



HAL
open science

Etude du métabolisme microbien dans les nuages : réponse au stress et impact sur la chimie atmosphérique

Nolwenn Wirgot

► **To cite this version:**

Nolwenn Wirgot. Etude du métabolisme microbien dans les nuages : réponse au stress et impact sur la chimie atmosphérique. Chimie organique. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC101 . tel-01930354

HAL Id: tel-01930354

<https://theses.hal.science/tel-01930354>

Submitted on 21 Nov 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.

UNIVERSITE CLERMONT AUVERGNE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialités : Chimie organique Biologique et Physique de l'Atmosphère

Par

Nolwenn WIRGOT

Etude du métabolisme microbien dans les nuages : réponse au stress et impact sur la chimie atmosphérique

Directrice de thèse : Anne-Marie DELORT

Soutenue le 27 Avril 2017 devant la commission d'examen :

Rapporteurs :

Dr Gilles BERGAMETTI

Directeur de Recherche CNRS. Laboratoire Inter-Universitaire des Systèmes Atmosphériques, Université Paris Créteil.

Dr Françoise BRINGEL

Directeur de Recherche. CNRS. Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, Université de Strasbourg.

Examineurs :

Pr Davide VIONE

Professeur. Département de Chimie Analytique, Université de Turin.

Dr Karine SELLEGRI

Directeur de Recherche CNRS. Laboratoire de Météorologie Physique, Université Clermont-Auvergne.

Dr Estelle PUJOS-GUILLOT

Ingénieur de Recherche INRA. Unité de nutrition humaine, Centre INRA Clermont-Ferrand-Theix.

Invitées :

Dr Isabelle CANET

Maître de conférences. Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Clermont-Auvergne.

Dr Virginie VINATIER

Maître de conférences. Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Clermont-Auvergne.

Dr Anne-Marie DELORT

Directeur de Recherche. Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Clermont-Auvergne.

A mes grands parents Marcel et Jacqueline,

Remerciements

Si cette thèse a vu le jour et a été menée à bien, c'est grâce à beaucoup de personnes qui m'ont suivi, accompagné et fait évoluer pendant cette expérience, de près et même d'un peu plus loin. C'est pour cela qu'il n'y a pas une ligne plus importante qu'une autre dans les remerciements qui suivent, le tout est de n'avoir oublié personne !

J'aimerais exprimer toute ma gratitude à l'ensemble des membres du jury.

Je remercie Gilles Bergametti du Laboratoire Interuniversitaire des Systèmes Atmosphériques de l'Université Paris Créteil et Françoise Bringel du Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie de l'Université de Strasbourg pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie Karine Sellegri du Laboratoire de Météorologie Physique de l'Université Clermont-Auvergne, Estelle Pujos-Guillot de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Clermont-Ferrand-Theix et Davide Vione du Département de Chimie Analytique de l'Université de Turin pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse en tant qu'examineurs.

Je les remercie grandement pour le temps qu'ils m'ont consacré et les conseils avisés dont j'ai bénéficié lors de ma soutenance de thèse.

Je remercie de tout cœur mes encadrantes de thèse Anne-Marie Delort, Virginie Vinatier et Isabelle Canet. Tout d'abord pour la confiance qu'elles m'ont accordé tout au long de ma thèse ; elles m'ont chacune à leur manière fait avancer, progresser et mûrir. Je les remercie pour m'avoir fait part de leurs expériences enrichissantes et formatrices. Je n'oublie pas également leur précieuse aide pour la rédaction de ce manuscrit et pour la préparation de ma soutenance de thèse.

Anne-Marie, je tiens à te remercier pour ton aide et ton soutien au quotidien, pour le temps (et je n'ai pas compté le nombre d'heures !) que tu m'as accordé sans oublier les formations dont tu m'as fait profiter. Je tiens également à te remercier pour toutes les discussions (jusqu'à des fois très tard !) que l'on a pu avoir toutes les deux et même en nous éloignant du contexte labo ce qui m'a témoigné ta grande ouverture d'esprit.

Virginie, un grand merci pour ton aide précieuse, pour toutes les discussions que l'on a pu avoir, pour m'avoir fait profiter de tes expériences et pour m'avoir donné ta vision des choses. Je te remercie également pour m'avoir fait participer à cette aventure inoubliable que fut la formation de cuisine moléculaire !

Isabelle, un grand merci pour ton aide et les conseils que tu as pu me donner (je me rappellerais de la RMN 2D !). Merci pour ton sourire et ta bonne humeur au quotidien. Tu as

sû me faire rire et même pendant la douce période de rédaction avec tes commentaires dans les marges !

J'aimerais exprimer toute ma gratitude à Martine Sancelme pour avoir participé à ces travaux de thèse concernant le côté microbiologie, pour m'avoir épaulé dans des expérimentations très chargées. Je te remercie Martine également pour les discussions que l'on a pu avoir et qui ont eu pour effet de me remonter le moral !

J'aimerais remercier Laurent Deguillaume et Hélène Perroux pour leur expertise en modélisation et pour avoir partagé avec moi un projet commun. Je te remercie Laurent pour les discussions que l'on a pu avoir et même s'il y a eu des moments difficiles je ne retiens évidemment que les bons. Tu as su m'écouter et me conseiller, je te remercie d'avoir été là pour moi.

J'aimerais également remercier Marie Lagrée pour avoir fortement participé à l'approche métabolomique de cette thèse. Je te remercie pour les bons moments que l'on a partagé lors des congrès et formations et aussi hors du cadre du laboratoire.

Je te remercie de tout mon cœur mon Mounir pour ton aide dans les analyses RMN de la partie métabolomique mais surtout surtout (la répétition est voulue !) je te remercie d'être ce que tu es ! Ne plus te voir tous les jours cela va beaucoup beaucoup me manquer et je le sais car c'est déjà le cas ...

Je remercie énormément Muriel Joly tout d'abord pour la formation dont j'ai bénéficié en stage de Master II. Tu m'as beaucoup apporté avec générosité, gentillesse et patience. Tu m'a toujours accordé ta confiance ce qui m'a fait prendre confiance en moi et ce n'était pas une mince affaire. Tu as rendu facile mon intégration au sein du laboratoire et sans oublier au sein du Nota (on se rappellera d'une soirée en particulier) ! Merci beaucoup Muriel pour tout cela ainsi que pour les sorties que tu as organisé pour me faire décompresser (j'ai découvert et adoré les escapes game !)

Je remercie Pascal Renard et Boris Eyhraguibel pour toutes les discussions que l'on a pu avoir, pour leur soutien, leur gentillesse et leurs nombreux conseils. J'ai tenu le coup aussi grâce à vous et eu plaisir d'évoluer au sein du laboratoire à vos côtés ! J'espère que l'on ne s'oubliera pas de sitôt !

Je remercie l'ensemble des personnes du groupe Nuage : Anne-Marie, Marie, Mounir, Virginie, Isabelle, Magali, Martine, Cyril, et tout particulièrement Pierre avec qui j'ai pu discuter, merci pour ta franchise et ton honnêteté ; c'est ce qu'il faut pour avancer. Je n'oublie pas Audrey qui a partagé mon bureau et donc partagé joie et peine avec moi ! Merci d'avoir été là pour moi et je te souhaite le meilleur pour ta fin de thèse ! Merci également à Ludo que j'ai rencontré plus récemment, pour les discussions que l'on a eu et surtout pour tous les conseils que tu as pu me donner.

J'aimerais également remercier Jonathan Colombet pour son expertise en cytométrie en flux et sa gentillesse, Magali Abrantès pour son coup de main en microbiologie ainsi que Guillaume Voyard pour son aide précieuse en chromatographie ionique et Aurélie Job en HPLC.

Merci à tous les enseignants avec qui j'ai eu plaisir à échanger lors de mes deux années de monitorat.

Merci à l'équipe Nota et à ceux avec qui j'ai eu plaisir à partager de bons moments: Clémentine, Maxime, Angelina, Kévin, Alexis, Fred, Mickaël, Yaël, Federico, Magali, Shyam, Marion, Romain, Muriel, Pierre J., Angelica, Hélène, Audrey & Audrey, Arnaud, Ludo, Benjamin, Miao (j'ai sûrement oublié des gens ... je m'en excuse par avance).

Voici maintenant le tour de la famille. J'aimerais remercier en premier lieu ma mère (personne ne m'en voudra) pour toujours avoir été là pour moi, m'écouter, me conseiller, m'épauler quitte à parfois même s'oublier... Maman, ce travail est surtout le tien. J'aimerais remercier ma sœur et mon frère qui forment avec moi le trio de choc. On a toujours été là les uns pour les autres et je serais toujours là pour vous. Merci aussi à mon frangin et ma belle-sœur pour avoir fait de moi une tata comblée (plein de bisous à Iris, Jezaïa et Jade).

J'aimerais remercier mon père pour être là pour moi, pour son soutien, son sourire en toute circonstance, ses appels qui durent parfois des heures mais qui remontent le moral comme jamais !

Je remercie le reste de ma famille, Patrick, Sylvie, Sandra, Sébastien, Noémi et Martine car les moments passés avec vous-même si vous ne vous en rendez pas compte ont été le moment pour moi de décompresser, de profiter ... et ça fait beaucoup de bien !

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	7
1. La chimie atmosphérique : le système nuageux	9
1.1. Généralités	9
1.1.1. Historique	9
1.1.2. Les nuages et leur formation	10
1.2. La composition chimique du nuage	11
1.2.1. Les espèces organiques	13
1.2.2. Les espèces inorganiques	16
1.2.3. Les oxydants : acteurs principaux de la réactivité dans les nuages	17
1.2.3.1. Le peroxyde d'hydrogène	17
1.2.3.2. Le fer	22
2. Les communautés microbiennes au sein des nuages	24
2.1. Le cycle des microorganismes : de la vie dans les nuages	25
2.2. La composition microbienne de l'eau des nuages	27
2.2.1. Concentrations	27
2.2.2. Viabilité	28
2.2.3. Biodiversité	29
3. Impact des microorganismes sur la chimie des nuages	31
3.1. Interaction des microorganismes des nuages avec les composés organiques	31
3.1.1. Biotransformation des composés organiques	31
3.1.2. Comparaison de l'activité microbienne et de la chimie radicalaire	33
3.2. Interactions des microorganismes avec les oxydants des nuages	38
3.2.1. Le peroxyde d'hydrogène	38
3.2.2. Le fer	39

4. Impact du milieu nuage sur les microorganismes	40
4.1. Les différentes sources de stress dans les nuages	40
4.2. Le stress oxydant.....	42
4.2.1. Généralités	42
4.2.2. La chimie et les sources cellulaires des ROS	44
4.2.3. Protection contre le stress oxydant : les antioxydants.....	45
4.2.3.1. Les systèmes enzymatiques	47
4.2.3.2. Les systèmes non-enzymatiques.....	48
4.2.3.3. Les systèmes de réparation : conséquences du stress oxydant.....	48
5. Problématique de la thèse.....	50

Chapitre II : Production de sidérophores par des microorganismes des nuages 53

1. Introduction.....	55
1.1. Les sidérophores	55
1.2. Le fer dans l'eau de nuage	58
2. Matériel et méthodes	60
2.1. Isolement et identification des souches microbiennes isolées d'eau de nuage ...	60
2.2. Produits chimiques utilisés.....	60
2.3. Conditions de croissance des microorganismes pour le screening des sidérophores	61
2.3.1. Pré-culture en microplaque 96 puits	61
2.3.2. Repiquage des souches et production de sidérophores.....	61
2.4. Mesure de la production de sidérophores	61
3. Résultats	62
3.1. Introduction.....	62
3.2. "Siderophores in Cloud Waters and Potential Impact on Atmospheric Chemistry: Production by Microorganisms Isolated at the Puy de Dôme Station."	64
4. Conclusion	104

Chapitre III : Interactions entre les microorganismes et le peroxyde d'hydrogène dans les nuages 109

1. Introduction.....	111
2. Impact de H₂O₂ sur le métabolisme microbien dans les nuages.....	113
2.1. Matériel et méthodes	113
2.1.1. Souches bactériennes utilisées	113
2.1.2. Milieu nuage artificiel de composition marine.....	113
2.1.3. Expériences de biodégradation réalisées en microcosme.....	114
2.1.3.1. Dispositif expérimental.....	114
2.1.3.2. Préparation des solutions de H ₂ O ₂ et de complexe de fer	115
2.1.4. Analyses.....	115
2.1.4.1. Dosage du peroxyde d'hydrogène	115
2.1.4.2. Dosage de l'adénosine triphosphate (ATP).....	117
2.1.4.3. Détermination du nombre de cellules.....	117
2.1.4.3.1. La cytométrie en flux.....	117
2.1.4.3.2. Le dénombrement sur boîte.....	118
2.1.5. Détermination des vitesses initiales de dégradation du peroxyde d'hydrogène.....	119
2.1.6. Tests statistiques.....	119
3. Réponse au stress oxydant par une bactérie modèle des nuages : le cas de H₂O₂	120
3.1. La métabolomique	120
3.2. Matériel et méthodes	122
3.2.1. Souche utilisée	123
3.2.2. Espèces chimiques.....	123
3.2.3. Conditions d'incubation et extraction des métabolites.....	123
3.2.4. Biodégradation du peroxyde d'hydrogène et évolution de la quantité d'ATP.....	124
3.2.5. Analyses par LC-MS et LC-MS/MS.....	125

3.2.5.1. Préparation des échantillons.....	125
3.2.5.2. Analyses par LC-MS pour le profilage des métabolites	125
3.2.5.3. Analyses par UPLC-MS/MS pour l'identification structurale des métabolites	125
3.2.6. Analyses par RMN 1D et 2D.....	126
3.2.6.1. Préparation des échantillons.....	126
3.2.6.2. Analyses par RMN 1D pour le profilage des métabolites	126
3.2.6.3. Analyses par RMN 1D et 2D pour l'identification structurale des métabolites-	126
3.2.7. Analyse des données	127
3.2.7.1. Traitement des données	127
4. Résultats	128
4.1. Introduction.....	128
4.2. « H ₂ O ₂ modulates the energetic metabolism of the cloud microbiome »	130
4.3. « Modulation and resilience of the metabolome of <i>Pseudomonas graminis</i> , a cloud bacterium, facing H ₂ O ₂ atmospheric stress »	171
5. Conclusion.....	229

Chapitre IV : Vers l'intégration de données biologiques dans un modèle de chimie atmosphérique : Détermination de constantes cinétiques de biodégradation du formiate, formaldéhyde, acétate et peroxyde d'hydrogène.....233

1. Introduction.....	235
1.1. Présentation du modèle de chimie du nuage du LaMP	236
1.2. Comment introduire des réactions biologiques dans le modèle de chimie du nuage ?	238
1.3. Objectifs	240
2. Matériels et méthodes	241
2.1. Substrats et souches bactériennes utilisés	241
2.2. Milieu nuage artificiel de composition marine.....	242

2.3. Expériences de biodégradation	243
2.4. Analyses des échantillons	243
2.4.1. Acides carboxyliques	243
2.4.2. Formaldéhyde.....	244
2.4.3. Peroxyde d'hydrogène.....	245
2.5. Calcul de constantes cinétiques.....	245
3. Résultats et discussion.....	248
3.1. Biodégradation des substrats	248
3.1.1. Les composés carbonés	248
3.1.2. Le peroxyde d'hydrogène.....	250
3.2. Détermination des vitesses de biodégradation	250
3.3. Détermination de constantes cinétiques	252
4. Conclusion	254
Conclusion générale et perspectives	255
1. Conclusion	257
2. Perspectives.....	259
Références bibliographiques	263
Table des illustrations	283
Annexe.....	291

Introduction

Les nuages représentent la forme la plus abondante de l'eau condensée dans la troposphère. Il a été observé à partir de photographies satellitaires qu'ils couvrent plus de 50% de la planète et se trouvent pour la quasi-totalité dans la troposphère, constituant environ 7% de son volume (Pruppacher & Jaenicke, 1995 ; Ravishankara, 1997).

Les nuages sont d'une grande importance dans les processus météorologiques et climatiques. En effet, ils ont un impact important sur le bilan radiatif de la Terre ainsi que sur les mécanismes climatiques. Ils réfléchissent le rayonnement solaire, en ayant pour effet de provoquer un refroidissement à l'échelle globale, et font écran simultanément aux rayons infrarouges renvoyés par la Terre, contribuant ainsi à l'effet de serre. La compréhension de la chimie des nuages est un enjeu majeur en raison du fait que la description des processus chimiques et physiques est à la base de modèles numériques ayant pour objectif d'alimenter des modèles globaux de la prévision du climat. Ces prévisions comportent de nombreuses incertitudes, dont la plus grande est liée aux nuages et principalement dans la prédiction du climat et de la compréhension des flux énergétiques (Matus & L'Ecuyer, 2017). Cette dernière représente un véritable challenge en raison de la chimie extrêmement complexe des nuages, due à leur caractère multiphasique impliquant trois phases (gaz, solide, liquide) en perpétuelle évolution et échangeant les unes avec les autres. De plus, les nuages sont décrits comme des milieux dynamiques contrôlés par des processus microphysiques – tels que les précipitations ou les phénomènes de pluie et de neige – qui dirigent leur formation, leur durée de vie et leur dissipation, ce qui a pour conséquence la redistribution des espèces chimiques entre les différents compartiments.

L'étude de la phase aqueuse de l'atmosphère et plus précisément des gouttelettes de nuage, représente un grand intérêt de par son aptitude à capter et dissoudre un grand nombre de composés gazeux et particulaires. Ceci fait de ce milieu un des milieux les plus concentrés et réactifs de l'atmosphère au sein duquel les composés présents peuvent subir de nombreuses transformations, principalement par voie photochimique (radicalaire), qui peuvent mener à la formation d'aérosols secondaires. De plus, la phase aqueuse du nuage a la propriété d'être oxydante (Deguillaume et al., 2014) en raison de la présence de nombreuses espèces radicalaires ($\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$) et de composés tels que le peroxyde d'hydrogène et le fer.

Au fil des années, la présence avérée de microorganismes métaboliquement actifs (Amato et al., 2007a) dans l'atmosphère a soulevé de nombreuses questions notamment sur la santé avec le risque de transmissions de pathogènes ou plus récemment sur leur rôle dans les processus atmosphériques (Delort et al., 2010 ; Vaithilingom et al., 2013). En effet, les microorganismes pourraient modifier la composition des nuages en utilisant comme substrat les composés carbonés, qui représentent une fraction importante des composés

présents dans les nuages. De plus, les microorganismes sont suspectés de jouer un rôle dans la capacité oxydante des nuages, en impactant des composés clés de la réactivité chimique tels que le fer, le peroxyde d'hydrogène ou les radicaux hydroxyles.

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet ANR BIOCAP débuté en janvier 2014 ayant pour intitulé « Impacts biologiques et photochimiques sur la capacité oxydante des nuages ». L'objectif principal de ce projet est l'évaluation de la contribution relative des processus photochimiques et microbiologiques dans la capacité oxydante des nuages. Dans ce contexte, il m'a été proposé de m'intéresser à l'interaction des microorganismes avec deux espèces oxydantes de la phase aqueuse des nuages, le fer et le peroxyde d'hydrogène. Je me suis focalisée sur les mécanismes biologiques conduisant à la dégradation du peroxyde d'hydrogène et à la complexation du fer, et de manière réciproque, à l'impact de ces espèces oxydantes sur le microbiome des nuages. Il m'a été également proposé de quantifier de manière précise les vitesses de biodégradation de quatre composés importants dans les nuages afin de les intégrer dans un modèle de chimie atmosphérique et d'évaluer l'activité microbienne dans des conditions de nuage plus réalistes.

Ce mémoire est décliné en deux parties principales.

La première partie est consacrée à une étude bibliographique qui s'articule autour de quatre points essentiels. Tout d'abord nous avons fait un point sur la chimie atmosphérique et le système nuageux, allant de la formation du nuage à sa réactivité. Le deuxième point présente un état de l'art sur les communautés microbiennes qu'abritent les nuages. Nous nous sommes ensuite focalisés sur l'avancée des recherches concernant l'impact des microorganismes sur la chimie des nuages. Enfin la quatrième partie est consacrée, de manière réciproque, aux effets que peut induire le milieu nuageux, complexe par définition, sur ces communautés microbiennes.

