HAL
open science

Impact des processus photochimiques et biologiques sur la composition chimique du nuage

Audrey Lallement

To cite this version:

Audrey Lallement. Impact des processus photochimiques et biologiques sur la composition chimique du nuage. Chimie organique. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC066 . tel-01865833

HAL Id: tel-01865833

https://theses.hal.science/tel-01865833

Submitted on 2 Sep 2018

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

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

ED SF n° d'ordre : 936

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Chimie organique, minérale et industrielle

Par « **AUDREY LALLEMENT** »

Master Biologie et Environnement

Impact des processus photochimiques et biologiques sur la composition chimique du nuage.

Soutenue publiquement le « 18 décembre 2017 », devant la commission d'examen.

Président :

Abdelwahid MELLOUKI

Directeur de recherche au CNRS, ICARE, Orléans

Rapporteurs :

Aurélien DOMMERGUE

Maître de conférences à l'UGA, IGE, Grenoble

Nathalie WERY

Chargée de recherche à l'INRA, LBE, Narbonne

Directeurs :

Anne-Marie DELORT

Directrice de recherche au CNRS, ICCF, Clermont-Ferrand

Gilles MAILHOT

Directeur de recherche au CNRS, ICCF, Clermont-Ferrand

Remerciements

Je tiens à remercier, dans un premier temps, les membres du jury pour avoir accepté de lire et de juger ces travaux.

Tout cela n'aurait pas été possible sans mes encadrants : Anne-Marie DELORT, Virginie VINATIER et Gilles MAILHOT ainsi que l'Agence National de la Recherche. Je remercie particulièrement Gilles MAILHOT et Anne-Marie DELORT pour avoir lu des dizaines de fois cette thèse pendant la rédaction. Il me faut aussi remercier toutes les personnes qui ont participé à ce travail et notamment les stagiaires que j'ai pu co-encadrer : Marie BAC, Solène DUPERRAY et Lucie GUIBERT mais également Emma RONZIER et Clara TOURNEBIZE qui ont toutes participé à l'élaboration de cette thèse. Je tiens aussi à remercier Elise TIXIER et Martine SANCELME qui ont beaucoup participé à ce travail de thèse. Mes remerciements vont aussi à Ludovic BESAURY et Pierre AMATO qui ont été d'une aide indispensable pour la métatranscritpomique.

Il me faut également remercier mes collaborateurs et les personnes qui ont rendu cette collaboration possible : Isabelle CANET, Albert LEBEDEV, Olga POLYAKOVA et Viatcheslav ARTAEV. Un grand merci aussi à toute l'équipe de Cloud Buster : Laurent DEGUILLAUME, Angelica BIANCO, Marcello BRIGANTE et Mickaël VAITILINGOM. Je voudrais également remercier Claude HERVIER qui a permis la récolte des pluies, un grand merci pour sa disponibilité et sa bonne humeur.

Ensuite je me dois de remercier tous/toutes mes collègues pour leur bonne humeur et leurs écoutes. Je tiens tout particulièrement à remercier Marion LORILIERE, Angelica BIANCO, Hélène PERROUX mais également Laurianne PARIS et Elise DA SILVA. Enfin je souhaite remercier profondément Nolwenn WIRGOT pour toute l'aide et le soutien moral qu'elle a pu m'apporter.

Pour finir, merci à toute ma famille et mes amies de longue dates qui m'ont comprises et soutenues tout au long de ce travail. Un grand merci à tous pour tous les appels, les messages et les repas. Je tiens tout particulièrement à remercier celui qui partage ma vie pour avoir supporté mon irritabilité et ma non-disponibilité ces derniers mois.

Merci à tous.

Audrey Lallement.

Sommaire

Introduction **13**

Synthèse bibliographique **19**

I. Le nuage : un milieu complexe 23

I. 1. La création d'un nuage et sa vie 23

I. 2. La composition chimique du nuage 24

I. 2. 1) Les composés inorganiques 25

I. 2. 2) Les composés carbonés 26

I. 2. 3) Le fer et les molécules oxygénées 30

II. Les radicaux : une source importante de la réactivité chimique du nuage 36

II. 1. L'acteur principal de la chimie radicalaire : le radical hydroxyle 37

II. 1. 1) Les sources et les puits d'$^{\bullet}OH$ dans l'atmosphère 38

II. 1. 2) La concentration d'$^{\bullet}OH$ issue des modèles de chimie atmosphérique 42

II. 1. 3) Les concentrations d'$^{\bullet}OH$ dans les milieux naturels 46

II. 2. L'anion superoxyde / le radical hydroperoxyle 50

II. 2. 1) Les sources et les puits de l'anion superoxyde dans les nuages 50

II. 2. 2) L'estimation de cette concentration par les modèles de chimie atmosphérique 52

II. 2. 3) La concentration en $O_2^{\bullet-}$ dans les milieux naturels 53

II. 3. Des radicaux en interaction : les liens entre $HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$ et $^{\bullet}OH$ 55

III. Les microorganismes dans les nuages 56

III. 1. Des microorganismes qui survivent 56

III. 1. 1) Le cycle de vie des microorganismes dans l'atmosphère 57

III. 1. 2) Les principaux microorganismes retrouvés 60

III. 2. Des microorganismes qui modifient la chimie du nuage 66

III. 2. 1) Rôle des microorganismes dans la biotransformation des composés carbonés 67

III. 2. 2) Influence des microorganismes sur la chimie radicalaire : la voie du stress oxydant 73

IV. Les composés aromatiques dans le nuage, cas particulier du phénol 81

IV. 1. Les composés aromatiques simples : une famille diversifiée 81

IV. 2. Cas particulier du phénol 87

IV. 2. 1) La présence du phénol dans l'atmosphère 87

IV. 2. 2) La transformation du phénol par la chimie radicalaire 89

IV. 2. 3) Rôle des microorganismes dans la dégradation du phénol 91

Problématique **99**

Résultats **103**

Partie 1 : Les radicaux hydroxyles, acteurs majeurs de la chimie du nuage 105

I. Measurement of steady state hydroxyl radical concentrations in atmospheric waters 109

II. Conclusions et Perspectives 136

Partie 2 : Les composés aromatiques dans l'eau de nuage 141

I. Identification des composés aromatiques dans les eaux atmosphériques par GC-MS 143

I. 1. Matériel et Méthodes 144

I. 1. 1) Préparation des eaux atmosphériques 144

I. 1. 2) Incubation de l'eau de nuage récoltée le 21 octobre 2016 144

I. 1. 3) Extraction des composés organiques 145

I. 1. 4) Analyse en GC-MS 145

I. 2. Caractérisation des eaux atmosphériques 146

I. 3. Identification des composés aromatiques 148

I. 4. Conclusion 151

II. Biodégradation potentielle du phénol par les microorganismes du nuage 152

II. 1. Potential for phenol biodegradation in cloud waters 153

II. 2. Conclusion 188

III. Vers une évaluation quantitative de l'impact relatif des voies photochimiques et biologiques sur la dégradation du phénol 190

III. 1. Matériel et Méthodes 192

III. 1. 1) Séquençage de la souche *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 192

III. 1. 2) Photo- et biodégradation du phénol en présence ou en absence de fer 193

III. 1. 2. 1 – Préparation des cellules 193

III. 1. 2. 2 – Incubations 194

III. 1. 2. 3 – Techniques analytiques 196

III. 1. 3) Calcul des vitesses de dégradation du phénol dans les nuages 196

III. 2. Résultats 200

III. 2. 1) Les gènes impliqués dans la dégradation du phénol 200

III. 2. 2) Impact relatif des voies photochimiques et biologiques sur la dégradation du phénol dans les nuages 207

III. 2. 2. 1 – Photo-biodégradation du phénol en conditions de laboratoire 208

III. 2. 2. 2 – Impact du fer sur la dégradation du phénol 211

III. 2. 2. 3 – Photo- et biotransformation du phénol dans les nuages 216

III. 3. Conclusion.....222
Conclusion générale et Perspectives.....225
Bibliographie.....231
Annexes 257
1. Récolte de l'eau de nuage au sommet du puy de Dôme.....259
2. Chapitre de livre 260

Liste des illustrations

Figures :

Figure 1 : Forçage radiatif moyen à l'échelle du globe en 2011 par rapport à 1750. 22

Figure 2 : Influences sur le climat des composés chimiques et des aérosols les plus représentatifs ... 24

Figure 3 : Classification des nuages collectés sur 10 ans au puy de Dôme avec leurs compositions en matière inorganique (en %). 25

Figure 4 : Proportion (en %) des acides carboxyliques dans la phase aqueuse des nuages prélevés au puy de Dôme selon l'origine des masses d'air. 28

Figure 5 : Distribution relative moyenne des acides aminés, des aldéhydes et des acides carboxyliques mesurés dans 25 échantillons nuageux prélevés au sommet du puy de Dôme. 29

Figure 6 : Concentrations en Fe(II) et en Fe(III) mesurées dans les différents types de nuage collectés au sommet du puy de Dôme. 31

Figure 7 : Schéma réactionnel du fer dans les eaux atmosphériques. 33

Figure 8 : Concentrations en H_2O_2 obtenues au puy de Dôme selon les 4 origines des masses d'air. 35

Figure 9 : Transformations induites par l'interaction du rayonnement électromagnétique (lumière) avec la matière. 36

Figure 10 : Formation et réactivité des radicaux hydroxyles dans l'atmosphère. 38

Figure 11 : Contribution relative de différentes réactions à la formation du radical hydroxyle. 40

Figure 12 : Schéma des sources du radical hydroxyle dans les nuages. 41

Figure 13 : Relation entre la concentration en carbone organique dissous [en (mol de C).L^{-1}] et la constante de vitesse d'élimination de $^{\bullet}OH$ (k'OH)/[DOC] [en L.(mol de C)$^{-1}$.s^{-1}] dans les eaux atmosphériques. 45

Figure 14 : Détermination des $[^{\bullet}OH]_{ES}$, exemple du phénol. 49

Figure 15 : Sources et puits du radical hydroperoxyle. 51

Figure 16 : Les réactions chimiques impliquant $^{\bullet}OH$ et $HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$ dans les nuages. 55

Figure 17 : Bioaérosols vus en microscopie électronique à balayage et leurs distributions selon leurs tailles. 56

Figure 18 : Cycle de vie des microorganismes dans l'atmosphère. 57

Figure 19 : Fréquence d'observation des souches cultivables collectées au puy de Dôme. 63

Figure 20 : Composition de la communauté microbienne dans les 3 types de nuages récoltés au sommet du puy de Dôme pour les procaryotes et les eucaryotes. 64

Figure 21 : Le cycle de Krebs ou cycle du citrate et le cycle du méthane. 67

Figure 22 : Estimation de l'influence de l'activité microbienne et de la chimie radicalaire sur la dégradation des acides carboxyliques majoritaires. 69

Figure 23 : Comparaison de l'activité microbienne et de la chimie radicalaire pour deux concentrations en radical hydroxyles : 10^{-12} et 10^{-14} M. 70

Figure 24 : Contribution relative de la biodégradation et de la photo-dégradation pour deux systèmes d'irradiation à 17°C. 71

Figure 25 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène en biologie. 73

Figure 26 : Dommage cellulaire impliquant les ROS et les mécanismes de défense contre celles-ci. 74

Figure 27 : Régulation des ROS chez les bactéries par deux facteurs de transcription : soxRS et oxyR 76

Figure 28 : Survie cellulaire de 5 souches cultivables issues de nuage du puy de Dôme face à différentes concentrations en H_2O_2. 77

Figure 29 : Evolution de la concentration en H_2O_2 en fonction du temps. 78

Figure 30 : Evolution de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans les 3 nuages différents en présence ou en l'absence de lumière et/ou de la microflore native. 79

Figure 31 : Mécanismes réactionnels possibles après la réaction avec les radicaux libres X. 84

Figure 32 : Voie de substitution classique des aromatiques en phase aqueuse. 85

Figure 33 : Les voies de dégradation du benzène et du toluène. 86

Figure 34 : Mécanismes de dégradation du benzène en phénol dans la phase gaz. 87

Figure 35 : Spectre d'absorption du phénol comparé aux flux actiniques mesurés en présence ou en absence de nuages. 89

Figure 36 : Oxydation et nitration du phénol en solution aqueuse. 90

Figure 37 : Voies de biodégradation du phénol. 91

Figure 38 : Mécanisme catalytique de la dioxygénase intradiol. 92

Figure 39 : Mécanisme réactionnel de la dioxygénase extradiol. 93

Figure 40 : Représentation des gènes intervenant dans la dégradation du phénol (cat). 94

Figure 41 : Représentation schématique des régulateurs transcriptionnels de type LysR. 94

Figure 42 : Schéma représentant les différentes questions soulevées pendant cette thèse. 101

Figure 43 : Voies métaboliques potentiellement impliquées dans la dégradation des composés aromatiques mis en évidence dans l'eau de nuage. 150

Figure 44 : Présentation du système d'incubation utilisé. 194

Figure 45 : Flux actinique de notre système d'irradiation comparé à celui mesuré dans un nuage. . 195

Figure 46 : Détermination des coefficients de vitesse $k_{Phénol}$. 197

Figure 47 : Répartition des différentes catégories des sous-systèmes identifiés dans le génome de *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28. 203

Figure 48 : Voies de dégradation du benzoate. 205

Figure 49 : Modèle de fonctionnement du transporteur EfeUOB chez *Bacillus subtilis*. 206

Figure 50 : Cinétique de dégradation du phénol en présence ou en l'absence de lumière ou de *R. enclensis* PDD-23b-28. 209

Figure 51 : Influence de la présence de Fe-EDDS sur la dégradation du phénol par *R. enclensis* PDD-23b-28 à 17°C et à 22°C à l'obscurité et à 22°C en présence de lumière. 212

Figure 52 : Représentation schématique des hypothèses expliquant l'impact du Fe-EDDS en présence de lumière sur la dégradation du phénol. 214

Figure 53 : Impact relatif des vitesses de dégradation du phénol par les voies radicalaire et biologique en prenant en compte 3,93% de *Rhodococcus*. 218

Figure 54 : Impact relatif des vitesses de dégradation du phénol par les voies radicalaire et biologique en prenant en compte 19,51% de *Pseudomonas*. 219

Tableaux :

Tableau 1 : Pourcentage des aldéhydes mesurés au puy de Dôme en fonction des types de nuage. ... 29

Tableau 2 : Concentrations en fer mesurées dans les nuages pour différents sites. 31

Tableau 3 : Concentration en peroxyde d'hydrogène mesurée dans les nuages. 34

Tableau 4 : Temps de vie calculés pour différents composés organiques. 42

Tableau 5 : Concentrations en radical hydroxyle obtenues par modélisation. 43

Tableau 6 : Concentration à l'état stationnaire des radicaux hydroxyles dans différents milieux aquatiques 47

Tableau 7 : $[^{\bullet}OH]_{ES}$ obtenues ou calculées pour la rosée et la pluie. 48

Tableau 8 : Résultats des $[^{\bullet}OH]_{ES}$ obtenues par Anastasio and McGregor, 2001. 49

Tableau 9 : Concentrations en radical hydroperoxyle estimées par les modèles. 53

Tableau 10 : $[O_2^{\bullet -}]_{ES}$ dans les mers et océans. 54

Tableau 11 : Stress et réponses au stress. 59

Tableau 12 : Communautés microbiennes retrouvées dans les différents sites de prélèvement. ...61-62

Tableau 13 : Concentrations en microorganismes retrouvées dans les différents sites de prélèvements 66

Tableau 14 : Vitesses de transformation des acides carboxyliques et du formaldéhyde en présence ou en l'absence de lumière (UV) et/ou de microorganismes dans l'eau de nuage récoltée le 06/08/2010. 72

Tableau 15 : Composés aromatiques simples identifiés dans l'air de Finokalia, en Grèce. 82

Tableau 16 : Résumé des concentrations dans la phase gaz du benzène et du toluène. 82

Tableau 17 : Concentrations moyennes du phénol mesurées dans la pluie et dans les nuages. 88

Tableau 18 : Dégradation du phénol par des bactéries. 96

Tableau 19 : Caractérisation des eaux atmosphériques. 146-147

Tableau 20 : Les composés aromatiques dans les eaux atmosphériques. 148

Tableau 21 : Evolution des composés aromatiques présents dans le nuage du 21/10/2016. 149

Tableau 22 : Capacité des souches du genre *Pseudomonas* et *Rhodococcus* et celle de la famille des Moraxellaceae à pousser avec le phénol pour seule source de carbone 189

Tableau 23 : Quantification des ADN extraits 193

Tableau 24 : Concentration des radicaux provenant du modèle de chimie atmosphérique CAPRAM 3.0 198

Tableau 25 : Vitesse de biodégradation du phénol par *R. enclensis* PDD-23b-28. 210

Tableau 26 : Vitesses de dégradation du phénol en absence ou en présence de Fe-EDDS. 213

Tableau 27 : Paramètres utilisés pour le calcul des pourcentages de dégradation abiotique du phénol et les vitesses de dégradation du phénol par les radicaux $^{\bullet}OH$ et $NO_3^{\bullet}$. 217

Tableau 28 : Vitesses de biodégradation du phénol 217-218

Publication n°1 : Measurement of steady state hydroxyl radical concentrations in atmospheric waters.

Fig 1: Comparison of actinic fluxes of lamps used and of sun under cloudy and sunny conditions at puy-de-Dôme station below 400 nm. 113

Fig 2: Reaction between TA and $^{\bullet}OH$. 114

Fig 3: $[^{\bullet}OH]_{SS}$ as a function of Fe-EDDS concentrations. 117

Fig 4: $[^{\bullet}OH]_{SS}$ as a function of H_2O_2 concentrations (in artificial marine cloud media) under light and with 5 µM Fe-EDDS. 118

Fig 5: Evolutions of the number of cells and of the concentration of ATP as a function of time (0, 47 and 72 minutes) in the presence of three probe concentrations (0, 4 and 10 µM). 119

Fig 6: Concentrations of hydroxyl radical at steady state in rain and cloud waters without and with microorganisms. 121

Diagram S1: 96-well plate model. 129

Fig S1: Fluorescence of hydroxyterephthalic acid (TAOH) at different sampling times for 4 terephthalic acid (TA) concentrations under irradiation in marine artificial cloud media with 20 µM of H_2O_2 and light during 2 hours. 130

Fig S2: Fluorescence intensity measured as a function of time in experiments performed in marine artificial cloud media with 20 µM H_2O_2 and light. 130

Fig S3: Formation rates of hydroxyterephthalic acid (Rf_{TAOH}) for each concentration of TA. 131

Fig S4: Formation rates of hydroxyterephthalic acid evaluated for each probe concentration without or with addition of 5 µL DMSO (1 mM) immediately after the sampling. 132

Fig S5: Rain retro-trajectories. 133

Fig S6: Cloud retro-trajectories 133

Table S1: Atmospheric rain waters characterization. 134

Table S2: Atmospheric cloud waters characterization. 135

Publication n°2 : Potential for phenol biodegradation in cloud waters.

Figure 1: Main phenol biodegradation pathways described for aerobic microorganisms as referred in KEGG database. 157

Figure 2: Relative abundance of transcripts in cloud waters encoding for enzymes involved in phenol degradation pathways. 163

Figure 3: Relative abundance of the putative taxonomic affiliation of the microorganisms involved in phenol degradation. 164

Figure 4: Biodegradation of phenol by bacterial strains isolated from cloud waters. 165

Table 1: Phenol concentrations measured by GC-MS in the five cloud water sampled at the PUY station. 162

Figure SM1: Back trajectories of the air masses corresponding to cloud events at the PUY station. 177

Figure SM2: GC-MS analysis of the cloud sample collected the 16th of February 2016. 178

Figure SM3: Relative abundance of target species with metatranscriptomic sequences enriched in prokaryote mRNA. 186

Figure SM4: Percentage of phenol biodegradation by *Pseudomonas syringae* strains with Ice Nucleation activity or without Ice Nucleation capacity (T > -8°C). 187

Table SM1: List of the bacterial strains tested for their ability to degrade phenol. 179-182

Table SM2: Number of sequences corresponding to genes involved in phenol degradation affiliated with known bacteria in NCBI database. 183-185

Table SM3: Comparison of data obtained for *Pseudomonas syringae* strains in this study and in Berge *et al.* (2014). 185

Table SM4: Number of sequences corresponding to genes involved in phenol production (toluene monooxygenase) affiliated with known bacteria in NCBI database. 186

Annexe :

Figure Annexe 1 : Impacteur à nuage 259

Introduction

Les nuages sont des milieux extrêmement hétérogènes caractérisés par une forte réactivité comprenant plusieurs phases : une phase gazeuse, une phase solide et une phase aqueuse. Ils recouvrent en permanence plus de 50% du globe et peuvent s'étendre sur plusieurs kilomètres ou être isolés (visualisation satellite). Ils se forment grâce à des molécules ou particules appelées noyaux de condensation (CCN). Les CCN condensent l'eau à leur surface, ce qui permet la formation des gouttelettes en suspension dans l'air (Delmas *et al.*, 2005). Dans un premier temps, les études sur les eaux atmosphériques cherchaient à caractériser la composition chimique et les sources de ces composés. Ces auteurs ont notamment étudié les transferts d'espèces entre la phase gaz et la phase aqueuse. Ensuite la réactivité de la phase aqueuse des nuages a été analysée. Pour se faire, des expériences de laboratoire ont été réalisées afin de caractériser les constantes de réactivité des composés en phase aqueuse. Ces études se sont focalisées sur les réactions radicalaires (H_xO_y et NO_x) et ont permis d'implémenter des modèles de chimie atmosphérique. De nos jours, plusieurs modèles sont disponibles, notamment CAPRAM et CLEPS (Herrmann *et al.*, 2015; Mouchel-Vallon *et al.*, 2017). Grâce à la comparaison des résultats de modélisation et des valeurs obtenues directement dans le nuage, ces modèles se sont affinés et permettent de mieux décrire la complexité et la réactivité de cet environnement.

La découverte, en 2005, dans la phase aqueuse des nuages de microorganismes cultivables et métaboliquement actifs (Amato *et al.*, 2005) a ouvert une nouvelle voie de recherche quant à leur impact sur la physique et la chimie du nuage (Delort *et al.*, 2010). En effet ils peuvent jouer le rôle de CCN et donc influencer la formation des nuages mais aussi, pour certains d'entre eux, induire la formation de cristaux de glace et donc potentiellement la formation de précipitations. Comme ces microorganismes sont métaboliquement actifs, ils peuvent métaboliser de nombreux composés organiques présents dans la phase aqueuse du nuage (notamment les composés C1 et les acides carboxyliques) et donc potentiellement jouer un rôle dans la chimie atmosphérique. Ils survivent aux nombreux stress présents dans ce milieu, en particulier à la présence d'oxydants forts tels que le peroxyde d'hydrogène (Joly *et al.*, 2015). Leur métabolisme du stress oxydant leur permet en effet de dégrader le peroxyde d'hydrogène, un précurseur important du radical hydroxyle (Vaïtilingom *et al.*, 2013; Wirgot *et al.*, 2017).

Suite à la découverte de l'impact majeur que pouvaient avoir ces microorganismes sur la chimie des nuages, les recherches se sont intéressées à quantifier l'importance de ce phénomène vis-à-vis des réactions radicalaires déjà connues (thèse de Vaïtilingom, 2011). Ainsi, il a pu être montré que les microorganismes avaient un rôle dominant la nuit dans les nuages chauds (17°C). En présence de

lumière (le jour), les réactions photochimiques sont les acteurs principaux de la réactivité de la phase aqueuse mais la dégradation par les microorganismes n'est pas négligeable. De plus, un effet synergique de ces deux voies de dégradations peut être constaté pour certains composés (Vaïtilingom *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces travaux suggèrent que l'activité microbiologique pourrait être compétitive vis-à-vis des réactions radicalaires, notamment photochimiques, qui sont les seules actuellement considérées pour décrire la chimie de la phase aqueuse du nuage. Cependant de nombreuses incertitudes subsistent pour pouvoir comparer l'efficacité respective des processus biotiques et abiotiques ; en particulier la concentration en radicaux hydroxyles dans la phase aqueuse du nuage qui est estimée par les modèles de chimie atmosphérique varie de plusieurs ordres de grandeur selon les modèles et les scénarios (10^{-12} à 10^{-15} M). De plus, ces concentrations sont généralement considérées comme surestimées ; cette surestimation est notamment liée à une limitation des connaissances sur la matière organique qui représente un puits important des radicaux (Arakaki *et al.*, 2013; Herrmann *et al.*, 2015).

L'objectif de cette thèse est de progresser dans l'évaluation de l'impact des processus photochimiques et biologiques sur la composition chimique du nuage. Pour cela, cette thèse a plus particulièrement porté sur :

- **l'évaluation des concentrations stationnaires en radical hydroxyle dans la phase aqueuse du nuage**
- **et le devenir de la matière organique (particulièrement du phénol) présent dans ce milieu**

Cette thèse s'intègre dans le projet BIOCAP financé par le programme de recherche blanc de l'ANR, dont le but est de mesurer l'impact de la photochimie et de la biologie sur la capacité oxydante des nuages.

Ce travail de recherche a été possible grâce à la collaboration déjà ancienne entre l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF) et l'Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand (OPGC), permettant ainsi la récolte de l'eau de nuage. Une nouvelle collaboration récemment établie avec le département de Chimie organique de l'Université de Moscou (Lomonosov) nous a permis de mesurer des composés organiques semi-volatils dans la phase aqueuse du nuage (dont le phénol) par spectrométrie de masse.

La première partie de ce manuscrit de thèse commence par une synthèse bibliographique. Après une brève introduction, le milieu nuage est présenté en détail, notamment ses caractéristiques

physiques et sa composition chimique. Un focus est fait sur les radicaux hydroxyles et hydroperoxyles. Il regroupe les connaissances actuelles sur les sources et puits de ces composés (dans la phase gaz et la phase aqueuse), les concentrations simulées par les différents modèles de chimie atmosphériques et les concentrations connues de ces radicaux dans les milieux naturels. Puis la description des microorganismes retrouvés dans les nuages et leurs rôles dans la chimie atmosphérique sont présentés. Pour finir une attention particulière est portée sur les composés aromatiques et surtout sur le phénol. Cette partie commence par une présentation brève des composés aromatiques simples (ne comprenant qu'un noyau benzénique) et se poursuit par l'étude des concentrations du phénol dans l'atmosphère (dans la phase gaz et la phase aqueuse), de sa réactivité dans les deux phases et de ses voies de dégradation connues par les microorganismes.

Cet état de l'art est suivi par la présentation des objectifs de la thèse.

Les résultats sont ensuite décrits en deux parties.

La première se focalise sur les radicaux hydroxyles ; l'estimation de leurs concentrations et l'impact des microorganismes sur celles-ci sont étudiés.

La deuxième partie des résultats s'intéresse à la caractérisation des composés aromatiques simples. Après cela, le potentiel de dégradation du phénol par les microorganismes dans les nuages est étudié. Pour finir, une analyse de photo- et biodégradation de ce composé en laboratoire va permettre de mesurer l'impact relatif des voies photochimiques et biologiques sur la dégradation du phénol.

Enfin une partie conclusion et perspectives termine ce manuscrit de thèse.

Synthèse bibliographique

La terre sans couverture atmosphérique aurait une température de -19°C. Sa température moyenne de 14°C est possible grâce à l'absorption des rayons infrarouges par les gaz à effet de serre (Mostofa *et al.*, 2013). Cet équilibre est fragile car le Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (le GIEC) avertit depuis 2007 de grands changements climatiques dus à l'augmentation de la température. Les experts estiment ce réchauffement à 0,74°C.an^{-1}. Il serait dû à l'augmentation des gaz à effet de serre avec une hausse de 70% des gaz d'origine anthropique et notamment du dioxyde de carbone dont l'émission est passée de 21 à 38 gigatonnes par an. Les nuages jouent un rôle dans cet équilibre. Ils peuvent réémettre des radiations absorbées, par les gaz à effet de serre par exemple, mais ils peuvent aussi absorber les radiations à courtes longueurs d'onde (UV et visible). Pour les nuages et les aérosols, ces deux effets ne sont pas à l'équilibre ce qui leurs donnent un effet refroidissant. Malheureusement, l'apport de l'albédo des nuages reste difficile à quantifier car il dépend de plusieurs paramètres comme la surface de la couverture nuageuse, l'efficacité d'absorption et de réémission des nuages et de leurs températures. Ce paramètre est donc une des rétroactions ayant la plus grande source d'incertitude. Dans le but de limiter et de quantifier les changements climatiques, une attention particulière de la communauté scientifique a depuis été portée sur ces mécanismes de rétroaction encore incertains.

En 2013, une autre assemblée du GIEC s'est réunie pour étudier les nouveaux résultats scientifiques obtenus 2 ans avant et préciser les évolutions constatées depuis 2007. Ils ont calculé les forçages radiatifs des facteurs intervenant dans le réchauffement climatique (Figure 1). Le forçage radiatif est la mesure de l'influence d'un facteur particulier dans la balance de l'énergie du système Terre-Atmosphère. Un indice positif signifie donc une augmentation de la température et un indice négatif signifie au contraire un refroidissement.

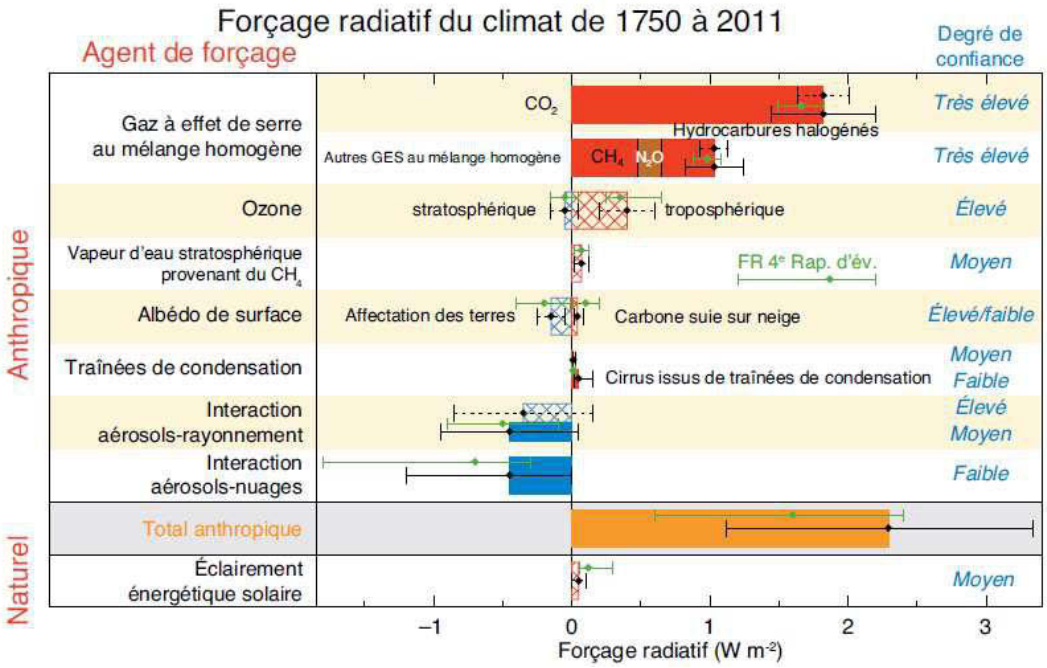


Figure 1 : Forçage radiatif moyen à l'échelle du globe en 2011 par rapport à 1750. Les agents entrainant une augmentation de la température (en rouge) et ceux qui la diminue (en bleu) ainsi que leurs incertitudes (en noir) sont indiqués, les écart-types verts sont ceux du 4^{éme} rapport. Un degré de confiance est attribué à chacun des paramètres. D'après le GIEC, Changements climatiques 2013.

Les paramètres entrainant une augmentation de la température sont ceux d'origine anthropique. Les gaz à effet de serre sont responsables de cette augmentation. A l'inverse, seuls deux paramètres ont un forçage radiatif négatif. Ceux-ci sont l'interaction entre les aérosols et le rayonnement et l'interaction aérosols-nuages. Le premier de ces paramètres a été fortement étudié, ce qui a permis l'obtention d'un indice de confiance élevé. En revanche, l'indice de confiance reste faible pour l'interaction aérosols-nuages. Pourtant elle présente la rétroaction la plus efficace bien qu'encore incertaine, elle est estimée à -0,5 ± 0,7 W.m^{-2}.

L'importance de cette rétroaction et son faible indice de confiance renforcent le besoin de connaissance sur les mécanismes influençant l'interaction aérosols-nuage et montrent l'importance de mieux comprendre et caractériser la chimie des nuages.

I. Le nuage : un milieu complexe

I. 1. La création d'un nuage et sa vie

Les nuages sont des milieux extrêmement hétérogènes caractérisés par une forte réactivité comprenant plusieurs phases : une phase gazeuse, une phase solide et une phase aqueuse. Ils occupent 5 à 10% du volume de la troposphère (Delmas *et al.*, 2005). Un nuage se forme lorsque la concentration en vapeur d'eau devient supérieure à la pression de vapeur d'eau saturante. Cette vapeur d'eau se condense alors sur des aérosols ou particules dites noyaux de condensation (CCN) et ceci permet la formation des gouttelettes de nuage. Le rayon des gouttelettes de nuage varie de quelques µm à 50 µm, la moyenne est de 10 µm. Le nuage est souvent défini par son contenu en eau, cette valeur fait référence à la masse d'eau liquide en suspension dans un m^3 d'air. Il varie de 0,05 à 3 $g.m^{-3}$ avec une moyenne de 0,3 $g.m^{-3}$. Ainsi le volume des gouttelettes de nuage représente une fraction de 5 x 10^{-8} à 3 x 10^{-6} fois le volume de la masse d'air et leur concentration est de 10^2 à 10^3 $gouttes.cm^{-3}$ (Delmas *et al.*, 2005).

La phase solide du nuage est constituée par les CCN, pour Cloud Concentration Nuclei ou noyau de condensation des nuages. Ils peuvent avoir deux origines différentes. Certains proviennent d'origine naturelle telle que les poussières minérales, les embruns marins ou les feux de biomasse. D'autres sont issus de l'activité humaine, comme par exemple les particules fines émises par la circulation des voitures ou le carbone organique provenant de l'utilisation des énergies fossiles. Ces aérosols peuvent présenter une grande diversité spatio-temporelle. Ils peuvent directement être issus de leurs émissions, ce sont les aérosols primaires, ou être formés suite aux réactions chimiques que subissent les aérosols primaires, ils sont alors dits aérosols secondaires. Les aérosols ont un effet sur le climat qui leur est propre : certains aérosols absorbent les rayonnements et d'autres au contraire les réfléchissent (Bernier *et al.*, 2016). La grande diversité de ces aérosols et leurs actions sur le climat participent à la complexité de la chimie du nuage (Figure 2).

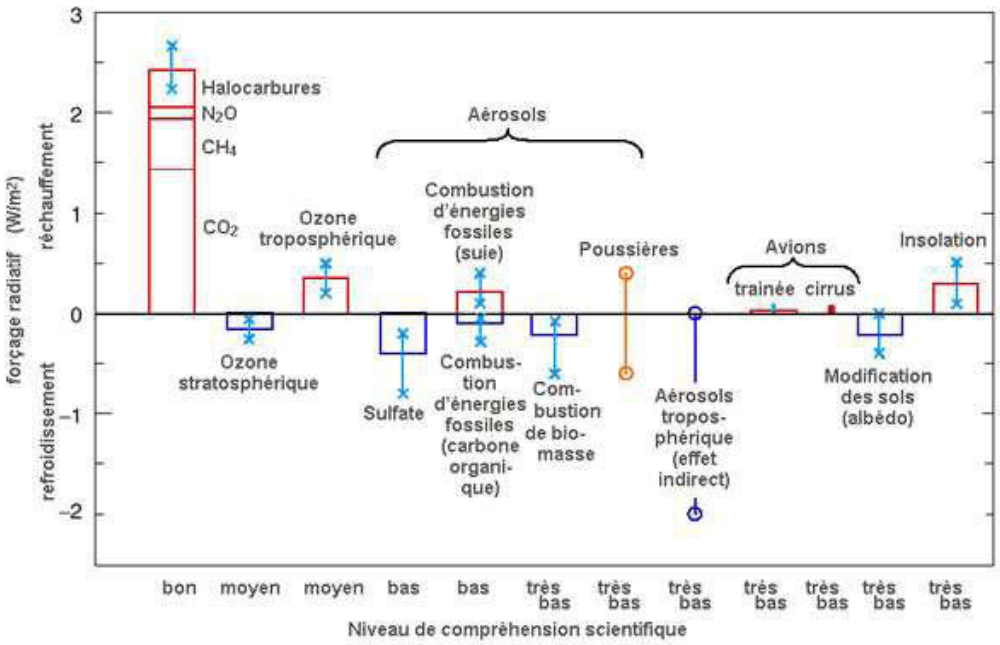


Figure 2 : Influences sur le climat des composés chimiques et des aérosols les plus représentatifs. A chaque indice est associé un niveau de compréhension scientifique. D'après le GIEC, Changements climatiques 2013.

La chimie de la phase aqueuse des nuages est définie par plusieurs processus : le transfert des espèces chimiques de la phase gaz à la phase liquide, les équilibres chimiques entre les espèces au sein de cette dernière phase et les réactions *in situ* (Delmas *et al.*, 2005). Plusieurs phénomènes chimiques participent donc à la réactivité de la phase aqueuse du nuage : la diffusion moléculaire, l'équilibre ionique et l'équilibre thermodynamique. De part ces variables, il existe une grande diversité de nuage. Leurs compositions pouvant être aussi bien influencées par l'origine des aérosols, les paramètres physico-chimiques tels que le pH ou encore par la trajectoire propre aux nuages après leurs formations. Malgré cette hétérogénéité et cette diversité, les nuages ont des caractéristiques communes.

I. 2. La composition chimique du nuage

La composition chimique d'un nuage varie selon la proportion de particules d'origine marine, terrestre et anthropogénique, les paramètres météorologiques globaux, la circulation atmosphérique et les saisons (Wilkinson *et al.*, 1997). Malgré cela, deux groupes de composés sont identifiés dans tous les nuages : le premier comprend les molécules inorganiques et l'autre est constitué des molécules organiques. Leurs proportions varient selon le type de nuage, son origine et sa composition en particules. Tous les échantillons analysés dans cette thèse ont été prélevés au sommet du puy de Dôme ainsi l'étude bibliographique va être centrée principalement sur les différents types de nuages récoltés sur ce site.

I. 2. 1) Les composés inorganiques

La phase inorganique a été bien étudiée, elle comprend principalement des ions sulfates et nitrates. Dans la phase aqueuse des nuages au puy de Dôme, les anions majoritaires sont le nitrate, le sulfate et le chlore. L'ammonium et le sodium sont les deux cations majoritaires. En minoritaire, des ions magnésium, potassium, calcium sont aussi retrouvés. Grâce à la caractérisation de la matière inorganique et à la mesure du pH d'eau de nuage pendant 10 ans, une classification des nuages a pu être établie (Figure 3).

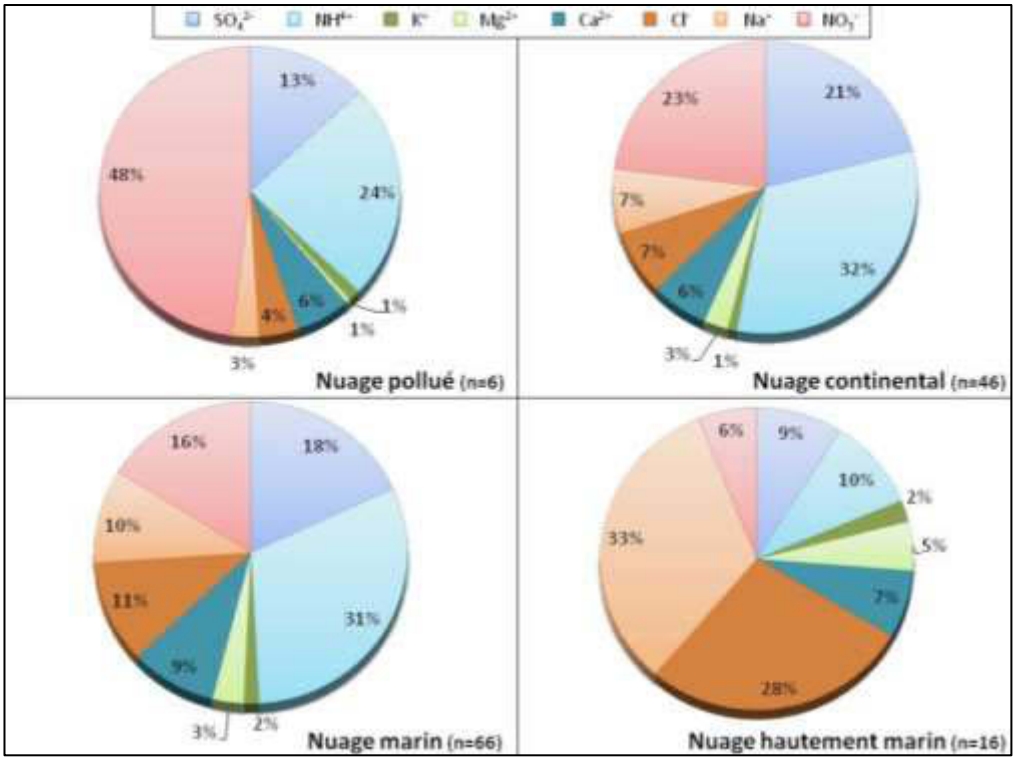


Figure 3 : Classification des nuages collectés sur 10 ans au puy de Dôme avec leurs compositions en matière inorganique (en %). Une analyse en composante principale sur 73 événements nuageux a permis de différentier 4 groupes de nuages : les nuages pollués, les nuages continentaux, les nuages marins et les nuages hautement marins. n représente le nombre d'événement par groupe (d'après Deguillaume *et al.*, 2014).

Les 4 groupes de nuages sont différentiables majoritairement par leur proportion en ion chlorure et nitrate. Plus le nuage est de type marin plus la concentration en nitrate diminue (en rouge) et la concentration en ion chlorure augmente (en marron), et inversement. Pour connaitre les sources de ces composés, Leriche *et al.* (2007) se sont servis du modèle M2C2 (modèle de chimie atmosphérique) pour tracer les origines des composés inorganiques trouvés dans la phase aqueuse des nuages. Ils ont trouvé que les particules d'aérosols ont un rôle important sur ces composés. En effet, 72,5% de la concentration en ammonium provient de la phase particulaire alors que les 27,5% restant proviennent de la phase gaz. Par contre, les ions sulfates sont issus des particules et formés en phase aqueuse. Pour

les nitrates, la répartition est plus complexe avec un apport majoritaire des particules (56%) et l'intervention de la phase gaz, de la réactivité de celle-ci et de celle de la phase aqueuse (*via* l'oxydation du dioxyde de soufre par l'acide pernitrique) (Leriche *et al.*, 2007). Les composés inorganiques mesurés dans les nuages collectés au sommet du puy de Dôme sont globalement similaire à ceux mesurés dans les nuages collectés sur les sites ayant une origine soit marine [Puerto Rico, (Gioda *et al.*, 2009; Reyes-Rodríguez *et al.*, 2009)], soit anthropogénique [les Vosges en France (Herckes *et al.*, 2002; Lammel and Metzig, 1991) ou encore les montagnes Sudètes en Pologne (Błaś *et al.*, 2008)] ; seules les valeurs en nitrates sont plus élevées que dans les autres sites, ceci peut être expliqué par un éloignement important des sources de nitrate ce qui entraine une forte oxydation des NOx (Deguillaume *et al.*, 2014).

Au sein de l'eau de nuage collectée au sommet du puy de Dôme, la fraction inorganique est bien identifiée. Elle a pour source principale la phase particulaire et la phase gaz. En revanche, la caractérisation de la fraction organique présente dans l'eau de nuage reste encore peu connue.

I. 2. 2) Les composés carbonés

Différentes méthodes ont été utilisées pour caractériser cette phase organique. Elles font appel, pour la plupart d'entre elles, à des techniques de chromatographies couplées ou non avec de la spectrométrie de masse. D'autres techniques d'analyses ont été utilisées pour caractériser plus en profondeur les eaux atmosphériques. De l'eau de brouillard a été analysée par RMN du proton après une pré-séparation grâce à la chromatographie ionique (Fuzzi *et al.*, 2002). Dans ces eaux collectées en Italie (à S. Pietro Capofiume dans la vallée de Po), les composés organiques solubles représentent plus de 85% de la TOC. Ils sont différentiables en 3 catégories : les neutres représentés surtout par des polyols et des polyesters (26%), des acides mono ou di carboxyliques surtout aliphatiques (37%) et des espèces insaturées aliphatiques ou aromatiques (23%). Plus récemment, Zhao *et al.* (2013) ont utilisé une technique de FT-ICR pour caractériser la matière organique de deux nuages collectés à Steamboat Springs au Colorado, États-Unis. Ils ont retrouvé plus de 3 000 composés (ceux-ci représentent 82 à 83% des pics ioniques obtenus), ils les ont ensuite classifié selon leurs compositions en carbone, oxygène, azote et soufre. Ainsi 4 catégories ont été faites : les CHO, les CHNO, les CHOS et les CHNOS, elles représentent respectivement 26%, 51%, 8% et 12%. Parmi ces molécules, sont retrouvés des aromatiques, des terpènes, des organonitrates, *etc*. Lors de cette étude, une forte influence des composés biogéniques est visible, certains des composés sont principalement émis par la combustion de bois.

Les composés organiques volatils (COV) sont donc importants dans la composition carbonée du nuage, ils regroupent toutes les molécules contenant du carbone et de l'hydrogène ayant une pression de vapeur supérieure à 10 Pa (à 20°C et à pression atmosphérique) (Le Cloirec, 2004). Parmi les COV d'origine biologique (BCOV), une grande attention a été portée sur l'isoprène et les mono-terpènes, composés émis principalement de la végétation. L'émission globale de ces BCOV est estimée à 1 150 Tg de C.an^{-1} (Shen *et al.*, 2013). Les COV peuvent aussi avoir une origine anthropique mais elle est estimée plus faible que la précédente (110 Tg de C.an^{-1}, Shen *et al.*, 2013). Il existe une grande variété de COV : des carbonyles, des acides organiques, des alcools, des alcanes, des alcènes, des esters et des hydrocarbones aromatiques (Atkinson and Arey, 2003; Kesselmeier and Staudt, 1999; Shen *et al.*, 2013). Ils sont regroupés en 4 grandes familles d'hydrocarbures : aliphatiques, alicycliques, aromatiques et substitués (Cicolella, 2008). La famille des composés aromatiques a été particulièrement étudiée dans l'air et un peu dans la phase aqueuse du nuage, elle sera le sujet de la 4^{éme} partie de cette thèse. De nos jours, les molécules clairement identifiées, caractérisées et classiquement quantifiées dans l'eau de nuage restent des molécules de faibles poids moléculaires notamment des acides carboxyliques et des carbonyles.

Les acides carboxyliques sont les composés organiques les plus étudiés dans les eaux atmosphériques. Les composés majoritaires dans la phase aqueuse des nuages collectés au puy de Dôme sont l'acide acétique et l'acide formique et plus minoritairement les acides oxalique, malonique et succinique. Ci-dessous, le pourcentage de chacun d'eux selon les différents types de nuages : nuage pollué, nuage continental, nuage marin et nuage hautement marin (Figure 4). La concentration en acétate varie de 0 à 48 µeq.L^{-1}, pour le formate les valeurs fluctuent entre 0,3 et 53 µeq.L^{-1}. Pour les trois autres acides carboxyliques, l'oxalate présente des concentrations plus élevées avec une moyenne de 4 µeq.L^{-1} alors que celles des acides succinique et malonique sont aux alentours de 1 µeq.L^{-1}. De façon globale, les acides carboxyliques représentent entre 9 et 12% du carbone organique total.

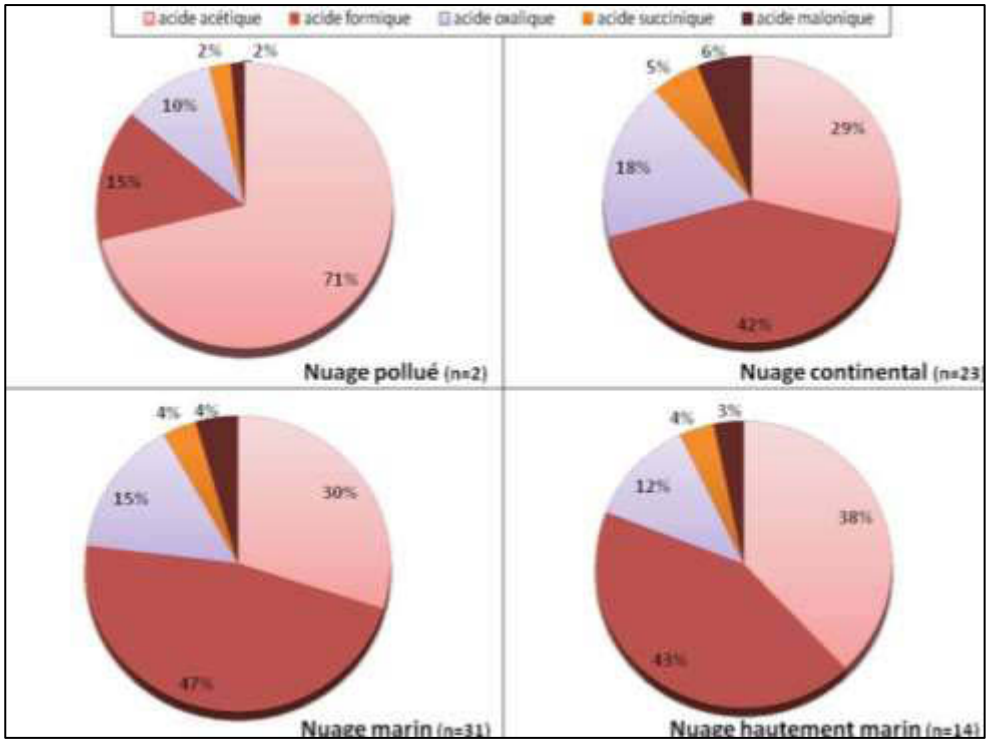


Figure 4 : Proportion (en %) des acides carboxyliques dans la phase aqueuse des nuages prélevés au puy de Dôme selon l'origine des masses d'air. Les pourcentages sont calculés grâce à la concentration de chaque ion (en µeq.L^{-1}). n représente le nombre de nuage ayant cette caractéristique (d'après Deguillaume *et al.*, 2014).

Sur le site de Rax en Autriche, les mêmes acides carboxyliques ont été dosés dans des échantillons d'eau de nuage collectés entre 1999 et 2000 (Löflund *et al.*, 2002). L'acide acétique et l'acide formique sont, là encore, les acides carboxyliques majoritaires avec une moyenne respectivement de 0,9 et 0,6 µeq.L^{-1}. Ils sont suivis par l'acide oxalique (0,4 µeq.L^{-1}) et par les acides malonique et succinique (avec une concentration respectivement de 0,2 et 0,15 µeq.L^{-1}). En Allemagne, sur le site de la montagne de Schmücke, la fraction organique de prélèvements d'eau de nuage a été analysée (Van Pinxteren *et al.*, 2005). Les mêmes types de résultats sont obtenus. Il en résulte donc que l'acide formique et l'acide acétique sont les acides carboxyliques majoritaires dans l'eau de nuage, suivi par l'acide oxalique et d'autres acides plus minoritaires. Ils peuvent avoir différentes sources : ils peuvent être émis directement dans la phase gaz, être présents dans la phase solide ou encore provenir de réactions chimiques au sein de la phase gaz. Pour les nuages du puy de Dôme, l'acide formique et l'acide acétique peuvent être le résultat de réactions chimiques. L'un est produit par la réaction entre le radical hydroxyle et le méthanol et l'autre par l'oxydation d'alcools dans la phase aqueuse. Mais ils peuvent aussi provenir de la phase gaz. A contrario, l'oxalate n'est pas le résultat d'un transfert de phase mais provient de l'oxydation de composés dans la phase aqueuse. Pour finir, les acides succinique et malonique ont pour source unique la phase particulaire (Deguillaume *et al.*, 2014).

Les composés carbonyles mesurés au puy de Dôme sont le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, le glyoxal, le méthylglyoxal et l'hydroxy-acétaldéhyde. Ils ne représentent que 0,8 à 2% du carbone organique total. Ils sont distribués de la façon suivante (Tableau 1).

Tableau 1 : Pourcentage des aldéhydes mesurés au puy de Dôme en fonction des types de nuage. n représente le nombre d'événements nuageux (d'après Deguillaume *et al.*, 2014).

	Nuage pollué (n = 3)	Nuage continental (n = 7)	Nuage marin (n = 11)	Nuage hautement marin (n = 3)
Formaldéhyde	52%	67%	73%	66%
Acétaldéhyde	7%	8%	13%	16%
Glyoxal	14%	10%	7%	6%
Hydroxy-acétaldéhyde	23%	13%	6%	10%
Méthylglyoxal	4%	2%	1%	1%

Le formaldéhyde est le carbonyle majoritaire retrouvé dans l'eau de nuage, représentant plus de 50% des carbonyles. Par la suite, l'acétaldéhyde est le deuxième carbonyle le plus abondant dans les nuages marins alors que dans les nuages continentaux et pollués c'est l'hydroxy-acétaldéhyde. Enfin le glyoxal ne représente que 10 à 14% et le méthylglyoxal 2 à 4%. Ils sont tous issus de la phase gaz et sont une source potentielle d'acides carboxyliques après leurs oxydations.

Ces composés cibles (acides carboxyliques et aldéhydes) ne représentent qu'environ 12% de la matière organique totale. Depuis 2016, des acides aminés ont également été caractérisés dans l'eau de nuage collectée au puy de Dôme (Figure 5) (Bianco *et al.*, 2016).

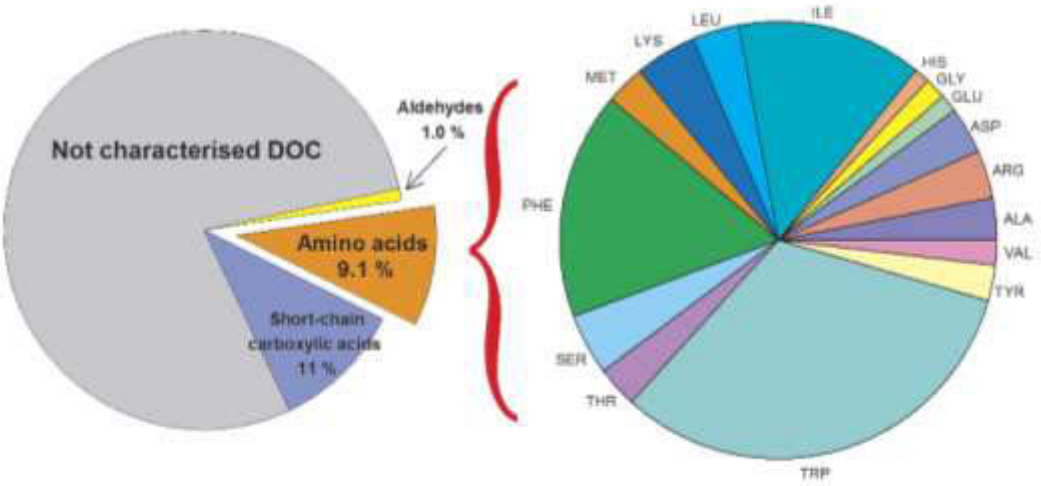


Figure 5 : Distribution relative moyenne des acides aminés, des aldéhydes et des acides carboxyliques mesurés dans 25 échantillons nuageux prélevés au sommet du puy de Dôme. Un zoom sur la distribution des acides aminés est fait (d'après Bianco *et al.*, 2016).

Malgré l'augmentation de la caractérisation de la matière organique a un peu plus de 20%, il reste encore beaucoup d'inconnus sur la composition chimique organique d'un nuage. Les molécules

présentées ici peuvent être la source ou être issues de molécules plus grandes grâce aux phénomènes de recombinaison radicalaire permettant la formation d'oligomères. Des molécules à hauts poids moléculaire sont également présentes mais restent encore non caractérisées et sont regroupées sous le terme HULIS pour Humic-like substances.

I. 2. 3) Le fer et les molécules oxygénées

Dans les nuages, d'autres composés peuvent être retrouvés et participent à la réactivité, notamment les métaux de transition et les molécules oxygénées représentées principalement par le peroxyde d'hydrogène H_2O_2.

Les TMI (Transition Metal Ions) peuvent jouer un rôle important dans cette réactivité comme expliqué dans la publication de Deguillaume *et al.*, 2005. Les métaux de transition les plus étudiés sont le fer, le cuivre et le manganèse. Le fer est le plus abondant en concentration et il est présent dans toutes les eaux atmosphériques : aérosols humides, brouillards, pluies, neige et bien sûr nuages. Il joue donc un rôle important dans la chimie de la phase aqueuse. En effet, ce métal de transition est très réactif. Sa réactivité est dépendante du pH du milieu, de son état d'oxydation et de sa concentration. Dans l'atmosphère, il provient principalement de la phase particulaire, à laquelle peut s'ajouter des sources anthropogéniques. En effet c'est la dissolution des aérosols, tels que les poussières du sol, les cendres, les fumées de combustion et d'usines, qui permet de retrouver ces métaux de transition dans les nuages. La solubilité du fer se calcule en faisant le ratio entre la concentration en fer dissous et celle en fer total. Concrètement, une partie de l'échantillon est filtrée (sur des filtres classiquement de 0,4 ou 0,5 µm de diamètre de pores) et la concentration en fer est mesurée ce qui correspond à la concentration en fer dissous alors que l'autre mesure est faite sur l'échantillon non filtré. La publication de Deguillaume *et al.*, 2005 rapporte les valeurs disponibles pour la dissolution du fer dans des eaux atmosphériques. Elle regroupe 10 valeurs provenant de plusieurs milieux : des eaux de nuage, des brouillards, des pluies et des particules humides. La solubilisation du fer dans ces milieux varient de 0,018 à 22% ; seulement deux nuages sont disponibles et ont des valeurs de 1,3 et 3,6% (pour des nuages collectés à Great Dun Fell et à Frankfurt). La concentration en fer dans les eaux atmosphériques est variable, des concentrations de 10^{-3} à 10^{-6} M ont été retrouvées. Quelques exemples sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Concentrations en fer mesurées dans les nuages pour différents sites. Pour chaque site sont référencées les concentrations minimales et maximales obtenues pour la concentration en fer total et en fer dissous. Référence : Siefert *et al.*, 1998 (1), Arakaki and Faust, 1998 (2), Sedlak *et al.*, 1997 (3), Hoigné *et al.* 1994 (4) et Parazols *et al.*, 2007 (5) (d'après Deguillaume *et al.*, 2005 ; cette publication donne des valeurs plus exhaustives).

Site	Concentration en fer total, µM	Concentration en fer dissous, µM	Type d'environnement	Référence
Montagne Whiteface, EU	< 0,02 – 20,7	0,02 – 1,6	rural	(1) et (2)
Great Dun Fell, Angleterre	0,7 – 3,9	0,06 – 1,6	rural	(3)
Munich, Allemagne	0,09 – 8,3	0,09 – 2,2	urbain	(4)
Bakersfield, CA	0,5 – 0,6	0,2 – 0,4	urbain	(1)
puy de Dôme, France	3,7 – 7,3	0,9 – 5,5	différentes origines	(5)

La concentration en fer est variable d'un site à l'autre mais elle est aussi variable dans le même site. En effet, le site de Whiteface aux États-Unis a les valeurs les plus faibles et les plus fortes de tous les sites référencés ici. Globalement la présence de fer soluble varie de plusieurs ordres de grandeurs car sa solubilité va dépendre de nombreux paramètres physico-chimiques.

Le fer est majoritairement, dans l'eau de nuage, sous deux formes d'oxydation : Fe(II) ou Fe(III). L'état d'oxydation de celui-ci dépend du pH, des processus oxydatifs ou réducteurs et de la présence d'agents complexants (Brigante and Mailhot, 2015). Le Fe(II) est plus présent dans les eaux atmosphériques que le Fe(III), il représente 76% du fer total (Parazols, 2007). Les concentrations en Fe(II) et Fe(III) obtenues pour les différents types de nuages prélevés au sommet du puy de Dôme sont représentées Figure 6.

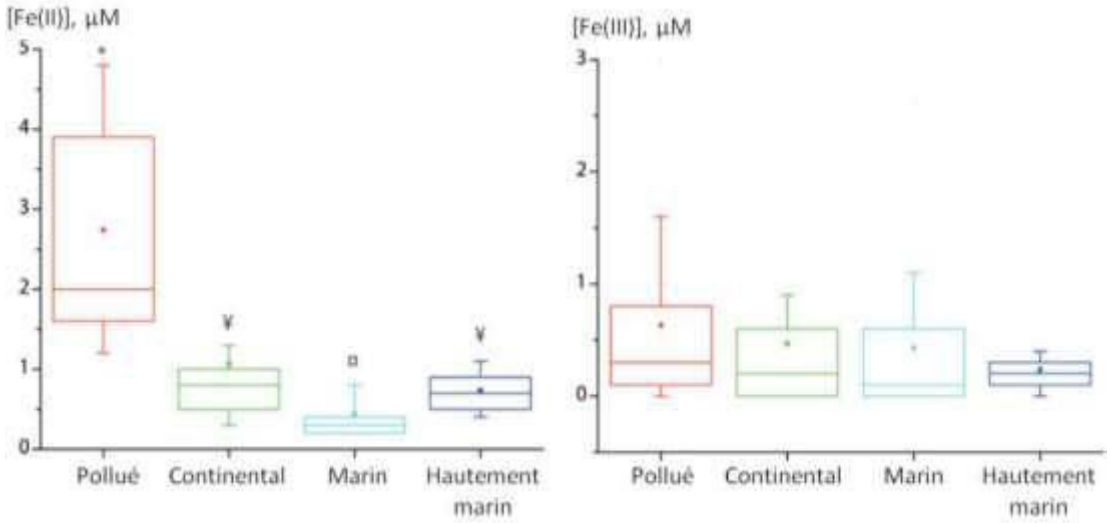


Figure 6 : Concentrations en Fe(II) et en Fe(III) mesurées dans les différents types de nuage collectés au sommet du puy de Dôme. En rouge les nuages pollués comprenant 15 échantillons individuels de nuage, en vert les nuages continentaux avec 31 échantillons, en bleu clair les 69 échantillons de nuage de type marins et en bleu foncé ceux qui sont hautement marins (14 échantillons). Les symboles représentent les différences statistiques entre les groupes après un test de Kruskal-Wallis (p.value < 0,05) (d'après Deguillaume *et al.*, 2014). Ces 129 échantillons proviennent de 73 évènements nuageux.

Sur 73 nuages analysés, la concentration en Fe(II) fluctue de 0,1 µM à 5 µM alors que le Fe(III) est plus faiblement concentré avec des valeurs allant de 0 à 2 µM. En plus d'avoir les valeurs les plus basses, aucun changement significatif de la concentration en Fe(III) ne peut être vu avec les différents types de nuage. A l'inverse, la concentration en Fe(II) présente des valeurs différentes selon le type de nuage. Elle augmente au sein d'un nuage pollué et est la plus faible dans un nuage de type marin. Dans tous les cas et pour tous les types de nuages, la valence majoritaire du fer dans les nuages au puy de Dôme est le Fe(II). Dans la base de données BEAM (http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/data.php), la concentration en fer total la plus élevée est de 9,10 µM et celle du Fe(II) de 6,80 µM (valeurs obtenues pour les 109 nuages collectés du 08/02/2001 au 18/11/2014). Cette prédominance du Fe(II) est explicable si des éléments stabilisants le fer sont présents dans l'eau de nuage. Ces agents sont principalement des complexants organiques puisqu'aucune corrélation n'est visible entre la concentration en fer et celles des composés inorganiques mesurées au puy de Dôme (Parazols, 2007). Le ligand organique modèle est l'oxalate (Long *et al.*, 2013; Weller *et al.*, 2014) mais des discordances sont présentes. En effet, expérimentalement, la photolyse de ce complexe ne donne pas les mêmes résultats que la photolyse d'eau de nuage (Parazols, 2007) et les modèles lorsqu'ils incluent les réactions du fer ne sont plus fidèles aux concentrations mesurées dans l'eau de nuage (Bianco *et al.*, 2015). Ceci laisse à penser qu'il existe d'autres ligands organiques complexant fortement le fer encore méconnus. Ainsi des complexants forts d'origine biologique sont envisagés notamment les EPS (exopolysaccharides) et les sidérophores (ligands produits par les microorganismes) qui ont une forte affinité avec le fer. Une étude récente a permis de mettre en évidence la possibilité de formation de sidérophores par 48% des 450 souches provenant des nuages collectés au sommet du puy de Dôme (Vinatier *et al.*, 2016).

Le fer est donc un élément important à prendre en compte pour la réactivité dans la phase aqueuse de l'atmosphère. Son cycle réactionnel est présenté dans la Figure 7.

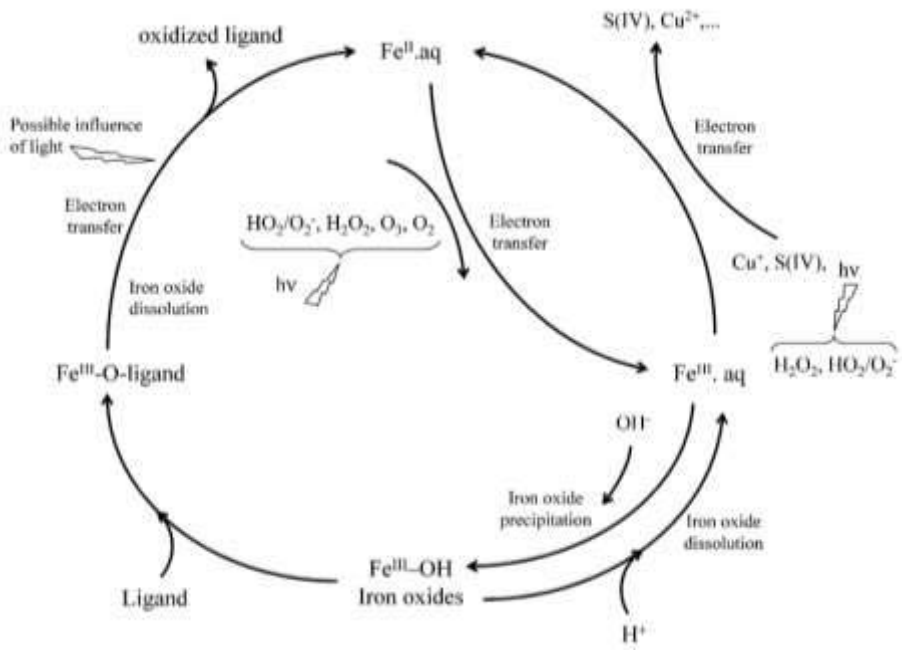


Figure 7 : Schéma réactionnel du fer dans les eaux atmosphériques. Les deux formes du fer sont représentées, les réactions impliquant le fer à l'obscurité et à la lumière sont spécifiées. (d'après Deguillaume *et al.*, 2005 tiré de Behra and Sigg, 1990).

Le cycle du fer est étroitement lié aux molécules oxygénées. Ces molécules oxygénées dans le nuage sont l'oxygène et l'ozone, bien entendu, mais aussi le peroxyde d'hydrogène. L'apport de l'oxygène et de l'ozone n'est pas limitant dans un système atmosphérique car la phase gaz de l'atmosphère comprend ces deux composés. Une attention particulière va être portée sur le peroxyde d'hydrogène : ses sources, sa concentration et sa réactivité. Il peut être émis dans la phase gaz de l'atmosphère par des processus de combustion et par des processus photochimiques importants, l'une de ses principales sources est notamment la dismutation du radical hydroperoxyle (Vione *et al.*, 2003). Sa formation est donc influencée par la présence de polluants atmosphériques (comme les oxydants azotés et les composés organiques) mais aussi par les paramètres météorologiques notamment l'irradiation solaire, la température et le contenu en vapeur d'eau. Sa concentration dans la phase gaz varie selon le cycle diurne, mais aussi avec les saisons et les latitudes. Dans le nuage, le peroxyde d'hydrogène provient surtout de la phase gaz de l'atmosphère car il est fortement soluble dans l'eau (la constante de Henry à 25°C est de 7,4 x 10^4 M.atm^{-1}, Lind and Kok, 1986). Les autres sources du peroxyde d'hydrogène dans la phase aqueuse sont des réactions en solutions impliquant des radicaux libres (comme par exemple la dismutation aqueuse du radical hydroperoxyle et la réduction du radical anion superoxyde par la matière organique), la photolyse de l'ozone, la photo nucléation de la vapeur d'eau et l'irradiation de composés aromatiques (non représentée dans les réactions suivantes) (Vione *et al.*, 2003) :

$$(H_2O_2)_{gaz} \rightarrow (H_2O_2)_{liquide}$$
$$2\ HO_2^{\bullet} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$
$$O_2^{\bullet -} + HO_2^{\bullet} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$
$$O_2^{\bullet -} + HCO_3^- + H^+ \rightarrow H_2O_2 + CO_3^{\bullet -}$$
$$O_2^{\bullet -} + \text{composé organique}_{réduit} \rightarrow H_2O_2 + \text{composé organique}_{oxydé}$$
$$O_3 + H_2O + h\upsilon \rightarrow H_2O_2 + O_2$$
$$H_2O + O_2 + h\upsilon \rightarrow H_2O_2 + O$$

La concentration en peroxyde d'hydrogène atmosphérique est diminuée par les dépôts secs et les précipitations, les réactions qui ont lieu dans la phase aqueuse et sa photolyse (Sakugawa *et al.*, 1990). Il a une grande influence sur la chimie atmosphérique car il est impliqué dans de nombreuses réactions : il peut participer à des réactions de Fenton et photo-Fenton, être une des sources du radical hydroxyle et hydroperoxyle et il peut également réagir avec S(IV) ce qui entraine une acidification des pluies (Vione *et al.*, 2003).

La photolyse

$$H_2O_2 + h\upsilon \rightarrow 2\ {}^{\bullet}OH$$

Réactions possibles dans la phase aqueuse du nuage

$$H_2O_2 + M^n \rightarrow M^{n+1} + OH^- + {}^{\bullet}OH$$
$$H_2O_2 + M^{n+1} \rightarrow M^n + H^+ + HO_2^{\bullet}$$
$$H_2O_2 + {}^{\bullet}OH \rightarrow H_2O + HO_2^{\bullet}$$
$$HSO_3^- + H_2O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + H_2O + H^+$$

Les concentrations en peroxyde d'hydrogène ont été mesurées dans les nuages échantillonnés grâce à des avions ou sur des sites instrumentés (Tableau 3).

Tableau 3 : Concentration en peroxyde d'hydrogène mesurée dans les nuages. [a] réalisés à partir d'avions.

Site d'échantillonnage	Concentration en H_2O_2, µM		Référence
	Minimale	Maximale	
Est des États-Unis [a]	1,2	72	Kelly *et al.*, 1985
Europe [a]	< 1,2	59	Römer *et al.*, 1985
Whitetop Mountain, États-Unis	< 0,04	247	Olszyna *et al.*, 1988
Côte atlantique, États-Unis [a]	0	112	Barth *et al.*, 1989
Great Dun Fell, Angleterre	0,2	4	Gallagher *et al.*, 1991
Mt Mitchell, États-Unis	0	219	Clairborn and Aneja, 1991
Mt Mitchell, États-Unis	8	103	Rao and Collett, 1995
La Jolla Peak, États-Unis	13	72	
Bassin de Los Angeles, États-Unis [a]	1	167	Richards, 1995
Schmücke Mountain, Allemagne	0	126	Valverde-Canossa *et al.*, 2005
puy de Dôme	0,1	58	Deguillaume *et al.*, 2014

La variation de la concentration en peroxyde d'hydrogène est importante dans les nuages, elle fluctue de 2 ordres de grandeur. Cependant il faut noter que ces écarts de concentrations sont globalement les mêmes autour de la Terre. Les concentrations en H_2O_2 sur le site du puy de Dôme sont plutôt basses, elles ne dépassent pas les 60 µM. La moyenne des 109 nuages disponibles sur la base de données BEAM est de 7,53 µM. La Figure 8 présente les concentrations en H_2O_2 obtenues en fonction de l'origine de la masse d'air.

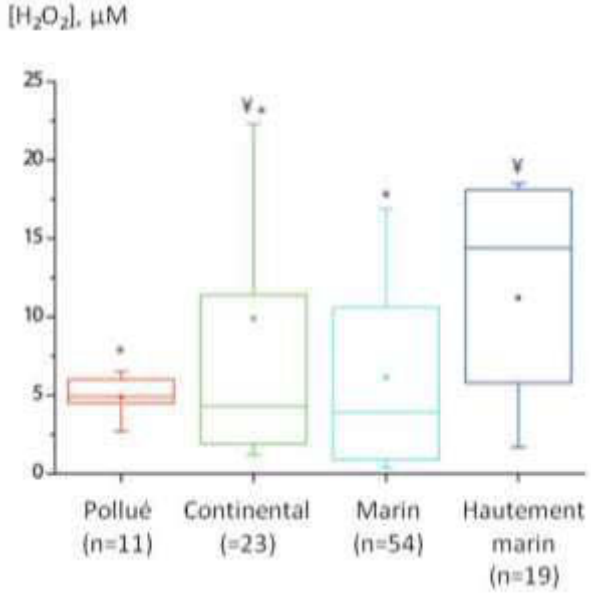


Figure 8 : Concentrations en H_2O_2 obtenues au puy de Dôme selon les 4 origines des masses d'air. Les symboles représentent les différences statistiques entre les groupes après un test de Kruskal-Wallis (p.value < 0,05) (d'après Deguillaume *et al.*, 2014).

Au puy de Dôme, les concentrations en peroxyde d'hydrogène les plus élevées sont retrouvées dans les masses d'air de type continentales et les plus faibles dans les nuages de type marins. La moyenne la plus basse est obtenue pour les masses d'air ayant une origine polluée. Ceci est cohérent avec les puits réactionnels connus du peroxyde d'hydrogène.

Que ce soit le fer ou le peroxyde d'hydrogène, ils sont présents et interviennent dans la chimie du nuage. Le fer intervient dans la formation des radicaux oxygénés et le peroxyde d'hydrogène est produit ou détruit par des réactions chimiques impliquant des radicaux. De plus, ils peuvent réagir ensemble dans les réactions de type Fenton et sont donc fortement impliqués dans les mécanismes de formation des radicaux et plus généralement dans la capacité oxydante du nuage et de l'atmosphère.

II. Les radicaux : une source importante de la réactivité chimique du nuage

Dans les nuages, la plupart des réactions chimiques sont faites par voies photochimiques. La photochimie est l'étude des transformations induites par l'interaction du rayonnement électromagnétique et/ou visible (lumière) avec la matière (Figure 9). L'absorption du rayonnement peut induire la formation d'un état à plus haute énergie aussi appelé état excité (A-B)*. La molécule peut ensuite revenir à son état énergétique le plus stable (état fondamental, A-B) ou subir des transformations telles que la rupture homolytique ou hétérolytique d'une liaison ou la perte d'un électron pour former une espèce radicalaire chargée. L'absorption d'une radiation lumineuse peut donc conduire à la dégradation de la molécule et à la formation de produits secondaires (aussi appelés photoproduits).

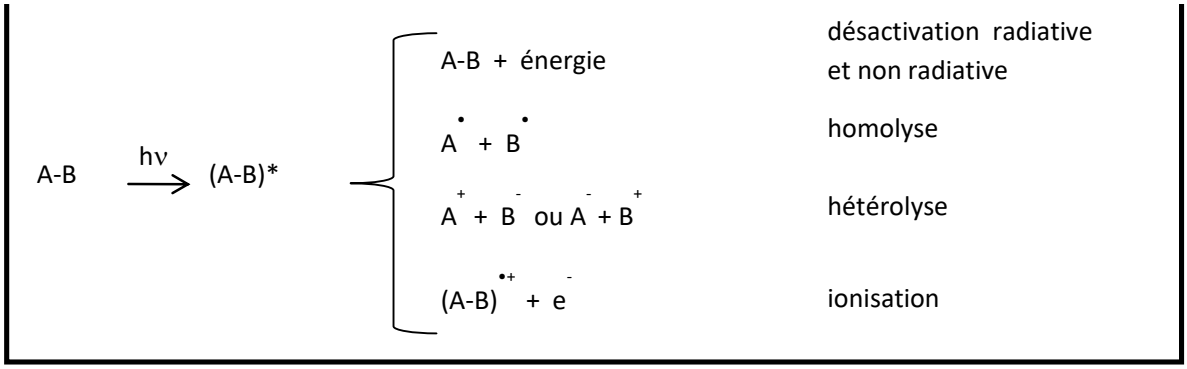


Figure 9 : Transformations induites par l'interaction du rayonnement électromagnétique (lumière) avec la matière.

Deux types de transformations induites par la lumière peuvent se produire :

- Les transformations directes (photolyse) : la molécule absorbe le rayonnement qui peut donc induire une rupture des liaisons chimiques.
- Les transformations indirectes par réaction avec d'autres espèces photo-générées dans le milieu : la lumière peut générer par photolyse des précurseurs (ions nitrate, ions chlorate, *etc.*), ou des espèces fortement oxydantes de courte durée de vie telles que les radicaux. Ces radicaux produits sont alors très réactifs. C'est notamment le cas du radical hydroxyle qui conduira à des réactions secondaires par oxydation d'autres molécules présentes dans l'eau et donc à la formation de sous-produits qui présentent généralement un état d'oxydation plus important (produits d'oxydation). Ces réactions sont aussi appelées réaction d'oxydation photo-induite.

Les radicaux majoritairements produits sont ceux de type H_xO_y et NO_x (mais il existe aussi les radicaux organiques RO_x). En présence de lumière, les radicaux hydrogénés sont les plus importants et principalement le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$) (Herrmann *et al.*, 2010). En l'absence de lumière, le nitrate est le radical majoritaire ($NO_3^{\bullet}$). Ce radical est principalement formé dans la phase gaz par la réaction entre l'ozone et les dioxydes d'azote et par la réaction entre le radical hydroxyle et l'acide nitrique (HNO_3). Dans la phase aqueuse, il est issu du transfert de ce composé de la phase gaz et est donc présent de nuit comme de jour. Par contre il est très sensible à la photolyse, ce qui explique sa prédominance la nuit. Il peut être éliminé par réactions avec des composés carbonés ou avec des composés inorganiques comme le chlore et l'acide nitrique (reformant des anions nitrates).

Ici, nous ne nous intéresserons qu'aux radicaux de type HO_y. Les deux radicaux principaux de forme HO_x sont le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$) et le radical hydroperoxyle ($HO_2^{\bullet}$) ou sa forme déprotonée le radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$). Les sources et les puits de chacun de ces radicaux dans l'atmosphère et dans le nuage vont être présentés, leurs réactivités et leurs concentrations vont être décrites ainsi que les connections entre ces deux radicaux.

II. 1. L'acteur principal de la chimie radicalaire : le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle est le radical ayant le plus d'impact sur la chimie du nuage la journée, il joue donc un rôle important dans la chimie atmosphérique et gouverne la capacité oxydante de l'atmosphère (Gligorovski *et al.*, 2015; Warneck, 1999). Il a notamment été surnommé « le détergent de l'atmosphère » par Paul Crutzen (Crutzen, 1996; Riedel and Lassey, 2008). Il a été découvert la première fois par Haber and Weiss, en 1934. Ils étudiaient la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et les ions ferreux et ferriques et ont pu constater que la décomposition du peroxyde d'hydrogène dépendait de réactions en chaine et impliquait des radicaux, c'est la réaction de Fenton. C'est une molécule composée d'un atome d'oxygène et d'hydrogène possédant un électron non apparié (électron célibataire) sur son orbital externe. Cette caractéristique lui confère un caractère fortement polaire en solution aqueuse, et par conséquent, il est très réactif vis-à-vis de nombreux composés organiques (aliphatiques et aromatiques) ou inorganiques et également avec les organismes vivants. Il réagit donc de manière non spécifique avec tous les types de composés qui possèdent un doublet non liant, une insaturation ou un atome d'hydrogène. Il est à noter que sans le radical hydroxyle, la concentration des gaz à effet de serre tel que le méthane et le monoxyde de carbone serait dix fois plus importante (Wennberg, 2006).

II. 1. 1) Les sources et les puits d'$^{\bullet}$OH dans l'atmosphère

Dans l'atmosphère le radical hydroxyle a un temps de vie de 0,01 à 1 seconde, dans le nuage il est de 2 à 11 microsecondes (Faust, 1999). Du à sa faible durée de vie, ses sources et ses puits sont locaux et dépendent surtout de la composition et de la concentration des espèces à plus longue durée de vie.

Plusieurs réactions chimiques peuvent former le radical hydroxyle. Dans sa publication, Wennberg (2006) représente les voies de formation et la réactivité des radicaux hydroxyles dans la phase gaz de l'atmosphère (Figure 10).

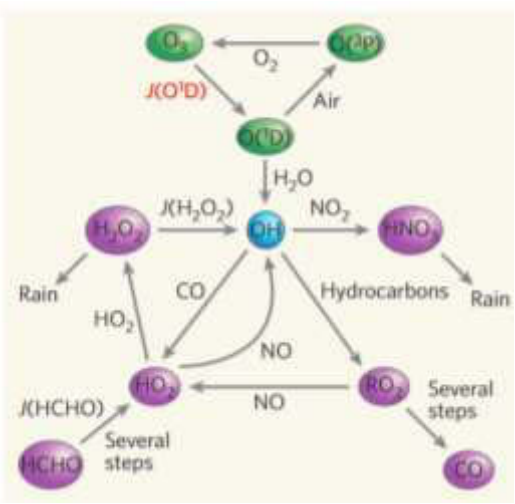


Figure 10 : Formation et réactivité des radicaux hydroxyles dans l'atmosphère. En vert sont représentées les voies majoritaires de formation du radical hydroxyle ; *J* représente la constante de photolyse des molécules par les rayonnements ultraviolets (d'après Wennberg, 2006).

Le radical hydroxyle est principalement formé par la photolyse de l'ozone. Celle-ci entraine la formation d'un oxygène atomique (O^{1D}) qui par réaction avec une molécule d'eau donne deux radicaux hydroxyles. Cet oxygène atomique peut aussi redonner de l'ozone grâce à un changement de son environnement électronique ($O(^3P)$). Le radical hydroxyle est aussi issu de la photolyse du peroxyde d'hydrogène, ce qui donne aussi deux radicaux hydroxyles, et de celle de composés azotés (réactions non représentées sur la Figure 10). L'irradiation d'ions nitrate (NO_3^-) et d'ions nitrite (NO_2^-) conduit aux réactions suivantes :

$$NO_3^- + h\upsilon \rightleftharpoons \left[{}^{\bullet}NO_2 + O^{-\bullet}\right]_{\text{solvent cage}} \rightarrow {}^{\bullet}NO_2 + O^{-\bullet}$$

$$NO_2^- + h\upsilon \rightarrow {}^{\bullet}NO + O^{-\bullet}$$

$$O^{-\bullet} + H^+ \rightleftharpoons {}^{\bullet}OH$$

La photolyse des nitrates et nitrites permet la formation de radicaux nitreux (le dioxyde d'azote et le monoxyde d'azote) et d'un radical oxygéné. La recombinaison de ce radical avec un ion hydrogène conduit à la production du radical hydroxyle. L'acide peroxynitreux et l'acide nitreux (HOONH et HONO), d'autres molécules azotées, peuvent aussi produire une molécule de radical hydroxyle (Gligorovski *et al.*, 2015; Vione *et al.*, 2014). Dans la phase gaz, la concentration en radical hydroxyle est fortement couplée à la constante de photolyse de l'ozone ($J(O^1D)$), aux longueurs d'onde comprises entre 305 et 330 nm. En effet, une corrélation positive entre ces deux paramètres a été démontrée par Rohrer and Berresheim, en 2006.

Afin de trouver les sources du radical hydroxyle dans le nuage, des modèles de chimie atmosphériques ont été utilisés. Ils se sont basés sur des mesures expérimentales de la vitesse de formation et du rendement quantique de formation du radical hydroxyle obtenus pour différentes sources. Les sources testées sont variées : elles comprennent la photolyse des nitrates, des nitrites et du peroxyde d'hydrogène (Hunt and Taube, 1952; Zellner *et al.*, 1990; Zepp *et al.*, 1987) et l'interaction du fer complexé ou non avec le peroxyde d'hydrogène (Benkelberg *et al.*, 1990; Faust and Hoigné, 1990; Faust and Zepp, 1993; Graf *et al.*, 1984; Joseph *et al.*, 2001; Lloyda *et al.*, 1997; Zepp *et al.*, 1992). Toutes ces vitesses de réactions, les rendements quantiques, les coefficients de photodissociation des espèces photolysées et les calculs des coefficients de partitionnement sont implémentés dans des modèles de chimie atmosphérique. Pour voir l'impact d'un paramètre sur la production de radical hydroxyle, des simulations sont faites en activant les voies de production *via* les valeurs de concentrations des composés phares. De nombreuses publications ont été faites, cherchant à voir le lien entre le radical hydroxyle et les autres composés oxygénés comme H_2O_2 et $HO_2^{\bullet}$ (Jacob, 1986) mais la plus grande partie des publications s'intéresse à l'impact du fer (Deguillaume *et al.*, 2005a; Graedel *et al.*, 1986; Weschler *et al.*, 1986). Un exemple illustratif est présenté dans la Figure 11, il provient de la publication de Warneck (1999). Dans cette publication, un modèle simple est utilisé pour mimer la réactivité chimique dans un cumulus continental exposé à la lumière. Le but est d'étudier les mécanismes intervenant dans l'oxydation du dioxyde de soufre et des nitrates. Dans son modèle, plus de 97 réactions sont présentes avec 50 espèces référencées uniquement pour la phase aqueuse du nuage. Parmi les sources du radical hydroxyle, sont présentes la photolyse pour 5 composés (le peroxyde d'hydrogène, le nitrate, le nitrite, l'acide nitreux et l'hydroxyde de fer) et 18 réactions impliquant les métaux de transition (fer et cuivre). Il étudie l'impact des métaux de transition sur la formation des radicaux hydroxyles. Pour cela, il calcule la production d'$^{\bullet}OH$ avec et sans la présence de ces métaux de transition (Figure 11).

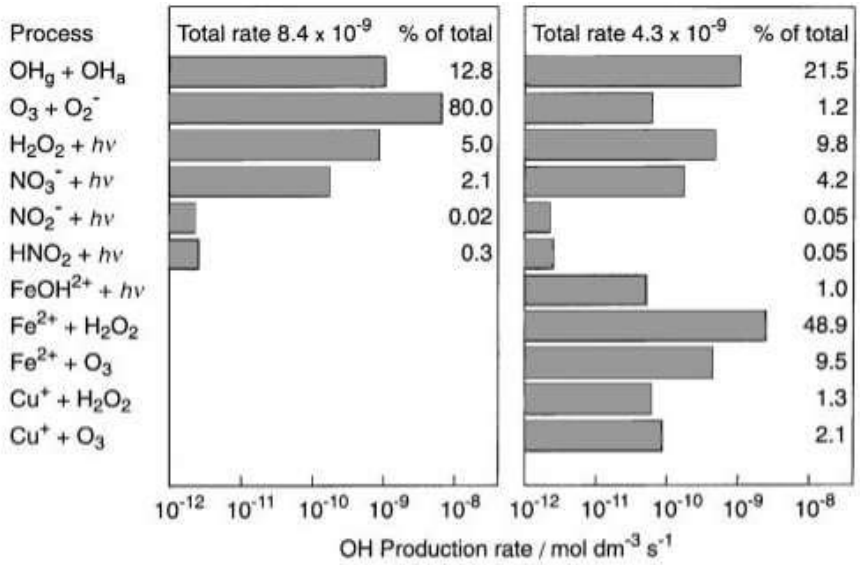


Figure 11 : Contribution relative de différentes réactions à la formation du radical hydroxyle. Valeurs obtenues 600 sec après la formation du nuage. A gauche, les réactions avec les métaux de transition ne sont pas actives alors qu'elles le sont à droite (d'après Warneck, 1999).

Ainsi il a pu montrer qu'en l'absence de fer, les processus dominants entrainant la formation du radical hydroxyle sont la réaction entre l'ozone transféré de la phase gaz et l'anion superoxyde et le transfert de la phase gaz. En présence de fer, la réaction du fer avec le peroxyde d'hydrogène est importante (48,9%) : c'est la réaction de Fenton (Faust and Allen, 1993). Elle est suivie par le transfert de la phase gaz (21,5%), la photolyse du peroxyde d'hydrogène et des nitrates et la réaction entre le fer et l'ozone. Afin de vérifier expérimentalement ce résultat, des mesures de formation de radical hydroxyle dans de l'eau de nuage ont été obtenues et une recherche de corrélation entre celles-ci et d'autres paramètres mesurés dans l'eau de nuage a été faite (Arakaki and Faust, 1998; Bianco *et al.*, 2015; Faust and Allen, 1993). De façon globale, ces mesures montrent que la formation du radical hydroxyle est principalement due à la photolyse du peroxyde d'hydrogène ou des nitrates et à la réaction de Fenton quand le fer est présent en assez grande quantité.

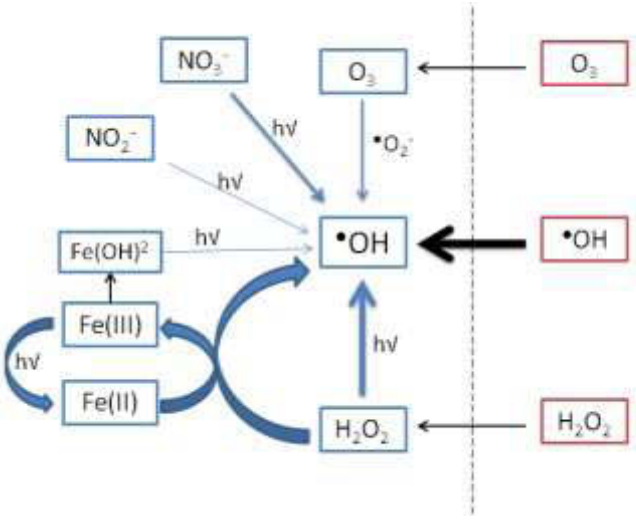


Figure 12 : Schéma des sources du radical hydroxyle dans les nuages. En bleu, les molécules dans le nuage et en rouge celles provenant de la phase gaz. La photolyse des différents composés est retrouvée (hν) ainsi que la réaction de Fenton : $Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + {}^{\bullet}OH + OH^-$.

Si les sources du radical hydroxyle sont facilement représentables (Figure 12), ces puits le sont moins. En effet, comme il est fortement réactif avec tous les types de molécules, il serait illisible de donner une représentation graphique de ces nombreuses réactions car le principal puits du radical hydroxyle est sa réaction avec tous les composés organiques solubles. La première publication prenant en compte ses interactions avec les composés organiques est celle de Graedel and Weschler, en 1981. Dans cette revue, les auteurs référencent plusieurs classes de composés organiques : les alcanes, les alcènes, les terpènes, les composés aromatiques, les alcools, les carbonyles, les acides carboxyliques, les composés organiques basiques et des radicaux organiques (ils font également un paragraphe court sur des composés contenant du sulfure mais ils sont peu trouvés dans l'atmosphère). Ils concluent que le radical hydroxyle est celui qui entraine la première étape d'oxydation de la plupart des molécules organiques. Suite à cela, de nombreuses analyses en laboratoire ont été faites pour quantifier l'oxydation des composés organiques solubles dans l'eau (WSOC). Monod et collaborateurs, en 2005, ont étudié les réactions entre $^{\bullet}OH$ et des composés intéressants pour la chimie atmosphérique. Après avoir étudié la cinétique et le mécanisme de dégradation de ces composés, ils ont évalué leurs temps de vie dans la phase gaz et dans la phase aqueuse de l'atmosphère (Tableau 4).

Tableau 4 : Temps de vie calculés pour différents composés organiques. Le but est de comparer les temps de vie obtenus en présence et en l'absence de nuage. Les temps de vie de ces espèces pour la chimie multiphasique ($\tau_{life\ global}$) ont également été évalués en prenant en compte la probabilité d'un événement nuageux dans la troposphère de 15%. Ces calculs sont basés sur leurs résultats expérimentaux et utilisent la loi de Henry ([1]Sander, 1999). Le % de diminution[2] du temps de vie est calculé comme suit $(\tau_{life\ global} - \tau_{life\ gas})/\tau_{life\ gas}$. Les paramètres de calculs sont les suivants : température à 10°C (283°K), avec une concentration théorique en radical hydroxyle de 10^6 molécules.cm^{-3} dans la phase gaz et de 10^{-13} M dans la phase aqueuse, $[S_{IV}] = 3 \times 10^{-9}$ M, LWC = 0,5 g.m^{-3} et un pH à 5. La constante de réaction dans la phase gaz est soit mesurée soit estimée ([3,4,5]) (d'après Monod *et al.*, 2005).

