vie d'une cellule bactérienne. Si les premières ont clairement une phase de sénescence, qui survient après un certain nombre de divisions, les bactéries peuvent en théorie se diviser indéfiniment si les conditions le permettent. On peut donc en conclure que toute bactérie est capable de former une colonie sur un milieu gélosé. La cellule est dans ce cas dans un état dynamique, se divisant et s'adaptant aux paramètres environnementaux par des moyens variés (régulation de la synthèse d'enzymes, gestion des substrats, détournement de voies métaboliques, adaptations physiologiques…). On a longtemps cru, des raisons pratiques en sont sûrement aussi la cause, qu'une bactérie « vivante » était obligatoirement une bactérie dans un tel état dynamique. Par opposition, une cellule incapable de se diviser était donc une bactérie « morte ». Mais suite à la découverte de l'état viable non cultivable, les définitions de vie et surtout de mort bactériennes devenaient donc erronées, la mort étant un principe irréversible. Une bactérie non cultivable n'est donc plus une bactérie morte, que l'on préfèrera définir comme une cellule pour laquelle la barrière osmotique entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire est rompue. Les gradients ioniques sont donc détruits, rendant la production d'énergie et le métabolisme compromis de façon irréversible.

III.1.b) La sporulation

(Voir la revue de Roszak & Colwell (1987) pour les références concernant ce paragraphe).

La formation d'une **spore bactérienne** est induite par des conditions défavorables entraînant un stress. Il s'agit d'une forme de résistance dans laquelle peuvent s'enfermer et certains genres bactériens à Gram-positif, comme *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Myxococcus* ou *Thermoactinomyces*. Les spores sont des structures extrêmement **résistantes à la chaleur, à la dessiccation et aux composés chimiques**, ce qui leur permet de perdurer jusqu'à plusieurs centaines d'années dans l'environnement. Les cellules, alors en état de dormance, sont incapables de se diviser, leur contenu en eau est très faible, et leur métabolisme est stoppé. Elles disposent également de bas niveaux de charge énergique potentielle (NTPs, pyrimidines nucléotides, acétyl-coenzymeA…). Les cellules sporulées peuvent donc « germer » si des conditions favorables se présentent, et reprendre une activité normale. Les conditions de germination sont dépendantes de celle de la sporulation : la physiologie et la charge enzymatique de la cellule doivent être adaptées aux conditions de germination, ce qui nécessite qu'elles ne soient pas trop éloignées des conditions de sporulation, excepté bien sûr le facteur qui a conduit à sporuler.

La sporulation est un phénomène progressif, dans lequel il existe un point de non-retour, à partir duquel la formation de la spore est inévitable. Pour germer, des spores nouvellement formées nécessitent un **stress d'activation** (lumière, baisse du pH, chaleur, agents réducteurs…), et ce même si les conditions sont optimales. On peut interpréter cela d'un point de vue physiologique : un stress indique à la cellule que le milieu qui a conduit à la

sporulation a changé, et peut ne plus être défavorable. La germination de spores plus anciennes ne requiert pas d'activation.

Les spores représentent **un moyen de dissémination** des bactéries par l'air, et elles ont donc toutes les chances de prendre part à la biomasse des nuages. Cependant, elles ne présentent pas d'intérêt au niveau des interactions micro-organismes / milieu, puisque leur métabolisme est réduit au strict minimum.

III.1.c) L'état viable non-cultivable (VBNC)

L'état VBNC peut être induit par des conditions de stress, dont le passage brusque d'un milieu favorable à un environnement à faibles concentrations en nutriments, qui provoque un stress nutritionnel. D'après Wilson & Lindow (1992), 75 % des cellules viables qui se développent sur des feuilles de végétaux, donc en présence de faibles quantités de nutriments, ne sont plus détectées par culture, après 3 jours passés dans cet environnement. Dans les eaux naturelles, les bactéries cultivables représentent généralement autour de 1 % environ du nombre total de cellules (Bussmann et al., 2001). Le chlore peut provoquer un état VBNC, ce qui peut induire des résultats faussement négatifs lors de contrôles de contamination (Calabrese & Bissonnette, 1990).

Kurath & Morita (1983) ont réalisé des dénombrements d'une souche marine de *Pseudomonas* sp. par différentes méthodes (cultures, transformation du glucose ^{14}C en $^{14}CO_2$, et microscopie) après avoir placé des cellules cultivées en condition de privation nutritionnelle (figure 22).

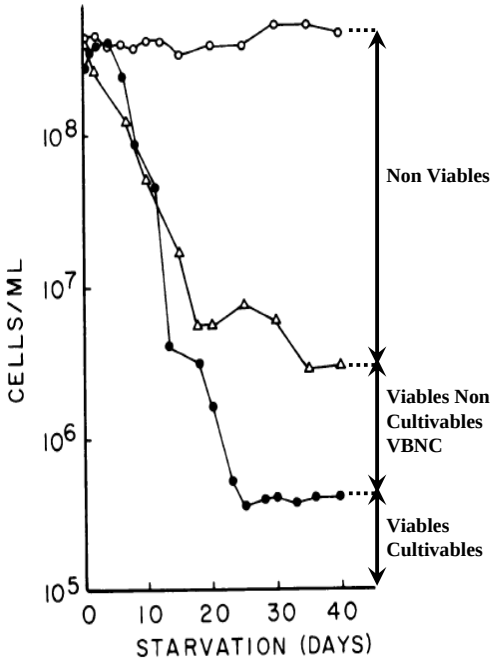


Figure 22 : Concentrations en cellules totales, viables et cultivables au cours d'une période de privation nutritionnelle. (●) Dénombrements par étalements sur milieu de culture ; (○) comptages directs par microscopie ; (△) nombre estimé par mesure de la respiration (^{14}C) (d'après Kurath & Morita, 1983).

On voit clairement que les dénombrements par culture aboutissent à des valeurs de concentrations environ 10 fois moindre que celles obtenues par mesure de la respiration, après 40 jours de stress nutritionnel. Des cellules métaboliquement actives se trouvent donc sur l'Agar sans former de colonie. Cette réponse au stress nutritionnel a été observé chez de nombreux genres bactériens, d'affiliations taxonomiques variées : *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Streptococcus* et même, dans une proportion moindre,

des organismes sporulants comme *Bacillus* (Byrd et al., 1991, et références citées ; Wilson & Lindow, 1992). L'état VBNC est certainement encore bien plus largement répandu. Il semblerait que cet état soit commun chez les bactéries de l'environnement, et nécessaire chez les non sporulantes, souvent confrontées à des conditions très variables donc potentiellement stressantes. D'autres facteurs relatifs au milieu, comme des teneurs anormalement réduites ou élevées en oxygène, de fortes concentrations en NaCl ou un milieu très réducteur peuvent aussi être à l'origine de la perte de cultivabilité (Mascher et al., 2000 ; Bussmann et al., 2001). De manière générale, l'ensemble des facteurs de stress peut conduire à un état VBNC.

Plusieurs études, dont Novitsky & Morita (1978) (dans Roszak & Colwell, 1987) ont constaté qu'à la suite d'un stress nutritionnel, des cellules peuvent être encore capables de se diviser mais sans augmentation de la biomasse, formant de petites cellules ovoïdes. Il s'agit donc d'une **division réductive**, dans laquelle la taille des cellules est considérablement réduite après quelques divisions : des rapports de volumes variant de 15 à 300 ont été décrits. Même si le nombre de cellules augmente, l'incapacité à former des colonies visibles demeure. Si ces cellules sont replacées sur un milieu plus nutritif, elles reprennent leur taille « normale » (habituellement observée en laboratoire). On peut penser qu'un tel comportement est favorisant au niveau sélectif pour des cellules en état de manque nutritionnel, dans le sens où l'augmentation du nombre de cellules accroît les possibilités de dissémination vers des milieux plus propices au développement.

La signification écologique de l'état VBNC n'est pas claire. Il apparaît dans certains cas que la perte de la cultivabilité est associée à un dysfonctionnement de la protection contre les radicaux libres (catalase) sous l'effet du stress, ce qui explique que l'ajout de catalase dans le milieu de culture améliore les résultats (voir II.2.a.*(ii)*). Mais l'état VBNC peut aussi être interprété comme une forme de défense des organismes non sporulants contre des conditions défavorables, qui consacrent leur énergie à se défendre contre les agressions extérieures plutôt qu'à la division cellulaire. Pourtant, des expériences conduites sur des *Pseudomonas fluorescens* montrent que leur taux de survie dans le sol n'est pas meilleur que celui des cellules cultivables (Mascher et al., 2000).

Il est donc finalement évident qu'une partie des cellules non détectées par cultures restent viables et conservent une certaine activité métabolique. Elles doivent pour cela trouver des substrats et peuvent par conséquent avoir une influence sur la composition chimique du milieu. Il s'agit d'un point à considérer avec attention dans la problématique qui nous occupe.

III.1.d) Les ultramicrobactéries

La présence de bactéries hétérotrophes de petite taille a été plusieurs fois mise en évidence dans l'eau de mer. En 1965, Anderson & Heffernan isolent des bactéries après une filtration sur une membrane de porosité 0,45µm, suivie d'une deuxième de 0,22 µm. Des cellules cultivables ont été retrouvées en aval de la première filtration, permettant d'estimer la taille de ces microbactéries entre 0,22 et 0,45 µm. Elles ont été identifiées comme appartenant aux genres *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Leucothrix*, *Spirillum* et *Vibrio*. Torrella & Morita (1981) ont observé des microcolonies et même des ultramicrocolonies par microscopie optique. Ces dernières, invisibles à l'œil nu, sont envahies par les colonies d'autres espèces, de taille classique, qui les « phagocytent », et restent donc indétectables par étalement sur milieu de culture (figure 23).

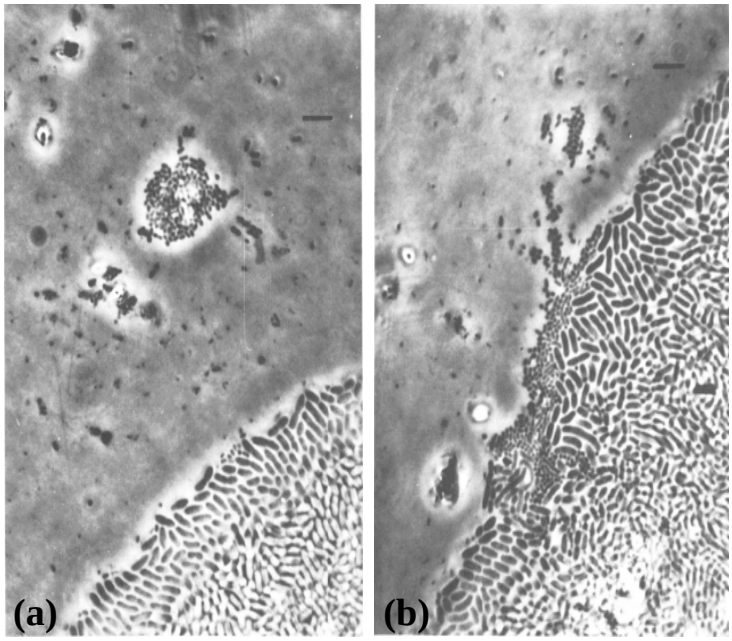


Figure 23 : Photographies de colonies bactériennes isolées d'eau de mer observées en microscopie optique, après 24 heures d'incubation à 20°C. (**a**) Deux colonies bactériennes : une colonie de taille habituelle, en bas à droite, et une ultramicrocolonie, formée d'ultramicrobactéries, au centre. (**b**) Contact entre les deux colonies ; l'ultramicrocolonie est « phagocytée » par la colonie de cellules « normales ». Taille de la barre = 5 µm. (Torrella & Morita, 1981).

Les **microcolonies** semblent constituées de cellules dont **la petite taille est induite par un stress nutritionnel**, puisqu'elles retrouvent une taille plus commune lorsque les souches concernées sont incubées sur un milieu plus riche. Par contre, **ce n'est pas le cas des ultramicrobactéries**, pour qui la taille n'excède jamais 0,3 µm. Ces bactéries, négligées dans les dénombrements, sont sûrement abondantes dans l'environnement car elles sont à l'aise avec de faibles concentrations en nutriments. Comme le suggère Roszak & Colwell (1987), l'acquisition de la petite taille représente sans doute une stratégie précoce dans l'adaptation bactérienne aux conditions oligotrophes. Cette adaptation aux faibles concentrations en nutriments pourrait leur conférer un avantage évident quant au transit par voie aérienne et à la survie dans les nuages.

III.2. Facteurs de stress et réponses bactériennes

Le fait qu'un paramètre soit un facteur de stress dépend de l'écologie habituelle de l'organisme. Les stresses sont provoqués par des variations brutales des conditions ambiantes, qui nécessitent une réponse physiologique de la part de la cellule qui les subit. Ici sont discutés les facteurs de stress potentiels que peut rencontrer une bactérie aérobie depuis son émission dans l'air jusqu'à sa présence dans le nuage ainsi que diverses réponses physiologiques permettant leur subsistance. Sans rentrer dans le détail des réponses physiologiques, des pistes sont données pour permettre une recherche bibliographique plus approfondie.

III.2.a) Généralités sur la réponse au stress

Les bactéries semblent capables de produire des réponses adaptées à chaque type de stress. Mais de fortes similarités existent souvent entre ces réponses, et ce paragraphe a pour but de donner un aperçu rapide des processus mis en jeu.

La cellule doit avant tout **préserver son matériel génétique** contre les agressions extérieures. Les bactéries disposent donc de systèmes de réparation et de protection de l'ADN (système SOS, par exemple) activés en cas de stress. Ceux-ci sont particulièrement exprimés lors d'expositions aux rayons ultraviolets, très mutagènes et dommageables. La revue de Foster (2005) traite de ces réponses génétiques aux stresses que peuvent subir les bactéries.

Des senseurs des conditions du milieu sont nécessaires pour pourvoir répondre de façon adaptée aux variations. Les senseurs cellulaires sont des protéines situées sur la membrane cytoplasmique ou libérées dans le milieu extracellulaire. Détecter les paramètres physico-chimique du milieu n'est pas la fonction première de ces molécules : les pilis ou des protéines-canal peuvent par exemple tenir ce rôle (Rowbury & Goodson, 1999 ; Booth et al., 2002). Le stress engendre une modification de leur structure et elles ne vont alors plus remplir leur fonction habituelle. Elles se complexent avec une autre protéine du périplasme, ou de la membrane cytoplasmique, un médiateur, qui induit une cascade d'interactions biochimiques à la suite de cette liaison. Ils provoquent des modifications physiologiques à différents niveaux : synthèse d'enzymes de détoxification et de protection, de protéines chaperonnes (qui se lient et protègent les molécules de la cellule), modifications de la composition de la membrane…. Les systèmes répondent généralement aux variations du milieu selon le modèle présenté sur la figure 24.

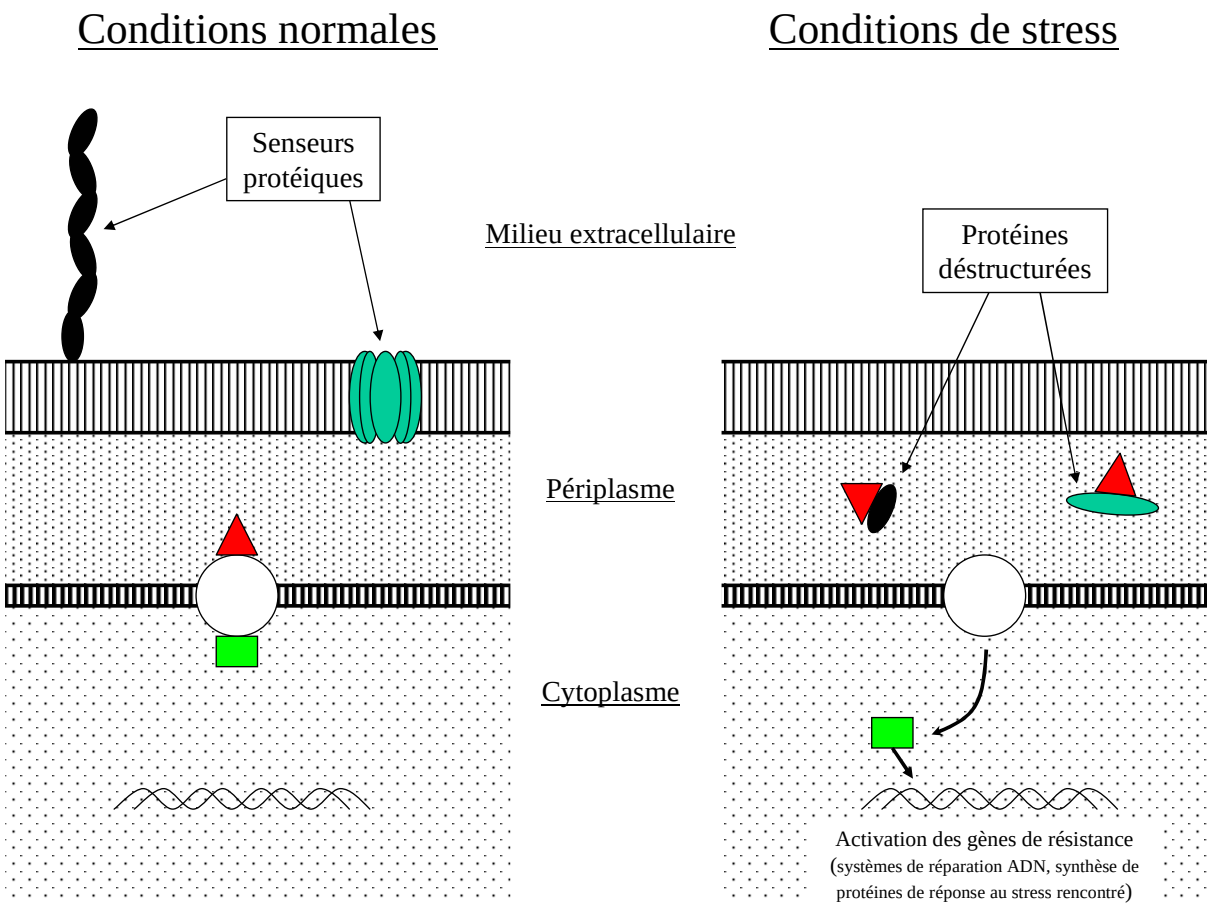


Figure 24 : Schéma modèle simplifié de la régulation de la réponse au stress chez les bactéries à Gram négatif. (D'après Duguay & Silhavy, 2004).

L'information de la variation des conditions extracellulaires est donc transmise jusqu'à l'intérieur de la cellule. En fin de chaîne, une protéine, souvent appelée facteur Sigma, va agir à un niveau transcriptionnel sur l'expression des gènes de résistance concernés (enzymes de détoxification, de réparation de l'ADN, pigments...). Les facteurs Sigma sont nombreux et

dépendent de l'affiliation taxonomique de la bactérie et du stress rencontré. Ils peuvent induire l'expression de nombreux gènes, comme le facteur SigmaB de *Bacillus subtilis*, agissant sur la transcription d'une centaine de gènes (Völker et al., 1999). Certains stresses peuvent induire une réponse équivalente de la part de la cellule : le facteur SigmaB est impliqué dans la réponse aux stresses thermique, osmotique, acide et rédox. La revue de Duguay & Silhavy (2004) décrit deux exemples d'inductions de réponses existantes chez *Escherichia coli* : les systèmes utilisant les facteurs SigmaE et Cpx comme médiateurs.

III.2.b) Les différents facteurs de stress rencontrés dans l'atmosphère

III.2.b.(i) L'aérosolisation

L'aérosolisation correspond au passage dans l'air depuis une surface solide ou liquide. Des études sur l'aérosolisation de bactéries ont montré qu'elle menait à une diminution de la cultivabilité. **Elle provoque des altérations du nombre de cultivables** d'un facteur 100 à 1000 chez *Cytophaga allerginae*, *Klebsiella planticola* et *Serratia marcescens* (Heidelberg et al., 1997). Walter et al. (1990) ont aérosolisé des cellules cultivées de *Pseudomonas syringae* et *Erwinia herbicola* dans une serre sous conditions contrôlées, avant de les collecter grâce à un impinger. Ils ont pu mettre en évidence l'influence des conditions d'humidité relative et de température lors de l'aérosolisation sur la cultivabilité. Celle-ci est de 35 à 65 fois supérieure à 12°C et 80% d'humidité par rapport à 27°C et 40% d'humidité. Zentner (1966) fait aussi la constatation que l'humidité lors de l'aérosolisation favorise la cultivabilité : 100% des cellules restent cultivables après aérosolisation en présence de 97% d'humidité, contre 2% à 40% d'humidité. Pour de faibles humidités, des composés comme le raffinose, qui ne pénètrent pas à l'intérieur de la cellule, la protègent de l'aérosolisation.

L'efficacité d'aérosolisation est dépendante de la souche considérée, et pourrait même dépendre de son état physiologique. *Micrococcus euryhalis* et *Serratia marinorubra* sont 10 à 100 fois mieux aérosolisés depuis un liquide qu'*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ou *Pseudomonas bathycetes*. De plus, comme on l'a vu précédemment (II.1.a) Burger & Bennett (1985) ont montré qu'une souche de *Serratia marcescens* pigmentée était mieux aérosolisée qu'une autre souche de la même espèce, non pigmentée. La proportion de lipides dans la membrane jouerait donc également un rôle important.

Certaines bactéries pourraient avoir évolué dans le sens de l'amélioration de l'efficacité d'aérosolisation et cela ne constituerait donc pas pour elles un véritable stress. Si tel était le cas, ces bactéries seraient préférentiellement retrouvées parmi les cellules encore actives dans les nuages. Le manque de données quant aux souches présentes dans les nuages ne permet pas encore de répondre.

III.2.b.(ii) Les oxydants

On trouve dans l'air et les gouttelettes de nuages de nombreux oxydants puissants (radicaux libres et ozone) pouvant oxyder le matériel biologique. La gestion des agents oxydants fait partie « du quotidien » des organismes aérobies. Pour cette raison, il s'agit ici moins d'un stress mais plutôt d'une **lutte permanente**. Le stress sera occasionné quand les outils de lutte à disposition à un moment donné ne seront plus suffisants, et que la cellule devra adapter sa physiologie sous la contrainte d'une augmentation de la concentration en agents oxydants.

Pour les micro-organismes aérobies, la présence d'oxygène est vitale en tant qu'accepteur terminal d'électrons de la chaîne respiratoire. La respiration et l'activité métabolique génèrent des composés oxydants toxiques comme les radicaux libres :

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$ (radical superoxyde)
$O_2^{\bullet -} + e^- \rightarrow H_2O_2$ (peroxyde d'hydrogène)
$H_2O_2 + e^- \rightarrow 2\ HO^{\bullet}$ (radical hydroxyle)

Pour rester viables en aérobiose, les cellules doivent donc avoir la capacité de lutter contre ces agents oxydants, d'autant plus si leur environnement est soumis à un ensoleillement important (la photochimie produit également de nombreux radicaux libres). Pour ce faire, les micro-organismes aérobies disposent d'enzymes, dont les principales sont les **superoxyde dismutases (SOD) ou superoxydases**, qui réduisent le radical $O_2^{\bullet -}$ en peroxyde d'hydrogène et dioxygène, **les catalases**, qui forment de l'eau et du dioxygène à partir du H_2O_2. La catalase KatB de *Pseudomonas aeruginosa* est jusqu'à 250 fois plus exprimée pendant un état de stress qu'en conditions habituelles (Ochsner et al., 2000). La protéine OxyR est essentielle dans la régulation de la synthèse de cette catalase. Le gène qui code pour cette enzyme (*oxyR*) se situe juste en amont de celui de la protéine RecG, une enzyme de réparation de l'ADN. Même s'il ne s'agit pas réellement d'un opéron, les synthèses d'OxyR, donc de KatB, et de RecG ont lieu successivement lors du stress oxydatif, pour à la fois détoxifier la cellule des agents oxydants et réparer l'ADN lésé par leurs attaques.

Un autre type de peroxydases, **les péroxyrédoxines**, participent à la détoxification de la cellule contre les peroxydes et hydroxypéroxydes. Elles ne possèdent pas de noyaux de type hème, et leur activité se fait par le biais des cystéines et éventuellement de flavoprotéines. Poole (2005) les décrit en détail.

On peut également noter qu'il existe des **protéines chaperonnes** qui se lient à la molécule d'ADN pour le protéger de l'oxydation, et des composés « pièges » à radicaux libres, comme le Beta-carotène (Gourmelon et al., 1994).

Comme témoins de la nécessité de la lutte contre les agents oxydants pour la survie de la cellule, on peut signaler que *P. aeruginosa* possède 3 catalases, codées par 3 gènes distincts (*katA*, *katB* et *katC*). Cela représente donc une part relativement importante du génome des bactéries aérobies, ce qui témoigne de l'importance de la lutte contre les oxydants.

III.2.b.(iii) Le rayonnement solaire

Le rayonnement solaire, et plus particulièrement les **rayons ultraviolets**, sont bien connus pour leur effet délétère sur le vivant. Leur courte longueur d'onde (10-380 nm) leur confère une énergie élevée. Ils traversent facilement les membranes cellulaires et atteignent et endommagent le matériel génétique, provoquant des mutations de l'ADN (dimère de deux cytosines consécutives, par exemple) qui peuvent s'avérer létales. Le pic d'absorption de l'ADN se situe aux alentours de $\lambda = 260$ nm. Cette longueur d'onde est donc très mutagène et dangereuse pour les bactéries. Le domaine visible de la lumière peut également être dommageable, dans une moindre mesure (Gourmelon et al., 1994). Les conséquences de l'exposition au rayonnement solaire sur une cellule dépend bien sûr du temps d'exposition et de la longueur d'onde, mais aussi de l'espèce et de l'état physiologique de la cellule considérée.

Tong & Lighthart (1997) (voir II.2.c) ont observé une **diminution de la cultivabilité** chez les bactéries après exposition au rayonnement solaire. La fraction de la communauté qui perd sa capacité à former des colonies est stressée par la lumière solaire, mais quant à savoir si la viabilité est réellement atteinte, cela reste encore à prouver.

La résistance au rayonnement solaire **dépend en grande partie de l'espèce bactérienne**. Aguogé et al. (2005) ont analysé la surface marine et sa relation à la lumière naturelle. Dans la microcouche de surface, la zone susceptible d'émettre des micro-organismes par « bubbling » (voir II.1.a) et soumise à de forts ensoleillements, il est rapporté 22 % de souches très

résistantes, 41 % de moyennement résistantes et seulement 16 % de sensibles. La sensibilité n'est pas répartie de façon homogène entre les groupes, et parmi les très résistantes, 43 % sont affiliées au groupe des Gamma-Proteobacteria (groupe des *Pseudomonas*), 14 % aux Alpha-Proteobacteria et seulement 8 % de Bacteroidetes. Chaque souche a une résistance face à la lumière qui lui est propre (figure 25).

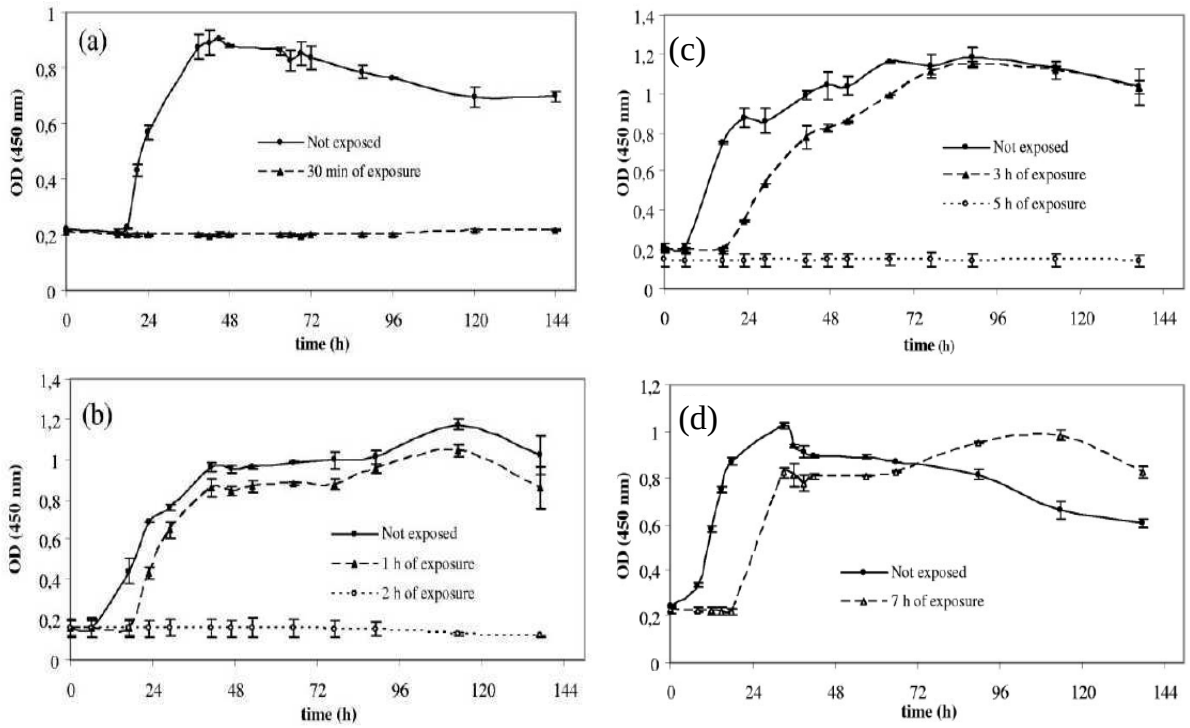


Figure 25 : Courbes de croissances représentatives (**a**) d'une souche très sensible, (**b**) assez sensible, (**c**) assez résistante et (**d**) très résistante à la lumière solaire. (Aguogé et al., 2005).

Une autre grande conclusion de cette étude (Aguogué et al.) est, à l'inverse de ce que l'on pourrait supposer, qu'il n'existe **pas de relation entre la présence de pigments bactériens** et la résistance à la lumière de la souche qui les produit. Cela entre pourtant en contradiction avec la capacité de certains pigments à piéger les radicaux libres produits par la lumière (Gourmelon et al., 1994).

Le stress dû au rayonnement solaire reçu au niveau du sol est loin d'être négligeable, et il l'est d'autant moins à haute altitude. L'énergie solaire reçue diminue avec l'épaisseur d'atmosphère traversée, surtout pour les courtes longueurs d'ondes (UVs) en grande partie absorbées par l'ozone et l'oxygène atmosphériques avant d'atteindre le sol. L'intensité du rayonnement ultraviolet reçu à 1000 mètres et 3000 mètres d'altitude est respectivement de 20 % et 50% supérieure à celle mesurée au niveau de la mer (Askew, 2002). On peut par conséquent considérer la lumière comme très dommageable pour les bactéries de la haute atmosphère et dans la partie supérieure du nuage. Dans la partie basse du nuage, les micro-organismes peuvent bénéficier de l'atténuation du rayonnement (ombre) provoquée par les gouttelettes et cristaux de glace de la partie supérieure.

III.2.b.(iv) L'humidité de l'air, la dessiccation et l'osmose

Résister au manque d'eau est une compétence clé pour la survie dans l'atmosphère. En effet, la survie (ou en tout cas la cultivabilité) observée de bactéries aérosolisées telles que *Serratia marcescens* est significativement supérieure pour les hautes valeurs d'humidité, comme on vient de le voir (II.2.b.*(i)*). De façon surprenante, la présence de monoxyde de

carbone CO semble protéger les cellules lors des faibles teneurs en humidité, sans que le phénomène ne soit expliqué (Lighthart, 1972). C'est peut-être ici simplement l'absence d'oxygène qui permet une meilleure résistance à la dessiccation, si l'on considère en parallèle les expériences de Zentner (1966) : une atmosphère de diazote avec 40% d'humidité relative permet la conservation de la cultivabilité pour 90% des cellules, contre 2% seulement dans l'air pour une même valeur d'humidité.

Généralement, après leur aérosolisation, les micro-organismes se retrouvent confrontés au problème du stress hydrique dans l'air. **La déshydratation et la dessiccation entraînent une mort cellulaire par modification des structures vitales** (dénaturations protéiques et changements de l'état physique des membranes), concentration des composés toxiques et rupture de la balance métabolique (Zentner, 1966).

Les pertes en eau peuvent être assimilées à un stress osmotique important et croissant au fur et à mesure du processus de déshydratation. Les cellules bactériennes se protègent en général en **accumulant d'abord le potassium K^+ intracellulaire**, puis des composés comme la **proline, la bétaïne ou le tréhalose** (Kempf & Bremer, 1998). Le tréhalose, disaccharide de glucose, est souvent impliqué dans la résistance contre le stress hydrique et la dessiccation, aussi bien chez les bactéries que chez les champignons, les invertébrés et les plantes (Garg et al., 2002). Une courte incubation des cellules en présence de tréhalose ou de sorbose avant leur lyophilisation améliore leur cultivabilité ultérieure, et peut-être leur viabilité (Zimmerman, 1962, Leslie et al., 1995) : l'utilisation de 100 mM de tréhalose permet de récupérer par culture jusqu'à 70% des cellules lyophilisées d'*Escherichia coli* et 57% de celles de *Bacillus thuringiensis*, contre respectivement 8% et 14% en son absence. D'autres substances sont également connues pour préserver les cellules de la **lyophilisation**, comme le lait écrémé, le saccharose, le glycérol ou encore le diméthylsulfoxyde. Comme le suggèrent Leslie et al. (1995), la dessiccation revient à retirer les liaisons hydrogènes qui existent entre l'eau et les phospholipides des membranes cellulaires. Ceux-ci se regroupent alors en paquets, sous une forme mixte gel/cristal. Lors de la réhydratation, certains de ces zones cristallisées ne reprennent pas leur structure normale, rendant impossibles les fonctions membranaires et conduisant donc à la mort de la cellule. Les disaccharides agissent en remplaçant progressivement l'eau dans les liaisons hydrogènes qu'elle formait avec la membrane, empêchant le changement de phase de celle-ci. De la même manière, ils empêchent la dénaturation des protéines.

En réponse à une variation de la pression osmotique, **le taux de caroténoïdes** intégrés dans la membrane peut aussi être ajusté par les cellules. Ce sont des pigments qui ont été isolés des souches extrémophiles chez les genres *Halobacterium*, *Haloferax*, *Micrococcus* et *Rubrobacter*.

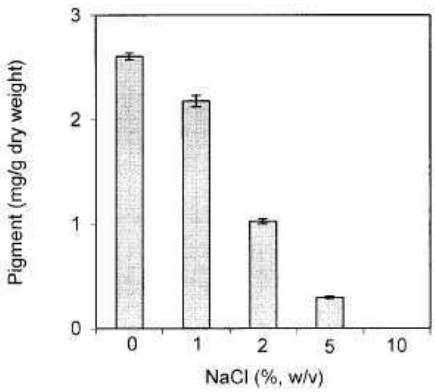


Figure 26 : Effet de la concentration en NaCl sur la production de caroténoïdes par la souche psychrotrophe *Arthrobacter agilis* MB813. (Fong et al., 2001).

Certaines souches psychrotrophes, comme *Arthrobacter agilis* peuvent synthétiser ces pigments de façon graduelle en réponse à une diminution de la pression osmotique (Fong et al., 2001) (figure 26). Il s'agit également d'une réponse au froid, comme nous le verrons plus loin. La revue de Potts (1994) constitue un excellent support bibliographique concernant la dessiccation des procaryotes et les réponses adoptées.

Les exopolysaccharides (EPS) que peuvent produire certaines bactéries leur procurent aussi une grande tolérance face à la baisse d'humidité en formant une sorte de gangue protectrice. Chez une cyanobactérie terrestre (*Nostoc commune*) produisant des EPS extracellulaires, l'activité photosynthétique n'est pas altérée même après plusieurs cycles de déshydratation-réhydratation (Tamaru et al., 2005). Chez le genre bactérien *Pseudomonas*, le groupement de gènes algU-mucA-mucB est responsable de la synthèse d'exopolysaccharides et d'alginates dans la gestion des stress osmotique et hydrique par la cellule (Schnider-Keel et al., 2001). Il s'agit d'une région très conservée chez les bactéries à Gram-négatif, ce qui suggère son importance capitale dans la survie face à des conditions défavorables. Le gène *mucA* code pour une protéine transmembranaire, *mucB* pour une protéine du périplasme, et *algU* pour le facteur sigma AlgU (appelé aussi AlgT, RpoE, anti-sigma factor MucA ou encore σ^{22}) (un facteur sigma est une molécule qui contrôle l'expression des gènes). En conditions normales, MucA et MucB interagissent et AlgU reste liée à MucA. En cas de stress hydrique, le complexe MucA-MucB se dissocie, et AlgU est alors relargué dans le cytoplasme et active la synthèse des EPS et d'alginates. L'ensemble de ces trois protéines joue donc un rôle de senseur et de régulateur dans la gestion du stress. Une étude récente a également montré que d'autres gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique pouvaient avoir été transmis horizontalement aux bactéries depuis les plantes, ce qui est un fait très rare (Ciccarelli & Bork, 2005). Cela atteste une nouvelle fois de la nécessité pour les bactéries de disposer dans leur génome de protections contre la déshydratation et la dessiccation.

Contre la dessiccation, **le fait que les cellules soient isolées est très défavorable**. Monier & Lindow (2003) ont montré que seules, ou presque, les cellules capables de former rapidement un agrégat survivent à la dessiccation à la surface de la végétation. En effet, alors que les cellules solitaires représentent 96 % du nombre total de cellules viables pulvérisées sur une feuille lors de l'expérience, elles ne sont plus que 35 % après un cycle d'exposition à une faible humidité relative, et moins de 7 % après 5 jours de temps passé sur la feuille et 3 périodes de dessiccation. En conditions humides permanentes, l'isolement n'est pas un désavantage (figure 27).

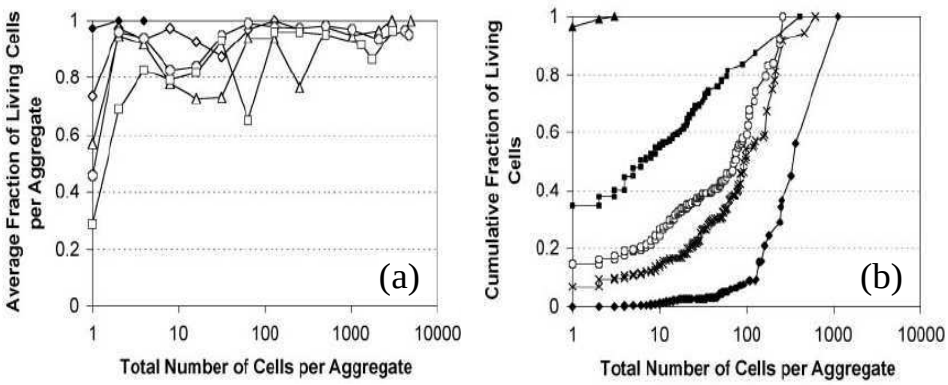


Figure 27 : Evolution de la fraction de cellules viables par agrégat cellulaire après pulvérisation d'une suspension de cellules sur une feuille. **(a)** En condition humides (temps 0 j (◆), 3 j (◇), 4 j (△), 5 j (○) et 7 j (□)) ; **(b)** après des cycles de dessiccation de 8 heures avant les prélèvements au temps 3, 4 et 5 jours (temps 0 j (▲), 3 j (■), 4 j (○), 5 j (×) et 7 j (◆)). (Monier & Lindow, 2003).

Les cellules regroupées se protègent donc mutuellement de la dessiccation et y résistent mieux. On a vu dans le chapitre précédent que la plupart des bactéries viables présentes dans l'air formaient des agrégats de cellules. Il pourrait s'agir de la conséquence de l'avantage que leur confère le regroupement dans la survie face à la dessiccation. Les cellules viables incorporées au nuage sont donc sans doute présentes dans la masse d'air sous forme d'amas de cellules, jusqu'à la condensation de l'eau en gouttelettes.

Plus importantes encore que le taux d'humidité lui-même, ce sont surtout **ses variations brutales (hausse ou baisse) qui sont létales pour les bactéries** (Hatch & Dimmick, 1966). Dans le sol, les micro-organismes sont soumis de façon relativement fréquente à des périodes de sécheresse, suivies d'un épisode pluvieux. Les cellules doivent faire face à la baisse brutale de concentration en solutés (pression osmotique). De plus, l'eau a tendance à envahir rapidement la cellule, adaptée aux conditions de sécheresse. L'osmolarité doit donc être réduite pour prévenir la rupture de la membrane sous l'effet de la tension engendrée par l'entrée d'eau (Morbach & Krämer, 2002). Ces processus de déshydratation-réhydratation dans le sol sont à l'origine d'une baisse d'activité métabolique des cellules dans les premières heures suivant la réhydratation (Pesaro et al., 2004). Le type de stimuli perçus par la cellule n'est pas connu, mais plusieurs hypothèses sont formulées : pression osmotique, dommages de la bicouche lipidique, concentrations en certains ions, force ionique, gradients osmotiques (Morbach & Krämer, 2002). La mortalité sous l'effet à la dessiccation peut encore être accentuée par des températures élevées (45°C par rapport à 25°C), comme l'ont montré Breeuwer et al. (2003), même si, précisément au moment de la réhydratation, une température supérieure à la température ambiante est plus favorable car elle facilite la fluidification de la membrane (Leslie et al., 1995).

Les gouttelettes de nuages protègent les micro-organismes de la dessiccation. Etant moins exposée au stress hydrique, une cellule rapidement intégrée dans les nuages, pourrait parcourir de plus grandes distances qu'en air sec tout en restant viable. Dans ce cas, les nuages constitueraient une voie de dissémination microbienne importante. Cependant, il faut aussi rappeler que dans un nuage, les gouttelettes s'évaporent et se condensent constamment et de façon très rapide. Une cellule présente dans une gouttelette est ainsi certainement soumise à de nombreux chocs hypo- et hyper osmotiques pouvant altérer sa viabilité. Il est donc difficile de pronostiquer quant à l'efficacité de transit que peuvent représenter les nuages par rapport à l'air sec. Mais même dans le nuage, les agrégats bactériens pourraient largement contribuer à la survie de cellules les plus internes des agrégats, en formant une zone tampon autour d'elles. Dans nos échantillons, de tels amas cellulaires n'ont cependant pas été mis en évidence lors des observations microscopiques.

III.2.b.(v) Le stress nutritionnel

Le manque de nutriments est un facteur de stress supplémentaire auquel les micro-organismes peuvent être confrontés à l'intérieur des gouttelettes de nuage. Deux stratégies peuvent être adoptées, en fonction des capacités de survie de la cellule : le **développement en présence de faibles concentrations en nutriments**, et la **réduction temporaire du métabolisme** (VBNC), ou même son arrêt (sporulation). Dans les deux cas, la cellule doit être capable d'économiser le substrat qui devient limitant pour son développement. La réduction du métabolisme peut se traduire par une perte de la cultivabilité. Voir le paragraphe III.1.a pour plus de détails.

Des enzymes à haute affinité (**high-binding proteins**) sont présentes chez des organismes se développant en milieu oligotrophe (Roszak & Colwell, 1987). Elles sont capables de capter le substrat présent en faible quantité, et leur existence doit être signalée car elles pourraient intervenir pour la survie dans le nuage.

III.2.b.(vi) L'acidité du milieu

La résistance aux pH acides est une nécessité pour qu'une bactérie puisse survivre dans l'eau des nuages. En effet, la dissolution du CO_2 dans l'eau pure sous l'effet de sa pression partielle dans l'air conduit à un pH de 5,6, généralement encore abaissé par les composés chimiques dissous dans la gouttelette (sulfates, acides organiques...).

Les cellules peuvent **s'adapter de façon progressive** à un milieu acide (Koutsoumanis & Sofos, 2004), et cela induit également une augmentation de la tolérance à la chaleur et la concentration en sels chez *Salmonella thyphimirium* (Leyer & Johnson, 1993). L'effet du pH est souvent relié à d'autres paramètres, comme l'oxygénation, et les réponses aux stresses oxydatif et acide se recoupent donc généralement (Stancik et al., 2002). Lors de variations brutales, l'habituation n'est pas possible et on assiste alors à un choc acide. La cellule doit alors lutter contre le gradient important de protons généré entre le cytoplasme et le milieu extérieur.

Plusieurs réponses bactériennes peuvent être apportées lors de l'exposition à un pH acide : la protection des protéines cellulaires, l'expulsion et l'augmentation de la consommation de protons et la modification de la composition de la membrane cytoplasmique.

Les protéines de protection, les chaperonnes HdeA et HdeB, forment un hétérodimère à pH neutre, qui se dissocie à pH acide. Chacune d'entre elle pourra alors se fixer avec les protéines de la cellule pour prévenir les attaques acides (Booth et al., 2002).

L'alcalinisation du cytoplasme s'effectue par plusieurs moyens simultanés. D'abord par **expulsion des protons** H^+, grâce à l'augmentation de l'activité et à la surexpression des ATPases membranaires, pompes excrétrices de protons (Fozo & Quivey, 2004 ; Matsumoto et al., 2004). Un autre moyen pour les bactéries consiste à **consommer les acides présents** dans la cellule. Le choc acide conduit à l'augmentation de l'expression des enzymes du métabolisme des acides aminés, particulièrement des décarboxylases (Booth et al., 2002 ; Stancik et al., 2002). Elles expulsent les fonctions acides carboxyliques des acides aminés sous la forme de CO_2, conduisant à une alcalinisation. A cela peut s'ajouter une alcalinisation de l'extérieur de la cellule, notamment par consommation de protons extracytoplasmiques. La cellule modifie donc son pH interne, mais aussi celui de son environnement direct, réduisant ainsi le gradient de protons. Le métabolisme des acides organiques, formiate et acétate, est aussi accru à pH acide, le but étant également ici de consommer les fonctions acides pour détoxifier la cellule (Stancik et al., 2002).

La membrane lipidique de la cellule constitue une véritable barrière à protons. Comme pour l'adaptation aux conditions froides, **la composition de la membrane** est modifiée en réponse à une augmentation de l'acidité : la proportion d'acides gras insaturés à longue chaîne est augmentée, ce qui accroît la tolérance aux bas pH (Booth et al., 2002). Cette acclimatation ne requiert pas de néo-synthèse de protéine, et peut être réalisée en à peine 20 minutes chez *Streptococcus mutans*, soit un temps inférieur à celui de la génération (Fozo & Quivey, 2004).

III.2.b.(vii) Le froid

Les basses températures sont enfin un facteur de stress auquel sont soumis les micro-organismes de la haute atmosphère et des nuages. Il s'agit certainement, avec la dessiccation rencontrée avant l'intégration dans le nuage, du paramètre le plus limitant à l'activité dans le nuage. Les cellules peuvent être rapidement portées à des altitudes où la température avoisine les 0°C et moins. Le stress dû au froid, appelé « **cold-shock** », est provoqué par une diminution brusque de température. Cela conduit à un « engourdissement » de la cellule : baisse des activités enzymatiques et ribosomales, diminution de l'affinité des systèmes de transports et rigidification des membranes lipidiques (Graumann & Marahiel, 1996).

En général, pour une bactérie, un passage brutal de 37°C à 10°C provoque l'arrêt total de la croissance et de la synthèse de protéines. Après le choc, la synthèse de protéines redémarre, mais il s'agit de molécules différentes de celles produites avant le cold-shock, qui sont induites par le stress thermique. Les ribosomes pourraient représenter les senseurs bactériens de la température (Graumann & Marahiel, 1996). Deux classes de protéines, produites par les espèces bactériennes *Escherichia coli* et *Pseudomonas fragi* en réponse au froid, ont été décrites : les CAPs (**Cold-Acclimatation-Proteins**) et les CSP ou CIP (**Cold-Shock** ou Cold-Induced-Proteins). Elles sont respectivement associées à une diminution lente et à une diminution brutale de la température. Les CSP, celles qui nous intéressent ici, sont de petites protéines (~7 kDa) qui ont pour action d'améliorer la transcription en stabilisant le complexe ARN polymérase-ADN. Elles jouent également un rôle sur la traduction, mais leur mode d'action reste inconnu. Leur durée de vie très courte à température moyenne permet leur régulation et leur activité stoppe quand les conditions de température redeviennent « normales ». Ce sont des molécules très répandues dans le monde du vivant : on les trouve chez les bactéries psychrophiles, mésophiles et thermophiles, les levures, les champignons, les plantes et les animaux. Leur importance pour la survie est donc évidente.

D'un autre côté, **la composition de la membrane** est modifiée pour accroître sa viscosité à basse température. Plusieurs moyens peuvent être mis en jeu : augmentation de la proportion de lipopolysaccharides (LPS), réduction de longueur de chaînes des acides gras, augmentation du branchement entre ces chaînes et de leur insaturation (Laybourn-Parry, 2002 ; Seshu-Kumar et al., 2002). L'intégration de pigments caroténoïdes et de leurs dérivés glycosylés (bactériorubine, par exemple) dans la membrane la stabilise également face aux basses températures (Fong et al., 2001) (figure 28).

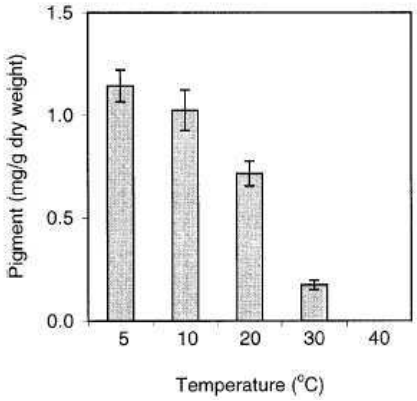


Figure 28 : Effet de la température de culture sur la production de caroténoïdes par la souche psychrotrophe *Arthrobacter agilis* MB813. (Fong et al., 2001).

Il s'agit du même type de pigments que ceux synthétisés en réponse au stress osmotique, que Fong et collaborateurs (2001) ont listés. La structure et les moyens de détection par HPLC sont également donnés.

Des **protéines « anti-gel »** existent aussi et peuvent être synthétisées pour éviter la formation de cristaux de glace dans la cellule. Elles forment des liaisons hydrogène avec les cristaux de glace pour empêcher leur développement (Ewart et al., 1999). Elles sont spécifiques du type de cristal rencontré, et elles sont présentes chez les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux. Ce sont des molécules mal connues, mais une protéine antigel isolée de *Pseudomonas putida* montre une structure étrangement similaire aux protéines glaçogènes InaZ dont il était question plus haut.

III.3. Activité en milieu froid et métabolisme microbien

Le froid est un critère relatif, mais on considère généralement qu'une température de moins de 5°C est froide. Cela concerne donc la majeure partie de l'environnement terrestre : 90% du volume des océans, et 14 % des surfaces émergées (pôles, montagnes) ainsi que la haute atmosphère. La température est certainement le paramètre abiotique le plus limitant pour l'activité microbienne dans les nuages, mais des organismes tolèrent le froid, ou même le requièrent, pour pouvoir se développer.

III.3.a) Les bactéries psychrophiles

Il existe différents groupes de micro-organismes définis suivant la gamme de températures à laquelle ils se développent. On trouve, par ordre croissant de température optimale de croissance : les psychrophiles, les mésophiles, les thermophiles et les hyperthermophiles. La découverte des psychrophiles a été faite à partir d'échantillons de poissons polaires à la fin du XIXème siècle. Le terme « psychrophile » est apparu en 1902, et définissait les organismes capables de se développer à basse température. Morita (1975), devant les utilisations abusives du terme, précise la définition :

Les vrais psychrophiles ont une température de croissance optimale inférieure à 15°C, et une température minimale qui peut être inférieure à 0°C. Mais ils ne peuvent pas se développer au-dessus 20°C ;

Les organismes psychrotrophes (ou psychro-tolérants) sont capables de se développer à basse température, mais leur température optimale de croissance est supérieure à 20°C. Ce sont en réalité des mésophiles qui supportent les basses températures (figure 29).

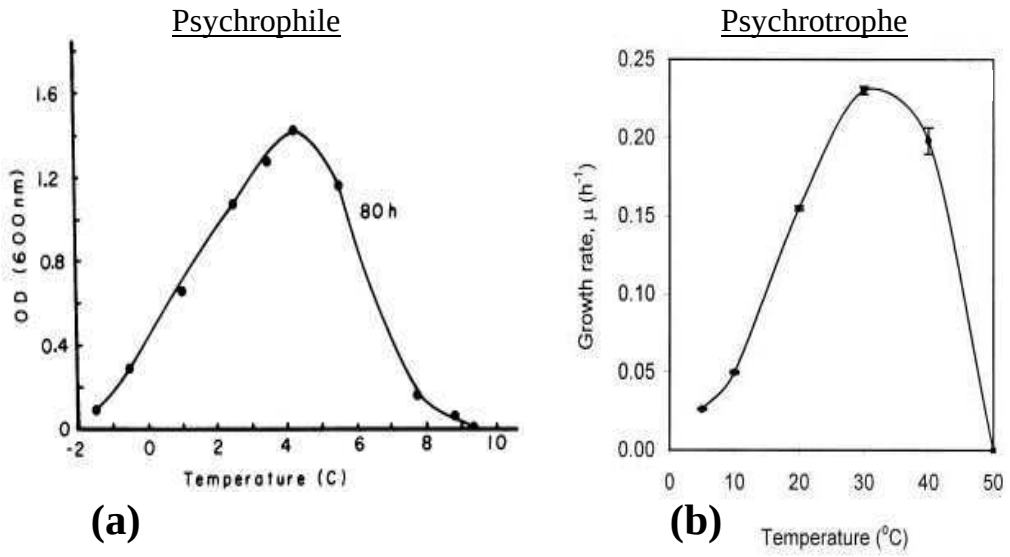


Figure 29 : (**a**) Densités optiques mesurées après 80 h de culture à différentes températures d'une souche psychrophile de *Vibrio* sp. (Morita, 1975) ; (**b**) évolution de la vitesse de croissance avec la température chez le psychrotrophe *Arthrobacter agilis* MB813 (Fong et al., 2001).

Logiquement, plus la température s'éloigne de la température optimale de croissance, plus l'énergie requise pour maintenir une certaine activité augmente. En général, la synthèse de macromolécules (protéines et acides nucléiques) est bloquée à 1-2°C au dessus ou au dessous des températures extrêmes de croissance, mais ce n'est pas une cause de mortalité.

Les psychrophiles ne sont pas rares dans l'environnement. Ils sont cultivés la plupart du temps par enrichissement des échantillons avec de faibles concentrations en nutriments. De plus, pour leur isolement, du matériel de mise en culture préalablement réfrigéré doit être

utilisé pour éviter tout choc thermique qui pourrait être létal. De nombreuses études rapportent l'isolement de psychrophiles et plus encore de psychrotrophes depuis les glaciers, sédiments, zones polaires et océans. Cela concerne au moins certaines Archaes et les genres bactériens *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cytophaga*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Spirillum* et *Vibrio* (Morita, 1975 ; Carpenter et al., 2000 ; Christner, 2001 ; Junge et al., 2004 ; Groudieva et al., 2004…).

Ainsi, dans les lacs antarctiques, par exemple, les micro-organismes sont actifs toute l'année, même à des températures négatives dans les lacs salés, et le facteur limitant le développement devient la disponibilité de la matière organique (Laybourn-Parry, 2002). De même, la surface de la neige en haute altitude permet une multiplication bactérienne rapide quand une pellicule d'eau liquide est présente (Segawa et al., 2005).

Plusieurs études de l'activité des micro-organismes psychrophiles à basse température ont été menées, par mesure soit de la respiration, soit de l'incorporation de composés précurseurs radioactifs de la synthèse d'acides nucléiques et de protéines (^{3}H leucine, ^{3}H thymidine, ^{14}C leucine…). Elles tendent toutes clairement à prouver qu'une activité bactérienne existe dans la neige et la glace polaire, à des températures largement négatives (jusqu'à -20°C) (Carpenter et al., 2000 ; Sattler et al., 2001 ; Christner, 2001 ; Junge et al., 2004). L'association avec des particules semble également favoriser cette activité, et cela ouvre de nombreuses perspectives quant à l'implication des micro-organismes dans la chimie des nuages.

III.3.b) Enzymes et basses températures

La psychrophilie et la psychro-tolérance imposent à la cellule de disposer d'enzymes actives à basse température. Groudieva et al. (2004) ont pu mettre en évidence l'utilisation de protéines (lait écrémé, caséine), de lipides (huile d'olive) et de polysaccharides (amidon, pectine) à 4°C par des souches isolées de glace de mer Arctique. Cela concernait majoritairement des souches psychrotrophes, et dans une moindre mesure, des psychrophiles. Ils ont extrait de ces souches une α-amylase et une β-galactosidase actives à -5°C, et produites quand la culture est réalisée entre 4 et 10°C, mais pas entre 20 et 30°C. Il semble donc s'agir d'enzymes spécialisées dans le métabolisme à basse température. La figure 30 (Hoyoux et al., 2004) donne un exemple de l'activité d'une enzyme mésophile (que les auteurs qualifient de psychrophile) en fonction de la température en comparaison avec celle de son homologue thermophile (qualifiée de mésophile).

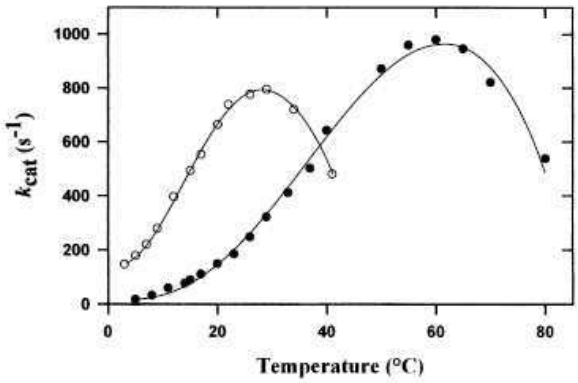


Figure 30 : Effet de la température sur l'activité catalytique d'une α-amylase psychrophile (*Pseudoalteromonas haloplanktis* (○) et mésophile *Bacillus amyloliquefaciens* (●). (Hoyoux et al., 2004).

De manière générale (Hoyoux et al., 2004), les enzymes adaptées au froid présentent, bien sûr, une haute activité à basse température, mais ont aussi pour les mêmes raisons une **faible stabilité thermique**. En effet, pour pouvoir permettre l'activité à basse température, la

structure des enzymes doit être modifiée. Ainsi, la principale modification est effectuée sur la structure de l'enzyme, qui est déstabilisée. Par rapport à son homologue mésophile, une enzyme psychrophile présente un **site actif de flexibilité et de taille accrues**. A basse température, cela facilite l'accès du substrat au site actif de l'enzyme et la libération des produits. Le reste de la structure de la protéine n'est généralement pas modifié. Pour cela, les interactions ioniques existant dans la protéine sont réduites, en nombre et en intensité : augmentation du nombre de résidus glycines et de l'exposition de résidus apolaires (hydrophobes), et réduction du nombre de résidus prolines et arginines, qui forment des liaisons hydrogène.

Cette diminution des liaisons non-covalentes altère également la tolérance de ces enzymes à la température. La malate déshydrogénase de *Vibrio marinus* MP-1, par exemple, est stable seulement entre 0 et 20°C et sa glucose-6-phosphatase est, elle, dénaturée dès 26°C (Morita, 1975). A la différence des psychrotrophes, qui possèdent un large éventail d'enzymes, ou des enzymes à large gamme d'activité, les organismes psychrophiles ne disposent pas d'enzymes moins thermolabiles, et des températures trop élevées ne leur autorisent donc aucune activité.

III.3.c) La multiplication cellulaire dans les nuages

Les nombreux facteurs de stress rencontrés par les micro-organismes avant l'intégration dans le nuage et une fois à l'intérieur des gouttelettes semblent donc s'opposer à la vie dans les nuages. De plus, le milieu offert ne semble *à priori* pas adapté à accueillir des cellules vivantes et Rüden et al ont suggéré, en 1978, que le milieu atmosphérique ne permettait pas le développement des micro-organismes. Pourtant, des expériences de laboratoires ont permis de montrer dès 1979 (Dimmick et al.) que si les bactéries présentes dans des gouttelettes en suspension dans l'air y trouvaient des nutriments, elles pouvaient s'y multiplier. Des conditions optimales étaient fournies aux cellules aérosolisées dans cette étude : température optimale de croissance et milieu de culture utilisé pour la formation des gouttelettes. En milieu naturel, Fuzzi et al. (1997) ont observé que les concentrations en micro-organismes en suspension sont plus élevées par conditions de brouillard, amenant à l'hypothèse de leur multiplication dans le milieu aqueux offert par les gouttelettes. Plus récemment (Sattler et al., 2001), il a été prouvé que l'eau de nuage pouvait représenter un milieu dans lequel les bactéries sont actives, même à basse température. Dans cette dernière étude, des échantillons d'eau de nuage ont été collectés à plus de 3000 m d'altitude, en Autriche, puis directement incubés après supplémentation en ^{3}H thymidine et ^{14}C leucine, sans addition d'aucun autre composé. Après 20 heures d'incubation à 0°C, les composés marqués ont été retrouvées dans les cellules. L'intégration de carbone organique (production primaire) par les bactéries à l'intérieur des nuages a été estimée à 1 à 10 Tg C an^{-1}. Cela reste relativement peu par rapport à la production dans les océans, de l'ordre de 45-50 Pg C an^{-1}, mais les auteurs mettent déjà en avant l'influence que les micro-organismes pourraient avoir sur la chimie des nuages.

III.4. Eléments de métabolisme microbien

III.4.a) Métabolisme central

Le métabolisme représente un enchevêtrement complexe de réactions biochimiques catalysées par les enzymes. Les organismes hétérotrophes aérobies prélèvent l'ensemble de leurs nutriments depuis leur environnement solide ou liquide, et utilisent l'oxygène de l'air comme accepteur final des électrons issus de la respiration. Des composés intermédiaires du métabolisme ont été retrouvés dans les nuages, et sont donc potentiellement utilisés comme substrats par les cellules. Certaines voies métaboliques occupent une place centrale dans la production d'énergie, comme par exemple **la glycolyse, le cycle de Krebs** (appelé aussi cycle du citrate ou cycle des acides tricarboxyliques TCA), **du glyoxylate et du pyruvate**. Ils sont donnés ici à titre de démonstration de la complexité et de la multiplicité des voies métaboliques existantes, et pour faciliter leur consultation, nécessaire lors de la lecture de cette thèse. Les composés intermédiaires du métabolisme microbien qui ont été été détectés dans l'eau des nuages sont **entourés en rouge** sur chacune des figures.

Les voies métaboliques qui pourraient être impliquées sont présentées par les figures 31 à 34. Elles sont issues de la banque de données métaboliques KEGG, libre d'accès (KEGG PATHWAY database http://www.genome.jp/kegg/pathway.html). Cette banque répertorie la plupart des voies métaboliques connues chez l'ensemble des organismes, et les enzymes associées. Il est possible de faire des recherches par organisme, par composé impliqué, par enzyme….

Dans les figures, les numéros encadrés correspondent aux références des enzymes, et la recherche peut s'effectuer à partir de ces références dans la banque. Pour chaque enzyme, de nombreuses informations sont disponibles, dont la ou les publications de référence.

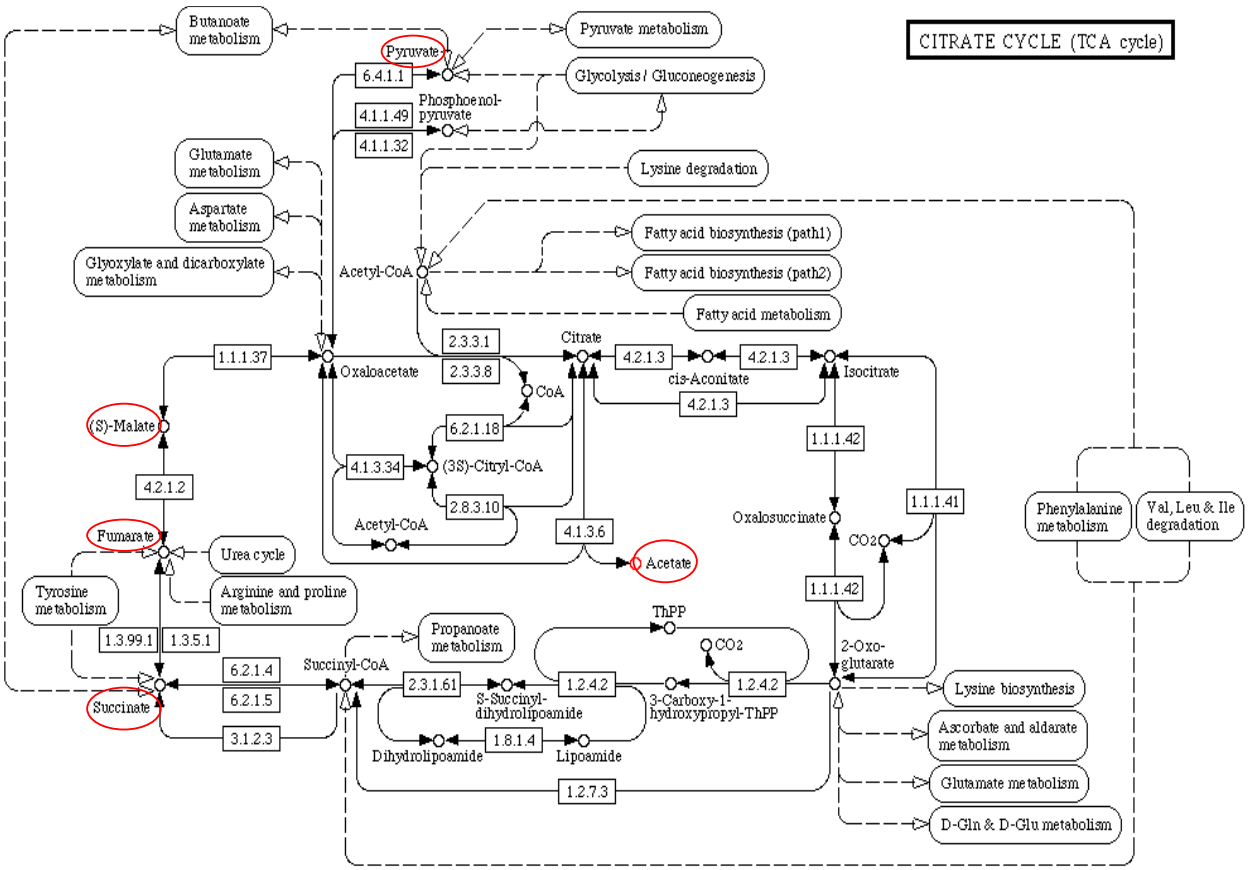


Figure 31 : Le cycle de Krebs. Les composés retrouvés dans les nuages sont entourés en rouge.

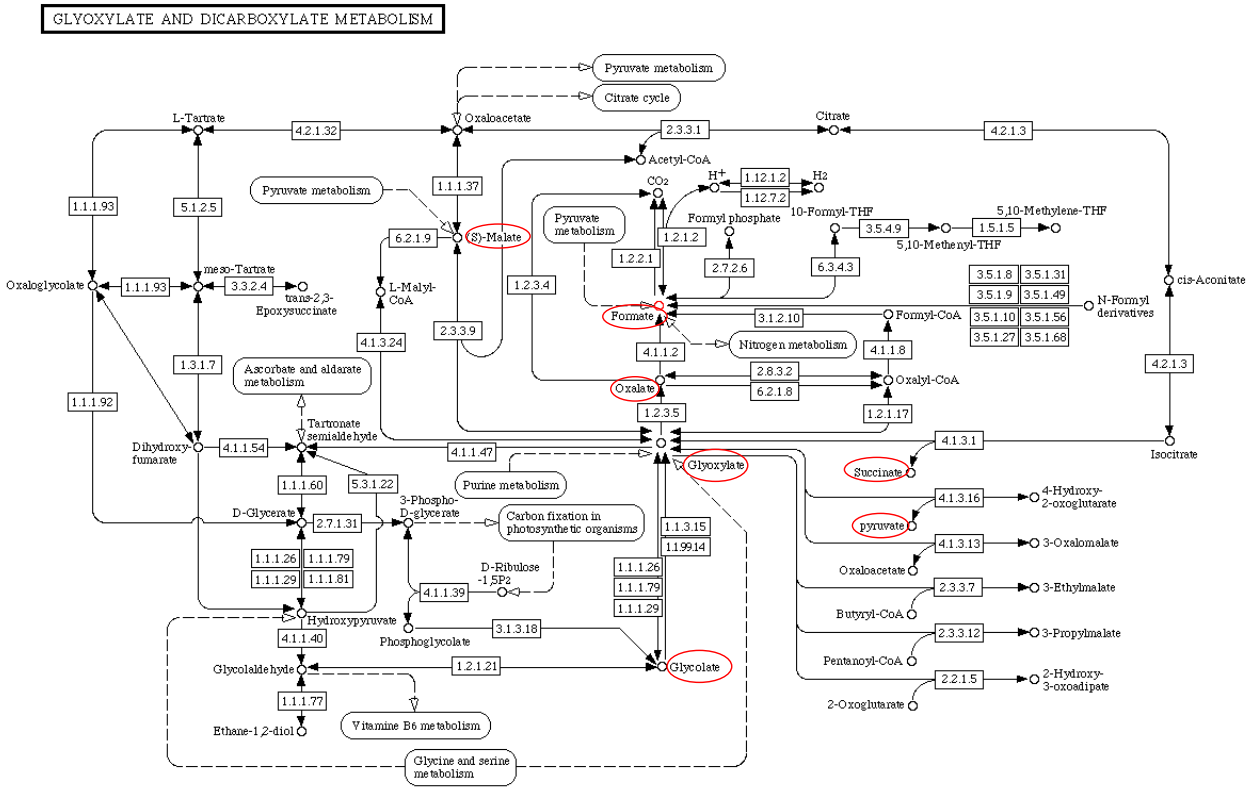


Figure 32 : Métabolisme du glyoxylate et des acides dicarboxyliques. Les composés retrouvés dans les nuages sont entourés en rouge.

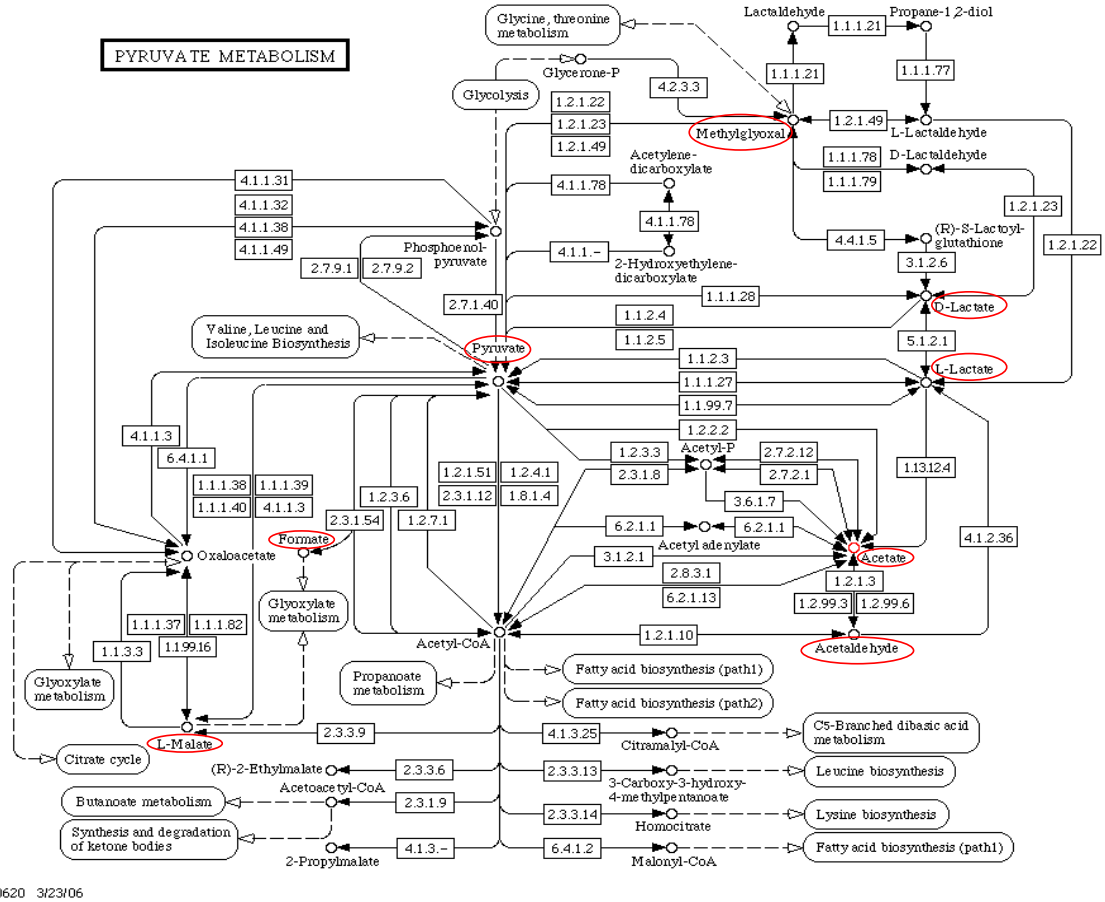


Figure 33 : Métabolisme du pyruvate. Les composés retrouvés dans les nuages sont entourés en rouge.

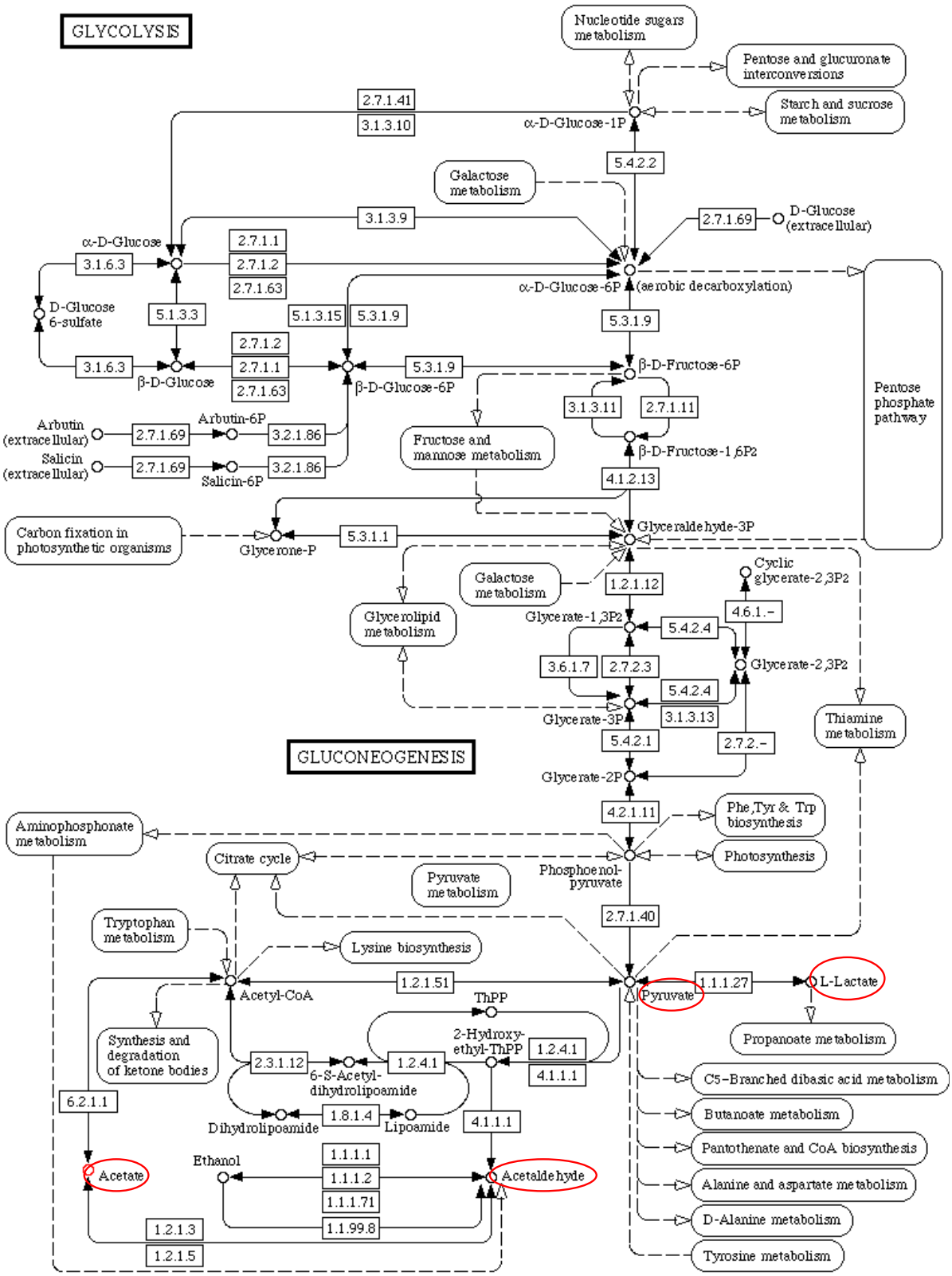


Figure 34 : La glycolyse et la néo-glucogénèse. Les composés retrouvés dans les nuages sont entourés en rouge.

Chaque souche bactérienne dispose d'un pool d'enzymes qui lui est propre. Même si des généralités existent (les réactions principales sont généralement conservées) les enzymes impliquées peuvent varier et les voies annexes ou certaines réactions être inexistantes. Des investigations sont généralement nécessaires pour déterminer les voies métaboliques dont

dispose une souche ou une espèce bactérienne. A titre d'exemple, on citera l'étude de Gerstmeir et al. (2003), spécifiquement dédiée au métabolisme de l'acétate et à sa régulation chez une espèce bactérienne (*Corynebacterium glutamicum*).

III.4.b) Métabolisme des composés en C_1

III.4.b.(i) Généralités

Les **méthylotrophes** sont des micro-organismes dont le métabolisme est basé sur l'assimilation des composés en C_1. Ils ont pour la plupart un mode de vie aérobie strict, compatible avec les gouttelettes de nuage. Ces sont des micro-organismes très répandus dans l'environnement (milieux aquatiques et terrestres) et ils sont d'une grande importance écologique dans les zones humides, les rizières, les toundras et les milieux marins. On trouve des méthylotrophes parmi les Alpha-, les Beta- et les Gamma-Proteobacteria et chez les bactéries à Gram positif. De plus, de nombreux micro-organismes sont des méthylotrophes facultatifs, et peuvent donc fonctionner sur la base des mêmes substrats que les méthylotrophes obligatoires si les conditions le nécessitent et le permettent.

Dans un but de production d'énergie, si des composés en C_1 plus réduits que le formaldéhyde sont captés (méthane, méthanol, amines méthylées,…), ils sont généralement oxydés en formaldéhyde, puis en formiate et enfin CO_2. Le formaldéhyde peut aussi rejoindre le métabolisme central de la cellule et participer à la synthèse de constituants cellulaires. Chacun des composés en C_1 dont il est question est évidemment susceptible d'être prélevé dans le milieu s'il est présent. Une représentation schématique générale du métabolisme en C_1 est présentée en figure 35. **Le formaldéhyde tient une place centrale dans ce type de métabolisme.**

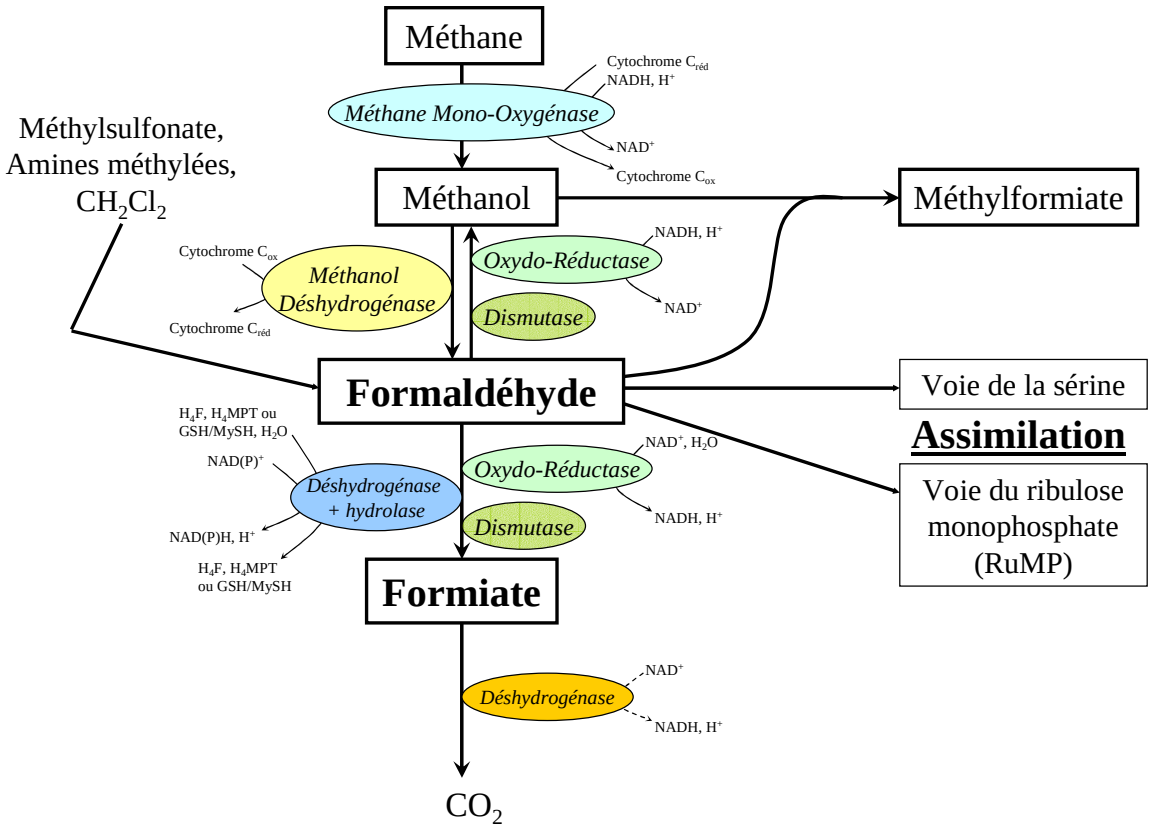


Figure 35 : Métabolisme bactérien des composés en C_1 et enzymes impliquées connues.

Chaque étape de ce métabolisme est détaillée dans la suite de ce chapitre. Les différentes enzymes, coenzymes et leurs modes d'action sont décrits, car le métabolisme en C_1 pourrait être fortement impliqué dans la problématique qui nous occupe.

III.4.b.(ii) Oxydation du méthane et du méthanol

Les **méthanotrophes** sont des méthylotrophes capables d'utiliser le méthane CH_4 comme seule source de carbone. Comme les organismes réducteurs de l'azote inorganique et les cyanobactéries, les méthanotrophes peuvent former des membranes intracytoplasmiques formés de lipides inhabituels pour des organismes bactériens. Suivant leur physiologie, l'arrangement de ces membranes et la voie d'assimilation du carbone utilisée, deux catégories de méthanotrophes ont été créées. Les méthanotrophes de type I (*Methylomonas*, *Methylococcus*, *Methylobacter*) incorporent le formaldéhyde par la voie du ribulose monophosphate (RuMP), ceux du type II (*Methylosinus*, *Methylocystis*) par la voie de la sérine. La figure 36 détaille l'oxydation du méthane en méthanol CH_3OH, qui est ensuite lui-même oxydé en formaldéhyde et rejoint le métabolisme général des C_1, décrit plus loin.

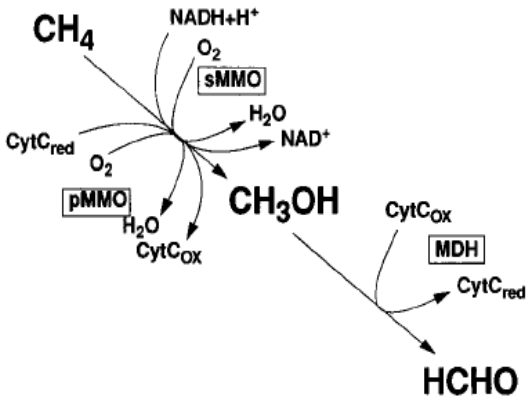


Figure 36 : Voie d'oxydation du méthane en méthanol, puis en formaldéhyde. **sMMO** : méthane mono-oxygénase soluble ; **pMMO** : méthane mono-oxygénase particulaire ; **MDH** méthanol déhydrogénase. (D'après Hanson & Hanson, 1996).

L'oxydation du méthane en méthanol se fait par la méthane **mono-oxygénase (MMO)** et nécessite la présence d'oxygène, même si l'enzyme y est très sensible. Deux formes de cette enzyme existent, une forme soluble, la sMMO, et une forme liée aux membranes intracytoplasmiques, la pMMO (pour « particulate » MMO). Seule la première est dépendante de la présence de NAD (Hanson & Hanson, 1996).

La **méthanol déhydrogénase (MDH)** intervient ensuite pour **oxyder le méthanol en formaldéhyde**. Un cytochrome c est requis comme accepteur d'électrons.

Seuls les méthanotrophes acceptent le méthane comme source de carbone. Des méthanotrophes psychrotolérants actifs dans des zones froides comme la toundra ont été décrits (Whalen & Reeburgh, 1990 ; Dunfield et al., 1993). Leur température optimale se situe aux alentours de 25°C : entre 0 et 5°C, la vitesse d'oxydation de leur MMO vaut de 10 à 38 % celle observée à 25°C (Omel'chenko et al, 1993). Dans le sol, il a été montré que la vitesse d'oxydation du méthane par les méthanotrophes est constante entre les pH 3,5 et 8. Ces propriétés rendent le métabolisme méthanotrophe possible dans les gouttelettes de nuages. La revue de Hanson & Hanson (1996), en plus de relater le métabolisme des méthanotrophes, s'attache également à décrire leur écologie et leur distribution dans les milieux naturels.

III.4.b.(iii) Le formaldéhyde

Le formaldéhyde HCHO est un composé très volatil, dont les sources majeures dans l'air sont l'industrie chimique et la chimie atmosphérique des hydrocarbures. Il est d'une grande importance en chimie atmosphérique, où il est impliqué dans de nombreuses réactions d'oxydoréduction. Le manque de spécificité des liaisons qu'il forme est à l'origine de sa toxicité élevée : il se lie avec de nombreuses molécules, et provoque notamment des lésions de l'ADN, des mutations, et est considéré comme carcinogène. Il représente pourtant un maillon central du métabolisme chez les méthylotrophes, résultant de l'oxydation du méthanol et des autres composés en C_1 que les méthylotrophes acceptent (voir la figure 35). La biodégradation du formaldéhyde présent dans des effluents industriels à des concentrations très élevées (de l'ordre de 0,05 M) a récemment été rapportée (Eiroa et al., 2006). La vitesse de dégradation du formaldéhyde apparaît comme indépendante de sa concentration et de la biomasse bactérienne mise en jeu, mais la présence de cellules viables intactes est nécessaire (Hidalgo et al., 2002).

Quatre devenirs biochimiques sont possibles pour le formaldéhyde : l'assimilation, la dismutation, la réaction avec le méthanol et l'oxydation. Notons que les 3 dernières réactions, catalysées ici de façon enzymatique, sont les mêmes que celles induites par la photochimie.

- Assimilation :

Le formaldéhyde peut être assimilé par la cellule et participer à la formation des structures cellulaires. Les **voies cycliques du ribulose monophosphate (RuMP) et de la sérine** peuvent être empruntées, suivant les souches (figure 37 ci-dessous). De manière générale, la voie du RuMP est plus efficace et plus courante que celle de la sérine. Cette dernière est rencontrée chez les méthanotrophes de type II, et chez les méthanotrophes facultatifs lorsqu'ils se développent en présence de méthanol (Higgins et al., 1981).

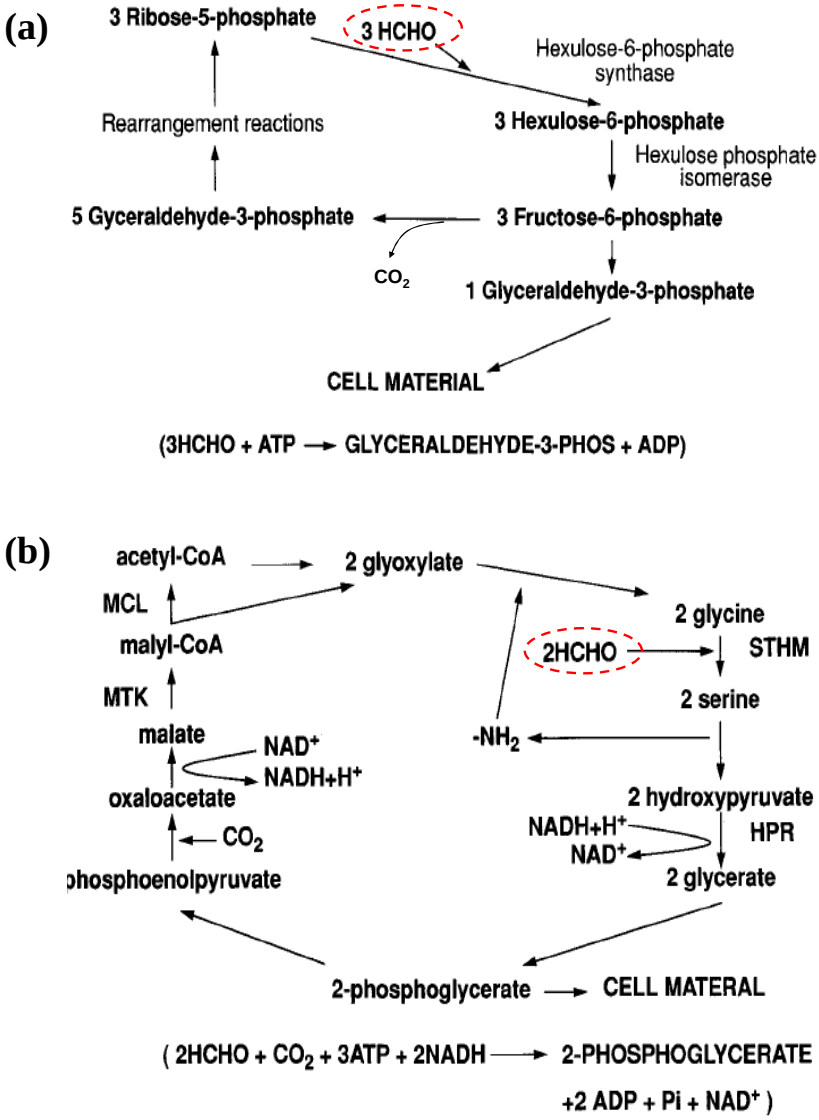


Figure 37 : Voies d'assimilation du formaldéhyde par (**a**) la voie du ribulose monophosphate (RuMP) et (**b**) le voie de la sérine (**STHM** : sérine hydroxyméthyl-transférase ; **HPR** : hydroxypyruvate réductase ; **MTK** : malate thiokinase ; **MCL** : malyl coenzyme A lyase). (D'après Hanson & Hanson, 1996).

La voie du RuMP est beaucoup moins coûteuse au niveau énergétique que **la voie de la sérine** : une seule molécule d'ATP est nécessaire pour 3 molécules de formaldéhyde dans le premier cas, contre 3 ATP et 2 NADH dans le second, pour seulement 2 molécules de formaldéhyde. Dans les deux cas, cela conduit à la formation d'un composé en C_3, après fixation d'une molécule de CO_2 dans la voie de la sérine.

- Dismutation :

La dismutation du formaldéhyde en formiate et méthanol peut se faire suivant **2 voies** enzymatiques distinctes (figure 38). La première met en jeu une oxydoréductase NAD^+ dépendante. Elle conduit soit à l'oxydation du formaldéhyde en formiate par réduction simultanée du NAD^+, soit à celle de méthanol, par réduction du NAD^+. La seconde voie, également appelée réaction de Cannizaro, est catalysée par la formaldéhyde dismutase (Kato et al., 1984), et ne nécessite pas la présence de cofacteur. Elle est induite par la présence de formaldéhyde dans le milieu.

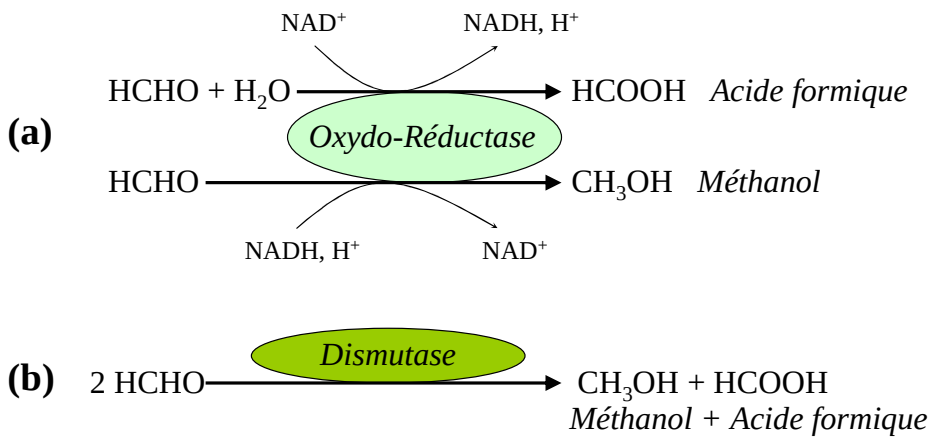


Figure 38 : Voies de dismutation du formaldéhyde en formiate et méthanol, catalysées par (**a**) une oxydo-réductase NAD^+ dépendante ou (**b**) la formaldéhyde dismutase.

Adroer et al. (1990) ont mis en évidence cette seconde enzyme dans la biodégradation du formaldéhyde par *Pseudomonas putida*. Leurs expériences, mettant en jeu des cellules en croissance en présence de formaldéhyde comme seule source de C, montrent 3 phases dans le développement bactérien : (i) une première phase exponentielle de mortalité cellulaire, due à la toxicité du formaldéhyde, suivie, sans pause, d'une phase (ii) de croissance exponentielle des cellules survivantes, et enfin (iii) d'une phase de dégradation du formaldéhyde en formiate et méthanol. Ils ont également pu montrer que le formiate produit est ensuite préférentiellement dégradé, par rapport au méthanol. Ce dernier peut être réoxydé en formaldéhyde par la méthanol déshydrogénase.

- Réaction avec le méthanol :

De manière enzymatique, **le formaldéhyde peut se recombiner avec le méthanol** pour conduire à la formation de méthylformiate, suivant (Mason & Sanders (1989) dans Delort, 2006) :

$$\boxed{HCHO + CH_3OH \rightarrow CH_3O\text{-}CH_2OH \rightarrow CH_3O\text{-}CHO}$$

Formaldéhyde + Méthanol → … → Méthylformiate

Les suivis isotopiques par RMN ^{13}C montrent que le méthanol impliqué dans la réaction peut provenir de la dismutation du formaldéhyde.

- Oxydation en formiate :

L'oxydation du formaldéhyde en formiate a lieu dans le cytoplasme, par une enzyme libre ou liée à la membrane. Il existe **plusieurs voies** pouvant conduire à la formation de formiate à partir du formaldéhyde. Trois d'entre elles sont décrites dans la revue de Vorholt (2002). Elles sont présentées en figure 39.

Chacune d'entre elle nécessite la présence d'un cofacteur spécifique, qui se lie à la (ou aux) molécule(s) de formaldéhyde, et de $NAD(P)^+$. La voie H_4F-dépendante nécessite la présence de tétrahydrofolate. Elle est surtout présente chez les bactéries pour qui la voie de la sérine constitue le moyen d'assimilation du formaldéhyde, et est donc relativement peu fréquente. La voie H_4MPT-dépendante est associée à la présence de déphospho-tétrahydrométhanoptérine. Elle a été mise en évidence chez des bactéries anaérobies méthanogènes et sulfato-réductrices et chez certaines Archaeas. Enfin, la troisième voie, GSH-dépendante, est de loin la plus répandue, aussi bien chez les bactéries que chez les

levures, les plantes et les mammifères, le plus souvent pour détoxifier l'organisme du formaldéhyde. Elle requiert la présence de glutathion (GSH) ou de mycothiol (MySH).

Dans chacun des cas, la réaction d'oxydation est induite par la liaison entre le cofacteur et le formaldéhyde. Cette activation est spontanée dans le cas de la voie H_4F-dépendante. Pour les deux autres voies, cette liaison est gluthation-dependante chez certaines bactéries, ou engendrée par des enzymes d'activation chez d'autres (Gluthatione-dependent (Gfa) ou H_4MPT-dependent (Fae) formaldehyde activating enzyme). Ces enzymes d'activation permettent aussi de complexer le formaldéhyde libre dans la cellule et d'empêcher sa liaison avec des molécules qu'il pourrait endommager.

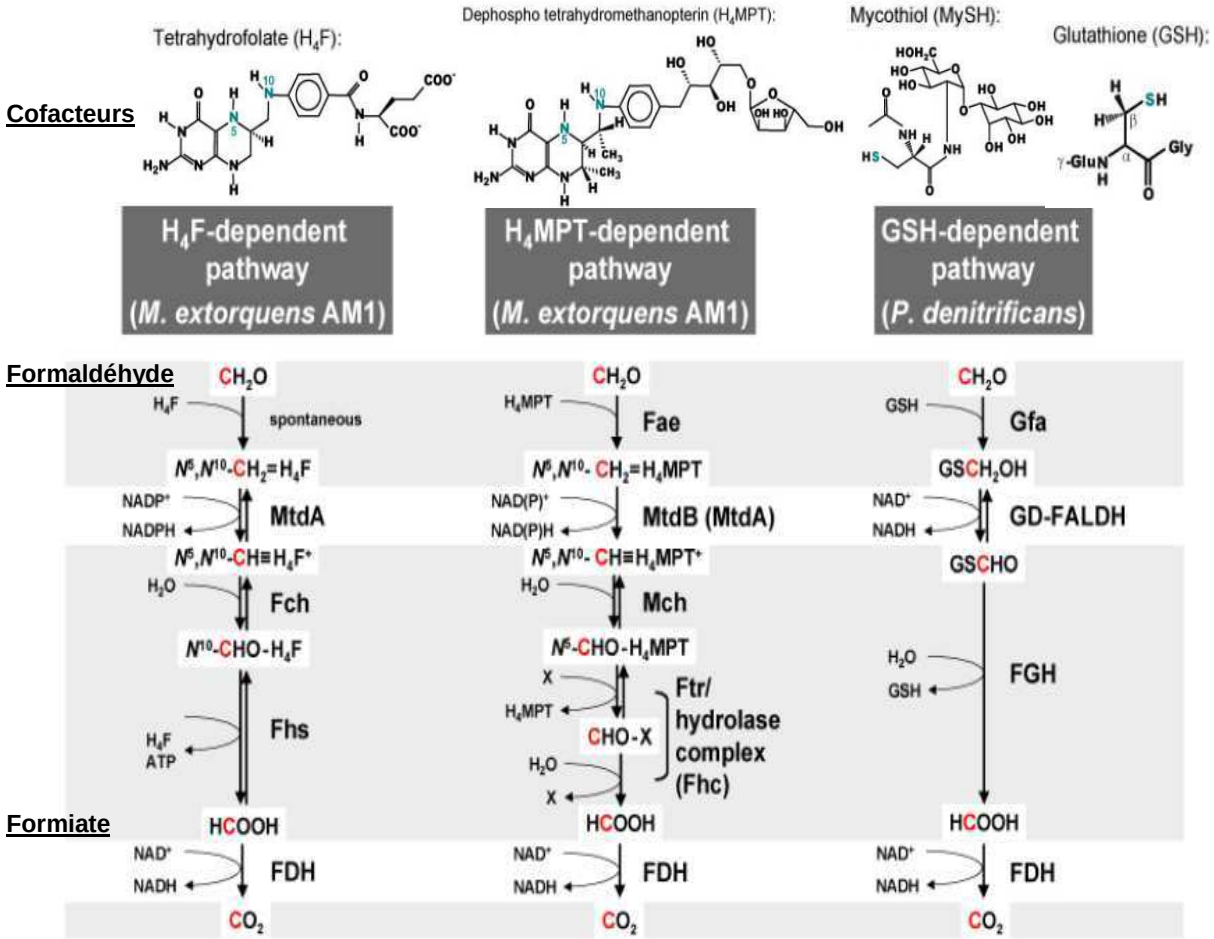


Figure 39 : Différentes voies linéaires d'oxydation du formaldéhyde chez *Methylobacterium extorquens* AM1 et *Paracoccus denitrificans* et leurs cofacteurs associés. **MtdA** : NADP-dependent methylene-H_4MPT dehydrogenase ; **Fch** : methenyl-H_4F cyclohydrolase ; **Fhs** : formyl-H_4F synthetase ; **FDH** : formate dehydrogenase ; **Fae** : H_4MPT-dependent formaldehyde activating enzyme ; **MtdB** : NAD(P)-dependent methylene-H_4MPT dehydrogenase ; **Mch** : methenyl-H_4MPT cyclohydrolase ; **Ftr** : formyltransferase ; **Fhc** : Ftr/hydrolase complex ; **Gfa** : glutathione-dependent formaldehyde activating enzyme ; **GD-FALDH** : NAD^+- and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase ; **FGH** : formyl-glutathione hydrolase ; **X** : cofacteur inconnu. (D'après Vorholt 2002).