La deuxième partie de ce manuscrit présente l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de la thèse sous la forme de trois chapitres.

Le premier chapitre s'intéresse au cycle du fer et à sa complexation dans les nuages, de nature encore très incertaine à ce jour. Dans l'idée d'apporter des premiers éléments de réponse quant à cette complexation, un large screening réalisé sur des microorganismes des nuages a été effectué afin d'évaluer leur capacité à produire des sidérophores (molécules d'origine biologique chélatantes du fer(III)).

Dans le deuxième chapitre, nous nous sommes intéressées aux interactions entre les microorganismes des nuages et le peroxyde d'hydrogène. Dans une première approche, nous avons étudié les paramètres et mécanismes responsables de la transformation biotique et abiotique du peroxyde d'hydrogène dans les eaux de nuage, ainsi que les effets de H₂O₂

sur le métabolisme énergétique des microorganismes. Dans un deuxième temps nous avons cherché à approfondir nos connaissances sur les modifications du métabolisme microbien face à des conditions très oxydantes rencontrées dans les eaux de nuage. Pour cela la réponse d'une souche modèle, isolée d'eau de nuage, exposée ou non à H_2O_2 , a été étudiée à travers une approche métabolomique.

Le troisième et dernier chapitre a pour finalité l'intégration de données biologiques dans des modèles de chimie atmosphérique simulant la réactivité chimique régnant au sein de l'atmosphère, permettant d'effectuer une comparaison des contributions relatives des voies biologiques et photochimiques dans des conditions atmosphériques réalistes. Dans ce contexte, la biodégradation de l'acétate, du formiate, du formaldéhyde et du peroxyde d'hydrogène, composés majeurs des nuages, a été quantifiée.

Les résultats des deux premiers chapitres seront présentés sous la forme de trois publications acceptées ou soumises prochainement. De ce fait, pour aider à leur compréhension et faciliter la lecture, chaque publication sera accompagnée i) d'une brève introduction reprenant le contexte et les objectifs de l'étude ii) de précisions au niveau des protocoles expérimentaux, iii) des principales conclusions.

Une conclusion générale viendra clore ce manuscrit et des perspectives à ces travaux de recherche seront proposées.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

1. La chimie atmosphérique : le système nuageux

1.1. Généralités

1.1.1. Historique

Dans les années 1950, le domaine de la chimie atmosphérique a connu un essor important en raison de l'augmentation de la pollution liée à la révolution industrielle. Les efforts de la communauté scientifique sur ce sujet se sont principalement concentrés sur l'étude des espèces gazeuses pour lesquelles on dispose désormais de modèles opérationnels adéquats. En revanche, les processus atmosphériques en phase aqueuse homogène et/ou hétérogène ont été essentiellement étudiés pour faire face à des situations de crise comme le problème des pluies acides ou encore du trou de la couche d'ozone atmosphérique. Pourtant, de par leur capacité à capter et dissoudre de nombreux composés gazeux et particulaires, les gouttelettes de nuage constituent l'un des milieux les plus concentrés et les plus réactifs de l'atmosphère. De ce fait, les nuages jouent un rôle majeur dans les processus météorologiques et climatiques et leurs interactions avec les constituants de l'atmosphère constituent un enjeu important pour la compréhension de l'impact de l'Homme sur le climat.

Pendant longtemps, l'étude du milieu nuageux et de son rôle sur la chimie atmosphérique a été négligée en raison de la complexité de ce milieu multiphasique et de la difficulté à l'analyser ; quelques études s'étaient toutefois attachées à comprendre et expliquer la composition chimique de prélèvements d'eau de pluie. Les premières données relatant la composition chimique de l'eau nuageuse ont été obtenues par [Grabosky \(1951\)](#) et [Schmeter \(1952\)](#). Déjà à cette époque, le rôle de la pollution atmosphérique sur la composition de l'eau nuageuse a été mis en évidence, malgré des difficultés dans la méthode de prélèvements d'eau de nuage encore peu aboutie ([Petrenchuk & Drozdova, 1966](#)). Ces recherches ont été approfondies au fil des années avec la modernisation des techniques de prélèvements et d'analyse. Des travaux de recherche ont montré la présence de composés organiques en quantité significative tels que les acides carboxyliques ou les aldéhydes. En effet, de nombreux composés organiques sont émis dans l'atmosphère depuis la surface par différentes sources d'origine anthropique ou naturelle. La diversité et la quantité de ces composés organiques ont augmenté dans l'atmosphère en raison des modifications de nos modes de vie (utilisation de ces composés comme carburants, solvants organiques, pesticides, etc.). Ceci se traduit par une augmentation de la pollution atmosphérique et dans ce cadre, les nuages sont des milieux permettant de transformer ces composés.

En effet, les composés organiques en phase aqueuse, en fonction de leur solubilité, peuvent être transférés dans les gouttelettes de nuage et sont alors soumis à de

nombreuses transformations chimiques. Ces transformations ont jusqu'à maintenant été considérées comme le résultat de processus radicalaires, *i.e.* émanant de la réactivité photochimique. Cependant plus récemment, la découverte de microorganismes métaboliquement actifs dans les nuages a soulevé la question de leur activité dans la transformation des molécules organiques comme alternative aux voies photochimiques (Ariya & Amyot, 2004 ; Delort et al., 2010).

1.1.2. Les nuages et leur formation

La première couche atmosphérique dans laquelle nous évoluons est la troposphère, de 0 à 15 km. C'est la couche la plus dense contenant jusqu'à 75% de la masse atmosphérique. Elle est constituée de composés chimiques à l'état de traces et d'eau qui présente la particularité d'exister sous ses trois états (gaz, liquide, solide). La vapeur d'eau présente une concentration très variable dans le temps et dans l'espace et se trouve pour sa quasi totalité dans la troposphère, ce qui explique la prépondérance des nuages dans cette première couche de l'atmosphère. En effet, les nuages sont la forme la plus abondante de l'eau condensée dans la troposphère (Ravishankara, 1997) et représentent 7% de son volume total (Pruppacher & Jaenicke, 1995). De manière plus globale, il est estimé que les nuages couvrent environ 50% de la surface terrestre.

La troposphère est un milieu complexe dans lequel coexistent des espèces gazeuses, des particules solides d'aérosol et des gouttelettes liquides. Les interactions pouvant avoir lieu entre ces différentes phases sont regroupées sous le terme de "chimie multiphasique".

La formation d'un nuage nécessite de saturer en vapeur d'eau une masse d'air humide. Ce processus microphysique, connu sous le nom de condensation, relève du mécanisme d'activation des particules d'aérosols (suspension de particules solides ou liquides dans l'air atmosphérique) en gouttelettes de nuage. En effet, aux conditions atmosphériques, la formation de gouttelettes nécessite la présence d'un support solide, les particules d'aérosols, qui en fonction de leur taille et de leur caractère hydrophile, servent de noyaux de condensation plus ou moins efficaces (Pruppacher & Jaenicke, 1995). De ce fait, la vapeur d'eau peut se condenser à des sursaturations moindres en vapeur d'eau.

Deux types d'aérosols sont distingués : les particules d'aérosols dites *primaires*, c'est-à-dire émises directement dans la troposphère par des sources variées allant des activités anthropiques (combustion des carburants, etc.) aux causes naturelles (feux de biomasse, embruns, cendres ou aérosolisation de particules d'origine biologique) et les particules *secondaires* qui sont, elles, formées dans l'atmosphère à partir de composés gazeux qui se convertissent en particules sous l'effet de leur réactivité chimique et des modifications des conditions thermodynamiques de l'atmosphère (Raes et al., 2000). Durant leur temps de séjour dans l'atmosphère, leur taille et leur composition sont modifiées. Par exemple, des

espèces gazeuses moins volatiles peuvent condenser sur des particules existantes ou des réactions chimiques au sein de la particule peuvent modifier sa composition chimique. Enfin, lorsque les particules d'aérosols sont activées pour former des gouttelettes d'eau nuageuse, leurs propriétés physico-chimiques sont largement modifiées lors de leur passage dans le nuage.

Les aérosols et les nuages ont une influence importante sur le bilan radiatif illustrant l'inventaire de l'énergie reçue et perdue par le système climatique de la Terre comprenant les compartiments sols-atmosphère-océans, et ainsi sur les mécanismes climatiques. En réfléchissant le rayonnement solaire, les nuages réduisent la quantité d'énergie traversant l'atmosphère terrestre, provoquant un refroidissement à l'échelle globale (albédo). Mais simultanément, en faisant écran aux rayonnements infrarouges renvoyés par la terre, ils contribuent également à l'effet de serre. Le réchauffement climatique est devenu l'un des problèmes environnementaux planétaires les plus visibles des deux dernières décennies (GIEC, 2001, 2007) et ses répercussions comptent parmi les plus importantes. L'augmentation de la température à la surface de la Terre joue un rôle dans la formation des nuages car un climat plus chaud provoque des modifications dans la formation des couches nuageuses, ce qui va affecter un certain nombre de leurs propriétés (processus de condensation, pouvoir réfléchissant, durée de vie) et par conséquent l'intensité des précipitations.

Ainsi, le nuage est un milieu d'une extrême complexité, siège de réactions multiphasiques et de processus microphysiques, jouant un rôle important dans le devenir d'un grand nombre d'espèces chimiques atmosphériques (Ravishankara, 1997). D'importantes avancées ont été faites dans le domaine de la chimie atmosphérique (Herrmann et al., 2015), mais les nuages continuent de représenter une source significative d'incertitude dans la compréhension des flux énergétiques et de la prédiction du climat (Matus & L'Ecuyer, 2017).

1.2. La composition chimique du nuage

La composition de la phase aqueuse du nuage est extrêmement complexe en raison du nombre et de la grande diversité des espèces chimiques présentes, organiques ou inorganiques (Deguillaume et al., 2014). La variabilité ainsi que la concentration de ces espèces dépendent étroitement de la provenance de la masse d'air impliquée dans la formation du nuage.

Deguillaume et al. (2014) ont montré que, parmi un ensemble d'échantillons d'eau nuageuse collectés au sommet du puy de Dôme (1465 m, France), quatre classes pouvaient être définies en fonction de leur composition chimique : hautement marine, marine, continentale et polluée. Chacune de ces classes est caractérisée par une teneur en

composés chimiques spécifique : par exemple, de très fortes concentrations en ions sodium Na^+ et chlorure Cl^- pour la catégorie hautement marine ou la présence de NO_3^- , NH_4^+ , SO_4^{2-} et d'un pH acide pour le nuage de composition dite polluée. La **Figure 1** illustre l'analyse statistique effectuée, analyse en composantes principales (ACP), qui a pu mettre en évidence des discriminations significatives entre ces différentes masses d'air et a permis de définir ces quatre classes.

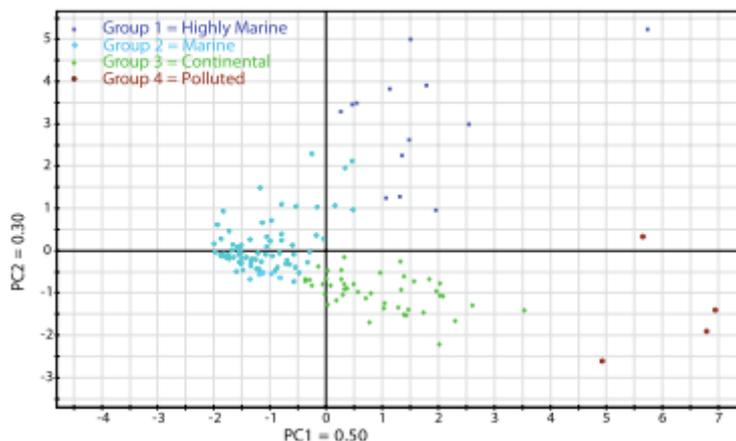


Figure 1: Analyse en composantes principales réalisée à partir des paramètres mesurés dans les échantillons d'eau nuageuse (pH, $[\text{Na}^+]$, $[\text{Cl}^-]$, $[\text{SO}_4^{2-}]$, $[\text{NO}_3^-]$, $[\text{NH}_4^+]$) pour 56 événements nuageux distincts (Deguillaume et al., 2014).

De plus, dans l'objectif de mettre en évidence l'influence des masses d'air sur la composition chimique de l'eau nuageuse, les rétro-trajectoires des masses d'air impliquées dans la formation des nuages dont la phase aqueuse a été collectée, ont été déterminées à l'aide d'une interface disponible à l'adresse suivante : <http://www.arl.noaa.gov/ready.html> (**Figure 2**).

Ainsi, quatre secteurs prédominants ont été mis en évidence : Ouest, Nord-Ouest/Nord, Nord-Est et Sud/Sud-Ouest. A chacun de ces secteurs définis, sont associées des compositions chimiques des prélèvements effectués différentes. En guise d'exemple, les nuages de type pollué ont très majoritairement pour origine le secteur Nord-Est, probablement en raison des émissions des pays de l'Europe de l'Est (activités anthropiques). Les nuages de composition dite hautement marine viennent eux uniquement des secteurs Ouest et Nord-Ouest/Nord, qui sont des zones de forte influence océanique.

Il a été conclu que durant ces dix dernières années, 13% des masses d'air atteignant le sommet du puy de Dôme étaient sous influence hautement marine, 52% sous influence marine, 26% sous influence continentale et 9% sous influence anthropique.

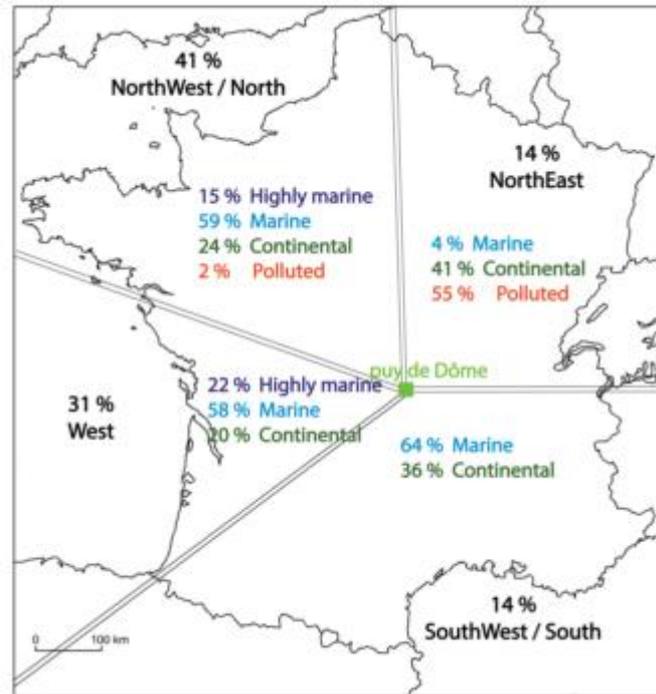


Figure 2: Secteurs définis par l'analyse des rétro-trajectoires des masses d'air impliquées dans la formation des nuages collectés au sommet du puy de Dôme. Le pourcentage donné en noir représente la proportion des événements nuageux pour chaque secteur. Les pourcentages en couleur représentent la proportion des événements nuageux pour chaque secteur selon leur classe (Deguillaume et al., 2014).

Cette composition chimique est la résultante de différents phénomènes tels que l'absorption d'espèces gazeuses au sein de l'eau des nuages, la dissolution partielle ou totale des constituants du noyau de condensation lors de l'activation de la particule en gouttelette de nuage ou le fait qu'un grand nombre de réactions chimiques se déroulent. Il est primordial d'étudier en détail ces variations en termes de composition chimique car elles permettent de remonter aux différents processus se déroulant dans les nuages. En effet, les nuages sont les acteurs d'importants processus atmosphériques tels que la formation et la transformation d'espèces chimiques (Herrmann et al., 2015), la production et la consommation d'espèces oxydantes, notamment le peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres (Marinoni et al., 2011) et l'activation de particules en gouttelette de nuage.

1.2.1. Les espèces organiques

L'étude des composés organiques représente un fort intérêt scientifique car ils sont avant tout une source de pollution atmosphérique importante et représentent de ce fait un risque sanitaire. Ils ont également la propriété de pouvoir modifier la capacité oxydante de l'atmosphère, en raison de leur réactivité chimique et photochimique ; en effet, ces composés peuvent réagir avec des composés radicalaires comme par exemple le radical

$\cdot\text{OH}$ qui est l'agent oxydant principal au sein de l'atmosphère. Les sources primaires de ces composés organiques retrouvés largement en phase gazeuse troposphérique sont le résultat de l'activité naturelle (émissions de composés biogéniques par les plantes, combustion de biomasse, etc.) et de l'activité humaine (rejets industriels, combustion de carbone fossile, utilisation de pesticides, etc.). Ces composés sont alors transformés dans l'atmosphère où ils sont principalement oxydés. Dans le nuage, ces transformations sont le résultat de la présence de radicaux comme $\cdot\text{OH}$, $\text{NO}_3\cdot$, $\text{HO}_2\cdot$ (Kroll & Seinfeld, 2008). Ces oxydations en phase aqueuse aboutissent souvent à la production d'espèces chimiques avec de faibles pressions de vapeur et peuvent être alors considérées comme une source potentielle d'aérosols organiques secondaires (AOS) lorsque le nuage évapore (Blando & Turpin, 2000 ; Ervens et al., 2004 ; Lim et al., 2005 ; Carlton et al., 2006).

La matière organique dans les nuages rassemble une grande variété de molécules qui incluent des acides carboxyliques, des aldéhydes ou des alcools. Parmi les composés carbonés majeurs de la phase aqueuse des nuages, les acides carboxyliques sont très représentés avec des concentrations allant du nM à plusieurs dizaines de μM (Hegg et al., 2002; Löflund et al., 2002; Marinoni et al., 2004; Van Pinxteren et al., 2005; Charbouillot et al., 2011; Deguillaume et al., 2014). Les acides carboxyliques peuvent être formés par réactivité dans la phase aqueuse (Tilgner & Herrmann, 2010; Charbouillot et al., 2011) (Figure 3). Les plus étudiés sont les acides formique et acétique. Il a été déterminé à partir d'études effectuées sur le terrain que ces deux acides sont les plus abondants au sein de la phase aqueuse du nuage (Tableau 1). Ils proviennent de sources très variées et notamment de la dissolution de la phase gazeuse dans la phase aqueuse des nuages.

Tableau 1: Concentrations minimales - maximales de l'acide formique et acétique mesurées dans de l'eau nuageuse (μM).

Site d'échantillonnage	Concentrations (μM)		Références
	Acide formique	Acide acétique	
Mer, Sud de San Fransisco, USA	1-6	0-11	(Hegg et al., 2002)
Mont Rax, Autriche	1-34	5-38	(Löflund et al., 2002)
Puy de Dôme, France	1-70	1-48	(Marinoni et al., 2004)
Schmücke, Allemagne	5-39	2-41	(Van Pinxteren et al., 2005)
Puy de Dôme, France	2-53	2-47	(Charbouillot et al., 2011)
Puy de Dôme, France	0-53	0-58	(Deguillaume et al., 2014)

En phase aqueuse, l'acide formique peut provenir de l'oxydation du méthanol par l'action de radicaux et principalement du radical $\cdot\text{OH}$ en présence de lumière et l'acide acétique peut

être produit par l'oxydation de l'éthanol et d'autres alcools (Khwaja, 1995 ; Chebbi & Carlier, 1996 ; Khare et al., 1999 ; Löflund et al., 2002 ; Marinoni et al., 2004 ; Charbouillot et al., 2011).