Compound	Henry's law constant[1] (M atm^{-1} 283 K)	$\tau_{life\ gas}$ clear sky	$\tau_{life\ cloud}$ in-cloud	$\tau_{life\ global}$ 15% cloud	% reduction[2]
Ethyl formate	0.43	12.7 days	7.30 days	11.9 days	−6.4
MEK (2-butanone)	48.7	5.32 days	5.23 days	5.30 days	−0.25
2,2,2-trifluoroethanol	59.0	134 days	111 days	130 days	−2.6
acetone	68.0	327 days	219 days	311 days	−5.0
1-Propanol	494	2.10 days	1.64 days	2.03 days	−3.3
Methanol	555	23.5 days	11 days	21.6 days	−8.0
Ethanol	615	6.4 days	3.8 days	6.0 days	−6.0
Propionic acid	4.10×10^5	9.8 days	2.3 days	8.7 days	−12
4-Methyl phenol (*p*-cresol)	5.32×10^5	4.7 h	2.2 h	4.3 h	−8.0
Phenol	6.96×10^5	14.5 h	6.3 h	13.3 h	−8.5
Formaldehyde	1.07×10^4	2.85 h	2.60 h	2.81 h	−1.3
Formic acid	1.49×10^4	45 days	1.6 h	38 days	−15
Acetic acid	1.69×10^4	23 days	6.8 days	21 days	−11
N-methyl pyrrolidone	6.41×10^4	5.6 h	52 min	4.8 h	−13
Chloroacetic acid	1.20×10^5	23 days[3]	1.5 days	20 days	−14
H_2O_2	3.10×10^5	24 h	5 s	(20.5 h)	(−15)
Succinic acid	3.00×10^8	6.4 days[4]	1.10^{-4} s	(5.5 days)	(−15)
Malonic acid	4.00×10^8	10 days[5]	2.10^{-3} s	(8.2 days)	(−15)

Pour tous les composés chimiques testés, leurs temps de vie sont réduits en présence de nuage. Cette diminution est significative pour les composés modérément et hautement solubles. Ceci est en accord avec la publication d'Arakaki et Faust (1998) où ils ont mesuré la vitesse de formation du radical hydroxyle dans 25 nuages de type continental (les nuages sont prélevés sur le site de Whiteface mountains, aux États-Unis de 1992 à 1995). Dans cette publication, ils ont pu mettre en évidence une diminution du temps de vie du radical hydroxyle lorsque les concentrations en carbone organique dissous, en bisulfite et en chlorure augmentent.

Le radical hydroxyle est très important pour l'atmosphère dû à sa forte réactivité, c'est pourquoi sa quantification est un point crucial pour mesurer son impact sur la chimie atmosphérique.

II. 1. 2) La concentration d'$^{\bullet}$OH issue des modèles de chimie atmosphérique

La plupart des concentrations en radicaux hydroxyles disponibles proviennent de simulations issues des modèles de chimie atmosphérique. Ces modèles deviennent de plus en plus complexes au fur et à mesure des années parce qu'ils dépendent de l'avancée des connaissances et de la compréhension des mécanismes de la physique et de la chimie du nuage. Il est par contre difficile de les comparer entre eux car les paramètres d'entrée et les sujets de recherche sont souvent différents.

Tableau 5 : Concentrations en radical hydroxyle obtenues par modélisation. Pour chaque publication sont référencés les paramètres du nuage (la température, le contenu en eau liquide (LWC) et la taille des gouttes) et le temps de modélisation. Pour donner une idée de la complexité et de l'enrichissement des modèles au cours du temps, le nombre total de réactions présentes dans le modèle est marqué ainsi que la répartition de ces réactions entre la phase aqueuse et gazeuse et les équilibres. Enfin la concentration en radical hydroxyle est indiquée (en M) selon les différents types de nuages modélisés. Pour mieux comprendre le contexte, un bref rappel des buts des publications est fait ci-dessous. (¤) La moyenne des concentrations en radical hydroxyle est indiquée dans le tableau : [•OH] = 7 x 10^{-14} M à minuit et [•OH] = 1 x 10^{-12} M à midi. (*) Nuage des tropiques de type continental avec forte émissions biogéniques. [1] Le rayon des gouttes suit une loi gaussienne centrée sur 0,1 µm. (◊) représente les concentrations moyennes obtenues sans (0,9) ou avec (1,0) prise en compte des réactions de Fenton.

Publications	Chameides and Davis, 1982	Jacob, 1986	Herrmann *et al.*, 2000	Leriche *et al.*, 2000	Ervens *et al.*, 2003	Barth *et al.*, 2003	Deguillaume *et al.*, 2004	Deguillaume *et al.*, 2005b	Herrmann *et al.*, 2005	Leriche *et al.*, 2007	Tilgner and Herrmann, 2010	Deguillaume *et al.*, 2010	Herrmann *et al.*, 2010	Tilgner *et al.*, 2013	Mouchel-Vallon *et al.*, 2017
Température, °C	7	25	15	-3	15	12	15	15	25	-3	25	15	25	25	17
LWC, $g.m^{-3}$	1,5	0,5	0,3	0,25 à 0,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2 à 0,4	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3
Rayon des gouttes, µm	12	10	1	10	10	10	10	10	1 à 64[1]	10	1 à 64[1]	10	1 à 64[1]	1 à 64[1]	10
Temps de simulation, (Saison simulée)		1h (Printemps)	48h (Eté)	3h (Hiver)	72h (Eté)	12h (Eté)	72h (Eté)	72h (Eté)	96h (Eté)	0h12 (Hiver)	8 nuages de 2h/120h (Eté)	72h (Eté)	14h, 58h et 72h (Eté)	8 nuages de 2h/120h (Eté)	12h (Eté)
Nom du mécanisme réactionnel du modèle			CAPRAM 2.3	M2C2	CAPRAM 2.4		M2C2	M2C2	CAPRAM 3.0	M2C2	CAPRAM 3.0	M2C2	CAPRAM 3.0i	CAPRAM 3.0i	CLEPS
Nombre de réaction (gaz-aqueuse-équilibre)	68 (9-46-13)	208 (100-96-12)	399 (160-205-34)	257 (101-143-13)	676 (237-382-57)	78 (33-25-20)	354 (101-235-18)	354 (101-235-18)	1 014 (237-688-89)	373 (101-252-20)	1 014 (237-688-89)	373 (101-252-20)	1 014 (237-688-89)	1 014 (237-688-89)	3 358 (2 043-850-465)
[•OH], M Nuage Continental	3,5 x 10^{-13} (¤)	4,0 x 10^{-13} (*)	1,7 x 10^{-12}	2,0 x 10^{-14}	2,0 x 10^{-13}	1,6 à 2,3 x 10^{-14}	1,5 x10^{-12}	0,9 à 1,0 x 10^{-12} (◊)	1,5 x 10^{-13}		1,0 x 10^{-14}	2,2 x 10^{-13}	2,2 x 10^{-14}	0,6 à 1,3 x 10^{-13}	0,3 à 3,0 x 10^{-14}
[•OH], M Nuage Marin			1,9 x 10^{-12}		4,5 x 10^{-13}		4,8 x 10^{-13}						2,0 x 10^{-12}		
[•OH], M Nuage Pollué			1,4 x 10^{-12}		1 x 10^{-13}		1,2 x10^{-12}			3,0 x 10^{-14}	5,0 x 10^{-14}		3,5 x 10^{-15}	0,6 à 1,0 x 10^{-14}	

Certaines publications ont pour but d'étudier la chimie radicalaire dans la phase aqueuse du nuage (Chameides and Davis, 1982; Herrmann *et al.*, 2000, 2010; Jacob, 1986; Tilgner *et al.*, 2013), d'autres cherchent à estimer l'impact de la voie radicalaire sur la dégradation de molécules carbonées (Mouchel-Vallon *et al.*, 2017; Tilgner and Herrmann, 2010). Les modèles ont aussi été utilisés pour voir l'influence des voies réactionnelles impliquant les métaux de transition, de façon globale (Deguillaume *et al.*, 2004, 2005b) ou sur un point précis tel que la dissolution du fer dans le nuage (Deguillaume *et al.*, 2010) ou la présence de fer complexé avec des carboxylates (Weller *et al.*, 2014). Enfin les dernières publications ont testé de nouveaux paramètres, simplifié et/ou amélioré les modèles. Pour cela, ils comparent les modèles entre eux ou avec leur version précédente (Barth *et al.*, 2003; Ervens *et al.*, 2003; Herrmann *et al.*, 2005) ou encore à des mesures expérimentales (Leriche *et al.*, 2000, 2007). NB : CLEPS et M2C2 font référence au même modèle.

Les différentes concentrations en radicaux hydroxyles obtenues par les modèles sont présentées dans le Tableau 5. Ce tableau donne une idée de la variation de la concentration en radical hydroxyle obtenue dans des modèles "simple boite" à travers le temps. Afin de parler de l'évolution de cette concentration, 4 catégories ont été faites : avant les années 2000, entre les années 2000 et 2009, après 2009 et en 2017.

Avant les années 2000 les simulations ne se faisaient que pour un type de nuage, elles avaient pour but de simuler la réactivité entre les composés organiques et les H_XO_Y. Après les années 2000, l'augmentation des connaissances sur ce milieu a permis la modélisation de 3 types de nuage : le nuage continental, marin ou pollué (dit aussi urbain). En 1986, la concentration en radical hydroxyle était de l'ordre de 10^{-13} M mais le nombre de réactions considérées dans la phase aqueuse était faible (68). Puis dans les années 2000, la modélisation de la concentration en radical hydroxyle fluctuait entre 10^{-12} et 10^{-13} M. Les modèles utilisés se sont complexifiés au fur et à mesure entrainant des changements dans la concentration en radical hydroxyle simulée. En effet, pour un même auteur (Herrmann), une simulation en 2000 donne une concentration en radical hydroxyle à 10^{-12} M alors que 5 ans après cette même concentration est de 10^{-13} M. La valeur en radical hydroxyle la plus basse simulée durant cette période (pour un nuage continental) est de 10^{-14} M (Barth *et al.*, 2003). Le dernier modèle utilisé est très complexe (CLEPS a plus de 3 000 réactions). De plus, une constante de réactivité entre la matière organique et le radical hydroxyle est appliquée à tous les composés (même si leurs mécanismes de dégradation ne sont pas connus). Les valeurs alors obtenues fluctuent entre 3 x 10^{-15} et 3 x 10^{-14} M. Les valeurs en radical hydroxyle simulées par les modèles de chimie atmosphérique varient donc de 10^{-12} à 10^{-15} M. Il est à noter que la concentration en $^{\bullet}OH$ simulée diminue au fur et à mesure des années avec la complexification des modèles.

En effet, les chercheurs se sont rendus compte que leurs modèles avaient tendance à surestimer la concentration en radicaux. L'implémentation de molécules carbonées plus complexes a permis de diminuer la concentration en radical hydroxyle obtenue, principalement dû à l'augmentation de ces puits. Malheureusement, il reste encore beaucoup de molécules dont la réactivité n'est pas connue ou qui ne sont pas encore implémentées dans les modèles (dû à la difficulté et au temps nécessaire à la réalisation de ce travail). Ainsi, en 2013, Arakaki et collaborateurs ont constaté que les radicaux hydroxyles ont bien été surestimés dans les modèles de chimie atmosphérique et l'expliquent par une surestimation de la vitesse de formation et par une sous-estimation des puits (ce paramètre prédomine sur le premier). Dans un premier temps,

ils comparent les concentrations obtenues en milieu réel avec celles simulées et trouvent des différences. Afin de régler le problème, ils proposent d'implémenter une constante de vitesse d'élimination d'•OH (k'_{OH}). Puisque le puits majoritaire du radical hydroxyle est sa réactivité vis-à-vis de la matière organique dissoute (88%), ils mesurent ou calculent cette valeur dans différentes eaux et la comparent à la concentration en carbone organique dissous (Figure 13).

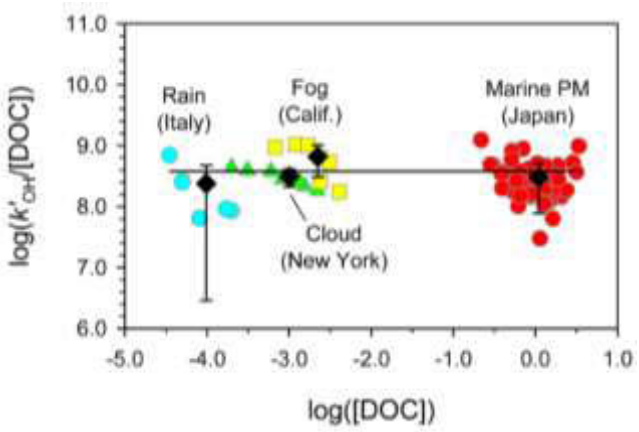


Figure 13 : Relation entre la concentration en carbone organique dissous [en (mol de C).L^{-1}] et la constante de vitesse d'élimination de •OH (*k*'OH)/[DOC] [en L.(mol de C)$^{-1}$.s^{-1}] dans les eaux atmosphériques. En rouge, les particules marines collectées à Okinawa, Japon (la valeur de *k*'OH est mesurée), les carrés jaunes représentent les brouillards récoltés en Californie, États-Unis (Anastasio and McGregor, 2001), les triangles verts sont pour les nuages échantillonnés à New York, États-Unis (Arakaki and Faust, 1998) et enfin les ronds bleus illustrent les pluies collectées en Italie (Warneck, 2005). Les valeurs de *k*'OH pour les trois dernières catégories ont été calculées. La moyenne des valeurs pour chaque catégorie est représentée par les diamants noirs et la ligne noire indique la moyenne globale (d'après Arakaki *et al.*, 2013).

Grâce à cela, ils ont pu relier la valeur de la constante de vitesse d'élimination d'•OH (k'_{OH}) à la concentration en carbone organique dissous :

$$k'_{OH}\ (\mathrm{s}^{-1}) = [\mathrm{DOC}] \times k_{\mathrm{C,OH}}$$

où $k_{\mathrm{C,OH}} = 3{,}8 \pm 1{,}9 \times 10^{8}$ L.(mol de C)$^{-1}$.s^{-1}

Ils proposent donc que l'estimation des puits pour les radicaux hydroxyles soit faite en utilisant cette équation. L'implémentation de cette constante de vitesse ($k_{\mathrm{C,OH}}$) dans les modèles est recommandée par Herrmann (Herrmann *et al.*, 2015).

Il en résulte que pour l'instant les valeurs en radicaux hydroxyles ne peuvent pas être obtenues grâce à la modélisation, ces valeurs étant encore surestimées, il est donc important de mesurer les concentrations en •OH dans les échantillons naturels.

II. 1. 3) Les concentrations d'$^{\bullet}$OH dans les milieux naturels

Plusieurs techniques permettent de mesurer la concentration en radical hydroxyle. Leurs productions et leurs détections peuvent se faire directement par photolyse laser des principaux précurseurs du radical hydroxyle (Laser Flash Photolysis) et par résonance paramagnétique électronique. Cependant, comme les radicaux sont des espèces avec un temps de vie court, ils sont souvent difficilement mesurables car ils sont proches des limites de diffusion, leur détection nécessite alors de les piéger pour obtenir des espèces plus stables. Ainsi l'autre possibilité est donc de faire une mesure indirecte par l'intermédiaire de sondes chimiques. Ces sondes sont le plus souvent des molécules aromatiques et elles sont souvent détectables par spectrophotométrie UV-visible, fluorescence, chimiluminescence ou spectrométrie de masse (Gligorovski *et al.*, 2015).

Peu de publications sont disponibles sur la mesure d'$^{\bullet}$OH à l'état stationnaire dans la phase aqueuse des nuages, par contre plusieurs mesures dans les eaux de lacs, les eaux douces ou maritimes ont été faites (Tableau 6). Un état stationnaire est défini quand la vitesse de consommation est égale à la vitesse de formation de l'espèce. Dans ces publications, la plupart des analyses sont faites par HPLC en suivant le produit de réaction entre $^{\bullet}$OH et une sonde. Ces sondes sont l'isopropylbenzène, le chlorure de butyle, le méthanol, le nitrobenzène, l'acide benzoïque et le benzène. Pour la plupart ces molécules sont des dérivés du benzène car le benzène est la sonde la plus efficace (Vione *et al.*, 2010). Parmi les 11 publications citées, la concentration $^{\bullet}$OH à l'état stationnaire a été mesurée dans 5 lacs, 7 cours d'eau et 6 mers. Les eaux douces présentent de grandes variations en concentration en radical hydroxyle. La concentration dans les lacs varie de 10^{-18} à 10^{-14} M, celle des cours d'eau fluctue entre 10^{-17} et 10^{-15} M. En revanche, la concentration dans les milieux marins est plus basse, avec des mesures allant de 10^{-20} à 10^{-17} M. Ces variations sont explicables par les différentes concentrations en nitrate et en matière organique présentes dans les eaux. A ceci s'ajoute des différences de température, d'exposition à la lumière et un gradient de concentration dans la colonne d'eau.

Tableau 6 : Concentration à l'état stationnaire des radicaux hydroxyles dans différents milieux aquatiques. Les concentrations en radicaux hydroxyles sont directement mesurées dans les publications citées sauf celles avec (α) qui donnent une concentration en $^{\bullet}OH$ estimée (en divisant la vitesse de formation par une concentration en piégeurs estimée) et celle avec (β) n'a pas pu être classée. Pour chaque concentration obtenue, la sonde utilisée est indiquée ; la sonde ou son produit de réaction sont suivis par HPLC ([1]), par spectrophotométrie UV-visible ([2]) ou par chromatographie gazeuse ([3]).

Publications	Sondes utilisées	Localisation	Sites	$[^{\bullet}OH]_{ES}$, M
Mill *et al.*, 1980	Isopropylbenzène[1]	Palo Alto, États-Unis	Lac Boronda	$2,0 \times 10^{-16}$
		Floride, État-Unis	Rivière Aucilla	$1,8 \times 10^{-17}$
		San Jose, État-Unis	Ruisseaux Coyote	$1,6 \times 10^{-17}$
Russi *et al.*, 1982 (β)	Benzène[2]	Suisse	Goldach	$\sim 5 \times 10^{-16}$
Haag and Hoigné, 1985	Butyl-chloride[3]	Suisse	Lac Greifensee	$7,0 \times 10^{-15}$
Zepp *et al.*, 1987 (α)	Butyl-chloride[1] Nitrobenzène[1]	Suisse	Lac Greifensee	$2,5 \times 10^{-16}$ à $3,0 \times 10^{-18}$
		Pacifique	Océan Pacifique	$2,2 \times 10^{-19}$
Zhou and Mopper, 1990	Méthanol[1] Acide benzoïque[1]	Floride, État-Unis	Baie de Biscayne	$5,6 \times 10^{-18}$
		État-Unis	Mer des Sargasses	$9,5$ à $13,5 \times 10^{-18}$
Brezonik et Fulkerson-Brekken, 1998	Butyl-chloride[3]	Minnesota, Etat-Unis	Blue earth river	$8,4 \times 10^{-15}$
		Idaho, Etat-Unis	Mann creek	$3,8 \times 10^{-15}$
		Winconsin et Minnesota, État-Unis	Lac Minntonka, Nichols et Vandercook	$0,6$ à $1,5 \times 10^{-14}$
Arakaki *et al.*, 1999	Benzène[1]	Japon*	Pluies et Rosées	1×10^{-15}
Anastasio and McGregor, 2001	Benzène[1] Acide benzoïque[1]	Californie, État-Unis	Bouillards	3 à 7×10^{-16}
		Tenerife, Canary	Nuage	1 à 7×10^{-16}
Qian *et al.*, 2001	Acide benzoïque[1]	Péninsule Antartique	Mer Scotia et Weddell	$0,1$ à $4,3 \times 10^{-19}$
al Housari *et al.*, 2010	Benzène[1]	Camargue, France	Estuaire Vaccarès	$1,71 \times 10^{-16}$
			Canal Fumemorte	$9,41 \times 10^{-17}$
Albinet *et al.*, 2010 (α)	Benzène[1]	Turin, Italie	Pluies	$0,8$ à $1,5 \times 10^{-15}$

Trois publications uniquement ont donné une concentration à l'état stationnaire en $^{\bullet}OH$ dans des eaux atmosphériques : la rosée, les pluies et les nuages (Albinet *et al.*, 2010; Anastasio and McGregor, 2001; Arakaki *et al.*, 1999). Parmi elles, deux publications mesurent réellement la concentration en radical hydroxyle alors que l'autre l'estime.

Un focus sur les concentrations obtenues pour la pluie et la rosée permet de voir que les valeurs sont semblables, avec des concentrations moyennes allant de 0,8 à 1,2 x 10^{-15} M malgré la localisation très différente des prélèvements (Tableau 7).

Tableau 7 : $[^{\bullet}OH]_{ES}$ obtenues ou calculées pour la rosée et la pluie.

Publications	Type d'échantillon	Nombre d'événement	$[^{\bullet}OH]_{ES}$, x 10^{-15} M Min-Max	$[^{\bullet}OH]_{ES}$, x10^{-15} M Moyenne
Arakaki *et al.*, 1999	Rosées	5	0,38 – 1,44	1,02
	Pluies	8	0,91 – 1,29	0,79
Albinet *et al.*, 2010	Pluies	6	0,87 – 1,51	1,16

Pour finir, l'unique publication mesurant la concentration en radical hydroxyle à l'état stationnaire dans des nuages et brouillards va être étudiée en détail (Anastasio and McGregor, 2001). Dans leur publication, les auteurs ont analysé des brouillards récoltés à Davis, en Californie, et des nuages collectés à Tenerife, dans les îles Canaries. Deux façons différentes ont été utilisées pour récolter les brouillards. Les brouillards récoltés par les auteurs sont échantillonnés sous forme de bulk, ceux échantillonnés par des chercheurs de l'université du Colorado sont séparés selon deux tailles des gouttes (les grosses gouttes ont un diamètre ≥ 23 µm et les petites gouttes ont un diamètre compris entre 4 et 23 µm). Ils ont utilisé deux sondes, le benzène et l'acide benzoïque, à plusieurs concentrations (de 50 à 1 500 µM). Ils mesurent la cinétique de production sous irradiation du phénol et du benzoate, produits de réaction entre leurs sondes et $^{\bullet}OH$, par HPLC. Ils calculent les vitesses de production aux différentes concentrations en sonde et font une régression linéaire entre les inverses de ces vitesses et de la concentration en sonde utilisée (Figure 14).

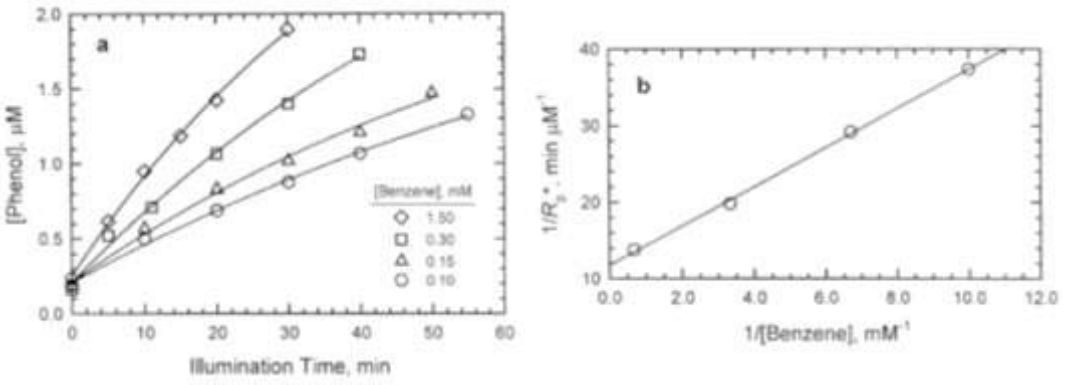


Figure 14 : Détermination des [•OH]$_{ES}$, exemple du phénol. La détermination des cinétiques de photo-formation du phénol permet de mesurer la vitesse de production de celui-ci (R^*_p), puis l'inverse de cette production ($1/R^*_p$) est reporté en fonction de l'inverse de la concentration en sonde utilisée (1/[Benzène]) (d'après Anastasio and McGregor, 2001).

Pour obtenir la concentration en radical hydroxyle, ils utilisent l'équation suivante :

$$\left[{}^{\bullet}\mathrm{OH}\right]_{\mathrm{ES}} = \frac{1}{k_p \times \text{pente} \times \mathrm{Y}_{\text{produit}}}$$

Où k_p est la constante de réaction entre •OH et la sonde ; $Y_{produit}$ est le rendement de cette réaction et la pente est celle déterminée par $1/R^*_p$ en fonction de 1/[Sonde].

Suite à ces calculs, ils obtiennent les [•OH]$_{ES}$ suivantes (Tableau 8).

Tableau 8 : Résultats des [•OH]$_{ES}$ obtenues par Anastasio and McGregor, 2001.

Echantillons	Fractionnement	Sonde utilisée	[•OH]$_{ES}$, x 10^{-16} M
Brouillards	Aucun	Acide benzoïque	6,4 ± 1,6
			6,6 ± 2,0
		Benzène	5,7 ± 0,2
			4,7 ± 1,7
	diamètre entre 4 et 23 µm	Acide benzoïque	4,8 ± 1,2
	diamètre ≥ 23 µm		3,4 ± 0,7
Nuages	diamètre entre 4 et 23 µm	Acide benzoïque	1,7 ± 0,0
	diamètre ≥ 23 µm		7,7 ± 1,9

Toutes les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur. La [•OH]$_{ES}$ obtenue dans les brouillards non fractionnés est de 5,9 ± 0,9 x 10^{-16} M. Lorsque les brouillards sont fractionnés, cette valeur diminue de 19 à 42%. Les auteurs en concluent que la formation du radical hydroxyle est favorisée dans les petites gouttes. Les 2 concentrations en [•OH]$_{ES}$ obtenues pour un même nuage collecté à Tenerife sont de 1,7 et 7,7 x 10^{-16} M et, dans ce cas là, la concentration est plus importante dans les grosses gouttes.

A notre connaissance cette publication est la seule donnant une valeur en radical hydroxyle à l'état stationnaire dans le nuage. Les concentrations obtenues de l'ordre de

quelques 10^{-16} M valident la surestimation de cette concentration par les modèles de chimie atmosphérique (qui fluctue de 10^{-12} à 10^{-15} M). Pour pouvoir mieux estimer l'impact de ce radical sur la chimie atmosphérique, l'implémentation de la constante de vitesse d'élimination d'$^{\bullet}OH$ et un nombre plus important de mesures dans les nuages sont nécessaires.

II. 2. L'anion superoxyde / le radical hydroperoxyle

L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et sa forme protonée le radical perhydroxyle ou hydroperoxyle ($HO_2^{\bullet}$) font partie des oxydants majoritaires dans la phase aqueuse du nuage. Sa réactivité dans la phase gaz est connue depuis les années 1970. Depuis, l'étude de la chimie multiphasique a permis une meilleure compréhension des mécanismes réactionnels et de son importance dans la chimie radicalaire du nuage. Il a été montré que ce radical a des liens étroits avec les radicaux hydroxyles et le peroxyde d'hydrogène.

II. 2. 1) Les sources et les puits de l'anion superoxyde dans les nuages

Dans la phase gaz, le radical hydroperoxyle est issu de la réaction du radical hydroxyle avec le monoxyde de carbone ou le méthane (exemple de la réaction avec le monoxyde de carbone : $^{\bullet}OH + CO \rightarrow H^{\bullet} + CO_2$ et $H^{\bullet} + O_2 + M \rightarrow HO_2^{\bullet} + M$ (où M est un métal de transition)). Il provient aussi de la réaction entre des composés organiques et l'oxygène (par exemple la réaction entre l'oxygène et le radical méthoxyle, qui appartient au cycle du méthane : $CH_3O^{\bullet} + O_2 \rightarrow HCHO + HO_2^{\bullet}$) ou encore résulte de la photolyse de la matière organique. Une fois formé, ce radical peut réagir avec l'ozone, se recombiner avec lui-même ou oxyder la matière organique. Il peut aussi oxyder le monoxyde d'azote entrainant la formation de dioxyde d'azote et de radical hydroxyle, il participe donc de manière indirecte à la formation d'ozone.

$$NO + HO_2^{\bullet} \rightarrow {}^{\bullet}OH + NO_2$$
$$NO_2 \xrightarrow{h\upsilon} NO + O$$
$$O + O_2 \rightarrow O_3$$

Dans la phase gaz, le temps de vie du radical hydroperoxyle est proche de la minute, il est donc supérieur à celui du radical hydroxyle. Il en résulte que sa concentration est 50 à 100 fois plus importante que celle du radical hydroxyle (Monks, 2005).

Sa source principale est similaire à celle du radical hydroxyle. Cependant vu que sa concentration dans la phase gaz est plus importante, son transfert de la phase gaz à la phase

aqueuse est très rapide, il peut être de quelque $nM.s^{-1}$ et est le principal puits du radical hydroperoxyle dans la phase gaz (50% de perte) (Chameides and Davis, 1982; Piechowski *et al.*, 1993; Schwartz, 1984). Il est important dans la chimie du nuage car il est une source de peroxyde d'hydrogène et de radical hydroxyle dans la phase aqueuse du nuage. Tilgner et collaborateurs (en 2013) ont étudié la chimie multiphasique des oxydants importants dans une particule déliquescente ou dans un nuage chaud pour 2 scénarios différents : continental et pollué. Pour se faire ils ont modélisé les sources et les puits de ce composé dans l'eau du nuage urbain (Figure 15).

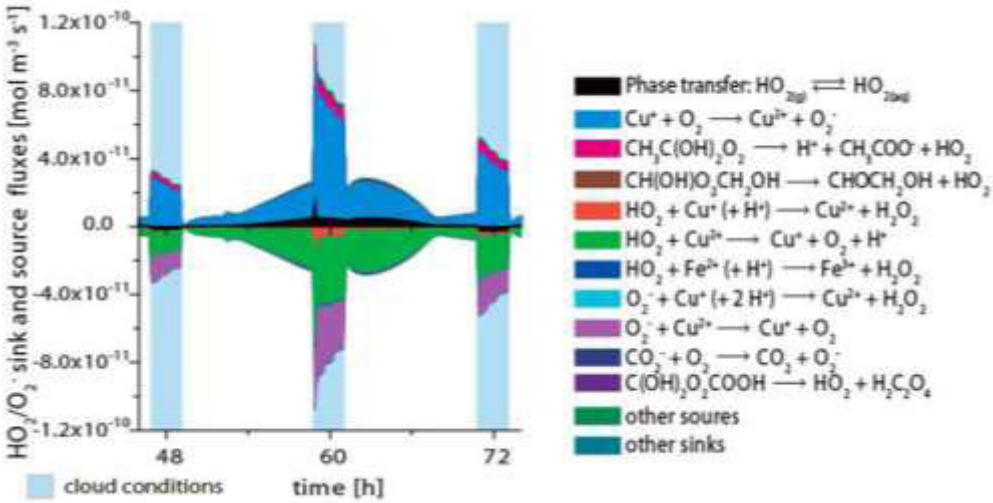


Figure 15 : Sources et puits du radical hydroperoxyle. Le modèle utilisé est CAPRAM 3.0i. En bleu sont représentées les conditions nuageuses (d'après Tilgner *et al.*, 2013).

Les flux ayant un signe positif sont les sources du radical hydroperoxyle alors que les puits sont représentés par des flux négatifs. Les sources majoritaires sont la réaction entre le cuivre et l'oxygène (en bleu), le transfert de la phase gaz (en noir) et la photolyse de radicaux organiques (en rose, 47%). Les puits sont principalement l'interaction de ce radical avec le cycle du cuivre (vert, bleu et violet). L'interaction entre le cuivre et ce radical est donc importante et est principalement gouvernée par les réactions suivantes :

$$Cu^{+} + O_2 \rightarrow Cu^{2+} + O_2^{\bullet -}$$
$$Cu^{2+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Cu^{+} + O_2$$
$$Cu^{2+} + HO_2^{\bullet} \rightarrow Cu^{+} + H^{+} + O_2$$

Le cuivre n'est pas analysé dans les nuages du puy de Dôme mais sa concentration dans les nuages fluctue entre 0,004 et 23 µM (nuages récoltés sur le site de Great Dun Fell, Angleterre et Davis, États-Unis) et il est présent sous forme dissous (Deguillaume *et al.*, 2005). Les réactions entre les métaux de transition et le radical hydroperoxyle sont en compétition avec sa

réaction avec l'ozone et la matière organique (qui sont des puits minoritaires ici). Sa réaction avec l'ozone est d'ailleurs une source de radical hydroxyle dans le nuage mais elle est peu efficace voir inexistante (Jacob, 2000) : $O_2^{\bullet-} + O_3 \xrightarrow{H_2O} OH^{\bullet} + OH^{-} + 2\,O_2$

De plus, le radical hydroperoxyle est une source de peroxyde d'hydrogène en présence de fer et de cuivre mais il peut également produire du peroxyde d'hydrogène en réagissant avec lui-même (Faust, 1999) : $O_2^{\bullet-} + HO_2^{\bullet} \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Cette réaction peut devenir alors l'un des puits majoritaire du radical hydroperoxyle en l'absence des métaux de transition (Chameides and Davis, 1982). Ses réactions avec la matière organique dépendent aussi de la présence de ces métaux de transition. En présence de ceux-ci, la réaction entre les radicaux organiques et les radicaux hydroperoxyles est catalysée par le fer ou le cuivre (Weller *et al.*, 2014) : $ROO^{\bullet} + HO_2^{\bullet} \xrightarrow{\text{Cu et Fe}} ROOH + O_2$

En l'absence de ceux-ci, cette réaction n'a pas lieu, en revanche il peut réagir avec des radicaux carbonnés. En effet, la dégradation du 2-butoxyéthanol entraine la formation d'esters, de cétones, d'aldéhydes *via* la formation d'un radical peroxyle par addition d'oxygène (Stemmler and von Gunten, 2000a, 2000b).

Le radical hydroperoxyle est en interaction avec l'ozone, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle, il est donc important de le quantifier.

II. 2. 2) L'estimation de cette concentration par les modèles de chimie atmosphérique

En comparaison avec le nombre important de publications disponibles pour le radical hydroxyle, peu de publications de modélisation donnent la valeur en radical hydroperoxyle (Tableau 9). Les valeurs fluctuent entre 10^{-13} et 10^{-7} M. Cette fluctuation semble plus dépendre du modèle que du type de nuage. En effet, tous les nuages simulés par Ervens sont de l'ordre du 10^{-13} M, même si dans le nuage pollué la concentration en $HO_2^{\bullet}$ est un peu plus élevée avec une valeur de 8,3 x 10^{-13} M. Par contre, le nuage de type pollué simulé par Deguillaume et collaborateurs, en 2004, a une concentration en $HO_2^{\bullet}$ de 1 x 10^{-7} M. Les dernières publications donnant une valeur de la concentration en radical hydroperoxyle sont celles de Tilgner *et al.* (2013) et Mouchel-Vallon *et al.* (2017). Ils estiment cette concentration aux alentours du 10^{-9} M.

Tableau 9 : Concentrations en radical hydroperoxyle estimées par les modèles.

Publications	Température, °C	LWC, $g.m^{-3}$	Rayon des gouttes, µm	Nombre de réaction	Type de nuage	$[HO^{\bullet}_2]$, M
Chameides et Davis, 1982	7	1,5	12	68	Continental	$4,2 \times 10^{-9}$
Jacob, 1986	25	0,5	10	208	Continental	$1,0$ à $3,0 \times 10^{-8}$
Herrmann *et al.*, 2000	15	0,3	1	399	Marin	$0,01$ à $1,0 \times 10^{-8}$
Ervens *et al.*, 2003	15	0,3	10	676	Continental	$1,3 \times 10^{-13}$
					Marin	$1,0 \times 10^{-13}$
					Pollué	$8,3 \times 10^{-13}$
Barth *et al.*, 2003	12	0,3	10	78	Continental	$1,0 \times 10^{-12}$
Deguillaume *et al.*, 2004	15	0,3	10	354	Pollué	$1,0 \times 10^{-7}$
Deguillaume *et al.*, 2010	15	0,3	10	373	Continental	$1,4 \times 10^{-10}$
Tilgner *et al.*, 2013	25	0,5	1 à 64	1 014	Continental	$2,5 \times 10^{-9}$
					Pollué	$1,0 \times 10^{-8}$
Mouchel-Vallon *et al.*, 2017	17	0,3	10	3 358	Continental	$0,2$ à 3×10^{-8}

Les modèles donnent une bonne vision des mécanismes intervenant dans la chimie du nuage mais ils ne permettent pas une quantification précise d'une molécule. En effet, trop de variables contrôlent la concentration en radical hydroperoxyle notamment la concentration d'autres composés phares comme le cuivre, les radicaux organiques, la composition en matière organique, *etc*. Autant de variables qui sont encore difficiles à prendre en compte dans un modèle. A cela s'ajoute les variations au sein même du nuage car la répartition au sein de la goutte de nuage n'est pas la même pour les deux espèces. Du à sa forte affinité avec l'eau $O_2^{\bullet-}$ a tendance à se mélanger de façon homogène dans la goutte alors que $HO_2^{\bullet}$ a tendance à s'accumuler à l'interface entre l'air et l'eau (Martins-Costa *et al.*, 2012).

II. 2. 3) La concentration en $O_2^{\bullet-}$ dans les milieux naturels

L'anion superoxyde absorbe entre 230 et 350 nm, il peut donc être mesuré directement par absorbance. Pour cela, sa concentration doit être en micro molaire, cependant dans des échantillons réels de fortes interférences peuvent avoir lieu car d'autres composés absorbent aux mêmes longueurs d'onde. Il peut aussi être quantifié par spectrophotométrie en mesurant le taux de dégradation d'un composé qui réagit avec $O_2^{\bullet-}$. Le plus souvent, la ferricytochrome C (FC), le bleu nitré-tétrazolium (NBT) ou le 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) ont été utilisés mais cette technique présente les mêmes inconvénients que la précédente avec

aussi, une spécificité faible. L'utilisation de sonde luminescente permet de dépasser ces biais. Les sondes les plus utilisées sont le luminol, le MCLA (pour 2-méthyl-6-(4-méthoxyphényl)-3,7-dihydroimidazol[1,2a]pyrazin-2(7H)-one) ou le red-CLA (pour [2-[4-[4-[3,7-dihydro-2-méthyl-3-oxoimidazo[1,2a]pyrazin-6-yl]phénoxy]butyramido]éthylamino]sulforhodamine 101). Les deux dernières sondes citées sont les plus efficaces car le luminol réagit aussi avec l'oxygène dissous et le peroxyde d'hydrogène. Le luminol a malheureusement été très utilisé pour quantifier l'anion superoxyde. Il est à noter que le MCLA et le red-CLA réagissent avec l'oxygène singulet mais que cette réaction peut être évitée (Burns *et al.*, 2012).

La concentration en anion superoxyde a principalement été mesurée dans les mers et les océans. Ci-dessous, un tableau récapitulatif des concentrations trouvées (Tableau 10).

Tableau 10 : $[O_2^{\bullet -}]_{ES}$ dans les mers et océans. La plupart des publications obtiennent la concentration à l'état stationnaire en calculant la production et les puits d'$O_2^{\bullet -}$. Pour la publication de Rose *et al.*, 2008, les valeurs prises sont celles obtenues à 1 m de profondeur. ¤ citée dans la publication de Anifowose *et al.*, 2015.

Publications	Localisation	Sites	Sondes	$[O_2^{\bullet -}]_{ES}$, M
Goldstone and Voelker, 2000	États-Unis	Chesapeake Bay	2 propanol et benzophénone	1 à 7 x 10^{-11}
Hansard *et al.*, 2010	États-Unis	Alaska gulf	MCLA	0,4 à 5,5 x 10^{-10}
Rose *et al.*, 2010	Australie	Great Barrier Reef Lagoon	MCLA	1,0 à 5,9 x 10^{-10}
Rose *et al.*, 2008	Pacifique	Océan Pacifique	MCLA	0,3 à 5,4 x 10^{-11}
Heller and Croot, 2009	Antarctique	Drake Passage	MCLA	1,2 x 10^{-10}
Powers and Miller, 2014¤	Monde	Océan	MCLA	0,001 à 2,9 x 10^{-10}
Anifowose *et al.*, 2015	Japon	Seto Inland Sea	3′,6′-(Diphenylphosphinyl)fluorescein	0,6 à 2,7 x 10^{-11}

Les concentrations en anion superoxyde obtenues dans les mers varient peu. Mise à part la publication de Powers et Miller qui estime des valeurs minimales à 10^{-13} M, les autres publications donnent des valeurs de 3 x 10^{-12} à 6 x 10^{-10} M. Les concentrations en radical anion superoxyde sont donc très poches, surtout si on prend en compte la grande variabilité des sites incluant des sites côtiers et des milieux très spécifiques comme la barrière de corail.

Les publications dans l'atmosphère font référence à la phase gaz uniquement. Pour cela, plusieurs stratégies ont été utilisées : soit les mesures ont été faites par avion (Commane *et al.*, 2010; Mauldin III *et al.*, 1997, 1998), soit un monitoring de la phase gaz a été fait à un point donné (campagne Hill Cap Cloud Thuringia en 2010 sur le Mt Schümcke ; Whalley *et al.*,

2015). Dans toutes ces publications, une diminution de la concentration en radical hydroperoxyle de la phase gaz a été constatée lors d'un épisode nuageux (Whalley *et al.*, 2015) mais aucune mesure dans la phase liquide n'a été faite. Il y a donc un manque de connaissance sur le sujet et seules les valeurs issues de la modélisation sont disponibles.

II. 3. Des radicaux en interaction : les liens entre $HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$ et $^{\bullet}OH$

Le radical hydroxyle et le radical hydroperoxyle sont interconnectés l'un à l'autre, comme le montre la figure de la publication de Deguillaume *et al.*, 2005 (Figure 16).

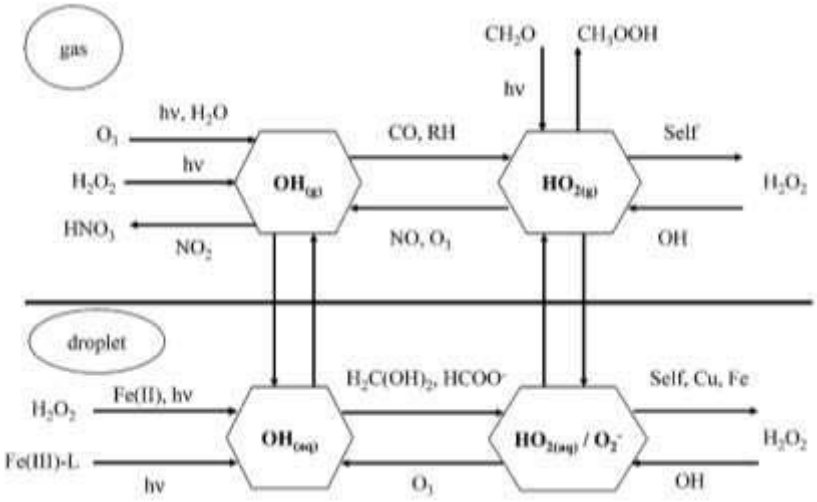


Figure 16 : Les réactions chimiques impliquant $^{\bullet}OH$ et $HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$ dans les nuages (d'après Deguillaume *et al.*, 2005)**.**

Ces deux radicaux sont liés dans la phase gaz et dans la phase aqueuse. Ils sont une source l'un de l'autre. De part sa réaction avec des radicaux organiques ou le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle est une source de radical hydroperoxyle. A l'inverse, la réaction de $HO_2^{\bullet}$ avec l'ozone est une source d'$^{\bullet}OH$. Ils partagent des sources communes comme le peroxyde d'hydrogène et la photolyse de molécules organiques. De plus, ils sont tous les deux dépendant de la concentration en métaux de transition : le fer pour le radical hydroxyle et principalement le cuivre pour le radical anion superoxyde même si le fer peut aussi intervenir.

Ces deux radicaux sont des acteurs importants dans la chimie du nuage. En effet, la chimie radicalaire est le processus prépondérant dans ce milieu.

III. Les microorganismes dans les nuages

La chimie de la phase aqueuse des nuages a toujours été considérée comme gouvernée uniquement par la chimie radicalaire (et notamment la photochimie), cependant des microorganismes métaboliquement actifs ont été découverts dans la phase aqueuse de l'atmosphère. La question se pose alors de savoir qui ils sont et quels sont leurs rôles dans la phase aqueuse des nuages ?

III. 1. Des microorganismes qui survivent

La présence de microorganismes aéroportés n'est pas nouvelle. Elle a été suspectée la première fois au XVIIème siècle, les premiers échantillons eux datent du XIXème siècle (Gregory, 1971; Pasteur, 1862). Plusieurs éléments d'origine biologique ont été retrouvés dans l'atmosphère : des morceaux de feuilles et d'insectes, des pollens et des microorganismes qu'ils soient eucaryotes ou procaryotes (algues, protozoaires, virus, bactéries et champignons sporulés ou non) (Figure 17).

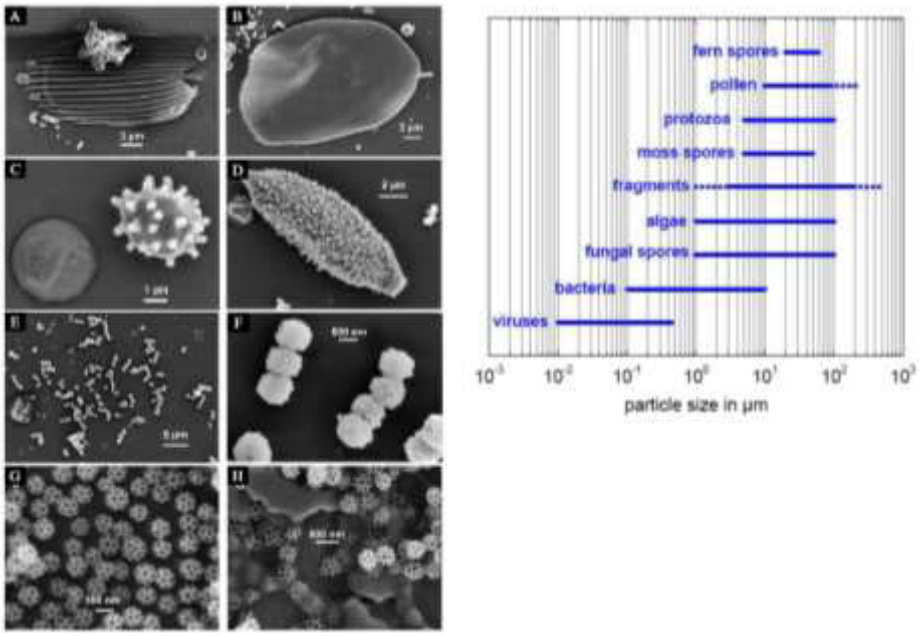


Figure 17 : Bioaérosols vus en microscopie électronique à balayage et leurs distributions selon leurs tailles. A et **B** : écailles d'insectes, **C** et **D** : spores de champignons, **E** et **F** : bactéries, **G** et **H** : brochosomes (granules microscopiques sécrétées par les insectes de la famille des Cicadellidae) (d'après la thèse de Vaïtilingom (2011), issue de la publication de Wittmaack *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces particules constitue les aérosols biologiques primaires (PBA). Ces aérosols peuvent être issus de tous les compartiments de la biosphère avec notamment une forte

implication du sol, de la phyllosphère et des écosystèmes aqueux. L'ensemble de ces particules n'est pas négligeable car elles peuvent représenter 10 à 40% des aérosols totaux présents dans l'atmosphère (Morris *et al.*, 2011).

Parmi l'ensemble de ces aérosols biologiques primaires, nous avons centré notre étude sur ceux ayant les capacités d'influencer la chimie du nuage : les microorganismes. Parmi ceux-ci, les bactéries ont été les plus étudiées. Elles sont ubiquistes dans l'atmosphère et peuvent être transportées sur de longues distances de part leurs tailles. La durée de leur transport a été évaluée par modélisation, elle est de 2 à 10 jours selon les conditions d'humidité (Burrows *et al.*, 2009). Il existe donc un moyen permettant à ces microorganismes d'être incorporés dans les nuages tout en restant vivants.

III. 1. 1) Le cycle de vie des microorganismes dans l'atmosphère

Le cycle de vie de ces microorganismes a été schématisé par Delort *et al.*, 2010 (Figure 18).

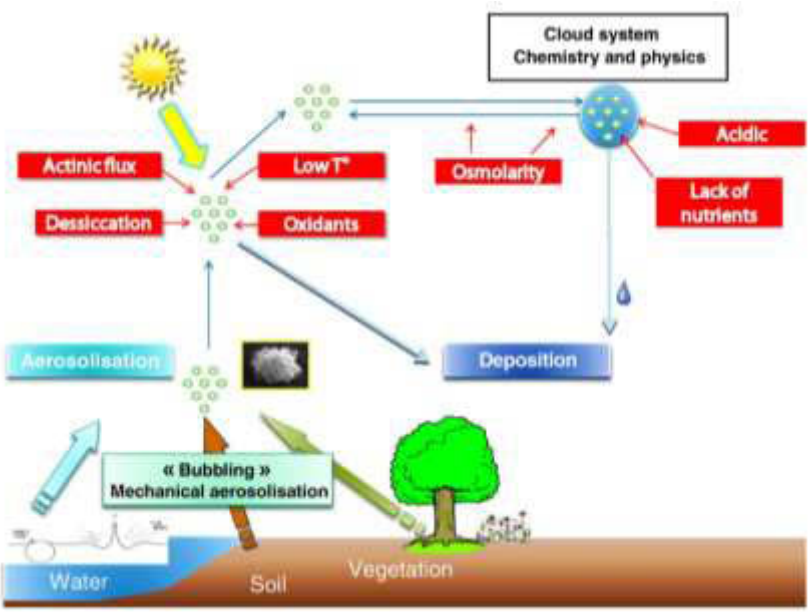


Figure 18 : Cycle de vie des microorganismes dans l'atmosphère (schéma de Delort *et al.*, 2010).

Ces microorganismes commencent leurs transports par un processus d'aérosolisation. Ce processus consiste en l'émission de particules dans l'atmosphère. Il dépend de nombreux paramètres : climatiques (la température, l'humidité, l'irradiation solaire et la vitesse du vent) mais aussi biologiques (la nature du microorganisme comme par exemple sa taille et ses caractéristiques physiologiques : sa pigmentation, sa capacité à être sporulé ou sous forme de

biofilm). Ainsi le milieu d'origine et les conditions environnementales lors de l'aérosolisation vont être des facteurs importants. Une source importante des microorganismes dans l'air est l'océan par le phénomène de bullage. Ce phénomène consiste en la formation de gouttes d'eau par l'action des vagues (les crêtes des vagues ou l'écume) ou par collision avec des gouttes de pluie. Avec ces gouttes d'eau sont emportés les microorganismes qui peuplent la surface des océans. Ceux-ci se retrouvent alors plus concentrés dans cette microgoutte que dans leur goutte d'origine grâce aux propriétés hydrophobes des cellules (Blanchard, 1989; Burger and Bennett, 1985; Grammatika and Zimmerman, 2001; Mayol *et al.*, 2014). Deux autres compartiments participent à l'aérosolisation des microorganismes : la phyllosphère et le sol. L'aérosolisation à partir de ces deux compartiments est fortement contrôlée par les conditions climatiques. La vitesse du vent permet d'arracher les microorganismes de la surface des feuilles ou encore de soulever des particules de terre sur lesquels ils adhérent. L'humidité et la température régulent la formation de bioaérosols car ils influencent la solidité de l'interaction entre les microorganismes et leurs supports (Jones and Harrison, 2004). Les précipitations ont aussi un impact sur l'aérosolisation des microorganismes de la phyllosphère car lorsqu'elles frappent les feuilles, les pluies entrainent l'émission de gouttelettes. Après leur aérosolisation, les microorganismes vont être transportés dans l'air. Là ils peuvent intégrer le nuage en jouant le rôle de CCN puis ils retombent au sol *via* des dépôts humides, sous forme de précipitations, ou secs.

Lors de ce cycle, les microorganismes sont soumis à différents stress : radiatif, osmotique, thermique, chimique et nutritif. Dans la phase gaz, ils vont souffrir de dessiccation, d'irradiation, les températures vont baisser avec l'augmentation de l'altitude et la chimie radicalaire sera très présente. Dans le nuage, l'irradiation diminue mais ils subissent des variations de la teneur en eau de part les processus d'évaporation et de condensation voir de coalescence des gouttes de nuage. De plus, ils restent dans un milieu pauvre, en nutriments carbonés ou en oligo-éléments, qui peut être acide. Pour les microorganismes, il est crucial de maintenir leur homéostasie et de se protéger des dommages que leur causent ces stress. Pour se défendre, ils ont à leurs dispositions plusieurs mécanismes (Tableau 11).

Tableau 11 : Stress et réponses au stress (d'après Vorob'eva, 2004).

Facteur de stress	Effets	Mécanismes de résistance
Stress acide	pH faible	Voie de la déamination de l'arginine entrainant la formation de NH_3 pour neutraliser le milieu
Stress à la chaleur	Dénaturation de protéines	Synthèse de protéines chaperonnes[1] facilitant le repliement des protéines
Stress osmotique (du à un assèchement)	Déshydratation	Transport actif et production d'osmolytes[2]
Stress radiatif	Dommage à l'ADN	Réparation de l'ADN
Stress au froid	Diminution de la traduction, inhibition de la transcription et de la réplication	Protéines CSP[3], stimulation des protéines chaperonnes[1] de l'ARN, efficacité de la traduction
Stress oxydant *	Oxydation des macromolécules	Elimination des espèces réactives de l'oxygène

Les protéines chaperonnes[1] sont des protéines ubiquistes dont le rôle est d'empêcher le repliement des protéines par complémentarité de surface. Les osmolytes[2] sont des petites molécules organiques qui restent solubles dans l'eau même à des concentrations très élevées. Ils peuvent être des sucres (tréhalose, sucrose, mannitol, *etc*), des acides aminés (proline, carnitine, *etc*) mais aussi des petits peptides et des alcools (le glycérol). Les protéines CSP[3] (pour Cold Shock Proteins) sont impliquées dans la synthèse des protéines et repliement des ARNm. Le stress oxydant sera étudié en détail dans la sous-partie III.2.2.

Les microorganismes ont donc développé des mécanismes de défense contre plusieurs stress. Pour évaluer la capacité de réponses aux stress des bactéries du nuage, leur survie a été testée en présence de stress similaires à ceux d'origine atmosphérique (Joly *et al.*, 2015). Dans cette publication, 5 souches collectées dans de l'eau de nuage au puy de Dôme ont été exposées à des stress d'irradiation (exposition sous lumière artificielle mimant le spectre solaire), des chocs osmotiques (différentes concentrations en NaCl mimant les cycles d'évaporation-condensation dans les gouttelettes de nuage), à des cycles de gel-dégel (expositions répétées à des cycles de gel-dégel de 5°C à -40°C) et à des conditions oxydantes (les résultats pour ce stress seront présentés dans la sous-partie III.2.2). La survie des cellules a été estimée par comptage sur boite de pétri. Parmi les stress testés, l'irradiation a eu peu d'impact sur les cellules, le choc osmotique n'a entrainé de mortalité que chez une des 5 souches (*Sphingomonas sp.*) alors que les cycles de gel-dégel ont le plus endommagé les cellules. Ce stress est en fait la combinaison de plusieurs stress : dans un premier temps un stress au froid, puis la formation de cristaux entraine aussi un choc mécanique (présence de cassures au sein de la cellule) et un choc osmotique, à cela s'ajoute un stress oxydant. Toutes les bactéries testées ont été sensibles à ce dernier stress, avec une diminution de croissance entre 20% (pour *Dioszegia hungarica*) et 84% (pour *Arthrobacter sp.*, la plus sensible), ceci au bout de 6 cycles successifs entre des températures extrêmes (5°C et -

40°C) ce qui est relativement drastique. Bien qu'elles soient sensibles à ces stress, les bactéries testées ont été capables de survivre laissant entendre que les bactéries au sein d'un nuage resteront vivantes.

Ainsi les microorganismes peuvent intégrer la phase aqueuse du nuage et résister aux nombreux stress que cela engendre. Malgré tout, les stress environnementaux sont connus pour entrainer une pression sélective sur les espèces du milieu, existe-il donc une population microbienne typique de l'environnement nuage ?

III. 1. 2) Les principaux microorganismes retrouvés

Depuis la découverte des microorganismes dans les nuages, les chercheurs ont tenté d'identifier la communauté microbienne. Pour cela, 2 techniques différentes ont été utilisées : une approche culturale et une approche génomique. La première implique la culture des microorganismes sur un milieu solide souvent pauvre en nutriment ainsi seuls les microorganismes à même de pousser dans les conditions de culture sont accessibles. Les microorganismes cultivables ne représentent que 1% de la population microbienne (Amann *et al.*, 1995). La deuxième approche consiste à extraire l'ADN du milieu, à amplifier les séquences de l'ARNr 16S ou 18S de la communauté et à les séquencer. Une fois obtenues, ces séquences génétiques sont comparées aux séquences génétiques d'organismes connues et sont affiliées à des genres microbiens (il est rare de pouvoir aller jusqu'à l'espèce). Ici, le biais principal vient des bases de données. Plus la base de données est riche en organismes provenant de différents écosystèmes, plus l'identification des séquences est facilitée. Un résumé des publications caractérisant la communauté des microorganismes dans les eaux atmosphériques est présenté dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Communautés microbiennes retrouvées dans les différents sites de prélèvement. ¤ Prélèvement par avion. °air récolté pendant un épisode nuageux le 17 août 2010 avant l'ouragan Earl. Dans la publication de Šantl-Temkiv *et al.*, 2013, des prélèvements sont aussi faits dans l'air. n.d fait référence à un pourcentage global comprenant les deux milieux (*Hyphomicrobium* : 8%, *Variovorax* : 6% et *Pseudomonas* : 5%). * calcul de pourcentage moyen pour 3 pluies.

Référence	Site de collecte	Milieu	Approche	Phylum ou *Genres* majoritaires retrouvés dans la communauté microbienne
Fuzzi *et al.*, 1997	St Pierto Capofiume, Italie	Brouillards	Culturale	**Bactéries :** *Bacillus* (9%), *Pseudomonas* (27%) et *Acinetobacter* (64%) **Champignons :** *Aspergillus* (51%), *Penicillium* (41%), *Geotrichum* (1%), *Phythium* (5%) et non identifiés (2%) **Levures :** *Candida* (67%), *Rhodotorula* (28%), *black yeast* (2%) et non identifiés (3%)
Amato *et al.*, 2005	Sommet du puy de Dôme, France	Nuages	Culturale	**Bactéries :** Actinobacteria (59%), Proteobacteria (18%) Genres majoritaires : *Streptomyces* et *Bacillus* **Champignons :** Basidiomycota (50%) et Ascomycota (42%)
Ahern *et al.*, 2007	Caepa bhal et An Clisean, en Écosse	Nuages	Génomique	**Bactéries :** *Pseudomonas* (26%) et *Acinetobacter* (11%)
Amato *et al.*, 2007b	Sommet du puy de Dôme, France	Nuages	Cultural	**Bactéries :** Actinobacteria (35%), Proteobacteria (30%) et Firmicutes (17%) Genres majoritaires : *Pseudomonas* (11%) et *Staphylococcus* (10%) **Champignons :** Ascomycota (33%) et Basidiomycota (21%)
Bowers *et al.*, 2009	Mont Werner, États-Unis	Prélèvements d'air hors et dans le nuage	Génomique	**Bactéries :** Proteobacteria (83 et 43%), Bacteroidetes (10 et 0%) et Cyanobacteria (0 et 26%) Familles majoritaires : Burkolderiales (96 et 91%) et Moraxellaceae (83 et 92%) **Champignons :** Ascomycota (82 et 92%), Zygomycota (14 et 0%), et Basidiomycota (4 et 8%)
		Neiges		
Kourtev *et al.*, 2011	Péninsule du Michigan, États-Unis	Nuages	Génomique	**Bactéries :** Cyanobacteria (49%), Proteobacteria (22%) et Actinobacteria (18%)
Temkiv *et al.*, 2012	Ljubljana, Slovénie	Nuages	Culturale	**Bactéries :** *Methylobacterium* (17%), *Bradyrhizobium* (8%), *Bacillus* (9%), *Paenibacillus* (7%) et *Afipia* (non précisé)
			Génomique	**Bactéries :** Proteobacteria (31%), Actinobacteria (26%) et Bacteroidetes (16%) Ordres majoritaires : Actinomycetales (15%), Planctomycetales (13%) et Sphingobacteriales (12%)

Référence	Site de collecte	Milieu	Approche	Phylum ou *Genres* majoritaires retrouvés dans la communauté microbienne
Vaïtilingom *et al.*, 2012	Sommet du puy de Dôme, France	Nuages	Culturale	**Bactéries :** Proteobacteria (49%) et Actinobacteria (36%) Genres majoritaires : *Pseudomonas* (53%), *Sphingomonas* (47%) et *Rhodococcus* (41%) **Champignons :** Basidiomycota (90%) et Ascomycota (6%)
DeLeon-Rodriguez *et al.*, 2013	États-Unis, Golfe du Mexique, Mer des Caraïbes et Océan Atlantique ¤	Prélèvements d'air dans le nuage°	Génomique	**Bactéries :** Proteobacteria (>50%), Bacteroidetes (8%) et Firmicutes (6%) Familles majoritaires : Bradyrhizobiaceae (19%), Flavobacteriaceae (8%) et Clostridiaceae (6%)
Šantl-Temkiv *et al.*, 2013a	Aarhus University, Danemark	Pluies	Génomique	**Bactéries :** Proteobacteria Genres majoritaires : *Methylocystis* (21%), *Hyphomicrobium* (n.d %), *Variovorax* (n.d%), *Pseudomonas* (n.d %) et *Pseudoxanthomonas* (3%)
Šantl-Temkiv *et al.*, 2013b	ville de Ljubljana, Slovénie	Grêle	Culturale	**Bactéries :** Proteobacteria et Firmicutes Genres majoritaires : *Bacillus* + *Paenibacillus* + *Bradyrhizobium* (44%) et *Methylobacterium* (22%)
			Génomique	**Bactéries :** Actinobacteria (23%), Plantomycetes (11%), Bacteroidetes (14%) et Proteobacteria (25%)
Cho and Jang, 2014	Séoul, Corée du Sud	Pluies	Culturale	**Bactéries :** Proteobacteria (47%), Firmicutes (35%) et Actinobacteria (18%)
			Génomique	**Bactéries :** Proteobacteria (58%*), Bacteroidetes (16%*) et Firmicutes (13%*)
Amato *et al.*, 2017	Sommet du puy de Dôme, France	Nuages	Génomique	**Bactéries :** Proteobacteria (28 à 51%), Bacteroidetes (5 à 30%), Firmicutes (5 à 18%) et Actinobacteria (6 à 13%) Genres majoritaires : *Bdellovibrio*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Sphingomonas* et *Streptococcus* **Champignons :** Basidiomycota (38 à 60%) et Ascomycota (29 à 48%)
Wei *et al.*, 2017	Mont Thaï, Chine	Nuage	Génomique	**Bactéries :** Proteobacteria (80%), Bacteroidetes (5%), Cyanobactéries (3%) et Firmicutes (2%)
Xu *et al.*, 2017	Mont Thaï, Chine	Nuages	Génomique	**Bactéries :** Proteobacteria (82%), Firmicutes (7%) et Bacteroidetes (4%) Ordres majoritaires : Pseudomonadales (>30%)

Les microorganismes les plus étudiés et identifiés sont les bactéries. Parmi elles, 2 phyla sont majoritairement retrouvés : les Protéobactéries et les Actinobactéries alors que les Bacteroidetes, les Firmicutes et les Cyanobactéries sont plus minoritaires.

Au puy de Dôme, la première publication s'intéressant aux microorganismes dans les nuages est celle d'Amato et collaborateurs, en 2005. Par la suite, d'autres prélèvements ont suivi permettant à Vaïtilingom *et al.* (2012) de faire une description des souches cultivables récoltées entre 2003 et 2010 au sommet du puy de Dôme (Figure 19).

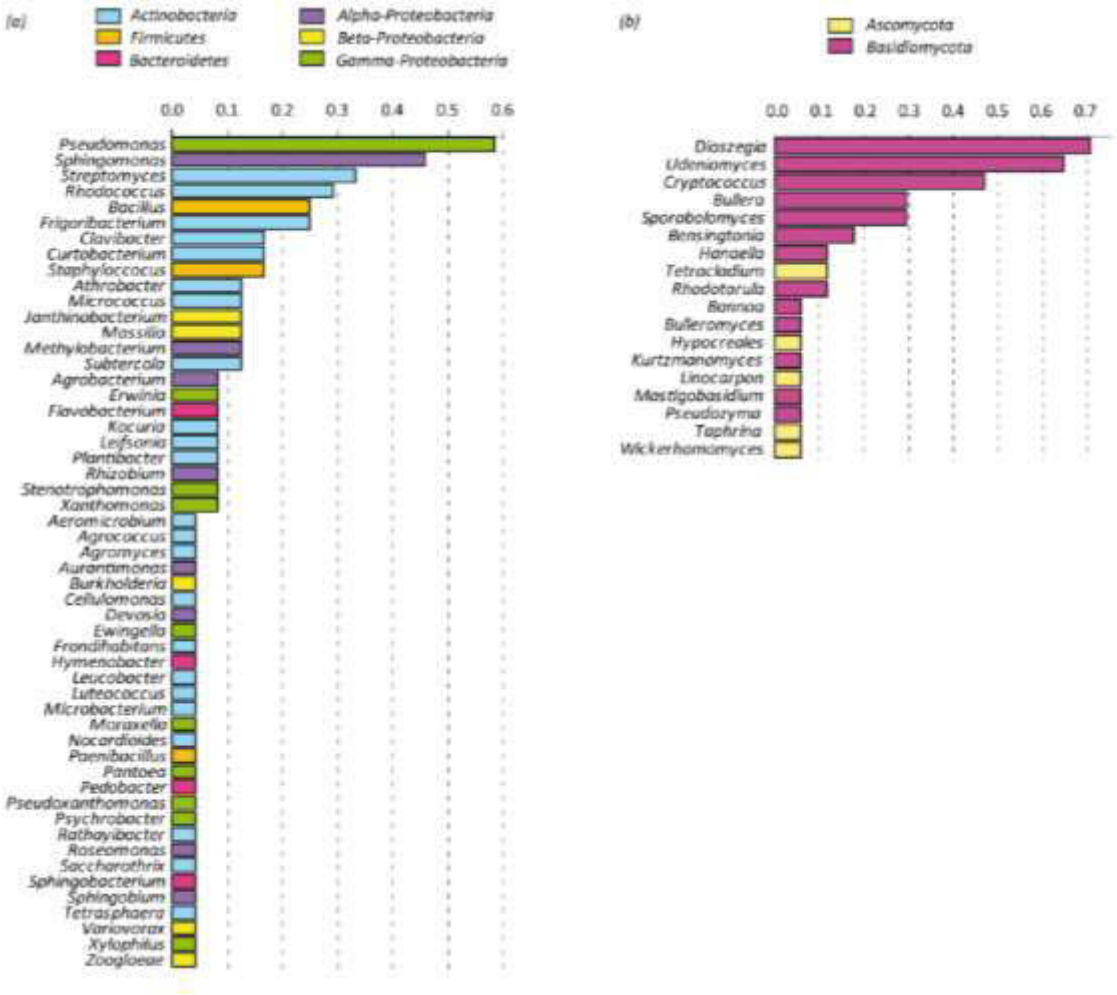


Figure 19 : Fréquence d'observation des souches cultivables collectées au puy de Dôme. En (a) les bactéries et en (b) les levures récoltées entre 2002 et 2010 (d'après la thèse de Joly, 2013 ; tirée de la publication de Vaïtilingom *et al.*, 2012).

Les Gamma-Protéobactéries sont les bactéries les plus fréquemment récoltées dans les échantillons au puy de Dôme et elles sont surtout représentées par l'espèce *Pseudomonas*. Les espèces suivantes sont *Sphingomonas* (Alpha-Protéobactérie), *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Bacillus* (3 Actinobactéries) et *Frigoribacterium* (Bêta-Protéobactérie). Récemment, l'étude de

la population microbienne et de son activité a été faite sur 3 nuages de types différents récoltés au puy de Dôme (Amato *et al.*, 2017a). Dans cette publication, l'ADN et l'ARN des procaryotes et eucaryotes sont étudiés de façon générale, les champignons et les Protéobactéries sont par la suite étudiés plus en détail (Figure 20).

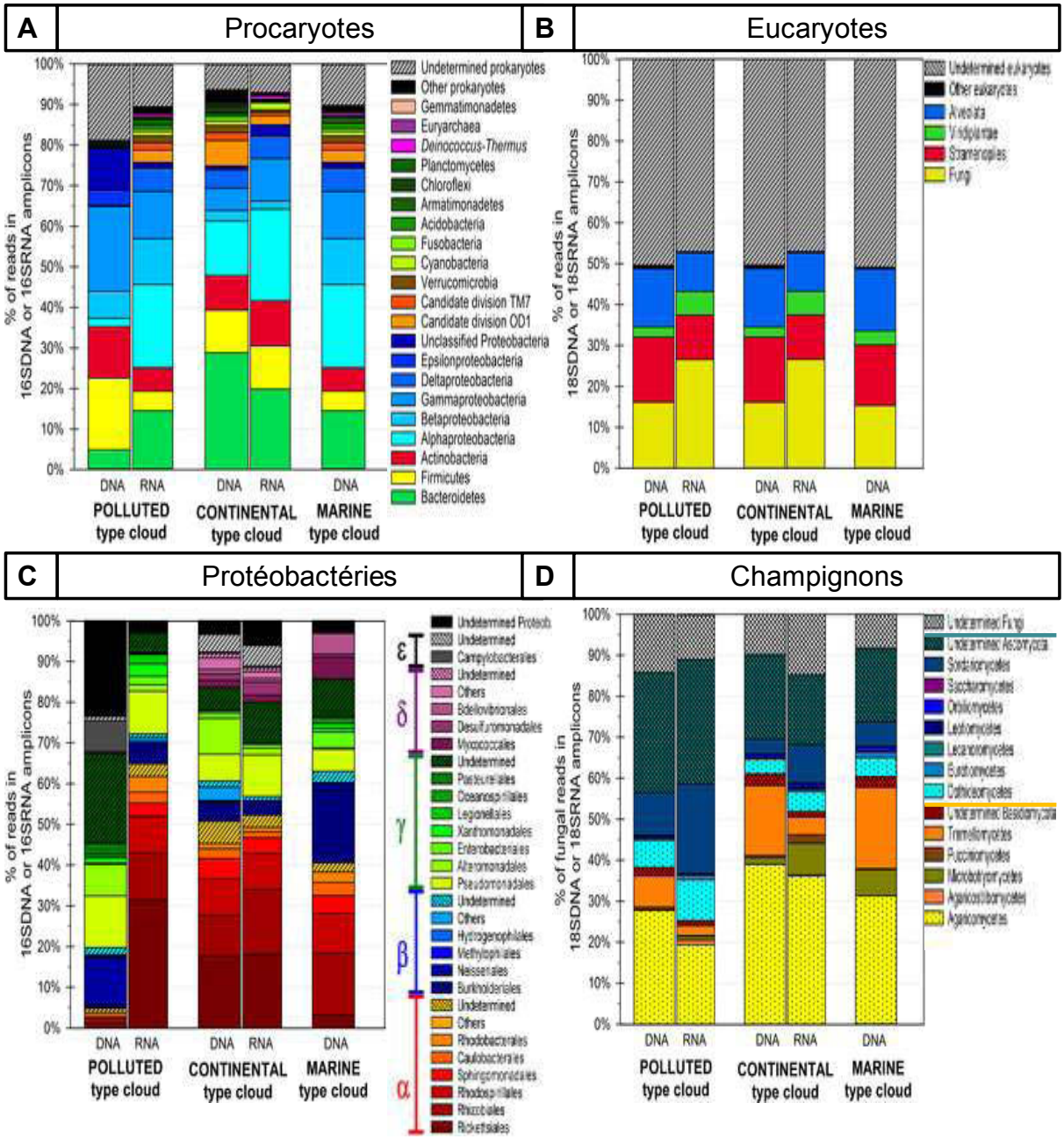


Figure 20 : Composition de la communauté microbienne dans les 3 types de nuages récoltés au sommet du puy de Dôme pour les procaryotes (A) et les eucaryotes (B). Une attention particulière est portée sur les Protéobactéries (**C**) et les champignons (**D**) (d'après la publication d'Amato *et al.*, 2017).

Les phyla majoritaires ont déjà été discutés dans le tableau précédent, ici nous allons étudier plus en détail les genres dominants en fonction des types nuageux et l'activité des différentes communautés. Dans un nuage de type pollué, les genres procaryotes majoritaires sont

Dolosigranulum, *Corynebacterium*, *Moraxella* et *Campylobacterbacteria* alors que dans les nuages marin et continental *Bdellovibrio*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Rickettsia*, *Clostridium*, *Streptococcus* et *Corynebacterium* sont dominants. Pour les eucaryotes, les changements selon le type de nuage sont moins flagrants ceci s'explique facilement car plus de 50% de la communauté n'est pas identifiée. Pour la communauté spécifique des champignons, les mêmes genres sont retrouvés dans tous les types d'échantillons mais leurs proportions varient. Ainsi pour les nuages marin et continental, les *Agaricomycètes* et les *Tremellomycètes* sont fortement représentés (56 et 51%) alors qu'ils diminuent dans le nuage pollué (46%). A l'inverse, les champignons ascomycètes sont plus présents dans le nuage pollué (notamment les non déterminé et le genre *sordariomycètes* qui passent de 40% à 24% dans les deux autres types de nuage).

Les microorganismes retrouvés grâce aux données de méta-génomique sont similaires à ceux cultivables. En effet, parmi les bactéries sont retrouvées principalement les Protéobactéries (41% en moyenne) et dans cette division les classes majoritaires sont les alpha- et les gamma-Protéobactéries (toutes les deux aux alentours de 31%). Les ordres Pseudomonadales et Sphingomonadales, fréquemment récoltés en cultures, sont présents dans les nuages de type marins et continental. Dans ces types de nuage récoltés couramment au puy de Dôme, les Pseudomonadales représentent 5 et 6% et les Sphingomonadales 10 et 9% des séquences assimilées aux Protéobactéries (respectivement pour des nuages de type marin et continental).

Les genres majoritaires ne reflètent pas l'activité de cette communauté, en effet ils représentent chacun seulement 1% de l'activité. Les plus actifs sont les champignons (18 à 27%), parmi les phyla bactériens ayant le plus d'activité (le plus de transcrits exprimés *in situ* dans le nuage) sont retrouvés les Protéobactéries et les Actinobactéries. Parmi eux, les genres majoritaires sont *Rickettsia*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Enhydrobacter*, *Pseudomonas* et *Acidiphilium* pour les Protéobactéries et *Spirosoma*, *Deinococcus*, *Janthinobacterium*, *Frigoribacterium* et *Curtobacterium* pour les Actinobactéries. La conservation d'une activité métabolique avait déjà été montrée par Sattler *et al.*, 2001, *via* l'incorporation de [méthyl-3H]thymidine et de leucine marqués ou par des mesures *in situ* de l'état énergétique des microorganismes des nuages (mesures d'ATP) (Amato *et al.*, 2005, 2007b; Vaïtilingom *et al.*, 2012). L'intégralité cellulaire a été constatée pour 76% des bactéries nuageuses récoltées par Hill *et al.* (2007). De plus, les microorganismes incubés dans de l'eau de nuage pendant 4 jours à 17°C sont capables de se multiplier, en effet leur nombre passe de $7,6 \times 10^4$ à $1,1 \times 10^6$

cellules.mL^{-1} (Amato *et al.*, 2007c). La découverte d'ARN au sein de la phase aqueuse du nuage est une preuve supplémentaire que l'activité microbienne persiste dans ce milieu.

Dans les nuages ont retrouve une communauté comprenant de nombreuses espèces, actives ou non. Leurs densités bactériennes dans ce milieu est faible (Tableau 13).

Tableau 13 : Concentrations en microorganismes retrouvées dans les différents sites de prélèvements.

Sites d'échantillonnage	Concentrations en bactéries, nombre.mL^{-1}	Référence
Mont Sonnblick, Autriche	0,8 à 2,5 x 10^3	Sattler *et al.*, 2001
Mont Rax, Autriche	0,5 à 8,1 x 10^4	Bauer *et al.*, 2002, 2003
puy de Dôme, France	0,4 x 10^3 à 2,5 x 10^5	Amato *et al.*, 2007b, 2007a, 2017a; Vaïtilingom *et al.*, 2012
Michigan, États-Unis	0,9 à 4,3 x 10^5	Kourtev *et al.*, 2011
ville de Ljubljana, Slovénie	7,8 x 10^2 à 2,1 x 10^4	Šantl-Temkiv *et al.*, 2013b

Le nombre de bactéries est modulé par l'origine des masses d'air et par le vent. L'arrivée d'un vent violent peut changer la population présente (DeLeon-Rodriguez *et al.*, 2013). La proportion des genres bactériens change avec le type de nuage.

Les microorganismes peuvent incorporer le nuage, ils forment alors une communauté diversifiée malgré leurs faibles nombres. Certains conservent une activité métabolique, ils sont donc viables dans les nuages et pourraient influencer la chimie du nuage.

III. 2. Des microorganismes qui modifient la chimie du nuage

Les microorganismes contrôlent les cycles biogéochimiques sur Terre. Classiquement, ils sont capables de métaboliser des composés organiques or ces composés sont présents en concentrations suffisantes dans les nuages. De plus, ils survivent aux stress qu'ils rencontrent puisqu'ils sont à même de garder une activité métabolique. Pour étudier l'impact de ces microorganismes sur la composition chimique du nuage, plusieurs stratégies ont été entreprises. Dans un premier temps, des expériences sont faites en utilisant des souches cultivables dans un milieu ne comprenant que la molécule d'intérêt. Ensuite, les mêmes expériences sont réalisées dans un milieu mimant la composition chimique des types de nuages connus. Enfin, l'incubation directe d'eau de nuage comprenant sa microflore native est effectuée.

III. 2. 1) Rôle des microorganismes dans la biotransformation des composés carbonés

Depuis la découverte des composés organiques simples et l'obtention des premières souches cultivables de nuage, peu d'équipes dans le monde s'intéressent à ce nouveau sujet. Ces équipes de recherches se sont focalisées sur la dégradation des acides carboxyliques et des carbonyles présents dans les nuages. En effet, les voies de dégradations des composés par les microorganismes sont clairement établies. La Figure 21 (A) décrit la dégradation de nombreux acides carboxyliques d'intérêt, la Figure 21 (B) celle des composés en C1.

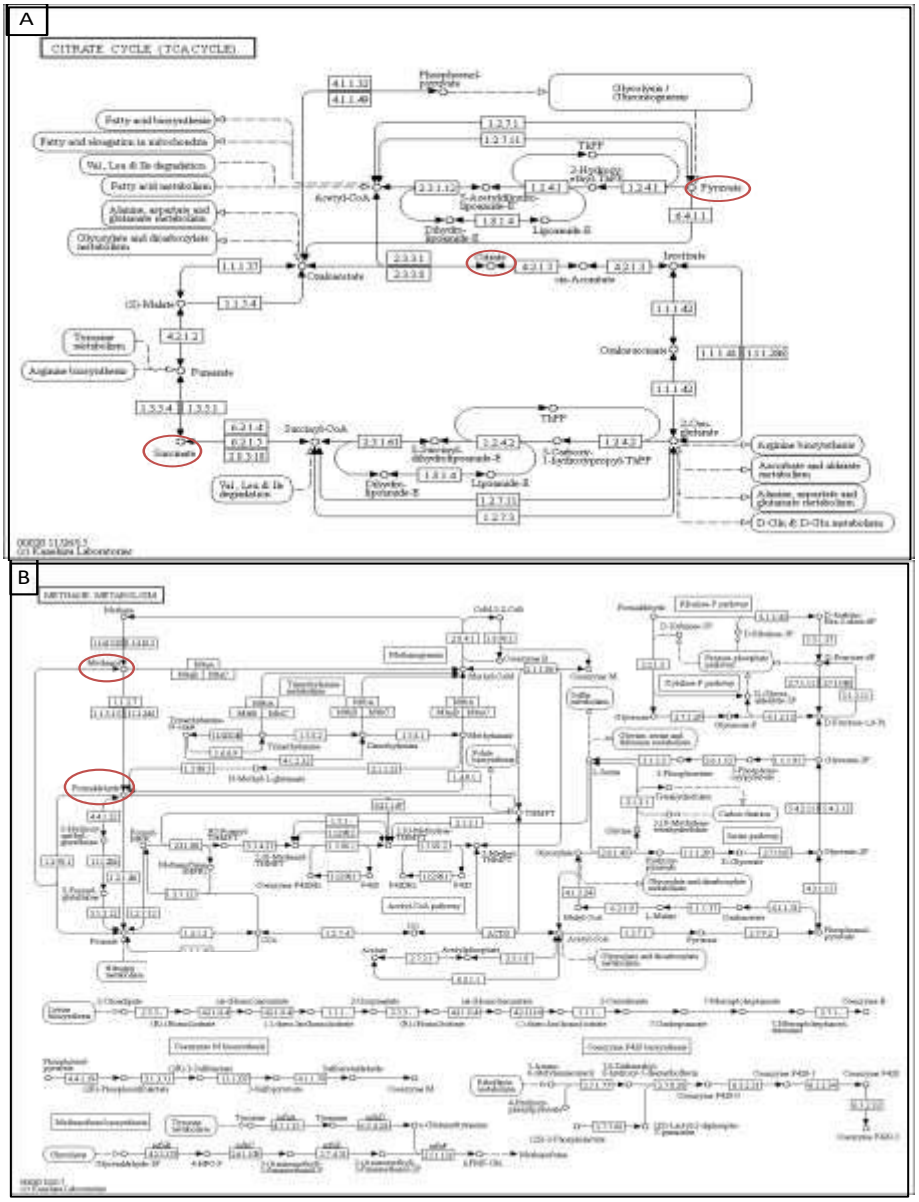


Figure 21 : Le cycle de Krebs ou cycle du citrate (A) et le cycle du méthane (B). La première voie permet la dégradation du succinate, du pyruvate et d'autres composés carbonés et la deuxième illustre la décomposition du méthanol (d'après la base de donnés KEGG : http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html).

La dégradation de nombreux composés carbonés a été étudiée en utilisant des souches cultivables en présence d'un seul composé. La dégradation de 7 acides dicarboxyliques par des champignons aéroportés a été étudiée par Ariya *et al.* (2002) et Côté *et al.* (2008). Dans ces publications, 6 acides sont dégradés : malonique, succinique, glutarique, adipique, pimélique et pinique. La dégradation de l'acétate, du succinate et du malonate a été également confirmée par des souches cultivables récoltées au puy de Dôme, le lactate a été également testé (Amato *et al.*, 2005, 2007c; Vaïtilingom *et al.*, 2010). Des souches issues de grêlons ont été capables de dégrader les acides lactique, acétique, glycolique, propionique, formique, glyoxylique, cétoglutarique, succinique et tartarique (Temkiv *et al.*, 2012). Le formaldéhyde peut aussi être dégradé par des souches récoltées au puy de Dôme (Amato *et al.*, 2007c; Husárová *et al.*, 2011). Une autre étude a permis de mettre en évidence la dégradation des sucres retrouvables dans l'atmosphère par un *Bacillus* récolté au puy de Dôme (Matulová *et al.*, 2014). Après l'identification de tous ces composés présents dans l'atmosphère et biodégradables, la dégradation des composés carbonés les plus concentrés par des souches cultivables a été testée en milieu artificiel mimant la composition chimique du nuage (Vaïtilingom *et al.*, 2010, 2011). Pour finir, cette dégradation a été mesurée directement dans de l'eau de nuage récoltée au sommet du puy de Dôme avec sa microflore native (Vaïtilingom *et al.*, 2013). Ceci a permis de montrer que les microorganismes natifs sont capables de dégrader le formaldéhyde, l'acétate, le formate, le succinate et le malonate mais pas l'oxalate.

Les microorganismes étant capables de dégrader ces molécules simples, les scientifiques ont cherché à savoir si cette voie de dégradation était compétitive vis-à-vis de la chimie radicalaire. Pour cela, deux stratégies ont été utilisées : les vitesses de biodégradation ont été comparées à des vitesses de dégradation radicalaire calculées ou à des vitesses de photo-dégradation expérimentales.

- La comparaison entre les vitesses de biodégradation et les vitesses de dégradation radicalaire éstimées a été faite dans trois publications (Husárová *et al.*, 2011; Vaïtilingom *et al.*, 2010, 2011). Les vitesses de biodégradations ont été calculées dans un milieu artificiel mimant la composition chimique du nuage à 5 et 17°C.

Dans un premier temps, les auteurs ont étudié la dégradation du formaldéhyde et du méthanol par 4 bactéries isolées du nuage : deux *Pseudomonas* (*graminis* et *syringae*), une *Frigoribacterium sp.* et un *Bacillus sp*. Une dégradation de ces composés a été constatée à 5 et 17°C. Les vitesses de biodégradations pour ces composés sont du même ordre que celles

calculées pour les radicaux, ainsi les auteurs ont pu montrer que les processus de biotransformation pouvaient être importants dans la dégradation des composés C1 dans des nuages chauds la nuit (Husárová *et al.*, 2011). Dans la même idée, l'impact de la biodégradation de *Pseudomonas graminis* sur des acides carboxyliques vis-à-vis de la dégradation radicalaire diurne (représentée par $^{\bullet}OH$ et $NO_3^{\bullet}$) et nocturne ($NO_3^{\bullet}$) a été étudié (Figure 22) (Vaïtilingom *et al.*, 2010, 2011).

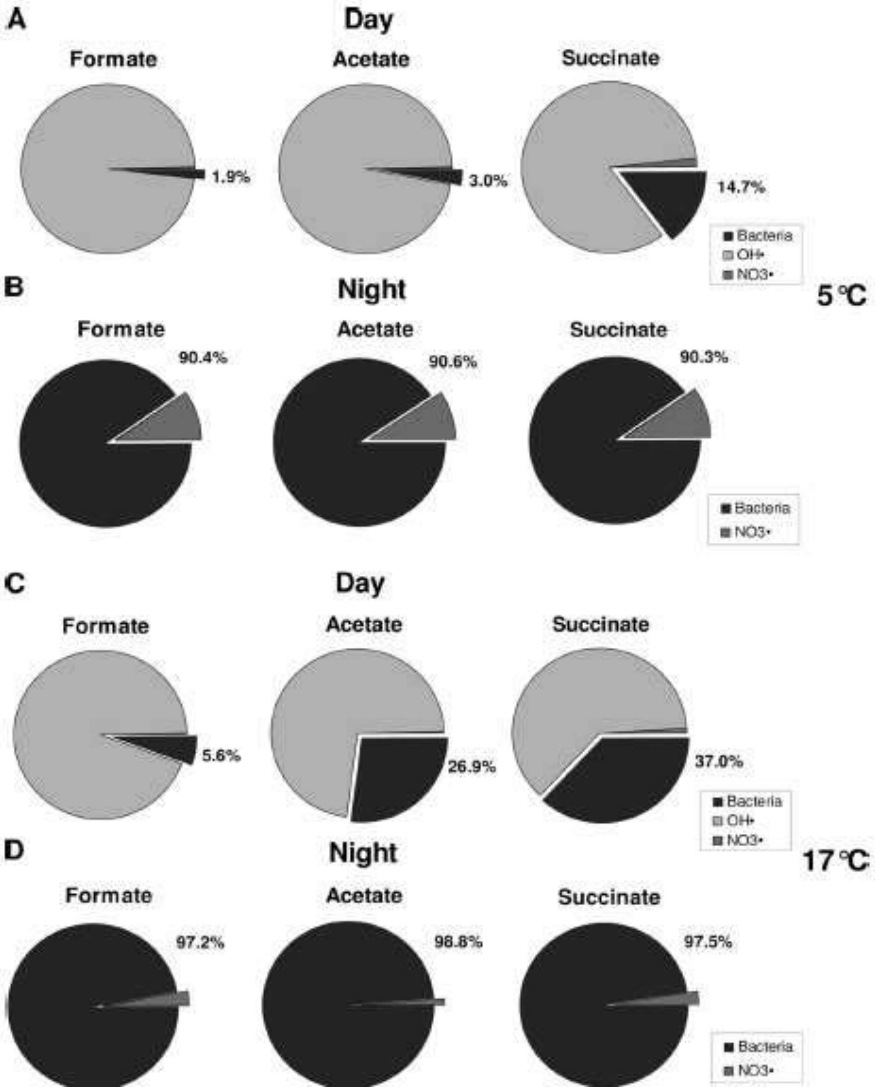


Figure 22 : Estimation de l'influence de l'activité microbienne (en noir) et de la chimie radicalaire (en gris) sur la dégradation des acides carboxyliques majoritaires. La dégradation de ces composés a été estimée pour le jour et la nuit à 5°C (A et B) et à 17°C (C et D). La concentration en radical hydroxyle est de 1,2 x10^{-13} M et celle du nitrate de 1,5 x 10^{-14} M (d'après Vaïtilingom *et al.*, 2010).

Le jour, l'effet des bactéries n'est que de 2 à 15%, en revanche la nuit il devient compétitif avec 90% de la dégradation attribuée aux microorganismes (pour un nuage à 5°C). A 17°C, une augmentation de la contribution de l'activité microbienne est visible, elle est de 6 à 37% le jour

et va à 97 - 99% la nuit. Il en résulte donc que les microorganismes auraient un rôle prépondérant la nuit et ce rôle serait plus important dans un nuage chaud.

Pour vérifier ce résultat, les auteurs ont affiné les vitesses de biodégradation en calculant la moyenne des dégradations faites par 17 souches bactériennes provenant des nuages. Ils cherchent à voir l'influence de cette dégradation vis-à-vis de la dégradation du radical hydroxyle. A cause de la fluctuation de la concentration en radical hydroxyle dans les modèles de chimie atmosphérique, ils sont obligés de choisir les concentrations minimale et maximale modélisées : 10^{-14} et 10^{-12} M (Figure 23). La concentration minimale a été modélisée par Herrmann *et al.* (2010) et Tilgner and Herrmann (2010), la concentration maximale vient de la publication de Deguillaume *et al.* (2004).

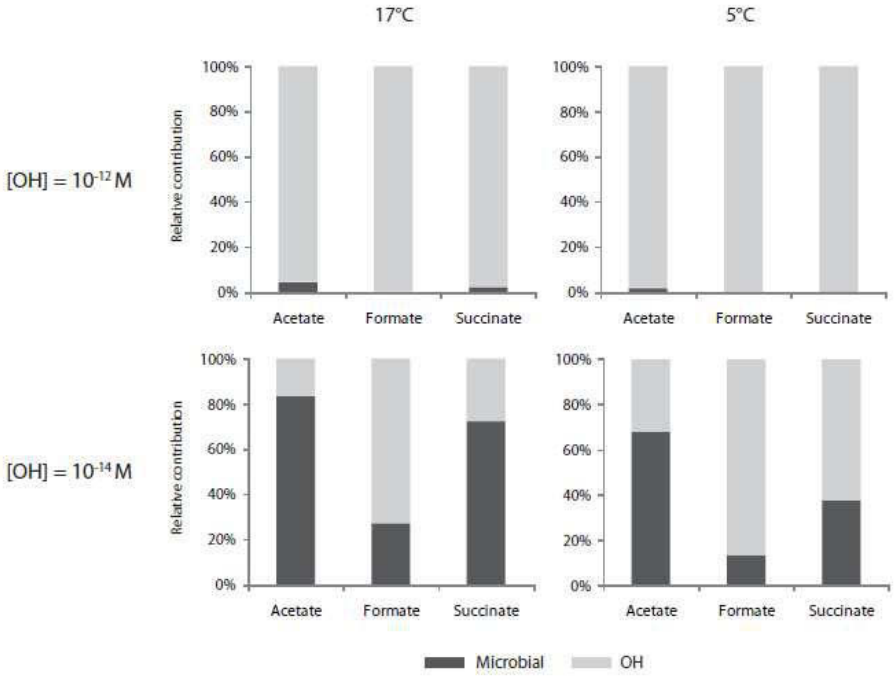


Figure 23 : Comparaison de l'activité microbienne (en gris foncé) **et de la chimie radicalaire** (en gris clair) **pour deux concentrations en radical hydroxyles : 10^{-12} et 10^{-14} M** (d'après Vaïtilingom *et al.*, 2011).

L'importance de l'activité microbienne dépend de la concentration en radical hydroxyle considérée. A 10^{-12} M, l'activité microbienne est faible voire nulle alors que pour une concentration en radical hydroxyle à 10^{-14} M dans un nuage, la dégradation microbienne devient majoritaire pour l'acétate et le succinate. Ceci montre bien l'importance de donner une valeur précise et réelle à la concentration en radical hydroxyle. Ne pouvant la mesurer, ils ont utilisé la seconde stratégie : l'irradiation directe de l'échantillon.

➢ <u>La comparaison entre les vitesses de biodégradation et les vitesses de photo-dégradation.</u>

La première de ces études est faite en milieu synthétique mimant la composition de deux types de nuage : marin et continental (Vaïtilingom *et al.*, 2011). Les vitesses de dégradation des composés carbonés sont calculées pour 17 souches et la dégradation abiotique est faite par deux systèmes d'irradiation différents : une lampe xénon à 1 000 W (P1) et des lampes Philips à 15 W (Actinic BL) (P2) (Figure 24).