En conclusion, il n'existe pas de voie universelle pour l'utilisation du formaldéhyde. **Plusieurs voies existent et coexistent souvent dans une même cellule**, que ce soit pour l'assimilation du carbone, la production d'énergie ou la détoxification. Il est probable (Vorholt, 2002), au regard de la toxicité du formaldéhyde, que des systèmes périplasmiques de fixation existent pour réguler son entrée dans la cellule. Ce point est à considérer avec attention car il pourrait réquisitionner une partie du formaldéhyde et le rendre indisponible à la chimie des gouttelettes, déplaçant ainsi les équilibres réactionnels.

III.4.b.(iv) Oxydation du formiate

L'acide formique HCOOH est un des maillons des métabolismes du pyruvate, du glyoxylate, et du métabolisme azoté. Son mécanisme d'oxydation, irréversible, par voie enzymatique par la **formiate déshydrogénase** (FDH) (voir figure 39) est bien connu et fait l'objet de plusieurs revues, dont Popov & Lamzin (1994) et Tishkov & Popov (2004). On trouve **deux familles de formiate déshydrogénases**, suivant leur structure quaternaire et la présence et le type de groupements prosthétiques : **la première**, conjuguée au protéines Fe-S microbiennes, peu résistantes à l'oxygène, est la moins commune. Elle a été décrite chez des souches de *Pseudomonas oxalaticus*, *Methylomonas methilica* et *Methylobacterium extorquens*. **La seconde** est très importante chez les méthylotrophes et chez les micro-organismes aérobies de manière générale (Jormakka et al., 2003) et regroupe les FDH NAD^+-dépendantes. On la retrouve chez des souches des genres bactériens *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Paracoccus* ou encore *Mycobacterium* et elle est très répandue également chez les levures et les plantes supérieures. La spécificité pour le NAD^+ (par rapport au $NADP^+$) est très importante. Les séquences génétiques codant pour les FDH de certaines souches sont connues et les numéros d'accessions (EMBL par exemple) sont précisés par Tishkov & Popov (2004). De même, cette revue liste les caractéristiques (activité spécifique, k_{cat}, K_m et température optimale) de plusieurs FDH retrouvées chez différentes souches de bactéries, levures et plantes.

Le mécanisme réactionnel mis en jeu est le transfert d'un ion hydride (H^-) provenant du formiate sur le C_4 du groupement nicotinamide du NAD^+. Il a été montré que l'utilisation de formiate marqué au deutérium, pour l'étude de l'activité enzymatique par exemple, peut diminuer par 2 l'activité de la FDH d'une souche de *Candida* et par 3 celle d'une souche de *Pseudomonas*. Il s'agit d'un point très important, à signaler dans l'optique d'investigations avec utilisation de composés marqués. Les FDH sont capables d'accepter de nombreux analogues des substrats avec une affinité plus ou moins importante, souvent meilleure que pour le formiate ou le CO_2 eux-mêmes. L'affinité pour les nitrates, par exemple, est similaire à celle du CO_2. Une telle polyvalence a facilité l'étude des FDH par l'utilisation de composés analogues au formiate et au CO_2.

Ces enzymes sont inductibles et peuvent représenter jusqu'à 10-15% du contenu protéique total de la cellule, quand elle se développe sur des composés en C_1. L'ATP est un inhibiteur connu de l'activité des FDH, témoignant de leur implication dans la production d'énergie. Quand la concentration en ATP diminue, l'activité des FDH reprend et le formiate est de nouveau oxydé. Cela conduit à la réduction d'une molécule de NAD^+ par molécule de formiate, équivalent de la production de 3 ATP par le biais de la phosphorylation oxydative.

En général, les FDH ont une activité maximale à pH neutre, bien que la FDH de la levure *Candida biodinii*, par exemple, présente une activité constante entre pH 5,2 et pH 11,0. La baisse d'activité de l'enzyme à pH acide est due à une moindre affinité pour le NAD^+, mais l'affinité pour le formiate n'est altérée que pour les pH basiques.

III.4.c) Assimilation des autres éléments (N, P, S)

Les composés inorganiques sont nécessaires au développement microbien. Ils sont présents dans les nuages et sont donc susceptibles de participer au métabolisme. Ils entrent dans la composition des acides aminés des protéines, des acides nucléiques, des cofacteurs enzymatiques, des nucléotides phosphates, etc.

Ce chapitre donne un rapide aperçu des moyens dont disposent les bactéries pour assimiler l'azote, le phosphore et le soufre, sous leurs différentes formes chimiques, à titre de rappel.

III.4.c.(i) Assimilation de l'azote

- N_2 :

Bien que l'azote soit présent en grande quantité dans l'air, le N_2 atmosphérique n'est accessible qu'aux bactéries possédant l'enzyme nitrogénase : Cyanobactéries (photosynthétiques), *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Rhizobium* (aérobies), *Clostridium* et *Methanococcus* (anaérobies). Les autres bactéries utilisent les nitrates, l'ammoniac et les composés azotés organiques comme source d'azote.

Le N_2 est réduit en ammoniac avant d'être incorporé, ce qui nécessite l'utilisation d'ATP, suivant la réaction :

Nitrogénase	$\mathbf{N_2} + 6\ H^+ + 6\ e^- + 12\ ATP + 12\ H_2O \rightarrow 2\ \mathbf{NH_3} + 12\ (ADP + P_i)$

La nitrogénase est une enzyme très sensible à l'oxygène, car elle contient du molybdène et du fer, et elle doit donc être protégée de l'oxydation.

La métabolisation de N_2 est peu probable dans l'eau de nuage quand on considère sa faible solubilité.

- NO_3^- et NO_2^- :

L'incorporation des nitrates et des nitrites est classiquement réalisée par les bactéries. Elle se fait selon :

Nitrate réductase	$\mathbf{NO_3^-} + NADPH, H^+ \rightarrow \mathbf{NO_2^-} + NADP^+ + H_2O$
Nitrite réductase	$\mathbf{NO_2^-} \rightarrow NH_2OH \rightarrow \mathbf{NH_3}$

Les nitrates représentent une fraction importante du contenu ionique des nuages, et leur utilisation dans les gouttelettes par les micro-organismes serait d'un haut intérêt environnemental.

- NH_3 et NH_4^+ :

L'assimilation de l'azote sous forme d'ammoniac ou d'ammonium est la moins coûteuse en énergie, puisque le composé est déjà déshydrogénase, qui fixe le NH_4^+ sur l'α-cétoglutarate et forme du glutamate. Le glutamate peut à son tour recevoir un NH_3 pour former de la glutamine, ou subir l'action de transaminases pour la synthèse des autres acides aminés.

III.4.c.(ii) Assimilation du Phosphore

Le phosphore est assimilé par la cellule sous forme de phosphates. Le phosphate inorganique $\mathbf{P_i}$ (PO_4^{3-}) est incorporé dans le métabolisme lors de la synthèse d'ATP ou de sucres-phosphates, et il joue un rôle important dans la régulation de nombreux phénomènes biochimiques. Les esters organiques de phosphate peuvent également être utilisés grâce à des

phosphatases libérant le P_i. Chez les bactéries à Gram négatif, des phosphatases sont présentes dans le périplasme.

III.4.c.(iii) Assimilation du soufre

Le soufre peut être assimilé à partir de la cystéine et de la méthionine présentes dans le milieu, mais ce sont plus les interactions sulfates-bactéries qui nous intéressent ici. En effet, les sulfates représentent une grande part des ions solubles dans l'eau des nuages, leur origine est clairement anthropique. Les sulfates $\mathbf{SO_4^{2-}}$ peuvent être réduits en sulfites SO_3^- par utilisation de 2 molécules d'ATP et d'une molécule de NADPH, H^+, puis en H_2S avant d'être incorporés dans les acides aminés soufrés. En anaérobiose, les bactéries sulfato-réductrices utilisent le sulfate comme accepteur terminal des électrons de la respiration anaérobie. Il est alors réduit en H_2S.

III.4.d)La spectroscopie par RMN et l'étude du métabolisme

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire est un outil très adapté à l'étude du métabolisme cellulaire. En effet, elle a l'avantage, contrairement aux autres techniques analytiques couramment utilisées (spectrométrie de masse, chromatographie) de ne présenter aucun *à priori* et de ne pas être invasive. Elle permet donc l'analyse des phénomènes *in vivo* et leur suivi au cours du temps. Cependant, elle est moins sensible que les techniques précédemment citées, ce qui limite son utilisation à des investigations du métabolisme sur des expériences de laboratoire, dans lesquelles la concentration en substrat peut être ajustée.

L'abondance naturelle proche de 100% du ^1H fait de la **RMN du proton** la technique la plus sensible : elle ne requiert pas de marquage des molécules. Elle est quantitative, mais la faible gamme de résonance des protons (~15 ppm) peut conduire à des superpositions de pics. De plus, la présence d'eau en grande quantité engendre un signal important, qui peut s'avérer gênant et masquer les signaux aux alentours de 5 ppm.

La **RMN du ^{13}C** ne présente pas ces problèmes : sa gamme de résonance s'étend sur environ 250 ppm. Par contre, l'abondance naturelle de cet atome (~1%) ne permet pas de le détecter à faible concentration et l'utilisation de molécules marquées est souvent nécessaire. Cela peut être vu comme un avantage, dans la mesure où l'origine du ^{13}C est alors totalement contrôlée. L'utilisation de molécules marquées permet d'établir des voies métaboliques par suivi de l'atome marqué le long de sa métabolisation par la cellule. Il s'agit d'une technique très pertinente pour l'étude du métabolisme dans la mesure où l'ensemble des molécules carbonées est observable, sans sélectivité.

La **RMN du ^{32}P** est également souvent utilisée en biologie, car elle permet d'accéder à une mesure de pH intracellulaire *in vivo* par mesure de la spéciation du PO_4^{3-}. L'ensemble des composés cellulaires phosphorylés est très important dans le métabolisme, comme les nucléotides-phosphate et certains cofacteurs enzymatiques.

La revue de Grivet et al. (2003) présente différents exemples détaillés de l'utilisation de la RMN dans l'étude du métabolisme microbien. A titre d'exemples, les figures 40 à 42 montrent comment la RMN du ^{13}C peut être utilisée pour identifier et caractériser des voies métaboliques *in vivo*. Du formaldéhyde marqué au carbone 13 est utilisé, et son devenir est suivi (Delort, 2006). Sur la figure 40 (Hunter et al., 1984), il s'agit de la **transformation du ^{13}C-formaldéhyde** (~82 ppm) en différents composés, dont le **^{13}C-formiate** (~170 ppm) et le **^{13}C-méthanol** (~50 ppm) par une souche de *E. coli*. Les autres pics du spectre (~60-70 ppm) correspondent à des composés à plus longue chaîne ($R\text{-}CH_2\text{-}R'$) formés à partir de l'assimilation du formaldéhyde.

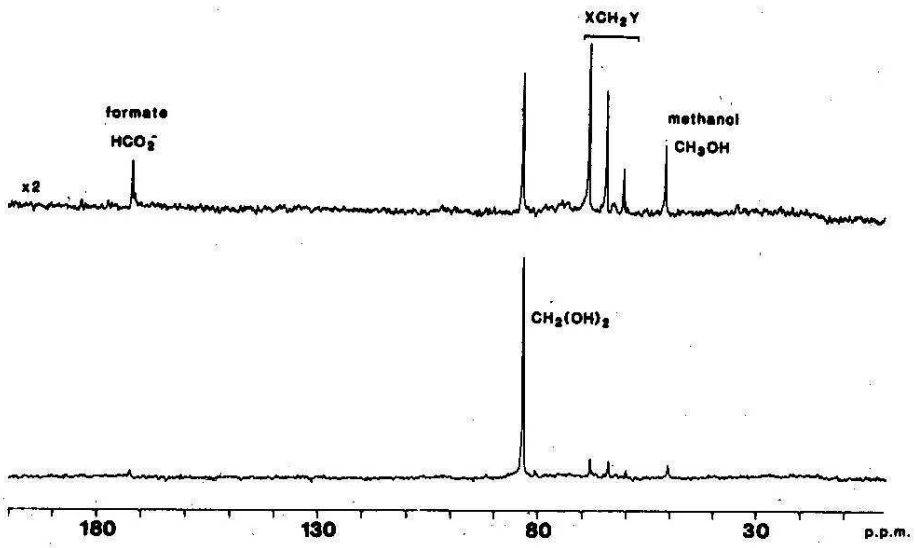


Figure 40 : Spectre RMN ^{13}C d'une suspension non aérée de *E. coli* (10^{12} cellules mL^{-1}) contenant 10 mM de ^{13}C-formaldéhyde, après 20 minutes (**en bas**) 3 heures (**en haut**) d'incubation. (Hunter et al., 1984).

La RMN ^{13}C *in vivo* a par exemple aussi permis la mise en évidence chez *Bacillus methanolicus* de la **voie du ribulose monophosphate** (RuMP) impliquée dans l'assimilation du formaldéhyde (Pluschkell & Flickinger, 2002) (figure 41). La cinétique précise de dégradation de méthanol marqué au ^{13}C montre en premier lieu l'apparition de ^{13}C-formaldéhyde, puis de ^{13}C-formiate et de $^{13}C_1$-hexose-phosphate. La présence de ce dernier implique celle de la voie du RuMP.

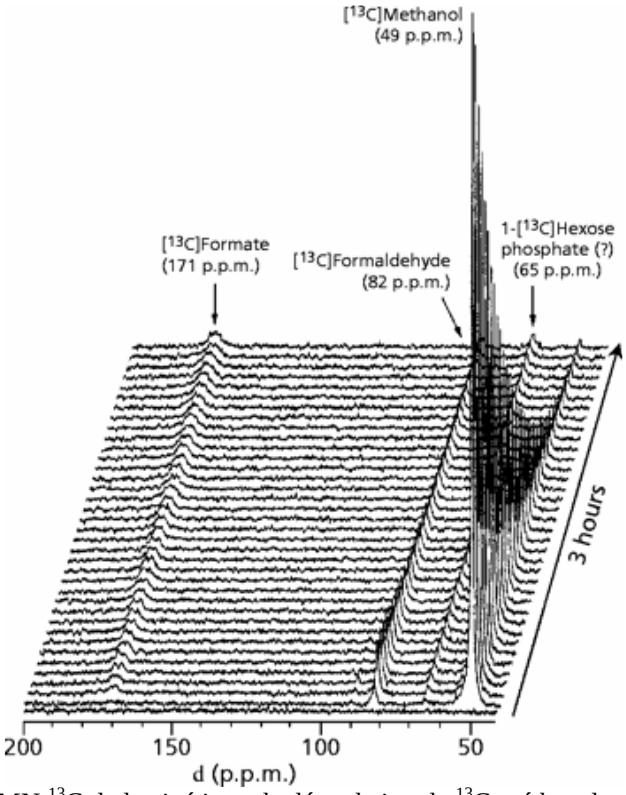


Figure 41 : Analyse par RMN ^{13}C de la cinétique de dégradation de ^{13}C-méthanol par une suspension cellulaire de *B. methanolicus* (Pluschkell & Flickinger, 2002).

La figure 42 montre enfin que les liaisons d'un substrat marqué avec d'autres molécules peuvent êtres détectées, et que les cofacteurs de réactions enzymatiques peuvent par conséquent être mis en évidence. Mason et al. (1986) ont ainsi pu démontrer que le

formaldéhyde (marqué) était lié à l'intérieur de la cellule (culot) au glutathion, qui devenait donc visible par RMN du ^{13}C. La voie d'oxydation GSH-dépendante du formaldéhyde en formiate que l'on a vu précédemment est donc ici mise en évidence.

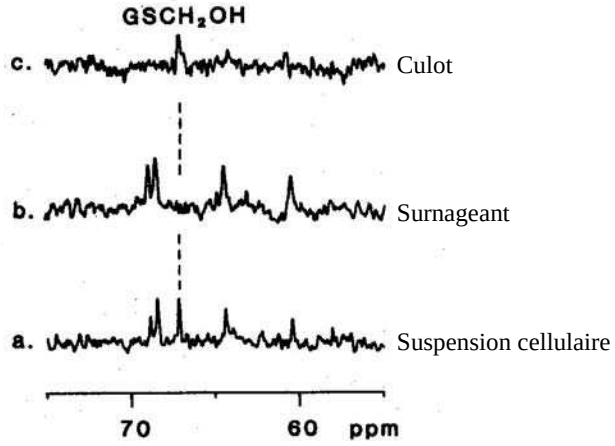


Figure 42 : Spectre RMN ^{13}C d'une suspension de *E. coli* supplémentée depuis 4 minutes avec 10 mM de ^{13}C-formaldéhyde, après incubation pendant 1 heure en présence de 10 mM du même substrat non marqué. (**a**) Suspension (cellules + milieu) ; (**b**) surnageant obtenu après centrifugation ; (**c**) culot cellulaire (cellules). (Mason et al., 1986).

Problématique

L'eau de nuage est une solution aqueuse complexe dont la composition résulte de la solubilisation de composés originaires des particules ayant servi de noyaux de condensation aux gouttelettes, de la dissolution des gaz interstitiels, de la capture d'aérosols interstitiels et des réactions chimiques qui s'y déroulent. Les valeurs de concentrations des différents composés chimiques peuvent être très variables, souvent d'un facteur supérieur à 100 pour un même site et pour des mesures peu espacées dans le temps. Un des facteurs de variation est la quantité d'eau que renferme le nuage par unité de volume, qui dilue ou concentre les éléments en solution. La teneur en eau liquide (LWC, Liquid Water Content) ou en glace (IWC, Ice Water Content) du nuage échantillonné est donc un paramètre important pour comparer les valeurs de concentrations d'un échantillon à un autre. Elle est exprimée en g d'eau m^{-3} de nuage, et varie généralement entre 0,1 à 1,5 g m^{-3} (Löflund et al., 2002, par exemple).

L'eau atmosphérique est, sauf de rares exceptions, toujours de **pH** acide. Le pH moyen de l'eau de nuage vaut 5,6, valeur de l'équilibre avec le CO_2 de l'air, et il est souvent encore abaissé par la présence de composés acides : acide nitrique HNO_3, acide sulfurique H_2SO_4 et acides organiques (Kawamura et al., 2001 ; Cini et al., 2002). La gamme de pH s'étend de 2,5 à 7 (Suzuki et al., 1998 ; Collett et al., 2002 ; Fuzzi et al., 2002 ; Fisak et al., 2002 ; Löflund et al., 2002 ; Marinoni et al., 2004 ; Sellegri et al., 2003) et les pH les plus acides sont mesurés dans les nuages « pollués », à forte influence anthropique.

Concernant la **composition chimique**, les composés inorganiques et organiques majoritaires retrouvés dans l'eau de nuage sont récapitulés dans le tableau 6 ci-dessous.

Lieu de prélèvement	***Altitude (m a.s.l.)***	**SO_4^{2-}**	**NO_3^-**	**NH_4^+**	**Formiate**	**Acétate**	**Oxalate**	**Référence**
Kopisty, République Tchèque	*240*	192,9	99,6	52,7				Fisak et al., 2002
Prague, République Tchèque	*304*	70,5	48	16,5				Fisak et al., 2002
Jablonec, République Tchèque	*520*	8,1	8,1	1,9				Fisak et al., 2002
Zindelen, Suisse	*685*	42,9	63,2	35,8			0,78	Joos & Baltensperger, 1991
Mont Maya, Japon	*700*	83	140	64	1,2	0,4		Suzuki et al., 1998
Kleiner Feldberg, Allemagne	*825*	6,6	12,8	3,7	0,15	0,09		Wobrock et al., 1994
Milesovka, République Tchèque	*837*	29,2	27,0	16,2				Fisak et al., 2002
Churanov, République Tchèque	*1122*	17,0	18,0	7,4				Fisak et al., 2002
Puy de Dôme, France	*1465*	8,1	23,6	3,9	0,24	0,27	0,07	Voisin et al., 2000
Puy de Dôme, France	*1465*	4,1	6,4	2,6	0,45	0,49	0,16	Marinoni et al., 2004
Whiteface Mountain, Etats-Unis	*1512*	20,4	5,5	2,4	1,16	0,53	0,87	Khwaja et al., 1995
Mont Rax, Autriche	*1644*	7,9	8,5	4,1	0,61	0,93	0,46	Löflund et al., 2002
Mont Sonnblick, Autriche	*3106*	3,9	1,8	0,8	0,29	2,1		Brantner et al., 1994
Mont Sonnblick, Autriche	*3106*	1,2						Limbeck & Puxbaum, 2000

Tableau 6 : Valeurs de concentrations en µg mL^{-1} des principaux composés mesurés dans l'eau de nuage pour différents sites, classés par altitude croissante.

Si l'on s'intéresse plus spécifiquement à la **fraction organique**, on remarque une grande diversité de composés, avec de grandes variations de concentrations (tableau 7 ci-dessous).

Composés		Formules	Masses molaires (g mol^{-1})	Concentrations (µg L^{-1})				
				Marinoni et al., 2004 **Puy de Dôme, France Nuage** *25percentile - 75percentile*	Marinoni et al., 2004 **Puy de Dôme, France Nuage** *Extrêmes*	Löflund et al., 2002 Mont Rax, Autriche Nuage *Extrêmes*	van Pinxteren et al., 2005 Schmücke mountain, Allemagne Nuage *Extrêmes*	Kawamura et al., 2001 Los Angeles, Etats-Unis pluie *Extrêmes*
Carbone Organique Dissous				2100-7680	1200 - 15460			
Acides monocarboxyliques								
Formiate	C1	HCOOH	46,03	151-464	37 - 3213	60 - 1580	225 - 1800	5 - 2348
Acétate	C2	CH_3-COOH	60,05	186-591	37 - 2873	330 - 2270	96 - 2487	12 - 1742
Glycolate	C2	CH_2OH-COOH	76,02	26-102	0 - 753			1,5 - 193
Glyoxylate	C2	COOH-CHO	74,00	3,6-24	0 - 638			
Propionate	C3	CH_3-CH_2.COOH	74,04	18-53	0 - 600		0 - 67	
Lactate	C4	CH_3-CHOH-COOH	90,03	59-156	20 - 514		45 - 100	
Acides dicarboxyliques								
Oxalate	C2	HOOC-COOH	90,00	65-164	8 -1259	90 - 1140	108 - 522	16 - 2520
Malonate	C3	HOOC-CH_2-COOH	104,01	17-113	0 - 405	< 38 - 300	20 - 94	1 - 573
Succinate	C4	HOOC-$(CH_2)_2$-COOH	118,03	24-122	7 - 473	< 80 - 300	0 - 60	7 - 862
Maléate	C4	HOOC-CH=CH-COOH	116,01	6-36	0 -180		0 - 47	0 - 209
Tartrate	C4	HOOC-$(CHOH)_2$-COOH	150,02	2-15	0 -122		0 - 30	
Glutarate	C5	HOOC-$(CH_2)_3$-COOH	132,04	16-63	7 - 337		0 - 14	2 - 317
Aldéhydes								
Formaldéhyde	C1	HCHO	30,30				3 - 146	25 - 1364
Acétaldéhyde	C2	CH_3-CH_2O	44,03				3,5 - 53	3 - 212
Glyoxal	C2	OHC-CHO	58,01				46 - 656	0,5 - 697
Méthylglyoxal	C3	CH_3-CO-CHO	72,02				28 - 238	0,7 - 865

Tableau 7 : Concentrations en composés organiques mesurées dans des échantillons de nuage et de pluie dans différentes études.

Classiquement, la concentration en **carbone organique dissous** (COD) vaut environ 5 mg L^{-1} pour les nuages collectés au sommet du puy de Dôme. Les mono- et diacides carboxyliques représentent de 18 à 71 % (moyenne 36 %) du COD, les monoacides étant de loin les plus abondants. La plus grande partie concerne les acides formique HCOOH et acétique CH_3COOH (~3-10 µM) (Brantner et al., 1994 ; Wobrock et al., 1994 ; Khwaja et al., 1995 ; Voisin et al., 2000 ; Löflund et al., 2002 ; Marinoni et al., 2004). Parmi les diacides carboxyliques majoritairement retrouvées, les plus abondants sont l'oxalate et le succinate (Kawamura et al., 2001 ; Löflund et al., 2002 ; Marinoni et al., 2004).

La composition en acides organiques moyenne de l'eau de nuage, pour le site du puy de Dôme, est présentée en figure 43.

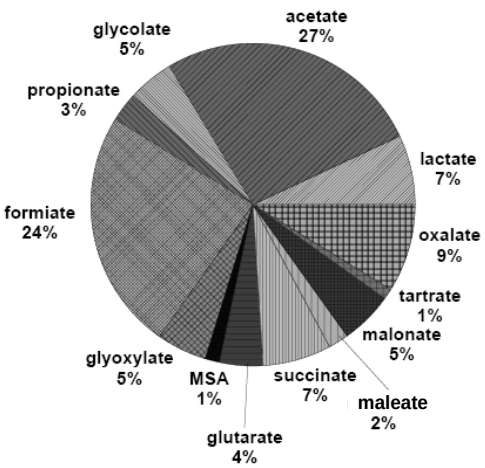


Figure 43 : Contribution des différents acides organiques à la composition chimique de l'eau des nuages, moyennée sur 16 évènements collectés au sommet du puy de Dôme. **MSA** : acide méthylsulfonique (D'après Marinoni et al., 2004).

La chimie induite par la lumière solaire, **la photochimie**, est une composante déterminante de la chimie atmosphérique : elle produit des radicaux libres, oxydants puissants ($OH^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$) qui vont attaquer les composés organiques et être à la source de la grande majorité des réactions qui ont lieu dans les nuages. Il a été montré par modélisation que la photochimie qui a lieu dans la phase aqueuse des nuages pouvait influencer de façon significative la phase gaz environnante (Jacob, 1986 ; Lelieveld & Crutzen, 1991). Les radicaux hydroxyles sont majoritairement générés par photolyse du péroxyde d'hydrogène H_2O_2, suivant les réactions :

$H_2O_2 + hv \rightarrow 2\ OH^{\bullet}$	($\lambda \leq 310$ nm)
$H_2O_2 + OH^{\bullet} \rightarrow HO_2^{\bullet} + H_2O$	
$HO_2^{\bullet} + HO_2^{\bullet} \rightarrow H_2O_2 + O_2$	$HO_2^{\bullet} \leftrightarrows O_2^{\bullet -} + H^+$ pKa = 4,7
$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet -} + H_2O \rightarrow H_2O_2 + O_2 + OH^-$	

Il est généralement admis par la communauté scientifique que la réactivité des composés organiques dans l'atmosphère est très largement liée à la photochimie et aux radicaux libres qu'elle produit. La figure 44 ci-dessous résume la chimie des composés organiques dans l'atmosphère telle qu'on la considère à l'heure actuelle. Les réactions radicalaires impliquant l'acide acétique et les composés en C_1, ainsi que les constantes de vitesse qui leur sont associées sont précisées dans le tableau 8 ci-dessous.

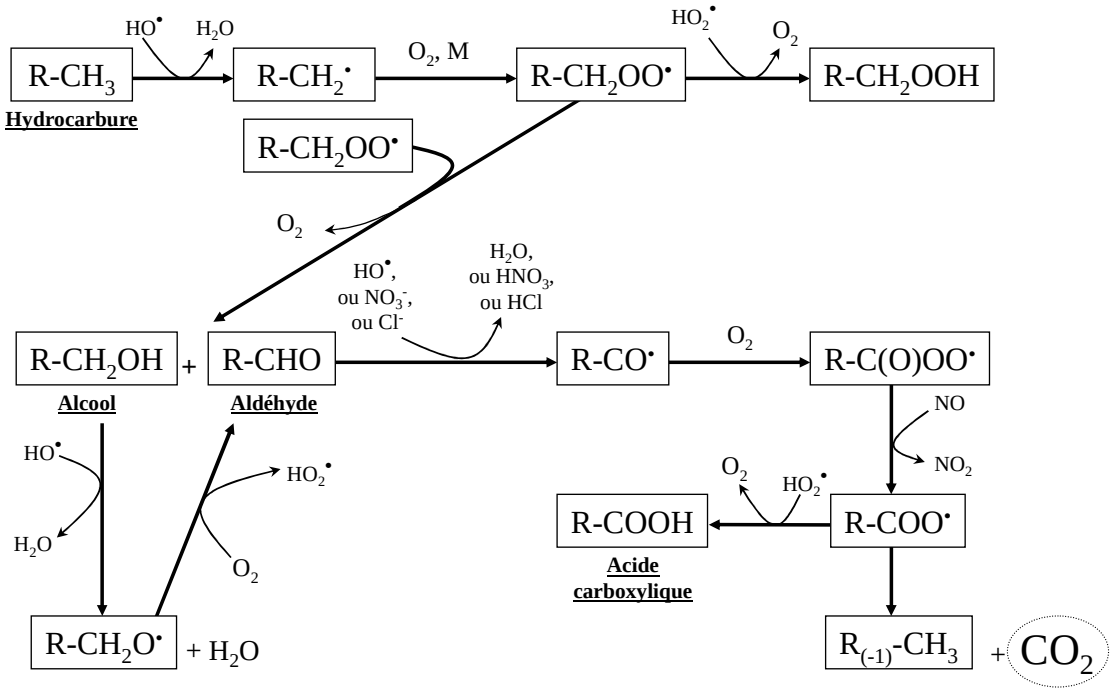


Figure 44 : Principales voies d'oxydation des hydrocarbures dans l'atmosphère.

Réaction	k_{298} (L mol^{-1} s^{-1})	Référence
Production d'acide acétique		
$CH_3CO^{\bullet} + H_2O \leftrightarrows CH_3C(OH)_2^{\bullet}$	?	Faust et al., 1996
$CH_3C(OH)_2OO^{\bullet} \rightarrow HO_2^{\bullet} + CH_3COOH$	?	Faust et al., 1996
Chimie du méthanol, de l'acide formique et du formaldéhyde		
$CH_3OO^{\bullet} + O_2^{-} + H_2O \rightarrow CH_3OOH + OH^{-} + O_2$	$5{,}0 \times 10^{7}$	Barth, 2006
$CH_3OOH + OH^{\bullet} \rightarrow CH_3OO^{\bullet} + H_2O$	$2{,}7 \times 10^{7}$	Barth, 2006
$CH_3OOH + OH^{\bullet} \rightarrow CH_2(OH)_2 + OH^{\bullet}$	$1{,}9 \times 10^{7}$	Barth, 2006
$CH_2(OH)_2 + OH^{\bullet} \rightarrow HCOOH + HO_2^{\bullet} + H_2O$	$2{,}0 \times 10^{9}$	Barth, 2006
$HCOOH + OH^{\cdot} \rightarrow CO_2 + HO_2^{\cdot} + H_2O$	106×10^{8}	Barth, 2006
$HCOO^{-} + OH^{\bullet} \rightarrow CO_2 + HO_2^{\bullet} + OH^{-}$	$2{,}5 \times 10^{9}$	Barth, 2006
$CH_3OH + OH^{\bullet} \rightarrow CH_2OH^{\cdot} + H_2O$	$1{,}0 \times 10^{9}$	Elliot & Mc Cracken (1989), dans Monod et al. 2000
$CH_2OH^{\bullet} + O_2 \rightarrow OOCH_2OH^{\cdot}$	$4{,}5 \times 10^{9}$	Buxton et al. (1988), dans Monod et al. 2000
$CH_2OH^{\bullet} + CH_2OH^{\bullet} \rightarrow CH_3OH + H_2CO$	?	Monod et al., 2000
$OOCH_2OH^{\cdot} \rightarrow HCOOH + HO_2^{\bullet}$	< 10	Bothe et al. (1977, 1978), dans Monod et al. 2000
$OOCH_2OH^{\bullet\cdot} + HO_2^{\bullet} \rightarrow HOOCH_2OH + O_2$	?	Bothe et al. (1977, 1978), dans Monod et al. 2000
$CH_2(OH)_2 + OH^{\bullet} \rightarrow CH(OH)_2^{\bullet} + H_2O$	$7{,}8 \times 10^{8}$	Chin & Wine (1994) dans Monod et al., 2000
$CH_2(OH)_2 + H_2O_2 \leftrightarrows HOOCH_2OH + H_2O$	?	Monod et al., 2000
$HCOOH + OH^{\bullet} \rightarrow COOH^{\bullet} + H_2O$	$1{,}1 \times 10^{8}$	Chin & Wine (1994) dans Monod et al., 2000
$HCOO^{-} + OH^{\bullet} \rightarrow COO^{\bullet} + H_2O$	$3{,}1 \times 10^{9}$	Chin & Wine (1994) dans Monod et al., 2000
Chimie de Fenton		
$HCOOH + FeO^{2+} + O_2 + H^{+} \rightarrow Fe^{3+} + CO_2 + HO_2^{\bullet} + H_2O$	$1{,}6 \times 10^{2}$	Deguillaume et al., 2005
$HCOO^{-} + Fe^{2+} + O_2 + H^{+} \rightarrow Fe^{3+} + CO_2 + HO_2^{\bullet} + OH^{-}$	$3{,}0 \times 10^{5}$	Deguillaume et al., 2005
$CH_2(OH)_2 + Fe^{2+} + O_2 + H^{+} \rightarrow Fe^{3+} + CO_2 + HO_2^{\bullet} + OH^{-}$	$4{,}0 \times 10^{2}$	Deguillaume et al., 2005

Tableau 8 : Principales réactions radicalaires de la chimie en phase aqueuse des acides acétique et formique, du méthanol, et du formaldéhyde, et valeurs des constantes cinétiques associées.

Un fait marquant pour un biologiste au regard de la composition de l'eau des nuages est la présence de nombreux composés que l'on retrouve également dans le métabolisme microbien. Pourtant, quand on s'intéresse aux études menées en chimie atmosphérique, aucune ne mentionne la possibilité d'une intervention des micro-organismes dans la réactivité du milieu. Barth (2006), par exemple, ne considère dans son modèle de chimie atmosphérique en phase aqueuse que la réactivité induite par la photochimie et à la production de radicaux libres qu'elle engendre. Si on compare la chimie radicalaire atmosphérique avec les transformations biochimiques possibles, on remarque rapidement que certaines de ces voies de dégradation sont très similaires aux processus métaboliques (figure 45).

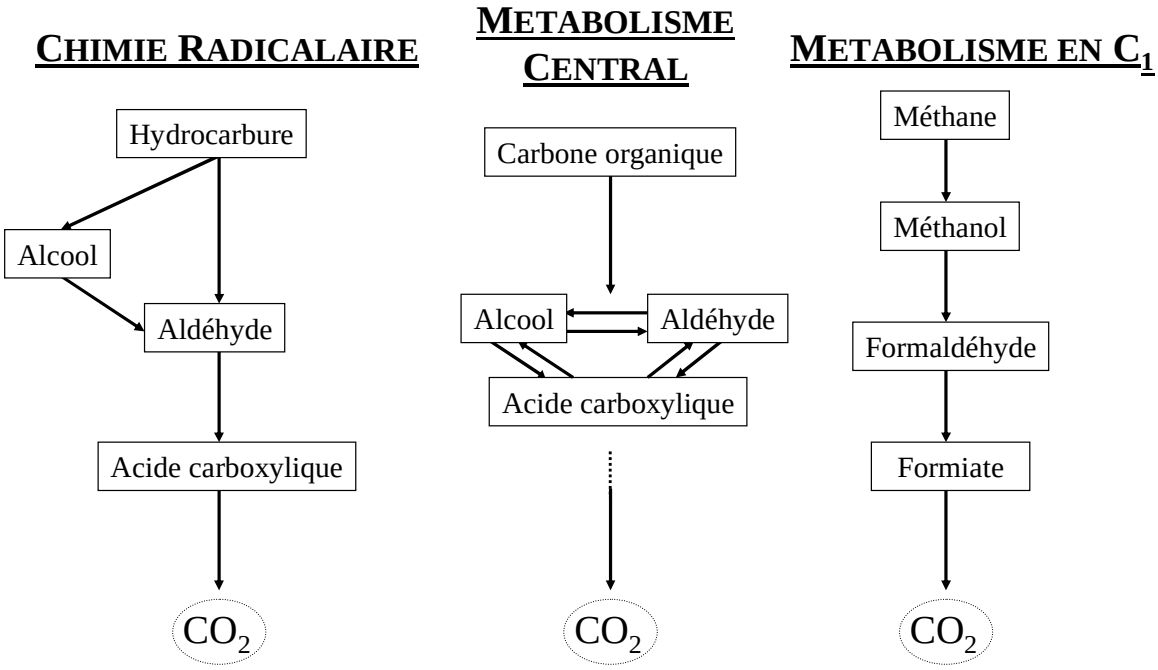


Figure 45 : Synthèse des voies de transformation des composés carbonés organiques catalysées photochimiquement (**à gauche**) et biochimiquement (métabolisme central et métabolisme méthylotrophe) (respectivement **au centre et à droite**).

Une implication potentielle du vivant dans la chimie en phase aqueuse des nuages est donc bien à envisager. Il a été prouvé que les bactéries présentes dans les nuages peuvent être actives, même à basse température, et la production primaire à l'intérieur des nuages a été estimée à 1 à 10 Tg C an^{-1} (Sattler et al., 2001). C'est donc autant de carbone réquisitionné par les micro-organismes. Les auteurs, même si ça n'est pas leur intention dans le travail qu'ils ont présenté, mettent déjà en avant l'influence que les micro-organismes pourraient avoir sur la chimie des nuages. A notre connaissance, seule l'équipe canadienne de Ariya et Amyot s'est réellement intéressée à la dégradation des composés organiques atmosphériques par les micro-organismes (Ariya et al., 2002 ; Ariya & Amyot, 2004). Ils ont récupéré des micro-organismes de l'air par exposition de solutions d'acides dicarboxyliques à l'air extérieur sur différents sites. Puis, ils ont sélectionné le champignon *Geotrichum* pour tester sa capacité à dégrader des diacides carboxyliques présents dans l'atmosphère. Les résultats montrent des vitesses de dégradation microbiologiques comparables à celles impliquant des oxydants puissants comme $HO^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$ ou O_3 (tableau 9 ci-dessous).

	Temps de vie estimé (jours)			
Composé	**$HO^{\bullet}$(aq)**	**$HO_2^{\bullet}$(aq)**	**O_3 (aq)**	**Voie microbiologique**
Molanate	6-24	> 643	$2,1 \times 10^3$	1,5
Succinate	3-12	> 771	$17,3 \times 10^6$	10
Glutarate	1,3-5,2	-	$8,9 \times 10^6$	5
Acide adipique	0,1-0,4	-	$6,8 \times 10^6$	2
Acide pimélique	0,03-0,12	-	$2,6 \times 10^6$	3,5
Acide pinique	-	-	$4,6 \times 10^5$	4

Tableau 9 : Temps de vie de différents acides carboxyliques estimés à partir des vitesses de réaction associées à différentes voies de dégradation. [$OH^{\bullet}$], [$HO_2^{\bullet}$] et [O_3] mises en jeu sont estimées à partir de leur constante de Henry, et sont respectivement égales à $(0,5\text{-}2) \times 10^{-13}$, $6,0 \times 10^{-8}$ et $1,0 \times 10^{-9}$ mol L^{-1}. (D'après Ariya et al., 2002).

D'un autre côté, les auteurs ont suivi la biodégradation de ^{13}C succinate par résonance magnétique nucléaire (RMN) du ^{13}C. Ils ont observé la synthèse de protéines et d'acides gras marqués, démontrant ainsi que des micro-organismes de l'air sont capables d'assimiler des composés organiques présents dans l'atmosphère. Cependant, il n'est fait aucune mention dans leur travail de la concentration en micro-organismes utilisée, ni de la température à laquelle ont été réalisées les expériences. De plus, la méthode expérimentale de collecte des micro-organismes de l'air semble peu adaptée, et l'étude concerne un champignon, qui est vraisemblablement sous forme sporulée dans l'air. Enfin, le choix des composés testés est-il vraiment pertinent dans la mesure où la majorité de ceux-ci sont très faiblement représentés dans l'eau de nuage ? **On peut donc s'interroger sur la signification des valeurs données** dans ce tableau. Les résultats tels qu'ils sont présentés sont peu exploitables et il est difficile de les extrapoler.

Notre but à travers cette étude est donc dans un premier temps de **déterminer quel est le contenu microbien de l'eau des nuages** pour le site du puy de Dôme. On sait en effet que des micro-organismes (bactéries et espèces fongiques) sont présents et actifs dans les nuages d'altitude, respectivement grâce aux études de Bauer et al. (2002a) et Sattler et al. (2001), mais on ne connaît encore rien de la variabilité de ce contenu ni de l'affiliation taxonomique des communautés rencontrées. Une fois notre connaissance des nuages élargie à la composante microbiologique, notre objectif principal pourra être abordé : **estimer le niveau d'implication de l'activité cellulaire sur la composition et sur la réactivité du milieu**. Ici aussi, tout reste à découvrir puisque aucune investigation n'a encore été menée sur ce thème, exceptée celle de Ariya et al. (2002).

La présentation des résultats s'organise autour des 5 articles auxquels ce travail de thèse a conduit. Après **(i)** une présentation introductive des premiers résultats obtenus, récapitulant l'ensemble de nos champs d'investigations, une grande partie du travail exposé concerne la description des micro-organismes retrouvés dans l'eau des nuages, par une approche quantitative et qualitative. Nous nous intéresserons d'abord **(ii)** au **contenu microbiologique et à sa variabilité** sous la pression des facteurs abiotiques (saison, paramètres météorologiques et physico-chimiques), puis **(iii)** à la **taxonomie** et aux propriétés physiologiques des micro-organismes isolés. Enfin, les résultats concernant **(iv) l'aptitude de ces micro-organismes à dégrader des composés organiques atmosphériques** majeurs sont présentés, en terminant par **(v)** une **évaluation de leur activité dans l'eau des nuages**.

Résultats

.

Les résultats principaux sont présentés en anglais sous la forme d'articles publiés ou à soumettre prochainement (avant fin 2006) :

- Les premiers résultats obtenus, en 2003, à propos du contenu microbien des nuages et des expériences de laboratoire sur le métabolisme des souches isolées ont été publiés dans *Atmospheric Environment* en 2005.
- Par la suite, la confrontation des données microbiologiques accumulées avec les données physico-chimiques a fait l'objet d'un article à soumettre.
- La description de l'ensemble des souches bactériennes et fongiques cultivées a été publiée dans *FEMS Microbiology Ecology* en 2006.
- Enfin, les travaux concernant le métabolisme des souches cultivées envers des composés organiques (formiate, acétate, lactate, succinate, méthanol et formaldéhyde) ont permis l'écriture de 2 articles.

En complément, les résultats non publiés sont discutés en parallèle de chaque article. Les protocoles précis utilisés sont détaillés en annexe, ainsi que l'ensemble des données brutes.

I. PREMIERS RESULTATS

Cette partie correspond à la naissance de l'étude et à la mise au point du protocole. Celui-ci a été modifié depuis, et les différentes manipulations et l'évolution du protocole utilisé le long de cette thèse sont détaillés dans l'annexe 1 et dans chacun des articles. Les premiers résultats sont présentés sous la forme de la publication qui a suivi. Ils correspondent à ceux obtenus sur deux prélèvements réalisés et analysés lors de mon stage de DEA (2003), et du stage de maîtrise (2003) et d'une partie du stage de DEA (2004) de Matthieu Ménager.

I.1. Contexte de l'étude

I.1.a) Laboratoires impliqués

Le chalet de l'Observatoire de Physique du Globe de Clermont-ferrand (**OPGC**) installé au sommet du puy de Dôme permet au Laboratoire de Météorologie Physique (**LaMP**) de s'intéresser à la chimie atmosphérique. C'est avec la thèse d'Angela Marinoni soutenue en 2004, sous encadrements conjoints du LaMP et du Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire (**LPMM**) que les recherches sur la phase aqueuse des nuages commencent aux laboratoires, dans les équipes « nuages et rayonnement » du LaMP (Paolo Laj) et « photochimie environnementale » (Gilles Mailhot) du LPMM. Elle s'attache à caractériser chimiquement ce milieu et adapte aux nuages la classification chimique des masses d'air précédemment établie par Karine Sellegri (lors de sa thèse au LaMP), à partir de données concernant les aérosols secs. Angela Marinoni réalise également les premières expériences d'irradiation d'échantillons de nuage pour étudier l'effet de la photochimie. Les caractéristiques chimiques des masses d'air rencontrées au puy de Dôme par temps sec ou lors de la présence de nuage sont donc relativement bien connues depuis quelques années. Les 2 laboratoires disposent du matériel et du savoir-faire relatifs aux prélèvements d'air et de nuage et aux analyses des échantillons et données collectés.

En 2003, dans le cadre de l'Observatoire de Recherche en Environnement intitulé Bio-physico-chimie de l'Eau Atmosphérique et Modifications Anthropiques (**ORE-BEAM**) dont les activités sont centrées sur le puy de Dôme, le sujet de la microbiologie de l'eau des nuages débute. L'objectif de cette étude est de **déterminer la structure et le fonctionnement des communautés microbiennes de l'eau des nuages**. En d'autres termes, il s'agit de caractériser la microbiologie de ce milieu à des niveaux quantitatif et qualitatif, et d'estimer quelle pourrait être le niveau d'implication de ces micro-organismes dans la chimie du nuage. Cette thématique pluridisciplinaire requiert des compétences en météorologie et chimie, respectivement assumées par le le LaMP et le LPMM, mais aussi de microbiologie, ainsi que du matériel d'analyse adapté à de telles investigations. Pour cette raison, le Laboratoire de Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (**SEESIB**), particulièrement l'équipe « RMN métabolique et environnement » (Anne-Marie Delort), a la coresponsabilité de cette étude au sein de l'ORE-BEAM, aux côtés du LaMP et du LPMM.

I.1.b) Mise au point du protocole

Le stage qui m'a été proposé en 2003 portait sur ce sujet, dans le cadre du DEA Climat et Physico-Chimie de l'Atmosphère (CPCA), sous la direction de A-M. Delort au SESSIB. Il consistait à établir :

- Un protocole adapté aux objectifs
- **La faisabilité d'une telle étude** dans un Observatoire de Recherche (ce qui impose un rythme d'échantillonnage relativement soutenu)

Le SEESIB ne disposait alors d'aucune expérience en la matière, et un protocole a du être mis au point (figure 46), en accord avec le matériel disponible et la très peu nombreuse littérature sur le sujet. L'équipe italienne de Paolo Mandrioli a également été rencontrée pour leur expérience dans le domaine de l'aérobiologie, et plus particulièrement concernant leurs recherches sur le brouillard (Fuzzi et al., 1997).

Pour les prélèvements, un des impacteurs à gouttelettes dont disposait déjà le LaMP pouvait être utilisé, dans la mesure où il était stérilisable par autoclave et que d'autres équipes travaillant sur le même sujet (notamment celle de Sattler en Autriche) utilisaient du matériel similaire avec succès. **Pour les analyses**, il était premièrement inconcevable de ne pas dénombrer les cellules. Ensuite, des micro-organismes devaient aussi être récupérés par culture pour des investigations de laboratoire concernant leur métabolisme. Une étude moléculaire serait aussi réalisée (T-RFLP) pour déterminer la structure de la communauté microbienne. Enfin les cinétiques des tests de biodégradation mettant en jeu les souches isolées seraient suivies par spectroscopie par RMN ^{1}H. Ces différents points du protocole sont abordés de façon plus détaillée dans la suite de cette section.

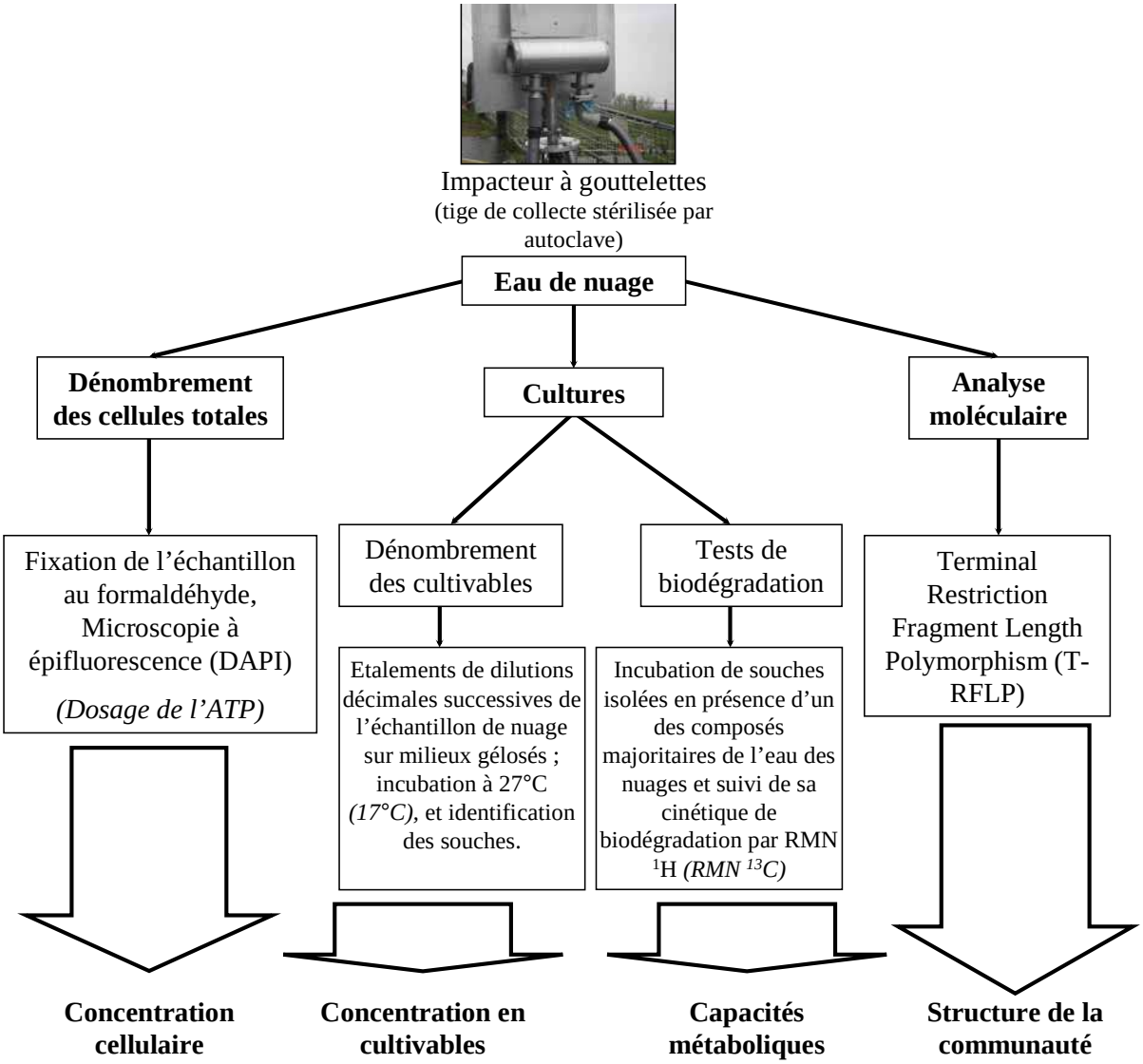


Figure 46 : Méthodes choisies en 2003 pour l'analyse microbiologique des nuages. Entre parenthèses et en italique sont indiquées les améliorations majeures apportées au protocole défini au départ.

I.1.b.(i) Gestion de l'échantillon

En raison de l'absence d'équipement de microbiologie dans l'Observatoire du puy de Dôme, les différents échantillons d'un même évènement sont rassemblés et ramenés au laboratoire. Là, le volume est réparti entre les différentes analyses. Plus tard, les manipulations sont réalisées sur le site de prélèvement en considérant chaque prélèvement d'un même évènement de manière indépendante.

I.1.b.(ii) Dénombrement des cellules totales

La microscopie à épifluorescence a rapidement été retenue pour déterminer la concentration en cellules totales dans l'eau de nuage. C'est une méthode très utilisée dans l'analyse d'échantillons environnementaux, et la filtration d'eau de nuage est facile tant la charge particulaire est faible (comparée à celle d'un lac). Le choix du fluorochrome s'est orienté vers le DAPI, car il représente LA référence en microscopie à épifluorescence. Il est également utilisé par des équipes comme celle de Bauer et celle de Sattler, dont les travaux comptent parmi nos références les plus pertinentes.

I.1.b.(iii) Cultures

Pour le dénombrement des cultivables, la méthode classique d'**étalements** de 0,1 mL de dilutions successives de l'échantillon **sur milieux gélosés** est sélectionnée. Dans la crainte de ne récupérer que très peu de colonies, un volume de 1 mL est également étalé après mélange avec de la gélose. Après incubation à 27°C, les micro-organismes cultivés sur milieux TSA pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons, sont comptés pour estimer leur concentration dans l'échantillon, et isolés pour subir les investigations métaboliques vouées à évaluer leur implication dans la chimie du nuage. Ces milieux de culture étaient couramment utilisés au laboratoire. Les manipulations de mise en culture sont réalisées au laboratoire, sous hotte à flux laminaire, quelques heures après le prélèvement de nuage. Par la suite, d'autres milieux seront aussi considérés et incubés à 17°C.

I.1.b.(iv) Identification des souches

Au commencement de l'étude, des essais d'identifications des souches isolées basées sur des tests physiologiques et métaboliques (coloration de Gram, présence de catalase, de monooxygénase, culture sur différents milieux, galeries API…) ont été tentés. Mais il est rapidement apparu que des souches environnementales étaient difficilement identifiables par de telles méthodes, dans la mesure où la connaissance des propriétés métaboliques des souches se limite à peu près à des souches d'intérêt médical. De plus, la méthode laisse toujours un doute quant à l'identification déterminée. Le **séquençage de la séquence ADN codant pour l'ARNr 16S** a donc été employé dès le second échantillon pour identifier les bactéries. La méthode permet de comparer la séquence avec celles contenues dans les bases de données et d'en déduire l'affiliation taxonomique avec fiabilité. De plus, c'est une technique moderne couramment utilisée et finalement incontournable. Les manipulations correspondantes ont été réalisées avec le matériel de l'INRA de Clermont-ferrand-Theix.

Concernant l'identification des champignons, elle est confiée à un laboratoire indépendant spécialisé (CBS), en Hollande.

I.1.b.(v) Tests de biodégradation

S'intéresser au métabolisme de souches isolées était une des compétences de l'équipe, au Laboratoire. Il s'agit de mettre des cellules cultivées en présence du composé à dégrader dans un milieu ou aucun autre nutriment n'est présent. La dégradation est suivie par **RMN ^{1}H**, qui

est utilisée en routine au Laboratoire. C'est une technique quantitative qui permet de doser et d'identifier sans à priori les composés dégradés et les métabolites produits. La dégradation d'acides carboxyliques présents en quantités relativement importante dans les nuages (acétate, formiate et lactate) est étudiée, ainsi que celle d'un mélange commercial de formaldéhyde et de méthanol.

I.1.b.(vi) Analyse moléculaire

La structure de la communauté microbienne est obtenue par Terminal Length Fragment Polymorphism (**T-RFLP**). Dans cette méthode quantitative, l'ADN bactérien total contenu dans l'échantillon est digéré enzymatiquement et la longueur des fragments correspondant aux extrémités détermine un groupe taxonomique donné (Operational Taxonomic Unit, OTU). Une empreinte globale de la communauté bactérienne est ainsi obtenue et peut être comparée d'un échantillon à un autre. Cette analyse est réalisée au Laboratoire de Biologie des Protistes (**LBP**), dans l'équipe de Didier Debroas.

L'analyse moléculaire est abandonnée dès le second échantillon pour des raisons évoquées plus loin.

I.2. Premiers résultats

Deux prélèvements ont été réalisés, respectivement les **4 et 6 mars 2003**, et analysés selon le protocole défini. Pour les manipulations sur le terrain, la présence d'Angela Marinoni, en fin de thèse, a permis de « prendre contact » avec le fonctionnement des impacteurs et des différents instruments installés au puy de Dôme.

Les résultats obtenus lors de mon stage de DEA et de ceux de maîtrise et de DEA de Matthieu Ménager ont été publiés (Amato et al., 2005) dans ***Atmospheric Environment* n°39, p 4143-4153**. Ils concernent la description du contenu microbien des 2 premiers échantillons et l'étude de biodégradation menée sur les bactéries isolées par culture. Il est rappelé qu'il s'agit des **résultats préliminaires** obtenus en vue d'apprécier quelle pourrait être l'implication de la présence d'une vie éventuelle dans les nuages.

I.2.a) Problèmes rencontrés

Les premiers résultats ont levé l'appréhension de ne « rien » trouver dans l'eau des nuages. Les échantillons contiennent des cellules en nombre suffisant pour les dénombrer, et des micro-organismes cultivables sont même présents. Ce test de faisabilité est donc un succès, même si certains problèmes ont été rencontrés :

- D'abord, **l'analyse moléculaire** (T-RFLP) nécessite un grand volume d'échantillon, et la représentativité des résultats est douteuse dans la mesure où 2 réactions de PCR sont nécessaires pour obtenir une quantité d'ADN suffisante, ce qui peut provoquer un biais important dû à l'amplification différentielle suivant le groupe bactérien considéré. Cette analyse n'a donc été réalisée que sur le premier échantillon et n'a pas été traitée.
- Ensuite, comme précisé dans la partie précédente, **l'identification des bactéries** par des tests métaboliques n'a pas été concluante, et une méthode génétique a très tôt été préférée.
- Enfin, un des problèmes majeurs a été celui de la **quantification du formaldéhyde** dans les tests de biodégradation : la RMN ^{1}H ne permet pas sa détection, son pic étant masqué par celui de l'eau. L'analyseur de formaldéhyde du LaMP Aerolaser AL4021, utilisé pour doser ce composé dans l'eau de nuage, a donc finalement été choisi en remplacement.

I.2.b) Résumé et commentaires

Les résultats des analyses microbiologiques (cellules totales et cultivables) de l'eau des nuages échantillonnée (évènements du 4 et du 6 mars 2003) sont exposés dans cette publication, ainsi que les principales caractéristiques physico-chimiques, températures et pH, et les rétrotrajectoires. Les dénombrements des cellules totales ont permis d'estimer à environ **1 x 10^5 cellules mL^{-1}** (3 x 10^4 cellules m^{-3} de nuage) la charge microbienne de l'eau des nuages. **Les bactéries cultivables à 27°C représentent environ 1 %** de cette valeur de concentration. La diversité apparaît comme importante, même si seul le contenu cultivable est identifié : des représentants bactériens gram-positifs et gram-négatifs appartenant respectivement aux phyla Actinobacteria et Firmicutes et Bacteroidetes, Beta- et Gamma-Proteobacteria sont présents. Les souches concernent les genres *Bacillus*, *Streptomyces*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Clavibacter*, *Pseudomonas*, *Kocuria* et *Arthrobacter*. Diverses espèces de champignons ont également été isolées et déterminées, parmi lesquels on retrouve des Ascomycètes et des Basidiomycètes.

La confrontation des paramètres microbiologiques et physico-chimiques semblent montrer que **l'acidité du milieu est liée à une diminution du nombre de cellules cultivables** non sporulantes. Fuzzi et al. (1997) ont observé un fait similaire dans le brouillard de la vallée du Pô. Cela conduit à penser que le milieu représenté par les gouttelettes de nuage peut constituer un facteur de sélection pour les micro-organismes. Cette sélectivité serait donc en grande partie induite par la pollution anthropique, ce qui pourrait finalement nuire à la dissémination des micro-organismes par l'air.

D'un autre coté, l'hypothèse de l'implication des cellules actives (puisque cultivables) dans la chimie du milieu est introduite. Les tests de biodégradation ont été réalisés, mettant en jeu des cultures pures des bactéries en présence d'un composé présent dans l'eau des nuages. Les analyses réalisées par RMN ^1H montrent que lorsqu'elles sont placées dans des conditions optimales, les **souches isolées sont capables de dégrader des composés organiques** comme le formiate, l'acétate, le lactate, le méthanol et le formaldéhyde. Si l'on considère en parallèle les travaux de Sattler et al. (2001) relatant une activité des micro-organismes dans l'eau des nuages à 0°C, des perspectives intéressantes sont envisageables à la suite de ces premières investigations.

I.2.c) Publication

Amato P., Ménager M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. & Delort A-M. (2005). Microbial community in cloud water at the Puy de Dôme: implication for the chemistry of clouds. *Atmospheric Environment* 39, 4143-4153.

I.3. Conclusion et perspectives à la suite de ces premiers résultats

Ces premiers résultats sont très encourageants pour le devenir de l'étude, à plusieurs niveaux. (i) Premièrement, **des micro-organismes vivants et cultivables ont pu être isolés** par culture de l'eau des nuages, et sont donc disponibles à des investigations de laboratoire. (ii) Ensuite, la structure de cette population cultivable varie et semble être influencée par les caractéristiques physico-chimiques de façon significative et **l'influence anthropique pourrait jouer un rôle important**. (iii) Enfin, la capacité de bactéries à priori actives dans les gouttelettes à dégrader des composés atmosphériques majeurs permet de parler **d'implication « potentielle » de la microbiologie dans la chimie** en phase aqueuse des nuages. Expérimentalement, la faisabilité est établie, mais l'**allégement du protocole** est nécessaire pour permettre l'analyse d'échantillons avec un pas de temps compatible avec l'ORE et avec nos moyens humains : aucune analyse moléculaire ne sera donc réalisée.

Des perspectives à plus long terme peuvent être envisagées à la suite de ces premières investigations : afin de s'intéresser spécifiquement à des souches qui pourraient être actives dans les nuages, des **milieux de culture supplémentaires**, oligotrophes, seront utilisés ; **l'activité devra aussi être mesurée** *in situ*, dans l'eau de nuage ; enfin, la nécessité de **se rapprocher des conditions rencontrées dans les nuages**, d'effectuer des cultures et des tests de biodégradations à une température inférieure à la température ambiante apparaît comme une évidence. Du matériel adapté est donc acquis par le laboratoire, et une étude de plus grande envergure peut débuter.

II. INFLUENCES DES FACTEURS ABIOTIQUES SUR LE CONTENU MICROBIEN DES NUAGES COLLECTES AU SOMMET DU PUY DE DOME

II.1. Introduction

Entre décembre 2003 et octobre 2005, 16 évènements nuageux ont pu être échantillonnés, sans périodicité particulière, mais cela correspond à une fréquence moyenne de 1 prélèvement toutes les 5 à 6 semaines durant cette période. On peut donc considérer que l'objectif de départ, fixé à un prélèvement par mois, n'est clairement pas atteint, mais le rythme reste soutenu. L'analyse des échantillons et le traitement des données ont permis de mettre en évidence différents facteurs pouvant expliquer les variations du contenu microbien global. Les résultats présentés ici correspondent donc à l'ensemble des données environnementales (météorologiques, chimiques et microbiologiques) collectées au cours de cette thèse. Nous nous sommes ici spécialement intéressés aux variations de ces différents paramètres pour détecter les éventuelles corrélations qui pourraient exister, ainsi qu'aux paramètres temporels et à l'origine géographique des masses d'air par tracés de rétrotrajectoires. L'ensemble des données brutes est présenté en annexe2.

Tout en conservant la possibilité de comparer les échantillons entre eux, des perfectionnements du protocole utilisé l'ont fait évoluer le long de ces 16 prélèvements (voir annexe 1 pour les protocoles détaillés et leur évolution). Pour le premier de ces prélèvements, il m'est incombé seul la tâche d'effectuer les mesures chimiques et microbiologiques. Car il faut signaler que la thèse devait au départ prendre en considération les deux aspects simultanément. Ensuite, Marius Parazols a pris en charge l'ensemble des analyses chimiques, d'abord en stage de DEA CPCA entre janvier et juin 2004, puis en thèse à partir de septembre 2004. Dès janvier 2004, les champignons, en plus des bactéries, ont été dénombrés en microscopie à épifluorescence. Plus tard, concernant la chimie, les mesures de conductivité et le potentiel rédox ont débuté, puis les analyses par chromatographie ionique ont permis de déterminer les contenus anionique et cationique de l'eau de nuage à partir de septembre 2004. Pour la microbiologie, la concentration en ATP est mesurée depuis novembre 2004. Enfin, pour les quatre derniers prélèvements, l'évènement nuageux prélevé a été suivi microbiologiquement, par réalisation de cultures et comptage des cellules totales à chaque relevé d'impacteur (toutes les 2 heures environ), pendant des périodes s'étalant sur plus de 12 heures (rappelons qu'au départ, l'ensemble des prélèvements étaient rassemblés avant analyse).

II.2. Principaux résultats

Les principaux facteurs de variations et les corrélations identifiées entre les paramètres microbiologiques (concentrations en cellules totales et en cellules cultivées à 27°C et à 17°C, [ATP]) et les paramètres abiotiques ont fait l'objet de l'article à soumettre présenté ici. En complément, les différents aspects non traités, ou seulement évoqués, sont détaillés à la suite.

II.2.a) Remarques et commentaires

Les 14 échantillons collectés à partir de janvier 2004 (échantillons numérotés **5** à **22** inclus) ont été pris en compte lors de cette analyse, correspondant aux échantillons avec cultures à 15°C et dénombrements des champignons totaux par microscopie à épifluorescence. L'ATP est dosé depuis l'échantillon n°**15** (17 novembre 2004).

Il faut aussi préciser que les isolements de souches et leur identification n'ont été réalisés que jusqu'au prélèvement n°**14**, dans la mesure où un grand nombre de souches (plus de 100)

avaient déjà pu être récupérées. Les analyses prenant en compte ce paramètre sont donc limitées, mais une tendance saisonnière d'augmentation du nombre de Gram-négatifs durant la saison chaude est pourtant détectée. Elle est introduite dans la partie III de ce chapitre (publication dans *FEMS* décrivant les souches).

Quelques remarques préliminaires doivent être apportées avant de s'intéresser plus largement aux résultats obtenus. D'abord, la teneur en eau liquide (**LWC**) n'est disponible que pour 4 des 14 échantillons collectés (problèmes de givre, entre autres) et n'est donc jamais prise en considération. Elle est utilisée pour ramener une valeur de concentration mesurée dans l'eau à un volume de nuage (air + eau) et permet donc de s'affranchir des phénomènes de dilution/concentration. Dans un autre registre, les dénombrements des cellules totales par microscopie, sur filtres, n'ont pas permis d'observer d'**agglomérats cellulaires** spécialement nombreux. Même si quelques-uns ont pu être vus, il ne s'agit pas de la majorité des cellules comptées. Il est pourtant souvent question dans la littérature de l'association des bactéries entre elles ou avec des particules dans l'air (voir la synthèse bibliographique), mais cela n'est pas apparu dans l'eau des nuages. Il est très probable que les cellules se dissocient de la particule ou des autres cellules au moment de la formation de la gouttelette, qui dissout une grande partie de la masse de l'aérosol. Les micro-organismes se retrouvent alors en solution dans la gouttelette de nuage.

II.2.b) résumé

Une grande variété de nuages a pu être échantillonnée au cours de ces 2 ans. Le pH moyen est de 5,6, variant entre 3,2 et 7,0. La conductivité et le potentiel rédox varient également beaucoup, avec des valeur maximales logiquement mesurées dans les évènements les plus anthropisés (respectivement 325 µS cm^{-1} et 358 mV (E_0 de l'électrode de référence = 0,4 V). Des nuages ont été échantillonnés par flux d'ouest le plus souvent, avec quelques évènements de nord et nord-est, donc pour lesquels la masse d'air a traversé une vaste zone continentale industrialisée avant d'atteindre le puy de Dôme (région de la Ruhr et nord de la France).

Les paramètres microbiologiques suivant ont été analysés de façon conjointe avec les caractéristiques physico-chimiques :

- Concentration en cellules bactériennes totales
- Concentration en cellules fongiques totales
- Concentration en bactéries aérobies cultivées à 27°C et à 15°C
- Concentration en champignons et levures aérobies cultivés à 27°C et à 15°C
- Concentration en ATP

….Et grandeurs dérivées de ces mesures

Les résultats principaux sont présentés dans la publication, et les données sont présentes en annexe 2.

En résumé, des concentrations variant entre 1,7 x 10^4 et 2,4 x 10^5 cellules mL^{-1} (médiane à 8,1 x 10^4 mL^{-1}) pour les bactéries et 8,9 x 10^2 et 2,5 x 10^4 cellules mL^{-1} (médiane à 4,8 x 10^3 mL^{-1}) pour les champignons sont trouvées. Les observations microscopiques montrent des cellules libres la plupart du temps, alors qu'elles sont connues pour être associées à des particules hors nuage. Si plus de 10% des cellules fongiques sont classiquement retrouvées par méthodes culturales (environ 600 CFU mL^{-1}), moins de 1% de bactéries le sont (environ 100 CFU mL^{-1}), que ce soit à 15°C ou à 27°C, malgré l'utilisation d'un milieu adressé aux micro-organismes stressés. Pourtant, les mesures d'ATP laissent fortement supposer que la majorité d'entre elles sont actives, donc dans un état VBNC vraisemblable.

D'importantes variations sont observées pour l'ensemble des paramètres microbiologiques considérés, mais ceux impliquant les bactéries varient de façon indépendante de ceux prenant en compte les champignons. Les paramètres météorologiques locaux n'expliquent pas ces variations, et une contamination locale semble donc à exclure. Un effet de la saison est par contre détecté, avec une augmentation pendant la période chaude de l'année. Ceci est surtout vrai en ce qui concerne les cultivables, plus particulièrement les champignons et levures. Ces tendances sont en accord avec la littérature portant sur les aérosols, mais aucune donnée comparable n'existe à propos des nuages. Concernant la concentration en bactéries totales, elle apparaît surtout beaucoup plus variable en été que le reste de l'année, mais là non plus, rien n'est comparable à notre étude. Par ailleurs, le nombre de micro-organismes capables de se développer à 15°C, par rapport à ceux retrouvés à 27°C augmente pendant la période froide, même si leur nombre absolu reste inférieur à celui observé en été. Cela suggère que les micro-organismes tolérant le froid sont relativement favorisés en hiver, sans que l'on puisse déterminer s'il s'agit ou non d'un effet de source.

Une importante relation entre le contenu (qualitatif) microbien de l'eau des nuages et sa composition chimique est mise en évidence. En effet, la concentration en micro-organismes augmente avec **la concentration en ions Na^+** dans le milieu, qui elle-même augmente avec l'influence océanique sur la masse d'air échantillonnée. Une contribution microbiologique importante de la source océanique semble donc être observée, mais des résultats contraires sont généralement observés par temps clair. Il s'agit donc vraisemblablement d'une intégration préférentielle des micro-organismes de source océanique dans les nuages, d'autant que plusieurs faits supportent cette idée :

(i) Les surfaces liquides émettent, par le phénomène de bullage, des gouttelettes plus concentrées en micro-organismes que le milieu liquide lui-même

(ii) L'océan peut représenter une source de bactéries, mais aussi de champignons

(iii) L'océan émet de grosses particules, qui en plus sont très hygroscopiques et donc très souvent recouvertes d'une fine pellicule d'eau liquide qui pourrait protéger les micro-organismes de la dessiccation et du choc osmotique lors de la formation de la gouttelette de nuage

(iv) Cela expliquerait enfin que les cellules ne soient pas associées à des particules dans l'eau de nuage, dans la mesure où une grande partie des particules émises par l'océan est soluble

Enfin, la concentration en bactéries totales diminue fortement lors d'épisodes anthropogéniques, comme l'attestent **les mesures du pH** ou du potentiel rédox, notamment. Il pourrait s'agir d'un effet de source, puisque cette corrélation s'applique avec les cellules totales, mais pas avec les bactéries cultivables. Cependant, l'hypothèse d'une toxicité éventuelle du nuage liée à sa « pollution » n'est pas exclure, car il pourrait influer sur la capacité des cellules à se multiplier DANS le nuage (même les VBNC), et donc finalement conduire à une baisse relative de leur abondance totale sans jouer sur celui de cultivables.

II.2.c) Publication

Amato P., Parazols M., Sancelme M., Mailhot G., Laj P. & Delort A-M. (Soumis en décembre 2006). An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the puy de Dôme (France). ***Atmospheric Environment*.**

An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the puy de Dôme (France)

Pierre Amato[a, b], Marius Parazols[b, c], Martine Sancelme[a], Gilles Mailhot[c], Paolo Laj[b], and Anne-Marie Delort[a*]

[a]Laboratoire de Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique, UMR 6504 CNRS- Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France.
[b]Laboratoire de Météorologie Physique, UMR 6016 CNRS- Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France
[c]Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire, UMR 6505 CNRS- Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France.

*Corresponding author: Tel 00 33 473 40 77 14; Fax: 00 33 473 40 77 17
E-mail address: A-marie.Delort@univ-bpclermont.fr

Keywords: cloud water, bacteria, fungi, ATP, season, air masses, atmospheric pollution.

Abstract

A description of the microbial content of cloud water based on samples collected along an almost years period is presented. Cloud water from fourteen events was sampled at the puy de Dôme summit (1465m a.s.l). Total bacterial and fungal cells were about respectively 8.1 x 10^4 mL^{-1} and 5.9 x 10^3 mL^{-1}, with more than 10% of the fungi but less than 1% of bacteria recovered by cultivation at 15°C or 27°C. However, ATP concentration of about 0.40 pmol mL^{-1} shows that a large majority of cells are likely viable but not cultivable (VBNC) and remain alive in clouds. A high variability is noticed, and local meteorological variations are not involved. A seasonal effect is shown, with a general increase in cultivable microorganism number and of total fungal cell concentration during summer and autumn. Moreover, psychrotolerant microorganisms, respect to those growing only at 27°C, are more numerous during winter. The number of microorganisms (total and cultivable) was clearly linked to the chemical composition of cloud water: an increase with increasing oceanic contribution is pointed, and bacteria number decreases with increasing anthropic influence. A preferential integration of micro-organisms emitted by the ocean in cloud droplets compared to micro-organisms from other sources is likely to occur, making of the ocean a major source for micro-organisms of clouds. It also suggests that the toxicity of polluted cloud water could disturb an eventual multiplication of cells in atmospheric droplets.

1. Introduction

Among the aerosol particles present in the atmosphere, numbers of micro-organisms likely released by ground sources can be found. They can be transported over long distances (Bovallius et al. 1978a) and are even retrieved in the mesosphere, as high as at 77 km from the Earth surface (Imshenetsky et al., 1978). Their presence in free atmosphere, in particular in the aqueous phase of tropospheric clouds, is notable for many reasons: first, they can serve as efficient cloud condensation nuclei or ice nuclei (Szyrmer and Zawadski, 1997; Cochet and Widehem, 2000) and could thus have an influence on cloud formations and developments; second, they are suspected to play a role in the chemical composition of atmosphere by contributing, in cloud water, to the degradation of compounds related to human activities (Ariya et al. 2002, Amato et al., 2005). Dissemination of microorganisms in the air has therefore many ecological, meteorological and climatic implications but is also of public health concern as shown by recent problems related to the presence of *legionella* in urban environments and also safety concern with their potential role in bioterrorism.
Bacterial and fungal cells are present, respectively in concentrations of about ~10^4 and ~10^3 cells m^{-3} in a remote site under background atmospheric conditions (Katial et al., 1997; Bauer et al., 2002a; Harrison et al., 2004). About ~10^2 of these total cells can be retrieved by aerobic cultivation, for both bacteria and fungi (Shaffer & Lighthart, 1997; Di Giorgio et al., 1996). It is well assumed that airborne micro-organisms are less numerous at high altitude than close to the ground. The relative contribution of bacteria (respect to fungal cells) increases with altitude (Fulton, 1966a; 1966b) likely due to their smaller size and consequent lower settlement velocity (Shaffer and Lighthart, 1997; Jones and Harrison, 2004). The values of concentrations are highly variable in a given site, and many factors had been identified to be involved in the fluctuations observed. The period of the year seems to be the most important of them, and an increase during the warm season was shown in several studies (Bovallius et al., 1978b; Di Giorgio et al., 1996; Jones and Cookson, 1983; Katial et al., 1997). The existence of a diurnal cycle, with a maximum around midday, was also reported (Lighthart and Shaffer, 1995; Lighthart, 1999). In addition, urban-influenced air masses carry generally more bacteria than rural and coastal ones (Bovallius et al., 1978b; Fulton and Mitchell, 1966; Di Giorgio et al., 1996; Shaffer and Lighthart, 1997). A negative link between the anthropic influence on air masses and their quantitative content in micro-organisms was observed (Mancinelli & Shulls, 1978), and clearly occurs in fog droplets, as shown by Fuzzi and collaborators (1997).
A common feature of all these studies is the fact that they were performed under conditions free of liquid water; we focused for our part on tropospheric clouds, for which only a few data are available and no long term study is yet reported. We present results from a 21 months survey of the microbiological communities in cloud droplets. Many parameters are taken in consideration, confronting quantitative contents in total and cultivable cells for bacteria and fungi, ATP measurements and temporal, meteorological and physico chemical factors.

2. Material and methods

2.1 Sampling site and cloud water collection

Cloud water sampling was performed using a cloud droplets impactor, following the same procedure as described in Amato et al. (2005). The sampling site was based on the puy de Dôme summit (1465 m a.s.l., approximately 45°N, 2°E, France), where a strongly instrumented station for atmospheric observations and researches is installed. Clouds were randomly sampled, when they occurred on the summit, all along the year but without periodicity. For each event, several samples were successively collected and volumes of about

50 mL were brought back every two hours, dispatched and treated in situ for the further analyses. Properties of air masses (origin and physico-chemical parameters) were recorded continuously and simultaneously to the sampling time by the Observatory station.

2.2 Physico-chemical parameters

Various chemical characteristics were considered, from water collected with a specifically dedicated sampling device similar to the one used for microbiological analyses. Many parameters were measured in situ, including pH, conductivity and redox potential (electrodes). Remaining volumes were kept frozen until analyses of the ionic and carbonaceous contents. Ions were measured by ionic chromatography (Dionex DX320, column AS11 for anions; Dionex ICS1500, column CS16 for cations), while total, total organic and total inorganic carbon concentrations were determined using a dedicated device (Shimadzu TOC5050A).

2.3 Total cell counts

Known volumes (from 5 to 15 mL) of collected cloud water were immediately fixed by equal volumes of pre-filtered (0.2 µm, sterile Millipore filters) 4-5% formaldehyde. Triplicates, when sample volumes were sufficient, or at least duplicates were made. The obtained solutions were kept cold (but not frozen) until further analysis (less than a week later). Total cell counts were performed from filtered samples (black GTBP 0.22 µm filters (Millipore)), after being incubated 20 minutes in the dark and in the presence of 2.5 µg mL^{-1} of 4', 6-diamino-2-phenylindole (DAPI), a DNA specific fluorochrome (Porter and Feig, 1980). Filters were mounted on slides to be observed under epifluorescence microscopy (Olympus BH-2). Fungi and yeasts, and bacteria were counted respectively under objectives x40 and x100. Cell numbers present on random fields were extrapolated to estimate their concentration in each sample (e.g. 30 fields for fungal cells and 50 for bacteria). Uncertainty on cell concentration vault about 30% of the mean count, as determined from replicates (at 95% confidence) for both bacteria and fungi.

2.4 Cultivable micro-organisms counts

Aerobic fraction of cultivable micro-organisms was measured by plating samples on nutrient media: R2A medium for bacteria (Reasoner and Geldreich, 1983; Difco) and Sabouraud medium (Difco) for fungi. This was performed directly on sampling site to avoid any problems of loss of cultivability caused by storage. Colonies formed after 5 days at 27°C and at 15°C were counted. Even if these temperatures are higher than those found in clouds (our maximal sampling temperature is 9.7°C), 15°C is used to distinguish the fraction of psychrophilic, or at least psychrotolerant microorganisms, from those unable to grow at relatively low temperature (undetected at 27°C). Triplicates were made for every kind of medium at each temperature.

2.5 Determination of ATP concentration

A small volume of each sample (0.4 mL) was strongly mixed in a microtube with a same of extractant B/S from the ATP measurement kit used (ATP Biomass Kit HS, Biothema) and stored frozen until further analysis. ATP levels were determined by bioluminescence (its reaction with D-luciferin and luciferase produces photons proportionally to ATP) (Stanly and Williams, 1969), and the amount of light emitted from 0.1 or 0.2 mL of the mix (sample plus extractant) was measured using a Biolumineter (Lumac Biocounter M2500).

3. Results and discussion

3.1. Microbial concentration and ATP measurements

Microbial concentration:

Values of bacterial and fungal concentrations are summarized in **Table 1**, for total and cultivable cells (27°C and 15°C). Data do not follow a Gaussian distribution, and as a consequence median is a better describing parameter than mean. The former falls in the lower range of values observed, and so is likely corresponding to the background levels in cloud water at the puy de Dôme site: 8.1 x 10^4 bacterial cells and 4.8 x 10^3 fungal cells mL^{-1} of cloud water in median (means are respectively 10.2 ± 3.7 x 10^4 mL^{-1} for bacteria and 7.47 ± 4.14 x 10^3 mL^{-1} for fungal cells). We can note that bacterial cells are more than one order of magnitude more numerous than fungal cells, but their concentration appears to be 2 fold less variable, with min:max ratios of about 1:15 and 1:30. Furthermore, concentrations of the two types of cells do not vary in parallel, with a Pearson correlation coefficient r^2 very close to zero (precisely 5 x10^{-5}, n = 14), testifying to the existence of different influencing factors for each of them.

		Bacteria	**Fungi and Yeasts**
Total cells ($N\ mL^{-1}$)	Median	8.1 x10^4	4.8 x10^3
	25-percentile	6.1 x10^4	3.1 x10^3
	75-percentile	1.3 x10^5	8.1 x10^3
	Min	*1.7 x10^4*	*8.9 x10^2*
	Max	*2.4 x10^5*	*2.5 x10^4*
Cultivable cells at 27°C ($N\ mL^{-1}$)	Median	100	673
	25-percentile	38	481
	75-percentile	301	1302
	Min	*0*	*20*
	Max	*513*	*3000*
Cultivable cells at 15°C ($N\ mL^{-1}$)	Median	112	590
	25-percentile	28	413
	75-percentile	180	980
	Min	*3*	*10*
	Max	*373*	*1671*
Proportion of cultivable cells at 27°C ($N\ mL^{-1}$)	Median	0,20 %	13,81 %
	25-percentile	0,05 %	6,56 %
	75-percentile	0,33 %	24,86 %
	Min	*0,00 %*	*1,32 %*
	Max	*1,03 %*	*36,09 %*
Proportion of cultivable cells at 15°C ($N\ mL^{-1}$)	Median	0,15 %	9,87 %
	25-percentile	0.02 %	5.29 %
	75-percentile	0,23 %	15,39 %
	Min	*0,00 %*	*0,12 %*
	Max	*0,84 %*	*40,94 %*

Table 1: Global microbiological characteristics of cloud water sampled at the puy de Dôme. These values are obtained regarding all the 14 cloud events collected, without any classification.

Total bacteria concentration is comparable to what we previously observed at the puy de Dôme (1465 m) (1 x 10^5 cells mL^{-1}) (Amato et al., 2005). It is slightly more than concentrations found at 1644 m in the Austrian Alps by Bauer et al. (2002a), of 2.0 10^4 cells .mL^{-1}. As it is observed in free-of-cloud atmosphere, cloud water collected at higher altitude (3106 m) is less loaded in bacteria (1.5 x10^3 bacteria mL^{-1}) (Sattler et al., 2001). Concerning fungal spores, our results are very close to those reported by Bauer et al (2002a), of 5.9 10^3 cells mL^{-1}. The proportion of fungal cells, respect to bacteria, that is observed at the puy de Dôme is thus lower than in the Alpine site, but the high variability we observe limits

the comparison. Such variability was described in another relevant environmental study about airborne fungal cells (Katial et al., 1997).
Considering mean values of 17 fg C $cell^{-1}$ for bacteria (Sattler et al., 2001) and 13 pg C $cell^{-1}$ for fungi (Bauer et al., 2002b), the total micro-organisms represent in our samples about 64 ng mL^{-1} of organic carbon (OC), corresponding to 2.3 % of the total OC measured. Though they are less numerous, fungal spores are responsible of almost all the contribution in carbon (62.6 ng C mL^{-1}, 2.25 % of the total OC). Bacteria represent less than 1.4 ng C mL^{-1}, only 0.05 % of the total OC. Our values are in the same range than those published by Bauer et al. (2002a) who found 1.5 % of OC due to fungal spores and 0.01 % due to bacteria in cloud water samples. The slight differences between their percentages and ours attest of a relatively lower total OC content in our case, indicating quite similar remoteness from anthropic sources for the two sites.
Aerobic cultivable bacteria concentrations are very sparse, often lower than the limit generally admitted to allow a relevant count, corresponding to at least 30 colonies per Petri dish. As cultures were performed from volumes of 0.1 mL of cloud water, it indicates that less than 300 CFU mL^{-1} were present in the samples in those cases. Median values obtained are approximately about 100 colony-forming units (CFU) mL^{-1}, so quite similar to results of Bauer et al. (2002a) (about 120 CFU mL^{-1}) who cultured bacteria under the same conditions (27°C and R2A). Incubations at 27°C compared to 15°C lead to more variable counts, with respective maxima of about 510 and 370 CFU mL^{-1} (minima <10 CFU mL^{-1}). Number of colony formed are not under dependence of total bacteria contents, and the cultivable fraction involves a weak fraction of the total number of bacteria determined by microscopy, ranging from about 0% to 1%. As typically observed in outdoor environments, viable but non cultivable (VBNC) cells are certainly present (Kurath & Morita, 1983; Mascher et al., 2000; Bussman et al., 2001). It can be induced by conditions of stress potentially encountered in clouds, like starvation or variations of osmotic pressure.
Concerning cultivable fungi and yeasts, they are relatively much more retrieved by cultivation than bacteria. They are slightly more numerous at 15°C (median of 673 mL^{-1} representing 12.7 % of the total) than at 27°C (590 mL^{-1}, 9.9 % of the total). Means are respectively 686 ± 291 mL^{-1} at 15°C and 889 ± 451 mL^{-1} at 27°C (95%), testifying of the high variability at both temperatures. It also shows that while incubations at 15°C lead generally to a better recovering of fungi, highest values are obtained at 27°C. Conversely to bacteria, their number is closely related to the number of total fungal cells (Pearson $r^2 = 0.8$ at 27°C, $r^2 = 0.56$ at 15°C, n = 14). Consequently, the selection pressure due to abiotic factors for being more or less cultivable appears limited in the case of fungal spores. As a comparison, Bauer et al. (2002a) found an average of 159 CFU mL^{-1} at 25°C in their samples, corresponding to only 3.2 % of the total, and the medium used could be at the origin of this difference.

ATP measurements:
ATP (Adenosine TriPhosphate) which is a key molecule of the energetic cell metabolism was detected in each of the eight cloud water samples analysed, its median concentration value was 0.40 pmol mL^{-} A theoretical concentration of ATP has been calculated considering 3×10^{-6} pmol ATP $bacteria^{-1}$ (Franzen and Binkley, 1961) and 3×10^{-5} pmol ATP fungal $spore^{-1}$ (deducted from Rakotonirainy et al., 2003), applied on total cell counts. Results are shown in **Table 2**, median theoretical values of 0.24 pmol mL^{-1} and 0.12 pmol mL^{-1} were found respectively for bacteria and fungi, giving an estimation of the theoretical ATP value for the total population of 0.37 pmol mL^{-1}. This median value is very close to the measured one (0.40 $pmol.mL^{-1}$). Although these calculations are really approximate, and that an important variability was observed in the different samples (see percentile and extreme values in **Table 2**) they show that most of the cells present in cloud water contain ATP molecules, a clear

signature of active cells. So in spite of the low cultivability of microorganisms isolated from cloud samples, this result suggests that many of then are alive, remaining in a VBNC form. This result is of first importance as it makes the implication of microbial metabolism in cloud chemistry very likely to happen. It is consistent with previous studies demonstrating the capacity of bacteria to live and even be active in cloud water, where they can find the required nutrients (Sattler et al., 2001). To our knowledge the use of ATP measurement is described here for the first time in atmospheric samples. This approach to characterize microbial content of clouds is very informative, easy and rapid, and could be applied in the case of monitoring purposes.

	ATP calculated (pmol mL^{-1})			**ATP measured** (pmol mL^{-1})
	Bacteria	**Fungi & Yeasts**	**Total**	
Median	0.13	0.24	0.37	0.40
25-percentile	0.08	0.22	0.30	0.33
75-percentile	0.16	0.29	0.45	0.78
Min	*0.04*	*0.11*	*0.15*	*0.04*
Max	*0.59*	*0.47*	*1.06*	*2.01*

Table 2: Distribution of ATP concentration measured in 8 distinct cloud samples, and theoretical ATP concentration calculated according to the total cell concentrations.

The main conclusions of this first part of the work are first that micro-organisms are likely to be alive in clouds, and second that bacterial and fungal total counts varied from a sample to another. This latter result highly suggests the implication of abiotic factors on microbial distribution.

3.2 Influence of abiotic factors on the microbial content of clouds

Influence of meteorological factors:

Actually no correlation between microbiological content in clouds and local meteorological recordings, including temperature and wind speed, can be established. If we compare with results reported about airborne microbial content in dry air, some authors described a positive correlation between microbial concentrations and temperature and wind speed (Di Giorgio et al, 1996; Katial et al., 1997) while Harrison et al. (2004) only detected the influence of wind on fungi number. Many other examples could be cited, but their conclusions are very contradictory.

Influence of seasons:

Figure 1 shows seasonal variation of total cells concentrations and cultivable cells recovered by cultivation at 15 °C and 27°C, both for bacteria and fungi. Cloud samples were distributed as follows: 3 events in spring, 2 in summer, 5 in autumn and 4 in winter. These numbers are too low to permit a statistical analysis but a seasonal tendency is observed.

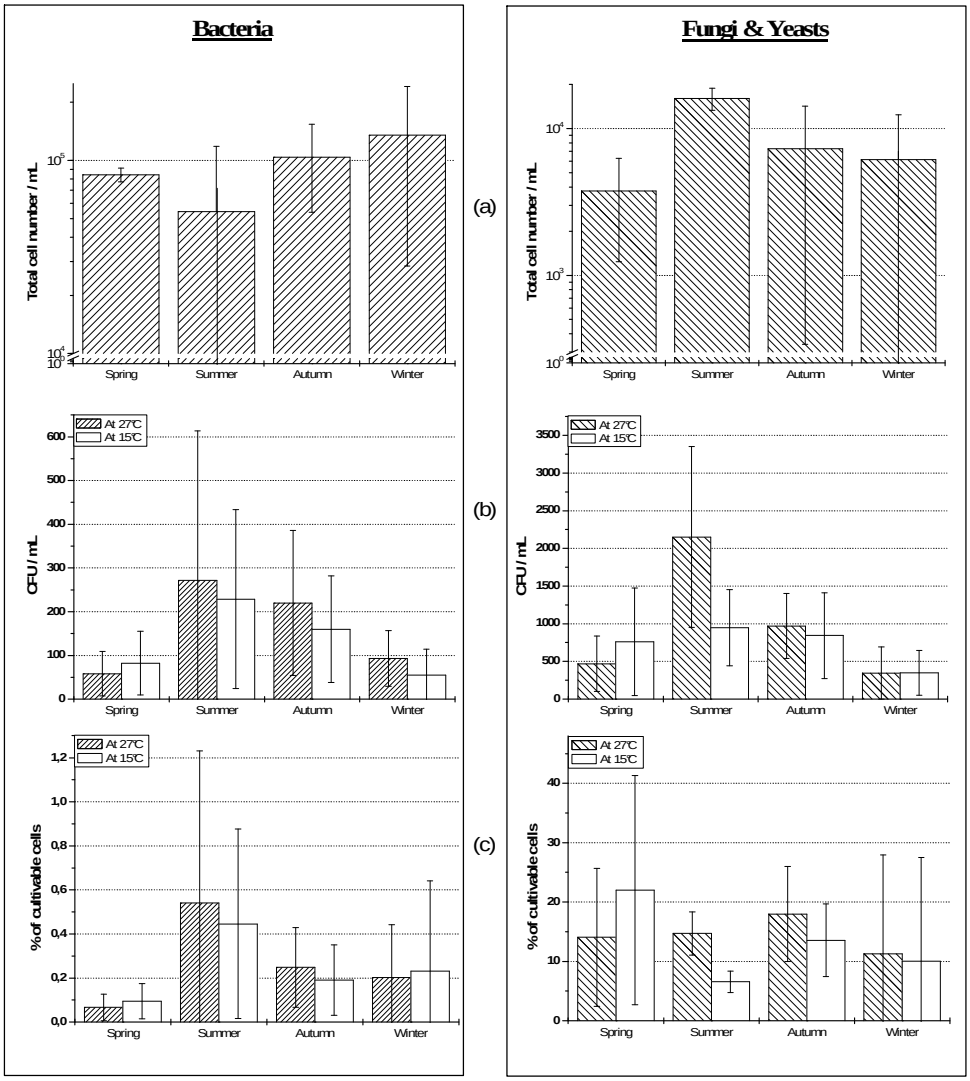


Figure 1: Seasonal variations of bacterial and fungal contents in cloud droplets. (a) Total cell counts; (b) Counts of cultivable at 27°C and 15°C; and (c) Proportion of cultivable cells at the two temperatures investigated. Averages are represented, and error bars correspond to standard deviations.

Surprisingly, the lowest total bacteria concentration was found during summer (**Figure 1a**). However, their cultivability is higher during that season (**Figure 1c**), finally resulting in an increase on cultivable cell concentration (**Figure 1b**). Thus, this cultivability progressively decreases and the lowest concentration was of cultivable cells is found during the coldest period of the year. Winter average temperature at the puy de Dôme is usually lower than 0°C when a cloud occurs. It likely contributes, with the mechanical stress caused by the sampling procedure, to the loss of cultivability of bacteria, making them VBNC. In cloud-free air, similar observations concerning temporal variations of cultivable bacteria number (Wright et al., 1969; Bovallius et al., 1978b; Baxter and Cookson, 1983; Di Giorgio et al., 1996), but no data is available in relation to total bacterial count.

Opposite to bacteria, fungi and yeasts are more numerous during summer than during the rest of the year, regarding to both total (**Figure 1a**) and cultivable concentrations (**Figure 1b**). At this point, we can also note that the season does not affect the fungal cell cultivability (**Figure 1c**), resulting in identical profiles of total and cultivable concentrations. This increase of fungi number during summer is likely linked to emissions by spore releasing, that are known to be generally favoured under warm conditions (Jones and Harrison, 2004, and references therein),

i.e. in summer. Such variations were also observed by Katial et al. (1997) and Di Giorgio et al. (1996) in cloud-free air.

Interestingly, we can observe that the ratio between the numbers of cultivable microorganisms at the two temperatures (15°C *vs*. 27°C) varies with season (**Figure 2**). This value slowly rises from summer to autumn, winter and spring. In other words psychrophilic or psychrotolerant microorganisms growing at 15 °C are favoured during the coldest seasons (spring and winter) compared to mesophiles growing at 27°C. This result suggests that not only the number of cultivable cells is season-dependant (see **Figure 1**) but also the type of microorganisms is different according the seasons. This is in agreement with a recent work (Amato et al., 2007) showing that Gram negative bacteria are mostly abundant in summer, compared to winter. Also the phyla are different in samples collected during these two seasons, for instance the presence of Gamma-Proteobacteria is favoured in summer *vs* winter.

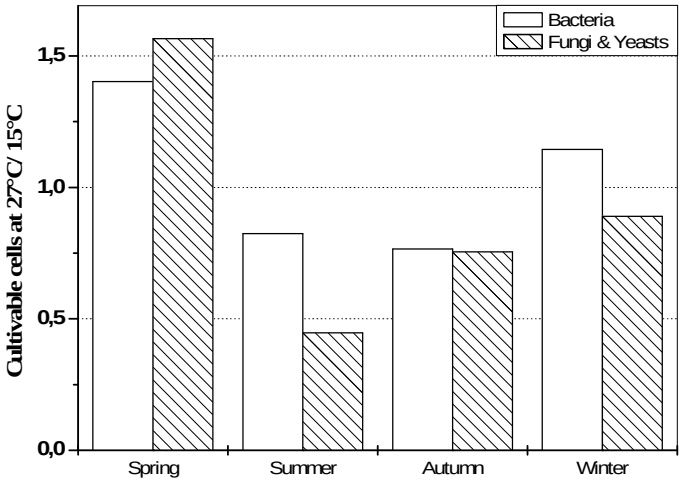


Figure 2: Seasonal variations of the ratio between the proportion of cultivable cells at 15°C and at 27°C for bacteria and fungi and yeasts. Data presented on Figure 1 (c) are used to calculate the ratios.