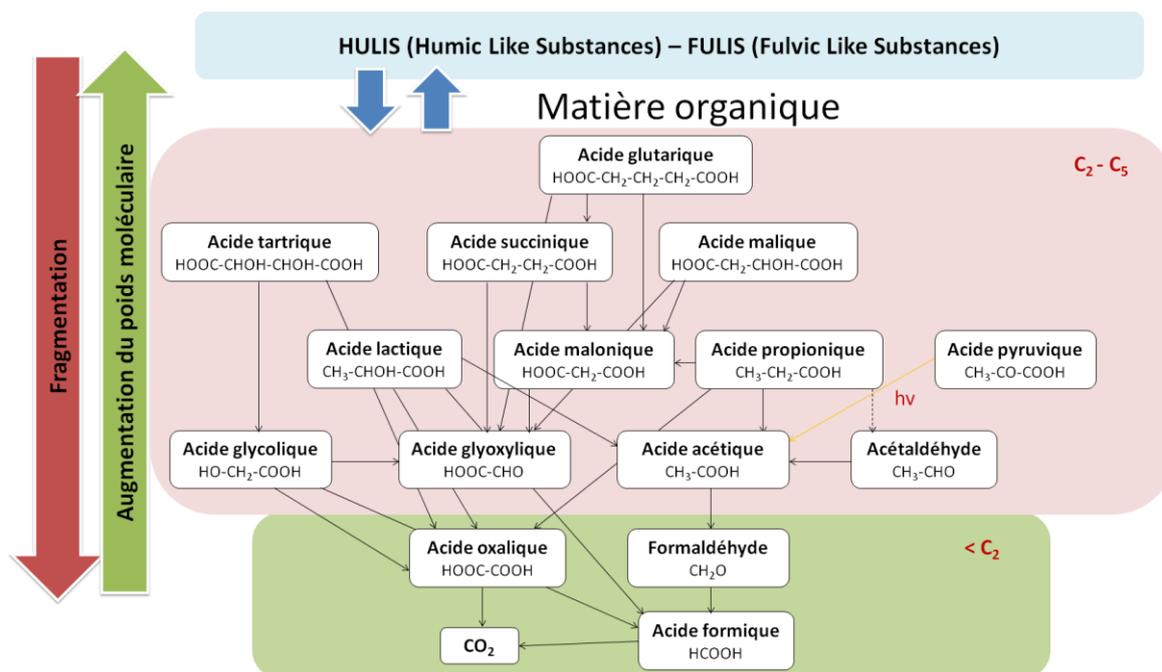


Figure 3: Représentation schématique des possibles voies de fragmentation (en acides carboxyliques puis minéralisation en CO_2) et d'augmentation de la taille (jusqu'à la formation de substances type humiques, HULIS et FULIS) de la matière organique présente dans le nuage suite aux réactions avec les radicaux hydroxyles (d'après Delort et al., 2016).

Ces acides carboxyliques proviennent également de leur solubilisation depuis la phase gaz (Keene & Galloway, 1986 ; Chebbi & Carlier, 1996 ; Sellegri et al., 2003). La contribution des acides carboxyliques au carbone organique dissous est estimée à 11% en moyenne dans l'eau nuageuse collectée au puy de Dôme (Marinoni et al., 2004). Le transfert de la phase gaz à la phase aqueuse du nuage est régi par de fortes constantes de Henry, de $5,4 \cdot 10^3$ et $5,3 \cdot 10^3 \text{ M} \cdot \text{atm}^{-1}$ pour l'acide formique et acétique respectivement, et représente ainsi une source importante de ces composés.

Le formaldéhyde est également un composé carboné retrouvé en relativement grande quantité dans l'eau nuageuse. Il est le composé carbonyle mesuré le plus abondant dans le nuage (Tableau 2). Le formaldéhyde fait partie des polluants primaires. Il est directement émis en phase gazeuse dans l'atmosphère par le biais de nombreuses activités industrielles et est connu pour son effet néfaste sur la santé humaine (Sawerysyn, 2008). Il peut aussi être le produit de la réactivité chimique en phase gazeuse à travers l'oxydation de nombreux composés organiques. Il peut être alors solubilisé en raison de sa forte constante de Henry, de $10^3 \text{ M} \cdot \text{atm}^{-1}$. Enfin, il peut être également produit en phase aqueuse par réaction

chimique, notamment par l'oxydation de composés tels que le méthanol (**Figure 3**). En phase aqueuse, ce composé s'hydrate et réagit avec d'autres espèces chimiques présentes. L'oxydation des aldéhydes peut produire des acides carboxyliques, par exemple le formaldéhyde dissous peut s'oxyder pour former de l'acide formique (Kieber et al., 1999) et peut mener également à la formation d'oligomères (Ervens et al., 2013 ; Ervens, 2015).

Tableau 2: Concentrations minimales - maximales du formaldéhyde mesurées dans de l'eau nuageuse (μM).

Site d'échantillonnage	Concentrations (μM)	Références
Formaldéhyde		
Henninger flat, rural, USA	0-36	(Grosjean & Wright, 1983)
Henninger flat, continental, USA	46-62	(Igawa et al., 1989)
Los Angeles, urbain, USA	6-43	(Richards, 1995)
Schmücke, Allemagne	0-5	(Van Pinxteren et al., 2005)
Puy de Dôme, France	0-14	(Deguillaume et al., 2014)

En définitive, le devenir de ces composés organiques volatils (COV) dissous en phase aqueuse, se caractérisant par une chimie multiphasique complexe, reste encore mal connu et fait l'objet de travaux expérimentaux et de modélisation afin d'éclaircir leur processus de transformation dans le nuage.

Une large fraction des composés organiques dissous dans les nuages reste à ce jour non caractérisée ou non quantifiée. Parmi cette matière organique complexe, des HULIS (Humic Like Substances) ont été identifiées (Feng & Möller, 2004) ainsi que des protéines, de la cellulose, des polyols, des acides aminés, des acides gras, des sucres, des polysaccharides, des hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques, etc. (Leclair et al., 2012 ; Ekström et al., 2010). Des acides aminés sont également retrouvés dans les nuages et représentent environ 9% du carbone organique dissous (Bianco et al., 2016a; 2016b).

1.2.2. Les espèces inorganiques

L'eau de nuage est également composée d'espèces inorganiques avec pour anions majoritaires les ions nitrate (NO_3^-), sulfate/sulfite ($\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}$) et chlorure (Cl^-) et pour cations les ions sodium (Na^+), ammonium (NH_4^+), magnésium (Mg^{2+}), potassium (K^+) et calcium (Ca^{2+}). Ces espèces inorganiques sont responsables du caractère acide de la phase aqueuse des nuages ainsi que de sa capacité oxydante. Leur concentration connaît une grande variabilité due principalement à l'origine de la masse d'air. En effet, les ions NO_3^- , NH_4^+ et SO_4^{2-} sont les marqueurs d'une forte activité humaine. Dans ces régions de ce fait polluées, l'oxydation du dioxyde de soufre et d'azote est une source importante d'acides forts

tels que les acides sulfurique (H_2SO_4) et nitrique (HNO_3) jouant un grand rôle dans l'acidité de l'eau de nuage. Des masses d'air d'origine marine sont composés majoritairement des ions Na^+ et Cl^- constituants des sels marins, et la présence d'ions K^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} , caractérise plutôt des particules d'aérosols issues du sol pour les masses d'air provenant d'une origine plutôt continentale ([Charbouillot et al., 2011](#) ; [Deguillaume et al., 2014](#)).

1.2.3. Les oxydants : acteurs principaux de la réactivité dans les nuages

Les nuages sont des milieux réactionnels caractérisés par un potentiel oxydant de 200 mV. Cette capacité oxydante est expliquée par la présence en nombre d'espèces oxydantes dont les deux principales sources sont le peroxyde d'hydrogène et les métaux.

En effet, les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), nitrate ($\text{NO}_3\cdot$), peroxyde ($\text{RO}_2\cdot$), hydroperoxyde ($\text{HO}_2\cdot$) ou superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$) présents dans l'atmosphère peuvent être produits ou photo-produits par des ions de métaux de transition tels que le fer, le manganèse ou le cuivre, et également par des molécules de la famille des hydroperoxydes (H_xO_y), notamment le peroxyde d'hydrogène possédant un fort caractère oxydant. Ces radicaux jouent un rôle central dans les processus chimiques qui transforment les gaz à l'état de traces et les polluants dans l'atmosphère ([Monks, 2005](#)). Les réactions chimiques dans les nuages sont conduites ainsi majoritairement par des processus d'oxydation.

Nous avons vu précédemment l'intérêt d'étudier la composition chimique des nuages, nous soulignerons plus loin qu'il est également important d'étudier la réactivité des espèces chimiques pour comprendre et quantifier leurs mécanismes de dégradation.

1.2.3.1. Le peroxyde d'hydrogène

Ce paragraphe a été construit principalement à partir des travaux de [Vione et al. \(2003\)](#).

Les hydroperoxydes, de formule générale H_xO_y , et notamment le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), sont considérés comme des oxydants importants de l'atmosphère car ils interviennent dans un très grand nombre de processus. Les principales voies de production et de destruction des H_xO_y en phase gazeuse et aqueuse dans l'atmosphère, sont illustrées dans la **Figure 4**.

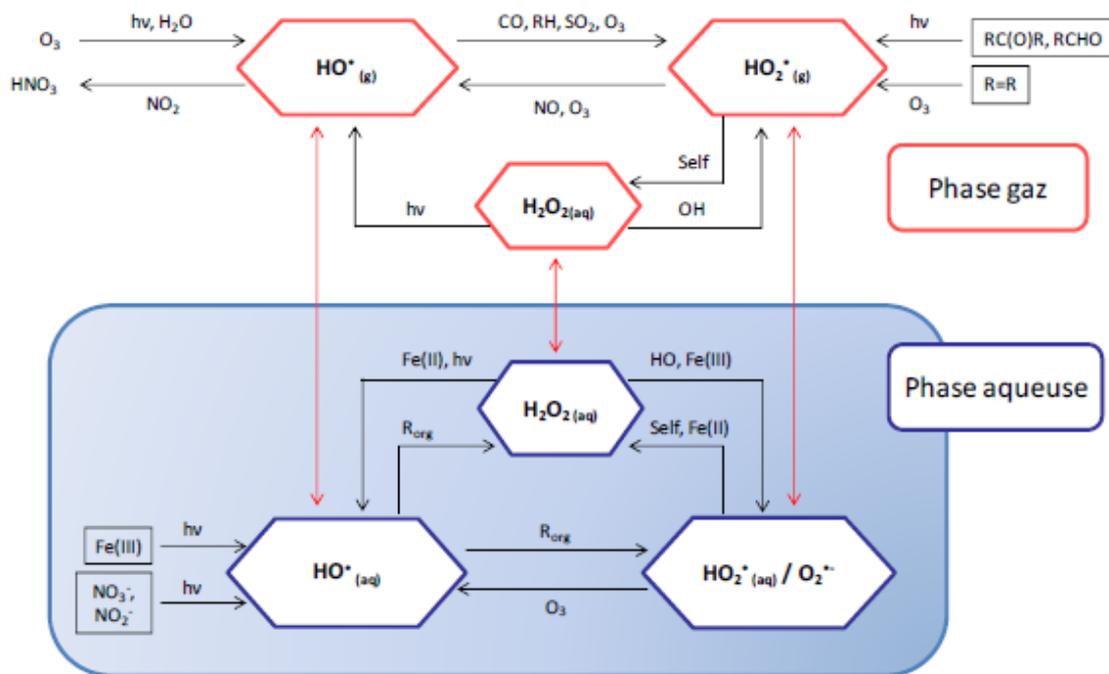


Figure 4: Principales voies de production/destruction des H_xO_y en phase gazeuse et aqueuse (Deguillaume et al., 2010).

Le peroxyde d'hydrogène, découvert dans l'atmosphère et identifié comme un produit de la photochimie dans l'air dans les années 1980, est un composé clé de l'atmosphère en raison de sa réactivité avec les radicaux libres, la matière organique, ou même le fer. Il est présent à la fois en phase gaz et en phase aqueuse et peut jouer le rôle d'oxydant comme de réducteur. Sa concentration, de l'ordre du μM dans les nuages (**Tableau 3**), donne une bonne indication de la capacité oxydante de l'atmosphère, meilleure que l'ozone (Vione et al., 2003). En effet, en tant que réservoir de radicaux ($\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$, $\text{RO}_2\cdot$) (Gunz & Hoffmann, 1990), la concentration en H_2O_2 reflète le niveau des oxydants présents dans l'atmosphère.

Tableau 3: Concentrations minimales - maximales du peroxyde d'hydrogène mesurées dans de l'eau nuageuse (μM).

Site d'échantillonnage	Concentrations (μM)		Références
	H_2O_2		
Terres de l'est, USA	0-72		(Kelly et al., 1985)
Whitetop Mountain, USA	0-247		(Olszyna et al., 1988)
Côte Atlantique, USA	0-112		(Barth et al., 1989)
Mt Mitchell, USA	0-219		(Claiborn & Aneja, 1991)
Mt Mitchell, USA	8-103		(Rao & Collett, 1995)
La Jolla Peak, USA	13-72		(Rao & Collett, 1995)
Los Angeles, USA	1-167		(Richards, 1995)
Schmücke Mountain, Allemagne	0-14		(Valverde-Canossa et al., 2005)
Puy de Dôme, France	0-19		(Marinoni et al., 2011)
Puy de Dôme, France	0-58		(Deguillaume et al., 2014)

En phase gaz, le peroxyde d'hydrogène est l'un des produits finaux de la chimie atmosphérique des oxydants. Sa source principale est la dismutation du radical hydroperoxyde selon la réaction suivante :



La formation du radical hydroperoxyde est initiée par des processus photochimiques principalement par la réaction entre les radicaux hydroxyles et les hydrocarbures et par la photolyse du formaldéhyde (HCHO). Ainsi, la concentration atmosphérique de H_2O_2 est directement reliée à la photochimie atmosphérique.

Il existe d'autres sources d'émission de peroxyde d'hydrogène dans l'atmosphère telles que les feux de biomasse qui conduisent directement à la formation de HCHO et du radical HO_2^* dont la dismutation forme, comme il l'a été vu précédemment, du peroxyde d'hydrogène.

Il est important de noter que l'émission de peroxyde d'hydrogène par des sources de combustion est directe, ne nécessitant pas la contribution de la lumière solaire, et peut jouer un rôle significatif sur la concentration de H_2O_2 dans les zones urbaines.

En phase aqueuse, la source significative du peroxyde d'hydrogène est sa dissolution à partir de la phase gazeuse. Cette dissolution représente le puits principal du peroxyde d'hydrogène gazeux et les précipitations, par conséquent, jouent un rôle très important dans le processus d'élimination du H_2O_2 atmosphérique. De nombreuses autres sources de peroxyde d'hydrogène en phase aqueuse existent telles que la photolyse de l'ozone (O_3)

aqueux, la photonucléation de la vapeur d'eau, la dismutation du radical hydroperoxyde aqueux (HO_2^\bullet) ou encore la réduction de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) par des composés organiques (**Figure 5**).

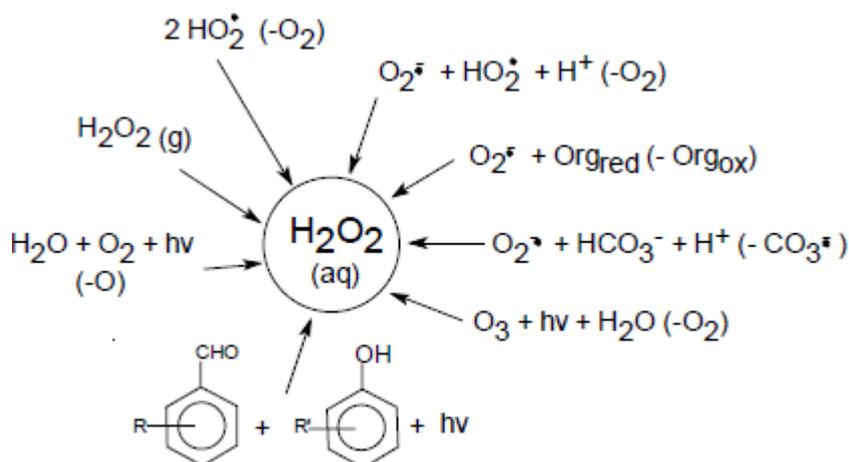
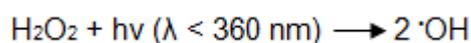


Figure 5: Les différentes sources de peroxyde d'hydrogène en phase aqueuse (Vione et al., 2003).

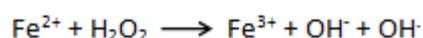
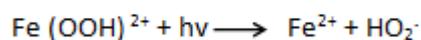
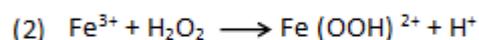
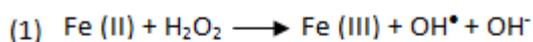
Le peroxyde d'hydrogène tient une place centrale dans la chimie atmosphérique. En effet, il intervient dans un grand nombre de réactions redox se déroulant au sein de la troposphère. Dans les nuages et les eaux de pluie, H_2O_2 est considéré comme l'oxydant le plus important impliqué dans la réaction d'oxydation du soufre (IV) en soufre (VI) (H_2SO_4) à $\text{pH} < 5,5$, participant ainsi activement à l'acidification des nuages et des précipitations (Anastasio et al., 1994 ; Vione et al., 2003). Pour les cas plus rares où le pH est supérieur à 5,5, l'ozone est l'acteur principal de ce phénomène.

La photolyse de H_2O_2 participe également fortement à la réactivité de la chimie atmosphérique. Elle peut avoir lieu aussi bien en phase gaz qu'en phase aqueuse :



Le rendement quantique de cette réaction est de 1 en phase gaz et est réduit de moitié pour la phase aqueuse. De ce fait, H_2O_2 produit de manière efficace des radicaux hydroxyles, qui sont des espèces extrêmement oxydantes et acteurs de la réactivité de la chimie atmosphérique.

Le peroxyde d'hydrogène peut également être impliqué dans deux réactions très importantes qui sont les réactions de Fenton (1) et photo-Fenton (2) :



Le réactif de Fenton ($\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2$) peut oxyder les espèces organiques et inorganiques dans les gouttes d'eau atmosphériques.

Des études en laboratoire ainsi que de modélisation ont montré que la concentration en H_2O_2 dans l'atmosphère est impactée par une grande variété de paramètres météorologiques tels que l'activité photolytique, la température et l'humidité relative (Gunz & Hoffmann, 1990 ; Sakugawa et al., 1990 ; Tremmel et al., 1993, 1994 ; Watkins et al., 1995a, 1995b ; Jackson & Hewitt, 1996). Un des paramètres les plus importants contribuant à l'évolution de H_2O_2 est la présence de la lumière. En effet, la concentration de H_2O_2 dans la phase gaz connaît de fortes variations journalières et saisonnières. Elle augmente considérablement pendant la journée et en période estivale où l'activité photochimique est à son maximum (Yamashita et al., 1994 ; Watanabe et al., 1999, 2001 ; Ortiz et al., 2000 ; Sakugawa et al., 1993). Au contraire, durant la nuit et l'hiver, la concentration diminue fortement en raison de la combinaison d'une activité photochimique moindre et de la dissolution de H_2O_2 gazeux en phase aqueuse. Ce phénomène est davantage marqué en présence d'une haute humidité relative.

De plus, il a été observé qu'en présence d'une forte concentration en oxydes d'azote (NO_x) une diminution de la concentration en H_2O_2 est observée. En effet, les NO_x inhibent la formation de H_2O_2 en phase gaz. Les oxydes nitreux représentent un puits pour les radicaux hydroxyles et hydroperoxydes pour finalement former de l'acide nitrique et nitreux (HNO_3 , HNO_2). Ce phénomène est alors en compétition avec la formation de H_2O_2 . De même, la présence de dioxyde de soufre (SO_2) provoque une forte consommation de H_2O_2 et ce, tout particulièrement en hiver lorsque les émissions de SO_2 sont plus élevées.

Pour finir, le peroxyde d'hydrogène est présent à des concentrations suffisantes dans l'atmosphère pour engendrer des dommages sur l'environnement (Vione et al., 2003). En effet, il peut avoir des effets très toxiques sur les plantes (Tanaka et al., 1982, 1985 ; MacRae & Ferguson, 1985) et a causé de forts dommages allant jusqu'au déclin de forêts en Amérique du Nord et en Europe Centrale (Masuch et al., 1986 ; Hewitt et al., 1990 ; Hewitt & Kok, 1991 ; Simonaitis et al., 1991). Il a également été montré à travers une étude sur les aiguilles de pin que la réaction de photo-Fenton peut avoir des effets néfastes sur elles, allant jusqu'à impacter leur activité photosynthétique (Kume et al., 2001).