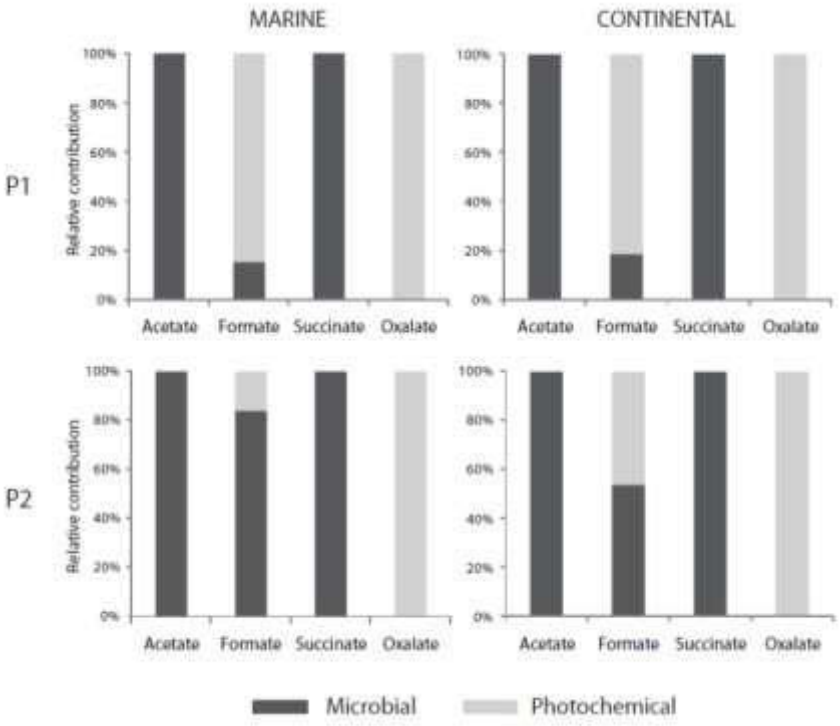


Figure 24 : Contribution relative de la biodégradation et de la photo-dégradation pour deux systèmes d'irradiation à 17°C (d'après Vaïtilingom *et al.*, 2011). Les vitesses de photo-dégradation ont été calculées après irradiation par une lampe xénon à 1 000 W (P1) ou des lampes Philips à 15 W (Actinic BL) (P2).

Là encore, l'oxalate n'est dégradé que par des processus photochimiques. Parmi les trois acides carboxyliques, seul le formate présente une dégradation par les deux processus, le pourcentage de photo-dégradation changeant avec le type d'irradiation et le milieu utilisé. La biodégradation de ces composés est donc bien compétitive avec la photo-dégradation, excepté pour le formate avec le système d'irradiation P1. Celle-ci est d'ailleurs plus compétitive que lorsque les vitesses de dégradation par voie radicalaire sont calculées. En effet, dans la Figure 23, à 17°C pour la concentration en radical hydroxyle la plus faible, l'acétate et le succinate étaient encore dégradés en partie par la chimie radicalaire alors qu'ici seuls les microorganismes les dégradent.

Ceci peut être dû aux systèmes d'irradiation ou à une surestimation de la concentration d'$^{\bullet}OH$ par les modèles.

Pour s'affranchir de l'étape culturale et obtenir la capacité de dégradation des acides carboxyliques *in situ* par la microflore native du nuage avec toute sa complexité, les chercheurs ont incubé, de façon stérile, de l'eau de nuage à 17°C (Vaïtilingom *et al.*, 2013). Quatre conditions différentes sont comparées : au noir sans microorganismes, à la lumière sans microorganismes, au noir avec microorganismes et enfin à la lumière avec microorganismes. Pour chacune de ces conditions ils calculent les vitesses de formation ou de dégradation de plusieurs composés organiques (Tableau 14).

Tableau 14 : Vitesses de transformation des acides carboxyliques et du formaldéhyde en présence ou en l'absence de lumière (UV) et/ou de microorganismes dans l'eau de nuage récoltée le 06/08/2010. Le nuage est de type continental. Un signe négatif signifie une diminution du composé dans le milieu (d'après Vaïtilingom *et al.*, 2013)

	Acétate	Formate	Succinate	Oxalate	Malonate	Formaldéhyde
Conditions	Vitesses de formation, x 10^{-11} $M.s^{-1}$					
Au noir Sans microorganismes	0	0	0	0	0	0
A la lumière Sans microorganismes	0	0	0	- 4,0	0,3	0,2
Au noir Avec microorganismes	- 15,5	- 17,5	4,5	0	- 4,2	- 0,3
A la lumière Avec microorganismes	- 15,6	- 16,1	-3,5	- 2,7	- 4,3	0

Comme précédemment, l'oxalate est uniquement photo-dégradé. Les vitesses de dégradation pour l'acétate, le formate et le succinate sont les mêmes pour les deux conditions comprenant les microorganismes (avec et sans lumière), donc la capacité de dégradation des microorganismes ne changent pas lorsqu'ils sont exposés à la lumière (formation de radicaux hydroxyles). Les auteurs ont mesuré les vitesses de dégradations pour ces composés, elles sont du même ordre de grandeur. Ces deux systèmes de dégradation peuvent donc être présents dans les gouttes de nuages.

Les microorganismes sont capables de modifier la concentration de certains composés carbonés dans l'eau de nuage car ils les utilisent comme source de carbone. Ils restent actifs en présence de lumière et donc en présence de radicaux hydroxyles, ils ont donc des moyens pour se prémunir contre ces stress (radiatifs et radicalaires).

III. 2. 2) Influence des microorganismes sur la chimie radicalaire : la voie du stress oxydant

Les microorganismes du nuage sont des organismes aérobies. Ils ont besoin d'oxygène pour survivre et ont donc développé des systèmes de défense contre les ROS (Reactive Oxygen Species) formés par les enzymes de la chaine respiratoire. Ces molécules comprennent des molécules radicalaires et non radicalaires. Les radicaux primaires résultent de la réduction d'un électron de l'oxygène tel que le radical anion superoxyde et le radical hydroxyle ($O_2^{\bullet-}$ et $^{\bullet}OH$) ou de la perte d'un hydrogène d'une molécule d'eau (donnant l'anion hydroxyde HO^-). Les molécules dérivées de l'oxygène mais non radicalaires sont l'oxygène singulet et le peroxyde d'hydrogène ($^1O_2$ et H_2O_2). D'autres molécules peuvent intervenir dans le cycle des ROS : le monoxyde d'azote et le peroxynitrite. Ci-dessous un schéma des différentes voies impliquées dans la formation des ROS (Figure 25).

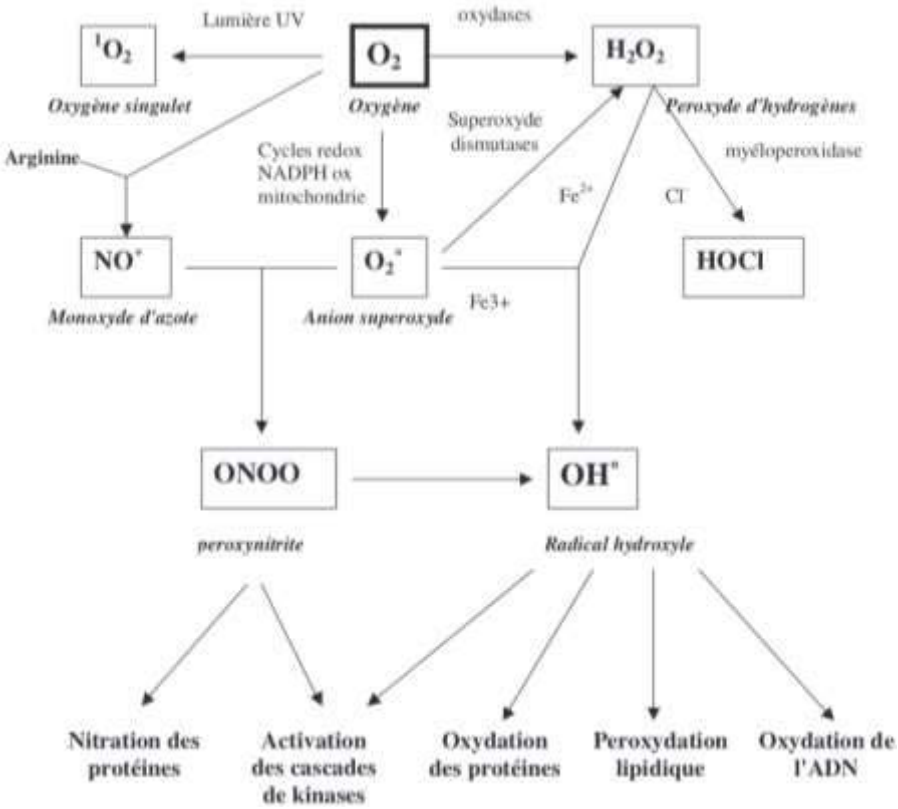


Figure 25 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène en biologie (pour les Eucaryotes et les Procaryotes ; Favier, 2003).

Les ROS formées intracellulairement sont similaires à celles retrouvées dans les nuages, les prépondérants étant le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, l'anion superoxyde et le radical nitrate. Il faut savoir que ces molécules peuvent facilement être internalisées dans la

cellule. La présence de ces molécules dans le milieu extérieur entraine donc la mise en place des mécanismes de défense intracellulaire, regroupés sous le nom de voie du stress oxydant.

Cette voie a pour rôle de contrôler de façon très précise la concentration en ROS présentes dans la cellule. Les ROS à faible concentration sont bénéfiques pour la cellule car elles permettent d'activer des fonctions biologiques importantes et positives (Favier, 2003; Halliwell, 2006) : elles sont impliquées dans la transmission de signaux intra- et extracellulaires, participent à la régulation des gènes et à la fonctionnalisation d'enzymes (elles aident à la phosphorylation et à la réparation des enzymes [Fe-S]), elles entrent en jeu dans le cycle cellulaire et la phagocytose, elles interviennent dans le recyclage des composés oxydés (lipides et protéines) et elles jouent un rôle dans la réponse cellulaire contre des facteurs de stress. Cependant à fortes concentrations, leurs effets bénéfiques ne sont plus présents et elles entrainent un stress oxydant car elles causent des dommages aux cellules en oxydant des composés biologiques essentiels tels que l'ADN, les protéines, les lipides et les sucres ou entrainent la génération de composés cytotoxiques et de mutagènes.

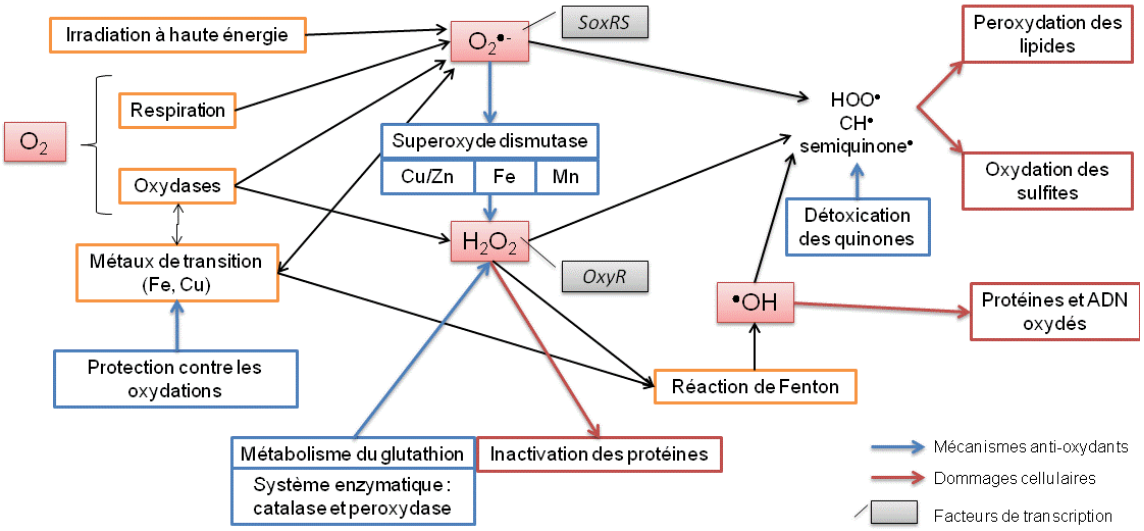


Figure 26 : Dommage cellulaire impliquant les ROS et les mécanismes de défense contre celles-ci. En jaune sont représentées les sources des ROS, en rouge sont indiqués les dommages cellulaires causés par celles-ci et en bleu les mécanismes de défense. En gris sont présentés les facteurs de transcription qui régulent les mécanismes de défense des ROS (d'après un schéma obtenu dans RAST (http://rast.theseed.org/FIG/seedviewer.cgi) et la publication de Favier, 2003).

Un focus va être fait sur l'implication du radical hydroxyle et du radical anion superoxyde dans le stress oxydant (Avery, 2011; Favier, 2003; Halliwell, 2006). Le radical hydroxyle est très réactif et attaque préférentiellement les lipides et les acides gras polyinsaturés *via* la

peroxydation lipidique (formation de double liaison dans ces molécules). Ceci entraine la conversion des lipides insaturés en lipides polaires ce qui augmente la fluidité membranaire, entrainant des fuites de solutés et un arrêt des enzymes associées aux membranes et fini par la désintégration de la membrane extracellulaire entrainant la mort de la cellule. Le radical hydroxyle peut aussi endommager l'ADN entrainant une mauvaise réplication de celui-ci et déclenche les mécanismes de mort cellulaire : l'apoptose. Le radical hydroperoxyle agit surtout par la formation d'acide peroxynitreux qui entraine les mêmes dommages. Pour finir, ces deux molécules peuvent également entrainer l'oxydation des acides aminés ou des ruptures de la chaines peptidiques ce qui entraine l'inactivation des protéines. Les plus touchées sont les protéines comportant des fonctions SH, ceux sont notamment des protéines impliquées dans le transport et des enzymes. Ces protéines dénaturées peuvent également devenir hydrophobes, elles vont alors se regrouper en amas perturbant ainsi la cellule.

Pour empêcher ces dommages cellulaires, les microorganismes vont mettre en place un système de défense pour prévenir la formation de ROS, éviter la propagation des dégâts et réparer les dommages (Halliwell, 2006; Vorob'eva, 2004). Des molécules anti-oxydantes sont utilisées pour atteindre ces objectifs. Elles regroupent différentes classes de composés organiques tels que des vitamines, des caroténoïdes et le glutathion (GSH). A ceux-ci s'ajoutent des processus enzymatiques, les enzymes particulièrement impliquées sont les suivantes : la superoxyde dismutase (SOD) et les peroxydases comprenant la catalase et la glutathion peroxydase.

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2\ H_2O + O_2$$

$$H_2O_2 + H_2O_2\text{-}R \xrightarrow{Peroxydase} 2\ H_2O + O{=}R{=}O$$

$$2\ GSH + H_2O_2 \xrightarrow{Glutathion\ peroxydase} GS\text{-}SG + 2\ H_2O$$

Ensemble ces enzymes permettent la réduction des espèces oxydantes comme l'H_2O_2 en H_2O mais aussi d'autres peroxydes organiques (A. Flavier, 2003). Des facteurs de transcription permettent de signaler la présence des deux ROS les plus stables : $O_2^{\bullet -}$ et H_2O_2. Ces senseurs sont appelés *soxR* et *oxyR*. Leurs actions chez les bactéries sont représentées par la Figure 27 (Lushchak, 2001).

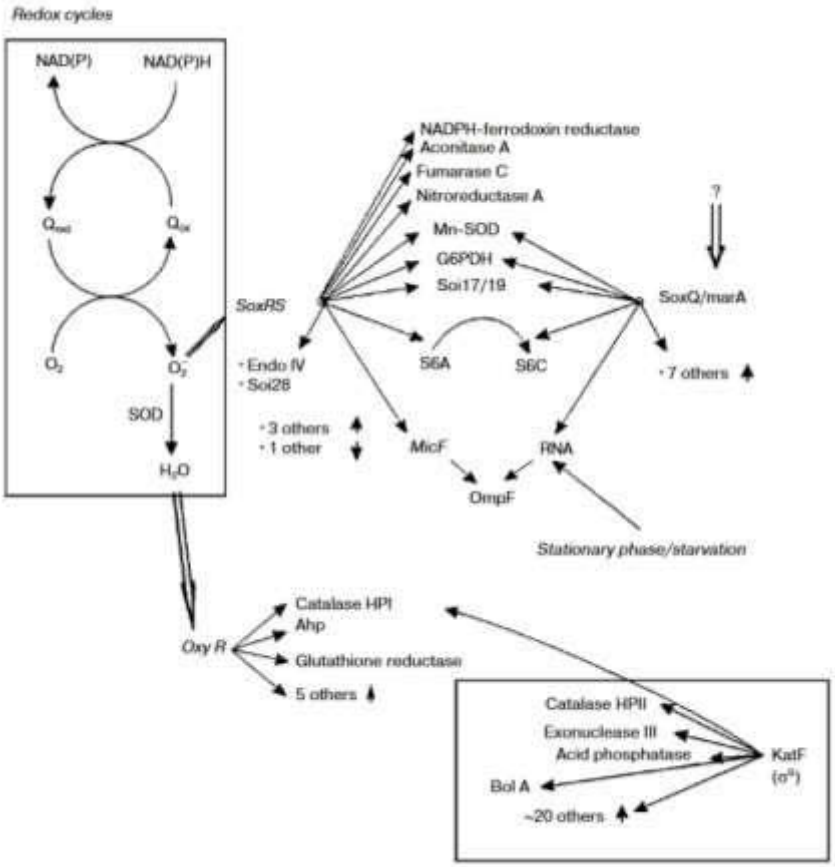


Figure 27 : Régulation des ROS chez les bactéries par deux facteurs de transcription : *soxRS* et *oxyR*. Endo IV : endonucléase IV ; G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase ; S6A et S6C : deux formes de la protéine ribosomial S6 ; OmpF : porine de la membrane externe ; Ahp : alkyle hydroperoxyde réductase ; HP : hydroxyperoxydase (d'après Lushchak, 2001).

La présence du radical anion superoxyde est déterminée par le facteur de transcription *SoxRS* qui change alors de conformation (*SoxR* est le détecteur et *SoxS* est un activateur de la transcription). Ce changement aide la fixation de l'ARN polymérase à l'ADN ce qui va permettre l'expression de gène, et notamment celui de l'enzyme SOD. La nitroréductase sert à réduire les composés organiques azotés et évite donc la formation du peroxynitrite. Quand le radical anion superoxyde est réduit en peroxyde d'hydrogène par la SOD, une oxydation de la protéine OxyR est faite. Ceci active une série d'enzymes (des catalases et réductases) ainsi que d'autres protéines. Une partie de ces protéines permet de maintenir le taux de glutathion (glutathion réductase et G6PDH), les autres interviennent dans la réparation de l'ADN (l'endonucléase IV) ou dans celle des lipides (alkyle hydroperoxyde réductase). L'ensemble de ces actions permet de diminuer les concentrations en anion superoxyde et en peroxyde d'hydrogène tout en réparant la cellule (Imlay, 2008; Lushchak, 2001).

Dans les nuages, l'oxydant le plus étudié est le peroxyde d'hydrogène car il est présent de manière intrinsèque dans la phase aqueuse du nuage. Plusieurs études ont été faites dans le

but de comprendre l'impact de cette molécule sur les microorganismes ou celui des microorganismes sur la concentration en peroxyde d'hydrogène.

➢ <u>L'impact du peroxyde d'hydrogène sur les microorganismes.</u>

Dans un premier temps, la survie face à un stress oxydant important de 5 souches récoltées dans des nuages au puy de Dôme a été testée en milieu artificiel, pour cela plusieurs concentrations en peroxyde d'hydrogène allant jusqu'à 1 mM ont été utilisées. Les 4 souches bactériennes sélectionnées sont 2 *Pseudomonas*, 1 *Sphingomonas* et 1 *Arthrobacter*, à celles-ci s'ajoute une levure *Dioszegia*. Pour vérifier la mortalité, un comptage des cellules est fait après 90 min d'incubation des souches avec le peroxyde d'hydrogène à 20°C au noir. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 28.

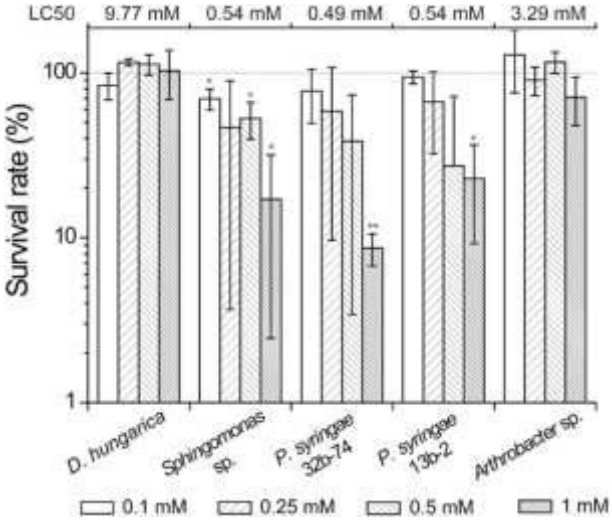


Figure 28 : Survie cellulaire de 5 souches cultivables issues de nuage du puy de Dôme face à différentes concentrations en H_2O_2. 4 concentrations en H_2O_2 sont testées (0,1, 0,25, 0,5 et 1 mM) sur 4 bactéries (2 *Pseudomonas*, 1 *Sphingomonas* et 1 *Arthrobacter*) et 1 levure (*Dioszegia*). * représente les valeurs significativement différentes après un test ANOVA1 (* p.value < 0,05 ; ** : p.value < 0,01). LC50 indique la concentration en H_2O_2 nécessaire pour entrainer une mortalité de 50% des cellules (d'après Joly *et al.*, 2015).

La capacité de survie face au stress oxydant est souche dépendante. En effet, les *Pseudomonas* et la *Sphingomonas* sont plus sensibles à ce stress que *Arthrobacter* (LC50 au alentour de 0,5 mM pour les 3 premières alors que *Arthrobacter* a un LC50 de 3,3 mM). Parmi les concentrations testées ici, la concentration la plus proche des valeurs retrouvées dans l'eau de nuage du puy de Dôme est de 100 µM. En effet, lorsque l'H_2O_2 a été dosé dans les nuages, les concentrations obtenues sont entre 0,3 et 57,7 µM (base de données BEAM). A cette concentration (histogramme blanc), toutes les cellules survivent.

Un autre test de survie a été fait sur 3 bactéries cultivables (Wirgot *et al.*, 2017). Dans un milieu artificiel mimant la composition d'un nuage marin, 2 *Pseudomonas* et 1 *Sphingomonas* sont

mises en culture en présence de 20 µM de H_2O_2 (à 17°C) et la mortalité des cellules est suivie à 0, 180, 420 et 1 440 minutes (24 heures). Pour toutes les souches, aucune mortalité cellulaire n'est vue. Au contraire, une croissance cellulaire similaire au témoin (sans H_2O_2) est constatée. Dans cette publication, les auteurs constatent également que le peroxyde d'hydrogène modifie le statut énergétique de la cellule. En effet, ils constatent une diminution de l'ATP en présence de H_2O_2 suivi par une résilience de celui-ci lorsque le peroxyde d'hydrogène n'est plus présent. Le peroxyde d'hydrogène entraine donc une modification de l'état énergétique de la cellule lorsqu'il est présent mais, pour les concentrations retrouvées dans le nuage, il n'entraine pas de mortalité cellulaire. Les microorganismes sont donc capables de faire face au stress oxydant provoqué par cette molécule.

- L'impact des microorganismes sur la concentration en H_2O_2.

Puisque les microorganismes testés survivent sans trop de dommage à ce composé, les chercheurs ont voulu voir si les microorganismes pouvaient modifier la concentration en peroxyde d'hydrogène.

En effet dans la publication de Wirgot *et al.* (2017), les auteurs ne se sont pas contentés de vérifier la survie ou de mesurer l'ATP, ils ont également suivi la concentration en H_2O_2 (concentration initiale : 20 µM) pendant 8 heures dans le milieu synthétique nuage en présence ou en absence de plusieurs facteurs : les 3 bactéries (à 10^6 cellules.mL^{-1}), la lumière et un complexe de Fe-EDDS à 4 µM. Les résultats obtenus pour la souche *Pseudomonas graminis* sont présentés dans la Figure 29.

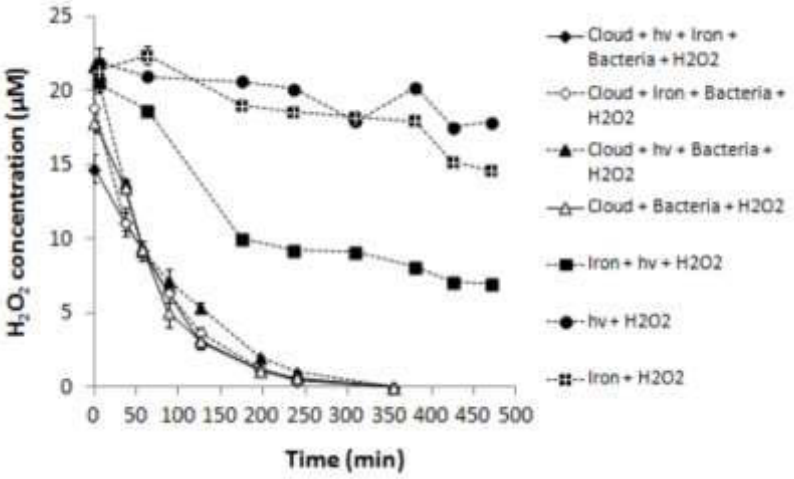


Figure 29 : Evolution de la concentration en H_2O_2 en fonction du temps. Les incubations ont été faites à 17°C en condition aérobie. Conditions expérimentales : $[H_2O_2]_{initiale}$ = 20 µM, [*Pseudomonas graminis*] = 10^6 cellules.mL^{-1} et [Fe-EDDS] = 4 µM. Les lampes utilisées sont des Sylvania Reptistar 15 W (d'après Wirgot *et al.*, 2017).

Les trois souches ont les mêmes profils de dégradation. Sans microorganismes, la diminution de la concentration en H_2O_2 n'est visible que lorsque des réactions de photo-Fenton sont présentes (carré noir). Lorsque les microorganismes sont présents, cette dégradation est plus efficace. Le peroxyde d'hydrogène est entièrement dégradé en 6 heures.

La cinétique de dégradation du peroxyde d'hydrogène a également été suivie dans 3 nuages récoltés au puy de Dôme (Vaïtilingom *et al.*, 2013). Ici, les microorganismes et la concentration en H_2O_2 sont ceux présents directement dans le nuage. Les 3 nuages sont de 3 types différents (marin, continental et urbain aussi dit pollué) permettant ainsi d'avoir toute la complexité du milieu (la matière organique encore inconnue et la biodiversité de la communauté microbienne). Les conditions expérimentales ont été expliquées dans la partie précédente (dans la section La comparaison entre les vitesses de biodégradation et les vitesses de photo-dégradation). Elles permettent de comparer les réactions entre elles et de voir particulièrement l'action des microorganismes (Figure 30).

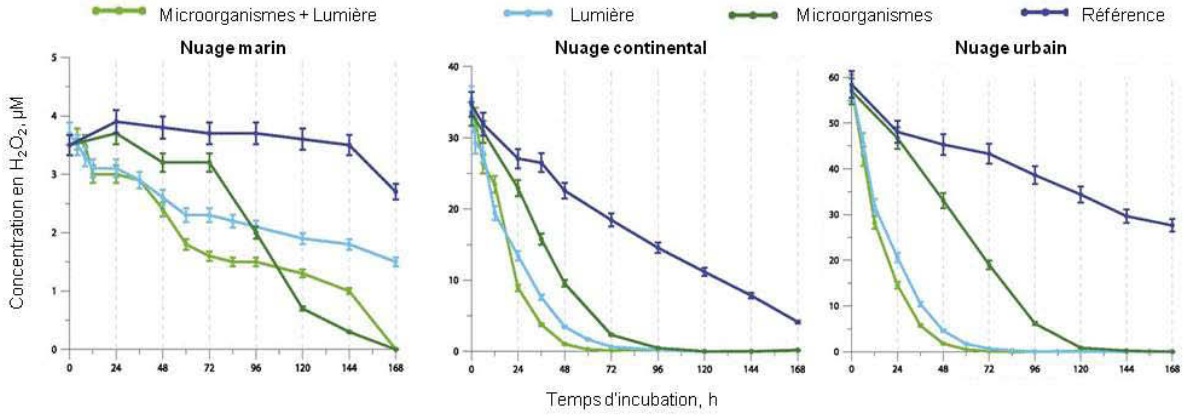


Figure 30 : Evolution de la concentration en peroxyde d'hydrogène dans les 3 nuages différents en présence ou en l'absence de lumière et/ou de la microflore native. L'expérience dite référence est faite à l'obscurité et sans microorganismes. Toutes les conditions sont incubées à 17°C pendant 7 jours. La concentration en microorganismes est de 3,9 x 10^4, 8,9 x 10^4 et 9,3 x 10^4 cellules.mL^{-1} dans le nuage marin, continental et urbain respectivement (d'après Vaïtilingom *et al.*, 2013).

Les concentrations initiales en peroxyde d'hydrogène en sont pas les mêmes dans les nuages analysés (3,6 µM, 33,4 µM et 57,7 µM). En l'absence de lumière et sans microorganismes (en bleu foncé), la dégradation de H_2O_2 est lente (nuage continental et urbain) voir négligeable (nuage marin). Cette dégradation est due à des réactions de Fenton ou à la réaction de H_2O_2 avec les sulfites. En présence de lumière (bleu clair), l'H_2O_2 se photolyse et des réactions de photo-Fenton ont lieu ce qui entraine une diminution beaucoup plus rapide de ce composé. La communauté microbienne native à l'obscurité (vert foncé) est capable dans les 3 types de nuages de dégrader le peroxyde d'hydrogène mais de façon globalement moins efficace que la lumière seule. En revanche, lorsque les microorganismes et la lumière sont présents la

dégradation de H_2O_2 est encore plus rapide que seulement en présence de lumière, montrant ainsi un effet synergique des conditions biotiques et abiotiques. Grâce à cette expérience, les auteurs calculent l'impact relatif des processus biotiques *vs* les processus abiotiques dans le nuage continental et urbain. Dans la journée, le peroxyde d'hydrogène est surtout photo-dégradé (54% et 74% respectivement), les dégradations biotiques suivent (30% et 18%) et les dégradations abiotiques non photochimique influencent peu la concentration en H_2O_2 (16% et 6%). La nuit, la photochimie n'a pas lieu permettant à la biodégradation de devenir majoritaire (66% et 76%).

Les microorganismes sont confrontés aux ROS intra ou extracellulaires. Ils ont développé des mécanismes de défense (enzymatiques ou non) pour empêcher ou limiter les lésions cellulaires. Ainsi la présence de H_2O_2, dans les gammes de concentrations retrouvées dans les nuages, n'entraine pas une mortalité cellulaire mais peut modifier leurs statuts énergétiques. Des souches cultivables ont même montré une capacité à dégrader ce ROS en condition de laboratoire, cette capacité de dégradation a également été retrouvée dans des incubations d'eau de nuage provenant de 3 nuages de types différents. La microflore native d'un nuage peut donc influencer la composition en peroxyde d'hydrogène dans la phase aqueuse des nuages. Elle est également capable de se protéger des radicaux hydroxyles formés (photolyse de H_2O_2 et réaction de photo-Fenton ou Fenton). Les microorganismes peuvent donc jouer un rôle important sur les oxydants majeurs du nuage et donc sur la capacité oxydante de celui-ci.

IV. Les composés aromatiques dans le nuage, cas particulier du phénol

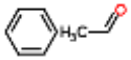
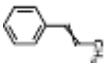
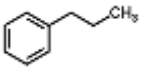
Nous avons vu dans les chapitres précédents que le nuage est un milieu complexe. Malgré son temps de vie court, il est soumis à des réactions abiotiques et biotiques. Les études se sont focalisées pour le moment à l'analyse de la dégradation de composés organiques simples (les acides carboxyliques et les composés en C1) et de celle du peroxyde d'hydrogène. Nous allons nous intéresser, dans cette partie, à une classe de composés encore mal connus dans la phase aqueuse des nuages, les composés aromatiques. Après avoir étudié ces composés cycliques simples, nous allons nous intéresser plus particulièrement au phénol et à l'interaction des microorganismes avec cette molécule.

IV. 1. Les composés aromatiques simples : une famille diversifiée

Parmi les COV, les composés aromatiques simples sont des molécules possédant un seul cycle benzénique. Ils ont surtout été étudiés dans l'air car ils ont une forte origine anthropique et deviennent les COV majoritaires en milieu urbain (Cabrera-Perez *et al.*, 2016). Ils comprennent les BTX : benzène, toluène et xylène et leurs dérivés. Ils sont souvent pris comme exemple de la réactivité des aromatiques en général.

En 1992, les principales sources des BTX étaient liées à l'utilisation du fuel (49%) et à la filière du gasoil (18%). Leurs principales émissions dans la phase gaz provenaient de l'Europe, des États-Unis et du Japon et étaient estimées à 14 041 $Gg.an^{-1}$ (Piccot *et al.*, 1992). Maintenant la famille des aromatiques s'est agrandie et prend en compte un plus grand nombre de molécules, elle représente 15% des composés organiques analysés dans la phase gaz prélevée en Grèce à Finokalia (Xu *et al.*, 2003). A titre d'exemple, sont représentés ci-dessous les composés aromatiques issus de ce prélèvement (Tableau 15).

Tableau 15 : Composés aromatiques simples identifiés dans l'air de Finokalia, en Grèce (d'après Xu *et al.*, 2003), les structures chimiques ont été obtenues sur Pubchem et ChemSpider.

Composés	Structure chimique	Composés	Structure chimique
Benzène		Méthylstyrène	
Éthylbenzène (simple ou di)		Phénylacétylène	
Méthylbenzène (di ou tri) ex du xylène		Acétaldéhyde-benzène	
Propénylbenzène		Phénol	
Propylbenzène		Acide benzoïque	
Toluène		Acétophénone	
Éthyltoluène		Benzaldéhyde	
Styrène		Méthylbenzaldéhyde	

Les concentrations en benzène et toluène dans l'air ont été mesurées au Pays-Bas, aux États-Unis, au Canada et au Japon (Tableau 16).

Tableau 16 : Résumé des concentrations dans la phase gaz du benzène et du toluène. ¤ 11 campagnes par avions ont été faites, elles ont survolé plusieurs villes des États-Unis : Monterey, San Francisco, Los Angeles, Tampa et Broomfield. ° Campagne par avions.

Publications	Lieu de prélèvement	[Benzène]	[Toluène]
Warneke *et al.*, 2001	Cabauw, Pays-Bas	440 pptv	950 pptv
Ho and Lee, 2002	Hong Kong, Chine	1 490 pptv	7 504 pptv
Kuster *et al.*, 2004	Houston, États-Unis	0 ppbv	0,03 à 0,10 ppbv
De Gouw *et al.*, 2004	États-Unis ¤	1,04 pptv	0,83 pptv
Na *et al.*, 2005	Séoul, Corée du sud	1,0 à 1,7 ppb	6,2 à 7,7 ppb
De Gouw *et al.*, 2006	Alaska et Canada°	25,6 pptv	30,2 pptv
Kerbachi *et al.*, 2006	Alger, Algérie	1 997 à 8 327 pptv	3 230 à 10 211 pptv
Kim *et al.*, 2008	Dae Gu, Corée	0,99 ppb	8,58 ppb
Zhang *et al.*, 2017	Pékin, Chine	1257 pptv	1589 pptv

De façon générale, les BTX sont retrouvés dans l'air de tous les pays développés ou en voie de développement (Calvert *et al.*, 2002; Colón *et al.*, 2001; Ho and Lee, 2002; Kerbachi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Na *et al.*, 2005). De part la diversité des sites et les variations temporelles, un focus va être fait sur une publication (Zhang *et al.*, 2017). Dans cette publication, les auteurs ont

réalisé un suivi sur 1 an de la concentration de 84 COV dans le district de Chaoyang à Pékin. Parmi eux, ils ont quantifié 17 composés aromatiques : le benzène, le toluène, l'éthylbenzène, les xylènes, le styrène, les propylbenzènes, les éthyltoluènes, les diéthylbenzènes, les tétraméthylbenzidines (TMB) et le naphtalène. Tous ces aromatiques ont pu être dosés à des valeurs allant de 0,01 à 9,31 $\mu g.m^{-3}$ (pour le 1,2,3-TMB et le toluène respectivement), hormis le naphtalène. La concentration globale des aromatiques va de 14 à 35 $\mu g.m^{-3}$ avec une moyenne annuelle de 23 $\mu g.m^{-3}$. Ils représentent entre 15 et 26% de la concentration totale en COV. Une variation saisonnière est visible avec des concentrations en aromatique plus fortes en hiver et en automne. Leurs concentrations sont aussi plus importantes la nuit que le jour. De plus, ils contribuent à la formation de l'ozone (34%) et à la formation de SOA (82%, les acteurs principaux de cette formation sont le toluène, les xylènes, l'éthybenzène, les TMB et le benzène). Les auteurs ont par la suite estimé les risques sanitaires dus à l'exposition aux COV. Le seul COV ayant un indice de risque carcinogènique toujours supérieur aux normes est le benzène, les autres (toluène, ethylbenzène et xylène) étant en dessous du seuil.

La présence de ces composés aromatiques simples dans l'eau de nuage a peu été étudiée malgré leurs rôles importants dans la chimie atmosphérique. A notre connaissance, seules deux publications ont dosé les BTEX dans le nuage. Leur objectif était de mesurer les COV dans l'eau de nuage. Le premier de ces dosages a été fait en 1993 sur des nuages collectés au Mont Mitchell aux États-Unis (Aneja, 1993). Parmi ces COV ont été trouvés l'éthylbenzène, l'o-xylène, le toluène et le triméthylbenzène. Leurs concentrations sont comprises entre 0 et 2,6 $ng.mL^{-1}$ (le maximum étant pour le xylène). En moyenne, le toluène est le composé le plus concentré (0,6 $ng.mL^{-1}$), puis vient le xylène et le triméthylbenzène (0,5 et 0,3 $ng.mL^{-1}$) et l'éthylbenzène (0,2 $ng.mL^{-1}$). L'auteur en conclut que les nuages permettent la déposition de ces composés organiques (entre 0,9 et 3,1 x 10^5 $ng.m^{-2}.an^{-1}$). La seconde publication provient aussi des États-Unis, les nuages ont été échantillonnés au Mont Elden (Hutchings *et al.*, 2009). Là encore, les auteurs mesurent la concentration du toluène, de l'éthylbenzène et des xylènes et précisent que la concentration du benzène ne peut pas être obtenue car elle est inférieure à la limite de détection. Après avoir calculé la moyenne des concentrations dans 6 nuages, ils trouvent que le xylène est l'aromatique le plus concentré (1,2 $ng.mL^{-1}$ pour le m- et le p-xylène et 0,5 $ng.mL^{-1}$ pour l'o-xylène), suivi par l'éthylbenzène (1,1 $ng.mL^{-1}$) et le toluène (1,0 $ng.mL^{-1}$). Cependant il est important de noter que ces composés ne représentent que 0,1 à 0,2% de la DOC.

De part leur omniprésence et leur importance dans la chimie atmosphérique, la réactivité de ces molécules dans la phase gaz de l'atmosphère a été étudiée très tôt. Les aromatiques sont principalement éliminés suite à leurs réactions avec le radical hydroxyle, réaction majoritaire, et le nitrate (Atkinson, 2000). Deux voies sont possibles : tout d'abord l'arrachement d'un atome d'hydrogène, par le radical

hydroxyle, du cycle aromatique (pour le cas du benzène) ou du groupement substitué, l'arrachement de l'hydrogène est une voie minoritaire pour le benzène et ces dérivés méthylés (< 10%). La deuxième voie est l'ajout d'un $^{\bullet}OH$ sur le cycle benzénique entrainant la formation d'un adduit aromatique-OH. Une fois formé l'adduit peut réagir avec O_2 et NO_2. Dans la troposphère, les réactions avec O_2 sont majoritaires et entrainent la formation des produits de dégradation. Pour le benzène, les produits de dégradation sont le phénol, un radical alkoxy-époxyde, un radical peroxyle et l'oxépine. Ensuite, ces composés sont dégradés, suite à une ouverture du cycle, en composés di-carbonylés. L'ensemble des produits de dégradation n'est pas connu pour toutes les molécules, et ce même pour les molécules les plus étudiées comme le benzène, toluène et xylène (seulement 30 à 50% des composés sont connus) (Atkinson, 2000; Grosjean, 1991).

Dans la phase aqueuse, un mécanisme réactionnel prédictif a été établi en 1995 par Herrmann et son équipe (Figure 31).

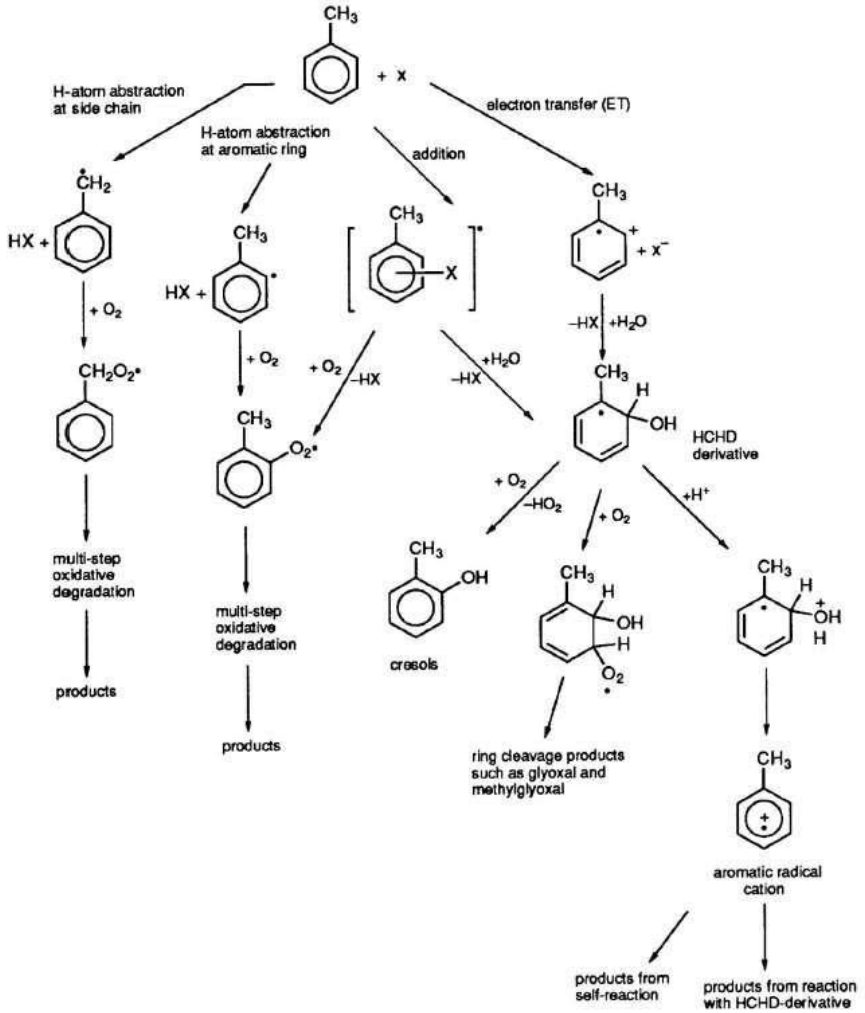


Figure 31 : Mécanismes réactionnels possibles après la réaction avec les radicaux libres X (où X = $SO_4^{-\bullet}$ ou $NO_3^{\bullet}$) **en solution aqueuse.** HCHD : radical hydroxycyclohexadiényle (d'après Herrmann *et al.*, 1995).

Quatre voies de dégradations sont présentes : l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur le substituant ou sur le cycle, une addition radicalaire et un transfert d'électron. Ces voies peuvent conduire, après plusieurs oxydations ou une seule, à la formation de radicaux cycliques qui pour se stabiliser forment des composés aromatiques plus stables (le phénol ou l'o-crésol) ou se décyclisent. Lorsque le radical hydroxyle est impliqué, l'abstraction d'un hydrogène est très minoritaire et ne peut avoir lieu qu'en présence de composés chargés positivement dans le milieu. Ainsi l'addition radicalaire sur le cycle devient majoritaire en solution aqueuse (dans 90% des cas), elle se fait souvent selon le processus d'addition-élimination (Figure 32) (Gligorovski *et al.*, 2015).

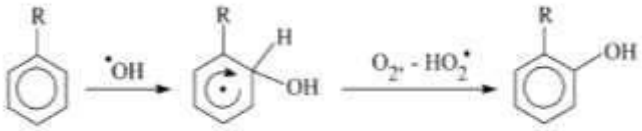


Figure 32 : Voie de substitution classique des aromatiques en phase aqueuse (d'après Gligorovski *et al.*, 2015).

Il est intéressant de noter que les microorganismes ont aussi la capacité de dégrader ces molécules complexes dans les sols ou les eaux contaminées et les stations d'épuration (Ukpaka, 2016). Les genres les plus aptes à entreprendre la dégradation aérobie de ces composés sont *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et *Nocardia*. Le plus étudié est le genre *Pseudomonas* qui peut dégrader de nombreux aromatiques allant du benzène au benzo(pyrène). Ces microorganismes transforment ces composés aromatiques en intermédiaires clés, principalement grâce à des réactions d'oxygénation. Quand ils sont sous la forme d'intermédiaire dihydroxy-aromatique, leur cycle est clivé et ils entrent dans la voie du métabolisme central. L'étude de la biodégradation des BTX a permis de montrer l'existence d'une hiérarchie dans celle-ci : le toluène est facilement dégradé, suivi par les xylènes (p- et m-), le benzène, l'éthylbenzène et l'o-xylène. Les voies de dégradation diffèrent selon les microorganismes, un exemple est représenté dans la Figure 33.

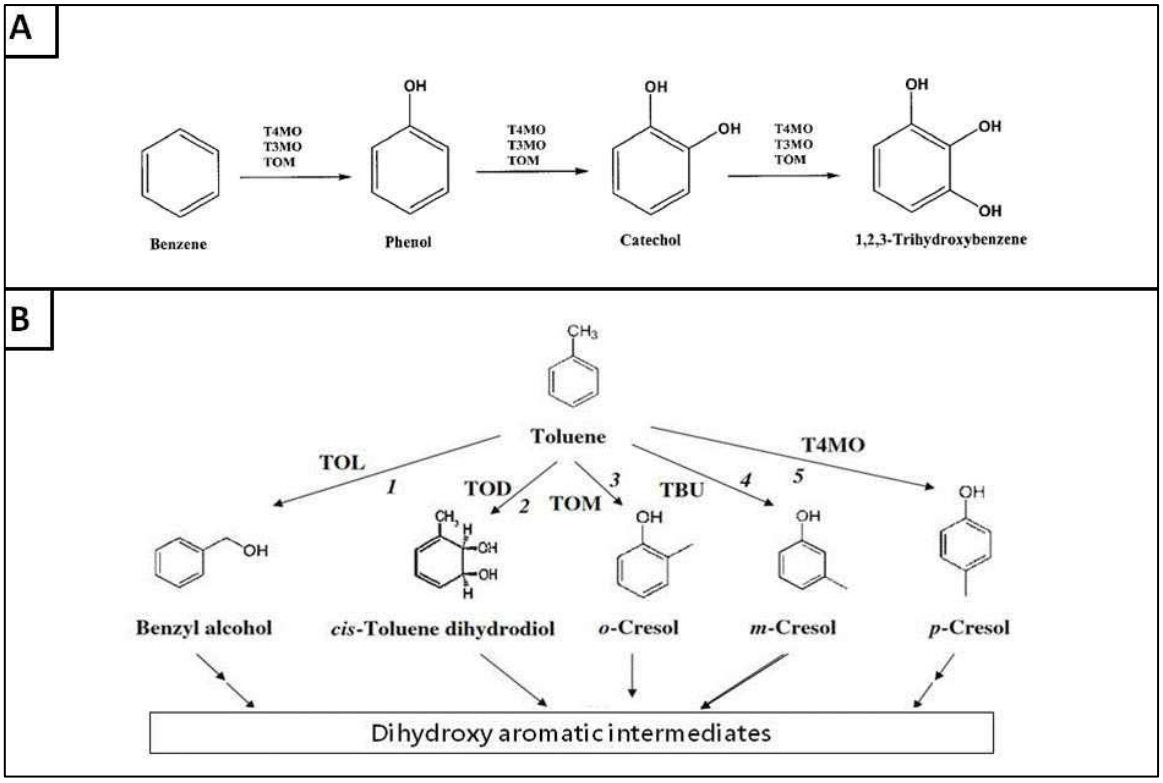


Figure 33 : Les voies de dégradation du benzène (A) et du toluène (B). A : Voies de dégradation du benzène par *Pseudomonas mendocina* et *Ralstonia pickettii*. TOM : toluène ortho-monooxygénase et T3MO ou T4MO : toluène monooxygénase (d'après Tao *et al.*, 2004). **B :** Voies de dégradation du toluène par 1 et 2 : *Pseudomonas putida* (mt-2 et F1) ; 3, 4 et 5 : *Burkolderia cepacia*, *B. picketti* et *B. mendocina.* TOL : oxydation du substituant alkyl, TOD : dioxygénation du toluène, TOM : ortho-monooxygénation du toluène, TBU : méta-monooxygénation du toluène et T4MO : para-monooxygénation du toluène (Modifié de la publication de Gülensoy and Alvarez, 1999).

Selon la formation de l'intermédiaire aromatique, deux voies métaboliques peuvent être utilisées, elles consistent en l'hydroxylation du cycle ou l'oxydation d'un substituent alkyl (voie TOL). La voie majoritaire est celle de l'hydroxylation du cycle, elle peut être faite par l'ajout d'un ou de deux oxygènes (TOD, TOM, TBU, T3MO et T4MO) faisant des composés di hydroxylés ou des oxydes d'arènes qui, instables, se transforment en phénol ou en crésol. Il n'existe pas une voie de dégradation regroupant la dégradation de tous les BTEX mais beaucoup d'enzymes sont communes à ces nombreuses voies de dégradation (Cao *et al.*, 2009; Kitayama *et al.*, 1996).

La concentration dans l'eau de nuage des BTX est faible et ils ne représentent que peu de matière organique dissoute. Pourtant les aromatiques font partie des composés les plus communément retrouvés dans les eaux atmosphériques (avec les acides mono carboxyliques) (Gill *et al.*, 1983). Pour étudier leur réactivité, nous nous sommes concentrés sur un aromatique simple, autre que le benzène, le phénol.

IV. 2. Cas particulier du phénol

Le phénol a été particulièrement étudié dans les années 1980-2000 car les nitrophénols ont des capacités phytotoxiques et ils ont été accusés de jouer un rôle dans le déclin des forêts d'Europe du Nord et d'Europe Centrale (Natangelo *et al.*, 1999; Rippen *et al.*, 1987). Il a aussi été l'un des aromatiques le plus régulièrement analysé dans les publications voulant caractériser la matière organique.

IV. 2. 1) La présence du phénol dans l'atmosphère

En 1985, les rejets de phénol dans la phase gaz étaient de 1 900 $Tg.an^{-1}$ pour les rejets automobiles et de 2 300 $Tg.an^{-1}$ pour les feux de biomasse (Lesh and Mead, 1985). Ses sources naturelles sont la décomposition de la matière organique et les feux de forêt (Schauer *et al.*, 2001). Mais il peut aussi provenir de sources anthropogéniques : les rejets automobiles et les processus industriels. Il intervient dans la production d'huiles, de plastiques, de médicaments, de pesticides, de colorants, de teintures, *etc*. Il est également utilisé comme conservateur du bois et du cuir (Gami *et al.*, 2014). De nos jours (2016), le phénol est produit dans le monde à hauteur de 10,7 $Tg.an^{-1}$ (Merchant Research & Consulting Itd). Il peut aussi être formé *via* le benzène et les alkylbenzènes (Atkinson and Aschmann, 1988; Grosjean, 1991; Tubaro *et al.*, 2003; Volkamer *et al.*, 2002). La formation du phénol à partir du benzène dans la phase gaz peut se faire de 3 façons différentes mais toutes nécessitent en premier lieu l'oxydation du benzène par le radical hydroxyle (Figure 34).

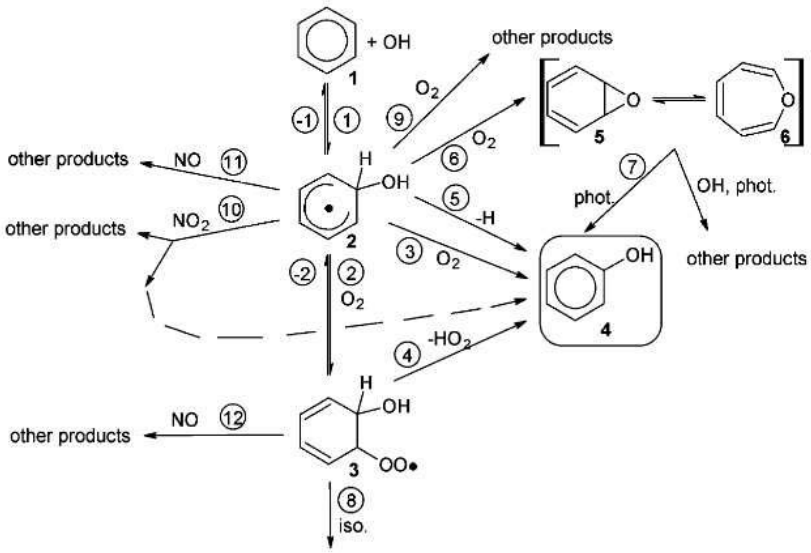


Figure 34 : Mécanismes de dégradation du benzène en phénol dans la phase gaz (d'après Volkamer *et al.*, 2002).

Après avoir obtenu l'adduit benzène-OH (2), le phénol peut être formé suite à une abstraction d'hydrogène ou une réaction avec le dioxygène. Cet adduit peut aussi réagir avec O_2 pour donner un peroxy-hydroxycyclohexadiényle (3). Cette molécule est une source de phénol par une perte d'un anion hydroperoxyle (HO_2^-). Volkamer et collaborateurs trouvent un rendement de formation du phénol à 53% (Volkamer *et al.*, 2002). Par la suite, une modélisation globale de toutes ces sources dans la phase gaz a permis de donner une estimation de la quantité de phénol émise (Cabrera-Perez *et al.*, 2016). La première des sources du phénol est l'oxydation du benzène (59% des sources totales représentant l'émission de 3,4 Tg de $C.an^{-1}$), puis les feux de biomasse (32%) et les émissions anthropiques (9%).

Une fois formé le phénol peut passer dans la phase aqueuse car il est polaire, soluble et sa constante de Henry est de 5 430 $M.atm^{-1}$ à 5°C (plus de 10% du phénol gazeux passe dans la phase aqueuse ; Feigenbrugel *et al.*, 2004). Ainsi il a été dosé dans la pluie et dans l'eau de nuage (Tableau 17).

Tableau 17 : Concentrations moyennes du phénol mesurées dans la pluie et dans les nuages.

Sites	Type de sites	Milieux	Moyenne, $\mu g.L^{-1}$	Cité dans
Los Angeles, États-Unis	Urbain	Pluies	6	Kawamura and Kaplan, 1983
Portland, États-Unis	Urbain		0,0003	Leuenberger *et al.*, 1985
Dübendorf, Suisse	Urbain		7,7	Leuenberger *et al.*, 1988
Greppen, Suisse	Rural		5,1	Czuczwa *et al.*, 1987
Hannover, Allemagne	Urbain		7,7	Levsen *et al.*, 1990
Montagne des Vosges, France	Rural		1,6	Harrison *et al.*, 2005
Strasbourg, France	Urbain		1,5	Schummer *et al.*, 2009
Erstein, France	Rural		6,4	
Montagne des Vosges, France	*non précisé*	Nuages	3,5	Harrison *et al.*, 2005
Great Dun Fell, Angleterre	Continental		5,4	Lüttke *et al.*, 1997
Mount Brocken, Allemagne	Pollué		3	Harrison *et al.*, 2005

La concentration en phénol varie de 0,0003 à 7,7 $\mu g.L^{-1}$. Seule la valeur obtenue sur le site de Portland est basse, les autres sont toutes du même ordre de grandeur. De façon globale, la valeur moyenne du phénol dans la pluie est de 4,5 ± 3,0 $\mu g.L^{-1}$ (4,6 ± 3,6 $\mu g.L^{-1}$ en milieu urbain et 4,4 ± 2,5 $\mu g.L^{-1}$ en milieu rural). Dans les nuages, les mêmes gammes de concentration sont obtenues, avec une concentration moyenne de 4,0 ± 1,3 $\mu g.L^{-1}$. Vu le peu d'échantillons, il est difficile de tirer des conclusions sur l'importance du type de masse d'air étudié mais la pollution locale ne semble pas influencer les concentrations retrouvées dans les nuages.

Le phénol peut donc passer dans la phase aqueuse du nuage, être généré dans ce milieu mais aussi y subir des réactions chimiques.

IV. 2. 2) La transformation du phénol par la chimie radicalaire

La photolyse du phénol va être très faible car les longueurs d'onde d'émission du spectre solaire et celles d'absorption du phénol ne se recouvrent pas.

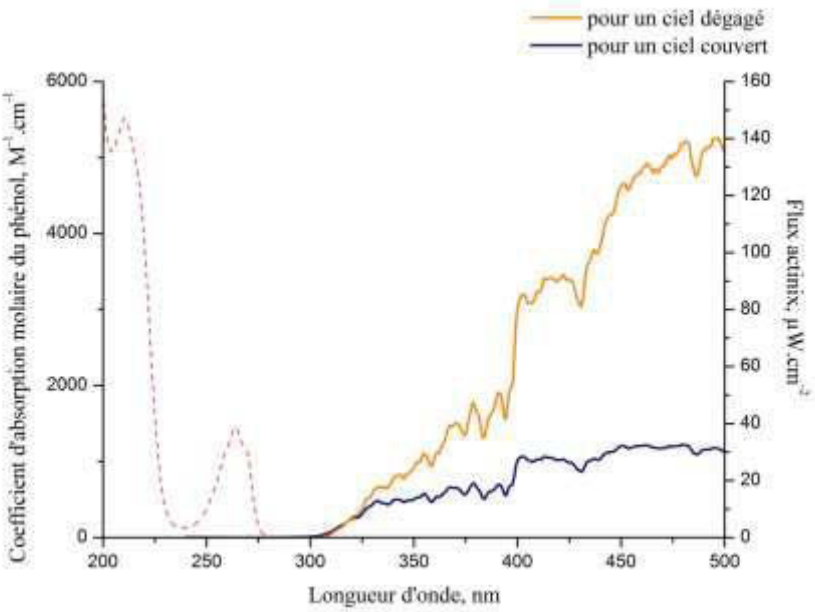


Figure 35 : Spectre d'absorption du phénol comparé aux flux actiniques mesurés en présence ou en absence de nuages. Le flux actinique mesuré pour un ciel dégagé a été obtenu sur le campus universitaire des Cézeaux, Clermont-Ferrand ; celui mesuré pour un ciel couvert a été acquis au sommet du puy de Dôme.

La photolyse du phénol va être très faible voire inexistante, par contre il va être très sensible à la chimie radicalaire.

Dans la phase gaz, le phénol va être principalement dégradé par le radical hydroxyle, le jour, et le nitrate, la nuit. Les constantes de réactivité dans la phase gaz pour ces radicaux sont estimées respectivement à 2,6 x 10^{-11} et 3,6 x 10^{-12} $cm^3.molecule^{-1}.s^{-1}$ (Grosjean, 1991). Le radical hydroxyle va pouvoir réagir avec le phénol de deux manières : par une étape d'addition réversible, il entraine la formation d'un adduit phénol-OH ou il peut enlever un hydrogène au phénol faisant ainsi un radical phénoxyl. Le mécanisme d'addition domine sur celui d'abstraction. Cet adduit peut alors réagir avec O_2, NO_2 et NO_3. Dans l'atmosphère, la réaction avec O_2 est privilégiée voir exclusive et donne du catéchol suite à une abstraction d'hydrogène. A l'inverse, le radical phénoxyl réagit préférentiellement avec NO_2 ou NO_3 et donne majoritairement de l'o-nitrophénol (Berndt and Böge, 2003).

La photolyse du phénol dans la phase aqueuse ne va pas être importante puisque, là aussi, les longueurs d'onde ne se recouvrent pas (Figure 35). Sa réactivité est donc contrôlée par la chimie radicalaire. Dans la phase aqueuse, la constante de réactivité du phénol avec le radical hydroxyle est

de 1,9 x 10^9 $M^{-1}.s^{-1}$ (Herrmann *et al.*, 2010), elle a été obtenue suite à des expériences de photo-Fenton faites à 20°C et pH 2 (calcul fait par Monod *et al.* (2005), grâce à des méthodes cinétiques relatives entre le 2-propanol et le phénol, la lampe utilisée est une lampe Xénon de 250 à 800 nm (300 W)). Celle avec $NO_3^{\bullet}$ a été mesurée à 25°C et à pH 0,5, $k_{phénol,\ NO3}$ = 1,8 x 10^9 $M^{-1}.s^{-1}$ (Barzaghi and Herrmann, 2002; Umschlag *et al.*, 2002). La réactivité du phénol dans la phase aqueuse est présentée dans la Figure 36.

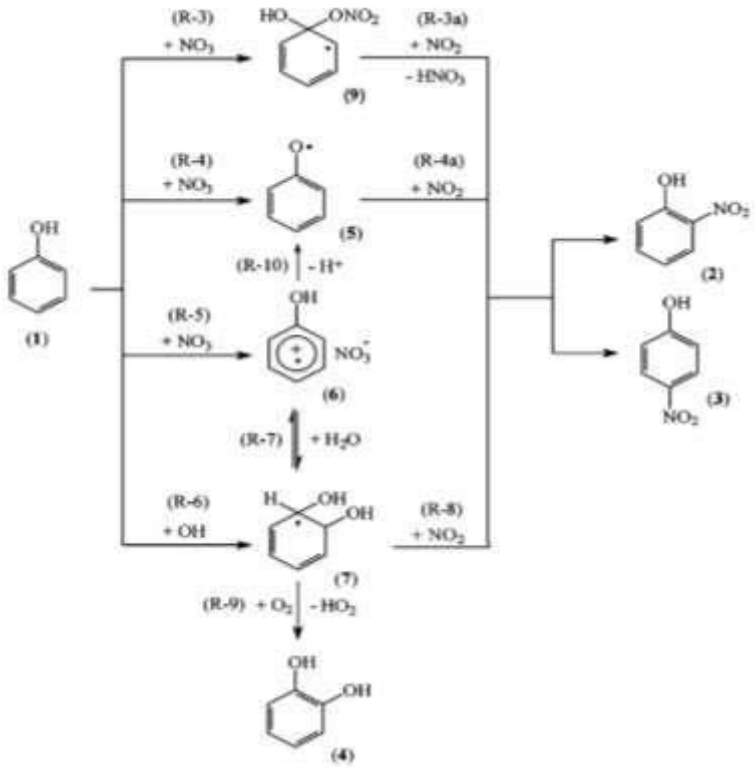


Figure 36 : Oxydation et nitration du phénol en solution aqueuse. Les réactions ont été faites par photolyse éclair avec un laser. (1) Phénol ; (2) 2-nitrophénol ; (3) 4-nitrophénol ; (4) Catéchol ; (5) Radical phénoxy ; (6) Cation radicalaire de phénol ; (7) Adduit phénol-OH et (9) Radical de phénol avec une fonction ester de nitrate. R3, R6, R7, R8, R9 et R10 : mécanismes d'addition/élimination ; R4 : abstraction d'hydrogène ; R5 : transfert d'électron (d'après Barzaghi et Herrmann, 2002). La formation du radical nitrate est faite par photolyse flash à 248 nm de 0,01 M d'anion nitrate à pH 5 ; pendant cette expérience les auteurs mesurent la concentration en radical hydroxyle après la réaction de ce radical et l'ion chlorure.

Les mêmes procédés de transformations que ceux intervenant dans la phase gaz sont présents dans la phase aqueuse. Le produit majoritaire de la dégradation du phénol est, là aussi, le catéchol (4) ; les composés nitrés ((2) et (3)) ne représentant que 6 à 17% des produits formés (Barzaghi and Herrmann, 2002).

Le phénol peut donc passer de la phase gaz à la phase aqueuse. Il va réagir avec les radicaux hydroxyles et nitrates pour former en majorité du catéchol. Son temps de demi-vie dans la troposphère (en prenant en compte la phase gaz et la phase aqueuse) est estimé entre 2h (Cabrera-Perez *et al.*, 2016)

et 13h (Monod *et al.*, 2005). La réactivité dans la phase aqueuse du nuage joue donc un rôle important dans la dégradation de ce composé (Monod *et al.*, 2005).

IV. 2. 3) Rôle des microorganismes dans la dégradation du phénol

Ayant déjà démontré la présence de microorganismes dans l'eau de nuage et parlé brièvement de leurs capacités à dégrader des composés aromatiques simples, une présentation plus détaillée des voies de dégradation du phénol va être faite ici. Le phénol peut être dégradé de façon aérobie ou anaérobie. Dans les nuages, l'oxygène étant omniprésent, seule la biodégradation aérobie va être présentée. Cette partie a été rédigée principalement en s'appuyant sur le livre de Pelmont, 2012.

La dégradation du phénol fait partie de la voie de dégradation du benzoate dans KEGG (Base de donnée des voies métaboliques ; site internet : http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00362). Une simplification de cette voie est illustrée ici (Figure 37).

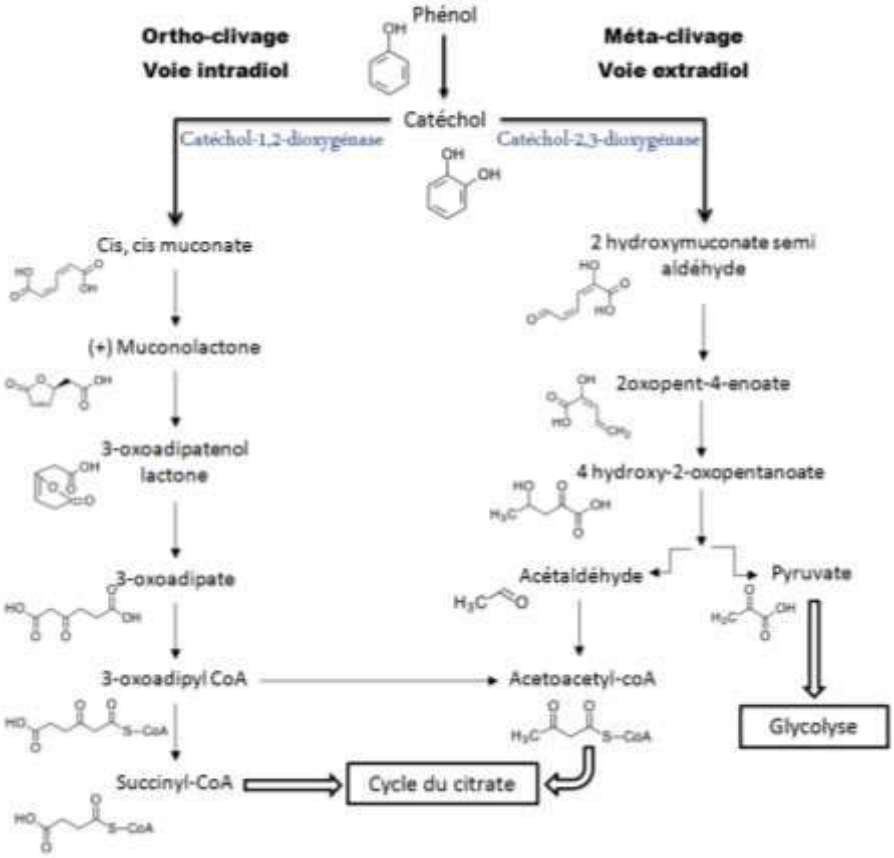


Figure 37 : Voies de biodégradation du phénol (d'après la base de données KEGG**).**

Dans un premier temps, le phénol est dégradé en catéchol, c'est le même produit de dégradation que par la dégradation photochimique. L'enzyme qui réalise cette réaction porte plusieurs noms : phénol 2-monooxygénase, phénol hydroxylase ou phénol o-hydroxylase. Elle permet la fixation d'un atome

d'oxygène provenant du dioxygène sur le phénol. Le deuxième oxygène est réduit en eau, le cofacteur nécessaire à la réaction est le NADPH (couple rédox NADPH/$NADP^+$).

Une fois le catéchol obtenu, il peut suivre 3 voies de dégradation : la voie intradiol (position ortho), la voie extradiol (position méta) et la voie du gentisiate (en position para). Cette dernière voie est rare alors que les deux premières sont assez courantes et peuvent être présentes dans le même organisme. La voie intradiol conduit à l'ouverture du cycle aromatique et entraine la production de succinyl-CoA et d'acétoacétyl-CoA alors que la voie extradiol va former de l'acétaldéhyde et du pyruvate. Ces 4 molécules vont pouvoir intégrer le métabolisme central par le cycle du citrate et la glycolyse. Ces deux voies sont initiées par le clivage du catéchol par des dioxygénases. Ces oxydases permettent la fixation d'atomes d'oxygène au catéchol. L'enzyme catéchol-1,2-dioxygénase permet ainsi l'obtention du cis, cis muconate, l'ajout d'un groupement hydroxyle se fait en position ortho. L'enzyme catéchol-2,3-dioxygénase l'ajoute en position méta faisant ainsi du 2 hydroxymuconic semialdéhyde. Pour fonctionner, elles nécessitent toutes les deux du fer dans leurs sites actifs : l'enzyme catéchol-1,2-dioxygénase utilise du Fe(III) alors que la catéchol-2,3-dioxygénase nécessite du Fe(II) (ou plus rarement le Mn(II)).

- Pour la catéchol-1,2-dioxygénase, le Fe(III) est non héminique et est lié à l'enzyme par 4 acides aminés : 2 histidines et 2 tyrosines. Son rôle est de transformer le substrat en le faisant réagir directement avec O_2. Pour cela, une liaison se crée entre le substrat et le fer, ceci entraine la formation d'une semi-quinone qui réagit avec O_2. L'intermédiaire formé va subir un réarrangement pour permettre l'ouverture du cycle (Figure 38).

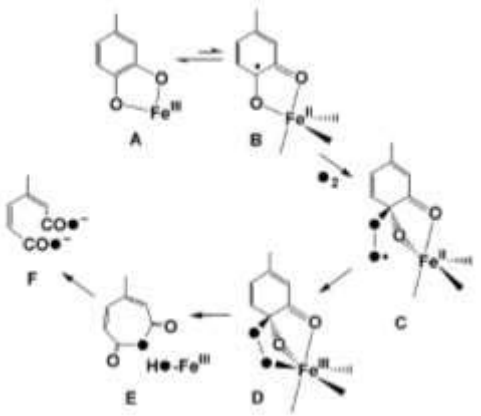


Figure 38 : Mécanisme catalytique de la dioxygénase intradiol (d'après Costas *et al.*, 2004).

- Pour la catéchol-2,3-dioxygénase, le noyau ferreux est lié au substrat, à 2 histidines et un acide glutamique. Le mécanisme réactionnel de l'enzyme est le suivant :

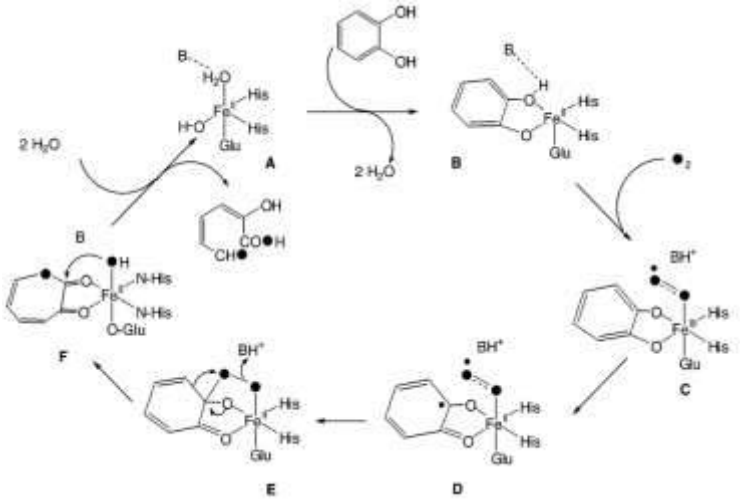


Figure 39 : Mécanisme réactionnel de la dioxygénase extradiol (d'après Costas *et al.*, 2004).

La première étape consiste en une perte d'eau entrainant un changement dans la coordination du fer. Ce changement permet la réaction du centre métallique avec le dioxygène entrainant la formation d'une complexation avec un radical anion superoxyde. Un réarrangement électronique permet là encore l'ouverture du cycle.

Ces mécanismes sont similaires à ceux de la réactivité du Fe(II) et Fe(III) présentée en Figure 7. En effet, le Fe(III) est associé par une liaison oxygène au substrat (ligand dans la figure) et l'interaction avec le substrat finit par la formation d'oxydes de fer. Durant ce processus enzymatique, la chimie radicalaire intervient, notamment après l'ajout de dioxygène, sur le complexe de fer ou sur le composé entrainant la formation d'un complexe radicalaire. Les dégradations photochimiques ou biologiques conduisent toutes les deux à une ouverture du cycle aromatique.

Les gènes des enzymes impliquées dans la biodégradation du phénol et surtout ceux dégradant le catéchol peuvent être sur le chromosome ou sur des plasmides dits plasmides de dégradation. Ils sont regroupés sous forme d'opéron, les enzymes sont donc inductibles et leur synthèse est contrôlée par une rétroaction catabolique. La voie intradiol est très répandue chez les microorganismes appartenant à la phyllosphère. Les gènes intervenant dans cette voie peuvent varier selon les organismes, par leurs nombres et par leurs dispositions. Un aperçu de l'organisation de l'opéron pour plusieurs bactéries est représenté en Figure 40.

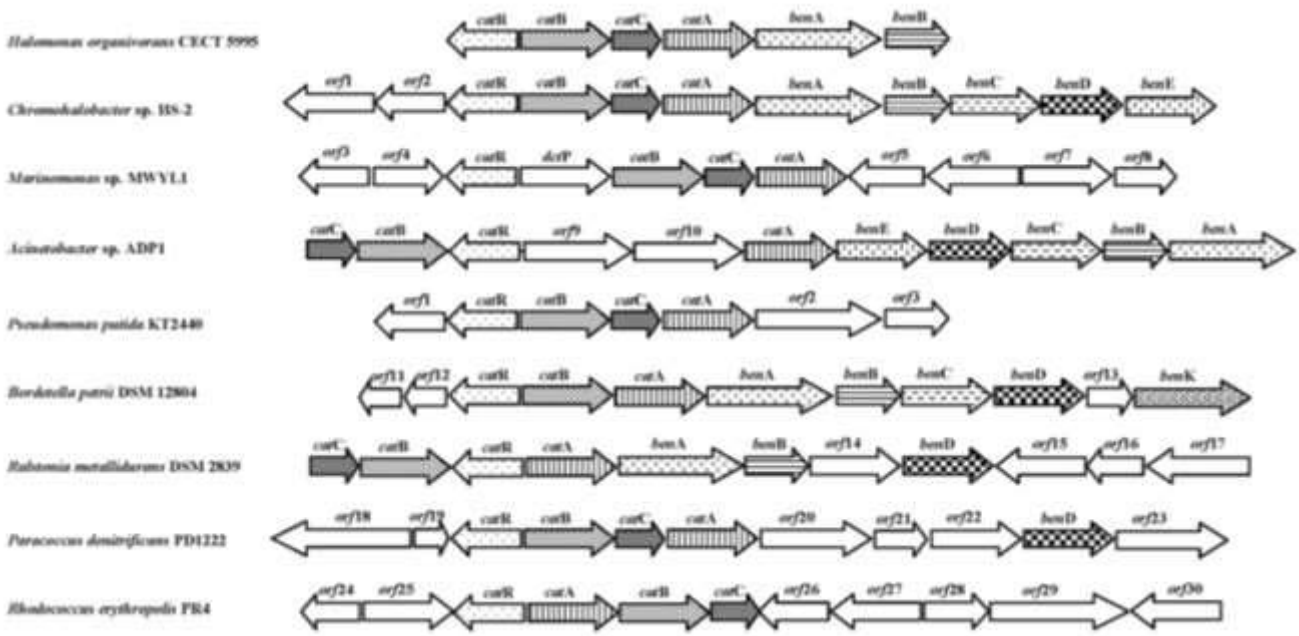


Figure 40 : Représentation des gènes intervenant dans la dégradation du phénol (*cat*). La direction des flèches donnent le sens de transcription. *catA* : catéchol-1,2-dioxygénase ; *catB* : cis, cis muconate cyclo-isomérase ; *catC* : munconolactone isomérase ; *catR* : régulateur transcriptionnel. Les gènes *ben* font référence à la dégradation du benzoate (d'après Moreno *et al.*, 2011).

La régulation de ces gènes est aussi variable, l'induction de la transcription pouvant se faire soit par le substrat soit par un intermédiaire métabolique. En effet, pour les régulateurs transcriptionnels de type LysR l'activation de la transcription se fait par le cis, cis-muconate alors que pour ceux de type IclR elle se fait par le composé aromatique lui-même. Les bactéries *Pseudomonas* et *Streptomyces*, par exemple, présentent un régulateur de type LysR (McFall *et al.*, 1998; Park and Kim, 2003) alors que *Rhodococcus* présente une régulation de type IclR (Veselý *et al.*, 2007). Ces deux types de réactions ont des structures similaires et interagissent de la même manière avec l'ADN (Figure 41).

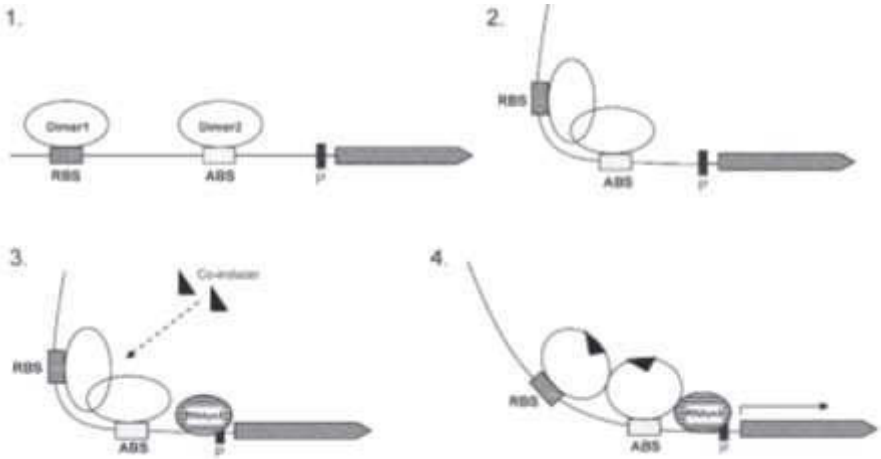


Figure 41 : Représentation schématique des régulateurs transcriptionnels de type LysR. RBS : Repression binding site ; ABS : Activation binding site ; P : Promoteur ; RNApol : ARN polymérase (d'après Maddocks and Oyston, 2008).

Les régulateurs transcriptionnels se lient, sous forme de dimère, sur l'ADN en amont de l'opéron sur un site dit RBS (repression binding site). Ainsi ils entrainent une courbure de l'ADN, empêchant la fixation de l'ARN polymérase. Quand la molécule inductrice est présente, ils changent de conformation, l'angle de courbure de l'ADN diminue permettant l'accès au promoteur et la transcription des gènes.

Cette voie de dégradation est commune à de nombreux microorganismes : les bactéries (Gram positives et négatives), les levures, les champignons (ascomycètes et basidiomycètes) et les algues (Basha *et al.*, 2010; Michalowicz and Duda, 2007). Plusieurs genres bactériens peuvent dégrader le phénol : *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Brevibacterium*, *Citrobacter*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Halomonas*, *Limnobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Streptomyces* et *Xanthobacter* (Gami *et al.*, 2014; Nair *et al.*, 2008; Padmanabhan *et al.*, 2003). Les organismes les plus étudiés sont *Acinetobacter* et *Pseudomonas* (Basha *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013). La plupart des études ont été faites sur des sols pollués ou sur les boues activées des stations d'épuration. Le phénol n'est pas facilement biodégradable, sa biodégradation dépend de la température et des substrats présents dans le milieu (la présence de glucose diminue la dégradation du phénol) (Basha *et al.*, 2010). Le tableau suivant résume les publications ayant étudié la dégradation du phénol.

Tableau 18 : Dégradation du phénol par des bactéries. (¤) exprimée en mg de masse sèche par litre. # Temps de dégradation réel (en enlevant le temps de latence). n.s est marqué lorsque la concentration n'est pas donnée ou calculable dans la publication. n.d indique que les vitesses ne sont pas calculables.

Milieu	Genres bactériens	Température	Concentration, cellules/mL (sauf ¤)	[Phénol], M	Temps de dégradation, h #	Vitesse de dégradation, mol.cellule^{-1}.h^{-1}	Référence
Culture	*Pseudomonas*	10°C	9,16 (¤)	2 x10^{-3}	47,45	n.d	Kotturi *et al.*, 1991
Culture	*Pseudomonas*	20°C	8,9 x 10^{6}	2 x 10^{-3} 1 x 10^{-2}	14 92	3,21 x 10^{-17} 12,2 x 10^{-17}	Hinteregger *et al.*, 1992
Culture	*Pseudomonas*	30°C	0,17 (¤)	5 x 10^{-4}	70	n.d	Reardon *et al.*, 2000
Culture	*Pseudomonas*	37°C	5 x 10^{6}	1 x 10^{-4} 7 x 10^{-4}	100 124	0,002 x 10^{-17} 0,08 x 10^{-17}	Razika *et al.*, 2010
Lac Parishan, Iran	*Acinetobacter*	30°C	n.s	2 x 10^{-3}	48	n.d	Kafilzadeh *et al.*, 2010
Boues activées	*Comamonas*	28°C	n.s	1 x 10^{-3}	124	n.d	Felföldi *et al.*, 2010
Sédiment, Wuhan, Chine	*Pseudomonas*	30°C	n.s	5 x 10^{-3}	48	n.d	Tian *et al.*, 2017

Selon la concentration en phénol, le type de bactérie et le temps d'induction, le temps de dégradation peut être de quelques heures à pratiquement une semaine. Au delà d'une certaine concentration, le phénol peut ne plus être dégradé par la bactérie : *Pseudomonas* ne dégrade plus le phénol quand sa concentration est supérieure à 0,01 M (Hinteregger *et al.*, 1992). Le phénol étant une molécule toxique et ayant des propriétés carcinogènes, il peut devenir dommageable à forte concentration pour les microorganismes. Il a la possibilité de changer la fluidité de la paroi bactérienne, une fois dans la cellule il peut également former des radicaux phénoliques et provoquer un stress oxydatif (Gami *et al.*, 2014).

A notre connaissance, aucune publication n'a étudié l'impact des microorganismes issus des nuages sur le phénol. Seules les publications de Sandhu et collaborateurs se rapprochent de notre milieu. Ils ont étudié les communautés microbiennes de la phyllosphère et ont cherché à voir si elles étaient à même de dégrader le phénol (émis dans la phase gaz) (Sandhu *et al.*, 2007, 2009). Dans un premier temps, ils ont ensemencé des bactéries de leur collection sur différentes plantes (haricots et maïs) et les ont exposé au phénol. Ils trouvent que le phénol peut se concentrer au niveau des feuilles et est donc disponible pour la dégradation bactérienne des deux *Pseudomonas sp.* inoculées. Par la suite, ils ont récolté des feuilles de frêne et en ont stérilisé une partie avant de les exposer au phénol (marqué au ^{13}C) pendant 24h. 20% du phénol est assimilé par une partie de la communauté phyllosphérique composée de 10^5 à 10^7 CFU.g^{-1}. Les principaux microorganismes constituant cette communauté sont *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* et *Rhodococcus*. Afin de caractériser les acteurs de cette dégradation, ils poursuivent leur étude par l'isolement et la

caractérisation des souches dégradant le phénol. Pour cela, ils récoltent les feuilles, mettent en culture les microorganismes avec le phénol comme seule source de carbone, les exposent au phénol et mesurent la minéralisation de celui-ci. La caractérisation des souches est faite par séquençage de l'ADNr 16S. Trente trois bactéries sont isolées, dix d'entre elles minéralisent le phénol en 48h. Ces dix souches sont associées aux genres *Acinetobacter* (5), *Alcaligenes* (2) et *Rhodococcus* (3).

Le phénol atmosphérique est donc dégradable par des souches de la phyllosphère, or cette communauté est une des sources de bactéries dans les nuages. De plus, le genre le plus communément étudié (*Pseudomonas*) est celui le plus fréquemment récolté par culture dans les nuages du puy de Dôme et il fait partie des genres les plus actifs dans les nuages de type continental et marin (Amato *et al.*, 2017a; Vaïtilingom *et al.*, 2012). Ceci laisse à penser que les microorganismes pourraient influencer la concentration du phénol dans la phase aqueuse du nuage.

Problématique

Le nuage est un milieu important pour la chimie atmosphérique. Son rôle encore peu connu entraine des incertitudes sur ses capacités de rétrocontrôle du réchauffement climatique. Si sa composition en molécules inorganiques est bien établie, celle des composés organiques nécessite encore beaucoup de travail. Les réactions de transformations de cette matière organique sont régies par la chimie radicalaire (issue de la photochimie) mais aussi par des réactions biologiques, depuis la mise en évidence de microorganismes actifs dans l'eau de nuage.

Plusieurs points sont donc limitant pour comprendre la réactivité des composés chimiques dans le nuage. Dans un premier temps, il y a une grande incertitude sur la concentration en radical hydroxyle, alors qu'il est l'acteur principal de cette réactivité le jour. Ceci s'explique par le manque de connaissance sur la composition en matière organique, son puits majoritaire, ainsi nous avons cherché à caractériser une autre classe de composés chimiques : les aromatiques simples. Dans un second temps, la réactivité des microorganismes vis-à-vis de ce radical et de cette nouvelle catégorie de composés n'avait pas encore été étudiée. Ainsi l'objectif de ce travail est double (Figure 42) :

- Mesurer la concentration en radical hydroxyle et l'impact des microorganismes sur cette concentration.
- Caractériser la réactivité biologique et radicalaire de la nouvelle classe de composés en prenant comme exemple le phénol.

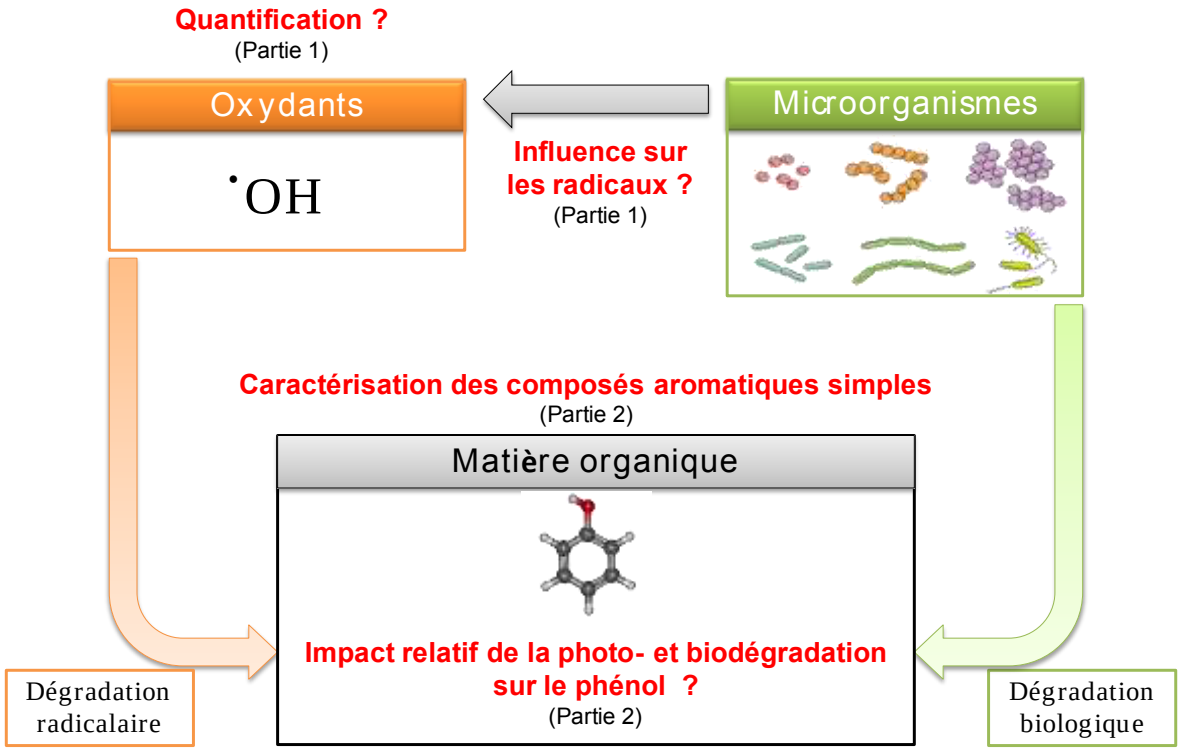


Figure 42: Schéma représentant les différentes questions soulevées pendant cette thèse.

La première partie de ce travail est centrée sur l'étude de la chimie radicalaire et l'impact des microorganismes sur celle-ci. Dans les nuages, peu de concentrations en radicaux oxygénés sont disponibles. Elles sont pourtant nécessaires car ces radicaux sont la source de nombreuses réactions. La modélisation de scénarios types par les modèles de chimie atmosphérique ne permet pas l'obtention d'un consensus, en effet les valeurs estimées fluctuent entre 10^{-12} et 10^{-15} M pour $^{\bullet}OH$. Ainsi une partie de ce travail a été de mettre au point une méthode pour doser la concentration de ce radical dans la phase aqueuse du nuage. Après les différentes mises au point, la concentration à l'état stationnaire du radical hydroxyle a été mesurée dans l'eau des nuages. De manière concomitante, cette concentration a été obtenue pour des échantillons d'eau de pluie et de nuage avec ou sans leurs microflores natives. En effet, les microorganismes sont capables de se défendre contre cette molécule, ainsi l'impact des microorganismes sur cette concentration a été recherché.

La deuxième partie de ce travail est focalisée sur les composés aromatiques simples. Dans un premier temps, nous avons voulu caractériser ces composés dans des pluies et des nuages collectés à Clermont-Ferrand afin de savoir s'ils étaient présents sur notre site. Pour cela, une analyse d'eaux atmosphériques par GC-MS a été faite. Après nous nous sommes concentrés sur l'étude d'un seul composé : le phénol. Nous avons voulu estimer l'impact des microorganismes sur la dégradation de cette molécule. Ceci a été fait en couplant deux approches : un large test de dégradation avec des souches cultivables et la recherche de transcrits *in situ* dans l'eau de nuage. Suite à cela, nous avons cherché à mesurer la contribution relative de la photo- et biodégradation du phénol. Pour cela, des cinétiques de dégradation avec une souche cultivable (*Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28) issue des nuages ont été faites, ce qui a permis d'estimer les vitesses de photo-dégradation et de calculer expérimentalement les vitesses de biodégradation du phénol.

Résultats

Partie 1 : Les radicaux hydroxyles, acteurs majeurs de la chimie du nuage

Les radicaux sont considérés comme les acteurs majeurs des transformations chimiques dans les nuages, parmi eux, le radical hydroxyle domine le jour et permet la dégradation des composés organiques. A cause de sa réactivité non spécifique, il a été appelé « le détergent de l'atmosphère ». Sa concentration est le plus souvent issue de simulations faites par des modèles de chimie atmosphérique. De façon globale, cette concentration a diminué au fur et à mesure des connaissances et de la complexité de ces modèles, elle est passée d'une valeur de l'ordre de 10^{-12} à $10^{-14}/10^{-15}$ M pour le cas d'un nuage de type continental. En fonction des différents scénarios simulés, et donc des différents types de nuages, cette concentration change. Elle est plus importante dans les nuages de type marin où elle est 100 fois plus grande que celle obtenue pour un nuage continental, ceci est du à une plus faible concentration en matière organique dans les scénarios simulant les nuages de type marin.

A notre connaissance, la concentration stationnaire en radical hydroxyle dans la phase aqueuse du nuage n'a été mesurée que par Anastasio et McGregor (2001) en se servant du benzène ou de l'acide benzoïque. Pour cela, ils ont dosé par HPLC le phénol et l'acide m-hydroxybenzoïque, produits de la réaction du radical hydroxyle avec ces sondes, ceci pour différentes concentrations en sondes. Afin d'éviter l'évaporation du benzène, et aussi de limiter sa toxicité, ils ont du sceller les tubes, ce qui impose de travailler avec un échantillon distinct pour chaque temps d'irradiation et chaque concentration en sonde. Après avoir calculé les vitesses de formation, celles-ci ont été exprimées en fonction de la concentration en sonde utilisée. La linéarité du rapport entre les inverses des vitesses de formation et de leurs concentrations en sonde permet l'obtention de la concentration en radicaux hydroxyles. La concentration en radical hydroxyle a été mesurée dans un seul nuage par cette méthode. Deux types d'échantillonnages ont été prélevés en fonction du diamètre des gouttes de nuage. Ainsi la concentration en radicaux hydroxyles pour les gouttes inférieures à 23 µm est de $1,7 \times 10^{-16}$ M et de $7,7 \times 10^{-16}$ M pour des gouttes supérieures à 23 µm.