Links to chemical composition:

In order to investigate any eventual link between the microbial load and the chemical composition of the water phase of clouds, pH, redox potential and conductivity were systematically measured. In addition, 9 out of the 14 cloud events collected, regrouping 26 samples, have been chemically analyzed by ionic chromatography. An acidic pH of cloud water testifies of an anthropic influence (Marinoni et al. 2004), while the Na^+ content constitutes a good marker of the degree of oceanic influence on air masses arriving at the puy de Dôme (the higher is this ratio, the more important is the oceanic influence) (Parazols et al., unpublished data), It is important to note that no overlap is detected between the chemical composition and the factors previously treated, especially the season. Student test confirms it indicating that no difference exists between Na^+ concentration observed during autumn and spring ($p > 0.86$, with ν (1; 22)).

Figure 3 shows relations between the different microbiological parameters and the Na^+ concentration in the cloud water samples. All ionic measurements were carried out on samples collected either in spring or in autumn, except one in winter which is pointed out in the figure. The increase in total bacterial number with the increase of the sodium content is remarkable (**Figure 3a**). Concerning cultivable cells and their proportion on the total bacteria, higher values are also observed in clouds in which the higher oceanic contributions are measured (**Figures 3b and 3c**). The same tendencies are observed for fungi and yeasts, with lower concentrations of total cells when low levels of Na^+ are present (**Figure 3a**). The

number of cultivable cells is also positively affected, but not their proportion on the total fungal cells.

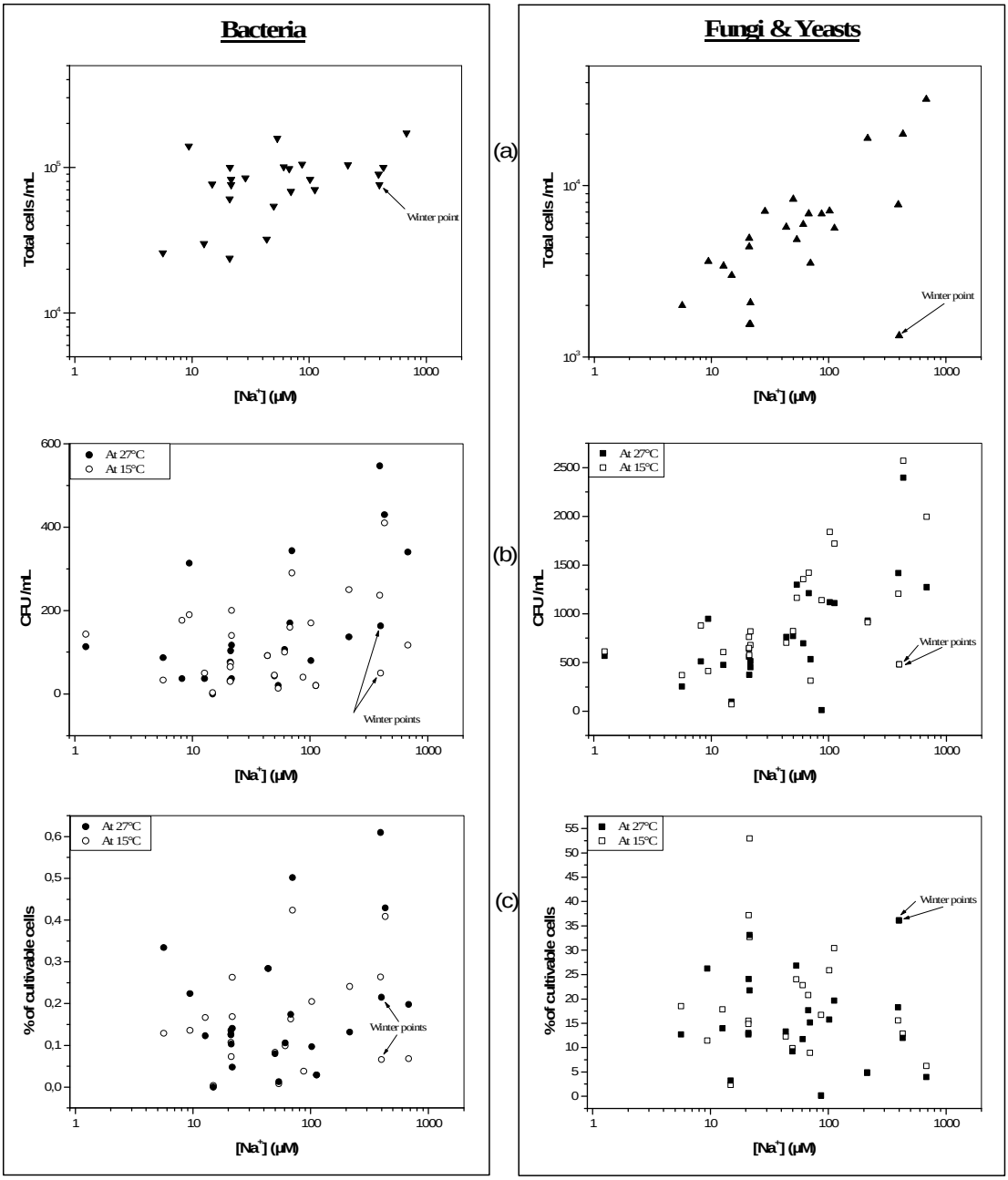


Figure 3: Relation between air masses and Na^+ concentration in cloud water. All data are from spring or autumn samples, apart one winter event which is indicated. (a) Total cell counts; (b) Counts of cultivable; and (c) Proportion of cultivable cells. Results obtained for each of the samples collected for each of the collected events are reported.

This elevated correlation between microbial content of cloud water and the proportion of an ion issued from the ocean is quite surprising compared with previous works on airborne microbial content, which generally tend to conclude to higher values of concentration in continental sites than in coastal ones (Bovallius et al., 1978b; Shaffer & Lighthart, 1997). So it would be expected to find more cells under continental influence. Several causes can be responsible of such a difference. The most probable hypothesis is that sea does not actually emit more microorganisms than land, but implies a concomitant phenomenon: a differential

integration of microorganisms in liquid water, as a function of their ability to act as cloud condensation nuclei (CCN). It would mean that microorganisms of marine origin themselves or associated particles are more efficient to act as CCN than those emitted from other sources, and would be thus preferentially integrated in cloud droplets. As a consequence they would be more numerous than in clouds formed in air masses of continental origins. In addition, airborne microorganisms are carried by large sized aerosols (Shaffer and Lighthart, 1997) as those produced by oceanic sources, also known to represent a source of microorganisms, even of fungi (Prasannarai & Sridhar, 2001). Moreover, it has been demonstrated than micro-organisms were more concentrated in the droplets aerosolised from sea surface than the sea water (Aller et al., 2005). Finally, the high hygroscopic property of NaCl particles permits the presence of liquid water on their surface at relatively low values of humidity (70%) (Lee et al., 2002). It could contribute to protect micro-organisms toward desiccation and osmotic shocks, and provide a more favourable media for microbial multiplication. The multiplication of bacteria in atmospheric water was suggested by Fuzzi et al. (1997), who observed higher quantities of cells per volume of air when fog was present than by clear conditions. Sattler et al. (2001) showed that cloud carried bacteria can multiply in the solution provided by cloud water and at a temperature encountered there (0°C). We also determined that most of the isolated bacteria can sustain growth at 5°C (Amato et al., 2007).

In our samples, pH ranged from 3.2 to 7.0. **Figure 4** shows that a strong link exists between pH and total bacteria concentration ($r^2 = 0.65$, n = 29), meaning a negative relation with the increasing anthropic influence on the air mass. Other parameters remain not significantly affected (not shown).

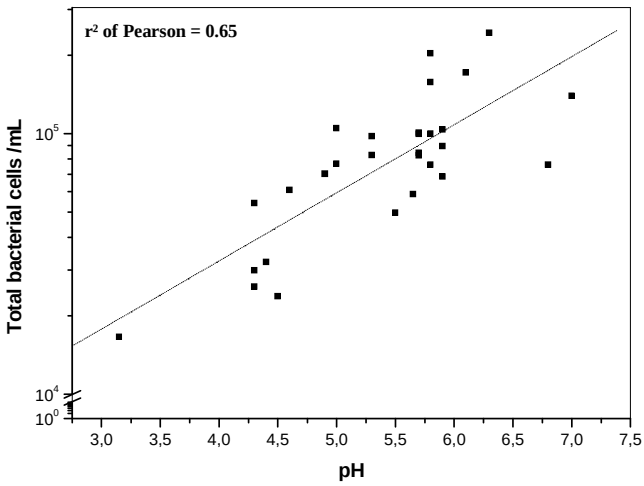


Figure 4: Relation between the total bacterial content and the pH of cloud water. Each sample of the fourteen events collected and measured is plotted here. A linear fit line shows the correlation.

Fuzzi et al (1997) also noticed a decrease in fog water by decreasing pH. It is not possible to conclude on an actual causal effect of the anthropogenic atmospheric pollution on bacteria abundance. In our opinion, low emission of bacteria by urban areas in direction of clouds is the more probable explanation that can be given. However, considering the previous data, it could mean that the pollution linked to Human activities is responsible of a decrease in cell multiplication, resulting in a decrease in total cells counted. Such a hypothesis was also formulated by Fuzzi et al. (1997).

On the whole, the chemical approach provides some new tracks in the understanding of the distribution of micro-organisms in the atmosphere. Results shows that the oceanic contributions to the microbial content of cloud water in free troposphere is likely more important than what can be expected at relatively long distances from the coast (about 400 km). On the contrary, the anthropogenic sources appear to be weaker.

4. Conclusion

In order to describe the microbial content of the cloud compartment of the atmosphere and its variations, cloud water have been sampled at different periods of the year and under various meteorological conditions. Total bacteria are one order of magnitude higher than fungal cells, with respective concentrations valuing about 8.1 x 10^4 mL^{-1} and 5.9 x 10^3 mL^{-1}. A maximum of 1% of the total bacteria are retrieved by cultural methods, conversely for fungal cells for which as high as about 40% can be recovered both at 27°C and at 15°C. However ATP measurements show that a large majority of bacteria are alive and active in clouds, as viable but non cultivable cells. A high variability in the microbiological parameters considered is noticed, independently for bacteria and for fungi. No influence of the local meteorological factors is detected, but a general seasonal tendency can be reported. Higher concentrations in cultivable bacteria and of total fungal cells are found in summer and autumn, consistently with the literature. It is also observed that the number of micro-organisms cultivable at 15°C respect to cultivable at 27°C increases during the colder season, dealing with qualitative variations of composition.

In addition, strong links exist between microbiological parameters considered and chemical composition of cloud water. Values of concentration of total and cultivable cells well correlated with the Na^+ content measured, and negatively with the anthropogenic influence for total bacteria. It suggests an important conclusion: micro-organisms originating from ocean are preferably integrated in cloud droplets compared to those from continental sources, and as a consequence, ocean represents a major source for micro-organisms of clouds. Many considerations can be brought to support this idea, like the favoured aerosolisation from water surfaces and the high hygroscopy and the size of oceanic aerosols.

Acknowledgements

The research was funded by the French LEFE-CHAT from the CNRS and the ORE-BEAM program of the French Ministry of Research. Pierre Amato is the recipient of a scholarship from the French Ministry of Research. Marius Parazols is under fellowship of the Region Auvergne which is also acknowledged. Finally, we thank Elodie Cano for her technical help.

References

Aller J.Y., Kuznetsova M.R., Jahns C.J. & Kemp P.F., 2005. The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols. *Aerosol Science* 36, 801-812.

Amato P., Ménager M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. & Delort A-M., 2005. Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds, *Atmospheric Environment* 39, 4143-4153.

Amato P., 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.

Ariya P.A., Nepotchatykh O., Ignatova O. & Amyot M., 2002. Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. *Geophysical Research Letters* 29, 22, 2077-2080.

Bauer H., Kasper-Giebl A., Löflund M., Giebl H., Hitenberger R., Zibuschka F. & Puxbaum H., 2002a. 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., Kasper-Giebl A., Zibuschka F., Hitenberger R., Kraus G. F. R. & Puxbaum H., 2002b. Determination of the carbon content of airborne fungal spores. *Annals of Chemistry* 74, 1, 91-95.

Baxter L. J. & Cookson J. T., 1983. Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 3, 919-934.

Bovallius Å., Bucht B., Roffey R. & Ånäs P., 1978a. Long-range air transmission of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 36, 6, 1231-1232.

Bovallius Å., Bucht B., Roffey R. & Ånäs P., 1978b. Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 5, 847-852.

Bussmann I., Phillipp B. & Schink B., 2001. Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 47, 41-50.

Cochet N. & Widehem P., 2000. Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiology Biotechnology* 54, 153-161.

Di Giorgio C., Krempff A., Guiraud H., Binder P., Tiret C., Dumenil G., 1996. Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles. *Atmospheric Environment*, 30, 1, 155-160.

Franzen J.S. & Binkley S.B., 1961. Comparison of the acid-soluble nuceotides in *Escherichia coli* at different growth rates. *The Journal of Biological Chemistry*, 236, No. 2, 515-519.

Fulton J. D., 1966a. Micro-organisms of the upper atmosphere: III. Relationship between altitude and micropopulation. *Applied Microbiology*, 14, No. 2, 237-240.

Fulton J. D., 1966b. Micro-organisms of the upper atmosphere: V. Relationship between frontal activity and the micropopulation at altitude. *Applied Microbiology*, Vol. 14, No. 2, 245-250.

Fulton J. D. & Mitchell R.B., 1966. Micro-organisms of the upper atmosphere: II. Microorganisms in two types of air masses at 690 meters over a city. *Applied Microbiology*, 14, No. 2, 232-236.

Fuzzi S., Mandrioli P. & Perfetto A., 1997. Fog droplets – An atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmospheric Environment*, Vol. 31, No. 2, 287-290.

Harrison R. M., Jones A. M., Biggins P. D. E., Pomeroy N., Cox C. S., Kidd S. P., Hobman J. L., Brown N. L. & Beswick A., 2004. Climate factors influencing bacterial count in background air samples. *International Journal of Biometeorology*, 49, 167-178.

Imshenetsky A.A., Lysenko S.V. & Kazakov G.A., 1978. Upper boundary of the biosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 1, 1-5.

Jones B. L. & Cookson J. T., 1983. Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 3, 919-934.

Jones A. M. & Harrison R. M., 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations – a review. *Science of the Total Environment*, 326, 151-180.

Katial R. K., Zhang Y., Jones H. J. & Dyer P. D., 1997. Atmospheric mold spore counts in relation to meteorological parameters. *International Journal of Biometeorology*, 41, 17-22.

Kurath G. & Morita R.Y., 1983. Starvation-survival physiological studies of a marine *Pseudomonas* sp.. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 4, 1206-1211.

Lee U.B., Kim H.K. & Kim S.S., 2002. Hygroscopic growth of *E. coli* and *B. subtilis* bioaerosols. *Aerosol Science* 33, 1721-1723.

Lighthart B., 1999. An hypothesis describing the general temporal and spatial distribution of alfresco bacteria in the earth's atmospheric surface layer. *Atmospheric Environment*, 33, 611-615.

Lighthart B. & Shaffer B. T., 1995. Airborne bacteria in the atmospheric surface layer: temporal distribution above a grass seed field. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1492-1496.

Mancinelli R. & Shulls W. A., 1978. Airborne bacteria in an urban environment, *Applied and Environmental Microbiology*, 35, 6, 1095-1101.

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.

Mascher F., Hase C., Moënne-Loccoz Y. & Défago G., 2000. The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4, 1662-1667.

Porter K. G. & Feig Y. S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25, 943-948.

Prasannarai K. & Sridhar K. R., 2001. Diversity and abundance of higher marine fungi on woody substrates along the west coast of India. *Current science*, 81, 304-311.

Rakotonirainy M.S., Héraud C. & Lavédrine B., 2003. Detection of viable fungal spores contaminant on documents and rapid control of the effectiveness of an ethylene oxide disinfection using ATP assay. *Luminescence*, 18, 113-121.

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

Sattler B., Puxbaum H. & Psenner R., 2001. Bacterial growth in supercooled could droplets. *Geophysycal Research Letters*, 28, 2, 239-242.

Shaffer B. T. & Lighthart B., 1997. Survey of culturable airborne bacteria at four diverse location in Oregon: urban, rural, forest, and coastal. *Microbial Ecology*, 34, 167-177.

Stanly P. E. & Williams S. G., 1969. Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. *Anal of Biochemistry*, 29, 381-392.

Szyrmer W. and Zawadzki I., 1997. Biogenic and anthropogenic sources of ice-forming nuclei: A review. *Bulletin of the American Meteorological Society* 78, 209-227.

Wright T. J., Greene V. W. & Paulus H. J., 1969. Viable microorganisms in an urban atmosphere. *J. Air Pollut. Cont. Assoc*. 199, 337-341.

II.3. Résultats complémentaires et commentaires

II.3.a) Concentration en ATP

La concentration en ATP dans l'eau de nuage est mesurée depuis l'évènement n°**15** datant du 17 novembre 2004. Comme notifié dans la publication, une forte corrélation existe entre les concentrations en ATP et en spores fongiques (figure 47).

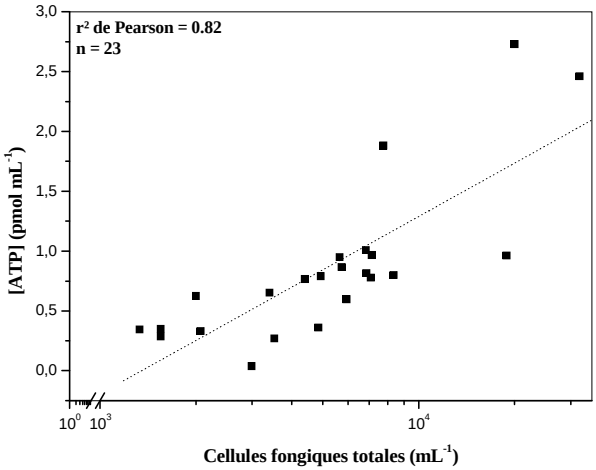


Figure 47 : Relation entre les concentrations en ATP et en cellules fongiques totales.

Une proportion assez constante de spores fongiques viables est donc présente dans les échantillons. Cette relation n'existe pas avec les bactéries, qui renferment une quantité d'ATP très inférieure. Cette relation montre clairement que la grande majorité des spores sont viables, et pourraient donc être responsables de biotransformations de composés chimiques dans l'eau des nuages.

Les valeurs moyennes de concentration en ATP mesurées et calculées pour chaque évènement sont reportées dans le tableau 10 ci-dessous.

Evènement nuageux	[ATP] mesurée (pmol mL^{-1})	[ATP] calculée (pmol mL^{-1})	[ATP] calculée / [ATP] mesurée
15	0,36	0,62	1,7
16	0,27	0,31	1,1
17	0,35	0,27	0,8
18	0,04	0,32	8,5
19	0,85	0,47	0,5
20	0,44	0,31	0,7
21	2,01	0,94	0,5
22	0,75	0,26	0,3

Tableau 10 : Valeurs de concentrations en ATP mesurées et calculées d'après les concentrations en micro-organismes totaux pour chaque évènement.

Une concentration théorique en ATP peut être calculée, sur la base du nombre de cellules bactériennes et fongiques totales contenues dans l'échantillon. Les valeurs de 3 x 10^{-6} pmol ATP $bacterie^{-1}$ (Franzen & Binkley, 1961) et 3 x 10^{-5} pmol ATP $spore^{-1}$ (déduit de Rakotonirainy et al., 2003) ont été utilisées. Ces calculs entraînent généralement (5 évènements sur 8) une sous estimation de la concentration en ATP, d'un facteur 1,4 à 3,3, alors que les quantités d'ATP par cellule maximales ont été choisies parmi celles données dans les travaux cités. Cela tend à montrer que l'ensemble des cellules sont viables et potentiellement très actives, renfermant une quantité importante d'ATP. Le calcul surestime largement la valeur de concentration en ATP dans le seul cas de l'évènement n°**18**. Il s'agit de

l'échantillon dans lequel le nombre de cellules bactériennes cultivables est le plus faible, ce qui pourrait signifier qu'une grande partie d'entre elles n'ont pas seulement perdu la capacité d'être cultivées, mais ne sont plus viables. Enfin, il reste à envisager qu'il puisse aussi s'agir d'un problème survenu à notre insu lors du dosage si l'on considère la valeur mesurée, 10 fois plus faible que l'ensemble des autres valeurs.

Malheureusement, aucun dosage d'ATP n'a pu être réalisé sur un échantillon très « pollué ». Mais l'évènement n°**22**, avec un pH moyen de 4,3 est relativement anthropisé. Il s'agit de l'évènement pour lequel le calcul sous-estime le plus la concentration en ATP, et on peut émettre l'hypothèse que les cellules, pour se maintenir en vie, « luttent » contre les gradients ioniques et les composés toxiques, et produisent de l'ATP en quantité importante.

Les résultats sont présentés différemment dans la publication, mais la conclusion reste la même : une part importante des micro-organismes présents dans l'eau des nuages reste viable.

II.3.b) Influence des paramètres météorologiques

II.3.b.(i) Effet de la température

Il ne semble pas exister de lien entre le contenu microbien des nuages collectés au puy de Dôme et les paramètres météorologiques comme le vent ou la température. La figure 48 montre la relation entre le contenu microbien et la température enregistrée simultanément aux échantillonnages par la station du puy de Dôme.

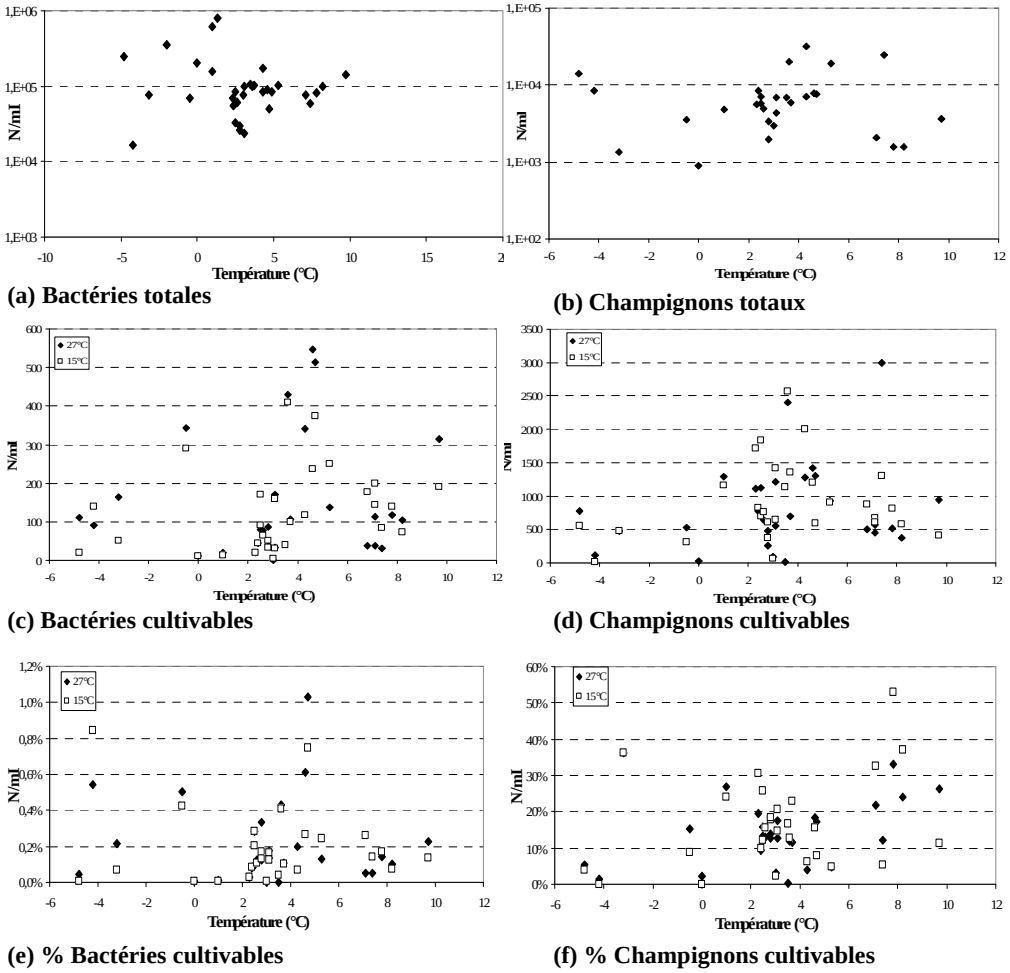
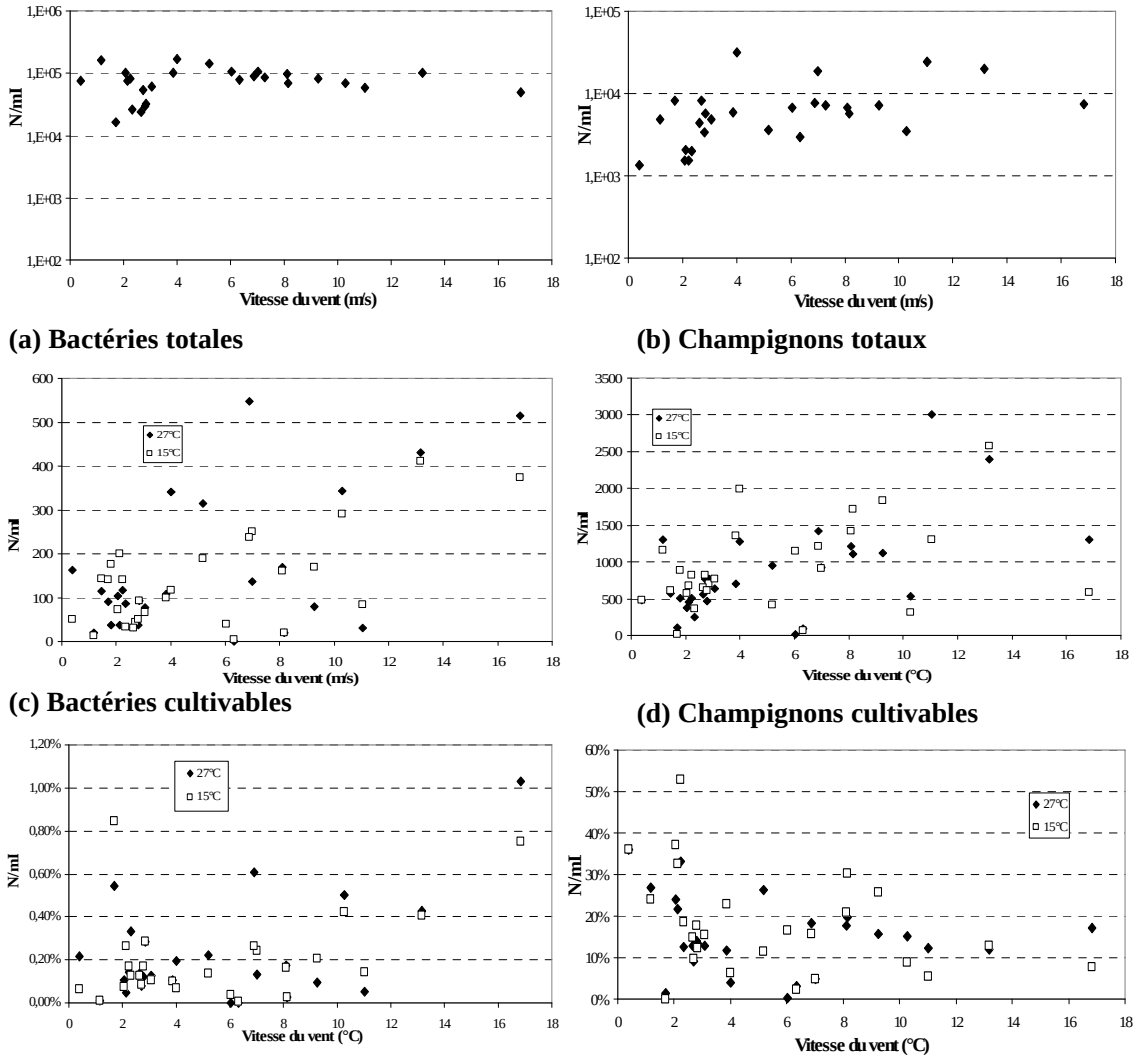


Figure 48 : Concentrations en bactéries et champignons totaux ((**a**) et (**b**)), cultivés ((**b**) et (**c**)) à 27°C et 15°C et proportions de cellules cultivées ((**e**) et (**f**)) à 27°C et 15°C en fonction de la vitesse du vent. Chaque point de chaque évènement nuageux échantillonné est reporté.

La température ambiante au moment du prélèvement n'explique pas les variations du contenu microbien total, ni la proportion de cultivables. Une relation positive avec la concentration en cellules cultivable est rapportée par d'autres études (Di Giorgio et al., 1996 ; Harrison et al., 2005), sur d'autres sites, mais hors nuage.

II.3.b.(ii) Effet de la vitesse du vent

Les relations entre les paramètres biologiques et la vitesse du vent mesurée au sommet du puy de Dôme sont présentées sur la figure 49 ci-dessous.



(a) Bactéries totales **(b) Champignons totaux**

(c) Bactéries cultivables **(d) Champignons cultivables**

(e) % Bactéries cultivables **(f) % Champignons cultivables**

Figure 49 : Concentrations en bactéries et champignons totaux ((**a**) et (**b**)), cultivés ((**b**) et (**c**)) à 27°C et 15°C et proportions de cellules cultivées ((**e**) et (**f**)) à 27°C et 15°C en fonction de la vitesse du vent. Chaque point de chaque évènement nuageux échantillonné est reporté.

La vitesse locale du vent n'intervient donc pas sur les dénombrements. Les concentrations en cellules cultivables les plus élevées sont observées par vent est fort, mais leur proportion par rapport aux cellules totales n'est pas modifiée. Il s'agit d'un résultat intéressant, montrant que la contamination locale des échantillons par les poussières éventuellement soulevées par le vent est inexistante, ou en tous cas reste indétectable. Concernant ce paramètre, les conclusions des différentes études sont contradictoires, et il semble que le site de prélèvements ait un effet important sur l'influence de la vitesse du vent.

II.3.c) Influence de l'origine de la masse d'air

L'origine géographique de la masse d'air est déjà connue pour avoir d'importantes répercutions sur sa composition chimique et donc sur celle de la phase aqueuse du nuage collectée. Ainsi, d'après les travaux de Karine Sellegri et d'Angela Marinoni précédemment menés respectivement en air sec et sur l'eau de nuage, **différents types de masses d'air** peuvent être rencontrées sur le site du puy de Dôme:

- les masses d'air originaire du secteur nord et nord-est, à influence anthropique importante. Cela se traduit par un pH acide et une grande contribution des nitrates NO_3^- à un contenu ionique total élevé (18-50 mg L^{-1}).

- les masses d'air en provenance d'un large secteur ouest, à influence océanique. Les contenus en Na^+ et Cl^- deviennent alors importants par rapport aux autres ions.

Ces caractéristiques chimiques et leurs relations avec les rétrotrajectoires sont globalement vérifiées. Les données sont aussi disponibles en annexe 1.

Un des objectifs de cette étude environnementale était la détection d'éventuels indicateurs microbiologiques des masses d'air, et l'établissement d'une classification comme il a été fait avec les caractéristiques chimiques. Bien que cela aurait demandé la prise en compte de plus de paramètres (notamment la composition bactérienne globale par une méthode moléculaire), on peut remarquer que la classification déjà existante est également pertinente avec les variations observées du contenu microbiologique.

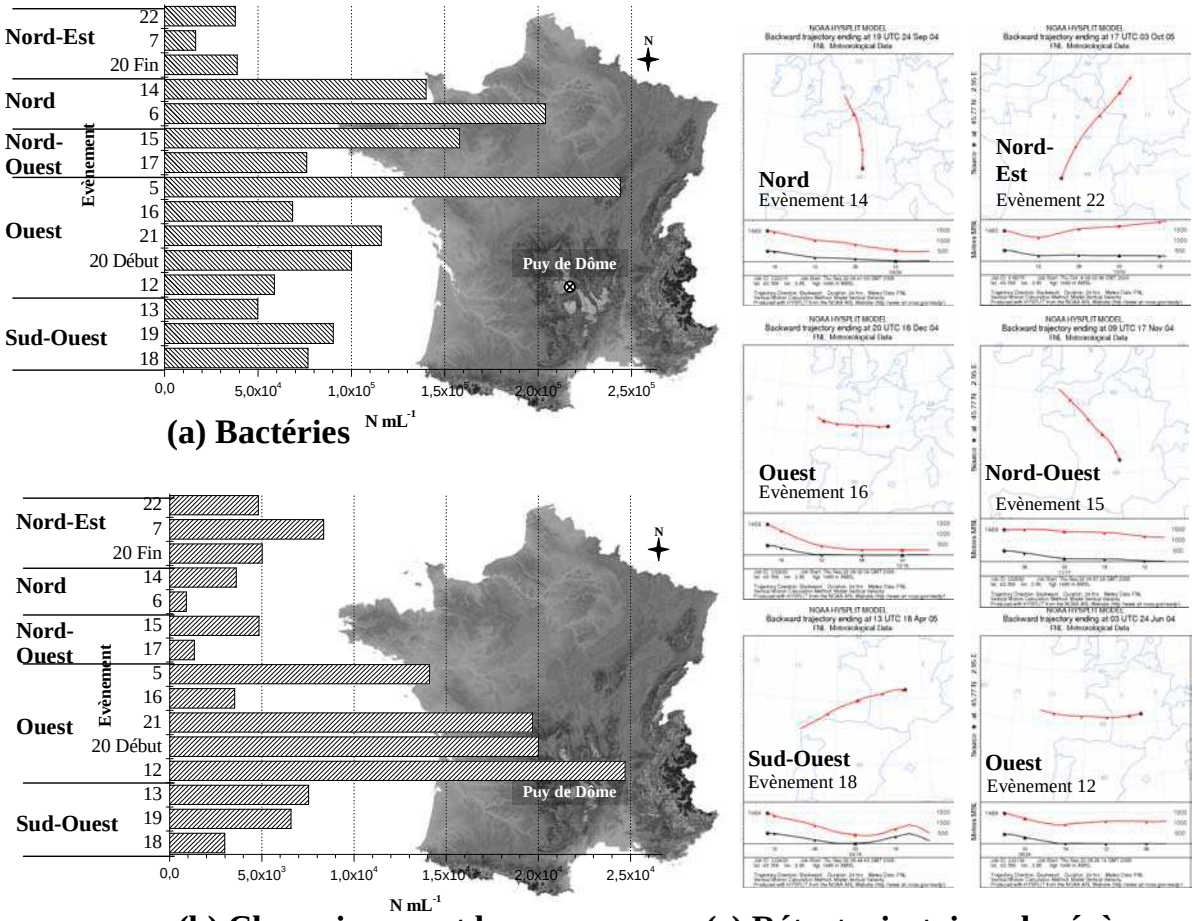


Figure 50 : Concentrations en cellules totales bactériennes (**a**) et fongiques (**b**) dans les échantillons, classés selon l'origine de la masse d'air, dont quelques exemples sont montrés (**c**). Les évènements n° **5**, **6**, **7** et **17** ont été réalisés en hiver et les **18**, **19** et **20** au printemps.

Comme que le montre la figure 50 précédente, les nuages présents dans les masses d'air de provenance nord-ouest sont les plus concentrés en bactéries (les évènements **7**, **22** et la fin de l'évènement **20** sont de nord-est). Le pic de concentration en cellules fongiques totales se situe légèrement plus au sud, à l'ouest du puy de Dôme.

Afin de quantifier cette observation de manière plus précise et quantitative qu'en considérant des rétrotrajectoires, des corrélations avec les paramètres chimiques on été tentées (les 9 derniers échantillons ont été analysés par chromatographie ionique). La **concentration en Na^+** témoigne du degré d'influence océanique, et donc de l'origine géographique de la masse d'air arrivant au puy de Dôme. Le Na^+ a été choisi ici car il s'agit d'un ion dont l'origine océanique est presque exclusive, et avec lequel il y a peu d'ambiguïté. Notons également qu'aucune relation entre les caractéristiques chimiques des échantillons et la saison n'a été détectée et les résultats sont donc présentés sous cette forme dans l'article. Il est montré que les concentrations en cellules totales (bactéries et champignons/levures) sont positivement liées à la concentration en Na^+ ($r^2_{bactéries}$=0,46 et $r^2_{champignons/levures}$=0,77, avec n=24, et $r^2_{bactéries}$=0,50 et $r^2_{champignons/levures}$=0,90 avec n=23, sans l'évènement hivernal, (Pearson)). Concernant les cultivables, cette relation est également bien vérifiée pour les eucaryotes et dans une moindre mesure pour les bactéries. Pour ces dernières, la tendance apparaît peu, mais les concentrations les plus élevées restent observées pour les nuages à forte influence océanique. La cultivabilité des bactéries et des champignons n'est elle pas affectée.

L'influence du type de masse d'air est donc évidente, et vient s'ajouter au facteur « saison » abordé dans l'article. Pour cette raison, le seul prélèvement réalisé en hiver considéré dans cette analyse (les autres étant tous réalisés à l'automne ou au printemps) est signalé sur les graphiques présentés. Cela explique que cet évènement, pourtant d'influence océanique forte, soit parmi les échantillons les moins chargés en champignons.

En comparant ces données avec la littérature, on remarque rapidement qu'elles sont contradictoires avec ce qui est couramment observé en air sec. Bovallius et al. (1978b) et Shaffer and Lighthart (1997), par exemple, cultivent moins de micro-organismes à partir d'échantillons provenant de sites côtiers que ceux relatifs à des sites continentaux, ruraux ou urbains. Pour ces derniers, les plus fortes concentrations sont observées. Il faut cependant ici signaler que ces études prennent en considération des échantillons réalisés à proximité du sol, ce qui pourrait être la cause de ces différences. De plus, comme on l'a observé, il est couramment admis aujourd'hui que la population de cultivables ne reflète pas la biomasse réellement présente dans un milieu. Une seule étude à notre connaissance s'est plus intéressée à l'influence des zones survolées par la masse d'air qu'à un effet de site en échantillonnant l'air à 690 mètres d'altitude. Les conclusions sont les mêmes, avec une concentration en micro-organismes cultivables à 30°C plus faible dans les masses d'air à influence marine que dans les masses d'air à influence continentale (Fulton and Mitchell, 1966). En considérant à la fois les résultats de ces études, les rétrotrajectoires tracées et la composition chimique des échantillons, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette corrélation :

- (i) La première hypothèse venant logiquement à l'esprit est celle d'une **source continentale importante de micro-organismes située entre l'océan et le puy de Dôme**. Cela nécessiterait que cette source soit suffisamment importante pour modifier la composition microbiologique de la masse d'air, et cela sans modifier l'influence à dominante océanique. En l'absence d'influence anthropique, la concentration bactérienne semble augmenter avec la distance parcourue au dessus du continent, ce qui va dans le sens d'une origine continentale.

- (ii) La seconde hypothèse est celle de **l'émission par l'océan de quantités importantes de micro-organismes retrouvés dans l'eau des nuages**. On sait que le milieu marin renferme des bactéries en concentration élevée et qu'il peut même représenter une source de champignons (Prasannarai & Sridhar, 2001). De plus, les gouttelettes aérosolisées depuis une surface liquide sont plus concentrées en micro-organismes que le liquide lui-même (voir la

partie II.1.a de la synthèse bibliographique). Cependant, les prélèvements hors nuage devraient dans ce cas aboutir à la même conclusion. Il reste possible que l'océan soit effectivement une source de micro-organismes relativement faible, mais que les cellules émises aient des propriétés de nucléation (CCN) particulièrement élevées. En d'autres termes, les micro-organismes aérosolisés à la surface de l'océan seraient plus hydrophiles que ceux émis par les surfaces continentales, ou seraient associés à des particules plus hygroscopiques, donc préférentiellement intégrés dans la phase aqueuse du nuage. De ce fait, ils resteraient à des concentrations faibles hors du nuage, mais une grande partie d'entre eux seraient intégrés dans la phase aqueuse lors de sa formation et se retrouvent donc finalement plus concentrés dans les échantillons récupérés que des micro-organismes terrigènes. Cette hypohèse est très probable, car les aérosols émis depuis l'océan sont effectivement très hygroscopiques. Enfin, **le Na^+ contenu** en plus grande quantité dans les nuages sous influence océanique pourrait agir sur la survie et la conservation de l'intégrité des cellules, même s'il reste à un niveau micromolaire. Il pourrait contribuer à protéger les cellules lors de la formation de la gouttelette et de son gel éventuel en influant sur la **pression osmotique** et sur la **température de congélation**. Au contraire, les polluants comme le formaldéhyde pourraient avoir un effet inverse du à leur toxicité dans les masses d'air continentales anthropiques.

Des éléments dont nous disposons permettent de s'orienter plutôt vers la seconde hypothèse. Cela suggère que l'océan représente une source importante de micro-organismes pour les nuages, car ils y sont préférentiellement intégrés. Des paramètres supplémentaires devraient être testés pour vérifier chacune d'entre elles, comme par exemple l'utilisation d'un milieu de culture « marin » pour cultiver plus spécifiquement les micro-organismes originaires de l'océan, la recherche de Cyanobactéries ou encore l'échantillonnage à partir d'autres sites ou par avion (pour suivre le nuage le long de son trajet et de son évolution).

II.3.d) Poids des facteurs de variabilité temporelle et chimique

Les différents paramètres pouvant être impliqués dans les variations du contenu microbien se chevauchent et les concentrations mesurées résultent de leurs influences respectives. Une analyse statistique multivariée serait nécessaire pour appréhender l'influence de chaque paramètre, mais les données collectées sont encore trop peu nombreuses pour l'autoriser. Les influences des 2 paramètres identifiés peuvent malgré tout être comparés.

Le tableau 11 ci-dessous compare les influences de la saison et de la contribution du Na^+ à la composition chimique de la masse d'air sur chacun des paramètres microbiologiques pris en considération. Pour cela, le test non paramétrique de Spearman a été utilisé, en attribuant des coefficients aux paramètres abiotiques comme suit :

Effet saison :
- Eté → 4
- Automne → 3
- Hiver → 2
- Printemps → 1

Effet masse d'air :
- $[Na^+]$ / [Total ions] > 0,3 → 1
- 0,13 < $[Na^+]$/ [Total ions] < 0,29 → 2
- $[Na^+]$ / [Total ions] < 0,12 → 3

Une valeur positive de R correspond donc à une augmentation du paramètre considéré durant la saison chaude, puisque les plus hauts coefficients lui ont été attribués, ou à une augmentation quand la masse d'air est sous influence continentale (influence océanique faible).

Paramètre		Valeurs de R de Spearman	
		Effet « saison »	**Effet « masse d'air »**
Bactéries	Cellules totales	-0,28	-0,33
	Cultivées à 27 °C	0,21	-0,42
	Cultivées à 15°C	0,14	-0,25
	% cultivées à 27°C	0,47	-0,14
	% cultivées à 15°C	0,33	-0,05
Champignons & levures	Cellules totales	0,32	-0,55
	Cultivés à 27 °C	0,46	-0,59
	Cultivés à 15°C	-0,06	-0,43
	% cultivés à 27°C	-0,06	0,06
	% cultivés à 15°C	-0,50	0,23

Tableau 11 : Comparaison entre l'influence de la saison et du type de masse d'air sur les contenus bactérien et fongique. Effet saison : R > 0 pour augmentation pendant la période été-automne ; Effet masse d'air : R > 0 pour augmentation quand le niveau d'influence océanique diminue.

Concernant les bactéries, l'effet « masse d'air » apparaît impliqué à un niveau équivalent à celui de la « saison » pour la concentration totale, avec une tendance à la baisse en été et pour les masses d'air sous influence océanique faible (R_{saison}= -0,28 ; $R_{masse\ d'air}$= -0,33). Pour les cultivées, l'effet « masse d'air » semble mieux expliquer leur nombre ($R_{27°C}$= -0,42 et $R_{15°C}$= -0,25), qui augmente avec le degré d'influence océanique du nuage. Cependant, leur proportion par rapport au total est essentiellement gouvernée par la saison avec des valeurs de cultivabilité à 27°C, et dans une moindre mesure à 15°C, plus élevées pendant la période la plus chaude de l'année (respectivement $R_{\%27°C}$= 0,47 et $R_{\%15°C}$= 0,33). Cela signifie à l'inverse que la cultivabilité en période froide diminue surtout pour les organismes qui ne sont pas capables de se développer à la plus basse de ces 2 températures de culture.

Pour expliquer le contenu fongique, chacun des 2 effets considérés est plus impliqué que pour les bactéries. La concentration en cellules totales est fortement influencée par la masse d'air (R= -0,55), diminuant avec la proportion en Na^+, mais aussi par la saison (R= 0,32). La concentration en cellules cultivées à 27°C suit celle globalement celle des cellules totales et est également très influencée (R_{saison}= 0,46 ; $R_{masse\ d'air}$= -0,59). La cultivabilité à 27°C est indépendante de ces 2 effets. Par contre, le type de masse d'air semble jouer un rôle sur le nombre de cultivés à 15 °C, mais la cultivabilité à cette température dépend beaucoup de la saison ($R_{\%15°C}$= 0,50) et est meilleure pour les évènements collectés pendant les périodes les plus froides de l'année. Ainsi, comme dans le cas des bactéries, en période froide, la culture des organismes psychrotrophes est favorisée (ou moins défavorisée) par rapport à celle impliquant une température plus élevée.

II.3.e) Caractéristiques anthropiques

Sur l'ensemble des prélèvements, un seul est identifiable comme fortement anthropisé : le prélèvement n°**7**, du 16 février 2004, avec un pH de 3,2. Il s'agit de l'évènement le moins chargé en bactéries. Comme le montre la figure 4 présentée dans la publication, la concentration bactérienne totale est fortement liée au paramètre caractérisant le degré d'anthropisation d'une masse d'air qu'est le pH : la concentration en bactéries diminue significativement avec le pH (r^2 = 0,65 ; n = 29).

Une telle observation a été faite sur les bactéries cultivées, par Fuzzi et al (1997) dans le brouillard de la vallée du Pô. De même, Mancinelli & Shulls (1978) ont montré que les bactéries cultivées dans leurs conditions étaient défavorisées par des hauts niveaux de NO, un

composé dont l'accumulation est liée aux activités humaines. Nos résultats prouvent également cette tendance sur les bactéries totales, que ces études n'ont pas considérées.

Malgré la corrélation évidente, il ne peut être établi aucune relation de cause à effet entre les deux paramètres, pH et concentration bactérienne. Mais l'hypothèse d'un effet négatif des activités anthropiques est tout à fait plausible. Il est de plus étayé par le fait que la concentration en champignons/levures ne semble pas altérée par une hausse de l'influence anthropique de la masse d'air. Les cellules capables de développer une forme de résistance sont donc plus aptes à conserver leur intégrité dans de telles conditions. Ce point est également cohérent avec les analyses menées sur les 2 premiers échantillons présentés au chapitre I des résultats.

Au niveau chimique, l'anthropisation de la masse d'air se traduit par une concentration relative élevée en nitrates NO_3^-, dans les échantillons collectés au puy de Dôme (Marinoni et al., 2004). Ils résultent essentiellement des activités agricoles, fortes sources de NH_4NO_3. La relation négative avec ces composantes chimiques existe, comme avec l'ensemble des caractéristiques anthropiques, mais reste moins marquée qu'avec le pH ou le potentiel rédox.

Une fois de plus la concentration en cellules bactériennes apparaît négativement liée aux émissions des activités anthropiques.

II.3.f) Suivi temporel d'un évènement nuageux

II.3.f.(i) Observations

Les différents paramètres mesurés ont été suivis au cours des échantillons n° **19** à **22**, avec un pas de temps d'environ 2 heures. Le suivi temporel de l échantillon **19** (22-23 mai 2005) est présenté sur la figure 51 ci-dessous.

L'échantillonnage dure de 18h00 à 04h30 (UTC). Pendant cette période, **l'influence anthropique augmente** : le pH baisse de près d'une unité (de 5,7 à 4,9), et la conductivité suit logiquement une tendance inverse (car les ions H^+ sont pris en compte dans la mesure). Le nuage devient également plus oxydant (le potentiel rédox double, passant de 170 à 360 mV). La fin de la journée n'explique pas ces variations : le jour, la photochimie produit des oxydants, et accroît de ce fait le potentiel rédox qui devrait logiquement diminuer la nuit ; une acidification par des émissions d'acides organiques par les végétaux se produirait également durant la journée, quand l'activité stomatique est maximale. Il s'agit donc vraisemblablement d'une influence anthropique.

On observe que, pendant le même temps, **la concentration bactérienne chute**, de plus de 1×10^5 à moins de 7×10^4 cellules mL^{-1}, sans que la concentration en cellules eucaryotes soit modifiée (~$6,5 \times 10^3$ cellules mL^{-1}). Concernant les organismes cultivés, la concentration bactérienne subit une brusque baisse en fin de la série de prélèvements (de 340 à 130 CFU mL^{-1}), au contraire du **nombre de champignons et levures cultivés qui augmente**. La prise en compte de la LWC, disponible pour ces prélèvements, ne modifie en rien l'ensemble de ces considérations.

Des variations importantes du contenu microbiologique sont donc observées au sein de cet évènement de transition entre des conditions physico-chimiques changeantes.

Si l'on s'intéresse maintenant aux rétrotrajectoires (figure 51), on remarque que la zone d'origine de la masse d'air échantillonnée se déplace lentement depuis le nord de l'Espagne vers le plein océan, pendant que la contribution du Na^+ aux ions totaux mesurés augmente progressivement de 15% à 31% (non montré).

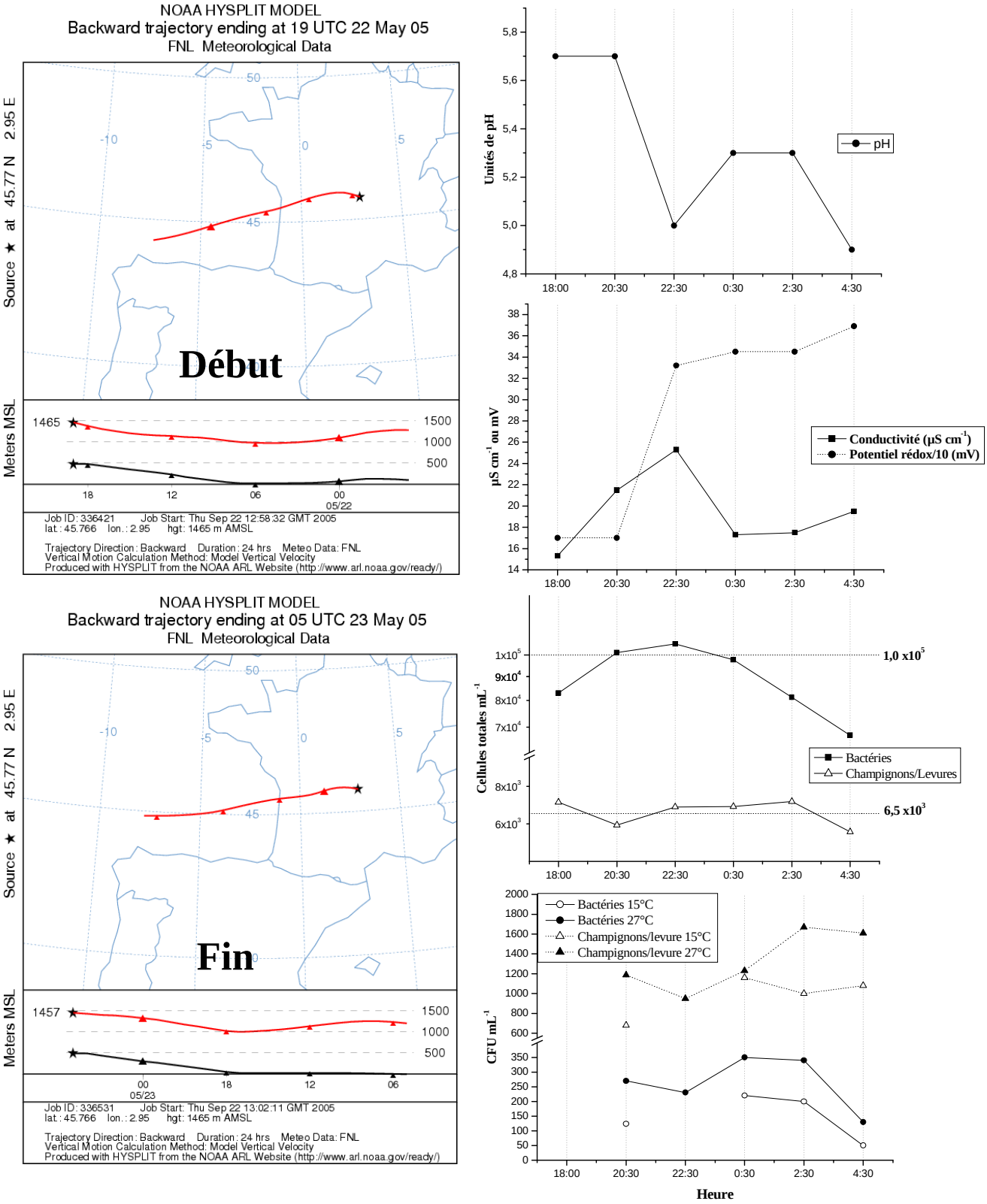


Figure 51 : Variation du pH, du potentiel rédox, de la conductivité, et du contenu en micro-organismes totaux et cultivées à 15°C et 27°C au cours du même évènement n°**19** (22-23 mai 2005), et rétrotrajectoires correspondant au début et à la fin du prélèvement.

Au niveau de l'activité des cellules, on remarque que, alors que le nombre de cellules fongiques ne varie pas et que celui des bactéries chute, la quantité calculée d'ATP par cellule bactérienne augmente fortement (figure 52).

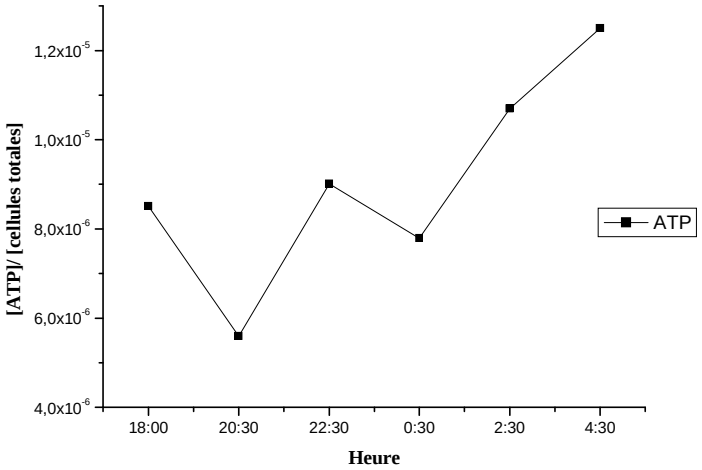


Figure 52 : Evolution de la quantité d'ATP par cellule au cours de l'échantillon n°**19**.

Il semble donc que les cellules, en réponse à une modification du milieu, augmentent leur niveau d'activité.

II.3.f.(ii) Scénario du déroulement de l'évènement

L'échantillonnage de cet évènement, qu'on pourrait qualifier de « modèle d'école », fait intervenir l'ensemble des facteurs de variabilité identifiés. De plus, il vérifie (les données restent insuffisantes pour parler de validation) les hypothèses formulées concernant une source océanique des micro-organismes, et d'une hausse d'activité des cellules provoquée par l'influence anthropique :

(1) La zone d'origine de la masse d'air se décale progressivement vers l'océan. La concentration bactérienne augmente en conséquence et une valeur maximale est atteinte vers 22h30. Cela n'a pourtant aucun effet sur les cellules fongiques.

(2) La zone d'origine de la masse d'air se décale encore vers le nord et finit par aligner le puy de Dôme avec l'agglomération Bordelaise. Une baisse de la concentration bactérienne est donc observée en rapport avec cette influence anthropique, alors que le nombre de spores fongiques n'est pas modifié. L'augmentation de la concentration en ATP mesurée pourrait alors correspondre à la nécessité pour les bactéries d'accroître leur métabolisme pour permettre le maintien des gradients chimiques transmembranaires et la lutte contre les composés toxiques. En conséquence, cela les conduit à cesser de se multiplier et elles sont donc finalement moins nombreuses.

Sur les 4 évènements suivis de façon détaillée, seul celui présenté ici montre des variations importantes permettant de détecter certaines tendances. Des suivis similaires doivent êre faits sur d'autres évènements pour confirmer les tendances observées lors de telles transitions, entre des situations météorologiques et physico-chimiques distinctes.

II.4. Conclusion

Des concentrations de l'ordre de 8 x 10^4 bactéries mL^{-1} et 5 x 10^3 cellules fongiques mL^{-1} ont été observées dans les nuages prélevés au sommet du puy de Dôme. Jusqu'à plus de 40% des champignons et levures sont retrouvés par les méthodes culturales, mais le plus souvent moins de 1% des bactéries le sont. Les mesures de concentration en ATP, très influencée par la concentration en cellules fongiques, suggèrent aussi la présence d'une grande proportion de bactéries viables, par conséquent actives.

Les grandeurs microbiologiques mesurées sont soumises à des variations importantes suivant les évènements nuageux et les concentrations des 2 types de micro-organismes évoluent de façon très distincte. Deux paramètres ont finalement été clairement identifiés comme influents sur la composition microbiologique globale des nuages collectés au sommet du puy de Dôme :

Le facteur *saison* régule le « bruit de fond » microbien atmosphérique en influant sur la taille des sources (en intervenant notamment sur l'abondance de la végétation).

Le facteur *source*, où l'océan apparaît vraisemblablement comme une source majeure de micro-organismes pour les nuages, particulièrement de bactéries.

Enfin, les émissions *anthropiques* sont liées de façon significative à une baisse de la densité bactérienne dans l'eau du nuage, mais n'interviennent pas sur la part fongique. Le lien de cause à effet n'est pas établi et un effet de source est envisageable. On peut également supposer que l'influence anthropique gène la multiplication bactérienne dans le nuage et conduit par conséquent à une baisse du nombre total de cellules.

III. LES GROUPES MICROBIENS IDENTIFIES DANS LES NUAGES

III.1. Principaux résultats

III.1.a) Contexte et résumé

A partir des prélèvements n° **3** à **14** inclus, les bactéries et les champignons et levures récupérés par cultures en conditions aérobies ont été isolés et identifiés. Le but de ces isolements était d'une part de s'intéresser à la composition microbiologique de ce milieu, et d'autre part de disposer de souches cultivées au laboratoire, pour permettre des investigations concernant leur métabolisme. L'étude métabolique fait l'objet du prochain et dernier chapitre de la partie Résultats.

L'ensemble des souches isolées est présenté et discuté dans l'article présenté, publié dans *FEMS Microbiology Ecology* (sous presse). Dans le même temps, les séquences ADN codant pour l'ARNr 16S qui ont conduit aux identifications taxonomiques des souches ont été déposées dans la banque de séquences GenBank. Les numéros d'accession sont données dans la publication et sont rappelés en annexe 2.

Un nombre total de 42 souches de champignons et 15 levures ont été isolées. Au moins 20 genres comptent parmi les 32 souches identifiées, mais le nombre de souches non identifiées (13 champignons et 12 levures) reste important. Les genres les plus retrouvés sont *Cladosporium* (un Ascomycota très commun dans l'environnement naturel), *Trametes* (un Basidiomycota saprophyte) et *Cryptococcus* (un Deuteromycota généralement associé à l'eau et à la végétation, retrouvé aussi en Arctique). Le groupe des Agaricales est également très présent, avec 5 souches.

Chez les bactéries, parmi les **71 isolats**, 61 souches ont été identifiées et sont affiliées aux Actinobacteria (25 souches), Firmicutes (12), Alpha- (8), Beta- (2) et Gamma-Proteobacteria (11), et Bacteroidetes (3). Par ordre d'importance, les genres majoritaires sont *Pseudomonas* (8 isolats), *Staphylococcus* (7), *Sphingomonas* (6), *Streptomyces* (5) et *Arthrobacter* (4). L'ensemble des souches bactériennes fait le plus souvent référence à des micro-organismes de l'environnement naturel (eau douce, mer, sol, végétation), et même des régions polaires. Les colonies sont souvent pigmentées, vraisemblablement par des caroténoïdes, composés connus pour être impliqués dans la résistance au froid et aux faibles pressions osmotiques.

Cette importante diversité déterminée en considérant seulement la fraction cultivée laisse supposer une diversité globale bien plus importante, dans la mesure où seulement ~10% des champignons/levures et ~0,1% des bactéries sont récupérés par méthodes culturales.

La comparaison entre les souches retrouvées en été et en hiver montre que les genres à Gram négatif sont surtout isolés en été : ce groupe représente de 26% à 55% des isolats en hiver (en fonction de l'affiliation des souches indéterminées) contre 59% en été. Cela s'explique essentiellement par l'abondance de la végétation durant la période la plus chaude de l'année, qui conduit parallèlement à l'augmentation du nombre de Gamma-Proteobacteria, et plus particulièrement au genre *Pseudomonas* qui concerne de nombreuses espèces épiphytes. Au contraire, le nombre de Firmicutes (Gram positifs, groupe des *Staphylococcus* et *Bacillus*) diminue en été, ce qui pourrait être expliqué par leur plus faible résistance face au rayonnement solaire.

La capacité de développement à différentes températures (5°C, 17°C et 27°C) a été testée sur une partie des souches bactériennes isolées. La température la plus basse correspond à la valeur annuelle moyenne enregistrée au sommet du puy de Dôme. Il apparaît que 11 des 20 souches pour lesquelles la croissance à 5°C a été testée sont capables de se multiplier à cette température, ce qui va dans le sens de leur activité dans les nuages.

III.1.b)Publication

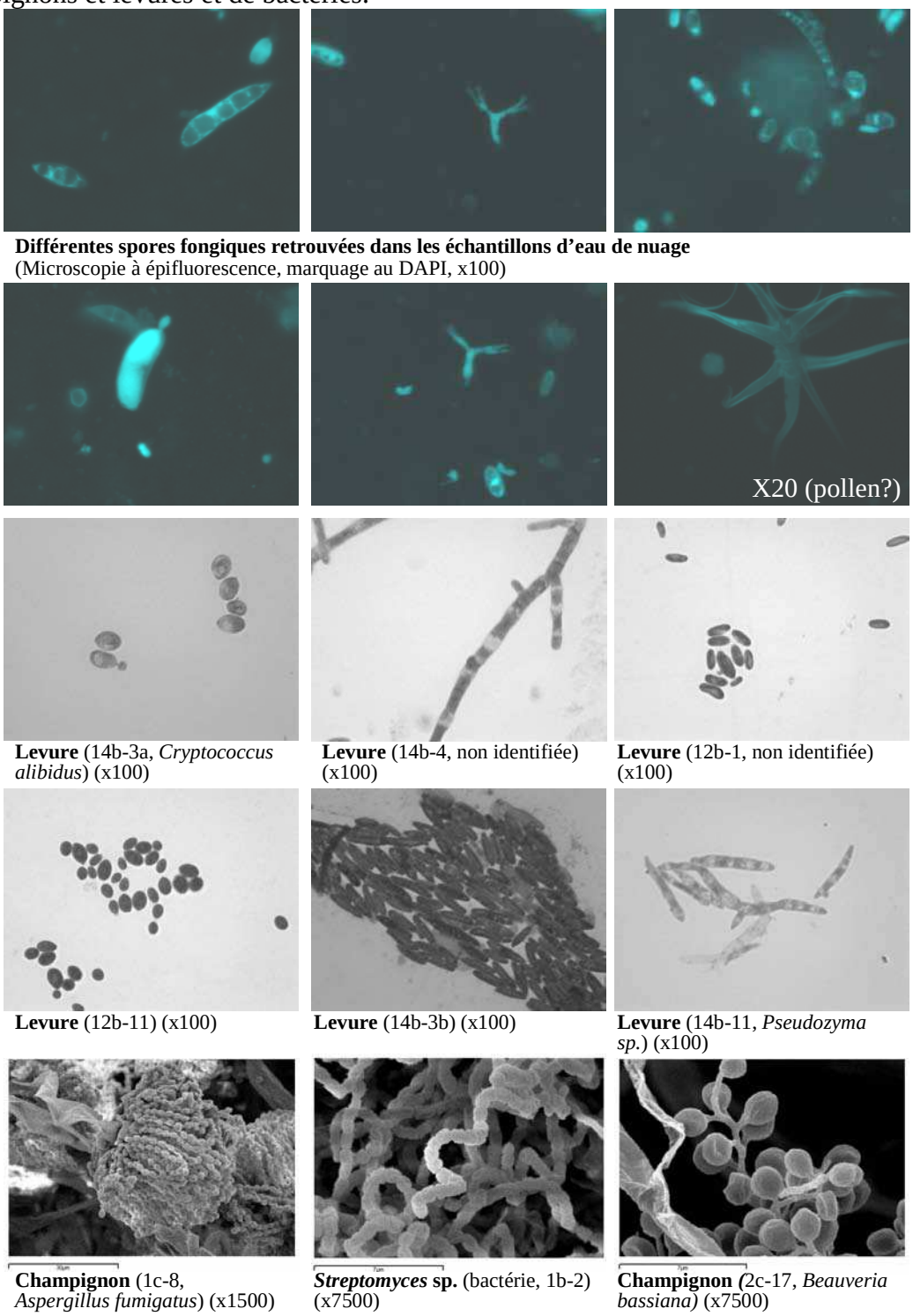
Amato P., Parazols M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. & Delort A-M. (2007). Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology* 59, 242-254 (DOI:10.1111/j.1574-6941.2006.00199.x).

III.2. Résultats complémentaires et commentaires

III.2.a) Observations microscopiques et identifications

III.2.a.(i) Observations microscopiques

Les figures 53 et 54 ci-dessous montrent des observations microscopiques de champignons et levures et de bactéries.



Différentes spores fongiques retrouvées dans les échantillons d'eau de nuage (Microscopie à épifluorescence, marquage au DAPI, x100)

Levure (14b-3a, *Cryptococcus alibidus*) (x100)

Levure (14b-4, non identifiée) (x100)

Levure (12b-1, non identifiée) (x100)

Levure (12b-11) (x100)

Levure (14b-3b) (x100)

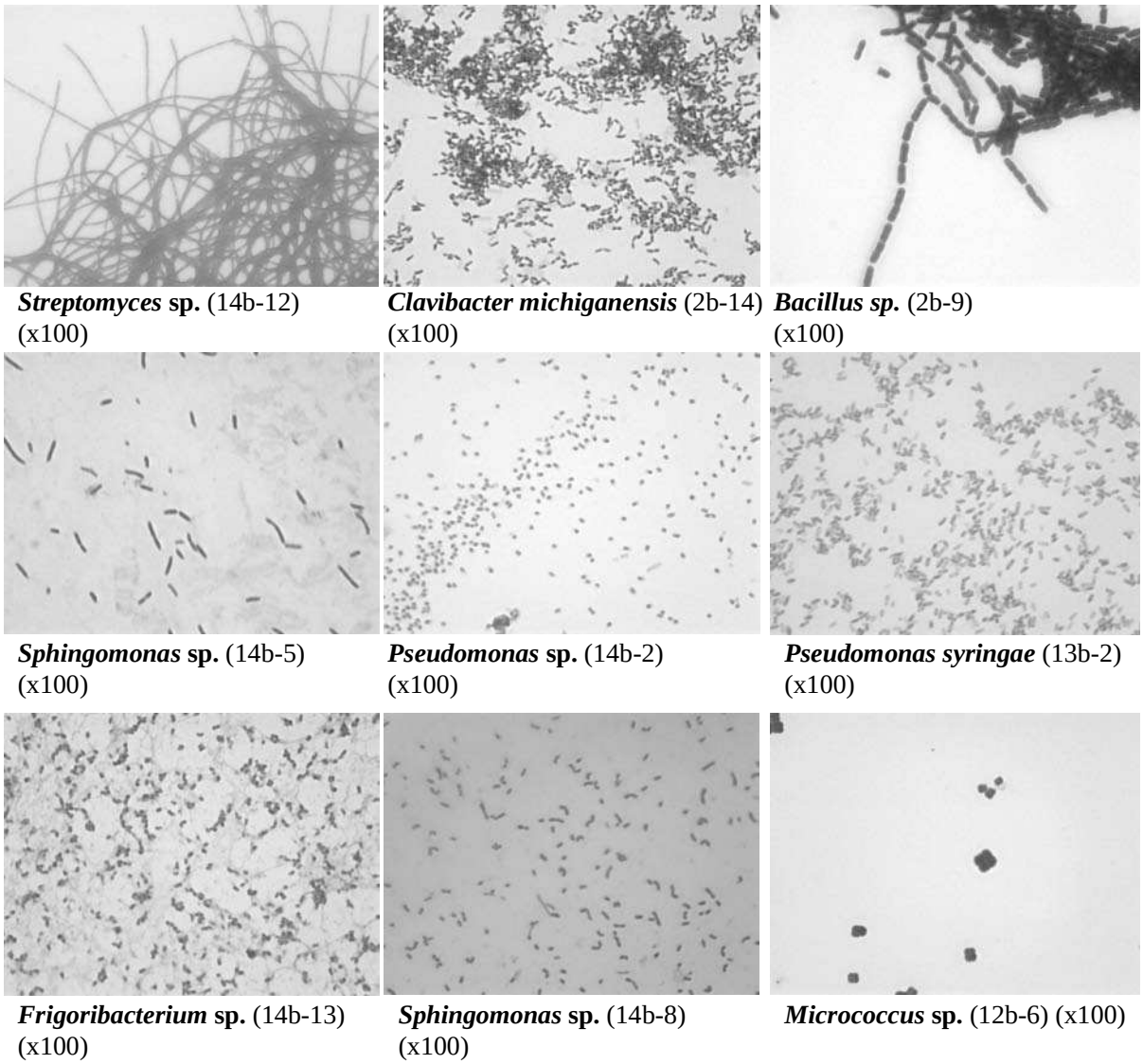
Levure (14b-11, *Pseudozyma sp.*) (x100)

Champignon (1c-8, *Aspergillus fumigatus*) (x1500)

***Streptomyces* sp.** (bactérie, 1b-2) (x7500)

Champignon (2c-17, *Beauveria bassiana)* (x7500)

Figure 53 : Observation microscopiques de spores de champignons retrouvées dans les échantillons d'eau de nuages (microscopie à épifluorescence, **en haut**), et de cultures de levures en microscopie optique (**au milieu**) et en microscopie électronique à balayage (**en bas**).



Streptomyces* sp.** (14b-12) (x100) | ***Clavibacter michiganensis (2b-14) (x100) | ***Bacillus sp.*** (2b-9) (x100)

Sphingomonas* sp.** (14b-5) (x100) | ***Pseudomonas* sp.** (14b-2) (x100) | ***Pseudomonas syringae (13b-2) (x100)

***Frigoribacterium* sp.** (14b-13) (x100) | ***Sphingomonas* sp.** (14b-8) (x100) | ***Micrococcus* sp.** (12b-6) (x100)

Figure 54 : Observations microscopiques de différentes cultures bactériennes (frottis, microscopie optique).

III.2.a.(ii) Identification bactérienne

Pour les identifications taxonomiques, seule une partie de la séquence ADN codant pour l'ARNr 16S a été considérée. Cela permet le plus souvent d'accéder au genre, mais rarement à l'espèce. Si cela suffit à l'identification taxonomique partielle dont nous avons besoin dans cette étude, cela limite fortement des analyses phylogénétiques plus poussées. Une représentation sous forme d'arbres phylogénétiques regroupant certaines des séquences des souches est quand même donnée pour permettre une vision d'ensemble, mais seulement à titre indicatif (figure 55 et figure 56 ci-dessous).

Comme on le voit, la composition (phyla retrouvés) est plus proche de celle que peuvent décrire les études moléculaires des micro-organismes de l'atmosphère (Maron et al., 2005) que les études considérant seulement les organismes cultivés. Il semble donc que les conditions de cultures utilisées ici (milieu oligotrophe, température de 15°C) sont plus adaptées aux micro-organismes des nuages que les conditions de cultures habituellement employées (milieu riche et température < 20°C).

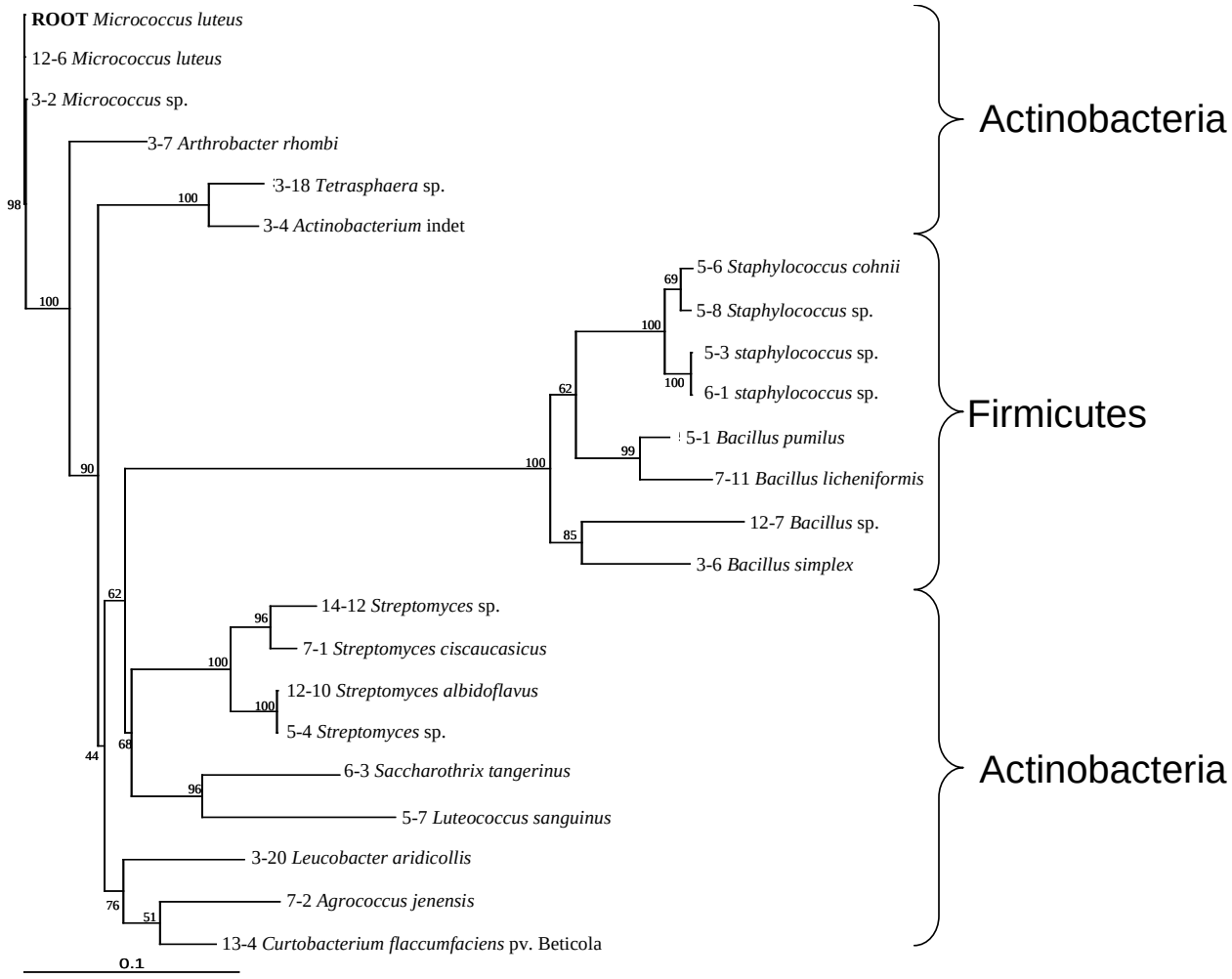


Figure 55 : Arbre phylogénétique intercomparant les séquences partielles (730 pb) de souches bactériennes à gram positif isolées, construit selon la méthode du plus proche voisin (neighbour-joining). 100 arbres ont été générés par bootstrap et l'arbre consensus est présenté. L'arbre est enraciné avec une souche type de *Micrococcus luteus*, et sur chacun des nœuds sont indiqués les nombres d'occurrences.

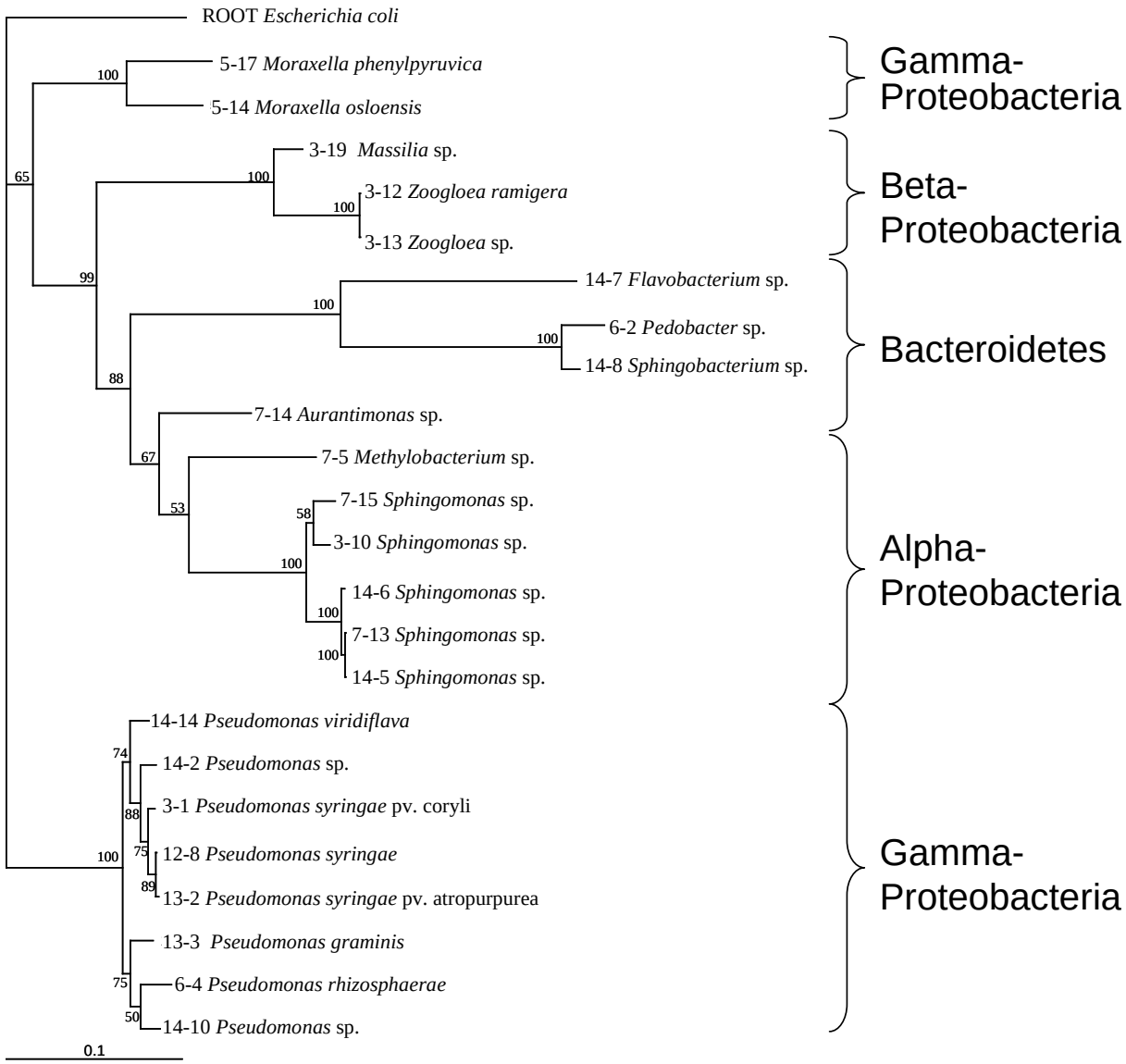


Figure 56 : Arbre phylogénétique intercomparant les séquences partielles (765 pb) de souches bactériennes à gram négatif isolées, construit selon la méthode du plus proche voisin (neighbour-joining). 100 arbres ont été générés par bootstrap et l'arbre consensus est présenté. L'arbre est enraciné avec une souche type d'*Escherichia coli*, et sur chacun des nœuds sont indiqués les nombres d'occurrences.

Trois autres souches ont aussi été isolées des échantillons n°**16** et **22**. La souche 16b-1 est vraisemblablement, d'après l'observation microscopique, un *Bacillus* sp. Les 2 autres semblent être des *Sphingomonas* sp. (pigmentation, aspect, observation microscopique), mais aucune réelle tentative d'identification n'a été menée par manque de temps. Sur ces trois souches, des tests de croissance aux différentes températures ont été faits (voir annexe 2). La première souche se développe plus rapidement à 27°C qu'à 17°C. Par contre, les souches 22b-1 et 22b-2 sont toutes les 2, clairement psychrotrophes. Pour 22b-1, 17°C est la température à laquelle elle est la se multiplie le plus rapidement. Les cultures de la souche 22b-2 atteignent environ la même densité optique quelle que soit la température, plus ou moins rapidement.

III.2.b) Comparaison entre les échantillons

La composition en micro-organismes cultivés est très variable d'un échantillon à l'autre, d'un point de vue qualitatif, mais aussi quantitatif (nombre de colonies distinguables). Le

nombre de colonies bactériennes distinctes dans les cultures d'un même échantillon varie en effet de 4 (échantillons n° **6** et **13**) à 19 (échantillon n° **3**), et le nombre de phyla représentés varie lui aussi, dans une moindre mesure (voir la publication pour plus de détails). Concernant les champignons, ils n'ont pas été systématiquement isolés, mais des levures sont présentes seulement dans les échantillons n° **5**, **12**, **13** et **14**.

Si l'on s'intéresse de plus près à la composition de chaque échantillon, on remarque la quasi absence de redondances des isolements bactériens : seuls les isolats 3b-16 et 3b-17 se sont révélés être similaires. La discrimination visuelle des colonies à isoler est donc efficace, mais conduit certainement, à l'opposé, à confondre certaines colonies de souches en réalité distinctes. Cela indique que la diversité de la population bactérienne cultivée est sans doute sous évaluée ici. Or, elle représente sans doute elle-même une sous évaluation la diversité totale qui doit donc être importante.

Certaines souches apparaissent par contre similaires (à partir de la séquence partielle), mais sont retrouvées dans des échantillons différents. C'est au moins le cas de 5 souches bactériennes, et vraisemblablement d'une levure :

- **5b-4 et 12b-10**, dont le plus proche voisin est *Streptomyces albidoflavus* (source inconnue) ;
- **7b-4 et 12b-6**, dont le plus proche voisin est *Micrococcus luteus* CV31, isolée d'une nappe phréatique ;
- **3b-16, 5b-3 et 6b-1**, dont le plus proche voisin est *Staphylococcus* sp. (Bacterium G24), isolée de l'eau d'un lac (Green Lake) ;
- **7b-13 et 14b-5** dont le plus proche voisin est *Sphingomonas* sp. M3C203B-B isolée du lac sous-glaciaire de Vostok, en Antarctique ;
- **12b-8 et 13b-2** dont le plus proche voisin est *Pseudomonas syringae* pv. artropurpurea isolée de graminées ;
- **12b-1, 13b-1 et 14b-1**, une levure non identifiée, mais dont la couleur rose la rend remarquable.

Le tableau 12 ci-dessous recense les milieux d'isolements des plus proches voisins des bactéries identifiées :

Eau	Sol	Froid	Animaux	Végétation	Autre ou inconnue	
3b-2	3b-18	3b-10	3b-7	3b-1	3b-4	5b-16
5b-3	5b-11	3b-11	5b-7	3b-8	3b-5	6b-3
5b-6	6b-4	5b-15	5b-8	7b-6	3b-6	7b-1
6b-1	7b-2	6b-2	5b-14	7b-12	3b-12	7b-9
7b-4	7b-7	7b-13	7b-11	12b-7	3b-14	12b-10
7b-5	14b-8	7b-14	12b-4	12b-8	3b-15	
12b-6	14b-9	7b-15	12b-5	13b-2	3b-16	
14b-6	14b-12	14b-2		13b-3	3b-19	
14b-7		14b-5		13b-4	3b-20	
		14b-13		14b-10	5b-1	
				14b-14	5b-4	

Tableau 12 : Type de source des plus proches voisins des souches bactériennes isolées identifiées.

On voit que la majorité des souches isolées sont probablement originaires de milieux naturels aquatiques, de la végétation et de milieux froids, ou sont en tous cas proches de micro-organismes retrouvés dans ces milieux. Ces sources sont rassemblées dans le nuage puisque les souches isolées d'un même échantillon peuvent à chaque fois être réparties entre ces différentes catégories. Les évènements n°**6**, **7** et **14** en provenance du nord renferment tous les trois des souches isolées de milieux froids extrêmes, dont une est commune aux

échantillons n° **7** et **14**. De même, les souches liées à la végétation sont plus abondantes en été, quelle que soit la provenance de la masse d'air échantillonnée (échantillons n° **12**, **13** et **14**).

Un effet de la saison semble aussi exister, probablement lié à la variation de la taille des sources au cours de l'année. Globalement, les bactéries à Gram négatif occupent une place plus importante en été par rapport aux bactéries à Gram positif, comme le montre la figure 57 ci-dessous.

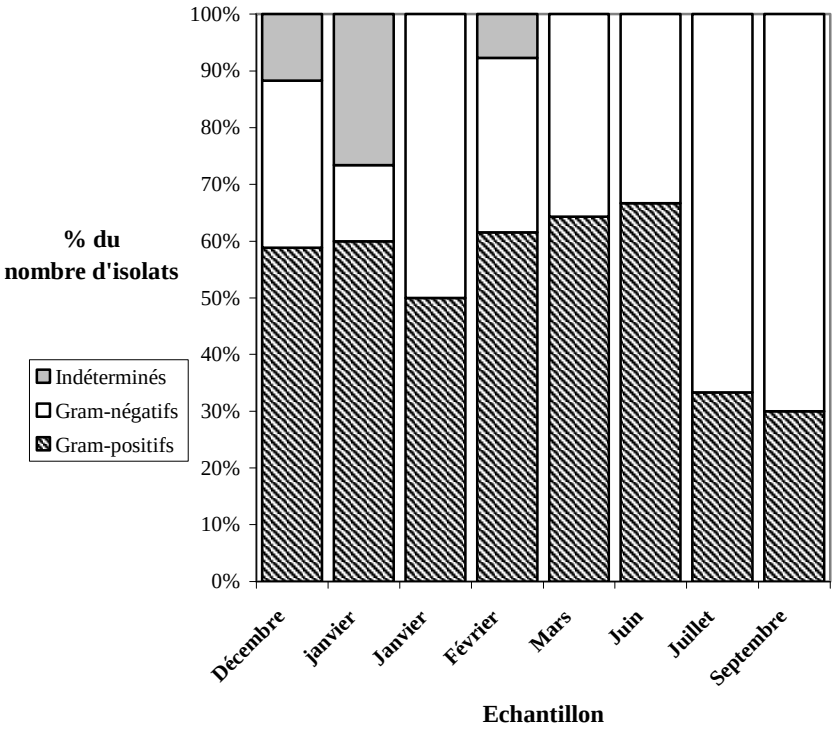


Figure 57 : Variation de la proportion d'isolats bactériens Gram positifs et Gram négatifs dans les 7 échantillons considérés en fonction la date d'échantillonnage. L'échantillon n° **2** du 6 mars 2003 est également pris en compte.

Le lien dont l'existence était supposée au départ entre la proportion de bactéries sporulantes (genres *Bacillus*, *Paenibacillus* et *Streptomyces*) **et l'influence anthropique** n'est pas mis en évidence sur les bactéries cultivées. Cela avait été observé par Fuzzi et al (1997) au niveau du brouillard, et nos premiers résultats le suggéraient également. Cependant, de souches sporulantes ont bien été isolées des échantillons n° **3**, **5** et **7**, mais l'influence anthropique n'est nettement marquée que dans le cas de l'échantillon **7** (pH respectifs de 6,3 et 5,7 et 3,2).

III.2.c) Caractéristiques particulières de certaines souches

Les souches isolées présentent certaines caractéristiques intéressantes, notamment sur des points qui pourraient leur procurer un avantage dans la survie dans les nuages, et leur faire tenir un rôle important aux niveaux chimiques et physiques. En plus de la capacité de nombreuses souches à se développer à basse température dont il est question dans la publication, certaines souches sont pigmentées, présentent une activité de nucléation élevée ou possèdent des capacités de dégradation paticulières.

III.2.c.(i) Pigmentation

De nombreuses souches bactériennes cultivées et quelques levures forment des colonies de couleur jaune à rouge (figure 58). La synthèse de caroténoïdes pourrait être impliquée. Ils sont connus pour leur rôle dans le maintien de la fluidité de la membrane cellulaire à basse température et pour de faibles pressions osmotiques, ainsi que pour leur implication dans la lutte contre les radicaux libres. Ils pourraient également être à l'origine d'une meilleure aérosolisation des cellules depuis les surfaces liquides (voir Synthèse Bibliographique III). La présence de caroténoïdes est donc susceptible d'accroître la capacité de ces souches à être présentes et à rester viables dans l'atmosphère.

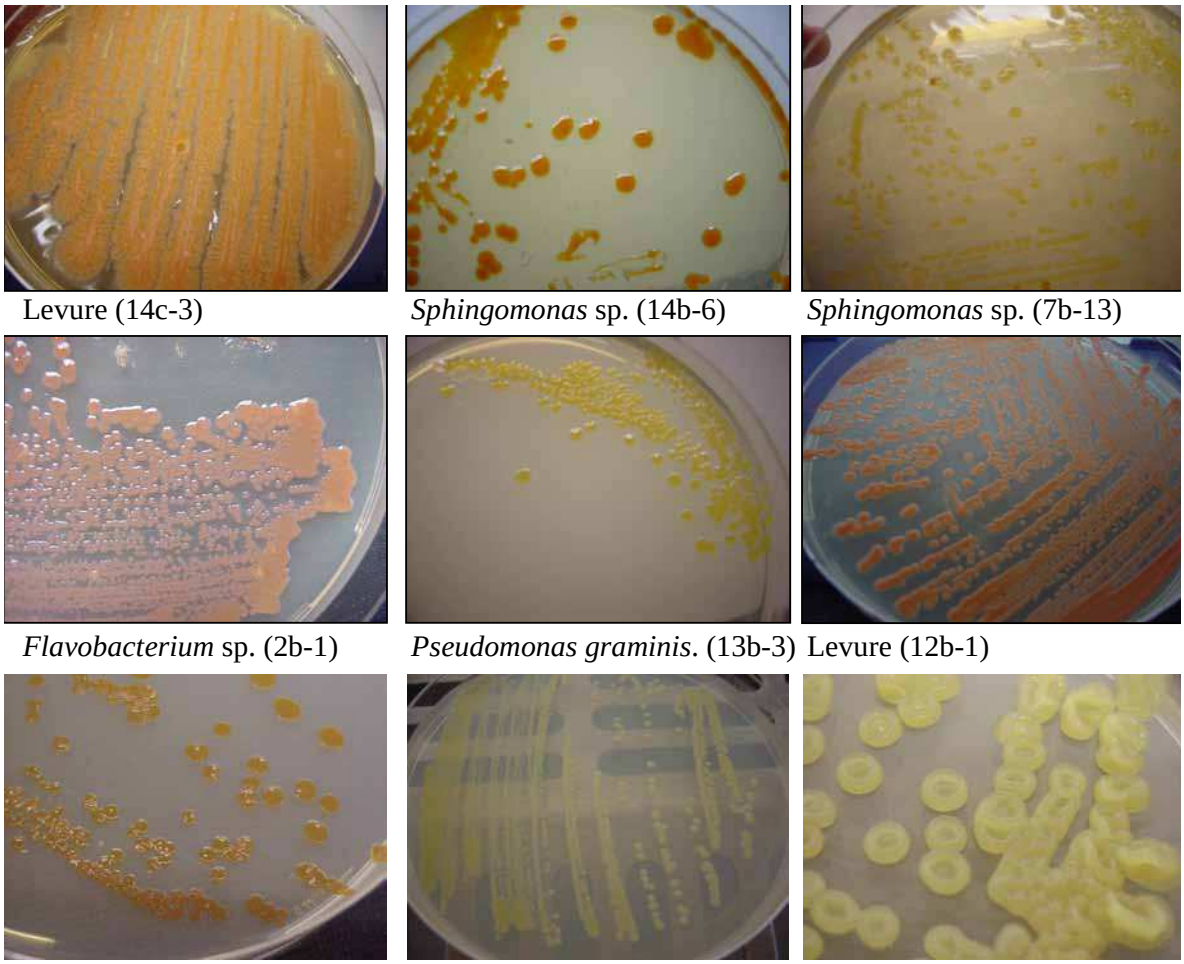


Figure 58 : Exemples de colonies de souches pigmentées cultivées.

III.2.c.(ii) Propriétés de nucléation

Comme discuté dans la publication, certaines des souches isolées concernent des espèces connues pour leurs propriétés glaçogènes, c'est-à-dire capable d'induire le gel de l'eau à une température plus élevée (mais évidemment négative) qu'en leur absence. Il s'agit d'espèces généralement phytopathogènes, dont l'exemple le plus connu est certainement celui de *Pseudomonas syringae*, chez lequel certaines souches sont actives dès -2°C. Les propriétés des souches récupérées dans les nuages ont intéressé l'équipe de Pathologie Végétale de l'INRA d'Avignon (équipe de Cindy Morris), avec qui nous avons donc collaboré et transmis (juillet 2006) certaines souches *à priori* potentiellement intéressantes : l'ensemble des *Pseudomonas* (3b-1, 6b-4, 12b-8, 13b-2, 13b-3, 14b-2, 14b-10 et 14b-14), la souche du genre

Pantoa (12b-5), et les champignons *Verticillium nigrescens* (12c-7), *Botrytis cinerea* (12c-11), et *Fusarium avenaceum* (14c-4). Des tests ont été menés sur ces souches pour déterminer leur activité glaçogène (température à laquelle elles induisent le gel de l'eau) par mesure de l'émission infrarouge. En parallèle, cette équipe va étudier leurs niveaux de pathogénicité envers les plants de tabac. Les résultats portant sur les activités glaçogènes montrent qu'une seule des souches bactériennes possède effectivement une telle propriété (13b-2, *P. syringae*). Son activité, relativement élevée, se situe aux alentours de -6°C. Le champignon *Fusarium avenaceum* amène lui à un point de congélation de -3°C, et compte donc parmi les souches les plus actives de celles connues à l'heure actuelle. Des analyses de phytopathogénicité des souches à l'encontre de plants de tabac sont en cours.

III.2.c.(iii) Dégradation de xénobiotiques

La capacité de la souche 3b-6 (*Bacillus* sp.) à dégrader la mésotrione a été mise en évidence au sein du laboratoire SEESIB. Il s'agit d'une propriété apparemment rare, puisque sur environ 200 souches testées, (dont l'ensemble de celles des nuages), ce *Bacillus* est la seule pour laquelle une activité importante a pu être observée. Cet herbicide n'est commercialisé que depuis 2001 (sous le nom de Callisto® par la société Syngenta) et sa biodégradabilité est très mal connue. Cette thématique de biodégradation est la spécialité de l'équipe « RMN métabolique et environnement », et l'étude de la biodégradation de la mésotrione représente le sujet de thèse de Stéphanie Durand. L'activité de cette souche bactérienne sur la mésotrione a fait l'objet d'une publication dans ***Letters in Environmental Microbiology*** (Durand et al., 2006). Pour cette raison, la séquence ADN codant pour l'ARNr 16S a été séquencée sur toute sa longueur, pour permettre une identification plus précise de la souche. Cependant, l'espèce demeure indéterminée car le genre *Bacillus* nécessite des investigations plus poussées pour discriminer les différentes espèces avec certitude.

III.3. Conclusion

Une importante diversité a pu être mise en évidence au niveau de la population de micro-organismes cultivés, ce qui laisse supposer une biodiversité globale au moins équivalente. Certains genres bactériens apparaissent comme dominants, parmi lesquels les Actinobacteria *Streptomyces*, *Arthrobacter* et *Micrococcus*, les Firmicutes *Bacillus* et *Staphylococcus*, les Alpha-Proteobacteria *Sphingomonas* et les Gamma-Proteobacteria *Pseudomonas*. Cette composition est cohérente avec celle rapportée pour les micro-organismes de l'air, impliquant des investigations moléculaires. Les bactéries à Gram négatif sont plus nombreuses dans les échantillons d'été. Les souches isolées comptent parmi des espèces décrites de milieux froids, du sol, de l'eau et de la végétation essentiellement.

Une grande partie des souches cultivées présente des caractéristiques physiologiques d'intérêt pour leur survie dans le nuage ainsi que pour la chimie et la microphysique du nuage (développement à basse température, pigmentation, activité glaçogène élevée).

Des indicateurs biologiques de caractéristiques abiotiques des nuages semblent exister (masses d'air à influence nordique, effet de la végétation…), mais leur définition en vue d'une caractérisation des masses d'air demande encore de nombreux échantillonnages.

Enfin, grâce à ces isolements, nous disposons d'une importante collection de souches aux caractéristiques et affiliations taxonomiques très variées. Elles permettront les investigations métaboliques menées en laboratoire afin de déterminer leurs comportements vis-à-vis de composés chimiques présents dans l'eau de nuage.

IV. METABOLISME DES SOUCHES ISOLEES ET IMPLICATION DANS LA CHIMIE DES NUAGES

IV.1. Résultats généraux pour l'ensemble des souches (screenings)

IV.1.a) Introduction

Evaluer l'influence du métabolisme microbien dans la chimie des nuages constitue l'objectif principal de cette étude. Après avoir caractérisé le contenu microbien d'un point de vue quantitatif et qualitatif et identifié certains des facteurs de variabilité, il s'agit donc de s'intéresser aux propriétés métaboliques des souches isolées dans ce but. La première publication (I-Premiers résultats) relatait déjà nos activités en positionnant notre travail dans ce domaine. La quasi-totalité des souches isolées par la suite a pu être testée pour leur activité à transformer des composés présents en quantité importante dans les nuages. Il s'agissait d'abord d'un lourd travail de screening, consistant à tester de manière systématique les souches isolées et leur activité envers chacun des composés choisis. Ensuite, certaines souches ont pu être sélectionnées, soit pour leur caractéristiques métaboliques, soit pour leur capacité à se développer à basse température. Sur ces souches, l'effet de la température sur l'activité de biodégradation a été étudié. Les recherches se sont également focalisées de façon plus précise sur le métabolisme des composés en C_1 de ces souches, par l'utilisation de formaldéhyde marqué au ^{13}C. L'ensemble de cette partie a impliqué les stages de DEA consécutifs de Matthieu Ménager (2004), Florence Demeer (2005) et Stéphane Fontanella (2006), ainsi que du stage de Amina Melaouhi, qui ont tous largement participé aux résultats présentés ici, qui présentés de façon détaillée en annexe 2.