De plus, le peroxyde d'hydrogène, comme il l'a été abordé précédemment, dégrade de manière significative la qualité de l'air, à travers notamment des épisodes de pluie acide. En guise d'exemple, le peroxyde d'hydrogène a été considéré comme l'espèce responsable de périodes d'irritation (au niveau de la peau et des yeux) qui se sont déroulés dans les étés 1973-1975 aux alentours de Tokyo (Okita & Ohta, 1979).

Pour toutes ces raisons, l'évolution du peroxyde d'hydrogène doit faire l'objet de la plus grande attention car un changement au niveau de ses concentrations aura un effet direct sur la chimie atmosphérique. Les scientifiques prédisent que sa concentration dans le futur va connaître très probablement une augmentation car les activités anthropiques s'intensifient font augmenter la concentration des oxydants dans l'atmosphère (Vione et al., 2003).

1.2.3.2. Le fer

Les métaux de transition et notamment le fer sont émis dans l'atmosphère sous la forme de particules d'aérosols et se retrouvent dans les gouttelettes de nuages après dissolution de la fraction soluble de ces particules (Hoffmann et al., 1997 ; Desboeufs et al., 2005 ; Valavanidis et al., 2006). Cette solubilité est dépendante de l'acidité du milieu et de la nature de l'aérosol (Deguillaume et al., 2005 ; Desboeufs et al., 2005 ; Mahowald et al., 2009). En d'autres termes, la fraction soluble est dépendante de l'origine de la masse d'air impliquée dans la formation du nuage. En effet, il a été observé que pour des masses d'air d'origine anthropique ou marine, la fraction soluble est plus importante ; ce phénomène peut être expliqué par le fait que les solubilités de ces composés augmentent quand le pH vient à diminuer.

Les ions des métaux de transition ont la propriété d'être très réactifs en solution et sont connus pour être impliqués dans la production d'espèces réactives oxygénées (reactive oxygen species, ROS). Cette réactivité dépend du pH, de leur état d'oxydation et de leur concentration (Deguillaume et al., 2014). Parmi ces métaux de transition, le fer est considéré comme le plus abondant et le plus réactif dans les eaux atmosphériques ; on peut le trouver principalement sous deux états d'oxydation, Fe(II) et Fe(III). Son origine au sein de la goutte du nuage est essentiellement due à la dissolution du fer présent dans les particules solides. Des concentrations en Fe(II) et Fe(III) mesurées dans de l'eau nuageuse à différents sites de prélèvements sont données en guise d'exemple dans le **Tableau 4**.

Tableau 4: Concentrations minimales - maximales du Fe(II) et Fe(III) mesurées dans de l'eau nuageuse. LD^a pour Limite de Détection.

Site d'échantillonnage	Concentrations (µM)		Références
	Fe(II)	Fe(III)	
San Pedro Hill, USA	1,5-4,9	0,6-1,4	(Pehkonen et al., 1992)
San Pedro Hill, USA	0,3-18,7	0,0-4,2	(Erel et al., 1993)
Kleiner Feldberg, Allemagne	0,1-0,9	0,1-0,7	(Deutsch et al., 2001)
Puy de Dôme, France	0,1-6,8	0,0-5,1	(Parazols et al., 2006)
Puy de Dôme, France	1,1-6,8	LD ^a -4,9	(Deguillaume et al., 2014)

Au sein des particules atmosphériques, le fer peut être sous forme d'oxydes ou d'hydroxydes de fer (état d'oxydation +III). Les oxydes de fer trouvés dans les aérosols sont le plus souvent l'hématite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) et la goethite ($\text{FeO}(\text{OH})$). La fraction en fer dans des aérosols urbains se trouve entre 6 et 8% alors que dans les régions rurales, cette fraction est réduite de moitié (Deguillaume et al., 2005).

Le fer joue un rôle direct et indirect sur la chimie des composés organiques. Il peut, en effet, influencer le taux de radicaux libres car il réagit de manière efficace avec un grand nombre d'agents oxydants et réducteurs de la phase aqueuse atmosphérique tels que HO_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou $\cdot\text{OH}$. Sa réactivité est étroitement liée à sa concentration en phase aqueuse et elle est extrêmement dépendante de sa spéciation - c'est-à-dire du rapport entre la teneur en Fe(II) et Fe(III) - liée principalement à l'activité photochimique (Ervens et al., 2003 ; Deguillaume et al., 2004). En effet, ces deux états d'oxydation ont une réactivité et une photoréactivité très différentes. Par exemple, une concentration plus forte en Fe(II), issu essentiellement de la photoréduction de complexes de Fe(III), est observée de jour lorsque l'activité photochimique est la plus importante alors que la concentration en Fe(III) n'est pas affectée par la lumière solaire. De plus, au sein des particules minérales, la dissolution du Fe(II) est plus rapide que celle du Fe(III). De ce fait, la photoréduction du Fe(III) en Fe(II) serait un mécanisme augmentant la solubilité du fer. Ce processus est aussi connu pour générer des radicaux (OH^{\cdot} , HO_2^{\cdot} , etc.). Quant au Fe(II), il peut être oxydé en Fe(III) par l'action du peroxyde d'hydrogène ou d'autres peroxydes organiques comme il l'a été vu dans la section précédente (paragraphe 1.2.3.1., page 17).

De plus, dans les gouttelettes de nuage, le Fe(II) est majoritairement présent sous forme cationique libre (Fe^{2+}) tandis que le Fe(III) peut former différents complexes. Les ligands impliqués dans ces réactions de complexation peuvent être de différents types : inorganiques (sulfate, nitrate, chlorure, etc.) ou organiques (oxalate, formate, acétate, etc.). Ces réactions de complexation sont dépendantes de la concentration en ligands ainsi que de

la valeur de la constante de complexation associée qui traduit l'affinité entre le Fe(III) et les ligands impliqués.

La complexation du fer par d'autres molécules dans les nuages fera l'objet d'une partie dédiée de cette thèse.

2. Les communautés microbiennes au sein des nuages

-Historique-

La détection de microorganismes dans l'atmosphère remonte au XVII^{ème} siècle avec Antonie van Leeuwenhoek (Gregory, 1971). Il suppose leur existence en émettant l'hypothèse qu'il existe des organismes vivants dans l'atmosphère de trop petites tailles pour être aperçus à l'œil nu mais visualisables en microscopie. Au XIX^{ème} siècle, Louis Pasteur a pu mettre en évidence la présence de ces organismes par échantillonnage et observation de prélèvements d'air (Pasteur, 1861) grâce auxquels il a également observé une variabilité du nombre de ces organismes dans l'atmosphère sous différentes conditions telles que les précipitations, le vent et le cycle jour/nuit. La pertinence et l'intérêt d'étudier la variabilité saisonnière et spatiale de ces organismes ont ainsi été montrés. Fred C. Meier a observé au début du XX^{ème} siècle la présence de microorganismes viables à haute altitude (Meier & Lindbergh, 1935).

Au fil des années, la présence avérée de microorganismes dans l'atmosphère a soulevé de nombreuses questions, tout d'abord dans le domaine de la santé avec le risque de transmissions de pathogènes, et plus récemment sur leur rôle dans les processus atmosphériques, notamment leur participation à la formation des nuages. En effet, les microorganismes ont, entre autres, la capacité de jouer le rôle de noyau de condensation (CCN pour Cloud Condensation Nuclei) et de nucléation de la glace (IN pour Ice Nuclei) pouvant ainsi induire la formation de nuage. Plusieurs revues ont fait le point sur la connaissance actuelle du rôle des aérosols organiques incluant les bioaérosols comme noyaux de condensation et leur rôle potentiel dans les processus microphysiques au sein du nuage (Sun & Ariya, 2006 ; Möhler et al., 2007 ; Morris et al., 2008 ; Delort et al., 2010; DeMott & Prenni, 2010 ; Hoose & Möhler, 2012; Hill et al., 2017).

Il existe plusieurs types de bioaérosols rencontrés dans l'atmosphère. On peut retrouver des fragments de végétaux, d'insectes ou des pollens (avec un rayon aux alentours ou supérieur à 5 μm) et également des microorganismes, et plus précisément des algues et champignons /levures ($r > 0,5 \mu\text{m}$), des bactéries ($r > 0,2 \mu\text{m}$) et des virus (caractérisés par un rayon allant de 0,005 à 0,25 μm) (Figure 6). Ces bioaérosols représentent dans l'atmosphère 10 à 40% de la totalité des aérosols retrouvés (Morris et al., 2011).

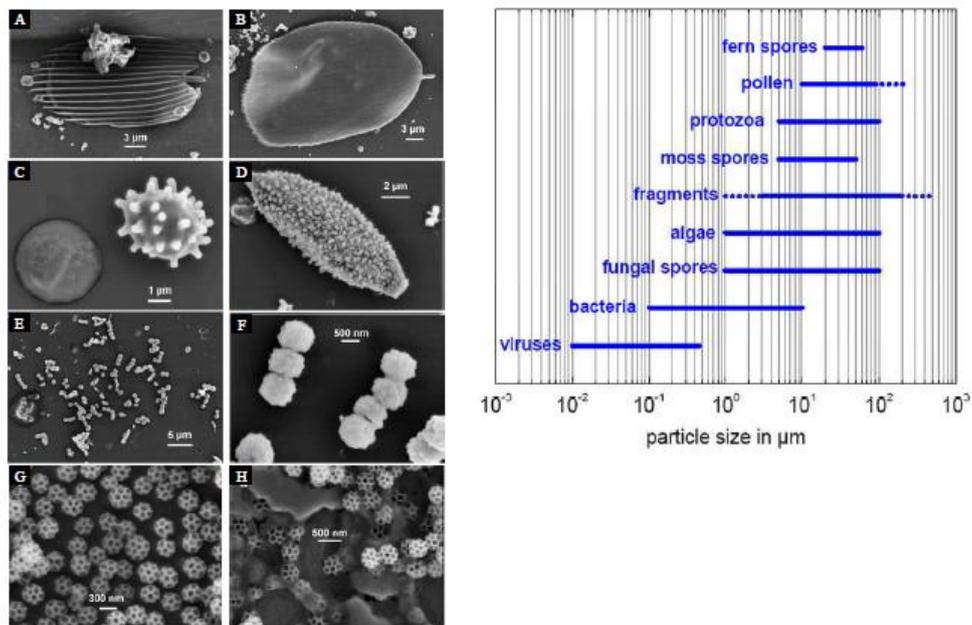


Figure 6: A gauche : Images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) de différents types de bioaérosols. A et B : Ecailles d’insectes ; C et D : Spores de champignons filamenteux ; E et F : Bactéries ; G et H : Brochosome ; A droite : Distribution en taille des bioaérosols (μm) (Wittmaack et al., 2005).

2.1. Le cycle des microorganismes : de la vie dans les nuages

Les sols, les eaux de surface et les plantes sont connus pour être trois grandes réserves de biomasse microbienne. La notion de microorganismes dans les nuages est, elle, récente et originale. En effet, comme nous le verrons par la suite, le nuage est un environnement très instable comparé à ces milieux plus traditionnels. De ce fait, les microorganismes ne sont plus du tout dans les mêmes conditions que dans leurs écosystèmes traditionnels et se trouvent confrontés à des conditions extrêmes.

Les microorganismes vont pouvoir coloniser l’atmosphère grâce à un phénomène appelé aérosolisation. S’il dépend d’un certain nombre de paramètres météorologiques tels que la température, la lumière solaire, la vitesse du vent ou l’humidité, ce phénomène va dépendre également des caractéristiques aérodynamiques et physiologiques des cellules microbiennes telles que la production de spores, de bio-films ou leur pigmentation (50% des microorganismes isolés dans l’eau nuageuse collectée au puy de Dôme sont pigmentés) (Figure 7).

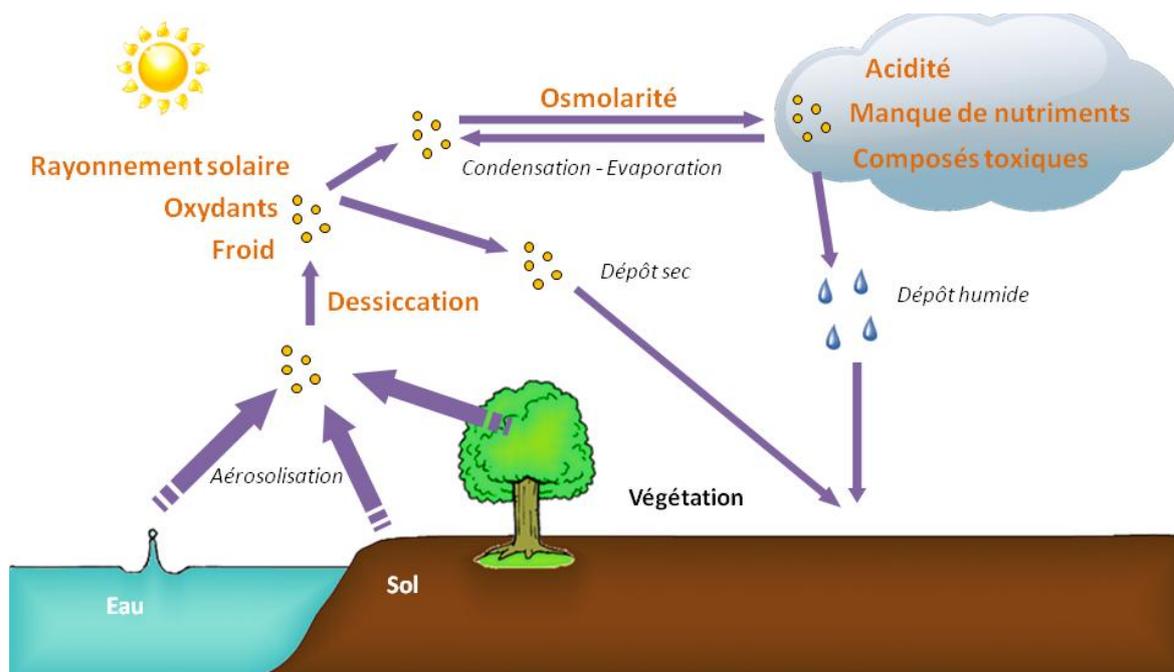


Figure 7: Schématisation du cycle des microorganismes dans l'atmosphère. Les facteurs représentant des sources de stress sont indiqués en orange (d'après la thèse de Muriel Joly).

Il a été estimé que 10^{24} cellules bactériennes subissent chaque année ce phénomène d'aérosolisation (Burrows et al., 2009). Parmi les diverses sources possibles de microorganismes, les océans qui recouvrent 70% de la surface du globe représentent l'une des sources majeures. L'aérosolisation des eaux de surface se produit par effet de bullage (« bubble bursting »). En effet, lorsque les bulles d'eau formées par l'action des vagues ou les gouttes de pluie, vont éclater à la surface de l'eau, les aérosols (dont les cellules microbiennes) vont être expulsés et dispersés dans l'air où ils peuvent séjourner pendant de longues périodes et parcourir de longues distances. Il a été montré que la concentration en microorganismes dans les microgouttes expulsées est supérieure à celle dans la bulle d'eau de départ, on parle de phénomène d'enrichissement (Blanchard, 1989 ; Marks et al., 2001 ; Mayol et al., 2014).

Le temps de résidence des cellules dans l'atmosphère va être régi par un certain nombre de facteurs qui sont la température de l'air, l'humidité, les courants de masse d'air ainsi que la taille des cellules (Williams et al., 2002; Burrows et al., 2009). Le temps de résidence a été estimé par modélisation entre 2 et 15 jours (Burrows et al., 2009). Comme déjà vu précédemment, les cellules microbiennes peuvent alors intégrer les nuages par des phénomènes de condensation (CCN) et vont retourner au sol par l'action notamment des précipitations (en jouant aussi parfois le rôle de noyaux de nucléation).

2.2. La composition microbienne de l'eau des nuages

2.2.1. Concentrations

Sattler et al. (2001) et Bauer et al. (2002) ont été les premiers à décrire les microorganismes dans les gouttelettes de nuage. Des travaux ont succédé à ces premières descriptions en apportant plus de précisions sur cette population microbienne (Amato et al., 2005, 2007c,d ; Bauer et al., 2003 ; Vaïtilingom et al., 2012 ; Kourtev et al., 2011).

La concentration en microorganismes dans l'eau de nuage a été estimée par microscopie ou par cytométrie en flux ; elle se situe entre 10^3 et 10^5 cellules.mL⁻¹ pour les bactéries et entre 10^2 et 10^4 cellules.mL⁻¹ pour les champignons et les levures, qui sont comptabilisés ensemble car il est peu aisé de les différencier. Le **Tableau 5** récapitule ces concentrations.

Tableau 5: Concentrations minimales - maximales des microorganismes (Bactéries et Champignons/Levures) mesurées dans de l'eau nuageuse (ND pour Non Déterminé).

Site d'échantillonnage	Concentrations (cellules.mL ⁻¹)		Références
	Bactéries	Champignons et Levures	
Mont Sonnblick, Autriche	$7,9.10^2$ - $2,5.10^3$	N.D	(Sattler et al., 2001)
Mont Rax, Autriche	$4,9.10^3$ - $8,1.10^4$	$5,9.10^3$	(Bauer et al., 2002, 2003)
Puy de Dôme, France	$3,3.10^3$ - $2,5.10^5$	$8,9.10^2$ - $3,2.10^4$	(Amato et al., 2007c,d ; Vaïtilingom et al., 2012)
Prélèvement par avion, Michigan, USA	$9,2.10^4$ - $4,3.10^5$	N.D	(Kourtev et al., 2011)

Il est important de noter que parmi ces microorganismes, une très faible proportion d'entre eux est cultivable. En effet, 1% à 2,2% des bactéries et 3% à 8% des levures sont cultivables en laboratoire sur un milieu R2A, destiné à la croissance des microorganismes dans l'eau potable (Bauer, 2003; Vaïtilingom et al., 2012). Ce ratio est similaire au pourcentage rencontré dans d'autres environnements tels que l'eau de mer ou de lac (Amann et al., 1995 ; Bernard et al., 2000).

Une variabilité spatiale (horizontale et verticale) et temporelle du contenu microbien, gouvernée par la saison et le moment de la journée, a été observée dans l'atmosphère sèche. Concernant la variabilité spatiale, il a été observé que de plus grandes concentrations en microorganismes se trouvent à proximité des zones urbaines en comparaison des zones côtières et que leur nombre diminue généralement avec l'altitude. Il a également été montré que la concentration en microorganismes connaît une variabilité temporelle avec de plus fortes concentrations en été/automne et durant la journée (Lindemann & Upper, 1985 ; Lighthart, 1997 ; Shaffer & Lighthart, 1997 ; Fahlgren et al, 2010 ; Bowers et al., 2012).

Dans l'eau des nuages, une tendance saisonnière de la concentration en microorganismes a été mise en évidence par [Amato et al. \(2007d\)](#). Les auteurs ont observé une concentration totale en bactéries plus faible en été et plus importante en hiver. À l'inverse, le nombre de bactéries cultivables atteignait son maximum en été. Par la suite, [Vaïtilingom et al. \(2012\)](#) ont également étudié la variabilité saisonnière de la concentration en microorganismes dans les nuages mais bien que l'étude ait été conduite sur un plus grand nombre de données, aucune variabilité saisonnière significative n'a pu être montrée. Les nuages issus de masses d'air en provenance des zones continentales ont généralement une concentration en microorganismes supérieure à celles originaires des régions océaniques. Enfin, ces travaux effectués sur le long terme n'ont mis en évidence aucune corrélation significative entre les concentrations microbiennes et les caractéristiques physico-chimiques des nuages (pH, composition ionique, etc.).

2.2.2. Viabilité

Afin d'avoir une idée de la proportion de cellules viables et de cellules mortes au sein d'un échantillon, différentes méthodes peuvent être utilisées. La méthode qui a été une des plus utilisées, en raison de sa simplicité de mise en œuvre, consiste à réaliser l'étalement d'un échantillon sur un milieu nutritif et de comptabiliser le nombre de colonies microbiennes qui poussent sur ce milieu. Malgré le côté pratique et peu coûteux de cette méthode, un certain nombre d'inconvénients a poussé les utilisateurs à se former à d'autres méthodes. En effet, le problème majeur de cette méthode est que le milieu nutritif sélectionné pour la croissance des microorganismes entraîne une sélection des souches, les conditions de croissance de certaines souches pouvant ne pas être compatibles avec le milieu. Enfin, cette méthode permet de recenser uniquement les cellules cultivables mais pas d'observer les cellules viables et non cultivables. Ainsi, cette méthode peut être utile pour avoir une idée de la viabilité au sein d'un échantillon mais pas de manière précise.