Un contraste est donc visible entre les valeurs estimées par les modèles et la seule valeur mesurée dans la phase aqueuse des nuages. Afin de caractériser et de quantifier l'impact de la chimie radicalaire sur les composés du nuage, l'obtention de cette concentration est nécessaire. De plus, les microorganismes présents dans les nuages sont actifs et survivent aux stress présents dans ce milieu. Ils sont également à même de dégrader le peroxyde d'hydrogène, qui est une des sources du radical hydroxyle. Ainsi, un développement méthodologique, non dommageable pour les microorganismes, permettant de mesurer la concentration du radical hydroxyle à l'état stationnaire dans l'eau de nuage a été entrepris. La sonde utilisée ici est l'acide téréphtalique. Dans un premier temps, nous avons mis au point une méthode non-toxique pour les microorganismes, ceci a été vérifiée avec une bactérie

modèle récoltée dans les nuages (*Pseudomonas graminis* 13b-3). Les conditions expérimentales ont été ajustées pour pouvoir mesurer des concentrations en radicaux hydroxyles très faibles (de l'ordre du $10^{-15/-16}$ molaire). Pour cela, des mesures de cette concentration ont été faites dans un milieu synthétique, mimant les nuages de type marin récoltés au puy de Dôme, comprenant du peroxyde d'hydrogène et du fer, composés impliqués dans le processus de photo-Fenton. Après validation de la méthode, elle a été appliquée sur des eaux atmosphériques (pluies et nuages) pour mesurer leurs concentrations en radical hydroxyle à l'état stationnaire. L'impact de la présence de microorganismes sur la concentration en radical hydroxyle à l'état stationnaire a également été étudié en comparant entre eux des échantillons filtrés (sans microorganismes) et des échantillons non filtrés (comprenant la microflore native des eaux atmosphériques).

Ce travail a été le sujet de plusieurs communications orales :

- A. Lallement, V. Vinatier, A. M. Delort et G. Mailhot. « **Impact des voies photochimiques et biologiques sur la chimie radicalaire des nuages** », 2ème journée de l'école doctorale des Sciences Fondamentales, Clermont-Ferrand, le 26/06/2015.
- A. Lallement, V. Vinatier, A. M. Delort et G. Mailhot. « **Impact des voies photochimiques et biologiques sur la chimie radicalaire du nuage** », Séminaire ICCF, Clermont-Ferrand, le 08/12/2015.
- A. Lallement, V. Vinatier, A. M. Delort et G. Mailhot. « **Impact des voies photochimiques et biologiques sur la chimie radicalaire du nuage : les radicaux hydroxyles** », Journée scientifique de l'axe Chimie et Environnement de l'ICCF, Besse en Chandesse, le 28 et 29/01/2016.
- A. Lallement, V. Vinatier, A. M. Delort and G. Mailhot. « **A new method for measuring the steady state concentration of hydroxyl radicals in atmospheric waters** ». Congrès European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC 17), Inverness, Ecosse, le 29/11 au 02/12/2016.

Une communication par affiche a également été présentée au congrès European Aerosol Conference (EAC 22nd), Tours, France, le 04 au 09/09/2016 : A. Lallement, V. Vinatier, M. Sancelme, L. Deguillaume, A.M. Delort and G. Mailhot. « **Measurement of the steady state concentration of hydroxyl radicals in cloud water** ».

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'une publication : « MEASUREMENT OF STEADY STATE HYDROXYL RADICAL CONCENTRATIONS IN ATMOSPHERIC WATERS ». A. Lallement, V. Vinatier, M. Brigante, L. Deguillaume, A. M. Delort and G. Mailhot. Elle sera soumise au journal Chemosphere.

I. Measurement of steady state hydroxyl radical concentrations in atmospheric waters

MEASUREMENT OF STEADY STATE HYDROXYL RADICAL CONCENTRATIONS IN ATMOSPHERIC WATERS

A. Lallement[1], V. Vinatier[1], M. Brigante[1], L. Deguillaume[2], A. M. Delort[1*] and G. Mailhot[1*]

[1] Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France
[2] Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire de Météorologie Physique, 63000 Clermont-Ferrand, France

**Corresponding author: A-marie.Delort@uca.fr, gilles.mailhot@uca.fr*

ABSTRACT

Clouds are a particular environment where chemical reactions can occur and microorganisms metabolically active have been found. Hydroxyl radical is the main oxidant in cloud water, and more generally in the atmosphere, during the day and drives the cloud oxidant capacity. Steady state hydroxyl radical concentrations in cloud have been poorly studied; only one publication in 2001 gave a measured concentration in cloud water. Except this publication, available concentrations of hydroxyl radical have been estimated with atmospheric chemistry models, ranging from 10^{-12} to 10^{-15} M and could be overestimated due to a lack of knowledge about the speciation of organic matter which acts as a sink for hydroxyl radicals. The aim of this publication is to quantify the concentration of hydroxyl radicals at steady state in rain and cloud waters and to measure the impact of native microflora on this concentration. First, methodological development is performed with terephthalic acid as probe which non-toxicity was controlled before the analysis in real atmospheric water samples. Higher concentrations of hydroxyl radicals were found in cloud waters than in rain waters, with a mean value $1.6 \pm 1.5 \times 10^{-16}$ M and $7.2 \pm 5.0 \times 10^{-16}$ M for rain and cloud waters respectively and no real impact of microorganisms was observed. The method proposed in this paper allows to evaluate steady state hydroxyl radical concentrations at very low concentration (down to 10^{-17} M) and is biocompatible. So this method, which gives a new tool for the evaluation of atmospheric water oxidant capacity, represents a real breakthrough for atmospheric sciences.

INTRODUCTION

Clouds are multiphasic systems where many chemical reactions occur, in particularly in droplets (Faust, 1994; Lelieveld and Crutzen, 1991; Schwartz, 2003). As a consequence the water phase chemistry can influence cloud behavior: chemical composition, lifetime and so

transport of chemical compounds. Among the different parameters an important one for atmospheric chemistry is the cloud oxidant capacity which is the potential to remove pollutants by oxidation and mainly by reaction with radicals. Among the radicals, hydroxyl radical is the most powerful agent also called "the detergent of the atmosphere". Several works were carried out on hydroxyl radical chemistry in cloud to define $^{\bullet}OH$ sources and reactivity (Blough and Zepp, 1995; Chameides and Davis, 1982; Jacob, 1986; Mauldin III *et al.*, 1997). Main sources of hydroxyl radical are i) hydrogen peroxide, nitrite and nitrate photolysis (Yu and Barker, 2003; Zafiriou and Bonneau, 1987; Zellner *et al.*, 1990; Zepp *et al.*, 1987), ii) iron *via* ligand-to-metal charge-transfer reactions or photo-Fenton chemistry (Deguillaume *et al.*, 2004, 2005; Faust and Hoigné, 1990; Faust and Zepp, 1993; Nakatani *et al.*, 2007; Weschler *et al.*, 1986) and iii) the transfer of $^{\bullet}OH$ or O_3 from the gas phase to the aqueous phase of the cloud droplets (Arakaki and Faust, 1998; Faust and Allen, 1993). Its main sink is due to the reactivity with dissolved organic matter (Arakaki *et al.*, 2013). However, these organic compounds are quite difficult to identify and so poorly characterized (Herckes *et al.*, 2013) with only 21% of the organic matter in cloud waters sampled at the puy-de-Dôme station characterized (Bianco *et al.*, 2016). Furthermore, microorganisms are also present and metabolically active in cloud water. They can survive despite of numerous stress factors like osmotic chocks, temperature changing and freeze-thaw cycles (Amato *et al.*, 2007a; Joly *et al.*, 2015). In order to survive, they use organic matter as a source of carbon such as aldehydes and carboxylic acids (Amato *et al.*, 2007b; Ariya *et al.*, 2002; Vaïtilingom *et al.*, 2010) but they also have an effect on the oxygenated compounds. As aerobic cells, they are able to consume or either neutralize Reactive Oxygen Species (ROS) like hydroxyl radical, singlet oxygen and hydrogen peroxide. Cloud microorganisms, present in cloud water, have the capacity to degrade hydrogen peroxide and can contribute from 18 to 30% of the degradation of organic compounds during the day and up to 66 - 76% during the night (Vaïtilingom *et al.*, 2010, 2013).

Up to now, the hydroxyl radical concentrations have been estimated using simulations from different models and range from 10^{-12} to 10^{-15} M (Deguillaume *et al.*, 2004, 2005, Herrmann *et al.*, 2000, 2010; Mouchel-Vallon *et al.*, 2017; Tilgner and Herrmann, 2010; Tilgner *et al.*, 2013). Moreover, to parameterize the models, formation rates of hydroxyl radical are used (Bianco *et al.*, 2015; Faust and Allen, 1993; Nakatani *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2004) but they do not reflect steady state concentrations. In fact, they express the maximum of $^{\bullet}OH$ concentration formed without taking into account the different scavengers present in cloud water. However, steady state hydroxyl radical concentrations have been estimated in different

surface waters but, to our knowledge, the study of Anastasio and McGregor (2001) is the only one that carried out this type of work on cloud water. In their experiments, they used benzene and benzoic acid as probes at concentrations ranging from 50 to 1500 µM and analyzed reaction products by HPLC. One of the main concerns about this study is that benzene is volatile and therefore requires working in closed reactors which are incompatible with studies performed with aerobic bacteria like those present in cloud waters. Benzene is also toxic, irritating and deleterious for human and bacteria (Fishbein, 1984; Glatt *et al.*, 1989; Nunes-Halldorson *et al.*, 2004). As a consequence for health concern the use of benzene is prohibited in European laboratories and due to its toxicity it cannot be used to assess the role of active bacteria.

The main goals of this publication are to (1) quantify the steady state of hydroxyl radical concentrations in atmospheric waters (rain and cloud) with terephthalic acid as probe and to (2) assess the impact of microorganisms on these concentrations. For that development of a new method to determine the concentration of hydroxyl radicals is important mainly for two reasons: the first one is to use a non-toxic probe allowing the work on impact of microorganisms and the second one is to determine a real steady state concentration in aerobic natural cloud water using a very low concentration of a probe in comparison of former studies.

EXPERIMENTAL SECTION

1. Chemicals.

Terephthalic acid (TA) (benzene-1,4-dicarboxylic acid) (Sigma Aldrich) and 2-hydroxyterephthalic acid (TAOH) (Atlantic Research Chemical), with a purity of 98 and 97% respectively, are used without additional purification. Acetic acid and H_2SO_4 are from Acros Organic. Formic acid, oxalic acid, succinic acid, K_2SO_4, $MgCl_2$-$6H_2O$, NO_3NH_4, NaH_2PO_4-$2H_2O$, Na_2HPO_4-$2H_2O$, ferrozine and hydrogen peroxide (30% in water, not stabilized) are from Fluka. $CaCl_2$-$2H_2O$, NaCl, horse radish peroxydase, Tris-EDTA buffer solution, dimethylsulfoxide (DMSO), $FeCl_3$-$6H_2O$ and ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid (EDDS) are from Sigma Aldrich. NaOH is from Merck and 4-hydroxyphenylacetic acid is from Alfa Aesar®.

2. Irradiation setup.

Lamps used are tropical terrarium bulb call Reptile UVB (13 W) from Exo Terra®. Actinic flux is measured with an optical fiber and a charge-coupled device (CDC) spectrophotometer (Ocean

Optics USD 2000 + UV-Vis). Lamp actinic flux is compared with sun actinic fluxes measured at the puy-de-Dôme station under cloudy or clear sky (Fig. 1).

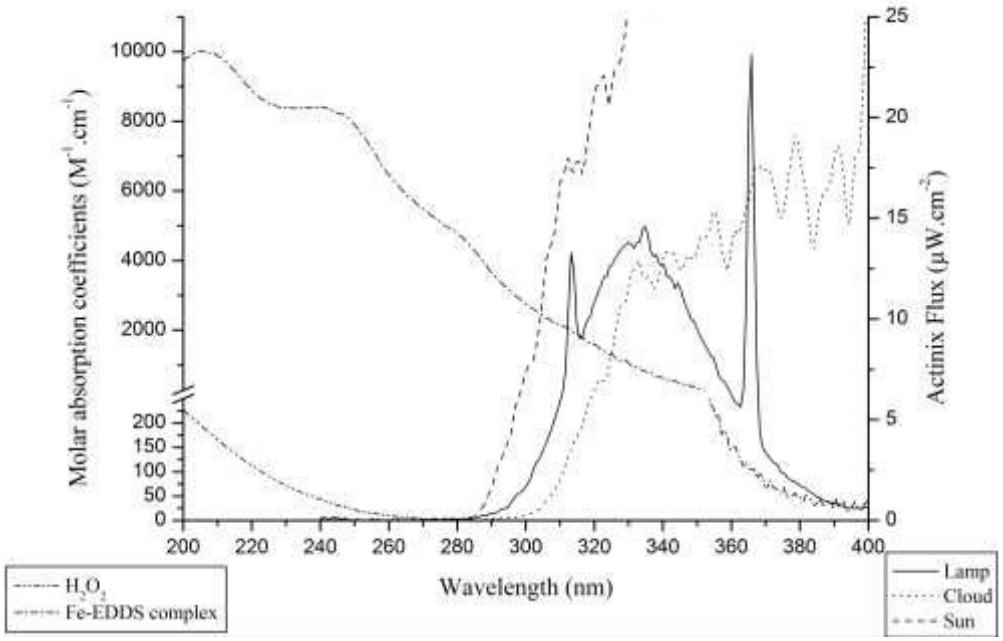


Fig. 1: **Comparison of actinic fluxes of lamps used and of sun under cloudy and sunny conditions at puy-de-Dôme station below 400 nm.** Full line represents lamp actinic flux, dotted line is cloudy condition actinic flux and dashed line is sunny condition actinic flux. Dotted line separated by a dash represents molar absorption coefficient, with one dot is the one of Fe-EDDS complex and two dots is the one of H_2O_2.

3. Artificial marine cloud media.

Artificial marine cloud media is composed of ten times higher concentrations than in natural cloud water of the following compounds in sterilized ultrapure water (Vaïtilingom *et al.*, 2011): acetic acid 2.0 x 10^{-4} M, formic acid 1.45 x 10^{-4} M, oxalic acid 3.0 x 10^{-5} M, succinic acid 1.5 x 10^{-5} M, $MgCl_2$-$6H_2O$ 1.0 x 10^{-4} M, $CaCl_2$-$2H_2O$ 4.0 x 10^{-4} M, K_2SO_4 5.0 x 10^{-5} M, NaCl 2.0 x 10^{-3} M, NO_3NH_4 8.0 x 10^{-4} M, NaOH 1.1 x 10^{-3} M and H_2SO_4 3.15 x 10^{-4} M. pH solution is adjusted near 6.1 corresponding to the average pH of cloud in marine conditions. The solution is sterilized with 0.22 µm PES filter (Polyethersulfone, diameter 28 mm, membrane of type 16532-k, Sartorius Stedium biotech, Germany) and kept in the dark at 17°C.

4. Sampling of natural atmospheric waters (clouds and rains).

Rain samples were collected in September 17th, October 28th and December 2nd, 2015 and on February 17th and September 15th, 2016 on OPGC (Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand) roof (435 m above sea level, 45°76’ North, 3°11’ East, France) with a homemade pluviometer, composed of sterilized Erlenmeyer (2 000 mL) and sterilized funnel. Cloud waters were collected on February 16th, April 1st, June 1st and 5th and July 2nd, 2016 at

the puy-de-Dôme station (1 465 m above the sea level, 45°46' North, 2°57' East, France) using sterilized cloud impactor as done by Amato *et al.* (2005).

Cloud and rain samples are kept in the dark and stored at 4°C before the experimentation. Chemical composition analyses performed on cloud and rain samples are the pH, total organic carbon (TOC), iron concentrations and ionic species concentrations. The pH is measured before and after experimentation with a pH meter MP 225 (Mettler Toledo). TOC analyses are performed on TOC 5050A analyzer (Shimatzu). Concentrations of Fe(II) and Fe(III) are quantified by spectrophotometric assays after complexation with ferrozine (colorimetric complexing agent) as it was described by M. Parazols *et al.* (2006) for cloud water analyses. Ionic species are quantified by ionic chromatography system with Dionex DX320 column for anions and Dionex ICS1500 column for cations. For microbiological characterization, cells are counted by flow cytometry. Cultured microorganisms are grown on R2A medium at 5 and 17°C. ATP is measured with BioThema© ATP Biomass kit HS.

Measurements of hydroxyl radical concentrations in atmospheric waters are performed under irradiation and with filtered or non-filtered samples. Waters are filtered just before filling the plate, thanks to Minisart® PES filter (pore size of 0.22 µm and filter diameter of 28 mm from Sartorius, Germany) under sterilized conditions.

5. Determination of steady state hydroxyl radical concentrations.

The detection of •OH radical is based on the following reaction with TA (Fig. 2):

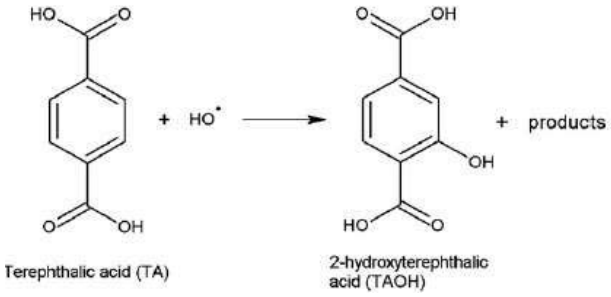


Fig. 2 : Reaction between TA and •OH.

Among the products formed 2-Hydroxyterephthalic acid (TAOH) is easily detected and quantified due to its strong fluorescence. The TAOH formation yield (γ_{TAOH}) is clearly described and evaluated as a function of temperature and pH by Charbouillot *et al.* (2011). In the same work the second order rate constant between TA and •OH is determined, $k_{TA} = 4.1 \pm 0.1 \times 10^9$ M^{-1} s^{-1}.

In order to obtain the real steady state concentration of •OH ($[^{\bullet}OH]_{ss}$), with natural organic matter present in cloud sample, the formation rate of •OH ($Rf_{\bullet OH}$) is necessary and can be calculated from TAOH formation rate (Rf_{TAOH} or $d[TAOH]/dt$) as follows:

$$Rf_{\bullet OH} = \frac{Rf_{TAOH}}{\gamma_{TAOH}} \quad (1) \text{ and as a consequence } \frac{\frac{d[TAOH]}{dt}}{\gamma_{TAOH}} = k_{TA}.[TA].[^{\bullet}OH]_{SS} \quad (2)$$

So the steady state hydroxyl radical concentration can be calculated as follows:

$$[^{\bullet}OH]_{SS} = \frac{\frac{d[TAOH]}{dt}}{\gamma_{TAOH}.k_{TA}.[TA]} \quad (3)$$

To determine this steady state concentration the linear part of the curve between Rf_{TAOH} and concentration of the probe TA is used. In fact, these conditions represent the non-saturated concentration of the probe in order to keep the impact of all the natural scavengers present in cloud aqueous phase. The equation of the linear part is then divided by the second rate constant between TA and •OH (k_{TA}) and by TAOH formation yield (γ_{TAOH}) as it is described in equation 3. These experimental conditions make possible the determination of the real steady state concentration by taking into account the impact of all the chemical compounds present in the environment. Moreover, the use of TA as probe and the formation of TAOH which is detected by fluorescence spectroscopy, allows to reach concentration of •OH in the order of tenth of femtomolar.

All the experimental and calculation details are presented in the supplementary data file (Diagram S1, Fig. S1, S2, S3). Note that DMSO is used in order to stop the generation of •OH occurring during the experiments through the light irradiation and/or different chemical processes. The addition of 5 µL of DMSO (1 mM) immediately after the sampling does not change the quantification of •OH (Fig. S4).

6. Hydrogen peroxide concentration measurement.

H_2O_2 concentrations are measured using an accurate enzymatic fluorimetric assay with a 4-hydroxy-phenylacetic acid that produced a fluorescent dimeric compound with hydrogen peroxide. This method is described in detail in the paper of Vaïtilingom *et al.* (2013).

7. Assessment of the probe non-toxicity.

To check the non-toxicity of TA to microorganisms the following procedure is carried out: The non-toxicity has been evaluated on *Pseudomonas graminis* 13b-3, DQ512786 isolated from

cloud water sampled at the puy de Dôme station. *Pseudomonas graminis* 13b-3 is incubated in R2A medium at 17°C and 130 rpm. After one day of incubation, 6 mL of the culture are centrifuged 3 min at 12 500 rpm. Cells pellets are washed with NaCl 0.8% and cloud artificial medium. Optical density (OD) is taken with a spectrophotometer (at $\lambda = 575$ nm) to obtain cells concentration equal to 10^6 cells/mL. Incubation is done in cloud artificial media with different concentrations of TA. At 0, 47 and 72 min of incubation, culture is done in R2A plate incubated at 17°C and ATP concentration is measured with an ATP Biomass kit HS, BioThema©.

RESULTS

1. [•OH]ss in marine artificial cloud waters as a function of H_2O_2 and iron concentrations.

The first experiments are carried out to evaluate the impact of two main photochemical sources (H_2O_2 and iron) responsible of the *in-situ* generation of •OH in artificial cloud water. These experiments are also conducted to validate our methodology presented in the experimental section. In fact, these two chemical compounds are responsible of the photochemical generation of •OH through their photolysis and Fenton or photo-Fenton processes like it is described by the following equations:

$$Fe^{3+} + h\nu + H_2O \rightarrow Fe^{2+} + {}^{\bullet}OH + H^+$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + OH^-$$
$$H_2O_2 + h\nu \rightarrow 2\ {}^{\bullet}OH$$

However, considering the average pH found in natural marine cloud water, pH = 6.1, Fe^{3+} is necessarily complexed to be present in water soluble forms. So, to stabilize and keep iron into soluble forms, in this artificial system, EDDS is used as a model complexing agent instead of EDTA which is toxic for the environment. Huang *et al.* (2012) demonstrated that the Fe(III)−EDDS 1:1 complex is stable in aqueous solution under neutral pH conditions and photochemically efficient. Fe(III)−EDDS complex is easily photolyzed and the quantum yields of •OH formation are high on a wide range of pHs (3−9). So the complex is easily photolyzed and it leads to a highest formation of •OH. Moreover, with H_2O_2, it can undergo the following reaction and then the Fenton reaction:

$$Fe(III)\text{-}EDDS + H_2O_2 \rightarrow Fe(II) + EDDS^{\bullet} + HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet -} + H^+$$

The chosen experimental conditions are as close as possible to those present in clouds at the puy de Dôme station: i) the lamps used mimic solar light measured directly in clouds (Fig. 1), ii) artificial cloud solution mimics cloud chemical composition from cloud samples classified as "marine" as defined by Deguillaume *et al.* (2014), iii) H_2O_2 and Fe(III) concentrations are within the range of those measured at that site.

The steady state hydroxyl radical concentrations are evaluated in artificial marine cloud water with 20 µM of H_2O_2 under irradiation and with different Fe(III)-EDDS concentrations, from 0 to 10 µM (Fig. 3).

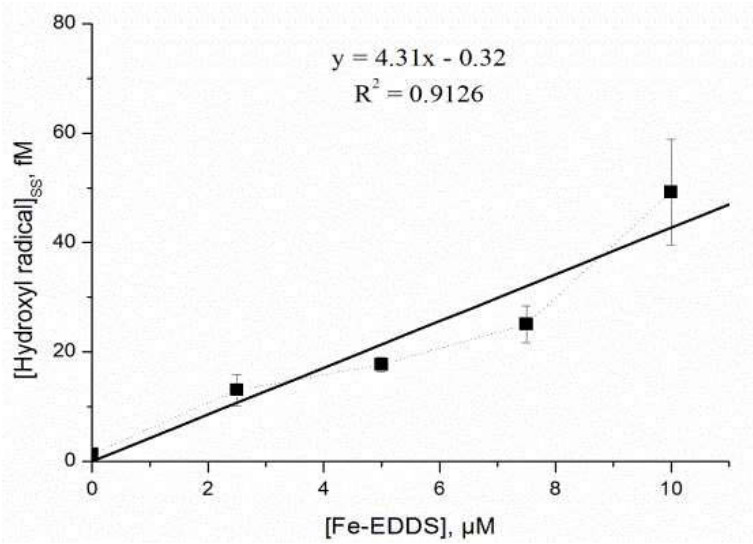


Fig. 3: [•OH]$_{SS}$ as a function of Fe-EDDS concentrations. Experiments are done in artificial marine cloud media with 20 µM of H_2O_2 under irradiation. Error bars represent standard deviation from the means (n = 3). Linear equation and correlation coefficient are indicated.

The steady state hydroxyl radical concentration increases linearly with the increase of Fe(III)-EDDS concentration to reach almost 50 fM with 10 µM of Fe(III)-EDDS. The increase is due to the increase of iron concentration which is one photochemical source of •OH and also of Fe(II) which is one of the compounds involved in the Fenton process. Without iron, the formation of •OH radicals is very low showing that the photolysis of H_2O_2 under our experimental condition is a negligible process due to the low absorption of H_2O_2 (Fig. 1).

The same experiment is performed with fixed concentration of Fe-EDDS (5 µM) and with increasing H_2O_2 concentrations (ranged from 0 to 200 µM) (Fig. 4).

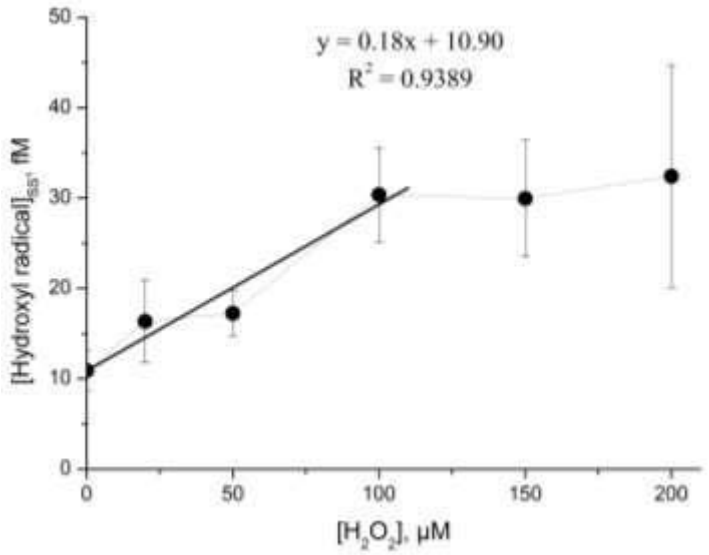


Fig. 4: [•OH]$_{SS}$ as a function of H_2O_2 concentrations (in artificial marine cloud media) under light and with 5 µM Fe-EDDS. Error bars represent standard deviation from the means (n = 3). Linear equation and correlation coefficient are indicated.

A linear increase is observed until 100 µM of H_2O_2 and then a plateau is reached with no more or negligible increase of hydroxyl radical steady state concentration. The constant value (around 30 fM) obtained when H_2O_2 increased from 100 to 200 µM shows that iron is a limiting parameter in such conditions and again that the photolysis of H_2O_2 is negligible. As a contrary of previous experiments (Fig. 3), without H_2O_2, hydroxyl radical are generated by the photolysis of Fe(III)-EDDS (around 10 fM).

A linear increase of the hydroxyl radical steady state concentration is observed when the two chemical compounds involved in the Fenton or photo-Fenton process increases independently. In a photo-Fenton system, linear correlation between sources and radical hydroxyl concentrations are well known. This observation is made in the papers of Lindsey and Tarr, (2000), Maezono *et al.* (2011) and Tokumura *et al.* (2011) with higher concentrations of sources (few mM of H_2O_2 and Fe(III) concentration ranging from 10 µM to 1 mM); probes used are acid benzoic or coumarin. The same observation is also obtained by Nakatani *et al.* (2007) with lower concentrations (0.5 µM H_2O_2 and 1 µM trioxalate ferrate) and benzene used as a probe. As we mention before in our experiment, increase of iron concentration influences more •OH steady state concentration than H_2O_2 increase. Maezono *et al.* (2011) show the same tendency with another probe, coumarin. Our results and the comparison with former results demonstrate that TA and our method are useful to quantified a very small [•OH]$_{SS}$ in a medium containing few organic compounds like atmospheric waters where photochemical reactions dominate during daytime (Arakaki and Faust, 1998).

2. Validation of the non-toxicity of terephthalic acid

In order to see the impact of microorganisms on hydroxyl radical concentration, it is crucial to check the non-toxicity of our probe. *Pseudomonas graminis* 13b-3 isolated in cloud water at the puy de Dôme station is chosen as a model strain because it is representative of the major genus present in clouds at that site (Vaïtilingom *et al.*, 2012) and because it is able to degrade H_2O_2 (Wirgot *et al.*, 2017). This strain is incubated at a concentration of $1.5 \pm 0.3 \times 10^6$ cells.mL^{-1} with 3 different probe concentrations (0, 4 and 10 µM) in artificial marine cloud medium. The evolutions of cell counts and of ATP concentrations as a function of time are presented in the following figure (Fig. 5).

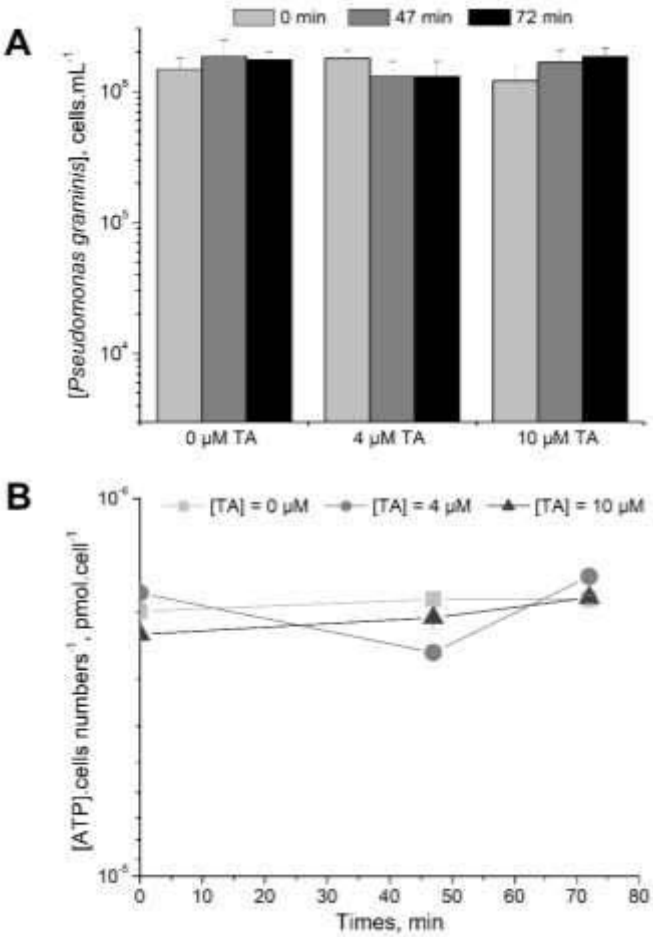


Fig. 5: Evolutions of the number of cells (A) and of the concentration of ATP (B) as a function of time (0, 47 and 72 minutes) in the presence of three probe concentrations (0, 4 and 10 µM).

Whatever the TA concentration, the number of bacteria remains within the same order of magnitude and so no impact of probe concentration is detectable. Similarly, no major change in ATP concentrations is observed with time under all the tested conditions, ranging from 1.6 to 2.6 x 10^{-6} pmol.cell^{-1} with a mean value of 2.0 x 10^{-6} pmol.cell^{-1}.

We can conclude that terephthalic acid does not impact *Pseudomonas graminis* viability and energy, showing that this probe can be used for measuring microorganism's impact on hydroxyl radical concentration.

3. Hydroxyl radical steady state concentration in atmospheric waters.

With this new method, $[^{\bullet}OH]_{ss}$ has been evaluated under irradiation (2 hours) in various natural atmospheric water, 5 rain waters and 5 cloud waters sampled in 2015 and 2016. Characterization of these atmospheric waters (including meteorological, physicochemical and biological parameters) and their retro-trajectories over 120 h are presented in supplementary data (Tables S1 and S2, Fig.S5 and S6 respectively).

During the two hours of irradiation the concentration of $^{\bullet}OH$ are evaluated at different sampling times. At the same time, hydrogen peroxide concentrations are followed and no decrease of the concentration is observed (data not shown). The steady state hydroxyl radical concentrations obtained in rain and cloud waters are shown in Fig. 6.The standard deviations for steady state concentration are calculated from the TAOH formation yield (γ_{TAOH}) variability obtained in Charbouillot *et al.* (2011).

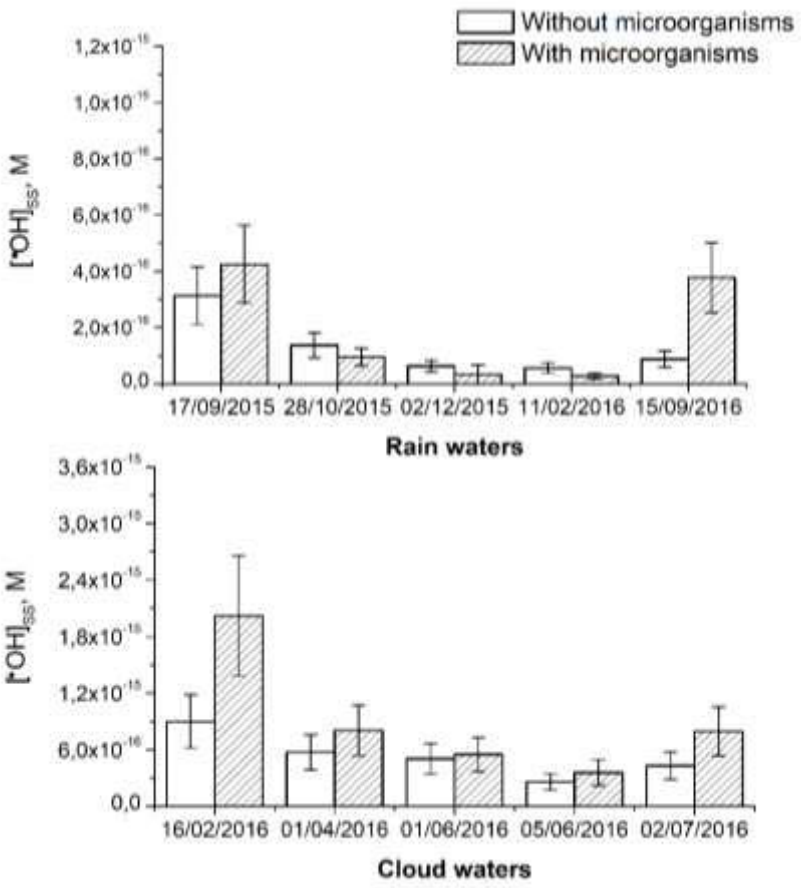


Fig. 6: Concentrations of hydroxyl radical at steady state in rain and cloud waters without (white histogram) and with microorganisms (dash histogram). Standard deviation is calculated thanks to TAOH formation yield variability (see supplementary data for more information).

Measured hydroxyl radical concentrations for atmospheric waters range from 2.8 x 10^{-17} M (in rain water) to 2.0 x 10^{-15} M (in cloud water). Steady state hydroxyl radical concentrations in cloud waters are more concentrated than in rain waters, with values in cloud water ranging from 2.6 x 10^{-16} to 2.0 x 10^{-15} M with a mean value of 7.2 ± 5.0 x 10^{-16} M and values in rain water ranging from 2.8 x 10^{-17} to 4.3 x 10^{-16} M with a mean value of 1.6 ± 1.5 x 10^{-16} M. So the concentration of $[^{\bullet}OH]_{ss}$ is more than four times higher in cloud waters than in rain waters. From our results, no major influence of the air mass origins of the studied clouds and rains could be detected on $[^{\bullet}OH]_{ss}$. However more samples should be analyzed to really conclude on this point.

After assessing the concentration of hydroxyl radicals in real atmospheric waters, the same experiments are performed with filtered waters in order to see if microorganisms can impact $[^{\bullet}OH]_{ss}$ (Fig. 6). Concentration of hydroxyl radicals without (filtered) or with (non-filtered) microorganisms in rain waters show similar results except for two samples where concentrations are higher with the presence of microorganisms (September 17th, 2015 and

September 15th, 2016). This observation is even more obvious with cloud waters. Systematically, the steady state concentrations of $^{\bullet}OH$ are higher with microorganisms than without microflora. However the difference is not significant when the standard deviations due to the uncertainty of γ_{TAOH} values are taken into account, so it can be considered that microorganisms have no significant impact on $[^{\bullet}OH]_{ss}$

DICUSSION AND CONCLUSION

For the first time a reliable method has been developed for the determination of steady state hydroxyl concentration in real atmospheric waters. Indeed, terephthalic acid (TA) used as a probe is non-toxic for microorganisms and therefore allows to work with natural sample and to study the impact of the microflora. Moreover, TA is soluble in water and not volatile so the experiments can be performed in aerobic conditions essential to work on natural sample which is not the case with other probes used before like benzene. Finally another positive aspect is due to the formation of fluorescent product (TAOH) to evaluate the concentration of $^{\bullet}OH$, it ensures that the technique is very sensitive with a limit of quantification near 10^{-17} M and that the measurement is easy to perform and fast. So, the use of TA as a very sensitive probe allows to evaluate the steady state concentrations considering the sinks naturally present in the sample contrarily to the evaluation of the hydroxyl radical formation rates obtained in many previous studies (Faust and Allen (1993) in cloud; Takeda *et al.* (2004) in river; Nakatani *et al.* (2007) in rain and river and Bianco *et al.* (2015) in cloud water). This result is thus important for atmospheric scientist as the steady state hydroxyl radical concentration is really a crucial parameter corresponding to the oxidant capacity of cloud water and more generally of the atmosphere.

In this study, the measured values of the steady state hydroxyl radical concentrations are within the range of few 10^{-16} M with a mean value found in cloud water of $7.2 \pm 5.0 \times 10^{-16}$ M, more than four times higher than those found in rain water $1.6 \pm 1.5 \times 10^{-16}$ M. This lower concentration in rain is not surprising as it is well known that the concentrations of chemical compounds are systematically higher in cloud than in rain waters, between 2 and 23 times (Lin and Peng, 1999), including the concentrations of photochemical sources of $^{\bullet}OH$.

The $[^{\bullet}OH]_{ss}$ found in cloud waters in the order 10^{-16} M are within the same range than those measured by Anastasio and McGregor (2001) in cloud waters (1 to 7 10^{-16} M) or in fog waters (3 to 7 10^{-16} M).

On the contrary, our values are much lower than most of the values estimated by atmospheric chemistry models. Depending on the scenarios (polluted, continental, marine) and the model used, the estimated $^{\bullet}OH$ concentrations vary from 2.10^{-12} M to $3.5.10^{-15}$ M (Deguillaume *et al.*, 2010; Herrmann *et al.*, 2010; Mouchel-Vallon *et al.*, 2017; Tilgner and Herrmann, 2010; Tilgner *et al.*, 2013). Only a few cases give values of 10^{-15} M which are close to the highest concentrations that we found in cloud waters. So the models used seem to overestimate the hydroxyl radical concentration as it was previously mentioned by Arakaki *et al.* (2013). The differences between our results and the estimated value from models can come i) from the underestimation of scavengers especially the role of organic matter that is the major sink of $^{\bullet}OH$ (Arakaki *et al.*, 2013) and/or ii) from the uncertainty about the $^{\bullet}OH$ gas transfer in aqueous phase.

Moreover, thanks to this new method we have shown that the endogenous microflora has no significant impact on the steady state hydroxyl radical concentrations. First microorganisms could be a sink of $^{\bullet}OH$ radicals as any other organic matter present in clouds; however this quenching effect is suspected to be negligible as microorganisms represent a low fraction of the total organic carbon (evaluated to 1.7% by Bauer *et al.*, 2002). Second, microorganisms could trap $^{\bullet}OH$ radicals by an active process involving their oxidative stress metabolism as we know that it is active in clouds (Vaïtilingom *et al.*, 2013). On the contrary they could produce $^{\bullet}OH$ radicals by a passive mechanism. Indeed Samake *et al.* (2017) have recently reported that dead microorganisms used as bioaerosol models (bacteria and fungi) can produce ROS, although the method used does not allow to identify the type of radicals formed. Finally our results can be interpreted in two ways: i) the production or quenching of $^{\bullet}OH$ is too low due to the low concentration of microorganisms in clouds thus no change in $[^{\bullet}OH]_{ss}$ can be measured; ii) the rates of production and consumption of $^{\bullet}OH$ by microorganisms are not negligible but within the same range of order and thus the resulting $[^{\bullet}OH]_{ss}$ remains constant.

In conclusion, the method proposed in this paper allows to evaluate steady state hydroxyl radical concentrations at very low concentration (down to 10^{-17} M), it is quick and biocompatible. It is a new tool for the evaluation of atmospheric water oxidant capacity and represents thus a real breakthrough for atmospheric sciences**.** It should be applied now to measure a great number of samples at different sites. It is important to emphasize the necessity to obtain accurate values of $^{\bullet}OH$ concentrations at the steady state as there are used in atmospheric models to evaluate the fate of the organic matter in clouds and thus their

composition, their evolution and lifetime. As clouds play a major role in the climate, any uncertainty in cloud processes will have a significant impact on the climate predictions.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was funded by the french ANR program BIOCAP.

BIBLIOGRAPHY

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

Amato, P., Demeer, F., Melaouhi, A., Fontanella, S., Martin-Biesse, A.-S., Sancelme, M., Laj, P., and Delort, A.-M. (2007b). A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: Their biotransformation by micro-organisms. Atmospheric Chemistry and Physics *7*, 4159–4169.

Anastasio, C., and McGregor, K.G. (2001). Chemistry of fog waters in California's Central Valley: 1. In situ photoformation of hydroxyl radical and singlet molecular oxygen. Atmospheric Environment *35*, 1079–1089.

Arakaki, T., and Faust, B.C. (1998). Sources, sinks, and mechanisms of hydroxyl radical ('OH) photoproduction and consumption in authentic acidic continental cloud waters from Whiteface Mountain, New York: The role of the Fe(r) (r = II, III) photochemical cycle. Journal of Geophysical Research *103*, 3487–3504.

Arakaki, T., Anastasio, C., Kuroki, Y., Nakajima, H., Okada, K., Kotani, Y., Handa, D., Azechi, S., Kimura, T., Tsuhako, A., *et al.* (2013). A general scavenging rate constant for reaction of hydroxyl radical with organic carbon in atmospheric waters. Environmental Science & Technology *47*, 8196–8203.

Ariya, P.A., Nepotchatykh, O., Ignatova, O., and Amyot, M. (2002). Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. Geophysical Research Letters *29*, 34-1-34–4.

Bauer, H., Kasper-Giebl, A., Löflund, M., Giebl, H., Hitzenberger, R., Zibuschka, F., and 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.

Bianco, A., Passananti, M., Perroux, H., Voyard, G., Mouchel-Vallon, C., Chaumerliac, N., Mailhot, G., Deguillaume, L., and Brigante, M. (2015). A better understanding of hydroxyl radical photochemical sources in cloud waters collected at the puy de Dôme station – experimental versus modelled formation rates. Atmospheric Chemistry and Physics *15*, 9191–9202.

Bianco, A., Voyard, G., Deguillaume, L., Mailhot, G., and Brigante, M. (2016). Improving the characterization of dissolved organic carbon in cloud water: Amino acids and their impact on the oxidant capacity. Scientific Reports *6*.

Blough, N.V., and Zepp, R.G. (1995). Reactive oxygen species in natural waters. In Active Oxygen in Chemistry, C. S. Foote, J. Valentine, A. Greenberg and J. F. Liebman (Springer), pp. 280–330.

Chameides, W.K., and Davis, D.D. (1982). The free radical chemistry of cloud droplets and its impact upon the composition of rain. Journal of Geophysical Research *87*, 4863–4877.

Charbouillot, T., Brigante, M., Mailhot, G., Maddigapu, P.R., Minero, C., and Vione, D. (2011). Performance and selectivity of the terephthalic acid probe for OH as a function of temperature, pH and composition of atmospherically relevant aqueous media. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry *222*, 70–76.

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

Deguillaume, L., Leriche, M., and Chaumerliac, N. (2005). Impact of radical versus non-radical pathway in the Fenton chemistry on the iron redox cycle in clouds. Chemosphere *60*, 718–724.

Deguillaume, L., Desboeufs, K.V., Leriche, M., Long, Y., and Chaumerliac, N. (2010). Effect of iron dissolution on cloud chemistry: From laboratory measurements to model results. Atmospheric Pollution Research *1*, 220–228.

Deguillaume, L., Charbouillot, T., Joly, M., Vaïtilingom, M., Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Delort, A.-M., Vinatier, V., Flossmann, A., *et al.* (2014). Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) based on 10 yr of monitoring of their physicochemical properties. Atmospheric Chemistry and Physics *14*, 1485–1506.

Faust, B.C. (1994). Photochemistry of clouds, fogs, and aerosols. Environmental Science & Technology *28* (5), 217A–222A.

Faust, B.C., and Allen, J.M. (1993). Aqueous-phase photochemical formation of hydroxyl radical in authentic cloudwaters and fogwaters. Environmental Science & Technology *27*, 1221–1224.

Faust, B.C., and Hoigné, J. (1990). Photolysis of Fe (III)-hydroxy complexes as sources of OH radicals in clouds, fog and rain. Atmospheric Environment. Part A. General Topics *24*, 79–89.

Faust, B.C., and Zepp, R.G. (1993). Photochemistry of aqueous iron (III)-polycarboxylate complexes: roles in the chemistry of atmospheric and surface waters. Environmental Science & Technology *27*, 2517–2522.

Fishbein, L. (1984). An overview of environmental and toxicological aspects of aromatic hydrocarbons. I. Benzene. Science of the Total Environment *40*, 189–218.

Glatt, H., Padykula, R., Berchtold, G.A., Ludewig, G., Platt, K.L., Klein, J., and Oesch, F. (1989). Multiple activation pathways of benzene leading to products with varying genotoxic characteristics. Environmental Health Perspectives *82*, 81–89.

Herckes, P., Valsaraj, K.T., and Collett, J.L. (2013). A review of observations of organic matter in fogs and clouds: Origin, processing and fate. Atmospheric Research *132*, 434–449.

Herrmann, H., Ervens, B., Jacobi, H.-W., Wolke, R., Nowacki, P., and Zellner, R. (2000). CAPRAM2.3: A chemical aqueous phase radical mechanism for tropospheric chemistry. Journal of Atmospheric Chemistry *36*, 231–284.

Herrmann, H., Hoffmann, D., Schaefer, T., Bräuer, P., and Tilgner, A. (2010). Tropospheric aqueous-phase free-radical chemistry: Radical sources, spectra, reaction kinetics and prediction tools. ChemPhysChem *11*, 3796–3822.

Huang, W., Brigante, M., Wu, F., Hanna, K., and Mailhot, G. (2012). Development of a new homogenous photo-Fenton process using Fe(III)-EDDS complexes. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry *239*, 17–23.

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.

Joly, M., Amato, P., Sancelme, M., Vinatier, V., Abrantes, M., Deguillaume, L., and Delort, A.-M. (2015). Survival of microbial isolates from clouds toward simulated atmospheric stress factors. Atmospheric Environment *117*, 92–98.

Lelieveld, J., and Crutzen, P.J. (1991). The role of clouds in tropospheric photochemistry. Journal of Atmospheric Chemistry *12*, 229–267.

Lin, N.-H., and Peng, C.-M. (1999). Estimates of the contribution of below-cloud scavenging to the pollutant loadings of rain in Taipei, Taiwan. Terrestrial, Atmospheric and Oceanic Sciences *10*, 693–704.

Lindsey, M.E., and Tarr, M.A. (2000). Quantitation of hydroxyl radical during Fenton oxidation following a single addition of iron and peroxide. Chemosphere *41*, 409–417.

Maezono, T., Tokumura, M., Sekine, M., and Kawase, Y. (2011). Hydroxyl radical concentration profile in photo-Fenton oxidation process: Generation and consumption of hydroxyl radicals during the discoloration of azo-dye Orange II. Chemosphere *82*, 1422–1430.

Mauldin III, R.L., Madronich, S., Flocke, S.J., and Eisele, F.L. (1997). New insights on OH: Measurements around and in clouds. Geophysical Research Letters *24*, 3033–3036.

Mouchel-Vallon, C., Deguillaume, L., Monod, A., Perroux, H., Rose, C., Ghigo, G., Long, Y., Leriche, M., Aumont, B., and Patryl, L. (2017). CLEPS 1.0: A new protocol for cloud aqueous phase oxidation of VOC mechanisms. Geoscientific Model Development *10*, 1339–1362.

Nakatani, N., Ueda, M., Shindo, H., Takeda, K., and Sakugawa, H. (2007). Contribution of the photo-Fenton reaction to hydroxyl radical formation rates in river and rain water samples. Analytical Sciences *23*, 1137–1142.

Nunes-Halldorson, V. da S., Steiner, R.L., and Smith, G.B. (2004). Residual toxicity after biodegradation: Interactions among benzene, toluene, and chloroform. Ecotoxicology and Environmental Safety *57*, 162–167.

Samake, A., Uzu, G., Martins, J.M.F., Calas, A., Vince, E., Parat, S., and Jaffrezo, J.L. (2017). The unexpected role of bioaerosols in the Oxidative Potential of PM. Scientific Reports *7*.

Schwartz, S.E. (2003). Cloud chemistry. In Handbook of Weather, Climate and Water, (Wiley-Intersclence), pp. 331–345.

Takeda, K., Takedoi, H., Yamaji, S., Ohta, K., and Sakugawa, H. (2004). Determination of hydroxyl radical photoproduction rates in natural waters. Analytical Sciences *20*, 153–158.

Tilgner, A., and Herrmann, H. (2010). Radical-driven carbonyl-to-acid conversion and acid degradation in tropospheric aqueous systems studied by CAPRAM. Atmospheric Environment *44*, 5415–5422.

Tilgner, A., Bräuer, P., Wolke, R., and Herrmann, H. (2013). Modelling multiphase chemistry in deliquescent aerosols and clouds using CAPRAM3.0i. Journal of Atmospheric Chemistry *70*, 221–256.

Tokumura, M., Morito, R., Hatayama, R., and Kawase, Y. (2011). Iron redox cycling in hydroxyl radical generation during the photo-Fenton oxidative degradation: Dynamic change of hydroxyl radical concentration. Applied Catalysis B: Environmental *106*, 565–576.

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

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

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

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

Weschler, C.J., Mandich, M.L., and Graedel, T.E. (1986). Speciation, photosensitivity and reactions of transition metal ions in atmospheric droplets. Journal of Geophysical Research *91*, 5189–5204.

Wirgot, N., Vinatier, V., Deguillaume, L., Sancelme, M., and Delort, A.-M. (2017). H_2O_2 modulates the energetic metabolism of the cloud microbiome. Atmospheric Chemistry and Physics Discussions 2017, 1–20.

Yu, X.-Y., and Barker, J.R. (2003). Hydrogen peroxide photolysis in acidic aqueous solutions containing chloride ions. I. Chemical mechanism. The Journal of Physical Chemistry A *107*, 1313–1324.

Zafiriou, O.C., and Bonneau, R. (1987). Wavelength-dependent quantum yield of OH radical formation from photolysis of nitrite ion in water. Photochemistry and Photobiology *45*, 723–727.

Zellner, R., EXNER, M., and HERRMANN, H. (1990). Absolute OH quantum yields in the laser photolysis of nitrate, nitrite and dissolved H_20_2 at 308 and 351 nm in the temperature. Atmospheric Chemistry *10*, 411–425.

Zepp, R.G., Hoigne, J., and Bader, H. (1987). Nitrate-induced photooxidation of trace organic chemicals in water. Environmental Science & Technology *21*, 443–450.

Supplementary data

MEASUREMENT OF STEADY STATE HYDROXYL RADICAL CONCENTRATIONS IN ATMOSPHERIC WATERS

A. Lallement[1], V. Vinatier[1], B. Marcello[1], L. Deguillaume[2], A. M. Delort[1*] and G. Mailhot[1*]

[1] Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France
[2] Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire de Météorologie Physique, 63000 Clermont-Ferrand, France

**Corresponding author: A-marie.Delort@uca.fr; gilles.mailhot@uca.fr*

Determination of steady state hydroxyl radical concentrations [•OH]ss.

Methodology is presented using an example in cloud artificial medium with light and H_2O_2.

To prepare the mother solution of TA, three milligrams of terephthalic acid are diluted in NaOH 50 mM and ultrapure water at pH 5.7. The solution concentration is calculated by spectrophotometry with a Cary series UV-Vis spectrophotometer (Agilent Technologies) (with λ = 243 nm and ε = 11 900 $M^{-1}.cm^{-1}$).

Then, 300 µL of medium are placed in each of the 25 wells of a 96-well Teflon plate with a multichannel pipette. Hydrogen peroxide is added in each well with a multichannel pipette just before the experimentation due to its high reactivity. After filling the plate with all the chemical compounds, terephthalic acid is added with a micropipette in each well as a function of desired concentrations. The following diagram explains the methodology used:

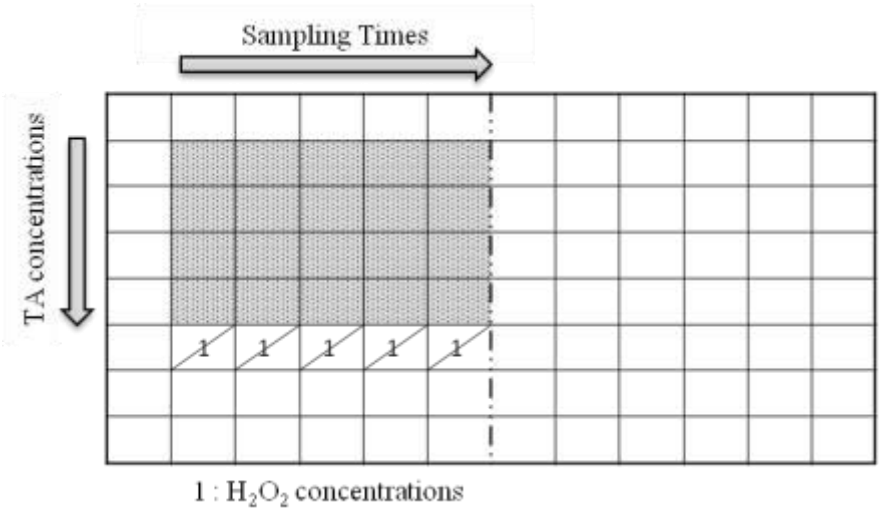


Diagram S1: 96-well plate model. The plate is filled with increasing TA concentrations (0, 4, 6 and 8 µM). The TA concentration increases vertically and the sampling time increases horizontally on the scheme of the plate. The last line is kept without TA (the same than the first one) but is used to measure the H_2O_2 concentration at each time of incubation.

During the experiment, the 96-well plate is irradiated and incubated at 17°C and 300 rpm in HLC system (DITABIS®). At each sampling time, 200 µL of samples from the same column are transferred with a multichannel pipette to another 96-well plate. Immediately after, 5 µL of DMSO (1×10^{-3} M) are added in each well with a multichannel pipette in order to stop the formation of TAOH. This plate is stored under dark conditions at room temperature. At the end of the incubation, absorbance is read by a plate reader Saphire™, Tecan (with $\lambda_{emission}$ = 320 nm, $\lambda_{excitation}$ = 430 nm and gain = 120).

So, TAOH fluorescence is measured during 2 hours of irradiation/incubation, with direct fluorescence acquired every 30 minutes. In the same irradiation/incubation, 4 concentrations of TA probe are tested in order to measure the TAOH formation rate as a function of the probe concentrations (Fig. S1).

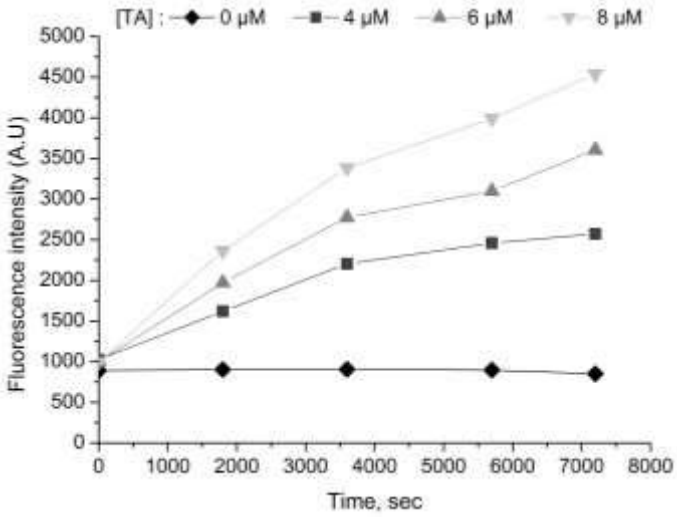


Fig. S1: Fluorescence of hydroxyterephthalic acid (TAOH) at different sampling times for 4 terephthalic acid (TA) concentrations under irradiation in marine artificial cloud media with 20 µM of H_2O_2 and light during 2 hours. Terephthalic acid concentrations: 0 µM (black diamond), 4 µM (black square), 6 µM (grey triangle) 8 µM (light grey triangle).

The linear part of the plot is used to calculate the formation rate of TAOH (Rf_{TAOH}) (Fig. S2).

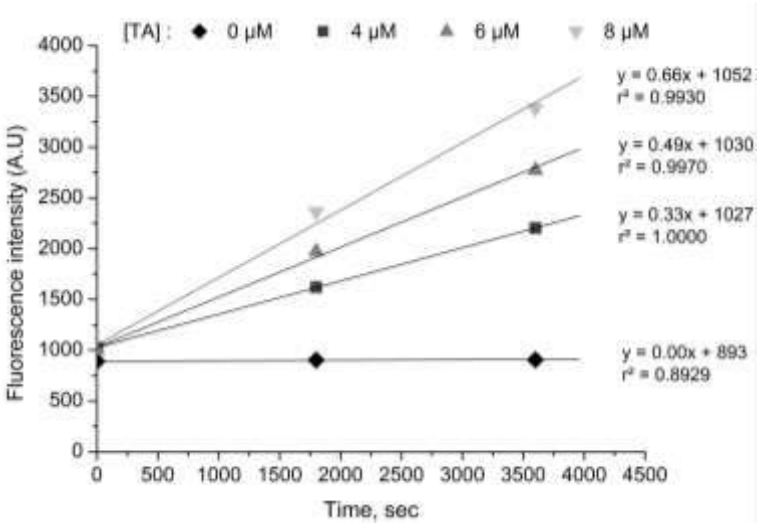


Fig. S2: Fluorescence intensity measured as a function of time in experiments performed in marine artificial cloud media with 20 µM H_2O_2 and light.

The formation rates of TAOH (Rf_{TAOH}) (deduced from Fig.S2) are plotted as a function of TA concentrations (Fig. S3).

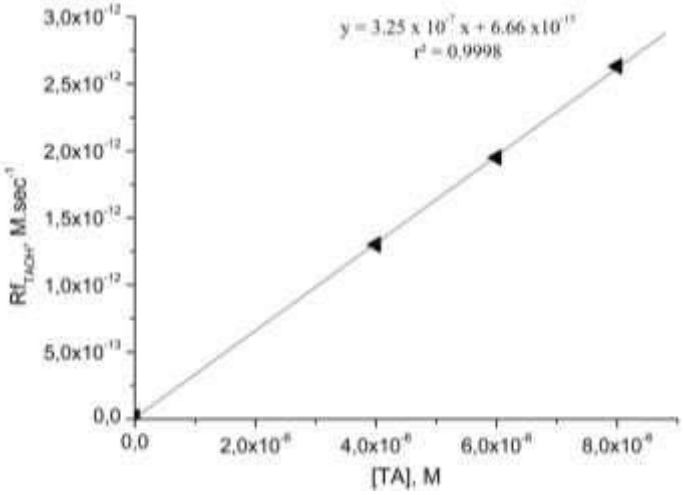


Fig. S3: Formation rates of hydroxyterephthalic acid (Rf_{TAOH}) for each concentration of TA. Linear equation and correlation coefficient are indicated.

Steady state concentration of hydroxyl radicals $[^{\bullet}OH]_{ss}$ is calculated from the slope calculated in the figure S3 giving the rate of formation of TAOH as a function of the concentration in TA (Rf_{TAOH}/[TA]). This slope is then divided by the second order rate constant between TA and $^{\bullet}OH$ (k_{TA}) and TAOH formation yield (γ_{TAOH}); equation (1) ($Rf_{TAOH} = d[TAOH]/dt$).

$$\left[{}^{\bullet}OH\right]_{SS} = \frac{\frac{d\left[TAOH\right]}{dt}}{\gamma_{TAOH}.k_{TA}.\left[TA\right]} \quad (1)$$

This experimental method, optimized as a function of different TA concentrations, allows to measure $[^{\bullet}OH]_{SS}$ in the range of 10^{-17} M.

Determination of steady state hydroxyl radical standard deviation for rain and cloud waters.

Standard deviation for cloud and rain waters are calculated taking into account the variation of TAOH formation yield according to the pH; variation with temperature was negligible since it is strictly controlled under our experimental conditions. This uncertainty was more important than the standard deviation of the slope between formation rates of TAOH and TA concentrations (in Fig. S3).

We calculated hydroxyl radical concentrations considering the standard deviation of the yield thanks to the following equation (Charbouillot *et al.*, 2011):

$$\gamma_{\mathrm{TAOH}} = \left(0.0248 \pm 0.0059 \times \mathrm{pH}\right) + 0.046 \pm 0.035 \quad (2)$$

Hydroxyl concentration increased due to the standard deviation of the yield (equation 2) was calculated thanks to equation (1) and the difference between the concentrations obtained with and without this increase allowed us to obtain the standard deviation of hydroxyl radical concentration in our environmental samples.

Utilization of DMSO for [•OH]ss measurement.

DMSO is used in order to stop the generation of •OH, constantly generated in the experiments through the light irradiation and/or different chemical processes. Due to the very short sampling time (less than 2 minutes with high concentration of iron and/or H_2O_2), it was important to stop the reaction immediately after the sampling to facilitate the experimentation. The same experiment was performed without and with addition of 5 µL of DMSO (1 mM) immediately after the sampling. In the experiment without DMSO, TAOH fluorescence was measured just after the sampling time. In the experiment with addition of DMSO, all the samples were analysed at the end and simultaneously. No significant difference was noticed for the rates of TAOH formation calculated under these two conditions (Fig. S4)

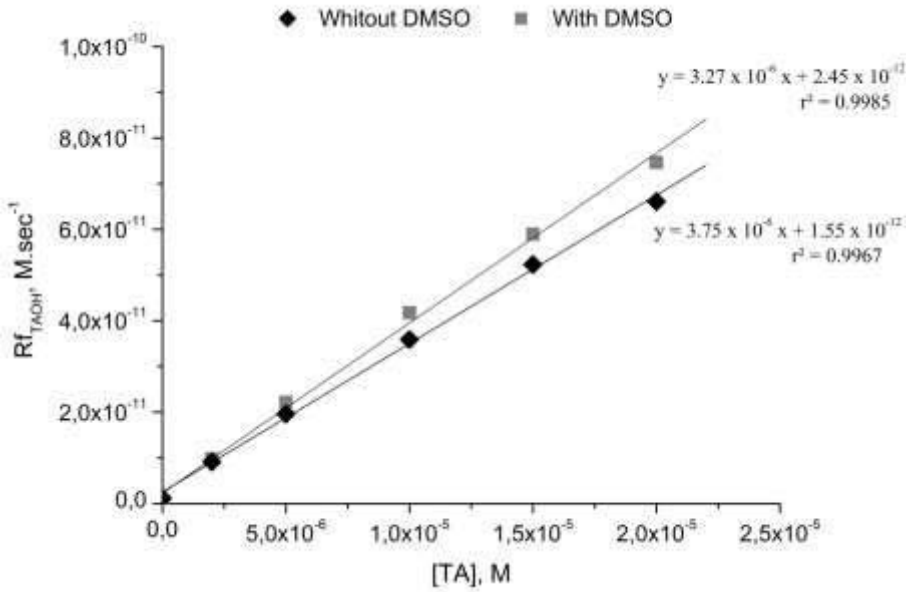


Fig. S4: Formation rates of hydroxyterephthalic acid evaluated for each probe concentration without or with addition of 5 µL DMSO (1 mM) immediately after the sampling. These experiments were performed with light in marine artificial cloud media containing 20 µM of H_2O_2 and 5 µM of Fe-EDDS. Values without DMSO (black diamond) were measured just after the sampling while experiments with addition of DMSO (grey square) were kept in the dark at room temperature until the end of the experimentation.

These results show that DMSO is able to stop the reaction between •OH and TA and is not interfering with fluorescence acquisition. So, for all the experimentation, DMSO is further used in all the experimentations.

Retro-trajectories of air masses of rain and cloud waters analyzed.

Fig. S5 and Fig. S6 present retro-trajectories of air masses of rain and cloud waters collected respectively. All retro-trajectories backward are for 120 hours and come from the National Oceanic and Atmospheric Administration Hysplit model.

Fig. S5: Rain retro-trajectories: pink line September 17th 2015, blue line October 28th 2015, green line December 2nd 2015, yellow line February 17th 2016 and red line September 15th 2016.

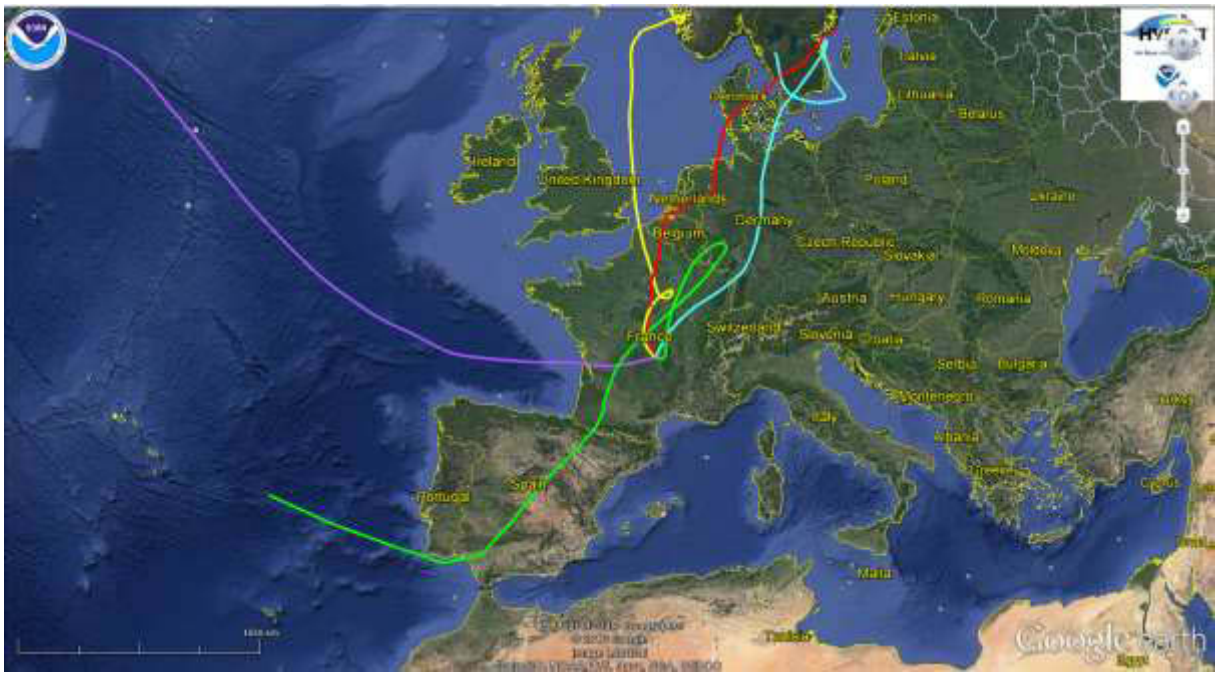


Fig. S6: Cloud retro-trajectories: blue line February 16th 2016, green line April 1st 2016, yellow line June 1st 2016 cloud, red line June 5th 2016 and purple line July 2nd 2016.

Atmospheric waters characterization.

Parameters given in the following tables were obtained for waters collected just before the experimentation. pHs were measured just before the determination of hydroxyl radical concentration.

Table S1: Atmospheric rain waters characterization. Meteorological parameter ranges were obtained from Cézeaux station of OPGC (**http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/mesures/cez.php**). n.a = not available ; n.v = not enough volume of sample ; b.d.l = below detection limit.

Date		17/09/2015	28/10/2015	02/12/2015	11/02/2016	15/09/2016
pH		**5.3**	**5.0**	**6.3**	**5.9**	**5.9**
Temperature	°C	14 to 18	14 to 11	10 to 2	1 to 6	17 to 14
Liquid Water Content	$g.m^{-3}$					
Effective radius of droplets	µm					
Relative humidity	%	80 to 95	70 to 91	57 to 83	55 to 92	100 to 70
Precipitation rate	$mm.h^{-1}$	2.5 to 19	2.4 to 9.5	n.a	2.5	5 to 17
Direction	$°.N^{-1}$	150 to 250	variable	150 to 200	variable	variable
Wind speed	$m.s^{-1}$	2 to 4	0.2 to 5	0.1 to 2.5	0.2 to 3.5	1 to 1.5
Pressure	hPa	950 to 956	961 to 962	983 to 980	957.5 to 960	962 to 964
Acetate	µM	7.85	n.v	3.84	5.42	15.14
Formate		3.50		1.68	1.98	5.13
Succinate		1.3		0.43	0.71	2.41
Malonate		1.48		2.18	1.06	2.13
Oxalate		1.79		0.51	0.87	b.d.l
Cl^-		5.20		5.06	29.54	2.90
NO_3^-		11.23		11.21	8.37	13.42
SO_4^{2-}		4.78		5.54	5.14	8.32
Na^+		13.17		1.02	51.96	8.57
NH_4^+		17.13		4.85	21.49	25.29
K^+		11.43		0.05	1.11	1.64
Mg^{2+}		1.53		0.18	5.88	1.78
Ca^{2+}		5.94		0.42	9.63	9.39
TIC	µM	**86.33**	**n.v**	**36.97**	**143.16**	**96.12**
TOC	$mgC.L^{-1}$	**3.47**	**n.v**	**25.94**	**127.9**	**0.90**
Iron Total	µM	**0.59**	**n.v**	**0.49**	**1.34**	**0.27**
Fe(II)		0.51	n.v	b.d.l	0.39	0.24
Fe(III)		0.08	n.v	0.49	0.95	0.02
H_2O_2		**7.97**	**b.d.l**	**17.03**	**2.53**	**10.28**
CMF	cells/mL	**5.18×10^4**	**2.15×10^3**	**1.86×10^4**	**4.61×10^4**	**2.65×10^4**
ATP	pmol/mL	**0.09**	**n.v**	**0. 32**	**0.33**	**0.04**

Table S2: Atmospheric cloud waters characterization. Meteorological parameters were obtained from puy-de-Dôme station of OPGC (**http://wwwobs.univ-bpclermont.fr/SO/mesures/pdd.php**). n.a = not available ; b.d.l = below detection limit.

Date		16/02/2016	01/04/2016	01/06/2016	05/06/2016	02/07/2016
pH		**3.9**	**6.2**	**5.7**	**6.8**	**5.5**
Temperature	°C	-7.5 to -5.5	-1 to -1.5	4.5 to 7.5	9 to 7	12 to 6
Liquid Water Content	$g.m^{-3}$	n.a	0.25 to 0.45	0.10 to 0.20	0 to 0.45	0 to 0.40
Effective raduis of droplets	µm	n.a	7 to 8	8 to 12	0 to 7	0 to 12
Relative humidity	%	94 to 95.5	99 to 99.5	100	majority at 100	100
Précipitation rate	$mm.h^{-1}$					
Direction	$°.N^{-1}$	variable	variable	majority at 275	variable	250 to 280
Wind speed	$m.s^{-1}$	3 to 7	1	17 to 1	4 to 1	16 to 5
Pressure	hPa	858 to 858.5	near 852	852 to 854.3	853 to 857	856 to 859.5
Acetate	µM	2.81	5.70	2.10	18.82	23.76
Formate		4.78	2.83	10.49	7.41	10.08
Succinate		b.d.l	1.87	b.d.l	7.22	4.15
Malonate		b.d.l	0.51	b.d.l	2.16	3.16
Oxalate		1.44	0.66	0.93	1.66	2.61
Cl^-		8.08	20.76	6.00	35.17	5.66
NO_3^-		224.07	137.91	20.85	63.65	27.20
SO_4^{2-}		27.01	18.53	3.94	25.43	23.68
Na^+		7.14	47.89	13.38	98.10	12.45
NH_4^+		113.55	98.16	6.24	76.73	67.05
K^+		2.11	1.49	11.55	36.54	1.31
Mg^{2+}		3.07	1.36	3.29	38.81	2.97
Ca^{2+}		25.11	7.65	12.74	61.84	9.37
TIC	µM	**419.17**	**345.32**	**91.51**	**473.54**	**193.45**
TOC	$mgC.L^{-1}$	**7.05**	**12.96**	**3.72**	**3.95**	**5.79**
Iron Total	µM	**0.83**	**1.06**	**0.26**	**0.40**	**0.30**
Fe(II)		0.18	0.03	0.26	0.40	0.30
Fe(III)		0.65	1.03	b.d.l	b.d.l	b.d.l
H_2O_2		**5.90**	**5.31**	**9.14**	**30.25**	**32.39**
CMF	cells/mL	**7.85×10^4**	**4.18×10^4**	**1.28×10^5**	**8.68×10^4**	**1.82×10^5**
ATP	pmol/mL	**0.11**	**0.11**	**2.12**	**1.02**	**0.21**

II. Conclusions et Perspectives

L'objectif de ce travail était de mettre au point une méthode pour quantifier la concentration en radicaux hydroxyles à l'état stationnaire dans les eaux atmosphériques. Cette méthode devait aussi permettre d'estimer l'impact des microorganismes sur cette concentration.

Pour atteindre ces objectifs, plusieurs freins technologiques ont dû être levés :

- Dans un premier temps, vu la réactivité des radicaux hydroxyles, la méthode devait être rapide et sensible afin de permettre de mesurer les concentrations faibles attendues. Pour cela, nous avons utilisé une sonde fluorescente et miniaturisé la technique afin que toutes les conditions puissent être analysées en même temps.
- Aucune interférence ne devait avoir lieu après l'expérience afin d'éviter des biais sur les mesures. Pour conserver un produit de réaction stable, le DMSO a été utilisé.
- Enfin, cette méthode devait être biocompatible ainsi la non toxicité de l'acide téréphtalique a été vérifiée.

Afin de valider cette méthode, nous avons mesuré les concentrations en radical hydroxyle à l'état stationnaire dans un milieu synthétique sous irradiation, la composition chimique est similaire à une eau de nuage de type marin et la lampe utilisée mime le spectre solaire, où les concentrations en H_2O_2 et en fer (sous forme de complexe avec l'EDDS) sont contrôlées. Nous avons pu montrer que la concentration en radical hydroxyle augmente de façon linéaire avec la concentration en fer pour un taux fixe de H_2O_2 alors que cette concentration en fonction de l'augmentation du peroxyde d'hydrogène est limitée par la concentration en fer. Dans ces conditions, il est possible de mesurer des concentrations de l'ordre de 10^{-17} M ce qui démontre la grande sensibilité de la méthode.

Une fois la méthode validée, il a été possible de mesurer la concentration en radical hydroxyle à l'état stationnaire dans 5 échantillons d'eaux de pluies et 5 échantillons d'eaux de nuages. Afin de voir l'impact des microorganismes, deux types d'analyses pour mesurer les concentrations en radicaux hydroxyles ont été faites en parallèle : la première est faite dans l'eau filtrée (donc ne comprenant pas les microorganismes) et l'autre est mesurée dans l'eau non filtrée (gardant la microflore native de ces eaux). Dans les eaux de pluies, la concentration en radical hydroxyle va de $0,28 \pm 0,19$ à $4,3 \pm 2,9 \times 10^{-16}$ M alors que dans les nuages cette

concentration est plus importante : 2,6 ± 1,7 à 20 ± 14 x 10^{-16} M. La concentration de ce radical est plus faible dans la pluie ce qui est cohérent avec le phénomène de dilution ; en effet les concentrations des composés présents dans les pluies sont 2 à 23 fois plus faibles que celles mesurées dans les nuages. Les concentrations en radical hydroxyle obtenues dans les nuages sont homogènes, quelle que soit l'origine de la masse d'air. De plus, aucune différence significative n'est constatée entre les concentrations obtenues pour les nuages qu'ils soient filtrés ou non.

Notre méthode est similaire à celle d'Anastasio et McGregor sur de nombreux points : l'utilisation d'une sonde, la quantification du produit de réaction entre la sonde et le radical hydroxyle et les calculs mis en place. En revanche, nous utilisons des concentrations en sonde beaucoup plus faibles, notre sonde n'est pas toxique et permet ainsi de mesurer l'impact des microorganismes sur la concentration en radical hydroxyle. De plus, notre temps d'analyse est très court et la miniaturisation et l'utilisation d'une plaque 96 puits nous permettent de mesurer toutes les conditions expérimentales en même temps. L'inconvénient principal de notre méthode est l'incertitude sur le rendement de réaction entre l'acide téréphtalique et le radical hydroxyle. Les écart-types de la concentration en radicaux hydroxyles dans les échantillons analysés sont donc plus importants que ceux obtenus par Anastasio et McGregor. Malgré ces différences, les concentrations en radicaux hydroxyles mesurées dans nos nuages sont du même ordre de grandeur que celles obtenues dans leur publication (10^{-16} M). Les concentrations en radical hydroxyle obtenues par les modèles de chimie atmosphérique sont donc bien surestimées. Cette surestimation est d'autant plus importante selon le type de nuage modélisé, si elle n'est que d'un facteur 10 ou 100 pour les nuages continentaux (dans le modèle CLEPS et CAPRAM 3.0i respectivement ; Herrmann *et al.*, 2010; Mouchel-Vallon *et al.*, 2017), elle devient très importante dans les simulations mimant un nuage de type marin (un facteur 10 000 est présent pour le modèle CAPRAM 3.0i). Les concentrations obtenues ici ne reflètent qu'un petit nombre d'échantillons de nuage. L'ordre de grandeur de la concentration de ce radical est principalement de 10^{-16} M dans les eaux atmosphériques. Enfin pour confirmer ou infirmer l'influence du type de masse d'air sur la concentration en radical hydroxyle, il serait nécessaire de mesurer cette concentration dans beaucoup plus d'échantillons.

La présence de microorganismes n'influence pas ou très peu la concentration en radical hydroxyle. Dans tous les cas, aucune diminution visible de cette concentration n'est constatée. Un piégeage passif de ceux-ci n'était pas attendu puisqu'ils ne représentent que peu de matière

organique (environ 1,7% du carbone organique total). En revanche, un mécanisme actif impliquant la voie du stress oxydant aurait pu permettre une diminution de cette concentration. Ce mécanisme ne se met pas en place ici, nous pouvons émettre l'hypothèse que la concentration en radical hydroxyle est trop faible et ne nécessite pas l'activation de cette voie métabolique. Les microorganismes peuvent également produire des ROS, une étude sur trois bactéries et des spores provenant de 4 champignons différents a été publiée récemment par Samake *et al.*, 2017. Dans cette publication, les auteurs montrent que les microorganismes testés sont capables d'influencer la capacité oxydante, selon l'espèce et la concentration en souches. Les spores de champignons produisent plus de ROS que les bactéries, ce phénomène de production serait lié à un mécanisme passif. La production est importante pour 10^4 à 10^5 cellules.mL^{-1} mais elle devient négligeable pour des concentrations en cellules inférieures à 10^3 cellules.mL^{-1}. Dans notre étude, ces mécanismes de production n'ont pas été constatés. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées : i) les ROS formées dans leur publication ne sont pas des radicaux hydroxyles, ii) la formation de radical hydroxyle est trop faible pour être mesurée ou encore iii) la production et le piège des radicaux hydroxyles sont tous les deux actifs et de même ordre de grandeur ne permettant pas de voir un impact des microorganismes sur la concentration en radical hydroxyle à l'état stationnaire.

En conclusion, une méthode pour doser les radicaux hydroxyles à l'état stationnaire a été mise au point. Elle est biocompatible, facile à réaliser, rapide et très sensible. La quantification de ce radical dans les eaux atmosphériques est possible. Les concentrations stationnaires obtenues dans l'eau de nuage sont de l'ordre de 10^{-16} M. Pour aller plus loin, il serait intéressant de :

- Mesurer la concentration en radical hydroxyle dans d'autres eaux de nuages collectées au puy de Dôme mais également sur d'autres sites de collectes comme au Great Dun Fell en Angleterre, au Mont Schmücke en Allemagne, au Mont Thaï en Chine, *etc*.
- Approfondir l'étude des radicaux oxygénés dans la phase aqueuse du nuage. Il serait notamment intéressant de quantifier le radical anion superoxyde dans l'eau de nuage et de voir si les microorganismes ont un impact sur la concentration de ce radical. Pour se faire, un dosage non dommageable pour les microorganismes et sensible doit être mis au point. Dans un premier temps, des bactéries modèles pourraient être utilisées dans un milieu contrôlé pour voir si certains microorganismes sont

susceptibles d'influencer la concentration de ce radical. Si cette hypothèse est avérée alors une analyse en parallèle sur de l'eau de nuage filtrée et non filtrée pourrait être entreprise.

Partie 2 : Les composés aromatiques dans l'eau de nuage

I. Identification des composés aromatiques dans les eaux atmosphériques par GC-MS

Les composés organiques sont encore peu connus dans la phase aqueuse du nuage. Les plus étudiés et complètement caractérisés sont les acides carboxyliques, les acides aminés et les carbonyles de faibles poids moléculaires. Plusieurs autres molécules sont suspectées mais non caractérisées, c'est le cas de molécules complexes comme les substances humiques (HULIS). Parmi les molécules organiques, les composés aromatiques ont été peu étudiés dans la phase aqueuse et ces études remontent pour la plupart aux années 2000. Les molécules aromatiques sont émises dans l'atmosphère par des sources biogéniques ou anthropogéniques et sont principalement dégradées par leur forte réactivité avec les radicaux hydroxyles. Elles ne sont pas analysées en routine dans l'eau de nuage collectée au puy de Dôme, ainsi l'objectif de cette partie est de caractériser les composés aromatiques présents dans différents échantillons de nuages et de pluies par GC-MS. Ce travail est le résultat d'une collaboration avec un laboratoire et une société : l'université Lomonosov de Moscou, particulièrement A. Lebedev et O. Polyakova, a permis l'analyse et l'interprétation des spectres et la société LECO Corporation aux États-Unis, notamment V. Artaev, a mis à disposition leurs matériels analytiques de très haute performance.

Le travail présenté ici est ciblé sur les composés aromatiques simples. La caractérisation des échantillons d'eaux de nuage a fait l'objet d'une publication en cours de rédaction : « CHARACTERIZATION OF ATMOSPHERIC POLLUTANTS IN CLOUD WATERS BY GC-GC/MS », A. T. Lebedev, O. V. Polyakova, D. M. Mazur, V. B. Artaev, A. Lallement, M. Vaïtilingom, L. Deguillaume, I. Canet and A. M. Delort. Une centaine de composés organiques semi volatils ont été identifiés, 90% d'entre eux sont des composés oxygénés et douze d'entre eux sont inscrits sur la liste de l'EPA (United States Environmental Protection Agency). Ces composés appartiennent aux groupes des phénols et des di-alkyl phtalates qui ont une importante source d'origine anthropogénique. Parmi tous les composés identifiés ou partiellement identifiés, aucun halogène n'a été détecté. Pourtant beaucoup de ces composés sont émis dans l'atmosphère, il est possible que la chimie radicalaire conduise à une déhalogénation rapide de ces composés.

I. 1. Matériel et Méthodes

I. 1. 1) Préparation des eaux atmosphériques

Les pluies du 15/09/2016 et 25/10/2016 ont été récoltées sur le campus universitaire des Cézeaux sur le toit de l'OPGC (coordonnées GPS : 45,761307 ; 3,110317) dans un pluviomètre constitué d'un Erlenmeyer et d'un entonnoir stérilisés. Cinq nuages ont été prélevés au sommet du puy de Dôme. Le système de collecte est présenté en annexe. Trois des nuages ont été récoltés en 2016 (16/02/2016, 21/10/2016 et 26/10/2016) alors que les deux autres sont plus anciens : 05/11/2013 et 27/06/2014. La composition chimique et microbiologique de ces eaux atmosphériques a été analysée. Pour cela, tout d'abord le pH a été mesuré avec un pH mètre MP 225 (Mettler Toledo). La concentration en espèces ioniques est quantifiée par chromatographie ionique en utilisant pour les anions une colonne Dionex DX320 et pour les cations une colonne Dionex ICS1500. La concentration en matière organique est analysée par un appareil TOC 5050A (Shimatzu). La concentration en fer est mesurée par spectrophotométrie après complexation avec la ferrozine (méthode de Parazols *et al.*, 2007) et le peroxyde d'hydrogène est mesuré par fluorimétrie grâce à l'enzyme HRP (Horseradish peroxidase) (Vaïtilingom *et al.*, 2013). Le nombre de microorganismes est obtenu par cytométrie en flux et la concentration en ATP est mesurée grâce au kit ATP Biomass HS de BioThema©.

Une fois récoltés, ces échantillons sont filtrés stérilement, trois rinçages à l'eau ultra-pure des filtres et des tubes Falcons sont réalisés au préalable. Les deux échantillons de pluies et les échantillons de nuages récoltés ont été filtrés sur un filtre PES 0,22 µm (Polyethersulfone, 28 mm de diamètre, membrane de type 16532-k, Sartorius Stedium biotech, Allemagne). Après cette filtration, les échantillons ont été congelés.

I. 1. 2) Incubation de l'eau de nuage récoltée le 21 octobre 2016

L'eau de nuage récoltée le 21/10/2016 a été divisée en deux parties de 10 mL chacune. La première partie a été filtrée et congelée, comme expliqué précédemment, dès l'arrivée au laboratoire. La deuxième a été gardée intacte et incubée stérilement à l'obscurité, à 130 rpm et 17°C. Après 24 heures d'incubation, celle-ci a été filtrée et congelée avec le même mode opératoire que la première.

I. 1. 3) Extraction des composés organiques

Avant d'extraire les composés, la verrerie a été lavée au préalable en utilisant une solution de piranha composée de 6 mL d'acide sulfurique concentré et de 2 mL de peroxyde d'hydrogène à 30%. Après avoir laissé reposer durant une nuit, la verrerie a été lavée 3 fois à l'eau ultra-pure et 2 fois au dichlorométhane.

Une fois décongelées, les eaux atmosphériques sont acidifiées à pH 2 avec de l'acide sulfurique (9 M) et les composés organiques sont extraits trois fois avec du dichlorométhane (15,6 M) avec un rapport de 10% (1 mL de dichlorométhane dans 9 mL d'eau atmosphérique). La phase aqueuse est ensuite ajustée à pH 11 avec du NaOH 10 M et est extraite à nouveau avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont réunies, puis séchées grâce à du $MgSO_4$ anhydre et concentrées sous pression réduite jusqu'à atteindre 1 mL. Ces échantillons sont ensuite conservés à 4°C avant d'être envoyés et analysés.

Entre chaque extraction, la verrerie est lavée au dichlorométhane et à l'eau ultra-pure pour éviter les contaminations entre échantillons. Un blanc dichlorométhane pur est également réalisé.

I. 1. 4) Analyse en GC-MS

L'analyse des échantillons est effectuée à Saint Joseph aux États-Unis par LECO Corporation sur un spectromètre de masse haute résolution à temps de vol Pegasus® GC-HRT en mode IE (logiciel ChromaTOF-HRT). L'identification des composés est réalisée en utilisant le temps de rétention et la précision massique. Un standard interne est utilisé : le naphtalène D8.

I. 2. Caractérisation des eaux atmosphériques

Dans un premier temps, les paramètres météorologiques, physico-chimiques et biologiques, mesurés habituellement pour tous les nuages récoltés au puy de Dôme, ont été mesurés (Tableau 19).

Tableau 19 : Caractérisation des eaux atmosphériques. n.a indique que les paramètres n'ont pas été mesurés. < l.d signifie que la concentration est inférieure à la limite de détection.

	Pluies		Nuages				
Date	15/09/16	25/10/16	05/11/13	27/06/14	16/02/16	21/10/16	26/10/16
Paramètres météorologiques							
Température (°C)	14	11 à 13	6	8,4	-6	2	10 à 4
Pression (hPa)	964 à 970	968 à 972	842,8	856	858	853	862-864
Humidité (%)	60 à 90	98 à 70	100	100	94,5	100	100
Vitesse du vent ($m.s^{-1}$)	0,5 à 2	0,5 à 4	16,2	8 à 5	5	1,8	6 à 1
Direction du vent (°/N)	variable	variable	283,8	265 à 270	variable	variable	variable
Taux de précipitation ($mm.h^{-1}$)	47,0	2,5 à 28					
Taille des gouttes ($cm^2.m^{-3}$)			814,1	2000 à 0	n.a	900 à 0	500
Contenu en eau liquide ($g.m^{-3}$)			0,4	0,4 à 0	n.a	0,4 à 0	0,4
Origine	N	S	O	O	N-E	N-O/N	NO/N
Type de nuage			Marin	Continental	Continental	Marin	Marin
Paramètres physico-chimiques							
pH	5,9	n.a	5,5	5,2	5,6	n.a	6,1
Concentrations ($\mu mol.L^{-1}$)							
SO_4^{2-}	8,3	4,8	7,7	44,7	27,0	4,5	11,5
NO_3^-	13,4	10,4	4,8	55,8	224,1	10,4	56,7
Cl^-	2,9	2,9	16,4	2,1	8,1	2,9	7,3
Acide acétique	15,1	6,3	11,6		2,8	6,3	26,7
Acide formique	5,1	1,8	17,4		4,8	1,8	8,8
Acide oxalique	< l.d	0,7	1,6	n.a	1,4	< l.d	2,5
Acide succinique	2,4	0,5	3,2		< l.d	0,5	3,3
Acide malonique	2,1	2,0	0,0		< l.d	2,0	2,6
Na^+	8,6	5,9	5,6	44,1	7,1	5,9	13,9
NH_4^+	25,3	22,6	16,7	180,0	113,6	22,6	82,0
Mg^{2+}	1,8	1,2	< l.d	< l.d	3,1	1,2	3,7
K^+	1,6	0,5	26,1	< l.d	2,1	0,5	3,2
Ca^{2+}	9,4	8,0	< l.d	< l.d	25,1	8,0	9,6
Fer total	0,3	0,2	n.a	n.a	1,0	0,3	0,3
Fe (II)	0,2	0,2			1,0	0,3	0,3
H_2O_2	9,3	6,0	8,0	< l.d	1,2	50,4	29,5

		Pluies		Nuages				
	Date	15/09/16	25/10/16	05/11/13	27/06/14	16/02/16	21/10/16	26/1016
Paramètres physico-chimiques (suite)								
Carbone ($mg.L^{-1}$)	TOC	0,9	2,3	1,1	n.a	n.a	n.a	7,3
	TC	1,5	3,0	1,8			9,2	8,0
	IC	0,6	0,6	0,7			n.a	0,7
Paramètres biologiques								
Microorganismes totaux ($cells.mL^{-1}$)		$2,7x10^4$	$1,3x10^4$	n.a	$2,1x10^4$	$7,9x10^4$	$1,7x10^3$	$3,6x10^4$
Concentration en ATP ($pmol.mL^{-1}$)		0,04	0,11	n.a	n.a	0,11	0,34	6,38

I. 3. Identification des composés aromatiques

Après avoir caractérisé ces eaux atmosphériques, les composés aromatiques présents dans celles-ci ont été analysés par GC-MS. Les molécules aromatiques simples mises en évidence sont indiquées dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Les composés aromatiques dans les eaux atmosphériques. La présence des composés est indiquée par le symbole suivant ●.

Type	Pluies		Nuages				
Dates / Noms	15/09/16	25/10/16	05/11/13	27/06/14	16/02/16	21/10/16	26/10/16
Phénol	●	●	●	●	●	●	●
Nitrophénol				●	●		
Acide phénylacétique		●					
Benzène-1,2-dicarboxyaldéhyde		●				●	●
Acide benzoïque		●					
Benzaldéhyde	●					●	●
4-hydroxybenzaldéhyde						●	
4-méthylbenzaldéhyde	●					●	●
Alcool benzylique		●	●	●	●	●	●
2-phényléthanol		●				●	●
Acétophénone	●	●				●	●

Onze molécules aromatiques sont retrouvées dans les échantillons. Le benzène n'a pas été identifié mais certains de ses dérivés sont présents. Les aromatiques simples peuvent être catégorisés en 6 classes : le phénol et son dérivé nitré, les dérivés du benzène, l'acide benzoïque, le benzaldéhyde et ses dérivés, les alcools et l'acétophénone. Deux composés, l'acide benzoïque et l'acide phénylacétique, ne sont retrouvés que dans les eaux de pluie alors que le 4-hydroxybenzaldéhyde est présent uniquement dans le nuage du 21/10/2016. Ainsi certains composés semblent spécifiques à une eau atmosphérique alors que d'autres sont plus ubiquistes : c'est le cas du phénol (retrouvé dans les 8 eaux atmosphériques) et de l'alcool benzylique (retrouvé 7 fois sur 8). Certains nuages présentent peu de composés aromatiques (les 3 premiers) alors qu'on note 2 fois plus de composés dans les deux derniers.

Le schéma réactionnel reliant tous ces composés est difficile à proposer. Certains intermédiaires sont manquants, de plus les sources de ces composés n'ont pas pu être identifiées. Cependant, on peut dire que la plupart des molécules citées ici sont des dérivés des BTX (Benzène, Toluène et Xylène). En effet, il est très probable qu'une grande partie du phénol provienne de la réactivité du benzène alors que l'acide benzoïque peut être le résultat de la

dégradation du toluène. Le trop faible nombre d'échantillons analysés ne nous permet pas d'aller plus loin dans l'identification de schémas réactionnels.