Différents composés ont été choisis pour l'étude, parmi les plus abondants des composés organiques mesurés dans les échantillons collectés au sommet du puy de Dôme. Cela concernait d'abord trois monoacides carboxyliques (formique, acétique et lactique). Depuis 2004, un diacide, l'acide succinique, fait également partie de la liste. Le formaldéhyde a été sélectionné pour son importance en chimie de l'atmosphère et sa toxicité élevée. Le méthanol, enfin, a également été considéré dans la mesure où il est lié de manière importante aux autres composés en C_1 (formiate et formaldéhyde), aussi bien par voie photochimique que métabolique. Il n'est pas mesuré dans les nuages au sommet du puy de Dôme (ce qui ne signifie pas qu'il est absent), mais sa présence (25 µM) à été reportée dans une étude sur le brouillard, au Japon (Suzuki et al., 1998). On peut donc s'attendre à le retrouver dans l'eau de nuage, en concentration faible (~1 µM). Le tableau 13 ci-dessous récapitule les différents composés testés, en précisant pour chacun la gamme de concentrations mesurées dans les échantillons de nuage collectés depuis 2001.

Composé	**Formule**	**Masse molaire (g mol^{-1})**	**Concentration dans les tests systématiques (mM)**	**Concentration dans les nuages** (µM) (Marinoni et al, (2004) + Parazols et al., non publié)
Acide formique	HCOOH	46	20	0,20 - 70
Acide acétique	CH_3-COOH	60	20	0,01 - 48
Acide lactique	CH_3-CHOH-COOH	90	20	0,20 - 6
Acide succinique	HOOC-$(CH_2)_2$-COOH	118	20	0,02 - 4
Formaldéhyde	HCHO	30	2 (mélange formaldéhyde/méthanol)[a]	0,01 - 15
Méthanol	CH_3OH	32	0,8 (mélange formaldéhyde/méthanol)[a]	25[b]

Tableau 13 : Composés testés et concentrations utilisées et mesurées dans les échantillons d'eau de nuage collectés au sommet du puy de Dôme. (**a** : solution commerciale de formaldéhyde stabilisée au méthanol ; **b** : Suzuki et al., 1998, dans un brouillard pollué).

Un seul de ces composés, le succinate, est commun avec l'étude de Ariya et al. (2002), qui est la seule abordant le sujet d'une manière relativement proche à la nôtre.

De plus, les quantités de biomasse et les concentrations en substrats utilisées pour les tests de biodégradation sont ajustées pour être comparables au rapport entre le nombre de cellules et les concentrations en composés chimiques que l'on trouve dans les nuages.

Les résultats concernant les tests de biodégradation systématiques des souches dans leur ensemble sont présentés sous la forme d'une publication, à soumettre. Elle traite des 60 souches de bactéries et levures testées, en considérant le pourcentage de composé dégradé en 24 heures à 27°C ou 17°C, en fonction des conditions les plus favorables à la croissance, préalablement déterminées. Les souches utilisées et les tests réalisés sont listés dans le tableau 14 ci-dessous. Consultez pour plus de détails les résultats classés par phylum et par température en annexe 2.

Souche	Identification	Tests réalisés	T°
3b-1	*Pseudomonas syringae*	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-2	*Micrococcus luteus*	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-3	Non identifiée	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-4	Intrasporangiaceae	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-6	*Bacillus* sp.	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-7	*Arthrobacter rhombi*	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-8	*Cellulomonas* sp.	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-9	Non identifiée	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-10	*Sphingomonas* sp.	F, A, L, f/MeOH	17°C
3b-12	*Zoogloea* sp.	F, A, L, f/MeOH	17°C
3b-13	Non identifiée	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-14	Non identifiée	F, A, L, f/MeOH	17°C
3b-15	*Staphylococcus epidermidis*	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-16	*Staphylococcus* sp.	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-17	*Staphylococcus* sp.	F, A, L, f/MeOH	27°C
3b-20	*Leucobacter* sp.	F, A, L, f/MeOH	27°C
5b-1	*Bacillus pumilus*	F (x2), A (x2), L (x2), S (x2), f/MeOH (x2)	27°C
5b-2	*Bacillus* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
5b-3	*Staphylococcus* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	17°C
5b-5	Non identifiée	F, A, L, S, f/MeOH MeOH seul, $f^{13}C$	27°C, 17°C et 5°C
5b-6	*Staphylococcus* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
5b-8	*Staphylococcus* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
5b-11	*Arthrobacter* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
5b-16	*Staphylococcus equorum*	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
6b-1	*Staphylococcus* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
6b-2	*Pedobacter* sp.	F, A, L, f/MeOH	27°C
6b-4	*Pseudomonas* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
7b-2	*Agrococcus* sp.	F, A, L, S	27°C
7b-4	*Micrococcus* sp.	F, A, L, f/MeOH	27°C
7b-5	*Methylobacterium* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	17°C
7b-6	*Paenibacillus* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	17°C
7b-7	*Nocardioides* sp.	F (x2), A (x2), L (x2), S (x2), f/MeOH (x2)	27°C
7b-8	Non identifiée	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
7b-9	*Arthrobacter* sp.	F, A, L, f/MeOH	27°C
7b-11	*Bacillus* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
7b-12	*Kocuria* sp.	F, A, L, f/MeOH	27°C
7b-13	*Sphingomonas* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	17°C et 5°C
7b-15	*Sphingomonas* sp.	F, A, L, f/MeOH	27°C
12b-1	Levure rose	F, A, L, S, f/MeOH	17°C
12b-4	Actinobacterium	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
12b-5	*Pantoea* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
12b-6	*Micrococcus* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
12b-7	Bacillales	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
12b-8	*Pseudomonas syringae*	F, A, L, S, f/MeOH, MeOH seul, $f^{13}C$	27°C, 17°C et 5°C
12b-9	Levure	F, A, L, S, f/MeOH	17°C
13b-1	Levure rose	F, A (x2), L (x2), S (x2), f/MeOH (x2)	17°C
13b-2	*Pseudomonas syringae*	F, A, L, S, f/MeOH	17°C
13b-3	*Pseudomonas graminis*	F, A, L, S, f/MeOH	17°C et 5°C
13b-4	*Curtobacterium flaccumfaciens*	F, A, L, S, f/MeOH	17°C
14b-1	Levure rose	F, A, L, S, f/MeOH	17°C et 5°C
14b-2	*Pseudomonas* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	17°C et 5°C
14b-3a	Levure *Cryptococcus albidus*	F (x2), A (x2), L (x2), S (x2), f/MeOH (x2)	17°C
14b-5	*Sphingomonas* sp.	F, A, L, S, MeOH	27°C
14b-6	*Sphingomonas* sp.	F, A, L, S, MeOH	27°C
14b-7	*Flavobacterium* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	17°C
14b-10	*Pseudomonas* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
14b-11	Levure *Pseudozyma* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C
14b-13	*Frigoribacterium* sp.	F, A, L, S, f/MeOH, MeOH seul, $f^{13}C$	27°C, 17°C et 5°C
14b-14	*Pseudomonas viridiflava*	F, A, L, S, f/MeOH	27°C, 17°C et 5°C
16b-1	*Bacillus* sp.	F, A, L, S, f/MeOH	27°C

Tableau 14 : Liste des tests métaboliques réalisés. **F** : formiate ; **A** : acétate ; **L** : lactate ; **S** : succinate ; **f/MeOH** : mélange formaldéhyde/méthanol ; **$f^{13}C$** : formaldéhyde marqué au carbone 13, **MeOH seul** : méthanol.

IV.1.b) Publication

Amato P., Demeer F., Melaouhi A., Martin-Biesse A-S., Sancelme M., Laj P. & Delort A-M. (Soumis en janvier 2007). A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by micro-organisms. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*.

A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by micro-organisms

Pierre Amato[a, b], Florence Demeer[a], Amina Melaouhi, Anne-Sophie Martin-Biesse[a], Martine Sancelme[a], Paolo Laj[b] and Anne-Marie Delort[a]

a. Laboratoire de Synthèse et Etudes de Systèmes à Intérêt Biologique, UMR 6504 CNRS-Université Blaise Pascal, 63177 Aubière cedex, France.

b. Laboratoire de Météorologie Physique, UMR 6016 CNRS-Université Blaise Pascal, 63177 Aubière cedex, France.

*Corresponding author: Tel 00 33 473 40 77 15; Fax 00 33 473 40 77 17
E-mail address: A-Marie.Delort@univ-bpclermont.fr

Keywords: Bacteria, cloud, atmospheric chemistry, biodegradation

Abstract

The interactions between microbial and chemical contents of cloud water were investigated. First, we observe clearly that the bulk cloud water solution provides a substantial environment where bacteria can develop significantly. Then, a global overview of the potential microbial influence on cloud chemistry is brought. A total number of 60 microbial strains originating from seven distinct samples of cloud water and of various taxonomic affiliations were looked for their ability to degrade some of the main atmospheric carboxylic acids (formic, acetic, lactic and succinic), formaldehyde and methanol. Biodegradation tests show that all the compounds can be transformed when used as single substrate, with activities depending on both the strain and the compound. On the whole Gram negative bacteria are more efficient than Gram positive or yeasts and higher capacities of biodegradation are observed towards formaldehyde, formate and acetate, which are also the more concentrated compounds typically measured in cloud water. It is of first importance since Gram negative are likely to represent the main part of active cells in cloud water. Analyses by ^{1}H NMR permitted to establish for instance that compounds like pyruvate or fumarate can be produced and released in the media in relation to the transformation of lactate or succinate. In addition, utilization of ^{13}C labelled formaldehyde can be transformed through many metabolic pathways, similar to those induced by photochemistry and leading to the production of formate and/or methanol. These results suggest that microorganims of cloud water can have various behaviours towards the chemical compounds present and are on the whole very active.

1. Introduction

Up to the last decade, the existence of a living microbial biota in cloud water has being demonstrated (Fuzzi et al., 1997; Bauer et al., 2002; Amato et al., 2005), and the evidence of its metabolic activity under the conditions of temperature encountered in clouds has been given: the primary production resulting from the multiplication of micro-organisms in clouds was estimated to reach 1 to 10 Tg C per year (Sattler et al., 2001). For our part, we retrieve a large variety of bacterial and fungal micro-organisms from cloud water samples, in which an *in situ* activity have been actually observed (Amato et al., in preparation). Such an activity should be supported by the presence of substrates and likely involves atmospheric organic compounds, of which the chemistry has become a subject of increasing interest with the growing problems of air pollution. As suggested by Ariya & Amyot (2004), the microbiological component could interfere with the chemical processes occurring in cloud droplets and finally have a non negligible influence on its composition.
Organic compounds are present in all the compartments of the atmosphere, the gaseous and particulate phases (Chameides & Davis, 1983; Puxbaum et al., 1988; Grosjean, 1989; Kumar et al., 1996; Sellegri et al., 2003), rain water (Kieber et al., 1999; Kawamura et al., 2001) and also in cloud water on which we focus in this paper (Voisin et al., 2000; Fuzzi et al., 2002; van Pinxteren et al., 2005; Parazols et al., 2006). Carboxylic acids, originating from both anthropogenic and biogenic sources, predominate and represent between 10 % and more than 70 % of the total dissolved organic carbon contained in cloud water (Löflund et al., 2002; Marinoni et al., 2004). High levels in aldehyde concentrations are strongly linked to human activities (Granby et al., 1997) and to photochemistry (Riedel et al., 1999), and alcohols, though rarely measured essentially due to analytical problems, have been detected in polluted fog water using nuclear magnetic resonance (NMR) (Suzuki et al., 1998). All these compounds are related to the oxidation of hydrocarbons, mainly emitted from anthropic activities, and are strongly linked between themselves by atmospheric chemistry. As an example in the case of C_1 compounds, the transformation of methanol to formaldehyde, formate and finally to CO_2 is catalyzed by the free radicals produced by photochemical processes (Monod et al., 2000). For the moment, investigations concerning the capacity of such atmospheric compounds to be microbiologically transformed show some very interesting potentialities (Ariya al., 2002; Amato et al., 2005), but they are limited to a very few micro-organisms, and a real overall picture is still not available. To contribute to fill this lack, we present in this article results obtained from a large study, involving 60 microbial strains isolated from cloud water samples collected all along a period of almost two years, described elsewhere in a recently published paper (Amato et al., 2007). Six organic compounds have been considered, among which four carboxylic acids (three monoacids (formate C_1, acetate C_2 and lactate C_3) and one diacid (succinate C_4)), an aldehyde (formaldehyde C_1) and an alcohol (methanol C_1). An introducing observation is presented, proving the capacity of micro-organisms to develop under the nutritive conditions provided by cloud water.

2. Material and methods

2.1 Incubation of non modified cloud water

A volume of cloud water sampled at the puy de Dôme summit as described in Amato et al (2005) have been brought back to the laboratory for a further incubation at 17°C, under agitation (200 rpm). All precautions were taken to prevent contamination during all the experiment. ATP concentration was measured by bioluminescence (luciferin/luciferase) all along a period of about four days, on triplicate volumes of 0.2 mL sampled under sterile conditions. Reagents from a commercial kit (Biothema, ATP Biomass kit) were used, and the

measurement was made with a bioluminometer Biocounter M2500 (Lumac). In addition, total cell counts have been carried out by epifluorescence microscopy at the beginning and at the end of the incubation, in triplicates. Volumes of 7.5 mL were fixed with equal volumes of prefiltered 4-5% formaldehyde, incubated 20 min in the dark in the presence of 2.5 µg mL^{-1} of 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI), filtered (GTBP 0.2 µm, Millipore) and filters were finally dried and mounted on slides to be observed. Cells present on random microscopic fields were counted (objective x40 for fungal cells, then x100 under immersion for bacteria), using a microscope Olympus BH-2.

2.2 Incubations of strains in the presence of organic compounds

For each isolated strain, liquid pure pre-culture was incubated at 17°C or 27°C in M200, TS (Biomerieux) or R2 (prepared according to the R2A Difco medium) broths. Pure cultures were then incubated under the same conditions and cells were harvested by centrifugation (4000 g, 15 min., 4°C) after 24 or 48 hours of growth, twice rinsed with NaCl 0.8 % and finally suspended in the test media containing one of the compounds to degrade. The test media were composed of cells originating from a volume of 25 mL of culture, for an OD_{575nm} of 10, with addition of about 20 mM of sodium formate (CH_3COONa) (Aldrich), lactic acid ($CH_3CHOHCOOH$, mix of isomers L and D, approximately 70:30) (Touzard & Matignon), sodium succinate ($NaOOC(CH_2)_2COONa$) (Aldrich) or 2 mM of formaldehyde and 0.8 mM of methanol from a mixed aqueous solution of formaldehyde/methanol ($HCHO/CH_3OH$) (Sigma 37 % v/v formaldehyde, stabilized with 15% v/v of methanol) in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.0. The values of culture volume used and of substrate concentration were adjusted to keep constant the ratio between cell density and amount of the compound to degrade. For a same strain, all tests were performed using cells from a same culture, which was dispatched between the tests media. One single compound was present in each of the incubation media, except for L- and D-lactate and for formaldehyde/methanol. A blank constituted by cells and phosphate buffer was systematically made. Incubations were carried out in 100 mL Erlenmeyer's under agitation (200 rpm), at 17°C or 27°C depending of the culture conditions previously used, corresponding to better conditions of growth of the considered strain. Samples of about 1 mL were taken at the beginning of the incubation and after 24 hours, centrifuged (12000 g, 3 min) to discard the cell pellet and the supernatants were kept frozen (-40 °C) until analysis.

2.3 Organic acids and methanol quantifications by ^1H NMR

Supernatants from biodegradation test media were prepared for ^1H NMR by mixing a volume of 450 µl of the sample with 50 µl of sodium tetra deuteriated trimethylsilyl propionate ($TSPd_4$, Eurisotop) in solution in D_2O. The latter was used for locking and shimming, while $TSPd_4$ constituted a reference for chemical shifts (0 ppm) and quantification. Final volumes of 500 µl of prepared samples were put in 5 mm-diameter tubes for NMR. Acquisition of spectra were made at 400.13 MHz, 21°C, on a Bruker Avance 400 spectrometer, by collection of 32 scans (90° pulse, 4789.27 Hz SW, 65.536 data points, 6.84 min total acquisition time). Water signal was eliminated by presaturation, and no filter was applied before Fourier transformation. Using Bruker software (X-Win NMR), baseline was corrected before integration for quantification. The concentration of metabolites was calculated as follow: $[m] = (9 * Ao * [TSPd_4])/(b * A_{ref})$, where $[m]$ is the concentration of the compound to quantify, Ao is the area of m resonance, A_{ref} is the area of $TSPd_4$ resonance, and 9 and b are respectively the numbers of protons of $TSPd_4$, resonating at 0 ppm, and of m.

2.4 Formaldehyde measurements

Formaldehyde is not detectable by ^1H NMR due to its chemical shift of about 4.5, masked by the signal of water. So a sensitive automatic analyser was used (Aerolaser AL4021). The

principle is based on the reaction of formaldehyde with acetylacetone and ammoniac, resulting in the formation of the detected fluorochrome complex ($\lambda_{excitation}$= 400 nm; $\lambda_{emission}$= 510 nm), for which light emission is directly proportional to formaldehyde concentration.

2.5 Utilization of ^{13}C labelled formaldehyde and analysis by ^{13}C NMR

Incubation in the presence of ^{13}C labelled formaldehyde (Eurisotop, solution at 20% v/v) was also carried out for three strains at 17°C and 5°C, to follow the formaldehyde metabolism and unambiguously identify formed compounds as metabolites. Incubations were carried out as previously exposed, and acquisitions of ^{13}C NMR spectra were performed at 100.62 MHz using the same 400 MHz spectrometer than for ^{1}H NMR. 512 scans were collected (90° pulse, 25125.63 Hz SW, 65.536 data points, 54.19 min total acquisition time), and spectra were treated using the X-Win NMR software. This method is not quantitative, and the analyser AL4021 and ^{1}H NMR have been used to quantify formaldehyde and of formed labelled metabolites.

3. Results and discussion

3.1 Evidence that cloud water provides a nutritive medium for microbial growth

A bulk cloud water sample was incubated, without any modification of composition and a few hours after sampling, in order to investigate its capacity to act as a nutritive medium for cells present in the sample. Evolution of the concentration in ATP in this cloud sample is shown in **figure 1**, and the total bacteria concentrations observed at the beginning of the incubation and after 97 hours at 17°C are also plotted.

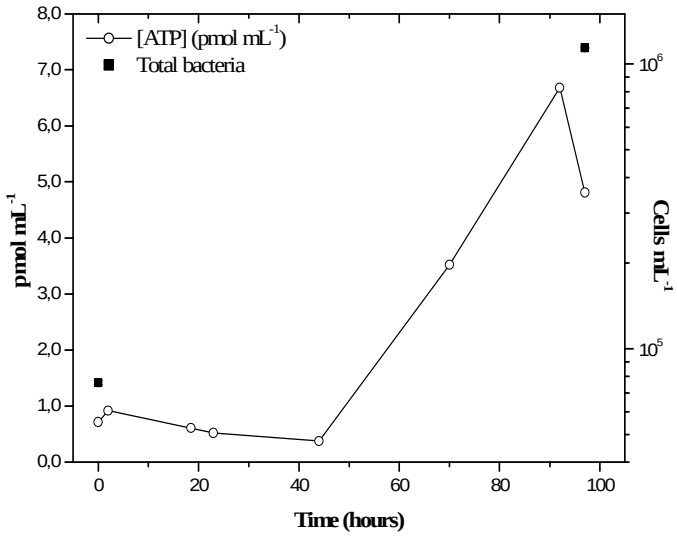


Figure 1: Time dependence of the concentration in adenosine tri-phosphate (ATP) in a bulk cloud water sample stored at 17°C under agitation (200 rpm) and closed against exogenous contamination. Total cells were counted by epifluorescence microscopy at the beginning and at the end of the experiment. Fungal cells (not plotted) were respectively 2.7 ± 0.6 x10^3 mL^{-1} and 1.5 ± 0.6 x10^3 mL^{-1}. Errors bars obtained from triplicates are masked by symbols.

We observe that after a lag time of about 45 hours during which ATP concentration is rather constant, an important activity appears. After 90 hours, the ATP concentration reaches about 7 times the value measured at the beginning. Furthermore, during the time of the incubation, while fungal cells concentration is not significantly changed, bacteria concentration is increased from 7.6 x 10^4 ± 1.3 x 10^3 mL^{-1} to 1.1 x10^6 ± 4.6 x 10^3 mL^{-1}. Such an observation suggests that bacteria find nutrients to multiply in the liquid phase of clouds, and confirms a previous hypothesis made by Fuzzi et al. (1997). In this sample, organic acid measurements

made by ionic chromatography show the presence of potential substrates. For instance, concentrations in formate and acetate were about 4 µM, and many other organic compounds like succinate, malonate, oxalate and formaldehyde were detected (Parazols et al., unpublished data). The lag time could correspond to the selection of a set of strains presenting the capacity to develop under the low nutrient concentration encountered. It could also be attributed to mechanical and thermal shocks caused by the sampling by impaction and by the conservation before incubation.

3.2 Efficiencies of biodegradation of atmospheric organic compounds

Biodegradation capacities of a total of 60 aerobic strains previously isolated from cloud water collected at the puy de Dôme summit (1465 m asl), including bacteria and yeasts, have been tested on formate, acetate, lactate, succinate, and on a mixed solution of formaldehyde and methanol. 30 Gram positive, 20 Gram negative and 4 unidentified bacteria and 6 yeasts strains have been investigated.

Results are given separately for Gram positive, Gram negative and yeasts isolates in **figure 2,** which give an overview of the potentialities of all the tested strains. In **figure 3**, biodegradation efficiencies of strains belonging to the main bacterial genera recovered from cloud water (3 strains of *Arthrobacter*, 3 of *Micrococcus*, 6 of *Bacillus*, 7 of *Staphylococcus*, 5 of *Sphingomonas* and 9 of *Pseudomonas*) and yeasts are detailed for each compound. These two figures will be discussed simultaneously all along the presentation of this section. Means and medians are generally distinct, indicating that data does not follow Gaussian distributions. Medians are generally higher than means, and the former will thus be preferably considered to compare biodegradation tests between themselves.

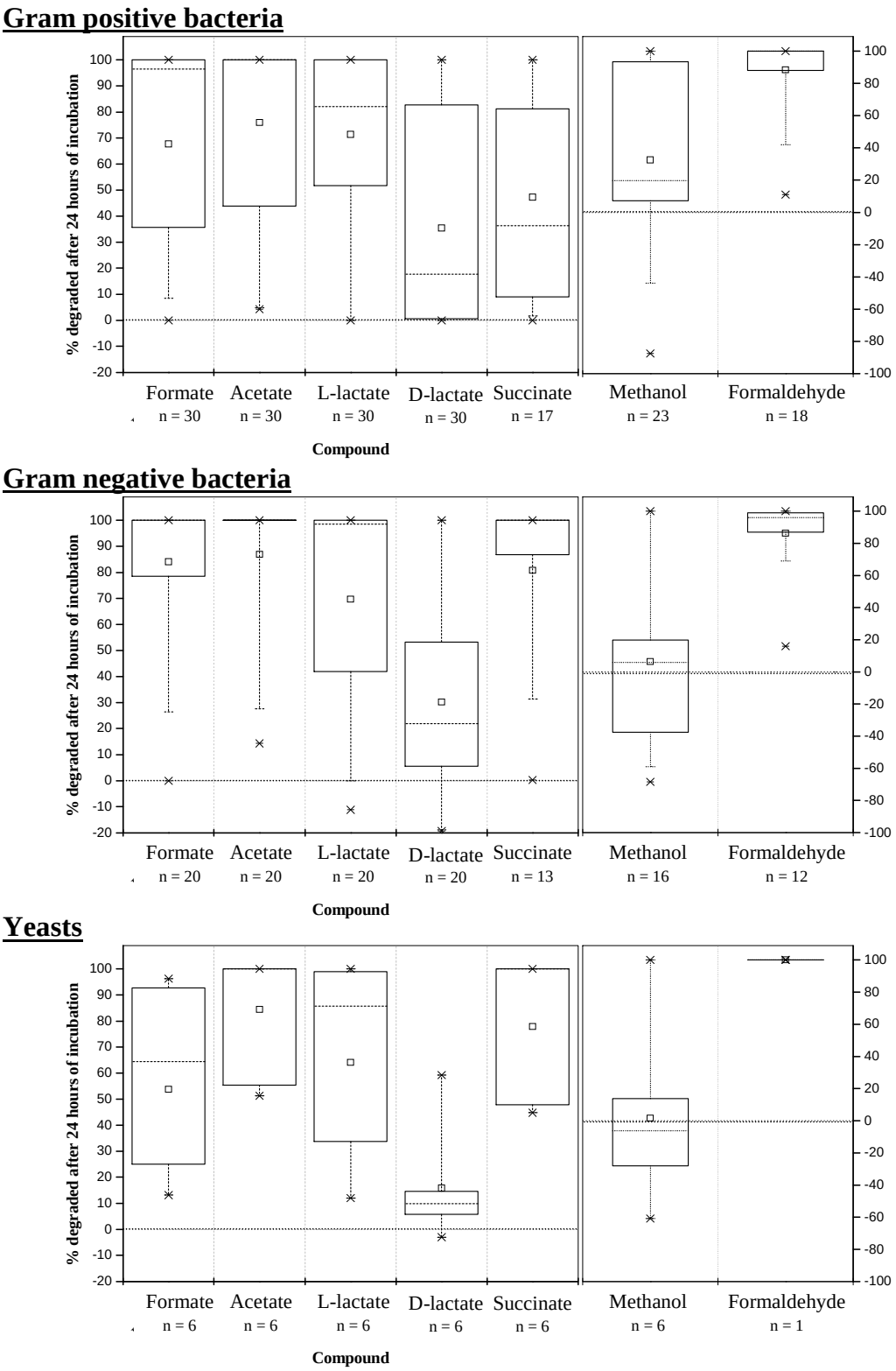


Figure 2: Percentages of biodegradation for each compound by Gram positive and Gram negative bacteria and yeasts after 24 hours of incubation. Boxes represent medians (---) and 25-75percentiles; □ means; × minima and maxima. The number of strains considered in each case is indicated. Median is not precised when n < 5.

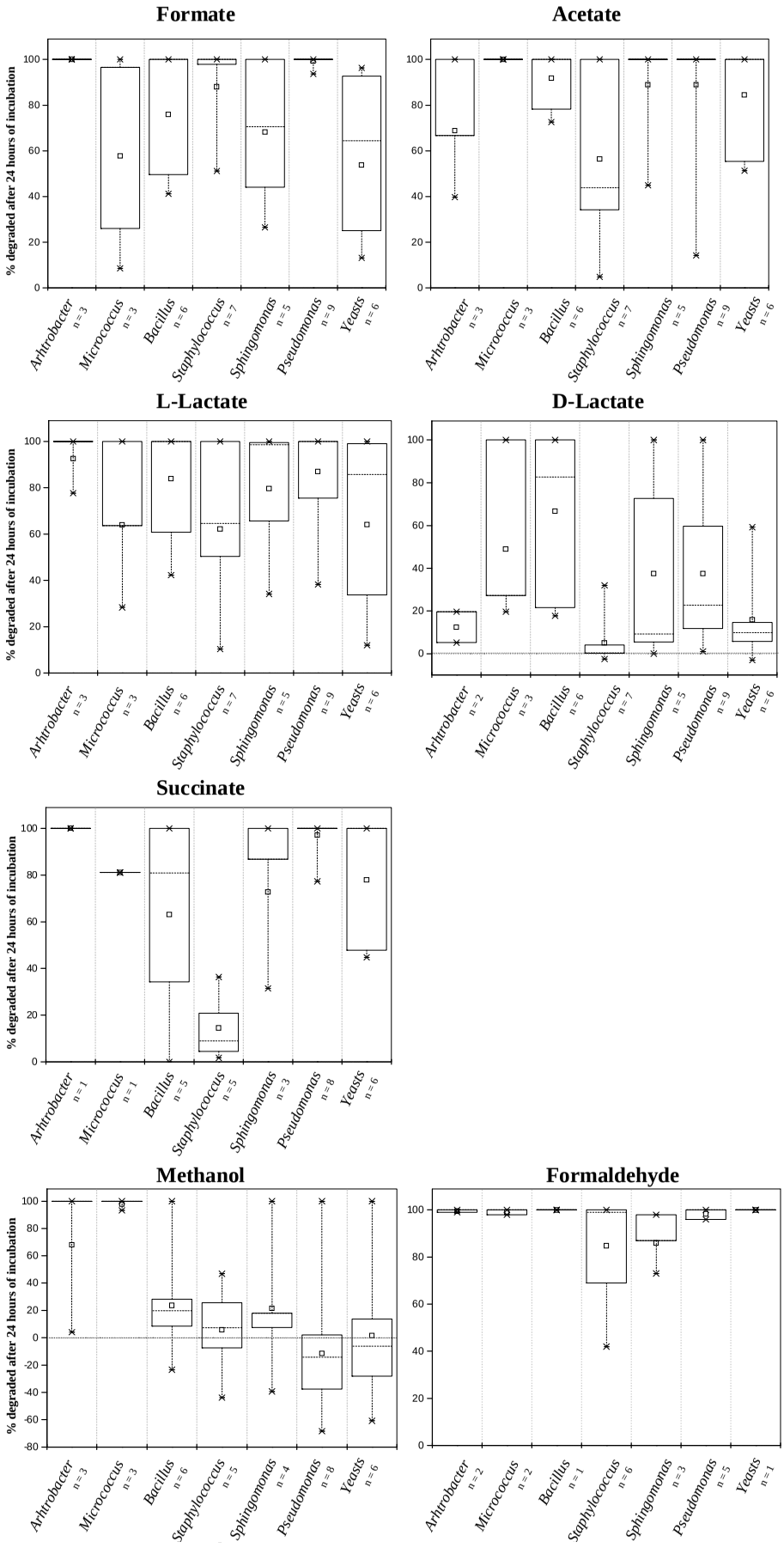


Figure 3: Percentages of biodegradation for each compound by main genera of bacteria and total yeasts found in cloud water, after 24 hours of incubation (*Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Sphingomonas* and *Pseudomonas* and yeasts). Boxes represent medians (---) and 25-75percentiles; □ means; × minima and maxima. The number of strains considered in each case is indicated. Median is not precised when n < 5.

On the whole, highest efficiencies of degradation are observed for Gram negative bacteria (**figure 2**). It is of first interest since Gram negative bacteria are thought to be the more active cells present in clouds, as they often develop at low temperature (Amato et al., 2007). In addition, formate, acetate and formaldehyde appear to be the more actively transformed compounds, and they are also the more concentrated organic compounds found in cloud water. All these results support a potential activity of biodegradation of those compounds in cloud water.

For formate, Gram negative and Gram positive bacteria and yeasts degrade respectively, in median, 100%, 97% and 65% of the amount present at the beginning of the test (**figure 2**). Only a few strains have a poor activity toward this compound, especially *Micrococcus*, *Sphingomonas* and yeasts strains for the main genera (**figure 3**). On the contrary, all of the strains of *Arthrobacter* and *Pseudomonas* affiliations completely remove formate from the incubation media within 24 hours of incubation.

A large majority of strains degrade acetate very efficiently, especially among Gram negative and yeasts isolates. For the main genera present in cloud water, highest activities are noticed among *Micrococcus*, *Sphingomonas* and *Pseudomonas* groups, for which percentages of biodegradation reach 100% in most of the cases. On the other hand, *Staphylococcus* species regroup the less efficient strains with a median situated under the value of 40%.

For lactate, as expected, biodegradation is dependent on the isomer form considered, and is always better in the case of L-lactate. Indeed, medians are ranging from 60% (*Staphylococcus* group) to 100% (*Bacillus* and *Pseudomonas* groups) for the latter, while for D-Lactate it falls to less than 50% for a majority of strains, and is even close to 0% for the entire *Staphylococcus* group. Only a few strains are able to degrade D-lactate, especially among strains belonging to *Micrococcus* and *Bacillus* for the selected genera. For some *Staphylococcus* and yeasts strains, an increase of concentration of D-lactate is even observed (negative value of biodegradation), likely resulting from the transformation of L-lactate by a racemase.

Concerning succinate, percentages of biodegradations are very variable from one group to another, often superior to 90% among Gram negative bacteria, but lower than 20% for 4 out of all the 5 *Staphylococcus* species tested.

Methanol and formaldehyde were studied as a mix in the incubation media due to the use of a commercial solution in which formaldehyde is stabilized with methanol. In this particular case, the rapid elimination of formaldehyde seems to be a priority for cells: almost all strains transform the total amount of this compound in 24 hours (or less). A related production of methanol (resulting in a negative value of biodegradation) is consequently often observed. **Figure 2 and figure 3** show that Gram positive bacteria highly transform both formaldehyde and methanol, while the methanol often accumulates in the cases of Gram negative (especially *Pseudomonas*) and yeasts strains.

3.3 Metabolic considerations

From a microbiological point of view, several metabolic behaviours toward the different compounds are encountered among the main groups isolated from cloud water (**figure 3**). First, strains of the genus *Staphylococcus* have a great specificity for formate, being less efficient than all the other groups toward each of the other compounds. *Sphingomonas* and yeasts are poor consumers of formate and prefer acetate, L-lactate or succinate. *Micrococcus* is situated between these two extremes, degrading methanol and formaldehyde very efficiently, but not formate. *Bacillus* strains seem to have no special requirement, as well as *Arthrobacter* and *Pseudomonas*, except D-lactate for the former and methanol for the latter.

3.4 Carboxylic acids

The metabolic pathways involved in the biotransformation of carboxylic acids cannot be determined with certitude by solely considering the data presented here. However, it gives indications when metabolites are produced in the solution and then are detected by ^{1}H NMR analysis. **Table 1** reports the chemical shifts and multiplicity of signals related to the tested carboxylic acids, and to signals corresponding to metabolites (*i.e.* when they are not detected in the blank).

Compound		Chemical shift (ppm)	Metabolite detected
Formate	**H**-COO$^-$	8.46, singlet	None
Acetate	**H$_3$**C-COO$^-$	1.92, singlet	Triplet at 1.05 ppm Doublets at 5.80 ppm and 7.55 ppm
Lactate	**H$_3$**C-CHOH-COO$^-$	1.45, doublet (L isomer) 1.33, doublet (D isomer)	Acetate (1.92 ppm, singlet) Pyruvate (2.38 ppm, singlet) Triplets at 2.4 and 3.0 ppm
Succinate	$^-$OOC-(C**H$_2$**)$_2$-COO$^-$	2.41, singlet	Acetate (1.92 ppm, singlet) Fumarate (6.50 ppm, singlet) Triplet at 3.00 ppm Singlets at 1.35 ppm, 1.50 ppm and 5.45 ppm

Table 1: Carboxylic acids tested, ^{1}H NMR chemical shifts of the groups in bold (respect to TSPd$_4$, at pH 7.0) and related metabolites detected in the incubation media.

Formate is the shorter existing carboxylic acid, and microbial metabolism can only lead to its direct oxidation to carbon dioxide (KEGG Metabolic Pathway database) (**see figure 4a**). As a consequence, no metabolite is detected here.

Acetate is a link taking place in many routes of the central metabolism mainly through the complexation with Coenzyme A to enter the Krebs cycle. In addition, the uptake of acetate by cells does not require, most of the time, any carrier system as it diffuses through the cytoplasmic membrane (Kell et al., 1981). This certainly explains the high capacity of biodegradation generally noticed, among all microbial groups. However, few strains have a low activity on that substrate, especially among genera *Bacillus* and *Staphylococcus* for Gram positive bacteria, and a very low value (5 %) is observed for an Actinobacteria: *Frigoribacterium* sp. PDD14b-13 (DQ512796). Unidentified products were released in the incubation media in some cases, resonating as doublets at 5.80 ppm and 7.5 ppm, or as a triplet at 1.05 ppm (**figure 5a**).

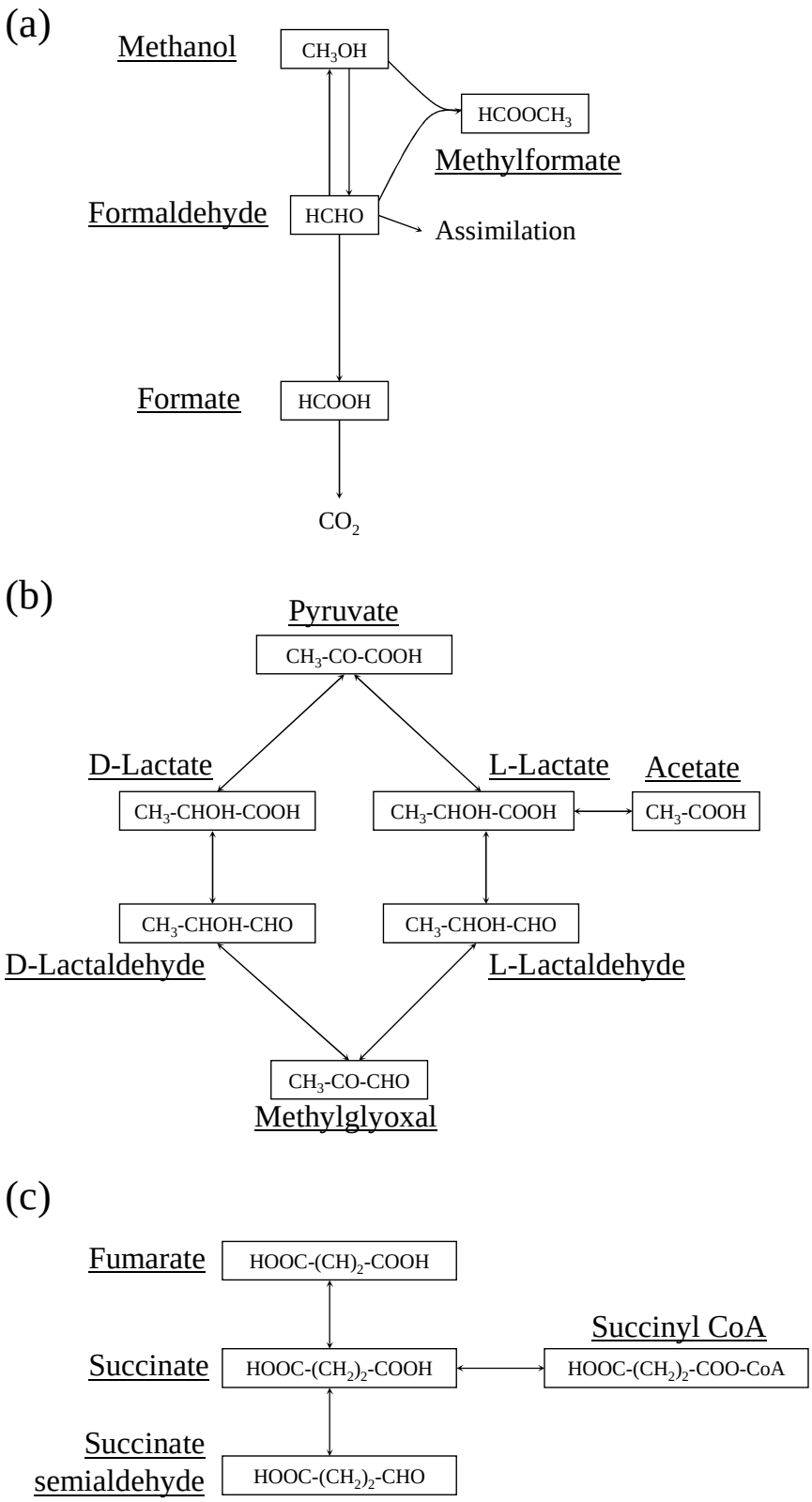


Figure 4: Schematic representation of known metabolic pathways involving methanol, formaldehyde and formate **(a)**, lactate **(b)** and succinate **(c)**.

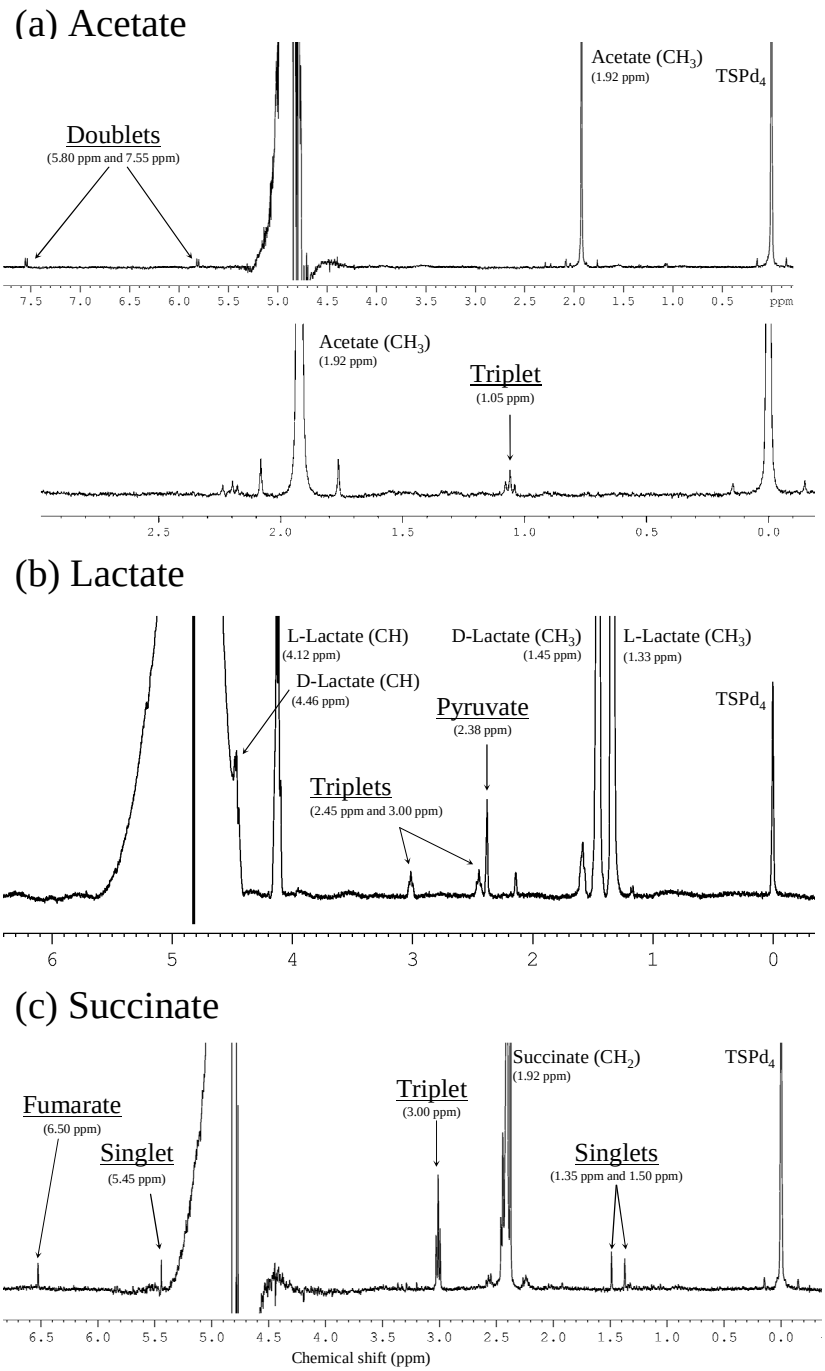


Figure 5: Examples of ^{1}H NMR spectra showing signals that can appear during incubation with acetate **(a)**, lactate **(b)** and succinate **(c)**. Spectra presented on **(a)** were obtained with strains of *Bacillus* sp. (upper trace)) and *Curtobacterium flaccumfaciens* (lower trace); on **(b)** *Pseudomonas viridiflava* and on **(c)** *Curtobacterium flaccumfaciens*. The large signal around 5 ppm corresponds to the signal of water.

For lactate, different metabolic pathways exist depending on the isomer form L or D (**figure 4b**). A racemase is known to be involved in the transformation of an isomer form of lactate to the other (Kitahara et al., 1953), but is rarely encountered, referring to the KEGG database. For both forms, lactate can enter the central microbial metabolism either by oxidation to pyruvate or reduction to lactaldehyde (it can also be complexed with Coenzyme A; not shown on the scheme). A fourth way involves only L-lactate, and consists in its decarboxylation, leading to the production of acetate. Acetate (δ = 1.92 ppm) and pyruvate (δ = 2.38 ppm) productions were unambiguously identified, while the apparition of non identified triplet

signals is often observed (δ = 2.4 ppm and 3.0 ppm) (**figure 5b**). Interestingly, as D-lactate concentration increases in the presence of the two isomers (leading to a negative value of biodegradation on the graphs), two Gram negative bacterial strains likely express a lactate racemase: *Methylobacterium* sp. PDD7b-5 (DQ512770) and *Flavobacterium* sp. PDD14b-7 (DQ512791). The presence of low levels of pyruvate in cloud water was reported by Löflund and collaborators (2002), and one could see here the signature of such biological activity.
Succinate is largely involved in the central metabolism (Krebs cycle) and represents a metabolic link between succinyl-CoA and fumarate (**figure 4c**). Its oxidation to fumarate is directly linked to the production of ATP, as it takes place in the oxidative phosphorylation. We often observe the production of a compound resonating as a singlet at 6.5 ppm, which is assigned to the signal of the CH signal of fumarate (HOOC-HC=CH-COOH) (**figure 5c**). A release of acetate is also observed in some cases, as well as an unidentified product resonating as a triplet centred at 3.0 ppm. The latter can also corresponds to one of the two triplets observed under incubation with lactate, the other being masked by the signal of succinate itself. Other non assigned singlets are also present in some spectra corresponding to the incubation media of strains in the presence of succinate.

3.5 Methanol and formaldehyde

The values of biodegradation determined for methanol show a large dispersion, ranging from about -80 % (production of methanol) to 100 % (**figure 2**). The concentration of methanol measured in our analysis results from the equilibrium between on one hand its degradation to formaldehyde, and on one other hand its production from formaldehyde (see **figure 4a**). Formaldehyde degradation is very efficient in all microbial groups, and this compound consequently does not accumulate when methanol is oxidized. Considering the known high toxicity of formaldehyde, the priority for the cells is likely to eliminate it early, and in many cases methanol concentration is thus increasing during the 24 hours of the test.
In order to identify more clearly and with certainty the metabolites produced in relation to formaldehyde only, we incubated one selected strain in the presence of pure ^{13}C labelled formaldehyde. The strain was arbitrary chosen amongst the bacteria for its interesting behaviour toward the mixed solution of formaldehyde/ methanol. It was identified as an Actinobacterium, *Frigoribacterium* sp. PDD14b-13 (DQ512796). Four fates of formaldehyde are possible through microbial metabolic pathways (**figure 3a**): (i) its assimilation by the serine and/or the ribulose monophosphate pathways (the latter involves a decarboxylation); (ii) its reduction to methanol; (iii) its oxidation to formate; and (iv) its reaction with methanol, forming methylformate ($HCOOCH_3$) (Mason & Sanders, 1989; Murdanoto et al., 1997; Delort, 2006). The second and third ways involve an oxydoreductase and/or a dismutase (Kato et al., 1984), the latter simultaneously producing formate and methanol from two molecules of formaldehyde. In addition, several known formaldehyde dehydrogenases are only dedicated to formaldehyde reduction (Vorholt, 2002), and a methanol dehydogenase also exists, catalyzing the production of formaldehyde.
Analyses of the supernatants by ^{13}C NMR clearly show that the strain of *Frigoribacterium* highly transforms formaldehyde to formate and methanol (**figure 6**).

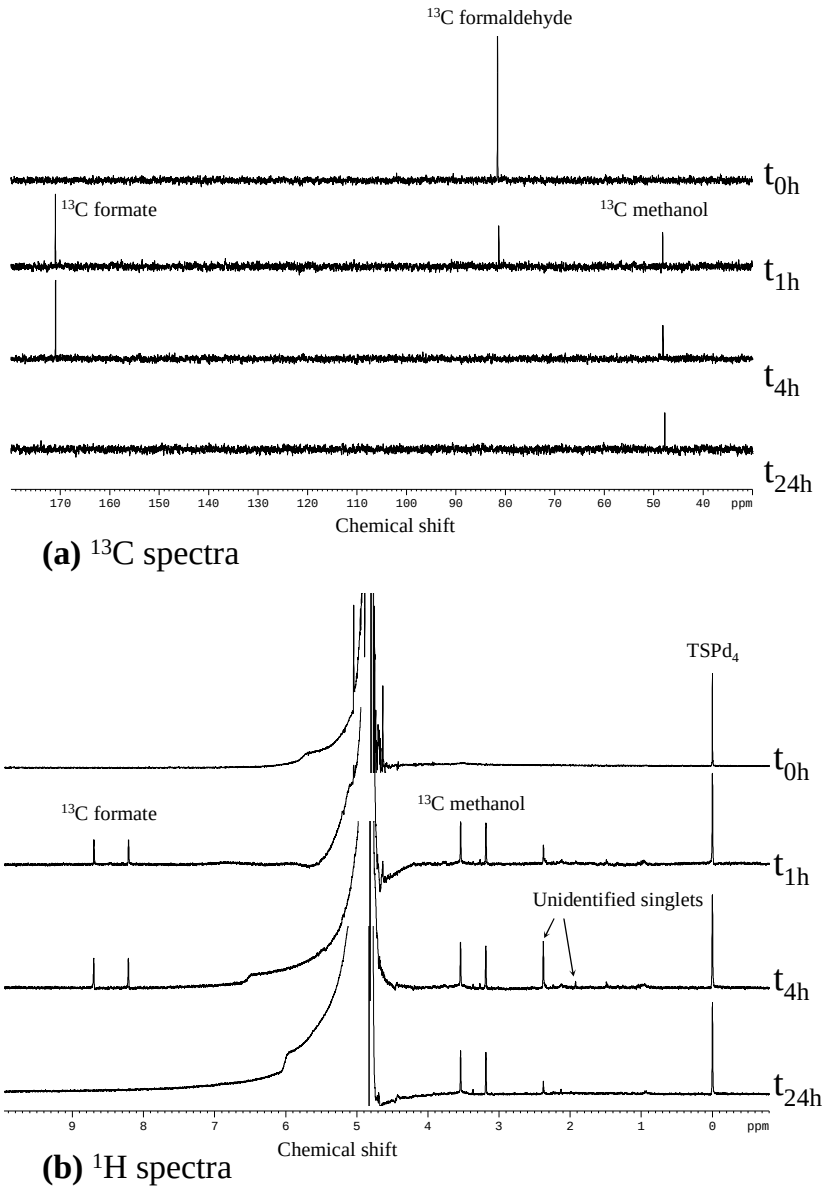


Figure 6: (a) ^{13}C NMR spectra showing the transformation of ^{13}C formaldehyde present at the beginning into ^{13}C methanol and ^{13}C formate during the time of incubation (example of the strain *Frigoribacterium* sp. PDD14b-13 (DQ512796) incubated at 17°C. **(b)** Corresponding ^{1}H NMR spectra, with doublets corresponding to ^{13}C labelled compounds. Singlet signals are related to non labelled compounds.

After les than 4 hours, no formaldehyde is remaining in the solution that contained approximately 2 mM at the beginning. Then, formate is oxidized to CO_2, while methanol is still not transformed after 24 hours. ^{1}H NMR spectrum of the same samples also show the presence of ^{13}C formate and ^{13}C methanol, the doublets indicating that these compounds are actually labelled with the ^{13}C originates from formaldehyde. In addition, other compounds are released, corresponding to signals at 1.45 ppm, 1.95 ppm, 2.4 ppm and 2.15 ppm, resonating as singlets. Such signals can correspond either to non labelled metabolites due to a decarboxylation related to their assimilation (loss of the ^{13}C to $^{13}CO_2$) or to metabolites produced from endogenous storage compounds.

Formaldehyde is strongly linked to the chemistry of free radicals (Satsumabayashi et al., 1995; Riedel et al., 1999; Kawamura et al., 2005), and is consequently of first interest in atmospheric chemistry. Monod et al. (2000) studied photochemistry of methanol in aqueous phase and showed that free radicals produced by solar light also oxidize methanol to

formaldehyde and formate. The results obtained here show that strains found in clouds can be responsible of the same transformations than those induced by photochemistry.

4. Conclusion

In this study we investigated the interactions between micro-organisms and the chemical environment encountered in cloud water. First we observed that, as it was discussed for several years, cloud water solution can provide a niche for the multiplication of bacteria, supported by the organic compounds it contains. As a consequence, the uptake of chemical compounds by micro-organisms could have an effect on the whole composition of cloud water, assumed to be of first importance in atmospheric chemistry. We tested a total of 60 microbial strains (bacteria and yeasts) previously isolated from cloud water samples for their ability to degrade or transform various single organic compounds that are relatively highly present in cloud water: carboxylic acids (formic, acetic, lactic and succinic), formaldehyde and methanol. Strains generally show a high activity on acetate, formate, L-lactate and formaldehyde. These are also the main organic compounds found in cloud water. Biodegradation of D-lactate appears to be relatively low. Many genera often encountered in cloud water, like *Pseudomonas* or *Bacillus*, highly degrade all the compounds tested. On the contrary, *Staphylococcus* species are very specialized toward formate degradation. For succinate, results show high variations depending on the microbial groups.
Several metabolites were detected, like pyruvate from lactate transformation or fumarate from succinate. These compounds were actually detected in clouds, and can originate from such a microbial activity. Metabolisms of methanol and formaldehyde are strongly linked, and incubations in the presence of ^{13}C labelled formaldehyde bring the proof that both oxidation and reduction of formaldehyde can be microbiologically catalysed by strains found in cloud water. As such reactions also involve photochemistry, microbiological and photochemical processes can act conversely or simultaneously on the chemistry of cloud water. Consequently, the concentration in a given compound can be negatively as well as positively influenced, and actual models of atmospheric chemistry could under or overestimate the influence of some reactions by considering only free radicals implication. The relatively poor knowledge about their contribution does not allow any conclusion about an actual involvement of micro-organisms in atmospheric chemistry, but experimental results in favour of such a hypothesis are constantly improving.
In a companion paper, we present some special investigations concerning the effect of low temperatures on the development of selected strains and their metabolism toward organic acids. The results and discussion are centred on the life in clouds, and on quantitative estimations of the potentialities of micro-organisms to cloud water chemistry.

Acknowledgements
The research was funded by the French LEFE-CHAT from the CNRS and the ORE-BEAM program of the French Ministry of Research. Pierre Amato is also the recipient of a scholarship from the French Ministry of Research. Amina Melahoui is under and AUF fellowship. Elodie Cano is greatly acknowledged for her technical help.

References
Amato P., Ménager M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. & Delort A-M. (2005). Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds. *Atmospheric Environment* 39: 4143-4153.

Amato P., 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.

Ariya P.A., Nepotchatykh O., Ignatova O. & Amyot M. (2002). Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. *Geophysycal Research Letters* 29: 2077-2081.

Ariya P.A. & Amyot M. (2004). New directions: the role of bioaerosols in atmospheric chemistry and physics. *Atmospheric Environment* 38, 1231-1232.

Bauer H., Kasper-Giebl A., Löflund M., Giebl H., Hitzenberger R., Zibuschka F. & Puxbaum H. (2002). The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. *Atmospheric Research* 64, 109-119.

Chameides W.L. & Davis D.D. (1983). Aqueous-phase source for formic acid in clouds. *Nature* 304, 427-429.

Delort A-M. (2006). Use of NMR to study *in situ* bioconversion of gaseous compounds. In *Gas resources for resource recovery*. Lens. P. Ed. IWA Publishing, London, Chapter 9, 117-131.

Fuzzi S., Mandrioli P. & Perfetto A. (1997). Fog droplets – An atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmospheric Environment* 31, 2, 287-290.

Fuzzi S., Facchini M.C., Decesari S., Matta E. & 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.

Granby K., Christensen C.S. & Lohse C. (1997). Urban and semi-rural observations of carboxylic acids and carbonyls. *Atmospheric Environment* 31, 10, 1403-1415.

Grosjean D. (1989). Organic acids in south California air: ambient concentrations, mobile source emissions, in situ formation and removal processes. *Environmental Science and Technology* 23, 1506-1514**.**

Kato N., Kobayashi T., Shimao M. & Sakazawa C. (1984). Properties of formaldehyde dismutation catalyzing enzyme of *Pseudomonas putida* F61-a. *Journal of Biotechnology* 1, 295-273.

Kawamura K., Steinberg S., Ng L. & Kaplan I.R. (2001). Wet deposition of low molecular weight mono- and di-carboxilic acids, aldehydes and inorganic species in Los Angeles. *Atmospheric Environment* 35, 3917-3926.

KEGG PATHWAY database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) http://www.genome.jp/kegg/pathway.html.

Kell D.B., Peck M.W., Rodger G. & Morris J.G. (1981). On the permeability of weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Community* 99, 81-88.

Kieber R.J., Rhines M.F., Willey J.D. & Brooks Avery Jr. D. (1999). Rainwater formaldehyde: concentration, deposition and photochemical formation. *Atmospheric Environment* 33, 3659-3667.

Kitahara K., Obayashi A. & Fukui, S. (1953). Racemase I cell-free racemase. *Enzymologia* 15, 259-266

Kumar N., Kulshrestha U.C., Khare P., Saxena A., Kumari K.M. & Srivastava S.S. (1996). Measurements of formic and acetic acid levels in the vapor phase at Dayalbagh, Agra, India. *Atmospheric Environment* 30, 20, 3545-3550.

Löflund M., Kasper-Giebl A., Schuster B., Giebl H., Hitzenberger R. & PuxbaumH. (2002). Formic, acetic oxalic and succinic acid concentrations and their contribution to organic carbon in cloud water. *Atmospheric Environment* 36, 1553-1558.

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.

Mason R.P. & Sanders J.K. (1989). *In vivo* enzymology: a deuterium NMR study of formaldehyde dismutase in *Pseudomonas putida* F61a and *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 28, 5, 2160-2168.

Monod A., Chebbi A., Durand-Jolibois R. & Carlier P. (2000). Oxidation of methanol by hydroxyl radicals in aqueous solution under simulated cloud droplet conditions. *Atmospheric Environment* 34, 5283-5294.

Murdanoto A.P., Sakai Y., Konishi T., Yasuda F., Tani Y. & Kato N. (1997). Purification and properties of methyl formate synthase, a mitochondrial alcohol dehydrogenase, participating in formaldehyde oxidation in methylotrophic yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 5, 1715-1720.

Parazols M., Marinoni A., Amato P., Abida O., Laj P, & Mailhot G. (2006). Speciation and role of iron in cloud droplets at the puy de Dôme station. *Journal of Atmospheric Chemistry* 54, 3, 267-281.

Puxbaum H., Rosenberg C., Gregori M., Lanzerstorfer C., Ober E. & Winiwarter W. (1988). Atmospheric concentrations of formic and acetic acid in eastern and northern Austria. *Atmospheric Environment* 22, 2841-2850.

Riedel K., Weller R. & Schrems O. (1999). Variability of formaldehyde in the Antarctic atmosphere. *Physical Chemistry and Chemical Physic* 1, 5523-5527.

Sattler B., Puxbaum H. & Psenner R. (2001). Bacterial growth in supercooled could droplets. *Geophysical Research Letters* 28, 2, 239-242.

Satsumabayashi H., Kurita, H., Chang Y-S., Carmichael G.R. & Ueda H. (1995). Photochemical formations of lower aldehydes and lower fatty acids under long-range transport in central Japan. *Atmospheric Environment* 29, 2, 255-266.

Sellegri K., Laj P., Marinoni A., Dupuy R., Legrand M. & Preunkert S. (2003). Contribution of gaseous and particulate species to droplet solute composition at the Puy de Dôme, France. *Atmospheric Chemistry and Physics* 3, 1509-1522.

Suzuki Y., Imai S., Kawakami M., Masuda K. & Akasaka K. (1998). Identification and determination of low-molecular weight organic compounds in contaminated fog water using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 355-362.

Van Pinxteren D., Plewka A., Hofmann D., Müller K., Kramberger H., Svrcina B., Bächmann K., Jaeschke W., Mertes S., Collett Jr. J.L. & Herrmann H. (2005). Schmücke hill cap cloud and valley stations aerosol characterisation during FEBUKO (II): organic compounds. *Atmospheric Environment* 39, 4305-4320.

Voisin D., Legrand M. & Chaumerliac N. (2000). 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.

Vorholt J.A. (2002). Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Archives of Microbiology* 178, 239-249.

IV.1.c) Compléments de résultats : métabolites produits

IV.1.c.(i) Les acides carboxyliques

La haute dégradabilité des acides carboxyliques était prévisible quand on considère leur importance au niveau du métabolisme. Ils sont tous le plus souvent rapidement dégradés, hormis l'isomère D du lactate. Des composés apparaissent fréquemment dans le milieu suite à l'incubation. Les différents signaux détectés lors des tests métaboliques correspondants sont listés dans le tableau 15 ci-dessous.

Composé	Métabolites	Signal RMN ^{1}H	Constante de couplage (Hz) (J_{H-H})	Souches	
Formiate	**Méthanol**	Singulet à 3,36 ppm	-	12b-6	
	n.a*	Singulet à 3,6 ppm	-	5b-5 (17°C et 5°C)	
Acétate	**n.a***	Triplet à 1,05 ppm	-	13b-4	
	n.a*	Doublet à 5,8 ppm	7,6 Hz	5b-2 (27°C)	
	n.a*	Doublet à 7,5 ppm	7,8 Hz	5b-2 (27°C)	
Lactate (L et D)	**n.a***	Singulet à 2,38 ppm	-	6b-1	
	Pyruvate	Singulet à 2,28 ppm	-	5b-2 (27°C) 12b-6 5b-2 (27°C) 14b-6 (27°C)	
	n.a*	Triplet à 2,4 ppm	7,1 Hz	7b-13 (17°C) 14b-2 (17°C) 14b-1 (17°C)	7b-7 6b-1 5b-1 (27°C)
	n.a*	Triplet à 3,0 ppm	6,9 Hz	7b-13 (17°C) 14b-2 (17°c) 14b-1 (17°C)	7b-7 6b-1 5b-1 (27°C)
Succinate	**Fumarate**	Singulet à 6,5 ppm	-	7b-13 (17°C et 5°C) 6b-1 14b-1 7b-7 5b-1 (27°C)	5b-16 (27°C) 5b-3 (17°C) 5b-8 (27°C) 14b-6 (27°C)
	n.a*	Singulet à 1,9 ppm (acétate ?)		14b-5	
	n.a*	Triplet à 3,0 ppm	6,9 Hz	14b-2 (17°C) 13b-4 14b-1 (17°C et 5°C)	14b-14 (17°C) 5b-16 (27°C) 5b-11 (27°C)

Tableau 15 : Signaux des métabolites produits (ou composés relargués) en rapport avec la dégradation des acides carboxyliques par les différentes souches (liste des souches non exhaustive). (**n.a*** non attribué).

Les signaux non attribués pourraient également correspondre à de composés seulement relargués en relation avec le métabolisme du substrat testé, sans qu'ils en soient des métabolites directs. Cette remarque vaut aussi pour certains signaux retrouvés lors des tests en présence de méthanol/formaldéhyde (voir le tableau 16 plus loin).

Les signaux retrouvés le plus souvent lors d'incubations en présence d'acétate, de lactate et de succinate sont présentés sur les figures 59 et 60 ci-dessous.

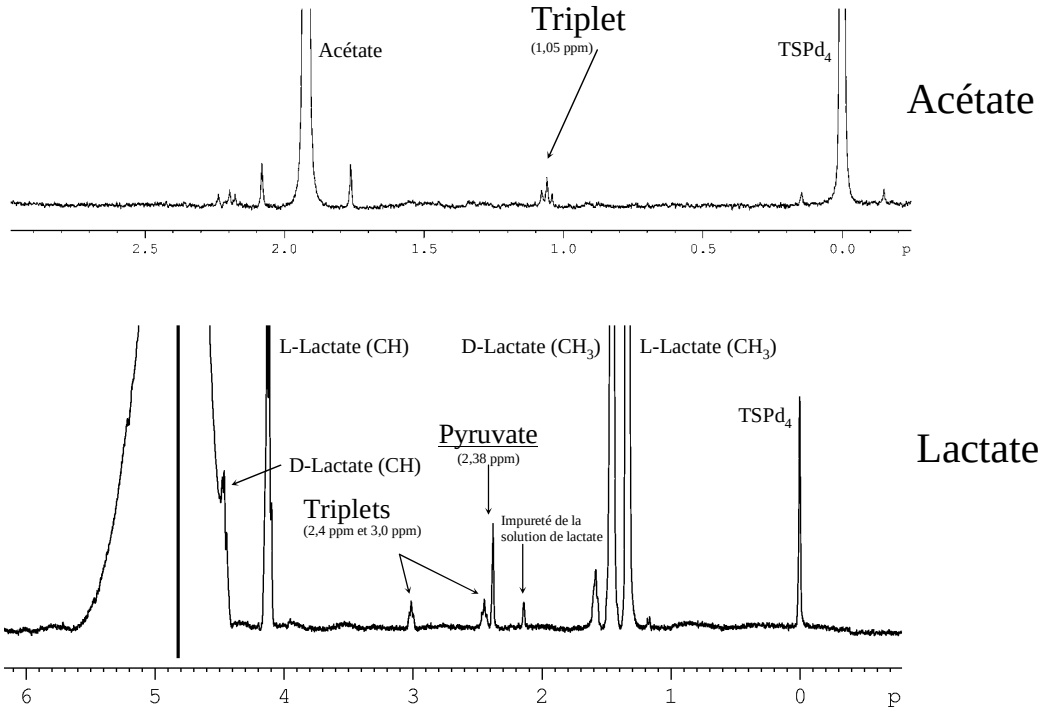


Figure 59 : Exemples de spectres RMN ^{1}H correspondant aux milieux contenant l'acétate **(en haut)** et le lactate **(en bas)** après 24 heures d'incubation, montrant les produits formés retrouvés le plus souvent parmi les différentes souches.

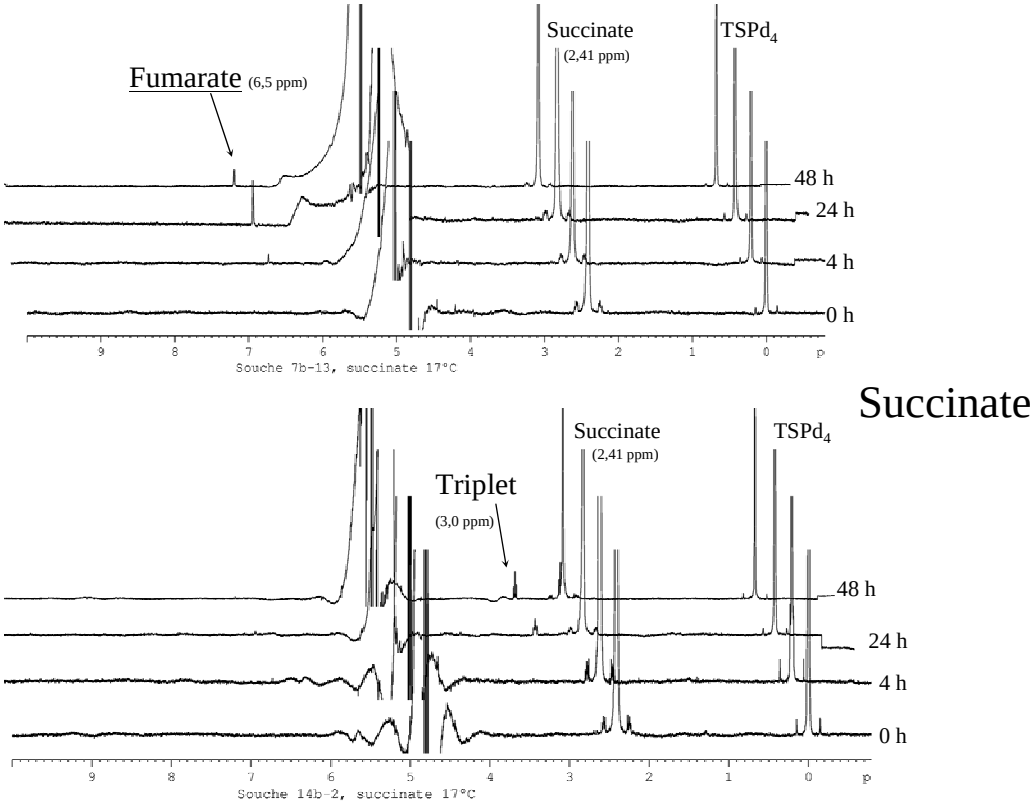


Figure 60 : Exemples de spectres RMN ^{1}H correspondant au milieu contenant le succinate après 4, 24 et 48 heures d'incubation, montrant les produits le plus souvent formés ou relargués au cours de l'incubation, parmi les différentes souches.

En récapitulant, les résultats de ces tests métaboliques montrent que :

- du **pyruvate** est produit en présence de **lactate**.
- du **fumarate** est produit en présence de **succinate**.
- de façon étonnante, du **méthanol** semble être produit en présence de **formiate** notamment pour la souche 12b-6. Ce résultat, s'il est confirmé, mettrait en jeu une ou des enzymes encore inconnues à l'heure actuelle.
- concernant les **signaux non attribués**, on remarque essentiellement que des triplets (2,4 et 3,0 ppm) apparaissent avec de nombreuses souches lors d'incubation en présence de lactate ou de succinate. Les constantes de couplage mesurées (environ 7,0 Hz) suggèrent que ces signaux correspondent tous les deux à un même composé, et le triplet à 2,4 ppm est vraisemblablement masqué par le succinate lui-même quand il est présent. Des investigations plus poussées sont nécessaires pour identifier ce composé.
- en présence d'acétate, certaines souches (exemple de la souche 5b-2) produisent un composé résonnant sous la forme d'un doublet de doublets (5,8 et 7,5 ppm), comme l'attestent les constantes de couplage similaires de chacun des doublets (environ 7,7 Hz).
- de nombreux composés sont produits, apparaissant sous la forme de singulets, et restent non attribués.

Concernant les voies métaboliques qui pourraient être impliquées avec chacun des substrats, elles sont indiquées dans la publication. Voir également à ce sujet la partie de la synthèse bibliographique consacrée au métabolisme microbien.

IV.1.c.(ii) Cas du formaldéhyde et du méthanol

- Attribution des signaux

Les tests de dégradation du méthanol et du formaldéhyde mettaient en jeu une solution commerciale où les 2 composés étaient mélangés. La première étape consistait donc à identifier les signaux RMN ^{1}H de chacun d'entre eux. Le déplacement chimique du formaldéhyde étant supposé être aux alentours de celui de l'eau, l'attribution des pics a été faite à partir d'une dilution de cette solution dans du D_2O pour limiter le pic parasite de H_2O. Le spectre HSQC H-^{13}C (^{1}H en abscisse, ^{13}C en ordonnée) correspondant est présenté sur la figure 61, et a permis la détermination des déplacements chimiques ^{1}H et ^{13}C du formaldéhyde et du méthanol.

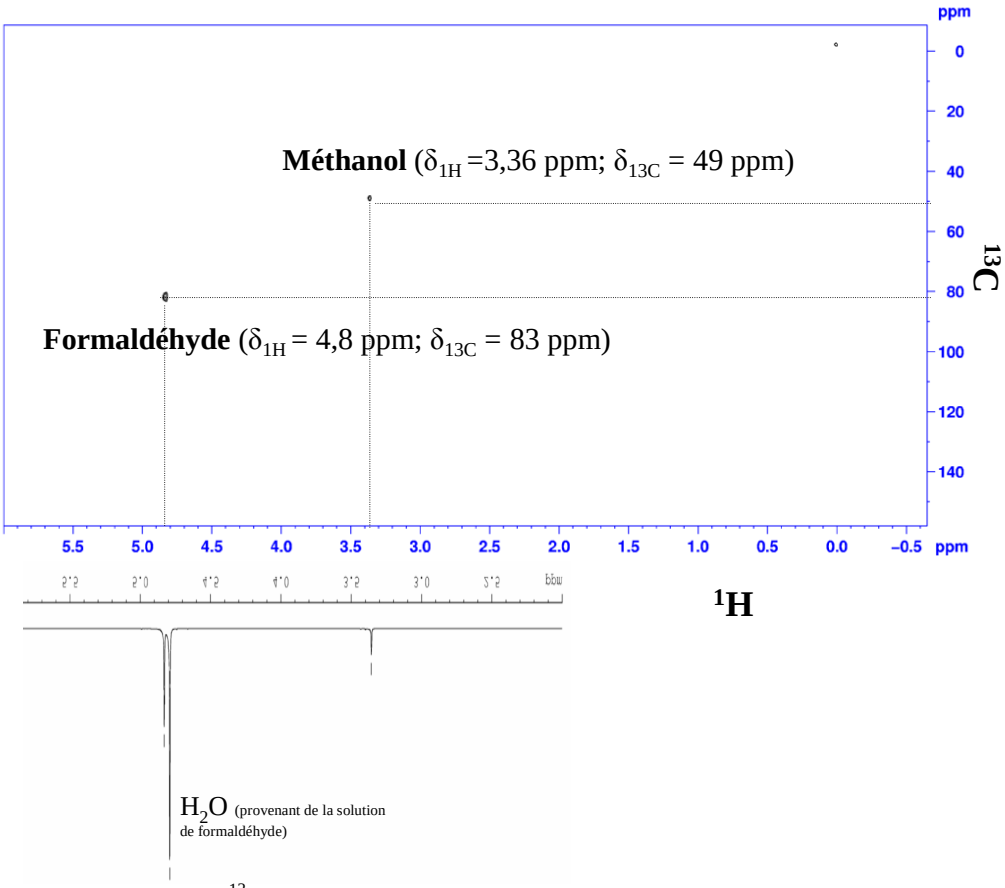


Figure 61 : Spectre HSQC H-^{13}C de la solution commerciale de formaldéhyde/méthanol diluée dans D_2O.

Le formaldéhyde (identifié car la solution contenant plus de formaldéhyde que de méthanol, l'intégrale de son signal est plus élevée) à donc un déplacement chimique de 4,83 ppm en RMN ^{1}H. En présence d'eau en quantité importante, il est donc masqué et confondu avec le signal de l'eau. Le cas du formaldéhyde a donc nécessité l'utilisation d'une technique autre que la RMN ^{1}H pour sa mesure : l'analyseur automatique de formaldéhyde Aerolaser AL4021, très sensible.

- Métabolites produits

Le tableau 16 ci-dessous récapitule les signaux détectés dans les milieux d'incubation correspondant aux tests de biodégradation du méthanol et/ou du formaldéhyde.

Composé	Métabolites	Signal RMN ^{1}H	Constante de couplage (Hz)	Souches	
Mélange Formaldéhyde/ Méthanol	**n.a***	Singulet à 1,95 ppm	-	13b-4	
	n.a*	Singulet à 2,15 ppm	-	14b-2	
	n.a*	Singulet à 2,25 ppm	-	14b-2	
	n.a*	Singulet à 2,3 ppm	-	14b-2	
	n.a*	Singulet à 2,4 ppm	-	13b-4	
	n.a*	Singulet à 3,3 ppm (différent de méthanol)	-	14b-5 13b-1	5b-6 (27°C) 5b-8 (27°C)
	n.a*	Singulet à 3,6 ppm	-	14b-12 5b-5 (17°C)	
	Formiate	Singulet à 8,46 ppm	-	7b-13 (17°C et 5°C) 14b-14 (17°C et 5°C) 14b-2 (17°C et 5°C) 13b-4 14b-7 7b-7 14b-5 13b-1 12b-7 14b-1 14b-13 5b-2 (27°C)	14b-11 7b-8 13b-3 (27°C, 17°C et 5°C) 12b-6 5b-1 (27°C) 5b-11 (27°C) 5b-2 (27°C) 5b-3 (17°C) 5b-8 (27°C) 14b-6 (27°C) 14b-11 (27°C)
	n.a*	Doublet à 5,8 ppm	7,7 Hz (J_{H-H})	14b-10	
	n.a*	Doublet à 7,5 ppm	7,6 Hz (J_{H-H})	14b-10	
	n.a*	Triplet à 2,45 ppm	7,0 Hz (J_{H-H})	14b-12	
	n.a*	Triplet à 2,7 ppm	6,6 Hz (J_{H-H})	14b-12	
Formaldéhyde ^{13}C	**Méthanol**	Doublet à 3,36 ppm	143 Hz (J_{C-H})	13b-3 (17°C et 5°C) 14b-13 (17°C et 5°C) 12b-8 (17 °C et 5°C)	
	Formiate	Doublet à 8,46 ppm	195 Hz (J_{C-H})	13b-3 (17°C et 5°C) 14b-13 (17°C et 5°C) 5b-5 (17°C et 5°C)	
	n.a*	Doublet dédoublé à 1,2 ppm	115 Hz (J_{C-H}) 6,5 Hz (J_{H-H})	5b-5 (17°C et 5°C)	

Tableau 16 : Métabolites produits (ou composés relargués) lors de la dégradation du mélange formaldéhyde/méthanol et de formaldéhyde ^{13}C par les différentes souches (liste des souches non exhaustive). Dans le cas du formaldéhyde ^{13}C, seuls les composés marqués sont indiqués. (**n.a*** non attribué).

Les souches isolées de l'eau des nuages sont très actives pour transformer les composés en C_1, surtout en ce qui concerne le formaldéhyde. Dans seulement 5 cas sur 31 souches testées, moins de 70 % de la quantité de formaldéhyde de départ sont transformés. Cela concerne les souches 3b-13, 5b-3 et 7b-7, pour qui l'activité reste faible envers l'ensemble des composés testés, et les souches 3b-14 et 5b-6.

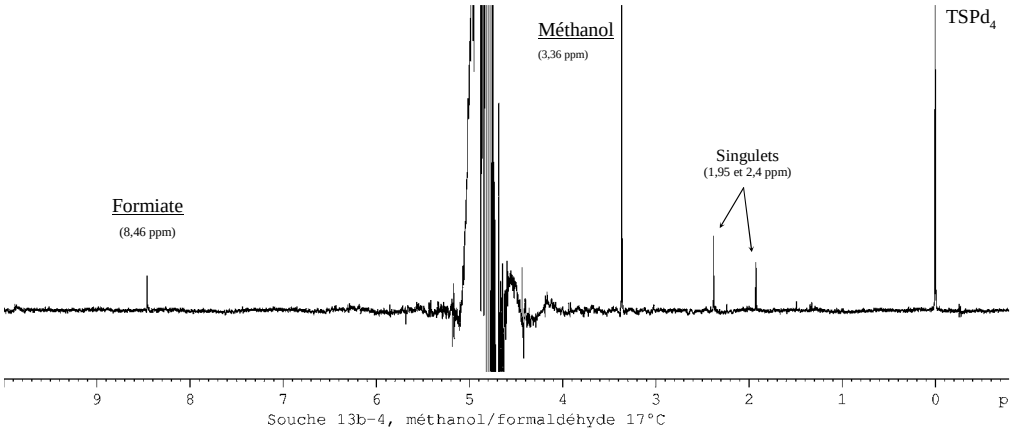


Figure 62 : Exemple de spectre RMN ^{1}H correspondant au milieu contenant le mélange formaldéhyde/méthanol après 24 heures d'incubation. Le signal du formaldéhyde (4,8 ppm) est masqué par celui de l'eau.

La **production de formiate** provenant de l'oxydation du formaldéhyde est très souvent observée (exemple de spectre sur la figure 62 ci-dessus). Notons aussi que lors de l'incubation en présence du mélange formaldéhyde/méthanol, la concentration en méthanol augmente souvent, provenant vraisemblablement de la réduction enzymatique du formaldéhyde, qui est une voie connue. Ce fait est confirmé par la **production de méthanol ^{13}C** lors d'incubations en présence de formaldéhyde ^{13}C. On note, en plus, l'apparition d'autres signaux détectés par RMN ^{1}H, qui restent non attribués et sont très divers. Le métabolisme des composés en C_1 est présenté dans la publication, ainsi que dans la partie de la synthèse bibliographique consacrée au métabolisme microbien.

Pour récapituler, on retrouve, suivant les souches :

En présence de formaldéhyde/méthanol :

- Production de **formiate**
- Production de **méthanol**
- Nombreux **singulets non attribués** autour de 2-3 ppm
- Le même doublet de doublets (5,8 et 7,5 ppm, environ 7,7 Hz) que celui observé lors d'incubations en présence d'acétate (voir tableau 15)
- Des **triplets** (2,45 et 2,7 ppm) de constantes de couplage très proches de celle mesurée pour les triplets apparaissant lors d'incubations en présence de lactate ou de succinate. Des composés proches semblent donc être produits ici, mais les constantes de couplage différentes des 2 triplets rencontrés en présence de formaldéhyde/méthanol montrent qu'ils correspondent vraisemblablement à des composés différents.

La présence de des derniers signaux, retrouvés lors d'incubations avec des composés aussi différents que le succinate et le formaldéhyde/méthanol, laisse supposer qu'il s'agit de métabolites produits à partir de réserves endogènes des cellules, mais rien ne permet d'être catégorique sur ce point.

En présence de formaldéhyde ^{13}C:

- Production de formiate ^{13}C
- Production de méthanol ^{13}C
- Apparition d'un doublet de doublets (centré à 1,2 ppm), non identifié mais correspondant peut-être au signal du CH_3 du méthylformiate.

IV.2. Influence de la température sur les efficacités de biodégradation

IV.2.a) Introduction

Il est fortement probable que la température ait un effet sur les activités enzymatiques des souches, et il s'agit d'un paramètre qui pourrait limiter leur efficacité à dégrader les composés proposés dans les conditions rencontrées dans le nuage. Afin d'appréhender l'activité à une température compatible avec celle rencontrée dans les nuages, des tests à 5°C et à 17°C ont été menés en parallèle. L'efficacité de dégradation à 17°C correspond à une valeur maximale de température que l'on peut rencontrer dans les nuages, 5°C étant la température annuelle moyenne mesurée au sommet du puy de Dôme.

IV.2.b) Publication

Format à modifier pour soumission à *Nature* prévue début 2007.

Degradation of atmospheric organic acids at low temperature by micro-organisms isolated from cloud water

Pierre Amato[a, b], Martine Sancelme[a], Paolo Laj[b] and Anne-Marie Delort[a]

a. Laboratoire de Synthèse et Etudes de Systèmes à Intérêt Biologique, UMR 6504 CNRS-Université Blaise Pascal, 63177 Aubière cedex, France.
b. Laboratoire de Météorologie Physique, UMR 6016 CNRS-Université Blaise Pascal, 63177 Aubière cedex, France.

*Corresponding author: Tel 00 33 473 40 77 14; Fax 00 33 473 40 77 17
E-mail address: A-Marie.Delort@univ-bpclermont.fr

Keywords: Cloud, atmospheric chemistry, bacteria, biological activity, organic acids

Abstract

The efficiency of cells isolated from cloud water to multiply and to degrade formate, acetate, lactate and succinate was investigated and our experiments were focused on two temperatures, 5°C and 17°C, which respectively correspond to the annual average and to the maximum encountered temperature during cloud events at the site from where strains were isolated. Five strains have been considered, among the most often recovered from our set of cloud samples: 3 *Pseudomonas*, 1 *Sphingomonas* and 1 yeast. Results show that they can develop at low temperature, with doubling times of about 20 hours at 5°C for four of them. It is short enough to be consistent with their multiplication in clouds. Metabolic activities of biotransformation by these strains lead to times to degrade 100% of the content of atmospheric organic acids in cloud water ranging from 7 to 50 days at 5°C and from less than 1 day to about 20 days at 17°C. These results are consistent with a real and strong role of microbial metabolism in cloud water chemistry.

1. Introduction

Organic compounds are of first importance in atmospheric chemistry. Their concentration in atmosphere is largely due to human activities, through photochemical oxidization of anthropogenic hydrocarbons and incomplete combustions of fossil fuels (Kawamura et al., 2005). Their presence is also greatly linked to atmospheric pollutions, like increases in levels of tropospheric ozone. Their origin in cloud water is clearly the gaseous phase (Khwaja et al., 1995; Sellegri et al., 2003), and they are efficiently incorporated in droplets, especially in the case of diacids (van Pinxteren, 2005). It is generally admitted that their reactivity in the atmosphere is only due to the presence of free radicals, both in gaseous and in aqueous phases. However, a microbial factor could be involved, as discussed by an increasing part of the scientific community. Indeed, it is now well established that living micro-organisms are present in clouds (Sattler et al., 2001; Bauer et al., 2002; Amato et al., 2005; 2007). They seem to be able to sustain growth in the water phase (Fuzzi et al., 1997; Amato et al, in preparation) where they can remain metabolically active even at a temperature as low as 0°C (Sattler et al., 2001). Such an activity requires uptake of nutrients from the droplet by cells, what can thus influence cloud chemistry by increasing the degradation of compounds that can be used as substrates, like organic acids. Ariya et al. (2002) have estimated that in some cases, biodegradation processes would lead to equivalent lifetimes in the atmosphere than the oxidation by free radicals. The lifetime of malonate would be 1.5 days, a value at least four times lower than the one involving chemical reactions. Between March 2003 and October 2004, we isolated by cultivation more than one hundred of strains of bacteria, fungi and yeasts from cloud water samples (see Amato et al., 2005 & 2007). It includes a large proportion of non sporing bacteria able to grow at low temperature. In a companion paper, we have shown that they have the capacity to degrade compounds like formate, acetate, lactate, and even methanol and formaldehyde. To realistically evaluate the implication of micro-organisms in the chemistry of clouds, temperatures encountered there have to be taken in account as a factor controlling the enzymatic activity. In this work, we especially focused on the degradation at low temperature of organic acids highly present in cloud water (Löflund et al., 2002; Marinoni et al., 2004): formate (C_1), acetate (C_2), lactate (C_3) and succinate (C_4, diacid). Four bacterial and one yeast strains previously isolated from cloud samples have been tested to grow at 27°C, 17°C and 5°C. Then biodegradations of the given compounds have been performed at both 5°C and 17°C to be compared, and an extrapolation of the results to cloud conditions is given. The colder temperature corresponds to the mean measured at the puy de Dôme summit, while 17°C is approximately the maximal temperature observed there when a cloud occurs (see http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/observ/chimie/DATA/pdd_Choix.html). The final objective of this study is to model the effect of the presence of active micro-organisms on cloud chemistry, taking in account realistic physico-chemical conditions of clouds.

2. Material and methods

2.1 Growth conditions

Pure cultures of the strains were cultivated in liquid R2 (prepared according to the Difco R2A medium, but free of agar (Reasoner and Geldreich, 1985)) or Trypcase-Soy (TS, Biomerieux) broths simultaneously at 5°C, 17°C and 27°C under agitation (200 rpm). After 24 or 48 h of incubation, 2 mL of each of these pre-cultures were transferred in 20 mL of fresh medium, and incubated at the three temperatures. Samples were taken regularly along a week of cultivation to measure the optical density at 575 nm and establish growth curves.

2.2 Conditions of incubation for the biodegradation tests

For each isolated strain, liquid pure pre-culture was incubated at 17°C or 27°C in, M200, TS or R2 (Reasoner & Geldreich, 1985) broths. Large volumes (about 400 mL) of cultures were then incubated under the same conditions and cells were harvested after 24 or 48h of growth by centrifugation (4000 g, 15 min., 4°C), twice rinsed with NaCl 0.8 % and finally resuspended in the test media containing one of the compound to degrade. The test media were composed of 25 mL of 0.1 M phosphate buffer at pH 7.0, with addition of about 20 mM of sodium formate (CH_3COONa) (Aldrich), lactic acid ($CH_3CHOHCOOH$, mixed isomers L and D) (Touzart & Matignon), or sodium succinate ($NaOOC(CH_2)_2COONa$) (Aldrich). Incubations were carried out in 100 mL Erlenmeyer's under agitation (200 rpm), at 5°C or 17°C. Cell concentrations in the test media were adjusted to a final OD_{575nm} of 1, corresponding to about 10^9 bacteria or 10^7 yeast cells mL^{-1}. Thus, biodegradation tests were performed with an equivalent ratio between substrate and cell concentrations than what can actually be observed in cloud water. In the test media, OD_{575nm} was adjusted at a value of 1, corresponding approximately to 10^9 bacteria or 10^7 yeasts cells mL^{-1}, formate, lactate, and succinate were 20 mM. A blank constituted by cells in phosphate buffer was simultaneously made for each of the strains. Samples for analysis were taken at the beginning and after 4, 24 and 48 hours of incubation. About 1 mL was centrifuged (12000 g, 3 min), and the supernatants were kept frozen (-40 °C) until analysis.

2.3 Determination of precise cell concentrations

Triplicate volumes of 0.1 mL of successive dilutions of the pure cultures were plated on agar R2A or TSA and incubated at the temperature used for the liquid cultivation (17°C or 27°C). After 1 to 3 days of incubation, colonies were counted and Petri dishes with from 30 to 300 CFUs were taken in account to determine the effective cell concentrations in the test media.

2.4 Measurements by ^1H NMR

Supernatants from biodegradation test media were prepared for ^1H NMR by mixing a volume of 450 µl of the sample with 50 µl of sodium tetra deuteriated trimethylsilyl propionate ($TSPd_4$, Eurisotop) in solution in D_2O. D_2O was used for locking and shimming, while $TSPd_4$ constituted a reference for chemical shifts (0 ppm) and quantification. Final volumes of 500 µl of prepared samples were put in 5 mm-diameter tubes for NMR. Acquisition of spectra were made at 400.13 MHz, 21°C, on a Bruker Avance 400 spectrometer, by collection of 32 scans (90° pulse, 4789.27 Hz SW, 65.536 data points, 6.84 min total acquisition time). Water signal was eliminated by presaturation, and no filter was applied before Fourier transformation. Using Bruker software (X-Win NMR), baseline was corrected before integration for quantification. The concentration of metabolites was calculated as follow: $[m] = (9 * Ao * [TSPd_4])/(b * A_{ref})$, where $[m]$ is the concentration of the compound to quantify, Ao is the area of m resonance, A_{ref} is the area of $TSPd_4$ resonance, and 9 and b are respectively the numbers of protons of $TSPd_4$, resonating at 0 ppm, and of m.

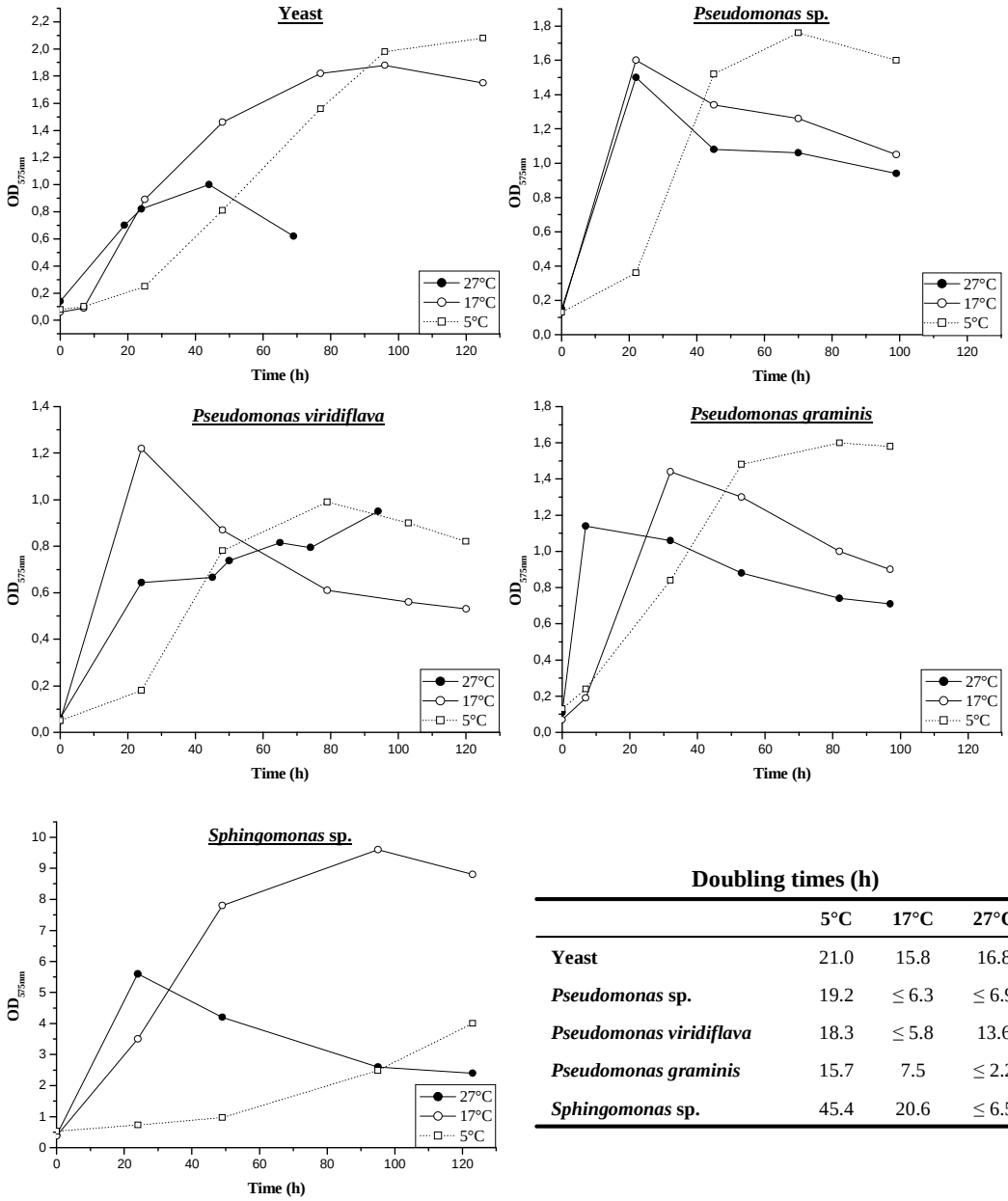
3. Results and discussion

Four bacteria and one yeast strains isolated from cloud water samples collected at the puy de Dôme summit have been considered. The pink-coloured yeast remains still undetermined, but was present in several of the cloud events sampled. Bacteria are Gram negative species previously identified as *Pseudomonas* sp. (DQ512788), *Pseudomonas viridiflava* (DQ512797), *Pseudomonas graminis* (DQ512786) and *Sphingomonas* sp. (DQ512776) (Amato et al., 2007). They were selected for their presence in several clouds sampled:

Pseudomonas and *Sphingomonas* species were respectively detected in 5 and 3 of the 7 clouds collected between December 2003 and September 2004.

3.1 Growth at different temperatures

Growth curves obtained in culture media for the five strains at 27°C, 17°C and 5°C, and corresponding doubling times are shown in **Figure 1**.



Doubling times (h)

	5°C	17°C	27°C
Yeast	21.0	15.8	16.8
***Pseudomonas* sp.**	19.2	≤ 6.3	≤ 6.9
Pseudomonas viridiflava	18.3	≤ 5.8	13.6
Pseudomonas graminis	15.7	7.5	≤ 2.2
***Sphingomonas* sp.**	45.4	20.6	≤ 6.5

Figure 1: Growth curves at 27°C, 17°C and 5°C for the five strains tested, and corresponding determined doubling times.

No significant effect of the incubation temperature of the pre-culture on the further cultivation has been detected. All the strains are able to develop all along the range of temperatures investigated with doubling times comprised between less than 2.2 and 16.8 hours at 27°C, less than 5.8 and 20.6 hours at 17°C and 15.7 and 45.4 hours at 5°C. At 5°C, the three *Pseudomonas* strains have doubling times of less than 20 hours making them psychrotrophic micro-organisms. For *P. viridiflava*, 17°C clearly constitutes the most appropriated

temperature, with doubling times of less than 6 hours. Results for *Pseudomonas* sp. are quite similar, but not difference between efficiencies at 27°C and 17°C was observed due to the lack of data during the first hours of incubation. *P. graminis* is the most adapted strain to grow at 27°C, but also at 5°C. *Sphingomonas* sp. has the lowest abilities to multiply at 17°C and at 5°C, with respective doubling times of about 21 and 46 hours. However, this strain grows as fast as the other bacteria at 27°C. For this strain values of OD reached at the three temperatures are higher than those of the other strains, whatever the temperature, certainly due to its cultivation in TS medium (R2 medium was used for all the other bacteria). Finally, the yeast has the lowest temperature limitations, and doubles in about 16 to 21 hours whatever the temperature of incubation. However, the maximum OD_{575nm} reached at 27°C is about two times lower than those at 17°C or 5°C.
All these strains can multiply at 5°C: this result constitutes an important point, as it is consistent with their development in cloud water. Moreover, the generation times of a few hours in the presence of nutrients are consistent with the life time of a cloud. Such an efficiency to be active and even to grow at low temperature was already registered in the case of bacteria isolated from cloud water (Sattler et al., 2001; Amato et al., 2007). In 1979, it was even shown that bacteria can divide in the air (Dimmick et al., 1979), while in airborne droplets, a possible multiplication of cells allowed by the chemical content acting as a substrate had been hypothesized from field measurements by Fuzzi et al. (1997). The growth rates determined here at low temperature for strains isolated from cloud water also support this idea.

3.2 Biodegradation rates and effect of temperature

The chemical composition of cloud water samples collected at the puy de Dôme summit have been reported in Marinoni et al. (2004). The total content of dissolved organic carbon ranged from 1.2 to 15.5 mg L^{-1}, with major contributions of formate (37-3213 µg L^{-1}, 0.8-70 µM) and acetate (37-2873 µg L^{-1}, 0.6-48 µM). Lactate and succinate concentrations ranged respectively from 20 to 514 µg L^{-1} (0.2-6 µM) and from 7 to 473 µg L^{-1} (0.06-4 µM). The microbial cloud water content was also described in samples taken at the puy de Dôme, and total cell counts were about 1 x 10^5 mL^{-1} (Amato et al., 2005). In our more recent samplings, total fungi and yeasts have also been counted and were about ~10^3 cells mL^{-1} (Amato et al., unpublished data). In the test media, formate, acetate, lactate (about 70 % of L-lactate and 30 % of D-lactate) and succinate were 20 mM, and cell concentrations determined by platting were 2.7 x 10^9 cells mL^{-1} for *Pseudomonas* sp.; 1.7 x 10^9 cells mL^{-1} for *P. viridiflava*; 2.0 x 10^9 cells mL^{-1} for *P. graminis*; 2.3 x 10^9 cells mL^{-1} for *Sphingomonas* sp.; and 2.7 x 10^7 for the yeast strain. These values are much higher than those encountered in clouds due to practical consideration (analytical measurements of chemical compounds are easier). However ratios between substrate and cell concentrations in the incubation media were adjusted to be in the same range than those actually measured in cloud samples (all values of concentrations were multiplied by a factor ~10^4 in these experimental conditions).

On **Figures 2 and 3** are presented biodegradation curves for each compound by each strain, at 5°C and at 17°C.