En plus de la détermination de la viabilité cellulaire l'activité métabolique des microorganismes des nuages a été démontrée par plusieurs approches. [Sattler et al. \(2001\)](#) ont été les premiers à montrer, par marquage au tritium, que les microorganismes pouvaient intégrer des molécules dans des gouttelettes de nuage en surfusion. [Amato et al. \(2007a\)](#) ont montré que les microorganismes présents dans de l'eau de nuage incubée en laboratoire pouvaient se développer en utilisant des substrats carbonés et azotés du milieu nuage. Cette activité métabolique a été largement confirmée en mesurant le contenu en ATP (Adénosine-5'-triphosphate) *in situ* dans de l'eau de nuage ([Amato et al., 2005, 2007d](#) ; [Vaïtilingom et al., 2012](#)), l'ATP étant considérée comme molécule référence de l'état énergétique des cellules. En utilisant une autre approche basée sur l'intégrité des membranes cellulaires, [Hill et al. \(2007\)](#) ont démontré que 76% des bactéries étaient vivantes dans des eaux nuageuses.

2.2.3. Biodiversité

Des travaux basés sur des techniques culturales ont mis en évidence des genres microbiens majoritaires dans des eaux atmosphériques. Fuzzi et al. (1997) ont été les premiers à mettre en évidence la présence de souches cultivables de *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Acinetobacter* dans des eaux de brouillard. En 2007, Ahern et al. ont isolé un grand nombre de *Pseudomonas* dans les nuages. Les travaux de Vaïtilingom et al. (2012) relatent une très large description des microorganismes isolés d'eau nuageuse (puy de Dôme, France). Les résultats ont montré que les genres bactériens majoritaires (**Figure 8**) sont les *Pseudomonas*, *Shingomonas*, *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Bacillus* et *Frigobacterium*. Concernant les levures, les genres majoritaires rencontrés sont les *Dioszegia*, *Udeniomyces* et *Cryptococcus* (**Figure 9**).

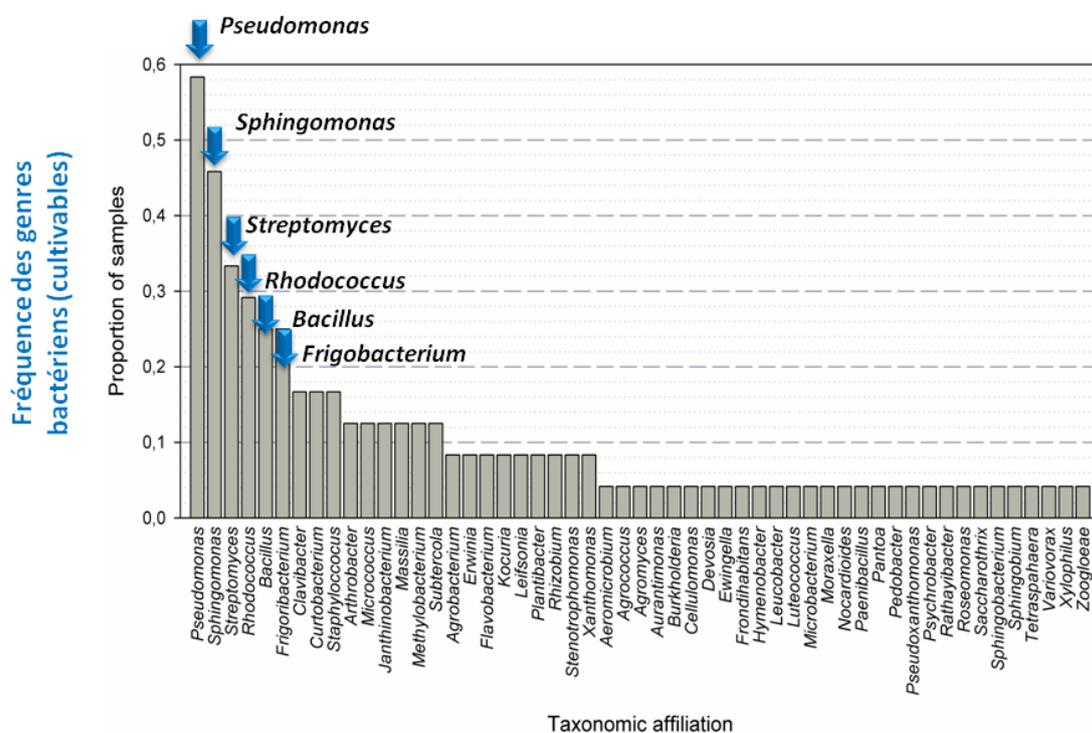


Figure 8: Fréquences des genres bactériens majoritaires cultivables déterminées à partir de 24 prélèvements nuageux indépendants collectés au sommet du puy de Dôme (2003-2010), adapté à partir de Vaïtilingom et al., (2012).

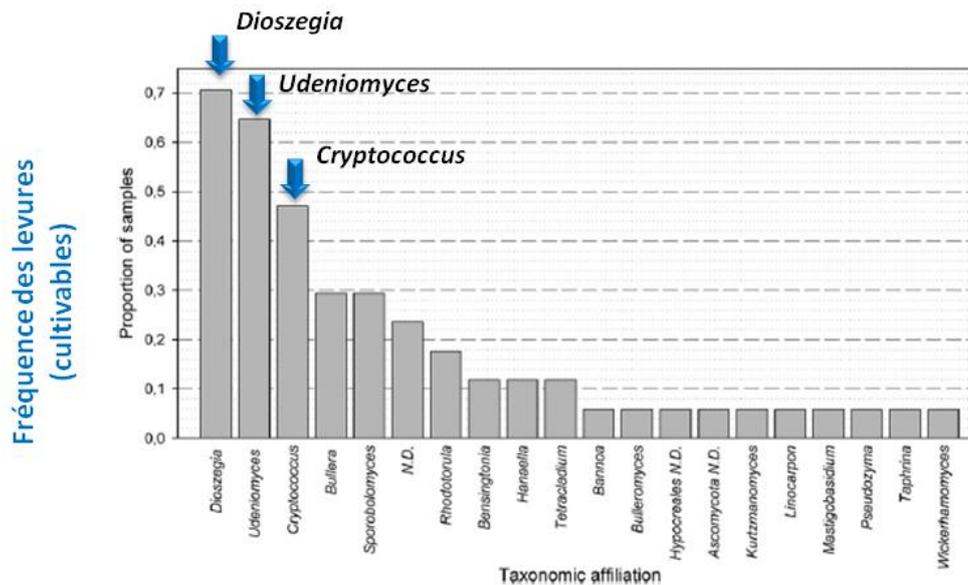


Figure 9: Fréquences des levures majoritaires cultivables déterminées à partir de 17 prélèvements nuageux indépendants collectés au sommet du puy de Dôme (2007-2010), adapté à partir de Vaïtilingom et al., (2012).

La détermination de la biodiversité des microorganismes dans les nuages n'est pas chose facile. En effet, la plupart des études s'étant intéressées à la biodiversité dans les nuages ont été effectuées à partir de techniques culturales. Comme nous l'avons vu précédemment, le problème majeur dans ce cas est que seuls les microorganismes cultivables sont comptabilisés (<1% pour les bactéries et aux alentours de 10% pour les champignons/levures). Une grande incertitude demeure ici car la grande majorité du contenu réel microbien reste inconnu. Dans ce cadre, des techniques de biologie moléculaire plus exhaustives (*i.e.* basées sur l'analyse de l'ADN) apparaissent aujourd'hui comme une alternative pour contourner les limitations des techniques culturales. Cependant, ces méthodes ont jusqu'à maintenant été très peu appliquées au milieu nuage, notamment à cause des faibles concentrations cellulaires présentes et, par conséquent, des grandes quantités de volume d'échantillon nécessaires pour les analyses. Des premières analyses (Kourtev et al., 2011 ; DeLeon-Rodriguez et al., 2013 ; Šantl-Temkiv et al., 2013 ; Xu et al., 2017) confirment que les phyla majoritairement représentés (Protéobactéries, Actinobactéries et Firmicutes) sont comparables avec les travaux de Vaïtilingom et al. (2012). Les auteurs rapportent aussi la présence d'autres microorganismes d'intérêt tels que des Cyanobactéries, et des classes bactériennes comme les *Methylobacteriaceae* et *Oxalobacteraceae*.

Ainsi, bien que relativement peu d'études se soient intéressées à identifier et quantifier les microorganismes dans les nuages, il a été montré que les nuages abritent une microflore diversifiée. Les premiers résultats issus de travaux basés sur des analyses génétiques plus

poussées font apparaître des similitudes avec les techniques culturales. Il est essentiel de poursuivre les recherches dans ce sens en multipliant les expériences et en utilisant des outils de biologie moléculaire.

De plus, il a été montré qu'une très large majorité des cellules microbiennes reste métaboliquement active dans les nuages. Ceci implique que malgré les conditions atmosphériques drastiques (**Figure 7**), ces microorganismes peuvent vivre, ou au moins survivre, dans ce milieu. Cette activité métabolique soulève la question du rôle de ces microorganismes dans la chimie des nuages. Nous tenterons de répondre à cette interrogation dans le paragraphe suivant.

3. Impact des microorganismes sur la chimie des nuages

Pendant de nombreuses années, la chimie des nuages était basée sur l'étude des réactions chimiques et photochimiques qui pouvaient s'y produire. La découverte de microorganismes métaboliquement actifs dans les nuages a ouvert de nouvelles perspectives puisqu'ils peuvent être alors considérés comme des biocatalyseurs capables de transformer des composés atmosphériques et être acteurs de la chimie des nuages. Aujourd'hui, il est question de comprendre si la dégradation microbienne de ces composés peut rentrer en compétition avec la chimie radicalaire dans l'eau de nuage.

Cette partie s'intéressera donc à l'évolution des différentes expériences qui ont été entreprises afin de donner des éléments de réponse à cette question scientifique.

3.1. Interaction des microorganismes des nuages avec les composés organiques

3.1.1. Biotransformation des composés organiques

Les microorganismes ont la capacité d'utiliser les acides carboxyliques (mono ou dicarboxyliques) ainsi que d'autres composés en C1 tels que le méthane, le méthanol et le formaldéhyde comme substrats *via* leur métabolisme central. Ces composés peuvent être utilisés pour maintenir leur niveau énergétique à travers la production d'adénosine triphosphate (ATP) et synthétiser des molécules plus complexes telles que des protéines ou des acides nucléiques.

-Métabolisme des acides carboxyliques-

Les microorganismes peuvent métaboliser des acides carboxyliques *via* leur métabolisme central (cycle de Krebs ou tricarboxylic acid cycle (TCA)) présent chez tous les microorganismes aérobies pouvant minéraliser la matière organique en dioxyde de carbone

(CO₂) et en eau (H₂O). La **Figure 10** illustre l'ensemble des voies métaboliques du cycle de Krebs.

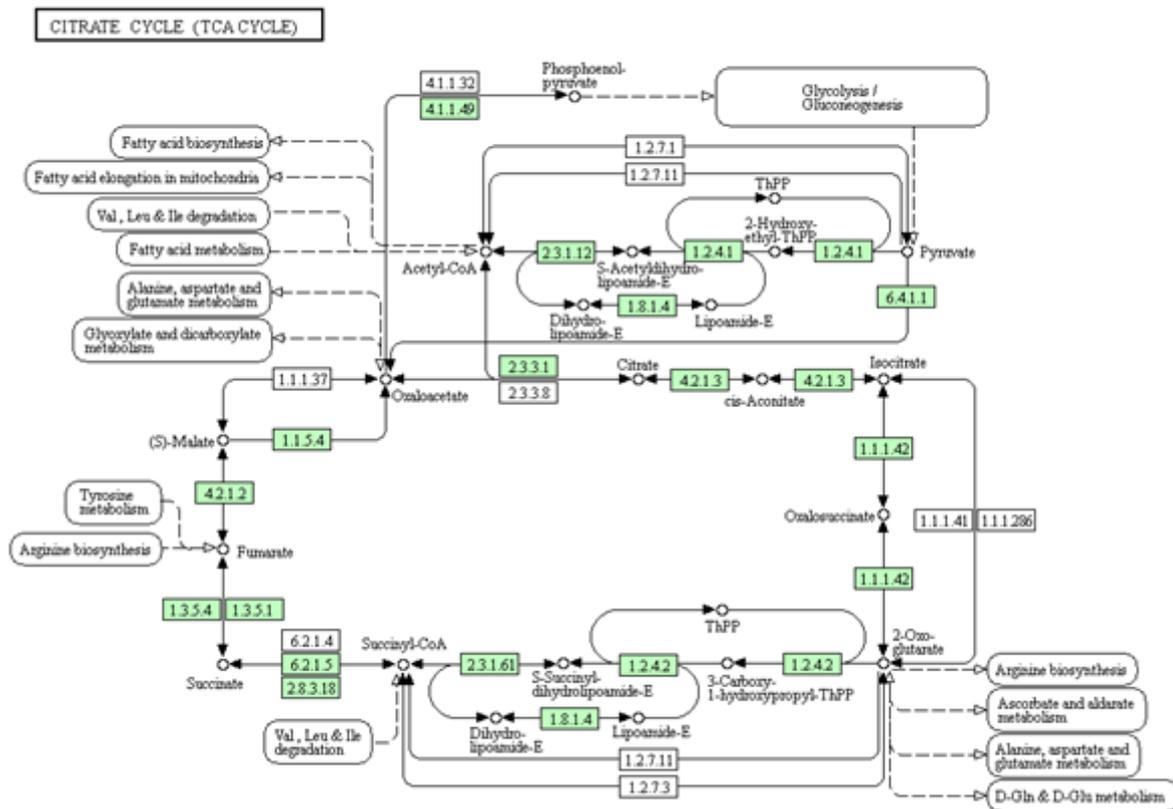


Figure 10: Voies métaboliques du cycle de Krebs (voie du citrate) obtenu à partir de Kegg (<http://www.kegg.jp/kegg/>).

La toute première étude ayant montré l'impact potentiel des microorganismes dans la chimie multiphasique atmosphérique s'est intéressée à la dégradation des acides formique et acétique par des bactéries issues d'eau de pluie (Herlihy et al., 1987). Ces travaux ont montré que les précipitations contenaient des microorganismes capables d'utiliser l'acide formique et acétique et ont conclu que la minéralisation et/ou la transformation microbienne était responsable de la diminution observée de la concentration en acide formique et acétique. L'équipe d'Ariya a montré que des acides di-carboxyliques (succinique, malonique, glutarique, adipique, pimélique et pinique) étaient dégradés efficacement par des souches fongiques isolées de l'atmosphère (Ariya et al., 2002 ; Côté et al., 2008). Par la suite, des études réalisées avec des souches bactériennes isolées au sommet du puy de Dôme (France), possédaient le matériel enzymatique pour dégrader des acides carboxyliques simples (acides acétique, formique, lactique, pyruvique et succinique) (Amato et al., 2005, 2007a ; Vaïtilingom et al., 2010, 2011, 2013). Enfin, il a été mis en évidence que des souches isolées de grêlons utilisaient des acides carboxyliques (acides lactique, acétique, propionique, succinique, etc.) en tant que substrats (Šantl-Temkiv et al., 2012).

-Métabolisme du méthane, du méthanol et du formaldéhyde-

Le méthane (CH₄) est le troisième gaz à effet de serre menant au réchauffement climatique. De ce fait, les microorganismes capables de le transformer font l'objet d'intérêt. Le méthane peut engendrer la formation de méthanol (CH₃OH). De même, bien que le méthanol et le formaldéhyde (HCHO) soient des composés toxiques pour beaucoup de microorganismes, ils peuvent être biotransformés à travers diverses voies métaboliques. Le formaldéhyde peut être transformé en méthanol, en formiate de méthyle (HCOOCH₃), formiate (HCOO⁻) ou même en dioxyde de carbone (CO₂). Le méthanol quant à lui peut être converti en formaldéhyde par oxydation.

Notre équipe a montré que le formaldéhyde et le méthanol pouvaient être biotransformés par des souches isolées des nuages au puy de Dôme (Amato et al., 2007a ; Husárová et al., 2011). De son côté une équipe danoise a isolé des souches de l'air et de la pluie capables de dégrader le méthane (Šantl-Temkiv et al., 2013). Bien que minoritaires dans les communautés bactériennes cultivables isolées dans les nuages (Vařtilingom et al., 2012), une fraction non négligeable des bactéries dans les grêlons appartiennent au genre *Methylobacterium* comme démontré par l'utilisation de techniques analytiques basées sur la biologie moléculaire (Šantl-Temkiv et al., 2012, 2013). De même, DeLeon-Rodriguez et al. (2013) ont identifié par une approche de pyroséquençage de l'ADN, des bactéries appartenant à la classe des *Methylobacteriaceae* dans différents compartiments de l'atmosphère incluant les nuages.

3.1.2. Comparaison de l'activité microbienne et de la chimie radicalaire

Dès lors que des microorganismes isolés étaient capables de transformer les composés organiques majeurs des nuages ; il est devenu fondamental d'évaluer leur activité en comparaison avec la chimie radicalaire.

A titre d'exemple la **Figure 11** présente la comparaison des voies radicalaires et biologiques impliquées dans la dégradation des composés en C1.

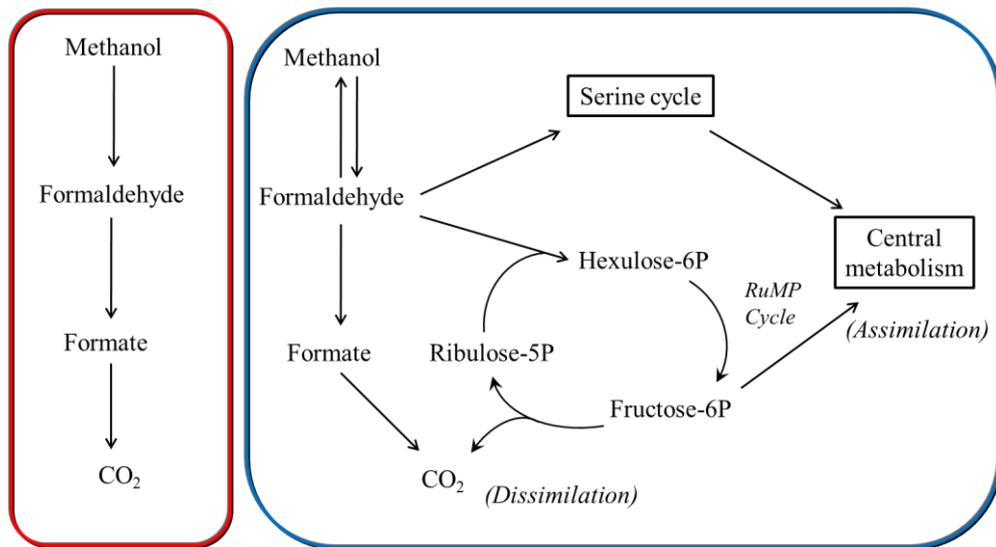


Figure 11: Transformation des composés organiques en C1. A gauche, par voie radicalaire et à droite par voie biologique.

La démarche choisie pour comparer chimie radicalaire et biotransformation a été évolutive, les conditions expérimentales utilisées ont été de plus en plus complexes, l'objectif étant de se rapprocher au mieux de l'environnement nuageux (**Figure 12**).