La réactivité au sein de la phase aqueuse du nuage est certainement très complexe et donc difficile à représenter. Cependant, afin d'aller plus loin dans l'évolution des composés organiques dans la phase aqueuse d'un nuage, l'eau de nuage du 21/10/2016 a été divisée en deux parties. La première a été fixée directement permettant ainsi d'obtenir les concentrations au temps initial. L'autre partie a été incubée stérilement pendant 24 heures au noir à 17°C et sous agitation, l'échantillon n'ayant pas été filtré la microflore du nuage est présente. Suite à cette incubation, il a été filtré et les deux temps d'incubations ont été analysés en parallèle.

Tableau 21 : Evolution des composés aromatiques présents dans le nuage du 21/10/2016. Incubé au noir, sous agitation et à 17°C. Les concentrations sont en $\mu g.L^{-1}$.

Temps d'incubation, h / Noms	0	24
Phénol	0,21	0,01
Benzaldéhyde	0,75	0,04
Alcool benzylique	0,4	0
Acétophénone	1,8	0,06
4-méthylbenzaldéhyde	0,41	0
2-phényléthanol	0,69	0
Benzène-1,2-dicarboxyaldéhyde	0,24	0,09

Avant incubation, le composé le plus concentré est l'acétophénone, suivi du benzaldéhyde et du 2-phényléthanol. Leurs concentrations sont supérieures à 0,6 $\mu g.L^{-1}$. Après incubation, la concentration de tous les composés a diminué et certains ont été totalement dégradés. En effet, sur 7 composés seuls 4 sont retrouvés dans l'eau de nuage après 24 heures d'incubation. Le benzène-1,2-dicarboxyaldéhyde est le plus difficilement dégradable (une perte de 63% de la concentration est visible) alors que l'acétophénone, le benzaldéhyde et le phénol présentent un pourcentage de dégradation supérieur à 90% (97%, 95% et 95% respectivement).

Ces dégradations peuvent être dues aux radicaux hydroxyles. En effet, au noir en présence de Fe(II) et de peroxyde d'hydrogène, la réaction de Fenton peut avoir lieu et permettre la dégradation des aromatiques. Cependant, les concentrations en fer et en H_2O_2 dans le nuage ne sont pas comparables à celles utilisées dans les publications traitant de la réaction de Fenton comme celle de Chen and Pignatello, en 1997 ([Fer total] = 0,15 µM *vs* 0,05 mM, [H_2O_2] = 50 µM *vs* 4 mM). Les radicaux nitrates peuvent aussi prendre part à cette dégradation. En effet, ils

sont à même de réagir avec les composés aromatiques par le biais d'un transfert d'électron ou d'un arrachement d'hydrogène selon le composé (Herrmann, 2003).

En plus de ces dégradations abiotiques, des dégradations biotiques peuvent avoir lieu. En effet, les microorganismes présents dans l'eau de nuage sont à même de dégrader des composés carbonés simples comme l'acétate, le formate, le malonate et le succinate (Vaïtilingom *et al.*, 2013). Parmi les composés présents, au moins 7 sont connus pour être dégradables par les microorganismes et sont référencés dans KEGG. Ils impliquent plusieurs voies de dégradation, une simplification de ces voies est présentée dans la Figure 43.

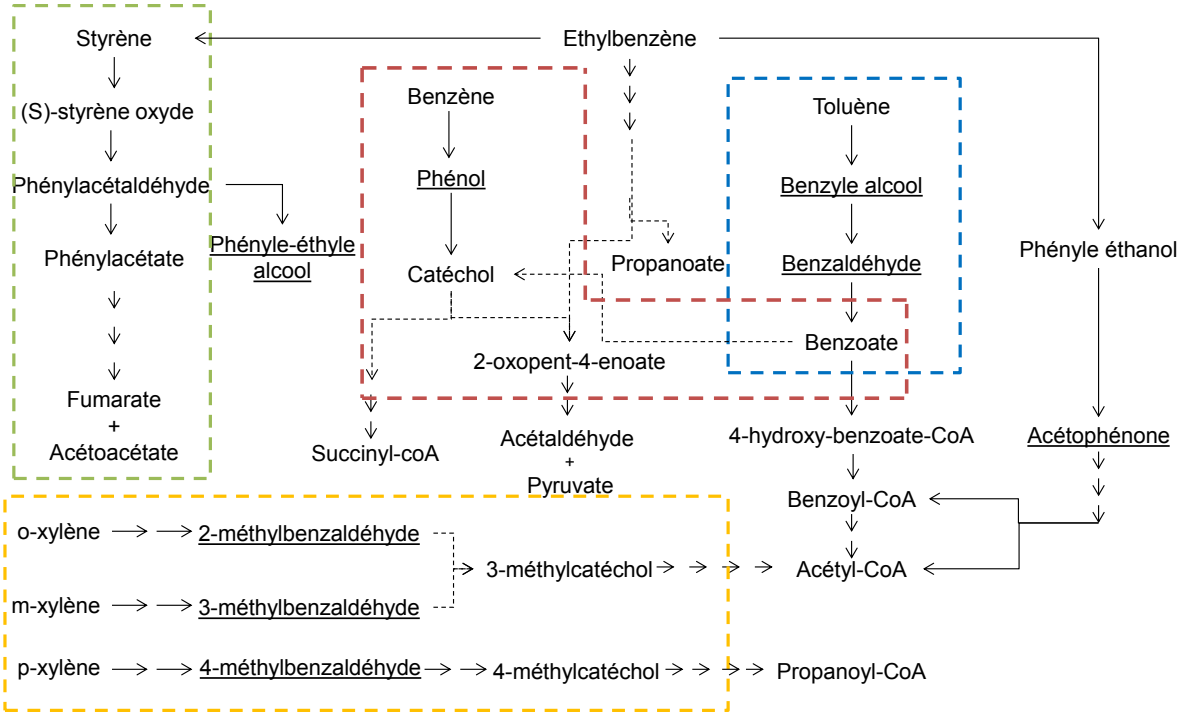


Figure 43 : Voies métaboliques potentiellement impliquées dans la dégradation des composés aromatiques mis en évidence dans l'eau de nuage. Les composés aromatiques retrouvés sont soulignés. En jaune est représentée une simplification de la voie des xylènes, en vert celle du styrène, en rouge celle du benzoate et en bleu celle du toluène. Le propanoate, le propanoyl-CoA et l'acétoacétate rejoignent le métabolisme du propanoate alors que le succinyl-CoA, l'acétaldéhyde, le pyruvate, acétyl-CoA et le fumarate rejoignent le métabolisme central (notamment la glycolyse et le cycle du citrate). Une flèche pleine représente une étape alors que plusieurs flèches ou une flèche en pointillée indiquent plusieurs étapes intermédiaires (d'après la base de donnée KEGG).

I. 4. Conclusion

Nous avons caractérisé certains composés organiques semi-volatils présents dans la phase aqueuse du nuage. L'analyse par GC-MS de ces eaux a permis d'identifier une centaine de composés. Ces composés sont surtout des composés oxygénés (91%), aucun composé halogéné n'a été retrouvé. Parmi eux, douze sont caractérisés comme polluants et font l'objet d'une réglementation par l'United States Environmental Protection Agency (EPA). Ils sont réunis en deux groupes : les phtalates et les phénols. Par la suite, nous nous sommes donc concentrés sur les onze composés aromatiques simples caractérisés dans les eaux atmosphériques dont le phénol, le nitrophénol, l'acide benzoïque, le benzaldéhyde et l'acétophénone. Certains semblent spécifiques d'un type d'eaux atmosphériques alors que d'autres sont présents dans tous les échantillons analysés. Une dégradation de ces composés a été constatée après une incubation à l'obscurité pendant 24 heures à 17°C. Elle peut être réalisée par les radicaux (hydroxyles ou nitrates) mais également par les microorganismes.

Ainsi les microorganismes pourraient jouer un rôle dans la dégradation des composés aromatiques. Pour vérifier cette hypothèse, une étude plus complète ciblée sur le potentiel de biodégradation du phénol par les microorganismes présents dans les eaux athmosphériques a été faite car ce composé est omniprésent dans nos échantillons et est considéré comme toxique.

II. Biodégradation potentielle du phénol par les microorganismes du nuage

La présence de phénol a été mise en évidence dans tous les échantillons d'eaux atmosphériques analysés (Chapitre I) à une concentration de l'ordre du $\mu g.L^{-1}$. Pour étudier l'impact des microorganismes sur ce composé, deux approches ont été menées.

La première permet de cibler les gènes actifs impliqués dans la voie de dégradation du phénol *in situ* dans l'eau de nuage. Pour cela, une analyse bioinformatique de trois métatranscriptomes d'eau de nuage a été réalisée. Ces métatranscriptomes ont été obtenus suite à la collecte d'un nuage du 17 novembre 2014, échantillonné pendant 15 heures. Après extraction et enrichissement des ARNm procaryotes et séquençage, 4 bases de données ont été créées. Elles regroupent les séquences génétiques, disponibles dans NCBI (National Center for Biotechnology Information), des enzymes intervenant dans la dégradation du phénol en catéchol (phénol hydroxylase ou phénol monooxygénase), dans celle du catéchol (la catéchol-1,2-dioxygénase débutant la voie intradiol et la catéchol-2,3-dioxygénase initiant la voie extradiol) et des enzymes putatives impliquées dans la dégradation du phénol. Après avoir créé ces bases de données qui regroupent 281 séquences génétiques, un blastn est effectué permettant de rechercher les séquences similaires entre les bases de données et les métatranscriptomes nuageux.

La deuxième approche est une approche culturale. Un screening de la dégradation du phénol par les bactéries isolées d'eaux de nuage a été mené. 145 souches ont été testées, elles regroupent les genres *Pseudomonas*, *Rhodococcus* et 2 souches issues de la famille des Moraxellaceae. Après 5 jours d'incubation à l'obscurité et à 17°C en condition aérobie, le pourcentage de dégradation a été calculé pour chaque souche. Pour pouvoir refléter la capacité de dégradation réelle du phénol dans l'eau de nuage tout en permettant le dosage du phénol, le ratio entre le nombre de cellule et la concentration en phénol est gardé.

Ces deux approches permettent d'une part de mettre en évidence la présence de gènes induits impliqués dans la dégradation du phénol au sein de la phase aqueuse du nuage et, d'autre part d'estimer la capacité et le temps de dégradation du phénol en conditions de laboratoire. Elles sont complémentaires (culturales et non-culturales) et permettent ainsi d'étudier la capacité de ces microorganismes à dégrader le phénol présent dans les nuages.

Cette partie de thèse a été le sujet de trois communications orales (2 nationales et une internationale) :

- A. Lallement, L. Besaury, P. Amato, E. Tixier, M. Sancelme, V. Vinatier, A. M. Delort et G. Mailhot. « **Les microorganismes au service de la dépollution des nuages, le cas du phénol : de la génomique au métabolisme** ». Séminaire ICCF, Clermont-Ferrand, 21/03/2017.

- A. Lallement, L. Besaury, E. Tixier, M. Sancelme, P. Amato, V. Vinatier, O. Polyakova, V. Artaev, A. Lebedev, I. Canet, G. Mailhot and A. M. Delort. « **Le potentiel de biodégradation du phénol par les microorganismes du nuage** ». Journée scientifique de l'axe Chimie et Environnement de l'ICCF, Besse en Chandesse, 04 au 05/05/2017

- A. Lallement, L. Besaury, E. Tixier, M. Sancelme, P. Amato, V. Vinatier, O. Polyakova, V. Artaev, A. Lebedev, I. Canet, G. Mailhot and A. M. Delort. « **Potential for phenol degradation by cloud microorganisms** ». Congrès ATMOspheric CHEMical and BIOlogical processes: interactions and impacts (ATMOCHEMBIO), Clermont-Ferrand, France, 19 au 21/06/2017.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme de publication : « POTENTIAL FOR PHENOL BIODEGRADATION IN CLOUD WATERS ». A. Lallement, L. Besaury, E. Tixier, M. Sancelme, P. Amato, V. Vinatier, I. Canet, O. Polyakova, V. Artaev, A. Lebedev, L. Deguillaume, G. Mailhot and A. M. Delort. Elle sera soumise au journal Frontiers in Microbiology.

II. 1. Potential for phenol biodegradation in cloud waters

POTENTIAL FOR PHENOL BIODEGRADATION IN CLOUD WATERS

Audrey LALLEMENT[1], Ludovic BESAURY[1], Elise TIXIER[1], Martine SANCELME[1], Pierre AMATO[1], Virginie VINATIER[1], Isabelle CANET[1], Olga V. POLYAKOVA[2], Viatcheslay B. ARTAEV[3], Albert T. LEBEDEV[2], Laurent DEGUILLAUME[4], Gilles MAILHOT[1] and Anne-Marie DELORT[1*].

[1] *Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

[2] *Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991, Russia*

[3] *LECO Corporation, 3000 Lakeview Avenue, St. Joseph, Michigan, 49085, USA*

[4] *Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire de Météorologie Physique, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

**Corresponding author: A-marie.Delort@uca.fr*

ABSTRACT

Phenol is particularly toxic and can be found in many environments, and particularly in the atmosphere due to its high volatility. It can be emitted directly from manufacturing processes or natural sources but can also result from benzene *in situ* oxidation in the atmospheric gas and aqueous phases. Although phenol biodegradation by microorganisms has been studied in many environments, the cloud medium has not been investigated yet as the discovery of active microorganisms in cloud is rather recent.

The main objective of this work was to evaluate the potential degradation of phenol by cloud microorganisms. Two strategies were used, one based on a metranscriptomic analysis made on cloud waters collected at the PUY station (summit of puy-de-Dôme, 1465 m a.s.l., France), the other-one based on a screening performed with bacterial strains isolated at the same sampling site. As no data on phenol concentration was available at the PUY station we first measured it on five cloud samples using GC-MS. Phenol was present in all samples and its concentration ranged from 0.15 to 0.74 $\mu g.L^{-1}$.

Bioinformatic treatments of the enzymatic pathways for phenol degradation were performed on prokaryotic enriched metatranscriptome sequences, obtained from 3 cloud water samples. We found transcriptomic sequences similar of those associated to enzymes that degrade phenol (phenol monooxygenases and phenol hydroxylases) and its main degradation product, catechol (catechol 1.2-dioxygenases). These enzymes were found in Gamma-Proteobacteria, a dominant class in clouds; more specifically we found sequences similar to those of *Acinetobacter* and *Pseudomonas* genera.

Cultivable strains (*Pseudomonas, Rhodococcus* and strains from the Moraxellaceae family) isolated from cloud waters were screened for their ability to degrade phenol. 93% of the 145 tested were able to degrade 0.1mM of phenol in 5 days at 17°C. A special focus was made on *Pseudomonas* strains which are the most abundant species in our collection, particularly on *Pseudomonas syringae*, a typical strain from the phyllosphere.
In conclusion this work suggests that phenol could be biodegraded in clouds. Further work is needed to compare this biological activity with radical chemistry and better describe the fate of this pollutant in the atmosphere.
Key words: Cloud water**,** phenol, biodegradation, metatranscriptomics, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, puy de Dôme.

1. INTRODUCTION

Due to its high toxicity, phenol is one of the main pollutants listed by U.S Environmental Protection Agency (US EPA, 1981) and its concentration in drinking water is inspected and regulated (Michalowicz and Duda, 2007). In France, phenol limit concentration in drinking water is 0.5 $\mu g.L^{-1}$. Phenol is issued from natural sources such as organic matter decomposition and biomass burning (Schauer *et al.*, 2001), but it mainly results from industrial processes. For instance phenol is involved in the production of oils, xylene, plastics, drugs, explosives, dyes, pesticides; it is also present in oil refining and wood and leather preservatives (Gami *et al.*, 2014; Schummer *et al.*, 2009). The annual phenol production exceeds 10.7 million tones worldwide in 2016 (Merchant Research & Consulting Itd).

Phenol can be found in all environmental compartments (soil, water), including the atmosphere (Atkinson *et al.*, 1992; Rubio *et al.*, 2012). Even if its volatility is low (≤ 7% at 25°C) (The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)), phenol is present in the gas phase, but this polar compound can also be transferred to the aqueous phases of the atmosphere (rain, snow, clouds) thanks to its solubility described by the Henry's law constant (H = 3.2 10^3 $M.atm^{-1}$ at 298 K and mass accommodation = 2.7 10^{-2} at 283 K; Harrison *et al.*, 2002 and Heal *et al.*, 1995). Phenol can also be formed by the oxidation of precursors such as benzene directly in the atmosphere both in the gas and the aqueous phases (Grosjean, 1991; Harrison *et al.*, 2005; Herrmann *et al.*, 2015; Vione *et al.*, 2004). The production of phenol by the aqueous phase reactivity is expected to be less efficient than in the gas phase. Indeed, benzene is precursor of phenol but it will not accumulate in the droplet in significant amount due to its relatively low Henry's law constant (H = 1.8 10^{-1} M atm^{-1}). Phenol

concentration ranges from 2.8 to 8.9 µg.L^{-1} (0.03 µM to 0.09 µM) in cloud waters (Harrison *et al.*, 2005; Lüttke and Levsen, 1997), and it reaches up to 91.3 µg.L^{-1} (0,97 µM) in rain (Czuczwa *et al.*, 1987; Harrison *et al.*, 2005; Kawamura and Kaplan, 1983; Leuenberger *et al.*, 1985, 1988; Levsen *et al.*, 1990; Schummer *et al.*, 2009).

In the gas phase, phenol is transformed into nitrophenols either in the presence of $HO^{\bullet}$ and $NO_2^{\bullet}$ (during the day) or in the presence of $NO_3^{\bullet}$ and $NO_2^{\bullet}$ (during the night) (Atkinson *et al.*, 1992; Olariu, 2001; Olariu *et al.*, 2002). In the aqueous phase, phenol can undergo transformations that should be much faster than in the gas phase leading to the formation of nitrophenols (Lüttke *et al.*, 1997; Vione *et al.*, 2004). Recent studies show that direct photolysis should be competitive to the radical reactivity for phenol (Rayne *et al.*, 2009) and that phenol exposed to atmospherically relevant photochemical conditions lead to the production low-volatile compounds such as light-absorbing molecules (HULIS). In-cloud processing of phenol can therefore be a source of Secondary Organic Aerosol (Gilardoni *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2010).

A great number of studies have been conducted to assess the biodegradation of phenol by microorganisms including bacteria, fungi, yeast and algae in the context of environmental and water treatment chemistry (Michalowicz and Duda 2007). Most of those microorganisms were isolated from soils (including the rhizosphere) and waters (fresh and marine waters, waste waters and sediments) where contamination by phenol has been studied (Basha *et al.*, 2010; Kafilzadeh *et al.*, 2010; Michalowicz and Duda, 2007; Mishra and Kumar, 2017; Sandhu *et al.*, 2009; Sridevi *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2017). Only one team has focused on atmospheric phenol uptake by microorganisms (Sandhu *et al.*, 2007, 2009). They studied microbial community on leaves directly in contact with phenol in the air and found that they were able to degrade it. Many studies are based on direct measurement of the biodegradation activity of microbial isolates, in particular for biotechnological application in industrial effluent decontamination (Basha *et al.*, 2010; Michalowicz and Duda, 2007; Mishra and Kumar, 2017; Sridevi *et al.*, 2012). Alternatively others used molecular based approaches and reported microbial genes of phenol or catechol degrading enzymes (Brennerova *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2013; Sandhu *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013; Suenaga *et al.*, 2009) or gained knowledge from metatranscriptomic analyses of microbial communities (Auffret *et al.*, 2015). Ajaz *et al.* (2004) have identified thirty bacteria resistant to phenol in garden soil and Padmanabhan *et al.* (2003) have done DNA-SIP with ^{13}C-labeled phenol to identify 6 phenol-degrading populations in soil thanks to 16S rRNA gene analysis. Main bacterial genera able to biodegrade phenol are *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter* and *Bacillus*, other genera are also described to

degrade phenol such as *Arthrobacter*, *Alcalinogenes*, *Burkholderia*, *Thauera*, etc (Basha *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2013; Jadeja *et al.*, 2014; Michalowicz and Duda, 2007; Padmanabhan *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2013). Major biodegradation pathways for aerobic bacteria have been established (Figure 1) : first phenol can be oxidized into catechol by phenol hydroxylases or phenol mono-oxygenases, then the ring opening can be catalyzed by dioxygenases, catechol 1,2-dioxygenase produces cis-cis-muconate ("ortho" pathway) while catechol 2,3-dioxygenase leads to 2-hydroxymuconate semialdehyde ("meta" pathway). Finally these products are integrated in the central metabolism of the bacteria and end up in CO_2 production (Basha *et al.*, 2010).

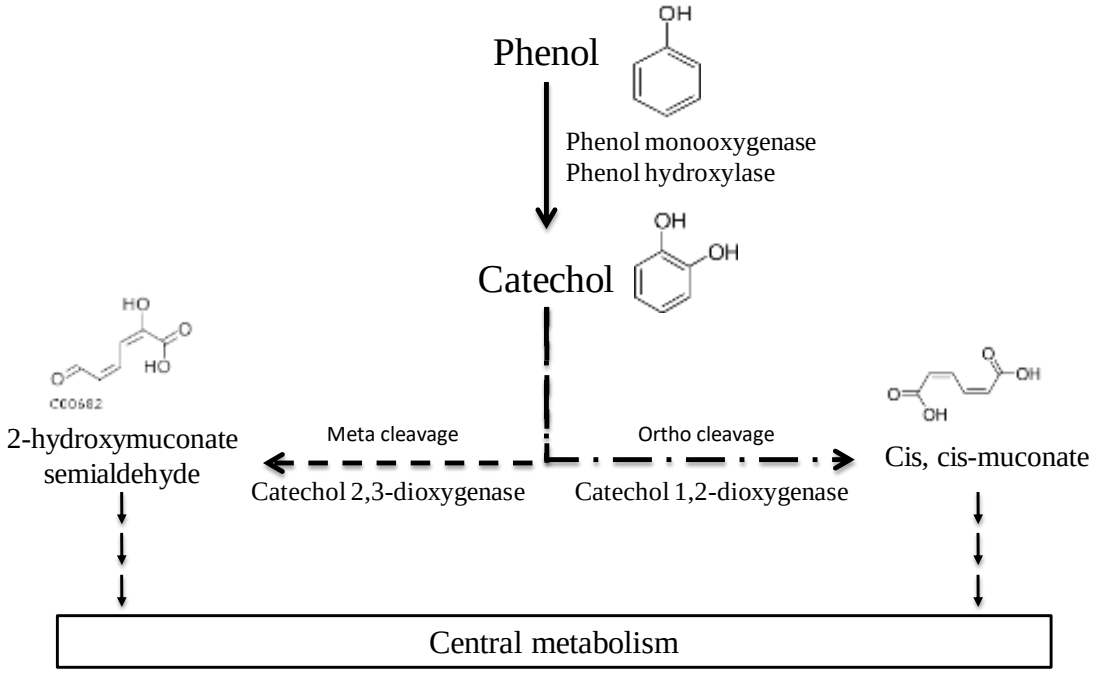


Figure 1: Main phenol biodegradation pathways described for aerobic microorganisms as referred in KEGG database

Alternative pathways have been described with anaerobic microorganisms. In these cases, phenol is carboxylated by a carboxylase in the para position to produce 4-hydroxybenzoate and this metabolite is further metabolized in benzoyl-CoA *via* anaerobic routes before its ring opening step (Basha *et al.*, 2010).

Although phenol is present in clouds, to our knowledge its transformation by microorganisms in these specific environments has never been assessed. Bacterial concentration usually ranges from 10^4 to 10^5 cells per mL of cloud water (Vaïtilingom *et al.*, 2012). In spite of the numerous atmospheric stresses, it has been shown that microorganisms can survive in clouds, maintain metabolic activity and degrade organic compounds (Amato *et al.*, 2007b, 2007a, 2017a, 2017b, Delort *et al.*, 2010, 2017; Hill *et al.*, 2007; Sattler *et al.*, 2001; Vaïtilingom *et al.*, 2013). Among

bacteria known for phenol degradation, *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria) and *Rhodococcus* (Actinobacteria) notably are frequently found viable and potentially active (Amato *et al.*, 2017a, 2017b).

The aim of this work was to explore the potential for phenol biodegradation in clouds. First, phenol concentration was quantified in atmospheric waters, and cloud water metatranscriptomes generated earlier (Amato *et al.*, to publish) were checked for the presence of phenol-degrading genes; second, bacterial strains isolated from cloud water were screened for phenol biodegradation ability.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemical reagents.

Phenol (>99%) and hydrogen peroxide (30%) were obtained from Fluka, sodium chloride (>99%), dichloromethane (>99.8%) and sulfuric acid (>95-97%) were from Sigma Aldrich, acetonitrile (>99.9%) was from VWR Chemicals, NaOH (99%) from Merck, and $MgSO_4$ (>98%) from Carlo Erba reactifs – SDS.

2.2 Cloud water analysis

Cloud sampling: Cloud waters have been sampled at the PUY station (summit of the puy-de-Dôme, 1 465 m above the sea level, 45°46' North, 2°57' East, France) which is part of the atmospheric survey networks EMEP (the European Monitoring and Evaluation Programme), GAW (Global Atmosphere Watch), and ACTRIS (Aerosols, Clouds, and Trace gases Research Infrastructure). The sampling site is fully described in Deguillaume *et al.* (2014). The global meteorological context was examined through 120 h back-trajectories of the air masses sampled using the HYSPLIT model (HYbrid Single-Particle Lagrangian Inte-grated Trajectory). Five cloud water samples collected in 2013 (November 05th), 2014 (June 27th) and 2016 (February 16th, October 21st and October 26th) were analyzed for phenol quantification by GC-MS. Samples were collected using a sterilized cloud droplet impactor and immediately filtered through Minisart® PES filter (0.22 µm porosity; Sartorius, Germany) under sterilized conditions; these have been stored at -25°C.

GC-MS analysis: Sample preparation was carried out according to US EPA 8270 Method. Prior utilization, all the glassware was cleaned with piranha reagent composed of 6 mL of sulfuric acid mixed with 2 mL of hydrogen peroxide. The reagents were kept in the glassware for one night and after all the glasses were washed two times with ultrapure water and two times

with dichloromethane. With clean glasswave, cloud waters kept frozen were melted at room temperature and the pH adjusted to pH = 2 and 11. Organic compounds were extracted three times with dichloromethane (keeping the ratio 10 mL of water for 1 mL of CH_2Cl_2). All the dichloromethane fractions were then dried with $MgSO_4$ and evaporated to 1mL. Samples were kept at 4°C until analysis.

All analyses were performed at Saint Joseph, MI at LECO Corporation (USA). Accurate GC-MS measurements were performed with a high resolution time-of-flight mass spectrometer Pegasus® GC-HRT in GC mode (software ChromaTOF-HRT). The obtained EI mass spectra were used for phenol identification by utilizing high mass accuracy data and retention time (Lebedev *et al.*, 2013). Phenol concentrations were measured using naphthalene D8 as internal standard. Response factor (0.7) was calculated using standard solution of phenol.

2.3 Analysis of metatranscriptomes

Transcriptomic analysis: Cloud water samples were collected on November 17th, 2014, during three consecutive periods of 5 hours. The clouds droplets collected by impaction were immediately transferred by gravity into sterile collection bottles (Nalgene, Rochester, U.S.A) through sterile (autoclaved) silicone tubing. Before cloud sampling operations started, a control sample was made by pouring 200 mL of sterile water into the collection device and through the tubing, and by processing it in parallel of the cloud water samples, including sequencing and data treatment. Immediately after collection, water sample were filtered (MoBio 14880-50-WF) within an UV-sterilized laminar flow hood installed at the sampling site. The filters were then put into ~5 mL of RNA Later solution (Sigma, Steiheim, Germany) and stored at -80°C until further processing. Briefly, the filters were cut in halves, one half being used for investigating DNA, the other for RNA. DNA or RNA were extracted from filter halves using MoBio Power Water DNA or RNA kit, respectively. From RNA extracts, ribosomal RNA were depleted using MICROB*Express* Bacterial mRNA Enrichment kit (Life Technologies). Metagenomes and metatranscriptomes were then obtained by multiple displacement amplification using REPLI-g WGA & WTA kit from these extracts, and shotgun libraries were sequenced on Illumina MiSeq paired-end 2*300bp. Sequencing reads were quality checked (FastQC, (Andrews, 2010)) and trimmed (PRINSEQ-Lite, (Schmieder and Edwards, 2011)) before assembling the mate pairs using PANDA-SEQ (Masella *et al.*, 2012). Annotations were made against UNIPROTKB database (Leinonen *et al.*, 2006), including protein sequences for bacteria, archaea, and fungi using BLASTX software (best hits with e-value < 10^{-4}). All steps were performed using specially written custom per scripts.

Bioinformatics treatment: Known proteins involved in phenol degradation were found in KEGG Database (KEGG, http://www.genome.jp/kegg/ or http://www.kegg.jp/) (see Figure 2). We only focused on aerobic metabolism as cloud environment is highly oxidative. Four nucleotide sequence databases were created from NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) corresponding to phenol hydroxylases (69 sequences), phenol mono-oxygenases (29 sequences); catechol (regrouping catechol 1.2-dioxygenases and catechol 2.3-dioxygenases) (145 sequences) and a fourth database including genes coding for putative phenol degradation enzymes (38 sequences). The sequences from the cloud metatranscriptomes corresponding to the different created databases were then extracted using Bowtie2 (very-sensitive option; (Langmead and Salzberg, 2012)). The affiliation of the extracted sequences was determined using blastn on a local server (e-value = 0.00001; Camacho *et al.*, 2009).

2.5 Biodegradation of phenol by bacterial strains from cloud waters

Bacterial strains: Bacterial strains were isolated from cloud waters sampled at the PUY station and identified as previously described in Vaïtilingom *et al.* (2012). From our lab strain collection, we choose all the potential bacteria that could biodegrade phenol. 119 *Pseudomonas* strains, 24 *Rhodococcus* strains and 2 strains form the Moraxella family were selected for the screening of phenol degradation (see Table SM1). More precisely *Pseudomonas* strains included 4 *P. fluorescens*, 10 *P. graminis*, 1 *P. grimortii*, 2 *P. poae*, 1 *P. reactans*, 1 *P. reinekii*, 3 *P. rhizosphaerae*, 35 *P. syringae*, 2 *P. trivialis*, 2 *P. veronii*, 1 *P. viridiflava* and 57 *Pseudomonas* sp. *Rhodococcus* strains included 1 *R. erythropolis*, 1 *R. enclensis* and 22 *Rhodococcus sp.* Moraxella family strains were 1 *Moraxella sp* and 1 *Psychrobacter sp*.

Incubations: All the strains were grown in R2A medium for 48 hours at 17°C, 130 rpm (Reasoner and Geldreich, 1985). Then cultures were centrifuged at 4 000 rpm for 15 minutes. Bacteria pellets were rinsed first with 5 mL of NaCl 0.8% and after with Volvic® mineral water. Cells were re-suspended in 5 mL of 0.1 mM phenol solution, prepared in Volvic® mineral water, and incubated at 17°C, 130 rpm agitation during 5 days in the dark. To know the concentration, the OD for each strain was taken during the experiment. Strains concentration was around 10^9 cells.mL^{-1}. The ratio number of bacterial cells / phenol concentration was kept to that measured in cloud waters, in clear all the concentrations were multiplied by a factor of 10^4. Indeed the mean bacteria concentration is around 10^5 cells.mL^{-1} of cloud water while that of phenol can reach 0.011 µM (see the result section) in clouds collected at the PUY station. We showed in the past that when the ratios cells / substrates are kept constant the rates of biodegradation are constant (Vaïtilingom *et al.*, 2010).The temperature (17°C) corresponds to

the average temperature at the PUY station in summer under cloud condition. It is well known that under culture conditions in a laboratory, a lag time can be observed before bacteria starts to biodegrade phenol that corresponds to the induction period of the gene expression (Al-Khalid and El-Naas, 2012). As the objective of the work was to perform a large screening with different types of cells, incubation duration of 5 days was chosen to be sure that the induction period necessary for laboratory experiments was long enough to be able to detect biodegradation ability for all the tested cells. This time is quite long for a cloud but the objective here is not to evaluate a rate of biodegradation but to investigate the potential of biodegradation of microorganisms present in cloud waters.

Before sampling, evaporation of water has been compensated by adding Volvic® mineral water. A control experiment was performed by incubating phenol without bacteria; phenol concentration remained stable with time (0.1 mM of phenol was obtained at the end of the experiment). For phenol quantification over time in the incubation experiments, 600 µL samples were centrifuged at 12 500 rpm for 3 minutes and the supernatants were kept frozen until HPLC analysis.

Phenol HPLC analysis: Before analysis, all the samples were filtered on H-PTFE filter (pore size at 0.2 µm and diameter of 13 mm from Macherey-nagel, Germany). Phenol detection was done on HPLC VWR Hitachi Chromaster apparatus fitted with a DAD detector and driven by Chromaster software. Isocratic mode was used with a reverse phase endcapped column (LiChrospher® RP-18, 150 mm-4.6 mm, 5 µm, 100 Å). Mobile phase was composed of acetonitrile and filtered water (Durapore® membrane filters, 0.45 µm HVLP type, Ireland) in 25/75 ratio with a flow rate at 1.2 $mL.min^{-1}$ (adapted from Zhai, 2012). Sample injection volume was 50 µL, spectra were recorded at 272 nm and the run time was 10 min.

Phenol degradation: Percentage of phenol degradation was calculated by the following equation:

$$\text{Phenol degradation (\%)} = 100 - \frac{[Phenol]_{final} \times 100}{[Phenol]_{initial}} \qquad (1)$$

Limit of phenol quantification was 3.8 µM. Strains are not considered active below 5 % of phenol degradation, corresponding to 5 µM.

Comparison of strain phenol degradation abilities was done using Kruskal-Wallis test (p. value < 0.05) with Past software.

3. RESULTS

3.1. Phenol quantification in cloud waters

The objective of this paper was to explore the ability of microorganisms isolated or present in cloud waters collected at the PUY station to degrade phenol. We first checked its presence in cloud waters sampled at the PUY station by performing GC-MS analysis. Figure SM1 presents the back trajectories of the air masses corresponding to the 5 cloud events at the PUY station. The air mass origins of the 5 cloud samples determined from these back trajectories were classified as described in Deguillaume *et al.* (2014) and are reported in Table 1.

Table 1: Phenol concentrations measured by GC-MS in the five cloud water sampled at the PUY station.

Cloud water sampling date	05/11/2013	27/06/2014	16/02/216	21/10/2016	26/10/2016
Air mass origin	West	West	North East	North West/North	North West/North
Phenol concentration	0.52 µg.L^{-1}	0.73 µg.L^{-1}	0.74 µg.L^{-1}	0.21 µg.L^{-1}	0.15 µg.L^{-1}

The GC-MS analysis performed on cloud samples allowed reliable identification and quantification of phenol in all samples (Table 1), the measured phenol concentrations ranged from 0.15 to 0.74 µg.L^{-1}. Figure SM2 (A) represents, as a typical example, the total ion current chromatogram of the cloud sample collected the 16th of February 2016, the corresponding mass-chromatogram based on the ion 94 current (characteristic for phenol) is represented in Figure SM2 (B). Quantification was done using similar mass chromatograms of all samples and the identification was proven by the correct retention time and accurate mass measurements (calculated: 94.0413; experimental: 94.0414).

3.2. Possibility of in-cloud phenol degradation by the cloud microbiome using a meta-transcriptomic analysis.

The presence of transcripts involved in the biodegradation pathways of phenol (Figure 2) has been investigated in metatranscriptomic data obtained from the 3 cloud water samples collected in November 2014. An extensive metagenomics and metatranscriptomic study was previously published on the same cloud samples (Amato *et al.*, to be published). Here we performed enrichment of the prokaryotic mRNA in order to search for specific transcripts present in low amount in the sample. Four databases, regrouping 281 sequences, were used for searching the

sequences matching with cloud prokaryote metatranscriptomes (more details about the affiliation of the sequences are given in Table SM2).

Gene transcripts were detected for all the enzymes, except the catechol 2,3-dioxygenase, showing a possible implication of the microorganisms in the degradation of phenol in cloud (Figure 3). However the number of hits and the relative abundance of the transcripts coding for the different enzymes varied according to the cloud samples. 257 hits (sequence homology) could be counted for cloud 2, for only 70 in cloud 1 and 130 in cloud 3. Transcripts corresponding to the enzyme involved in the first step of oxidation of phenol leading to catechols (phenol hydroxylases and phenol mono-oxygenases) were the most abundant in clouds 2 and 3 while those corresponding to the opening of the catechol ring (catechol 1,2 dioxygenases) were dominant in cloud 1. For all the samples the transcripts corresponding to putative phenol degradation enzyme pathways (i.e. none explicitly described enzymes) remained low. These results suggest that the potential microbial activity toward phenol varied with time as the 3 samples presented here make reference to one cloud which stayed 15 hours at the summit of PUY station.

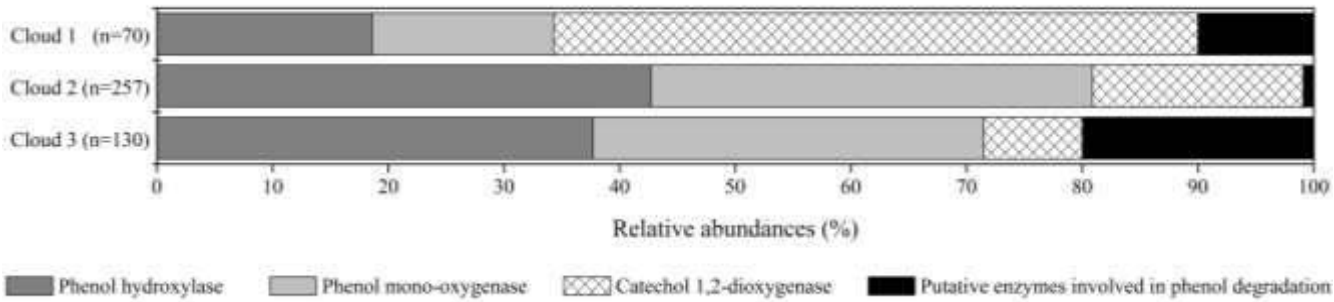


Figure 2: Relative abundance of transcripts in cloud waters encoding for enzymes involved in phenol degradation pathways. The absolute total number of hits for each sample is indicated (n).

Figure 2 presents the relative abundance of putative taxonomic affiliation of microorganisms involved in phenol biodegradation, based on the information associated with sequences in the databases. All the sequences were affiliated with γ-Proteobacteria, from only two genera, namely *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, corresponding to only four species (*P. fluorescens*, *A. gyllenbergii*, *A. oleivorans* and *A. pitii*) matched with cloud transcripts, among a total of 50 (Table SM2). This very low diversity was unexpected considering that sequences from 50 bacterial genera including 109 species were tested. In addition the relative abundance of sequences affiliated to a bacterial species varied a lot with the considered enzymes and clouds (Figure 3).

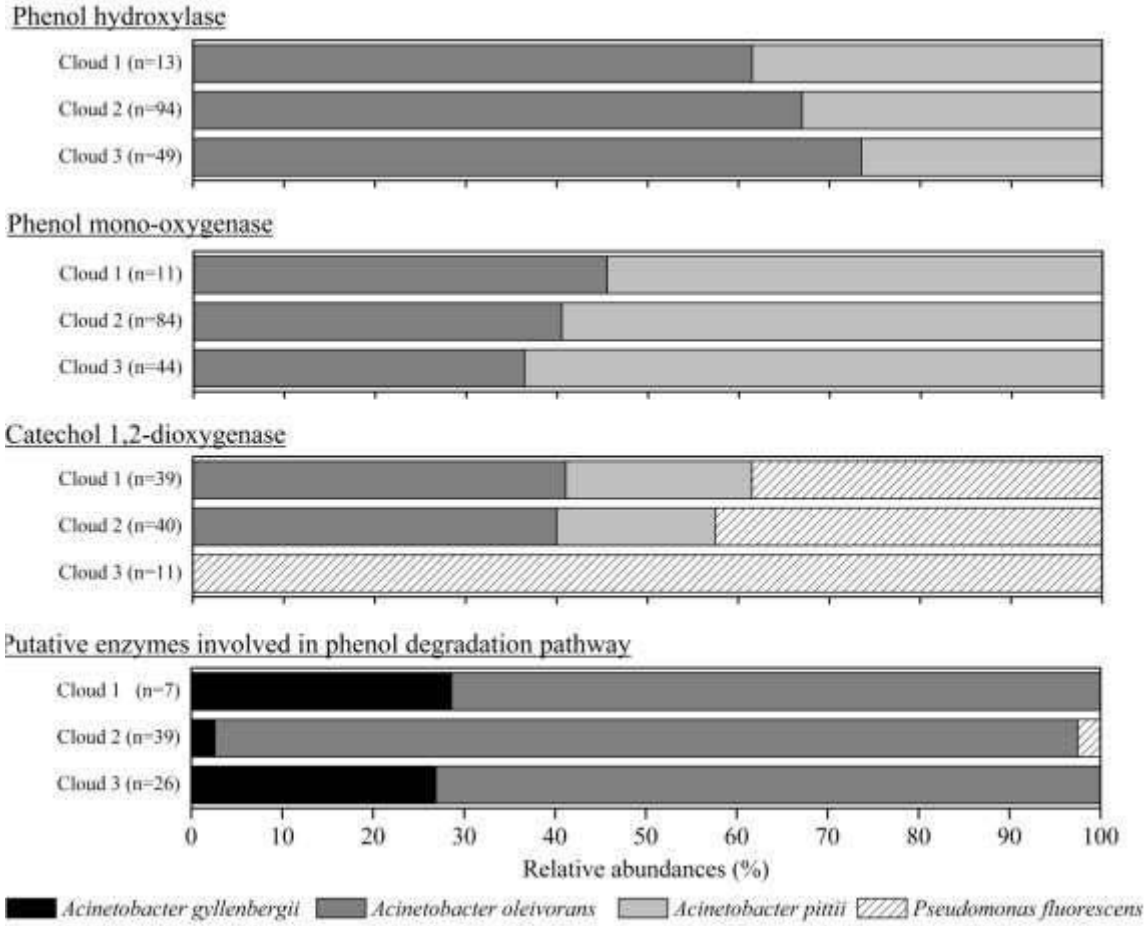


Figure 3: Relative abundance of the putative taxonomic affiliation of the microorganisms involved in phenol degradation. For the 5 databases, microorganisms associated to a matching sequence with cloud transcripts are plotted here; the absolute total number of hits for each sample is indicated (n).

γ-Proteobacteria were found to represent only 0.3% of the sequences in cloud water samples, but it was one of the most active classes with 47.9% of the transcripts identified, with 13.5% affiliated with *Pseudomonas* and 24% with *Acinetobacter* (Amato *et al.*, to be published). *Rhodococcus* were previously isolated from clouds at the PUY station (Vaïtilingom *et al.*, 2012) but genes for phenol degradation affiliated with this genus were not detected here.

3.3. Screening of bacterial strains isolated from cloud waters for their ability to biodegrade phenol

From our strain collection of 826 cultivable microorganisms isolated from clouds collected at the PUY station between March 2003 and June 2016, we selected strains belonging to genera of interest concerning their potential ability for phenol biodegradation. Interesting genera were *Pseudomonas* and *Acinetobacter* (GammaProteobacteria) and *Rhodococcus* (Actinobacteria). Therefore 119 *Pseudomonas* strains and 24 *Rhodococcus* strains were selected and assessed for phenol degradation. As no *Acinetobacter* was available in our bacterial collection we choose closely related genera namely two strains of *Moraxella* and *Psychrobacter*. Altogether 145

bacterial strains were tested (Table SM1). The percentage of phenol degradation measured by HPLC after 5 days of incubation at 17°C is reported in Figure 4 and in Table SM1. As explained in the materials and methods section, the duration time of 5 days was considered to allow a large screening and avoid limitations due to long induction periods often observed under laboratory conditions. The aim of this experiment is to investigate the enzymatic equipment of cloud microorganisms for potential phenol biodegradation and not to measure accurate biodegradation rates compatible with the life time of a cloud system.

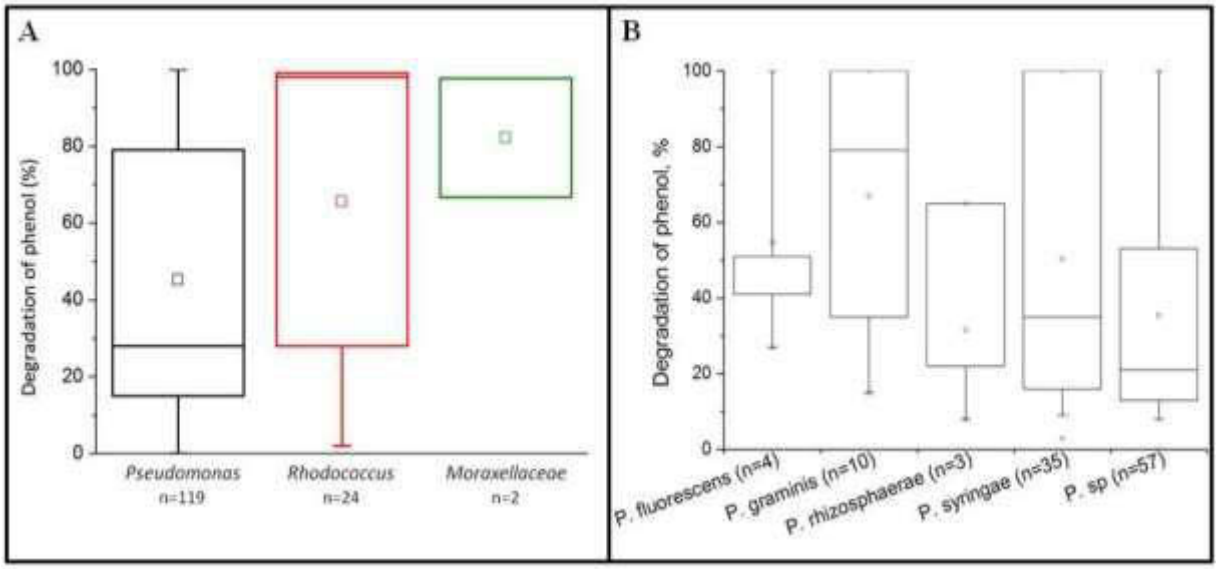


Figure 4: Biodegradation of phenol by bacterial strains isolated from cloud waters. Results are expressed as the % of phenol biodegradation measured by HPLC after 5 days of incubation at 17°C. A) Results obtained for the 119 *Pseudomonas* strains, the 24 *Rhodococcu*s strains, and the 2 strains from the Moraxellaceae family. B) Focus on the *Pseudomonas* species. Only species groups with a minimum of 3 strains are plotted here.

We found that 93.1% of the 145 tested strains were able to degrade phenol after 5 days of incubation. Globally, in our experimental conditions, all the families tested were very good phenol degraders (see Figure 4A). No significative difference was found in the capacity of phenol degradation between *Pseudomonas*, *Rhodococcus* and Moraxellaceae strains. A focus on the *Pseudomanas* strains according to their species is presented in Figure 4B. The mean capacity of phenol degradation varied between 31% and 67% (for *Pseudomonas rhizosphaerae* and *Pseudomonas graminis* respectively), however no significative difference was observed between the species according to the Kruskal-Wallis test. Considering specifically *Pseudomonas syringae* strains which are the most abundant genus present in cloud waters, only 2 of them out of 35 were not capable of degrading phenol (strains PDD-32b-31and PDD-69b-20, see Table SM1).

2. DISCUSSION AND CONCLUSION

Phenol was present in all cloud water samples at concentrations ranging from 0.15 to 0.74 µg.L^{-1}; these values are within the range usually measured in atmospheric waters at remote sampling sites (Harrison *et al.*, 2005; Leuenberger *et al.*, 1988; Lüttke and Levsen, 1997), but globally the concentrations measured at the PUY station are rather in the lower range of values. In our case although the air masses had different geographical origins with distinct influences, varying from non-polluted (West origin) to polluted (North East origin), only slight variations of phenol concentration was observed.

The results reported combining molecular approach and biodegradation assays involving culturable bacteria indicate that phenol-degrading microorganisms are present in clouds. Molecular approach allowed detection of enzymes belonging to *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains but *Rhodococcus* species could not be detected. In parallel *Rhodococcus* strains isolated from clouds were very active phenol degraders but no *Acinetobacter* have been isolated from clouds. This difference reflects the complementarity but also the bias of each approach (molecular *vs* cultural). Meta-transcriptomic can be biased by technical issues (extraction, sequencing …) or by the creation of uncompleted database (limited by our knowledge in studied microorganisms), on the other hand it is well known that cultivable strains only represent 1% or less than the total population (Amann *et al.*, 1995). *Acinetobacter*, *Pseudomonas* and *Rhodococcus* genera are known to degrade phenol in other environments (Basha *et al.*, 2010; Gami *et al.*, 2014; Michalowicz and Duda, 2007; Sandhu *et al.*, 2007). The cloud microbiome harbors species usually affiliated with the phyllosphere (Amato *et al.*, 2017a; Vaïtilingom *et al.*, 2012). Sandhu *et al.* (2007) explored the presence of phenol degraders among microbial communities on plant leaves. They did not find *Pseudomonas* but they isolated *Acinetobacter* and *Rhodococcus* strains (Actinobacteria), and noticed globally a low diversity of phenol degraders. Only the genes encoding for the ortho pathway for phenol degradation that involves the catechol 1,2-dioxygenase activity were present in both Proteobacteria and Actinobacteria. Similarly, we did not found transcripts of genes coding for catechol 2,3-dioxygenases but only those coding for phenol hydroxylases, phenol monooxygeneases and catechol 1,2-dioxygenase. In principle bacteria can have either ortho or meta pathways, or both, but their expression is dependent on phenol concentration. The enzyme catechol 1,2-dioxygenase is produced at low phenol concentration while catechol 2,3-dioxygenases become dominant at high phenol concentrations (3 mM) (Sandhu *et al.*, 2009). This might explain why bacteria from clouds and the phyllosphere only produce catechol 1,2-dioxygenases as the

phenol concentration in the atmosphere is much lower than in surface water for instance (in the range of a few µg.L^{-1} versus 100 to 1000 µg.L^{-1}) (Czuczwa *et al.*, 1987; Gami *et al.*, 2014; Harrison *et al.*, 2005; Kawamura and Kaplan, 1983; Leuenberger *et al.*, 1985, 1988; Levsen *et al.*, 1990; Lüttke and Levsen, 1997; Schummer *et al.*, 2009, 2009; Sturaro *et al.*, 2010).
In our study we focused on *Pseudomonas* strains as they are the most frequent in cloud waters. We observed that the strains likely issued from the phyllosphere, *P. graminis* and *P. syringae* were able to degrade phenol. In the literature, *P. aeruginosa* and *P. putida* are the most popular phenol degraders (Basha *et al.*, 2010; Der Yang and Humphrey, 1975; Erhan *et al.*, 2004; Gami *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2005; Molin and Nilsson, 1985). Berge *et al.* (2014) have reported an extensive study performed with 763 *Pseudomonas syringae* strains which have been classified in 13 phylogroups. The authors have associated various phenotypes with the different phylogroups, among them ice nucleation activity and the presence of the catechol operons (see Table SM3). The presence of these operons was limited to the phylogroups I and II which presented moderate INA+ activity (32.7%). In our case we also measured the ice nucleation activity of the 35 *Pseudomonas syringae* strains as described in Joly *et al.* (2013). Figure SM4 presents the strains which were INA+ (T>-8°C) *versus* their phenol degradation ability. The % of INA+ bacteria among the phenol degraders was higher in our case (57.6%) compared to the results of (Berge et al., 2014) (Table SM3). A different situation was observed when all the strains were considered: in Berge *et al.* (2014) the % of INA+ was higher than in our study (65.0% *vs* 57.1%) but much lower for phenol degradation (12.8% *vs* 94.3%). These differences may reflect specificity of the cloud medium or of the sampling location for *Pseudomonas syringae* species, as previous suggested (Joly *et al.*, 2013).

We showed that microorganisms from clouds were able to degrade phenol. The question raises what is the potential impact of this biotransformation on the fate of phenol in real clouds? First the presence of transcripts of phenol-degrading enzymes measured directly *in situ* demonstrates a real in-cloud activity of microorganisms. However, these data do not give any exact quantitative contribution of the microbial activity to the phenol transformation in real clouds. On the other hand the large screening performed with cloud isolates showed that their enzymatic equipment for phenol degradation is largely present and represents a high potential for biodegradation in clouds. However no precise biodegradation rates were determined under realistic cloud conditions to evaluate its real impact. It will be very important to compare the relative contribution of biological degradation *versus* radical chemistry, especially with photochemistry. It is well known that radicals species ($^{\bullet}OH$, $NO_2^{\bullet}$ $NO_3^{\bullet}$ radicals) can react

with phenol independently or in combination to give rise to catechol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol and 2,4-diniropenol, these compounds can be further degraded in shorter molecules after the ring opening (Harrison *et al.*, 2005).

In addition of examining the presence of phenol degrading pathways, we also looked for biological pathways leading to the potential formation of phenol from benzene (Choi *et al.*, 2013; Tao *et al.*, 2004), involving toluene monooxygenases in 8 species of Actinobacteria, Alpha- and Betaproteobacteria (Table SM4). None of these sequences were found in the cloud prokaryote metatranscriptomes. This result should be confirmed by incubating cloud microorganisms directly with benzene to assess the real potential of cloud microorganism to produce phenol under these conditions. Consequently the origin of phenol in cloud waters could only result of the mass transfer from the gas phase to the aqueous phase or of the production *via* radical processes in the atmosphere. For instance the production of phenol in the gas phase can result from the reactivity of $^{\bullet}OH$ radical with benzene (Grosjean, 1991; Volkamer *et al.*, 2002). Considering that benzene has a very low solubility in water, it is likely that the production of phenol mainly occurs in the gas phase and is transferred to the water phase. The contributions of biological or abiotic transformation of benzene into phenol in the water phase should remain minor processes.

In conclusion, this is the first report of the potential degradation of phenol by cloud microorganisms. The study was centered on bacteria present in cloud waters collected at the PUY station where phenol concentrations were measured by GC-MS and found in the range of 0.15 to 0.74 $\mu g.L^{-1}$. Metatranscriptomic analysis suggested that phenol could be biodegraded in-clouds, while a large screening of isolated strains showed that the enzymatic equipment to degrade phenol was not rare. *Pseudomonas, Acinetobacter* and *Rhodococcus* strains were the major genera potentially involved in phenol biodegradation. Further work is needed to evaluate the relative contribution of this biological activity and radical chemistry (particularly photochemistry) to phenol transformation. For that, experiments will be set up to measure phenol biodegradation rates under realistic cloud conditions and compare them with abiotic degradation rates. This will bring valuable information to better describe the fate of this pollutant in the atmosphere. This will be of major interest for health and air quality considering that phenol is highly toxic and is one of the main pollutants listed by U.S Environmental Protection Agency (US EPA, 1981). Microorganisms could participate to a natural remediation process of the atmosphere.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was funded by the french ANR program BIOCAP.

REFERENCES

Ajaz, M., Noor, N., Rasool, S.A., and Khan, S.A. (2004). Phenol resistant bacteria from soil: identification-characterization and genetical studies. Pakistan Journal of Botany 36, 415–424.

Al-Khalid, T., and El-Naas, M.H. (2012). Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 42, 1631–1690.

Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews 59, 143–169.

Amato, P., Ménager, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., and 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., Mailhot, G., Laj, P., and Delort, A.-M. (2007a). An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the puy de Dôme (France). Atmospheric Environment 41, 8253–8263.

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

Amato, P., Joly, M., Besaury, L., Oudart, A., Taib, N., Moné, A.I., Deguillaume, L., Delort, A.-M., and Debroas, D. (2017a). Active microorganisms thrive among extremely diverse communities in cloud water. PLoS One 12, e0182869.

Amato, P., Brisebois, E., Draghi, M., Duchaine, C., Fröhlich-Nowoisky, J., Huffman, J.A., Mainelis, G., Robine, E., and Thibaudon, M. (2017b). Main biological aerosols, specificities, abundance and diversity. In Microbiology of Aerosols, A.-M. Delort and P. Amato, éds. (Wiley Blackwell) pp. 3–22.

Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. URL: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Atkinson, R., Aschmann, S.M., and Arey, J. (1992). Reactions of OH and NO_3 radicals with phenol, cresols, and 2-nitrophenol at 296±2 K. Environmental Science & Technology 26, 1397–1403.

Auffret, M.D., Yergeau, E., Labbé, D., Fayolle-Guichard, F., and Greer, C.W. (2015). Importance of *Rhodococcus* strains in a bacterial consortium degrading a mixture of

hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. Applied Microbiology and Biotechnology 99, 2419–2430.

Basha, K.M., Rajendran, A., and Thangavelu, V. (2010). Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. Asian Journal of Experimental Biological Sciences 1, 219–234.

Berge, O., Monteil, C.L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D.C., and Morris, C.E. (2014). A User's Guide to a Data Base of the Diversity of *Pseudomonas syringae* and Its Application to Classifying Strains in This Phylogenetic Complex. PLoS One 9, e105547.

Brennerova, M.V., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D.H., and Junca, H. (2009). Metagenomics reveals diversity and abundance of meta -cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. Environmental Microbiology 11, 2216–2227.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., and Madden, T.L. (2009). BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10, 421.

Choi, E.J., Jin, H.M., Lee, S.H., Math, R.K., Madsen, E.L., and Jeon, C.O. (2013). Comparative Genomic Analysis and Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and o-, m-, and p-Xylene (BTEX) Degradation Pathways of *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. Applied and Environmental Microbiology 79, 663–671.

Czuczwa, J., Leuenberger, C., Tremp, J., and Giger, W. (1987). Determination of trace levels of phenol and cresols in rain by continuous liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography 233–241.

Deguillaume, L., Charbouillot, T., Joly, M., Vaïtilingom, M., Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Delort, A.-M., Vinatier, V., Flossmann, A., *et al.* (2014). Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) based on 10 yr of monitoring of their physicochemical properties. Atmospheric Chemistry and Physics 14, 1485–1506.

Delort, A.-M., Vaïtilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Parazols, M., Mailhot, G., Laj, P., and Deguillaume, L. (2010). A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes. Atmospheric Research 98, 249–260.

Delort, A.M., Vaïtilingom, M., Joly, M., Amato, P., Wirgot, N., Lallement, A., Sancelme, M., Matulova, M., and Deguillaume, L. (2017). Clouds: A Transient and Stressing Habitat for Microorganisms. In Microbial Ecology of Extreme Environments, C. Chénard, and F.M. Lauro, éds. (Springer International Publishing), pp. 215–245.

Der Yang, R., and Humphrey, A.E. (1975). Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. Biotechnology and Bioengineering 17, 1211–1235.

Erhan, E., Yer, E., Akay, G., Keskinler, B., and Keskinler, D. (2004). Phenol degradation in a fixed-bed bioreactor using micro-cellular polymer-immobilized *Pseudomonas syringae*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 79, 195–206.

Fang, H., Cai, L., Yu, Y., and Zhang, T. (2013). Metagenomic analysis reveals the prevalence of biodegradation genes for organic pollutants in activated sludge. Bioresource Technology 129, 209–218.

Gami, A.A., Shukor, M.Y., Khalil, K.A., Dahalan, F.A., Khalid, A., and Ahmad, S.A. (2014). Phenol and its toxicity: A short review. Journal of Environmental Microbiology and Toxicology 2, 11–23.

Gilardoni, S., Massoli, P., Paglione, M., Giulianelli, L., Carbone, C., Rinaldi, M., Decesari, S., Sandrini, S., Costabile, F., and Gobbi, G.P. (2016). Direct observation of aqueous secondary organic aerosol from biomass-burning emissions. Proceedings of the National Academy of Sciences 113, 10013–10018.

Grosjean, D. (1991). Atmospheric fate of toxic aromatic compounds. Science of the Total Environment 100, 367–414.

Harrison, M.A., Cape, J.N., and Heal, M.R. (2002). Experimentally determined Henry's Law coefficients of phenol, 2-methylphenol and 2-nitrophenol in the temperature range 281–302K. Atmospheric Environment 36, 1843–1851.

Harrison, M.A.J., Barra, S., Borghesi, D., Vione, D., Arsene, C., and Iulian Olariu, R. (2005). Nitrated phenols in the atmosphere: a review. Atmospheric Environment 39, 231–248.

Heal, M.R., Pilling, M.J., Titcombe, P.E., and Whitaker, B.J. (1995). Mass accommodation of aniline, phenol and toluene on aqueous droplets. Geophysical Research Letters 22, 3043–3046.

Herrmann, H., Schaefer, T., Tilgner, A., Styler, S.A., Weller, C., Teich, M., and Otto, T. (2015). Tropospheric aqueous-phase chemistry: kinetics, mechanisms and its coupling to a changing gas phase. Chemical Reviews 115, 4259–4334.

Hill, K.A., Shepson, P.B., Galbavy, E.S., Anastasio, C., Kourtev, P.S., Konopka, A., and Stirm, B.H. (2007). Processing of atmospheric nitrogen by clouds above a forest environment. Journal of Geophysical Research 112, D11301.

Jadeja, N.B., More, R.P., Purohit, H.J., and Kapley, A. (2014). Metagenomic analysis of oxygenases from activated sludge. Bioresource Technology 165, 250–256.

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

Kafilzadeh, F., Farhangdoost, M.-S., and Tahery, Y. (2010). Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. African Journal of Biotechnology 9, 6721–6726.

Kawamura, K., and Kaplan, I.R. (1983). Organic compounds in the rainwater of Los Angeles. Environmental Science & Technology 17, 497–501.

Kumar, A., Kumar, S., and Kumar, S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. Biochemical Engineering Journal 22, 151–159.

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods 9, 357–359.

Lebedev, A.T., Polyakova, O.V., Mazur, D.M., and Artaev, V.B. (2013). The benefits of high resolution mass spectrometry in environmental analysis. Analyst 138, 6946–6953.

Leinonen, R., Nardone, F., Zhu, W., and Apweiler, R. (2006). UniSave: the UniProtKB sequence/annotation version database. Bioinformatics 22, 1284–1285.

Leuenberger, C., Ligocki, M.P., and Pankow, J.F. (1985). Trace organic compounds in rain. 4. Identities, concentrations, and scavenging mechanisms for phenols in urban air and rain. Environmental Science & Technology 19, 1053–1058.

Leuenberger, C., Czuczwa, J., Tremp, J., and Giger, W. (1988). Nitrated phenols in rain: atmospheric occurrence of phytotoxic pollutants. Chemosphere 17, 511–515.

Levsen, K., Behnert, S., PrieX, B., Svoboda, M., Winkeler, H.-D., and Zietlow, J. (1990). Organic compounds in precipitation. Chemosphere 1037–1061.

Lüttke, J., and Levsen, K. (1997). Phase partitioning of phenol and nitrophenols in clouds. Atmospheric Environment 31, 2649–2655.

Lüttke, J., Scheer, V., Levsen, K., Wünsch, G., Cape, J.N., Hargreaves, K.J., Storeton-West, R.L., Acker, K., Wieprecht, W., and Jones, B. (1997). Occurrence and formation of nitrated phenols in and out of cloud. Atmospheric Environment 31, 2637–2648.

Masella, A.P., Bartram, A.K., Truszkowski, J.M., Brown, D.G., and Neufeld, J.D. (2012). PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. BMC Bioinformatics 13, 31.

Michalowicz, J., and Duda, W. (2007). Phenols transformations in the environment and living organisms. Current Topics in Biophysics 30, 24–36.

Mishra, V.K., and Kumar, N. (2017). Microbial degradation of phenol: a review. Journal of Water Pollution & Purification Research 17–22.

Molin, G., and Nilsson, I. (1985). Degradation of phenol by *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in continuous culture at different ratios of biofilm surface to culture volume. Applied and Environmental Microbiology 50, 946–950.

Olariu, R.I. (2001). Atmospheric oxidation of selected aromatic hydrocarbons. Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal.

Olariu, R.I., Klotz, B., Barnes, I., Becker, K.H., and Mocanu, R. (2002). FT–IR study of the ring-retaining products from the reaction of OH radicals with phenol, o-, m-, and p-cresol. Atmospheric Environment 36, 3685–3697.

Padmanabhan, P., Padmanabhan, S., DeRito, C., Gray, A., Gannon, D., Snape, J.R., Tsai, C.S., Park, W., Jeon, C., and Madsen, E.L. (2003). Respiration of ^{13}C-Labeled Substrates Added to Soil in the Field and Subsequent 16S rRNA Gene Analysis of ^{13}C-Labeled Soil DNA. Applied and Environmental Microbiology 69, 1614–1622.

Rayne, S., Forest, K., and Friesen, K.J. (2009). Mechanistic aspects regarding the direct aqueous environmental photochemistry of phenol and its simple halogenated derivatives. A review. Environment International 35, 425–437.

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

Renard, P., Canet, I., Sancelme, M., Wirgot, N., Deguillaume, L., and Delort, A.M. (2016). Screening of cloud microorganisms isolated at the puy de Dôme (France) station for the production of biosurfactants. Atmospheric Chemistry and Physics 12347–12358.

Rubio, M.A., Lissi, E., Herrera, N., Pérez, V., and Fuentes, N. (2012). Phenol and nitrophenols in the air and dew waters of Santiago de Chile. Chemosphere 86, 1035–1039.

Sandhu, A., Halverson, L.J., and Beattie, G.A. (2007). Bacterial degradation of airborne phenol in the phyllosphere. Environmental Microbiology 9, 383–392.

Sandhu, A., Halverson, L.J., and Beattie, G.A. (2009). Identification and genetic characterization of phenol-degrading bacteria from leaf microbial communities. Microbial Ecology 57, 276–285.

Sattler, B., Puxbaum, H., and Psenner, R. (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets. Geophysical Research Letters 28, 239–242.

Schauer, J.J., Kleeman, M.J., Cass, G.R., and Simoneit, B.R.T. (2001). Measurement of Emissions from Air Pollution Sources. 3. C1 − C29 organic compounds from fireplace combustion of wood. Environmental Science & Technology 35, 1716–1728.

Schmieder, R., and Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics 27, 863–864.

Schummer, C., Groff, C., Al Chami, J., Jaber, F., and Millet, M. (2009). Analysis of phenols and nitrophenols in rainwater collected simultaneously on an urban and rural site in east of France. Science of The Total Environment 407, 5637–5643.

Sharma, N., Tanksale, H., Kapley, A., and Purohit, H.J. (2012). Mining the metagenome of activated biomass of an industrial wastewater treatment plant by a novel method. Indian Journal of Microbiology 52, 538–543.

Silva, C.C., Hayden, H., Sawbridge, T., Mele, P., De Paula, S.O., Silva, L.C.F., Vidigal, P.M.P., Vicentini, R., Sousa, M.P., Torres, A.P.R., *et al.* (2013). Identification of genes and pathways related to phenol degradation in metagenomic libraries from petroleum refinery wastewater. PLoS One 8, e61811.

Sridevi, V., Chandana Lakshmi, M.V.V., Manasa, M., and Sravani, M. (2012). Metabolic pathways for the biodegradation of phenol. International Journal of Engineering Science & Advanced Technology 2, 695–705.

Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G., and Ferrara, D. (2010). Long-term phenol, cresols and BTEX monitoring in urban air. Environmental Monitoring and Assessment 164, 93–100.

Suenaga, H., Koyama, Y., Miyakoshi, M., Miyazaki, R., Yano, H., Sota, M., Ohtsubo, Y., Tsuda, M., and Miyazaki, K. (2009). Novel organization of aromatic degradation pathway genes in a microbial community as revealed by metagenomic analysis. The ISME Journal 3, 1335–1348.

Sun, Y.L., Zhang, Q., Anastasio, C., and Sun, J. (2010). Insights into secondary organic aerosol formed via aqueous-phase reactions of phenolic compounds based on high resolution mass spectrometry. Atmospheric Chemistry and Physics 10, 4809–4822.

Tao, Y., Fishman, A., Bentley, W.E., and Wood, T.K. (2004). Oxidation of benzene to phenol, catechol, and 1,2,3-trihydroxybenzene by toluene 4-monooxygenase of *Pseudomonas mendocina* KR1 and toluene 3-monooxygenase of *Ralstonia pickettii* PKO1. Applied and Environmental Microbiology 70, 3814–3820.

The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) Phenol. URL : https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0493.html.

Tian, M., Du, D., Zhou, W., Zeng, X., and Cheng, G. (2017). Phenol degradation and genotypic analysis of dioxygenase genes in bacteria isolated from sediments. Brazilian Journal of Microbiology 48, 305–313.

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

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

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

Vinatier, V., Wirgot, N., Joly, M., Sancelme, M., Abrantes, M., Deguillaume, L., and Delort, A.-M. (2016). Siderophores in cloud waters and potential impact on atmospheric chemistry: production by microorganisms isolated at the puy de Dôme station. Environmental Science & Technology 50, 9315–9323.

Vione, D., Maurino, V., Minero, C., Lucchiari, M., and Pelizzetti, E. (2004). Nitration and hydroxylation of benzene in the presence of nitrite/nitrous acid in aqueous solution. Chemosphere 56, 1049–1059.

Volkamer, R., Klotz, B., Barnes, I., Imamura, T., Wirtz, K., Washida, N., Becker, K.H., and Platt, U. (2002). OH-initiated oxidation of benzene. Physical Chemistry Chemical Physics 4, 1598–1610.

Zhai, A. (2012). Determination of phenols in drinking water with agilent bond elut plexa SPE and HPLC. URL : https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-9730EN.pdf.

Supplementary Material

Potential biodegradation of phenol in cloud waters

Audrey LALLEMENT[1], Ludovic BESAURY[1], Elise TIXIER[1], Martine SANCELME[1], Pierre AMATO[1], Virginie VINATIER[1], Isabelle CANET[1], Olga V. POLYAKOVA[2], Viatcheslay B. ARTAEV[3], Albert T. LEBEDEV[2], Laurent DEGUILLAUME[4], Gilles MAILHOT[1] and Anne-Marie DELORT[1*].

[1] *Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

[2] *Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Leninskie Gory 1/3, Moscow, 119991, Russia*

[3] *LECO Corporation, 3000 Lakeview Avenue, St. Joseph, Michigan, 49085, USA*

[4] *Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire de Météorologie Physique, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

**Corresponding author: A-marie.Delort@uca.fr*

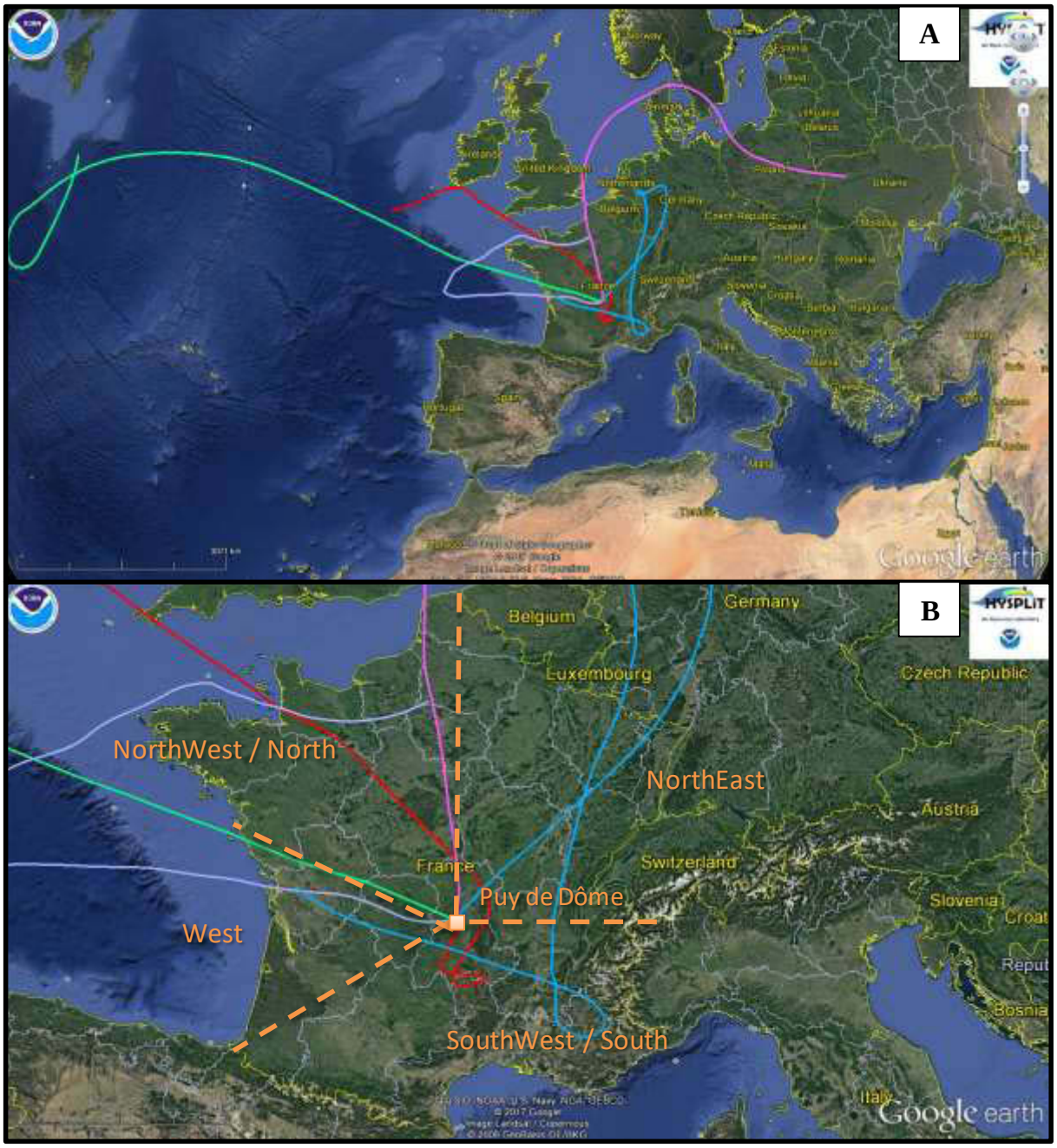


Figure SM1: Back trajectories of the air masses corresponding to cloud events at the PUY station. A) 120 h back-trajectories of the air masses sampled were determined using the HYSPLIT model (HYbrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory). Sampling times: November 05th, 2013 (green); June 27th, 2014 (purple); February 16th, 2016 (blue); October 21st, 2016 (pink) and October 26th, 2016 (red). B) Distribution of air masses origin as described in Deguillaume *et al.* (2014).

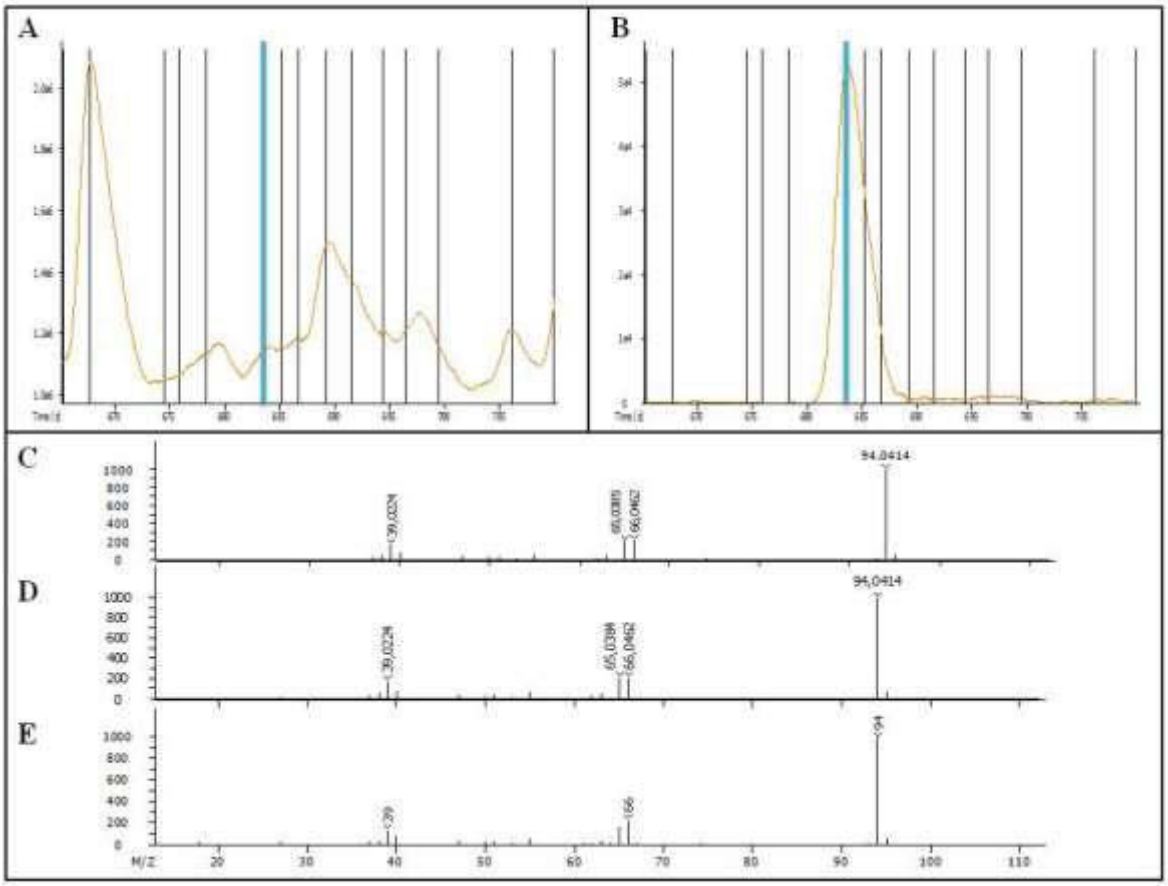


Figure SM2: GC-MS analysis of the cloud sample collected the 16th of February 2016. A) Total ion chromatogram of the cloud sample: Phenol peak is highlighted with blue. B) Mass chromatogram based on the current of ion of m/z 94 (characteristic for phenol). C) Mass spectrum of phenol: Raw (caliper) spectrum, D) deconvoluted (Peak True) experimental spectrum and E) library spectrum. Identification score was very high – 919.

Table SM1: List of the bacterial strains tested for their ability to degrade phenol. Percentage of phenol degradation after 5 days of incubation at 17°C. Isolated by Amato *et al.*, 2005 (1a.), Amato *et al.*, 2007b (1b.), Vaïtilingom *et al.* (2012) (2.), Renard *et al.*, 2016 (3.) and Vinatier *et al.*, 2016 (4.).

Reference number (PDD-)	Publication referring the isolation of the strains	Genus	Species	Accession number	Biodegradation of phenol after 5 days of incubation, %
36b-3	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*fluorescens*	JF706525	41
36b-5	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*fluorescens*	JF706526	27
37b-5	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*fluorescens*	JF706535	51
59b-8	3., 4.	*Pseudomonas*	*fluorescens*	KR922146	100
13b-3	3., 4.	*Pseudomonas*	*graminis*	DQ512786	67
32b-55	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*graminis*	HQ256853	83
32b-60	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*graminis*	HQ256858	100
32b-66	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*graminis*	HQ256863	100
38b-9	2.	*Pseudomonas*	*graminis*	JF706541	79
58b-20	3., 4.	*Pseudomonas*	*graminis*	KR922133	100
59b-25	3., 4.	*Pseudomonas*	*graminis*	KR922157	35
66b-5	3., 4.	*Pseudomonas*	*graminis*	KR922249	20
69b-28	This study	*Pseudomonas*	*graminis*	KR922297	71
69b-35	This study	*Pseudomonas*	*graminis*		15
50b-1	3., 4.	*Pseudomonas*	*grimontii*	KR922067	16
37b-2	2.	*Pseudomonas*	*poae*	JF706533	59
37b-7	This study	*Pseudomonas*	*poae*		100
47b-7	3., 4.	*Pseudomonas*	*reactans*	JN176591	100
48b-2	3., 4.	*Pseudomonas*	*reinekii*		25
59b-38	3., 4.	*Pseudomonas*	*rhizosphaerae*	KR922167	22
71b-5A	This study	*Pseudomonas*	*rhizosphaerae*		65
71b-5B	This study	*Pseudomonas*	*rhizosphaerae*		8
3b-1	1b.	*Pseudomonas*	*syringae*	DQ512737	100
12b-8	1b.	*Pseudomonas*	*syringae*	DQ512783	100
13b-2	1b.	*Pseudomonas*	*syringae*	DQ512785	100
33b-2	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	HQ256867	74
32b-74	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	HQ256872	57
36b-1	2.	*Pseudomonas*	*syringae*	JF706523	13
38b-10	2.	*Pseudomonas*	*syringae*	JF706539	100
32b-31	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	JN176585	< 5
32b-19	This study	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922052	16
48b-5	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922059	32
50b-5	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922071	24
50b-6	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922072	40
50b-7	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922073	100
50b-9	4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922075	25
51b-5	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922080	10
51b-10	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922084	23

Reference number (PDD-)	Publication referring the isolation of the strains	Genus	Species	Accession number	Biodegradation of phenol after 5 days of incubation, %
55b-15	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922097	19
58b-1	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922124	35
58b-2	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922125	100
58b-28	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922139	100
59b-3	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922141	100
59b-5	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922143	45
59b-14	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922151	100
59b-15	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922152	100
59b-16	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922153	33
66b-1	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922246	96
66b-2	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922247	16
69b-2	This study	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922274	10
69b-6	This study	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922278	9
69b-20	This study	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922289	< 5
69b-40	This study	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922303	12
70b-1	This study	*Pseudomonas*	*syringae*	KR922304	11
69b-24	This study	*Pseudomonas*	*syringae*	KR92292	67
59b-2	3., 4.	*Pseudomonas*	*syringae*		72
71b-15	This study	*Pseudomonas*	*syringae*		16
32b-53	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*trivialis*	HQ256851	68
36b-2	2.	*Pseudomonas*	*trivialis*	JF706524	23
37b-8	2.	*Pseudomonas*	*veronii*	JF706536	100
65b-7	This study	*Pseudomonas*	*veronii*	KR922245	33
14b-14	1b.	*Pseudomonas*	*viridiflava*	DQ512797	76
6b-4	1b.	*Pseudomonas*	*sp*	DQ512766	75
14b-2	3.	*Pseudomonas*	*sp*	DQ512788	100
14b-10	1b.	*Pseudomonas*	*sp*	DQ512794	100
25b-5	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	HQ256806	41
27b-3	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	HQ256813	93
31b-4	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	HQ256826	26
32b-42	2., 3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	HQ256842	33
24b-12	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	HQ260323	100
38b-2	2.	*Pseudomonas*	*sp*	JF706540	14
48b-1	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922057	14
48b-10	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922063	17
49b-4	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922066	< 5
50b-2	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922068	33
50b-3	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922069	24
50b-4	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922070	26
50b-8	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922074	100
51b-1	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922077	21
51b-3	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922078	10

Reference number (PDD-)	Publication referring the isolation of the strains	Genus	Species	Accession number	Biodegradation of phenol after 5 days of incubation, %
51b-4	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922079	28
51b-6	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922081	17
51b-7	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922082	14
51b-8	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922083	7
55b-2	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922096	9
57b-1	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922105	12
58b-25	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922137	65
59b-1	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922140	22
59b-4	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922142	44
59b-6	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922144	85
59b-7	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922145	71
59b-10	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922148	15
59b-11	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922149	100
59b-12	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922150	13
59b-17	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922154	100
59b-37	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922166	< 5
59b-40	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922169	16
59b-53	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922175	16
60b-1	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922180	15
60b-12	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922190	100
60b-24	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922197	8
63b-30	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922230	8
67b-19	3.	*Pseudomonas*	*sp*	KR922264	9
69b-1	This study	*Pseudomonas*	*sp*	KR922273	18
69b-13	This study	*Pseudomonas*	*sp*	KR922283	53
69b-25	This study	*Pseudomonas*	*sp*	KR922293	22
69b-34	This study	*Pseudomonas*	*sp*	KR922300	14
69b-38	This study	*Pseudomonas*	*sp*	KR922301	9
2b-15	1a.	*Pseudomonas*	*sp*		100
32b-26	This study	*Pseudomonas*	*sp*		16
32b-34	This study	*Pseudomonas*	*sp*		53
36b-4	This study	*Pseudomonas*	*sp*		13
50b-10	3., 4.	*Pseudomonas*	*sp*		22
71b-16	This study	*Pseudomonas*	*sp*		9
71b-3	This study	*Pseudomonas*	*sp*		12
71b-4	This study	*Pseudomonas*	*sp*		42
77b-1	This study	*Pseudomonas*	*sp*		22
77b-6	This study	*Pseudomonas*	*sp*		17
78b-1	This study	*Pseudomonas*	*sp*		9
23b-26	This study	*Rhodococcus*	*erythropolis*		99
23b-28	This study	*Rhodococcus*	*enclensis*	NOVD00000000	99
23b-25	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	HQ256782	99

Reference number (PDD-)	Publication referring the isolation of the strains	Genus	Species	Accession number	Biodegradation of phenol after 5 days of incubation, %
23b-27	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	HQ256783	99
23b-29	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	HQ256784	< 5
23b-5	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	HQ256785	99
25b-12	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	HQ256803	< 5
29b-2	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	HQ256815	99
30b-2	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	HQ256817	< 5
30b-5	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	HQ256819	< 5
30b-6	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	HQ256820	< 5
31b-2	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	HQ256824	< 5
35b-34	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	JF706515	32
35b-37	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	JF706516	98
35b-43	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	JF706519	92
41b-2	2., 3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	JF706542	98
52b-2	3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	KR922085	29
54b-3	3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	KR922092	98
56b-3	3., 4.	*Rhodococcus*	*sp*	KR922098	98
56b-13	3.	*Rhodococcus*	*sp*	KR922101	99
63b-17	This study	*Rhodococcus*	*sp*	KR922222	99
67b-29	3.	*Rhodococcus*	*sp*		99
73b-5	This study	*Rhodococcus*	*sp*		28
70b-14	This study	*Rhodococcus*	*sp*		98
53b-1	3., 4.	*Moraxella*	*sp*	KR922089	98
5b-17	1b.	*Psychrobacter*	*sp*	DQ512762	67

Table SM2: Number of sequences corresponding to genes involved in phenol degradation affiliated with known bacteria in NCBI database. PH : Phenol hydroxylase, PMO : Phenol monooxygénase, C : catechol database regrouping catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase enzyme genetic sequences, PE : Putative enzymes involved in phenol degradation

Taxonomic affiliation in NCBI of the genetic sequences used			Number of sequences in the four databases				**Total**
Bacterial phylum or class	Genus	Species	PH	PMO	C	PE	
Actinobacteria	*Amycolatopsis*	*japonica*			1		1
		mediterranei	1		3		4
		orientalis			1		1
		vancoresmycina	1		2		3
	Arthrobacter	*aurescens*		2			2
	Corynebacterium	*glutamicum*		2	1		3
		simulans		1			1
		striatum		1			1
	Microbacterium	*maritypicum*		1			1
	Micrococcus	*luteus*		1			1
	Mycobacterium	*smegmatis*			2		2
	Nocardia	*mikamii*			1		1
	Pseudonocardia	*dioxanivorans*	1				1
	Rhodococcus	*aetherivorans*			3		3
		erythropolis	1		2		3
		fascians			2		2
		jostii			5		5
		opacus			1		1
		pyridinivorans			2		2
		ruber	4		5		9
	Streptomyces	*ghanaensis*			2		2
		sp.			2		2
		sviceus			1		1
Bacteroidetes/Chlorobi group	*Capnocytophaga*	*ochracea*				2	2
	Chryseobacterium	*indologenes*				1	1
Chloroflexi	*Chloroflexus*	*aurantiacus*			1		1
Deinococcus-Thermus	*Thermus*	*thermophilus*	1		2		3
Alphaproteobacteria	*Agrobacterium*	*radiobacter*		1	2		3
		tumefaciens			1		1
	Bradyrhizobium	*elkanii*			2	2	4
		genosp.		1	2	2	5
		japonicum		1	3	1	5
	Ensifer	*adhaerens*			3	3	6
	Neorhizobium	*galegae*		1	1		2
	Rhizobium	*etli*			1		1
		leguminosarum			1		1
	Rhodobacter	*sphaeroides*				1	1
	Sphingobium	*japonicum*	3		1		4
	Sphingomonas	*sp.*			1		1

Taxonomic affiliation in NCBI of the genetic sequences used			Number of sequences in the four databases				**Total**
Bacterial phylum or class	Genus	Species	PH	PMO	C	PE	
Betaproteobacteria	*Achromobacter*	*xylosoxidans*				3	3
	Alcaligenes	*faecalis*	4	1	1		6
	Bordetella	*hinzii*				1	1
		holmesii			1		1
	Burkholderia	*cepacia*			2	3	5
		gladioli			1		1
		glumae			1	1	2
		mallei			1		1
		multivorans			2		2
		phenoliruptrix	1		1	1	3
		phymatum		1	1		2
		pseudomallei			1		1
		ubonensis			2		2
		xenovorans			1		1
	Caballeronia	*zhejiangensis*		1	4		5
	Comamonas	*testosteroni*	4	2	1		7
	Cupriavidus	*metallidurans*	6	2	4	1	13
		taiwanensis			1		1
	Delftia	*acidovorans*			1		1
	Herbaspirillum	*seropedicae*			4	2	6
	Ralstonia	*eutropha*	4	1	2	1	8
		pickettii	6	1	2		9
		solanacearum				1	1
	Variovorax	*paradoxus*			1		1
Gammaproteobacteria	*Acinetobacter*	*baylyi*			1		1
		bereziniae	4		5	1	10
		gyllenbergii			1	1	2
		johnsonii	2	1	3	1	7
		lwoffii			1		1
		oleivorans	4	1	1	1	7
		pittii	3	5	1		9
		radioresistens			1		1
		schindleri			2		2
		soli			1		1
		sp.	1				1
		ursingii				1	1
		venetianus			1		1
	Enterobacter	*aerogenes*			1		1
	Francisella	*tularensis*	1				1
	Klebsiella	*oxytoca*			1		1
		pneumoniae			1		1
	Leclercia	*adecarboxylata*			1		1
	Legionella	*pneumophila*	1				1
	Pantoea	*rwandensis*			1		1

Taxonomic affiliation in NCBI of the genetic sequences used			Number of sequences in the four databases				**Total**
Bacterial phylum or class	Genus	Species	PH	PMO	C	PE	
Gammaproteobacteria	*Pluralibacter*	*gergoviae*			3		3
	Proteus	*vulgaris*	1				1
	Pseudomonas	*aeruginosa*			2		2
		alkylphenolia	4		2	1	7
		fluorescens			4	3	7
		fragi			3		3
		knackmussii	4	1	1		6
		protegens			2		2
		putida			1		1
		sp.			1		1
		stutzeri			3		3
	Stenotrophomonas	*maltophilia*	1				1
	Vibrio	*fischeri*	1				1
	Xanthomonas	*albilineans*	1			1	2
		arboricola				2	2
		axonopodis	1				1
		campestris	1				1
		oryzae	1				1
		translucens	1				1
Firmicutes	*Bacillus*	*amyloliquefaciens*			1		1
		atrophaeus			1		1
		licheniformis			1		1
		subtilis			1		1
	Enterococcus	*casseliflavus*			1		1
	Geobacillus	*thermoglucosidasius*			2		2
	Paenibacillus	*polymyxa*			1		1
Number	**50**	**109**	**69**	**29**	**145**	**38**	**281**

Table SM3: Comparison of data obtained for *Pseudomonas syringae* strains in this study and in Berge *et al.* (2014).

Number of *Pseudomonas syringae* strains	**Phenol or catechol degradation**		**Ice Nucleation Active (INA+)**		**Reference**
	Number of strains	%	Number of strains	%	
35 (Total)	33	94.3	20	57.1	This study
33 (Phenol degraders)	33	100	19	57.6	This study
763 (Total)	98	12.8	496	65.0	Berge *et al.* (2014)
98 (Phylogroups I and III Catechol operons)	98	100	32	32.7	Berge *et al.* (2014)

Table SM4: Number of sequences corresponding to genes involved in phenol production (toluene monooxygenase) affiliated with known bacteria in NCBI database.