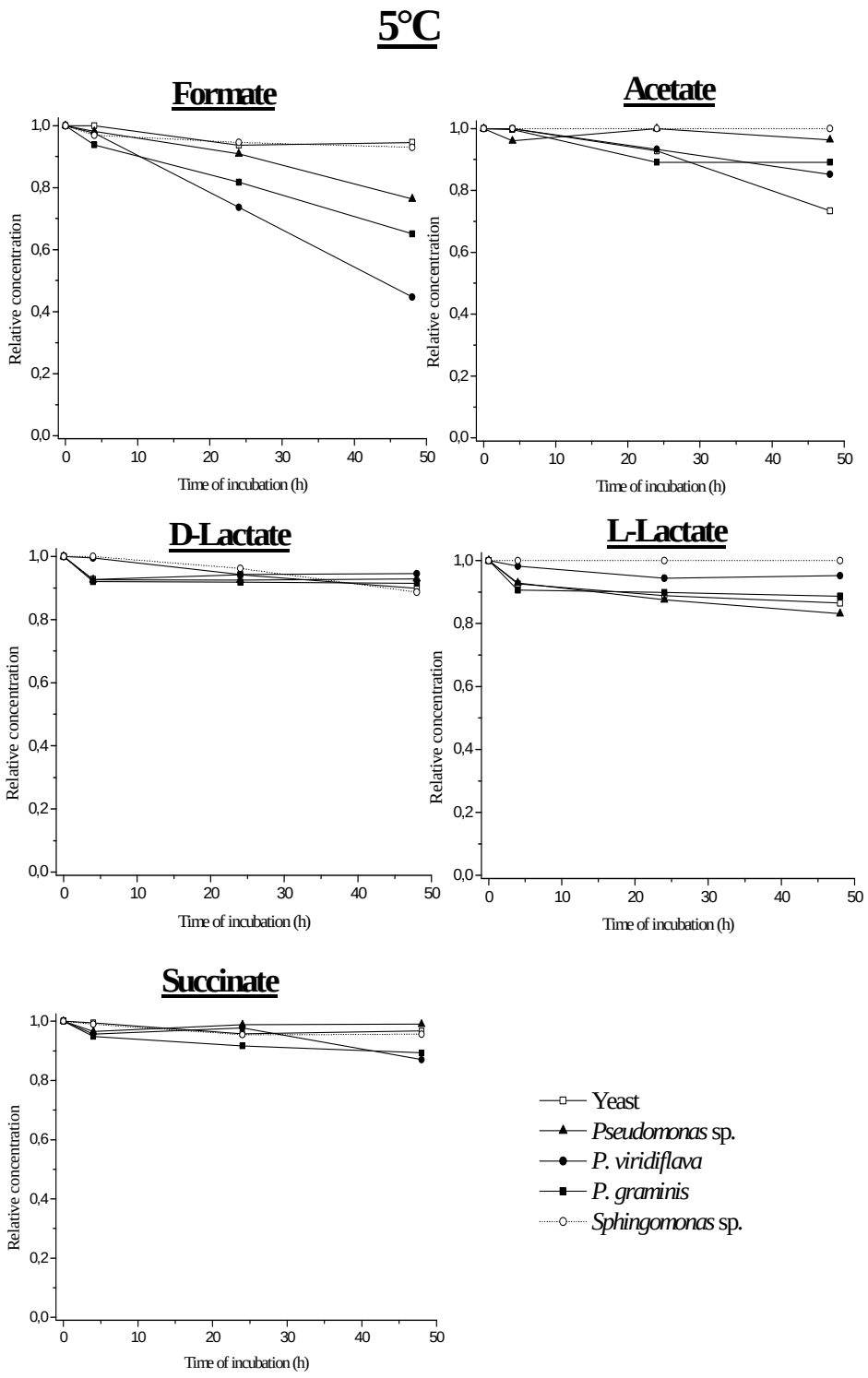


Figure 2: Biodegradations at 5°C of formate, acetate, L- and D-lactate and succinate by the five strains.

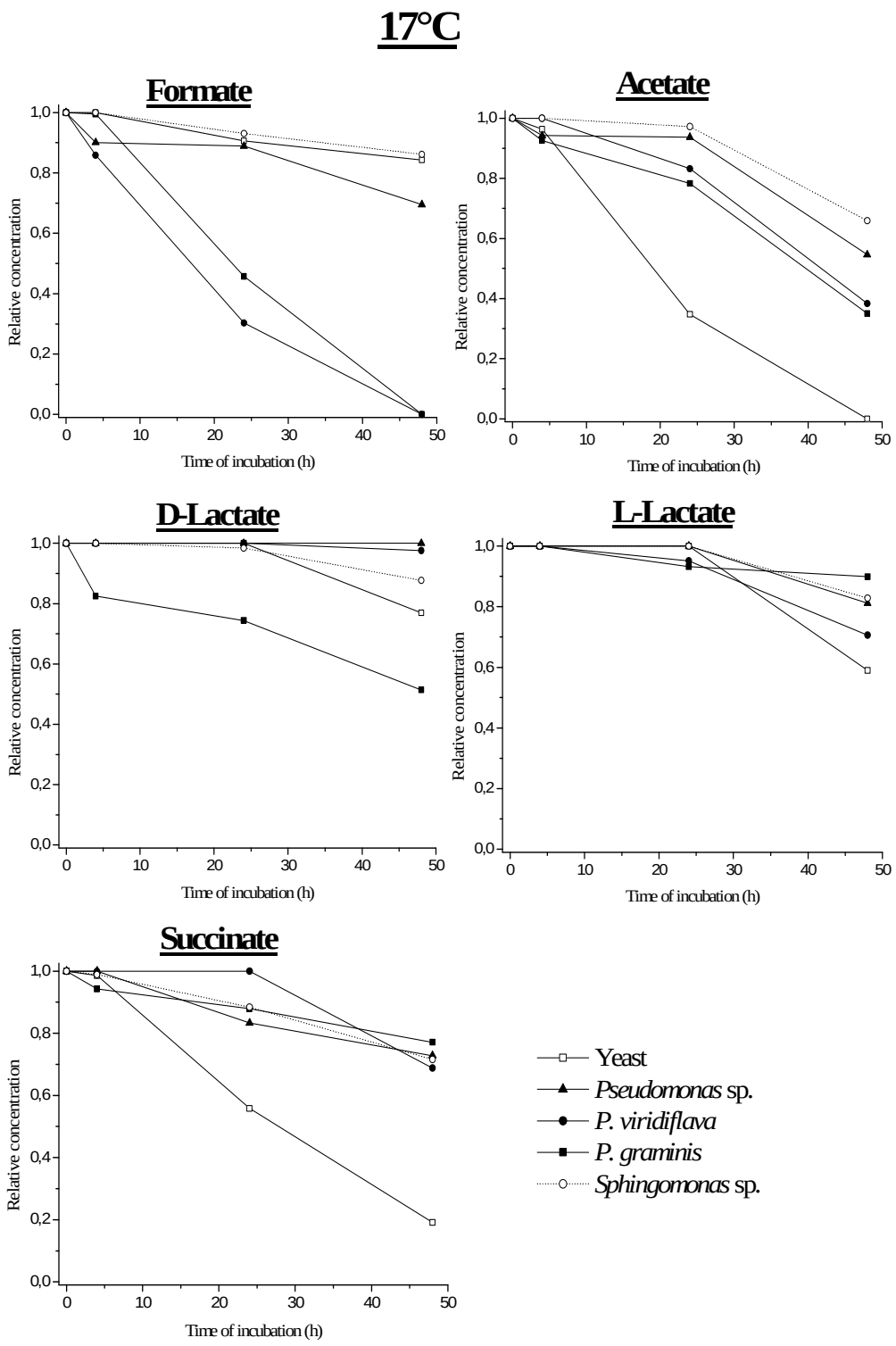


Figure 3: Biodegradations at 17°C of formate, acetate, L- and D-lactate and succinate by the five strains.

	Formate			Acetate			D-Lactate			L-Lactate			Succinate		
	5°C	**17°C**	**Ratio 5°C/17°C**	**5°C**	**17°C**	**Ratio 5°C/17°C**	**5°C**	**17°C**	**Ratio 5°C/17°C**	**5°C**	**17°C**	**Ratio 5°C/17°C**	**5°C**	**17°C**	**Ratio 5°C/17°C**
Yeast	$1,31 \times 10^{-6}$	$3,94 \times 10^{-6}$	33,15%	$6,80 \times 10^{-6}$	$2,48 \times 10^{-5}$	27,37%	$7,91 \times 10^{-7}$	$1,87 \times 10^{-6}$	42,27%	$2,37 \times 10^{-6}$	$7,38 \times 10^{-6}$	32,06%	$9,53 \times 10^{-7}$	$2,36 \times 10^{-5}$	4,04%
***Pseudomonas* sp.**	$3,10 \times 10^{-6}$	$4,22 \times 10^{-6}$	73,45%	$4,77 \times 10^{-7}$	$6,12 \times 10^{-6}$	7,79%	$3,26 \times 10^{-7}$	-	-	$1,67 \times 10^{-6}$	$1,74 \times 10^{-6}$	95,74%	$1,58 \times 10^{-7}$	$4,13 \times 10^{-6}$	3,83%
Pseudomonas viridiflava	$1,68 \times 10^{-5}$	$3,46 \times 10^{-5}$	48,62%	$4,29 \times 10^{-6}$	$2,02 \times 10^{-5}$	21,26%	$5,48 \times 10^{-7}$	$2,47 \times 10^{-7}$	222,09%	$1,05 \times 10^{-6}$	$6,73 \times 10^{-6}$	15,64%	$5,42 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-5}$	51,43%
Pseudomonas graminis	$1,62 \times 10^{-5}$	$4,22 \times 10^{-5}$	38,41%	$5,38 \times 10^{-6}$	$2,53 \times 10^{-5}$	21,22%	$1,25 \times 10^{-6}$	$< 10^{-7}$	-154,64%	$3,81 \times 10^{-6}$	$9,17 \times 10^{-6}$	41,55%	$6,23 \times 10^{-6}$	$1,27 \times 10^{-5}$	48,97%
***Sphingomonas* sp.**	$2,16 \times 10^{-6}$	$3,32 \times 10^{-6}$	65,02%	$< 10^{-7}$	$9,84 \times 10^{-6}$	-2,15%	$1,05 \times 10^{-6}$	$8,61 \times 10^{-7}$	121,40%	-	$2,76 \times 10^{-6}$	-	$1,49 \times 10^{-6}$	$9,37 \times 10^{-6}$	15,86%
Mean	**$7,92 \times 10^{-6}$**	**$1,76 \times 10^{-5}$**	**51,7%**	**$3,35 \times 10^{-6}$**	**$1,73 \times 10^{-5}$**	**15,1%**	**$7,93 \times 10^{-7}$**	**$5,42 \times 10^{-7}$**	**57,8%**	**$1,78 \times 10^{-6}$**	**$5,56 \times 10^{-6}$**	**37,0%**	**$2,85 \times 10^{-6}$**	**$1,21 \times 10^{-5}$**	**24,8%**

Table 1: Rates of biodegradation of organic acids and **r**atios between 5°C and 17°C for each of the tested strains. Values of rates are expressed as µmol h^{-1} for 10^5 bacteria or 10^3 yeasts.

In order to precisely compare degradation activities, calculations of degradation rates have been performed and are given in **Table 1**. They were based on the concentrations measured after 48 hours of incubation, and show that in 1 hour of incubation at 17°C, 1 x 10^3 yeasts or 1 x 10^5 bacteria (average cloud water content) can degrade from about 3 x 10^{-6} to 5 x 10^{-5} µmol of formate, from 6 x 10^{-6} to 3 x 10^{-5} µmol of acetate, from 0 to 9 x 10^{-7} µmol of D-lactate, from 2 x 10^{-6} to 1 x 10^{-5} µmol of L-lactate, and from 5 x 10^{-6} to 3 x 10^{-5} µmol of succinate, depending on the strain. At 5°C, these values fall from about 2 x 10^{-6} to 2 x 10^{-5} µmol for formate, from 0 to 7 x 10^{-6} µmol for acetate, from 3 x 10^{-7} to 2 x 10^{-6} µmol for D-lactate, from 1 to 4 x 10^{-6} µmol for L-lactate and from 1 x 10^{-7} to 7 x 10^{-6} µmol of succinate.

On **Table 1** are also reported ratios between the degradation rates observed at 5°C versus 17°C in each case. As expected, temperature has a strong influence on the biodegradation capacities, with important differences observed between the two temperatures, depending both on the substrate and on the strain. Formate is efficiently degraded by the *Pseudomonas* strains at both temperatures, especially by *P. viridiflava* and *P. graminis*. Activity on this compound remains relatively high at 5°C, reaching on the whole from 38 % to 73 % of the values determined at 17°C. Acetate is also well degraded at 17°C, but an important effect of the temperature is observed for all of the strains, lowering activities by a factor ranging from 3 (for the yeast) to more than 100 (*Sphingomonas* sp.). Succinate degradation profile is globally quite similar to acetate, with a great activity at 17°C, especially in the case of the yeast strain. Comparing the two temperatures of incubation shows that its degradation at 17°C is only two-fold decreased at 5°C for two of the strains (*P. viridiflava* and *P. graminis*), while it is about one tenth for the others. Uptakes of L- and D- lactate and their responses to low temperature are variable, but globally better with the L isomer. Ratios of degradation between the two temperatures range from 19 % to 96 % for L-lactate and from 42 % to 230 % for D-lactate. So, while the activities on D-lactate remain quite low, it is in some cases (strains *Pseudomonas viridiflava* and *Sphingomonas* sp.) better degraded at low temperature than at 17°C.

Biodegradation of formate, acetate, lactate, methanol and formaldehyde by strains from cloud water were already demonstrated to be possible under optimal conditions of temperature (Amato et al., 2005). We bring now the evidence that it is even possible under cold temperature conditions. Furthermore, micro-organisms from cloud water can remain metabolically active at low temperature. This is consistent with their ability to grow at 5°C, which can thus be supported by atmospheric compounds thanks to the presence of cold tolerant enzymes. More, number of studies had also proven that a microbial activity exists, even at subzero temperature (Carpenter et al., 2000; Sattler et al., 2001; Christner, 2001; Junge et al., 2004), making it compatible with super cooled cloud droplets. There is thus no objection to the existence of a microbial activity in cloud droplets and it should be taken in account among the processes catalyzing atmospheric chemistry, in parallel to free radicals oxidation.

Interestingly, the metabolic pathways of degradation of the organic compounds studied can be similar to those catalyzed by photochemical processes. As an example, photochemistry, through the production of radicals $OH^{\bullet}$, is involved in the progressive oxidation of hydrocarbons and others organic compounds to CO_2. The final step is constituted by the oxidization of formate (Monod et al., 2000; Deguillaume et al., 2005), and such a reaction is also possibly catalyzed by microbial metabolism (Vorholt, 2002; KEGG metabolic pathways databank). So, a part of the chemical transformations occurring in the atmosphere and attributed to photochemistry could in fact imply microbiology. To clarify this hypothesis an attempted extrapolation of the biodegradation rates previously determined for the organic acids to cloud water is proposed.

3.3 Extrapolation to clouds

A model cloud water solution is considered for the extrapolation, with typical chemical and microbial concentrations. The chemical values of concentration were: 6 µM of formate, 5 µM of acetate, 1 µM of lactate (0.5 µM of each of the isomers) and 0.5 µM of succinate. They corresponds to the median values of concentration measured in the cloud water sampled at the puy de Dôme (Marinoni et al., 2004). In addition, loads of micro-organisms of 5 x 10^2 yeasts and 5 x 10^4 bacteria mL^{-1} were considered, corresponding to about respectively 10% and 60% of the median densities observed in our cloud samples (Amato et al., 2005 and unpublished data). For yeasts, the proportion considered is quite low since counts of fungal cell include not only yeasts, but also fungi. Proportions of the cloud water content of each compound biodegraded after 24 hours in such conditions are presented in **Table 2**.

	Formate		**Acetate**		**Lactate**		**Succinate**	
	5°C	**17°C**	**5°C**	**17°C**	**5°C**	**17°C**	**5°C**	**17°C**
Maximum	3.6% (27.6)	9.2% (10.8)	2.9% (34.2)	12.0% (8.3)	19.2% (5.2)	46.3% (2.2)	17.2% (5.8)	87.1% (1.1)
Mean	**2.2% (46.0)**	**5.0% (20.0)**	**2.2% (44.9)**	**9.6% (10.4)**	**13.4% (7.5)**	**34.6% (2.9)**	**10.3% (9.7)**	**78.7% (1.3)**
Minimum	0.7% (144.4)	1.5% (68.9)	1.6% (63.2)	7.4% (13.5)	8.4% (12.0)	27.0% (3.7)	2.7% (37.5)	66.5% (1.5)

Table 2: Theoretical in-cloud biodegradations of formate, acetate, lactate and succinate at 5°C and 17°C, expressed in % of the concentrations found in cloud water degraded in 24 hours, and associated times (in parenthesis) to degrade 100% of the content in cloud water (days). A cloud water of typical composition (see text) is considered for the calculation of percentages of compounds degraded, with a microbial load of 5 x 10^2 yeasts and 5 x 10^4 bacteria mL^{-1}. Maximum, mean and minimum values correspond respectively to the use for the calculation of the maximum, the mean or the minimum rate of biodegradation observed for bacteria.

Cloud water is not bulk, as in our tests, but distributed in droplets, and it influences cloud chemistry, notably by improving exchanges between air and liquid phases. It has to be kept in mind even if extrapolations made do not consider this fact. Results show that, considering the mean biodegradation rate observed among bacteria, more than 2% of formate and acetate and more than 10% and 13% of the succinate and lactate present in cloud water would be degraded at 5°C. In other terms, more than 45 days would be necessary for a complete metabolic transformation of formate or acetate, about 10 days for succinate and less than 8 days for lactate. In the warmest clouds encountered at the puy de dome (17°C), the microbial activity would be responsible in 24 hours of the degradation of 5% of formate (20 days to degrade 100%), about 10% of acetate (about 10 days), 35% of lactate (les than 3 days) and almost 80 % of succinate (about 30 hours). These values are averages, but if we consider for example a single sample, collected the 24th of September 2004, for which 1.4 x 10^5 bacteria mL^{-1} were found, and concentrations of formate, acetate, lactate and succinate were respectively 3.3 µM, 2.6 µM, 0.1 µM and 1.3 µM, results are highly improved (not shown). Under those conditions, the times to degrade 100% of the content of the cloud water at 5°C and 17°C would respectively be of 5.4 and 2.1 days for formate, 6.5 and 1.4 days for acetate, 2.4 and 1.0 days for lactate and 10 and 3 hours for succinate. For this sample taken as example, the recorded temperature on the sampling site was 9.7°C, and if all cells present are actually as efficient as the tested ones, the chemical composition measured would be strongly influenced by such a microbial activity.

A lifetime of 10 days due to theoretical microbial metabolism in the atmosphere have already been mentioned for succinate in another study (Ariya et al., 2002), but the temperature of incubation was not mentioned. These times could seem relatively long compared to the lifetime of a cloud, especially if we consider that these results are obtained from laboratory experiments in which metabolism is artificially oriented. But the time scales estimated for

degrading the whole content of cloud water falling in the range of a few days indicate that the microbial activity could significantly contribute to degrade organic compounds in the atmosphere. It is however still not taken in account by models of atmospheric chemistry (Barth et al., 2006).

Looking at the encouraging results presented here, large investigations have now to be carried out to determine potentialities of biodegradation of other organic compounds involved in cloud chemistry. In addition, to supply and sharpen models, great numbers of bacteria and yeasts originating from cloud water have to be tested and the actual microbial activity have to be measured *in situ*, in clouds.

4. Conclusion

In previous works, we have brought the proof that living microbial cells exist in cloud droplets. An important diversity was detected by cultivation including yeasts, fungi and bacteria, among which *Pseudomonas* and *Sphingomonas* are the dominant genera. The question of a possible implication of this living content on the cloud chemistry through its metabolism was thus asked. The results presented here show that a yeast, three *Pseudomonas* and a *Sphingomonas* strains isolated from cloud water are able to sustain growth under cold conditions. It supports the hypothesis of a multiplication of cells in cloud droplets, and also of a metabolic activity. In addition, biodegradation of atmospheric organic compounds by these five strains have been carried out at both 17°C and 5°C. As expected, rates of biodegradation are generally decreased with decreasing temperature, but the activity remains compatible with a microbial implication in cloud chemistry even at 5°C, especially in the cases of *Pseudomonas* spp. strains. Extrapolations to cloud water indicate that, during the lifetime of a cloud fixed at 24 hours, micro-organisms are likely to be responsible of the degradation of significant amounts of formate, acetate, lactate and succinate: only a few days are required for the micro-organisms to degrade 100% of the contents in cloud water at 17°C and at 5°C. Finally, to conclude on their relative efficiency among the other parameters involved in atmospheric chemistry, microbial contribution has to be compared to the main known catalyser: solar radiation, producer of free radicals. Work is in progress on this field to collect data allowing this comparison.

Acknowledgements

The research was funded by the French LEFE-CHAT from the CNRS and the ORE-BEAM program of the French Ministry of Research. Pierre Amato is the recipe of a scholarship from the French Ministry of Research. Elodie Cano is acknowledged for her technical help.

References

Amato P., Ménager M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. & Delort A-M. (2005). Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds. *Atmospheric Environment* 39: 4143-4153.

Amato P., 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.

Amato P., Demeer F., Melaouhi A., Martin-Biesse A-S., Sancelme M., Laj P. & Delort A-M. (soumis en janvier 2007). A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by micro-organisms. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*.

Ariya P.A., Nepotchatykh O., Ignatova O. & Amyot M. (2002). Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. *Geophysical Research Letters* 29, 22, 2077-2080.

Barth M.C. (2006).). The importance of cloud drop representation on cloud chemistry. *Atmospheric Research* 82, 294-309.

Bauer H., Kasper-Giebl A., Löflund M., Giebl H., Hitzenberger R., Zibuschka F. & Puxbaum H. (2002). The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and

aerosols. *Atmospheric Research* 64, 109-119.

Carpenter E., Lin S. & Capone D.G. (2000). Bacterial activity in South Pole. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 10, 4514-4517.

Christner B.C. (2001). Incorporation of DNA and protein precursors into macromolecules by Bacteria at -15°C. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 12, 6435-6438.

Deguillaume L., Leriche M. & 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.

Dimmick R.L., Wolochow H. & Chatigny M.A. (1979). Evidence that bacteria can form new cells in airborne particles. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 5, 924-927.

Fuzzi S., Mandrioli P. & Perfetto A., 1997. Fog droplets – An atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmospheric Environment*, 31, 2, 287-290.

Junge K., Eicken H. & Deming J.W. (2004). Bacterial activity at -2 to -20°C in Arctic wintertime sea-ice. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1, 550-557.

Kawamura K., Imai Y. & Barrie L.A. (2005). Photochemical production an loss of organic acids in high Arctic aerosols during long-range transport and polar sunrise ozone depletion events. *Atmospheric Environment* 39, 599-614.

KEGG metabolic pathways, http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html#metabolism

Khwaja H., Brudnoy S. & Husain L. (1995). Chemical characterization of three summer cloud episodes at white-face Mountain. *Chemosphere* 31, 349-362.

Löflund M., Kasper-Giebl A., Schuster B., Giebl H., Hitzenberger R. & PuxbaumH. (2002). Formic, acetic oxalic and succinic acid concentrations and their contribution to organic carbon in cloud water. *Atmospheric Environment* 36, 1553-1558.

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.

Monod A., Chebbi A., Durand-Jolibois R. & Carlier P. (2000). Oxidation of methanol by hydroxyl radicals in aqueous solution under simulated cloud droplet conditions. *Atmospheric Environment* 34, 5283-5294.

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

Sattler B., Puxbaum H. & Psenner R. (2001). Bacterial growth in supercooled could droplets. *Geophysical Research Letters* 28, 2, 239-242.

Sellegri K., Laj P., Marinoni A., Dupuy R., Legrand M. & Preunkert S. (2003). Contribution of gaseous and particulate species to droplet solute composition at the Puy de Dôme, France. *Atmospheric Chemistry and Physics* 3, 1509-1522.

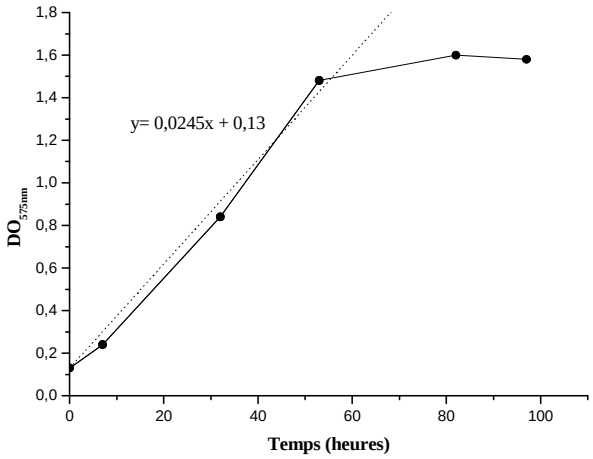
Van Pinxteren D., Plewka A., Hofmann D., Müller K., Kramberger H., Svrcina B., Bächmann K., Jaeschke W., Mertes S., Collett Jr. J.L. & Herrmann H. (2005). Schmücke hill cap cloud and valley stations aerosol characterisation during FEBUKO (II): organic compounds. *Atmospheric Environment* 39, 4305-4320.

Vorholt J.A. (2002). Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Archives of Microbiology* 178, 239-249.

IV.2.c) Complément de résultats

IV.2.c.(i) Calcul des temps de doublement

Le calcul des temps de doublements est< réalisé comme présenté sur la figure 63 ci-dessous. Ils sont basés sur les mesures de densités optiques de cultures pures.



$$\textbf{Temps de doublement (heures)} = \frac{t \times \ln 2}{\ln[(DO_t - DO_{t0})/DO_{t0}]}$$

Avec:

DO_t = Densité optique au temps t

DO_{t0} = Densité optique au temps t_0

t = Temps (h)

Figure 63 : Calcul du temps de doublement cellulaire. Exemple de la souche 13b-3 (*Pseudomonas graminis*), où le temps de 53 heures est considéré pour le calcul, conduisant à un temps de doublement de 15,7 heures

IV.2.c.(ii) Calcul des vitesses de dégradation

Les vitesses de biodégradation doivent pour pouvoir être extrapolées, être rapportées à une unité biologique (nombre de cellules, quantité de protéines….). Pour l'ensemble des tests de « screening », cette information n'est pas disponible ce qui n'autorise pas de calcul. Elle l'est cependant pour les tests voués à étudier l'effet de la température. Dans la publication les valeurs de vitesses données (et les extrapolations au nuage qui en découlent) sont calculées en considérant la quantité dégradée après 48 heures d'incubation. Cette quantité (en mM) est transformée en vitesse en divisant par le temps (48 h), et ramenée au nombre de cellules en divisant par la concentration en cellules déterminée par les étalements (attention : considérer une concentration en CFU L^{-1} pour un calcul prenant en compte des mM). Le tableau 17 ci-dessous récapitule les vitesses calculées. Les calculs ne sont pas possibles dans le cas du formaldéhyde et du méthanol car les tests de dégradation de ces substrats n'ont pas été réalisés de façon indépendante (mélange formaldéhyde/méthanol). Les investigations concernant ces substrats sont présentées dans le paragraphe suivant.

Composé	Souche	Concentration en cellules dans le milieu d'incubation (mL^{-1})	Quantité dégradée en 48 heures (5°C) (mM)	Quantité dégradée en 48 heures (17°C) (mM)	Vitesse de transformation à 5°C (µmole/cellules/heure)	Vitesse de transformation à 17°C (µmole/cellules/heure)
Formiate	**7b-13**	$1,39 \times 10^{9}$	1,44	2,21	$2,15 \times 10^{-11}$	$3,32 \times 10^{-11}$
	13b-3	$8,40 \times 10^{8}$	6,53	17,00	$1,62 \times 10^{-10}$	$4,22 \times 10^{-10}$
	14b-1	$1,61 \times 10^{7}$	1,01	3,05	$1,31 \times 10^{-9}$	$3,94 \times 10^{-9}$
	14b-2	$2,66 \times 10^{9}$	3,96	5,39	$3,10 \times 10^{-11}$	$4,22 \times 10^{-11}$
	14b-14	$1,20 \times 10^{9}$	9,66	19,86	$1,68 \times 10^{-10}$	$3,46 \times 10^{-10}$
Acétate	**7b-13**	$1,39 \times 10^{9}$	0,00	6,54	0,00	$9,84 \times 10^{-11}$
	13b-3	$8,40 \times 10^{8}$	2,17	10,21	$5,38 \times 10^{-11}$	$2,53 \times 10^{-10}$
	14b-1	$1,61 \times 10^{7}$	5,27	19,25	$6,80 \times 10^{-9}$	$2,48 \times 10^{-8}$
	14b-2	$2,66 \times 10^{9}$	0,61	7,81	$6,34 \times 10^{-11}$	$6,12 \times 10^{-11}$
	14b-14	$1,20 \times 10^{9}$	2,46	11,57	$4,29 \times 10^{-11}$	$2,02 \times 10^{-10}$
L-Lactate	**7b-13**	$1,39 \times 10^{9}$	0,00	1,83	0,00	$2,76 \times 10^{-11}$
	13b-3	$8,40 \times 10^{8}$	1,54	3,70	$3,81 \times 10^{-11}$	$9,17 \times 10^{-11}$
	14b-1	$1,61 \times 10^{7}$	1,83	5,72	$2,37 \times 10^{-9}$	$7,38 \times 10^{-9}$
	14b-2	$2,66 \times 10^{9}$	2,13	2,22	$1,67 \times 10^{-11}$	$1,74 \times 10^{-11}$
	14b-14	$1,20 \times 10^{9}$	0,60	3,86	$1,05 \times 10^{-11}$	$6,73 \times 10^{-11}$
D-Lactate	**7b-13**	$1,39 \times 10^{9}$	0,70	0,57	$1,05 \times 10^{-11}$	$8,61 \times 10^{-12}$
	13b-3	$8,40 \times 10^{8}$	0,51	-0,33	$1,25 \times 10^{-11}$	$-8,11 \times 10^{-12}$
	14b-1	$1,61 \times 10^{7}$	0,61	1,45	$7,91 \times 10^{-10}$	$1,87 \times 10^{-9}$
	14b-2	$2,66 \times 10^{9}$	0,42	-0,13	$3,26 \times 10^{-12}$	$-1,05 \times 10^{-12}$
	14b-14	$1,20 \times 10^{9}$	0,31	0,14	$5,48 \times 10^{-12}$	$2,47 \times 10^{-12}$
Succinate	**7b-13**	$1,39 \times 10^{9}$	0,99	6,23	$1,49 \times 10^{-11}$	$9,37 \times 10^{-11}$
	13b-3	$8,40 \times 10^{8}$	2,51	5,13	$6,23 \times 10^{-11}$	$1,27 \times 10^{-10}$
	14b-1	$1,61 \times 10^{7}$	0,74	18,27	$9,53 \times 10^{-10}$	$2,36 \times 10^{-8}$
	14b-2	$2,66 \times 10^{9}$	0,20	5,27	$1,58 \times 10^{-12}$	$4,13 \times 10^{-11}$
	14b-14	$1,20 \times 10^{9}$	3,11	6,05	$5,42 \times 10^{-11}$	$1,05 \times 10^{-10}$

Tableau 17 : Vitesses de biotransformation des acides carboxyliques par 5 souches sélectionnées, et données associées aux calculs. **7b-13** : *Sphingomonas* sp. ; **13b-3** : *Pseudomonas graminis* ; **14b-1** : Levure rose ; **14b-2** : *Pseudomonas* sp. ; **14b-14** : *Pseudomonas viridiflava*. Les valeurs de vitesse sont généralement environ 100 fois plus importantes pour la souche 14b-1, une levure, que pour les bactéries en raison de l'unité utilisée exprimée en nombre de cellules.

Il ne faut pas perdre de vue, en considérant ces valeurs, que les calculs sont basés uniquement sur la dégradation observée après 48 heures d'incubation. Les vitesses sont donc surtout indicatives et donnent un ordre de grandeur des potentialités microbiennes. Des estimations sont faites plus loin, au niveau de leur activité potentielle au sein des nuages.

IV.3. Utilisation du formaldéhyde ^{13}C et cinétiques détaillées de dégradation des composés en C_1 par des souches sélectionnées

Les solutions commerciales de formaldéhyde contiennent presque systématiquement du méthanol, En vue d'appréhender exclusivement les métabolites produits en relation avec la transformation du formaldéhyde, du formaldéhyde en solution pure et marqué au ^{13}C a été utilisé. Trois souches ont été sélectionnées pour leurs réponses différentes à l'incubation en présence du mélange : *Frigoribacterium* sp. 14b-13, *Pseudomonas syringae* 12b-8 et une souche non identifiée 5b-5. Des tests ont d'abord été réalisés en considérant un pas de temps de prélèvement correspondant à celui utilisé pour les tests systématiques (0h, 4h, 24h et 48h). Les résultats et des exemples de spectres obtenus sont présentés dans la publication précédente. Plus récemment, ces manipulations ont été reprises, et ces trois souches ont été incubées en présence formaldéhyde marqué, parallèlement à 17°C et à 5°C. De plus, les cinétiques de transformation ont été suivies de façon plus précise dans le temps, permettant d'accéder à des calculs de vitesse présentés plus loin, et d'appréhender l'effet de la température sur le métabolisme de ce composé. Des incubations en présence de méthanol pur

(non mélangé avec du formaldéhyde) et de formiate, non-marqués, ont également été réalisées pour connaître les cinétiques précises des transformations correspondantes.

IV.3.a)Résultats

La spectroscopie par RMN ^{13}C est une approche permettant le suivi du devenir de composés marqués, et ainsi la mise en évidence de voies métaboliques.

Les spectres RMN ^{13}C correspondant à l'incubation de la souche 14b-13 (*Frigoribacterium* sp.) en présence de formaldéhyde ^{13}C sont présentés sur la figure 64 ci-dessous.

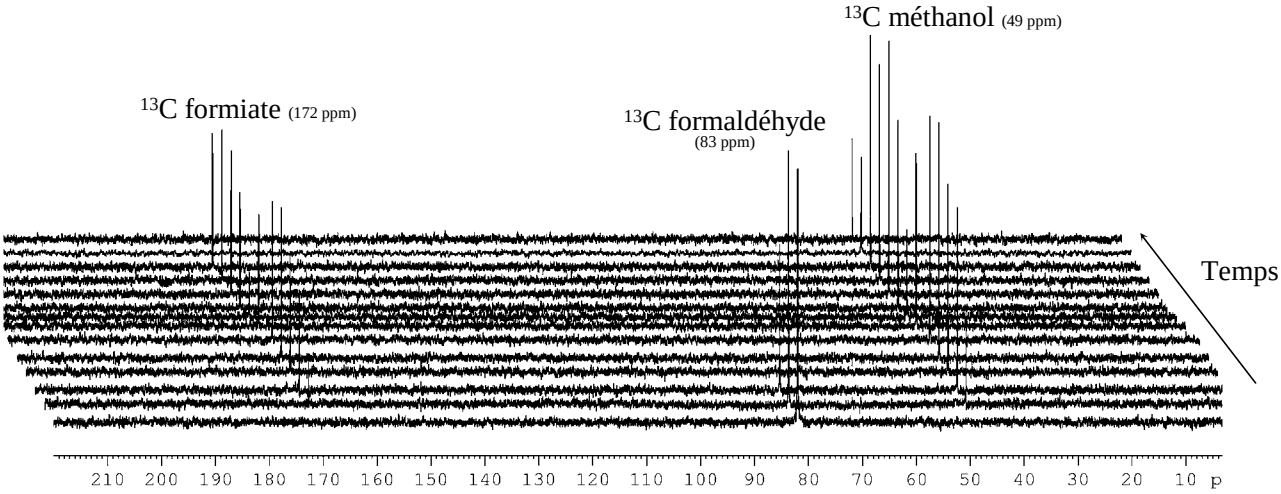


Figure 64 : Spectre RMN ^{13}C montrant la transformation progressive du formaldéhyde en méthanol et en formiate (souche 14b-13, 17°C, temps 0, 1, 2, 3, 4, 12, 24, 31, 48, 74, 120 et 168 heures).

On voit clairement que le formaldéhyde ^{13}C est rapidement transformé en méthanol et en formiate qui se retrouvent donc marqués à leur tour. Ces 2 produits sont ensuite dégradés. Les mêmes phénomènes, légèrement plus lents, sont observés à 5°C. Des calculs de vitesses sont présentés plus loin.

La spectroscopie par RMN ^{1}H a été utilisée pour doser ces produits, et a également permis de détecter, comme dans le cas de l'utilisation du mélange formaldéhyde/méthanol, des signaux correspondant à des composés non marqués. L'exemple présenté sur la figure 65 ci-dessous confronte les spectres respectivement obtenus en présence du mélange des composés non-marqués formaldéhyde/méthanol et en présence de formaldéhyde ^{13}C.

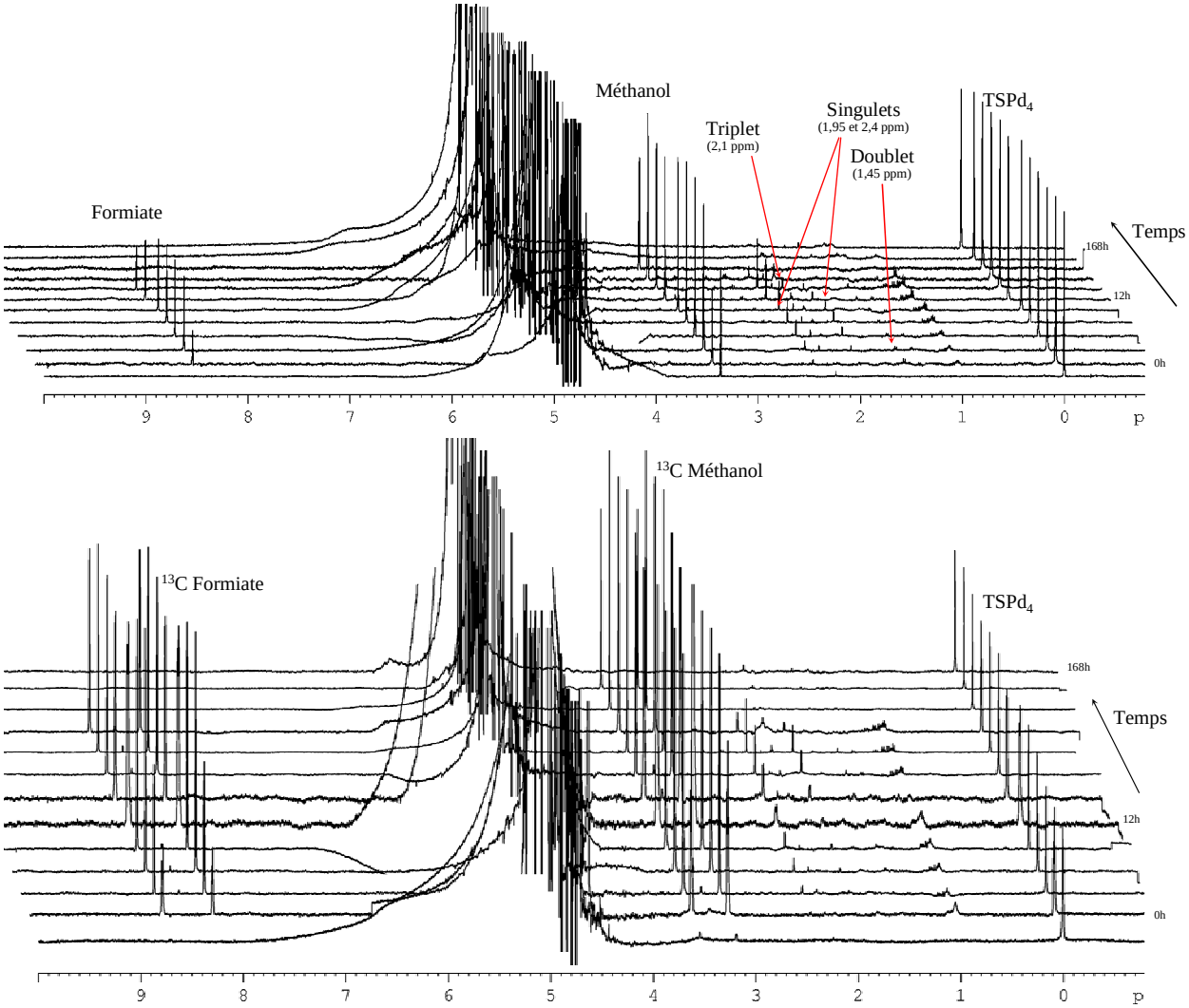


Figure 65 : Spectres RMN ^{1}H correspondant au milieu contenant le mélange formaldéhyde/méthanol **(en haut)** et le formaldéhyde marqué au ^{13}C **(en bas)** pour différents temps d'incubation, de 0 à 168 heures. Le marquage permet d'identifier les produits provenant indubitablement de la transformation du formaldéhyde. Les signaux relatifs aux composés non marqués retrouvés dans les 2 cas sont indiqués sur le spectre du haut. (Souche 14b-13, 17°C, mêmes temps d'incubation que sur la figure précédente).

Les signaux détectés lors de l'analyse par RMN ^{1}H du milieu d'incubation contenant le formaldéhyde ^{13}C ont 3 origines possibles :

- D'abord, ils peuvent être des produits directs de la transformation du formaldéhyde. Dans ce cas, les produits sont eux-mêmes marqués au ^{13}C et les signaux sont dédoublés en raison du couplage ^{13}C-H. C'est le cas pour le formiate (8,46 ppm) et le méthanol (3,36 ppm), provenant respectivement de l'oxydation et de la réduction du formaldéhyde (voir les schémas métaboliques présentés dans l'article et dans la synthèse bibliographique).

- Dans le cas de signaux non dédoublés, il peut quand même s'agir de métabolites du formaldéhyde. Dans ce cas particulier, le marquage au ^{13}C est perdu suite à une décarboxylation (volatilisation de $^{13}CO_2$), et on est en présence des mêmes composés (au niveau isotopique) qu'avec du formaldéhyde non marqué.

- Les signaux non dédoublés peuvent aussi correspondre à des produits relargués par la cellule, qui les a synthétisés à partir de réserves endogènes (glucides, lipides…) et qui ne sont donc pas marqués. Ce relarguage peut, ou non, être induit par la présence du composé testé, en l'occurrence le formaldéhyde dont la toxicité est avérée et peut être impliqué dans de tels phénomènes.

Concernant les singulets observés sur le spectre ^{1}H du milieu contenant le formaldéhyde ^{13}C, il nous est impossible de conclure sur une ou l'autre des 2 dernières possibilités évoquées.

Notons enfin que des produits plus éloignés des voies d'assimilation du formaldéhyde peuvent être marqués mais sans être détectés à cause de leur dilution dans le milieu (tout le formaldéhyde n'est pas transformé en un composé unique).

Pour la souche 12b-8 (*P. syringae*) (non montré), le formaldéhyde est également transformé en méthanol et en formiate. Ce dernier n'est pourtant détecté que sur un seul des spectres, car sa dégradation est très rapide et il ne s'accumule pas.

Pour la souche 5b-5 (non montré), les mêmes métabolites sont détectés, mais le formaldéhyde ^{13}C est dégradé moins rapidement. De plus, le formiate, mais aussi le méthanol produits sont dégradés durant le temps de l'incubation. Plusieurs triplets (couplés et montrant une signature ^{13}C ?) (1,7 ppm, 2,5 ppm, 2,7 ppm et 3,0 ppm notamment) sont également observés après incubation ave du formaldéhyde ^{13}C lors de l'analyse par spectroscopie RMN ^{1}H. Pour cette souche, aucune valeur de vitesse de dégradation du formaldéhyde et du méthanol n'est donnée car le dosage du formaldéhyde n'a pas pu être réalisé (l'analyseur n'étant pas disponible), ni le test en présence de méthanol seul.

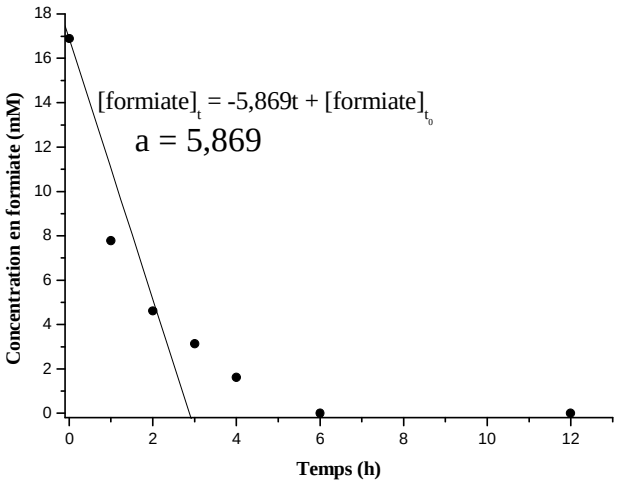
IV.3.b) Calcul des vitesses de transformation

La partie linéaire de la dégradation du tracé graphique de **[composé] = f(t)** du composé considéré est prise en compte pour la détermination de la vitesse initiale de dégradation. Les vitesses de biotransformation correspondent à la pente ***a*** de la droite de régression **[composé] = *a* × t + [composé]$_{t0h}$**. Cette valeur de pente est simplement divisée par la concentration en cellules ou en protéines dans le milieu d'incubation pour obtenir une valeur de vitesse en µmole cellule^{-1} h^{-1} ou en µmole (mg protéines)$^{-1}$ h^{-1}.

Exemple de calcul de vitesse : souche 12b-8, dégradation du formiate à 17°C

Valeurs mesurées

Temps (h)	[formiate] (mM)
0	16,89
1	7,79
2	4,62
3	3,13
4	1,62
6	0
12	0
24	0
36	0
48	0
72	0



Durée de la partie linéaire considérée : 3 heures, a= 5,869 x10^{-3} mol L^{-1} h^{-1}

Concentration en cellules dans le milieu test : N = 4,24 x 10^{12} cellules L^{-1}

↳ **Vitesse de dégradation** = a / N = 1,38 x 10^{-9} µmol cellule h^{-1}

(avec les unités précisées pour a et N)

Les vitesses de dégradation données dans le tableau 18 ci-dessous sont exprimées en µmoles par cellule et par heure. La souche 13b-3 pour laquelle une cinétique détaillée a été

réalisée précédemment mais de façon ponctuelle en présence de formaldéhyde ^{13}C, est ajoutée à la suite des souches considérées. Par contre, pour la souche 5b-5, les données de biomasse (concentrations cellulaires et protéiques) sont manquantes et le calcul n'a donc pas pu être effectué.

Souches	Vitesse de transformation (µmol/cellule/h) *(µmol/mg protéines/h)*					
	Formiate		Formaldéhyde		Méthanol	
	5°C	17°C	5°C	17°C	5°C	17°C
14b-13	$7,53 \times 10^{-13}$ *(0,034)*	$4,46 \times 10^{-12}$ *(0,199)*	$2,31 \times 10^{-11}$ *(1,034)*	$2,31 \times 10^{-10}$ *(1,029)*	$9,18 \times 10^{-14}$ *(0,004)*	$1,26 \times 10^{-10}$ *(0,006)*
12b-8	$4,69 \times 10^{-10}$ *(2,526)*	$1,38 \times 10^{-9}$ *(7,448)*	$3,09 \times 10^{-10}$ *(1,665)*	$5,06 \times 10^{-10}$ *(2,725)*	$2,10 \times 10^{-12}$ *(0,011)*	$2,04 \times 10^{-11}$ *(0,110)*
13b-3	-	-	$2,93 \times 10^{-11}$ *(0,138)*	$6,84 \times 10^{-11}$ *(0,323)*	-	-

Tableau 18 : Vitesses de biotransformation du formiate, du formaldéhyde et du méthanol à 5°C et 17°C, déterminées à partir des cinétiques détaillées du formaldéhyde ^{13}C pour le formaldéhyde. **14b-13** : *Frigoribacterium* sp. ; **12b-8** : *Pseudomonas syringae* ; **13b-3** : *P. graminis*.

IV.4. Transposition des résultats au nuage

IV.4.a) « Temps de vie » des composés dans le nuage

Note importante : Les « temps de vie » correspondent ici aux temps nécessaires à la dégradation microbiologique d'une quantité égale à la concentration retrouvée dans l'eau de nuage. Il ne s'agit donc pas véritablement de temps de vie tels qu'ils sont précisément définis en chimie atmosphérique, avec lesquels ils ne peuvent en aucun cas être comparés.

L'objectif de cette étude est finalement de transposer les résultats obtenus en laboratoire au milieu qui nous intéresse : le nuage. Un modèle couplant les composantes microphysique et chimie du nuage doit être utilisé pour cela (Maud Leriche, LaMP), en incorporant les vitesses de biodégradation déterminées dans notre étude, afin d'appréhender qualitativement l'influence que pourrait avoir le métabolisme sur la composition milieu.

Les valeurs de concentrations en composés et en cellules considérées pour le calcul sont précisées dans le tableau 19 ci-dessous.

Composé	Concentration mesurée dans les échantillons du puy de Dôme (µM ou cellules mL^{-1})	Concentration considérée pour l'extrapolation (µM ou cellules mL^{-1})
Composante chimique		
Formiate	0,2 - 70	6,0
Acétate	0,01 - 48	5,0
L-Lactate	0,2 - 6	0,5
D-Lactate		0,5
Succinate	0,02 - 4	0,5
Méthanol	?	0,1
Formaldéhyde	0,01 - 15	0,5
Composante microbiologique		
Bactéries	8×10^4	5×10^4
Champignons & Levures	5×10^3	5×10^2

Tableau 19 : Conditions utilisées pour l'extrapolation des valeurs de vitesse.

Pour le « temps de vie » moyen, une vitesse moyenne est prise en compte pour les bactéries, et la valeur déterminée pour la levure est ajoutée. Il prend en compte des concentrations de 5 x 10^4 bactéries et 5 x 10^2 levures par millilitre. Ce calcul considère donc que la population de bactéries est composée en parts égales de chacune des bactéries prises en compte, et de levures dont l'efficacité est égale à celle testée. De telles extrapolations sont présentées dans la publication traitant de l'influence de la température.

Les « temps de vie » sont calculés suivant :

« Temps de vie » du composé dans le nuage (jours) =

$$\frac{[\text{composé}]}{[(v_B \times B_B) + (v_L \times B_L)] \times 24}$$

Avec:

[composé] = Quantité de composé dans 1 L de milieu les conditions choisies (µmol) (ex: 6,0 µmol pour le formiate)

v_B = Vitesse de dégradation bactérienne (µmol cellule^{-1} h^{-1})

B_B = Biomasse bactérienne dans 1 L (5 x 10^7 cellules) (=5 x 10^4 cellules mL^{-1})

v_L = Vitesse de dégradation par les levures (µmol cellule^{-1} h^{-1})

B_L = Biomasse levures dans 1 L (5 x 10^5 cellules) (=5 x 10^2 cellules mL^{-1})

Des « temps de vie » des composés chimiques sont calculés à partir des vitesses déterminées pour chaque souche. Les résultats des calculs sont présentés dans les tableaux 20 (acides carboxyliques, 5°C), 21 (acides carboxyliques, 17°C) et 22 (méthanol et formaldéhyde, 5°C et 17°C) ci-dessous.

Souche (origine expérimentale des données)	Formiate			Acétate			L-Lactate		D-Lactate		Lactate total		Succinate		
Bactéries	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	« Temps de vie » (jours)	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	« Temps de vie » (jours)	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	Dégradé en 24h (µmol)	« Temps de vie » (jours)	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	« Temps de vie » (jours)
7b-13 (influence de la température)	2,15 x 10^{-11}	0,03	**231,7**	< 1 x 10^{-13}	< 0,001		< 1 x 10^{-13}	< 0,001	1,05 x 10^{-11}	0,01	0,01	**39,8**	1,49 x 10^{-11}	0,02	**28,0**
13b-3 (influence de la température)	1,62 x 10^{-10}	0,19	**30,9**	5,38 x 10^{-11}	0,06	**77,5**	3,81 x 10^{-11}	0,05	1,25 x 10^{-11}	0,02	0,07	**8,2**	6,23 x 10^{-11}	0,07	**6,7**
14b-2 (influence de la température)	3,10 x 10^{-11}	0,04	**161,3**	6,34 x 10^{-11}	0,08	**65,7**	1,67 x 10^{-11}	0,02	3,26 x 10^{-12}	< 0,001	0,02	**20,9**	1,58 x 10^{-12}	< 0,001	**264**
14b-14 (influence de la température)	1,68 x 10^{-10}	0,20	**29,7**	4,29 x 10^{-11}	0,05	**97,2**	1,05 x 10^{-11}	0,01	5,48 x 10^{-12}	0,01	0,02	**26,0**	5,42 x 10^{-11}	0,07	**7,7**
12b-8 (cinétiques détaillées)	4,69 x 10^{-10}	0,56	**10,7**												
14b-13 (cinétiques détaillées)	7,53 x 10^{-13}	< 0,001	**6637**												
Moyenne bactéries	**1,42 x 10^{-10}**			**4,00 x 10^{-11}**			**1,63 x 10^{-11}**		**7,94 x 10^{-12}**				**3,32 x 10^{-11}**		
Levure															
14b-1 (influence de la température)	1,31 x10^{-9}	0,02	**383,1**	6,80 x 10^{-9}	0,08	**61,3**	2,37 x 10^{-9}	0,03	7,91 x 10^{-10}	0,01	0,04	**13,2**	9,53 x 10^{-10}	0,01	**43,7**
5 x 10^4 bactéries mL^{-1} + 5 x 10^2 levures mL^{-1}	**7,75 x 10^{-3}**	**0,19**	**32,2**	**5,00 x 10^{-3}**	**0,13**	**38,8**	**2,00 x 10^{-3}**		**7,93 x 10^{-4}**		**0,07**	**7,5**	**2,14 x 10^{-3}**	**0,05**	**9,7**

Tableau 20 : Récapitulatif des vitesses de dégradation des acides carboxyliques **à 5°C**, quantité dégradée en 24 heures par B_B= 5 x 10^7 bactéries (5 x 10^4 mL^{-1}) ou B_L= 5 x 10^5 levures (5 x 10^2 mL^{-1}), et temps de vie correspondants dans le nuage (temps pour dégrader 100 % de la quantité considérée dans le nuage, en jours). Une valeur moyenne est donnée en dernière ligne, calculée à partir de la vitesse moyenne des bactéries, à laquelle est ajoutée celle de la levure. Le temps de vie donnée correspond donc à un nuage moyen aux niveaux microbiologique (quantitativement) et chimique. Pour le calcul avec le lactate, les valeurs de vitesse de dégradation du L-lactate et du D-lactate sont additionnées. **7b-13** : *Sphingomonas* sp. ; **13b-3** : *Pseudomonas graminis* ; **14b-2** : *P.* sp. ; **14b-14** *: P. viridiflava*; **12b-8** : *P. syringae* ; **14b-13** : *Frigoribacterium* sp. ; **14b-1** : levure rose non identifiée.

Souche (origine expérimentale des données)	Formiate			Acétate			L-Lactate		D-Lactate		Lactate total		Succinate		
Bactéries	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	« Temps de vie » (jours)	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	« Temps de vie » (jours)	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	Dégradé en 24h (µmol)	« Temps de vie » (jours)	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	« Temps de vie » (jours)
7b-13 (influence de la température)	3,32 x 10^{-11}	0,04	**150,7**	9,84 x 10^{-11}	0,12	**42,4**	2,76 x 10^{-11}	0,03	8,61 x 10^{-12}	0,01	0,04	**11,5**	9,37 x 10^{-11}	0,11	**4,4**
13b-3 (influence de la température)	4,22 x 10^{-10}	0,51	**11,9**	2,53 x 10^{-10}	0,30	**16,5**	9,17 x 10^{-11}	0,11	< 1 x 10^{-13}	< 0,001	0,11	**5,0**	1,27 x 10^{-10}	0,15	**3,3**
14b-2 (influence de la température)	4,22 x 10^{-11}	0,05	**118,5**	6,12 x 10^{-11}	0,07	**68,1**	1,74 x 10^{-11}	0,02	< 1 x 10^{-13}	< 0,001	0,02	**23,9**	4,13 x 10^{-11}	0,05	**10,1**
14b-14 (influence de la température)	3,46 x 10^{-10}	0,42	**14,4**	2,02 x 10^{-10}	0,24	**20,7**	6,73 x 10^{-11}	0,08	2,47 x 10^{-12}	< 0,001	0,08	**6,0**	1,05 x 10^{-10}	0,13	**4,0**
12b-8 (cinétiques détaillées)	1,38 x 10^{-9}	1,66	**3,6**												
14b-13 (cinétiques détaillées)	4,46 x 10^{-12}	0,01	**1121**												
Moyenne bactéries	**3,71 x 10^{-10}**			**4,00 x 10^{-11}**			**5,1 x 10^{-11}**		**2,77 x 10^{-12}**				**3,32 x 10^{-11}**		
Levure															
14b-1 (influence de la température)	**3,94 x 10^{-9}**	**0,05**	**127**	**2,48 x 10^{-8}**	**0,30**	**16,8**	**7,38 x 10^{-9}**	**0,09**	**1,87 x 10^{-9}**	**0,02**	**0,11**	**4,5**	**2,36 x 10^{-8}**	**0,28**	**1,8**
5 x 10^4 bactéries mL^{-1} + 5 x 10^2 levures mL^{-1}	**2,05 x 10^{-2}**	**0,49**	**12,2**	**2,01 x 10^{-2}**	**0,48**	**10,4**	**6,24 x 10^{-3}**		**1,07 x 10^{-3}**		**0,17**	**2,9**	**1,64 x 10^{-2}**	**0,39**	**1,3**

Tableau 21: Récapitulatif des vitesses de dégradation des acides carboxyliques **à 17°C**, quantité dégradée en 24 heures par B_B= 5 x 10^7 bactéries (5 x 10^4 mL^{-1}) ou B_L= 5 x 10^5 levures (5 x 10^2 mL^{-1}), et temps de vie correspondants dans le nuage (temps pour dégrader 100 % de la quantté considérée dans le nuage, en jours). Une valeur moyenne est donnée en dernière ligne, calculée à partir de la vitesse moyenne des bactéries, à laquelle est ajoutée celle de la levure. Le temps de vie donnée correspond donc à un nuage moyen aux niveaux microbiologique (quantitativement) et chimique. Pour le calcul avec le lactate, les valeurs de vitesse de dégradation du L-lactate et du D-lactate sont additionnées. **7b-13** : *Sphingomonas* sp. ; **13b-3** : *Pseudomonas graminis* ; **14b-2** : *P.* sp. ; **14b-14** *: P. viridiflava*; **12b-8** : *P. syringae* ; **14b-13** : *Frigoribacterium* sp. ; **14b-1** : levure rose non identifiée.

Souche (origine expérimentale des données)	5°C						17°C					
	Méthanol			Formaldéhyde			Méthanol			Formaldéhyde		
Bactéries	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	Temps de vie (jours)	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	Temps de vie (jours)	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	Temps de vie (jours)	Vitesse (µmol cellule^{-1} h^{-1})	Dégradé en 24h (µmol)	Temps de vie (jours)
12b-8 (cinétiques détaillées)	2,10 x 10^{-12}	< 0,001	**39,7**	3,09 x 10^{-10}	0,37	**1,3**	2,04 x 10^{-11}	0,02	**4,1**	5,06 x 10^{-10}	0,61	**0,8**
14b-13 (cinétiques détaillées)	9,18 x 10^{-14}	< 0,001	**908**	2,31 x 10^{-11}	0,03	**18,0**	1,26 x 10^{-13}	< 0,01	**664**	2,31 x 10^{-11}	0,03	**18,0**
13b-3 (cinétiques détaillées)				2,93 x 10^{-11}	0,04	**14,2**	2,03 x 10^{-12}	< 0,01	**41,1**	6,84 x 10^{-11}	0,08	**6,1**
Moyenne bactéries	**1,10 x 10^{-12}**			**1,20 x 10^{-10}**			**7,52 x 10^{-12}**			**1,99 x 10^{-10}**		
Moyenne 5 x 10^4 bactéries mL^{-1}	**5,48 x 10^{-5}**	**< 0,001**	**76,1**	**3,02 x 10^{-3}**	**0,14**	**3,5**	**3,76 x 10^{-4}**	**0,01**	**11,1**	**9,96 x 10^{-3}**	**0,24**	**2,1**

Tableau 22 : Récapitulatif des vitesses de dégradation du méthanol et du formaldéhyde **à 5°C et à 17°C**, quantité dégradée en 24 heures par B_B= 5 x 10^7 bactéries (5 x 10^4 bactéries mL^{-1}) et temps de vie correspondants dans le nuage (temps pour dégrader 100 % de la concentration considérée dans le nuage). Une valeur moyenne est donnée en dernière ligne, calculée à partir de la vitesse moyenne des bactéries. **13b-3** : *Pseudomonas graminis* ; **12b-8** : *P. syringae* ; **14b-13** : *Frigoribacterium* sp..

Dans l'ensemble, les résultats sont très variables suivant les substrats et les souches. les résultats les plus spectaculaires sont observés sur la dégradation du formaldéhyde, avec des « temps de vie » dans le nuage associés à l'activité microbienne de 2 et 3 jours respectivement à 17°C et 5°C. C'est pourtant avec le formiate que les plus fortes vitesses de dégradation sont observées, à 17°C (2,05 x 10^{-2} µM h^{-1} en moyenne dans le nuage considéré) et à 5°C (7,75 x 10^{-3} µM h^{-1}). La quantité importante de formiate présente dans l'eau de nuage considérée conduit malgré ces valeurs élevées à des « temps de vie » relativement longs (respectivement 12,2 et 32,2 jours). Les résultats obtenus avec l'acétate sont très similaires. Concernant le lactate et le succinate, les vitesses sont moindres, mais la concentration plus faible dans l'eau de nuage mène à des temps de 1 à 3 jours à 17°C, et 7 à 10 jours à 5°C pour une dégradation microbiologique complète de la quantité contenue dans l'eau de nuage. Enfin, le méthanol reste le composé le moins bien dégradé quelle que soit la température, mais là également, la concentration considérée est très faible et à 17°C, à peine 3,5 jours sont nécessaires pour que les micro-organismes dégradent la totalité de la quantité présente. Les valeurs de temps données sont bien sûr seulement indicatives et ne correspondent pas à la réalité puisque les calculs sont réalisés selon l'hypothèse d'un système fermé négligeant les équilibres avec la phase gaz. Cela permet toutefois d'avoir un ordre de grandeur de la vitesse avec laquelle les composés pourraient être métaboliquement dégradés dans le nuage.

Les « temps de vie » déterminés pour les différents composés, de l'ordre de quelques jours, sont compatibles avec celui du nuage. En effet l'influence microbiologique semble pouvoir être significative, le contenu microbien moyen du nuage dégradant souvent plusieurs µM des composés testés en quelques heures.

La température a un effet important sur les vitesses de dégradation. Ce point est discuté dans la publication dédiée à l'influence de la température (IV.2), et est récapitulé ici pour l'ensemble des souches pour lesquelles des tests ont simultanément été réalisés à 5°C et à 17°C (tableau 23).

Composé	Rapport des vitesses (5°C/17°C)
Formiate	0,378
Acétate	0,249
L-Lactate	0,321
D-Lactate	0,741
Succinate	0,130
Méthanol	0,146
Formaldéhyde	0,604

Tableau 23 : Influence de la température sur l'activité de dégradation de chaque substrat par l'ensemble des souches considérées dans les calculs.

Pour les acides carboxyliques, excepté le succinate, l'activité à 5°C vaut environ 1/3 de celle mesurée à 17°C. La dégradation du D-lactate est elle très faible dans les 2 cas, ce qui explique la valeur élevée du rapport. Le succinate est le composé dont la dégradation est la plus affectée, avec celle du méthanol, et l'activité à 5°C n'atteint pas 15 % de celle à 17°C. La biotransformation du formaldéhyde est relativement peu affectée par la température et reste élevée à 5°C.

IV.4.b) Commentaires et critique générale

Plusieurs remarques doivent enfin être apportées pour préciser certains aspects expérimentaux qui pourraient influer sur les résultats obtenus. Il s'agit des critiques principales qui pourraient être faites à l'encontre de cette étude métabolique, et des points qui représentent un frein à l'extrapolation des observations et calculs à un nuage réel.

IV.4.b.(i) Souches testées

Nous avons vu que moins de 1% des bactéries présentes dans l'eau des nuages collectés étaient récupérées par culture. De plus, il semble qu'une grande partie des bactéries proviennent de l'océan, et les souches identifiées n'y font que rarement référence. On peut donc s'interroger quant à la significativité des résultats obtenus en considérant uniquement les micro-organismes cultivés.

IV.4.b.(ii) Concentrations en cellules et en substrats

Ensuite, il faut s'intéresser aux rapports entre les concentrations en cellules et en substrats mises en jeu lors des tests. Cela peut en effet avoir une incidence sur la probabilité de rencontre entre les cellules et le composé chimique en solution, et donc influer sur les vitesses de dégradation finalement calculées. Le tableau 24 ci-dessous compare ces rapports pour les différents tests, et précise la gamme de rapports effectivement mesurés dans les nuages (en considérant la valeur moyenne de concentration bactérienne que nous avons déterminée au cours de l'étude et la gamme de concentrations mesurées dans les nuages du sommet du puy de Dôme par Marinoni et al. (2004) et Parazols et al. (non publié)).

	Bactéries mL^{-1}	**Rapport [bactéries]/[composé] (10^8 cellules mM^{-1})**				
		Formiate	**Acétate**	**Lactate**	**Succinate**	**Formaldéhyde**
Tests systématiques	~10^{10}	~5	~5	~5	~5	~50
Effet de la température						
7b-13	1,39 x 10^9	0,7	0,7	0,7	0,7	
13b-3	8,40 x 10^8	4,2	4,2	4,2	4,2	42
14b-2	2,66 x 10^9	1,3	1,3	1,3	1,3	
14b-14	1,20 x 10^9	0,6	0,6	0,6	0,6	
Cinétiques détaillées						
12b-8	4,24 x 10^9	2,1				21,2
14b-13	4,14 x 10^{10}	41,4				414
Nuage	8 x 10^4	0,02 - 80	0,13 - 4	0,2 - 40	0,05 - 80	0,01 - 4

Tableau 24 : Rapports entre les concentrations en cellules et en substrat pour les différents tests réalisés et dans l'eau de nuage (dernière ligne). Le méthanol n'est pas renseigné car il n'est pas mesuré dans les échantillons de nuage considérés.

Les quantités respectives de cellules et de substrats sont donc proches de la réalité, puisque la gamme mesurée dans les échantillons recouvre la valeur de rapport utilisée pour les tests. Cette remarque est surtout vraie pour les tests effectués pour appréhender l'effet de la température. Pour les autres, les valeurs se situent souvent dans la partie supérieure de la gamme mesurée, signifiant un nombre relativement élevé de cellules. Dans le cas du formaldéhyde, la concentration utilisée est systématiquement plus faible qu'elle ne devrait l'être : il s'agit d'un choix expérimental dû à la toxicité connue de ce composé pour les micro-organismes. Les variations de ce rapport ne semblent cependant pas liées aux variations de vitesses observées. Pour le formaldéhyde notamment, il a été montré que la quantité de cellules n'avait étrangement pas d'influence sur la vitesse de biodégradation de ce composé (voir synthèse bibliographique III.4).

IV.4.b.(iii) Conditions de tests

Il ne faut pas perdre de vue à la lecture de ces résultats, et plus particulièrement des extrapolations conduisant à des calculs de temps de vie, que les conditions de tests de reflètent pas celles rencontrées dans les nuages. En effet, même si le paramètre température est maîtrisé, nous avons travaillé en milieu « bulk », ce qui constitue la critique majeure que l'on puisse faire à cette étude. La **distribution de l'eau de nuage en gouttelettes** de petites tailles, donc avec de forts rayons de courbures, influe de façon importante sur la chimie du milieu, en favorisant notamment la volatilisation. Cela joue aussi sur les probabilités de rencontre entre les bactéries et leur substrat. Les équilibres entre les différentes phases sont donc différents entre nos expériences et la réalité. De plus, **l'ensemble des sources des différents composés** testés (dissolution depuis la phase gaz, solubilisation depuis la particule CCN, réactivité chimique) sont ignorés dans le calcul. Par ailleurs, les différents substrats ont été traités de manière indépendante, même si la même culture cellulaire est à chaque fois répartie entre les différents milieux d'incubation, qui permet de s'affranchir de la variabilité biologique d'une même souche. Les **interactions entre les métabolismes** respectifs impliqués ainsi que la préférence sélective pour tel ou tel substrat ne sont donc pas considérés. Enfin, des cellules cultivées, donc *à priori* **peu ou pas stressées** sont utilisées, ce qu n'est sans doute pas le cas dans les nuages même si elles restent actives.

Pour tenter de contrer ces différentes limites à nos investigations, le développement de plusieurs manipulations a été entrepris. Cela concerne essentiellement l'utilisation d'un milieu de composition chimique complexe, plus proche de celle de l'eau de nuage, et l'aérosolisation de ce milieu en gouttelettes. Ces **manipulations préliminaires** et prospectives sont présentés en annexe 3.

IV.5. Conclusion

Les investigations métaboliques des souches isolées des échantillons d'eau de nuage ont impliqué des substrats variés : acides carboxyliques (monoacide : formiate, acétate et lactate, et diacide : succinate), alcool (méthanol) et aldéhyde (formaldéhyde). Il s'agit de composés présents en quantité relativement importante dans l'eau de nuages. Plus de 60 souches bactériennes et de levures ont été testées (« screenings ») pour leur aptitude à dégrader ces composés, en conditions optimales de température (27°C ou 17°C suivant les souches) et en présence d'un composé unique. Les souches montrent une capacité importante à transformer l'ensemble des composés, excepté le D-lactate le plus souvent. Les bactéries à Gram négatif constituent le groupe le plus efficace envers les acides carboxyliques en C_1 (formiate), C_2 (acétate) et C_3 (lactate), alors que les levures semblent plus orientées vers les chaînes plus longues (C_2, C_3 et C_4 (succinate)). Les bactéries à Gram négatifs sont de plus toutes incapables de sporuler et sont donc les plus susceptibles d'influencer la chimie du nuage, pour ces 2 raisons.

A partir de ces tests systématiques, la spectroscopie par RMN ^{1}H utilisée en routine au laboratoire pour doser les composés dans les milieux d'incubation a également permis de montrer que les micro-organismes pouvaient, en plus de représenter un puits pour les

composés chimiques, être une source d'autres composés. Le succinate peut par exemple être transformé en fumarate, ou encore le lactate en pyruvate. Concernant le formaldéhyde et le méthanol, ils ont été testés simultanément, et il apparaît que le formaldéhyde est très souvent oxydé en formiate, comme c'est le cas dans les processus photochimiques. Les micro-organismes semblent « vouloir se débarrasser » rapidement du formaldéhyde et le réduisent également rapidement en méthanol.

L'ensemble de ces tests a ensuite permis la sélection de souches pour des investigations plus poussées, concernant d'une part le métabolisme des composés en C_1 par l'utilisation de formaldéhyde marqué au carbone 13 et de la spectroscopie par RMN ^{13}C, et d'autre part l'effet de la température sur la vitesse de biodégradation. Des tests métaboliques ont donc été réalisés à 5°C, qui correspond à la température moyenne annuelle enregistrée au sommet du puy de Dôme. Les résultats obtenus lors de l'incubation en présence de formaldéhyde ^{13}C montrent de façon claire que le formiate et le méthanol sont des métabolites du formaldéhyde, rencontrés chez toutes les souches considérées ici. De plus, à basse température, les capacités de biodégradations en moyenne divisées par 3 entre 17°C et 5°C pour le formiate, l'acétate et l'isomère L du lactate, pour les souches considérées (bactéries à Gram négatif et levure). La vitesse de biotransformation du formaldéhyde, composé majeur en chimie de l'atmosphère, atteint à 5°C plus de 60 % la valeur déterminée à 17°C.

Des extrapolations des vitesses de dégradation déterminées pour ces souches sélectionnées à un nuage de composition microbienne et chimique moyennes ont été réalisées, pour les 2 températures. Elles montrent que même si l'activité microbiologique n'explique évidemment pas toute la réactivité des produits testés dans la phase aqueuse du nuage, ils pourraient être impliqué de façon significative avec des transformations de l'ordre de plusieurs µM en quelques heures même à 5°C. Cette partie de l'étude reste très novatrice et elle est expérimentalement abordée tels que le permettent les moyens techniques actuels. Même s'il reste encore difficile d'extrapoler les résultats obtenus, cela donne un bon aperçu de l'intervention potentielle réelle de l'activité microbienne dans la chimie aqueuse du nuage.

Conclusion générale

Une étude du contenu microbiologique des nuages collectés au sommet du puy de Dôme a donc pu être mise en place entre le LaMP et le SEESIB. Les résultats montrent que des micro-organismes sont présents dans la phase aqueuse des nuages en troposphère libre. Leur concentration en bruit de fond se situe pour ce site autour de 5 x 10^4 cellules mL^{-1} pour les bactéries et 5 x 10^3 cellules mL^{-1} pour les champignons et levures. Les cellules apparaissent la plupart du temps libres, et les champignons sont présents uniquement sous forme de spores.

Différents paramètres, comme **la saison et l'origine de la masse d'air, sont liés aux variations de concentrations** observées, mais aucune influence des paramètres météorologiques locaux n'a été détectée.

D'abord, les niveaux de concentration en cellules fongiques (totales et cultivées) sont globalement plus importants en été. Cette tendance reste vraie pour les bactéries cultivées, mais concernant les bactéries totales, la concentration estivale semble surtout plus variable que le reste de l'année. De plus, le nombre de micro-organismes cultivés à 15°C apparaît relativement plus élevé durant la période la plus froide de l'année, par rapport à ceux cultivés à 27°C.

A cette périodicité saisonnière s'ajoute l'influence de l'origine de la masse d'air : l'océan est apparemment une source majeure de micro-organismes, qui seraient intégrés de façon préférentielle aux gouttelettes de nuages. Une corrélation négative entre le nombre total de bactéries et le degré d'influence anthropique est aussi nettement observée, sans que la concentration en cellules fongiques soient affectée. Bien qu'il puisse s'agir d'un effet de source, on ne peut pas exclure que la toxicité de l'eau de nuages « pollués » soit à l'origine d'une telle tendance.

Une faible proportion de cellules est récupérée par culture (~10% pour les espèces fongiques et généralement moins de 1% pour les bactéries), que ce soit à 27°C ou à 15°C, et ce malgré l'utilisation d'un milieu de culture adapté aux micro-organismes stressés. Pourtant la plus grande partie d'entre eux sont en vie (VBNC), d'après les mesures de concentration en ATP, avec une activité potentiellement importante. Les communautés rencontrées, au moins pour les cultivables, concernent souvent des souches aux propriétés physiologiques pouvant leur permettre de subsister dans le nuage, comme la présence de pigments ou la capacité de se développer à basse température. Parmi les 71 souches bactériennes, les 42 souches de champignons et les 15 levures isolées, une importante diversité est constatée. Les genres

bactériens rencontrés sont affiliés aux Actinobacteria, aux Firmicutes, aux Alpha-, Beta- et Gamma-Proteobacteria, ainsi qu'aux Bacteroidetes. Les genres bactériens majoritaires sont *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Arthrobacter* et *Streptomyces*.

Les caractéristiques métaboliques des souches isolées ont été étudiées et les analyses réalisées par spectroscopie par RMN ^{1}H attestent de leur grande efficacité à dégrader des composés organiques présents en quantité dans l'eau des nuages, comme le formiate, l'acétate, le lactate, le succinate, le méthanol et le formaldéhyde. Cette activité métabolique est observée même à basse température (5°C), et pourrait influencer de façon significative sur la composition et la réactivité chimique de l'eau de nuage. Des composés peuvent être produits suite à la dégradation des composés testés. Concernant les acides carboxyliques, il a été montré que la transformation du lactate conduisait dans certains cas à la production de pyruvate, ou encore que le succinate pouvait être oxydé en fumarate. Le formaldéhyde est pour sa part très rapidement transformé en méthanol et/ou en formiate. Cette dernière constatation a pu être vérifiée grâce à l'incubation de cellules en présence de formaldéhyde marqué au ^{13}C, suivie d'analyses par spectroscopie par RMN ^{13}C. Les voies de transformations biochimiques mises en évidence sont similaires à celles induites photochimiquement, notamment pour les composés en C_1 et surtout le formaldéhyde, d'une importance capitale en chimie atmosphérique.

Les vitesses de biodégradation déterminées envers les composés organiques testés et les extrapolations effectuées montrent qu'une implication de la composante microbiologique dans la chimie des nuages est tout à fait envisageable : plusieurs micromolaires de ces composés pourraient être transformés toutes les heures dans les nuages, par voie biochimique. Il s'agit de la conclusion principale de mon travail de thèse.

D'un autre côté, plusieurs souches ont une capacité IN très élevée (-3°C) suggérant une probable intervention des micro-organismes dans les processus microphysiques du nuage. Leur importance relative reste cependant à déterminer.

Finalement, le genre bactérien *Pseudomonas* est l'exemple type des intérêts que peuvent avoir l'étude des micro-organismes transitant par les gouttelettes de nuages et de leur implications : abondance, caractère non sporulant, croissance et activité métabolique rapides à basse température, activité glaçogène, ou encore phytopathogénicité.

A un niveau personnel, cette thèse fut d'un grand intérêt, permettant de réaliser des recherches dans un domaine largement inexploré tout en impliquant des manipulations de terrains relativement exotiques et enthousiasmantes. Enfin, elle m'a permis d'accéder à une mission en région polaire ayant donné lieu à une publication, présentée en annexe 4.

Perspectives

De nombreuses possibilités d'élargissement du champ d'investigations permettant d'aborder le sujet de manière plus complète ont été émises ou nous ont été suggérées tout au long de cette étude. Le sujet quasiment vierge est inspirant et permet des recherches novatrices. Au regard des hypothèses émises pour expliquer certains des résultats obtenus et avec un recul sur le sujet de plus de 3 ans, il est clair que des améliorations techniques peuvent être apportées au protocole suivi, à la fois sur les analyses des échantillons d'eau de nuage et sur les investigations de laboratoire.

Partie environnementale de l'étude

Quelques améliorations générales sont à apporter, comme l'utilisation de **milieux de cultures** contenant un composé antifongique pour le dénombrement des bactéries et un antibiotique pour le dénombrement des champignons et levures pour faciliter la tâche de l'expérimentateur. La culture des échantillons à une troisième température de 5°C est également à envisager puisque les moyens du laboratoire le permettent désormais. De plus, des milieux de culture plus sélectifs, adaptés à des organismes d'origine marine par exemple, ou plus spécifiquement aux cyanobactéries, doivent être utilisés en complément des milieux généraux pour tenter de déterminer le poids de différentes sources de micro-organismes possibles, notamment la source océanique.

Concernant les dénombrements par microscopie, la technique de Fluorescent In Situ Hybridization (**FISH**) pourrait être appliquée pour accéder relativement rapidement à la structure globale de la population bactérienne.

Pour valider ou infirmer l'hypothèse d'une intégration différentielle des micro-organismes dans les gouttelettes de nuages, il serait pertinent de suivre un évènement lors de la transition air sec → nuage, en considérant à la fois la phase aqueuse et la phase particulaire interstitielle pour déterminer le **taux de fractionnement microbien**. Le mieux serait évidemment de réaliser des prélèvements à partir d'avion, permettant ainsi une couverture spatiale plus large.

D'un autre coté, les mesures d'**ATP** doivent être élargies à celle de la charge énergétique (considérant simultanément l'ATP, l'ADP et l'AMP), pour véritablement déterminer l'état énergétique dans lequel se trouvent les micro-organismes dans le nuage à l'instant t du prélèvement. Des mesures de production microbienne peuvent aussi être effectuées grâce à

l'utilisation de substrats tritiés (microautoradiographie), comme on pu le montrer certaines manipulations dont il n'est pas fait mention dans ce manuscrit.

Investigations métaboliques

L'ensemble des manipulations doit être réalisé en accord avec l'intégration des résultats dans un modèle de chimie atmosphérique. Pour cela, il apparaît nécessaire de disposer pour chaque test d'un **paramètre relatif à la biomasse** mise en jeu.

Il faut aussi déterminer des **affinités enzymatiques** (K_m) et des **constantes de vitesses** (K_{cat}), en réalisant des tests en présence de différentes concentrations du composé à biodégrader, et en se focalisant sur les températures les plus froides expérimentalement accessibles. Les constantes cinétiques déterminées sont ensuite à comparer avec les constantes correspondant aux transformations photochimiques.

De plus, **l'utilisation de composés marqués** doit être élargie pour établir une cartographie générale des processus réactionnels imputables aux micro-organismes dans les nuages. Il serait également intéressant de capter le **CO_2 produit** lors de l'incubation en présence de composés marqués au **^{13}C** pour vérifier les bilans déterminés. En plus du marquage au ^{13}C, des composés deutérés (marquage au **^{2}H**) peuvent être utilisés, notamment pour établir l'implication éventuelle de cofacteurs enzymatiques comme le NAD.

Ce travail ouvre des perspectives scientifiques majeures à plus long terme, dans la mesure où il apparaît que le rôle de l'activité microbiologique dans la chimie des composés organiques dans la phase aqueuse du nuage a clairement été sous-estimé jusqu'ici. Un tel impact pourrait également s'exprimer sur les particules d'aérosol, puisqu'elles contiennent également souvent une quantité d'eau disponible importante. De plus, l'influence de l'océan sur le contenu microbien de l'atmosphère pourrait jusqu'ici avoir été largement sous-évaluée et ces micro-organismes peuvent se révéler de très efficaces IN. Cet ensemble de constats implique que la composante microbienne de l'atmosphère soit reconsidérée à grande échelle, afin de considérer les cellules non plus comme de banales particules organiques, mais comme des particules biologiques aux propriétés particulières et capitales pour la physico-chimie de l'atmosphère dans son ensemble. Enfin, la relation négative entre le contenu bactérien et l'influence anthropique est à considérer avec attention, car elle montre que l''impact des activités humaines, en plus de la problématique de réchauffement global que l'on connaît, pourrait être à l'origine d'une altération du transit des micro-organismes par l'atmosphère, donc du lien aérien existant entre des écosystèmes éloignés.

Références bibliographiques

Abyzov S.S., Mitskevich I.N., Poglazova M.N., Barkov N.I., Lipenkov V.Y., Bobin N.E., Koudryashov B.B., Pashkevich V.M. & Ivanov M.V. (2001). Microflora in the basal strata at Antarctic ice core above the Vostok lake. *Advances in Space Research* 28, 701-706.

Adhikari A., Reponen T., Grinshpun S.A., Martuzevucius D. & LeMasters G. (2006). Correlation of ambient inhalable bioaerosols with particulate matter and ozone: a two-year study. *Environmental Pollution* 140, 16-28.

Adroer N., Casas C., de Mas C. & Solà C. (1990). Mechanism of formaldehyde biodegradation by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33, 217-220.

Aguogué H., Joux F., Obernosterer I. & Lebaron P. (2005). Resistance of marine bacterioneuston to solar radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 9, 5282-5289.

Ahern H., Hill T., Walsh K. & Moffett B. (2006). The bacteria of Scottish coastal clouds. *Poster P018 de l'International Conference on Alpine and Polar Microbiology*, Innsbruck – Autriche, 27-31 mars 2006.

Alfreider A., Pernthaler J., Amann R., Sattler B., Glockner F.O., Wille A. & Psenner R. (1996). Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2138–3144.

Aller J.Y., Kuznetsova M.R., Jahns C.J. & Kemp P.F. (2005). The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols. *Aerosol Science* 36, 801-812.

Amann R.I., Ludwig W. & Schleifer K-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews* 59,143-169.

Amato P., Ménager M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. & Delort A-M., (2005). Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds. *Atmospheric Environment* 39, 4143-4153.

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

Amato P., Hennebelle R., Magand O., Sancelme M., Delort A-M., Barbante C., Boutron C. & Ferrari C. (2007b). Bacterial characterization of the snow cover at Spitzberg, Svalbard. *FEMS Microbiology Ecology* 59, 255-264.

Amato P., Parazols M., Sancelme M., Mailhot G., Laj P. & Delort A-M. (soumis en décembre 2006). An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the puy de Dôme (France). *Atmospheric Environment*.

Amato P., Demeer F., Melaouhi A., Martin-Biesse A-S., Sancelme M., Laj P. & Delort A-M. (à soumettre en janvier 2007). A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by micro-organisms. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*.

Amato P., Sancelme M., Laj P. & Delort A-M. (à soumettre début 2007). Is oxidation of organic acids in clouds controlled by micro-organisms? *Nature*.

Andersen A.A. (1958). New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *Journal of Bacteriology* 76, 471-484.

Andersen A.A & Andersen M.R. (1962). A monitor for airborne bacteria. *Applied Microbiology* 10, 181-184.

Anderson J.I.W. & Heffernan W.P. (1965). Isolation and characterization of filterable bacteria. *Journal of Bacteriology* 90, 6, 1713-1718.

Andreeva I.S., Belan B.D., Borodulin A.I., Buryak G.A., Zhukov V.A., Panchenko M.V., Penenko V.V., Petrishchenko V.A. & Safatov A.S. (2001). Variability of the content of live microorganisms in the atmospheric aerosol in southern regions of the western Siberia. *Doklady Biological Sciences* 381, 530-534.

Angulo-Romero J., Mediavilla-Molina A. & Domínguez-Vilches E. (1999). Conidia of *Alternaria* in the atmosphere in the city of Cordoba, Spain, in relation to meteorological parameters. *International Journal of Biometeorology* 43, 1, 45-49.

Ariya P.A., Nepotchatykh O., Ignatova O. & Amyot M. (2002). Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. *Geophysical Research Letters* 29, 22, 2077-2080.

Ariya P.A. & Amyot M. (2004). New directions: the role of bioaerosols in atmospheric chemistry and physics. *Atmospheric Environment* 38, 1231-1232.

Askew E.W. (2002). Work at high altitude and oxydative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology* 180, 107-119.

Barth M.C. (2006). The importance of cloud drop representation on cloud chemistry. *Atmospheric Research* 82, 294-309.

Bauer H., Kasper-Giebl A., Löflund M., Giebl H., Hitzenberger R., Zibuschka F. & Puxbaum H. (2002a). 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., Kasper-Giebl A., Zibuschka F.,

Hitzenberger R., Kraus G.F.R. & Puxbaum H. (2002b). Determination of the carbon content of airborne fungal spores. *Analytic Chemistry* 74, 1, 91-95.

Bauer H., Giebl H., Hitzenberger R., Kasper-Giebl A., Reischl G., Zibuschka F. & Puxbaum H. (2003). Airborne bacteria as cloud condensation nuclei. *Journal of Geophysical Research* 108(D21), 4658. doi:10.1029/2003JD003545.

Baxter L.J. & Cookson J.T. (1983). Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 919-934.

Bergauer P., Fonteyne P.A., Nolard N., Schinner F. & Margesin R. (2005). Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere* 59, 909-918.

Blanchard D.C. & Syzdek L. (1982). Water-to-air transfert and enrichment of bacteria in drops from bursting bubbles. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 5, 1001-1005.

Booth I.R., Cash P. & O'Byrne C. (2002). Sensing and adapting to acid stress. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 33-42.

Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J. & Desjardins R. (1999). LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* 37, 1, 77-86.

Bovallius Å., Bucht B., Roffey R., Ånäs P., (1978a). Long-range air transmission of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 36, 6, 1231-1232.

Bovallius Å., Bucht B., Roffey R. & Ånäs P. (1978b). Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in Sweden. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 5, 847-852.

Brantner B., Fierlinger H. & Puxbaum H. (1994). Cloud water chemistry in the subcooled droplet regime at mount Sonnblick (3106 m a.s.l., Salzburg, Austria). *Water, Air and Soil Pollution* 74, 363-384.

Breeuwer P., Lardeau A., Peterz M. & Joosten H.M. (2003). Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Applied Microbiology* 95, 967-973.

Bridges K.S., Jickells T.D., Davies T.D., Zeman Z. & Hunova I. (2002). Aerosol, precipitation and cloud water chemistry observations on the Czech Krusne Hory plateau adjacent to a heavily industrialised valley. *Atmospheric Environment* 36, 353-360.

Brinkmeyer R., Knittel K., Jügens J., Weyland H., Amann R. & Helmke E. (2003). Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6610-6619.

Burch M. & Levetin E. (2002). Effects of meteorological conditions on spore plumes. *International Journal of Biometeorology* 46, 107-117.

Burger S.R. & Bennett J.W. (1985). Droplet enrichment factors of pigmented and nonpigmented *Serratia marcescens*: possible selective function for prodigiosin. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 2, 487-490.

Bussmann I., Philipp B. & Schink B. (2001). Factors influencing the cultivability of lake water bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 47, 41-50.

Byrd J.J., Xu H-S. & Colwell R.R. (1991). Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 2, 487-490.

Calabrese J.P. & Bissonnette G.K. (1990). Improved membrane filtration method incorporating catalase and sodium pyruvate for detection of chlorine-stressed coliform bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 11, 3558-3564.

Carpenter E., Lin S. & Capone D.G. (2000). Bacterial activity in south pole. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 10, 4514-4517.

Casareto B.E., Suzuki Y., Okada K & Morita M. (1996). Biological micro-particles in rain water. *Geophysical Research Letters* 23, 2, 173-176.

Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D. & Sowers R.K. (2002). Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 253-261.

Chameides W.L. & Davis D.D. (1983). Aqueous-phase source for formic acid in clouds. *Nature* 304, 427-429.

Christner B.C. (2001). Incorporation of DNA and protein precursors into macromolecules by Bacteria at -15°C. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 12, 6435-6438.

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

Ciccarelli F.D. & Bork P. (2005). The WHy domain mediates the response to desiccation in plants and Bacteria. *Bioinformatics* 21, 8, 1304-1307.

Cini, R., Prodi F., Santachiara G., Porcù F., Bellandi S., Strortini A.M., Oppo C., Ustidi R. & Pantani F. (2002). Chemical characterization of cloud episodes at a ridge site in Tuscan Appennines, Italy. *Atmospheric Research*, 61, 311-334.

Cochet N. & Widehem P. (2000). Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Applied Microbiology*

Biotechnology 54, 153-161.

Collett Jr. J.L., Bator A., Sherman D.E., Moore K.F., Hoag K.J., Demoz B.B., Rao X. & Reilly J.E. (2002). The chemical composition of fogs and intercepted clouds in the United States. *Atmospheric Research* 64, 29-40.

Deguillaume L., Leriche M. & Chaumerliac N. (2005). Impact of radical versus non-radical pathways in the Fenton chemistry on the iron redox cycle in clouds. *Chemosphere* 60, 718-724.

Deguillaume L., Leriche M., Amato P., Delort A-M., Chaumerliac N., Flossmann A., Pöschl U. & Ariya P.A. (Soumis en décembre 2006). PBA and chemical processes in the atmosphere – reciprocal effects. *Biogeosciences*.

Delort A.M. & Combourieu B. (2000). NMR in microbiology. Theory and application. Barbotin and Portais (eds), Chap. 19 pp 421-427., Horizon scientific press, UK.

Delort A-M. (2006). Use of NMR to study *in situ* bioconversion of gaseous compounds. In *Gas resources for resource recovery*. Lens. P. Ed. IWA Publishing, London, Chapitre 9, 117-131.

Delort A-M., Amato P., Sancelme M. & Laj P. (2007). Do micro-organisms play a role in cloud chemistry? *Numéro spécial de la Swiss Society for Aerobiology* (Revue sur invitation).

Dingle A.N. (1966). Pollen as condensation nuclei. *J. Rech. Atmos.* 2, 231-237.

Dimmick R.L., Wolochow H. & Chatigny M.A. (1979). Evidence that bacteria can form new cells in airborne particles. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 5, 924-927.

Di Giorgio C., Krempff A., Guiraud H., Binder P., Tiret C. & Dumenil G. (1996). Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles. *Atmospheric Environment* 30, 1, 155-160.

Duguay A.R. & Silhavy T.J. (2004). Quality control in the bacterial periplasm. *Biochimica et Biophysica Acta* 1694, 121-134.

Dunfield P., Knowles R., Dumont R & Moore T. (1993). Methane production and consumption in temperate and subarctic peat soils: response to temperature and pH. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 321-326.

Durand K.T.H, Muilenberg M.L., Burge H.A. & Seixas N.S. (2002). Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration. *Ann. Occup. Hyg.* 46, 1, 113-118.

Durand S., Amato P., Sancelme M., Delort A-M., Combourieu B. and Besse-Hogan P. (2006). First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms mesotrione. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 2, 222-228.

Eduard W., Blomquist G., Nielsen H.B. & Heldal K.K. (2001). Recognition errors in the quantification of micro-organisms by fluorescence microscopy. *Ann. Occup. Hyg*. 45, 6, 493-498.

Eiroa M., Vilar A., Kennes C. & Veiga M.C. (2006). Formaldehyde biodegradation in the presence of methanol under denitrifying conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81, 312-317.

Ervens B., Feingold G. & Kreidenweis S.M. (2005). The influence of water soluble organic carbon on cloud drop number concentration. *Journal of Geophysical Research* 110(D18211), doi:10.1029/2004JD005634.

Ewart K.V., Lin Q. & Hew C.L. (1999). Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55, 271-283.

Faust B.C., Powell K., Janakiram Rao C. & Anastasio C. (1996). Aqueous-phase photolysis of biacetyl (an α-dicarbonyl compound): a sink for biacetyl, and a source of acetic acid, peroxyacetic acid, hydrogen peroxyde, and the highly oxidizing acetylperoxyl radical in aqueous aerosols, fogs, and clouds. *Atmospheric Environment* 31, 3, 497-510.

Felsenstein J. (2004). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *Distributed by the author*. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

Fisak J., Tesar M., Rezacova D., Elias V., Weignerova V. & Fottova D. (2002). Pollutant concentrations in fog and low cloud water at selected sites of the Czech Republic. *Atmospheric Research* 64, 75-87.

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

Fong N.J.C, Burgess M.L., Barrow K.D. & Glenn D.R. (2001). Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Applied Microbiology and Biotechnologies* 56, 750-756.

Foster P.L. (2005). Stress responses and genetic variation in Bacteria. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 569, 3-11.

Fozo E.M. & Quivey Jr R.G. (2004). Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2, 929-936.

Franzen J.S. & Binkley S.B. (1961). Comparison of the acid-soluble nuceotides in *Escherichia coli* at different growth rates. *The Journal of Biological Chemistry*, 236, 2, 515-519.

Fulton J. D. (1966a). Micro-organisms of the upper atmosphere: III - Relationship between altitude and micropopulation. *Applied Microbiology* 14, 2, 237-240.

Fulton J. D. (1966b). Micro-organisms of the upper atmosphere: IV - Microorganisms of a land air mass as it traverses ocean. *Applied Microbiology* 14, 2, 241-244.

Fulton J. D. (1966c). Micro-organisms of the upper

atmosphere: V - Relationship between frontal activity and the micropopulation at altitude. *Applied Microbiology* 14, 2, 245-250.

Fulton J. D. & Mitchell R.B. (1966). Micro-organisms of the upper atmosphere: II - Microorganisms in two types of air masses at 690 meters over a city. *Applied Microbiology* 14, 2, 232-236.

Fuzzi S., Mandrioli P. & Perfetto A. (1997). Fog droplets – An atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmospheric Environment* 31, 2, 287-290.

Fuzzi S., Facchini M.C., Decesari S., Matta E. & 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.

Garg A.K., Kim J-K., Owens T.G., Ranwala A.P., Choi Y.D., Kochian L.V. & Wu R.J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS* 99, 25, 15898-15903.

Gerday C., Aittaleb M., Arpigny J.L., Baise E., Chessa J-P., Garsoux G., Petrescu I. & Feller G. (1997). Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochemica et Biophysica Acta* 1342, 119-131.

Gerstmeir R., Wendisch V.F., Schnicke S., Ruan H., Farwick M., Reinscheid D. & Eikmanns B.J. (2003). Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 104, 99-122.

Gounot AM. (1999). Microbial life in permanently cold soils. In Cold-adapted Organisms: *Ecology, Physiology, Enzymology and Molecular Biology* 3-17. Edited by Margesin R & Schinner F. Heidelberg: Springer-Verlag.

Gourmelon M., Cillard J. & Pommepuy M. (1994). Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxydative stress hypothesis. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 1, 105-112.

Gich F., Schubert K., Bruns A., Hoffelner H. & Overmann J. (2005). Specific detection, isolation and characterization of selected, previously uncultured members of the freshwater bacterioplankton community. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 5908-5919.

Granby K., Christensen C.S. & Lohse C. (1997). Urban and semi-rural observations of carboxylic acids and carbonyls. *Atmospheric Environment* 31, 10, 1403-1415.

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

Grivet J-P., Delort A-M. & Portais J-C. (2003). NMR and microbiology: from physiology to metabolomics. *Biochimie* 85, 823-840.

Grosjean D. (1989). Organic acids in south California air: ambient concentrations, mobile source emissions, in situ formation and removal processes. *Environmental Science and Technology* 23, 1506-1514**.**

Grossart H.P., Kiorboe T., Tang K. & Ploug H. (2003) Bacterial colonization of particles: growth and interactions. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6, 3500-3509.

Groudieva T., Kambourova M., Yusef H., Royter M., Grote R., Trinks H. & Antranikian G. (2004). Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. *Extremophiles* 8, 475-488.

Hanson R.S. & Hanson T.E. (1996). Methanotrophic Bacteria. *Microbiological Reviews* 60, 2, 439-471.

Harrison R.M., Jones A.M., Biggins P.D.E., Pomeroy N., Cox C.S., Kidd S.P., Hobman J.L., Brown N.L. & Beswick A. (2005). Climate factors influencing bacterial count in background air samples. *International Journal of Biometeorology* 49, 167-178.

Hatch M.T. & Dimmick R.L. (1966). Physiological responses of airborne bacteria to shifts in relative humidity. *Bacteriological Reviews* 30, 3, 597-602.

Heidelberg J.F., Shahamat M., Levin M., Rahman I., Stelma G., Grim C. & Colwell R.R. (1997). Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 9, 3585-3588.

Heinmets F., Taylor W.W. & Lehman J.J. (1953). The use of metabolites in the restoration of the viability of heat and chemically inactivated *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 67, 5-14.

Hejkal T.W., LaRock P.A. & Winchester J.W. (1980). Water-to-air fractionation of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 2, 335-338.

Herlihy L.J., Galloway J.N. & Mills A.L. (1987). Bacterial utilization of formic and acetic acid in the rainwater. *Atmospheric Environment* 21, 2397-2402.

Hidalgo A., Lopategi, A., Prieto M., Serra J.L. & Llama M.J. (2002). Formaldehyde removal in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. *Applied Microbiology and biotechnology* 58, 260-263.

Higgins I.J., Best D.J., Hammond R.C. & Scott D. (1981). Methane-oxidizing Bacteria. *Microbiological Reviews* 45, 4, 556-590.

Hoyoux A., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Huston A.L., Marx J-C., Sonan G., Zeng Y., Feller G. & Gerday C. (2004). Extreme catalysts from low-temperature environments. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98, 5, 317-330.

Humayoun S.B., Bano N. & Hollibaugh J.T. (2003). Depth distribution of microbial diversity in Mono Lake, a meromictic soda lake in California. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1030-1042.

Hunter B.K., Nicholls K.M. & Sanders J.K. (1984). Formaldehyde metabolism by *Escherichia coli*. *In vivo* carbon, deuterium, and two-dimensional NMR observations of multiple detoxifying pathways. *Biochemistry* 23, 3, 508-514.