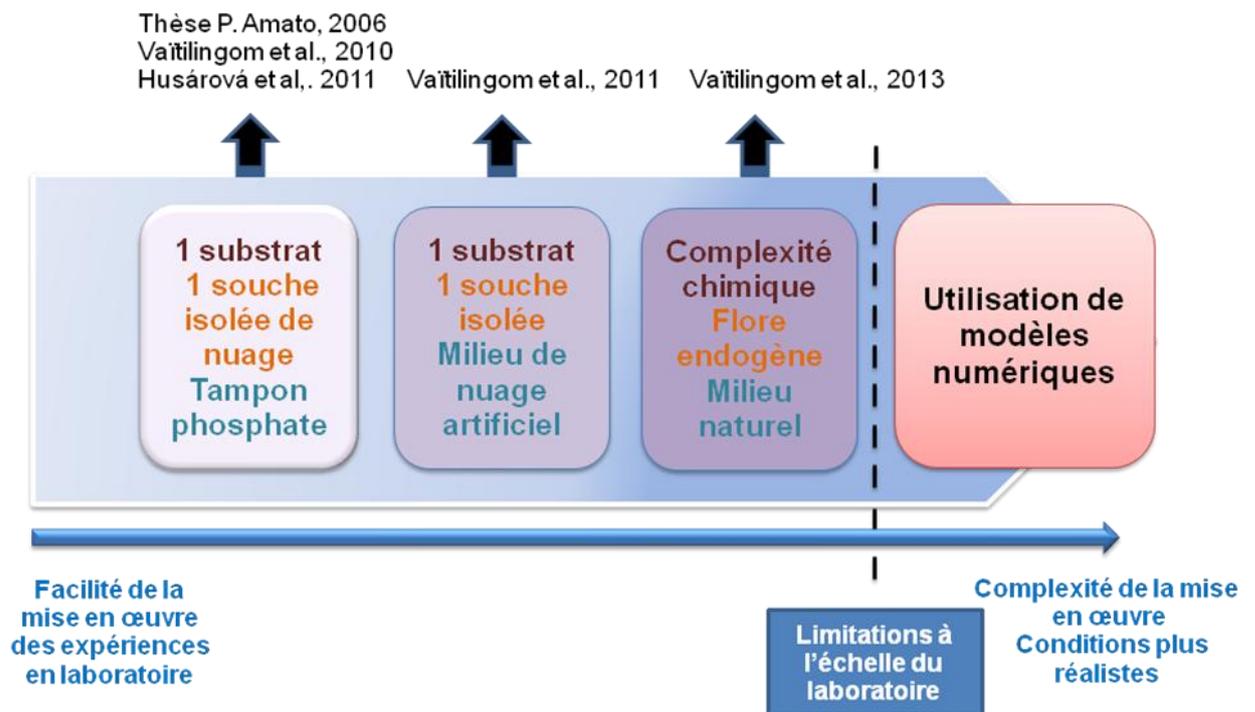


Figure 12: Evolution de la démarche utilisée pour étudier la dégradation des composés carbonés de l'eau de nuage.

Les premières expériences de dégradation ont été réalisées en laboratoire dans des conditions simples, c'est-à-dire en milieu beaucoup moins complexe que le milieu nuage (tampon phosphate) avec un substrat unique et une souche bactérienne isolée d'eau nuageuse (Amato, 2006 ; Husárová et al., 2011 ; Vaïtilingom et al., 2010). Par la suite, des expériences ont été réalisées en milieu de nuage artificiel – se rapprochant de la composition chimique de l'eau de nuage – toujours en présence d'un substrat unique et d'une souche bactérienne (Vaïtilingom et al., 2011). Récemment, Vaïtilingom et al. (2013) ont travaillé sur du milieu réel de nuage conservant toute sa flore endogène et sa complexité chimique. Malgré l'avancée de ces expériences, des limitations sont atteintes à l'échelle du laboratoire. En effet, de vraies conditions nuageuses ne peuvent pas être reproduites, et dans ce contexte, l'utilisation de modèles numériques apparaît comme une alternative à ces limitations.

-Dégradations de substrats uniques par des souches microbiennes pures isolées de l'atmosphère-

Les travaux d'Ariya et al. (2002) ont consisté à étudier la cinétique de la dégradation d'un substrat seul, en l'occurrence de la famille des acides carboxyliques, par une souche microbienne pure isolée de l'air, et de calculer sa durée de vie relative. Les premiers résultats ont montré que les valeurs de vitesse obtenues étaient comparables à celles correspondant à la réactivité des $\cdot\text{OH}$. Dans la même idée, Vaïtilingom et al. (2010) ont quantifié la dégradation du formiate, acétate, lactate (L et D) et succinate par cinq souches isolées d'eau nuageuse dans un milieu tamponné (phosphate).

Par la suite, la biodégradation du méthanol et du formaldéhyde a été évaluée pour quatre souches différentes, isolées d'échantillons de nuage prélevés au puy de Dôme et incubées dans un milieu tamponné (Husárová et al., 2011). Cette étude a été réalisée à 5°C et 17°C qui sont les températures moyennes annuelles et maximales respectivement, mesurées au sommet du puy de Dôme. Les taux de biodégradation mesurés ont été comparés aux résultats obtenus par réactivité radicalaire et notamment par l'activité des espèces $\cdot\text{OH}$ et $\text{NO}_3\cdot$. Les taux de dégradation radicalaires ont été évalués en prenant en compte des concentrations en radicaux issues de simulations numériques reproduisant la réactivité nuageuse, et des constantes cinétiques d'oxydation des composés organiques issues de la littérature. Il a été observé que l'activité microbienne est souvent favorisée à de plus hautes températures. Le rôle du cycle diurne a également été évalué. Il a été montré que la photodégradation de ces composés est prépondérante le jour par l'action des radicaux $\cdot\text{OH}$ et que la nuit la voie microbienne prend l'ascendant. En effet, la production de radicaux $\cdot\text{OH}$ étant négligeable en absence de lumière, la chimie radicalaire n'est plus régie que par les radicaux $\text{NO}_3\cdot$.

En conclusion, les résultats ont montré que les microorganismes avaient peu d'impact le jour mais pourraient être le puits principal de ces composés organiques la nuit dans les nuages liquides.

-Dégradations de substrats uniques par des souches microbiennes isolées d'eau nuageuse en microcosmes dans un milieu de nuage artificiel-

Par la suite, les études ont cherché à s'approcher de plus en plus des conditions réelles des nuages, notamment par l'utilisation d'un milieu nuage artificiel, avec une composition chimique "mimant" la composition réelle de nuage (Vaïtilingom et al., 2011). L'impact de l'origine de la masse d'air ainsi que celui de la température ont été étudiés. Pour cela, deux types de nuages artificiels ont été créés, marin et continental, en jouant principalement sur le pH et les concentrations en ions NH_4^+ , NO_3^- , et SO_4^{2-} . 17 souches recouvrant une grande diversité bactérienne ont été isolées et testées. En parallèle, des expériences de photodégradation ont été effectuées dans des photoréacteurs mimant la lumière solaire à différentes longueurs d'onde. Il a été montré, pour un nuage de type marin, que certains composés organiques étaient uniquement photodégradés (oxalate), d'autres uniquement biodégradés (acétate, succinate) et que pour certains d'entre eux comme le formiate par exemple, les deux voies de dégradation étaient possibles. Il a été établi que l'influence de la composition chimique en phase aqueuse (continental et marin) n'était pas significative sur l'activité microbienne et que les taux de biodégradation ne diminuaient pas de manière importante lorsque la température d'incubation variait de 17°C à 5°C.

D'autre part, en comparant les constantes expérimentales de réaction de la biodégradation et de la photodégradation, il a été conclu que les bactéries étaient susceptibles d'intervenir pour une part non négligeable dans la chimie atmosphérique. La même conclusion a été mise en avant en comparant cette fois les taux de réactions théoriques, estimés dans les nuages en se basant sur des concentrations en substrat, en radical $\cdot\text{OH}$ et en bactéries, issues de la littérature. Ainsi, il a été montré par la mesure comme par le calcul, que les taux de biodégradation déterminés à la température de 5°C étaient compétitifs avec les taux de photodégradation, notamment dans le cas de l'acétate et du formiate.

-Biodégradation dans des échantillons réels de nuage-

L'étude la plus récente a consisté à prélever de l'eau nuageuse au puy de Dôme avec l'entièreté de sa biodiversité microbienne et de sa composition chimique complexe, et de réaliser des expériences de dégradation sans aucune modification des échantillons, c'est-à-dire sans effectuer de culture ou de sélection de souches (Vaïtilingom et al., 2013). Les trois

catégories de nuage les plus représentatives collectées au puy de Dôme ont ainsi été étudiées : marin, continental et pollué.

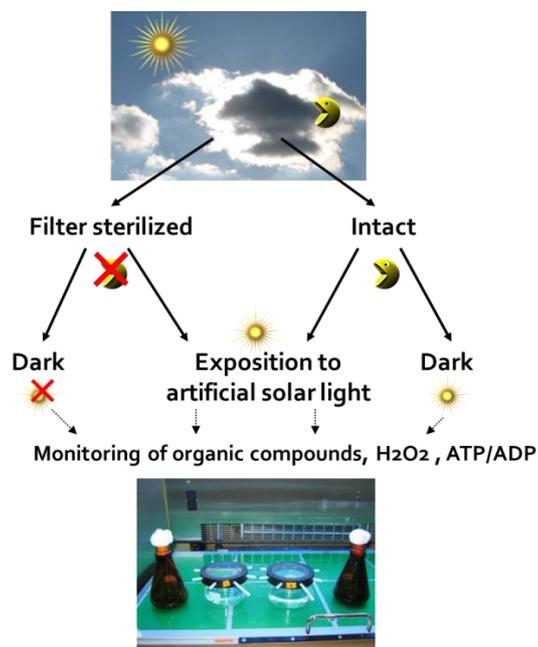


Figure 13: Approche expérimentale adoptée dans les travaux de Vaïtilingom et al. (2013).

Les expériences de dégradation ont été réalisées dans des photo-bioréacteurs mimant de manière plus réaliste les conditions réelles de nuage (**Figure 13**). En effet, l'utilisation de ce dispositif permet de combiner la biodégradation, par l'utilisation d'échantillons de nuage non filtrés, et la photodégradation, en exposant le système à la lumière du jour. Ces expériences combinant les deux processus de dégradation ont ensuite été comparées à des expériences réalisées i) en absence de lumière et en présence de microflore ou à l'inverse ii) à la lumière du jour en filtrant les échantillons pour éliminer la microflore. Les taux de dégradation de composés organiques des expériences combinant l'activité des microorganismes et la photochimie ont été déterminés. Il a été observé que l'effet de ces deux processus se "cumulait". En effet, les composés organiques connus pour être biodégradés tels que l'acétate, le formiate, le succinate ou le formaldéhyde, sont également biodégradés en présence d'espèces oxygénées réactives. Ces deux processus de transformation peuvent donc coexister dans les gouttelettes de nuage. De plus, la comparaison entre les taux de photo- et de biodégradation est possible car les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur.

Ainsi, il a été conclu que les microorganismes pouvaient avoir un impact sur le bilan carboné au sein de la phase aqueuse des nuages. L'ensemble de ces résultats suggère que la contribution microbienne est loin d'être négligeable au sein de la chimie atmosphérique.

En définitive, le contenu microbiologique de l'eau nuageuse présente un impact sur la composition chimique mais de nombreuses zones d'ombre persistent. Il est de ce fait fondamental d'accorder une priorité à cet axe d'étude et notamment au rôle des microorganismes sur la chimie des composés organiques afin d'améliorer les connaissances actuelles sur le bilan de la matière organique au sein de la goutte nuageuse. Les différentes expériences réalisées en laboratoire ont connu une évolution progressive qui a permis de simuler des conditions de plus en plus proches de celles qui conditionnent un nuage réel. Toutefois, les microcosmes d'étude dits "bulk" sont encore des milieux éloignés du milieu nuageux qui est lui un système polydispersé *i.e.* constitués d'un ensemble de gouttes. De plus, le nuage en condition réelle subit des variations spatiales et temporelles non représentées en laboratoire. Ainsi, toute la complexité de la chimie multiphasique nuageuse ne peut être reproduite en laboratoire. Pour pallier à ces différences rencontrées, une des approches actuelles est d'utiliser des modèles numériques simulant les réactions chimiques dans les nuages. Cependant, aucun des modèles développés jusqu'à présent n'a jamais intégré de données biologiques. Cette problématique fera l'objet d'une partie de ces travaux de thèse (Chapitre IV, page 237).

3.2. Interactions des microorganismes avec les oxydants des nuages

En plus de la capacité à utiliser des composés carbonés comme substrat *via* leur métabolisme carboné (action directe), les microorganismes peuvent également interagir avec les oxydants de la phase aqueuse des nuages qui sont responsables de la transformation de la matière organique (action indirecte).

3.2.1. Le peroxyde d'hydrogène

Les travaux de [Vaïtilingom et al. \(2013\)](#), décrits dans la section précédente (**Figure 13**), ont montré que les microorganismes des nuages ont la capacité de dégrader efficacement le peroxyde d'hydrogène. Les vitesses obtenues sont présentées dans le **Tableau 6**. Pour les échantillons « références », c'est-à-dire filtrés (sans microorganismes) et incubés dans l'obscurité, une très faible dégradation est observée due probablement à la réactivité d'espèces chimiques présentes dans le milieu (réaction de Fenton, par exemple). Pour les autres conditions expérimentales, les résultats obtenus pour le nuage marin (nuage 1) diffèrent des deux autres types de nuage puisque, dans tous les cas, des vitesses de dégradation du peroxyde d'hydrogène quasiment nulles ont été observées ; ceci peut s'expliquer par les faibles concentrations de tous les éléments chimiques constituant le milieu (fer, soufre) y compris celle du peroxyde d'hydrogène (concentration initiale de 3,6 μM).

Pour les nuages 2 et 3, en ce qui concerne les échantillons filtrés et incubés à la lumière (condition 2) ou les échantillons non filtrés et incubés à l'obscurité (condition 3), le peroxyde d'hydrogène est dégradé efficacement comme le montrent les vitesses mesurées. Le résultat le plus intéressant est qu'en présence à la fois de lumière et de microorganismes (condition 4), un effet cumulatif est observé sur la dégradation de H₂O₂. En effet, les vitesses obtenues sont nettement supérieures à celles des autres conditions d'incubation.

Ce résultat était particulièrement novateur, car pour la première fois il était montré que les microorganismes pouvaient potentiellement impacter la capacité oxydante du nuage.

Tableau 6: Récapitulatif des vitesses de dégradation de H₂O₂ (M.s⁻¹) dans différentes conditions pour trois prélèvements d'eau nuageuse.

Condition d'incubation		Nuage 1 (Marin)	Nuage 2 (Continental)	Nuage 3 (Pollué)
		Vitesse de disparition du peroxyde d'hydrogène (x 10 ⁻¹¹ M.s ⁻¹)		
1	Référence	0	-9,8	-7,2
2	Lumière	-0,6	-48,6	-105,1
3	Microorganismes	-2,9	-28,5	-30,0
4	Microorganismes + Lumière	-0,9	-68,4	-126,9

3.2.2. Le fer

Le fer joue un rôle clé dans la chimie des nuages, comme il l'a été vu précédemment, car il impacte la concentration des radicaux ([•]OH, HO₂[•]) et des oxydants (H₂O₂) présents dans l'atmosphère. Une grande incertitude persiste quant à la complexation du fer(III) dans les nuages. En effet, il a été montré que la production des radicaux [•]OH dans l'eau nuageuse ne pouvait pas être expliquée uniquement par la présence de complexes de type Fe[oxalate] (Bianco et al., 2015).

L'hypothèse récente qui a été émise est que le fer(III) peut être chélaté par d'autres ligands organiques d'origine biologique (Herckes et al., 2013 ; Hermann et al., 2015) modifiant ainsi la disponibilité du fer dans la chimie réactionnelle des radicaux.

Il a été montré que des microorganismes présents dans les océans avaient la capacité de produire des sidérophores, molécules chélatantes du fer (Gledhill & Buck, 2012 ; Sandy & Butler, 2009). Plus récemment, les travaux de Cheize et al. (2012) ont mis en évidence dans des eaux de pluie la présence de fer(III) complexé par des ligands organiques avec de hautes constantes de complexation (K > 10²⁰-10²²). Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse de la présence de sidérophores.

Ainsi, ces résultats ouvrent l'hypothèse de la présence de sidérophores dans les nuages. En effet, la pluie étant le résultat des phénomènes de collision-coalescence des gouttelettes

de nuage, il serait logique de retrouver ce type de molécules également dans les eaux de nuage. Cette hypothèse fera l'objet d'un chapitre de ces travaux de thèse (Chapitre II, page 53).

4. Impact du milieu nuage sur les microorganismes

Dans les nuages et plus généralement dans l'atmosphère, les microorganismes subissent perpétuellement des stress très variés. En effet, les nuages sont considérés comme un environnement extrême au sein duquel les microorganismes peuvent subir de fortes variations de température, de pression osmotique ou même de pH ainsi que les effets de la lumière solaire. De plus, comme développé précédemment, le nuage est un milieu très oxydant en raison de la présence d'un grand nombre d'espèces chimiques réactives en perpétuelle évolution. Les microorganismes sont en interaction directe avec ces espèces ce qui représente un stress majeur qu'ils doivent combattre pour survivre. Or, des microorganismes métaboliquement actifs sont retrouvés dans les nuages, suggérant fortement qu'ils ont la capacité de survivre à ces conditions. L'objectif de ce paragraphe va être de comprendre comment les microorganismes évoluent dans le nuage face à ces oxydants et plus précisément quelles stratégies ils mettent en œuvre pour les combattre.

4.1. Les différentes sources de stress dans les nuages

Les microorganismes subissent de nombreux stress au sein des nuages. Pour plus de détails, le lecteur peut se référer au chapitre de livre dont je suis auteur mis en **Annexe 1**. La composition chimique des nuages fait partie de ces stress, elle connaît une forte variation et est étroitement dépendante de l'origine de la masse d'air (Deguillaume et al., 2014). En premier lieu, cette composition influence le pH du milieu : en effet, l'acidité d'un nuage varie en fonction de la nature des molécules dissoutes. Dans un nuage de type pollué, l'acidité va être plus importante que pour les autres types de composition chimique (marine, continentale ou hautement marine) en raison de la présence par exemple d'acide sulfurique ou de NO_x . Ainsi, le pH au sein du nuage peut varier entre 2 et 7 unités de pH (Deguillaume et al., 2014). Or, la majorité des microorganismes connaît des conditions de croissance optimales pour des pH compris entre 5 et 9 (Padan et al., 2005). Au-delà de ces limites, leur survie dépendra de leur capacité à maintenir leur pH cytoplasmique à des valeurs compatibles avec leur métabolisme. Comme présenté précédemment (3.1.1., page 31), la présence de polluants comme le formaldéhyde peut aussi être facteur de stress.

De plus, au sein du nuage, les microorganismes peuvent subir des chocs osmotiques (dérégulation des pressions au sein de la cellule) expliqués par les différents cycles d'évaporation et de condensation au sein de l'atmosphère. Ces cycles causent des

variations de concentration en solutés autour des particules en diluant les composés solubles des aérosols (condensation) ou en concentrant les solutés dissous dans l'eau liquide autour des particules (évaporation).

Dans les nuages, les microorganismes sont soumis également à de brusques variations de température, de l'ordre de la dizaine de degré en quelques secondes en cas de forts vents verticaux.

Enfin, dans les nuages, les microorganismes subissent les effets de la lumière solaire, qu'il s'agisse de lumière visible (longueurs d'ondes de 400 à 750 nm) ou de rayonnements ultra-violets (longueurs d'ondes de 280 à 400 nm). Ces rayons sont connus pour créer des dommages potentiellement létaux sur les cultures bactériennes. Les travaux de [Tong et Lighthart \(1997\)](#) ont montré que les bactéries de l'atmosphère présentaient des sensibilités différentes aux rayons solaires selon le moment de la journée : les bactéries présentes la nuit sont plus sensibles aux rayonnements solaires que celles collectées à midi par temps ensoleillé. Ceci suggère qu'il existe une sélection des bactéries par les rayonnements solaires au cours de la journée et que par conséquent, la lumière solaire est un facteur déterminant pour la survie des microorganismes.