Taxonomic affiliation in NCBI of the genetic sequences used			Number of sequences
Bacteria phylum/class	**Genus**	**Species**	
Actinobacteria	*Frankia*	*sp*	3
	Pseudonocardia	*dioxanivorans*	1
Alphaproteobacteria	*Phaeobacter*	*gallaeciensis*	2
Betaproteobacteria	*Bordetella*	*holmesii*	3
	Caballeronia	*udeis*	3
	Cupriavidus	*metallidurans*	3
		taiwanensis	3
	Ralstonia	*pickettii*	2
Number	**7**	**8**	**20**

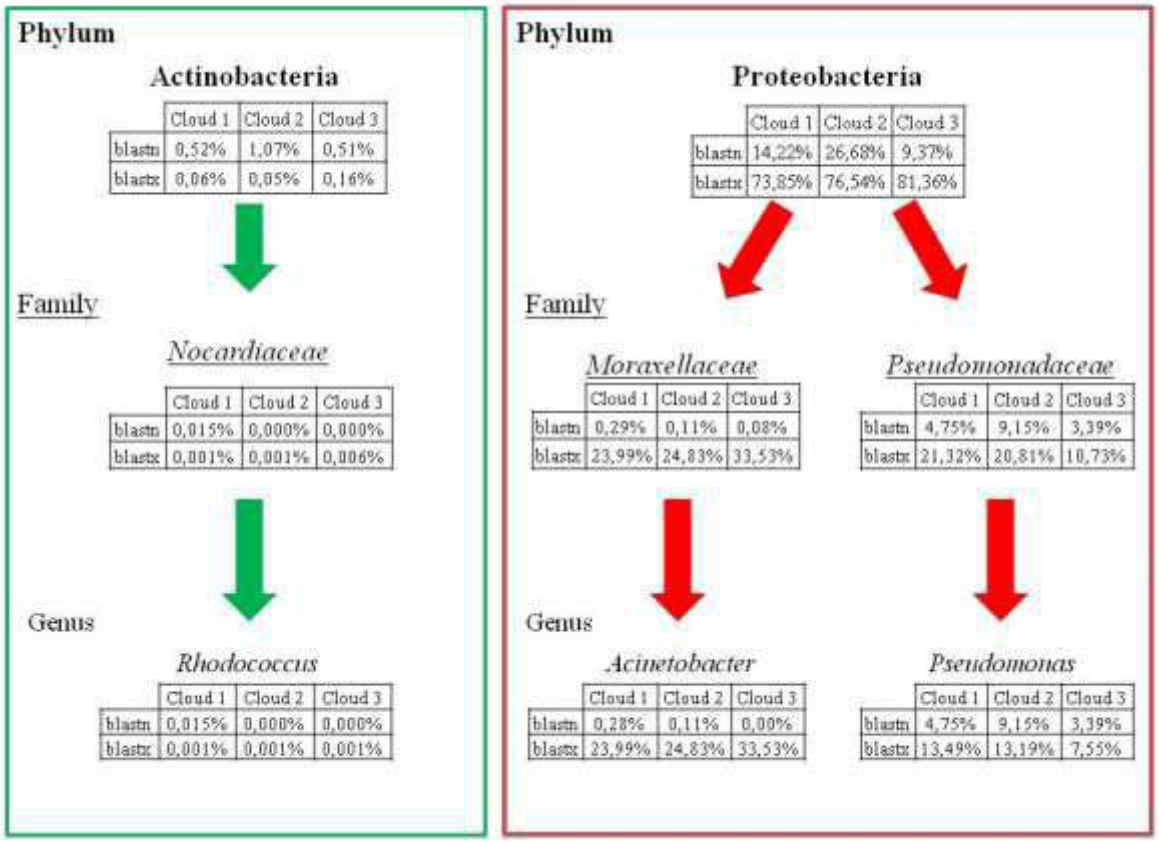


Figure SM3: Relative abundance of target species with metatranscriptomic sequences enriched in prokaryote mRNA.

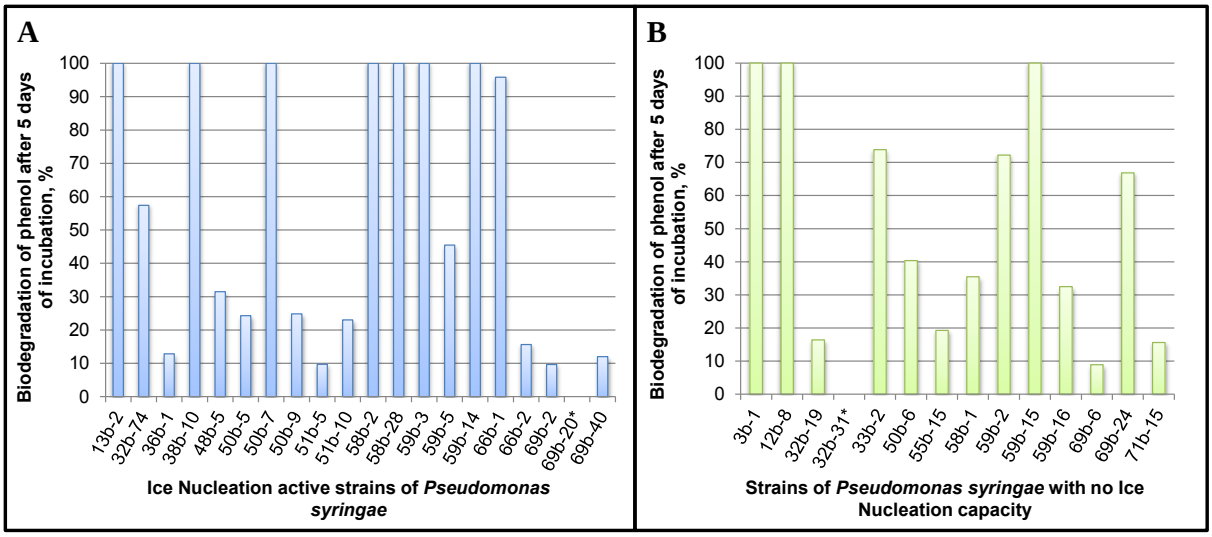


Figure SM4: Percentage of phenol biodegradation by *Pseudomonas syringae* strains with Ice Nucleation activity (A) or without Ice Nucleation capacity (B) (T > -8°C). Ice nucleation activity was measured as described in Joly *et al.* (2013). Ice nucleation activities of strains PDD-13b-2, PDD-32b-74, PDD-36b-1 and PDD-38b-10 were previously published in Joly *et al.* (2013). One strain was not analyzed (PDD-70b-1). * Phenol degradation rate was below 5%.

II. 2. Conclusion

Afin d'étudier pour la première fois le potentiel des microorganismes des nuages à dégrader le phénol, nous avons dans un premier temps dosé ce composé dans l'eau de nuage. Il est présent dans les 5 échantillons de nuages, à des concentrations allant de 0,0016 à 0,0079 µM (correspondant à 0,15 et 0,74 $\mu g.L^{-1}$). Deux approches différentes ont été mises en place pour estimer son potentiel de biodégradation dans les nuages :

- Une approche métatranscriptomique a permis de mettre en évidence la présence de transcrits de gènes codant pour des protéines impliquées dans la voie de dégradation du phénol. Ceci permet d'affirmer que ces gènes sont exprimés au sein de la phase aqueuse du nuage. Les ARNm ne peuvent pas provenir de l'aérosolisation car leur temps de vie est en moyenne de quelques minutes (Picard *et al.*, 2009; Rauhut and Klug, 1999). Les transcrits retrouvés codent pour les enzymes phénol hydrolase, phénol monooxygénase et catéchol-1,2-dioxygénase. Aucun transcrit impliqué dans la voie de dégradation extradiol n'a été trouvé. Ceci est cohérent avec la littérature car cette voie n'est active que pour des concentrations en phénol plus élevées (Sandhu *et al.*, 2009). Une variation au cours du temps des transcrits est visible, dans le premier échantillonnage d'eau de nuage où seules 70 séquences sont similaires à notre base de données alors que pour les 2 autres plus de 100 séquences sont retrouvées. De manière surprenante, les 457 hits (en regroupant les 3 échantillonnages) sont similaires aux séquences génétiques affiliées à seulement 4 organismes dans NCBI : 3 espèces du genre *Acinetobacter* et 1 espèce du genre *Pseudomonas*. Les séquences appartenant au genre *Acinetobacter* sont celles ayant le plus de hits, celles affiliées au genre *Pseudomonas* appartiennent uniquement aux transcrits impliqués dans la dégradation intradiol du catéchol.
- Pour vérifier la capacité de dégradation de ces genres bactériens, un screening a été fait sur des souches isolées à partir d'eau de nuage. Il a permis de mettre en évidence que la plupart des souches testées étaient à même de dégrader le phénol (93%) sur une période de 5 jours à 17°C. Parmi les deux genres testés (*Pseudomonas* et *Rhodococcus*, genres possédant plus de trois souches) aucune différence significative n'a été vue dans la capacité de dégradation du phénol. La famille des *Acinetobacter*, Moraxellaceae, comprenant uniquement deux souches cultivables n'a pas pu être étudiée plus en détail.

En complément avec les résultats de la publication, la capacité des souches à pousser avec comme seule source de carbone le phénol a été testée. Pour cela, elles ont toutes été cultivées en milieu gélosé comprenant du milieu minimum avec 1 mM de phénol. Après 14 jours d'incubation à 17°C, la présence visible de colonie est observée.

Tableau 22 : Capacité des souches du genre *Pseudomonas* et *Rhodococcus* et celle de la famille des Moraxellaceae à pousser avec le phénol pour seule source de carbone. Les colonies ont été mises en culture en milieu minimum avec 1 mM de phénol.

Genres ou Famille bactériens/ne	Nombre de souches formant des colonies visibles à l'œil nu	Nombre de souches ne présentant aucune colonie	Total
Pseudomonas	42	77	119
Rhodococcus	21	0	21
Moraxellaceae	1	1	2

Ici seules 21 souches du genre *Rhodococcus* ont été testées. Toutes croissent sans problème sur ce milieu, elles peuvent donc minéraliser le phénol et ne se contentent pas seulement de le dégrader. Celles du genre *Pseudomonas* sont moins efficaces pour minéraliser ce composé, uniquement 35% d'entre elles croissent. Parmi la famille des Moraxellaceae, *Psychrobacter sp* est visible à l'œil nu au bout de 15 jours par contre aucune souche n'est présente pour *Moraxella sp.* La capacité à croitre sur phénol n'est pas corrélée avec les pourcentages de dégradation calculés ci-dessus. En effet, *Moraxella sp* dégrade 98% de 0,1 mM de phénol en 5 jours par contre elle ne croit pas sur boite en milieu minimum, à l'inverse *Pseudomonas sp* PDD-59b-37 ne dégrade pas le phénol en 5 jours mais des colonies sont présentes sur la boite de Pétri.

Ainsi les microorganismes dans l'eau de nuage sont potentiellement capables de dégrader le phénol. Dans un premier temps, les souches collectées dans les nuages sont en grande partie aptes à dégrader le phénol, une partie plus faible d'entre elles est même capable d'utiliser ce composé comme seule source de carbone. De plus, des transcrits codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de ce composé ont été trouvés *in situ* dans l'eau de nuage. La question se pose alors de savoir si cette dégradation est compétitive avec la chimie radicalaire. L'impact de ces deux processus de dégradation peut être estimé en comparant les vitesses de biodégradation du phénol par différents microorganismes aux vitesses de dégradation du phénol par les radicaux ($^{\bullet}OH$ et $NO_3^{\bullet}$). Ceci permettrait de mieux comprendre le devenir de ce polluant dans l'atmosphère et le rôle des microorganismes dans la phase aqueuse du nuage. En effet, l'implication de ceux-ci dans la dégradation de polluant pourrait impliquer qu'ils participent à la remédiation naturelle de l'atmosphère.

III. Vers une évaluation quantitative de l'impact relatif des voies photochimiques et biologiques sur la dégradation du phénol

Dans les eaux atmosphériques, les microorganismes ont un impact sur les composés carbonés, notamment l'acétate, le formate et le succinate. Cet impact peut même être compétitif vis-à-vis de la chimie radicalaire et devenir prépondérant la nuit dans le cas de nuages chauds (Vaïtilingom *et al.*, 2010). Précédemment, nous avons vu que ces microorganismes pouvaient jouer un rôle dans la dégradation du phénol. Une étude des cinétiques de dégradation du phénol par les 135 souches actives détectées lors du screening précédent demanderait énormément de temps ; nous nous sommes donc focalisés sur la souche la plus efficace : *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 ; ce genre est bien connu pour ses capacités de dégradation des composés aromatiques (Auffret *et al.*, 2015; Margesin *et al.*, 2005; Martinkova *et al.*, 2009).

Cette souche a été collectée le 13 décembre 2007 dans un nuage de type continental provenant du Nord-Est. Elle a ensuite été isolée et conservée en culture pure dans la souchothèque. Lors du screening, elle s'est révélée particulièrement active pour dégrader le phénol. En effet, la concentration en phénol a été mesurée pour plusieurs temps : 0, 1, 2 et 5 jours. Les points intermédiaires n'ont pas été présentés dans la publication car l'objectif était seulement de donner un aperçu de la possibilité de dégradation. Cette souche est une des rares à avoir totalement dégradé le phénol en 24 heures (5 autres souches du genre *Rhodococcus* en ont été capables). De plus, pour cette souche, des colonies bactériennes ont commencé à être visibles sur boite de pétri (milieu minimum gélosé + 1 mM de phénol) à partir de seulement 5 jours d'incubation à 17°C. Au vu de ces bons résultats, elle a été étudiée plus en détail.

Dans un premier temps, son génome a été séquencé pour permettre la caractérisation de la souche et la recherche des gènes impliqués dans la dégradation du phénol. Puis les cinétiques de dégradation abiotique et biotique du phénol ont été réalisées à l'obscurité (3 expériences) et à la lumière (1 expérience). Certaines enzymes impliquées dans la dégradation du phénol ont besoin de fer pour fonctionner, de plus dans des travaux précédents un impact du fer sur la dégradation de composés aromatiques avait déjà été démontré chez une autre souche de *Rhodococcus*. Dans les thèses de Bunescu (en 2006) et Chorao (en 2008), les systèmes combinant la lumière, le fer complexé (avec du NTA ou de l'EDDS) et la bactérie *Rhodococcus*

rhodochrous se sont avèrés les plus efficaces pour dégrader des dérivés du benzothiazole (composé possédant un cycle benzénique accolé à un cycle thiazole). Dans ce système, le fer servait de photo-inducteur, il aidait ainsi la dégradation du composé, et était internalisé par la bactérie sous forme de complexe Fe(III)-NTA ou Fe(III)-EDDS. Chez ce microorganisme, le Fe(III) était réduit en Fe(II) au sein de la cellule ce qui permettait l'activation d'oxygénases impliquées dans la dégradation du composé aromatique. Certaines voies de dégradation du benzothiazole sont communes à celles du phénol (formation du catéchol et sa transformation), ainsi l'impact du fer sur la dégradation du phénol par *Rhodococcus enclensis* a également été exploré. Les vitesses de dégradation ont été calculées et ont été comparées aux vitesses théoriques de dégradation calculées pour les radicaux hydroxyles et nitrates, ceci afin d'estimer la contribution relative des voies photochimiques et biologiques sur la dégradation du phénol dans les nuages.

III. 1. Matériel et Méthodes

La souche *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 provenant de la souchothèque a été mise en culture 3 jours à 17°C sur une boite de pétri comprenant du milieu R2A. Ensuite, elle a été ensemencée en milieu liquide R2A supplémenté avec 0,1 mM de phénol et incubée 48 heures, sous agitation (130 rpm) à 17°C. Un étalement sur une boite de Pétri contenant du milieu minimum avec 1 mM de phénol a alors été réalisé et incubé à 17°C pendant 5 jours. Elle a ensuite été conservée à 4°C, toutes les cultures suivantes ont été faites à partir d'elle.

III. 1. 1) Séquençage de la souche *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28

Rhodococcus enclensis a été cultivée dans 200 mL de R2A liquide à 17°C sous agitation (130 rpm). La culture a été divisée en 3 parties, centrifugées 15 min à 4 000 rpm et à 5°C afin d'obtenir les culots bactériens. L'ADN a été extrait à l'aide du kit DNeasy® Power Water® de Qiagen. Dans un premier temps, les cellules sont re-suspendues dans 1 mL de solution de lyse chauffée (PW1). Ce mélange est transféré dans un tube contenant des billes de 0,15 mm de diamètre. L'agitation pendant 5 minutes permet de casser les cellules bactériennes. Le broyat cellulaire est récupéré après une centrifugation pour culoter les billes (4 000 rpm pendant 1 minute) et transféré dans un tube propre. Une autre étape de centrifugation plus rapide permet d'enlever le maximum d'impureté (13 000 rpm, 1 minute). Par la suite, après transfert du surnageant dans un tube propre, plusieurs étapes de lavage et de filtration vont être faites, entrecoupées par des centrifugations de 13 000 rpm pendant 1 minute. Celles-ci débutent dans un premier temps par la mise en contact de l'échantillon avec une solution d'élimination des inhibiteurs (200 µL d'une solution nommée IRS) et une incubation à 4°C pendant 5 minutes. Après transfert du surnageant, 650 µL d'une solution tampon (PW3) sont ajoutés à l'échantillon, suite à une agitation de l'échantillon ce mélange est filtré sur une colonne (MB Spin Column) grâce à une centrifugation. Le même processus est fait avec un autre tampon (PW4) et avec de l'éthanol. Après une étape supplémentaire de centrifugation (de 2 minutes à 13 000 rpm), 100 µL de la solution d'élution (EB) et une centrifugation de 1 minute à la même vitesse permet de récupérer l'ADN purifié.

La quantification et la vérification de la pureté des 3 réplicats d'ADN (mesure des rapports 260/280 et 260/230) ont été réalisées grâce à un spectrophotomètre BioSpec-nano (Shimadzu corporation) guidé par le logiciel informatique du même nom en utilisant la fonction dsDNA (Sukumaran, 2011).

Tableau 23 : Quantification des ADN extraits

Répliquats	[ADN], ng.µL^{-1}	Ratio 260/280	Ratio 260/230
1	862,62	1,97	2,09
2	791,25	1,96	2,19
3	1 123,03	1,81	1,96

Les échantillons ont ensuite été regroupés et envoyés pour séquençage à MR DNA (Molecular Research), à Shallowater aux États-Unis. La totalité du génome est séquencé grâce à un séquenceur Illumina MiSeq après avoir préparé le génome en amont en suivant les instructions du kit de préparation des échantillons d'ADN Nextera (Illumina, San Diego, États-Unis). Les séquences obtenues ont été filtrées en fonction de leurs qualités (logiciel FastQC ; Andrews, 2010) puis elles ont été coupées par le logiciel Prinseq-Lite (Schmieder and Edwards, 2011). Après avoir été assemblé avec le logarithme SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012), le génome a été annoté en utilisant le serveur RAST (http://rast.nmpdr.org).

III. 1. 2) Photo- et biodégradation du phénol en présence ou en absence de fer

III. 1. 2. 1 – Préparation des cellules

Afin d'obtenir assez de matériel biologique, 3 étapes de culture de *Rhodococcus enclensis* dans du milieu R2A supplémenté avec 0,1 mM de phénol sont nécessaires. Toutes ces étapes comprennent une incubation de 48 heures à 17°C avec une agitation de 130 rpm. Dans un premier temps, un ensemencement à l'aide d'une öse est réalisé dans 5 mL de milieu R2A, puis 0,5 mL de cette culture sont incubés dans 25 mL du même milieu. Ceci permet d'obtenir un volume suffisant pour ensemencer, à 2 %, les 2,5 Erlenmeyers de 500 mL (comprenant 100 mL de R2A à 0,1 mM de phénol) nécessaires pour chaque condition biotique.

Après avoir incubé les cellules à 17°C pendant 48 heures et sous agitation, elles sont lavées afin d'éliminer toutes les sources de carbone présentes dans le milieu R2A. Pour cela, le contenu des Erlenmeyers est réparti dans les pots de centrifugation, 1 mL est prélevé afin de vérifier l'homogénéité des cultures en mesurant le pH (avec un pH-mètre MP225 de Mettler) et la DO à 600 nm (en utilisant un spectrophotomètre UV3100 de UVisco). Afin de culoter les cellules, une centrifugation à 8 000 rpm pendant 15 min à 4°C est réalisée, le surnageant est éliminé et le culot est repris avec 100 mL de NaCl à 0,8%. Les cellules re-suspendues sont de

nouveau centrifugées comme précédemment. Le même processus est réalisé avec 100 mL d'eau de Volvic®.

III. 1. 2. 2 – Incubations

Les incubations abiotiques et biotiques sont réalisées dans une solution de 0,1 mM de phénol dans de l'eau de Volvic®. Cette solution est au préalable filtrée en condition stérile avec un filtre PES 0,22 µm (Polyethersulfone, 28 mm de diamètre, membrane de type 16532-k, Sartorius Stedium biotech, Allemagne). Cette solution est complémentée avec 0,5 mM du complexe Fe-EDDS pour mesurer l'impact du fer sur la dégradation du phénol, ce complexe a déjà été utilisé pour former les radicaux hydroxyles dans la partie 1 des résultats. Brièvement, une solution équimolaire de $FeCl_3$, $6H_2O$ et d'acide EthylèneDiamine-N-N' Disuccinique est préparée. Après avoir laissé le complexe se former à l'abri de la lumière, son pH est ajusté à 6 et sa concentration est calculée grâce à la mesure de son absorbance à 293 nm au spectrophotomètre (ε : 8 400 $M^{-1}.cm^{-1}$, Huang, 2012).

Les incubations au noir se font dans des Erlenmeyers bruns alors que celles nécessitant la lumière sont réalisées dans des photo-bioréacteurs. La Figure 44 présente un exemple d'incubation, le détail des photo-bioréacteurs est présenté dans la publication Vaïtilingom *et al.* (2013).

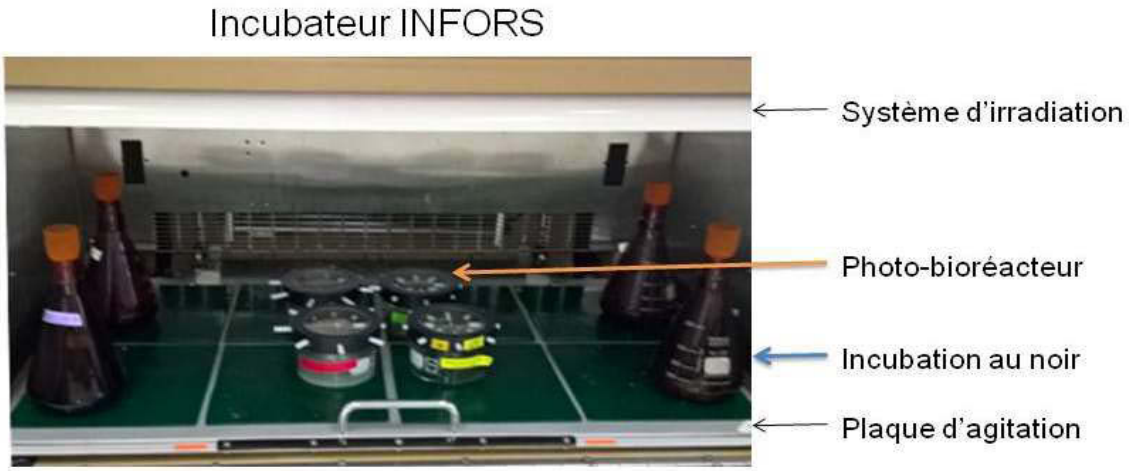


Figure 44 : Présentation du système d'incubation utilisé

Ces incubations sont réalisées dans un incubateur (Infors®) à 17°C avec une agitation de 130 rpm. Ce système permet également l'irradiation. Ci-dessous est représentée l'intensité du système lumineux au sein de l'Infors® équipé de lampes Sylvania Reptistar® de 15 W. Le flux actinique est comparé à celui mesuré au sein d'un nuage au puy de Dôme.

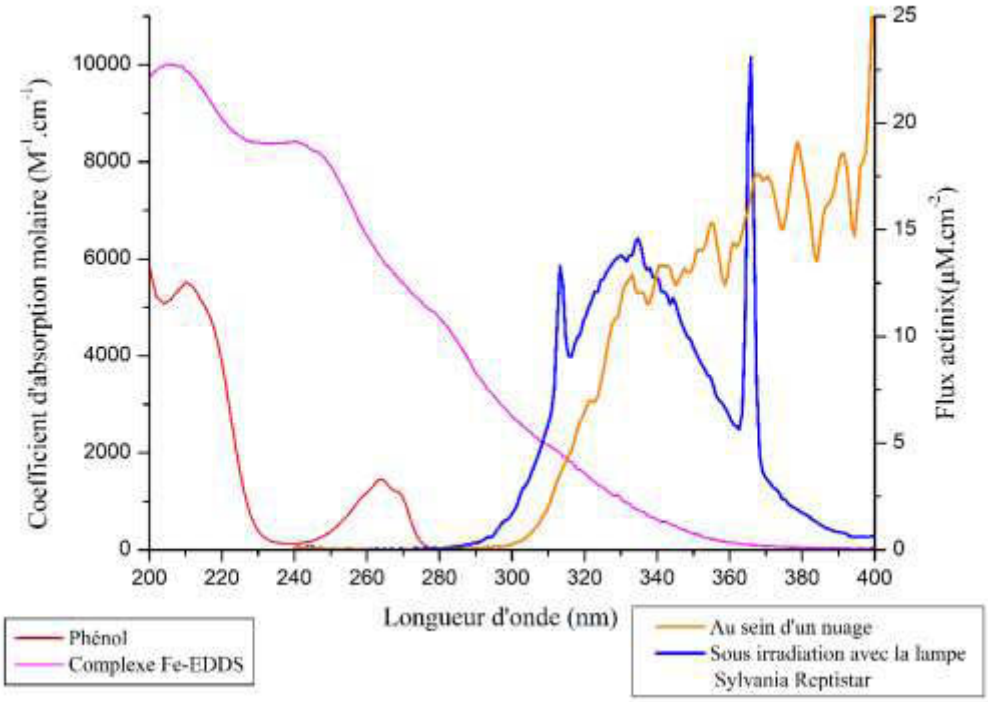


Figure 45 : Flux actinique de notre système d'irradiation (en bleu) **comparé à celui mesuré dans un nuage** (en jaune). Les spectres d'absorption du phénol (en rouge) et du complexe Fe-EDDS (en rose) sont aussi indiqués.

En présence ou en absence de lumière, les trois expériences comprennent 4 conditions :

- Une condition abiotique sans fer constituée de 0,1 mM de phénol dans de l'eau de Volvic®
- Une condition biotique sans fer : 0,1 mM de phénol avec 10^9 cellules de *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28.mL^{-1}.
- Une condition abiotique avec fer : 0,1 mM de phénol + 0,5 mM de Fe-EDDS
- Une condition biotique avec du fer : 0,1 mM de phénol avec 10^9 cellules de *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28.mL^{-1} + 0,5 mM de Fe-EDDS.

Un suivi de la dégradation du phénol est réalisé au cours du temps, toutes les demi-heures pendant 6 heures et après 7 heures d'incubation. La densité optique, le pH et le dénombrement des cellules sont mesurés au début et à la fin de l'expérience. A chaque temps, 1 mL est prélevé, centrifugé à 12 500 rpm pendant 3 minutes, 970 µL du surnageant sont alors prélevés et congelés en attendant les analyses.

Le ratio au sein du nuage entre la concentration en phénol et le nombre de cellules est conservé dans ces expériences. En revanche, le fer est moins concentré que dans le nuage mais le ratio entre la concentration en composé aromatique et celle du fer complexé est le même que dans

les expériences de Chorao (2008) qui avait constaté une internalisation du fer par *Rhodococcus rhodochrous* lors de la biodégradation du 2-aminobenzothiazole.

III. 1. 2. 3 – Techniques analytiques

Le phénol est dosé par HPLC comme décrit dans la publication « POTENTIAL FOR PHENOL BIODEGRADATION IN CLOUD WATERS ». Chaque échantillon est pré-filtré avec des filtres H-PTFE (0,2 µm de taille de pores et 13 mm de diamètre, Macherey-Nagel). L'appareil utilisé est un Hitachi chromaster avec un détecteur DAD (barrettes de diodes), il est piloté par le logiciel Chromaster Software. L'analyse s'effectue en injectant 50 µL d'échantillon sur une colonne en phase inverse (Lichrospher® RP-18, 150 mm - 4,6 mm, 5 µm, 100 Å). La phase mobile est composée de 25% d'acétonitrile et 75% d'eau filtrée (grâce à des filtres membranes Durapore® de 0,45 µm de type HVLP) et le débit est de 1,2 $mL.min^{-1}$. Chaque analyse dure 10 minutes et la détection se fait à une longueur d'onde de 272 nm.

III. 1. 3) Calcul des vitesses de dégradation du phénol dans les nuages

Dans un premier temps, les vitesses de dégradation maximales du phénol sont calculées pour toutes les conditions présentées ci-dessus. Pour les calculer, la constante de vitesse de pseudo-ordre 1 ($k_{\text{Phénol}}$) est déterminée :

$$\ln\left(\frac{C_F}{C_0}\right) = f(t) = -\,k_{\text{Phénol}} \times t$$

Concrètement, les concentrations obtenues sont normalisées par la concentration initiale (C_F/C_0) puis à ce rapport est appliquée une fonction logarithmique. Une régression linéaire de ces points en fonction du temps permet l'obtention du coefficient de vitesse ($k_{\text{Phénol}}$). Le coefficient de vitesse est calculé sur la pente la plus forte. Un exemple issu de la première expérience réalisée au noir à 17°C est présenté dans la Figure 46.

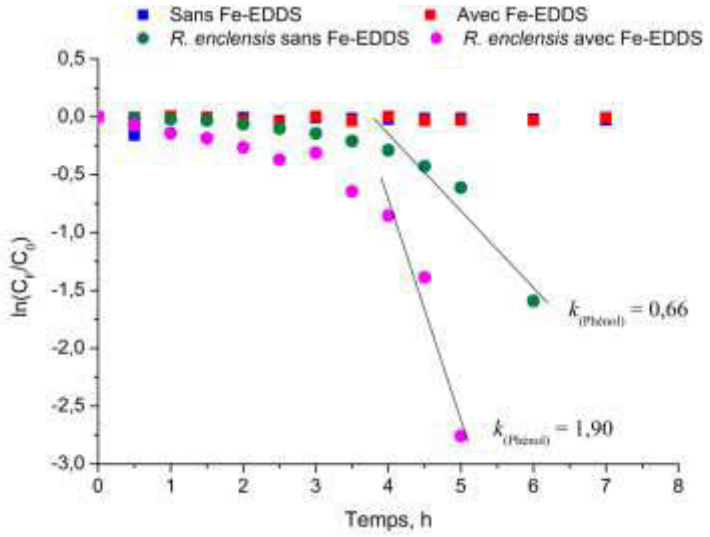


Figure 46 : Détermination des coefficients de vitesse $k_{Phénol}$. Ils sont calculés par la pente de la droite $\ln(C_F/C_0) = f(t)$. L'expérience présentée ici est réalisée à l'obscurité.

Ce coefficient n'est pas une constante de biodégradation car cette valeur n'est pas extrapolable. Elle est considérée, ici, comme une constante de réactivité mais elle prend en compte la réactivité globale de la cellule, pas uniquement une réaction enzymatique. En effet, la présence d'un temps de latence laisse entendre qu'il est nécessaire d'avoir une induction de la transcription des gènes avant la dégradation.

Une fois celle-ci obtenue, la vitesse de biodégradation du phénol ($V_{Phénol}$) est calculée par la fonction suivante :

$$V_{Phénol} = \frac{(k_{Phénol} \times [Phénol]_{initiale})}{N}$$

Où le coefficient de vitesse de biodégradation du phénol ($k_{Phénol}$) est exprimé en h^{-1} ; la concentration initiale en phénol en $mol.L^{-1}$ et le nombre de cellules (N) en $cellules.L^{-1}$. La vitesse de biodégradation du phénol ($V_{Phénol}$) est donc exprimée en $mol.cellule^{-1}.h^{-1}$.

Une fois les vitesses de biodégradation maximales obtenues ($V_{Phénol}$), elles vont servir à estimer des vitesses de biodégradation du phénol dans le nuage ($V_{Phénol,\ nuage}$) *via* l'équation suivante :

$$V_{Phénol,\ nuage} = V_{Phénol} \times N_{nuage}$$

Où la vitesse de biodégradation du phénol ($V_{Phénol}$) est en $mol.cellule^{-1}.h^{-1}$ et le nombre de cellules (N_{nuage}) est de $6{,}81 \times 10^{7}$ $cellules.L^{-1}$ (valeur moyenne du nombre de bactéries mesuré

pendant 10 ans dans les nuages récoltés au puy de Dôme ; Vaïtilingom *et al.*, 2012). Donc la vitesse de biodégradation du phénol dans le nuage ($V_{Phénol,\ nuage}$) est exprimée en $mol.L^{-1}.h^{-1}$.

Celles-ci vont être comparées aux vitesses théoriques de dégradation radicalaire du phénol avec les deux radicaux : le radical hydroxyle et le radical nitrate. Pour les radicaux hydroxyles, la constante de réactivité utilisée est celle inscrite dans le modèle de chimie atmosphérique CAPRAM 3.0 (Herrmann *et al.*, 2010). Celle des radicaux nitrates a été référencée par Barzaghi and Herrmann, 2002. Ces constantes sont les suivantes :

$$k_{Phénol,\ ^{\bullet}OH} = 1{,}9 \times 10^{9}\ M^{-1}.s^{-1}$$
$$k_{Phénol,\ NO_3^{\bullet}} = 1{,}8 \times 10^{9}\ M^{-1}.s^{-1}$$

Les vitesses de dégradation radicalaire du phénol dans les nuages ($V^{\bullet}_{Phénol,\ nuage}$) vont donc être calculées en multipliant les constantes de réactivité par la concentration moyenne en phénol mesurée dans le nuage (résultat de la sous-partie II) et la concentration en radical.

$$V^{\bullet}_{Phénol,\ nuage} = k_{Phénol,Radical} \times [Radical] \times [Phénol]$$

où $V^{\bullet}_{Phénol,\ nuage}$ en $mol^{-1}.h^{-1}$; [Radical] et [Phénol] en $mol.L^{-1}$ et $k_{Phénol,Radical}$ en $L.mol^{-1}.h^{-1}$

Les concentrations des radicaux issues des modèles et celles mesurées au cours de cette thèse (uniquement pour le radical hydroxyle) vont être comparées :

- Dans le premier cas, les concentrations sont issues du modèle de chimie atmosphérique CAPRAM 3.0 (Herrmann *et al.*, 2010). Les concentrations obtenues pour le radical hydroxyle et le radical nitrate pour les 3 types de nuages sont indiquées dans Tableau 24.

Tableau 24 : Concentration des radicaux provenant du modèle de chimie atmosphérique CAPRAM 3.0 (d'après Herrmann *et al.*, 2010)**.**

Concentration en radicaux, M	Nuage pollué	Nuage continental	Nuage marin
$NO_3^{\bullet}$	$1{,}4 \times 10^{-13}$	$5{,}1 \times 10^{-15}$	$6{,}9 \times 10^{-15}$
$^{\bullet}OH$	$3{,}5 \times 10^{-15}$	$2{,}2 \times 10^{-14}$	$2{,}0 \times 10^{-12}$

- Dans le deuxième cas, les valeurs de radicaux hydroxyles proviennent de nos expérimentations. La concentration utilisée est la moyenne des concentrations en radicaux hydroxyles à l'état stationnaire mesurées dans les nuages filtrés. Deux types de nuages ont été mesurés dans nos expérimentations (marin et continental).

Ces moyennes sont 4,46 ± 1,65 x 10^{-16} M pour un nuage de type marin (3 eaux de nuage mesurées) et 6,65 ± 3,31 x 10^{-16} M pour un nuage de type continental (2 mesures). Les concentrations utilisées pour l'ion nitrate sont celles calculées par le modèle CAPRAM 3.0 (Tableau 24) puisqu'aucune mesure de $NO_3^{\bullet}$ n'est disponible.

III. 2. Résultats

III. 2. 1) Les gènes impliqués dans la dégradation du phénol

Dans la publication « POTENTIAL FOR PHENOL BIODEGRADATION IN CLOUD WATERS », des transcrits de gènes codant pour des protéines impliquées dans la voie de dégradation du phénol ont été identifiés dans le nuage. De plus, *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 dégrade rapidement et efficacement le phénol en conditions de laboratoire. Afin de mieux caractériser les gènes impliqués dans cette dégradation, le génome de cette souche a été séquencé et annoté. Ce travail a été publié dans Genome Announcements, « DRAFT GENOME SEQUENCE OF *RHODOCOCCUS ENCLENSIS* 23b-28, A MODEL STRAIN ISOLATED FROM CLOUD WATER ». A. Lallement, L. Besaury, B. Eyheraguibel, P. Amato, M. Sancelme, G. Mailhot and A.M. Delort.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | genomeAnnouncements™

PROKARYOTES

Draft Genome Sequence of *Rhodococcus enclensis* 23b-28, a Model Strain Isolated from Cloud Water

A. Lallement, L. Besaury, B. Eyheraguibel, P. Amato, M. Sancelme, G. Mailhot, A. M. Delort

Université Clermont Auvergne, CNRS, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France

ABSTRACT The whole genome of *Rhodococcus enclensis* 23b-28, a bacterial strain isolated from cloud water, was sequenced. This microorganism is equipped with genes able to degrade aromatic compounds and could thus play a role in complex organic matter decomposition in cloud water.

Received 25 September 2017 **Accepted** 2 October 2017 **Published** 26 October 2017

Citation Lallement A, Besaury L, Eyheraguibel B, Amato P, Sancelme M, Mailhot G, Delort AM. 2017. Draft genome sequence of *Rhodococcus enclensis* 23b-28, a model strain isolated from cloud water. Genome Announc 5:e01199-17. https://doi.org/10.1128/genomeA.01199-17.

Copyright © 2017 Lallement et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to A. M. Delort, a-marie.delort@uca.fr.

Phenol can be found in all environmental compartments (soil and water), including the atmosphere (1, 2). Due to its high volatility, phenol is present in the gas phase, but this compound can also be transferred to the aqueous phase of the atmosphere (rain, snow, and clouds) thanks to its solubility (defined by Henry's law constant). The degradation of organic matter in cloud water occurs through photochemical reactions due to solar light, but also through enzymatic reactions performed by viable microorganisms (3) that can survive in clouds despite the numerous stresses they encounter (oxidative, radiative, and osmotic stresses) (4). Among the different strains isolated from cloud water from the Puy de Dôme station (1,465 m above sea level, France) the strain *Rhodococcus enclensis* 23b-28 was one of the most efficient for phenol degradation. This strain has been isolated aerobically, has the ability to develop at low temperature (17°C), and can produce biosurfactants (5). To further understand the specificities of this strain, its ability to degrade aromatic compounds, its presence, and the implications for cloud biochemistry, its whole genome was sequenced. Whole-genome shotgun sequencing (2 × 150 bp) was prepared using the Nextera DNA sample preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's user guide, and sequencing was done on an Illumina MiSeq sequencer (MR DNA, Shallowater, TX, USA). Sequence data files were filtered for quality using FastQC (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), trimmed using Prinseq-Lite (6), and *de novo* assembled with SPAdes (7). A total of 118 contigs were generated, with an average coverage of 23.1-fold. The average contig size was 61,133 bp, and the N_{50} contig size was 158,305 bp. The size of the assembled genome is 7,213,744 bp, with a GC content of 62.3% (this is a low value for *R. enclensis*, for which the GC content is 66.9% [8], but it is in the range of those obtained for *Rhodococcus* species in general, at 62 to 69% [9]). The RAST annotation server was used for annotating the draft genome of *Rhodococcus enclensis* 23b-28 (http://rast.nmpdr.org). It contains 59 RNAs and 6,755,000 protein-coding genes, of which 34% were assigned to a total of 2,367 subsystems; among those, 96 were affiliated with aromatic degradation. Genetic sequences affiliated with enzymes involved in benzoate degradation were found, along with the two degradation pathways for catechol (ortho- and meta-). This information allows us to think that *Rhodococcus enclensis* 23b-28 can play a role in the degradation of aromatic compounds in clouds.

Accession number(s). This whole-genome shotgun project has been deposited in the GenBank database under the accession number NOVD00000000.

Downloaded from http://genomea.asm.org/ on February 6, 2018 by guest

ACKNOWLEDGMENT

This study was funded by the project BIOCAP, supported by the French National Research Agency (ANR).

REFERENCES

1. Atkinson R, Aschmann SM, Arey J. 1992. Reactions of OH and NO_3 radicals with phenol, cresols, and 2-nitrophenol at 296±2K. Environ Sci Technol 26:1397–1403. https://doi.org/10.1021/es00031a018.
2. Rubio MA, Lissi E, Herrera N, Pérez V, Fuentes N. 2012. Phenol and nitrophenols in the air and dew waters of Santiago de Chile. Chemosphere 86:1035–1039. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.11.046.
3. Vaïtilingom M, Attard E, Gaiani N, Sancelme M, Deguillaume L, Flossmann AI, Amato P, Delort A-M. 2012. Long-term features of cloud microbiology at the Puy de Dôme (France). Atmos Environ 56:88–100. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.03.072.
4. Delort A-M, Vaïtilingom M, Amato P, Sancelme M, Parazols M, Mailhot G, Laj P, Deguillaume L. 2010. A short overview of the microbial population in clouds: potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes. Atmos Res 98:249–260. https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2010.07.004.
5. Renard P, Canet I, Sancelme M, Wirgot N, Deguillaume L, Delort A-M. 2016. Screening of cloud microorganisms isolated at the Puy de Dôme (France) station for the production of biosurfactants. Atmos Chem Phys 16:12347–12358. https://doi.org/10.5194/acp-16-12347-2016.
6. Schmieder R, Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics 27:863–864. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026.
7. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J Comput Biol 19:455–477. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021.
8. Dastager SG, Mawlankar R, Tang SK, Krishnamurthi S, Ramana VV, Joseph N, Shouche YS. 2014. *Rhodococcus enclensis* sp. nov., a novel member of the genus *Rhodococcus*. Int J Syst Evol Microbiol 64:2693–2699. https://doi.org/10.1099/ijs.0.061390-0.
9. Alvarez HM. 2010. Overview of *Rhodococcus* genome, p. 76–82. *In* Biology of *Rhodococcus*. Microbiology Monographs. Springer, Berlin, Germany.

Downloaded from http://genomea.asm.org/ on February 6, 2018 by guest

Dans le génome de *Rhodococcus enclensis*, 6 755 000 gènes codent pour des protéines. Seulement 34% du génome a pu être associé à des fonctions appelées « sous-système » dans RAST (http://rast.nmpdr.org). L'ensemble de ces 2 367 sous-systèmes est regroupé en 26 catégories présentées dans la Figure 47.

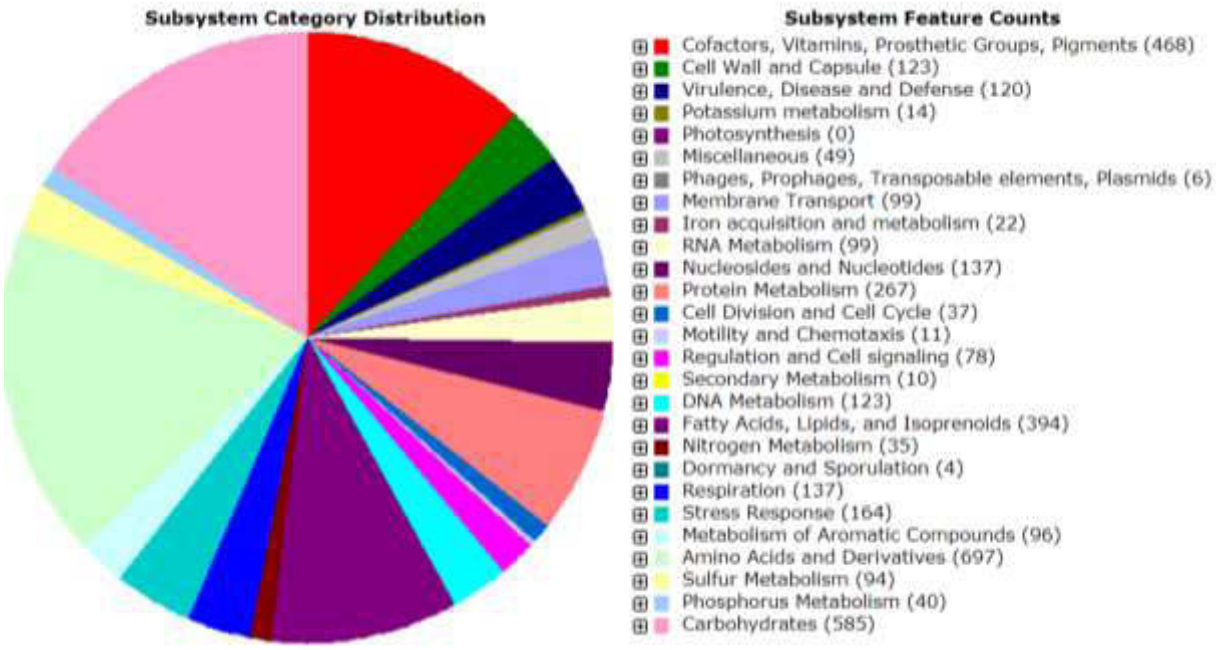


Figure 47 : Répartition des différentes catégories des sous-systèmes identifiés dans le génome de *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28

Les deux catégories majoritaires représentent les voies impliquant les acides aminés et leurs dérivés (en vert clair) et la voie de dégradation des carbohydrates (en rose). La première de ces deux voies regroupe toutes les voies de formation des acides aminés, ainsi que l'assimilation de l'azote *via* la production de glutamine/glutamate/aspartate/asparagine et le cycle de l'urée (voie de dégradation des acides aminés). La dégradation des carbohydrates regroupe la dégradation du tréhalose, du lactose, du mannose, du fructose, *etc*. Cette catégorie comprend également le métabolisme central : le cycle de Krebs, la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, *etc*. Des fonctions cellulaires essentielles sont également retrouvées, elles regroupent les voies impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire (la formation de polysaccharides et de peptidoglycanes), le transport membranaire (comprenant des systèmes de sécrétion et des transporteurs), la synthèse des ADN/ARN/protéines et la division cellulaire. Parmi les voies importantes pour la survie de la cellule au sein du nuage, cette souche possède des gènes associés au choc de température (froid et chaud), au choc osmotique et au stress oxydant. Les voies anti oxydantes retrouvées sont les quinones oxydoréductases, la voie du

glutathion, les protéines anti oxydantes classiques (catalase, peroxydase et le cytochrome C551 peroxydase) et différents types de superoxyde dismutase utilisant le fer, le manganèse ou le cuivre et le zinc.

Rhodococcus enclensis PDD-23b-28 est capable de dégrader des composés carbonés simples mais elle possède aussi des enzymes impliquées dans la dégradation des composés aromatiques. 96 sous-systèmes sont rattachés à cette catégorie (en bleu clair). Elle se compose de 3 sous-catégories : le métabolisme des intermédiaires aromatiques centraux (68), le métabolisme des composés aromatiques non associés à une voie précise de dégradation (15) et les voies périphériques de catabolisme des composés aromatiques (13). Les voies retrouvées impliquées dans la dégradation des aromatiques sont les voies du benzoate, de dégradation du protocatéchuate, du gentisate et homogentisate et celles impliquant le salicylate. Une représentation de la voie du benzoate (issue de KEGG) est faite en mettant en évidence les enzymes annotées par RAST dont la séquence génétique est présente dans le génome de *Rhodococcus enclensis* (Figure 48). Les enzymes retrouvées dans cette souche permettent la dégradation du benzoate en catéchol et la dégradation de celui-ci principalement par la voie intradiol (enzymes entourées en rouge). En effet, la catéchol-1,2-dioxygénase (1.13.11.1 entourée en rouge) est présente mais pas la catéchol-2,3-dioxygénase (1.13.11.2). De plus, toutes les enzymes de dégradation sont retrouvées pour la voie intradiol alors que dans la voie extradiol seules deux enzymes sont présentes (en orange) : elles permettent la dégradation du 2-oxopent-4-enoate en acétaldéhyde ou pyruvate. Ce résultat est similaire à celui obtenu pour les métatranscriptomes dans les nuages où seuls les transcrits des gènes de la catéchol-1,2-dioxygénase ont été retrouvés. Cette voie semble donc importante chez les bactéries du nuage (approche culturale et génomique) où le phénol est faiblement concentré. Aucune séquence génétique n'a été associée à la dégradation du phénol, cette souche est pourtant bien capable de dégrader le phénol en condition aérobie.

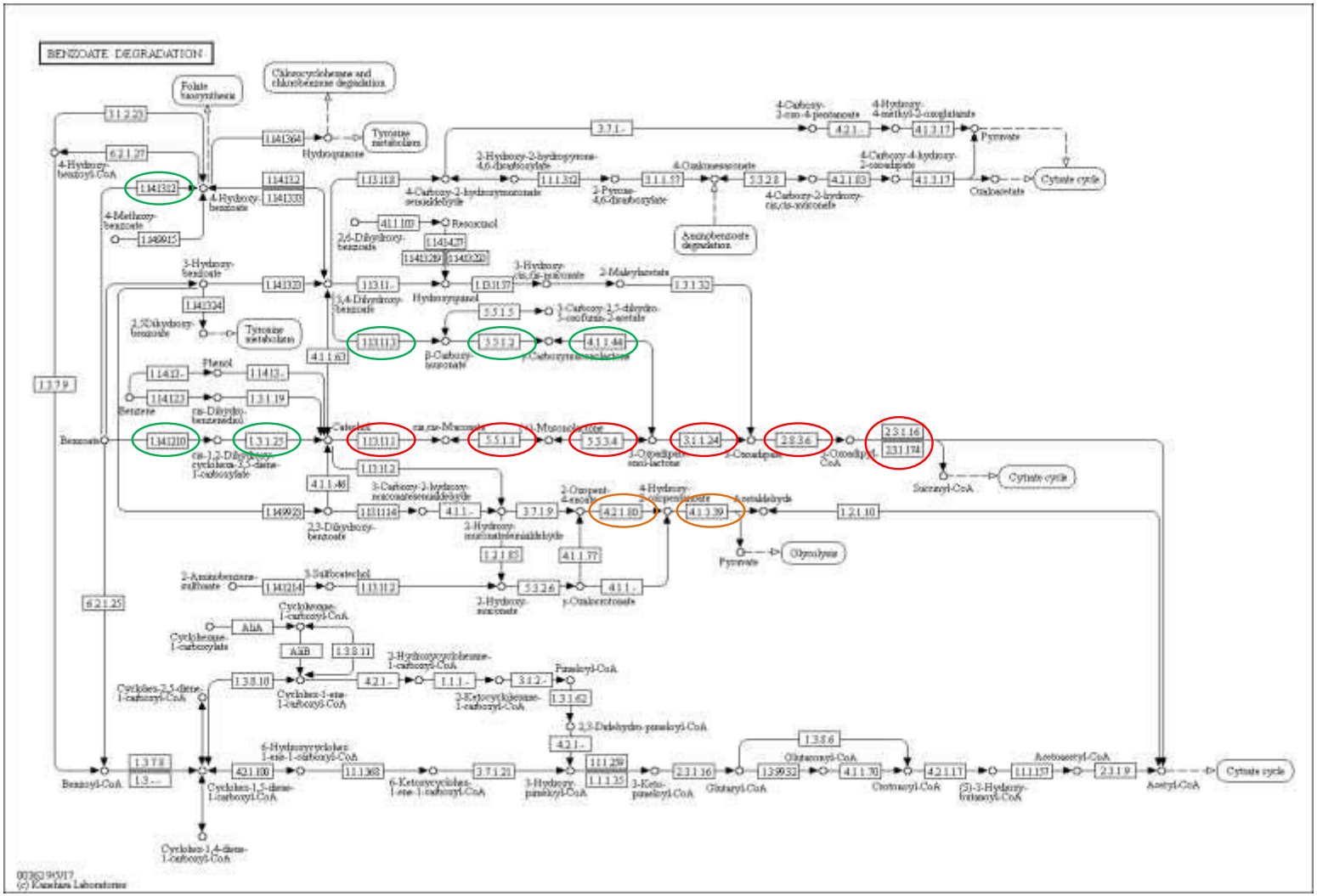


Figure 48 : Voies de dégradation du benzoate. Les enzymes entourées sont celles annotées par RAST à partir du génome de *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28. En vert, les enzymes permettent la dégradation du benzoate, en rouge et en orange celles impliquées dans la dégradation du catéchol par la voie intra- et exradiol respectivement.

RAST annote les séquences en suivant un processus complexe. Dans un premier temps, il identifie des protéines cibles dans le génome (des sélénoprotéines et des pyrrolysoprotéines), il fait par la suite une analyse phylogénétique pour trouver les 30 organismes les plus proches du génome à annoter. Après avoir identifié les séquences des ARN de transfert et ribosomique par blastn, les 30 séquences génétiques obtenues vont permettre d'alimenter les sous-systèmes et les inconnus vont être assignés si possible avec des blastp (Overbeek *et al.*, 2013). RAST est donc en lien avec les grandes bases de données (par le biais du logiciel SEED) comme NCBI, KEGG, GenBank, Swiss-Prot et d'autres. Des séquences génétiques codant pour l'enzyme phénol hydroxylase sont biens présentes dans NCBI puisqu'elles ont servi à alimenter notre base de données pour caractériser le potentiel de dégradation du phénol dans les nuages (Sous-partie II). Cependant, les séquences référencées en tant que phénol hydroxylase ou phénol-monooxygénase ne sont pas disponibles pour tous les organismes.

Rhodococcus enclensis PDD-23b-28 possède bien des gènes impliqués dans la dégradation des composés aromatiques et cette souche a la machinerie enzymatique pour dégrader le catéchol. Le manque d'information sur les enzymes permettant de dégrader le phénol ne permet pas de caractériser les gènes impliqués dans la première étape de dégradation. Il est également intéressant de constater qu'au sein du génome 20 sous-systèmes sont rattachés à l'utilisation du fer par cette bactérie. Elle possède notamment des transporteurs de types ABC qui permettent l'intégration des sidérophores, des composés héminiques et de la vitamine B12 (Köster, 2001). Elle peut aussi internaliser le fer extracellulaire grâce à un transporteur EfeUOB (Cao *et al.*, 2007). Le mécanisme d'action de ce transporteur a été étudié chez *Bacillus subtilis* (Miethke *et al.*, 2013). Ce système est composé de trois protéines : une perméase (EfeU), une protéine de liaison (EfeO) et une hémoprotéine (EfeB). EfeU est essentielle car elle permet de rassembler les deux autres enzymes et ainsi de former un complexe. Le mécanisme est schématisé dans la figure suivante :

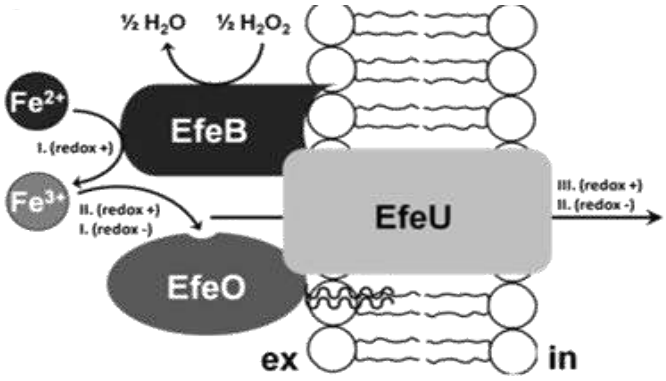


Figure 49 : Modèle de fonctionnement du transporteur EfeUOB chez *Bacillus subtilis* (d'après Miethke *et al.*, 2013).

L'enzyme EfeB oxyde le Fe(II) en Fe(III). Cette forme de fer se lie à la protéine EfeO qui transfert le Fe(III) à EfeU qui le transporte dans le cytosol. En plus de ces transporteurs, *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 possède des séquences génétiques affiliées à des enzymes impliquées dans la production de sidérophores (Vibriobactine, Bacillibactine et Entérochéline).

III. 2. 2) Impact relatif des voies photochimiques et biologiques sur la dégradation du phénol dans les nuages

Rhodococcus enclensis PDD-23b-28 possède des gènes impliqués dans le transport du fer et dans la dégradation du benzoate et du catéchol. Grâce au screening, nous savons que cette souche est capable de dégrader le phénol dans un temps relativement court.

Pour caractériser sa capacité de dégradation, plusieurs paramètres ont été étudiés. Dans un premier temps, nous avons mesuré la vitesse de biodégradation de cette souche à l'obscurité. Ensuite, nous avons cherché à savoir si la lumière pouvait influencer cette biodégradation. Pour continuer, l'impact d'un complexe de fer (Fe-EDDS) sur cette biodégradation a été étudié. Pour finir, une étude regroupant les bactéries, la lumière et le fer complexé a été menée. Ces approches expérimentales sont complétées par une estimation de la biodégradation du phénol dans la phase aqueuse des nuages. Ne connaissant pas la vitesse de dégradation du phénol pour toutes les souches présentes dans l'eau de nuage ni leurs activités, nous avons sélectionné une souche efficace afin de savoir si cette biodégradation pouvait être compétitive vis-à-vis de la chimie radicalaire.

III. 2. 2. 1 – Photo-biodégradation du phénol en conditions de laboratoire

Dans un premier temps, l'étude de la dégradation du phénol a été faite à l'obscurité. Afin de garder des conditions similaires à celles retrouvées dans les nuages, une température de 17°C a été choisie, elle correspond à la température moyenne des nuages récoltés au sommet du puy de Dôme en été. Le ratio cellules/concentration en phénol a été conservé mais étant donné les limites de détection du phénol en HPLC (4 µM), la concentration en cellules a été augmentée à 10^9 cellules.mL^{-1} pour 0,1 mM de phénol. La concentration en fer complexé avec de l'EDDS est de 0,5 mM. La concentration en fer complexé dans les nuages n'est pas connue, le type de ligand permettant cette complexation ne l'est pas non plus. Dans les nuages au puy de Dôme, la concentration en fer totale maximale est de 9,1 µM. Selon les types de nuages les moyennes vont de 0,8 à 3,3 µM pour les nuages de types marin et pollué respectivement (Deguillaume *et al.*, 2014). Proportionnellement, la concentration en fer utilisée ici est donc faible et mime un nuage pauvre en fer. Le ratio entre la concentration en phénol et celle en fer est similaire aux expériences réalisées dans la thèse de Chorao (2008). Les expériences sont réalisées dans un milieu simple ne comprenant que de l'eau de Volvic®, cette eau comprend des minéraux essentiels à la survie des microorganismes et a une composition stable et contrôlée.

Trois expériences de dégradation du phénol ont été faites à l'obscurité et une a été réalisée en présence de lumière, pour chacune d'entre elles la dégradation du phénol a été suivie sur 7 heures. Deux des expériences ont été réalisées à 17°C alors que la dernière expérience, réalisée à l'obscurité et en présence de lumière, a été faite à 22°C suite à des problèmes techniques. Les cinétiques obtenues pour les deux premières expériences à l'obscurité ont été fusionnées (Figure 50 A) alors que celles menées à 22°C sont présentées Figure 50 B.

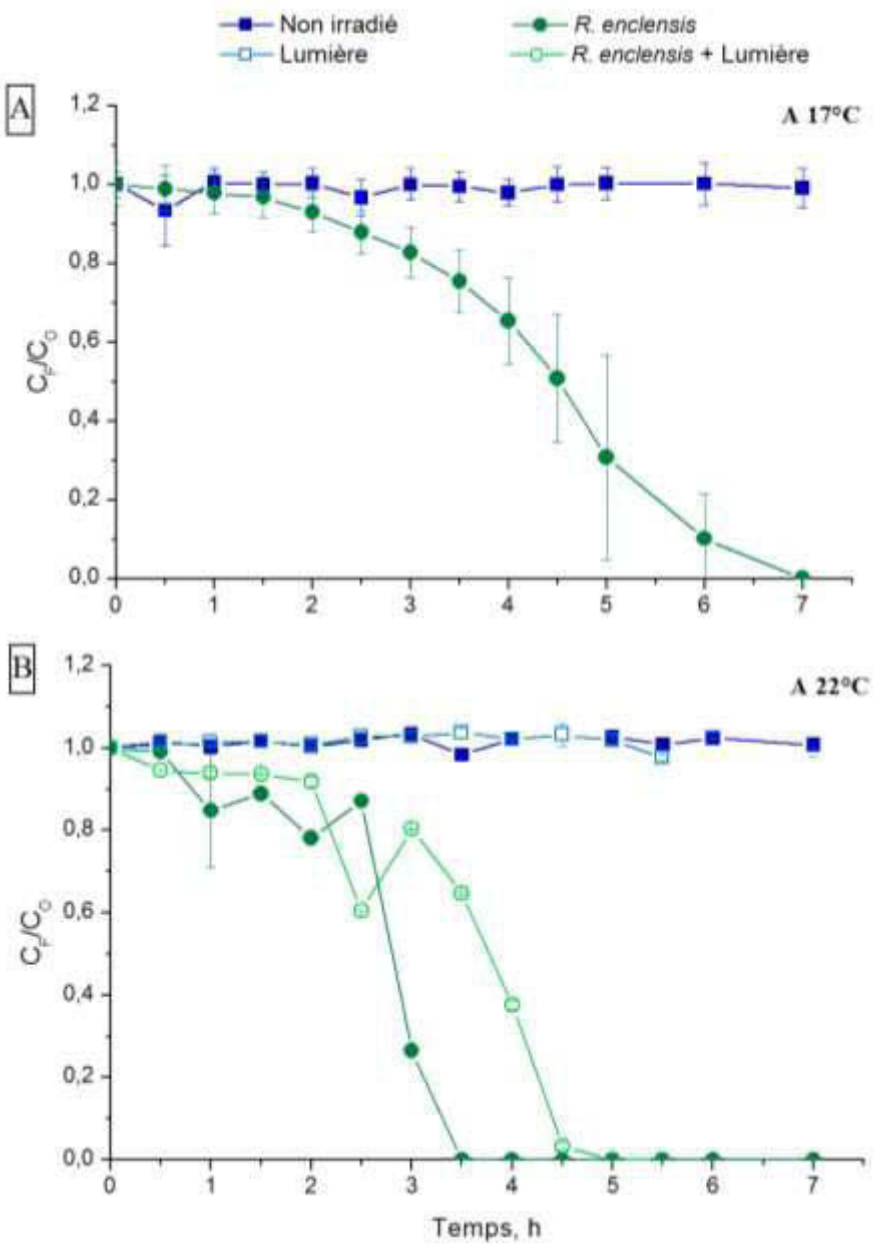


Figure 50 : Cinétique de dégradation du phénol en présence ou en l'absence de lumière ou de *R. enclensis* PDD-23b-28. Les 2 expériences faites à l'obscurité sont incubées à 17°C et fusionnées (**A**) et l'expérience de photo-biodégradation est faite à 22°C (**B**). $[\text{Phénol}]_{\text{initiale}}$ = 0,1 mM ; Système d'irradiation : lampes Sylvania Reptistar® de 15 W. Le pH est aux alentours de 7 dans les expériences biotiques.

Dans un premier temps, il est important de constater que le phénol seul, irradié ou non, ne se dégrade pas. Ce résultat était prévisible car les longueurs d'onde présentes dans notre système d'irradiation ne recouvrent pas celles de l'absorbance du phénol, le phénol n'est donc pas photolysé. A contrario, en présence de la souche, le phénol est dégradé. A l'obscurité, *R. enclensis* dégrade le phénol en 7 h à 17°C et 3,5 h à 22°C. Sous irradiation à 22°C, le temps de biodégradation de ce composé se situe entre 4h30 et 5h00 (à 4h30 il ne reste que 3% de la concentration en phénol initial).

Rhodococcus enclensis PDD-23b28 est capable de dégrader le phénol rapidement, il est intéressant de noter qu'en présence de lumière à 22°C cette dégradation est plus longue. Afin de vérifier si la capacité de dégradation de notre souche change en présence de l'irradiation, les vitesses de dégradation maximales sont calculées pour les trois conditions : en l'absence d'irradiation à 17 et 22°C et en présence de celle-ci à 22°C (Tableau 25). Elles vont également permettre de s'affranchir de la variabilité (faible mais présente) du nombre de cellules.

Tableau 25 : Vitesse de biodégradation du phénol par *R. enclensis* PDD-23b-28. Les coefficients de vitesse de biodégradation du phénol sont aussi indiqués. La vitesse de dégradation est calculée par l'équation suivante : $V_{Phénol} = (k_{Phénol} \times [Phénol]_{initiale})/N_{cellules}$.

Vitesses de biodégradation du phénol à l'obscurité			
Expérience	Température, °C	$k_{Phénol}$, h^{-1}	$V_{Phénol}$, mol.cellule^{-1}.h^{-1}
1	17	0,66	1,62 x 10^{-17}
2	17	1,46	8,79 x 10^{-17}
3	22	2,37	21,8 x 10^{-17}
Vitesses de biodégradation du phénol en présence de lumière			
Expérience	Température, °C	$k_{Phénol}$, h^{-1}	$V_{Phénol}$, mol.cellule^{-1}.h^{-1}
3	22	2,02	14,0 x 10^{-17}

A l'obscurité, les deux vitesses de biodégradation du phénol à 17°C sont différentes, ceci reflète la variabilité biologique. De plus, à 22°C cette vitesse est beaucoup plus élevée, 21,8 x 10^{-17} mol.cellule^{-1}.h^{-1}. En présence de lumière, la vitesse de biodégradation à 22°C est moins importante que celle enregistrée à l'obscurité. Cependant n'ayant qu'une seule expérience de photo-biodégradation à 22°C, nous ne pouvons pas savoir si cette différence est due à la variabilité biologique ou non.

Nos vitesses de dégradation sont du même ordre de grandeur que celles obtenues pour des cultures de *Pseudomonas putida* à 20°C (Hinteregger *et al.*, 1992), en revanche elles sont bien plus élevées que celles calculées à partir de la publication de Razika *et al.*, 2010. En effet, les vitesses de dégradation calculées à partir de la cinétique de dégradation du phénol par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* à 37°C sont de 0,002 à 0,08 x 10^{-17} mol.cellule^{-1}.h^{-1} dans cette publication. Nos valeurs sont donc assez proches de *P. putida* récoltée dans un sol contaminé, alors que *P. aeruginosa* issue d'un isolement d'eau de station d'épuration urbaine est moins efficace. L'augmentation des vitesses de dégradation de la matière organique en présence de lumière n'avait pas été constatée lors de la dégradation du 2-aminobenzothiazole par *R. rhodochrous* (thèse de Chorao en 2008, expérience similaire). Elle a été constatée dans des eaux douces (Bano *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2000, 2001), mais ces milieux naturels peuvent avoir une dégradation photochimique non prise en compte ou encore comprendre des microorganismes photosynthétiques. Le manque de répétition biologique de cette

expérience ne nous permet pas de conclure sur un réel effet de la lumière sur la biodégradation du phénol.

III. 2. 2. 2 – Impact du fer sur la dégradation du phénol

La concentration en fer utilisée ici (0,5 mM pour 10^9 cellules.mL^{-1}) est faible, en effet dans les nuages de type marin récoltés au puy de Dôme la concentration moyenne en fer est de 0,8 µM pour 10^5 cellules.mL^{-1} (Deguillaume *et al.*, 2014). Dans nos expériences, le fer est complexé à l'EDDS, c'est un modèle de complexation qui mime la présence de forts agents complexant le fer comme les sidérophores (Cheize *et al.*, 2012). Ces molécules sont synthétisées par les bactéries, 42% des bactéries récoltées dans l'eau de nuage sont capables de synthétiser ces composés en condition de laboratoire (Vinatier *et al.*, 2016). De plus, en analysant le génome de *Rhodococcus enclensis*, un système enzymatique qui transporte toutes les formes de fer a été retrouvé (système EfeUOB). Enfin dans des études précédentes, chez une autre *Rhodococcus*, le fer complexé avec le NTA ou l'EDDS était internalisé et favorisait la dégradation du benzothiazole (thèses de Bunescu en 2006 et Chorao en 2008). Ainsi nous avons voulu voir si la présence de fer complexé pouvait modifier la dégradation du phénol. Les cinétiques de dégradation du phénol sans fer obtenues précédemment sont rappelées et elles sont comparées à celles comprenant ce nouveau composé (Figure 51). Dans un premier temps, l'impact du fer sur la cinétique de dégradation du phénol à l'obscurité pour les deux températures est illustré (17°C en A et 22°C en B), puis cet impact en présence de lumière est indiqué (en C).

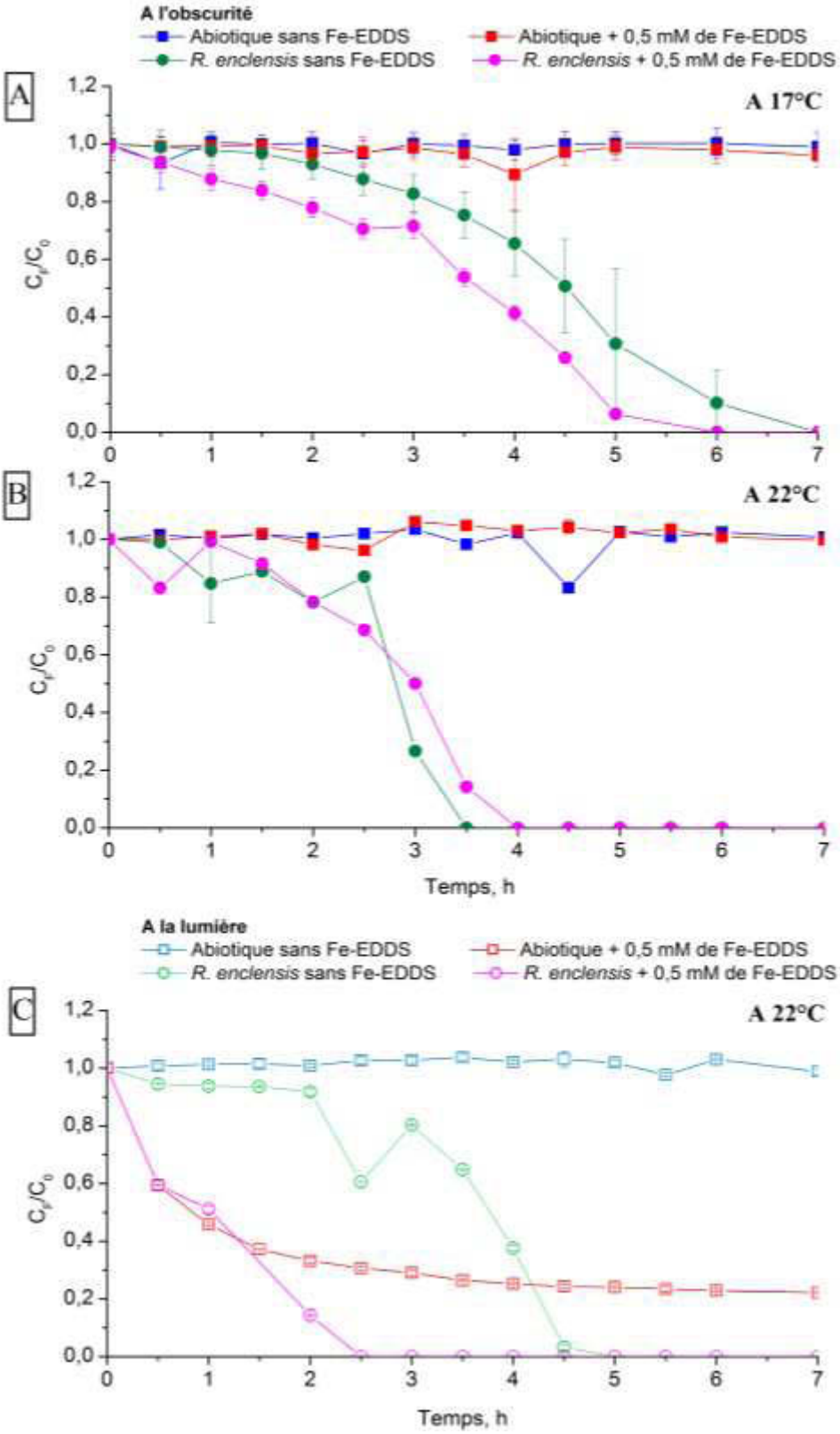


Figure 51 : Influence de la présence de Fe-EDDS sur la dégradation du phénol par *R. enclensis* PDD-23b-28 à 17°C et à 22°C à l'obscurité (A et B) et à 22°C en présence de lumière (C). Pour chaque expérience, les témoins abiotiques et sans fer sont faits. Les symboles pleins font références aux expériences faites à l'obscurité alors que les symboles entourés indiquent les expériences faites en présence de lumière. Les courbes présentées dans la partie A de la figure sont le résultat d'un duplicat expérimental. $[\text{Phénol}]_{\text{initiale}}$ = 0,1 mM ; Système d'irradiation : lampes Sylvania Reptistar® de 15 W.

Tableau 26 : Vitesses de dégradation du phénol en absence ou en présence de Fe-EDDS. Les coefficients de vitesses de dégradation du phénol ($k_{Phénol}$) sont également indiqués. Deux vitesses de dégradation sont calculées, $v_{phénol}$ est calculée sans diviser par le nombre de cellule (les conditions biotiques sont toutes ramenées à la même concentration en cellules ; [*R. enclensis*] = 1 x 10^9 cellules.mL^{-1}) alors que $V_{Phénol}$ est calculée comme précédemment ($V_{Phénol}$ = ($k_{Phénol}$ x [Phénol]$_{initiale}$)/$N_{cellules}$).

Vitesses de dégradation du phénol à l'obscurité				
Condition	[Fe-EDDS], mM	$k_{Phénol}$, h^{-1}	$v_{phénol}$, M.h^{-1}	$V_{Phénol}$, mol.cellule^{-1}.h^{-1}
Abiotique à 17°C	0 et 0,5	0	0	
Biotique à 17°C	0	0,66	1,62 x 10^{-5}	1,62 x 10^{-17}
	0,5	1,90	8,19 x 10^{-5}	8,19 x 10^{-17}
Biotique à 17°C	0	1,46	8,79 x 10^{-5}	8,79 x 10^{-17}
	0,5	1,42	6,97 x 10^{-5}	6,97 x 10^{-17}
Abiotique à 22°C	0 et 0,5	0	0	
Biotique à 22°C	0	2,37	21,8 x 10^{-5}	21,8 x 10^{-17}
	0,5	1,57	13,8 x 10^{-5}	13,8 x 10^{-17}
Vitesses de dégradation du phénol en présence de lumière				
Condition	[Fe-EDDS], mM	$k_{Phénol}$, h^{-1}	$v_{phénol}$, M.h^{-1}	$V_{Phénol}$, mol.cellule^{-1}.h^{-1}
Abiotique à 22°C	0	0	0	
	0,5	0,65	6,46 x 10^{-5}	
Biotique à 22°C	0	2,02	14,0 x 10^{-5}	14,0 x 10^{-17}
	0,5	0,95	14,9 x 10^{-5}	14,9 x 10^{-17}

Dans les conditions abiotiques, aucune dégradation n'est visible en absence de lumière. En présence de Fe-EDDS et de lumière, la dégradation du phénol est rapide pendant la première demi-heure et s'arrête au bout de 1h30, la concentration en phénol est alors de 0,022 mM. Cette dégradation peut facilement s'expliquer car le Fe-EDDS est photo-actif. Le mécanisme réactionnel intervenant suite à l'irradiation de ce complexe est présenté ci-dessous (Brigante and Mailhot, 2015) :

$$Fe(III)-EDDS \xrightarrow{h\upsilon} [Fe(III)-EDDS]^* \rightarrow Fe(II)+EDDS^{\bullet}$$
$$EDDS^{\bullet}+O_2 \rightarrow O_2^{\bullet -}+EDDS_{ox}$$
$$HO_2^{\bullet}+O_2^{\bullet -} \xrightarrow{H^+} H_2O_2+O_2+{}^{-}OH$$
$$HO_2^{\bullet}+HO_2^{\bullet} \xrightarrow{H^+} H_2O_2+O_2$$
$$Fe(III)+O_2^{\bullet -} \rightarrow Fe(II)+O_2$$
$$Fe(III)+HO_2^{\bullet} \rightarrow Fe(II)+O_2+H^+$$
$$Fe(II)+H_2O_2 \rightarrow Fe(III)+{}^{\bullet}OH+{}^{-}OH$$

La photolyse de ce complexe entraine la formation de radicaux hydroperoxyle/anion superoxyde, la formation de peroxyde d'hydrogène et la génération de radicaux hydroxyles (*via* la réaction de Fenton). Ces composés, une fois formés, vont réagir avec la matière organique jusqu'à, si les conditions le permettent, la minéralisation complète. Jusqu'à maintenant, ce complexant a été utilisé dans des processus de Fenton et photo-Fenton pour dégrader du 4-tert-butylphénol (Wu *et al.*, 2014), le

bisphénol A (Huang *et al.*, 2013), l'acide cyclohexanoïque (Zhang *et al.*, 2016), l'imidaclopride (Papoutsakis *et al.*, 2015), *etc*.

En présence de *R. enclensis* à l'obscurité, le phénol est dégradé en 6 ou 7 heures à 17°C et 3h30/4h à 22°C. La dégradation du phénol est faible pendant les deux premières heures, puis elle devient plus importante. La présence du fer semble augmenter légèrement la capacité de dégradation du phénol à 17°C mais pas à 22°C où les courbes sont équivalentes. En présence de lumière sans fer, la biodégradation est complète au bout de 5 heures alors qu'en présence de fer, le phénol n'est plus présent à partir de 2h30. Ceci montre la présence d'une synergie entre les conditions biotiques (les bactéries) et abiotiques (la lumière et le Fe-EDDS). Cet effet synergique n'avait pas été constaté pour la dégradation du 2-aminobenzothiazole par *R. rhodochrous* avec le même complexe de fer (Chorao, 2008) mais il a été constaté avec un autre complexe : le NTA (acide nitrilotriacétique) (Delort *et al.*, 2008).

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées sur l'origine de cet effet, elles sont présentées dans la Figure 52.

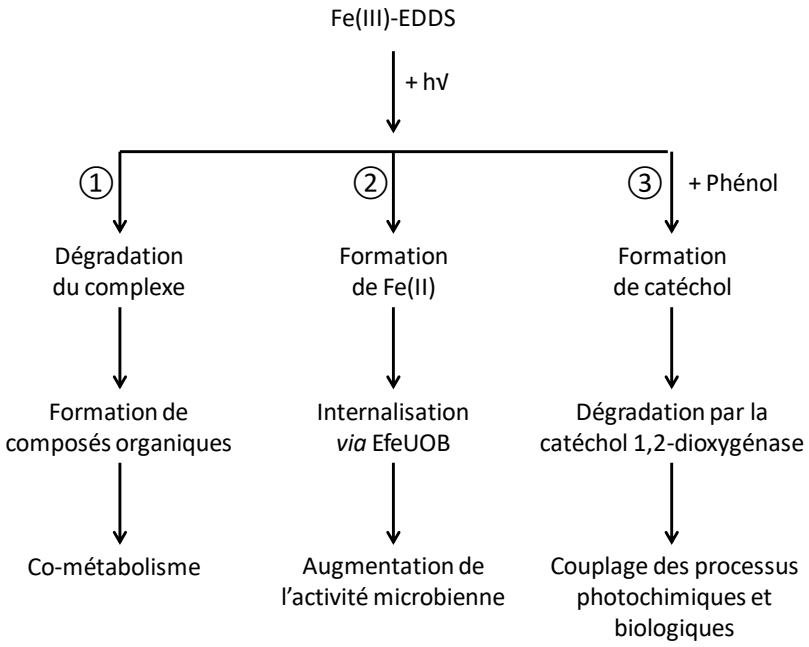


Figure 52 : Représentation schématique des hypothèses expliquant l'impact du Fe-EDDS en présence de lumière sur la dégradation du phénol.

La première hypothèse (voie 1) est que la dégradation de l'EDDS permet l'apport de nouvelles molécules carbonées qui favorisent la dégradation du phénol par un processus de co-métabolisme.

La seconde hypothèse (voie 2) est que la photolyse du complexe Fe-EDDS induit la formation de Fe(II) libre qui pourrait être internalisé par la bactérie grâce au système EfeUOB.

Enfin, une dernière explication possible (voie 3) implique une dégradation par le complexe Fe-EDDS et la lumière du phénol et donc la formation du catéchol. Dans la dégradation du phénol, deux systèmes enzymatiques interviennent : les phénol hydroxylases et les catéchol dioxygénases. Dans un système où la première étape (la dégradation du phénol en catéchol) est limitante, les processus photochimiques pourraient donc entrainer la formation du catéchol. Celui-ci pourrait alors être assimilé plus facilement par la cellule et entrainer des modifications dans la régulation transcriptionnelle.

- La première hypothèse est appuyée par la différence d'activité entre ces deux systèmes enzymatiques. En effet, Straube (1987) a mesuré l'activité de la phénol hydroxylase et de la catéchol-1,2-dioxygénase présentes chez *Rhodococcus sp* P1. Le phénol a été dégradé à une vitesse de 4,63 nmoles.min^{-1}.mg de protéines^{-1} alors que la catéchol-1,2-dioxygénase a eu une plus forte activité (de l'ordre de 3 µmole de cis, cis muconate formé.mg de protéines^{-1}). Chez *Pseudomonas putida* EKII, l'activité de ces enzymes a également été mesurée : 0,2 µmol de phénol.min^{-1}.mg de protéines^{-1} pour la phénol hydroxylase, 1,5 µmol de catéchol.min^{-1}.mg de protéines^{-1} pour la catéchol-2,3-dioxygénase et 0,107 µmol de catéchol.min^{-1}.mg de protéines^{-1} pour la catéchol-1,2-dioxygénase (Hinteregger *et al.*, 1992). Ainsi les catéchol dioxygénases semblent plus efficaces que les enzymes impliquées dans la dégradation du phénol.
- De plus, la transcription des gènes impliqués dans la dégradation du catéchol est contrôlée par des systèmes de régulations qui nécessitent la présence du substrat de l'enzyme ou d'un produit intermédiaire. Ainsi la présence de catéchol pourrait favoriser la transcription des enzymes le dégradant mais également celles intervenant dans la dégradation du phénol.

Pour conclure, le fer a peu d'impact sur la dégradation du phénol à l'obscurité. En revanche, en présence de lumière, la photo-dégradation du phénol a lieu jusqu'à ce que le complexe devienne limitant *via* la formation de radicaux hydroxyles. La condition la plus efficace dans la dégradation du phénol implique la lumière, le complexe de Fe-EDDS et *Rhodoccocus enclensis* où un effet synergique est constaté.

III. 2. 2. 3 – Photo- et biotransformation du phénol dans les nuages

Le phénol est à même d'être dégradé par des processus photochimiques dans le nuage puisqu'il est très sensible à la chimie radicalaire (sa constante de réactivité avec le radical hydroxyle est de 1,9 x 10^9 $M^{-1}.s^{-1}$ et avec le radical nitrate elle est de 1,8 x 10^9 $M^{-1}.s^{-1}$). Dans les parties précédentes de ce chapitre, nous avons également pu voir que les microorganismes présents *in situ* dans le nuage synthétisent des transcrits de gène codant pour des protéines intervenant dans la dégradation du phénol. Par des expériences de laboratoire, nous avons pu estimer la capacité de biodégradation du phénol de souches récoltées dans l'eau de nuages collectée au puy de Dôme. Après avoir sélectionné la meilleure des candidates (*R. enclensis* PDD-23b-28), nous avons calculé sa vitesse de dégradation du phénol à l'obscurité et en présence de lumière (mimant le spectre solaire au sein d'un nuage). Pour ne pas se restreindre au genre *Rhodococcus*, les valeurs obtenues dans la littérature pour la dégradation du phénol par deux espèces du genre *Pseudomonas* vont également être utilisées (elles ont été calculées à partir des publications de Hinteregger *et al.* (1992) et Razika *et al.* (2010)).

Afin de savoir si la biodégradation est compétitive vis-à-vis de la chimie radicalaire, nous avons calculé les impacts relatifs dans les conditions diurnes et les conditions nocturnes. Pour les conditions diurnes, deux concentrations en radical hydroxyle sont utilisées :

- Cas 1, [$^{\bullet}$OH] mesurée : la concentration en radicaux hydroxyles utilisée est la moyenne de celles obtenues dans cette thèse pour les différents types de nuages.
- Cas 2, [$^{\bullet}$OH] estimée : les concentrations en radicaux hydroxyles issues du modèle CAPRAM 3.0 (Herrmann *et al.*, 2010).

Pour toutes les conditions, les concentrations en radicaux nitrates utilisées sont celles issues de CAPRAM 3.0 et référencées selon les types de nuages dans le Tableau 24.

Concrètement, les vitesses abiotiques et biotiques de dégradation du phénol vont être calculées pour les différents types de nuage (marin, continental et pollué). Les paramètres utilisés pour calculer les pourcentages de dégradation abiotique sont présentés dans le Tableau 27. Les vitesses obtenues sont également indiquées ($V^{\bullet}_{\text{Phénol, nuage}} = k_{\text{Phénol, Radical}}$ x [Radical] x [Phénol] où $k_{\text{Phénol, Radical}}$ est la constante de réactivité entre le radical et le phénol).

Tableau 27 : Paramètres utilisés pour le calcul des pourcentages de dégradation abiotique du phénol et les vitesses de dégradation du phénol par les radicaux $^{\bullet}OH$ et $NO_3^{\bullet}$. Les radicaux hydroxyles n'ont pas été mesurés dans un nuage de type pollué ; deux nuages de type continental et trois de type marin ont été analysés. Les concentrations en radicaux nitrates sont, dans les deux cas, issues de CAPRAM 3.0 (Herrmann *et al.*, 2010).

Cas n°1 : [$^{\bullet}OH$] mesurée dans cette thèse				
Type de nuage	Radicaux hydroxyles		Radicaux nitrates	
	[$^{\bullet}OH$], M	$V^{\bullet}_{Phénol, nuage}$, $L.mol^{-1}.h^{-1}$	[$NO_3^{\bullet}$], M	$V^{\bullet}_{Phénol, nuage}$, $L.mol^{-1}.h^{-1}$
Marin	$4,46 \times 10^{-16}$	$1,69 \times 10^{-11}$	$6,9 \times 10^{-15}$	$24,7 \times 10^{-11}$
Continental	$6,65 \times 10^{-16}$	$2,51 \times 10^{-11}$	$5,1 \times 10^{-15}$	$18,3 \times 10^{-11}$
Cas n°2 : [$^{\bullet}OH$] estimée par le modèle CAPRAM 3.0				
Type de nuage	Radicaux hydroxyles		Radicaux nitrates	
	[$^{\bullet}OH$], M	$V^{\bullet}_{Phénol, nuage}$, $L.mol^{-1}.h^{-1}$	[$NO_3^{\bullet}$], M	$V^{\bullet}_{Phénol, nuage}$, $L.mol^{-1}.h^{-1}$
Marin	$2,0 \times 10^{-12}$	$7,56 \times 10^{-8}$	$6,9 \times 10^{-15}$	$2,47 \times 10^{-10}$
Continental	$2,2 \times 10^{-14}$	$8,31 \times 10^{-10}$	$5,1 \times 10^{-15}$	$1,83 \times 10^{-10}$
Pollué	$3,5 \times 10^{-15}$	$1,32 \times 10^{-10}$	$1,4 \times 10^{-13}$	$5,01 \times 10^{-9}$

Les vitesses de biodégradation obtenues dans cette thèse ou issues de la littérature sont rappelées dans le Tableau 28. Les vitesses de dégradation du phénol pour le genre *Rhodococcus* sont celles obtenues pour *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28. La vitesse de dégradation du phénol pour le genre *Pseudomonas* est la moyenne des vitesses calculées à partir des données disponibles dans la littérature, ainsi sera pris en compte une dégradation efficace et une dégradation plus faible des souches du genre *Pseudomonas*. Ces vitesses de biodégradation sont estimées pour les conditions nuageuses par $V_{Phénol, nuage} = V_{Phénol} \times [N_{Nuage}]$; où N_{Nuage} est le nombre de bactéries dans l'eau de nuage = $6,81 \times 10^{7}$ cellules.L^{-1} (Vaïtilingom *et al.*, 2012). L'impact relatif de la chimie radicalaire et du métabolisme microbien sur la dégradation du phénol a été calculé pour les deux genres en prenant en compte leurs pourcentages par rapport au nombre total de cutlivables.

Tableau 28 : Vitesses de biodégradation du phénol. La vitesse de biodégradation du phénol par *Rhodococcus enclensis* à l'obscurité est la moyenne des deux vitesses obtenues à 17°C. Celle en présence de lumière a été obtenue dans la seule expérience faite à 22°C. Les valeurs pour *Pseudomonas putida* proviennent de la publication de Hinteregger *et al.* (1992) et celles pour *Pseudomonas aeruginosa* ont été obtenues par Razika *et al.* (2010), la moyenne de ces 4 valeurs va être utilisée pour représenter la vitesse de dégradation du phénol par les *Pseudomonas*. Le pourcentage de bactéries du genre *Rhodoccocus* collectés par rapport au nombre des cultivables récoltées dans l'eau de nuage est de 3,93% et celui des *Pseudomonas* est de 19,51%.

	$V_{Phénol}$ $mol.cellule^{-1}.h^{-1}$	$V_{Phénol, nuage}$ $mol.L^{-1}.h^{-1}$	$V_{Phénol, nuage}$ en prenant en compte le pourcentage $mol.L^{-1}.h^{-1}$
Rhodococcus enclensis en absence de lumière	$5,21 \times 10^{-17}$	$3,55 \times 10^{-9}$	$1,40 \times 10^{-10}$
Rhodococcus enclensis en présence de lumière	$14,0 \times 10^{-17}$	$9,53 \times 10^{-9}$	$3,75 \times 10^{-10}$

	$V_{Phénol}$ mol.cellule^{-1}.h^{-1}	$V_{Phénol, nuage}$ mol.L^{-1}.h^{-1}	$V_{Phénol, nuage}$ en prenant en compte le pourcentage mol.L^{-1}.h^{-1}
Pseudomonas putida	3,21 et 12,2 x 10^{-17}		
Pseudomonas aeruginosa	0,20 et 7,90 x 10^{-19}		
Pseudomonas moyen	3,88 x 10^{-17}	2,64 x 10^{-9}	5,15 x 10^{-10}

Les Figures 53 et 54 présentent les résultats obtenus pour les différents scénarios et les 2 genres bactériens.

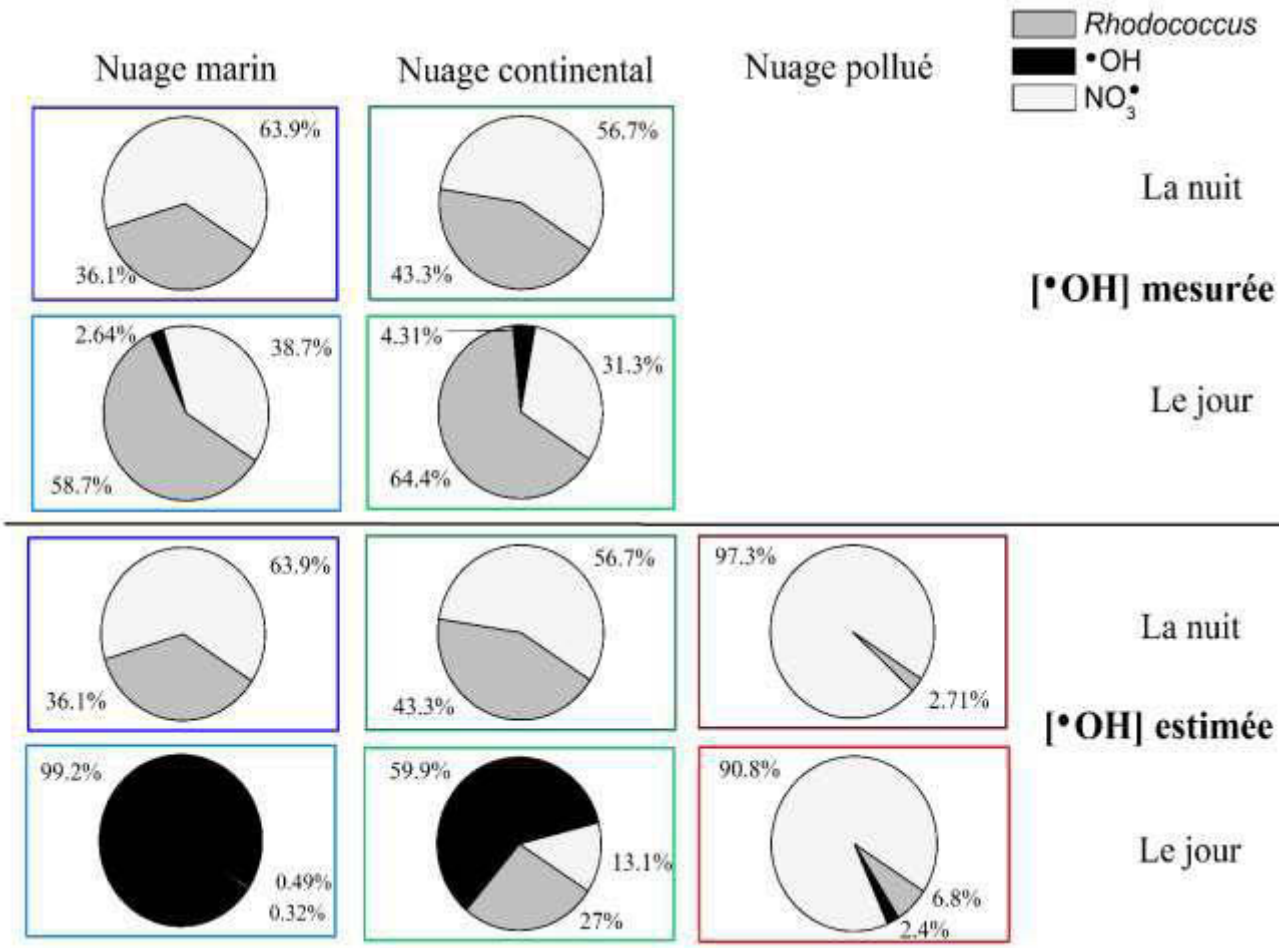


Figure 53 : Impact relatif des vitesses de dégradation du phénol par les voies radicalaire et biologique en prenant en compte 3,93% de *Rhodococcus*. Les paramètres utilisés sont présentés dans les Tableaux 27 et 28.