Imshenetsky A.A., Lysenko S.V. & Kazakov G.A. (1978). Upper boundary of the biosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 1, 1-5.

Jacob D.J. (1986). Chemistry of OH in remote clouds and its role in the production of formic acid and peroxymonosulfate. *Journal of Geophysical Research* 91, 9807-9826.

Jennison M.W. (1937). Relations between plate counts and direct microscopic counts of *Escherichia coli* during logarithm growth period. *Journal of Bacteriology* 33, 461-469.

Jones B.L. & Cookson J.T. (1983). Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 3, 919-934.

Jones A.M & Harrison R.M. (2004). The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations – a review. *Science of the Total Environment* 326, 151-180.

Joos F. & Baltensperger U. (1991). A field study on chemistry, S(IV) oxidation rates and vertical transport during fog conditions. *Atmospheric Environment* 25A, 217-230.

Jormakka M., Byrne B. & Iwata S. (2003). Formate dehydrogenase – a versatile enzyme in changing environments. *Current Opinion in Structural Biology* 13, 418-423.

Junge K., Eicken H. & Deming J.W. (2004). Bacterial activity at -2 to -20°C in Arctic wintertime sea-ice. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1, 550-557.

Juozaitis A., Lugauskas A., Sveistyte L., Ulevicius V., Willeke K., Grinshpun S.A. & Reponen T. (1998). Assessment of microorganism transfer from Baltic sea waters to the atmosphere. *Journal of Aerosol Science* 29, Suppl. 1, S547-S548.

Karl D.M., Bird D.F., Björkman K., Houlihan T., Shackelford R. & Tupas L. (1999). Microorganisms in the accreted ice of lake Vostok, Antarctica. *Science* 286, 2144-2147.

Kato N., Kobayashi T., Shimao M. & Sakazawa C. (1984). Properties of formaldehyde dismutation catalyzing enzyme of *Pseudomonas putida* F61-a. *Journal of Biotechnology* 1, 295-273.

Katial R.K., Zhang Y. & Jones R.H. (1997). Atmospheric mold spore counts in relation to meteorological parameters. *International Journal of Biometeorology* 41, 17-22.

Kawamura K., Steinberg S., Ng L. & Kaplan I.R. (2001). Wet deposition of low molecular weight mono- and di-carboxilic acids, aldehydes and inorganic species in Los Angeles. *Atmospheric Environment* 35, 3917-3926.

Kawamura K., Imai Y. & Barrie L.A. (2005). Photochemical production an loss of organic acids in high Arctic aerosols during long-range transport and polar sunrise ozone depletion events. *Atmospheric Environment* 39, 599-614.

KEGG PATHWAY database, http://www.genome.jp/kegg/pathway.html.

Kell D.B., Peck M.W., Rodger G. & Morris J.G. (1981). On the permeability of weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochemical and Biophysical Research Community* 99, 81-88.

Kempf B. & Bremer E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolarity environments. *Archives of Microbiology* 170, 319-330.

Khwaja H., Brudnoy S. & Husain L. (1995). Chemical characterization of three summer cloud episodes at white-face Mountain. *Chemosphere* 31, 349-362.

Kieber R.J., Rhines M.F., Willey J.D. & Brooks Avery Jr. D. (1999). Rainwater formaldehyde: concentration, deposition and photochemical formation. *Atmospheric Environment* 33, 3659-3667.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16,111-120.

Kitahara K., Obayashi A. & Fukui, S. (1953). Racemase I cell-free racemase. *Enzymologia* 15, 259-266

Kogure K., Simidu U. & Taga N. (1979). A tentative microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 25, 415-420.

Koutsoumanis K.P. & Sofos J.N. (2004). Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology* 38, 321-326.

Krämer M. & Schütz L. (1994). On the collection efficiency of a rotating arm collector and its applicability to cloud- and fogwater sampling. *Journal of Aerosol Sciences* 25, 1, 137-148.

Knaysi G. (1935). A microscopic method of distinguishing dead from living bacterial cells. *Journal of Bacteriology* 30, 193-206.

Kruisz C., Berner A. & Brantner B. (1993). A cloud water sampler for high wind speeds. *Proceeding of the EUROTRAC Symposium* 1992, edited by Borell PM, pp 523-525, SPB Acad, The Hague, The Netherlands.

Kumar N., Kulshrestha U.C., Khare P., Saxena A., Kumari K.M. & Srivastava S.S. (1996). Measurements of formic and acetic acid levels in the vapor phase at Dayalbagh, Agra, India. *Atmospheric Environment* 30, 20, 3545-3550.

Kurath G. & Morita R.Y. (1983). Starvation-survival physiological studies of a marine

Pseudomonas sp.. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 4, 1206-1211.

Lau A.P.S., Lee A.K.Y., Chan C.K. & Fang M. (2006). Ergosterol as a biomarker for the quantification of the fungal biomass in atmospheric aerosols. *Atmospheric Environment* 40, 249-259.

Laybourn-Parry J. (2002). Survival mechanisms in Antarctic lakes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 357, 863-869.

Lee U.B., Kim H.K. & Kim S.S. (2002). Hygroscopic growth of *E. coli* and *B. subtilis* bioaerosols. *Journal of Aerosol Science* 33, 1721-1723.

Lelieveld J. & Crutzen P.J. (1991). The role of clouds in tropospheric photochemistry. *Journal of Atmospheric Chemistry* 12, 229-267.

Leriche M., Chaumerliac N. & Monod A. (2001). 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(32), 5411-5423.

Leslie S.B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H. & Crowe L.M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 10, 3592-3597.

Leyer G.J. & Johnson E.A. (1993). Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 6, 1842-1847.

Lighthart B. (1972). Survival of airborne bacteria in a high urban concentration of carbon monoxide. *Applied Microbiology* 25, 1, 86-91.

Lighthart B. & Kim J. (1989). Simulation of airborne microbial droplet transport. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 9, 2349-2355.

Lighthart B. & Shaffer B.T. (1995a). Airborne bacteria in the atmospheric surface layer: temporal distribution above a grass seed field. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4, 1492-1496.

Lighthart B. & Shaffer B.T. (1995b). Viable bacterial aerosol particle size distributions in the midsummer atmosphere at an isolated location in the high desert chaparral. *Aerobiology* 11, 19-25.

Lighthart B. (1997). The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 23, 263-274.

Lighthart B. (1999). An hypothesis describing the general temporal and spatial distribution of alfresco bacteria in the earth's atmospheric surface layer. *Atmospheric Environment* 33, 611-615.

Limbeck A. & Puxbaum H. (2000). Dependence of in-cloud scavenging of polar organic aerosols compounds on the water solubility. *Journal of Geophysical Research* 105, 19857-19867.

Lin X., Reponen T.A., Willeke K., Grishpun S.A., Foarde K.K. & Ensor D.S. (1999). Long-term sampling of airborne bacteria into a non-evaporating liquid. *Atmospheric Environment* 33, 4291-4298.

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.

Lindemann J. & Upper C.D. (1985). Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 2, 1229-1232.

Löflund M., Kasper-Giebl A., Schuster B., Giebl H., Hitzenberger R. & Puxbaum H. (2002). Formic, acetic, oxalic and succinic acid concentrations and their contribution to organic carbon in cloud water. *Atmospheric Environment* 36, 1553-1558.

Lundholm I.M. (1982). Comparison of methods for quantitative determinations of airborne bacteria and evaluation of total viable counts. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 1, 179-183.

Magand O., Ferrari C., Gauchard P-A., Amato P. & Fain X. (2006). Analysis of 7Be and 210Pb air concentrations in Ny-Ålesund, Svalbard: CHIMERPOL II project, preliminary results. *Memoirs of National Institute of Polar Research*, special issue 59, 96-115.

Maki L.R. & Wiloughby K.J. (1978). Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei. *Journal of Applied Meteorology* 17, 1049-1053.

Mancinelli R.L. & Shulls W.A. (1978). Airborne bacteria in an urban environment. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 6, 1095-1101.

Margesin R. & Schinner F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 650-663.

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.

Maron P-A., Lejon D.P.H., Carvalho E., Bizet K., Lemanceau P., Ranjard L. & 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. & Ganio L., (1991). Resuscitation effects of catalase on airborne bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 9, 2775-2776.

Martin S.E., Flowers R.S. & Ordal Z.J. (1976). Catalase: its effects on microbial enumeration. *Applied and Environmental Microbiology* 32, 5, 731-734.

Martin P. & MacLeod R.A. (1984). Observations on the distinction between oligotrophic and eutrophic marine bacteria. *Applied and*

Environmental Microbiology 47, 1017-1022.

Mascher F., Hase C., Moënne-Loccoz Y. & Défago G. (2000). The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4, 1662-1667.

Mason R.P., Sanders J.K., Crawford A. & Hunter B.K. (1986). Formaldehyde metabolism by *Escherichia coli*. Detection by in vivo 13C NMR spectroscopy of S-(hydroxymethyl) glutathione as a transient intracellular intermediate. *Biochemistry* 25, 16, 4504-4507.

Mason R.P. & Sanders J.K.M. (1989). *In vivo* enzymology: A deuterium NMR study of formaldehyde dismutase in *Pseudomonas putida* F61a and *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 28, 2160-2168.

Matsumoto M., Ohishi H. & Benno Y. (2004). H^+-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology* 93, 109-113.

Matthias-Maser S. & Jeanicke 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.

Matthias-Maser S., Bogs B. & Jeanicke R. (2000). The size distribution of primary biological aerosol particles in cloud water on the mountain Kleiner Felderg / Taunus (FRG). *Atmospheric Research* 54, 1-13.

Meier F.C. (1935). Collecting micro-organisms from the Arctic atmosphere. *The Scientific Monthly*, 5-20.

Mitchell R.B., Fulton J.D. & Ellingson H.V. (1954). A soluble gelatin foam sampler for airborne microorganisms at surface levels. *American Journal of Public Health* 44, 1334-1339.

Miteva V.I. & 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, 12, 7806-7818.

Monier J-M. & Lindow S.E. (2003). Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promote aggregates formation on leaf surface. *PNAS* 100, 26, 15977-15982.

Monod A., Chebbi A., Durand-Jolibois R. & Carlier P. (2000). Oxidation of methanol by hydroxyl radicals in aqueous solution under simulated cloud droplet conditions. *Atmospheric Environment* 34, 5283-5294.

Morbach S & Krämer R. (2002). Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in Bacteria. *ChemBioChem* 3, 384-397.

Morita R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews* 39,2, 144-167.

Morita R.Y. (1997). Bacteria in oligotrophic environments. Chapman & Hall, New York, N.Y.

Mueller D.R., Vincent W.F., Bonilla S. & Laurion I. (2005). Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* 53, 73-87.

Murdanoto A.P., Sakai Y., Konishi T., Yasuda F., Tani Y. & Kato N. (1997). Purification and properties of methyl formate synthase, a mitochondrial alcohol dehydrogenase, participating in formaldehyde oxidation in methylotrophic yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 5, 1715-1720.

Newman I.V. (1948). Aerobiology on commercial air routes. *Nature* 4086, 275-276.)

Nichols D., Bowman J.P., Sanderson K., Nichols C.M., Lewis T., McMeekin T. & Nichols P.D. (1999). Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 240–246.

Novitsky J.A. & Morita R.Y. (1978). Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions. *Mar. Biol.* 48, 289-295, *dans Roszak & Colwell (1987)*.

Ochsner U.A., Vasil M.L., Alsabbagh E., Parvatiyar K. & Hassett J. (2000). Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-oxyG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: oxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF. *Journal of Bacteriology* 182, 16, 4533-4544.

Omel'chenko L., Vasil'eva V., Khmelenina V.N. & Trostenko Y.A. (1993). Pathways of primary and intermediate metabolism in a psychrophilic methanotroph. *Microbiology* 62, 509-512.

Paez-Rubio T., Viau E., Romero-Hernandez S., & Peccia J. (2005). Source bioaerosol concentration and rRNA gene-based identification of microorganisms aerosolized at a flood irrigation wastewater reuse site. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2, 804-810.

Panikov N.S., Flanagan P.W., Oechel W.C., Mastepanov M.A. & Christensen T.R. (2005). Microbial activity in soils frozen to below -39°C. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 785-794.

Parazols M., Marinoni A., Amato P., Abida O., Laj P, & Mailhot G. (2006). Speciation and role of iron in cloud droplets at the puy de Dôme station. *Journal of Atmospheric Chemistry* 54, 3, 267-281 (in press, DOI 10.1007/s10874-006-9026-x).

Pasteur M.L. (1860). Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère. *Annales de Chimie et de Physique* 3, 64, 5-110.

Pearce D.A., Van der Gast C.J., Lawley B. & Ellis-Evans J.C. (2003). Bacterioplankton community diversity in a maritime Antarctic lake, determined by culture-independent techniques. *FEMS Microbiology Ecology* 45, 59-70.

Pesaro M., Nicollier, G., Zeyer J. & Widmer F.

(2004). Impact of soil drying-rewetting stress on microbial communities and activities and on degradation of two crop protection products. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5, 2577-2587.

Pluschkell S.B. & Flinckinger M.C. (2002). Dissimilation of [(13)C]methanol by continuous cultures of *Bacillus methanolicus* MGA3 at 50 degrees C studied by (13)C NMR and isotope-ratio mass spectrometry. *Microbiology* 148, 3223-3233.

Poole L.B. (2005). Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433, 240-254.

Popov V.O. & Lamzin V.S. (1994). NAD+-dependent formate dehydrogenase. *Biochem. J.* 301, 625-643.

Porter K.G. & Feig Y.S. (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology Oceanography* 25, 943-948.

Potts M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews* 58, 4, 755-805.

Pouleur S., Richard C., Martin J-G. & Antoun H. (1992). Ice nucleation activity in *Fusarium acuminatum* and *Fusarium avenaceum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2960-2964.

Prasannarai K. & Sridhar K. R. (2001). Diversity and abundance of higher marine fungi on woody substrates along the west coast of India. *Current science* 81, 304-311.

Price P.B. & Sowers T. (2004). Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance and survival. *PNAS* 101(13), 4631-4636.

Priscu J.C., Fritsen C.H., Adams E.E., Giovannoni S.J., Paerl H.W., McKay C.P., Doran P.T., Gordon D.A., Lanoil B.D., Pinckney J.L. (1998). Perennial Antarctic Lake Ice: An Oasis for Life in a Polar Desert. *Sciences* 280(5372), 295-298.

Priscu J.C., Adams E.E., Lyons W.B., Voytek M.A., Mogk D.W., Brown R.L., McKay C.P., Takacs C.D., Welch C.F., Wolf J.D., Kirshtein J.D. & Avci R. (1999). Geomicrobiology of subglacial ice above Lake Vostok, Antarctica. *Science* 286, 2141-2143.

Psenner R. & Sattler B. (1998). Life at the freezing point. *Science* 280, 2073-2074.

Puxbaum H., Rosenberg C., Gregori M., Lanzerstorfer C., Ober E. & Winiwarter W. (1988). Atmospheric concentrations of formic and acetic acid in eastern and northern Austria. *Atmopheric Environment* 22, 2841-2850.

Radon K., Danuser B., Iversen M., Monso E., Weber C., Hartung J., Donham K.J., Palmgren U. & Nowak D. (2002). Air contaminants in different european farming environment. *Ann. Agric. Environ. Med.* 9, 41-48.

Rakotonirainy M.S., Héraud C., Lavédrine B., (2003). Detection of viable fungal spores contaminant on documents and rapid control of the effectiveness of an ethylene oxide disinfection using ATP assay. *Luminescence*, 18, 113-121.

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

Riedel K., Weller R. & Schrems O. (1999). Variability of formaldehyde in the Antarctic atmosphere. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1, 5523-5527.

Rivkina E., Gilichinsky D., Wagener S., Tiedje J., McGrath J. (1998). Biogeochemical activity of anaerobic microorganisms from buried permafrost sediments. *Geomicrobiology Journal* 15, 187-193

Rivkina E.M., Friedmann E.I., McKay C.P., Gilichinsky D.A. (2000). Metabolic Activity of Permafrost bacteria below the Freezing Point. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8), 3230-3233.

Roszak D.B. & Colwell R.R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* 51, 3, 365-379.

Rowbury R.J. & Goodson M. (1999). An extracellular acid stress-sensing protein needed for acid tolerance induction in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 174, 49-55.

Rüden H., Thofern E., Fischer P. & Mihm U. (1978). Airborne microorganisms ; their occurrence, distribution and dependance on environmental factors – especially on organic compounds of air-pollution. *Pageoph*. 116, 335-350.

Sabariego S., Diaz de la Guardia C. & Alba F. (2000). The effect of meteorological factors on the daily variation of airborne fungal spores in Granada (Southern Spain). *International Journal of Biometeorology* 44, 1-5.

Satsumabayashi H., Kurita, H., Chang Y-S., Carmichael G.R. & Ueda H. (1995). Photochemical formations of lower aldehydes and lower fatty acids under long-range transport in central Japan. *Atmospheric Environment* 29, 2, 255-266.

Sattler B., Puxbaum H. & Psenner R. (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophysical Research Letters* 28, 2, 239-242.

Saunders N.F., Thomas T., Curmi P.M., Mattick J.S., Kuczek E., Slade R., Davis J., Franzmann P.D., Boone D., Rusterholtz K., Feldman R., Gates C., Bench S., Sowers K., Kadner K., Aerts A., Dehal P., Detter C., Glavina T., Lucas S., Richardson P., Larimer F., Hauser .L, Land M. & Cavicchioli R. (2003). Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii*. *Genome Research*

13(7), 1580-8.

Sawada H., Takeuchi T. & Matsuda I. (1997). Comparative analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and pv. *phaseolicola* based on phaseolotoxin-resistant ornithine carbamoyl transferase gene (*arg*K) and 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 282-288.

Schnell R.C. & Vali G. (1972). Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation. *Nature* 236, 163-165.

Schnell R.C. & Vali G. (1976). Biogenic ice nuclei: part I – Terrestrial and marine sources. *Journal of Atmospheric Sciences* 236, 163-165.

Schnider-Keel U., Lejbolle K.B., Baehler E., Haas D. & Keel C. (2001). The sigma facto AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 12, 5683-5693.

Schütz L. & Krämer M. (1987). Rainwater composition over a rural area with special emphasis on the size distribution of insoluble particulate matter. *Journal of Atmospheric Chemistry* 5, 173–184.

Scortichini M., Marchesi U., Rossi M.P. & Di Prospero P. (2002). Bacteria associated with hazelnut (*Corylus avellana L.*) decline are of two groups: *Pseudomonas avellanae* and strains resembling *P. syringae* pv. *syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 476-484.

Segawa T., Miyamoto K., Ushida K., Agata K., Okada N. & Kohshima S. (2005). Seasonal change in bacterial flora and biomass in mountain snow from Tateyama mountains, Japan, analyzed by 16SrRNA gene sequencing and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 123–130.

Sellegri K., Laj P., Marinoni A., Dupuy R., Legrand M. & Preunkert S. (2003). Contribution of gaseous and particulate species to droplet solute composition at the Puy de Dôme, France. *Atmospheric Chemistry and Physics* 3, 1509-1522.

Seshu-Kumar G., Jagannadham M.V. & Ray M.K. (2002). Low-temperature-induced changes in composition and fluidity of lipopolysaccharides in the Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology* 184, 23, 6746-6749.

Segawa T., Miyamoto K., Ushida K., Agata K., Okada N. & Kohshima S. (2005). Seasonal change in bacterial flora and biomass in mountain snow from Tateyama mountains, Japan, analyzed by 16S rRNA gene sequencing and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1, 123-130.

Shaffer B.T. & Lighthart, B. (1997). Survey of culturable airborne bacteria at four diverse locations in Oregon: urban, rural, forest and coastal. *Microbial Ecology* 34, 167-177.

Shi T., Reeves R.H., Gilichinsky D.A. & Friedmann E.I. (1997). Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbial Ecology* 33(3), 169-79.

Shivaji S., Chaturvedi P., Reddy G.S. & Suresh K. (2005). *Pedobacter himalayensis* sp. nov., from the Hamta glacier locations in the Himalayan mountain ranges of India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1083-1088.

Skidmore M.L., Foght J.M., Sharp M.J. (2000). Microbial life beneath a high Arctic glacier. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3214-3220.

Skidmore M., Anderson S.P., Sharp M., Foght J. & Lanoil B.D. (2005). Comparison of microbial compositions of two subglacial environments reveals a possible role for microbes in chemical weathering processes. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6986-6997.

Staley J.T. & Gosink J.J. (1999). Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Review of Microbiology* 53, 189-215.

Stancik L.M., Stancik D.M., Schmidt B., Barnhart D.M., Yoncheva Y.N. & Slonczewski J.L. (2002). pH-dependent expression of periplasmic proteins and aminoacid catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 184, 15, 4246-4258.

Stanly P.E. & Williams S.G. (1969). Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. Analytical Biochemistry 29, 381-392.

Stewart S.L., Grinshpun S.A., Willeke K., Terzieva S., Ulevicius V. and Donnelly J. (1995). Effect of impact stress on microbial recovery on an agar surface. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4, 1232-1239.

Sun J. & Ariya P.A. (2006). Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): a review. *Atmospheric Environment* 40, 5, 795-820.

Suzuki Y., Imai S., Kawakami M., Masuda K. & Akasaka K. (1998). Identification and determination of low-molecular weight organic compounds in contaminated fog water using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 355-362.

Szyrmer W. & Zawadzki I. (1997). Biogenic and anthropogenic sources of ice-forming nuclei : A review. B*ulletin of the American Meteorological Society* 78, 209-227.

Tamaru Y., Takani Y., Yoshida T. & Sakamoto T. (2005). Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 11, 7327-7333.

Terzieva S., Donnelly J., Ulevicius V., Grinshpun

S.A., Willeke K., Stelma G.N. & Brenner K.P. (1996). Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 7, 2264-2272.

Thorne P.S., Kiekhaefer M.S., Whitten P. & Donham K.J. (1992). Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 8, 2543-2551.

T**homas D.N. & Dieckmann G.S. (2002)**. Biogeochemistry of Antarctic sea ice. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 40, 143-169.

Thomas D.N. & Dieckman, G.S. (2002). Antartic sea ice –a habitat for extremophiles. Science 295, 641-644.

Tong Y., Che F., Ku X., Chen M., Ye B. & Li J. (1993). Population study of atmospheric bacteria at the Fengtaï district on two representative days. *Aerobiology* 9, 69-74.

Tong Y. & Lighthart B. (1997). Solar radiation has a lethal effect on natural populations of culturable outdoor atmospheric bacteria. *Atmospheric Environment* 31, 6, 897-900.

Toom-Sauntry D. & Barrie L.A. (2002). Chemical composition of snowfall in the high Arctic: 1990–1994. *Atmospheric Environment* 36, 2683-2693.

Torrella F. & Morita R.Y. (1981). Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 2, 518-527.

Timmons D.E., Fulton J.D & Mitchell R.B. (1966). Microorganisms of the upper atmosphere: I - Instrumentation for isokinetic air sampling at altitude. *Applied Microbiology* 14, 2, 229-231.

Tishkov V.I. & Popov V.O. (2004). Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry* 69, 11, 1252-1267.

Tyler M.E., Shipe E.L. & Painter R.B. (1959). Bacterial aerosol samplers. III. Comparison of biological and physical effects in liquid impinger samplers. *Applied Microbiology* 7, 355-362.

Tyson G.W. & Banfield J.F. (2005). Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. *Trends in Microbiology* 13, 411-415.

Van Pinxteren D., Plewka A., Hofmann D., Müller K., Kramberger H., Svrcina B., Bächmann K., Jaeschke W., Mertes S., Collett Jr. J.L. & Herrmann H. (2005). Schmücke hill cap cloud and valley stations aerosol characterisation during FEBUKO (II): organic compounds. *Atmospheric Environment* 39, 4305-4320.

Vincent W.F., Gibson J.A.E., Pienitz R. & Villeneuve V. (2000). Ice shelf microbial ecosystems in the high Arctic and implications for life on snowball earth. *Naturwissenschaften* 87, 137-141.

Voisin D., Legrand M. & Chaumerliac N. (2000). 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.

Völker U., Maul B & Hecker M. (1999). Expression of the σ^B-dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 181, 13, 3942-3948.

Vorholt J.A. (2002). Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Archives of Microbiology* 178, 239-249.

Wainwright M., Wickramasinghe N.C., Narlikar J.V. & Rajaratnam P. (2003). Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km. *FEMS Microbiology Letters* 218, 161-165.

Walter M.V., Marthi B., Feiland V.P. & Ganio L.M. (1990). Effect of aerosolization on subsequent bacterial survival. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 11, 3468-3472.

Whalen S.C. & Reeburgh W.S. (1990). Consumption of atmospheric methane by tundra soils. *Nature (London)* 346, 160-162.

Willem S., Srahna M., Devos N., Gerday C., Loppes R., Matagne R.F. (2004). Protein adaptation to low temperatures: a comparative study of a-tubulin sequences in mesophilic and psychrophilic algae. *Extremophiles* 3, 221-226.

Wilson M. & Lindow S.E. (1992). Relationship of total viable and culturable cells in epiphytic populations of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 12, 3908-3913.

Wittmaack K., Wehnes H., Heinzmann U. & Agerer R. (2005). An overview of bioaerosols viewed by scanning electron microscopy. *Science of the Total Environment* 346, 244-255.

Wolke R., Sehili A.M., Simmel M., Knoth O., Tilgner A. & Herrmann H. (2005). SPACCIM: A parcel model with detailed microphysics and complex multiphase chemistry. *Atmospheric Environment* 39, 4375-4388.

Wobrock W. & 28 coauteurs (1994). The Kleiner Feldberg cloud experiment 1990, an overview. *Journal of Atmospheric Chemistry* 19, 3-35.

Wright T.J., Greene V.W. & Paulus H.J. (1969). Viable microorganisms in an urban atmosphere. *J. Air Pollut. Cont. Assoc.* 199, 337-341.

Zentner R.J. (1966). Physical and chemical stresses of aerosolizaton. *Bacteriological Reviews* 30, 3, 551-557.

Zimmerman L. (1962). Survival of *Serratia marcescens* after freeze-drying or aerosolization at unfavorable humidity – I. Effects of sugars. *Journal of Bacteriology* 84, 1297-1302.

Zhang X., Yao T.D. & Wang N.L. (2002). Microorganisms in a high altitude glacier ice in Tibet. *Folia Microbiologica* 47, 3, 241-245.

Annexes

La première des annexes est consacrée aux protocoles expérimentaux des différentes manipulations. Les protocoles donnés sont très détaillés car cette annexe, en plus de préciser les méthodes utlisées, a la **vocation de cahier de manipulations**. Elle est donc destinée au laboratoire, pour un expérimentateur éventuellement inexpérimenté pour chacune des manipulations décrites.

Dans l'Annexe 2 figurent l'ensemble des données (échantillons de nuages, identifications des souches isolées, investigations sur les potentialités de croissance à différentes températures et tests métaboliques)

L'Annexe 3 est dédiée aux manipulations effectuées de manière ponctuelle, mais ouvrant des perspectives enthousiasmantes sur le sujet : milieu nuage reconstitué et « machine à nuage ».

Enfin, dans l'Annexe 4 est présentée une étude menée au cours de cette thèse, mais sans rapport avec les nuages. Elle concernait la microbiologie de la neige en zone polaire Arctique, dans le cadre d'une étude de la chimie du mercure atmosphérique dans cette région du globe.

Sommaire des annexes

Annexe I -Protocoles détaillés- 223

1) PRELEVEMENTS ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS 224
1.1. Prélèvements 224
1.1.a) Site de prélèvements : le sommet du puy de Dôme 224
1.1.a(i) Situation géographique 224
1.1.a(ii) L'Observatoire atmosphérique du puy de Dôme 225
1.1.b) Les prélèvements 225
1.1.b(i) Impacteur à gouttelettes 225
1.1.b(ii) Matériel 226
1.1.c) Manipulations d'échantillonnages 226
1.2. Traitement et analyse des échantillons 227
1.2.a) Mises en culture 227
1.2.b) Préparation pour le dosage de l'ATP 228
1.2.c) Fixation pour le dénombrement des cellules totales 228
1.2.d) Analyses chimiques 228
2) RECUPERATION DES DONNEES PUY DE DOME ET DES RETROTRAJECTOIRES 229
2.1. Récupération des données météorologiques 229
2.2. Tracé de rétrotrajectoires avec le modèle Hysplit (NOAA) 229
3) DENOMBREMENT ET ISOLEMENT DES MICRO-ORGANISMES CULTIVES 230
4) DENOMBREMENT PAR MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE 231
4.1. Matériel nécessaire 231
4.2. Manipulations 231
5) DOSAGE DE L'ATP 233
6) CONSERVATION DES SOUCHES CULTIVEES 235
7) IDENTIFICATION DES SOUCHES CULTIVEES 236
7.1. Champignons/levures 236
7.2. Bactéries 236
7.2.a) Extraction de l'ADN génomique 237
7.2.b) Contrôle de l'ADN extrait 238
7.2.c) Amplification de l'ADNr 16S (PCR) 239
7.2.d) Contrôle du produit de la PCR 240
7.2.e) Purification sur colonne du produit PCR 240
7.2.f) Lyophilisation 240
7.2.g) Séquençage 241
7.2.h) Analyse des séquences 242
7.2.h(i) Recontruction de séquences complètes 242
7.2.h(ii) Identification des souches 243
7.2.h(iii) Analyse phylogénétique (arbres) 245
8) TESTS DE BIODEGRADATION ET ANALYSE PAR RMN 249
8.1. Préparation de l'incubation 251
8.2. Estimation de la biomasse mise en jeu 253
8.2.a) Concentration cellulaire dans le milieu d'incubation 253
8.2.b) Dosage des protéines totales dans le milieu d'incubation 253
8.3. Analyses des prélèvements : Formiate (F), Acétate (A), Lactate (L), Succinate (S), Méthanol (MeOH) 254
8.3.a) Préparation des tubes RMN 254

8.3.b) Analyse des échantillons 254
8.3.b(i) RMN ^{1}H : 254
8.3.b(ii) RMN ^{13}C : 254
Traitement des spectres : 255
8.4. Analyse des prélèvements : formaldéhyde (f) : 258
9) TESTS DE CROISSANCE A DIFFERENTES TEMPERATURES 260
10) EVOLUTION DE PROTOCOLE AU COURS DE LA THESE 261

Annexe II -Données brutes- 263

1) ECHANTILLONS DE NUAGES 264
2) SOUCHES ISOLEES : BACTERIES 265
3) SOUCHES ISOLEES : CHAMPIGNONS & LEVURES 266
4) TESTS DE CROISSANCE A DIFFERENTES TEMPERATURES 267
5) TESTS DE BIODEGRADATION (« SCREENING ») 268
6) INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA CAPACITE DE BIODEGRADATION . 274
7) TESTS DE BIODEGRADATION : FORMALDEHYDE ^{13}C ET CINETIQUES DETAILLEES 275

Annexe III -Manipulations prospectives- 277

1) L'UTILISATION D'EAU DE NUAGE 277
2) LA RECONSTITUTION D'EAU DE NUAGE ARTIFICIELLE 277
3) LA « MACHINE A NUAGE » 279

Annexe IV -Campagne polaire CHIMERPOL II- 283

Annexe I-Protocoles détaillés-

L'ensemble des protocoles expérimentaux utilisés est donné dans cette annexe. Les méthodes utilisées pour les analyses et manipulations principales réalisées sont récapitulées dans le tableau Annexe-25 ci-dessous.

Paramètres			Méthodes
	Mesurés dans le nuage		
Paramètres Météorologiques & Physico-chimiques fournis par l'Observatoire	**Météorologie**	Rayonnements (UV, visible et diffus), Vent (vitesse et direction), température, pression, humidité relative, taux de photolyse du NO_2, profil de vent, teneur en eau liquide du nuage, rayon effectif des gouttelettes	Voir le site de l'Observatoire (http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/atmos/pdd/visitepuydedome/accueil.html)
	Gaz	NO_2, NO, NO_x, NOy, O_3, CO et CO bas niveau, CO_2, ^{14}C, ^{13}C, CFC	
	Particules	Carbone-suie (BC), composés organiques solubles (WSOC) et particulaires (PIXE), spéciation des organiques particulaires (EC et OC), nombre de particules, spectres dimensionnel des particules, radon	
Chimie (nuage)	**Caractéristiques chimiques**	pH, conductivité, potentiel rédox	Electrodes
	Carbone	Spéciation du carbone (TC, IC, TOC)	Spectrométrie de flamme
	Cations	NH_4^+, Na^+, K^+, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, méthylamine, diméthylamine et triméthylamine	Chromatographie ionique
	Anions	SO_4^{2-}, NO_3^-, NO_2^-, Cl^-, F^-	
	Composés organiques	Formiate, acétate, succinate, malate, oxalate, pyruvate, propionate, lactate, méthylsulfonate…	
	Autres composés	Péroxyde d'hydrogène H_2O_2, formaldéhyde (HCHO), fer (Fe^{2+} et Fe^{3+})	Dosage spectrophotométrique (automatisé pour HCHO)
Biologie (nuage)	**Cellules totales**	Champignons/levures et bactéries	Microscopie à épifluorescence (DAPI)
	Cellules cultivables	Champignons, levures et bactéries	Cultures à 27°C et 15°C
	Nature des cultivables	Identification des souches isolées	Champignons/levures par observation et tests métaboliques, bactéries par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S
	ATP	Dosage de l'adénosine triphosphate	Bioluminescence (luciférase)
	Manipulations complémentaires de microbiologie		
	Implication potentielle des cellules dans la chimie du milieu	Capacité des souches isolées à dégrader l'acétate, le formiate, le lactate, le succinate, le méthanol et le formaldéhyde, à différentes températures	Tests de biodégradation, RMN ^1H et ^{13}C, analyseur de formaldéhyde
		Capacité des souches isolées à se développer à différentes températures	Cultures à 27°C, 17°C et 5°C

Tableau Annexe-25 : Principales paramètres collectés pour caractériser les échantillons de nuage, et manipulations complémentaires de microbiologie réalisées au cours de cette étude.

1) PRELEVEMENTS ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

1.1. Prélèvements

1.1.a) Site de prélèvements : le sommet du puy de Dôme

1.1.a(i) Situation géographique

L'ensemble des prélèvements d'eau de nuage a été réalisé depuis le sommet du puy de Dôme, volcan culminant de la chaîne des puys (1465 mètres d'altitude), dans le Massif Central. Cette chaîne est relativement linéaire, orientée nord-sud, et constitue le premier massif montagneux rencontré par les masses d'air en provenance de l'océan Atlantique (la côte se situe à environ 400 km à l'ouest) (figure Annexe-66 ci-dessous).

Figure Annexe-66 : Localisation du puy de Dôme (45°N, 2°E). (Source de la photo satellite : PlanetObserver.com).

De grandes agglomérations localisées sur la côte **ouest** de la France (Bordeaux, Nantes…) peuvent influencer le site, mais on considère généralement d'après les travaux précédemment menés au puy de Dôme que les masses d'air en provenance du secteur ouest sont sous influence océanique essentiellement.

A environ 20 km **à l'est** se trouve l'agglomération de Clermont-Ferrand (près de 200 000 habitants). Celle-ci est très proche, mais le sommet du puy de Dôme se trouve rarement dans son panache de pollution car les vents d'est sont très rares. Ils ne sont en outre que peu fréquemment associés à des évènements nuageux à une altitude aussi basse que celle du puy de Dôme, les masses d'air étant trop sèches lors de flux d'est.

Au nord s'étendent des plaines cultivées, vastes zones agricoles à prendre en considération. Plus loin, on trouve des zones fortement urbanisées et très industrialisées (région parisienne, nord-est de la France, région de la Ruhr…).

Au sud, on trouve des zones rurales faiblement peuplées, des forêts de feuillus et de résineux, des prairies, et, plus loin, des zones urbaines de taille importante (Béziers, Montpellier, Toulouse…). Les masses d'air provenant de sud sont presque systématiquement trop sèches (ou relativement trop chaudes) pour qu'un nuage se forme à l'altitude qui nous intéresse.

Plusieurs points font du sommet du puy de Dôme un lieu d'observation de l'atmosphère libre idéal :

- D'abord son altitude, le situant en troposphère libre. Même si cette notion est assez vague, elle signifie que ce sommet est la plupart du temps en dehors de la couche limite, où l'impact des émissions locales est important. La troposphère libre étant plus homogène que la couche la plus basse de l'atmosphère, cela signifie aussi que les mesures qui y sont faites peuvent être considérées comme valables à une échelle au moins régionale.

Ensuite, ses pentes abruptes (les environs directs se trouvent à une altitude d'environ 1000 m) font que le puy de Dôme domine littéralement les environs. Le temps de contact de la masse d'air avec le sol et le risque de contamination locale qui y est lié semblent donc minimisés.

- D'autre part, une route dont le trafic est contrôlé, le rend accessible en voiture (plus ou moins facilement en fonctions des conditions météorologiques).

- Enfin, ce sommet est historiquement très impliqué dans l'observation et la recherche atmosphérique. Cet historique comprend surtout la construction et le maintien d'un observatoire de pointe, comptant parmi les mieux équipés d'Europe. Celui-ci est décrit dans le paragraphe suivant.

1.1.a(ii) L'Observatoire atmosphérique du puy de Dôme

Le chalet-observatoire installé au sommet depuis 1876 est aujourd'hui multi-instrumenté et permet d'accéder à de nombreuses données mesurées de façon continue concernant l'atmosphère. Elles comprennent les paramètres météorologiques, gazeux et particulaires listés dans le tableau Annexe-1.

Ces données sont reçues en direct au LaMP et sont accessibles librement par Internet, en temps réel pour les données météorologiques, (http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/atmos/don-tem-reel.html) et mises à jour régulièrement et indexées pour l'ensemble d'entre-elles depuis 1995.

1.1.b)Les prélèvements

La montée au puy de Dôme est généralement prévue peu de temps à l'avance (la veille ou le matin), en raison de la difficulté de prévoir si des nuages y seront effectivement présents et « collectables ». Il arrive souvent d'effectuer une montée et d'attendre en vain l'arrivée du nuage. Il se peut aussi que le nuage soit trop peu dense pour être intéressant, ou encore qu'il soit précipitant. Seuls les nuages non précipitants et assez denses ont donc été finalement récupérés (lorsque du chalet on distingue mal le bout du temple de Mercure, à environ 50 m de là, soit ce qui correspond environ d'après notre expérience à une LWC de 0,2 g m^{-3}).

1.1.b(i) Impacteur à gouttelettes

Le type d'impacteur à gouttelettes est décrit dans la synthèse bibliographique, Chapitre I. Les 3 impacteurs dont dispose le LaMP fonctionnent simultanément : 1 pour notre étude microbiologique, et 2 pour l'étude chimique menée par Marius Parazols. Celui voué à la

microbiologie est stérilisé par autoclave, enfermé dans 2 sacs ouverts au dernier moment avant les échantillonnages.

1.1.b(ii) Matériel

La plus grande partie du matériel nécessaire pour le conditionnement des analyses microbiologiques est entreposée sur place. Une liste de ce matériel est donnée à titre indicatif pour les prochains expérimentateurs, la plus exhaustive possible :

- Becs bunsen et bouteilles de gaz (et briquet)
- Pipettes stériles de 10 mL et 2 mL à emballage unique
- Pipettes automatiques (1 mL et de 200 µL)
- Cônes stériles de 1 mL et de 200 µL et 1 mL stériles à filtres
- Pipeteur automatique et alimentation
- Tubes stériles de 50 mL
- Filtres pour seringues stériles (porosité 0,22 µm (Millipore)) et seringues stériles de 50 mL
- Gants stériles
- Pipettes Pasteur en boite stérile
- Microtubes Ependorf stériles de 1,5 mL et 2 mL
- Flacons (Schott) stériles de différents volumes
- Formaldéhyde 37 %
- Ethanol 96 % pour utilisation directe et préparation de solution à 70 %
- Au moins un flacon de solution d'extraction de l'ATP (comme l'« Extractant B/S » du kit Biothema utilisé dans cette étude), conservée au congélateur
- Eau distillée stérile
- Divers récipients de tailles variées (béchers, cristallisoirs)
- Rouleau de papier genre « essuie-tout »
- Sacs à autoclave stériles et élastiques
- Cutter et ciseaux
- Marqueurs
- Pissettes
- Parafilm et élastiques
- Désinfectant en pulvérisateur pour la paillasse (genre « Bactinyl »)
- En l'absence de hotte de microbiologie et de paillasse adaptée, prévoir de quoi se faire une paillasse surélevée, lisse et pouvant être nettoyée facilement, comme un bac chirurgical en métal émaillé ou en Inox préalablement autoclavé.

En plus de ce matériel à stocker *in situ*, une partie doit être transportée à chaque fois :

- La partie amovible de l'impacteur à gouttelettes, nettoyée et autoclavée sous 2 sacs à autoclave stériles. Du papier doit être placé entre les 2 sacs, maintenu à l'aide d'élastiques, de façons à ce que les angles de l'instrument ne risquent pas de percer les sacs
- Des milieux de culture en boite de Pétri en nombre assez important pour ne pas risquer d'en manquer
- Une glacière pour le transport des échantillons
- (Les clefs du chalet, bien sûr, à ne surtout pas oublier)

Au moins l'ensemble de ce matériel est nécessaire pour effectuer de façon confortable les analyses décrites dans cette étude. Tout ce qui est stérile doit être conservé sous le papier aluminium utilisé lors de l'autoclavage.

1.1.c) Manipulations d'échantillonnages

Une fois les systèmes d'aspiration en place, la partie supérieure proche de l'embouchure et l'embouchure elle-même, ainsi que l'intérieur de la partie fixe de l'impacteur sont minutieusement nettoyés avec de l'alcool ou un désinfectant en spray et essuyés. La partie amovible de l'impacteur est déballée au dernier moment de ses sacs à autoclave, immédiatement avant d'être mise en place.

Pour **le blanc de l'instrument**, de l'eau distillée stérile est versée dans le vase de collecte avant le début des échantillonnages, puis traitée comme les échantillons pour effectuer des dénombrements des cellules totales et cultivables. Les prélèvements sont réalisés quand la LWC atteint au moins environ 0,2 g m^{-3}. Quand chacune des tiges de collecte est en place, débuter les prélèvements et **noter l'heure de début**.

L'eau collectée est récupérée avec un pas de temps variant de 1 à 3 heures. L'heure est notée, les aspirateurs sont arrêtés, puis le matériel nécessaire aux prélèvements (pipeteur, tube stérile) est préparé, avant d'enfiler des gants stériles. Cette préparation des prélèvements se fait à l'intérieur du chalet (y compris la mise des gants, donc penser à ouvrir la porte avant de les enfiler) à cause du vent fort qui souffle souvent au sommet du puy de Dôme. **Si les échantillons sont liquides**, un pipeteur automatique avec une pipette de 10 mL sert à transvaser l'eau de nuage dans un tube stérile de 50 mL, quasiment sans sortir la tige de collecte du corps de l'impacteur ce qui limite au maximum les risques de contamination. En cas d'**échantillon congelé**, la tige de collecte est amenée à l'intérieur du chalet, dans un sac à autoclave stérile ou un grand tube à essai stérilisé. La glace se décolle de la plaque d'impaction en commençant à fondre, et peut alors être récupérée avec pince stérile, entre 2 becs Bunsen. Récemment, un tube en verre a été fabriqué, spécialement pour récupérer l'eau de fonte de la glace échantillonnée sans manipulation, dans une atmosphère stérile. Aucune occasion de le tester en conditions d'échantillonnage ne s'est présentée.

1.2. Traitement et analyse des échantillons

Les 50 mL collectés sont traités directement, et le volume est réparti entre les différentes analyses. Dans l'ordre, une partie des échantillons est d'abord mise en culture, puis fixé pour le dosage d'ATP et enfin le dénombrement des cellules totales.

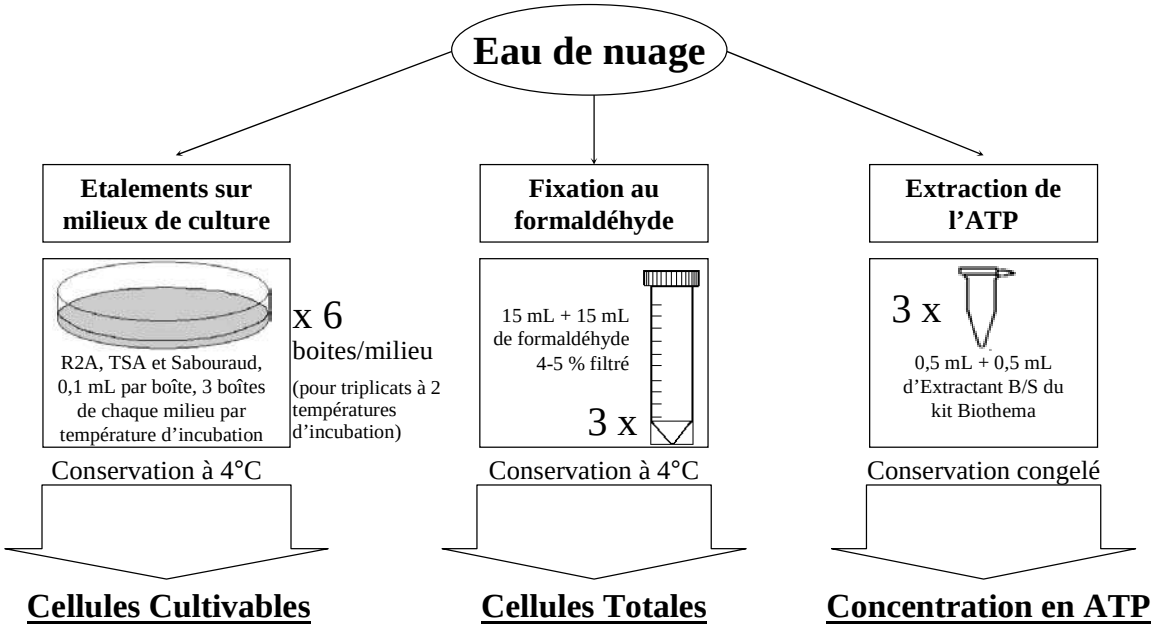


Figure Annexe-67 : Répartition d'un échantillon d'eau de nuage entre les différentes analyses, à réaliser directement après le prélèvement.

1.2.a) Mises en culture

Les **mises en cultures** sont effectuées sur le site de prélèvement, entre 2 becs bunsen et en respectant les conditions de stérilité. Aucune dilution des échantillons n'est nécessaire, et 0,1 mL d'eau de nuage sont donc directement étalés sur les milieux Trypcase-Soja Agar

(Biomérieux) (milieu généraliste), R2A (Difco) (milieu oligotrophe) et Sabouraud (Difco) (milieu pour champignons). Les ensemencements sont réalisés en triplicats, et incubés soit à 15°C, soit à 27°C. Un nombre total de 18 boîtes de Pétri est donc ensemencé, réquisitionnant donc moins de **2 mL d'échantillon**. Elles sont partiellement fermées avec du Parafilm pour limiter les risques de contamination, et maintenues avec des élastiques pour éviter l'ouverture intempestive du couvercle. La conservation avant mise en incubation se fait au réfrigérateur (4°C). Celle-ci a lieu dès le retour au laboratoire, dans les heures qui suivent le prélèvement.

1.2.b) Préparation pour le dosage de l'ATP

Des gants doivent être portés pour toute manipulation en rapport avec les analyses d'ATP, et l'utilisation de cônes à filtres est recommandée. Un petit volume de l'échantillon est prélevé (0,5 mL, en triplicats, donc **volume total de 1,5 mL**), et mélangé à **0,5 mL d' « Extractant B/S »** du kit Biothema (ATP Biomass Kit HS) (Il s'agit d'un détergent qui lyse les cellules, extrait l'ATP cellulaire et le protège). D'après les instructions données dans le kit, il faut éviter d'ajouter un volume d'extractant supérieur à celui de l'échantillon. Les mélanges sont réalisés dans 3 microtubes Ependorf, agités fortement et conservés au congélateur jusqu'aux analyses.

1.2.c) Fixation pour le dénombrement des cellules totales

Sur un échantillon d'un volume total de 50 mL, environ 46 mL restent. En général, **3 x 15 mL** précisément sont donc prélevés et fixés avec des **volumes équivalents de formaldéhyde 4-5 %**, dans 3 tubes stériles (Falcon) de 50 mL. Le formaldéhyde est préparé à l'avance, à partir de formaldéhyde 37 % (stabilisé avec 8 % de méthanol, Sigma) dilué dans de l'eau distillée et filtré sur filtre-seringues en nitrocellulose (Nalgene 0,22 µm). Si le volume total d'eau de nuage collecté est insuffisant, c'est le volume consacré à cette analyse qui est adapté, mais toujours de façon à avoir au moins 3 réplicats. Les échantillons fixés sont conservés au réfrigérateur (4°C).

1.2.d) Analyses chimiques

Les analyses chimiques sont, depuis janvier 2004, réalisées par Marius Parazols dans le cadre de sa thèse. Les mêmes évènements nuageux sont échantillonnés pour la microbiologie et la chimie, et les impacteurs voués aux 2 études sont relevés en même temps. Parallèlement aux manipulations de microbiologie, le **pH**, la **conductivité** et le **potentiel rédox** sont mesurés par électrodes. Puis, l'échantillon est divisé en fonction des analyses :

- **Environ 5 mL** sont placés dans une petite fiole pour mesure du contenu en **carbone total, inorganique et organique** (conservation à 4°C) (Shimadzu TOC-5050A).
- **Environ 5 mL** sont conservés congelés pour des mesures par chromatographie ionique (**cations :** NH_4^+, Na^+, K+, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Méthylamine, diméthylamine et triméthylamine ; **anions :** SO_4^{2-}, NO_3^-, NO_2^-, Cl^-, F^-, formiate, acétate, succinate, malate, oxalate, pyruvate, propionate, méthylsulfonate) (Dionex DX 320 colonne AS11 pour les anions ; Dionex ICS1500 colonne CS16 pour les cations).
- **Respectivement 0,5 et 2 mL** sont utilisés pour doser le H_2O_2 le fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}) (dosages par spectrophotométrie UV, sur le site de prélèvement).
- **Le reste** est stocké congelé pour effectuer des expériences d'irradiation en laboratoire.

2) RECUPERATION DES DONNEES PUY DE DOME ET DES RETROTRAJECTOIRES

2.1. Récupération des données météorologiques

Les données, notamment météorologiques, enregistrées simultanément aux échantillonnages par les différents instruments installés au sommet du puy de Dôme sont récupérées sur le serveur ftp correspondant. Récupérer les fichiers *.txt* relatifs au(x) jour(s) du (des) prélèvement(s), et les ouvrir au format *.xls* (excel). Ne conserver que les mesures correspondant à la période d'échantillonnage (d'où l'intérêt de bien noter les heures de début et de fin de chaque prélèvement).

2.2. Tracé de rétrotrajectoires avec le modèle Hysplit (NOAA)

(Interface disponible à l'adresse http://www.arl.noaa.gov/ready.html)

- Choisir l'option « *run Hysplit with archived data* » → *Trajectory model* → *Compute trajectories*

- Choisir la banque de données météorologiques *FNL*

- Préciser la partie de la banque de données en fonction de la date (pour l'hémisphère nord, les fichiers sont nommés « *fnl.nh.date* »)

- Indiquer d'abord les coordonnées géographiques du puy de Dôme (en base 100) (**Latitude 45,766 ; Longitude 2,95**)

- Rentrer les options choisies (pour l'exemple donné figure Annexe-68 : *Trajectory direction* = Backward ; *Start time* = date et heure de début du prélèvement ; *Total run time* = 24 h ; Start *a new trajectory every* = 24 h (pour obtenir un seul tracé, 6 h pour en avoir 4…) ; *Start height 1* = 1465 m AMSL ; et options graphiques).

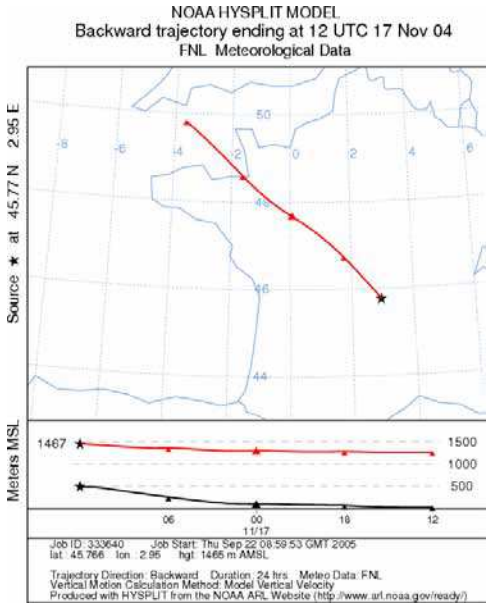
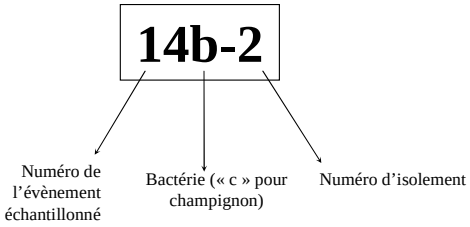


Figure Annexe-68 : exemple de rétrotrajectoire tracé avec Hysplit.

3) DENOMBREMENT ET ISOLEMENT DES MICRO-ORGANISMES CULTIVES

Le développement des colonies sur les milieux de culture ensemencés avec les échantillons de nuage est à surveiller chaque jour. Quand les CFUs sont visibles, un dénombrement est réalisé une première fois, ainsi que les jours suivants, pour chacune des boites. Le type de milieu (parmi TSA, R2A et Sabouraud) contenant le nombre maximum de colonies est retenu pour l'estimation de la concentration de chaque type microbien (bactéries et champignons/ levures) dans les échantillons.

En général, les comptages donnent les nombres les plus élevés après 4-5 jours de culture environ (plus tard, leur chevauchement conduit à une sous-estimation). Lors du dernier comptage, chaque type différent de colonie est repéré puis isolé à l'anse Pasteur (la gélose est découpée pour les champignons et les espèces crustales), sous hotte à flux laminaire. Pour chacune, le milieu et la température d'incubation sont les mêmes que les conditions ayant conduit au développement initial. Les caractéristiques morphologiques (couleur, forme, aspect…) de chaque type de colonie sont relevées et un numéro leur est attribué, de la façon suivante : (exemple de la deuxième colonie bactérienne isolée de l'évènement nuageux n°**14**) :



Les levures ont souvent une morphologie macroscopique similaire à celle des colonies bactériennes. Lors des comptages, elles sont donc confondues avec les bactéries. La correction est faite en considérant que les colonies de type lisse (comme celles des bactéries) qui se sont développées dans le milieu Sabouraud sont les levures. Elles sont ensuite repérées sur les milieux où les bactéries sont dénombrées et exclues du comptage (elles sont regroupées avec les champignons). En cas de doute, une rapide observation microscopique (frottis) est réalisée pour discriminer les colonies de levures.

Pour chaque souche isolée, des **ajustements des conditions de cultures** peuvent être réalisés, en testant la croissance sur différents milieux et températures, afin de déterminer les conditions optimales de croissance. Enfin, assez tôt, des photographies macroscopiques (colonies) et microscopiques (à partir d'une culture liquide quand c'est possible) sont réalisées pour illustrer la banque de souches isolées de l'eau des nuages. Elles permettent éventuellement plus tard de vérifier rapidement que l'on travaille avec la souche isolée au départ et non avec une pollution survenue après. Les photographies microscopiques sont faites avec le microscope du Laboratoire de Biologie des Protistes.

Pour les bactéries, effectuer éventuellement une coloration de Gram, même si d'après notre expérience la réponse des souches isolées est souvent mal définie.

Protocole de coloration différentielle de Gram :
- Réaliser un frottis à partir d'une culture cellulaire liquide jeune (24 heures)
- Recouvrir le frottis de **cristal violet**, attendre **1 min** et rincer à l'eau
- Recouvrir de **lugol**, attendre **30 s** et rincer
- Rincer (**3 s**) avec un mélange **éthanol/acétone** (50/50 v/v) et rincer à l'eau
- Recouvrir de **safranine**, attendre **1 min**, rincer à l'eau

Les bactéries à Gram-positif apparaissent violettes, et les bactéries à Gram-négatif roses

4) DENOMBREMENT PAR MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE

Note : Cette partie des manipulations a été réalisée avec le matériel du Laboratoire de Biologie des Protistes, (UMR6023 du CNRS-Université Blaise Pascal, 63177 Aubière cedex), accueilli par l'équipe d'écotoxicologie dirigée par J. Bohatier.

4.1. Matériel nécessaire

Celle liste est donnée à titre indicatif : dans la mesure où les manipulations sont réalisées dans le laboratoire voisin du SEESIB, ce matériel est transporté à chaque fois.

- Eau distillée stérile filtrée (0,22 µm), en grande quantité (~150 mL par échantillon)
- Filtres GTBP noir (Millipore) + pince à filtre
- Solution mère à 250 µg mL^{-1} de DAPI (stockée au réfrigérateur au LBP)
- Lames et lamelles
- Huile à immersion
- Ethanol 96 %
- Papier aluminium
- Pipette 1 mL + cônes à filtre
- Chronomètre

4.2. Manipulations

- Les échantillons fixés au formaldéhyde sont d'abord agités pour les homogénéiser, incubés **20 minutes dans le noir** en présence de **2,5 µg mL^{-1}** de 4'-6-diamino-2-phénylindole (**DAPI**), fluorochrome intercalant de l'ADN. La solution mère de DAPI est préparée à 250 µg mL^{-1}, et 300 µL sont donc utilisés pour marquer un échantillon (composé de 15 mL + 15 mL de formaldéhyde 4-5%). Utiliser des cônes à filtres pour ne pas contaminer le DAPI. Enfin, ce composé est relativement fragile : le tenir à l'abri de la lumière, et dans de la glace, pendant son utilisation.

- Pendant le temps de l'incubation, les colonnes de la rampe de filtration (Sartorius) sont **flambées à l'alcool 96 %**. Une fois refroidies, elles sont montées sur les filtres en polycarbonate noirs mis en place (Millipore, GTBP 0,2 µm), et recouvertes de papier aluminium pour limiter les contaminations par l'air.

- Après les 20 minutes d'incubation, les échantillons sont versés dans les colonnes et filtrés. Le DAPI en excès est ensuite **abondamment rincé** en filtrant de l'eau distillée stérile, préalablement filtrée (0,22 µm) pour éviter l'encombrement du filtre.

- Chaque filtre est posé sur une **lame d'observation microscopique**, séché à l'air à l'obscurité, et monté entre lame et lamelle avec une goutte d'huile à immersion. Les lames doivent être conservées au congélateur, au noir.

- **Les dénombrements** sont faits par microscopie à épifluorescence (microscope Olympus BH-2, équipé d'une grille de comptage), à une fréquence d'excitation UV (filtre B du microscope) de $\lambda_{excitation}$ = 365nm. Le fluorochrome réémet alors de la lumière bleue, à une longueur d'onde $\lambda_{émission}$ = 420 nm. Après avoir vérifié l'homogénéité de la répartition des cellules sur le filtre et l'absence d'agrégats importants, les champignons sont dénombrés (objectif x40). A ce grossissement, les bactéries ne sont pas, ou très peu, visibles, ce qui évite toute confusion entre champignons/levures et bactéries. Ces dernières sont comptées sous immersion, objectif x100. Les cellules présentes sur 30 à 50 champs sont

dénombrées (~200 champignons/levures ou ~1000 bactéries) pour estimer le nombre de champignons et levures ou de bactéries présentes dans les échantillons.

- Les concentrations cellulaires dans les échantillons sont estimées grâce au calcul suivant (attention à considérer le bon grossissement de microscope (qui influence S_g) pour les champignons/levures et les bactéries) :

$$\textbf{Concentration en cellules dans l'échantillon (cellules mL}^{-1}\textbf{)} = \frac{S_f}{S_g} \times \frac{N_{cell} / N_{champs}}{F_d \times V}$$

Avec:

S_f = Surface de filtration (mm²) (100π pour nous, avec des colonnes de rayon 10 mm)

S_g = Surface de la grille de comptage (mm²) (respectivement 0,041 et 0,0064 avec les objectifs x40 et x100)

N_{cell} = Nombre total de cellules dénombrées

N_{champs} = Nombre total de champs comptés

F_d = Facteur de dilution de l'échantillon (pour nous, ½ dû à la fixation au formaldéhyde)

V = Volume d'échantillon fixé filtré (mL)

Les cellules apparaissent en bleu, la matière minérale en jaune. Des particules peuvent également être marquées en bleu, et c'est la forme qui permet alors de discriminer les cellules de ces particules. Si le filtre n'a pas été suffisamment rincé, il y a un important bruit de fond bleu (DAPI résiduel) qui peut rendre impossible tout dénombrement.

5) DOSAGE DE L'ATP

La technique de bioluminescence a été employée ici, en utilisant les réactifs du kit de dosage de l'ATP Biothema Biomass Kit HS, conçu notamment pour les échantillons environnementaux. La méthode de dosage, enzymatique, est basée sur les propriétés de bioluminescence de la luciférine, composé retrouvée chez les organismes bioluminescences comme les lucioles. L'émission de photons est provoquée par l'oxydation de cette molécule par la luciférase. La réaction consomme une molécule d'ATP par photon émis, ce qui rend cette méthode quantitativ et potentiellement très sensible (en fonction de la sensibilité du compteur de photons efficace). Le luminomètre utilisé dans cette étude est un LUMAC Biocounter M2500. Il est automatisé mais le mécanisme n'est pas compatible avec le kit de réactifs utilisé, et les opérations sont donc effectuées manuellement.

Luciférase ATP + D-luciférine + O_2 → AMP + PPi + oxyluciférine + CO_2 + photon

Dans le kit, le « **Reagent HS** » correspond à un mélange lyophilisé d'une luciférase haute sensibilité et de D-luciférine. La solution « **Diluent B** » du kit doit être utilisée comme tampon pour le solubiliser. Le kit contient également une solution standard de concentration en ATP connue (10^{-7} mol L^{-1}). Pour les manipulations, des gants doivent être portés et des l'utilisation de cônes à filtres est fortement recommandée. Elle se déroule suivant les étapes suivantes :

- **Allumer le luminomètre** et laisser chauffer au moins **15 minutes** ;
- **Avant de démarrer les mesures**, effectuer les opérations suivantes sur le luminomètre :

  « Back max » → 0 et Enter

  « Wich Mode? » → Assay

  « Number » → 0 et Enter

  « Set limit » → 0 et Enter

Pour les mesures, appuyer simplement sur Enter une fois la cuvette insérée dans l'appareil. Les photons émis sont comptés pendant une durée d'environ 10 secondes, et un « bip » indique la fin de la mesure. La valeur donnée est en RLU, Relative Luminescence Units.

- Le **blanc de la cuvette de mesure** est vérifié, à vide. La valeur mesurée doit être minime (< 10);
- Effectuer un **blanc des réactifs** avec de l'eau distillée stérile filtrée suivant le protocole suivant. La valeur doit également être très basse (< 100) ;
- Pour chaque échantillon, pipeter **0,2 mL du mélange eau de nuage/« Extractant B/S »** et les placer au fond de la cuvette ;
- Ajouter **0,4 mL du « Reagent HS »** reconstitué et agiter par rotation ;
- Effectuer immédiatement une **mesure** et relever la valeur (**l_{smp}**) ;
- Ajouter 10 µL de la solution « ATP Standard » ;
- Agiter par rotation légère, effectuer une **mesure** et relever la valeur (**$l_{smp+stp}$**) ;
- L'estimation de la concentration en ATP dans l'échantillon se fait suivant :

Concentration en ATP dans l'échantillon (pmol mL^{-1}) = $\frac{l_{smp}}{l_{smp + std} - l_{smp}} / \frac{V}{2}$

Avec:

l_{smp} = Émission de l'échantillon seul

$l_{smp+std}$ = Émission après ajout du standard

V = Volume de solution eau de nuage (avant ajout de l'« Extractant B/S ») (mL)

Plusieurs remarques importantes doivent être ajoutées concernant les manipulations de dosage de l'ATP.

(*i*) D'abord, d'importantes précautions sont nécessaires pour ne pas contaminer les échantillons (gants, cônes à filtres, matériel décontaminé (à l'eau de javel, par exemple)).

(*ii*) Ensuite, la valeur de $l_{smp+std}$ doit être au moins 10 fois supérieure à celle mesurée pour l'échantillon seul. Sinon, l'échantillon doit être dilué.

(*iii*) La quantité de « Reagent HS » mise en jeu ne doit pas excéder ¼ de celle d' « Extractant B/S ».

(*iv*) La solution de luciférine/luciférase est très fragile est la température influence beaucoup son activité. Il est donc nécessaire d'aliquoter le « Reagent HS » (sachant qu'il faut 0,4 mL par échantillon). De plus, attendre que la solution soit bien à température ambiante avant de faire l'ensemble des mesures, le plus rapidement possible pour limiter l'effet de la perte d'activité. Celle-ci est en effet très rapide, mais son effet limité dans la mesure où c'est le rapport entre l'échantillon et le standard qui est regardé, et non une valeur absolue. Elle reste gênante car cela diminue la définition et donc la précision de la mesure. D'après notre expérience, les aliquots de « Reagent HS », même congelés à -40°C, ne peuvent pas être conservés plus de quelques mois.

6) CONSERVATION DES SOUCHES CULTIVEES

Les souches cultivées en cultures pures ne peuvent pas être conservées longtemps sur boite de Pétri. Chaque souche isolée lors de cette étude est conservée par congélation et/ou lyophilisation :

- **En tube, congelée dans une solution de glycérol**. Pour cela, une culture pure liquide est d'abord réalisée dans un volume connu de milieu. Après développement de la souche, du glycérol 60 % stérile est ajouté à la culture (concentration finale de 15 %), incubé environ 15 minutes dans les conditions de culture (agitation) pour que le glycérol pénètre dans les cellules, et des aliquots de cette suspension cellulaire sont réalisés. Dans notre cas, plusieurs aliquots de 3 mL, dans tes tubes de 5 mL, ont été faits pour chaque souche de bactérie et de levure. Ils sont conservés à -80°C.

- Pour la **lyophilisation**, des cultures pures en tubes sur pentes gélosées sont utilisées. Les colonies développées à la surface de la gélose sont récupérées dans une solution de lait écrémé (protège les cellules de la dessiccation) en versant la solution dans le tube de culture et en raclant la surface du milieu. La suspension de cellules est ensuite répartie entre plusieurs microcupules de verre, placés à l'intérieur de flacons à sertir, où elle est lyophilisée (lyophilisateur RP2V).

Il faut bien sûr s'assurer de la pureté de la culture avant de procéder à une conservation longue durée. Pour la congélation, ensemencer quelques boites de Pétri avec les aliquots juste avant leur congélation. Pour les cultures lyophilisées, vérifier directement sur la pente gélosée. Pour utiliser ces cultures, il suffit d'ensemencer un milieu de culture neuf avec le lyophilisat ou avec la solution congelée, qu'il faut décongeler rapidement (à l'eau tiède).

7) IDENTIFICATION DES SOUCHES CULTIVEES

Pour l'identification taxonomique des souches isolées, des méthodes différentes ont été employées pour les bactéries et pour les eucaryotes (champignons et levures). Dans les 2 cas, elle est menée à partir d'une culture pure de la souche.

7.1. Champignons/levures

Pour les champignons et levures, une culture sur pente gélosée, en tube à vis, est d'abord réalisée. L'identification est ensuite sous traitée à CBS, en Hollande (Centraalbureau voor Schimmelcultures, P.O. 85167, 3508 AD UTRECHT, The Nederlands). Chaque souche identifiée est facturée 50 Euros (août 2006).

L'identification est basée sur des observations macroscopiques et éventuellement des tests métaboliques. Elle est relativement longue (compter au moins 3 mois entre l'envoi des souches et la réception des résultats). Pour le envois, l'utilisation d'un colis réfrigéré n'est pas nécessaire, mais bien prendre garde à protéger les tubes pour ne pas qu'ils se cassent pendant le transport. Simultanément à l'envoi des souches, transmettre par mail (identification@cbs.knaw.nl) un fichier récapitulant les références de souches, leur origine (eau de nuage), et les conditions de cultures utilisées (milieu, température).

7.2. Bactéries

Note : Pour l'identification des bactéries, une grande partie des manipulations de biologie moléculaire a été réalisée grâce au matériel de l'équipe de Mme Christel Bera-Maillet de l'INRA de Clermont-ferrand-Theix, partageant la paillasse de Mr Yves Ribot.

En premier lieu, une culture pure classique de la souche à identifier est réalisée dans un milieu liquide, sous agitation (200 rpm). Un volume (1 à 25 mL en fonction de la densité de la culture) de la culture est centrifugé (4000 g, 5°C, 10 min). Le surnageant (milieu de culture) est éliminé et le **culot cellulaire** est remis en suspension dans 10 mL de tampon PBS 1X (pH 7,4), centrifugé dans les même conditions pour rincer les cellules. Enfin, le surnageant est éliminé et le culot (ou une partie du culot) est repris dans **200 µL de tampon PBS 1X** filtré (0,22 µm) dans un microtube Ependorf de 1,5 mL et conservé à -40°C.

Composition du tampon PBS (pH 7,4) :	
- NaCl	140 mM
- KCl	2,7 mM
- KH_2PO_4	1,5 mM
- Na_2HPO_4	6,5 mM

Les étapes de préparation du culot cellulaire sont les suivantes :

- Extraction de l'ADN génomique (Easy DNA kit, Invitrogen)
- Contrôle de l'ADN extrait *(migration sur gel et dosage)*
- Amplification de la séquence 16S par PCR (Mix for Taq Polymerase 5 U μL^{-1}, QBiogene)
- Contrôle du produit PCR *(migration sur gel)*
- Purification sur colonne de la séquence amplifiée (Strataprep Purification Kit, Stratagene)
- Dosage du produit purifié
- Lyophilisation

Les protocoles de chacune de ces étapes sont décrits dans les pages suivantes, ainsi que la méthode d'identification des souches à partir de la séquence obtenue.

7.2.a) Extraction de l'ADN génomique

Pour ces manipulations, 2 bacs chauffants (bains-marie ou étuves à 37°C et 65°C) sont nécessaires, et 2 solutions d'éthanol (100 % et 80 %) doivent être placées à -20°C. Ces manipulations, exceptée l'étape de « bit-bitting » ont pu être réalisées au SEESIB.

- **Pour les bactéries à Gram-positif**, il est nécessaire, avant de débuter les manipulations, d'effectuer une étape supplémentaire pour casser la paroi, épaisse. Pour cela, ajouter 1-2 microcuillèrées de billes de zirconium et broyer les cellules au « bit-bitter » (2 min). Si le Gram est indéterminé, réaliser cette étape en limitant le temps de « bit-bitter » à 1 minute, ce qui peut permettre de casser les cellules sans altérer la qualité de la molécule d'ADN.

Pour la suite des manipulations d'**extraction de l'ADN total**, le kit Easy DNA (Invitrogen) a été utilisé. Le protocole utilisé avec les culots cellulaires en suspension dans le PBS (avec ou sans billes de zirconium) est le suivant :

Extraction de l'ADN génomique *Easy DNA Kit (Invitrogen)*

- **Ajouter 350 µL de « Solution A »** et vortexer par périodes de 1 s pour dissoudre le culot
- **Incuber 10 min à 65°C** en vortexant de temps en temps
- **Ajouter 150 µL de « Solution B »** et vortexer fortement jusqu'à ce que le précipité bouge librement dans le tube et soit homogène (~ 1 min)
- **Ajouter 0,5 mL de chloroforme** et vortexer pour homogénéiser
- **Centrifuger** à vitesse maximale (20 min, 4°C)
- **Transférer le surnageant** dans un microtube froid
- **Ajouter 1 mL d'éthanol 100 %** (-20°C) et vortexer brièvement
- **Incuber au moins 30 min dans de la glace** *(cette étape peut être allongée à 12 h)*
- **Centrifuger** à vitesse maximale (30 min, 4°C) et **jeter le surnageant**
- **Ajouter 0,5 mL d'éthanol 80 %** (-20°C) et **mélanger très doucement** par inversion pour décoller le culot (3-5 min)
- **Centrifuger** à vitesse maximale (5 min, 4°C) et jeter le surnageant
- **Centrifuger** une 2ème fois à vitesse maximale (3 min, 4°C) et jeter le surnageant
- **Laisser sécher** (5 min) *(ne pas laisser sécher complètement pour pouvoir remettre le culot en suspension facilement)*
- **Resuspendre le culot dans 100 µL d'eau bidistillée stérile** *(le kit utilise du tampon TE, mais celui-ci est déconseillé pour la PCR)*
- **Ajouter 2 µL de la RNase** du kit
- **Incuber 30 min à 37 °C**
- Conservation à -20°C

Le tube contient l'ADN génomique en solution dans 100 µL d'eau

7.2.b) Contrôle de l'ADN extrait

L'efficacité de l'extraction est ensuite vérifiée, par migration sur gel d'agarose et dosage par spectrofluorimétrie.

Migration sur gel

- **Préparer et couler le gel :** *(compter environ 50 mL pour un grand gel à 13 petits puits)*
  - Peser 0,7 g d'agarose pour 100 mL de tampon TBE 0,5X
  - Chauffer au micro-ondes dans un Erlenmeyer, jusqu'à fusion complète de l'agarose et obtention d'un liquide homogène.
  - Sous une sorbonne, ajouter ~ 1 µL de BET (bromure d'éthidium) et homogénéiser *(attention à la manipulation du BET, très mutagène)*
  - Couler le gel
  - Après solidification (au moins 30 min), placer le gel dans la cuve de migration contenant du tampon TBE 1X (Tris Buffer EDTA)

- **Préparer les échantillons à faire migrer :**
  - Mélanger 10 µL de l'extrait d'ADN et 2 µL de «Bleu », dans des microtubes à PCR
  - Effectuer le dépôt dans les puits du gel

- **Migration (100 V, environ 20 min)**
- **Observation du gel en lumière UV** *(une importante bande fluorescente mal définie correspondant à l'ADN génomique extrait doit être présente)*

Le dosage est réalisé seulement en cas de réponse positive de la migration.

Dosage de l'ADN

(Des cuves de spectrofluorimétrie adaptées pour les petits volumes doivent être utilisées)

- Dans la cuve, diluer 10 µL d'extrait d'ADN dans 90 µL d'eau (dilution par 10)
- Effectuer une mesure de l'absorbance à λ = 260 nm (dosage de l'ADN)
- Effectuer une seconde mesure à λ = 280 nm (dosage des protéines)
- Ajuster la dilution de l'extrait d'ADN si l'absorbance est > 1
- Calculer la concentration en ADN dans l'extrait (une absorbance de 1 correspond à une concentration en ADN de 50 µg mL^{-1} et l'absorbance est proportionnelle à l'[ADN])
- Le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} vaut idéalement entre 1,8 et 2 pour la PCR

A partir de ce dosage, si la concentration est suffisante, il est conseillé de diluer l'extrait d'ADN à 100 ng μL^{-1} en rajoutant de l'eau, pour faciliter les manipulations de PCR (qui nécessitent environ 100 ng d'ADN).

7.2.c) Amplification de l'ADNr 16S (PCR)

L'amplification de la séquence ADN codant pour l'ARNr 16S (longueur totale ~1500 pb) est réalisée par PCR (réaction de polymérisation en chaîne). Les réactifs (tampon d'incubation, dNTPs, et Taq Polymerase) contenus dans le kit Mix for Taq Polymerase 5 U μL^{-1} (QBiogene), aliquotés, sont utilisés. Les amorces (synthétisées par MWG-Biotech) sont :

F8-Eub 5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC-3' *(Amorce terminale 5')*

1492r-Univ 5'-GNT ACC TTG TTA CGA CTT-3' *(Amorce terminale 3')*

(M = A ou C ; N = A, C, T ou G)

Une réaction de PCR est pour chacune des souches réalisée avec le couple d'amorces F8-1492r.

A partir de là, des **témoins négatif** (eau bidistillée stérile) **et positif** (extrait ADN bactérien choisi) sont réalisés simultanément à la série d'échantillons.

PCR *Kit Taq Polymerase (QBiogene)*

- **Déterminer le volume d'extrait ADN à utiliser** pour chaque échantillon et en déduire le volume d'eau à utiliser *(50 µL totaux -11,3 µL de « mix » - $V_{extrait\ d'ADN}$)*
- **Répartir l'eau** bidistillée stérile entre les tubes
- **Préparer le « mix » de PCR » :** *(valeurs pour 1 tube, à ajuster en prévoyant un mix pour au moins 2 tubes de plus que le nombre d'échantillons) (attention à bien homogénéiser)*
  - 5 µL de tampon d'incubation 10X avec $MgCl_2$ *(C_{finale} = 1X)*
  - 1 µL de mix de dNTPs 10 mM *(C_{finale} = 200 µM)*
  - 2,5 µL de chacune des 2 solutions d'amorces à 10 µM *($Quantité_{finale}$ = 25 pmol)*
  - 0,3 µL de Taq Polymérase à 5 U μL^{-1} *($Quantité_{finale}$ = 1,5 U)*
- **Répartir le mix** entre les tubes (**11,3 µl/tube**)
- **Ajouter l'extrait d'ADN** et bien homogénéiser

Chaque microtube contient donc 11,3 µL de « mix », 100 ng d'ADN (en général 1 µL) et qsp 50 µL d'eau bidistillée stérile (en général 37,7 µL)

Conditions de PCR *(durée totale : ~ 2 h)* :

- 94°C (5 min),
- **25 à 30 cycles** : 94 °C (30s), 55°C (30 s), 72°C (1 min 30 s)
- 72°C (7 min)
- Conservation à 4°C

7.2.d) Contrôle du produit de la PCR

Une **migration sur gel** d'agarose et un dosage de l'ADN sont effectués pour contrôler la qualité du produit de PCR. Les protocoles expérimentaux sont les mêmes que ceux précédemment utilisés pour contrôler l'extraction de l'ADN, mais pour économiser le produit PCR, la migration est réalisée avec 5 µL de produit PCR (au lieu de 10 µL) + 5 µL d'eau + 2 µL de Bleu. La migration d'un ladder (échelle de longueur ADN) est également réalisée. Si plusieurs bandes apparaissent à l'observation sous lumière UV, la PCR a conduit à l'amplification de plusieurs régions du génome, et il faut alors effectuer une extraction sur gel de la région amplifiée qui nous intéresse. Elle ne sera pas détaillée ici.

7.2.e) Purification sur colonne du produit PCR

La purification est réalisée si la quantité d'ADN dans le tube (déterminée à partir du dosage) dépasse environ 150 ng (d'après MWB-Biotech, environ 20 ng sont nécessaires pour séquencer 100 pb). Il s'agit d'une purification sur colonne, utilisant le kit Strataprep Purification Kit, dont le protocole est le suivant :

Purification *Strataprep Purification Kit (Strataprep)*

- Ajouter un volume de « **DNA-Binding solution** » égal à celui du produit PCR (40 µL, après la migration) et mélanger
- **Transférer dans la microcolonne** de filtration
- **Centrifuger** (vitesse max, 30 s) et jeter la solution filtrée
- **Ajouter 750 µL de «1x Wash Buffer »**
- **Centrifuger** (vitesse max, 30 s) et jeter la solution filtrée *(effectuer cette étape deux fois)*
- Placer la colonne sur un nouveau microtube de 1,5 mL
- Déposer sur la membrane **50 µL d'eau bidistillée stérile** *(le kit utilise un tampon d'élution, mais l'eau est préférable pour la lyophilisation et le séquençage (selon MWG-Biotech))*
- Incuber 5 min à température ambiante
- **Centrifuger** (vitesse max, 30 s)
- Conservation à -20°C

Le tube contient le fragment d'ADN à séquencer en solution dans 50 µL d'eau

Une étape de dosage de l'ADN peut éventuellement être effectuée après la purification pour s'assurer de ne pas procéder à un séquençage inutile.

7.2.f) Lyophilisation

Les produits PCR purifiés sont lyophilisés dans leur microtube ouvert, recouvert d'un parafilm percé avec l'aiguille d'une seringue. La lyophilisation ne doit pas être trop poussée pour permettre la remise en suspension du culot (arrêter la lyophilisation après environ 12 h). Des précautions doivent être prises en retirant le Parafilm pour ne pas perdre l'ADN qui pourrait y être collé, ce qui est fréquent (l'ADN est visible après sa lyophilisation).

Après lyophilisation, les échantillons sont conservés à température ambiante à l'abri de la lumière et de l'humidité.

7.2.g) Séquençage

Les échantillons lyophilisés sont envoyés pour séquençage par électrophorèse capillaire à MWG-Biotech (adresse complète : MWG Biotech, Le Dôme, 1, rue de la Haye, BP 12910, 95731 Roissy CDG, France).

Les références des échantillons sont rentrées en ligne (voir figure Annexe-69 ci-dessous) (https://ecom2.mwgdna.com/register/index.tcl → Sequencing (à gauche) → Value Read) (se créer un compte), en remplissant les champs de nom de l'échantillon, nature de l'échantillon (produit PCR), amorce à utiliser pour le séquençage et code de l'étiquette prépayée correspondant à l'échantillon. Le service « Value Read » est choisi (une seule tentative de séquençage). L'amorce à utiliser peut être jointe à l'envoi ou synthétisée (dans ce cas, commencer par soumettre en ligne le nom et la séquence de l'amorce à synthétiser, en indiquant qu'elle sera utilisée pour le Value Read, puis préciser son utilisation dans la saisie des références des échantillons). Le prix de chaque étiquette prépayée est d'environ 10 €, et la synthèse d'une amorce revient à 8,50 €. Signalons qu'une seule synthèse d'amorce est nécessaire pour le séquençage de l'ensemble des tubes soumis, mais celle-ci est à répéter à chaque envoi.

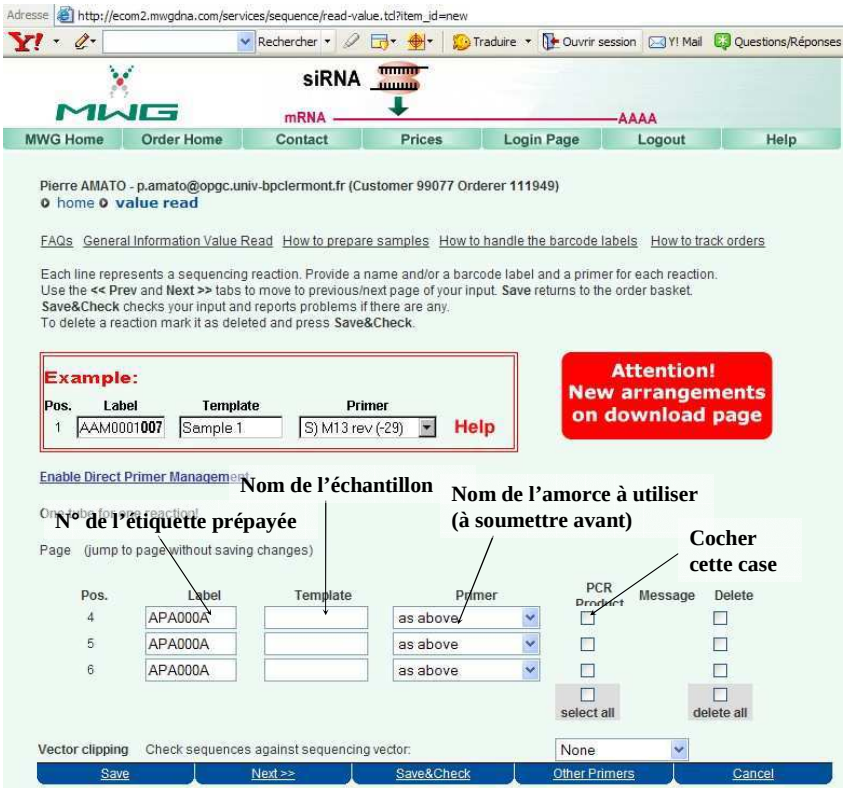


Figure Annexe-69 : Ecran du site de MWG-Biotech de saisie des références des échantillons d'ADN pour le séquençage (http://ecom2.mwgdna.com/services/sequence/read-value.tcl?item_id=new).

Les séquençages sont au moins réalisés avec **l'amorce F8-Eub** précédemment utilisée pour la réaction de PCR. L'utilisation d'une seule amorce ne permet pas d'accéder qu'à une partie de la séquence, d'une longueur d'environ 1000 pb dans le meilleur des cas. Occasionnellement, la **séquence complète** de l'ADN codant pour l'ARNr 16S est obtenue en effectuant un séquençage complémentaire dans le sens reverse avec **l'amorce 1492r-Univ**. Enfin, un troisième séquençage (nécessitant donc un troisième produit PCR de la même souche) est réalisé avec une amorce centrale (**F500**, séquence ci-dessous), pour s'assurer du chevauchement des 2 premières séquences. Obtenir la séquence complète (~ 1500 pb) est donc finalement 3 x plus onéreux que pour une séquence partielle pouvant atteindre 1000 pb.

Cependant, la séquence complète est nécessaire pour effectuer des analyses phylogénétiques (arbre) valables.

F500 5'-CTA ACT ACG TGC CAG CAG C-3' *(Amorce centrale)*

Les résultats sont reçus par e-mail (compter environ 10 j entre l'envoi des échantillons et la réception des résultats) et sont disponibles à partir du compte créé sur le site de MWG. Ils sont au **format FASTA** et la position de la séquence est donnée, dans le sens 5'→3'.

Exemple de résultat :
(souche 13b-3, avec l'amorce F8-Eub, nucléotides 21 à 1025)

>13-3-F8 21..1025 of trace file
AGCGGATGAAGAGAGCTTGCTCTCTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCA
TACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAA
CTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCAT
GCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCGAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCT
AACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGC
TCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCAAGCTAGAGTAGGGCAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGACCACCTGGGCTCATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGG
AAGCCTTGAGCTTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGAAGCACCGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCAATGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGT

7.2.h) Analyse des séquences

7.2.h(i) Recontruction de séquences complètes

(Cette étape est nécessaire seulement si plusieurs séquençages ont été réalisés en vue d'obtenir la séquence complète).

Pour reconstituer la séquence dans le sens 5'→3', il est nécessaire de déterminer la **séquence complémentaire** de celle obtenue avec l'amorce 1492r, et d'inverser la séquence (car elle est car donnée au départ dans le sens 5'→3'). Cela est rapidement fait grâce à un logiciel de complémentation libre sur Internet, comme **Analyseq** (http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/invcomp_in.pl) (figure Annexe-70).

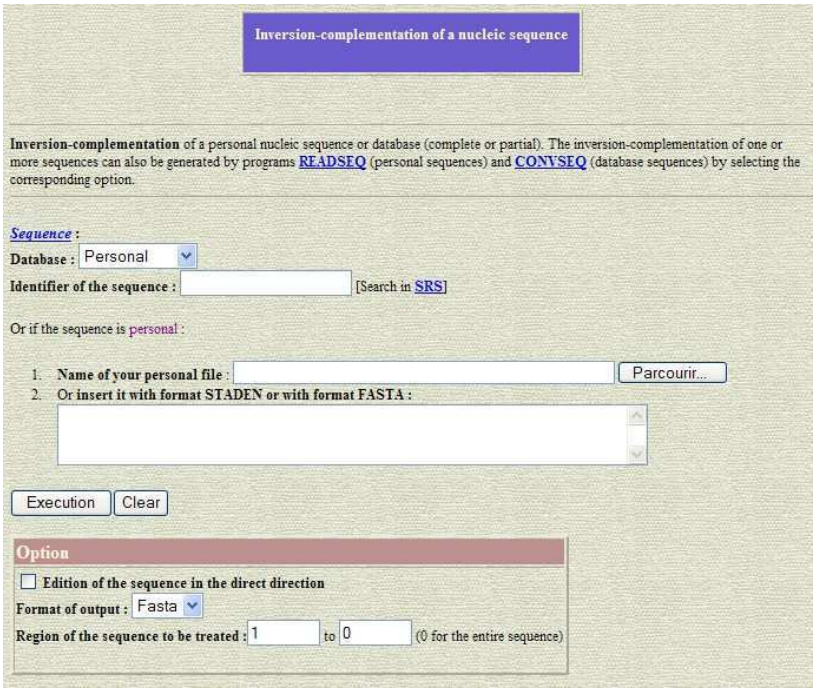


Figure Annexe-70: Ecran de l'interface INVCOMP permettant l'inversion-complémentation de séquences ADN.

Ensuite, déterminer les zones de chevauchement avec les séquences obtenues avec F8 et F500 (le mode « Rechercher » du menu « Edition » de Word est très pratique pour cela) et effectuer la reconstruction. Il est préférable d'éliminer les extrémités des séquences où peuvent se situer des erreurs de séquençage.

Séquences :

>C_2_2-F8-Eub 17..853 of trace file

GTCGAACGGACCCTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACGTGCCTTTAGGTTCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGAATGTGCCCTT
CGGGGGAAAGATTTATCGCCTTTAGAGCGGCCCGCGTCTGATTAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCCATGCCGCGTGGATGATGAAGGTCTT
AGGATTGTAAAATCCTTTCACCGGTGAAGATAATGACTGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTC
GGAATTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAACTGCCTTTGATACTGGGTGTCTTGAGTGTGATAGAG
GTATGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACATACTGGATCATTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTGCTAGTTGTCGGGGGATTTATCTCTCGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCAATCCGCCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG

>C_2_4-F500 30..863 of trace file

AGGGAGCGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAACTGCCTTTGATACTGGGTGTCTTGAGTGTGATAGAGGTATGTGGAACTCCGAG
TGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACATACTGGATCATTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTGCTAGTTGTCGGGGGATTTATCTCTCGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCAATCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
TTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCACCTTTTGACATGCCTGGACCGCCAGAG
AGATCTGGCTTTCCCTTCGGGGACTAGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCATTAG
TTGCCATCATTTAGTTGGGAACTCTAATGGGACTGCCGGTGCTAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACAGGGTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGCAACTACAGAGGGTTAATCCTTAAAAGTTGTCTCAGTTCGGATTGTCCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACC

>C_2_3-1492r-Univ 25..900 of trace file

GGTTAGCGCATCGCCTTCGGGTAGAACCAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGAT
TCCAACTTCATGCCCTCGAGTTGCAGAGGACAATCCGAACTGAGACAACTTTTAAGGATTAACCCTCTGTAGTTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCACCCTGTAAGGGC
CATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGCTTAGCACCGGCAGTCCCATTAGAGTTCCCAACTAAATGATGGCAACTAATGGCGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGA
CTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCCTAGTCCCCGAAGGGAAAGCCAGATCTCTCTGGCGGTCCAGGCATGTCAAAAGGTG
GTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGATTGCT
TAATGCGTTAGCTGCGTCACCGAGAGATAAATCCCCCGACAACTAGCAATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGC
CTCAGCGTCAGTAATGATCCAGTATGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCGAATATCTACGAATTTCACCTCTACACTCGGAGTTCCACATACCTCTATCACACTCAAGAC
ACCCAGTATCAAGGCAGTTCCAGAGTTGAGCTCTGGGATTTCACCCCTGACTTAAATGTCCGCCTACGCTCCTTTACGCCCAGTATTCCGAGCAACGC

Séquence complémentaire inverse de C_2_3-1492r-Univ :

>QUERY : Sens inverse-complémentaire de la séquence (1 - 875)

GCGTTGCTCGGAATACTGGGCGTAAAGGAGCGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAACTGCCTTGATACTGGGTGTCTTGAGTGTG
ATAGAGGTATGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACATACTGGATCATTACTGACGCTGAGGCTCGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTGCTAGTTGTCGGGGGATTTATCTCTCGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCAATCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCACCT
TTTGACATGCCTGGACCGCCAGAGAGATCTGGCTTTCCCTTCGGGGACTAGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTCGCCATTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGAACTCTAATGGGACTGCCGGTGCTAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCT
TACAGGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAACTACAGAGGGTTAATCCTTAAAAGTTGTCTCAGTTCGGATTGTCCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAGTTGGAATCG
CTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACCCGAAGGCGATGCGCTAACC

>C_Complète

GTCGAACGGACCCTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACGTGCCTTTAGGTTCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGAATGTGCCCTT
CGGGGGAAAGATTTATCGCCTTTAGAGCGGCCCGCGTCTGATTAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCCATGCCGCGTGGATGATGAAGGTCTT
AGGATTGTAAAATCCTTTCACCGGTGAAGATAATGACTGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTC
GGAATTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGAGCTCAACTCTGGAACTGCCTTTGATACTGGGTGTCTTGAGTGTGATAGAG
GTATGTGGAACTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACATACTGGATCATTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTGCTAGTTGTCGGGGGATTTATCTCTCGGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCAATCCGCCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCACCTTTTGAC
ATGCCTGGACCGCCAGAGAGATCTGGCTTTCCCTTCGGGGACTAGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTCGCCATTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGAACTCTAATGGGACTGCCGGTGCTAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACAG
GGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAACTACAGAGGGTTAATCCTTAAAAGTTGTCTCAGTTCGGATTGTCCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAGTTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTCTACCCGAAGGCGATGCGCTAACC

7.2.h(ii) Identification des souches

Les souches sont identifiées par comparaison de la séquence (complète ou partielle) avec les séquences contenues dans une banque de données. Le logiciel « **Blastn** », dont une interface est disponible librement sur le site de NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), a été utilisé, en se référant à l'ensemble des banques de séquences prises en compte (GenBank, EMBL, DDBJ et PDB).

Cette interface donne accès à l'homologie de la séquence soumise avec les plus proches trouvées dans la banque. Un exemple de résultat de la recherche par blast est présenté en figure Annexe-71 ci-dessous. Cela permet de déduire la taxonomie de la souche avec plus ou moins de précision en fonction des résultats : en général, on considère que le genre est le même pour une **homologie de séquence > 98 %**. De plus, l'alignement avec les séquences de la banque est visualisable, ainsi que les références bibliographiques (avec en plus un lien

direct) et, suivant les auteurs, des informations complémentaires sur les séquences (lieu d'isolement de la souche, taxonomie…).

L'ensemble des séquences les plus proches et le rapport de taxonomie (« Taxonomy report ») donné sont considérés pour déterminer l'affiliation la plus plausible de la souche considérée. Il faut signaler que les caractéristiques taxonomiques étant données par les dépositaires des séquences, elles peuvent parfois être inexactes.

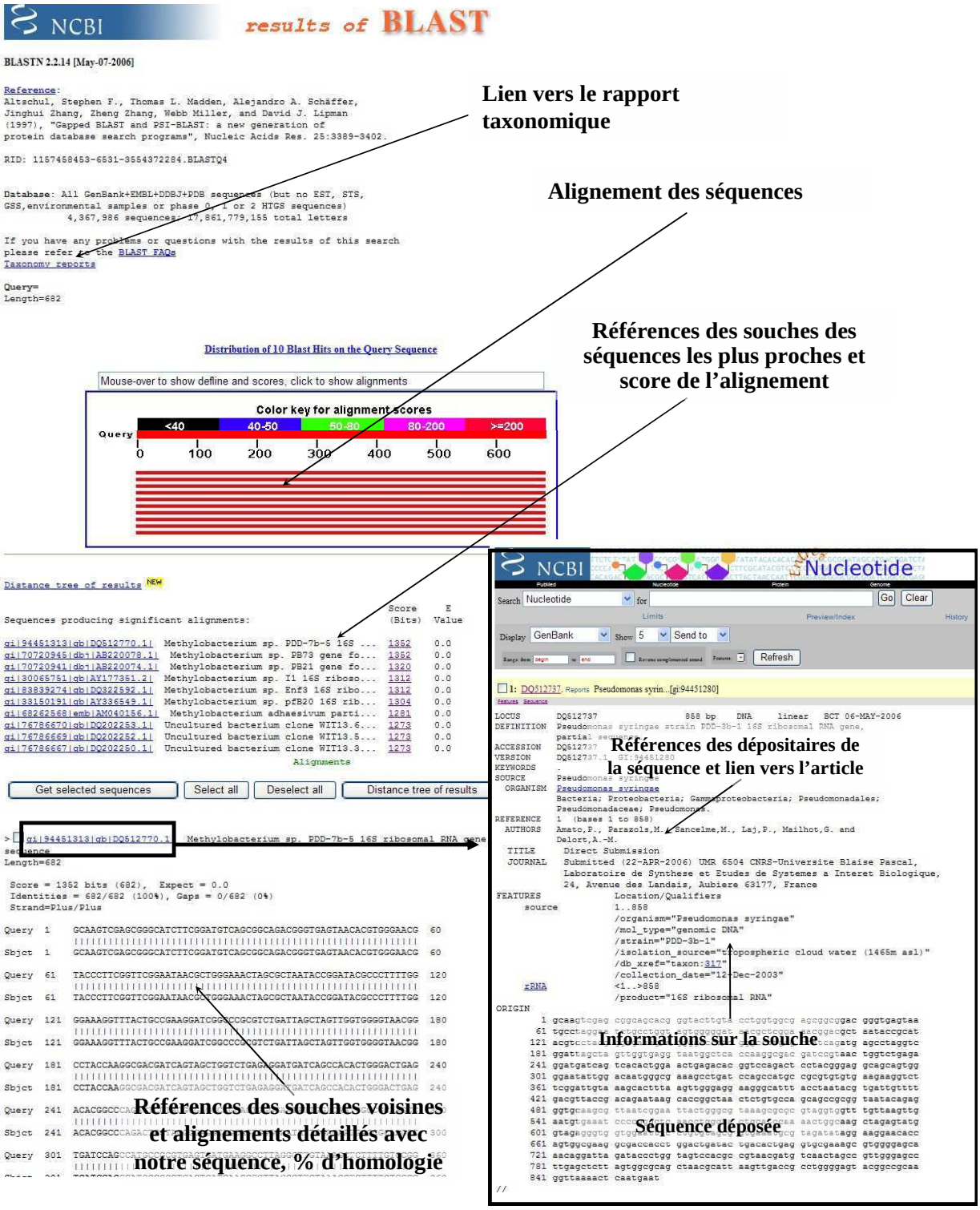


Figure Annexe-71 : Exemple de résultats d'un Blast réalisé avec Blastn et d'un lien vers les détails d'une des séquences voisines.

7.2.h(iii)Analyse phylogénétique (arbres)

Pour la construction des arbres phylogénétiques, il faut savoir que, évidemment, plus les séquences considérées sont longues, plus l'arbre obtenu est valable. Pour cette analyse, sélectionner des séquences de souches proches et moins proches de celles obtenues par séquençage. Réaliser ensuite un alignement multiple des séquences à l'aide d'une l'interface d'alignement multiple de séquences comme **ClustalW**, disponible à la page (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) (figure Annexe-72). Les extrémités non chevauchantes des séquences sont coupées (au format .txt par exemple) pour être toutes de la même longueur. Quand il est vérifié que toutes les séquences ont la même longueur, effectuer un dernier alignement multiple, en choisissant des résultats au format Phylip.