Les rayonnements solaires, plus particulièrement les UV, peuvent agir de façon directe sur la viabilité des cellules en créant des mutations ou des cassures de l'ADN. Toutefois, les rayons associés à ces dommages correspondent à de faibles longueurs d'ondes, généralement inférieures à 300 nm. Ces rayons sont très minoritaires aux altitudes qui concernent les nuages de la basse troposphère ; moins de 1% des rayonnements solaires atteignant la surface de la Terre sont attribués à des longueurs d'onde inférieures à 320 nm ([Coohill & Sagripanti, 2009](#)). Par conséquent, la mortalité liée à la lumière solaire est principalement due à des longueurs d'onde supérieures, pour lesquelles les rayonnements solaires peuvent agir indirectement en formant des dérivés réactifs de l'oxygène tels que les radicaux hydroperoxyde/superoxyde $\text{HO}_2^{\bullet}/\text{O}_2^{\bullet-}$ et hydroxyle $^{\bullet}\text{OH}$ ainsi que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

Les travaux de [Joly et al. \(2015\)](#) ont eu pour objectif d'évaluer le taux de survie de cinq souches microbiennes isolées d'eau nuageuse, représentatives du microbiome cultivable des nuages, et confrontées à chacun de ces stress. Nous limiterons ici notre propos au stress engendré par l'ajout de peroxyde d'hydrogène. Afin de déterminer le taux de survie de ces souches face à H_2O_2 , 100 μM de ce composé ont été ajoutés au milieu dans lequel ont été placés les microorganismes. Cette concentration a été choisie car elle était réaliste des concentrations retrouvées dans les nuages (0 à 247 μM). Les résultats ont montré que dans ces conditions, aucune des cinq souches n'était affectée par la présence du peroxyde d'hydrogène. Ces mêmes souches ont été confrontées à une lumière artificielle mimant la

lumière solaire rencontrée dans les nuages, dans ces conditions aucune des souches n'a été impactée significativement.

Ces résultats sont en totale adéquation avec les travaux de [Vaïtilingom et al. \(2013\)](#), décrits précédemment, qui ont consisté à incuber d'authentiques échantillons de nuage dans des photo-bioréacteurs conçus pour reproduire au mieux l'environnement nuage. Les résultats ont montré que la présence de lumière – et donc de ce fait la génération de radicaux $\cdot\text{OH}$ à travers les réactions de Fenton et photo-Fenton – n'inhibait pas la dégradation du peroxyde d'hydrogène par les microorganismes. En parallèle, des mesures de ratio ADP/ATP reflétant l'état métabolique des microorganismes des nuages ont confirmé que les microorganismes n'étaient aucunement impactés par la formation de radicaux et par la lumière solaire.

4.2. Le stress oxydant

Le fait que les microorganismes dégradent H_2O_2 et qu'ils se protègent des radicaux hydroxyles suggère qu'ils ont mis en place un système de défense face à ces oxydants. Ce métabolisme particulier est appelé métabolisme antioxydant.

4.2.1. Généralités

Dans des conditions physiologiques normales, des ROS sont formés en faible quantité et en permanence *via* l'action du métabolisme aérobie (nécessité absolue du dioxygène pour vivre). Un aperçu des entités oxygénées réactives que l'on peut retrouver dans les cellules est donné dans le **Tableau 7**.

Tableau 7: Aperçu des dérivés réactifs de l'oxygène présents dans les cellules vivantes.

Dérivés réactifs de l'oxygène	
Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
Superoxyde $O_2^{\bullet -}$	Peroxyde d'hydrogène H_2O_2
Hydroxyle $\bullet OH$	Ozone O_3
Peroxyde RO_2^{\bullet}	Oxygène singulet O_2^*
Hydroperoxyde HO_2^{\bullet}	

Ces dérivés sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont nécessaires à la cellule à dose raisonnable. Ils interviennent dans la signalisation cellulaire, la régulation des métabolismes ou du maintien d'un environnement redox optimal pour le bon fonctionnement des réactions biochimiques cellulaires (Wang et al., 2013). La production de ces composés peut devenir excessive ou résulter de phénomènes exogènes (exposition aux rayonnements UV, présence d'oxydants (H_2O_2), etc.) ce qui amènera les cellules à devoir se protéger de ces excès par différents systèmes antioxydants. Dans des conditions normales, il existe dans la cellule un équilibre entre la production de ces espèces réactives dites pro-oxydants et les systèmes de régulation, mis en place par la cellule, appelés antioxydants (**Figure 14**). Une situation de stress oxydant apparaît lorsque cette balance redox est modifiée en faveur des dérivés réactifs de l'oxygène, suite soit à une surproduction consécutive de pro-oxydants, soit à une action moins efficace des systèmes antioxydants. Cette rupture d'équilibre peut provoquer des altérations des constituants lipidiques, protéiques, nucléotidiques et même aller jusqu'à l'altération de la viabilité cellulaire. Le paradoxe réside donc dans le fait que les espèces réactives de l'oxygène peuvent être néfastes au métabolisme tout en étant indispensables.

Heureusement, les cellules disposent de nombreux systèmes antioxydants qui permettent d'éliminer ces espèces réactives et ainsi de maintenir l'équilibre redox antioxydant/oxydant.

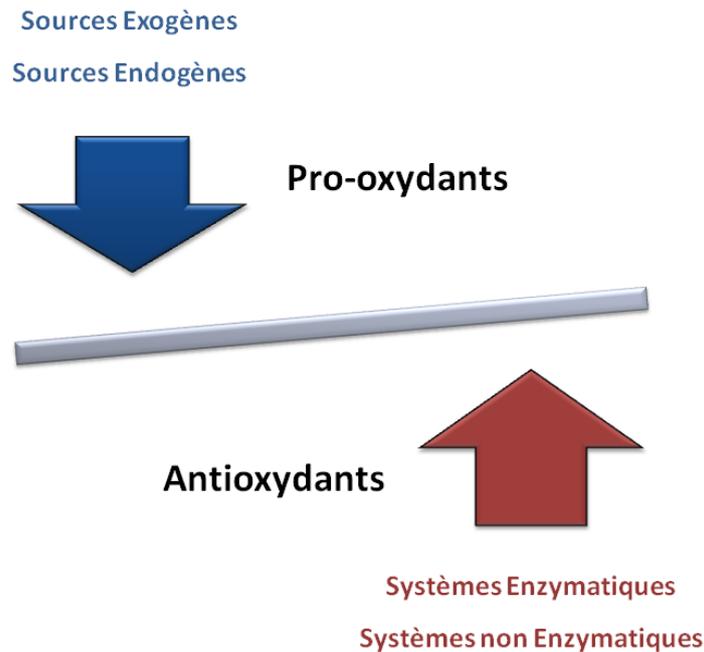


Figure 14: Schématisation de la balance oxydative. Un bon équilibre entre les pro-oxydants produits et l'action des antioxydants contribue au maintien de l'homéostasie (processus de régulation par lequel l'organisme maintient les différentes constantes du milieu intérieur). Lorsque cette balance est déséquilibrée, par une production en excès de pro-oxydants et/ou une trop faible activité antioxydante, l'équilibre redox de la cellule est rompu, engendrant des dommages sur cette dernière : on parle de stress oxydant (Dalattre et al., 2005).

4.2.2. La chimie et les sources cellulaires des ROS

La production de dérivés réactifs de l'oxygène peut être la conséquence d'une action extérieure ou de l'organisme lui-même, qui produit ces espèces au travers d'un grand nombre de processus ; ce sont des sous-produits du métabolisme normal. Les propriétés des principaux dérivés réactifs de l'oxygène sont détaillées ci-dessous.

-Le dioxygène (O_2)-

La molécule de dioxygène à l'état fondamental est stable et présente un faible pouvoir oxydant dû à son état triplet. En effet la plupart des molécules sont à l'état singulet et leur réaction directe avec l'oxygène est interdite par la restriction de spin. Cependant, l'utilisation de l'oxygène moléculaire par la cellule peut aboutir à la production de radicaux libres (doublets) comme l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle, ou de peroxydes comme H_2O_2 (singulet). Une grande partie de la chimie du dioxygène concerne des réactions impliquant des espèces paramagnétiques (présence d'électrons non appariés sur son orbitale externe), des espèces donneuses d'électrons, la lumière ou même la combinaison des trois.

-L'oxygène singulet (O_2^*)-

L'oxygène singulet est un état excité de la molécule de dioxygène. Dans les cellules microbiennes il est produit photochimiquement par l'intermédiaire de photosensibilisateurs (Ogilby, 2010).

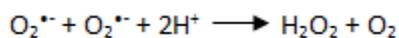
-Produits de réduction du dioxygène-

- L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)

Les sources du radical superoxyde sont très diverses. Chez les organismes aérobies la chaîne de transport électronique en est la principale source, il peut également être produit lors de réactions enzymatiques impliquant des cofacteurs quinoniques ou flaviniques (Imlay, 1995) ou par l'oxydation de xénobiotiques (Hassan & Fridovich, 1978). Le pKa du superoxyde étant de 4,7, il se trouve principalement sous sa forme ionisée au pH intracellulaire. Sa charge négative l'empêche de circuler à travers les membranes biologiques. Sa toxicité a principalement pour origine l'inhibition de métalloenzymes à fer (Gu & Imlay, 2013) en libérant le métal qui pourrait ensuite intervenir dans la réaction de Haber-Weiss (voir ci-après) (Halliwell, 1978).

- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Il est le résultat de la réduction par deux électrons du dioxygène. Son absence de charge lui permet de diffuser librement au travers des membranes biologiques. Le peroxyde d'hydrogène constitue une entité impliquée dans de nombreux processus d'oxydation. Il peut provenir de la dismutation spontanée ou catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) de $O_2^{\bullet -}$, selon la réaction suivante:



- Le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$)

$^{\bullet}OH$ est le plus réactif de tous les dérivés réactifs de l'oxygène. Comme il l'a été montré, il est produit *via* des réactions faisant intervenir d'autres espèces telles que H_2O_2 , et $O_2^{\bullet -}$ *via* le cycle de Haber-Weiss :



4.2.3. Protection contre le stress oxydant : les antioxydants

En permanente interaction avec ces dérivés réactifs, les cellules ont élaboré de nombreuses stratégies de défense permettant de les éliminer et de prévenir leur accumulation (**Figure 15**).

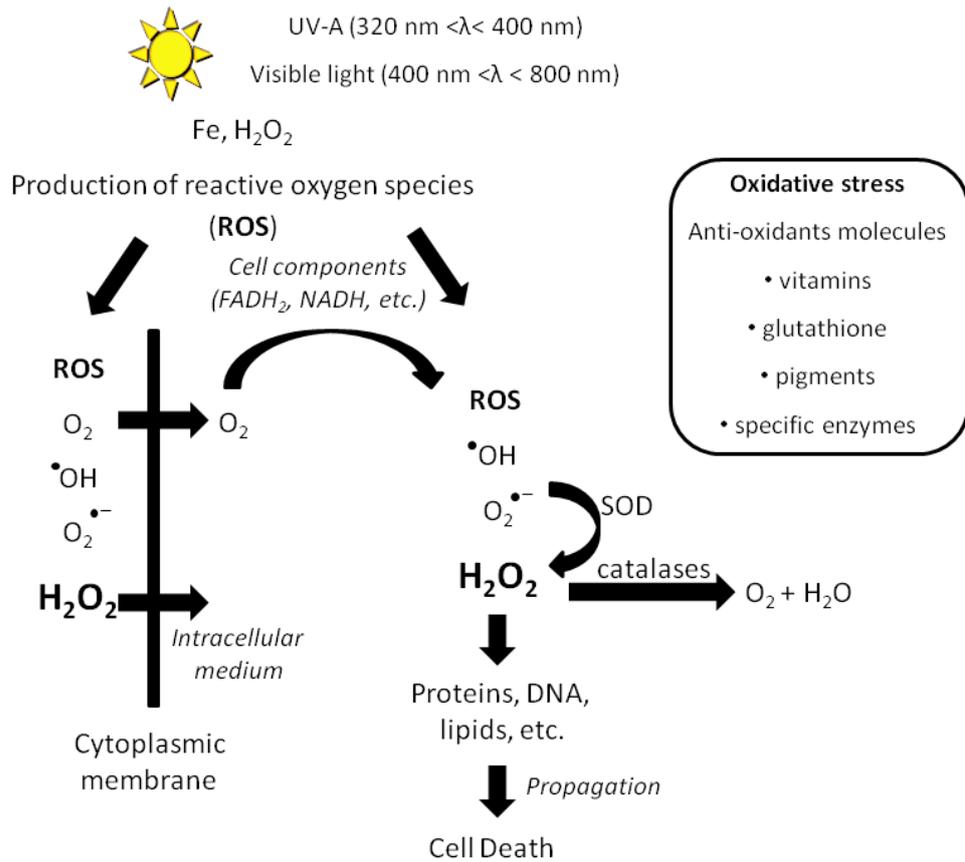


Figure 15: Exposition des microorganismes dans les nuages aux dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).

Ces systèmes de défense, permettant de réguler la concentration en espèces oxydantes afin de conserver l'intégrité de la balance pro-oxydants et antioxydants, peuvent être enzymatiques ou non (**Figure 16**). La partie suivante expose de manière non-exhaustive ces stratégies de défense ainsi que les espèces impliquées.

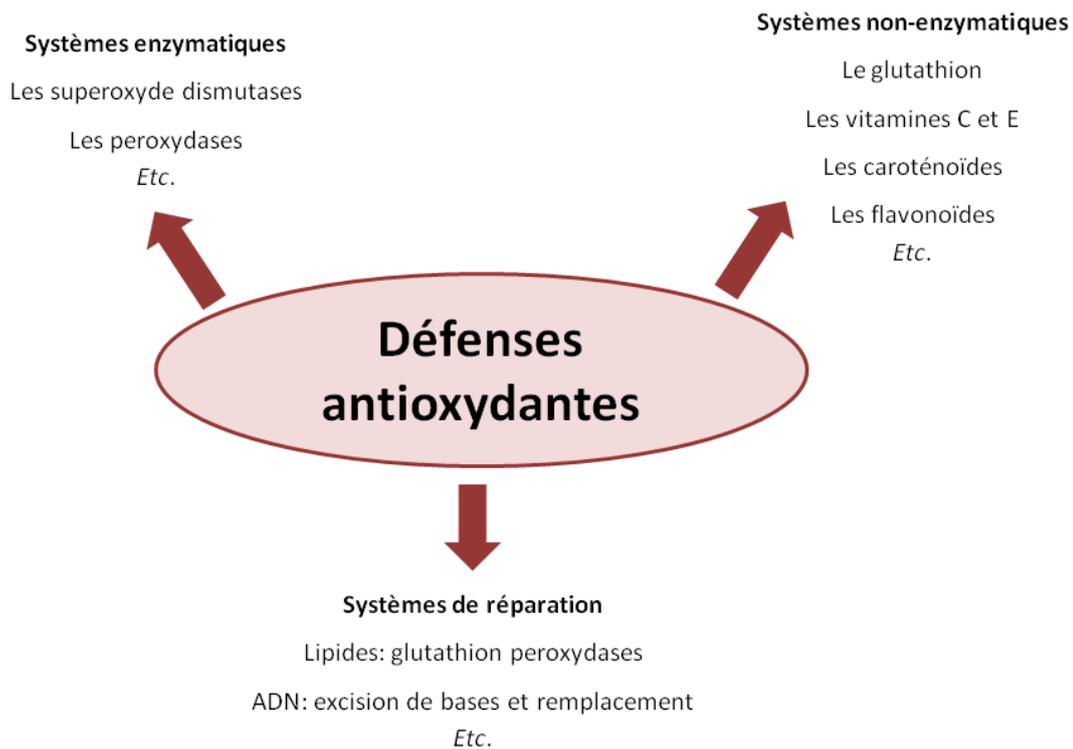


Figure 16: Illustration des différentes défenses antioxydantes mises en jeu lors du stress oxydant.

4.2.3.1. Les systèmes enzymatiques

Une des stratégies élaborée, de nature enzymatique, vise à éliminer les superoxydes et les peroxydes.

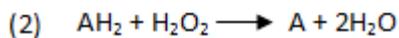
Les superoxydes dismutases (SOD), qui catalysent la réaction de dismutation de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (Wang et al., 2013), font partie de ces systèmes. Ce sont des métalloenzymes dont le site catalytique métallique est successivement réduit puis oxydé par l'anion superoxyde entraînant une réaction de dismutation de l'anion pour former de l'oxygène (O_2) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :



Les SOD peuvent être divisées en trois classes en fonction de leur structure et du métal présent (Miller, 2012) :

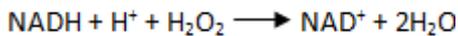
- SOD à fer ou manganèse
- SOD à cuivre/zinc
- SOD à nickel

Les catalases et peroxydases comptent parmi les peroxydases hémiques les plus étudiées. Elles ont pour rôle de catalyser la décomposition de H_2O_2 selon deux modes : catalytique (catalase) (réaction 1) et peroxydatique (catalase peroxydase) (réaction 2) selon les réactions suivantes :



avec A et AH₂ la forme oxydée et réduite de la catalase.

La NADH peroxydase compte parmi les peroxydases non-hémiques. Elle utilise uniquement H₂O₂ pour le convertir en eau et former du NAD oxydé selon la réaction :



4.2.3.2. Les systèmes non-enzymatiques

L'autre grande stratégie utilisée par les microorganismes pour se protéger du stress oxydant est d'actionner des systèmes non-enzymatiques réduisant les composés antioxydants.

Ainsi, le glutathion est un tripeptide (Glu-Cys-Gly) antioxydant *via* son groupement thiol qui s'oxyde en radical thiyle puis forme un pont disulfure avec un second radical. Il joue le rôle de « tampon redox » en maintenant l'homéostasie redox de la cellule où il se trouve à forte concentration (5-15 mM). Il agit sur les radicaux et les peroxydes soit directement soit comme substrat d'enzymes comme les glutathion peroxydases. Il est lui-même régénéré par la glutathion réductase en consommant une molécule de NADPH. Les thiorédoxines sont de petites protéines fonctionnant de la même manière grâce à leurs groupements thiols. Elles sont régénérées par la thiorédoxine réductase ([Carmel-Harel & Storz, 2000](#)).

De la même manière, les pigments, notamment les caroténoïdes qui peuvent être incorporés dans la membrane microbienne, ont pour action principale de piéger les radicaux libres ([Gourmelon et al., 1994](#)) pour former des radicaux stables. Il a été montré que 50% des isolats des nuages sont pigmentés ([Amato et al., 2005, 2007c](#) ; [Vaïtilingom et al., 2012](#)).

4.2.3.3. Les systèmes de réparation : conséquences du stress oxydant.

Toutes les classes de biomolécules sont affectées par le stress oxydant ([Farr & Kogoma, 1991](#)).

- Lipides : les radicaux [•]OH vont arracher un hydrogène en position allylique pour former un radical conjugué, oxydé ensuite en radical peroxy. Cette réaction est appelée la peroxydation lipidique. La conséquence principale d'altérations au niveau des lipides va être la modification de la fluidité de la membrane cellulaire qui va elle-même modifier le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs.
- Protéines : l'oxydation des résidus impliqués dans la catalyse peut provoquer l'inactivation de certaines enzymes.

- Acides nucléiques : l'attaque de la partie osidique par les radicaux hydroxyles peut provoquer des cassures dans les brins. Les bases peuvent être oxydées ou former des adduits avec des groupements carbonyles issus de l'oxydation d'autres molécules. Ces modifications conduisent à un mauvais appariement des bases et sont donc sources de mutations. Elles peuvent également bloquer la réplication de l'ADN ou sa transcription en ARN.

Ces dommages affaiblissent les cellules et peuvent même entraîner leur mort. Des systèmes de réparation doivent donc être mis en place, surtout en ce qui concerne l'ADN. Des complexes enzymatiques vérifient l'intégrité de l'ADN. Lorsqu'une lésion est repérée, la partie endommagée est retirée et la partie manquante est reconstruite. Pendant les réparations la division cellulaire est arrêtée (Branzei & Foiani, 2008). Ces systèmes de réparation sont liés avec les métabolismes énergétiques et oxydants par l'intermédiaire des nucléotides pyridiniques NAD et NADP (Oka et al., 2012) (Figure 17).