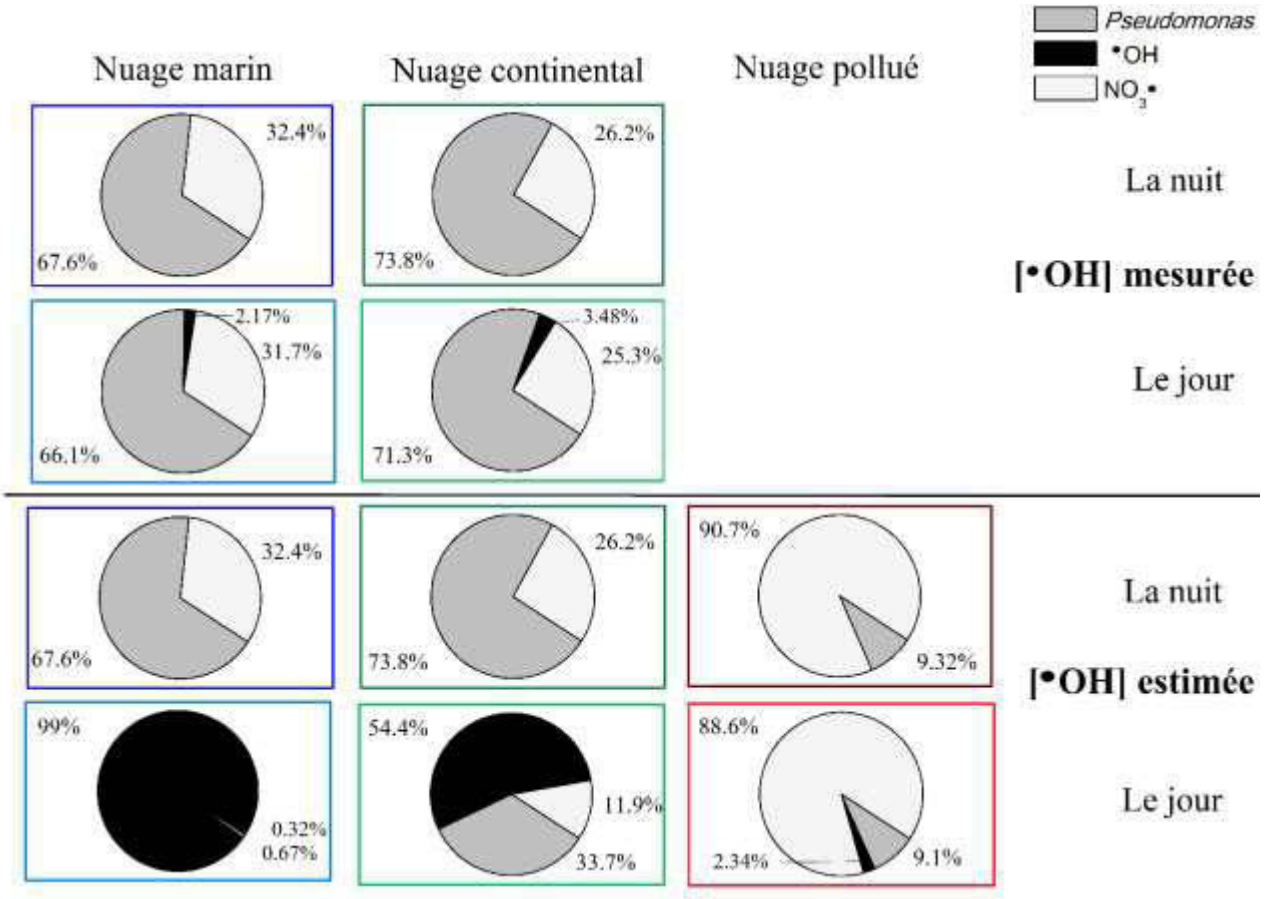


Figure 54 : Impact relatif des vitesses de dégradation du phénol par les voies radicalaire et biologique en prenant en compte 19,51% de *Pseudomonas*. Les paramètres utilisés sont présentés dans les Tableaux 27 et 28.

L'impact des microorganismes sur la dégradation du phénol dépend du genre considéré, du pourcentage des souches actives et de la concentration en radicaux hydroxyles. En effet, en prenant en compte 3,93% de *Rhodococcus*, la dégradation du phénol est faite pratiquement de manière équivalente par les radicaux et les bactéries, lorsque la concentration en radical hydroxyle est mesurée. En revanche, lorsque la concentration provient du modèle CAPRAM 3.0, la dégradation radicalaire est dominante le jour. Pour les *Pseudomonas*, les bactéries ont un rôle un peu plus important, elles sont responsables de plus de la moitié de la dégradation du phénol. Lorsque les concentrations en radicaux proviennent du modèle CAPRAM, la dégradation radicalaire est majoritaire.

Les vitesses de biodégradation du phénol sont du même ordre de grandeur que les vitesses de dégradation par les radicaux. Les bactéries, et plus généralement les microorganismes, peuvent donc intervenir comme puits pour ce composé. Cependant, beaucoup d'incertitudes sont à lever avant de pouvoir l'attester.

- Tout d'abord, la concentration en radicaux n'est pas bien connue. En effet, les concentrations mesurées dans cette thèse laissent entendre que les modèles surestiment cette valeur. Les radicaux hydroxyles n'ont été mesurés que dans 5 nuages, pour avoir une meilleure idée de cette concentration il faudrait avoir un nombre de nuage plus important (et surtout des nuages de type pollué). De manière concomitante, la concentration en radical nitrate n'a pas été mesurée dans la phase aqueuse des nuages, ce qui représente une source importante d'incertitude.
- Ensuite, une autre importante source d'incertitude est la proportion de microorganismes actifs et la composition de la communauté.

Ce manque de connaissances peut être la cause d'une surestimation de l'impact des bactéries. En effet, les vitesses de biodégradation du phénol utilisées sont soit issues de la littérature, les *Pseudomonas* dégradant le phénol proviennent d'autres environnements, soit mesurées à partir d'une souche très performante (*Rhodococccus enclensis*). De plus, le nombre de *Rhodococcus* ou de *Pseudomonas* par rapport au nombre total des cultivables peut être contestable car pour certains événement nuageux aucune souche du genre *Rhodococcus* n'a été mise en évidence alors que dans d'autres événements, plusieurs souches ont été isolées. Enfin, une des grandes incertitudes est la présence du temps de latence (qui n'est pas présent en chimie radicalaire). Il est observé pour toutes les bactéries testées en condition de laboratoire, or les vitesses mesurées pour *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 n'en tiennent pas compte.

Une sous-estimation est également possible car, en prenant en compte le pourcentage des cultivables, seule une petite partie de la communauté est considérée comme pouvant dégrader le phénol. De plus, ne sont présentés ici que deux genres bactériens, or les *Sphingomonas*, les *Streptomyces* et les *Bacillus* sont connus dans la littérature comme étant à même de dégrader le phénol (Gami *et al.*, 2014; Nair *et al.*, 2008; Padmanabhan *et al.*, 2003) et ils représentent, avec *Pseudomonas* et *Rhodococcus*, les genres bactériens les plus souvent récoltés dans la phase aqueuse des nuages du puy de Dôme (Vaïtilingom *et al.*, 2012). Là encore, la communauté microbienne est réduite au seul groupe des bactéries, or les champignons sont très actifs dans l'eau de nuage (Amato *et al.*, 2017a) et sont capables de dégrader le phénol surtout chez les Basidiomycota (Nair *et al.*, 2008) qui est le phylum majoritaire parmi les cultivables (Vaïtilingom *et al.*, 2012). Pour ce qui est du temps de latence, il se peut qu'il soit beaucoup plus court dans la phase aqueuse des nuages puisque

des transcrits sont présents *in situ*. La synergie entre la photo- et la biodégradation observée en condition de laboratoire pourrait également être effective dans les nuages réduisant fortement le temps de latence.

III. 3. Conclusion

L'objectif de cette partie était de quantifier l'impact des processus photochimiques et biologiques dans la dégradation du phénol. Pour cela, parmi les souches isolées dans l'eau de nuage, la souche la plus performante a été sélectionnée (*Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28).

Cette souche possède des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de composés aromatiques mais aucune séquence génétique n'a été affiliée à une enzyme permettant la dégradation du phénol. En revanche, toutes les enzymes de la voie intradiol impliquées dans la dégradation du catéchol sont présentes. Des gènes impliqués dans l'internalisation du fer ont également été recensés.

Afin de quantifier l'impact du métabolisme de *Rhodococcus enclensis* sur la dégradation du phénol, sa vitesse de biodégradation a été mesurée en présence et en absence de lumière. Simultanément, l'impact du fer sur cette dégradation a été testé et un effet synergique impliquant la lumière, le Fe-EDDS et *Rhodococcus enclensis* a été constaté.

Après l'obtention de ces vitesses, l'impact relatif des voies radicalaires et biologiques sur la dégradation du phénol a été calculé. Plusieurs incertitudes ont alors pu être constatées. Cependant, les microorganismes et les radicaux auraient un impact sur le devenir du phénol car leurs vitesses de dégradation sont du même ordre de grandeur.

Pour poursuivre cette étude, plusieurs perspectives peuvent être envisagées.

- Il faudrait mesurer les vitesses de dégradation du phénol pour plusieurs genres bactériens, et surtout celui des *Pseudomonas*, avec les souches cultivables isolées dans la phase aqueuse du nuage. Une étude avec des champignons et des levures pourrait également apporter des informations complémentaires.
- Il serait également intéressant de reproduire et de caractériser l'effet synergique constaté. Une étude plus approfondie de la dégradation du catéchol pourrait être entreprise pour confirmer la source de cet effet.
- Enfin, la dégradation du phénol pourrait être étudiée *in situ* dans des incubations d'eau de nuage. En comparant des échantillons filtrés et non filtrés en absence ou en présence de lumière, une distinction entre les processus abiotiques, photochimiques ou non, et les processus biotiques pourrait être faite. Les vitesses de dégradation de ce composé

pourraient alors être calculées, elles prendraient alors en compte la complexité de la composition chimique mais également celle de la microflore native.

Une fois ces informations obtenues, les voies de biodégradation du phénol pourraient être implémentées dans les modèles de chimie atmosphérique. Les vitesses obtenues pourraient alors servir pour paramétriser ces modèles. Ainsi plusieurs scénarios pourraient être faits en faisant varier le nombre de bactérie, le pourcentage de bactéries dégradant le phénol, *etc*. Il faudrait également implémenter l'effet synergique constaté entre la photo- et la biodégradation pour mieux comprendre le devenir et la concentration du phénol dans l'atmosphère.

Ainsi une caractérisation des composés aromatiques a été faite dans l'eau de nuage. Nous avons également montré que la biodégradation du phénol est possible par les microorganismes présents dans l'eau de nuage (activité *in situ* et dégradation par des souches récoltées dans l'eau de nuage). Nos résultats, bien que préliminaires, montrent que l'activité microbienne pourrait être du même ordre de grandeur que la réactivité radicalaire, voire supérieure à celle-ci, pour dégrader le phénol. Si ces résultats se confirment, ils démontreraient que les microorganismes peuvent intervenir dans la remédiation naturelle des polluants atmosphériques. Ceci pourrait être d'une grande importance pour la santé et la qualité de l'air au vu de la toxicité du phénol.

Conclusion générale et Perspectives

Le nuage est un milieu complexe car il est le résultat d'une interconnexion entre 3 compartiments : la phase gaz, la phase solide et la phase aqueuse. Il est soumis à des réactions chimiques, principalement radicalaires, mais également à des modifications dues à la présence de microorganismes. Sa composition chimique est encore incertaine avec seulement un peu plus de 20% de la matière organique totalement caractérisée. L'objectif de cette thèse était donc de **mesurer l'impact des processus photochimiques et biologiques sur la composition chimique du nuage.**

Dans un premier temps, nous avons focalisé ce travail sur l'évolution de la concentration stationnaire en radical hydroxyle dans l'eau de nuage. Ce paramètre, crucial, était auparavant issu des modèles de chimie atmosphérique. Ces modèles, complexifiés au fur et à mesure de l'avancée des connaissances, comportent encore certains biais et/ou incertitudes. Afin d'éviter une sous- et/ou surestimation de l'impact de l'une ou l'autre des voies, une mesure directe dans le milieu d'intérêt était nécessaire. A cette fin, nous avons mis au point une méthode simple, facile à utiliser et très sensible pour doser la concentration en radical hydroxyle à l'état stationnaire dans les eaux atmosphériques. Nous avons pu ainsi mettre en évidence que les concentrations obtenues sont plus basses que les concentrations estimées, en effet nos concentrations en radical hydroxyle à l'état stationnaire mesurées fluctuent entre 2,6 et 20 x 10^{-16} M alors que celles estimées par les modèles varient de 10^{-12} à 10^{-15} M.

Par la suite, nous avons voulu voir si les microorganismes influençaient cette concentration. En effet, leur capacité à modifier des espèces oxygénées dans la phase aqueuse du nuage avait déjà été démontrée (Vaïtilingom *et al.*, 2013). Pour mieux estimer l'impact de l'une ou l'autre des voies de dégradation, nous voulions être sûrs qu'aucune interférence n'avait lieu. Pour cela, nous avons analysé en parallèle des échantillons d'eaux de nuages filtrées et non filtrées dans le but de mesurer l'impact de la microflore native sur la concentration en radical hydroxyle à l'état stationnaire. Aucune différence significative n'a été constatée, nous permettant ainsi de conclure qu'aucune augmentation et/ou diminution de cette concentration n'a lieu en présence de microorganismes.

La surestimation de la concentration en radical hydroxyle dans les modèles est souvent due à une sous-estimation de sa réactivité avec la matière organique. Ceci s'explique par la faible proportion de matière organique clairement identifiée et mesurée en routine dans les nuages. Afin de contribuer à une meilleure compréhension de la matière organique, nous avons ensuite focalisé le travail sur l'identification de composés organiques semi-volatils présents dans des échantillons d'eaux de nuage. Ainsi, nous avons constaté qu'aucun composé halogéné n'était présent et que plus de 90% d'entre eux sont des composés oxydés et certains sont référencés comme polluants par l'EPA. Nous avons ensuite

ciblé notre étude sur onze composés aromatiques simples, parmi eux le phénol qui a été retrouvé dans toutes les eaux atmosphériques analysées.

De part sa potentielle toxicité et son ubiquité, nous avons approfondi notre étude sur ce composé.

- Dans un premier temps, nous nous sommes demandé si les microorganismes présents dans l'eau de nuage étaient à même de dégrader ce composé. Après avoir trouvé des transcrits exprimés *in situ* dans l'eau de nuage et constaté que 93% des souches (appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Rhodococcus* et à la famille des Moraxellaceae) cultivables récoltées dans les nuages collectés au puy de Dôme dégradent le phénol, nous en avons conclu que les microorganismes étaient susceptibles d'avoir un impact sur ce composé.
- Pour approfondir cette étude, nous avons cherché à estimer quantitativement l'impact relatif des voies photochimiques et biologiques sur la dégradation du phénol.

  Pour ce faire, une étude ciblée sur une des souches les plus performantes a été faite. Après avoir annoté les gènes présents chez *Rhodococcus enclensis* 23b-28, aucune séquence génétique n'a pu être associée à la dégradation du phénol. En revanche, des séquences génétiques intervenant dans la dégradation du catéchol ont bien été trouvées. Nous avons également pu constater que cette souche possède des gènes impliqués dans l'importation du fer. Ensuite, une étude de photo-biodégradation du phénol par cette souche nous a permis d'obtenir les vitesses de dégradation du phénol. Nous avons également vu un effet de synergie lorsque la lumière, le fer et la souche étaient présents.

  Grâce aux vitesses de dégradation calculées pour *Rhodococcus enclensis* et à celles obtenues dans la littérature pour *Pseudomonas*, l'impact relatif de la photo- et biodégradation du phénol a été estimé. Ceci nous a permis de constater que les vitesses de dégradation par les radicaux et par les bactéries testées sont du même ordre de grandeur laissant entendre que ces deux processus peuvent intervenir dans la dégradation de composés plus complexes (comme le phénol).

En conclusion, cette thèse a permis l'évaluation des concentrations stationnaires en radical hydroxyle dans la phase aqueuse du nuage. Ces valeurs représentent une véritable avancée pour la communauté des chimistes de l'atmosphère. Une caractérisation plus approfondie de la matière organique a également été obtenue. De plus, l'implication des microorganismes dans la dégradation du phénol a pu être mise en évidence. Cependant de nombreux points sont encore à étudier pour pouvoir réellement quantifier l'impact des voies photochimiques et biologiques sur la composition chimique du nuage.

Plusieurs perspectives ont été soulevées dans les chapitres précédents. Parmi elles, les plus pertinentes dans notre étude sont les suivantes :

- La mesure de la concentration stationnaire des radicaux doit être poursuivie.

  Dans un premier temps, les radicaux hydroxyles doivent être mesurés dans un plus grand nombre d'eaux de nuages récoltées au puy de Dôme pour évaluer l'impact de l'origine des masses d'air (nuages pollués, marins, continentaux) sur cette concentration ; elle pourrait également être mesurée dans d'autres sites d'échantillonnages. Ces informations permettraient de mieux paramètrer les modèles de chimie atmosphérique et d'avoir une meilleure compréhension de l'impact de ce radical sur la chimie atmosphérique.

  Il est aussi important de développer une méthode afin de quantifier l'autre radical majoritaire : le radical nitrate. Cette méthode devrait permettre de le doser *in situ* dans l'eau de nuage et il faudrait qu'elle puisse être réalisée en condition diurne et nocturne. Enfin pour continuer à mieux comprendre la réactivité de ce milieu oxydant, il serait également important de quantifier d'autres radicaux oxygénés de moindres importances, mais interagissant avec le radical hydroxyle, comme le radical anion superoxyde. Pour ces deux nouveaux radicaux, l'impact des microorganismes sur leurs concentrations doit également être testé. Il faudrait donc des méthodes biocompatibles permettant l'analyse d'eaux de nuage avec ou sans microorganismes.

- Les principales différences entre les concentrations modélisées et celles mesurées en laboratoires sont l'influence de la phase gaz et la complexité de la matière organique.

Au laboratoire, le transfert entre la phase gaz et la phase aqueuse ne peut pas être pris en compte dû à des contraintes pratiques. Dans les modèles, le transfert gaz-liquide est simulé en suivant le précepte de la loi de Henry. Ce paramètre est, pour certains composés, remis en cause, une étude plus approfondie serait donc nécessaire.

L'étude de la matière organique doit continuer. Pour cela, des méthodes de FT-ICR ou des analyses non ciblées en LC- ou GC-MS devront être mises en oeuvre. La première de ces méthodes ne permet pas une identification des molécules individuellement mais permet l'obtention de grandes familles de composés (CHO, CHON…). La deuxième méthode est plus complète en terme d'information cependant la quantité d'information à traiter est très importante.

- Enfin il nous faudra approfondir le rôle de la communauté microbienne dans les processus de transformation des composés organiques.

Amato *et al.* (2017) ont pu mettre en évidence que la communauté microbienne demeure active *via* la présence de transcrits dans l'eau de nuage. Une étude métatranscriptomique a également été réalisée montrant quelles fonctions sont exprimées par cette communauté. Au cours de cette thèse nous n'avons exploré qu'une partie infime de cette information, ciblée sur la dégradation du phénol. Il serait intéressant maintenant de chercher en détail toutes les fonctions exprimées par cette communauté et de façon plus spécifique celles liées à l'ensemble des composés aromatiques ou, plus généralement, aux composés semi-volatils présents dans l'eau de nuage.

Une autre approche serait d'étudier le devenir de la matière organique grâce à des microcosmes contenant des échantillons d'eau de nuage réelle. Pour se faire, de l'eau de nuage pourrait être incubée en présence ou en absence de lumière avec ou sans la microflore native (suite à un processus de filtration). Des cinétiques de dégradation et/ou de formation pourraient être obtenues en analysant, au cours du temps, l'évolution des composés organiques par GC-MS. Ainsi une comparaison des processus photochimiques et biologiques ayant lieu *in situ* dans l'eau de nuage pourrait être faite, elle prendrait ainsi en compte les effets synergiques et/ou antagonistes.

Bibliographie

Ahern, H.E., Walsh, K.A., Hill, T.C.J., and Moffett, B.F. (2007). Fluorescent pseudomonads isolated from Hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation. Biogeosciences *4*, 115–124.

Ajaz, M., Noor, N., Rasool, S.A., and Khan, S.A. (2004). Phenol resistant bacteria from soil: Identification-characterization and genetical studies. Pakistan Journal of Botany *36*, 415–424.

Albinet, A., Minero, C., and Vione, D. (2010). Photochemical generation of reactive species upon irradiation of rainwater: Negligible photoactivity of dissolved organic matter. Science of the Total Environment *408*, 3367–3373.

Al-Khalid, T., and El-Naas, M.H. (2012). Aerobic biodegradation of phenols: A comprehensive review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology *42*, 1631–1690.

Alvarez, H.M. (2010). Overview of *Rhodococcus* genome. In Biology of *Rhodococcus*, (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlac), pp. 76–82.

Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews *59*, 143–169.

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

Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., and Delort, A.-M. (2007b). An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the puy de Dôme (France). Atmospheric Environment *41*, 8253–8263.

Amato, P., Demeer, F., Melaouhi, A., Fontanella, S., Martin-Biesse, A.-S., Sancelme, M., Laj, P., and Delort, A.-M. (2007c). A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: Their biotransformation by micro-organisms. Atmospheric Chemistry and Physics *7*, 4159–4169.

Amato, P., Joly, M., Besaury, L., Oudart, A., Taib, N., Moné, A.I., Deguillaume, L., Delort, A.-M., and Debroas, D. (2017a). Active microorganisms thrive among extremely diverse communities in cloud water. PLoS One *12*, e0182869.

Amato, P., Brisebois, E., Draghi, M., Duchaine, C., Fröhlich-Nowoisky, J., Huffman, J.A., Mainelis, G., Robine, E., and Thibaudon, M. (2017b). Main biological aerosols, specificities, abundance and diversity. In Microbiology of Aerosols, A. M. Delort and P. Amato (Whiley), pp. 3–22.

Anastasio, C., and McGregor, K.G. (2001). Chemistry of fog waters in California's Central Valley: 1. In situ photoformation of hydroxyl radical and singlet molecular oxygen. Atmospheric Environment *35*, 1079–1089.

Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. URL: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Aneja, V.P. (1993). Organic compounds in cloud water and their deposition at a remote continental site. Air & Waste *43*, 1239–1244.

Anifowose, A.J., Takeda, K., and Sakugawa, H. (2015). Novel fluorometric method for the determination of production rate and steady-state concentration of photochemically generated superoxide radical in seawater using 3′, 6′-(diphenylphosphinyl) fluorescein. Analytical Chemistry *87*, 11998–12005.

Arakaki, T., and Faust, B.C. (1998). Sources, sinks, and mechanisms of hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) photoproduction and consumption in authentic acidic continental cloud waters from Whiteface Mountain, New York: The role of the Fe(r) (r = II, III) photochemical cycle. Journal of Geophysical Research *103*, 3487–3504.

Arakaki, T., Miyake, T., Shibata, M., and Sakugawa, H. (1999). Photochemical formation and scavenging of hydroxyl radical in rain and dew waters. Nippon Kagaku Kaishi *5*, 335–340.

Arakaki, T., Anastasio, C., Kuroki, Y., Nakajima, H., Okada, K., Kotani, Y., Handa, D., Azechi, S., Kimura, T., Tsuhako, A., and Miyagi, Y. (2013). A general scavenging rate constant for reaction of hydroxyl radical with organic carbon in atmospheric waters. Environmental Science & Technology *47*, 8196–8203.

Ariya, P.A., Nepotchatykh, O., Ignatova, O., and Amyot, M. (2002). Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. Geophysical Research Letters *29*, 34-1-34–4.

Atkinson, R. (2000). Atmospheric chemistry of VOCs and NOx. Atmospheric Environment *34*, 2063–2101.

Atkinson, R., and Arey, J. (2003). Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: A review. Atmospheric Environment *37*, 197–219.

Atkinson, R., and Aschmann, S.M. (1988). Kinetics of the reactions of acenaphthene and acenaphthylene and structurally-related aromatic compounds with OH and NO_3 radicals, N_2O_5 and O_3 at 296±2 K. International Journal of Chemical Kinetics *20*, 513–539.

Atkinson, R., Aschmann, S.M., and Arey, J. (1992). Reactions of OH and NO_3 radicals with phenol, cresols, and 2-nitrophenol at 296±2 K. Environmental Science & Technology *26*, 1397–1403.

Auffret, M.D., Yergeau, E., Labbé, D., Fayolle-Guichard, F., and Greer, C.W. (2015). Importance of *Rhodococcus* strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. Applied Microbiology and Biotechnology *99*, 2419–2430.

Avery, S.V. (2011). Molecular targets of oxidative stress. Biochemical Journal *434*, 201–210.

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., and Prjibelski, A.D. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. Journal of Computational Biology *19*, 455–477.

Bano, N., Moran, M.A., and Hodson, R.E. (1998). Photochemical formation of labile organic matter from two components of dissolved organic carbon in a freshwater wetland. Aquatic Microbial Ecology *16*, 95–102.

Barth, M.C., Hegg, D.A., Hobbs, P.V., Walega, J.G., Kok, G.L., Heikes, B.G., and Lazrus, A.L. (1989). Measurements of atmospheric gas-phase and aqueous-phase hydrogen peroxide concentrations in winter on the east coast of the United States. Tellus B *41*, 61–69.

Barth, M.C., Sillman, S., Hudman, R., Jacobson, M.Z., Kim, C.-H., Monod, A., and Liang, J. (2003). Summary of the cloud chemistry modeling intercomparison: Photochemical box model simulation. Journal of Geophysical Research: Atmospheres *108*, 4214.

Barzaghi, P., and Herrmann, H. (2002). A mechanistic study of the oxidation of phenol by $OH/NO_2/NO_3$ in aqueous solution. Physical Chemistry Chemical Physics *4*, 3669–3675.

Basha, K.M., Rajendran, A., and Thangavelu, V. (2010). Recent advances in the biodegradation of phenol: A review. Asian Journal of Experimental Biological Sciences *1*, 219–234.

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

Bauer, H., Giebl, H., Hitzenberger, R., Kasper-Giebl, A., Reischl, G., Zibuschka, F., and Puxbaum, H. (2003). Airborne bacteria as cloud condensation nuclei. Journal of Geophysical Research: Atmospheres *108*, 4658.

Behra, P., and Sigg, L. (1990). Evidence for redox cycling of iron in atmospheric water droplets. Nature *344*, 419–421.

Benkelberg, H.J., Deister, U., and Warneck, P. (1990). OH quantum yields for the photodecomposition of Fe(III) hydroxo complexes in aqueous solution and the reaction of OH with hydroxymethanesulfonate. In Physico-Chemical Behaviour of Atmospheric Pollutants, (Springer), pp. 263–269.

Berge, O., Monteil, C.L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D.C., and Morris, C.E. (2014). A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. PLoS ONE *9*, e105547.

Berndt, T., and Böge, O. (2003). Gas-phase reaction of OH radicals with phenol. Physical Chemistry Chemical Physics *5*, 342–350.

Bernier, J.-C., Brasseur, G., Bréchet, Y., Candel, S., Cazenave, A., Courtillot, V., Fontecave, M., Garnier, E., Goebel, P., Legrand, J., *et al.* (2016). La chimie de la glace : une archive de notre environnement passé. In Chimie et Changement Climatique, (EDT Sciences), pp.87–104.

Bianco, A., Passananti, M., Perroux, H., Voyard, G., Mouchel-Vallon, C., Chaumerliac, N., Mailhot, G., Deguillaume, L., and Brigante, M. (2015). A better understanding of hydroxyl radical photochemical sources in cloud waters collected at the puy de Dôme station – experimental versus modelled formation rates. Atmospheric Chemistry and Physics *15*, 9191–9202.

Bianco, A., Voyard, G., Deguillaume, L., Mailhot, G., and Brigante, M. (2016). Improving the characterization of dissolved organic carbon in cloud water: Amino acids and their impact on the oxidant capacity. Scientific Reports *6*.

Blanchard, D.C. (1989). The ejection of drops from the sea and their enrichment with bacteria and other materials: A review. Estuaries and Coasts *12*, 127–137.

Błaś, M., Sobik, M., and Twarowski, R. (2008). Changes of cloud water chemical composition in the Western Sudety Mountains, Poland. Atmospheric Research *87*, 224–231.

Blough, N.V., and Zepp, R.G. (1995). Reactive oxygen species in natural waters. In Active Oxygen in Chemistry, C. S. Foote, J. Valentine, A. Greenberg and J. F. Liebman (Springer), pp. 280–330.

Bowers, R.M., Lauber, C.L., Wiedinmyer, C., Hamady, M., Hallar, A.G., Fall, R., Knight, R., and Fierer, N. (2009). Characterization of airborne microbial communities at a high-elevation site and their potential to act as atmospheric ice nuclei. Applied and Environmental Microbiology *75*, 5121–5130.

Brennerova, M.V., Josefiova, J., Brenner, V., Pieper, D.H., and Junca, H. (2009). Metagenomics reveals diversity and abundance of *meta*-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. Environmental Microbiology *11*, 2216–2227.

Brezonik, P.L., and Fulkerson-Brekken, J. (1998). Nitrate-induced photolysis in natural waters: Controls on concentrations of hydroxyl radical photo-intermediates by natural scavenging agents. Environmental Science & Technology *32*, 3004–3010.

Brigante, M., and Mailhot, G. (2015). Phototransformation of organic compounds induced by iron species. In Surface Water Photochemistry, P. Calza and D.Vione (Royal Society of Chemistry), pp. 167–195.

Bunescu, A. (2006). Photo-et biodégradation de dérivés du benzothiazole: Etude en système combiné. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.

Burger, S.R., and Bennett, J.W. (1985). Droplet enrichment factors of pigmented and nonpigmented *Serratia marcescens*: Possible selective function for prodigiosin. Applied and Environmental Microbiology *50*, 487–490.

Burns, J.M., Cooper, W.J., Ferry, J.L., King, D.W., DiMento, B.P., McNeill, K., Miller, C.J., Miller, W.L., Peake, B.M., and Rusak, S.A. (2012). Methods for reactive oxygen species (ROS) detection in aqueous environments. Aquatic Sciences *74*, 683–734.

Burrows, S.M., Elbert, W., Lawrence, M.G., and Pöschl, U. (2009). Bacteria in the global atmosphere–Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems. Atmospheric Chemistry and Physics *9*, 9263–9280.

Cabrera-Perez, D., Taraborrelli, D., Sander, R., and Pozzer, A. (2016). Global atmospheric budget of simple monocyclic aromatic compounds. Atmospheric Chemistry and Physics *16*, 6931–6947.

Calvert, J.G., Atkinson, R., Becker, K.H., Kamens, R.M., Seinfeld, J.H., Wallington, T.H., and Yarwood, G. (2002). Importance of aromatic hydrocarbons in the chemistry of ozone generation in the urban atmosphere. In The Mechanisms of Atmospheric Oxidation of the Aromatic Hydrocarbons, Oxford University Press, pp. 3–35.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., and Madden, T.L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. BMC Bioinformatics *10*, 421.

Cao, B., Nagarajan, K., and Loh, K.-C. (2009). Biodegradation of aromatic compounds: Current status and opportunities for biomolecular approaches. Applied Microbiology and Biotechnology *85*, 207–228.

Cao, J., Woodhall, M.R., Alvarez, J., Cartron, M.L., and Andrews, S.C. (2007). EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe^{2+} transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K-12 but functional in *E. coli* O157: H7. Molecular Microbiology *65*, 857–875.

Chameides, W.K., and Davis, D.D. (1982). The free radical chemistry of cloud droplets and its impact upon the composition of rain. Journal of Geophysical Research *87*, 4863–4877.

Charbouillot, T., Brigante, M., Mailhot, G., Maddigapu, P.R., Minero, C., and Vione, D. (2011). Performance and selectivity of the terephthalic acid probe for OH as a function of temperature, pH and composition of atmospherically relevant aqueous media. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry *222*, 70–76.

Cheize, M., Sarthou, G., Croot, P.L., Bucciarelli, E., Baudoux, A.-C., and Baker, A.R. (2012). Iron organic speciation determination in rainwater using cathodic stripping voltammetry. Analytica Chimica Acta *736*, 45–54.

Chen, R., and Pignatello, J.J. (1997). Role of quinone intermediates as electron shuttles in Fenton and photoassisted Fenton oxidations of aromatic compounds. Environmental Science & Technology *31*, 2399–2406.

Cho, B.C., and Jang, G.I. (2014). Active and diverse rainwater bacteria collected at an inland site in spring and summer 2011. Atmospheric Environment *94*, 409–416.

Choi, E.J., Jin, H.M., Lee, S.H., Math, R.K., Madsen, E.L., and Jeon, C.O. (2013). Comparative genomic analysis and benzene, toluene, ethylbenzene, and o-, m-, and p-xylene (BTEX) degradation pathways of *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. Applied and Environmental Microbiology *79*, 663–671.

Chorao, C. (2008). Etude du métabolisme de *Rhodococcus rhodoch*rous lors de la photobiodégradation du 2-aminobenzothiazole: Effet de l'immobilisation des cellules et rôle du fer. Clermont-Ferrand 2.

Cicolella, A. (2008). Les composés organiques volatils (COV): Définition, classification et propriétés. Revue Des Maladies Respiratoires *25*, 155–163.

Clairborn, C.S., and Aneja, V.P. (1991). Measurements of atmospheric hydrogen peroxide in the gas phase and in cloud water at Mr. Mitchell, North Carolina. Journal of Geophysical Research *96*, 18771–18787.

Colón, M., Pleil, J.D., Hartlage, T.A., Guardani, M.L., and Martins, M.H. (2001). Survey of volatile organic compounds associated with automotive emissions in the urban airshed of Sao Paulo, Brazil. Atmospheric Environment *35*, 4017–4031.

Commane, R., Floquet, C.F.A., Ingham, T., Stone, D., Evans, M.J., and Heard, D.E. (2010). Observations of OH and HO_2 radicals over West Africa. Atmospheric Chemistry and Physics *10*, 8783–8801.

Costas, M., Mehn, M.P., Jensen, M.P., and Que, L. (2004). Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: Enzymes, models, and intermediates. Chemical Reviews *104*, 939–986.

Côté, V., Kos, G., Mortazavi, R., and Ariya, P.A. (2008). Microbial and "de novo" transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi. Science of the Total Environment *390*, 530–537.

Crutzen, P.J. (1996). My life with O_3, NOx, and other YZOx compounds (Nobel lecture). Angewandte Chemie International Edition *35*, 1758–1777.

Czuczwa, J., Leuenberger, C., Tremp, J., and Giger, W. (1987). Determination of trace levels of phenol and cresols in rain by continuous liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography *403*, 233–241.

Dastager, S.G., Mawlankar, R., Tang, S.-K., Krishnamurthi, S., Ramana, V.V., Joseph, N., and Shouche, Y.S. (2014). *Rhodococcus enclensis* sp. nov., a novel member of the genus *Rhodococcus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology *64*, 2693–2697.

De Gouw, J.A., Cooper, O.R., Warneke, C., Hudson, P.K., Fehsenfeld, F.C., Holloway, J.S., Hübler, G., Nicks Jr, D.K., Nowak, J.B., and Parrish, D.D. (2004). Chemical composition of air masses transported from Asia to the US West Coast during ITCT 2K2: Fossil fuel combustion versus biomass-burning signatures. Journal of Geophysical Research: Atmosphere *109*, D23S20.

De Gouw, J.A., Warneke, C., Stohl, A., Wollny, A.G., Brock, C.A., Cooper, O.R., Holloway, J.S., Trainer, M., Fehsenfeld, F.C., and Atlas, E.L. (2006). Volatile organic compounds composition of merged and aged forest fire plumes from Alaska and western Canada. Journal of Geophysical Research: Atmosphere *111*, D10303.

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

Deguillaume, L., Leriche, M., Desboeufs, K., Mailhot, G., George, C., and Chaumerliac, N. (2005a). Transition metals in atmospheric liquid phases: Sources, reactivity, and sensitive parameters. Chemical Reviews *105*, 3388–3431.

Deguillaume, L., Leriche, M., and Chaumerliac, N. (2005b). Impact of radical versus non-radical pathway in the Fenton chemistry on the iron redox cycle in clouds. Chemosphere *60*, 718–724.

Deguillaume, L., Desboeufs, K.V., Leriche, M., Long, Y., and Chaumerliac, N. (2010). Effect of iron dissolution on cloud chemistry: From laboratory measurements to model results. Atmospheric Pollution Research *1*, 220–228.

Deguillaume, L., Charbouillot, T., Joly, M., Vaïtilingom, M., Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Delort, A.-M., Vinatier, V., Flossmann, A., Chaumerliac, N., Pichon, J. M., Houdier, S., Laj, P., Sellegri, K., Colomb, A., Brigante, M. and Mailhot, G. (2014). Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) based on 10 yr of monitoring of their physicochemical properties. Atmospheric Chemistry and Physics *14*, 1485–1506.

DeLeon-Rodriguez, N., Lathem, T.L., Rodriguez-R, L.M., Barazesh, J.M., Anderson, B.E., Beyersdorf, A.J., Ziemba, L.D., Bergin, M., Nenes, A., and Konstantinidis, K.T. (2013). Microbiome of the upper troposphere: Species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 2575–2580.

Delmas, R., Mégie, G., and Peuch, V. (2005). Processus physico-chimiques. In Physique et Chimie de l'Atmosphère, Paris Belin (Échelles (Paris)), pp. 121-170.

Delort, A.M., Besse, P., Mailhot, G., Sancelme, M., Combourieu, B., Chorao, C., Covaliova, O., Covaliov, V., Bunescu, A., Dragalin, I., Cincilei, A. and Tolocichina, S. (2008). Aspects concerning

the photo- and biodegradation of benzothiazoles in aquatic compartment. Chemistry Journal of Moldova *3*, 58–64.

Delort, A.-M., Vaïtilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Parazols, M., Mailhot, G., Laj, P., and Deguillaume, L. (2010). A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes. Atmospheric Research *98*, 249–260.

Delort, A.M., Vaïtilingom, M., Joly, M., Amato, P., Wirgot, N., Lallement, A., Sancelme, M., Matulova, M., and Deguillaume, L. (2017). Clouds: A transient and stressing habitat for microorganisms. In Microbial Ecology of Extreme Environments, C. Chénard, and F.M. Lauro, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 215–245.

Der Yang, R., and Humphrey, A.E. (1975). Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. Biotechnology and Bioengineering *17*, 1211–1235.

Erhan, E., Yer, E., Akay, G., Keskinler, B., and Keskinler, D. (2004). Phenol degradation in a fixed-bed bioreactor using micro-cellular polymer-immobilized *Pseudomonas syringae*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology *79*, 195–206.

Ervens, B., George, C., Williams, J.E., Buxton, G.V., Salmon, G.A., Bydder, M., Wilkinson, F., Dentener, F., Mirabel, P., and Wolke, R. (2003). CAPRAM 2.4 (MODAC mechanism): An extended and condensed tropospheric aqueous phase mechanism and its application. Journal of Geophysical Research: Atmosphere *108*, 4426.

Fang, H., Cai, L., Yu, Y., and Zhang, T. (2013). Metagenomic analysis reveals the prevalence of biodegradation genes for organic pollutants in activated sludge. Bioresource Technology *129*, 209–218.

Faust, B.C. (1994). Photochemistry of clouds, fogs, and aerosols. Environmental Science & Technology *28 (5)*, 217A–222A.

Faust, B.C. (1999). Aquatic photochemical reactions in atmospheric, surface, and marine waters: Influences on oxidant formation and pollutant degradation. In Environmental Photochemistry, P. Boule (Springer), pp. 101–122.

Faust, B.C., and Allen, J.M. (1993). Aqueous-phase photochemical formation of hydroxyl radical in authentic cloudwaters and fogwaters. Environmental Science & Technology *27*, 1221–1224.

Faust, B.C., and Hoigné, J. (1990). Photolysis of Fe(III)-hydroxy complexes as sources of OH radicals in clouds, fog and rain. Atmospheric Environment. Part A. General Topics *24*, 79–89.

Faust, B.C., and Zepp, R.G. (1993). Photochemistry of aqueous iron (III)-polycarboxylate complexes: Roles in the chemistry of atmospheric and surface waters. Environmental Science & Technology *27*, 2517–2522.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. L'actualité Chimique *108*.

Feigenbrugel, V., Le Calvé, S., Mirabel, P., and Louis, F. (2004). Henry's law constant measurements for phenol, o-, m-, and p-cresol as a function of temperature. Atmospheric Environment *38*, 5577–5588.

Felföldi, T., Székely, A.J., Gorál, R., Barkács, K., Scheirich, G., András, J., Rácz, A., and Márialigeti, K. (2010). Polyphasic bacterial community analysis of an aerobic activated sludge removing phenols and thiocyanate from coke plant effluent. Bioresource Technology *101*, 3406–3414.

Fishbein, L. (1984). An overview of environmental and toxicological aspects of aromatic hydrocarbons. I. Benzene. Science of the Total Environment *40*, 189–218.

Fuzzi, S., Mandrioli, P., and Perfetto, A. (1997). Fog droplets—an atmospheric source of secondary biological aerosol particles. Atmospheric Environment *31*, 287–290.

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

Gallagher, M.W., Choularton, T.W., Tyler, B.J., Stromberg, I.M., and Mill, C.S. (1991). Measurements of the entrainment of hydrogen peroxide into cloud systems. Atmospheric Environment *25A*, 2029–2038.

Gami, A.A., Shukor, M.Y., Khalil, K.A., Dahalan, F.A., Khalid, A., and Ahmad, S.A. (2014). Phenol and phenolic compounds toxicity. Journal of Environmental Microbiology and Toxicology *2*, 11–23.

Gilardoni, S., Massoli, P., Paglione, M., Giulianelli, L., Carbone, C., Rinaldi, M., Decesari, S., Sandrini, S., Costabile, F., and Gobbi, G.P. (2016). Direct observation of aqueous secondary organic aerosol from biomass-burning emissions. Proceedings of the National Academy of Sciences *113*, 10013–10018.

Gill, P.S., Graedel, T.E., and Weschler, C.J. (1983). Organic films on atmospheric aerosol particles, fog droplets, cloud droplets, raindrops, and snowflakes. Reviews of Geophysics *21*, 903–920.

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

Glatt, H., Padykula, R., Berchtold, G.A., Ludewig, G., Platt, K.L., Klein, J., and Oesch, F. (1989). Multiple activation pathways of benzene leading to products with varying genotoxic characteristics. Environmental Health Perspectives *82*, 81–89.

Gligorovski, S., Strekowski, R., Barbati, S., and Vione, D. (2015). Environmental implications of hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$). Chemical Reviews *115*, 13051–13092.

Goldstone, J.V., and Voelker, B.M. (2000). Chemistry of superoxide radical in seawater: CDOM associated sink of superoxide in coastal waters. Environmental Science & Technology *34*, 1043–1048.

Graedel, T.E., and Weschler, C.J. (1981). Chemistry within aqueous atmospheric aerosols and raindrop. Reviews of Geophysics and Space Physics *19*, 505–539.

Graedel, T.E., Mandich, M.L., and Weschler, C.J. (1986). Kinetic model studies of atmospheric droplet chemistry; 2. Homogeneous transition metal chemistry in raindrop. Journal of Geophysical Research *91*, 5205–5221.

Graf, E., Mahoney, J.R., Bryant, R.G., and Eaton, J.W. (1984). Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. Journal of Biological Chemistry *259*, 3620–3624.

Grammatika, M., and Zimmerman, W.B. (2001). Microhydrodynamics of flotation processes in the sea surface layer. Dynamics of Atmospheres and Oceans *34*, 327–348.

Gregory, P.H. (1971). Airborne microbes: Their significance and distribution. Proceedings of the Royal Society of London B *117*, 469–483.

Grosjean, D. (1991). Atmospheric fate of toxic aromatic compounds. Science of the Total Environment *100*, 367–414.

Gülensoy, N., and Alvarez, P.J. (1999). Diversity and correlation of specific aromatic hydrocarbon biodegradation capabilities. Biodegradation *10*, 331–340.

Haag, W.R., and Hoigné, J. (1985). Photo-sensitized oxidation in natural water *via* OH radicals. Chemosphere *14*, 1659–1671.

Haber, F., and Weiss, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proceedings of the Royal Society of London A *147*, 332–351.

Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology *141*, 312–322.

Hansard, S.P., Vermilyea, A.W., and Voelker, B.M. (2010). Measurements of superoxide radical concentration and decay kinetics in the Gulf of Alaska. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers *57*, 1111–1119.

Harrison, M.A., Cape, J.N., and Heal, M.R. (2002). Experimentally determined Henry's Law coefficients of phenol, 2-methylphenol and 2-nitrophenol in the temperature range 281–302K. Atmospheric Environment *36*, 1843–1851.

Harrison, M.A.J., Barra, S., Borghesi, D., Vione, D., Arsene, C., and Iulian Olariu, R. (2005). Nitrated phenols in the atmosphere: A review. Atmospheric Environment *39*, 231–248.

Heal, M.R., Pilling, M.J., Titcombe, P.E., and Whitaker, B.J. (1995). Mass accommodation of aniline, phenol and toluene on aqueous droplets. Geophysical Research Letters *22*, 3043–3046.

Heller, M.I., and Croot, P.L. (2009). Superoxide decay kinetics in the Southern Ocean. Environmental Science & Technology *44*, 191–196.

Herckes, P., Wendling, R., Sauret, N., Mirabel, P., and Wortham, H. (2002). Cloudwater studies at a high elevation site in the Vosges Mountains (France). Environmental Pollution *117*, 169–177.

Herckes, P., Valsaraj, K.T., and Collett, J.L. (2013). A review of observations of organic matter in fogs and clouds: Origin, processing and fate. Atmospheric Research *132*, 434–449.

Herrmann, H. (2003). Kinetics of aqueous phase reactions relevant for atmospheric chemistry. Chemical Reviews *103*, 4691–4716.

Herrmann, H., Exner, M., Jacobi, H.-W., Raabe, G., Reese, A., and Zellner, R. (1995). Laboratory studies of atmospheric aqueous-phase free-radical chemistry: Kinetic and spectroscopic studies of reactions of NO_3 and SO_4 radicals with aromatic compounds. Faraday Discussions *100*, 129–153.

Herrmann, H., Ervens, B., Jacobi, H.-W., Wolke, R., Nowacki, P., and Zellner, R. (2000). CAPRAM2.3: A chemical aqueous phase radical mechanism for tropospheric chemistry. Journal of Atmospheric Chemistry *36*, 231–284.

Herrmann, H., Tilgner, A., Barzaghi, P., Majdik, Z., Gligorovski, S., Poulain, L., and Monod, A. (2005). Towards a more detailed description of tropospheric aqueous phase organic chemistry: CAPRAM 3.0. Atmospheric Environment *39*, 4351–4363.

Herrmann, H., Hoffmann, D., Schaefer, T., Bräuer, P., and Tilgner, A. (2010). Tropospheric aqueous-phase free-radical chemistry: Radical sources, spectra, reaction kinetics and prediction tools. ChemPhysChem *11*, 3796–3822.

Herrmann, H., Schaefer, T., Tilgner, A., Styler, S.A., Weller, C., Teich, M., and Otto, T. (2015). Tropospheric aqueous-phase chemistry: Kinetics, mechanisms, and its coupling to a changing gas phase. Chemical Reviews *115*, 4259–4334.

Hill, K.A., Shepson, P.B., Galbavy, E.S., Anastasio, C., Kourtev, P.S., Konopka, A., and Stirm, B.H. (2007). Processing of atmospheric nitrogen by clouds above a forest environment. Journal of Geophysical Research *112*, 1–16.

Hinteregger, C., Leitner, R., Loidl, M., Ferschl, A., and Streichsbier, F. (1992). Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII. Applied Microbiology and Biotechnology *37*, 252–259.

Ho, K.F., and Lee, S.C. (2002). Identification of atmospheric volatile organic compounds (VOCs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and carbonyl compounds in Hong Kong. Science of the Total Environment *289*, 145–158.

al Housari, F., Vione, D., Chiron, S., and Barbati, S. (2010). Reactive photoinduced species in estuarine waters. Characterization of hydroxyl radical, singlet oxygen and dissolved organic matter triplet state in natural oxidation processes. Photochemical & Photobiological Sciences *9*, 78–86.

Huang, W. (2012). Homogeneous and heterogeneous Fenton and photo-Fenton processes: Impact of iron complexing agent ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid (EDDS). Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.

Huang, W., Brigante, M., Wu, F., Hanna, K., and Mailhot, G. (2012). Development of a new homogenous photo-Fenton process using Fe(III)-EDDS complexes. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry *239*, 17–23.

Huang, W., Brigante, M., Wu, F., Mousty, C., Hanna, K., and Mailhot, G. (2013). Assessment of the Fe(III)–EDDS complex in Fenton-like processes: From the radical formation to the degradation of Bisphenol A. Environmental Science & Technology *47*, 1952–1959.

Hunt, J.P., and Taube, H. (1952). The photochemical decomposition of hydrogen peroxide. Quantum yields, tracer and fractionation effects. Journal of the American Chemical Society *74*, 5999–6002.

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

Hutchings, J.W., Robinson, M.S., McIlwraith, H., Kingston, J.T., and Herckes, P. (2009). The chemistry of intercepted clouds in Northern Arizona during the North American monsoon season. Water, Air, and Soil Pollution *199*, 191–202.

Hwang, H.-M., Slaughter, L.F., Cook, S.M., and Cui, H. (2000). Photochemical and microbial degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) in a freshwater environment. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology *65*, 228–235.

Hwang, H.-M., Shi, X., Ero, I., Jayasinghe, A., Dong, S., and Yu, H. (2001). Microbial ecotoxicity and mutagenicity of 1-hydroxypyrene and its photoproducts. Chemosphere *45*, 445–451.

Imlay, J.A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. Annual Review of Biochemistry *77*, 755–776.

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.

Jacob, D.J. (2000). Heterogeneous chemistry and tropospheric ozone. Atmospheric Environment *34*, 2131–2159.

Jadeja, N.B., More, R.P., Purohit, H.J., and Kapley, A. (2014). Metagenomic analysis of oxygenases from activated sludge. Bioresource Technology *165*, 250–256.

Joly, M. (2013). Interactions microorganismes-nuage: Activité glaçogène et survie. Clermont-Ferrand 2.

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

Joly, M., Amato, P., Sancelme, M., Vinatier, V., Abrantes, M., Deguillaume, L., and Delort, A.-M. (2015). Survival of microbial isolates from clouds toward simulated atmospheric stress factors. Atmospheric Environment *117*, 92–98.

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

Joseph, J.M., Varghese, R., and Aravindakumar, C.T. (2001). Photoproduction of hydroxyl radicals from Fe(III)-hydroxy complex: A quantitative assessment. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry *146*, 67–73.

Kafilzadeh, F., Farhangdoost, M.-S., and Tahery, Y. (2010). Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. African Journal of Biotechnology *9*, 6721–6726.

Kawamura, K., and Kaplan, I.R. (1983). Organic compounds in the rainwater of Los Angeles. Environmental Science & Technology *17*, 497–501.

Kelly, T.J., Daum, P.H., and Schwartz, S.E. (1985). Measurements of peroxides in cloudwater and rain. Journal of Geophysical Research *90*, 7861–7871.

Kerbachi, R., Boughedaoui, M., Bounoua, L., and Keddam, M. (2006). Ambient air pollution by aromatic hydrocarbons in Algiers. Atmospheric Environment *40*, 3995–4003.

Kesselmeier, J., and Staudt, M. (1999). Biogenic volatile organic compounds (VOC): An overview on emission, physiology and ecology. Journal of Atmospheric Chemistry *33*, 23–88.

Kim, K.-H., Shon, Z.-H., Kim, M.-Y., Sunwoo, Y., Jeon, E.-C., and Hong, J.-H. (2008). Major aromatic VOC in the ambient air in the proximity of an urban landfill facility. Journal of Hazardous Materials *150*, 754–764.

Kitayama, A., Suzuki, E., Kawakami, Y., and Nagamune, T. (1996). Gene organization and low regiospecificity in aromatic-ring hydroxylation of a benzene monooxygenase of *Pseudomonas aeruginosa* JI104. Journal of Fermentation and Bioengineering *82*, 421–425.

Köster, W. (2001). ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B 12. Research in Microbiology *152*, 291–301.

Kotturi, G., Robinson, C.W., and Inniss, W.E. (1991). Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*. Applied Microbiology and Biotechnology *34*, 539–543.

Kourtev, P.S., Hill, K.A., Shepson, P.B., and Konopka, A. (2011). Atmospheric cloud water contains a diverse bacterial community. Atmospheric Environment *45*, 5399–5405.

Kumar, A., Kumar, S., and Kumar, S. (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. Biochemical Engineering Journal *22*, 151–159.

Kuster, W.C., Jobson, B.T., Karl, T., Riemer, D., Apel, E., Goldan, P.D., and Fehsenfeld, F.C. (2004). Intercomparison of volatile organic carbon measurement techniques and data at La Porte during the TexAQS2000 Air Quality Study. Environmental Science & Technology *38*, 221–228.

Lammel, G., and Metzig, G. (1991). Multiphase chemistry of orographic clouds: Observations at subalpine mountain sites. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry *340*, 564–574.

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods *9*, 357–359.

Le Cloirec, P. (2004). COV (composés organiques volatils), Techniques Ingénieur. G1835-2.

Lebedev, A.T., Polyakova, O.V., Mazur, D.M., and Artaev, V.B. (2013). The benefits of high resolution mass spectrometry in environmental analysis. Analyst *138*, 6946–6953.

Leinonen, R., Nardone, F., Zhu, W., and Apweiler, R. (2006). UniSave: the UniProtKB sequence/annotation version database. Bioinformatics *22*, 1284–1285.

Lelieveld, J., and Crutzen, P.J. (1991). The role of clouds in tropospheric photochemistry. Journal of Atmospheric Chemistry *12*, 229–267.

Leriche, M., Voisin, D., Chaumerliac, N., Monod, A., and Aumont, B. (2000). A model for tropospheric multiphase chemistry: Application to one cloudy event during the CIME experiment. Atmospheric Environment *34*, 5015–5036.

Leriche, M., Curier, R.L., Deguillaume, L., Caro, D., Sellegri, K., and Chaumerliac, N. (2007). Numerical quantification of sources and phase partitioning of chemical species in cloud: Application to wintertime anthropogenic air masses at the puy de Dôme station. Journal of Atmospheric Chemistry *57*, 281–297.

Lesh, S.A., and Mead, R.C. (1985). Sources screening for phenol. Prepared by Radian Corporation for US Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC. Contract 3889.

Leuenberger, C., Ligocki, M.P., and Pankow, J.F. (1985). Trace organic compounds in rain. 4. Identities, concentrations, and scavenging mechanisms for phenols in urban air and rain. Environmental Science & Technology *19*, 1053–1058.

Leuenberger, C., Czuczwa, J., Tremp, J., and Giger, W. (1988). Nitrated phenols in rain: Atmospheric occurrence of phytotoxic pollutants. Chemosphere *17*, 511–515.

Levsen, K., Behnert, S., PrieX, B., Svoboda, M., Winkeler, H.-D., and Zietlow, J. (1990). Organic compounds in precipitation. Chemosphere *21*, 1037–1061.

Lin, N.-H., and Peng, C.-M. (1999). Estimates of the contribution of below-cloud scavenging to the pollutant loadings of rain in Taipei, Taiwan. Terrestrial, Atmospheric and Oceanic Sciences *10*, 693–704.

Lind, J.A., and Kok, G.L. (1986). Henry's law determinations for aqueous solutions of hydrogen peroxide, methylhydroperoxide, and peroxyacetic acid. Journal of Geophysical Research *91*, 7889–7895.

Lindsey, M.E., and Tarr, M.A. (2000). Quantitation of hydroxyl radical during Fenton oxidation following a single addition of iron and peroxide. Chemosphere *41*, 409–417.

Liu, Y., Shao, M., Fu, L., Lu, S., Zeng, L., and Tang, D. (2008). Source profiles of volatile organic compounds (VOCs) measured in China: Part I. Atmospheric Environment *42*, 6247–6260.

Lloyda, R.V., Hannaa, P.M., and Masona, R.P. (1997). The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. Free Radical Biology and Medicine *22*, 885–888.

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

Long, Y., Charbouillot, T., Brigante, M., Mailhot, G., Delort, A.-M., Chaumerliac, N., and Deguillaume, L. (2013). Evaluation of modeled cloud chemistry mechanism against laboratory irradiation experiments: The HxOy/iron/carboxylic acid chemical system. Atmospheric Environment *77*, 686–695.

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

Lüttke, J., and Levsen, K. (1997). Phase partitioning of phenol and nitrophenols in clouds. Atmospheric Environment *31*, 2649–2655.

Lüttke, J., Scheer, V., Levsen, K., Wünsch, G., Cape, J.N., Hargreaves, K.J., Storeton-West, R.L., Acker, K., Wieprecht, W., and Jones, B. (1997). Occurrence and formation of nitrated phenols in and out of cloud. Atmospheric Environment *31*, 2637–2648.

Maddocks, S.E., and Oyston, P.C. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. Microbiology *154*, 3609–3623.

Maezono, T., Tokumura, M., Sekine, M., and Kawase, Y. (2011). Hydroxyl radical concentration profile in photo-Fenton oxidation process: Generation and consumption of hydroxyl radicals during the discoloration of azo-dye Orange II. Chemosphere *82*, 1422–1430.

Margesin, R., Fonteyne, P.-A., and Redl, B. (2005). Low-temperature biodegradation of high amounts of phenol by *Rhodococcus spp*. and *basidiomycetous* yeasts. Research in Microbiology *156*, 68–75.

Martinkova, L., Uhnakova, B., Patek, M., Nesvera, J., and Kren, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. Environment International *35*, 162–177.

Martins-Costa, M.T.C., Anglada, J.M., Francisco, J.S., and Ruiz-Lopez, M.F. (2012). Reactivity of atmospherically relevant small radicals at the air-water interface. Angewandte Chemie International Edition *51*, 5413–5417.

Masella, A.P., Bartram, A.K., Truszkowski, J.M., Brown, D.G., and Neufeld, J.D. (2012). PANDAseq: Paired-end assembler for illumina sequences. BMC Bioinformatics *13*, 31.

Matulová, M., Husárová, S., Capek, P., Sancelme, M., and Delort, A.-M. (2014). Biotransformation of various saccharides and production of exopolymeric substances by cloud-borne *Bacillus sp.* 3B6. Environmental Science & Technology *48*, 14238–14247.

Mauldin III, R.L., Madronich, S., Flocke, S.J., and Eisele, F.L. (1997). New insights on OH: Measurements around and in clouds. Geophysical Research Letters *24*, 3033–3036.

Mauldin III, R.L., Frost, G.J., Chen, G., Tanner, D.J., Prevot, A.S.H., Davis, D.D., and Eisele, F.L. (1998). OH measurements during the first Aerosol Characterization Experiment (ACE 1): Observations and model comparison. Journal of Geophysical Research *103*, 16713–16729.

Mayol, E., Jiménez, M.A., Herndl, G.J., Duarte, C.M., and Arrieta, J.M. (2014). Resolving the abundance and air-sea fluxes of airborne microorganisms in the North Atlantic Ocean. Frontiers in Microbiology *5* (557), 1–9.

McFall, S.M., Chugani, S.A., and Chakrabarty, A.M. (1998). Transcriptional activation of the catechol and chlorocatechol operons: Variations on a theme. Gene *223*, 257–267.

Michalowicz, J., and Duda, W. (2007). Phenols transformations in the environment and living organisms. Current Topics in Biophysics *30*, 24–36.

Miethke, M., Monteferrante, C.G., Marahiel, M.A., and van Dijl, J.M. (2013). The *Bacillus subtilis* EfeUOB transporter is essential for high-affinity acquisition of ferrous and ferric iron. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research *1833*, 2267–2278.

Mill, T., Hendry, D.G., and Richardson, H. (1980). Free-radical oxidants in natural waters. Science *207*, 886–887.

Mishra, V.K., and Kumar, N. (2017). Microbial degradation of phenol: A review. Journal of Water Pollution & Purification Research *4*, 17–22.

Molin, G., and Nilsson, I. (1985). Degradation of phenol by *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in continuous culture at different ratios of biofilm surface to culture volume. Applied and Environmental Microbiology *50*, 946–950.

Monks, P.S. (2005). Gas-phase radical chemistry in the troposphere. Chemical Society Reviews *34*, 376–395.

Monod, A., Poulain, L., Grubert, S., Voisin, D., and Wortham, H. (2005). Kinetics of OH-initiated oxidation of oxygenated organic compounds in the aqueous phase: New rate constants, structure–activity relationships and atmospheric implications. Atmospheric Environment *39*, 7667–7688.

Moreno, M. de L., Sánchez-Porro, C., Piubeli, F., Frias, L., García, M.T., and Mellado, E. (2011). Cloning, characterization and analysis of cat and ben genes from the phenol degrading halophilic bacterium *Halomonas organivorans*. PLoS ONE *6*, e21049.

Morris, C.E., Sands, D.C., Bardin, M., Jaenicke, R., Vogel, B., Leyronas, C., Ariya, P.A., and Psenner, R. (2011). Microbiology and atmospheric processes: Research challenges concerning the impact of airborne micro-organisms on the atmosphere and climate. Biogeosciences *8*, 17–25.

Mostofa, K.M.G., Liu, C., Gao, K., Li, S., Vione, D., and Mottaleb, M.A. (2013). Impacts of global warming on biogeochemical cycles in natural waters. In Photobiogeochemistry of Organic Matter, K.M.G. Mostofa, T. Yoshioka, A. Mottaleb, and D. Vione, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 851–914.

Mouchel-Vallon, C., Deguillaume, L., Monod, A., Perroux, H., Rose, C., Ghigo, G., Long, Y., Leriche, M., Aumont, B., and Patryl, L. (2017). CLEPS 1.0: A new protocol for cloud aqueous phase oxidation of VOC mechanisms. Geoscientific Model Development *10*, 1339–1362.

Na, K., Moon, K.-C., and Kim, Y.P. (2005). Source contribution to aromatic VOC concentration and ozone formation potential in the atmosphere of Seoul. Atmospheric Environment *39*, 5517–5524.

Nair, C.I., Jayachandran, K., and Shashidhar, S. (2008). Biodegradation of phenol. African Journal of Biotechnology *7*, 4951–4958.

Nakatani, N., Ueda, M., Shindo, H., Takeda, K., and Sakugawa, H. (2007). Contribution of the photo-Fenton reaction to hydroxyl radical formation rates in river and rain water samples. Analytical Sciences *23*, 1137–1142.

Natangelo, M., Mangiapan, S., Bagnati, R., Benfenati, E., and Fanelli, R. (1999). Increased concentrations of nitrophenols in leaves from a damaged forestal site. Chemosphere *38*, 1495–1503.

Nunes-Halldorson, V. da S., Steiner, R.L., and Smith, G.B. (2004). Residual toxicity after biodegradation: Interactions among benzene, toluene, and chloroform. Ecotoxicology and Environmental Safety *57*, 162–167.

Olariu, R.I. (2001). Atmospheric oxidation of selected aromatic hydrocarbons. Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal.

Olariu, R.I., Klotz, B., Barnes, I., Becker, K.H., and Mocanu, R. (2002). FT–IR study of the ring-retaining products from the reaction of OH radicals with phenol, o-, m-, and p-cresol. Atmospheric Environment *36*, 3685–3697.

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

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., and Shukla, M. (2013). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Research *42*, D206–D214.

Padmanabhan, P., Padmanabhan, S., DeRito, C., Gray, A., Gannon, D., Snape, J.R., Tsai, C.S., Park, W., Jeon, C., and Madsen, E.L. (2003). Respiration of ^{13}C-labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of ^{13}C-labeled soil DNA. Applied and Environmental Microbiology *69*, 1614–1622.

Papoutsakis, S., Brites-Nóbrega, F.F., Pulgarin, C., and Malato, S. (2015). Benefits and limitations of using Fe(III)-EDDS for the treatment of highly contaminated water at near-neutral pH. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry *303–304*, 1–7.

Parazols, M. (2007). Caractérisation physico-chimique et réactivité de la phase aqueuse des nuages prélevée au sommet du puy de Dôme. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.

Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Abida, O., Laj, P., Mailhot, G., Delort, A.-M., and Sergio, Z. (2007). Speciation and role of iron in cloud droplets at the puy de Dôme station. Journal of Atmospheric Chemistry *57*, 299–300.

Park, H.-J., and Kim, E.-S. (2003). An inducible *Streptomyces* gene cluster involved in aromatic compound metabolism. FEMS Microbiology Letters *226*, 151–157.

Pasteur, L. (1862). Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère: examen de la doctrine des générations spontanées. In Leçons de Chimie et de Physique Professées En 1861 à La Société Chimique de Paris, pp. 219–254.

Pelmont, J. (2012). L'oxygénation des aromatiques. Ouverture intradiol du cycle aromatique. Ouverture extradiol-La voie du gentisate. In Biodégradations et Métabolismes, EDP Sciences, pp. 365–502.

Picard, F., Dressaire, C., Girbal, L., and Cocaign-Bousquet, M. (2009). Examination of post-transcriptional regulations in prokaryotes by integrative biology. Comptes Rendus Biologies *332*, 958–973.

Piccot, S.D., Watson, J.J., and Jones, J.W. (1992). A global inventory of volatile organic compound emissions from anthropogenic sources. Journal of Geophysical Research: Atmospheres *97*, 9897–9912.

Piechowski, M.V., Nauser, T., Hoignè, J., and Bühler, R.E. (1993). O_2 decay catalyzed by Cu^{2+} and Cu^{+} ions in aqueous solutions: A pulse radiolysis study for atmospheric chemistry. Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie *97*, 762–771.

Powers, L.C., and Miller, W.L. (2014). Blending remote sensing data products to estimate photochemical production of hydrogen peroxide and superoxide in the surface ocean. Environmental Science: Processes & Impacts *16*, 792–806.

Qian, J., Mopper, K., and Kieber, D.J. (2001). Photochemical production of the hydroxyl radical in Antarctic waters. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers *48*, 741–759.

Rao, X., and Collett, J.L.J. (1995). Behavior of S(IV) and formaldehyde in a chemically heterogeneous cloud. Environmental Science & Technology *29*, 1023–1031.

Rauhut, R., and Klug, G. (1999). mRNA degradation in bacteria. FEMS Microbiology Reviews *23*, 353–370.

Rayne, S., Forest, K., and Friesen, K.J. (2009). Mechanistic aspects regarding the direct aqueous environmental photochemistry of phenol and its simple halogenated derivatives. A review. Environment International *35*, 425–437.

Razika, B., Abbes, B., Messaoud, C., and Soufi, K. (2010). Phenol and benzoic acid degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Water Resource and Protection *02*, 788–791.

Reardon, K.F., Mosteller, D.C., and Bull Rogers, J.D. (2000). Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. Biotechnology and Bioengineering *69*, 385–400.

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

Renard, P., Canet, I., Sancelme, M., Wirgot, N., Deguillaume, L., and Delort, A.M. (2016). Screening of cloud microorganisms isolated at the puy de Dôme (France) station for the production of biosurfactants. Atmospheric Chemistry and Physics *16*, 12347–12358.

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

Richards, L.W. (1995). Airborne chemical measurements in nighttime stratus clouds in the Los Angeles Basin. Atmospheric Environment *29*, 27–46.

Riedel, K., and Lassey, K. (2008). Detergent of the atmosphere. Water & Atmosphere *16*, 22–23.

Rippen, G., Zietz, E., Frank, R., Knacker, T., and Klöpffer, W. (1987). Do airborne nitrophenols contribute to forest decline? Environmental Technology *8*, 475–482.

Rohrer, F., and Berresheim, H. (2006). Strong correlation between levels of tropospheric hydroxyl radicals and solar ultraviolet radiation. Nature *442*, 184–187.

Römer, F.G., Viljeer, J.W., Van Den Beld, L., Slangewal, H.J., Veldkamp, A.A., Kema, N.V., and Reunders, H.F.R. (1985). The chemical composition of cloud and rainwater. Results of preliminary measurements from an aircraft. Atmospheric Environment *19*, 1847–1858.

Rose, A.L., Webb, E.A., Waite, T.D., and Moffett, J.W. (2008). Measurement and implications of nonphotochemically generated superoxide in the Equatorial Pacific Ocean. Environmental Science & Technology *42*, 2387–2393.

Rose, A.L., Godrant, A., Furnas, M., and Waite, T.D. (2010). Dynamics of nonphotochemical superoxide production in the Great Barrier Reef lagoon. Limnology and Oceanography *55*, 1521–1536.

Rubio, M.A., Lissi, E., Herrera, N., Pérez, V., and Fuentes, N. (2012). Phenol and nitrophenols in the air and dew waters of Santiago de Chile. Chemosphere *86*, 1035–1039.

Russi, H., Kotzias, D., and Korte, F. (1982). Photoinduzierte hydroxylierungsreaktionen organischer chemikalien in natürlichen Gewässern-Nitrate als potentielle OH-radikalquellen. Chemosphere *11*, 1041–1048.

Sakugawa, H., Kaplan, I.R., Tsai, W., and Cohen, Y. (1990). Atmospheric hydrogen peroxide: Does it share a role with ozone in degrading air quality? Environmental Science & Technology *24*, 1452–1462.

Samake, A., Uzu, G., Martins, J.M.F., Calas, A., Vince, E., Parat, S., and Jaffrezo, J.L. (2017). The unexpected role of bioaerosols in the oxidative potential of PM. Scientific Reports *7*.

Sander, R. (1999). Compilation of Henry's law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry (Max-Planck Institute of Chemistry, Air Chemistry Department Mainz, Germany).

Sandhu, A., Halverson, L.J., and Beattie, G.A. (2007). Bacterial degradation of airborne phenol in the phyllosphere. Environmental Microbiology *9*, 383–392.

Sandhu, A., Halverson, L.J., and Beattie, G.A. (2009). Identification and genetic characterization of phenol-degrading bacteria from leaf microbial communities. Microbial Ecology *57*, 276–285.

Šantl-Temkiv, T., Finster, K., Hansen, B.M., Pašić, L., and Karlson, U.G. (2013a). Viable methanotrophic bacteria enriched from air and rain can oxidize methane at cloud-like conditions. Aerobiologia *29*, 373–384.

Šantl-Temkiv, T., Finster, K., Dittmar, T., Hansen, B.M., Thyrhaug, R., Nielsen, N.W., and Karlson, U.G. (2013b). Hailstones: A window into the microbial and chemical inventory of a storm cloud. PloS One *8*, e53550.

Sattler, B., Puxbaum, H., and Psenner, R. (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets. Geophysical Research Letters *28*, 239–242.

Schauer, J.J., Kleeman, M.J., Cass, G.R., and Simoneit, B.R.T. (2001). Measurement of emissions from air pollution sources. 3. C_1−C_{29} organic compounds from fireplace combustion of wood. Environmental Science & Technology *35*, 1716–1728.

Schmieder, R., and Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics *27*, 863–864.

Schummer, C., Groff, C., Al Chami, J., Jaber, F., and Millet, M. (2009). Analysis of phenols and nitrophenols in rainwater collected simultaneously on an urban and rural site in east of France. Science of The Total Environment *407*, 5637–5643.

Schwartz, S.E. (1984). Gas- and aqueous-phase chemistry of HO_2 in liquid water clouds. Journal of Geophysical Research: Atmosphere *89*, 11589–11598.

Schwartz, S.E. (2003). Cloud chemistry. In Handbook of Weather, Climate and Water, (Wiley-Intersclence), pp. 331–345.

Sedlak, D.L., Hoigné, J., David, M.M., Colvile, R.N., Seyffer, E., Acker, K., Wiepercht, W., Lind, J.A., and Fuzzi, S. (1997). The cloudwater chemistry of iron and copper at Great Dun Fell, U.K. Atmospheric Environment *31*, 2515–2526.

Sharma, N., Tanksale, H., Kapley, A., and Purohit, H.J. (2012). Mining the metagenome of activated biomass of an industrial wastewater treatment plant by a novel method. Indian Journal of Microbiology *52*, 538–543.

Shen, X., Zhao, Y., Chen, Z., and Huang, D. (2013). Heterogeneous reactions of volatile organic compounds in the atmosphere. Atmospheric Environment *68*, 297–314.

Siefert, R.L., Johansen, A.M., Hoffmann, M.R., and Pehkonen, S.O. (1998). Measurements of trace metal (Fe, Cu, Mn, Cr) oxidation states in fog and stratus clouds. Journal of the Air & Waste Management Association *48*, 128–143.

Silva, C.C., Hayden, H., Sawbridge, T., Mele, P., De Paula, S.O., Silva, L.C.F., Vidigal, P.M.P., Vicentini, R., Sousa, M.P., Torres, A.P.R., Santiago, V. M. J., and Oliveira, V. M. (2013). Identification of genes and pathways related to phenol degradation in metagenomic libraries from petroleum refinery wastewater. PLoS One *8*, e61811.

Sridevi, V., Chandana Lakshmi, M.V.V., Manasa, M., and Sravani, M. (2012). Metabolic pathways for the biodegradation of phenol. International Journal of Engineering Science & Advanced Technology *2*, 695–705.

Stemmler, K., and von Gunten, U. (2000a). OH radical-initiated oxidation of organic compounds in atmospheric water phases: Part 1. Reactions of peroxyl radicals derived from 2-butoxyethanol in water. Atmospheric Environment *34*, 4241–4252.

Stemmler, K., and von Gunten, U. (2000b). OH radical-initiated oxidation of organic compounds in atmospheric water phases: Part 2. Reactions of peroxyl radicals with transition metals. Atmospheric Environment *34*, 4253–4264.

Straube, G. (1987). Phenol hydroxylase *from Rhodococcus sp.* P1. Journal of Basic Microbiology *27*, 229–232.

Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G., and Ferrara, D. (2010). Long-term phenol, cresols and BTEX monitoring in urban air. Environmental Monitoring and Assessment *164*, 93–100.

Suenaga, H., Koyama, Y., Miyakoshi, M., Miyazaki, R., Yano, H., Sota, M., Ohtsubo, Y., Tsuda, M., and Miyazaki, K. (2009). Novel organization of aromatic degradation pathway genes in a microbial community as revealed by metagenomic analysis. The ISME Journal *3*, 1335–1348.

Sukumaran, S. (2011). Concentration determination of nucleic acids and proteins using the Micro-volume Bio-spec Nano Spectrophotometer. Journal of Visualized Experiments *48*, 1–5.

Sun, Y.L., Zhang, Q., Anastasio, C., and Sun, J. (2010). Insights into secondary organic aerosol formed *via* aqueous-phase reactions of phenolic compounds based on high resolution mass spectrometry. Atmospheric Chemistry and Physics *10*, 4809–4822.

Takeda, K., Takedoi, H., Yamaji, S., Ohta, K., and Sakugawa, H. (2004). Determination of hydroxyl radical photoproduction rates in natural waters. Analytical Sciences *20*, 153–158.

Tao, Y., Fishman, A., Bentley, W.E., and Wood, T.K. (2004). Oxidation of benzene to phenol, catechol, and 1, 2, 3-trihydroxybenzene by toluene 4-monooxygenase of *Pseudomonas mendocina* KR1 and toluene 3-monooxygenase of *Ralstonia pickettii* PKO1. Applied and Environmental Microbiology *70*, 3814–3820.

Temkiv, T.Š., Finster, K., Hansen, B.M., Nielsen, N.W., and Karlson, U.G. (2012). The microbial diversity of a storm cloud as assessed by hailstones. FEMS Microbiology Ecology *81*, 684–695.

The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) Phenol. URL: https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0493.html.

Tian, M., Du, D., Zhou, W., Zeng, X., and Cheng, G. (2017). Phenol degradation and genotypic analysis of dioxygenase genes in bacteria isolated from sediments. Brazilian Journal of Microbiology *48*, 305–313.

Tilgner, A., and Herrmann, H. (2010). Radical-driven carbonyl-to-acid conversion and acid degradation in tropospheric aqueous systems studied by CAPRAM. Atmospheric Environment *44*, 5415–5422.

Tilgner, A., Bräuer, P., Wolke, R., and Herrmann, H. (2013). Modelling multiphase chemistry in deliquescent aerosols and clouds using CAPRAM3.0i. Journal of Atmospheric Chemistry *70*, 221–256.

Tokumura, M., Morito, R., Hatayama, R., and Kawase, Y. (2011). Iron redox cycling in hydroxyl radical generation during the photo-Fenton oxidative degradation: Dynamic change of hydroxyl radical concentration. Applied Catalysis B: Environmental *106*, 565–576.

Tubaro, M., Marotta, E., Seraglia, R., and Traldi, P. (2003). Atmospheric pressure photoionization mechanisms. 2. The case of benzene and toluene. Rapid Communications in Mass Spectrometry *17*, 2423–2429.

Ukpaka, C. (2016). BTX degradation: The concept of microbial integration. Chemistry International *3*, 8–18.

Umschlag, T., Zellner, R., and Herrmann, H. (2002). Laser-based studies of NO_3 radical reactions with selected aromatic compounds in aqueous solution. Physical Chemistry Chemical Physics *4*, 2975–2982.

Vaïtilingom, M. (2011). Rôle des microorganismes des nuages dans la chimie atmosphérique. Comparaison avec la chimie radicalaire. Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II.

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

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

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

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

Valverde-Canossa, J., Wieprecht, W., Acker, K., and Moortgat, G.K. (2005). H_2O_2 and organic peroxide measurements in an orographic cloud: The FEBUKO experiment. Atmospheric Environment *39*, 4279–4290.

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

Veselý, M., Knoppová, M., Nešvera, J., and Pátek, M. (2007). Analysis of catRABC operon for catechol degradation from phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis*. Applied Microbiology and Biotechnology *76*, 159–168.

Vinatier, V., Wirgot, N., Joly, M., Sancelme, M., Abrantes, M., Deguillaume, L., and Delort, A.-M. (2016). Siderophores in cloud waters and potential impact on atmospheric chemistry: Production by microorganisms isolated at the puy de Dôme station. Environmental Science & Technology *50*, 9315–9323.

Vione, D., Maurino, V., Minero, C., and Pelizzetti, E. (2003). The atmospheric chemistry of hydrogen peroxide: A review. Annali Di Chimica *93*, 477.

Vione, D., Maurino, V., Minero, C., Lucchiari, M., and Pelizzetti, E. (2004). Nitration and hydroxylation of benzene in the presence of nitrite/nitrous acid in aqueous solution. Chemosphere *56*, 1049–1059.

Vione, D., Ponzo, M., Bagnus, D., Maurino, V., Minero, C., and Carlotti, M.E. (2010). Comparison of different probe molecules for the quantification of hydroxyl radicals in aqueous solution. Environmental Chemistry Letters *8*, 95–100.

Vione, D., Minella, M., Maurino, V., and Minero, C. (2014). Indirect photochemistry in sunlit surface waters: Photoinduced production of reactive transient species. Chemistry - A European Journal *20*, 10590–10606.

Volkamer, R., Klotz, B., Barnes, I., Imamura, T., Wirtz, K., Washida, N., Heinz Becker, K., and Platt, U. (2002). OH-initiated oxidation of benzene Part I. Phenol formation under atmospheric conditions. Physical Chemistry Chemical Physics *4*, 1598–1610.

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

Warneck, P. (1999). The relative importance of various pathways for the oxidation of sulfur dioxide and nitrogen dioxide in sunlit continental fair weather clouds. Physical Chemistry Chemical Physics *1*, 5471–5483.

Warneck, P. (2005). Multi-phase chemistry of C_2 and C_3 organic compounds in the marine atmosphere. Journal of Atmospheric Chemistry *51*, 119–159.

Warneke, C., Van der Veen, C., Luxembourg, S., De Gouw, J.A., and Kok, A. (2001). Measurements of benzene and toluene in ambient air using proton-transfer-reaction mass spectrometry: Calibration, humidity dependence, and field intercomparison. International Journal of Mass Spectrometry *207*, 167–182.

Wei, M., Xu, C., Chen, J., Zhu, C., Li, J., and Lv, G. (2017). Characteristics of bacterial community in cloud water at Mt Tai: Similarity and disparity under polluted and non-polluted cloud episodes. Atmospheric Chemistry and Physics *17*, 5253–5270.

Weller, C., Tilgner, A., Bräuer, P., and Herrmann, H. (2014). Modeling the impact of iron–carboxylate photochemistry on radical budget and carboxylate degradation in cloud droplets and particles. Environmental Science & Technology *48*, 5652–5659.

Wennberg, P.O. (2006). Atmospheric chemistry: Radicals follow the Sun. Nature *442*, 145–146.

Weschler, C.J., Mandich, M.L., and Graedel, T.E. (1986). Speciation, photosensitivity, and reactions of transition metal ions in atmospheric droplets. Journal of Geophysical Research *91*, 5189–5204.

Whalley, L.K., Stone, D., George, I.J., Mertes, S., van Pinxteren, D., Tilgner, A., Herrmann, H., Evans, M.J., and Heard, D.E. (2015). The influence of clouds on radical concentrations: Observations and modelling studies of HO_x during the Hill Cap Cloud Thuringia (HCCT) campaign in 2010. Atmospheric Chemistry and Physics *15*, 3289–3301.

Wilkinson, J., Reynolds, B., Neal, C., Hill, S., Neal, M., and Harrow, M. (1997). Major, minor and trace element composition of cloudwater and rainwater at Plynlimon. Hydrology and Earth System Sciences *1*, 557–569.

Wirgot, N., Vinatier, V., Deguillaume, L., Sancelme, M., and Delort, A.-M. (2017). H_2O_2 modulates the energetic metabolism of the cloud microbiome. Atmospheric Chemistry and Physics Discussions *2017*, 1–20.

Wittmaack, K., Wehnes, H., Heinzmann, U., and Agerer, R. (2005). An overview on bioaerosols viewed by scanning electron microscopy. Science of the Total Environment *346*, 244–255.

Wu, Y., Brigante, M., Dong, W., de Sainte-Claire, P., and Mailhot, G. (2014). Toward a better understanding of Fe(III)–EDDS photochemistry: Theoretical stability calculation and experimental investigation of 4-*tert*-butylphenol degradation. The Journal of Physical Chemistry A *118*, 396–403.

Xu, C., Wei, M., Chen, J., Sui, X., Zhu, C., Li, J., Zheng, L., Sui, G., Li, W., Wang, W., Zhang, Q., and Mellouki, A. (2017). Investigation of diverse bacteria in cloud water at Mt. Tai, China. Science of The Total Environment *580*, 258–265.

Xu, X., Stee, Llp., Williams, J., Beens, J., Adahchour, M., Vreuls, R.J.J., Brinkman, U.A., and Lelieveld, J. (2003). Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere. Atmospheric Chemistry and Physics *3*, 665–682.

Yu, X.-Y., and Barker, J.R. (2003). Hydrogen peroxide photolysis in acidic aqueous solutions containing chloride ions. I. Chemical mechanism. The Journal of Physical Chemistry A *107*, 1313–1324.

Zafiriou, O.C., and Bonneau, R. (1987). Wavelength-dependent quantum yield of OH radical formation from photolysis of nitrite ion in water. Photochemistry and Photobiology *45*, 723–727.

Zellner, R., Exner, M., and Herrmann, H. (1990). Absolute OH quantum yields in the laser photolysis of nitrate, nitrite and dissolved H_20_2 at 308 and 351 nm in the temperature. Atmospheric Chemistry *10*, 411–425.

Zepp, R.G., Hoigne, J., and Bader, H. (1987). Nitrate-induced photooxidation of trace organic chemicals in water. Environmental Science & Technology *21*, 443–450.

Zepp, R.G., Faust, B.C., and Hoigne, J. (1992). Hydroxyl radical formation in aqueous reactions (pH 3-8) of iron (II) with hydrogen peroxide: The photo-Fenton reaction. Environmental Science & Technology *26*, 313–319.

Zhai, A. (2012). Determination of phenols in drinking water with agilent bond elut plexa SPE and HPLC. URL: https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-9730EN.pdf

Zhang, H., Li, H., Zhang, Q., Zhang, Y., Zhang, W., Wang, X., Bi, F., Chai, F., Gao, J., and Meng, L. (2017). Atmospheric volatile organic compounds in a typical urban area of Beijing: Pollution characterization, health risk assessment and source apportionment. Atmosphere *8*, 61.

Zhang, Y., Klamerth, N., Messele, S.A., Chelme-Ayala, P., and Gamal El-Din, M. (2016). Kinetics study on the degradation of a model naphthenic acid by ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid-modified Fenton process. Journal of Hazardous Materials *318*, 371–378.

Zhao, Y., Hallar, A.G., and Mazzoleni, L.R. (2013). Atmospheric organic matter in clouds: Exact masses and molecular formula identification using ultrahigh-resolution FT-ICR mass spectrometry. Atmospheric Chemistry and Physics *13*, 12343–12362.

Zhou, X., and Mopper, K. (1990). Determination of photochemically produced hydroxyl radicals in seawater and freshwater. Marine Chemistry *30*, 71–88.

Annexes

1. Récolte de l'eau de nuage au sommet du puy de Dôme

Au sommet du puy-de-Dôme, à 1 465 m d'altitude, se trouve le site de prélèvement situé sur le toit du chalet de l'Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand (OPGC). Ce site de prélèvement a été labellisé au niveau mondial comme une station GAW (Global Atmosphere Watch). L'eau est collectée grâce à un impacteur. Ci-dessous le schéma de celui-ci.

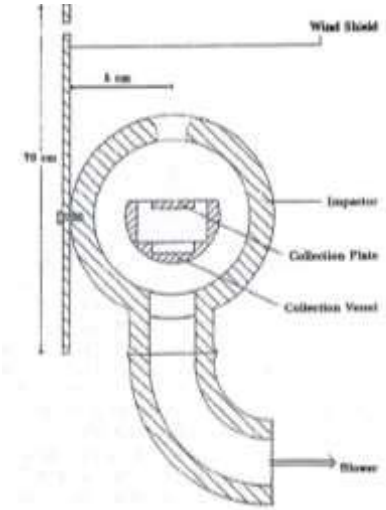


Figure Annexe 1: Impacteur à nuage (d'après la thèse de Joly, 2013).

Brièvement, le nuage est ralenti par une plaque coupe-vent, l'air est aspiré grâce à une pompe et les gouttes d'eau de nuage s'écoulent dans le réservoir de collecte. Avant chaque prélèvement, l'impacteur est lavé et certaines parties sont stérilisées à l'autoclave ou désinfectées avec de l'éthanol.

2. Chapitre de livre

Delort, A. M., Vaïtilingom, M., Joly, M., Amato, P., Wirgot, N., Lallement, A., Sancelme, M., Matulova, M., et Deguillaume, L. (2017). Clouds: A transient and stressing habitat for microorganisms. In Microbial Ecology of Extreme Environments, (C. Chénard and F. M. Lauro), pp. 215–245.

Chapter 10
Clouds: A Transient and Stressing Habitat for Microorganisms

Anne Marie Delort, Mickael Vaïtilingom, Muriel Joly, Pierre Amato, Nolwenn Wirgot, Audrey Lallement, Martine Sancelme, Maria Matulova and Laurent Deguillaume

Abstract In this chapter, we synthesized the current knowledge about clouds as ecosystems which have been discovered very recently. First, we briefly described the cloud habitat. Cloud physics chemistry and microphysics are described, showing that this environment is extreme. Microorganisms are exposed to a dynamic medium changing extremely rapidly (evaporation/condensation of the cloud droplets, quick temperature and pressure changes, freeze/thaw cycle) and also to chemical stresses (strong oxidants, acidic pHs and toxics). Then the life cycle of microorganisms in the atmosphere is detailed showing that cloud is a transient habitat: microorganisms are aerosolized, transported in the air, integrated in cloud droplets and deposited back to the ground with precipitation. Finally the cloud microbiome is described; it appears that it remains largely unknown and based mainly on culture techniques. In the second part of the chapter, the abilities of these microorganisms to survive in this stressing environment are described in details. Microbes can adapt their metabolism as it was shown that the majority of the community is metabolically active and that they metabolize organic compounds in cloud water. They have also developed general strategies that help resisting to atmospheric constraints, such as the production of extracellular polymeric substances and pigments, or the formation of spores. Finally they can respond to specific stresses such as oxidative, osmotic and temperature

A.M. Delort (✉) · M. Joly · P. Amato · N. Wirgot · A. Lallement · M. Sancelme
Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Unviersité Clermont-Auvergne, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France
e-mail: A-marie.delort@univ-bpclermont.fr

M. Vaïtilingom
Laboratoire de Météorologie Physique, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand and Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand, Université Clermont-Auvergne, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

M. Matulova
Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

L. Deguillaume
Laboratoire de Météorologie Physique, Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand, Université Clermont-Auvergne, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

© Springer International Publishing AG 2017

C. Chénard and F.M. Lauro (eds.), *Microbial Ecology of Extreme Environments*,
DOI 10.1007/978-3-319-51686-8_10

stresses thanks to protecting metabolites such as osmo- and thermo-protectants, anti-oxidants or by using specific enzymes.

10.1 Introduction

Unlike most environments such as soil, freshwaters, and oceans, microbiology of the atmosphere has only recently been studied. Indeed, the presence of living cells in clouds opens new routes in understanding the biogeochemistry of this medium. This lack of knowledge is certainly related to the fact that this environment is not easy to study: clouds are difficult to sample, specific sites are needed to get in parallel all the meteorological and physico-chemicals parameters, the number of microbial cells is low making investigations particularly difficult. As cloud environment is very difficult to reproduce in lab conditions, microcosm experiments are not easy to design. Finally working on cloud microorganisms requires knowledge in atmospheric sciences and strong interactions with physicists in this field. However, for a long time, a gap existed between atmospheric sciences and biology, where physicists considered microorganisms as simple particles and studied them only for their microphysical properties. The fact that they can be alive and can actively impact the atmospheric processes was not yet considered.

The question remains to know whether the cloud microbiome is a real "ecosystem". Indeed its major specificity is the fact that it is transient and highly diluted. This means that microorganisms are dispersed in a few droplets for a rather short time, and are thus not very likely to communicate. However they can exchange metabolites thanks to evaporation-condensation mechanisms leading to concentration modifications and exchanges between droplets.

Cloud environment can be considered as "extreme" mainly because it is an unstable medium, where physico-chemical conditions changes are large and fast. In addition this medium is highly oxidative due to the presence of strong oxidants and UV light. To face these stresses, some microorganisms have developed specific features allowing them to survive during their journey in the atmosphere.

10.2 Clouds as a Transient and Stressing Habitat for Microorganisms

10.2.1 The Cloud Habitat

10.2.1.1 The Physics of Cloud

Cloud lifetime is controlled by the dynamics of the atmosphere at the synoptic scale and, in close interaction, by microphysical processes (i.e. nucleation of cloud

droplets, condensation and evaporation, collision/coalescence processes, sedimentation of hydrometeor etc.) at small scale.

Clouds are made of microscopic droplets of liquid water ("warm clouds"), crystals of ice ("cold clouds"), or both ("mixed phase clouds"). Cloud droplets are formed by the condensation of water vapor onto cloud condensation nuclei (CCN) when the supersaturation of air exceeds a critical value which is described by the "Köhler theory" (Köhler 1936). Cloud condensation nuclei are needed during the formation of cloud droplets because of the Kelvin effect, which describes the variation in saturation vapor pressure due to a curved surface. When the cloud droplet radius is small, the amount of supersaturation needed for condensation to occur is so important, that it is impossible to occur naturally in the atmosphere. The second important factor is the concentration of solute that is described by the Raoult's Law: at high solute concentrations, when the droplets are small, the supersaturation needed is smaller than without the presence of a nucleus. The cloud lifetime depends on the way the cloud is evolving in the atmosphere. A cloud droplet can evaporate or fall to the Earth as precipitation. In warm clouds, larger cloud droplets fall at a higher terminal velocity than the smaller ones; the large droplets then can collide with small ones and combine to form larger drops. When drops become large enough so that the acceleration due to gravity is much larger than the acceleration due to drag, the drops can fall down as precipitation. These processes are called "collision/coalescence". In mixed phase cloud, this effect is not as important because other complex mixed phase processes occurs and lead to precipitation formation. Mixed-phase clouds and cold clouds are composed of various iced hydrometeors (pristine, snow, graupel) with a large size range and with various complex shapes. Important processes that form precipitation in mixed-phase clouds are riming, when a supercooled liquid drop collides with a solid snowflake, and also aggregation, when two solid snowflakes collide and combine together.

At synoptic scale, the formation of clouds strongly depends on updrafts. Water droplets that group together are quickly pulled down to the ground by gravity, so that they would quickly dissipate and the cloud never forms. An updraft can form if warm air interacts with cold air which can be cause by topography. As the warm air rises in the atmosphere, the moisture in the updraft will condense into liquid form and add to the amount of water available for precipitation. Violent updrafts can reach speed up to 290 km/h. The droplets can also freeze during through one of these updrafts and can cycle through several updrafts before finally becoming so heavy that it falls to the ground.

In this context, clouds are harsh environments for microorganisms because they have to deal with rapid changes in osmotic pressure when the liquid water of the cloud varies and/or when evaporation of cloud droplets occurs. Pruppacher and Jaenicke (1995) estimated that atmospheric water condensates and evaporates in average 10 times before being removed by precipitation (Pruppacher and Jaenicke 1995). The solute concentration can vary by several orders of magnitude: assuming neither precipitation nor gasification of the solutes, a 20 μm cloud droplet that evaporates to a diameter of 2 μm would concentrate chemical species by a factor of 10^3. For instance, ion species measured at the puy de Dôme station, the observed

concentrations of total ion content ranged from 1 to 1.9 mM (Deguillaume et al. 2014). Evaporation of cloud droplets would thus increase ion concentration to up to 1 M and create high osmotic shocks for the microorganisms.