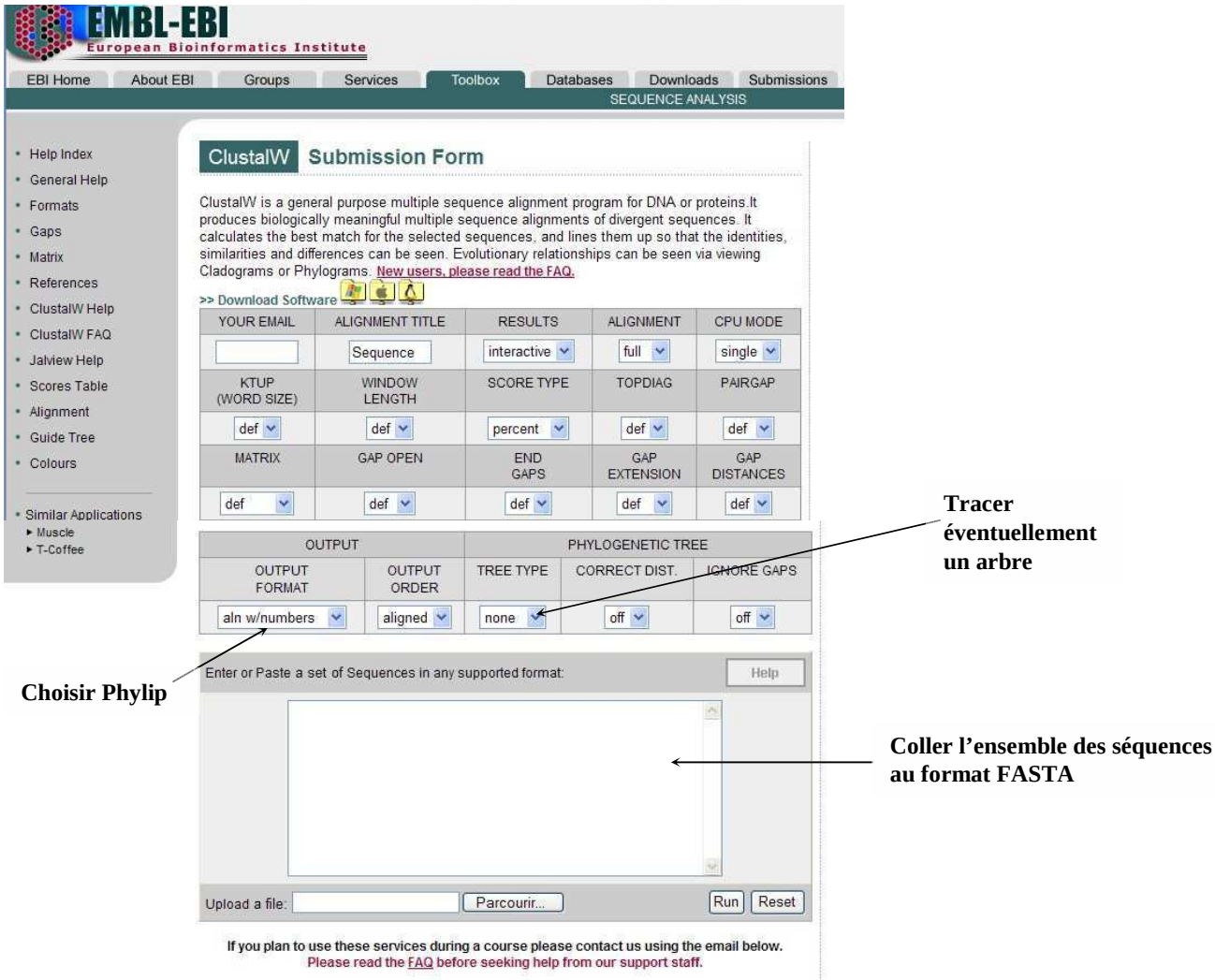


Figure Annexe-72 : Interface d'alignement multiple ClustalW.

- Récupérer ensuite l'alignement et le coller dans un fichier au format .txt.

Le logiciel Phylip 3.63 (Phylogeny Inference Package) (Felsenstein, 2004), disponible librement au téléchargement, est utilisé pour construire l'arbre. Son utilisation ne sera pas détaillée, mais la résolution de certains problèmes rencontrés (sous Microsoft Windows XP) mais qui ne sont pas référencés dans les aides est précisée ici, ainsi que le moyen de construction d'arbre par la méthode « Neighbour-joining » :

- **D'abord, permettre la modification de l'extension des fichiers**, en décochant l'option « Masquer l'extension dont le type est connu » de l'onglet Affichage, dans le menu Options des dossier du menu Outils d'une fenêtre de dossier. Cela permet par exemple de renommer un fichier nommé « *fichier* », sans extension en « *fichier.txt* » et de le transformer ainsi en fichier s'ouvrant avec le bloc note de Windows ;

- Après avoir téléchargé le package Phylip, inclure le fichier .txt contenant l'alignement de séquences et les modules de Phylip à utiliser (les copier) **dans un même dossier**, ainsi qu'un fichier de police de Phylip (nommé *font1, 2,* …et renommé *fontfile*) ;

- **Renommer** le fichier .txt avec l'alignement de séquences *infile.txt* ;

- Au lancement de chaque module, au message d'erreur « *can't find input file 'infile'* », indiquer le nom du fichier avec son extension (« *infile.txt* »).

Méthode simplifiée de
Construction d'un arbre consensus par génération de 100 arbres par la méthode Neighbour-joining *(Phylip 3.63)*

Avant de commencer, copier les modules exécutables *seqboot*, *dnadist*, *neighbor*, *consense* et le fichier *font1* dans un dossier. Renommer le fichier avec les séquences coupées et alignées en *infile.txt*. Parmi les séquences alignées doit se trouver sur la première ligne une séquence de référence, relativement éloignée des autres, pour enraciner l'arbre (ex : une séquence de souche de *E. coli* pour des gram négatifs environnementaux de différents groupes autres que des Entérobactéries). Adapter cette séquence racine en fonction des séquences à analyser. Un exemple de fichier d'alignement multiple au format supporté par Phylip est donné sur la figure Annexe-73 ci-dessous.

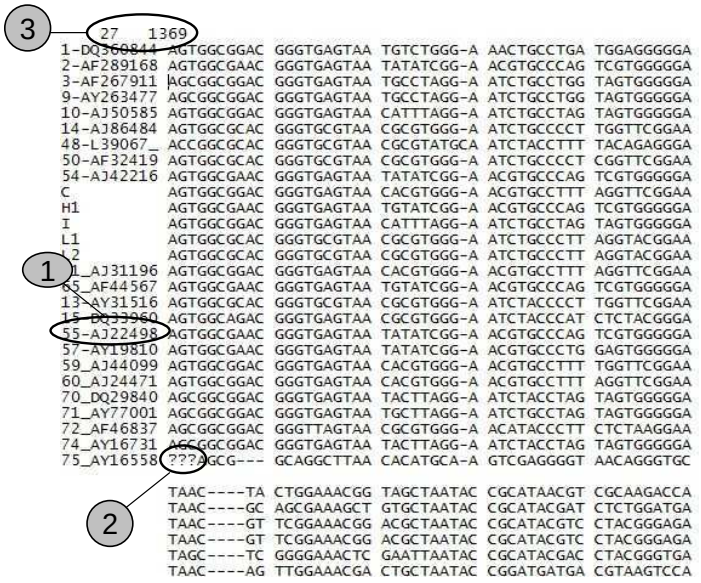


Figure Annexe-73 : Format d'entrée utilisé pour le logiciel Phylip. L'alignement de séquences est obtenu avec ClustalW et collé au format .txt. Les noms de séquences (**1**) ne peuvent pas comporter plus de 10 caractères (ils sont automatiquement coupés par ClustalW), sans espace. (**2**) Remplacer les quelques « - » éventuels restants après coupure des extrémités par des « ? ». Sur la première ligne (**3**) sont indiqués le nombre de séquences (27) et leur longueur (1369 pb).

- **Lancer l'exécution du module *seqboot*** (rentrer le nom de fichier sur lequel travailler : *infile.txt*. A l'option *R*, rentrer *100* (nombre de réplicats de l'analyse) ;

- **Renommer** le fichier *outfile* obtenu en *outfileseqboot*, sans extension

- **Lancer l'exécution du module *dnadist*** (avec le fichier *outfileseqboot*). A l'option *D*, choisir la correction de *Kimura2-parameter* ; à l'option *M*, choisir *multiple data set* (rentrer *D*) et indiquer le nombre de réplicats (*100 data sets*) ; (cette étape peut être assez longue suivant le puissance de l'ordinateur, le nombre de réplicats et le nombre de séquences à analyser)

- **Renommer** le fichier *outfile* obtenu en *outfilednadist*, sans extension

- **Lancer l'exécution du module *neighbor*** (avec le fichier *outfilednadist*). A l'option *M*, indiquer le nombre de réplicats (*100 data sets*) en entrer un nombre impair nécessaire au

tirage aléatoire de l'ordre d'entrée des séquences dans l'analyse. (Cette étape est elle aussi assez lourde)

- **Renommer** le fichier *outfile* obtenu en *outfileneighbor*, et le fichier *outtree* en *outtreeneighbor*, sans extension

- **Lancer l'exécution du module *consense*** (avec le fichier *intree*). A l'option *O*, indiquer la ligne sur laquelle se trouve la séquence de la racine (*1*)

- Le fichier *outfile* contient **l'arbre consensus** avec le nombre d'arbres sur les 100 générés qui est constitué de la branche de l'arbre correspondante. Renommer ce fichier *outfile* en *arbreconsensus.txt* par exemple pour visualiser l'arbre au format .txt

- **Pour retravailler l'arbre obtenu** (indiquer les poids des noeuds sur l'arbre et éventuellement modifier le nom de séquences), visualiser les 100 arbres générés après le traitement avec *neighbor* (fichier *outtreeneighbor*) avec un éditeur d'arbres comme **Treeview** et repérer celui qui correspond à l'arbre consensus. L'enregistrer au format image et utiliser par exemple **Microsoft Powerpoint** pour indiquer sur l'arbre les poids de chaque noeud (présents dans le fichier *arbreconsensus.txt*) et les noms de séquences complets (figure Annexe-74).

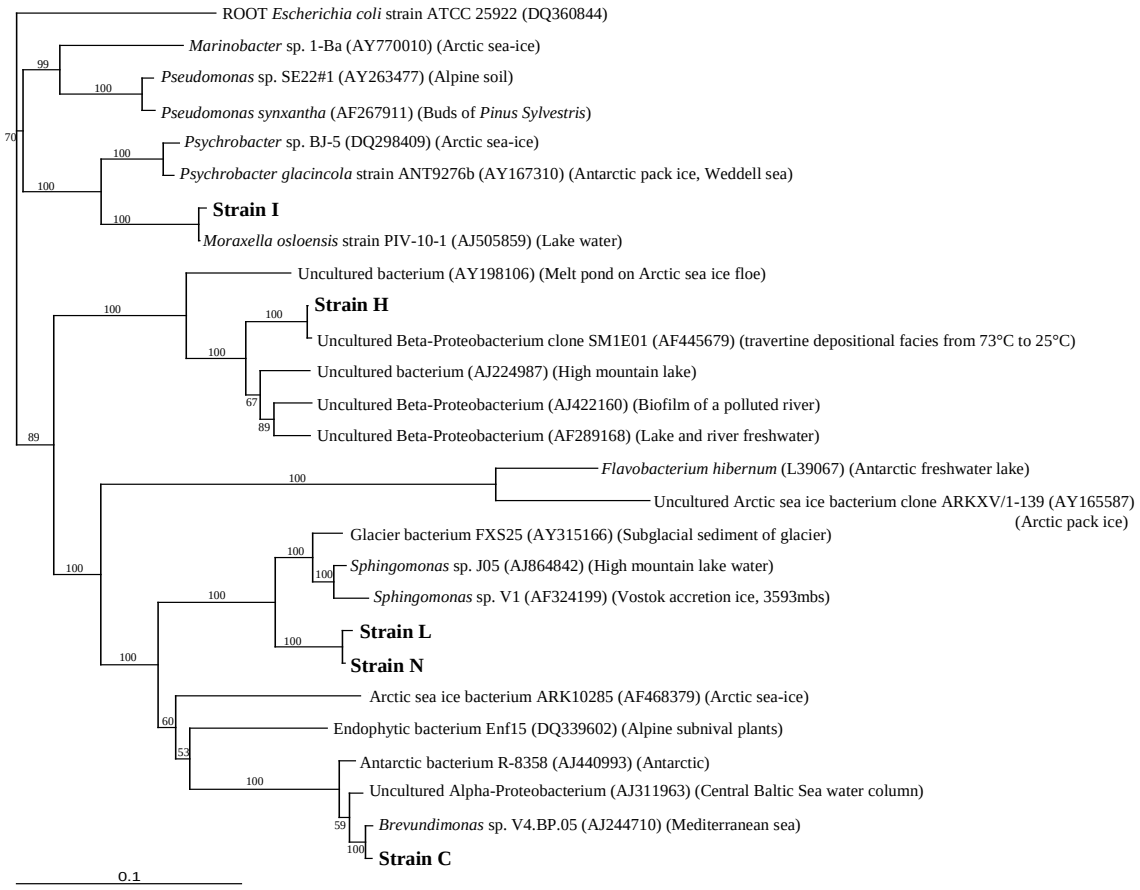


Figure Annexe-74 : Arbre consensus retravaillé, obtenu par la méthode de Neighbor-joining, avec le logiciel Phylip.

8) TESTS DE BIODEGRADATION ET ANALYSE PAR RMN

Les potentialités de dégradation des souches isolées ont été testées envers le formiate, l'acétate, le lactate, le succinate, le formaldéhyde et le méthanol. Ces composés organiques sont parmi ceux majoritairement retrouvés dans l'eau des nuages, y compris les échantillons collectés au sommet du puy de Dôme. Des resting cells des souches isolées sont d'abord mises en présence d'un de ces composé et les analyses sont réalisées par RMN ^{1}H, ou ^{13}C dans certains cas, et par l'analyseur à formaldéhyde AL4021 (Aerolaser).

Notons que des **cultures pures** des souches ont été utilisées, en présence d'**un seul composé chimique à la fois**. Cependant, les tests en présence de chacun des composés sont réalisés simultanément, en répartissant les cellules provenant d'une même culture entre les différents milieux d'incubation.

Le protocole général employé pour effectuer ces tests de biodégradation est donné sur la figure Annexe-75 ci-dessous, ainsi que la composition du tampon phosphate et des milieux d'incubation. Il est détaillé à la suite.

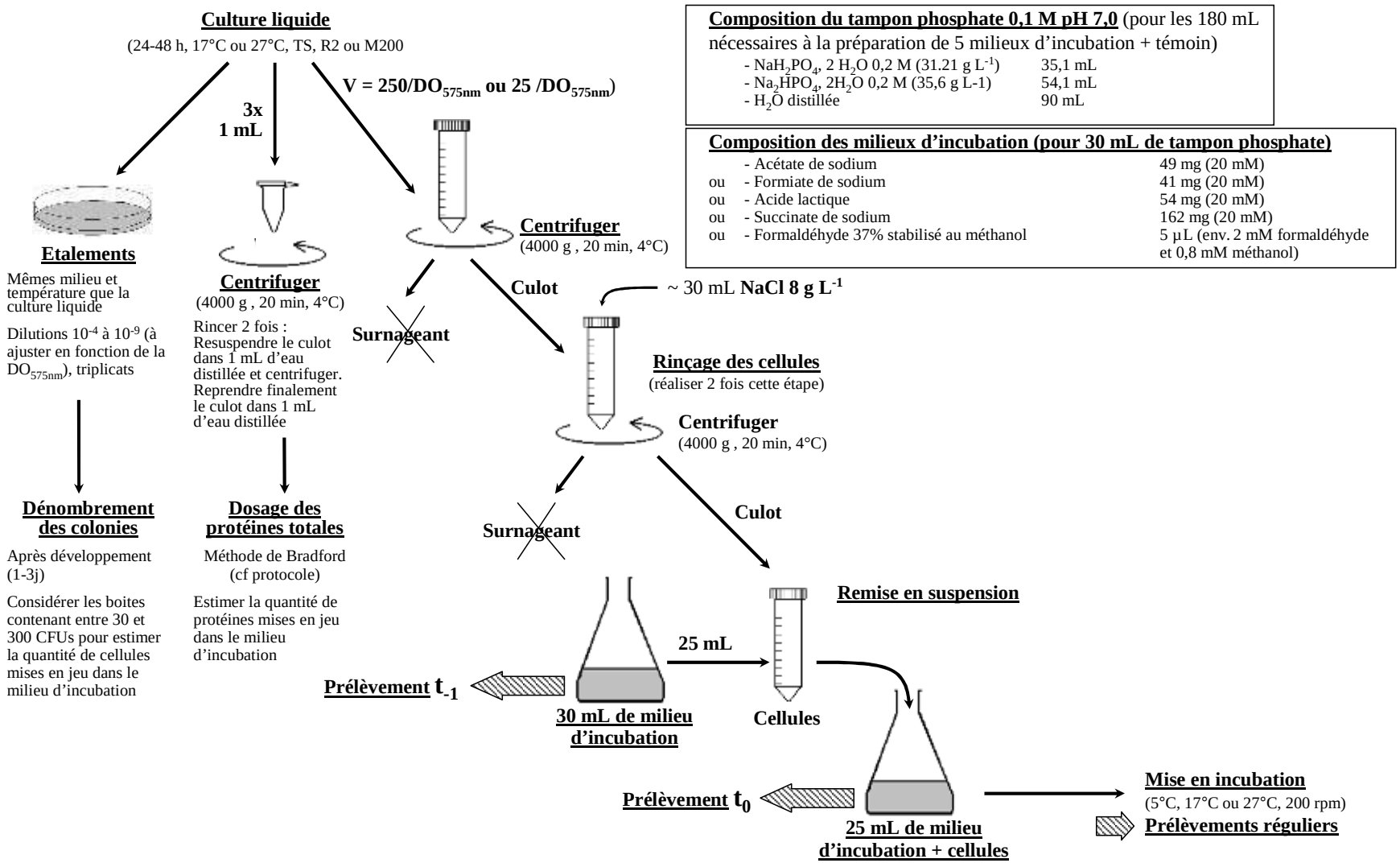


Figure Annexe-75 : Mode opératoire employé pour les tests de biodégradation, et compositions du tampon phosphate et des milieux d'incubation utilisés.

8.1. Préparation de l'incubation

- **Pour effectuer 6 tests simultanément** (5 substrats + 1 témoin), ensemencer au moins 300 mL de milieu de culture liquide adapté à la souche, et incuber à 27°C ou 17°C jusqu'à développement (à suivre par DO_{575nm}).

- **La densité optique** est utilisée pour normaliser la quantité de cellule dans les milieux d'incubation. Quand elle atteint une valeur suffisante (> 1), déterminer le volume à utiliser :

$$\boxed{V = 250 / DO_{575nm}} \text{ (mL)}$$

Ce volume correspond donc à la quantité de cellules contenues dans 50 mL d'une culture de DO_{575nm} de 10. Le volume utilisé est précisé à chaque fois dans les résultats donnés en annexe 2.

- Prélever environ 5 mL pour les étalements sur boites de pétri, et 3 mL pour le dosage des protéines.

- **Centrifuger** (4000 g, 20 min, 4°C) les 6 tubes (ou plus si le volume est supérieur à 50 mL) contenant la culture.

- Eliminer le surnageant, **ajouter 30 mL de NaCl 0,8 % et centrifuger** dans les mêmes conditions. Effectuer cette étape de rinçage des cellules **2 fois**

- Pendant les centrifugations préparer 30 mL de chaque milieu d'incubation (tableau Annexe-26) :

Composé	Formule	M (g mol^{-1})	Concentration (mM)	Quantité pour 30 mL de tampon
Formiate de sodium	HCOONa	68	20	41 mg
Acétate de sodium	CH_3-COONa	82	20	49 mg
Acide lactique	CH_3-CHOH-COONa	90	20	54 mg
Succinate de sodium	NaOOC-CH_2=CH_2-COONa	270,1	20	162 mg
Formaldéhyde 37 % (stabilisé avec 10-15 % de **méthanol**)	HCHO (CH_3OH)	30 (32)	~ 2 (0,8)	5 µl
Formaldéhyde ^{13}C 20 %	$H^{13}CHO$	31	2 mM	121,7 µL
Méthanol	CH_3OH	32	2 mM	2,4 µL

Tableau Annexe-26 : Différents composés testés et quantité à utiliser pour préparer 30 mL de milieu d'incubation à la concentration voulue.

- **Effectuer un prélèvement** (~1,2 mL) (**t_1**) du milieu d'incubation.

- **Resuspendre 5 des 6 culots dans 25 mL de chacun des 5 milieux** d'incubation et réaliser un témoin avec le dernier culot et du tampon phosphate seul.

- **Effectuer un prélèvement** (~1,2 mL) (**t_0**) du milieu d'incubation, en centrifugeant (12000g, 3 min) pour éliminer les cellules (culot), et transférer le surnageant dans un tube neuf.

- **Mettre en incubation** (27°C ou 17°C, 200 rpm d'agitation)

- **Effectuer des prélèvements à différents temps d'incubation** (4 h, 24 h et 48 h ont été choisis pour les tests systématiques).

- Conserver les prélèvements à -20°C

Pour les prélèvements, il est conseillé de séparer les 450 µL du surnageant qui vont servir à l'analyse (figure Annexe-76) avant la congélation, pour éviter d'avoir à décongeler-recongeler la totalité du volume prélevé. Cela a en plus l'intérêt de simplifier l'organisation des manipulations.

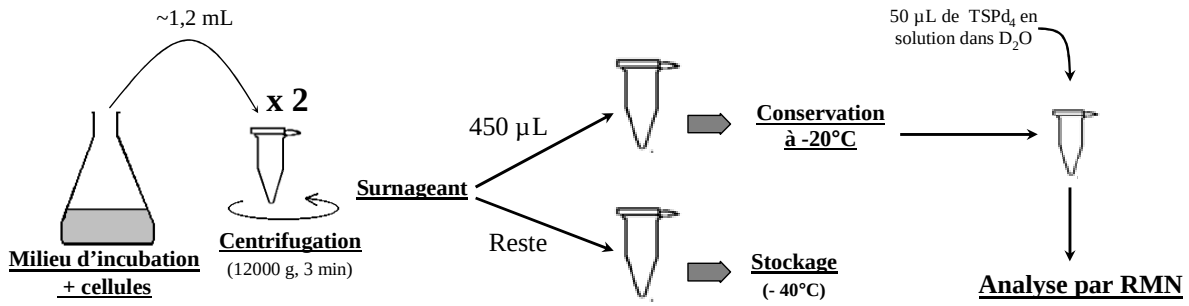


Figure Annexe-76 : Procédure de prélèvement utilisée pour simplifier les manipulations lors de la préparation aux analyses par RMN. Pour les analyses, 50 µL de solution de $TSPd_4$ sont ajoutés, conduisant à la concentration en D_2O de 10 % nécessaire à l'analyse par RMN.

8.2. Estimation de la biomasse mise en jeu

8.2.a) Concentration cellulaire dans le milieu d'incubation

Le nombre de cellules mises en jeu dans chaque milieu d'incubation est estimé par **dilutions décimales successives** de la culture utilisée dans du NaCl 8% stérile et **étalement** de 0,1 mL des dilutions 10^{-4} à 10^{-9} sur les milieux gélosés. Des triplicats sont réalisés (faire une nouvelle série de dilutions par série d'étalements). Les cultures servent également de contrôle de la pureté de la culture utilisée.

Les conditions d'incubation (température et milieu) sont les mêmes que celles utilisées pour la culture liquide. Les colonies formées après 24 à 72 h d'incubations sont dénombrées, et les boites contenant entre 30 et 300 colonies sont considérées pour estimer le nombre de cellules présentes dans chacun des milieux d'incubation, suivant :

Concentration en cellules dans le milieu d'incubation (cellules mL^{-1}) $= \frac{N}{F_d \times V_e} \times \frac{V_{culture}}{V_{test}}$

Avec:

N = Nombre de colonies moyen par boite (30 à 300)

F_d = Dilution de la culture liquide étalée (10^{-4} à 10^{-9})

V_e = Volume de culture étalé (mL)

$V_{culture}$ = Volume de culture liquide centrifugé pour chaque test de biodégradation (mL)

V_{test} = Volume de milieu d'incubation (généralement 25 mL)

8.2.b) Dosage des protéines totales dans le milieu d'incubation

Les protéines totales sont dosées selon la **méthode de Bradford** :

- Centrifuger 3 x 1 mL de la culture (12000g, 3 min)
- Eliminer le surnageant (milieu de culture)
- Rincer : ajouter 1 mL d'eau distillée et centrifuger (12000g, 3 min)
- Recommencer le rinçage
- Suspendre le culot dans 1 mL d'eau distillée
- Ajouter 0,25 mL de NaOH 1 M et vortexer fortement pour extraire les protéines
- Ajouter 5 mL de Bleu de Coomassie (Quick Start Bradford Reagent 1X, Biorad) et incuber 5 min à l'obscurité
- Mesurer l'absorbance à λ = 590nm ; diluer l'échantillon si la DO > 1
- Réaliser 3 réplicats

Un étalon est nécessaire pour relier la DO mesurée à une quantité de protéines. Celui-ci est réalisé à partir de Sérum Albumine Bovine (SAB) (Sigma, 2,6 % H_2O, pureté 99 %). La gamme de concentrations s'étend de 0 (eau distillée stérile filtrée) à 50 µg mL^{-1}. La concentration en protéines dans le milieu d'incubation est déterminée suivant :

Concentration en protéines dans le milieu d'incubation (µg mL^{-1}) $= \frac{P}{F_d \times V_e} \times \frac{V_{culture}}{V_{test}}$

Avec:

P = Concentration en protéines dans la culture (déterminé grâce à la gamme étalon) (µg mL^{-1})

F_d = Dilution éventuelle de l'échantillon (1 ; 0,5 ; 0,1…)

V_e = Volume de culture équivalent au volume utilisé pour le dosage (généralement 1 mL)

$V_{culture}$ = Volume de culture liquide centrifugé pour chaque test de biodégradation (mL)

V_{test} = Volume de milieu d'incubation (généralement 25 mL)

8.3. Analyses des prélèvements : Formiate (F), Acétate (A), Lactate (L), Succinate (S), Méthanol (MeOH)

Les acides organiques et le méthanol sont dosés par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton. La méthode est non invasive, non sélective et permet donc de détecter la présence de plusieurs composés en même temps, en aveugle, et leur concentration peut être déterminée si leur nombre de proton est connu. La spectroscopie par RMN requiert une référence de déplacement chimique, qui est ici le triméthylsilyl-propionate deutéré ($TSPd_4$) (Eurisotop) (δ = 0 ppm). L'eau deutérée (Eurisotop) servant au « Lock » et au « Shim » du spectromètre est utilisée pour préparer la solution de $TSPd_4$:

Préparation de la solution de $TSPd_4$ 20 mM:
(M_{TSPd4} = 172, 264 g mol^{-1})

- Peser précisément 34,5 mg de $TSPd_4$ dans une fiole jaugée de 10 mL
- Ajuster au trait de jauge avec de l'eau lourde (D_2O)
- Aliquoter en 10 x 1 mL et conserver à -20°C à l'abri de la lumière

8.3.a) Préparation des tubes RMN

Le $TSPd_4$ doit être utilisé à une concentration environ 10 fois moindre que celle du composé à doser (dans notre cas) en raison de la présence de ses 9 protons échangeables. De plus, le « Lock » nécessite la présence de 10 % de D_2O. En conséquence, **50 µL de $TSPd_4$ 20 mM** sont ajoutés à **450 µL de chaque échantillon** (C_{finale} = 2 mM) des milieux d'incubation F, A, L et S. Pour le mélange formaldéhyde/méthanol, du **$TSPd_4$ 2 mM** (C_{finale} = 0,2 mM) a été utilisé. Le mélange est réalisé dans un microtube de 1,5 mL, homogénéisé et introduit dans un tube RMN de diamètre 5 mm.

La concentration en $TSPd_4$ est ajustée si la concentration de départ en substrat dans le milieu d'incubation est différente de celle habituellement mises en jeu. Dans tous les cas, 50 µL de la solution de $TSPd_4$ dans le D_2O doivent être ajoutés, il faut donc faire varier la concentration de la solution mère de $TSPd_4$.

8.3.b) Analyse des échantillons

8.3.b(i) RMN ^1H :

Les analyses sont faites sur un spectromètre Bruker Avance 400 MHz avec passeur automatique d'échantillons. Le programme prédéfini « **zgpresat** » est utilisé, en ajustant le **nombre de scans à 32**. Les conditions d'analyses sont les suivantes : fréquence d'acquisition 400,13 MHz ; largeur spectrale 4789,2 Hz ; pulse 90° ; 65,536 points ; **temps d'acquisition de 6,84 min**. Le temps réel (avec le « lock », le « shim » et les manipulations du robot) nécessaire à l'obtention d'un spectre est d'environ 12 minutes.

8.3.b(ii) RMN ^{13}C :

La RMN du carbone 13 est utilisée pour suivre le devenir des composés marqués dans le milieu d'incubation. Dans notre étude, le milieu d'incubation contenant le formaldéhyde ^{13}C est analysé par cette méthode, en plus de l'analyse par RMN ^1H et du dosage du formaldéhyde avec l'analyseur. Le même spectromètre que pour le ^1H est utilisé. Le programme prédéfini « **NC13CPD256** » est utilisé, avec **512 scans**. Les conditions d'analyses sont les suivantes : fréquence d'acquisition 100,62 MHz ; largeur spectrale 25125,63 Hz ; pulse 90° ; délai de relaxation 5 s ; **temps d'acquisition de 54,19 min**.

L'ensemble des spectres acquis est conservé dans le disque dur du PC « RMN500 Process » (**compte « cloud » ; code d'accès « pdd400 »**).

Les noms ont été attribués aux fichiers suivant les exemples ci-dessous :

14b-2S27t4h	pour une incubation de la souche 14b-2 en présence de succinate à 27°C, après 4 h d'incubation.
12b-8f13C5t36h	pour une incubation de la souche 12b-8 en présence de formaldéhyde marqué au ^{13}C à 5°C, après 36 h d'incubation.
13b-4MeOH17t48h	pour une incubation de la souche 13b-4 en présence du mélange formaldéhyde/méthanol ou de méthanol seul à 17°C, après 48 h d'incubation. Un nom comme **13b-4f17t48h** peut également être trouvé pour les incubations en présence du mélange f/MeOH (pour les spectres datant d'avant 2005).
6b-3T17t0h	pour une incubation de la souche 6b-3 témoin à 17°C, au départ de l'incubation.

Traitement des spectres :

Les spectres acquis sont traités avec le logiciel X-Win NMR (Bruker).
De façon systématique, pour les spectres RMN ^{1}H :

- la FID (Free Induction Decay) est d'abord réinitialisée en rentrant la commande « ***a*** »
- la commande « ***em*** » est rentrée pour traiter le signal
- la transformée de Fourier est obtenue par la commande « ***ft*** »
- **le phasage** est réalisé (PH0 pour le pic du $TSPd_4$ et PH1 pour les autres pics)
- **la ligne de base** est ajustée manuellement (un point tous les 0,2 ppm, en évitant les pics) (utilities → defpoints)
- **le déplacement chimique du pic du $TSPd_4$** est ajusté à 0 ppm (« Shift ») (calibrate)
- **la valeur d'intégrale du pic de $TSPd_4$** est ajustée à 100 (inclure les pics satellites) (integrate → calibrate)
- **l'ensemble des pics** est intégré (integrate)

La valeur de l'intégrale de chaque pic est proportionnelle à la concentration du composé :

$$\textbf{Concentration en composé dans le milieu d'incubation (mM)} = \frac{9 \times A \times [TSPd_4]}{N_p \times A_{ref}} \times 1/F_d$$

Avec:

9 = Nombre de protons échangeables du $TSPd_4$

A = Valeur de l'intégrale du pic du composé

$[TSPd_4]$ = Concentration en $TSPd_4$ dans le tube RMN (mM)

N_p = Nombre de protons échangeables correspondant au pic considéré

A_{ref} = Valeur de l'intégrale du pic du $TSPd_4$ (ajustée à 100)

$1/F_d$ = Facteur de dilution dû à l'ajout de la solution de $TSPd_4$ ($1/F_d$ = 500/450)

Les spectres RMN ^{1}H des différents composés dont il est question sont présentés sur les figures Annexe-77 à Annexe-79.

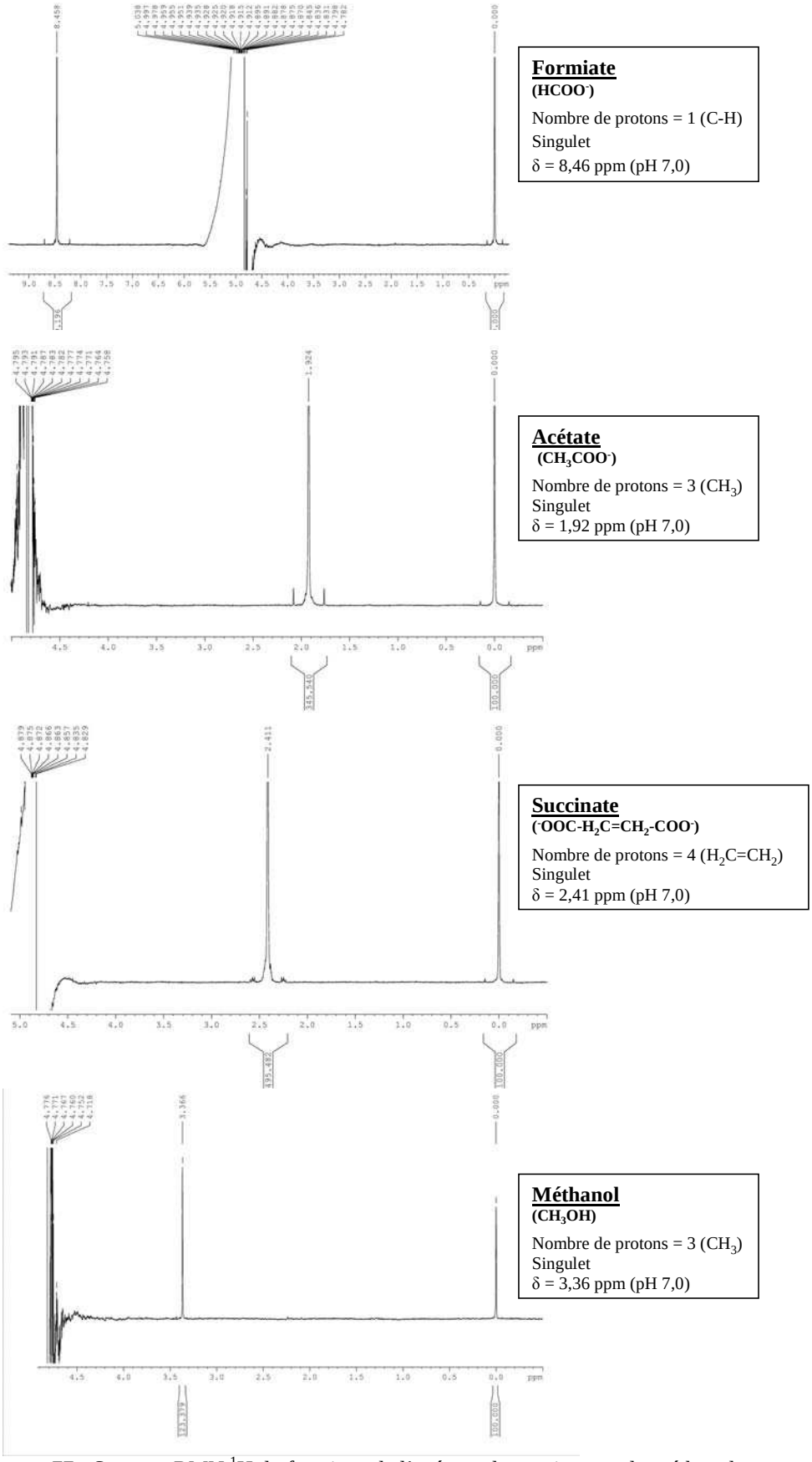


Figure Annexe-77 : Spectres RMN ^{1}H du formiate, de l'acétate, du succinate et du méthanol.

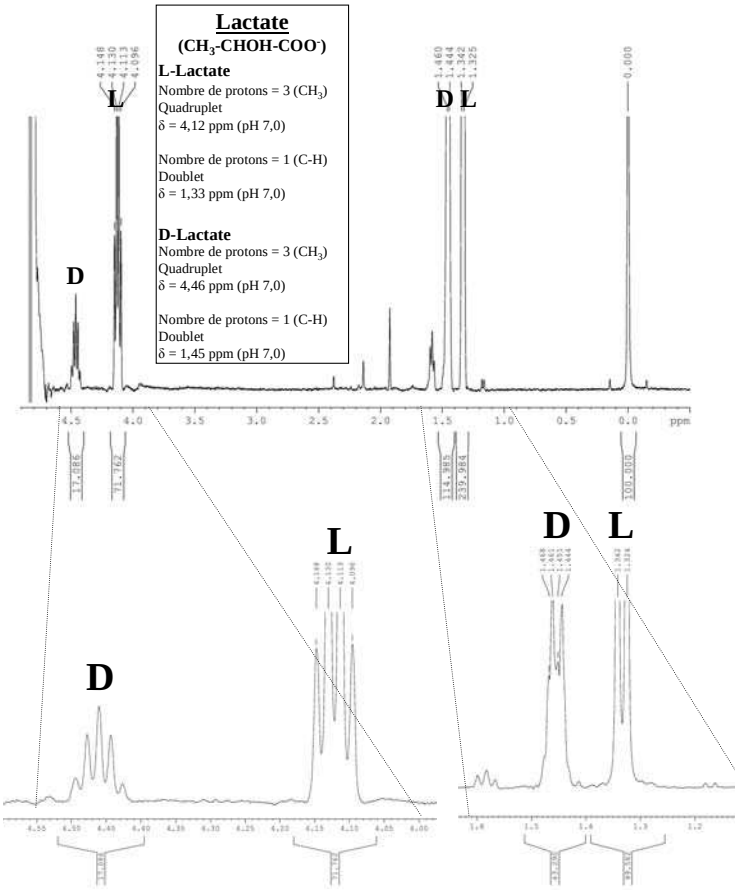


Figure Annexe-78 : Spectre RMN ^{1}H d'un mélange des isomères D et L du lactate.

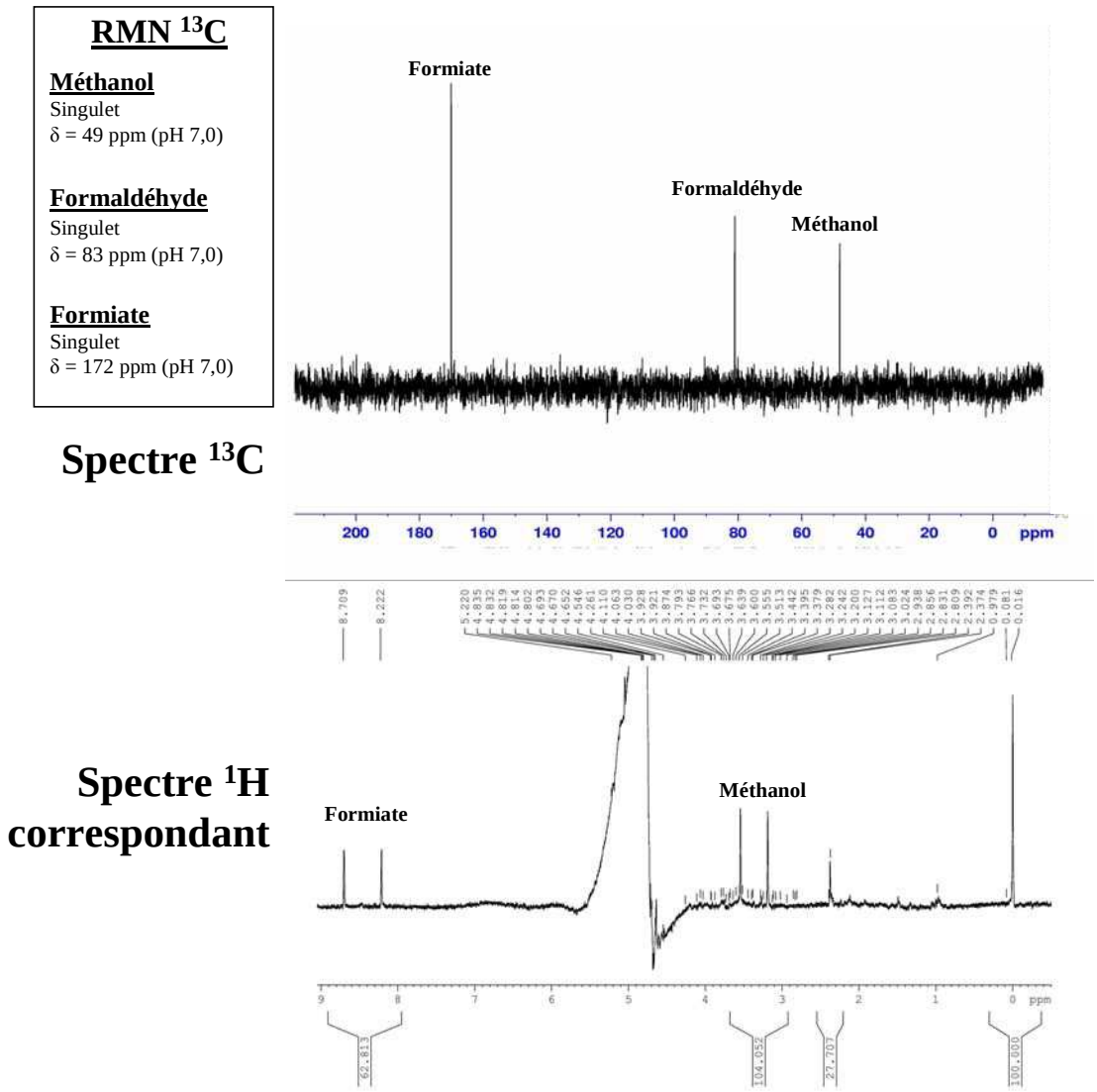


Figure Annexe-79 : Spectre ^{13}C d'un mélange de formiate, de formaldéhyde et de méthanol, et spectre RMN ^{1}H correspondant. Le pic du formaldéhyde est masqué par le signal de l'eau (~5 ppm) en RMN ^{1}H.

8.4. Analyse des prélèvements : formaldéhyde (f) :

Le formaldéhyde résonne en RMN ^{1}H à environ 4,8 ppm. Son signal est donc masqué par celui de l'eau, et cette technique ne peut pas être utilisée ici. Le formaldéhyde présent dans le milieu d'incubation aux différents temps est donc dosé à l'aide de l'analyseur automatique AL4021 (Aerolaser).

La méthode est basée sur la réactivité du formaldéhyde en phase aqueuse (réaction de Hantzch) avec l'acétylacétone et l'ammoniac, conduisant à un produit fluorescent ($\lambda_{excitation}$= 400 nm ; $\lambda_{émission}$= 510 nm) :

$$\boxed{HCHO + \text{acétylacétone} + NH_3 \rightarrow \alpha\text{-}\alpha'\text{-diméthyl-}\beta\text{-}\beta'\text{-diacétyl-pyrimidine}}$$

La fluorescence émise est donc proportionnelle à la concentration en formaldéhyde. La gamme de concentrations mesurables par l'appareil s'étend théoriquement de 0,1 µg L^{-1} (0,0033 µM) à 300 µg L^{-1} (10 µM).

Pour la mesure, les échantillons sont dilués par 1000 dans de l'eau distillée de façon à atteindre des concentrations de l'ordre du µM.

Avant toute série de mesures, il est nécessaire d'effectuer un étalonnage manuel de l'appareil, avec des solutions de concentrations connues.

$$\textbf{Pourcentage de biodégradation (\%)} = 1 - \frac{[C]_t}{[C]_{t0}} \times 100$$

Avec:

$[C]_t$ = Concentration du composé au temps t (mM)

$[C]_{t0}$ = Concentration du composé au temps t_0 (mM)

9) TESTS DE CROISSANCE A DIFFERENTES TEMPERATURES

La capacité des souches à se développer à différentes températures est déterminée de façon systématique. Pour cela, des précultures (20 mL) de la souche pure sont d'abord incubées à une des trois températures disponibles (5°C, 17°C et 27°C), sur le milieu déterminé comme étant le plus adapté (TS, R2 ou Emerson). Après 24 à 48 heures d'incubation (200 rpm), 3 Erlenmeyer de 100 mL contenant 20 mL du même milieu de culture, sont ensemencées avec 3 x 1 mL de culture. La **densité optique** des cultures est suivie à **λ = 575 nm**, en réalisant des prélèvements de 1 mL de culture. Toutes les combinaisons entre les différentes températures sont effectuées simultanément pour appréhender un éventuel effet d'habituation/adaptation des cellules à une des températures, induit par les conditions de préculture (voir figure Annexe-80 ci-dessous).

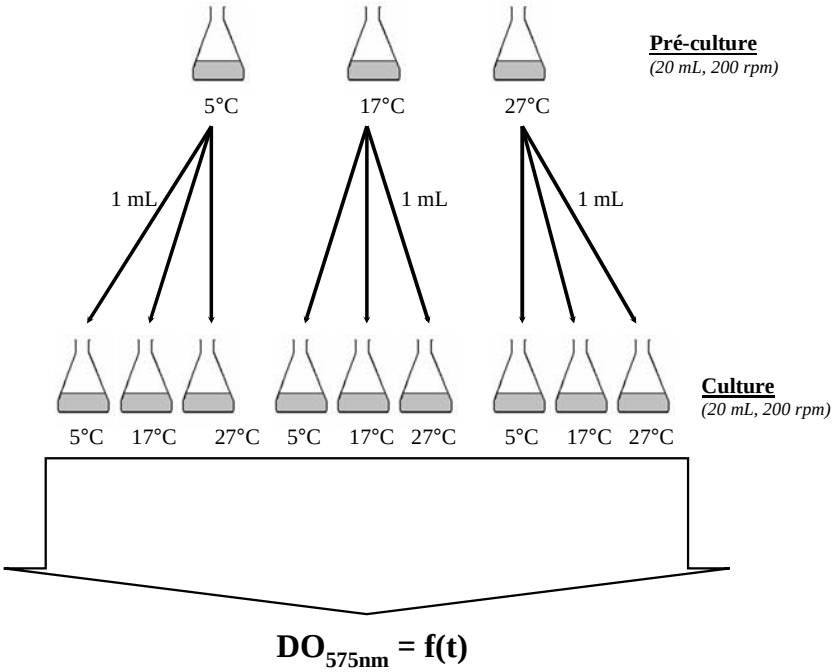


Figure Annexe-80 : Méthode employée pour appréhender l'effet de la température de préculture sur la croissance à 5°C, 17°C et 27°C.

10) EVOLUTION DE PROTOCOLE AU COURS DE LA THESE

Le tableau Annexe-27 récapitule les modifications des protocoles effectuées durant la thèse.

Analyses chimiques		
Paramètres mesurés dans l'eau de nuage	Depuis janvier 2004	Mesure de la conductivité et du potentiel rédox
	Depuis septembre 2004	Contenu par chromatographie ionique (anions et cations)
Analyses microbiologiques		
Echantillons de nuage		
Gestion globale de l'échantillon	Avant décembre 2004	Regroupement des différents prélèvements d'un même évènement et conservation à 4°C. Toutes les manipulations sont faites en laboratoire
	Entre décembre 2004 et mai 2005	Dénombrement des cellules totales (DAPI) sur chacun des prélèvements d'un même évènement; Mises en cultures réalisées au laboratoire sur le dernier prélèvement échantillonné (le plus récent)
	Depuis mai 2005	Analyse de chacun des prélèvements d'un même évènement, avec mises en culture et conditionnements des échantillons pour les différentes analyses sur le site de prélèvement
Cultures		
Milieux	Avant décembre 2003	Milieux TSA et Sabouraud
	Entre décembre 2003 et janvier 2004	Milieux TSA, TSA/10 et Cœur-Cervelle ou Emerson
	Depuis juin 2004	Milieux TSA, R2A et Sabouraud
Températures	Avant janvier 2004	Incubation uniquement à 27°C
	Depuis janvier 2004	2 températures d'incubation (15°C et 27°C)
Dénombrement des cellules totales (DAPI)	Avant janvier 2004	Bactéries uniquement
	Depuis janvier 2004	Bactéries et champignons/levures
Dosage de l'ATP	Depuis novembre 2004	-
Tests de biodégradation		
Composés testés	Avant septembre 2004	Formiate, Acétate, Lactate et mélange formaldéhyde/méthanol
	Depuis septembre 2004	Formiate, Acétate, Lactate, mélange formaldéhyde/méthanol et Succinate
	Fin du stage DEA de Florence Demeer (janvier-juin 2005)	Dégradation de méthanol seul et de formaldéhyde ^{13}C par des souches sélectionnées parmi celles testées sur les autres composés
	Stage DEA de Stéphane Fontanella (janvier-juin 2006)	Cinétique précise de dégradation du formiate, du méthanol seul, du mélange formaldéhyde/méthanol et de formaldéhyde ^{13}C sur des souches sélectionnées parmi celles testées sur les autres composés
Quantification des cellules	Avant septembre 2004	Aucune
	Depuis septembre 2004	Normalisation du volume à centrifuger à partir de la densité optique de la culture utilisée, de sorte que la DO_{575nm} soit de 10 dans le milieu d'incubation
	Depuis septembre 2005	Etalements pour dénombrement des CFUs
	Depuis novembre 2005	Dosage des protéines

Tableau Annexe-27 : Modifications apportées aux protocoles au cours de la thèse.

Annexe II -Données brutes-

1) ECHANTILLONS DE NUAGES

Evènement	Date	Heures UTC	Origine (° par rapport au nord)	PHYSICO-CHIMIE																CELLULES TOTALES				CULTURES				% CULTIVABLES				[ATP] (pmol /mL)	
																				Bactéries (N mL^{-1})		Champignons & levures (N mL^{-1})		Bactéries (N mL^{-1})		Champignons & levures (N mL-1)		27°C		15°C			
																								27°C	15°C	27°C	15°C						
				T° (°C)	V- vent (m/s)	LWC (g/m^3)	pH	Conductivité (µS/cm)	Potentiel Rédox (mV)	[TOC] (mg/L)	Somme des ions (µM)	Na^+ (µM)	NH_4^+ (µM)	Cl^- (µM)	SO_4^{2-} (µM)	NO_3^- (µM)	Formiate (µM)	Acétate (µM)	Succinate (µM)	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne	Bactéries	Champigons &levures	Bactéries	Champigons & levure	Moyenne	Ecart-type
1	4 mars 03	-		4,9			4,9			0,83										8,33E+04				32		1300		0,04%					
2	6 mars 03	-		-2,0			5,8													3,55E+05				1975		264		0,56%					
3	11 & 12 -dec-03	17:30-05:00	90	1,3			5,6			0,70										7,90E+05				240		30		0,03%					
4	9 janv 04	14:30-16:00	70	1,0			6,4			0,91										6,05E+05													
5	14 & 15 janv 04	17:00-06:00	70	-4,8			6,3			1,58										2,44E+05	2,69E+04	1,41E+04	3,90E+03	110	20	770	557	0,05%	5,48%	0,01%	3,96%		
6	20 & 21 janv 04	13:30-18:30 & 21:30-05:30	20	0,0			5,8	4,7	234,0	1,92										2,04E+05	4,97E+03	8,94E+02		10	10	20		0,00%	2,24%	0,00%	0,00%		
7	16 févr 04	10:00-14:30	310	-4,2	1,7		3,2	325	357,0	18,37										1,66E+04	-	8,34E+03		90	140	110	10	0,54%	1,32%	0,84%	0,12%		
12	24 juin 04	23:45-02:45	90	7,4	11,0		5,7	42,7	252,5	4,29										5,87E+04	1,52E+04	2,47E+04	1,00E+02	31	84	*3000*	1306	0,05%	*12,15%*	0,14%	5,29%		
13	7 juin 04	23:00-01:00	120	4,7	16,8	0,365	5,5	33	134,0	3,57										4,98E+04	3,25E+03	7,54E+03	2,81E+02	513	373	1303	590	1,03%	17,28%	0,75%	7,82%		
14	23 & 24 sept 04	19:00-02:45	0	9,7	5,2		7,0	9,6	204,8	1,85	127,86	9,41	45,11	15,68	12,01	3,76	3,29	2,58	0,08	1,40E+05	1,74E+04	3,61E+03	1,47E+03	313	190	947	413	0,22%	26,22%	0,14%	11,45%		
15	17 nov 04	09:15-15:15	45	1,0	1,2		5,8	22,8	311,0	3,03	284,26	53,52	53,03	32,52	16,35	48,09	10,81	2,65	0,16	1,58E+05	1,52E+04	4,84E+03	6,35E+02	20	13	1297	1163	0,01%	26,80%	0,01%	24,03%	0,361	0,021
16	16 & 17 déc-04	15:30-22:00 & 08:30-11:00	90	-0,5	10,3		5,9	27,2	301,0	3,25	427,28	69,98	62,70	46,33	31,31	39,21	1,44	1,09	0,13	6,84E+04	3,96E+03	3,52E+03	9,12E+02	343	290	533	313	0,50%	15,15%	0,42%	8,90%	0,271	0,073
17	19-janv-05	11:15-18:15	40	-3,2	0,4		6,8	58,8	213,8	2,78	858,61	314,57	49,84	242,33	25,07	24,88	4,78	3,60	0,25	7,61E+04	2,71E+03	1,33E+03	6,14E+02	163	50	480	480	0,21%	36,09%	0,07%	36,09%	0,346	0,163
18	18-avr-05	07:30-13:00	100	3,0	6,3	0,247	5,0	13	273,0	2,50	149,18	14,88	31,62	12,72	17,25	9,93	7,21	9,36	0,19	7,68E+04	1,87E+03	2,99E+03	1,81E+02	0	3	97	70	0,00%	3,23%	0,00%	2,34%	0,038	0,002
19-1	22 & 23 mai 05	17:30-18:50	110	4,3	7,3	0,281	5,7	15,3	170,0	1,50	191,78	28,67	48,85	11,56	20,57	14,97	5,38	6,61	0,18	8,46E+04	5,55E+02	7,08E+03	1,88E+03									0,780	0,087
19-2		19:30-21:30	110	3,7	3,9	0,286	5,7	21,5	170,0	1,40	294,23	60,80	56,56	29,76	29,85	22,69	8,55	4,83	0,38	1,01E+05	5,92E+03	5,94E+03	7,47E+02	270	123	1187	680	0,27%	19,97%	0,12%	11,44%	0,597	0,167
19-3		21:45-23:30	100	3,5	6,0	0,265	5,0	25,5	332,0	2,00	405,32	87,32	77,83	49,07	50,00	31,89	11,30	5,13	0,62	1,05E+05	8,79E+03	6,83E+03	5,54E+02	230		950			13,91%	0,00%	0,00%	1,006	0,225
19-4		23:45-01:15	100	3,1	8,1	0,281	5,3	17,3	345,0	1,30	304,01	67,55	62,00	39,62	37,39	18,88	7,74	3,82	0,33	9,79E+04		6,85E+03		350	220	1230	1160	0,36%	17,97%	0,22%	16,95%	0,816	0,299
19-5		01:45-03:30	100	2,5	9,3	0,328	5,3	17,5	345,0	1,60	368,16	101,97	57,50	60,88	35,28	19,47	10,15	10,37	0,31	8,29E+04	3,70E+02	7,12E+03	4,82E+02	340	200	1670	1000	0,41%	23,46%	0,24%	14,05%	0,966	0,240
19-6		04:00-05:15	90	2,3	8,2	0,339	4,9	19,5	369,0	1,60	363,71	112,04	48,80	67,55	38,62	17,77	5,52	1,83	0,24	7,02E+04	5,55E+03	5,65E+03	5,30E+02	130	50	1610	1080	0,19%	28,48%	0,07%	19,10%	0,951	0,305
Moyenne évènement 19				**3,2**	**7,1**	**0,297**	**5,3**	**19,4**	**288,5**	**1,57**	**321,20**	**76,39**	**58,59**	**43,07**	**35,28**	**20,95**	**8,11**	**5,43**	**0,35**	**9,02E+04**	**4,24E+03**	**6,58E+03**	**8,38E+02**	**264**	**148**	**1329**	**980**	**0,31%**	**20,76%**	**0,13%**	**12,31%**	**0,852**	**0,221**
20-1	06 & 07 juin 05	19:30-21:30	70	8,2	2,1	0,293	5,7	23,0	312,0		230,46	21,13	75,54	9,50	25,20	32,34	9,33	7,37	0,81	9,99E+04	2,32E+04	1,55E+03	0,00E+00	103	73	373	577	0,10%	24,09%	0,07%	37,22%	0,285	0,010
20-2		21:45-23:45	60	7,8	2,2	0,34	5,7	16,0	322,0		249,74	21,55	78,77	10,07	25,81	36,80	12,62	8,13	0,91	8,26E+04	1,31E+04	1,55E+03	6,52E+02	117	140	513	820	0,14%	33,13%	0,17%	52,92%	0,349	0,014
20-3		00:00-02:00	50	7,1	2,1	0,35	5,8	10,0	336,0		176,89	21,55	43,80	12,53	12,34	31,29	6,18	3,54	0,51	7,60E+04	2,02E+04	2,07E+03	5,57E+02	37	200	450	677	0,05%	21,74%	0,26%	32,68%	0,333	0,014
20-4		02:15-04:15	30	7,1	1,5	0,418	5,0	8,0	362,0		52,44	1,24	15,85	0,51	7,86	11,35	1,79	0,98	0,18					113	143	567	613					0,534	0,134
20-5		04:30-06:30	350	6,8	1,8	0,487	4,7	10,0	379,0		105,02	8,17	25,65	1,09	7,27	28,55	5,32	9,76	0,25					37	177	510	880					0,682	0,035
Moyenne évènement 20				**7,4**	**1,9**	**0,3776**	**5,4**	**13,4**	**342,2**	-	**162,91**	**14,73**	**47,92**	**6,74**	**15,70**	**28,07**	**7,05**	**5,96**	**0,53**	**8,62E+04**	**1,89E+04**	**1,72E+03**	**4,03E+02**	**81**	**147**	**483**	**713**	**0,10%**	**26,32%**	**0,17%**	**40,94%**	**0,437**	**0,042**
21-1	28 & 29 Sept 05	21:15-23:20	60	5,3	7,0		5,9	66,0	240,0		799,43	214,94	125,76	113,61	37,57	102,30	28,71	20,94	1,21	1,04E+05	1,40E+04	1,89E+04	2,01E+03	137	250	930	910	0,13%	4,91%	0,24%	4,80%	0,962	0,009
21-2		00:00-02:00	70	4,3	4,0		6,1	134,0	250,0	10,30	1815,99	678,56	189,96	368,35	72,18	231,76	42,38	24,84	2,24	1,72E+05	4,17E+02	3,20E+04	9,70E+03	340	117	1273	1997	0,20%	3,98%	0,07%	6,24%	2,463	0,017
21-3		02:15-04:00	80	4,6	6,9		5,9	62,0	255,0	6,70	1126,85	391,62	131,74	217,46	43,28	120,21	22,34	18,08	1,15	8,97E+04	1,62E+04	7,75E+03	5,19E+03	547	237	1417	1207	0,61%	18,29%	0,26%	15,57%	1,875	0,163
21-4		04:15-06:00	85	3,6	13,2		5,8	38,0	260,0	2,50	1006,38	430,80	70,02	258,48	33,21	55,25	11,58	4,88	0,52	1,00E+05	2,28E+04	2,00E+04	7,89E+02	430	410	2397	2570	0,43%	11,98%	0,41%	12,85%	2,727	0,006
Moyenne évènement 21				**4,5**	**7,8**	-	**5,9**	**75,0**	**251,3**	**6,50**	**1187,16**	**428,98**	**129,37**	**239,48**	**46,56**	**127,38**	**26,25**	**17,18**	**1,28**	**1,16E+05**	**1,33E+04**	**1,97E+04**	**4,42E+03**	**363**	**253**	**1504**	**1671**	**0,34%**	**9,79%**	**0,25%**	**9,87%**	**2,007**	**0,049**
22-1	03 & 04 Oct 05	16:00-18-00	320	2,4	2,7		4,3	50,0	347,0	4,90	556,31	49,89	138,62	30,36	64,81	144,99	8,88	6,71	0,82	5,42E+04	8,35E+03	8,34E+03	3,50E+02	43	45	770	822	0,08%	9,23%	0,08%	9,85%	0,800	0,013
22-2		18:15-20:00	320	2,5	2,9		4,4	36,0	351,0	3,00	434,49	43,44	107,06	24,80	41,46	107,58	10,44	4,96	0,66	3,22E+04	4,85E+03	5,73E+03	3,97E+02	92	92	762	702	0,28%	13,30%	0,28%	12,25%	0,867	0,002
22-3		20:15-22:15	320	2,6	3,1		4,6	28,0	350,0	2,20	292,34	21,01	88,81	13,03	31,28	72,66	7,37	4,44	0,35	6,08E+04	6,67E+03	4,93E+03	1,09E+03	77	65	640	763	0,13%	12,99%	0,11%	15,49%	0,791	0,008
22-4		22:30-00:00	320	3,1	2,6		4,5	27,0	354,0	2,10	314,98	21,01	96,03	10,91	35,03	82,99	6,81	4,25	0,37	2,38E+04	1,54E+03	4,39E+03	1,79E+02	33	30	558	650	0,14%	12,73%	0,13%	14,81%	0,767	0,039
22-5		00:15-02:30	320	2,8	2,8		4,3	33,0	370,0	2,20	282,60	12,69	77,19	7,78	34,12	81,94	5,99	2,89	0,31	2,99E+04	3,10E+03	3,40E+03	4,43E+02	37	50	473	607	0,12%	13,92%	0,17%	17,84%	0,653	0,002
22-6		02:45-05:15	320	2,8	2,3		4,3	28,0	373,0	2,10	385,19	5,64	241,25	4,76	27,23	54,39	3,92	3,46	0,14	2,59E+04	3,06E+03	2,00E+03	3,09E+02	87	33	253	370	0,33%	12,68%	0,13%	18,52%	0,623	0,013
Moyenne évènement 22				**2,7**	**2,7**	-	**4,4**	**33,7**	**357,5**	**2,75**	**377,65**	**25,61**	**124,83**	**15,27**	**38,99**	**90,76**	**7,23**	**4,45**	**0,44**	**3,78E+04**	**4,60E+03**	**4,80E+03**	**4,61E+02**	**61**	**53**	**576**	**652**	**0,18%**	**12,48%**	**0,15%**	**14,80%**	**0,750**	**0,013**
Ensemble des évènements		**Moyenne**		**2,0**	**6,0**	**0,322**	**5,6**	**52,2**	**270,8**	**3,52**	**432,90**	**112,01**	**67,00**	**72,68**	**26,50**	**43,67**	**8,46**	**5,81**	**0,38**	**1,81E+05**	**1,02E+04**	**7,47E+03**	**1,18E+03**	**271**	**127**	**826**	**686**	**0,25%**	**15,38%**	**0,22%**	**12,71%**	**0,633**	**0,073**
		Ecart-type		4,1	4,9	0,061	0,9	84,4	65,4	4,22	359,56	152,01	35,19	96,35	12,12	40,48	7,22	4,89	0,37	2,08E+05	8,02E+03	7,18E+03	1,44E+03	464	116	757	482	0,28%	10,73%	0,27%	12,66%	0,613	0,078
		Mediane		**2,0**	**5,8**	**0,331**	**5,7**	**27,2**	**273,0**	**2,63**	**321,20**	**53,52**	**53,03**	**32,52**	**25,07**	**28,07**	**7,21**	**4,45**	**0,25**	**8,82E+04**	**4,97E+03**	**4,82E+03**	**6,25E+02**	**110**	**112**	**576**	**590**	**0,18%**	**13,81%**	**0,14%**	**9,38%**	**0,399**	**0,045**
		25-percentile		-0,4	1,9	0,284	5,3	13,4	234,0	1,58	162,91	14,88	47,92	15,27	16,35	20,95	4,78	2,65	0,16	7,03E+04	3,96E+03	3,12E+03	3,72E+02	32	28	264	413	0,04%	6,56%	0,02%	4,29%	0,327	0,019
		75-percentile		4,6	8,4	0,368	5,9	42,7	311,0	3,33	427,28	76,39	62,70	46,33	35,28	48,09	8,11	5,96	0,44	1,93E+05	1,52E+04	8,14E+03	1,05E+03	313	180	1300	980	0,34%	24,86%	0,23%	14,17%	0,776	0,095
		Minimum		*-4,8*	*0,4*	*0,247*	*3,2*	*4,7*	*134,0*	*0,70*	*127,86*	*9,41*	*31,62*	*6,74*	*12,01*	*3,76*	*1,44*	*1,09*	*0,08*	*1,66E+04*	*1,87E+03*	*8,94E+02*	*1,00E+02*	*0*	*3*	*20*	*10*	*0,00%*	*1,32%*	*0,00%*	*0,00%*	*0,038*	*0,002*
		Maximum		*9,7*	*16,8*	*0,378*	*7,0*	*325,0*	*357,5*	*18,37*	*1187,16*	*428,98*	*129,37*	*242,33*	*46,56*	*127,38*	*26,25*	*17,18*	*1,28*	*7,90E+05*	*2,69E+04*	*2,47E+04*	*4,42E+03*	*1975*	*373*	*3000*	*1671*	*1,03%*	*36,09%*	*0,84%*	*40,94%*	*2,007*	*0,221*

Tableau Annexe-28 : Données microbiologiques et physico-chimiques des échantillons de nuage.

2) SOUCHES ISOLEES : BACTERIES

N° souche	Identification (nom de dépôt)	N° GenBank
1b-1	*Streptomyces* sp.	-
1b-2	*Streptomyces* sp.	-
2b-1	*Cytophaga* sp.	-
2b-2	*Micrococcus* sp.	-
2b-4	*Flavobacterium* sp.	-
2b-5	*Bacillus* sp.	-
2b-9	*Bacillus* sp.	-
2b-10	= 2b-9	-
2b-11	*Streptomyces* sp.	
2b-12	*Microbacterium phyllosphaerae*	-
2b-13	*Kocuria* sp.	-
2b-14	*Clavibacter michiganensis*	-
2b-15	*Pseudomonas* sp.	-
2b-16	*Arthrobacter* sp.	-
2b-18	*Janthinobacterium sp.*	-
2b-20	*Beta Proteobactérie*	-
2b-22	*Actinobactérie*	-
3b-1	*Pseudomonas syringae* strain PDD-3b-1	DQ512737
3b-2	*Micrococcus luteus* strain PDD-3b-2	DQ512738
3b-3	Non identifiée	-
3b-4	Intrasporangiaceae bacterium PDD-3b-4	DQ512739
3b-5	*Agromyces* sp. PDD-3b-5	DQ512740
3b-6	*Bacillus* sp. PDD-3b-6	DQ512741
3b-7	*Arthrobacter rhombi* strain PDD-3b-7	DQ512742
3b-8	*Cellulomonas* sp. PDD-3b-8	DQ512743
3b-9	Non identifiée	-
3b-10	*Sphingomonas* sp. PDD-3b-10	DQ512744
3b-11	*Sphingomonas* sp. PDD-3b-11	DQ512745
3b-12	*Zoogloea* sp. PDD-3b-12	DQ512746
3b-13	Non identifiée	-
3b-14	Non identifiée (122 pb)	-
3b-15	*Staphylococcus epidermidis* strain PDD-3b-15	DQ512752
3b-16	*Staphylococcus* sp. PDD-3b-16	DQ512753
3b-17	= 3b-16	-
3b-18	*Tetrasphaera* sp. PDD-3b-18	DQ512754
3b-19	*Massilia* sp. PDD-3b-19	DQ512747
3b-20	*Leucobacter* sp. PDD-3b-20	DQ512748
5b-1	*Bacillus pumilus* strain PDD-5b-1	DQ512749
5b-2	*Bacillus* sp. (164 pb)	-
5b-3	*Staphylococcus* sp. PDD-5b-3	DQ512750
5b-4	*Streptomyces* sp. PDD-5b-4	DQ512755
5b-5	Non identifiée	-
5b-6	*Staphylococcus* sp. PDD-5b-6	DQ512751
5b-7	Propionibacterineae bacterium PDD-5b-7	DQ512756
5b-8	*Staphylococcus* sp. PDD-5b-8	DQ512757
5b-9	Non identifiée	-
5b-10a	Non identifiée	-
5b-10b	Non identifiée	-
5b-11	*Arthrobacter* sp. PDD-5b-11	DQ512758
5b-14	*Moraxella osloensis* strain PDD-5b-14	DQ512759
5b-15	*Arthrobacter* sp. PDD-5b-15	DQ512760
5b-16	*Staphylococcus equorum* strain PDD-5b-16	DQ512761
5b-17	*Psychrobacter* sp. PDD-5b-17	DQ512762
6b-1	*Staphylococcus* sp. PDD-6b-1	DQ512763
6b-2	*Pedobacter* sp. PDD-6b-2	DQ512764
6b-3	*Saccharothrix* sp. PDD-6b-3	DQ512765
6b-4	*Pseudomonas* sp. PDD-6b-4	DQ512766
7b-1	*Streptomyces* sp. PDD-7b-1	DQ512767
7b-2	*Agrococcus* sp. PDD-7b-2	DQ512768
7b-4	*Micrococcus* sp. PDD-7b-4	DQ512769
7b-5	*Methylobacterium* sp. PDD-7b-5	DQ512770
7b-6	*Paenibacillus* sp. PDD-7b-6	DQ512771
7b-7	*Nocardioides* sp. PDD-7b-7	DQ512772
7b-8	Non identifiée	-
7b-9	*Arthrobacter* sp. PDD-7b-9	DQ512773
7b-11	*Bacillus* sp. PDD-7b-11	DQ512774
7b-12	*Kocuria* sp. PDD-7b-12	DQ512775
7b-13	*Sphingomonas* sp. PDD-7b-13	DQ512776
7b-14	Alpha proteobacterium PDD-7b-14	DQ512777
7b-15	*Sphingomonas* sp. PDD-7b-15	DQ512778
12b-4	Actinobacterium PDD-12b-4	DQ512779
12b-5	*Pantoea* sp. PDD-12b-5	DQ512780
12b-6	*Micrococcus* sp. PDD-12b-6	DQ512781
12b-7	Bacillales bacterium PDD-12b-7	DQ512782
12b-8	*Pseudomonas syringae* strain PDD-12b-8	DQ512783
12b-10	*Streptomyces* sp. PDD-12b-10	DQ512784
13b-2	*Pseudomonas syringae* strain PDD-13b-2	DQ512785
13b-3	*Pseudomonas graminis* strain PDD-13b-3	DQ512786
13b-4	*Curtobacterium flaccumfaciens* strain PDD-13b-4	DQ512787
14b-2	*Pseudomonas* sp. PDD-14b-2	DQ512788
14b-5	*Sphingomonas* sp. PDD-14b-5	DQ512789
14b-6	*Sphingomonas* sp. PDD-14b-6	DQ512790
14b-7	*Flavobacterium* sp. PDD-14b-7	DQ512791
14b-8	*Sphingobacterium* sp. PDD-14b-8	DQ512792
14b-9	*Streptomyces* sp. PDD-14b-9	DQ512793
14b-10	*Pseudomonas* sp. PDD-14b-10	DQ512794
14b-12	*Streptomyces* sp. PDD-14b-12	DQ512795
14b-13	*Frigoribacterium* sp. PDD-14b-13	DQ512796
14b-14	*Pseudomonas viridiflava* strain PDD-14b-14	DQ512797

Tableau Annexe-29 : Souches bactériennes isolées des échantillons d'eau de nuage, et numéros d'accession des séquences correspondantes, déposées dans la banque génomique GenBank (accès depuis http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, chercher « **Nucleotide** », et le mot clé « **PDD** » permet d'accéder à l'ensemble des séquences). Certaines souches restent non identifiées, soit à cause d'un séquençage insuffisant, soit pour des raisons de problèmes d'amplification par PCR. (7b-3 : champignon, remplacé par 7c-3 ; 7b-10 : n'existe pas).

3) SOUCHES ISOLEES : CHAMPIGNONS & LEVURES

N° souche	Identification (donnée par CBS)
1c-3	*Eurotium amstelodani*
1c-4	*Stereum* cf. *rugosum*
1c-5	Champignon non identifié
1c-6	*Stereum* cf. *sanguinalentum*
1c-7	Champignon non identifié
1c-8	*Aspergillus fumigatus*
1c-9	*Perenniporia* sp.
2c-2	Champignon non identifié
2c-6	*Aspergillus fumigatus*
2c-7	*Emericella nidulans*
2c-8	*Agaricalis sp.*
2c-17	*Beauveria bassiana*
3c-1	Champignon non identifié
3c-2	Champignon non identifié
3c-3	Champignon non identifié
3c-4	*Deschampsia flexuosa* (92% ITS) (Poacée)
3c-5	Champignon non identifié
3c-6	*Ganoderma* sp.
3c-7	Agaricale haploïde
3c-8	Agaricale haploïde
5c-1	Agaricale haploïde
5c-2	*Cladosporium herbarum*
5c-3	Champignon non identifié
5c-4	*Coniophora* sp.
5c-5	*Cladosporium* sp.
5b-12	Levure non identifiée
5b-13	Levure non identifiée
5b-18	Levure non identifiée
6c-1	Polypore haploïde (*Trametes* sp.)
6c-2	Polypore haploïde (*Trametes* sp.)
6c-3	*Trametes* sp.
6c-4	*Trametes* sp.
7c-1	*Trichoderma citrinoviride*
7c-2	Champignon non identifié
7c-3	*Aspergillus fumigatus*
7c-4	Champignon non identifié
7c-5	*Polyporus tuberaster*
7c-6	Champignon non identifié
7b-3	*Eurotium rubrum*
12c-1	Levure non identifiée
12c-2	*Cladosporium herbarum*
12c-3	Agaricale
12c-4	Agaricale
12c-5	Champignon non identifié
12c-6	*Acremonium* sp.
12c-7	*Verticillium nigrescens*
12c-8	*Schizophyllum* sp.
12c-9	*Phanerochaeta* sp.
12c-10	*Podospora* sp.
12c-11	*Botrytis cinerea*
12c-12	*Plectosphaerella cucumerina*
12b-1	Levure non identifiée (rose)
12b-2	Levure non identifiée
12b-3	Levure non identifiée
12b-9	Levure non identifiée
12b-11	Levure non identifiée
12b-12	Levure non identifiée
13b-1	Levure non identifiée (rose)
14c-1	*Cladosporium tenuissimum*
14c-2	Champignon non identifié
14c-4	*Fusarium avenaceum*
14c-5	*Penicillium thomii*
14c-6	Champignon non identifié
14b-1	Levure non identifiée (rose)
14b-3a	*Cryptococcus albidus*
14b-3b	*Cryptococcus laurentii*
14b-4	Levure non identifiée
14b-11	*Pseudozyma* sp.

Tableau Annexe-30 : Souches fongiques (champignons et levures) isolées des échantillons d'eau de nuage et identifications données par CBS. (14c-3 n'existe pas).

4) TESTS DE CROISSANCE A DIFFERENTES TEMPERATURES

Souche	Température de préculture	4°C DOmax-DOmin	4°C Tps (h)	Indice 4°C (DO/h)	17°C Domax-min	17°C Tps (h)	Indice 17°C (DO/h)	27°C Domax-min	27°C Tps (h)	Indice 27°C (DO/h)	$I_{4°C} / I_{17°C}$	$I_{4°C} / I_{27°C}$	$I_{17°C} / I_{27°C}$
2b-14	4°C	4,64	120	**0,039**	8,74	52	**0,168**	5,13	35	**0,147**	*0,23*	*0,26*	***1,15***
	17°C	6,5	100	**0,065**	8,86	35	**0,253**	7,91	35	**0,226**	*0,26*	*0,29*	***1,12***
	27°C	5,81	120	**0,048**	7,12	35	**0,203**	6,42	35	**0,183**	*0,24*	*0,26*	***1,11***
3b-6	4°C	0,02	136	**0,000**	11,34	44	**0,258**	13,75	15	**0,917**	*0,00*	*0,00*	*0,28*
	17°C	0,03	15	**0,002**	10,74	44	**0,244**	11,23	15	**0,749**	*0,01*	*0,00*	*0,33*
	27°C	0,01	15	**0,001**	10,95	44	**0,249**	10,94	15	**0,729**	*0,00*	*0,00*	*0,34*
3b-13	4°C	6,46	120	**0,054**	11,76	35	**0,336**	4,75	35	**0,136**	*0,16*	*0,40*	***2,48***
	17°C	6,19	100	**0,062**	13,03	35	**0,372**	3,57	35	**0,102**	*0,17*	*0,61*	***3,65***
	27°C	4,71	100	**0,047**	6,2	35	**0,177**	3,36	35	**0,096**	*0,27*	*0,49*	***1,85***
5b-1	27°C				0,1	72	**0,001**	0,14	48	**0,003**			*0,48*
5b-2	27°C				0,15	49	**0,003**	0,26	44	**0,006**			*0,52*
5b-3	27°C				18,84	72	**0,262**	17,42	72	**0,242**			***1,08***
5b-5	27°C				8,66	48	**0,180**	8,94	48	**0,186**			*0,97*
5b-6	27°C				17,1	24	**0,713**	14,13	24	**0,589**			***1,21***
5b-8	17°C	0,15	141	**0,001**	20,43	141	**0,145**				*0,01*		
	27°C				19,34	31	**0,624**	13,1	52	**0,252**			***2,48***
5b-11	27°C				19,3	31	**0,623**	27,43	31	**0,885**			*0,70*
5b-16	4°C	10,32	120	**0,086**	22,62	103	**0,220**				*0,39*		
	17°C	14,41	120	**0,120**	23,71	79	**0,300**				*0,40*		
	27°C				15,92	31	**0,514**	17,07	31	**0,551**			*0,93*
6b-1	27°C				11,36	47	**0,242**	17,96	24	**0,748**	*0,00*		*0,32*
6b-4	4°C	1,61	93	**0,017**	1,55	28	**0,055**	1,07	28	**0,038**	*0,31*	*0,45*	***1,45***
	17°C	1,72	69	**0,025**	1,45	28	**0,052**	0,83	28	**0,030**	*0,48*	*0,84*	***1,75***
	27°C	1,57	69	**0,023**	1,46	28	**0,052**	0,92	28	**0,033**	*0,44*	*0,69*	***1,59***
	27°C				10,57	47	**0,225**	8,95	24	**0,373**			*0,60*
7b-2	4°C	0,04	24	**0,002**	0,15	98	**0,002**	0,81	98	**0,008**	***1,09***	*0,20*	*0,19*
	17°C	0,11	42	**0,003**	2,69	113	**0,024**				*0,11*		
	17°C	0,03	24	**0,001**	0,07	24	**0,003**	1,21	123	**0,010**	*0,43*	*0,13*	*0,30*
	27°C				1,32	95	**0,014**	0,87	95	**0,009**			***1,52***
	27°C				5,58	72	**0,078**	1,9	48	**0,040**			***1,96***
	27°C	0,12	24	**0,005**	0,07	24	**0,003**	0,21	132	**0,002**	***1,71***	***3,14***	***1,83***
7b-6	4°C	4,38	125	**0,035**	4,39	25	**0,176**				*0,20*		
	17°C	2,32	165	**0,014**	3,29	48	**0,069**				*0,21*		
	17°C				2,85	76	**0,038**	2,64	28	**0,094**			*0,40*
7b-7	27°C				0,35	95	**0,004**	0,99	95	**0,010**			*0,35*
7b-9	17°C				1,16	76	**0,015**	2,37	23	**0,103**			*0,15*
7b-11	27°C				1,452	50	**0,029**	1,407	65	**0,022**			***1,34***
7b-13	4°C	1,08	123	**0,009**	7,79	95	**0,082**	3,18	24	**0,133**	*0,11*	*0,07*	*0,62*
	17°C	2,85	123	**0,023**	8,05	49	**0,164**	5,2	24	**0,217**	*0,14*	*0,11*	*0,76*
	17°C				1,21	76	**0,016**	1,47	23	**0,064**			*0,25*
	27°C	3,47	123	**0,028**	9,22	95	**0,097**	5,2	24	**0,217**	*0,29*	*0,13*	*0,45*
7b-14	4°C	1,12	111	**0,010**	3,28	88	**0,037**	5,35	88	**0,061**	*0,27*	*0,17*	*0,61*
	17°C	0,96	111	**0,009**	6,76	136	**0,050**	4,56	88	**0,052**	*0,17*	*0,17*	*0,96*
	27°C	0,69	111	**0,006**	4,21	88	**0,048**	4,41	88	**0,050**	*0,13*	*0,12*	*0,95*
	27°C				0,47	46	**0,010**	0,59	46	**0,013**	*0,00*		*0,80*
7b-15	4°C	4,89	123	**0,040**	11,22	49	**0,229**	13,41	24	**0,559**	*0,17*	*0,07*	*0,41*
	17°C	8,78	123	**0,071**	11,51	24	**0,480**	13,31	24	**0,555**	*0,15*	*0,13*	*0,86*
	27°C	7,73	123	**0,063**	12,88	49	**0,263**	12,82	24	**0,534**	*0,24*	*0,12*	*0,49*
12b-4	27°C				5,58	24	**0,233**	14,99	24	**0,625**			*0,37*
12b-5	17°C				8,17	20	**0,409**	7	20	**0,350**			***1,17***
12b-6	27°C				2,8	25	**0,112**	14,9	25	**0,596**	*0,00*		*0,19*
12b-7	4°C	0	179	**0,000**	1,08	95	**0,011**	1,3	24	**0,054**	*0,00*	*0,00*	*0,21*
	17°C	0	179	**0,000**	0,71	49	**0,014**	1,07	24	**0,045**	*0,00*	*0,00*	*0,33*
	17°C				0,6	47	**0,013**	18,31	24	**0,763**			*0,02*
	27°C	0	179	**0,000**	0,67	49	**0,014**	1,22	24	**0,051**	*0,00*	*0,00*	*0,27*
12b-8	4°C	1,42	79	**0,018**	1,35	24	**0,056**				*0,32*		
	17°C	1,15	79	**0,015**	0,97	24	**0,040**				*0,36*		
	27°C				9,92	25	**0,397**	10	20	**0,500**			*0,79*
13b-3	4°C	1,45	82	**0,018**	1,37	32	**0,043**	1,03	7	**0,147**	*0,41*	*0,12*	*0,29*
	17°C	1,35	53	**0,025**	1,27	32	**0,040**	1,67	7	**0,239**	*0,64*	*0,11*	*0,17*
	27°C	1,57	82	**0,019**	1,37	32	**0,043**	1,18	7	**0,169**	*0,45*	*0,11*	*0,25*
13b-4	4°C	1,14	143	**0,008**	1,7	45	**0,038**	2,36	22	**0,107**	*0,21*	*0,07*	*0,35*
	17°C	1,54	143	**0,011**	1,69	45	**0,038**	1,63	22	**0,074**	*0,29*	*0,15*	*0,51*
	27°C	0,19	143	**0,001**	1,64	70	**0,023**	1,32	22	**0,060**	*0,06*	*0,02*	*0,39*
14b-1 levure	4°C	1,9	96	**0,020**	2,02	125	**0,016**				***1,22***		
	17°C	1,62	165	**0,010**	1,76	77	**0,023**				*0,43*		
	17°C				1,51	28	**0,054**	0,78	23	**0,034**			***1,59***
	17°C				1,95	44	**0,044**	0,86	44	**0,020**			***2,27***
	27°C				2,01	69	**0,029**						
14b-2	4°C	1,55	99	**0,016**	1,44	22	**0,065**	1,51	22	**0,069**	*0,24*	*0,23*	*0,95*
	17°C	1,54	45	**0,034**	1,42	22	**0,065**	1,19	22	**0,054**	*0,53*	*0,63*	***1,19***
	27°C	1,57	70	**0,022**	1,47	22	**0,067**	1,35	22	**0,061**	*0,34*	*0,37*	***1,09***
	27°C				12,76	23	**0,555**	22,56	23	**0,981**			*0,57*
14b-3a levure	4°C	0,78	120	**0,007**	1,36	46	**0,030**	0,43	48	**0,009**	*0,22*	*0,73*	***3,30***
	17°C	1,44	113	**0,013**	1,06	21	**0,050**				*0,25*		
	17°C				1,08	76	**0,014**	0,84	23	**0,037**			*0,39*
	17°C	1,33	120	**0,011**	1,08	46	**0,023**	0,62	15	**0,041**	*0,47*	*0,27*	*0,57*
	27°C	0,94	120	**0,008**	0,86	46	**0,019**	0,45	15	**0,030**	*0,42*	*0,26*	*0,62*
14b-6	4°C	1,26	165	**0,008**	1,09	77	**0,014**				*0,54*		
	4°C	0,65	120	**0,005**	1,47	46	**0,032**	0,76	120	**0,006**	*0,17*	*0,86*	***5,05***
	17°C	1,4	165	**0,008**	1,34	77	**0,017**				*0,49*		
	17°C	1	120	**0,008**	1,65	46	**0,036**	0,3	15	**0,020**	*0,23*	*0,42*	***1,79***
	27°C				1,2	76	**0,016**	0,73	28	**0,026**			*0,61*
	27°C	0,01	15	**0,001**	1,44	65	**0,022**	0,8	90	**0,009**	*0,03*	*0,08*	***2,49***
14b-7	4°C	0,6	171	**0,004**	0,29	56	**0,005**	1,17	129	**0,009**	*0,68*	*0,39*	*0,57*
	17°C	1,11	104	**0,011**	0,59	56	**0,011**	0,63	74	**0,009**	***1,01***	***1,25***	***1,24***
	27°C	0,56	171	**0,003**	0,33	104	**0,003**	1,11	27	**0,041**	***1,03***	*0,08*	*0,08*
14b-8	17°C				0,77	46	**0,017**	0,43	17	**0,025**			*0,66*
	17°C	0,33	96	**0,003**	0,49	96	**0,005**				*0,67*		
	17°C				0,7	69	**0,010**	0,39	44	**0,009**			***1,14***
	27°C				0,2	69	**0,003**	0,82	69	**0,012**			*0,24*
14b-11 levure	4°C	0	137	**0,000**	1,32	137	**0,010**	1,27	18	**0,071**	*0,00*	*0,00*	*0,14*
	17°C	0	137	**0,000**	1,22	137	**0,009**	1,11	18	**0,062**	*0,00*	*0,00*	*0,14*
	27°C	0	137	**0,000**	0,07	18	**0,004**	1,18	18	**0,066**	*0,00*	*0,00*	*0,06*
14b-13	4°C	0,47	152	**0,003**	3,95	70	**0,056**				*0,05*		
	17°C				2,2	46	**0,048**	1,28	46	**0,028**			***1,72***
	17°C	0,78	152	**0,005**	4,94	108	**0,046**				*0,11*		
14b-14	4°C	1,19	79	**0,015**	1,06	24	**0,044**				*0,34*		
	17°C	0,94	79	**0,012**	1,17	24	**0,049**				*0,24*		
	27°C				0,788	94	**0,008**	0,889	94	**0,009**			*0,89*
16b-1	27°C				10,33	23	**0,449**	10,5	8	**1,313**			*0,34*
22b-1	4°C	1,58	117	**0,014**	2,33	41	**0,057**	2,47	41	**0,060**	*0,24*	*0,22*	*0,94*
	17°C	1,91	117	**0,016**	2,2	41	**0,054**	1,91	41	**0,047**	*0,30*	*0,35*	***1,15***
	27°C	1,74	117	**0,015**	2,24	41	**0,055**	1,72	41	**0,042**	*0,27*	*0,35*	***1,30***
22b-2	4°C	1,16	117	**0,010**	1,06	117	**0,009**	1,27	41	**0,031**	***1,09***	*0,32*	*0,29*
	17°C	1,09	117	**0,009**	1,69	117	**0,014**	0,76	41	**0,019**	*0,64*	*0,50*	*0,78*
	27°C	1,13	117	**0,010**	0,9	117	**0,008**	0,79	41	**0,019**	***1,26***	*0,50*	*0,40*

Tableau Annexe-31 : Résultats des tests de croissances à différentes températures. Un indice de vitesse, en unité de densité optique par heure, est calculé dans chaque cas, ainsi que les rapports entre les indices obtenus pour chaque température. Les températures de 5°C, 17°C et 27°C sont comparées. Un rapport d'indices supérieur à 1,0 indique une meilleure croissance à la plus froide des 2 températures considérées. La température de préculture est précisée dans chaque cas.

5) TESTS DE BIODEGRADATION (« SCREENING »)

Souche	Identification	T°	Milieu de préculture	DO	pH	$V_{utilisé}$ (mL)	$V_{Substrat}$ (mL)	Composé	Concentration (mM) t-1	t4	t24	t48	%biodégradation t4	t24	t48
3-1	*Pseudomonas syringae*	27°C	TS	9,15	7,9			Acetate	20,35		0,00			100,0%	
								D-Lactate	6,31		0,00			100,0%	
								L-Lactate	8,89		2,76			68,9%	
								Formiate	22,38		0,00			100,0%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	0,42		0,00			100,0%	
								Formaldéhyde						100,0%	
3-2	*Micrococcus* sp.	27°C	TS	32,8	7,7			Acetate	20,35		0,00			100,0%	
								D-Lactate	6,31		0,00			100,0%	
								L-Lactate	8,89		3,23			63,7%	
								Formiate	22,38		16,5			26,0%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	0,42		0,00			100,0%	
								Formaldéhyde						100,0%	
3-3		27°C	TS	9,5	7,6			Acetate	20,35		0,00			100,0%	
								D-Lactate	6,31		0,29			95,4%	
								L-Lactate	8,89		2,90			67,4%	
								Formiate	22,38		0,00			100,0%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	0,42		0,00			100,0%	
								Formaldéhyde						100,0%	
3-4		27°C	TS	1,4	7,2			Acetate	22,75		13,0			42,6%	
								D-Lactate	6,21		6,21			0,0%	
								L-Lactate	9,07		9,07			0,0%	
								Formiate	20,32		13,6			33,1%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)							
								Formaldéhyde						100,0%	
3-6	*Bacillus* sp.	27°C	TS	17,8	7,8			Acetate	20,35		0,00			100,0%	
								D-Lactate	6,31		0,00			100,0%	
								L-Lactate	8,89		0,00			100,0%	
								Formiate	22,38		0,00			100,0%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	0,42		0,00			100,0%	
								Formaldéhyde						100,0%	
3-7	*Arthrobacter rhombi*	27°C	TS	12,6	7,5			Acetate	22,85		0,00			100,0%	
								D-Lactate							
								L-Lactate	7,13		0,00			100,0%	
								Formiate	19,56		0,00			100,0%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	1,03		0,00			100,0%	
								Formaldéhyde						99,0%	
3-8	*Cellulomonas* sp.	27°C	TS	2,8	6,5			Acetate	22,75		0,00			100,0%	
								D-Lactate	6,21		0,00			100,0%	
								L-Lactate	9,07		0,00			100,0%	
								Formiate	20,32		16,0			21,1%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)							
								Formaldéhyde						88,0%	
3-9		27°C	TS	12,5	-			Acetate	20,75		0,00			100,0%	
								D-Lactate	5,92		0,00			100,0%	
								L-Lactate	9,18		2,13			76,8%	
								Formiate	19,76		0,00			100,0%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)							
								Formaldéhyde						100,0%	
3-10	*Sphingomonas* sp.	17°C	TS	8,5	7,3			Acetate	19,03		0,00			100,0%	
								D-Lactate	5,26		0,00			100,0%	
								L-Lactate	7,68		2,63			65,7%	
								Formiate	19,50		0,00			100,0%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)							
								Formaldéhyde						98,0%	
3-12	*Zoogloea* sp.	17°C	TS	16,2	6,6			Acetate	21,01		10,3			50,8%	
								D-Lactate	6,72		6,19			7,8%	
								L-Lactate	9,18		5,10			44,4%	
								Formiate	19,94		0,00			100,0%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)							
								Formaldéhyde						99,0%	
3-13		27°C	TS	-	-			Acetate	20,75		0,00			100,0%	
								D-Lactate	4,63		3,62			21,9%	
								L-Lactate	6,63		4,12			37,8%	
								Formiate	22,46		0,38			98,3%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	0,28		0,18			35,7%	
								Formaldéhyde						16,0%	
3-14		17°C	TS	9	7,6			Acetate	22,11		0,00			100,0%	
								D-Lactate	6,21		6,21			0,0%	
								L-Lactate	8,82		8,82			0,0%	
								Formiate	20,32		4,36			78,5%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)							
								Formaldéhyde						69,0%	
3-15	*Staphylococcus epidermidis*	27°C	TS	4,7	7,2			Acetate	19,03		0,00			100,0%	
								D-Lactate	5,26		3,57			32,1%	
								L-Lactate	7,68		0,00			100,0%	
								Formiate	19,50		9,52			51,2%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)							
								Formaldéhyde						99,0%	
3-16	*Staphylococcus* sp.	27°C	TS	25,6	7,5			Acetate	19,90		0,00			100,0%	
								D-Lactate	5,79		5,79			0,0%	
								L-Lactate	8,45		2,99			64,6%	
								Formiate	18,62		0,00			100,0%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)							
								Formaldéhyde						93,0%	

3-17	= 3b-16	27°C	TS	25,6	7,3			Acetate	19,90		0,00		100,0%		
								D-Lactate	5,79		5,79		0,0%		
								L-Lactate	8,45		2,99		67,8%		
								Formiate	18,62		0,00		100,0%		
								Succinate							
								Méthanol (mélange)							
								Formaldéhyde					100,0%		
3-20	*Leucobacter* sp.	27°C	TS	14,5	7,1			Acetate	19,35		1,26		93,5%		
								D-Lactate	6,47		0,00		100,0%		
								L-Lactate	8,96		0,00		100,0%		
								Formiate	19,44		10,5		46,0%		
								Succinate							
								Méthanol (mélange)							
								Formaldéhyde					87,0%		
5-1 (1)	*Bacillus pumilus*	27°C	R2A	0,3	-	41,7	12,5	Acetate	25,36		17,7	14,78	30,0%	41,7%	
								D-Lactate	7,87		7,69	6,01	2,3%	23,6%	
								L-Lactate	16,92		9,77	2,98	42,3%	82,4%	
								Formiate	24,32		19,1		21,2%		
								Succinate	36,29		33,7	14,03	7,0%	61,3%	
								Méthanol (mélange)	0,93		0,84		10,0%		
								Formaldéhyde							
5-1 (2)	*Bacillus pumilus*	27°C	R2A	0,2	7,5	62,4	5	Acetate	6,36		0,00		100,0%		
								D-Lactate	1,68		1,57		100,0%		
								L-Lactate	3,76		0,00				
								Formiate	6,31		3,71		41,2%		
								Succinate	7,35		1,40		80,9%		
								Méthanol (mélange)	0,25		0,23		8,5%		
								Formaldéhyde							
5-2	*Bacillus* sp.	27°C	TS	4,9	7,5	50	25	Acetate	20,57		4,47		78,3%		
								D-Lactate	6,12		1,05		82,8%		
								L-Lactate	13,30		5,21		60,8%		
								Formiate	21,79		10,9		49,6%		
								Succinate	24,73		16,2		34,3%		
								Méthanol (mélange)	1,29		1,18		8,8%		
								Formaldéhyde							
5-3	*Staphylococcus* sp.	17°C	TS	5,4	-	46,3	25	Acetate	22,56		21,4		4,9%		
								D-Lactate	6,06		5,82		4,1%		
								L-Lactate	13,29		11,9		10,4%		
								Formiate	18,35		6,06		67,0%		
								Succinate	27,83		26,5		4,5%		
								Méthanol (mélange)	1,04		0,97		7,3%		
								Formaldéhyde					42,0%		
5-5		27°C	TS	11	7,7	23,1	25	Acetate	29,73		0,00		100,0%		
								D-Lactate	6,16		6,14		0,4%		
								L-Lactate	15,35		1,64		89,3%		
								Formiate	20,03		0,00		100,0%		
								Succinate	19,72		18,4		6,3%		
								Méthanol (mélange)	0,95		1,40		-47,0%		
								Formaldéhyde					51,1%		
5-6	*Staphylococcus* sp.	27°C	TS	17	6,8	14,4	25	Acetate	18,01		0,00		100,0%		
								D-Lactate	6,26		6,23		0,4%		
								L-Lactate	13,90		0,00		100,0%		
								Formiate	14,65		0,31		97,9%		
								Succinate	23,81		18,8		20,9%		
								Méthanol (mélange)	2,56		1,36		46,9%		
								Formaldéhyde					69,0%		
5-8	*Staphylococcus* sp.	27°C	TS	16	7,4	15,4	25	Acetate	24,00		13,4		43,8%		
								D-Lactate	8,27		8,26		0,2%		
								L-Lactate	18,31		9,09		50,3%		
								Formiate	29,17		0,00		100,0%		
								Succinate	24,15		15,3		36,4%		
								Méthanol (mélange)	2,84		2,11		25,6%		
								Formaldéhyde					100,0%		
5-11	*Arthrobacter* sp.	27°C	TS	14	7,6	18	25	Acetate	19,74		11,8		39,7%		
								D-Lactate	6,10		5,78		5,2%		
								L-Lactate	15,70		3,51		77,7%		
								Formiate	27,21		0,00		100,0%		
								Succinate	26,92		0,00		100,0%		
								Méthanol (mélange)	2,07		1,98		4,0%		
								Formaldéhyde					100,0%		
5-16	*Staphylococcus equorum*	27°C	TS	11	7,2	22,9	25	Acetate	23,01		15,1		34,2%		
								D-Lactate	6,12		6,08		0,6%		
								L-Lactate	12,89		2,31		82,1%		
								Formiate	22,78		0,00		100,0%		
								Succinate	18,41		16,7		8,9%		
								Méthanol (mélange)	2,57		2,76		-7,4%		
								Formaldéhyde							
6-1	*Staphylococcus* sp.	27°C	TS	23,6	7,3	10,6	25	Acetate	23,04	22,8	20,1	10,83	0,6%	12,4%	53,0%
								D-Lactate	5,55	6,04	5,69	5,62	-8,9%	-2,5%	-1,2%
								L-Lactate	12,50	12,0	8,98	2,63	4,1%	28,2%	79,0%
								Formiate	19,84	7,80	0,00	0,00	60,7%	100,0%	100,0%
								Succinate	24,77	23,1	24,3	18,51	6,5%	1,7%	25,3%
								Méthanol (mélange)	0,53	0,83	0,76	0,67	-57,3%	-43,8%	-26,9%
								Formaldéhyde						100,0%	
6-2	*Pedobacter* sp.	27°C	TS	24,4	7,3			Acetate	19,23		0,00		100,0%		
								D-Lactate	6,09		3,93		35,4%		
								L-Lactate	8,53		2,15		74,8%		
								Formiate	18,84		6,88		63,5%		
								Succinate							
								Méthanol (mélange)							
								Formaldéhyde					92,0%		
6-4	*Pseudomonas* sp.	27°C	TS	8,5	7,5	29,5	25	Acetate	27,99		0,00		100,0%		
								D-Lactate	6,87		5,75		16,3%		
								L-Lactate	16,05		0,00		100,0%		
								Formiate	26,80		0,00		100,0%		
								Succinate	29,66		0,00		100,0%		
								Méthanol (mélange)	1,29		1,27		2,1%		
								Formaldéhyde					96,0%		
7-2	*Agrococcus* sp.	27°C	TS	-	-			Acetate	19,35		0,00		100,0%		
								D-Lactate	6,47		0,00		100,0%		
								L-Lactate	8,96		0,00		100,0%		
								Formiate	19,44		10,7		44,5%		
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	0,09		0,03		64,3%		
								Formaldéhyde							

7-4	*Micrococcus* sp.	27°C	TS	26,4	-			Acetate	20,53		0,00			100,0%	
								D-Lactate	5,41		4,35			19,6%	
								L-Lactate	7,55		5,41			28,3%	
								Formiate	18,26		16,7			8,5%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	0,10		0,01			93,3%	
								Formaldéhyde							
7-5	*Metylobacterium* sp.	17°C	TS	0,9	7,1	28	25	Acetate	2,03		1,47			27,6%	
								D-Lactate	0,42		0,50			-18,8%	
								L-Lactate	0,98		0,57			41,9%	
								Formiate	2,08		0,00			100,0%	
								Succinate	2,13		1,45			31,9%	
								Méthanol (mélange)	0,11		0,00			100,0%	
								Formaldéhyde							
7-6	*Paenibacillus* sp.	17°C	TS	3,5	6,6			Acetate	20,97		2,41			88,5%	
								D-Lactate	5,92		5,92			0,0%	
								L-Lactate	8,73		4,21			51,8%	
								Formiate	22,28		14,3			35,6%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	0,09		0,04			57,1%	
								Formaldéhyde							
7-7 (1)	*Nocardioides* sp.	27°C	R2A	1,1	8,1	23	25	Acetate	20,31	20,2	16,2	11,42	0,4%	20,0%	43,8%
								D-Lactate	5,59	5,85	5,85	5,33	-4,6%	-4,7%	4,6%
								L-Lactate	13,28	13,3	11,0	8,22	-0,5%	16,9%	38,1%
								Formiate	20,06	22,2	21,1	19,90	-10,7%	-5,1%	0,8%
								Succinate	23,03	22,6	22,7	21,61	1,8%	1,3%	6,2%
								Méthanol (mélange)	0,82	0,78	0,60	0,60	4,6%	26,8%	26,5%
								Formaldéhyde						11,0%	
7-7 (2)	*Nocardioides* sp.	27°C	R2A	1,2	8,6	61,5	25	Acetate	8,10		1,29			84,0%	
								D-Lactate	2,66		0,34			87,2%	
								L-Lactate	5,83		2,74			53,1%	
								Formiate	7,03		4,60			34,5%	
								Succinate	7,20		3,01			58,2%	
								Méthanol (mélange)	0,66		0,56			15,6%	
								Formaldéhyde							
7-8		27°C	R2A	1,3	6	28,8	12,5	Acetate	7,08		0,00			100,0%	
								D-Lactate	2,71		2,70			0,4%	
								L-Lactate	5,98		0,00			100,0%	
								Formiate	10,05		4,15			58,7%	
								Succinate	7,29		0,00			100,0%	
								Méthanol (mélange)	0,36		0,34			4,7%	
								Formaldéhyde							
7-9	*Arthrobacter* sp.	27°C	TS	9,4	8,1			Acetate	20,53		6,82			66,8%	
								D-Lactate	5,41		4,35			19,6%	
								L-Lactate	7,55		0,00			100,0%	
								Formiate	18,26		0,00			100,0%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	0,10		0,00			100,0%	
								Formaldéhyde							
7-11	*Bacillus* sp.	27°C	TS	7,4	-	34	25	Acetate	21,49		5,87			72,7%	
								D-Lactate	5,96		1,32			77,9%	
								L-Lactate	14,31		0,00			100,0%	
								Formiate	21,88		0,00			100,0%	
								Succinate	24,23		0,00			100,0%	
								Méthanol (mélange)	0,57		0,41			28,2%	
								Formaldéhyde							
7-12	*Kocuria* sp.	27°C	TS	25,2	7,5			Acetate	20,53		0,00			100,0%	
								D-Lactate	5,41		5,31			1,8%	
								L-Lactate	7,55		0,00			100,0%	
								Formiate	18,26		0,00			100,0%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	0,10		0,01			93,3%	
								Formaldéhyde							
7-13 (1)	*Sphingomonas* sp.	17°C	TS	6,4	7,5	39	25	Acetate	21,77		0,00			100,0%	
								D-Lactate	7,78		2,13			72,7%	
								L-Lactate	16,52		0,25			98,5%	
								Formiate	19,70		0,00			100,0%	
								Succinate	25,13		0,00			100,0%	
								Méthanol (mélange)	0,06		0,08			-39,3%	
								Formaldéhyde							
7-13 (2)	*Sphingomonas* sp.	17°C	R2A	1,5	8,6	49,8	25	Acetate	7,57		4,72	0,22		37,6%	97,0%
								D-Lactate	2,33		0,97	0,64		58,3%	72,7%
								L-Lactate	4,96		4,03	0,07		18,7%	98,5%
								Formiate	6,68		6,67	5,31		0,1%	20,5%
								Succinate	7,97		4,31	2,38		46,0%	70,1%
								Méthanol (mélange)	1,28		3,18	2,86		-148,3%	-123,2%
								Formaldéhyde						87,0%	
7-15	*Sphingomonas* sp.	27°C	TS	12	7,2			Acetate	20,53		0,00			100,0%	
								D-Lactate	5,41		5,41			0,0%	
								L-Lactate	7,55		0,00			100,0%	
								Formiate	18,26		10,2			44,1%	
								Succinate							
								Méthanol (mélange)	0,10		0,00			100,0%	
								Formaldéhyde							
12-1	Levure rose	17°C	M200	11	4,2	22,8	25	Acetate	20,97		0,00			100,0%	
								D-Lactate	6,10		5,21			14,5%	
								L-Lactate	13,52		0,00			100,0%	
								Formiate	26,86		9,56			64,4%	
								Succinate	24,00		0,00			100,0%	
								Méthanol (mélange)	0,48		0,61			-28,0%	
								Formaldéhyde							
12-4		27°C	TS	14	7,7	18	25	Acetate	21,02		0,00			100,0%	
								D-Lactate	7,67		6,75			11,9%	
								L-Lactate	16,00		0,00			100,0%	
								Formiate	18,86		0,00			100,0%	
								Succinate	24,29		2,53			89,6%	
								Méthanol (mélange)	0,65		0,55			15,3%	
								Formaldéhyde							
12-5	*Pantoea agglomerans*	27°C	TS	9,4	8,1	27	25	Acetate	22,41		0,00			100,0%	
								D-Lactate	8,28		3,87			53,2%	
								L-Lactate	16,57		0,00			100,0%	
								Formiate	22,80		0,00			100,0%	
								Succinate	23,02		0,00			100,0%	
								Méthanol (mélange)	0,57		0,83			-45,3%	
								Formaldéhyde						96,0%	

12-6	*Micrococcus* sp.	27°C	TS	15,4	7,6	16,3	25	Acetate	27,58		0,00			100,0%	
								D-Lactate	8,73		6,35			27,3%	
								L-Lactate	19,03		0,00			100,0%	
								Formiate	19,58		0,68			96,5%	
								Succinate	27,01		5,10			81,1%	
								Méthanol (mélange)	0,48		0,00			100,0%	
								Formaldéhyde						98,0%	
12-7		27°C	TS	7,9	7,3	31,6	25	Acetate	21,07		0,00			100,0%	
								D-Lactate	5,19		4,07			21,6%	
								L-Lactate	10,53		0,00			100,0%	
								Formiate	26,04		9,22			64,6%	
								Succinate	22,70		24,4			-7,9%	
								Méthanol (mélange)	0,76		0,61			19,8%	
								Formaldéhyde							
12-8	*Pseudomonas syringae*	27°C	TS	10,8	7,6	23,2	25	Acetate	22,77		19,5			14,3%	
								D-Lactate	6,71		6,63			1,2%	
								L-Lactate	16,43		0,00			100,0%	
								Formiate	23,20		0,00			100,0%	
								Succinate	24,19		0,00			100,0%	
								Méthanol (mélange)	0,76		1,22			-59,1%	
								Formaldéhyde							
12-9	Levure	17°C	M200	4,6	5,5	54,9	25	Acetate	20,51		0,00			100,0%	
								D-Lactate	5,77		2,35			59,2%	
								L-Lactate	13,28		6,10			54,0%	
								Formiate	21,04		0,78			96,3%	
								Succinate	24,83		6,29			74,7%	
								Méthanol (mélange)	0,51		0,00			100,0%	
								Formaldéhyde							
13-1 (1)	Levure rose	17°C	R2A	0,7	6,6	35	25	Acetate	26,00		25,9			0,3%	
								D-Lactate	6,97		6,58			5,5%	
								L-Lactate	15,28		14,6			4,2%	
								Formiate							
								Succinate	24,57		10,9			55,3%	
								Méthanol (mélange)	1,17		1,10			6,1%	
								Formaldéhyde						100,0%	
13-1 (2)	Levure rose	17°C	M200	6,2	4,7	40,3	25	Acetate	21,06	18,3	0,00	0,00	12,9%	100,0%	100,0%
								D-Lactate	5,53	5,16	5,21	3,84	6,6%	5,7%	30,5%
								L-Lactate	12,28	11,2	0,12	0,00	8,6%	99,0%	100,0%
								Formiate	23,75	22,9	17,8	8,73	3,3%	25,0%	63,3%
								Succinate	20,00	20,0	0,00	0,00	0,0%	100,0%	100,0%
								Méthanol (mélange)	0,75	0,77	0,79	0,55	-3,6%	-6,3%	25,9%
								Formaldéhyde							
13-2	*Pseudomonas syringae*	17°C	R2A	10	-	25	25	Acetate	18,20	11,7	0,00	0,00	35,5%	100,0%	100,0%
								D-Lactate	5,58	5,89	0,43	0,40	-5,5%	92,3%	92,9%
								L-Lactate	12,50	11,6	7,72	7,08	6,7%	38,2%	43,4%
								Formiate	24,09	0,00	0,00	0,00	100,0%	100,0%	100,0%
								Succinate	23,47	17,7	0,00	0,00	24,5%	100,0%	100,0%
								Méthanol (mélange)	1,53	2,35	2,58		-53,5%	-68,4%	
								Formaldéhyde						100,0%	
13-3	*Pseudomonas graminis*	17°C	TS	10	7,9	25	25	Acetate	22,05		0,00			100,0%	
								D-Lactate	14,37		5,79			59,7%	
								L-Lactate	6,60		0,00			100,0%	
								Formiate	28,85		0,00			100,0%	
								Succinate	24,83		0,00			100,0%	
								Méthanol (mélange)	2,20		2,67			-21,5%	
								Formaldéhyde							
13-4	*Curtobacterium flaccumfa*ciens	17°C	TS	9	6,7	28	25	Acetate	25,24	26,1	22,0	18,67	-3,8%	12,8%	26,0%
								D-Lactate	7,87	8,22	7,60	8,21	-4,4%	3,5%	-4,3%
								L-Lactate	17,40	17,3	17,4	16,32	0,3%	-0,1%	6,2%
								Formiate	26,48	24,2	27,7	12,89	8,5%	-5,0%	51,3%
								Succinate	29,36	32,0	28,0	19,26	-9,1%	4,6%	34,4%
								Méthanol (mélange)	0,57	0,70	0,64	0,68	-23,5%	-13,5%	-21,1%
								Formaldéhyde						100,0%	
14-1	Levure rose	17°C	R2A	0,9	6,9	28	25	Acetate	22,87	21,9	10,1	0,00	4,0%	55,4%	100,0%
								D-Lactate	6,45	5,97	5,82	5,89	7,5%	9,9%	8,8%
								L-Lactate	13,43	1,28	11,8	6,49	90,5%	12,0%	51,6%
								Formiate	21,56	17,1	18,7	21,55	20,7%	13,2%	0,0%
								Succinate	24,78	23,6	13,6	3,56	4,5%	44,8%	85,6%
								Méthanol (mélange)	0,72	0,63	0,78	0,66	12,5%	-9,2%	7,4%
								Formaldéhyde							
14-2 (1)	*Pseudomonas* sp.							Acetate	19,21	12,9	2,66	0,00	32,7%	86,1%	100,0%
								D-Lactate	5,34	5,72	5,29	0,13	-7,0%	1,0%	97,5%
								L-Lactate	11,81	12,4	2,90	4,10	-5,0%	75,5%	65,3%
								Formiate	19,87	15,2	1,25	0,00	23,4%	93,7%	100,0%
								Succinate	22,01		4,99	0,00		77,3%	100,0%
								Méthanol (mélange)	0,74			0,09			87,4%
								Formaldéhyde							
14-2 (2)	*Pseudomonas* sp.	27°C	TS	11,4	7,7	22	25	Acetate	19,25		0,00			100,0%	
								D-Lactate	7,52		6,63			11,8%	
								L-Lactate	16,50		0,00			100,0%	
								Formiate	18,13		0,00			100,0%	
								Succinate	22,61		0,00			100,0%	
								Méthanol (mélange)	0,50	0,98	0,69	0,89	-93,6%	-37,5%	-76,3%
								Formaldéhyde						96,0%	
14-3a (1)	*Cryptococcus albidus*	17°C	R2A	1,2	7,8	21	25	Acetate	23,71		13,5	1,19		43,0%	95,0%
								D-Lactate	6,10		6,06	5,98		0,6%	2,0%
								L-Lactate	14,30		13,3	10,32		6,8%	27,8%
								Formiate	27,22		19,1	18,90		29,8%	30,6%
								Succinate	27,77		13,8	4,30		50,1%	84,5%
								Méthanol (mélange)	0,67		0,45	1,24		32,6%	-87,0%
								Formaldéhyde							
14-3a (2)	*Cryptococcus albidus*	17°C	M200	5,9	5,8	42,3	25	Acetate	18,45	13,9	0,00	0,00	24,2%	100,0%	100,0%
								D-Lactate	5,17	5,54	4,74	3,93	-7,1%	8,5%	24,0%
								L-Lactate	11,67	11,7	7,74	0,00	-0,9%	33,7%	100,0%
								Formiate	19,83	17,9	13,6	1,41	9,4%	31,0%	92,9%
								Succinate	23,30	17,6	0,00	0,00	24,1%	100,0%	100,0%
								Méthanol (mélange)	0,61	1,33	0,98	1,10	-118,4%	-60,8%	-81,5%
								Formaldéhyde							
14-5	*Sphingomonas* sp.	27°C	TS	5,4	7,6	46,3	25	Acetate	22,49	18,2	0,00	0,00	19,0%	100,0%	100,0%
								D-Lactate	6,28	4,87	5,94	3,22	22,5%	5,5%	48,8%
								L-Lactate	14,09	6,07	0,07	0,00	56,9%	99,5%	100,0%
								Formiate	19,09	15,9	5,61	0,00	16,3%	70,6%	100,0%
								Succinate	23,61	23,2	3,10	0,00	1,5%	86,9%	100,0%
								Méthanol (mélange)	0,98	0,76	0,90	0,63	21,9%	7,6%	35,8%
								Formaldéhyde						73,0%	

14-6	*Sphingomonas* sp.	27°C	R2A	0,9	7,6	30	25	Acetate	25,94	14,3	2,52	44,9%	90,3%
								D-Lactate	7,91	7,18	6,90	9,2%	12,7%
								L-Lactate	15,31	10,0	3,68	34,1%	76,0%
								Formiate	22,91	16,8	8,66	26,5%	62,2%
								Succinate	29,36	20,1	17,85	31,4%	39,2%
								Méthanol (mélange)	0,84	0,69	0,56	18,0%	33,2%
								Formaldéhyde					
14-7	*Flavobacterium* sp.	17°C	TS	8,5	7,5	30	25	Acetate	7,12	0,00		100,0%	
								D-Lactate	5,25	6,26		-19,4%	
								L-Lactate	12,26	13,6		-11,1%	
								Formiate	18,41	20,2		-10,1%	
								Succinate	22,51	22,4		0,3%	
								Méthanol (mélange)	0,43	0,35		19,8%	
								Formaldéhyde					
14-10	*Pseudomonas* sp.	27°C	TS	9	-	30	25	Acetate	21,94	0,00		100,0%	
								D-Lactate	6,32	4,28		32,3%	
								L-Lactate	13,94	0,00		100,0%	
								Formiate	19,15	0,00		100,0%	
								Succinate	22,70	0,00		100,0%	
								Méthanol (mélange)	0,48	0,55		-14,2%	
								Formaldéhyde					
14-11	*Pseudozyma* sp.	27°C	R2A	1,2	8	60	12,5	Acetate	6,28	3,06		51,3%	
								D-Lactate	2,66	2,74		-3,0%	
								L-Lactate	6,05	0,86		85,8%	
								Formiate	6,92	0,50		92,7%	
								Succinate	7,21	3,76		47,9%	
								Méthanol (mélange)	0,83	0,72		13,8%	
								Formaldéhyde					
14-13 (1)	*Frigoribacterium* sp.	17°C						Acetate	22,21	21,0		5,0%	
								D-Lactate	7,31	6,87		6,0%	
								L-Lactate	15,92	14,7		7,3%	
								Formiate	23,71	21,4		9,4%	
								Succinate	23,09	22,7		1,6%	
								Méthanol (mélange)	1,00	1,23		-22,7%	
								Formaldéhyde					
14-13 (2)	*Frigoribacterium* sp.	17°C	TS	4,5	-	30	25	Acetate	26,84	25,7		4,2%	
								D-Lactate	8,82	7,45		15,6%	
								L-Lactate	19,09	13,3		30,0%	
								Formiate	22,09	19,1		13,5%	
								Succinate	26,39	21,6		18,0%	
								Méthanol (mélange)	1,09	2,04		-87,4%	
								Formaldéhyde				100,0%	
14-14	*Pseudomonas viridiflava*	27°C	TS	1,06	7,9	50	25	Acetate	27,55	0,00		100,0%	
								D-Lactate	5,84	4,51		22,7%	
								L-Lactate	13,27	0,00		100,0%	
								Formiate	18,76	0,00		100,0%	
								Succinate	26,48	0,00		100,0%	
								Méthanol (mélange)	0,57	0,53		5,9%	
								Formaldéhyde				100,0%	
16-1	*Bacillus* sp.	27°C	TS	13,6	7,6	18,5	25	Acetate	20,37	0,00		100,0%	
								D-Lactate	6,57	5,41		17,7%	
								L-Lactate	14,01	0,00		100,0%	
								Formiate	24,48	0,00		100,0%	
								Succinate	21,90	0,00		100,0%	
								Méthanol (mélange)	0,49	0,61		-23,5%	
								Formaldéhyde					

Tableau Annexe-32 : Conditions et résultats des tests de biodégradation menés de façon systématique (« screenings »). (Evolution de la concentration au cours du temps et pourcentages de biodégradation correspondants).

		17°C							27°C						
	exp	Acétate	L-Lactate	D-Lactate	Formiate	Succinate	Méthanol	Formaldéhyde	Acétate	L-Lactate	D-Lactate	Formiate	Succinate	Méthanol	Formaldéhyde
Actinobactéries															
3-2									1,000	0,637	1,000	0,260		1,000	1,000
3-4									0,426	0,000	0,000	0,331			1,000
3-7									1,000	1,000		1,000		1,000	0,990
3-8									1,000	1,000	1,000	0,211			0,880
3-20									0,935	1,000	1,000	0,460			0,870
5-11									0,397	0,777	0,052	1,000	1,000	0,040	1,000
7-2									1,000	1,000	1,000	0,445	0,643		
7-4									1,000	0,283	0,196	0,085		0,933	
7-7	(1)								0,200	0,169	-0,047	-0,051	0,013	0,268	0,110
	(2)								0,840	0,531	0,872	0,345	0,582	0,156	
7-9									0,668	1,000	0,196	1,000		1,000	
7-12									1,000	1,000	0,018	1,000		0,933	
12-4									1,000	1,000	0,119	1,000	0,896	0,153	
12-6									1,000	1,000	0,273	0,965	0,811	1,000	0,980
13-4		0,128	-0,001	0,035	-0,050	0,046	-0,135	1,000							
14-13	(2)	0,050	0,073	0,060	0,094	0,016	-0,227								
	(1)	0,042	0,300	0,156	0,135	0,180	-0,874	1,000							
Firmicutes															
3-6									1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000
3-15									1,000	1,000	0,321	0,512			0,990
3-16									1,000	0,646	0,000	1,000			0,990
3-17									1,000	0,678	0,000	1,000			1,000
5-1	(1)								0,300	0,423	0,023	0,212	0,070	0,100	
	(2)								1,000		1,000	0,412	0,809	0,085	
5-2									0,783	0,608	0,828	0,496	0,343	0,088	
5-3	(2)	0,049	0,104	0,041	0,670	0,045	0,073	0,420							
5-6									1,000	1,000	0,004	0,979	0,209	0,469	0,690
5-8									0,438	0,503	0,002	1,000	0,364	0,256	1,000
5-16									0,342	0,821	0,006	1,000	0,089	-0,074	
6-1									0,124	0,282	-0,025	1,000	0,017	-0,438	1,000
7-6		0,885	0,518	0,000	0,356		0,571								
7-11									0,727	1,000	0,779	1,000	1,000	0,282	
12-7									1,000	1,000	0,216	0,646	-0,079	0,198	
16-1									1,000	1,000	0,177	1,000	1,000	-0,235	
Alpha-Proteobacteries															
3-10		1,000	0,657	1,000	1,000			0,980							
7-5		0,276	0,419	-0,188	1,000	0,319	1,000								
7-13	(1)	1,000	0,985	0,727	1,000	1,000	-0,393								
	(2)	0,376	0,187	0,583	0,001	0,460	-1,483	0,870							
7-15									1,000	1,000	0,000	0,441		1,000	
14-5									1,000	0,995	0,055	0,706	0,869	0,076	0,730
14-6	(1)								0,449	0,341	0,092	0,265	0,314	0,180	
Beta-Proteobacteries															
3-12		0,508	0,444	0,078	1,000			0,990							
3-13									1,000	0,378	0,219	0,983		0,357	0,160
3-14		1,000	0,000	0,000	0,785			0,690							
Gamma-Proteobacteries															
3-1									1,000	0,689	1,000	1,000		1,000	1,000
6-4									1,000	1,000	0,163	1,000	1,000	0,021	0,960
12-5									1,000	1,000	0,532	1,000	1,000	-0,453	0,960
12-8									0,143	1,000	0,012	1,000	1,000	-0,591	
13-2		1,000	0,382	0,923	1,000	1,000	-0,684	1,000							
13-3		1,000	1,000	0,597	1,000	1,000	-0,215								
14-2	(2)	0,861	0,755	0,010	0,937	0,773									
	(1)								1,000	1,000	0,118	1,000	1,000	-0,375	0,960
14-10									1,000	1,000	0,323	1,000	1,000	-0,142	
14-14									1,000	1,000	0,227	1,000	1,000	0,059	1,000
Bacteroidetes															
6-2									1,000	0,748	0,354	0,635			0,920
14-7		1,000	-0,111	-0,194	-0,101	0,003	0,198								
Levures															
12-1		1,000	1,000	0,145	0,644	1,000	-0,280								
12-9		1,000	0,540	0,592	0,963	0,747	1,000								
13-1	(1)	0,003	0,042	0,055		0,553	0,061	1,000							
	(2)	1,000	0,990	0,057	0,250	1,000	-0,063								
14-1		0,554	0,120	0,099	0,132	0,448	-0,092								
14-3a	(1)	0,430	0,068	0,006	0,298	0,501	0,326								
	(2)	1,000	0,337	0,085	0,310	1,000	-0,608								
14-11									0,513	0,858	-0,030	0,927	0,479	0,138	
Indéterminés															
3-3									1,000	0,674	0,954	1,000		1,000	1,000
3-9									1,000	0,768	1,000	1,000			1,000
5-5									1,000	0,893	0,004	1,000	0,063	-0,470	0,511
7-8									1,000	1,000	0,004	0,587	1,000	0,047	

Tableau Annexe-33 : Proportion de composé biodégradé après 24 heures pour l'ensemble ds souches, classées par température et par phylum, pour les mêmes tests que ceux présentés dans le tableau Annexe-32.

6) INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA CAPACITE DE BIODEGRADATION

Souche (T° du test)	Identification	T°	Milieu de préculture	DO	pH	$V_{utilisé}$ (mL)	$V_{Substrat}$ (mL)	CFU mL^{-1} (culture)	[Protéines totales] (mg mL^{-1}) (culture)	Composé	Concentration (mM) t-1	t4	t24	t48	%biodégradation t4	t24	t48
7b-13 (17°C)	*Sphingomonas* sp.	5°C	R2A	1,76	7	15	25	2,31 x 10^9		Acetate	18,81	18,81	19,44	18,95	0,0%	-3,3%	-0,7%
										L-Lactate	6,18	6,25	5,95	5,49	-1,0%	3,8%	11,3%
										D-Lactate	14,08	14,18	14,97	14,85	-0,7%	-6,3%	-5,5%
										Formiate	20,37	19,75	19,26	18,93	3,1%	5,4%	7,0%
										Succinate	22,44	22,23	21,40	21,46	1,0%	4,6%	4,4%
										Méthanol	0,74	0,83	0,45	0,55	-11,7%	39,2%	25,6%
										Formaldéhyde	2,38	2,34	2,13	1,81	1,5%	10,3%	24,0%
7b-13 (5°C)	*Sphingomonas* sp.	17°C	R2A	1,76	7	15	25	2,31 x 10^9		Acetate	19,22	19,37	18,68	12,67	-0,8%	2,8%	34,1%
										L-Lactate	4,64	4,79	4,57	4,07	-3,2%	1,6%	12,3%
										D-Lactate	10,67	11,38	12,25	8,84	-6,6%	-14,8%	17,2%
										Formiate	15,99	16,16	14,89	13,78	-1,1%	6,9%	13,8%
										Succinate	21,98	21,74	19,44	15,75	1,1%	11,6%	28,4%
										Méthanol	0,69	0,65	0,60	0,59	5,4%	12,6%	13,5%
										Formaldéhyde	2,19	1,76	1,45	1,24	19,5%	33,7%	43,2%
13b-3 (5°C)	*Pseudomonas graminis*	5°C	R2A	2,34	7,7	10,5	25	2,00 x 10^9	178	Acetate	19,84	19,79	17,68	17,67	0,3%	10,9%	10,9%
										L-Lactate	5,95	5,47	5,47	5,45	8,0%	8,2%	8,5%
										D-Lactate	13,63	12,35	12,26	12,09	9,4%	10,1%	11,3%
										Formiate	18,68	17,53	15,26	12,16	6,2%	18,3%	34,9%
										Succinate	23,41	22,22	21,47	20,89	5,1%	8,3%	10,7%
										Méthanol							
										Formaldéhyde	2,41	2,23	1,89	0,84	7,4%	21,7%	65,0%
13b-3 (17°C)	*Pseudomonas graminis*	17°C	R2A	2,34	7,7	10,5	25	2,00 x 10^9	178	Acetate	21,01	17,34	15,63	10,80	17,5%	25,6%	48,6%
										D-Lactate	6,72	6,26	6,04	7,05	6,8%	10,1%	-4,9%
										L-Lactate	14,72	13,73	12,37	11,03	6,8%	16,0%	25,1%
										Formiate	17,00	16,92	7,77	0,00	0,5%	54,3%	100,0%
										Succinate	22,42	21,15	19,71	17,29	5,7%	12,1%	22,9%
										Méthanol	0,76	0,78	0,70	0,68	-2,3%	8,3%	10,7%
										Formaldéhyde	2,18	1,82	0,72	0,45	16,3%	66,7%	79,3%
14b-1 (5°C)	Levure rose	5°C	R2A	1,68	7,4	15	25	2,69 x 10^7		Acetate	19,84	20,06	18,41	14,57	-1,1%	7,2%	26,6%
										D-Lactate	6,09	5,65	5,74	5,48	7,3%	5,8%	10,1%
										L-Lactate	13,59	12,58	12,08	11,75	7,4%	11,1%	13,5%
										Formiate	18,66	19,06	17,47	17,65	-2,2%	6,3%	5,4%
										Succinate	22,09	21,98	21,17	21,35	0,5%	4,2%	3,3%
										Méthanol	0,79	0,76	0,76	0,87	3,6%	2,9%	-11,4%
										Formaldéhyde							
14b-1 (17C)	Levure rose	17°C	R2A	1,68	7,4	15	25	2,69 x 10^7		Acetate	19,25	18,54	6,71	0,00	3,7%	65,2%	100,0%
										D-Lactate	6,26	6,72	6,58	4,81	-7,4%	-5,1%	23,1%
										L-Lactate	13,95	15,02	14,24	8,23	-7,7%	-2,1%	41,0%
										Formiate	19,44	20,29	17,61	16,39	-4,4%	9,4%	15,7%
										Succinate	22,58	22,27	12,61	4,31	1,4%	44,2%	80,9%
										Méthanol	1,17	1,17	1,25	1,28	0,0%	-6,7%	-9,4%
										Formaldéhyde							
14b-2 (5°C)	*Pseudomonas* sp.	5°C	R2A	1,5	8	17	25	3,91 x 10^9		Acetate	16,90	16,23	17,08	16,30	4,0%	-1,1%	3,6%
										D-Lactate	5,86	5,43	5,42	5,45	7,4%	7,5%	7,1%
										L-Lactate	12,57	11,67	10,99	10,44	7,1%	12,5%	16,9%
										Formiate	16,72	16,40	15,19	12,76	1,9%	9,1%	23,7%
										Succinate	20,48	19,77	20,24	20,28	3,5%	1,2%	1,0%
										Méthanol	0,74	0,84	0,79	0,72	-13,1%	-6,9%	2,7%
										Formaldéhyde							
14b-2 (17°C)	*Pseudomonas* sp.	17°C	R2A	1,5	8	17	25	3,91 x 10^9		Acetate	17,21	16,21	16,12	9,41	5,8%	6,3%	45,4%
										D-Lactate	5,31	5,36	5,60	5,45	-1,0%	-5,4%	-2,5%
										L-Lactate	11,78	11,79	12,02	9,55	-0,1%	-2,1%	18,9%
										Formiate	17,64	15,89	15,68	12,26	9,9%	11,1%	30,5%
										Succinate	19,39	19,72	16,15	14,12	-1,7%	16,7%	27,2%
										Méthanol	0,78	0,82	0,77	0,78	-5,0%	1,4%	0,8%
										Formaldéhyde							
14b-14 (5°C)	*Pseudomonas viridiflava*	5°C	R2A	1,36	7,3	18	25	1,66 x 10^9		Acetate	16,66	16,77	15,53	14,20	-0,7%	6,7%	14,8%
										D-Lactate	5,69	5,66	5,36	5,37	0,5%	5,7%	5,5%
										L-Lactate	12,71	12,48	12,00	12,11	1,8%	5,6%	4,8%
										Formiate	17,46	17,04	12,86	7,80	2,4%	26,3%	55,3%
										Succinate	23,97	22,91	23,42	20,85	4,4%	2,3%	13,0%
										Méthanol	0,86	0,75	0,65	0,71	12,6%	24,4%	17,7%
										Formaldéhyde							
14b-14 (17°C)	*Pseudomonas viridiflava*	17°C	R2A	1,36	7,3	18	25	1,66 x 10^9		Acetate	18,77	19,27	15,61	7,21	-2,6%	16,8%	61,6%
										D-Lactate	5,82	5,91	5,69	5,68	-1,5%	2,2%	2,4%
										L-Lactate	13,12	13,26	12,48	9,26	-1,1%	4,9%	29,4%
										Formiate	19,86	17,06	6,02	0,00	14,1%	69,7%	100,0%
										Succinate	19,40	19,38	19,40	13,35	0,1%	0,0%	31,2%
										Méthanol	0,70	0,78	0,67	0,61	-12,5%	4,6%	11,9%
										Formaldéhyde							

Tableau Annexe-34 : Résultats des tests de biodégradation réalisés à 5°C et 17°C pour déterminer l'influence de la température. (Evolution de la concentration au cours du temps et pourcentages de biodégradation correspondants).

7) TESTS DE BIODEGRADATION : FORMALDEHYDE ^{13}C ET CINETIQUES DETAILLEES

	12b-8		14b-13		5b-5	
Temps (h)	**Formaldéhyde ^{13}C** (mM)	**Méthanol** (mM)	**Formaldéhyde ^{13}C** (mM)	**Méthanol** (mM)	**Formaldéhyde ^{13}C** (mM)	**Méthanol** (mM)
0	1,927	6,2	4,613	4,7	4,109	4,18
1		6,25		4,03		4,16
4	0,035	6,28		3,65		4,17
24	0,025	5,18	0,035	3,54	0,038	3,36
48		4,65		3,03		2,14

Tableau Annexe-35 : Tests de biodégradation de 3 souches sélectionnées en conditions optimales, en présence de formaldéhyde ^{13}C ou de méthanol seul (évolution de la concentration au cours du temps).

12b-8 (*Pseudomonas syringae*)

Composé testé	**Mélange formaldéhyde/méthanol**				**Methanol seul** (mM)		**Formiate** (mM)		**Formaldéhyde ^{13}C** (mM)	
	5°C		**17°C**							
Temps (h)	**Formaldéhyde** (mM)	**Méthanol** (mM)	**Formaldéhyde** (mM)	**Méthanol** (mM)	**5°C**	**17°C**	**5°C**	**17°C**	**5°C**	**17°C**
Avant introduction des cellules	3,31	1,12	2,15	0,89	2,85	1,75	18,91	15,47	1,60	1,68
0	1,70	1,53	1,16	1,02	2,88	1,75	17,63	16,89	0,76	1,03
1	1,01	1,64	0,00	0,95	2,91	1,56	16,45	7,79	0,57	0,00
2	0,24	1,50	0,00	1,14	3,00	1,51	13,40	4,62	0,00	0,00
3	0,00	1,41	0,00	1,31	2,78	1,47	12,24	3,13	0,00	0,00
4	0,00	0,78	0,00	1,12	2,85	1,47	5,94	1,62	0,00	0,00
6	0,00	0,97	0,00	0,98	2,82		7,91	0,00	0,00	0,00
12	0,00	1,49	0,00	1,21	2,75	1,50	1,77	0,00	0,00	0,00
24	0,00	1,57	0,00	1,04	2,62	1,34	0,00	0,00	0,00	0,00
36	0,00	1,57	0,00	0,99	1,62	1,35	0,00	0,00	0,00	0,00
48	0,00	1,52	0,00	0,74	1,30	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00
72	0,00	1,27	0,00	0,77	1,44	0,55	0,00	0,00	0,00	0,00
120	0,00	1,12	0,00	0,51	1,12	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00
168	0,00	1,00	0,00	0,00	0,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

5b-5 (Non identifiée)

Composé testé	**Methanol seul**		**Formiate**		**Formaldéhyde ^{13}C**					
					5°C			**17°C**		
Temps (h)	**5°C**	**17°C**	**5°C**	**17°C**	**Formaldéhyde ^{13}C** (mM)	**Méthanol ^{13}C** (mM)	**Formiate ^{13}C** (mM)	**Formaldéhyde ^{13}C** (mM)	**Méthanol ^{13}C** (mM)	**Formiate ^{13}C** (mM)
Avant introduction des cellules	2,02	1,35	14,34	11,67	Non dosé	0,02	0,04	Non dosé	0,04	0,07
0		1,30	13,70	11,62		0,14	0,12		0,15	0,23
1	2,48	0,66	13,46	11,12		0,09	0,13		0,20	0,17
2		0,00	10,47	6,04		0,29	0,50		0,30	0,71
3	3,57	3,18	10,13	2,38		0,16	0,31		0,25	0,29
4	2,96	1,02	7,77	0,78		0,20	0,21		0,25	0,40
6	2,73	0,24	5,96	0,32		0,06	0,12			
12	2,76	2,22	3,55	0,00		0,17	0,35		0,34	0,10
24	2,78	2,35	0,85	0,00		0,19	0,10		0,32	0,00
36	1,84	1,47	0,00	0,00		0,20	0,06			
48	1,70	1,20	0,19	0,00		0,18	0,01		0,27	0,00
72	1,86	0,00	0,00	0,00		0,24	0,00		0,21	0,00
120	1,92	0,00	0,00	0,00		0,37	0,01		0,16	0,00
168	1,37	0,00	0,00	0,00		0,35	0,05		0,07	0,00

13b-3 (*Pseudomonas graminis*)

	Formaldéhyde ^{13}C	
Temps (h)	**5°C**	**17°C**
0	1,78	1,92
2	1,78	1,74
4	1,73	1,53
7	1,54	1,31
24	1,21	0,48
30,5	1,11	0,29
48	0,91	0,01
55,5	0,88	0,00
78,5	0,72	0,00
94	0,70	0,00

Tableau Annexe-36 : Biodégradation de formaldéhyde ^{13}C, de méthanol seul et de formiate à 5°C et 17°C, et concentrations des métabolites éventuels produits dans chaque cas. (Souches 12b-8, 5b-5 et 13b-3).

14b-13 *(Frigoribacterium* sp.)																				
Composé testé	**Mélange formaldéhyde/méthanol**						**Methanol** (mM)		**Formiate** (mM)		**Formaldéhyde ^{13}C**									
	5°C			**17°C**							**5°C**					**17°C**				
Temps (h)	**Formaldéhyde** (mM)	**Méthanol** (mM)	**Formiate** (mM)	**Formaldéhyde** (mM)	**Méthanol** (mM)	**Formiate** (mM)	**5°C**	**17°C**	**5°C**	**17°C**	**Formaldéhyde ^{13}C** (mM)	**Méthanol ^{13}C** (mM)	**Formiate ^{13}C** (mM)	**Acétate** (mM)	**Inconnu** (aire)	**Formaldéhyde ^{13}C**	**Méthanol ^{13}C**	**Formiate ^{13}C**	**Acétate**	**Inconnu** (aire)
Avant introduction des cellules	0,96	0,42	0,00	0,96	0,39	0,00	1,00	0,67	7,57	9,25	13,45	0,00	0,00	0,00	0,00	13,04	0,00	0,00	0,00	0,00
0	0,49	0,48	0,38	0,40	0,26	0,29	0,97	0,63	8,65	9,00	7,16	2,39	3,14	0,00	3,92	7,73	7,19	2,37	0,00	0,00
1	0,00	0,60	0,91	0,00	0,55	0,84	0,84		8,68	10,62	2,41	5,49	6,05	0,00	7,99	1,32	9,57	4,14	0,02	8,10
2	0,00	0,59	0,93	0,00	0,62	0,90	0,88	0,64	9,56	8,66	1,06					0,00	17,82	7,49	0,01	10,02
3	0,00	0,59	0,98	0,00			0,92	0,65	8,70	8,01	0,24	5,95	6,96	0,01	14,09	0,00	16,01	7,05	0,02	14,73
4	0,00	0,57		0,00	0,59	0,85	0,96	0,63	7,76	8,36	0,00	7,10	8,93	0,01	16,89	0,00	12,70	6,38	0,03	15,38
6	0,00	0,53	0,92	0,00	0,51	0,73		0,68	8,15		0,00	6,31	8,59	0,01	12,79	0,00				12,21
12	0,00	0,58	0,83	0,00	0,53	0,66	0,82	0,64		9,36	0,00					0,00	13,89	6,27	0,07	33,42
24	0,00	0,58	0,90	0,00	0,45	0,35	0,71	0,64	8,64	8,27	0,00					0,00	13,09	7,04	0,18	39,14
31	0,00		0,73	0,00	0,52	0,00		0,57	8,17	0,60	0,00	5,69	8,05	0,11	32,96	0,00	11,66		0,13	38,19
48	0,00	0,52	0,76	0,00	0,37	0,00	0,72	0,50	8,18	0,00	0,00	5,24	6,91	0,04	41,42	0,00	13,56	6,50	0,06	16,40
74	0,00	0,51	0,58	0,00	0,00	0,00	0,84	0,26		0,00	0,00	5,27	7,77	0,08	62,55	0,00	9,57	0,00	0,00	0,00
120	0,00	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,58	0,00	5,36	0,00	0,00	4,60	7,55	0,15	49,39	0,00	5,60		0,00	0,00
168	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00	0,00	3,77	7,86	0,21	51,18	0,00	0,00		0,00	0,00

Tableau Annexe-37 : Cinétique détailée de biodégradation de formaldéhyde ^{13}C, méthanol seul et formiate à 5°C et 17°C, et concentrations de métabolites éventuels produits dans chaque cas. (Souche 14b-13)

Annexe III -Manipulations prospectives-

1) L'UTILISATION D'EAU DE NUAGE

L'incubation d'eau de nuage ensemencée avec une biomasse contrôlée et le suivi le la composition chimique au cours du temps a été tentée par Matthieu Ménager lors de son stage de DEA. Le contrôle du contenu microbien nécessite de stériliser l'échantillon de nuage et ce point a posé problème. Plusieurs procédés de stérilisation existent et pourraient être appliqués ici, notamment l'autoclavage et la filtration. Les deux ont été essayés, mais l'analyse par RMN ^{1}H a révélé une modification de la composition chimique globale à la suite de ces traitements. Dans le cas de la filtration, il s'agit moins de relarguage de composés par le filtre que d'une contamination à l'éthanol, utilisé pour nettoyer la hotte à flux laminaire. Ces expériences n'ont donc finalement pas pu être réalisées, mais il serait intéressant de poursuivre les investigations dans cette direction.

2) LA RECONSTITUTION D'EAU DE NUAGE ARTIFICIELLE

Alternativement à l'utilisation d'eau de nuage réelle, celle-ci peut être artificiellement reconstituée, au moins partiellement. La difficulté dans la reconstitution d'eau de nuage est de conserver les proportions relatives de chaque composé. Pour des raisons pratiques, une formule d'eau de nuage artificielle 10 fois plus concentrée que l'eau de nuage réelle est reconstituée, dont la composition est donnée dans le tableau Annexe-38 ci-dessous. Cette solution est elle-même préparée à partir d'une solution mère encore 100 fois plus concentrée (donc 1000 fois plus que de l'eau de nuage réelle).

Composé	Masse molaire (g mol^{-1})	Concentration (µmol L^{-1})	Apport en anion (µmol L^{-1})		Apport en cation (µmol L^{-1})		q.s.p. 200 mL de miileu 100X (mg)
Acétate de Na	82,05	80	80	Acétate	80	Na^+	131,3
Formiate de Na	68,01	100	100	Formiate	100	Na^+	136,0
Succinate de Na	270,1	10	10	Succinate	20	Na^+	54,0
Acide lactique	90	14	14	Lactate	-	-	25,2
NO_3NH_4	80	750	750	NO_3^-	750	NH_4^+	1200,0
$MgCl_2$	95,3	60	120	Cl^-	60	Mg^{2+}	114,4
$CaSO_4$	136	70	70	SO_4^{2-}	70	Ca^{2+}	190,4
$(NH_4)_2SO_4$	132	300	300	SO_4^{2-}	600	NH_4^+	792,0
KCl	74,6	50	50	Cl^-	50	K^+	74,6
NaCl	58,5	100	100	Cl^-	100	Na^+	117,0
HCl	36,5	300	300	Cl^-	-		219,0

Tableau Annexe-38 : Composition de l'eau de nuage artificielle et préparation du milieu 100X (à diluer par 100 pour préparer la solution finale 10 fois plus concentrée que l'eau de nuage réel)

Le tableau Annexe-39 ci-dessous montre la proportion entre la concentration de chacun des composés mis en solution par rapport à leur concentration dans l'eau de nuage réelle.

Composé	Formule	Concentration dans le nuage (µmol L^{-1})	Concentration dans le milieu (µmol L^{-1})	Rapport de concentrations (milieu / nuage)
Ammonium	NH_4^+	147,3	1350	9,2
Potassium	K^+	4,5	50	11,1
Sodium	Na^+	28,7	300	10,5
Magnésium	Mg^{2+}	5,8	60	10,4
Calcium	Ca^{2+}	7,3	70	9,6
Nitrate	NO_3^-	103,5	750	7,2
Chloride	Cl^-	59,4	570	9,6
Sulphate	SO_4^{2-}	42,5	370	8,7
Acide lactique	CH_3-CHOH-COOH	1,4	14	9,8
Acide acétique	CH_3-COOH	8,2	80	9,7
Acide formique	HCOOH	9,7	100	10,3
Acide succinique	HOOC-CH_2-CH_2-COOH	1,1	10	9,3

Tableau Annexe-39 : Concentration des constituants principaux de l'eau de nuage réelle, et concentrations absolue et relative de l'eau de nuage artificielle.

Ce milieu est préparé avec de l'eau distillée ultrapure et prend en considération les composés principaux trouvés dans l'eau de nuage. Il omet donc la présence de nombreux composés inorganiques et organiques (nitrites, propionate, oxalate…), qui pourraient pourtant jouer un rôle au niveau de l'activité microbiologique, par leur toxicité ou leur implication comme cofacteurs du métabolisme. Pour cette raison, il serait peut être judicieux d'enrichir de l'eau de nuage réelle avec cette solution, une fois les problèmes de stérilisation résolus.

3) LA « MACHINE A NUAGE »

Le fait que toutes les expériences soient réalisées en un milieu plan (« bulk »), alors que l'eau de nuage est distribuée en un système dynamique de gouttelettes gêne l'extrapolation des résultats et suscite les critique. Afin d'y répondre, il est nécessaire de pouvoir travailler en laboratoire sur un nuage artificiellement reconstitué. Pour cela, il a été tenté à la fin de cette thèse de développer un instrument avec lequel une solution peut être pulvérisée, tout en permettant des prélèvements faciles et des conditions biotiques et abiotiques contrôlées. Des appareils à nébuliser existe déjà, mais ne permettent pas des analyses microbiologiques (diamètre du pore de pulvérisation trop petit, matériaux utilisés). Aucun matériel n'a été acquis pour cela : un pulvérisateur de chimiste en verre fonctionnant à l'air comprimé est utilisé, placé dans un fermenteur d'environ 50 litres constituant le corps, et fermé par le couvercle rodé d'une cloche de dessiccation (figure Annexe-81). Le mieux serait de travailler en système fermé, avec une pompe à air (à membrane) permettant l'alimentation du pulvérisateur et aspirant l'air depuis le corps de l'instrument. Cependant, cela nécessite une pompe à air capable de supporter la présence d'eau en quantité importante, dont le débit est réglable et que l'on puisse stériliser, ce qui ne semble pas exister. L'alimentation générale en air comprimé du laboratoire a donc été utilisée, mais cette entrée d'air doit être filtrée contre les contaminations microbiennes et chimiques, et implique une sortie d'air. Celle-ci se trouve au centre du couvercle, surmonté de 3 condensateurs rodés superposés pour limiter les pertes en eau sans empêcher la sortie de l'air. Cette sortie sert également au passage du tuyau d'alimentation du pulvérisateur en air comprimé. L'ensemble du matériel peut être stérilisé facilement.

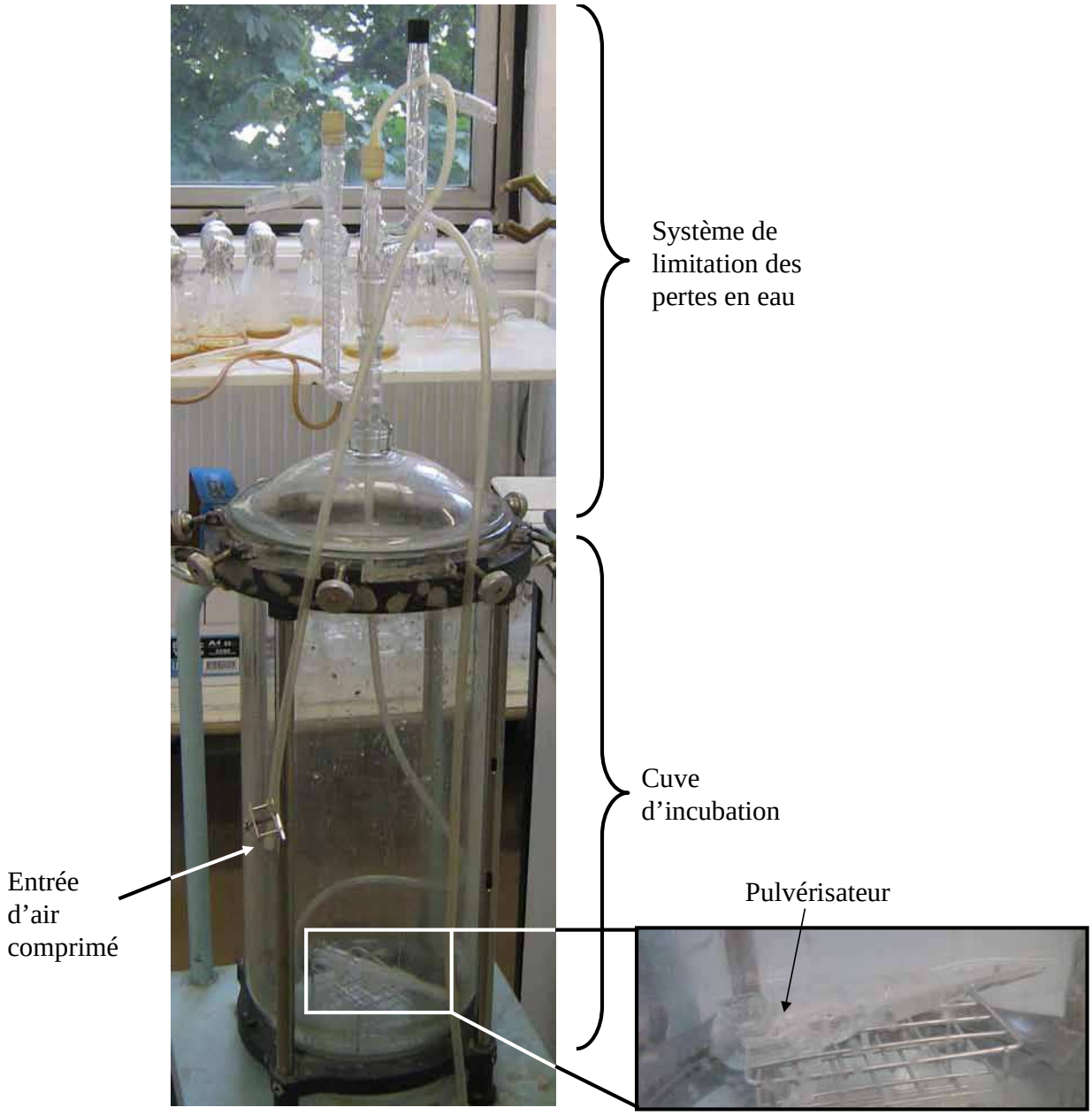


Figure Annexe-81 : « Machine à nuage », différentes parties et détail du pulvérisateur.

Une solution peut-être pulvérisée en continu : les gouttelettes se déposent sur les parois et s'écoulent jusqu'au fond pour être pulvérisées de nouveau. Le fond de la cuve est concave, ce qui facilite le pompage en continu de la solution, et permet de travailler avec un petit volume de solution dont la quasi-totalité est en suspension dans l'air.

Les essais montrent que le débit d'air doit être réglé à en environ 10 L min^{-1} maximum pour ne pas risquer d'endommager le pulvérisateur ou de désolidariser le système (une soupape de sécurité est installée). Le débit en eau (ou en solution) est, pour un débit d'air de 6 L min^{-1}, de 17 mL min^{-1}. Des mesures microphysiques (LWC, rayon des gouttelettes) ont également été réalisées avec un Gerber PVM-100A (figure Annexe-82).

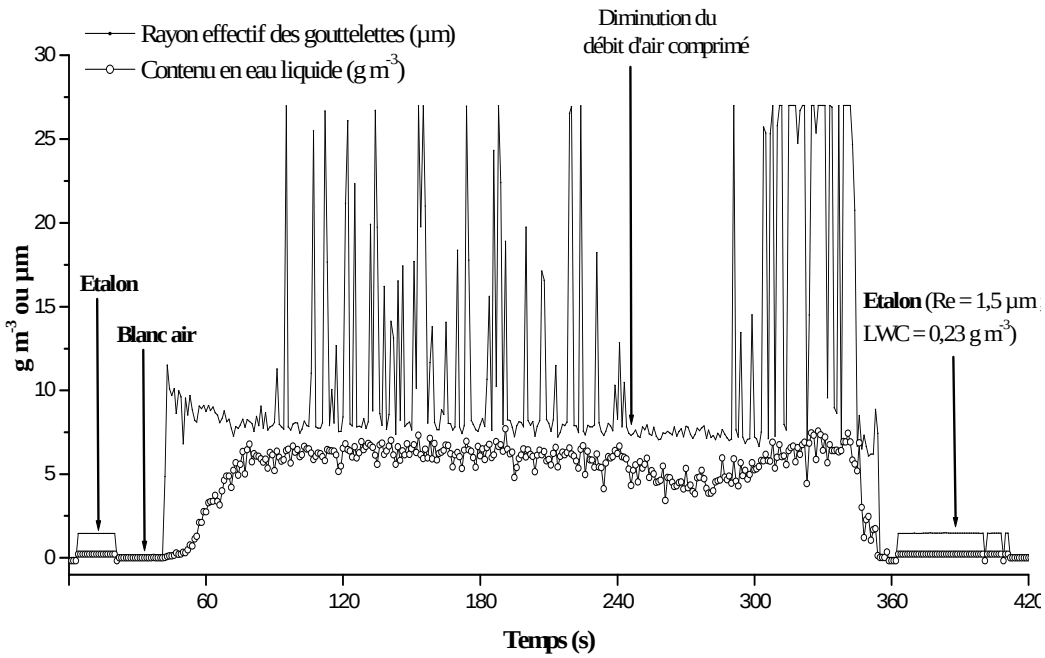


Figure Annexe-82 : Mesures des caractéristiques du nuage produit (rayon des gouttelettes et contenu en eau liquide (LWC)), réalisées avec le Gerber PVM-100.

L'instrument utilisé pour les mesures microphysiques est spécialement conçu pour être aéroporté, ce qui n'était évidemment pas le cas ici et peut influer sur les mesures faites. La teneur en eau liquide mesurée est très importante, et stable autour de 6 g mL^{-1} (plus de 10 fois celle des nuages réels rencontrés au sommet du puy de Dôme). Les gouttelettes produites ont un diamètre minimum de 7 µm, qui augmente quand le débit d'air est augmenté, jusqu'à dépasser la limite de mesure de l'instrument (> 27 µm). Le nuage produit est donc très dense, mais les gouttelettes sont de taille comparable à celles des nuages.

Un tel appareillage peut permettre de considérer le stress provoqué par l'aérosolisation des micro-organismes lors des tests de biodégradation, et les éventuelles modifications du métabolisme et de la chimie engendrées par la formation de gouttelettes.

Le fait de ne pas travailler en système totalement fermé constitue le problème majeur de cet appareil. En effet, une importante évaporation, de l'ordre de 50 mL en 12 heures, est premièrement constatée malgré le système de limitation des pertes installé. En conséquence, les composés chimiques non volatils se concentrent dans la solution, comme le montre la figure Annexe-83 ci-dessous pour de la pulvérisation d'eau de nuage artificielle. On observe qu'après 18 heures de pulvérisation en continu, les concentrations des différents composés sont généralement multipliées par plus de 10. Les concentrations en chlore et en lactate sont même environ 100 fois plus importantes que dans la solution de départ.

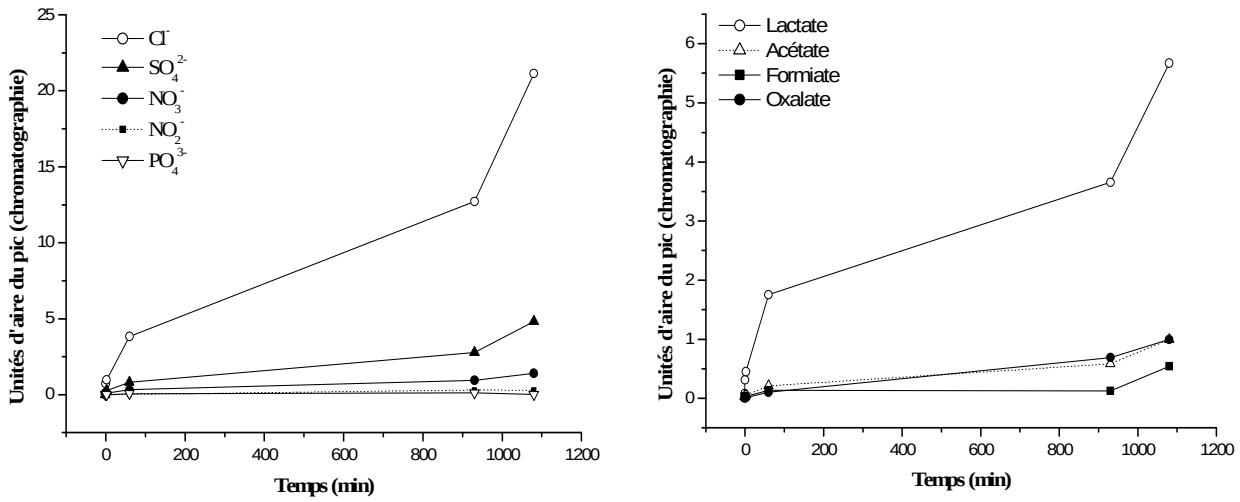


Figure Annexe-83 : Evolution des concentrations en composés inorganiques (à gauche) et des acides organiques (à droite) au cours du temps dans l'eau de nuage artificielle pulvérisée dans la « machine à nuage » (en unités d'aire de chromatographie ionique, proportionnelle pour un même composé à sa concentration).

La phase gaz de ce nuage artificiel n'est pas contrôlée, ce qui influe certainement sur la composition de la phase aqueuse. Ce point reste à résoudre pour rendre la « machine à nuage » opérationnelle. Cependant, l'expérience n'a pas été tentée en présence de micro-organismes, qui pourraient conduire à diminuer les concentrations en acides organiques malgré cette concentration sous l'effet de l'évaporation, ce qui prouverait de toute évidence leur activité même dans des gouttelettes en suspension. Le contrôle de l'air comprimé utilisé nécessite l'acquisition de gaz de qualité connue. De plus, Les essais ont été réalisés à température ambiante, en été, et ce phénomène devrait être moindre à 5°C. Enfin l'évaporation doit pouvoir être significativement réduite en plaçant l'appareillage dans une enceinte déjà saturée en vapeur d'eau.

Annexe IV -Campagne polaire CHIMERPOL II-

Dans le cadre d'une campagne d'étude de la chimie de mercure en zone polaire (CHIMERPOL II) menée au printemps 2004 par l'équipe de Christophe Ferrari du Laboratoire de Glaciologie et Géophysique de l'Environnement de Grenoble (LGGE), des prélèvements de neige ont été réalisés à Ny-Ålesund et ses environs. Il s'agit d'une base scientifique située sur l'île du Spitzberg, dans le comté du Svalbard (au nord de la Norvège). Le but de ces prèlèvements était de caractériser d'un point de vue microbiologique le manteau neigeux d'un site Arctique avant la fonte, et d'isoler éventuellement des souches pour des investigations de laboratoire. En effet, la zone polaire Arctique connaît à l'heure actuelle une importante pollution au mercure, qui touche les écosystèmes et finalement les populations humaines locales. On sait que la chimie du mercure en zone polaire est spéciale : des « pluies de mercure » (Mercury Depletion Events, MDEs) se produisent au printemps polaire, conduisant à un important dépôt de mercure sur la neige à partir de mercure atmosphérique. Pourtant, le lien entre cette chimie et la pollution constatée n'est pas établi, et il pourrait impliquer les micro-organismes présents dans la neige, qui constitueraient le moyen d'entrée du mercure dans les écosystèmes lors de la fonte, soit en le fixant, soit en le transformant en une forme de mercure très toxique et biodisponible. Ce travail a premièrement donné lieu à une publication dans *FEMS Microbiology Ecology* (Amato et al., 2007b) où il est question du contenu microbien du manteau neigeux. Les résultats encourageants ont finalement permis l'attribution d'une thèse sur ce sujet au LGGE (Raphaëlle Hennebelle).

Cette composante microbiologique dans la campagne était relativement anecdotique au départ car greffée à une étude de la chimie atmosphérique du mercure et des radionucléides atmosphériques. Elle devait permettre d'établir si une étude plus importante pouvait être envisagée, tout en renseignant sur la microbiologie de la neige, très peu connue, particulièrement pour ce site. Il s'agissait donc d'une opportunité de taille, permettant une expérience scientifique et personnelle exceptionnelle. Les manipulations de terrain se sont en plus révélées palpitantes, bien qu'éprouvantes physiquement (surtout que les manipulations de microbiologie nécessitent de travailler à mains nues, ou pire, avec des gants en latex qui écrasent les doigts). Pour conclure, cela reste une expérience personnelle inoubliable, à réitérer dès que possible.

Résumé de la publication :

Deux sites de prélèvements ont été choisis : le premier concerne un glacier situé à environ 40 km de Ny-Ålesund, à l'intérieur des terres ; le second est localisé dans les environs directs de la base, donc à proximité de la mer. Les dénombrements cellulaires (DAPI) montrent une concentration batérienne relativement constante le long du manteau neigeux du glacier, de l'ordre de 2 x 10^4 cellules mL^{-1}. Mais on constate également que la couche de glace correspondant à la surface du glacier de l'année précédente présente une concentration bactérienne 10 fois plus élevée, ce qui suggère un développement microbien à la surface du glacier pendant l'été (une microcouche liquide est peut-être présente), et à leur accumulation sous l'influence également des dépôts atmosphériques pendant cette période.

Pour le site côtier près de Ny-Ålesund, 6 x 10^4 bactéries mL^{-1} de neige ont été dénombrées. Des souches ont pu être cultivées à partir de neige provenant de ce deuxième site, grâce à des cultures par enrichissement de la neige fondue. Elles concernent des espèces bactériennes et des levures. Les bactéries ont, pour la plupart, été identifiées (séquençage ADNr 16S) (d'autres ont été perdues avant leur identification), mais les levures restent en majeure partie indéterminées (CBS). Les bactéries sont des Alpha, Beta et Gamma Proteobacteria, des Firmicutes et des Actinobacteria. Deux souches s'avèrent très éloignées des souches connues, avec une homologie de seulement 95% avec les plus proches voisins dont la séquence 16S est présente dans les bangues génomiques. L'ensemble des séquences a été déposé dans la banque GenBank.

Des investigations métaboliques ont été réalisées sur ces souches, en testant leur aptitude à dégrader, en conditions optimales de température, des acides organiques présents dans la neige. La méthode employée est similaire à celle qui a été utilisée pour les souches des nuages. Les résultats montrent d'importantes capacités de dégradation, et il semble donc qu'une croissance bactérienne des communautés de la neige au moment de sa fonte puisse se produire à partir des nutriments présents.

Amato P., Hennebelle R., Magand O., Sancelme M., Delort A-M., Barbante C., Boutron C. & Ferrari C. (2007b). Bacterial characterization of the snow cover at Spitzberg, Svalbard. *FEMS Microbiology Ecology* 59, 255-264

Table des illustrations

-Tableaux-

Tableau 1 : Concentrations en cellules bactériennes et fongiques **totales** dans des prélèvements atmosphériques (aérosols, nuages et précipitations) pour différents sites, classés par concentration croissante pour chaque type de masses d'air. 32
Tableau 2 : Concentrations en cellules bactériennes et fongiques **cultivées** à partir de prélèvements atmosphériques (aérosols et brouillard) pour différents sites, classés par concentration croissante pour chaque type de masse d'air. 32
Tableau 3 : Récapitulation des influences abiotiques connues sur le nombre de cellules totales et cultivées dans les échantillons atmosphériques. 41
Tableau 4 : Genres bactériens retrouvés dans des échantillons atmosphériques (les espèces sont précisées quand elles sont connues). Références : [1] Angulo-Romero et al. (1999) ; [2] Ariya et al. (2002); [3] Burch & Levetin (2002) ; [4] Fulton (1966a ; b ; c) ; [5] Fuzzi et al. (1997) ; [6] Harrisson et al. (2005) ; [7] Imshenetsky et al. (1978) ; [8] Jones & Cookson (1983) ; [9] Juozaitis et al. (1998) ; [10] Katial et al. (1997) ; [11] Mancinelli & Shulls (1978) ; [12] Maron et al. (2005) [13] Newman (1948) ; [14] Radon et al. (2002) ; [15] Sabariego et al. (2000) ; [16] Shaffer & Lighthart (1997) ; [17] Tong et al. (1993); [18] Zhang et al. (2002). (Toutes les études utilisent des méthodes culturales sauf [6] et [12]. [18] concerne un glacier d'altitude)..... 43
Tableau 5 : Genres fongiques (champignons et levures) retrouvés dans des échantillons atmosphériques. Voir la légende du tableau 4 pour le détail des références..... 43
Tableau 6 : Valeurs de concentrations en $\mu g\ mL^{-1}$ des principaux composés mesurés dans l'eau de nuage pour différents sites, classés par altitude croissante..... 77
Tableau 7 : Concentrations en composés organiques mesurées dans des échantillons de nuage et de pluie dans différentes études..... 78
Tableau 8 : Principales réactions radicalaires de la chimie en phase aqueuse des acides acétique et formique, du méthanol, et du formaldéhyde, et valeurs des constantes cinétiques associées..... 80
Tableau 9 : Temps de vie de différents acides carboxyliques estimés à partir des vitesses de réaction associées à différentes voies de dégradation. $[OH^{\bullet}]$, $[HO_2^{\bullet}]$ et $[O_3]$ mises en jeu sont estimées à partir de leur constante de Henry, et sont respectivement égales à (0,5-2) x 10^{-13}, 6,0 x 10^{-8} et 1,0 x 10^{-9} mol L^{-1}. (D'après Ariya et al., 2002)..... 82
Tableau 10 : Valeurs de concentrations en ATP mesurées et calculées d'après les concentrations en micro-organismes totaux pour chaque évènement..... 116
Tableau 11 : Comparaison entre l'influence de la saison et du type de masse d'air sur les contenus bactérien et fongique. Effet saison : R > 0 pour augmentation pendant la période été-automne ; Effet masse d'air : R > 0 pour augmentation quand le niveau d'influence océanique diminue. 122
Tableau 12 : Type de source des plus proches voisins des souches bactériennes isolées identifiées. 147
Tableau 13 : Composés testés et concentrations utilisées et mesurées dans les échantillons d'eau de nuage collectés au sommet du puy de Dôme. (**a** : solution commerciale de formaldéhyde stabilisée au méthanol ; **b** : Suzuki et al., 1998, dans un brouillard pollué). 153

Tableau 14 : Liste des tests métaboliques réalisés. **F** : formiate ; **A** : acétate ; **L** : lactate ; **S** : succinate ; **f/MeOH** : mélange formaldéhyde/méthanol ; **f^{13}C** : formaldéhyde marqué au carbone 13, **MeOH seul** : méthanol. 154
Tableau 15 : Signaux des métabolites produits (ou composés relargués) en rapport avec la dégradation des acides carboxyliques par les différentes souches (liste des souches non exhaustive). (**n.a*** non attribué). 171
Tableau 16 : Métabolites produits (ou composés relargués) lors de la dégradation du mélange formaldéhyde/méthanol et de formaldéhyde ^{13}C par les différentes souches (liste des souches non exhaustive). Dans le cas du formaldéhyde ^{13}C, seuls les composés marqués sont indiqués. (**n.a*** non attribué)..... 175
Tableau 17 : Vitesses de biotransformation des acides carboxyliques par 5 souches sélectionnées, et données associées aux calculs. **7b-13** : *Sphingomonas* sp. ; **13b-3** : *Pseudomonas graminis* ; **14b-1** : Levure rose ; **14b-2** : *Pseudomonas* sp. ; **14b-14** : *Pseudomonas viridiflava*. Les valeurs de vitesse sont généralement environ 100 fois plus importantes pour la souche 14b-1, une levure, que pour les bactéries en raison de l'unité utilisée exprimée en nombre de cellules. 192
Tableau 18 : Vitesses de biotransformation du formiate, du formaldéhyde et du méthanol à 5°C et 17°C, déterminées à partir des cinétiques détaillées du formaldéhyde ^{13}C pour le formaldéhyde. **14b-13** : *Frigoribacterium* sp. ; **12b-8** : *Pseudomonas syringae* ; **13b-3** : *P. graminis*. 196
Tableau 19 : Conditions utilisées pour l'extrapolation des valeurs de vitesse. 196
Tableau 20 : Récapitulatif des vitesses de dégradation des acides carboxyliques **à 5°C**, quantité dégradée en 24 heures par B_B= 5 x 10^7 bactéries (5 x 10^4 mL^{-1}) ou B_L= 5 x 10^5 levures (5 x 10^2 mL^{-1}), et temps de vie correspondants dans le nuage (temps pour dégrader 100 % de la quantité considérée dans le nuage, en jours). Une valeur moyenne est donnée en dernière ligne, calculée à partir de la vitesse moyenne des bactéries, à laquelle est ajoutée celle de la levure. Le temps de vie donnée correspond donc à un nuage moyen aux niveaux microbiologique (quantitativement) et chimique. Pour le calcul avec le lactate, les valeurs de vitesse de dégradation du L-lactate et du D-lactate sont additionnées. **7b-13** : *Sphingomonas* sp. ; **13b-3** : *Pseudomonas graminis* ; **14b-2** : *P.* sp. ; **14b-14** *: P. viridiflava*; **12b-8** : *P. syringae* ; **14b-13** : *Frigoribacterium* sp. ; **14b-1** : levure rose non identifiée. 198
Tableau 21: Récapitulatif des vitesses de dégradation des acides carboxyliques **à 17°C**, quantité dégradée en 24 heures par B_B= 5 x 10^7 bactéries (5 x 10^4 mL^{-1}) ou B_L= 5 x 10^5 levures (5 x 10^2 mL^{-1}), et temps de vie correspondants dans le nuage (temps pour dégrader 100 % de la quantté considérée dans le nuage, en jours). Une valeur moyenne est donnée en dernière ligne, calculée à partir de la vitesse moyenne des bactéries, à laquelle est ajoutée celle de la levure. Le temps de vie donnée correspond donc à un nuage moyen aux niveaux microbiologique (quantitativement) et chimique. Pour le calcul avec le lactate, les valeurs de vitesse de dégradation du L-lactate et du D-lactate sont additionnées. **7b-13** : *Sphingomonas* sp. ; **13b-3** : *Pseudomonas graminis* ; **14b-2** : *P.* sp. ; **14b-14** *: P. viridiflava*; **12b-8** : *P. syringae* ; **14b-13** : *Frigoribacterium* sp. ; **14b-1** : levure rose non identifiée. 199
Tableau 22 : Récapitulatif des vitesses de dégradation du méthanol et du formaldéhyde **à 5°C et à 17°C**, quantité dégradée en 24 heures par B_B= 5 x 10^7 bactéries (5 x 10^4 bactéries mL^{-1}) et temps de vie correspondants dans le nuage (temps pour dégrader 100 % de la concentration considérée dans le nuage). Une valeur moyenne est donnée en dernière ligne, calculée à partir de la vitesse moyenne des bactéries. **13b-3** : *Pseudomonas graminis* ; **12b-8** : *P. syringae* ; **14b-13** : *Frigoribacterium* sp.. 200

Tableau 23 : Influence de la température sur l'activité de dégradation de chaque substrat par l'ensemble des souches considérées dans les calculs. 201
Tableau 24 : Rapports entre les concentrations en cellules et en substrat pour les différents tests réalisés et dans l'eau de nuage (dernière ligne). Le méthanol n'est pas renseigné car il n'est pas mesuré dans les échantillons de nuage considérés. 202
Tableau Annexe-25 : Principales paramètres collectés pour caractériser les échantillons de nuage, et manipulations complémentaires de microbiologie réalisées au cours de cette étude. 223
Tableau Annexe-26 : Différents composés testés et quantité à utiliser pour préparer 30 mL de milieu d'incubation à la concentration voulue. 251
Tableau Annexe-27 : Modifications apportées aux protocoles au cours de la thèse. 261
Tableau Annexe-28 : Données microbiologiques et physico-chimiques des échantillons de nuage. 264
Tableau Annexe-29 : Souches bactériennes isolées des échantillons d'eau de nuage, et numéros d'accession des séquences correspondantes, déposées dans la banque génomique GenBank (accès depuis http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, chercher « **Nucleotide** », et le mot clé « **PDD** » permet d'accéder à l'ensemble des séquences). Certaines souches restent non identifiées, soit à cause d'un séquençage insuffisant, soit pour des raisons de problèmes d'amplification par PCR. (7b-3 : champignon, remplacé par 7c-3 ; 7b-10 : n'existe pas). 265
Tableau Annexe-30 : Souches fongiques (champignons et levures) isolées des échantillons d'eau de nuage et identifications données par CBS. (14c-3 n'existe pas). 266
Tableau Annexe-31 : Résultats des tests de croissances à différentes températures. Un indice de vitesse, en unité de densité optique par heure, est calculé dans chaque cas, ainsi que les rapports entre les indices obtenus pour chaque température. Les températures de 5°C, 17°C et 27°C sont comparées. Un rapport d'indices supérieur à 1,0 indique une meilleure croissance à la plus froide des 2 températures considérées. La température de préculture est précisée dans chaque cas. 267
Tableau Annexe-32 : Conditions et résultats des tests de biodégradation menés de façon systématique (« screenings »). (Evolution de la concentration au cours du temps et pourcentages de biodégradation correspondants). 272
Tableau Annexe-33 : Proportion de composé biodégradé après 24 heures pour l'ensemble ds souches, classées par température et par phylum, pour les mêmes tests que ceux présentés dans le tableau Annexe-32. 273
Tableau Annexe-34 : Résultats des tests de biodégradation réalisés à 5°C et 17°C pour déterminer l'influence de la température. (Evolution de la concentration au cours du temps et pourcentages de biodégradation correspondants). 274
Tableau Annexe-35 : Tests de biodégradation de 3 souches sélectionnées en conditions optimales, en présence de formaldéhyde ^{13}C ou de méthanol seul (évolution de la concentration au cours du temps). 275
Tableau Annexe-36 : Biodégradation de formaldéhyde ^{13}C, de méthanol seul et de formiate à 5°C et 17°C, et concentrations des métabolites éventuels produits dans chaque cas. (Souches 12b-8, 5b-5 et 13b-3). 275
Tableau Annexe-37 : Cinétique détailée de biodégradation de formaldéhyde ^{13}C, méthanol seul et formiate à 5°C et 17°C, et concentrations de métabolites éventuels produits dans chaque cas. (Souche 14b-13) 276
Tableau Annexe-38 : Composition de l'eau de nuage artificielle et préparation du milieu 100X (à diluer par 100 pour préparer la solution finale 10 fois plus concentrée que l'eau de nuage réel) 277

Tableau Annexe-39 : Concentration des constituants principaux de l'eau de nuage réelle, et concentrations absolue et relative de l'eau de nuage artificielle. 278

-FIGURES-

Figure 1 : Différents types de bioaérosols vus au microscope électronique à balayage. **A et B** : Ecailles d'insectes ; **C** : Conidie de *Penicillium* ou d'*Aspergillus* ; **D** : Conidie de *Cladosporium herbarum* ; **E et F** : Bactéries ; **G et H** : Brochosomes. (Wittmaack et al., 2005)..... 16
Figure 2 : Distribution du nombre de bioaérosols en fonction de leur taille. **(a)** au niveau du sol, à 800 m d'altitude et dans l'eau de nuage (N cm^{-3}); **(b)** dans l'eau de nuage et l'eau de pluie (N.mL^{-1}). L'unité utilisée en ordonnée correspond au nombre de particules normalisé par le log de leur rayon ; **PBAP** : Primary Biological Aerosol Particles. (Matthias-Maser et al., 2000). 17
Figure 3 : Impacteur Andersen à 6 étages. **(a)** Corps de l'appareil ; **(b)** Schéma en coupe montrant les boites de Pétri disposées sur les 6 étages de l'impacteur et le trajet de l'air aspiré. Gammes de tailles : étage 1 : > 8,2 µm ; étage 2 : de 5,0 à 10,4 µm ; étage 3 : 3,0 à 6,0 µm ; étage 4 : 2,0 à 3,5 µm ; étage 5 : 1,0 à 2,0 µm ; étage 6 : < 1,0 µm. (Andersen, 1958)..... 19
Figure 4 : L'Agar Drum Sampler conçu pour le suivi temporel des micro-organismes cultivables de l'air. **(a)** Corps de l'instrument, avec l'entrée d'air latérale et la sortie d'air sur le couvercle, ainsi que la pompe et le moteur entraînant la rotation du cylindre. **(b)** Cylindre de collecte enduit de milieu de culture gélosé, montrant, après incubation, un prélèvement de 26 minutes réalisé dans une pièce où ont été aérosolisées des cellules de *Serratia marcescens*. (D'après Andersen & Andersen, 1962). 20
Figure 5 : Schémas d'un Impinger AGI-30 classique (**A**) et du modèle amélioré proposé (**B**). (Lin et al., 1999). 21
Figure 6 : Schéma en coupe et photographies sur site (corps et ensemble opérationnel tige/vase de collecte) de l'impacteur à gouttelette. (Schéma en coupe d'après Kruisz et al., 1993)..... 22
Figure 7 : Processus d'aérosolisation consécutif au phénomène de bullage. **(a)** Bulle d'air au contact de la surface d'un liquide ; **(b)** explosion de la bulle au contact de la surface et génération de gouttelettes. (Blanchard & Syzdek, 1982). 25
Figure 8 : Comparaison entre les facteurs de concentration (CF) obtenus pour deux souches bactériennes, en fonction de la taille des gouttes générées par bullage. **(A)** *Serratia marinorubra* et **(B)** *Micrococcus euryhalis*. (Hejkal et al., 1980). 26
Figure 9 : Abondances bactériennes **(à gauche)** et virales **(à droite)** moyennes dans trois compartiments de l'interface air-mer : l'eau sub-surfacique, la microcouche de surface de l'eau et l'air. (Aller et al., 2005)..... 26
Figure 10 : (a) Agrégat bactérien provenant d'un prélèvement atmosphérique proche de l'océan (MEB). Le diamètre de cet amas est d'environ 2,8 µm. **(b)** Distribution relative des particules avec lesquelles sont associées les cellules bactériennes dans l'air (en % du nombre de bactéries cultivées dénombrées). Détail pour différentes classes de tailles (**à gauche**), et répartition entre les premières classes de tailles (D < 1,1 µm) et les plus grosses particules (2,1 µm < D < 7,0 µm) (**à droite**). (Lighthart, 1997). 27
Figure 11 : Variation annuelle de concentration en bactéries et en champignons cultivés, dans une zone urbaine. (Lighthart, 1997). 34
Figure 12 : Dénombrements des bactéries cultivées en été à 1,5 m du sol au dessus d'une prairie (moyenne sur 15 jours consécutifs). (Résultats dans Lighthart & Shaffer, 1995b, figure tirée de Lighthart & Shaffer 1995a)..... 35
Figure 13 : Représentation schématique des variations diurnes et annuelles de la concentration en bactéries cultivées en air libre. (Lighthart, 1999). 36

Figure 14 : Représentation schématique expliquant les variations saisonnières d'abondance des bactéries cultivées en air libre, aux deux périodes extrêmes de l'année, le solstice d'été et le solstice d'hiver. (Lighthart, 1999). 37
Figure 15 : Influence de la température sur la concentration en bactéries dans l'air, pour un site rural (points) et régression obtenue à partir des données d'un site côtier (ligne). (Harrison et al., 2005). 38
Figure 16 : Variations de la température (**courbe, échelle de droite**) et de la concentration en micro-organismes cultivés (bactéries + champignons) (**histogramme, échelle de gauche**) dans le brouillard. (Fuzzi et al. 1997)..... 38
Figure 17 : Influence de la vitesse du vent sur la concentration en spores fongiques dans l'air (Burch & Levetin, 2002). 39
Figure 18 : Relations entre la concentration en bactéries non-sporulantes et le pH (●) et la concentration en plomb (○) mesurés dans l' eau de brouillard en zone urbaine. (Fuzzi et al., 1997)..... 40
Figure 19 : Empreinte génétique ADN de la séquence intergénique située entre les gènes *rrs* et *rrl* pour 2 échantillons d'air de la région de Nancy (France) obtenus par fingerprinting (Maron et al., 2005)..... 41
Figure 20 : Composition de la population bactérienne d'un échantillon d'air (d'après Maron et al., 2005)..... 42
Figure 21 : Schéma récapitulatif des facteurs de stress et de mortalité microbienne dans l'atmosphère. 45
Figure 22 : Concentrations en cellules totales, viables et cultivables au cours d' une période de privation nutritionnelle. (●) Dénombrements par étalements sur milieu de culture ; (○) comptages directs par microscopie ; (△) nombre estimé par mesure de la respiration (^{14}C) (d'après Kurath & Morita, 1983). 47
Figure 23 : Photographies de colonies bactériennes isolées d'eau de mer observées en microscopie optique, après 24 heures d'incubation à 20°C. (**a**) Deux colonies bactériennes : une colonie de taille habituelle, en bas à droite, et une ultramicrocolonie, formée d'ultramicrobactéries, au centre. (**b**) Contact entre les deux colonies ; l'ultramicrocolonie est « phagocytée » par la colonie de cellules « normales ». Taille de la barre = 5 µm. (Torrella & Morita, 1981). 49
Figure 24 : Schéma modèle simplifié de la régulation de la réponse au stress chez les bactéries à Gram négatif. (D'après Duguay & Silhavy, 2004). 50
Figure 25 : Courbes de croissances représentatives (**a**) d'une souche très sensible, (**b**) assez sensible, (**c**) assez résistante et (**d**) très résistante à la lumière solaire. (Aguogé et al., 2005)..... 53
Figure 26 : Effet de la concentration en NaCl sur la production de caroténoïdes par la souche psychrotrophe *Arthrobacter agilis* MB813. (Fong et al., 2001). 54
Figure 27 : Evolution de la fraction de cellules viables par agrégat cellulaire après pulvérisation d'une suspension de cellules sur une feuille. **(a)** En condition humides (temps 0 j (◆), 3 j (◇), 4 j (△), 5 j (○) et 7 j (□)) ; **(b)** après des cycles de dessiccation de 8 heures avant les prélèvements au temps 3, 4 et 5 jours (temps 0 j (▲), 3 j (■), 4 j (○), 5 j (×) et 7 j (◆)). (Monier & Lindow, 2003)..... 55
Figure 28 : Effet de la température de culture sur la production de caroténoïdes par la souche psychrotrophe *Arthrobacter agilis* MB813. (Fong et al., 2001). 58
Figure 29 : (**a**) Densités optiques mesurées après 80 h de culture à différentes températures d'une souche psychrophile de *Vibrio* sp. (Morita, 1975) ; (**b**) évolution de la vitesse de croissance avec la température chez le psychrotrophe *Arthrobacter agilis* MB813 (Fong et al., 2001)..... 59

Figure 30 : Effet de la température sur l'activité catalytique d'une α-amylase psychrophile (*Pseudoalteromonas haloplanktis* (○) et mésophile *Bacillus amyloliquefaciens* (●). (Hoyoux et al., 2004)..... 60
Figure 31 : Le cycle de Krebs. Les composés retrouvés dans les nuages sont entourés en rouge..... 62
Figure 32 : Métabolisme du glyoxylate et des acides dicarboxyliques. Les composés retrouvés dans les nuages sont entourés en rouge..... 63
Figure 33 : Métabolisme du pyruvate. Les composés retrouvés dans les nuages sont entourés en rouge..... 63
Figure 34 : La glycolyse et la néo-glucogénèse. Les composés retrouvés dans les nuages sont entourés en rouge..... 64
Figure 35 : Métabolisme bactérien des composés en C_1 et enzymes impliquées connues. 65
Figure 36 : Voie d'oxydation du méthane en méthanol, puis en formaldéhyde. **sMMO** : méthane mono-oxygénase soluble ; **pMMO** : méthane mono-oxygénase particulaire ; **MDH** méthanol déhydrogénase. (D'après Hanson & Hanson, 1996). 66
Figure 37 : Voies d'assimilation du formaldéhyde par (**a**) la voie du ribulose monophosphate (RuMP) et (**b**) le voie de la sérine (**STHM** : sérine hydroxyméthyl-transférase ; **HPR** : hydroxypyruvate réductase ; **MTK** : malate thiokinase ; **MCL** : malyl coenzyme A lyase). (D'après Hanson & Hanson, 1996). 68
Figure 38 : Voies de dismutation du formaldéhyde en formiate et méthanol, catalysées par (**a**) une oxydo-réductase NAD^+ dépendante ou (**b**) la formaldéhyde dismutase. 69
Figure 39 : Différentes voies linéaires d'oxydation du formaldéhyde chez *Methylobacterium extorquens* AM1 et *Paracoccus denitrificans* et leurs cofacteurs associés. **MtdA** : NADP-dependent methylene-H_4MPT dehydrogenase ; **Fch** : methenyl-H_4F cyclohydrolase ; **Fhs** : formyl-H_4F synthetase ; **FDH** : formate dehydrogenase ; **Fae** : H_4MPT-dependent formaldehyde activating enzyme ; **MtdB** : NAD(P)-dependent methylene-H_4MPT dehydrogenase ; **Mch** : methenyl-H_4MPT cyclohydrolase ; **Ftr** : formyltransferase ; **Fhc** : Ftr/hydrolase complex ; **Gfa** : glutathione-dependent formaldehyde activating enzyme ; **GD-FALDH** : NAD^+- and glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase ; **FGH** : formyl-glutathione hydrolase ; **X** : cofacteur inconnu. (D'après Vorholt 2002). 70
Figure 40 : Spectre RMN ^{13}C d'une suspension non aérée de *E. coli* (10^{12} cellules mL^{-1}) contenant 10 mM de ^{13}C-formaldéhyde, après 20 minutes (**en bas**) 3 heures (**en haut**) d'incubation. (Hunter et al., 1984). 74
Figure 41 : Analyse par RMN ^{13}C de la cinétique de dégradation de ^{13}C-méthanol par une suspension cellulaire de *B. methanolicus* (Pluschkell & Flickinger, 2002). 74
Figure 42 : Spectre RMN ^{13}C d'une suspension de *E. coli* supplémentée depuis 4 minutes avec 10 mM de ^{13}C-formaldéhyde, après incubation pendant 1 heure en présence de 10 mM du même substrat non marqué. (**a**) Suspension (cellules + milieu) ; (**b**) surnageant obtenu après centrifugation ; (**c**) culot cellulaire (cellules). (Mason et al., 1986)..... 75
Figure 43 : Contribution des différents acides organiques à la composition chimique de l'eau des nuages, moyennée sur 16 évènements collectés au sommet du puy de Dôme. **MSA** : acide méthylsulfonique (D'après Marinoni et al., 2004). 79
Figure 44 : Principales voies d'oxydation des hydrocarbures dans l'atmosphère. 80
Figure 45 : Synthèse des voies de transformation des composés carbonés organiques catalysées photochimiquement (**à gauche**) et biochimiquement (métabolisme central et métabolisme méthylotrophe) (respectivement **au centre et à droite**)..... 81
Figure 46 : Méthodes choisies en 2003 pour l'analyse microbiologique des nuages. Entre parenthèses et en italique sont indiquées les améliorations majeures apportées au protocole défini au départ..... 85

Figure 47 : Relation entre les concentrations en ATP et en cellules fongiques totales. 116
Figure 48 : Concentrations en bactéries et champignons totaux ((**a**) et (**b**)), cultivés ((**b**) et (**c**)) à 27°C et 15°C et proportions de cellules cultivées ((**e**) et (**f**)) à 27°C et 15°C en fonction de la vitesse du vent. Chaque point de chaque évènement nuageux échantillonné est reporté..... 117
Figure 49 : Concentrations en bactéries et champignons totaux ((**a**) et (**b**)), cultivés ((**b**) et (**c**)) à 27°C et 15°C et proportions de cellules cultivées ((**e**) et (**f**)) à 27°C et 15°C en fonction de la vitesse du vent. Chaque point de chaque évènement nuageux échantillonné est reporté..... 118
Figure 50 : Concentrations en cellules totales bactériennes (**a**) et fongiques (**b**) dans les échantillons, classés selon l'origine de la masse d'air, dont quelques exemples sont montrés (**c**). Les évènements n° **5**, **6**, **7** et **17** ont été réalisés en hiver et les **18**, **19** et **20** au printemps. 119
Figure 51 : Variation du pH, du potentiel rédox, de la conductivité, et du contenu en micro-organismes totaux et cultivées à 15°C et 27°C au cours du même évènement n°**19** (22-23 mai 2005), et rétrotrajectoires correspondant au début et à la fin du prélèvement. 124
Figure 52 : Evolution de la quantité d'ATP par cellule au cours de l'échantillon n°**19**. 125
Figure 53 : Observation microscopiques de spores de champignons retrouvées dans les échantillons d'eau de nuages (microscopie à épifluorescence, **en haut**), et de cultures de levures en microscopie optique (**au milieu**) et en microscopie électronique à balayage (**en bas**). 143
Figure 54 : Observations microscopiques de différentes cultures bactériennes (frottis, microscopie optique). 144
Figure 55 : Arbre phylogénétique intercomparant les séquences partielles (730 pb) de souches bactériennes à gram positif isolées, construit selon la méthode du plus proche voisin (neighbour-joining). 100 arbres ont été générés par bootstrap et l'arbre consensus est présenté. L'arbre est enraciné avec une souche type de *Micrococcus luteus*, et sur chacun des nœuds sont indiqués les nombres d'occurrences. 145
Figure 56 : Arbre phylogénétique intercomparant les séquences partielles (765 pb) de souches bactériennes à gram négatif isolées, construit selon la méthode du plus proche voisin (neighbour-joining). 100 arbres ont été générés par bootstrap et l'arbre consensus est présenté. L'arbre est enraciné avec une souche type d'*Escherichia coli*, et sur chacun des nœuds sont indiqués les nombres d'occurrences. 146
Figure 57 : Variation de la proportion d'isolats bactériens Gram positifs et Gram négatifs dans les 7 échantillons considérés en fonction la date d'échantillonnage. L'échantillon n° **2** du 6 mars 2003 est également pris en compte. 148
Figure 58 : Exemples de colonies de souches pigmentées cultivées. 149
Figure 59 : Exemples de spectres RMN ^{1}H correspondant aux milieux contenant l'acétate **(en haut)** et le lactate **(en bas)** après 24 heures d'incubation, montrant les produits formés retrouvés le plus souvent parmi les différentes souches. 172
Figure 60 : Exemples de spectres RMN ^{1}H correspondant au milieu contenant le succinate après 4, 24 et 48 heures d'incubation, montrant les produits le plus souvent formés ou relargués au cours de l'incubation, parmi les différentes souches. 172
Figure 61 : Spectre HSQC H-^{13}C de la solution commerciale de formaldéhyde/méthanol diluée dans D_2O. 174
Figure 62 : Exemple de spectre RMN ^{1}H correspondant au milieu contenant le mélange formaldéhyde/méthanol après 24 heures d'incubation. Le signal du formaldéhyde (4,8 ppm) est masqué par celui de l'eau. 176

Figure 63 : Calcul du temps de doublement cellulaire. Exemple de la souche 13b-3 (*Pseudomonas graminis*), où le temps de 53 heures est considéré pour le calcul, conduisant à un temps de doublement de 15,7 heures 191
Figure 64 : Spectre RMN ^{13}C montrant la transformation progressive du formaldéhyde en méthanol et en formiate (souche 14b-13, 17°C, temps 0, 1, 2, 3, 4, 12, 24, 31, 48, 74, 120 et 168 heures). 193
F**igure 65 :** Spectres RMN ^{1}H correspondant au milieu contenant le mélange formaldéhyde/méthanol **(en haut)** et le formaldéhyde marqué au ^{13}C **(en bas)** pour différents temps d'incubation, de 0 à 168 heures. Le marquage permet d'identifier les produits provenant indubitablement de la transformation du formaldéhyde. Les signaux relatifs aux composés non marqués retrouvés dans les 2 cas sont indiqués sur le spectre du haut. (Souche 14b-13, 17°C, mêmes temps d'incubation que sur la figure précédente). 194
Figure Annexe-66 : Localisation du puy de Dôme (45°N, 2°E). (Source de la photo satellite : PlanetObserver.com). 224
Figure Annexe-67 : Répartition d'un échantillon d'eau de nuage entre les différentes analyses, à réaliser directement après le prélèvement. 227
Figure Annexe-68 : exemple de rétrotrajectoire tracé avec Hysplit. 229
Figure Annexe-69 : Ecran du site de MWG-Biotech de saisie des références des échantillons d'ADN pour le séquençage (http://ecom2.mwgdna.com/services/sequence/read-value.tcl?item_id=new). 241
Figure Annexe-70: Ecran de l'interface INVCOMP permettant l'inversion-complémentation de séquences ADN. 242
Figure Annexe-71 : Exemple de résultats d'un Blast réalisé avec Blastn et d'un lien vers les détails d'une des séquences voisines. 244
Figure Annexe-72 : Interface d'alignement multiple ClustalW. 245
Figure Annexe-73 : Format d'entrée utilisé pour le logiciel Phylip. L'alignement de séquences est obtenu avec ClustalW et collé au format .txt. Les noms de séquences (**1**) ne peuvent pas comporter plus de 10 caractères (ils sont automatiquement coupés par ClustalW), sans espace. (**2**) Remplacer les quelques « - » éventuels restants après coupure des extrémités par des « ? ». Sur la première ligne (**3**) sont indiqués le nombre de séquences (27) et leur longueur (1369 pb). 247
Figure Annexe-74 : Arbre consensus retravaillé, obtenu par la méthode de Neighbor-joining, avec le logiciel Phylip. 248
Figure Annexe-75 : Mode opératoire employé pour les tests de biodégradation, et compositions du tampon phosphate et des milieux d'incubation utilisés. 250
Figure Annexe-76 : Procédure de prélèvement utilisée pour simplifier les manipulations lors de la préparation aux analyses par RMN. Pour les analyses, 50 µL de solution de $TSPd_4$ sont ajoutés, conduisant à la concentration en D_2O de 10 % nécessaire à l'analyse par RMN. 252
Figure Annexe-77 : Spectres RMN ^{1}H du formiate, de l'acétate, du succinate et du méthanol. 256
Figure Annexe-78 : Spectre RMN ^{1}H d'un mélange des isomères D et L du lactate..... 257
Figure Annexe-79 : Spectre ^{13}C d'un mélange de formiate, de formaldéhyde et de méthanol, et spectre RMN ^{1}H correspondant. Le pic du formaldéhyde est masqué par le signal de l'eau (~5 ppm) en RMN ^{1}H. 258
Figure Annexe-80 : Méthode employée pour appréhender l'effet de la température de préculture sur la croissance à 5°C, 17°C et 27°C. 260
Figure Annexe-81 : « Machine à nuage », différentes parties et détail du pulvérisateur. 280

Figure Annexe-82 : Mesures des caractéristiques du nuage produit (rayon des gouttelettes et contenu en eau liquide (LWC)), réalisées avec le Gerber PVM-100. 281
Figure Annexe-83 : Evolution des concentrations en composés inorganiques (à gauche) et des acides organiques (à droite) au cours du temps dans l'eau de nuage artificielle pulvérisée dans la « machine à nuage » (en unités d'aire de chromatographie ionique, proportionnelle pour un même composé à sa concentration). 282

-Résumé-

Des micro-organismes sont présents dans la phase aqueuse des nuages troposphériques collectés depuis le sommet du puy de Dôme. Leur concentration, en bruit de fond pour ce site, se situe autour de 5 x 10^4 cellules mL^{-1} pour les bactéries, et 5 x 10^3 cellules mL^{-1} pour les champignons et levures. Différents paramètres, comme la saison et l'origine de la masse d'air sont liés aux variations de concentrations observées. L'océan représente vraisemblablement une source majeure de micro-organismes pour les gouttelettes de nuage, contrairement aux zones urbanisées. Une faible proportion de cellules est retrouvée par culture (autour de 10% pour les champignons et levures, moins de 1% pour les bactéries), mais la plus grande partie d'entre elles sont viables, comme le montrent les mesures de concentration en ATP. Cette population d'organismes cultivés évolue qualitativement au cours de l'année sous l'influence notamment de sources comme la végétation. Les micro-organismes cultivés concernent souvent des souches aux propriétés physiologiques pouvant leur permettre de subsister dans le nuage, comme la présence de pigments ou la capacité de se développer à basse température. Ils sont capables de dégrader efficacement des composés organiques présents en quantité relativement importante dans l'eau des nuages, comme le formiate, l'acétate, le lactate, le succinate, le méthanol et le formaldéhyde. Cette activité métabolique est possible même à basse température (5°C) et pourrait influencer de manière significative la composition et la réactivité chimique de l'eau des nuages. Des voies de transformation biochimiques similaires à celles induites photochimiquement sont mises en évidence, notamment pour les composés en C_1. Enfin, plusieurs souches ont une capacité élevée à agir comme noyau glaçogène. Au regard de l'ensemble des résultats, cette étude suggère que les micro-organismes présents dans les nuages ne sont pas de simples particules inactives, mais seraient impliqués dans les processus chimiques et physiques qui s'y déroulent, et leur importance est, à ce titre, à reconsidérer de façon globale.

-Summary-

The microbiological component of the aqueous phase of clouds collected from the puy de Dôme summit (1465 m a.s.l.) has been studied. We investigated 18 cloud events distributed along the year. We observed typical concentrations of 5 x 10^4 cells mL^{-1} for bacteria, and about 5 x 10^3 cells mL^{-1} for fungi and yeasts. Abiotic characteristics, like season or geographical origin of the sampled air masses, are closely related to the microbiological variations observed. Ocean is likely a major source of micro-organisms for cloud droplets, conversely to urban areas. Only a few of the total micro-organisms are retrieved by cultivation (about 10 % for fungi, and less than 1% for bacteria). However, as shown by ATP concentration measurements, they are almost all viable. Variations in the cultivable micro-organisms composition have been detected, and seem to be a result of the evolution of sources like vegetation. Most of the isolates have physiological properties that can allow them to survive, maintain and even possibly develop in cloud water, like pigments and ability to grow at low temperature. They also can efficiently degrade the main organic compounds present in cloud water: formate, acetate, lactate, succinate, methanol and formaldehyde. This metabolic activity is even observed at 5°C and could thus significantly influence cloud water chemistry. In addition, transformations pathways due to microbial metabolisms are highly similar to those involving photochemistry, which is considered as the main catalyser of atmospheric chemistry. Furthermore, several strains have an important ice nucleation activity and could play a microphysical role in clouds. To conclude, the thesis suggests that micro-organisms could be involved in chemical and physical processes occurring in cloud water, and their presence may have to be considered to reach a better description of atmospheric chemistry.