Clouds also have to deal with strong pressure and temperature variation as well as supporting several freeze-thaw cycles, especially when strong updrafts are present. For example, in the troposphere, temperature generally decreases with increasing altitude, by 0.6 to 1 °C every 100 m. This, associated with vertical winds of 50 km h^{-1} (14 m s^{-1}), potentially exposes airborne cells to thermal variations of up to approximately 1 °C every 7 s, and eventually also to freeze-thaw cycles.

10.2.1.2 The Chemistry of Cloud

The cloud aqueous phase is a very complex mixture of inorganic and organic chemical compounds. These chemical compounds found in cloud droplets originate from various sources: from the soluble fraction of the aerosol particles which can also act as cloud condensation nuclei (CCN), from the dissolution of soluble trace gases as well as from scavenging processes. Cloud reactivity also forms new chemical compounds. Since cloud water contains strong acids, potentially toxic molecules (formaldehyde for example), and strong oxidants like hydrogen peroxide or radicals, it can represent a stressful medium for microorganisms.

The major inorganic ions found in cloud water are the sulfate (SO_4^{2-}), chloride (Cl^-) and nitrate (NO_3^-) anions and the alkali and alkaline Earth metals cations (Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}), in addition to ammonium (NH_4^+). These chemical compounds results from various sources. For example, the major fraction of the potassium, magnesium and calcium ions come from the mineral part of aerosol particles originating from soil; nitrate and ammonium can enter into cloud water as constituents of condensation nuclei as well as by gas to liquid scavenging of gaseous HNO_3 and NH_3; the sulfate arises from the oxidation of gaseous precursors that are dissolved into cloud droplets such as SO_2. In polluted region, the oxidation of SO_2 and NO_2 is a major source of strong acids H_2SO_4 and HNO_3 that control cloud water acidity i.e. the pH. In coastal regions and over the ocean, sodium chloride constitutes the largest part of all ions. The acidity of the cloud water strongly depends on the air mass origin. The pH can vary between 2.2 and 7 (Aleksic et al. 2009; Collett Jr et al. 2002; Deguillaume et al. 2014; Hill et al. 2007). For example, for polluted clouds, the pH at the puy de Dôme station (France) is the most acidic due to the higher amount of nitrate and sulfate (pH around 4). pH values encountered in clouds are far from the known limits of growth of microorganisms that can develop at pH close to 0 for certain species (Schleper et al. 1995). However, beyond these limits, their survival strongly depends of their capacity to maintain their pH cytoplasmic at values compatible to their metabolism. Most of the microorganisms have optimal pH for their growth between 5 and 9 (Padan et al. 2005). During the cloud lifetime, the microorganisms have to deal with strong variations of the pH of the cloud droplets due to the condensation/evaporation processes.

The organic matter also represents a major fraction of the soluble matter in cloud droplets (Herckes et al. 2013). The total Dissolved Organic Carbon (DOC) is highly variable depending on the history of the air mass. For highly polluted clouds, DOC values can reach 200 mgC L^{-1} as reported by Wang et al. (2011) at Mount Tai in China (Wang et al. 2011). Currently, DOC values are between 5 and 10 mgC L^{-1} in average for continental clouds (Anastasio et al. 1994; Löflund et al. 2002; Ervens et al. 2013; Hutchings et al. 2009) and below 5 mgC L^{-1} for clouds from marine origin (Marinoni et al. 2004; Deguillaume et al. 2014). Carboxylic acids represent around 10% of the dissolved organic carbon in the cloud droplets (Table 10.1). The carboxylic acids can be produced in the gaseous phase and dissolved in the aqueous phase (main source of acetic and formic acid); they can also result from the dissolution of soluble particles (main source of oxalic, succinic, malonic, and maleic acids); or produced via the aqueous phase reactivity (Herrmann et al. 2015). Due to the presence of free radicals such as the hydroxyl radical $^{\bullet}OH$ in the aqueous phase, the oxidation of organic matter is considered as an important source of carboxylic acids (Tilgner and Herrmann 2010); they also represent one of their main sinks. Carbonyl compounds are also present in cloud water and they essentially result from their dissolution from the gas phase into the aqueous phase depending on their Henry's law constants (Ervens et al. 2003). In the aqueous phase, the oxidation of aldehydes produces carboxylic acids but also lead potentially to the formation of oligomers (Ervens et al. 2003, 2015). Concentration levels of carbonyl compounds such as formaldehyde, acetaldehyde, glyoxal and methylglyoxal have been measured in cloud water (Houdier et al. 2011; van Pinxteren et al. 2005; Matsumoto et al. 2005). Formaldehyde in the gas phase is produced by biomass burning and fossil fuel combustion, and also by photochemical oxidation of methane and non-methane hydrocarbons. This compound is efficiently transferred into the aqueous phase due to its efficient Henry's law constant, explaining its higher concentration in cloud water (Table 10.1). In the case of foggy event occurring in polluted area, the aqueous formaldehyde concentration can reach up to 710 μM (Jacob et al. 1984). This kind of high concentration of formaldehyde can be partially toxic for the biological content of the cloud/fog droplets.

The proportion of undetermined organic matter in cloud water is still high and represents more than 90% of the total dissolved organic matter. Among this complex organic matter in cloud water, HUmic LIke Substances (HULIS) have been identified and correspond to large multifunctional compounds such as proteins, cellulose, dicarboxylic acids, polyols, amino acids, fatty acids, sugars, polysaccharides or aliphatic and aromatic hydrocarbons (LeClair et al. 2012; Ekström et al. 2010).

This description of cloud carbon content shows that this medium is rather poor, with low DOC concentrations (Table 10.1). In addition, methanol and formaldehyde (C1 compounds) could be toxic for many microbial species.

Cloud water is an oxidizing environment with a redox potential of up to more than 200 mV (Deguillaume et al. 2014), notably due to the presence of radicals ($^{\bullet}OH$ and $HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$) and their precursors ($H_2O_2$, metals) (Table 10.1). H_2O_2 concentrations are ranging from 0 to 3.2 μM at Kleiner Feldberg [Germany; Sauer et al. (1996)], from 0.1 to 57.7 μM at the puy de Dôme, with an average of 7.8 μM

Table 10.1 Observed concentration of carboxylic acids, formaldehyde, hydrogen peroxide, iron and dissolved organic carbon in cloud samples

Chemical compounds	Concentrations (μM)	References
Acetic acid	30.0–84.0	Watanabe et al. (2001)
$CH_3CO(OH)$	4.0–37.8	Löflund et al. (2002)
	1.6–41.4	van Pinxteren et al. (2005)
	0.3–57.6	Deguillaume et al. (2014)
Formic acid	1.3–34.3	Löflund et al. (2002)
CHO(OH)	36.0–51.2	Decesari et al. (2001)
	4.9–39.1	van Pinxteren et al. (2005)
	0.2–52.8	Deguillaume et al. (2014)
Succinic acid	0.8–2.6	Löflund et al. (2002)
$CO(OH)CH_2CH_2CO(OH)$	0.1–4.1	Deguillaume et al. (2014)
Malonic acid	0.7–2.9	Löflund et al. (2002)
$CO(OH)CH_2CO(OH)$	0.4–1.8	van Pinxteren et al. (2005)
	0.3–7.0	Deguillaume et al. (2014)
Oxalic acid	0.7–12.6	Löflund et al. (2002)
CO(OH)CO(OH)	0.1–15.2	Decesari et al. (2001)
	2.4–11.6	van Pinxteren et al. (2005)
	0.2–19.4	Deguillaume et al. (2014)
Formaldehyde	8.0–14.0	Collett et al. (1990)
CH_2O	13.6–61.5	Igawa et al. (1989)
	0.1–4.8	van Pinxteren et al. (2005)
	0.1–14.2	Deguillaume et al. (2014)
Hydrogen peroxide	0–247	Olszyna et al. (1988)
H_2O_2	1–167	Richards (1995)
	0–14	Valverde-Canossa et al. (2005)
	0–19	Marinoni et al. (2011)
Iron	0.1–1.6	Deutsch et al. (2001)
Fe^{2+} and Fe^{3+}	0.6–6.3	Pehkonen et al. (1992)
	0.3–22.6	Erel et al. (1993)
	0.1–11.9	Parazols et al. (2007)
Disolved **O**rganic **C**arbon (**DOC**)	**Concentration** (**mgC L^{-1}**)	
	3.0–18.0	Anastasio et al. (1994)
	1.8–8.1	Ervens et al. (2013)
	2.0–35.0	Wang et al. (2013)
	0.3–25.0	Deguillaume et al. (2014)

[France; Deguillaume et al. (2014)], and extremely high concentrations (up to 247 μM) were reported from Whitetop Mountain [U.S.A.; Olszyna et al. (1988)]. Their aqueous concentrations result from both various chemical interactions

(photolysis processes and chemical reactions) and from the phase transfer exchange between the gas and aqueous phase. $^{\bullet}OH$ radicals, can be either taken up from the gas phase or in situ produced in the aqueous phase.

One of the most relevant in situ sources of $^{\bullet}OH$ in the aqueous phase is the so-called "Fenton" reaction between H_2O_2 and iron(II) (Eq. 10.1). The produced iron(III)-hydroxy complexes are also photolyzed (mostly the $[Fe(OH)]^{2+}$ aqua-complexe that is dominant for atmospheric pH between 3 and 5) accelerating the formation of $^{\bullet}OH$ in the aqueous phase (Eq. 10.2).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow [Fe(OH)]^{2+} + {}^{\bullet}OH \tag{10.1}$$

$$[Fe(OH)]^{2+} + h\nu \rightarrow Fe^{2+} + H^{+} + {}^{\bullet}OH \tag{10.2}$$

The photolysis of H_2O_2, NO_3^- and iron(III)-hydroxy complexes are also effective sources of $^{\bullet}OH$ in the aqueous phase (Bianco et al. 2015) together with the phase transfer from the gas phase. Additionally, the reactions of oxidized TMIs (Transition Ion Metals) with H_2O_2 and the photolysis of metal-organic acid complexes such as iron(III)-oxalate complexes can act as source for $HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$ in the aqueous phase (Weller et al. 2014). The presence of such an oxidizing environment represents a strong stress that microorganisms have to cope with.

10.2.2 The Cycle of Microorganisms via the Cloud Habitat

The concept of "cloud microbiome" which was recently suggested is unique mainly due to the specific status of cloud microorganisms compared to the other stable environmental ecosystems (waters, soil, plants, etc.). Cloud is a transient habitat lasting from a few hours to a few days as it is part of the life cycle of the microorganisms in the atmosphere. Microorganisms are aerosolized, transported in the air and deposited further or integrated in clouds by nucleation and scavenging processes and can be back to the earth by wet deposition using precipitation as shuttles (Fig. 10.1). During their travel they are exposed to very strong stresses, especially in cloud itself, which likely alter viability (see Sect. 10.1).

The sources of microorganisms are very wide including water, soil and vegetation; Burrows et al. (2009a) have evaluated that, globally, $\sim 10^{24}$ bacterial cells are aerosolized from surface environments each year. Large spatial and temporal heterogeneities exist in the distribution of microorganisms in the air, notably in relation with the type of surface cover (rural, urban, forest, ocean, etc.) and it varies temporally with seasonal and daily periodicities (Burrows et al. 2009a; Lighthart 1997). The mechanisms of aerosolization are still not completely understood. In the case of oceans, microorganisms are emitted by bubble bursting. Bubbles are produced at the surface of the sea by whitecaps and breaking waves and rainfalls; since microorganisms are concentrated at the water-air interface, their concentration within jet drops can be increased by several orders of magnitude compared with

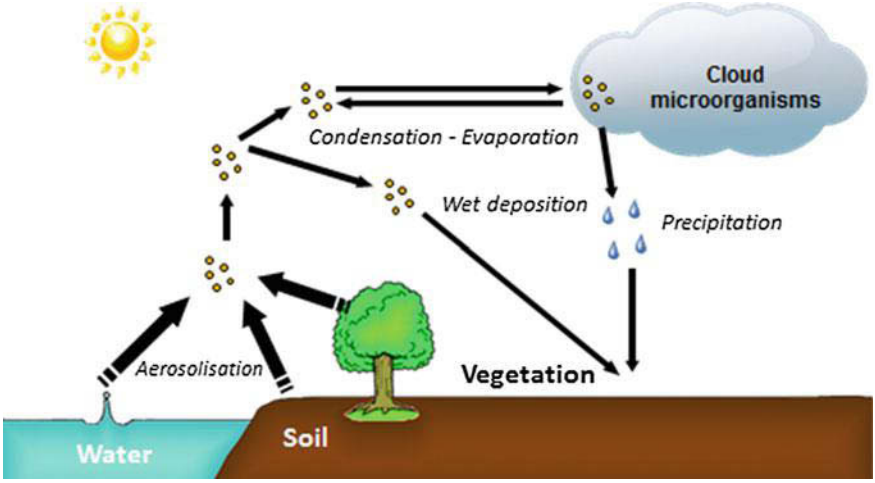


Fig. 10.1 Clouds acts as a transient habitat during the life cycle of microorganisms. Microorganisms are aerosolized, transported *vertically* and *horizontally*, integrated in clouds by condensing water and shuttled down to the ground mainly by precipitation

their concentration in the bulk liquid (Blanchard 1989; Marks et al. 2001; Aller et al. 2005; Mayol et al. 2014). Microorganisms can be also lifted up in the air by the wind as part of solid aerosols, particularly on dust particles (Griffin 2007). Fungi can emit spores specially designed to be aerosolized by the wind depending on meteorological factors including wind speed, temperature, humidity, (Jones and Harrison 2004). Finally vegetation is a major source of bioaerosols; the microbial density on plant leaves is $\sim 10^3$–10^8 bacteria g^{-1} (Lindow et al. 1978; Lindemann et al. 1982; Morris et al. 2008). In that case different mechanisms can be involved in aerosolization: microorganisms can be ejected by direct impact of rain drops on leaves or can be transported upward by turbulent flows (sensible heat flux); wind can lift dry leaves particles or dry biofilm fragments where bacteria are imbedded (Hirano and Upper 2000; Morris et al. 2004).

Measurement of emission fluxes is difficult and few data are available. It is supposed to vary largely with the type of sources: while Lindemann et al. (1982) have measured net upward fluxes in the range of 100–1000 CFU m^{-2} s^{-1} over agricultural areas, Burrows et al. (2009a, b) has evaluated emission rates as low as ~ 1 CFU m^{-2} s^{-1} from seas and glaciated ecosystems based on near-surface concentration measurements, however it should be noted that this evaluation is very rough and still questionable.

Once aloft, micron-sized particles like microorganisms are dispersed vertically and horizontally. They can go up in the atmosphere along the different layers (troposphere 0–12 km, stratosphere 12–50 km, and mesosphere 50–85 km). Although most studies have been performed in the troposphere, which is the major place where clouds form and exist; viable microorganisms have been collected up

to 77 km of altitude (Imshenetsky et al. 1978). Concerning horizontal dispersion microorganisms can be transported thousands of kilometers away from their emission source (Prospero et al. 2005; Kellogg and Griffin 2006; Smith et al. 2013), and eventually reach the most remote regions of the planet. For instance, Asian dust storms can take 7–9 days to cross the Pacific Ocean, while African dusts can reach the Caribbean and America within 3–5 days (Griffin 2007). The residence time of particles in the atmosphere depends on their size, large particles (>10 μm in diameter) can settle by dry deposition. For particles in the range of 0.1–10 μm the prominent process of deposition is wet: it requires the presence of condensed water. Finally small particles (from 10^{-4} to 10^{-1} μm) must aggregate within each other and reach a size large enough to be deposited (Renoux and Boulaud 1998). This means that the prominent manner to descend back to the surface for microorganisms, which are in the size range of 1 μm is wet deposition. The residence time of microorganisms in the atmosphere is thus largely dependent on meteorological conditions (dry vs. humid) and was modelled to be between 10 and 2 days, respectively (Burrows et al. 2009b). Very recently Amato et al. (2015) have measured the residence time of selected bacterial strains in a cloud simulated chamber (AIDA, Karlsruhe, Germany) which might improve the numerical models of bacterial dissemination in the future. The cultivability of airborne bacterial cells over time showed an exponentially decreasing function with a half-life time of about 3.5–4.5 h. In other words, considering the average residence time of 3.4 days of bacteria in the atmosphere estimated by models (Burrows et al. 2009b), our results indicate that the proportion of cells surviving aerial transport is only 1 cell out of 10^6 cells aerosolized from the surface. The distance of transportation of bioaerosols depends on the wind speed and can be simulated to be between several hundreds to thousand kilometers.

As explained above, microorganisms can be deposited to the ground using precipitation as shuttles. However falling rain drops are largely inefficient in scavenging particles of this size, so microorganisms have to be first integrated in cloud droplets by nucleation or scavenging processes into clouds. First microorganisms themselves can act as CCN (Cloud Condensation Nuclei) offering a surface to condensation of water vapour; it is as a particular case of aerosol particles presenting some specific physico-chemical properties due to their biological nature (Sun and Ariya 2006). Furthermore, some specific microorganisms, notably some bacteria belonging to the genus *Pseudomonas*, can initiate the formation of ice at relatively warm temperatures (−2 to −12 °C) thanks to a surface protein (Möhler et al. 2007; Ariya et al. 2009; Hoose and Möhler 2012). Such biological Ice Nuclei Active (INA) bioaerosols are present in precipitation (Christner et al. 2008a, b; Stephanie and Waturangi 2011). More recently they have also been described in cloud waters (Joly et al. 2013, 2014). Although the role of microorganisms as CCN is general and admitted, simply due to their particle size, the quantitative implication of INA bacteria in forming clouds and precipitations is still controversial (DeMott and Prenni 2010; Hoose et al. 2010).

10.2.3 The Cloud Microbiome

Before being precipitated, cloud is thus a transient habitat where microorganisms can live and survive for a few hours to a few days. However, it remains a rather unexplored extreme environment.

First descriptions of microorganisms in cloud droplets refers to the works of Sattler et al. (2001) and Bauer et al. (2002), it was then largely completed by recent studies (Amato et al. 2005, 2007d; Vaïtilingom et al. 2012). The concentration of microbial cells in warm clouds in the free troposphere was evaluated by microscopy or flow cytometry, it is in the range of 10^2–10^5 cells mL^{-1} depending on the sampling site, see Table 10.2.

The biodiversity of the cloud microbiome is still rather unknown. This is because only a few studies have been made due to the difficulties in sampling clouds in sterile conditions suitable for microbial study. In addition, most of the studies were performed using culture methods which is known to cover between <1% (of the bacteria) to ~10% (of the fungi) of the total communities. Fuzzi et al. (1997) first reported the presence of cultivable strains of *Pseudomonas*, *Bacillus and Acinetobacter* in fog water sampled in the Pô valley; Ahern et al. (2007) isolated a number of *Pseudomonas* strains in Hebridean clouds. The largest description of cloud isolates has been done from cloud waters sampled at the puy de Dôme station (1465 m a.s.l.) (Vaïtilingom et al. 2012) a site internationally recognized for atmospheric research (Global Atmospheric Watch, GAW labelled). 185 heterotrophic bacteria and 150 yeasts were isolated from 32 cloud events and identified, including -Alpha, -Beta and Gamma-Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Actinobacteria, and Basidiomycetous and Ascomycetous yeasts. The results show that major genera dominate among cultivable cells (Fig. 10.2). Concerning bacteria, the most frequently encountered genera are *Pseudomonas* (γ-Proteobacteria), *Sphingomonas*

Table 10.2 Microbial concentration in cloud waters

Sites	Altitude (m.a.s.l.)	Number of sampled clouds	Bacterial concentration (cells mL^{-1})	Fungal concentration (cells mL^{-1})	This study
Puy de Dôme, France	1465	34	3.3×10^3–2.5×10^5	8.9×10^2–3.2×10^4	Amato et al. (2007c), Vaïtilingom et al. (2012)
Mont Rax, Austria	1644	3	4.9×10^4–8.1×10^4	5.9×10^3	Bauer et al. (2002)
Mont Sonnblick, Austria	3106	12	7.9×10^2–2.5×10^3	–	Sattler et al. (2001)
Aircraft sampling, Michigan, U.S.A	2240–3320	5	9.2×10^4–4.3×10^5	–	Kourtev et al. (2011)

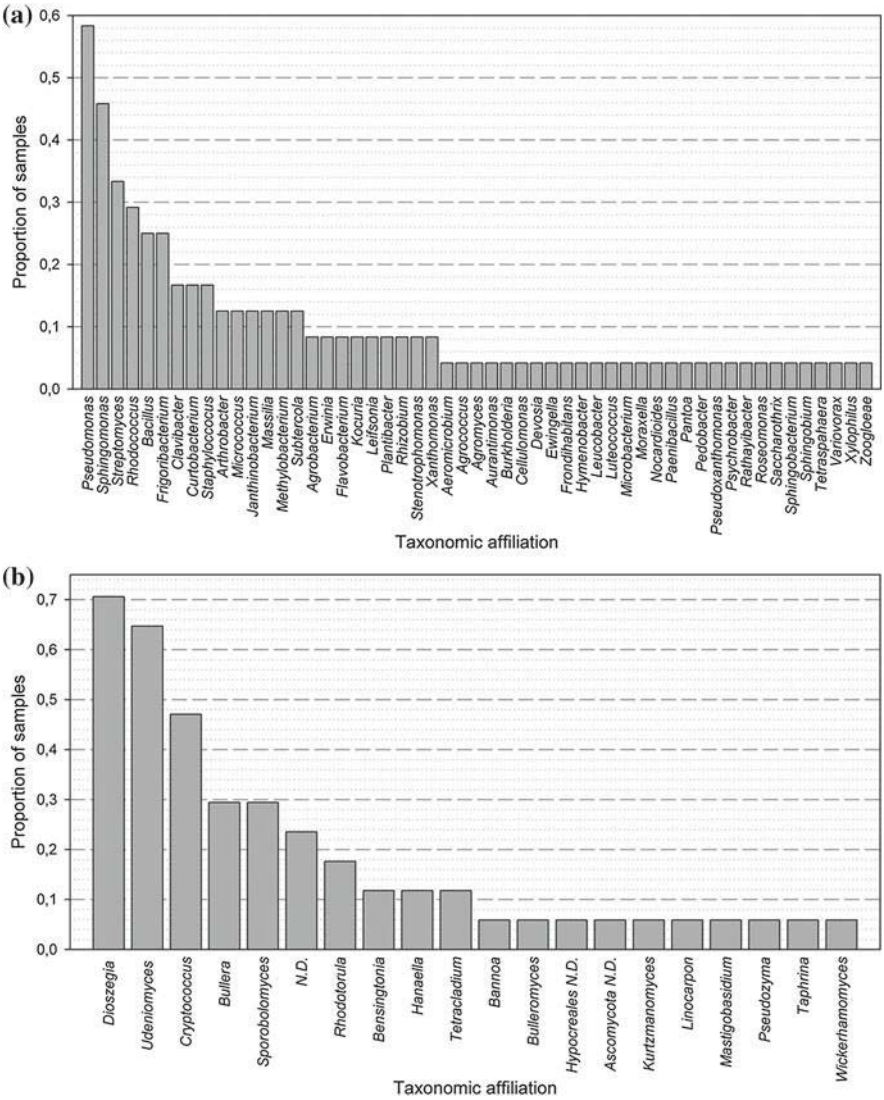


Fig. 10.2 The frequency of cloud events collected at the puy de Dôme submit in which the different genera of bacteria (**a**) or yeasts (**b**) were detected viable by culture over the period 2003–2010 (adapted from Vaïtilingom et al. 2012)

(α-Proteobacteria), *Streptomyces* (Actinobacteria), *Rhodococcus* (Actinobacteria), and *Bacillus* (Firmicutes), while for yeasts *Dioszegia* (Basidimycota), *Udeniomyces* (Basidimycota) and *Crytococcus* (Basidimycota) are the most frequent ones.

Although DNA-based analyses of air samples have been recently reported (Bowers et al. 2009; Brodie et al. 2007; Fierer et al. 2008; Gandolfi et al. 2013;

Garcia et al. 2012; Smith et al. 2013; Zweifel et al. 2012; Maki et al. 2010, 2013; Fröhlich-Nowoisky et al. 2009; Bottos et al. 2014; Fahlgren et al. 2010; Jeon et al. 2011; Maron et al. 2005; Després et al. 2007), very few studies have focused on cloud communities. Up to very recently it was very difficult to apply DNA-based techniques to assess this biodiversity due to sample volume limitations and a very low microbial density; new molecular tools which are very sensitive should provide more information. Kourtev et al. (2011) showed a high genetic diversity in Lower peninsula of Michigan (USA) by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE); they found the same major bacterial phyla (Proteobacteria > Actinobacteria > Firmicutes) than in clouds collected at the puy de Dôme (Vaïtilingom et al. 2012), but the major difference was the prevalence of Cyanobacteria (around 50% of the sequences). Actually cyanobacteria were not identified using culture-based methods as there were not looked for. More recently Šantl-Temkiv et al. (2013a, b) described the microbial population in a storm cloud (hailstones); the major bacterial groups belonged to Actinobacteria, Bacteroidetes, gamma and alpha Proteobacteria phyla as described in warm clouds (Vaïtilingom et al. 2012), however the major genus of alpha Proteobacteria in hailstones was *Mycobacterium* instead of *Sphingomonas.* Using SSU rRNA gene sequence analysis of microorganisms living in cloud-free, cloudy and tropical storm environments of the upper troposphere (8–15 km altitude) also revealed the prevalence of Proteobacteria (alpha and beta Proteobacteria) (DeLeon-Rodriguez et al. 2013). Interestingly two of the core families of these different samples were the *Methylobacteriacae* and *Oxalobacteraceae*. The difficulty to compare the biodiversity described in all these studies lays in the fact that of course the techniques used are different (culture *versus* uncultured-based approaches) but also because the samplings were performed in different geographical sites or altitudes. The heterogeneity at low altitude can result directly from the sources influences as described by Burrows et al. (2009b). However when the whole atmosphere is considered, one could think microorganisms circulate freely around the earth, opposite to microorganisms present in other closed environment compartments such as soil, lakes and rivers. The question of the biogeography of the atmosphere is still a non-resolved question (Womack et al. 2010).

These studies show that although the cloud microbiome is diverse, some major groups are dominating; this could result of a selection of the type of microorganisms occurring during the aerosolization process or thanks to their survival abilities in clouds.

10.3 Microorganisms Are Surviving in Clouds

10.3.1 Microorganisms Are Metabolically Active in Clouds

Physicists of the atmosphere had considered for a long time that microorganisms were just inert particles, however it has been discovered recently that at least a

fraction of the microorganisms are actually alive in clouds. Although a small fraction of cloud microorganisms can be cultivated, most of them were shown to be still viable. Sattler et al. (2001) measured the incorporation of [methyl-^{3}H]thymidine and [^{14}C]leucine demonstrating for the first time that bacteria could be maintained and grow in super-cooled cloud droplets. Amato et al. (2007a, b) showed the ability of microorganisms isolated from cloud to grow in cloud water incubated in laboratory. Looking at individual strains, their doubling times at 17 and 5 °C were in the range of 5–20 h depending on the strains. It is rather long compared to cloud life time, meaning that the multiplication of cells only happens during long cloud events, and probably not more than once in the cloud's lifetime. Cloud medium thus allows microorganisms to maintain a metabolic activity and develop by sustaining organic substrates to the cells, as suggested by Fuzzi et al. (1997). This metabolic activity was largely confirmed by assaying the ATP (Adenosine triphosphate) content directly in cloud water samples. The theoretical concentration of ATP in bacteria and fungi while taking into account their total number, was compared to those measured in clouds. The similar results suggest that most of the microorganisms were active (Amato et al. 2005). A long term survey of these in situ measurements at the puy de Dôme station showed that the ATP content is rather stable, independently from the season or the geographical origin of the air mass (Vaïtilingom et al. 2012). Hill et al. (2007) also demonstrated that 76% of the bacteria were alive in cloud waters as they were able to uptake the dye CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride). The existence of metabolic activity in clouds implies the uptake of molecular compounds by cells as nutrients, and so of their contribution to cloud chemical reactivity.

A few studied have focused on the biodegradation of some of the cloud carbon sources by cloud microorganisms. The first type of compounds investigated were carboxylic acids which constitute one of the major classes of organic compounds in cloud waters (Deguillaume et al. 2014). The group of Ariya studied the degradation of series of di-carboxylic acids (malonic, oxalic, succinic, glutaric, adipic, pimelic and pinic) by airborne fungi (Ariya et al. 2002; Côté et al. 2008). They showed that these were all good substrates except oxalate. Other studies confirmed that formic, acetate, succinate and malonic were degraded by cloud bacteria but not oxalate (Amato et al. 2007a; Vaïtilingom 2011; Vaïtilingom et al. 2013). Experimental data concerning the non-degradability of oxalate are not consistent with the description of the oxalate-degrading bacteria (*Oxalobacteraceae*) described by DNA-based methods (DeLeon-Rodriguez et al. 2013). This could result from the fact that this genus is not active in real atmospheric conditions or that it is not present in cloud samples collected at the puy de Dôme contrarily to sample collected at high altitude over the Atlantic Ocean. Mono-carboxylic acids such as formate, acetate and lactate are also easily degraded by cloud microorganisms (Amato et al. 2005, 2007a; Vaïtilingom et al. 2010, 2011, 2013). Herlily et al. (1987) also showed some years ago that acetate and formate were biodegraded in rainwater. Between 2 and 9 carboxylic acids (lactate, acetate, glycolate, propionate, formate, glyoxylate, α-keto-glutarate, succinate, tartrate) could be also used by seven strains of

Methylobacterium and one strain of *Bradyrhizobium* isolated from hailstones (Šantl-Temkiv et al. 2013a).

C1 compounds such as methanol and formaldehyde also represent valuable carbon sources for cloud microorganisms; the metabolic routes can be variable according to the strains. Among the theoretical potential pathways the transformations of formaldehyde into methanol (reduction) and/or into formate and CO_2 have been identified in 60 cloud strains using ^{1}H-NMR (Amato et al. 2007b). A more detailed study on a *Bacillus* strain by ^{13}C NMR showed that ^{13}C-formaldehyde was both reduced to methanol, oxidized to formate and CO_2 and also integrated in the serine metabolism leading to the production of glycerol, 1,2- and 1,3-propanediol (Husarova et al. 2011). The presence of facultative methyloptroph strains, belonging to the genus *Methylobacterium*, have been described as important in hailstones (Šantl-Temkiv et al. 2012). These strains were actively using methane under simulated cloud conditions, as demonstrated by enrichment techniques, and could thus represent a sink for atmospheric methane.

Finally, a recent paper reports the efficient degradation of sugars present in aerosols by a *Bacillus* strain isolated in cloud waters, as a model of cloud microorganisms (Matulová et al. 2014). These sugars have a biogenic origin; they include alditols (manitol, glucitol, arabitol), monosaccharides (arbinose, xylose, ribose, fructose, glucose, galactose, mannose, rhamnose), disaccharides (lactose, sucrose, maltose, tetrahose, cellobiose), oligosaccharides and polysaccharides (cellotetraose, cellulose, arabinogalactan, glucuronoxylan, inulin, starch). The degradation rates of theses sugars measured by ^{1}H-NMR was in the same range of order than those measured for C1 compounds by the same strain.

Most of these experiments have been performed on simplified microcosms, starting from a single strain incubated with a single substrate (Ariya et al. 2002; Côté et al. 2008; Husarova et al. 2011; Amato et al. 2007a; Vaïtilingom et al. 2010; Matulová et al. 2014; Šantl-Temkiv et al. 2012), but more complex systems closer to cloud environment have been used including artificial cloud water tested with 17 representative strains incubated at temperatures relevant for clouds (5° and 17 °C) (Vaïtilingom et al. 2011) or real cloud waters containing the whole endogenous microflora (with or without solar light) (Vaïtilingom et al. 2013). To conclude cloud waters provide numbers of carbon sources to maintain a high microbial metabolic activity.

10.3.2 Microorganisms Can Resist to Atmospheric Stresses

Cloud medium is clearly a harsh environment as fully explained in Sect. 1 both because it is constantly in evolution and thus under different micro-physical status and because cloud is a very active chemical reactor. However the fact that metabolically active microorganisms are present in clouds suggests that they have elaborated strategies to survive in clouds and resist to these stressing conditions.

10.4 Anti-stress General Features: Pigments, Spores, ExoPolymeric Substances (EPS)

First some general features characterize these microorganisms; they are related to stress protection. For instance about 50% of the cloud isolates are pigmented (yellow, red, orange) (Amato et al. 2005, 2007d; Vaïtilingom et al. 2012), as those recovered from permanently cold regions (Fong et al. 2001; Mueller et al. 2005; Dieser et al. 2010). These pigments are probably carotenoïds that could be incorporated in the microbial membrane and might have a double role: (i) they help maintaining membrane fluidity in the cold; (ii) they could also act as free radical scavengers (Gourmelon et al. 1994). Interestingly, these pigments are produced by bacteria exposed to UV light on plant leave surfaces, so these are "primed" for cloud conditions before being aerosolized. Some microorganisms resist against stresses being in the form of spores, it can be the case of fungal spores but also of some specific bacteria such as *Bacillus* species. Spore forming microorganisms have been found in large number in the atmosphere. *Bacillus* are widely present in the air (Maki et al. 2013; Šantl-Temkiv et al. 2012). Previous studies (Elbert et al. 2007; Heald and Spracklen 2009) estimated the fungal spore concentrations from 10^4 to 10^6 m^{-3} of air with a huge spatial and temporal variability. Elbert et al. (2007) report an average of 35% of the total aerosol mass to be fungal spores in the Amazon region. Fungal spores contribute to 0.9% of the total OC (Organic Carbon) mass in the Austrian Alps and could reach up to 14% of the OC mass concentration in summer at a suburban site (Bauer et al. 2002, 2008). More recently, different groups report on-line detection of bio-aerosols and particularly of fungal spores. This detection is based on the analysis of the fluorescent properties of biological compounds (including NADH and tryptophan) [see Pan (2015) for review]. Two main types of instruments are used: Ultraviolet Aerosol Particle Sizer (UV-APS) and Waveband Integrated Bioaerosol Sensor (WIBS). Although the global trends measured by these techniques are in accordance with the already published values of bioaerosol concentrations, these approaches are still under development to be able to discriminate between fungal spores, bacteria and yeasts. Interesting papers have precisely compared these real-time fluorescent techniques with classical microscopy: Gabey et al. (2013) described some disparity between bacteria numbers and fluorescent particles concentration, while Healy et al. (2014) reported a good correlation between spore numbers and their fluorescent measurements; however they pointed the difficulty to detect *Cladosporium* spores because of their dark, highly absorptive cell-wall. Unfortunately these on-line techniques cannot be applied to analyse atmospheric water contents. Microscopy techniques have shown that yeast, fungi as well as spore forming bacteria such as *Bacillus* strains are present in cloud and fog waters (Fuzzi et al. 1997; Amato et al. 2007d; Vaïtilingom et al. 2012). Their concentration was higher when the water pHs were lower suggesting an adaption to this polluted media (Fuzzi et al. 1997; Amato et al. 2007d).

Finally another global protective strategy against numerous stresses relies on the formation of a biofilm or aggregates using the synthesis of ExoPolymeric Substances (EPSs). Actually the formation of biofilms seems to be the typical way for bacterial cells to grow in nature as it confers many ecological advantages (Davey and O'toole 2000; Flemming and Wingender 2010). This highly hydrated layer surrounding the cells can protect them against desiccation and UV exposure (Davey and O'toole 2000) or protect them in extreme marine habitats (Poli et al. 2010). Monier and Lindow (2003) showed a differential survival of solitary and aggregated bacterial cells on leaf surfaces, aggregates were increasing drastically bacterial survival when exposed to desiccation. This study was performed using *Pseudomonas syringae* as a model strain. It is worth noting that this bacterial species is one of the most abundant cultivable species found in clouds, these bacteria might be aerosolized in the atmosphere under aggregated forms and therefore particularly well adapted to survive to atmospheric stresses (Vaïtilingom et al. 2012). It is also likely that microorganisms which are transported on dust storms are under the form of biofilms. Tong and Lighthart (1998) reported that cell aggregation or association with particles increased survival during the day due to a shielding effect. Although bacterial EPS synthesis has been studied in many environments, only one paper is related to the atmospheric environment. Matulova et al. (2014) showed that a cloud bacterium (*Bacillus* sp. 3B6) could produce two types of EPSs from various saccharides (L-arabitol, D-fructose, sucrose, D-glucose, cellotetraose, cellulose, starch) present in the atmosphere. Their structures were identified as 1,6-α-galactan and partially acetylated polyethylene glycol (AcPEG) (Matulová et al. 2014).

10.5 Facing Specific Stresses: Oxidative, Osmotic and Temperature Stresses

Apart from these general strategies, microorganisms can modify specifically part of their metabolism to face specific stresses encountered in clouds.

One major problem for microorganisms is the presence of oxidants or their sources, including $^{\bullet}OH$ radicals, H_2O_2, iron, and solar light. Joly et al. (2015) have investigated the survival of 5 strains isolated from cloud waters towards 100 μM H_2O_2 in artificial cloud water; this concentration is realistic for H_2O_2 in cloud waters as it was previously detected at concentrations ranging from 0 to 247 μM (Table 10.1). The strains were chosen as models of strains collected at the puy de Dôme station representative of the cloud cultivable microbiome: 2 *Pseudomonas*, 1 *Sphingomonas* and 1 *Arthrobacter* among bacteria and 1 Basidiomycota yeast related to the genus *Dioszegia* (Vaïtilingom et al. 2012). The results showed that under these conditions close (or slightly overestimating) to what is found in clouds, i.e. 100 μM H_2O_2, the five strains were not affected (Table 10.3). Joly et al. (2015)

Table 10.3 Survival rates observed for the experimental conditions the most relevant for clouds and proportion of cloud samples from which representatives of the corresponding genus were detected by culture

	Survival rates to stresses				Occurrence in clouds[a] (%)
Taxonomic affiliation and type of microorganism	H_2O_2 (90 min, 100 μM) (%)	Solar light (10 h) (%)	Osmotic shock (1 M NaCl) (%)	Freeze-thaw (10^6 cells mL^{-1}, per cycle) (%)	
Dioszegia hungarica	84	37	56	80	71
Yeast					
Sphingomonas sp.	70	101	15	71	46
Gram negative bacterium					
Pseudomonas syringae 32b-74	77	104	78	51	58
Gram negative bacterium					
Pseudomonas syringae 13b-2	94	104	63	45	
Gram negative bacterium					
Arthrobacter sp.	129	96	101	16	13
Gram positive bacterium					

Adapted from Joly et al. (2015)
[a]Proportion of clouds samples from which representatives of the corresponding genus were detected by culture (data from Vaïtilingom et al. 2012)

also exposed the same strains to artificial solar light mimicking the natural light inside a cloud at the top of the puy de Dôme station (Joly et al. 2015) and demonstrated that the light available inside a cloud does not significantly impact bacterial viability (Table 10.3).

These previous experiments were performed under simplified conditions and using model strains. The results were confirmed using real cloud water samples incubated in a photo-bioreactor, specifically designed to reproduce cloud environment (Vaïtilingom et al. 2013). 3 cloud samples from independent cloud events were collected at the puy de Dôme station where they contained a very complex mixture of organic compounds and a whole biodiversity of the cloud microbiome. Each sample was divided into four parts: two parts were filtered through 0.22 μm porosity and while the two other remained intact, generating sterile or non-sterile samples, respectively. A sterile and a non-sterile subsamples were exposed to artificial solar light. At the same time, the other sterile and non-sterile subsamples were incubated in darkness. This experimental design allowed us to demonstrate:

- *abiotic reactions*: typically Fenton reactions (iron + H_2O_2) and photochemical reactions (iron + H_2O_2 + light); these reactions generate hydroxyl radicals from H_2O_2 source.
- *biotic + abiotic reactions:* iron + H_2O_2 + microorganisms with or without light. These conditions allow studying the interactions between these oxidants (including radicals) and cloud microorganisms. Biotic reactions could be inferred from the difference between the reactions observed in the 2 conditions.

ADP/ATP ratio which reflects the metabolic status of cloud microorganisms was monitored over time; no change was measured in the presence or the absence of light. This clearly means that microorganisms were not impacted by the generation of radicals and by solar light. In parallel it was shown that the endogenous cloud microflora was able to degrade H_2O_2 present in the cloud samples, suggesting the presence of very active catalases. In addition the degradation rates of H_2O_2 were not decreased in the presence of light, showing no inhibition of the biological process by light and radicals.

Solar light is actually composed of two types of highly energetic wavelengths (UV-C, ~190–290 nm, and UV-B, ~290–320 nm) that can potentially affect microorganisms mainly by causing DNA damage (λ = 260 nm; see the review by Witkin (1976)). However UV-C radiations are mostly absorbed by stratospheric ozone, i.e. above the highest altitudes and thus have no effect on tropospheric clouds where microorganisms live. If microorganisms present in the air reach this stratospheric zone, they can be indeed damaged. This was shown by Smith et al. (2011) who exposed spores of *Bacillus subtilis* to a series of stratospheric simulations combining temperature, desiccation, pressure and UV light. UV light was the only stress to have an impact on *Bacillus* survival. For UV-B radiations, the deleterious effects are limited and can be balanced by repair mechanisms. Solar light is also composed of longer UV wavelengths (UV-A, ~320–400 nm) and visible light (~400–800 nm) which can indirectly alter cell viability by producing Reactive Oxygen Species (ROS) that include $^{\bullet}OH$ and $O_2^{\bullet -}$ radicals (Fig. 10.3). These extracellular radicals are produced mainly by direct photolysis of H_2O_2 or by photo-Fenton reactions (Fe + H_2O_2) and can diffuse into the cell across the cytoplasmic membrane. The same type of radicals can also be produced intracellularly when O_2 diffuses inside the cell during the respiration process of aerobic microorganisms. These radicals are extremely deleterious for cells as they can damage the major cellular components (Proteins, DNA, lipids, etc.) and induce cell death. Hopefully microorganisms are protected from these ROS with the assistance of various mechanisms involved in the oxidative stress metabolism [see Davey and O'toole (2000) for review]. First radicals can be scavenged by antioxidant molecules such as vitamins (ascorbic acid, α-tocopherol.), gluthatione, and pigments (carotenoïds) (Tong and Lighthart 1998; Dieser et al. 2010). As already stated the majority of atmospheric microorganisms is pigmented: 50% in clouds and 80% in the air (Amato et al. 2005; Fahlgren et al. 2010; Vaïtilingom et al. 2012; Zweifel et al. 2012). Another protection mechanism to fight the presence of ROS is based on the activity of specific enzymes of the oxidative metabolism (Fig. 10.3): Super

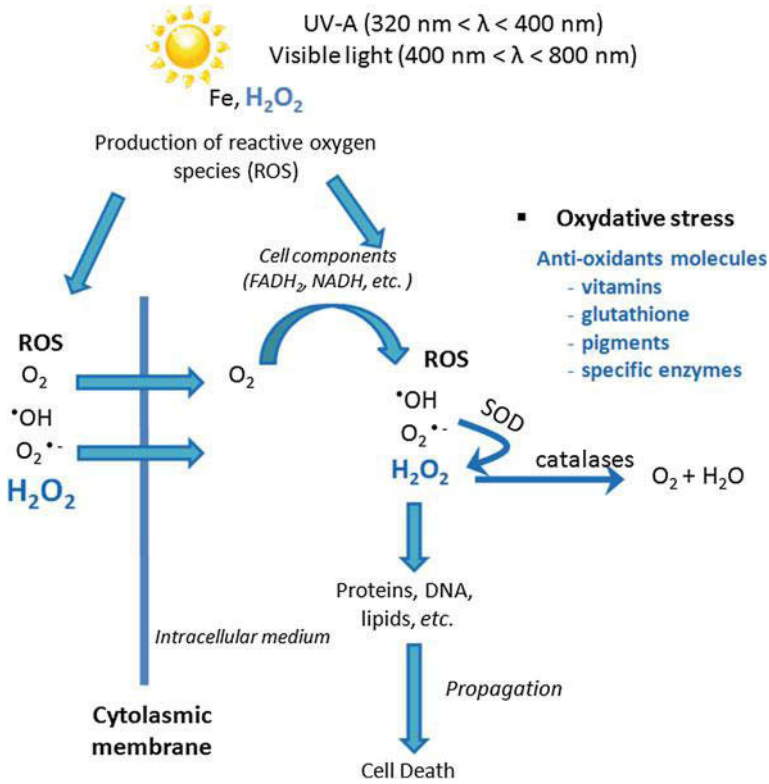


Fig. 10.3 In clouds, microbial cells are exposed to reactive oxygen species (ROS) produced by the uptake of O_2 during respiration or by chemical reactions (photolysis of H_2O_2, Fenton or photo-Fenton reactions) occurring in cloud water. Cells react to this oxidative stress thanks to the production of vitamins, glutathione, pigments or specific enzymes

oxide dismutase (SOD) is able to transform $O_2^{\bullet -}$ into H_2O_2 which again can be transformed in O_2 and H_2O as non-toxic compounds by catalases (Vorob'eva 2004; Davies 2000). Catalases can also act directly on H_2O_2 which has been transferred in the cell from the extracellular medium (cloud water).

A second important stress is osmotic stress. Once in clouds, microorganisms are protected against desiccation by the presence of condensed water; however they are then exposed to rapid variations of osmolarity due to repeated condensation-evaporation cycles. In clouds, microorganisms are subject to osmotic variations when water condensates or evaporates (Fig. 10.4). Evaporation will induce an increase of the extracellular concentration and thus a hyper-osmotic shock, while the reverse happens during the condensation phase and creates a hyper-osmotic shock. To mimic this evaporation-condensation phenomenon, Joly et al. (2015) have exposed the 5 cloud microbial strains to a hyper-osmotic shock (1 M NaCl, realistic concentration for cloud conditions), followed by a hypo-osmotic shock, and they measured viability by culture (Table 10.3). The survival rates for the 2 *Pseudomonas*

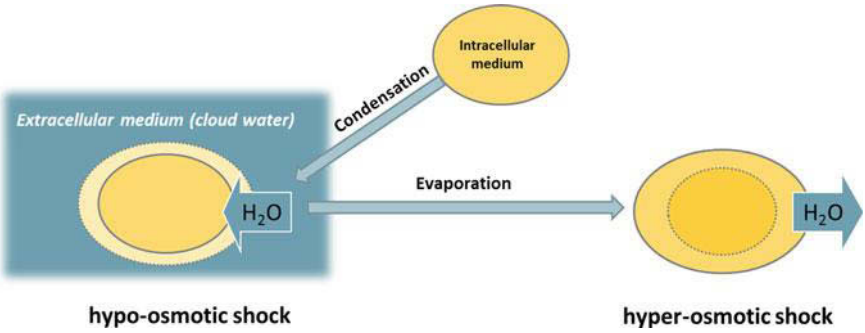


Fig. 10.4 During the evaporation-condensation cycles of cloud droplets, microbial cells experience hyper-osmotic and hypo-osmotic shocks due to the change of solute concentrations surrounding the cells. Cells answer by water efflux or influx modifying the cellular volume

and the *Arthrobacte*r strains was quite high, that of the yeast *Dioszegia* was also important, showing that these microorganisms can resist to osmotic stress. However, the *Sphingomonas* strain was very impacted by such osmotic shock. Although these model strains might give a limited view of the whole cloud microbiome, this work suggests that the adaptation to osmotic stress is not a common feature to microbial cells living in clouds, and it is more likely strain dependent.

Microorganisms have developed different processes to fight against osmotic shocks (see *Csonka*, 1989 for review). When the extracellular concentration is increased (hyperosmotic shock), microorganisms have to equilibrate internal and external osmolarities by immediate efflux of water molecules (Fig. 10.4). This response leads to increased intracellular concentration of metabolites, decreased metabolic activity, and shrinkage of the cell. To reestablish influx of water, cells increase cytoplasm osmolarity by synthesizing or up-taking compounds known as "compatible solutes" or "osmoprotectants": potassium ions, amino acids (proline, glutamate…), sugars (trehalose, sucrose…) or peptides. A recent publication demonstrated the production of compatible solutes including betaine, ectoine, *N*-acetylglutaminylglutamine amide (NAGGN), and trehalose by a strain of *Pseudomopnas syringae* under osmotic stress conditions (Kurz et al. 2010). This is of interest as this species is one of the major ones encountered in clouds.

Further stress to be encountered by cloud microorganisms is temperature; this includes living in the cold, and enduring cold shocks as well as freeze-thaw cycles. Cloud temperature varies with the altitude, the latitude and the season. Although some microorganisms have been collected at 77 km of altitude where the temperature is extremely low, this review focuses on microorganisms in low altitude clouds called "warm clouds", which have been examined in more detail than the ones in high atmosphere. In such clouds collected at the puy de Dôme station in France at 1465 m a.s.l., the annual average temperature is around 5 °C but can reach 17 °C or more during the summer. It has been shown that a great part of the cloud microbial isolates are psychrophile or psychrotolerant and are clearly adapted for growth at the temperatures existing in warm clouds (Amato et al. 2007d; Vaïtilingom et al. 2012).

In addition, as explained earlier, more than 50% of these isolates are pigmented, they can also be embedded in biofilms or aggregates, all these factors protect them against the cold. This ability to grow and survive at low temperatures is actually not surprising as microorganisms have been found in many cold environments including snow and ice, particularly in polar environments (Carpenter et al. 2000; Foght et al. 2004; Dieser et al. 2010; Amato et al. 2007b; Junge et al. 2006; Groudieva et al. 2004; Christner et al. 2001, 2003; Price 2000). The specificity of the atmospheric medium is that, because it is a transient habitat, microorganisms have to adapt from a terrestrial environment to an atmospheric one, they have to cope with cold shocks. In our group, we have studied this cold shock impact on a model strain, *Pseudomonas syringae* 13b2 using metabolomics (unpublished data). Incubations of the strain at 17 and 5 °C were compared; key biomarkers were identified by Nuclear Magnetic Resonance and Mass Spectrometry. These markers indicate that at 5 °C, many metabolic changes occur to compensate the effects of low temperature. The first important feature is to re-establish membrane fluidity by changing membrane composition which allows the membrane functionality (Shivaji and Prakash 2010). Also we observed that cryo-protectants, in particular trehalose, carnitine, glutamate, glycine, and glycerol were produced, and the energetic state was boosted (increase of ATP) as well as the sulfur metabolism (including glutathione over production). This global answer of the strain shows that a single stress such as a cold shock can also induce responses common with other stresses like osmotic shocks (osmo-protectants are often similar to cryo-protectants) and oxidative stress (gluthatione). These crossed answers have been often reported in the literature (Mikami et al. 2002; Tanghe et al. 2003). The regulation systems to cold and osmotic stresses present many similarities (Suzuki et al. 2001; Mikami et al. 2002), and osmoprotectant compatible solutes such as trehalose, glycerol and saccharose also serve as cryoprotectants (De Antoni et al. 1989; Panoff et al. 2000). Tanghe et al. (2006) highlighted the importance of aquaporins, channel proteins devoted to the transport of water through the cell membrane, in the resistance to freezing. Many studies have reported a close relationship between cold stress and oxidative stress in bacteria. Indeed it was shown that the production of free radicals ($O_2^{\circ -}$ and °OH) and H_2O_2 is increased when the temperature is decreased (Zhang et al. 2012).

In addition to cold shocks, microorganisms can experience repeated freeze-thaw cycles due to the temperature gradient existing in the troposphere associated with rapid vertical winds. To test the resistance of cloud microorganisms to such a stress, Joly et al. (2015) have subjected the 5 model strains mentioned above to 6 consecutive freeze-thaw cycles (−40 °C/+5 °C) and measured their survival (Table 10.3). The resistance was highly strain dependent, ranging from high to very low survival rates (1–80% per freeze-thaw cycle). Interestingly when cell concentration was increased the survival rate was improved, this is consistent with the observed improved resistance of aggregated cells (Monier and Lindow 2003). Also the ice nucleation activity of the *Pseudomonas* strains did not seem to be a protection.

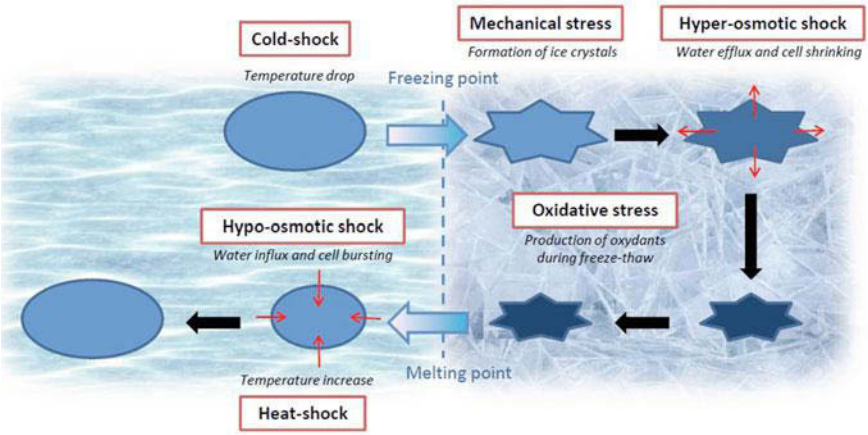


Fig. 10.5 Freeze-thaw cycles: a combination of multiple stresses

Freeze-thaw cycle is actually a complex mechanism involving a combination of different stresses (Fig. 10.5). The first step is directly related to a cold shock, as the temperature decreases very quickly, leading to the formation of ice. The formation of ice crystals represents then a mechanical stress for the cells which is combined with an osmotic stress as the osmolites are concentrated in the extracellular medium (hyper-osmotic shock). Indeed the formation of ice results in a supersaline liquid network of microveins where microbial cells are trapped (Price 2000; Mader et al. 2006; Amato et al. 2009). It is also combined with a change of the cell shape and possible mechanical damages. When ice is thawing, again a temperature shock (heat shock) is experienced by the cells in addition to another osmotic stress as the solutes are diluted in the extracellular medium (hypo-osmotic shock). During freezing-thawing, ROS are produced, inducing thus an additional oxidative stress in cells (Stead and Park 2000). We can thus hypothesize that the cells will adapt by modifying their metabolism to face these different stresses. For counteracting the mechanical damages caused by freezing, microorganisms can produce antifreeze proteins (Duman and Olsen 1993). For the other stresses (temperature, osmotic, and oxidative), as shown above, common response pathways can be induced (Mikami et al. 2002; Tanghe et al. 2003). In some cases it has been shown that pre-exposition to one stress can eventually help the cell to resist to other stresses; for instance oxidative stress resistance was shown to be improved by pre-exposition to low doses of oxidants as the result of the induction of oxidative (Storz et al. 1990) and general stress response (Tanghe et al. 2003).

Because the mechanisms of stress resistance are so complex, it is no possible to just sum the impacts of the different individual stresses for estimating the chances of survival in clouds. However it can be noted that the survival rate of the tested microorganisms facing freeze-thaw cycles roughly matches, perhaps coincidentally, the frequency of cloud events collected at the puy de Dôme station in which the different genera of bacteria or yeasts were detected viable by culture (Table 10.3).

For instance the yeast *Dioszegia hungarica* which was almost insensitive to freeze-thaw cycles (survival rate of 80%) belongs to the yeast genus the most represented in cloud water samples (71%). The Actinobacterium *Arthrobacter* which highly suffered from repeated freeze-thaw (survival rate of 16%) was detected as alive much less frequently (13% of the clouds). The Proteobacteria *Pseudomonas syringae* and *Sphingomonas* sp. survived freeze-thaw cycles with a rate of 45–71% were the most represented bacterial genera, present in about 40–60% of the samples.

10.6 Conclusions and Perspectives

In conclusion we know now that metabolically active microorganisms are present in clouds which represent a transient habitat. They can maintain viability to different major stresses present in this harsh environment thanks to various general or specific strategies. The recurring presence of some groups of microorganisms in clouds can possibly result from two mechanisms: (i) these microorganisms are aerosolized from major specific sources on Earth's surface (ii) these microorganisms have elaborated strategies to improve their survival in clouds. Previous studies suggest that stress response is very often strain dependent; therefore it is difficult to make a general assessment correlating the occurrence of specific microorganisms in clouds with their stress resistance. However our work, although it is restricted to a limited number of model strains (Table 10.3) and thus is still speculative, tends to give some tendencies: the resistance to freeze-thaw cycles seems to be a major factor driving the final frequency of microbial strains in clouds.

Future work is needed to better describe and understand this unexplored world which is the cloud microbiome. Thanks to the development of new technologies such as devices allowing high sampling volumes and sensitive molecular tools, it is hoped that "omics" studies will be available soon. Metagenomics and metatranscriptomics could give new insights into the structure and function of cloud communities. metabolomics could also bring valuable information about the response and adaptation of cloud microorganisms to atmospheric stresses. Finally, more sampling site should be considered as it is to date mainly restricted to a few sites over the world. For that new collaborations and interdisciplinary teams between biologists and physicists of the atmosphere should be established.

References

Ahern HE, Walsh KA, Hill TCJ, Moffett BF (2007) Fluorescent pseudomonads isolated from Hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation. Biogeosciences 4(1):115–124

Aleksic N, Roy K, Sistla G, Dukett J, Houck N, Casson P (2009) Analysis of cloud and precipitation chemistry at whiteface mountain, NY. Atmos Environ 43(17):2709–2716. doi:10.1016/j.atmosenv.2009.02.053

Aller JY, Kuznetsova MR, Jahns CJ, Kemp PF (2005) The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols. J Aerosol Sci 36(5–6):801–812. doi:10.1016/j.jaerosci.2004.10.012

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. Atmos Environ 39 (22):4143–4153

Amato P, Demeer F, Melaouhi A, Fontanella S, Martin-Biesse AS, Sancelme M, Laj P, Delort AM (2007a) A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by micro-organisms. Atmos Chem Phys 7:4159–4169

Amato P, Hennebelle R, Magand O, Sancelme M, Delort AM, Barbante C, Boutron C, Ferrari C (2007b) Bacterial characterization of the snow cover at Spitzberg, Svalbard. FEMS Microbiol Ecol 59(2):255–264

Amato P, Parazols M, Sancelme M, Laj P, Mailhot G, Delort A-M (2007c) Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures. FEMS Microbiol Ecol 59(2):242–254

Amato P, Parazols M, Sancelme M, Mailhot G, Laj P, Delort AM (2007d) An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the Puy de Dôme (France). Atmos Environ 41 (37):8253–8263

Amato P, Doyle S, Christner BC (2009) Macromolecular synthesis by yeasts under frozen conditions. Environ Microbiol 11(3):589–596. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01829.x

Amato P, Joly M, Schaupp C, Attard E, Möhler O, Morris CE, Brunet Y, Delort A-M (2015) Survival and ice nucleation activity of bacteria as aerosols in a cloud simulation chamber. Atmos Chem Phys 15(11):6455–6465. doi:10.5194/acp-15-6455-2015

Anastasio C, Faust BC, Allen JM (1994) Aqueous phase photochemical formation of hydrogen peroxide in authentic cloud waters. J Geophys Res Atmos 99(D4):8231–8248. doi:10.1029/94JD00085

Ariya PA, Nepotchatykh O, Ignatova O, Amyot M (2002) Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. Geophys Res Lett 29(22):2077–2081

Ariya PA, Sun J, Eltouny NA, Hudson ED, Hayes CT, Kos G (2009) Physical and chemical characterization of bioaerosols—implications for nucleation processes. Int Rev Phys Chem 28 (1):1–32. doi:10.1080/01442350802597438

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. Atmos Res 64(1–4):109–119

Bauer H, Schueller E, Weinke G, Berger A, Hitzenberger R, Marr IL, Puxbaum H (2008) Significant contributions of fungal spores to the organic carbon and to the aerosol mass balance of the urban atmospheric aerosol. Atmos Environ 42(22):5542–5549. doi:10.1016/j.atmosenv.2008.03.019

Bianco A, Passananti M, Perroux H, Voyard G, Mouchel-Vallon C, Chaumerliac N, Mailhot G, Deguillaume L, Brigante M (2015) A better understanding of hydroxyl radical photochemical sources in cloud waters collected at the Puy de Dôme station—experimental versus modelled formation rates. Atmos Chem Phys 15(16):9191–9202. doi:10.5194/acp-15-9191-2015

Blanchard DC (1989) The ejection of drops from the sea and their enrichment with bacteria and other materials: a review. Estuaries Coasts 12(3):127–137

Bottos EM, Woo AC, Zawar-Reza P, Pointing SB, Cary SC (2014) Airborne bacterial populations above desert soils of the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. Microb Ecol 67(1):120–128. doi:10.1007/s00248-013-0296-y

Bowers RM, Lauber CL, Wiedinmyer C, Hamady M, Hallar AG, Fall R, Knight R, Fierer N (2009) Characterization of airborne microbial communities at a high-elevation site and their potential to act as atmospheric ice nuclei. Appl Environ Microbiol 75(15):5121–5130

Brodie EL, DeSantis TZ, Parker JPM, Zubietta IX, Piceno YM, Andersen GL (2007) Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. Proc Natl Acad Sci 104(1):299–304

Burrows SM, Butler T, Jöckel P, Tost H, Kerkweg A, Pöschl U, Lawrence MG (2009a) Bacteria in the global atmosphere—part 2: modelling of emissions and transport between different ecosystems. Atmos Chem Phys 9(3):10829–10881

Burrows SM, Elbert W, Lawrence MG, Pöschl U (2009b) Bacteria in the global atmosphere—part 1: review and synthesis of literature data for different ecosystems. Atmos Chem Phys 9(3):10777–10827

Carpenter EJ, Lin S, Capone DG (2000) Bacterial activity in South Pole snow. Appl Environ Microbiol 66(10):4514–4517

Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG, Reeve JN (2001) Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice. Environ Microbiol 3(9):570–577

Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG, Reeve JN (2003) Bacterial recovery from ancient glacial ice. Environ Microbiol 5(5):433–436. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00422.x

Christner BC, Morris CE, Foreman CM, Cai R, Sands DC (2008a) Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall. Science 319(5867):1214

Christner BC, Cai R, Morris CE, McCarter KS, Foreman CM, Skidmore ML, Montross SN, Sands DC (2008b) Geographic, seasonal, and precipitation chemistry influence on the abundance and activity of biological ice nucleators in rain and snow. Proc Natl Acad Sci 105 (48):18854–18859

Collett JL Jr, Aaron Bator D, Sherman E, Moore KF, Hoag KJ, Demoz BB, Rao X, Reilly JE (2002) The chemical composition of fogs and intercepted clouds in the United States. Atmos Res 64(1–4):29–40

Côté V, Kos G, Mortazavi R, Ariya PA (2008) Microbial and 'de Novo' transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi. Sci Total Environ 390(2–3):530–537

Davey ME, O'toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev 64(4):847–67. doi:10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000

Davies KJ (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. IUBMB Life 50(4–5):279–289. doi:10.1080/713803728

De Antoni GL, Pérez P, Abraham A, Añón MC (1989) Trehalose, a cryoprotectant for Lactobacillus bulgaricus. Cryobiology 26(2):149–153. doi:10.1016/0011-2240(89)90045-X

Decesari S, Facchini MC, Matta E, Lettini F, Mircea M, Fuzzi S, Tagliavini E, Putaud JP (2001) Chemical features and seasonal variation of fine aerosol water-soluble organic compounds in the Po Valley, Italy. Atmos Environ 35(21):3691–3699

Deguillaume L, Charbouillot T, Joly M, Vaïtilingom M, Parazols M, Marinoni A, Amato P et al (2014) Classification of clouds sampled at the Puy de Dôme (France) based on 10 Yr of monitoring of their physicochemical properties. Atmos Chem Phys 14(3):1485–1506. doi:10.5194/acp-14-1485-2014

DeLeon-Rodriguez N, Lathem TL, Rodriguez-R LM, Barazesh JM, Anderson BE, Beyersdorf AJ, Ziemba LD, Bergin M, Nenes A, Konstantinidis KT (2013) Microbiome of the upper troposphere: species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. Proc Natl Acad Sci 110(7):2575–2580. doi:10.1073/pnas.1212089110

DeMott PJ, Prenni AJ (2010) New directions: need for defining the numbers and sources of biological aerosols acting as ice nuclei. Atmos Environ 44(15):1944–1945

Després VR, Nowoisky JF, Klose M, Conrad R, Andreae MO, Pöschl U (2007) Characterization of primary biogenic aerosol particles in urban, rural, and high-alpine air by DNA sequence and restriction fragment analysis of ribosomal RNA genes. Biogeosciences 4(6):1127–1141

Deutsch F, Hoffmann P, Ortner HM (2001) Field experimental investigations on the Fe(II)- and Fe (III)-content in cloudwater samples. J Atmos Chem 40(1):87–105

Dieser M, Greenwood M, Foreman CM (2010) Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. Arct Antarct Alp Res 42(4):396–405. doi:10.1657/1938-4246-42.4.396

Duman JG, Olsen TM (1993) Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi, and phylogenetically diverse plants. Cryobiology 30(3):322–328. doi:10.1006/cryo.1993.1031

Ekström S, Nozière B, Hultberg M, Alsberg T, Magnér J, Nilsson ED, Artaxo P (2010) A possible role of ground-based microorganisms on cloud formation in the atmosphere. Biogeosciences 7 (1):387–394. doi:10.5194/bg-7-387-2010

Elbert W, Taylor PE, Andreae MO, Pöschl U (2007) Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions. Atmos Chem Phys 7(17):4569–4588

Erel Y, Pehkonen SO, Hoffmann MR (1993) Redox chemistry of iron in fog and stratus clouds. J Geophys Res 98(D10):18423–18434

Ervens B, George C, Williams JE, Buxton GV, Salmon GA, Bydder M, Wilkinson F et al (2003) CAPRAM 2.4 (MODAC mechanism): an extended and condensed tropospheric aqueous phase mechanism and its application. J Geophys Res 108(D14):4426. doi:10.1029/2002jd002202

Ervens B, Wang Y, Eagar J, Leaitch WR, Macdonald AM, Valsaraj KT, Herckes P (2013) Dissolved Organic Carbon (DOC) and select aldehydes in cloud and fog water: the role of the aqueous phase in impacting trace gas budgets. Atmos Chem Phys 13(10):5117–5135. doi:10.5194/acp-13-5117-2013

Ervens B, Renard P, Tlili S, Ravier S, Clément J-L, Monod A (2015) Aqueous-phase oligomerization of methyl vinyl ketone through photooxidation—part 2: development of the chemical mechanism and atmospheric implications. Atmos Chem Phys 15(16):9109–9127. doi:10.5194/acp-15-9109-2015

Fahlgren C, Hagström Å, Nilsson D, Zweifel UL (2010) Annual variations in the diversity, viability, and origin of airborne bacteria. Appl Environ Microbiol 76(9):3015–3025. doi:10.1128/AEM.02092-09

Fierer N, Liu Z, Rodriguez-Hernandez M, Knight R, Henn M, Hernandez MT (2008) Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. Appl Environ Microbiol 74 (1):200–207

Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol 8(9):623–633. doi:10.1038/nrmicro2415

Foght J, Aislabie J, Turner S, Brown CE, Ryburn J, Saul DJ, Lawson W (2004) Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two southern hemisphere glaciers. Microb Ecol 47 (4):329–340

Fong N, Burgess M, Barrow K, Glenn D (2001) carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium 'Arthrobacter Agilis' in response to thermal and salt stress. Appl Microbiol Biotechnol 56(5–6):750–756. doi:10.1007/s002530100739

Fröhlich-Nowoisky J, Pickersgill DA, Després VR, Pöschl U (2009) High diversity of fungi in air particulate matter. Proc Natl Acad Sci 106(31):12814–12819. doi:10.1073/pnas.0811003106

Fuzzi S, Mandrioli P, Perfetto A (1997) Fog droplets—an atmospheric source of secondary biological aerosol particles. Atmos Environ 31(2):287–290

Gabey AM, Vaitilingom M, Freney E, Boulon J, Sellegri K, Gallagher MW, Crawford IP, Robinson NH, Stanley WR, Kaye PH (2013) Observations of fluorescent and biological aerosol at a high-altitude site in Central France. Atmos Chem Phys 13(15):7415–7428. doi:10.5194/acp-13-7415-2013

Gandolfi I, Bertolini V, Ambrosini R, Bestetti G, Franzetti A (2013) Unravelling the bacterial diversity in the atmosphere. Appl Microbiol Biotechnol 97(11):4727–4736. doi:10.1007/s00253-013-4901-2

Garcia E, Hill TCJ, Prenni AJ, DeMott PJ, Franc GD, Kreidenweis SM (2012) Biogenic ice nuclei in boundary layer air over two U.S. High Plains agricultural regions. J Geophys Res Atmos 117:D018209. doi:10.1029/2012JD018343

Gourmelon M, Cillard J, Pommepuy M (1994) Visible light damage to Escherichia Coli in seawater: oxidative stress hypothesis. J Appl Bacteriol 77(1):105–112

Griffin DW (2007) Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health. Clin Microbiol Rev 20(3):459–477. doi:10.1128/CMR.00039-06

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 Life Under Extreme Conditions 8(6):475–88. doi:10.1007/s00792-004-0409-0

Heald, CL, Spracklen DV (2009) Atmospheric budget of primary biological aerosol particles from fungal spores. Geophys Res Lett 36(9). doi:10.1029/2009GL037493

Healy DA, Huffman JA, O'Connor DJ, Pöhlker C, Pöschl U, Sodeau JR (2014) Ambient measurements of biological aerosol particles near Killarney, Ireland: a comparison between real-time fluorescence and microscopy techniques. Atmos Chem Phys 14(15):8055–8069. doi:10.5194/acp-14-8055-2014

Herckes P, Valsaraj KT, Collett JL Jr (2013) A review of observations of organic matter in fogs and clouds: origin, processing and fate. Atmos Res 132–133:434–449. doi:10.1016/j.atmosres.2013.06.005

Herlihy LJ, Galloway JN, Mills AL (1987) Bacterial utilization of formic and acetic acid in rainwater. Atmos Environ 21(11):2397–2402

Herrmann H, Schaefer T, Tilgner A, Styler SA, Weller C, Teich M, Otto T (2015) Tropospheric aqueous-phase chemistry: kinetics, mechanisms, and its coupling to a changing gas phase. Chem Rev 115(10):4259–4334. doi:10.1021/cr500447k

Hill KA, Shepson PB, Galbavy ES, Anastasio C, Kourtev PS, Konopka A, Stirm BH (2007) Processing of atmospheric nitrogen by clouds above a forest environment. J Geophys Res Atmos 112(D11):D11301. doi:10.1029/2006JD008002

Hirano SS, Upper CD (2000) Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on Pseudomonas syringae—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. Microbiol Mol Biol Rev 64(3):624–653. doi:10.1128/MMBR.64.3.624-653.2000

Hoose C, Möhler O (2012) Heterogeneous ice nucleation on atmospheric aerosols: a review of results from laboratory experiments. Atmos Chem Phys 12:9817–9854

Hoose C, Kristjánsson JE, Burrows SM (2010) How important is biological ice nucleation in clouds on a global scale? Environ Res Lett 5(2):024009

Houdier S, Barret M, Dominé F, Charbouillot T, Deguillaume L, Voisin D (2011) Sensitive determination of glyoxal, methylglyoxal and hydroxyacetaldehyde in environmental water samples by using dansylacetamidooxyamine derivatization and liquid chromatography/fluorescence. Anal Chim Acta 704(1–2):162–173

Husarova S, Vaitilingom M, Deguillaume L, Traikia M, Vinatier V, Sancelme M, Amato P, Matulova M, Delort A-M (2011) Biotransformation of methanol and formaldehyde by bacteria isolated from clouds. Comparison with radical chemistry. Atmos Environ 45(33):6093–6102. doi:10.1016/j.atmosenv.2011.06.035

Hutchings JW, Robinson MS, McIlwraith H, Kingston JT, Herckes P (2009) The chemistry of intercepted clouds in Northern Arizona during the North American Monsoon Season. Water Air Soil Pollut 199(1–4):191–202. doi:10.1007/s11270-008-9871-0

Igawa M, William Munger J, Hoffmann MR (1989) Analysis of aldehydes in cloud- and fogwater samples by HPLC with a postcolumn reaction detector. Environ Sci Technol 23(5):556–561

Imshenetsky AA, Lysenko SV, Kazakov GA (1978) Upper boundary of the biosphere. Appl Environ Microbiol 35(1):1–5

Jacob DJ, Waldman JM, William Munger J, Hoffmann MR (1984) A field investigation of physical and chemical mechanisms affecting pollutant concentrations in fog droplets. Tellus B 36B(4):272–285

Jeon EM, Kim HJ, Jung K, Kim JH, Kim MY, Kim YP, Ka J-O (2011) Impact of Asian dust events on airborne bacterial community assessed by molecular analyses. Atmos Environ 45(25):4313–4321. doi:10.1016/j.atmosenv.2010.11.054

Joly M, Attard E, Sancelme M, Deguillaume L, Guilbaud C, Morris CE, Amato P, Delort A-M (2013) Ice nucleation activity of bacteria isolated from cloud water. Atmos Environ 70:392–400

Joly M, Amato P, Deguillaume L, Monier M, Hoose C, Delort AM (2014) Quantification of ice nuclei active at near 0 °C temperatures in low-altitude clouds at the Puy de Dôme atmospheric station. Atmos Chem Phys 14(15):8185–8195. doi:10.5194/acp-14-8185-2014

Joly M, Amato P, Sancelme M, Vinatier V, Abrantes M, Deguillaume L, Delort A-M (2015) Survival of microbial isolates from clouds toward simulated atmospheric stress factors. Atmos Environ 117:92–98. doi:10.1016/j.atmosenv.2015.07.009 (September)

Jones AM, Harrison RM (2004) The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations: a review. Sci Total Environ 326(1–3):151–180

Jr C, Jeffrey L, Daube BC, Jr DG, Hoffmann MR (1990) Intensive studies of Sierra Nevada cloudwater chemistry and its relationship to precursor aerosol and gas concentrations. Atmos Environ Part A Gen Top 24(7):1741–1757

Junge K, Eicken H, Swanson BD, Deming JW (2006) Bacterial incorporation of leucine into protein down to −20 °C with evidence for potential activity in sub-eutectic saline ice formations. Cryobiology 52(3):417–429

Kellogg CA, Griffin DW (2006) Aerobiology and the global transport of desert dust. Trends Ecol Evol 21(11):638–644

Köhler H (1936) The nucleus in and the growth of hygroscopic droplets. Trans Faraday Soc 32:1152–1161. doi:10.1039/TF9363201152

Kourtev PS, Hill KA, Shepson PB, Konopka A (2011) Atmospheric cloud water contains a diverse bacterial community. Atmos Environ 45(30):5399–5405

Kurz M, Burch AY, Seip B, Lindow SE, Gross H (2010) Genome-driven investigation of compatible solute biosynthesis pathways of pseudomonas syringae pv. syringae and their contribution to water stress tolerance. Appl Environ Microbiol 76(16):5452–5462. doi:10.1128/AEM.00686-10

LeClair JP, Collett JL, Mazzoleni LR (2012) Fragmentation analysis of water-soluble atmospheric organic matter using ultrahigh-resolution FT-ICR mass spectrometry. Environ Sci Technol 46(8):4312–4322. doi:10.1021/es203509b

Lighthart B (1997) The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. FEMS Microbiol Ecol 23(4):263–274

Lindemann J, Constantinidou HA, Barchet WR, Upper CD (1982) Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation-active bacteria. Appl Environ Microbiol 44(5):1059–1063

Lindow SE, Arny DC, Upper CD (1978) Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. Appl Environ Microbiol 36(6):831–838

Löflund M, Kasper-Giebl A, Schuster B, Giebl H, Hitzenberger R, Puxbaum H (2002) Formic, acetic, oxalic, malonic and succinic acid concentrations and their contribution to organic carbon in cloud water. Atmos Environ 36(9):1553–1558

Mader HM, Pettitt ME, Wadham JL, Wolff EW, John Parkes R (2006) Subsurface ice as a microbial habitat. Geology 34(3):169–172. doi:10.1130/G22096.1

Maki T, Susuki S, Kobayashi F, Kakikawa M, Tobo Y, Yamada M, Higashi T et al (2010) Phylogenetic analysis of atmospheric halotolerant bacterial communities at high altitude in an Asian Dust (KOSA) arrival region, Suzu City. Sci Total Environ 408(20):4556–4562. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.04.002

Maki T, Kakikawa M, Kobayashi F, Yamada M, Matsuki A, Hasegawa H, Iwasaka Y (2013) Assessment of composition and origin of airborne bacteria in the free troposphere over Japan. Atmos Environ 74:73–82. doi:10.1016/j.atmosenv.2013.03.029

Marinoni A, Laj P, Sellegri K, Mailhot G (2004) Cloud chemistry at the Puy de Dôme: variability and relationships with environmental factors. Atmos Chem Phys 4(3):715–728

Marinoni A, Parazols M, Brigante M, Deguillaume L, Amato P, Delort A-M, Laj P, Mailhot G (2011) Hydrogen peroxide in natural cloud water: sources and photoreactivity. Atmos Res (In Press), Corrected Proof. http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V95-528YX2G-1/2/b7d2b89d5b5564997e0d6a96a1c84635

Marks R, Kruczalak K, Jankowska K, Michalska M (2001) Bacteria and fungi in air over the Gulf of Gdansk and Baltic sea. J Aerosol Sci 32(2):237–250

Maron P-A, Lejon David PH, 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. Atmos Environ 39(20):3687–3695. doi:10.1016/j.atmosenv.2005.03.002

Matsumoto K, Kawai S, Igawa M (2005) Dominant factors controlling concentrations of aldehydes in rain, fog, dew water, and in the gas phase. Atmos Environ 39(38):7321–7329. doi:10.1016/j.atmosenv.2005.09.009

Matulová M, Husárová S, Capek P, Sancelme M, Delort A-M (2014) Biotransformation of various saccharides and production of exopolymeric substances by cloud-borne Bacillus sp. 3B6. Environ Sci Technol 48(24):14238–14247. doi:10.1021/es501350s

Mayol E, Jiménez MA, Herndl GJ, Duarte CM, Arrieta JM (2014) Resolving the abundance and air-sea fluxes of airborne microorganisms in the North Atlantic Ocean. Front Microbiol 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00557

Mikami K, Kanesaki Yu, Suzuki I, Murata N (2002) The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in Synechocystis sp. PCC 6803. Mol Microbiol 46(4):905–915

Möhler O, DeMott PJ, Vali G, Levin Z (2007) Microbiology and atmospheric processes: The role of biological particles in cloud physics. Biogeosciences 4(6):1059–1071

Monier J-M, Lindow SE (2003) Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. Proc Natl Acad Sci 100(26):15977–15982. doi:10.1073/pnas.2436560100

Morris CE, Georgakopoulos DG, Sands DC (2004) Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. J Phys IV France 121:87–103

Morris CE, Sands DC, Vinatzer BA, Glaux C, Guilbaud C, Buffière A, Yan S, Dominguez H, Thompson BM (2008) The life history of the plant pathogen Pseudomonas syringae is linked to the water cycle. ISME J 2(3):321–334

Mueller DR, Vincent WF, Bonilla S, Laurion I (2005) Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. FEMS Microbiol Ecol 53(1):73–87. doi:10.1016/j.femsec.2004.11.001

Olszyna KJ, Meagher JF, Bailey EM (1988) Gas-phase, cloud and rain-water measurements of hydrogen peroxide at a high-elevation site. Atmos Environ (1967) 22(8):1699–1706

Padan E, Bibi E, Ito M, Krulwich TA (2005) Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. Biochim Biophys Acta (BBA) Biomembr 1717(2):67–88. doi:10.1016/j.bbamem.2005.09.010

Pan Y-L (2015) Detection and characterization of biological and other organic-carbon aerosol particles in atmosphere using fluorescence. J Quant Spectrosc Radiat Transfer Topical Issue Opt Part Charact Remote Sens Atmos Part I 150:12–35. doi:10.1016/j.jqsrt.2014.06.007 (January)

Panoff J-M, Thammavongs B, Guéguen M (2000) Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze–thaw stress in Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus CIP 101027T. Cryobiology 40(3):264–269. doi:10.1006/cryo.2000.2240

Parazols M, Marinoni A, Amato P, Abida O, Laj P, Mailhot G, Delort A-M, Sergio Z (2007) Speciation and role of iron in cloud droplets at the Puy de Dôme Station. J Atmos Chem 57 (3):299–300

Pehkonen SO, Erel Y, Hoffmann MR (1992) Simultaneous spectrophotometric measurement of iron(II) and iron(III) in atmospheric water. Environ Sci Technol 26(9):1731–1736

Poli A, Anzelmo G, Nicolaus B (2010) Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. Mar Drugs 8(6):1779–1802. doi:10.3390/md8061779

Price P Buford (2000) A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. Proc Natl Acad Sci 97 (3):1247–1251. doi:10.1073/pnas.97.3.1247

Prospero JM, Blades E, Mathison G, Naidu R (2005) Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. Aerobiologia 21(1):1–19. doi:10.1007/s10453-004-5872-7

Pruppacher HR, Jaenicke R (1995) The processing of water vapor and aerosols by atmospheric clouds, a global estimate. Atmos Res 38(1–4):283–295

Renoux A, Boulaud D (1998) Les Aérosols: Physique et Métrologie. Lavoisier Technique & Documentation

Richards LW (1995) Airborne chemical measurements in nighttime stratus clouds in the Los Angeles Basin. Atmos Environ 29(1):27–46

Šantl-Temkiv T, Finster K, Hansen BM, Nielsen NW, Karlson UG (2012) The microbial diversity of a storm cloud as assessed by hailstones. FEMS Microbiol Ecol 81(3):684–695. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01402.x

Šantl-Temkiv T, Finster K, Dittmar T, Hansen BM, Thyrhaug R, Nielsen NW, Karlson UG (2013a) Hailstones: a window into the microbial and chemical inventory of a storm cloud. PLoS ONE 8(1):e53550. doi:10.1371/journal.pone.0053550

Šantl-Temkiv T, Finster K, Hansen BM, Pašić L, Karlson UG (2013b) Viable methanotrophic bacteria enriched from air and rain can oxidize methane at cloud-like conditions. Aerobiologia 29(3):373–384. doi:10.1007/s10453-013-9287-1

Sattler B, Puxbaum H, Psenner R (2001) Bacterial growth in supercooled cloud droplets. Geophys Res Lett 28(2):239–242

Sauer F, Schuster G, Schäfer C, Moortgat GK (1996) Determination of H_2O_2 and organic peroxides in cloud and rain water on the Kleiner Feldberg during FELDEX. Geophys Res Lett 23(19):2605–2608

Schleper C, Puehler G, Holz I, Gambacorta A, Janekovic D, Santarius U, Klenk HP, Zillig W (1995) Picrophilus Gen. Nov., Fam. Nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. J Bacteriol 177 (24):7050–7059

Shivaji S, Prakash Jogadhenu S S (2010) How do bacteria sense and respond to low temperature? Arch Microbiol 192(2):85–95. doi:10.1007/s00203-009-0539-y

Smith DJ, Griffin DW, McPeters RD, Ward PD, Schuerger AC (2011) Microbial survival in the stratosphere and implications for global dispersal. Aerobiologia 27(4):319–332. doi:10.1007/s10453-011-9203-5

Smith DJ, Timonen HJ, Jaffe DA, Griffin DW, Birmele MN, Perry KD, Ward PD, Roberts MS (2013) Intercontinental dispersal of bacteria and archaea by transpacific winds. Appl Environ Microbiol 79(4):1134–1139. doi:10.1128/AEM.03029-12

Stead D, Park SF (2000) Roles of Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of Campylobacter Coli to freeze-thaw stress. Appl Environ Microbiol 66(7):3110–3112

Stephanie, Waturangi DE (2011) Distribution of Ice Nucleation-Active (INA) bacteria from rain-water and air. HAYATI J Biosci 18(3):108–112

Storz G, Tartaglia LA, Farr SB, Ames BN (1990) Bacterial defenses against oxidative stress. Trends Genet 6:363–368. doi:10.1016/0168-9525(90)90278-E

Sun J, Ariya PA (2006) Atmospheric organic and bio-aerosols as Cloud Condensation Nuclei (CCN): a review. Atmos Environ 40(5):795–820

Suzuki I, Kanesaki Yu, Mikami K, Kanehisa M, Murata N (2001) Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in Synechocystis. Mol Microbiol 40(1):235–244. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02379.x

Tanghe A, Van Dijck P, Thevelein JM (2003) Determinants of freeze tolerance in microorganisms, physiological importance, and biotechnological applications. Adv Appl Microbiol 53:129–176

Tanghe A, Van Dijck P, Thevelein JM (2006) Why do microorganisms have aquaporins? Trends Microbiol 14(2):78–85. doi:10.1016/j.tim.2005.12.001

Tilgner A, Herrmann H (2010) Radical-driven carbonyl-to-acid conversion and acid degradation in tropospheric aqueous systems studied by CAPRAM. Atmos Environ 44:5415–5422. doi:10.1016/j.atmosenv.2010.07.050

Tong Y, Lighthart B (1998) Effect of simulated solar radiation on mixed outdoor atmospheric bacterial populations. FEMS Microbiol Ecol 26(4):311–316. doi:10.1111/j.1574-6941.1998.tb00515.x

Vaïtilingom M (2011) Rôle Des Microorganismes Des Nuages Dans La Chimie Atmosphérique. Comparaison Avec La Chimie Radicalaire. Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France. http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00783928

Vaïtilingom M, Amato P, Sancelme M, Laj P, Leriche M, Delort A-M (2010) Contribution of microbial activity to carbon chemistry in clouds. Appl Environ Microbiol 76(1):23–29

Vaïtilingom M, Charbouillot T, Deguillaume L, Maisonobe R, Parazols M, Amato P, Sancelme M, Delort A-M (2011) Atmospheric chemistry of carboxylic acids: microbial implication versus photochemistry. Atmos Chem Phys 11:8721–8733

Vaïtilingom M, Attard E, Gaiani N, Sancelme M, Deguillaume L, Flossmann AI, Amato P, Delort A-M (2012) Long-term features of cloud microbiology at the Puy de Dôme (France). Atmos Environ 56:88–100. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.03.072

Vaïtilingom M, Deguillaume L, Vinatier V, Sancelme M, Amato P, Chaumerliac N, Delort A-M (2013) Potential impact of microbial activity on the oxidant capacity and organic carbon budget in clouds. Proc Natl Acad Sci 110(2):559–564. doi:10.1073/pnas.1205743110

Valverde-Canossa J, Wieprecht W, Acker K, Moortgat GK (2005) H_2O_2 and organic peroxide measurements in an orographic cloud: the FEBUKO experiment. Atmos Environ 39(23–24):4279–4290

van Pinxteren D, Plewka A, Hofmann D, Müller K, Kramberger H, Svrcina B, Bächmann K et al (2005) Schmücke hill cap cloud and valley stations aerosol characterisation during FEBUKO (II): organic compounds. Atmos Environ 39(23–24):4305–4320

Vorob'eva LI (2004) Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: a review. Appl Biochem Microbiol 40(3):217–224. doi:10.1023/B:ABIM.0000025941.11643.19

Wang Y, Guo J, Wang T, Ding A, Gao J, Zhou Y, Collett JL Jr, Wang W (2011) Influence of regional pollution and sandstorms on the chemical composition of cloud/fog at the summit of Mt. Taishan in Northern China. Atmos Res 99(3–4):434–442. doi:10.1016/j.atmosres.2010.11.010

Wang Y, Chiu C-A, Westerhoff P, Valsaraj KT, Herckes P (2013) Characterization of atmospheric organic matter using size-exclusion chromatography with inline organic carbon detection. Atmos Environ 68:326–332. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.11.049

Watanabe K, Ishizaka Y, Takenaka C (2001) Chemical characteristics of cloud water over the Japan Sea and the Northwestern Pacific Ocean near the central part of Japan: airborne measurements. Atmos Environ 35(4):645–655

Weller C, Tilgner A, Bräuer P, Herrmann H (2014) Modeling the impact of iron-carboxylate photochemistry on radical budget and carboxylate degradation in cloud droplets and particles. Environ Sci Technol 48(10):5652–5659. doi:10.1021/es4056643

Witkin EM (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia Coli*. Bacteriol Rev 40(4):869–907

Womack AM, Bohannan Brendan J M, Green JL (2010) Biodiversity and biogeography of the atmosphere. Philos Trans R Soc B Biol Sci 365(1558):3645–3653. doi:10.1098/rstb.2010.0283

Zhang J, Li Y, Chen W, Guo-Cheng D, Chen J (2012) Glutathione improves the cold resistance of Lactobacillus Sanfranciscensis by physiological regulation. Food Microbiol 31(2):285–292. doi:10.1016/j.fm.2012.04.006

Zweifel UL, Hagström Å, Holmfeldt K, Thyrhaug R, Geels C, Frohn LM, Skjøth CA, Karlson UG (2012) High bacterial 16S rRNA gene diversity above the atmospheric boundary layer. Aerobiologia 28(4):481–498. doi:10.1007/s10453-012-9250-6

RESUME

Dans un contexte de réchauffement climatique, une compréhension des mécanismes atmosphériques influençant le bilan radiatif terrestre est nécessaire. Les nuages peuvent participer à un refroidissement mais des incertitudes demeurent sur ces systèmes qui sont encore mal connus (notamment la composition de leur fraction organique). Depuis toujours, seules les réactions chimiques et surtout celles radicalaires sont considérées comme importantes pour jouer sur la composition des nuages. Cependant la découverte de microorganismes métaboliquement actifs pose la question de leur rôle en tant que biocatalyseurs. Ces microorganismes sont en effet à même d'utiliser des molécules carbonées comme nutriments, de dégrader des molécules précurseur des radicaux (H_2O_2) et de se prémunir contre le stress oxydant. L'objectif de ce travail est de mesurer l'impact des processus photochimiques et biologiques sur la composition chimique du nuage.

Pour cela, la quantification de $^{\bullet}OH$, le radical responsable de la réactivité diurne, et l'évaluation de l'impact des microorganismes sur cette concentration à l'état stationnaire ont été entreprises. Après un développement en milieu modèle, la méthode a été appliquée à des eaux atmosphériques (eaux de pluies et eaux de nuages). Les concentrations obtenues sont de l'ordre de 10^{-17} à 10^{-15} M et ne sont pas modifiées en présence de microorganismes. Ces concentrations sont plus faibles que celles obtenues dans les modèles de chimie atmosphérique, ceci peut s'expliquer par un manque de connaissance sur la matière organique. Pour mieux caractériser cette dernière, des composés aromatiques simples présents dans des eaux de nuages ont été identifiés, le phénol a été retrouvé dans les 8 échantillons analysés. Une étude approfondie sur sa dégradation a donc été entreprise. Nous avons montré que des transcrits d'enzymes intervenant dans sa biotransformation sont synthétisés par les bactéries *in situ* dans l'eau de nuage. De plus, 93% des souches bactériennes testées, isolées de ce milieu, dégradent le phénol. Pour évaluer l'impact relatif des processus de dégradation biotique et abiotique du phénol, une expérience de photo-biodégradation avec une souche modèle (*Rhodococcus erythropolis* PDD-23b-28) a été entreprise. Ces deux processus interviennent avec une importance de même ordre de grandeur. Ces résultats suggèrent que les microorganismes et les radicaux interviennent dans la remédiation naturelle de l'atmosphère.

Mots clés : Chimie atmosphérique, nuage, radical hydroxyle, microorganismes, composés aromatiques, phénol, photo-biodégradation.

ABSTRACT

In the context of global warming, more precise knowledge of atmospheric processes is needed to evaluate their impact on the Earth radiative budget. Clouds can limit the increase of temperature but this retroaction is not well understood due to a lack of knowledge of cloud media (like organic fraction composition). From the beginning of atmospheric studies, only chemical, especially radical, reactions was taken into account. However microorganisms metabolically active were found in cloud water arising questions about their role as biocatalyst. They are able to use carboxylic acids as nutriments, to degrade radical precursor (like H_2O_2) and to survive oxidative stress. The aim of this work is to quantify the impact of photochemical and biological processes on cloud chemistry composition.

First, the concentrations of $^{\bullet}OH$, the most reactive radical, were evaluated and the influence of microorganisms on the concentrations were studied. A new method was developed in artificial medial before direct quantification of steady state $^{\bullet}OH$ concentration in atmospheric waters (rain and cloud waters). Concentrations ranged from 10^{-17} to 10^{-15} M and did not change in presence of microorganisms. These measures were lower than concentrations estimated by chemical atmospheric models. A possible explanation was an underestimation of the main sink of this radical (organic matter). To better characterize this fraction, simple aromatic compounds were identified in cloud waters, phenol was found in the 8 samples analyzed. To go further, we studied phenol degradation in detail. Enzyme transcripts involved in phenol degradation were present in cloud water samples showing *in situ* activity of native bacteria. 93% of tested cultural strains, isolated from cloud waters, were able to degrade phenol. To quantify the relative contribution of radical *versus* microbial processes allowing phenol degradation, we performed photo-biodegradation experiment with a model strain (*Rhodococcus erythropolis* PDD-23b-28). Our results showed that these two processes participated equally to phenol degradation, suggesting that microorganisms and radicals can be involved in atmospheric natural remediation.

Key words: Atmospheric chemistry, cloud, hydroxyl radical, microorganisms, aromatic compounds, phenol, photo-biodegradation.