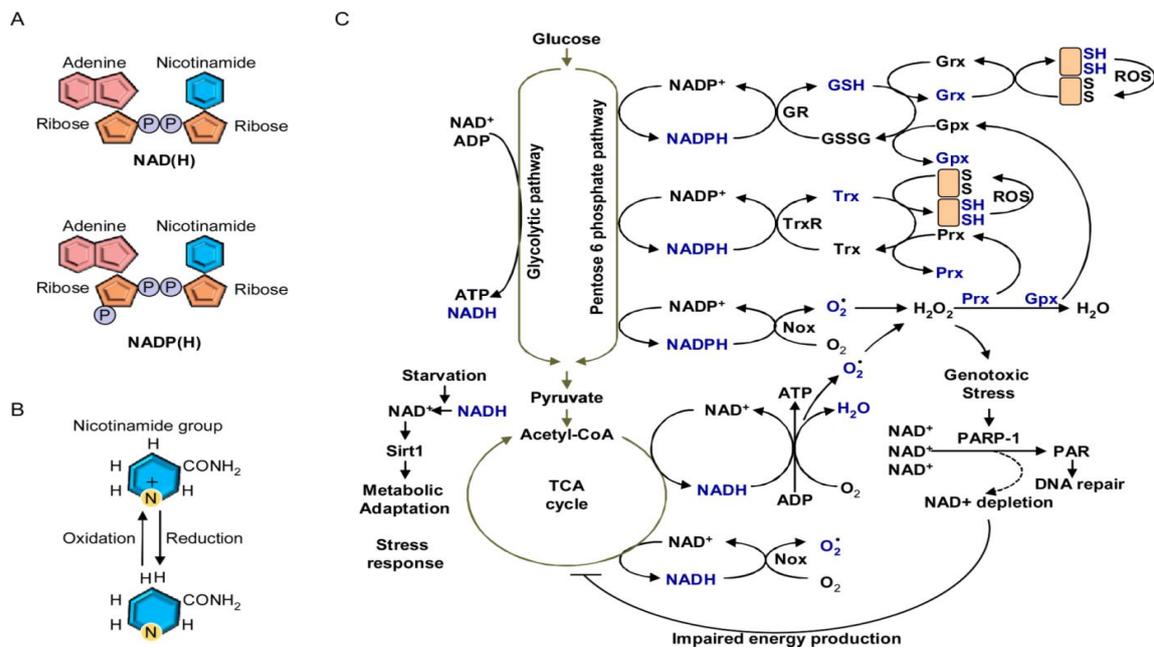


Figure 17: (A) Structures schématiques du NAD(H) et NADP(H). (B) Formes oxydées et réduites du groupe nicotinamide. Le groupe nicotinamide du NAD⁺ et NADP⁺ acquière deux électrons pour se convertir en NADH et NADPH, respectivement. (C) Aperçu des rôles biologiques des nucléotides à base de pyridine comme porteur d'électrons et médiateurs de signal. Le NAD⁺ est réduit par la voie du pentose phosphate. Le NADPH est utilisé pour piéger les ROS aussi bien par réduction de protéines oxydées *via* les systèmes Trx et GSH. Le NAD⁺ est réduit par plusieurs processus cataboliques (voie de la glycolyse, cycle de Krebs). L'électron provenant du NADH est transféré à la chaîne de transport des électrons pour convertir l'ADP en ATP (voir pour plus d'informations Oka et al., 2012).

5. Problématique de la thèse

Dans les nuages, les microorganismes sont en présence d'une vraie complexité chimique. En effet, ils sont en interaction permanente avec un grand nombre de composés inorganiques et organiques tels que des acides carboxyliques (11% du carbone total dissous) ou des aldéhydes, mais sont également en présence d'une grande variété de dérivés oxygénés réactifs, responsables de la capacité oxydante de l'environnement nuageux. [Deguillaume et al. \(2014\)](#) ont mesuré une valeur de potentiel redox de 200 mV en phase aqueuse de nuage. L'objectif principal de cette thèse s'inscrit dans ce contexte. Il a été en effet question d'approfondir nos connaissances sur les interactions entre les microorganismes et les oxydants dans les nuages.

Le premier objectif de cette thèse a consisté à s'intéresser à un premier oxydant, le fer, présent dans les nuages. Son devenir est extrêmement important car il fait partie des espèces chimiques qui gèrent la chimie réactionnelle des nuages. En effet, le fer est impliqué dans la production d'espèces réactives de l'oxygène à travers différents processus impactant la présence de radicaux tels que $\cdot\text{OH}$ ou $\text{HO}_2\cdot$ et de molécules oxydantes telle que H_2O_2 . De plus, le fer(III) peut former différents complexes dans les gouttelettes de nuage. Or, cette complexation fait encore aujourd'hui l'objet d'incertitude, comme nous l'avons exposé dans le paragraphe 3.2.2 de ce chapitre. Notamment, s'est posé récemment la question de la présence de ligands organiques d'origine biologique, dont les plus connus sont les sidérophores, dans les eaux atmosphériques. Leur présence jusqu'à maintenant a été démontrée dans les sols ou les eaux de surface. Or, la pluie est le résultat de phénomène de collision/coalescence des gouttelettes de nuage, ce qui laisse entendre que la présence de sidérophores dans les nuages est une hypothèse tout à fait plausible. Dans ce contexte, il a été décidé de réaliser un screening de souches isolées d'eau nuageuse afin de tester leur capacité à produire des sidérophores. Cette étude fera l'objet du 2^{ème} chapitre de ce mémoire.

Il a été question dans un second objectif de s'intéresser aux interactions entre les microorganismes des nuages et le peroxyde d'hydrogène. Nous avons décidé de nous concentrer sur le cas de H_2O_2 car il a été identifié comme un composé clé de l'atmosphère en raison de sa réactivité avec les radicaux libres, la matière organique et le fer. Sa concentration dans les nuages donne une indication fiable de la capacité oxydante de l'atmosphère ([Vione et al., 2003](#)). Le peroxyde d'hydrogène tient une place centrale dans l'atmosphère car il est impliqué dans un grand nombre de processus (oxydation du soufre (IV) en soufre (VI), réaction de Fenton et photo-Fenton, etc.). De plus, des études en laboratoire et de modélisation ont montré que la concentration en H_2O_2 dans l'atmosphère

est impactée par une grande variété de paramètres météorologiques et principalement par l'activité photolytique (variabilité journalière et saisonnière). Les travaux de [Vaïtilingom et al. \(2013\)](#) et de [Joly et al. \(2015\)](#) ont montré que les microorganismes des nuages ont la capacité de dégrader de manière efficace H_2O_2 , y compris en présence de lumière et de radicaux, sans avoir d'impact néfaste sur leur viabilité. Ces résultats suggèrent fortement la mise en place du métabolisme du stress oxydant chez les microorganismes dans un contexte de nuage. Dans ce cadre, une stratégie en deux étapes a été adoptée. Dans un premier temps, il a été question de compléter et d'affiner les travaux de [Vaïtilingom et al. \(2013\)](#) sur la biodégradation du peroxyde d'hydrogène entrepris dans des échantillons réels. Afin de préciser les mécanismes mis en jeu, il nous a semblé judicieux de travailler en laboratoire sur du milieu de nuage artificiel et des souches modèles nous permettant d'isoler chacun des paramètres pouvant avoir un rôle sur la dégradation de H_2O_2 . En complément, il faisait sens d'effectuer une approche par métabolomique dans le but d'identifier les métabolites potentiellement impliqués dans le stress oxydant engendré par le peroxyde d'hydrogène et de pouvoir ainsi remonter aux différentes voies métaboliques impactées. Ces résultats feront l'objet du 3^{ème} chapitre de ce mémoire.

Enfin, le dernier chapitre de cette thèse s'intéressera à évaluer l'importance des microorganismes dans la transformation de la matière organique dans les nuages. Il a été mis en évidence que dans l'eau de nuage réelle, la microflore endogène pouvait dégrader des composés organiques (acides carboxyliques, aldéhydes, alcools) ainsi que des molécules oxydantes comme H_2O_2 de façon aussi voire plus efficace que les voies photochimiques ([Vaïtilingom et al., 2013](#)). Cependant, ces expériences réalisées en laboratoire atteignent des limitations car une vraie condition nuageuse ne peut pas être reproduite. La principale différence repose sur les volumes étudiés car les nuages sont des milieux multiphasiques polydispersés alors que les volumes liquides nécessaires en laboratoire pour observer une biodégradation sont de l'ordre de quelques dizaines de millilitres. En conditions réelles, la réactivité des composés chimiques est modifiée par les transferts dynamiques de composés chimiques entre la phase gazeuse et la phase liquide et également par le fait que le nuage est un milieu évoluant par les processus microphysiques. D'autre part, en raison de la complexité des manipulations à mettre en œuvre et du temps que cela requiert, seul un faible nombre de conditions peuvent être étudiées en parallèle. Afin de surmonter ces limites expérimentales, il est nécessaire de faire appel à des outils de modélisation simulant la chimie multiphasique du nuage et permettant de considérer un grand nombre de paramètres physico-chimiques. L'objectif était donc de fournir des données expérimentales pouvant être prises en compte dans ce modèle et permettant la comparaison des contributions relatives des radicaux et des microorganismes dans la dégradation de

composés dans les nuages. Pour cela, des constantes cinétiques de biodégradation de quatre composés présents dans les nuages par trois souches bactériennes isolées de nuages ont été mesurées : formiate, acétate, formaldéhyde et peroxyde d'hydrogène. Ces éléments seront détaillés dans le dernier chapitre de ce mémoire.

Chapitre II :

Production de sidérophores par des microorganismes des nuages

1. Introduction

1.1. Les sidérophores

-Production de sidérophores-

La grande majorité des bactéries a besoin de fer pour leur croissance. En effet, le fer est un élément essentiel requis pour la réalisation de processus biologiques clés impliquant des métalloenzymes à fer. Cependant, obtenir du fer est un challenge pour les bactéries. L'insolubilité du fer(III) à pH physiologique (pH=7,4) dans des environnements aérobies (contenant de l'oxygène) limite la disponibilité de ce nutriment essentiel (Sandy & Butler, 2009). En effet, en présence d'oxygène et à pH neutre, l'oxydation du fer(II) en fer(III) se produit rapidement et aboutit finalement à la formation d'oxyhydroxyde de fer insoluble (FeO(OH)). Ce type de composés est quasi-indisponible pour l'acquisition par les bactéries. La biodisponibilité du fer se trouve aux alentours de 10^{-9} à 10^{-18} M. Or, les microorganismes ont besoin de l'ordre de 10^{-8} M de fer pour atteindre leur optimum de croissance et réaliser leurs processus physiologiques et métaboliques.

Le fer devient un facteur limitant dans le développement des microorganismes. Pour s'affranchir de cette limite, certaines bactéries ont développé des méthodes permettant d'extraire le fer de leur environnement proche sous forme d'ions Fe^{3+} et de le transporter dans les cellules. Pour cela, elles vont produire des molécules chélatantes du fer connues sous le nom de sidérophores (venant du grec pherein et sideros signifiant « porter le fer »). La synthèse de sidérophores est induite lors de carence en fer disponible dans le milieu. Ce sont des peptides de faibles poids moléculaires allant de 400 à 1000 kDa caractérisés par une forte affinité pour le fer(III) et capables de former des complexes $[Fe^{3+}(\text{sidérophores})]$ qui permettront d'internaliser le fer nécessaire au fonctionnement de la cellule. Ce complexe ainsi formé atteint la surface de la cellule pour se lier à une protéine transmembranaire réceptrice puis entre dans la cellule grâce à un transporteur spécifique. Une fois internalisé, le complexe va se dissocier et le Fe^{3+} est réduit en Fe^{2+} . Celui-ci peut alors être utilisé par la cellule, notamment pour le fonctionnement des enzymes et de la chaîne respiratoire. Le sidérophore libre est alors recyclé vers le milieu extracellulaire. Les valeurs classiques des constantes d'association des sidérophores pour le fer(III) varient entre 10^{12} et 10^{59} .

Tous les microorganismes ne sont pas capables de synthétiser ce type de molécules et certains d'entre eux vont pouvoir assimiler les sidérophores produits par d'autres bactéries (Gledhill & Buck, 2012 ; Sandy & Butler, 2009).

Il existe une grande variété structurale de sidérophores généralement classés, selon la nature des fonctions chélatantes, en catécholates (**Figure 18a**), hydroxamates (**Figure 18b**) et carboxylates (**Figure 18c**).

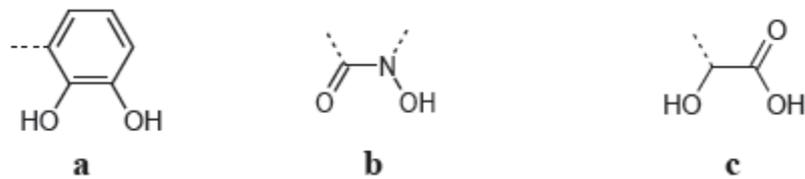


Figure 18: Fonctions chélatantes des trois grandes classes de sidérophores. (a) catécholate ; (b) hydroxamate et (c) carboxylate.

-Les catécholates -

Pour exemple, l'entérobactine, la salmochéline et la bacillibactine sont tous trois des sidérophores de la classe des catécholates (**Figure 19**).

L'entérobactine a été isolée à partir de différentes bactéries dont la plus connue est *Escherichia coli*. C'est un trimère de structure cyclique de la 2,3-dihydroxybenzoyl-L-sérine. La salmochéline, isolée de la *Salmonella enterica* et *Escherichia coli* est un analogue diglucosylé de l'entérobactine. Quant à la bacillibactine, isolée notamment de *Bacillus subtilis*, c'est un triester de la L-thréonine.

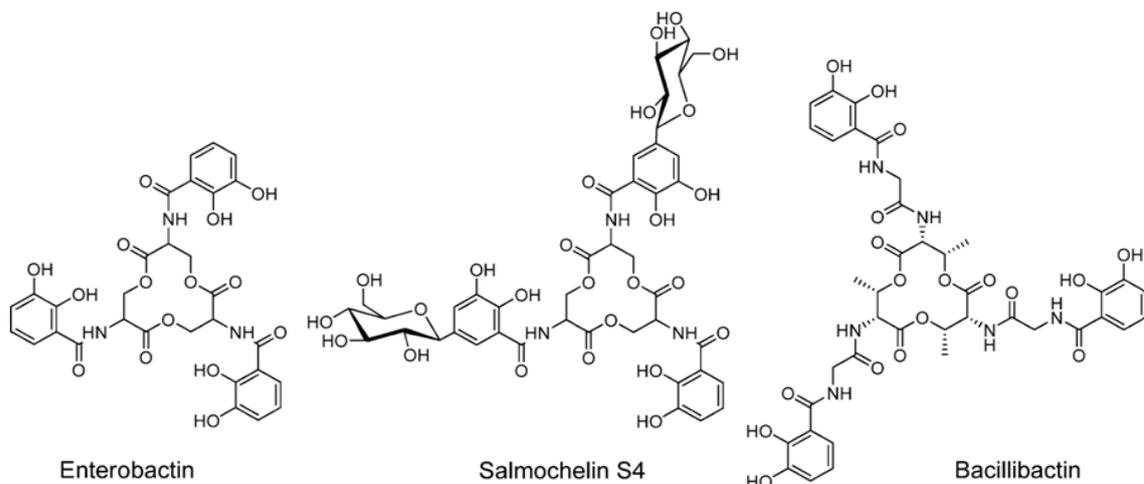


Figure 19: Structures de l'entérobactine, la salmochéline S4 et la bacillibactine (Sandy & Butler, 2009).

-Les hydroxamates-

Les acides hydroxamiques sont des composés organiques, de formule générale $R-CO-NH-OH$, représentant l'une des rares familles de composés d'origine biologique à posséder une liaison azote-oxygène dans leur groupement fonctionnel. Il en existe plusieurs types : les mono-, di- et tri-hydroxamates.

Parmi les monohydroxamates, on peut citer les acides aspergilliques isolés de différentes souches d'*Aspergillus*. Il existe également des dihydroxamates comme les mycobactines. Finalement, les trihydroxamates représentent la forme la plus stable où le fer trivalent est

coordonné à six atomes d'oxygène de trois fonctions hydroxamates, ce qui augmente ainsi leur affinité pour le fer (**Figure 20**).

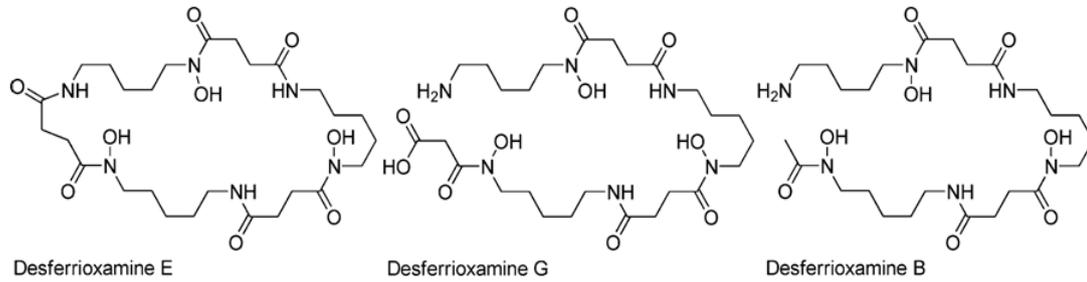


Figure 20 : Exemples de structure de trihydroxamates : lesferrioxamines (Sandy & Butler, 2009).

-Les carboxylates et fonctions mixtes-

Les carboxylates sont des molécules comportant à la fois des groupements fonctionnels hydroxyles et carboxyles. La rhizobactine est le premier sidérophore découvert représentatif de la famille des carboxylates. C'est le seul sidérophore pouvant être produit à la fois par les bactéries, les archées et les eucaryotes. D'autres sidérophores font également partie de cette famille telle que la vibrioferrine ou la staphyloferrine (**Figure 21**).

Pour finir, il y a beaucoup de sidérophores constitués de plusieurs fonctions chimiques différentes que l'on appelle les sidérophores à fonction mixte tels que l'aérobactine ou la pyoverdine (**Figure 21**).

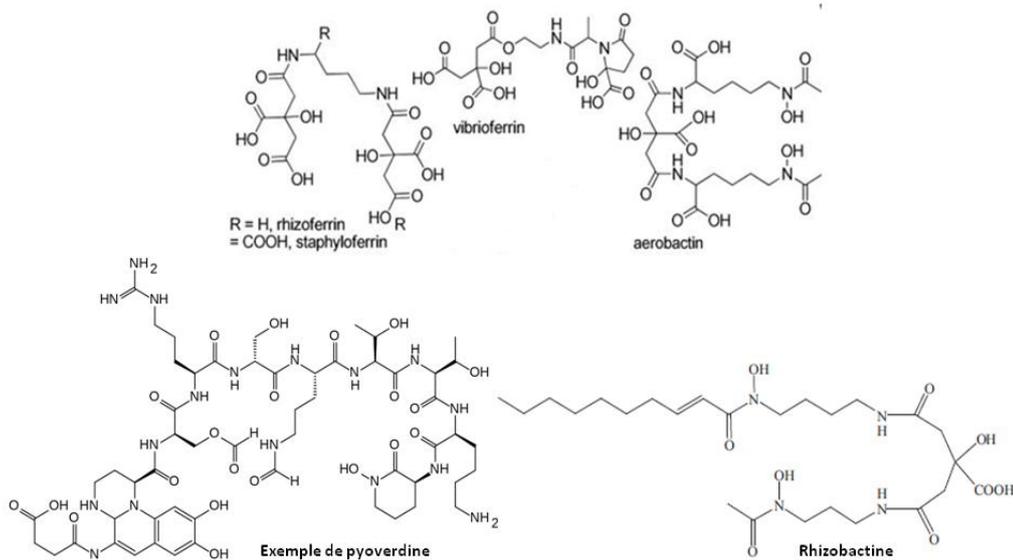


Figure 21 : Structure de sidérophores appartenant à la classe des carboxylates et des fonctions mixtes (adaptée à partir de Sandy & Butler, 2009).

-Méthodes de détection des sidérophores-

Les sidérophores ont longtemps été détectés par la mise en évidence des différentes fonctions chimiques chélatantes. Ces techniques présentent plusieurs inconvénients. Elles sont peu sensibles, ne sont pas liées au pouvoir chélatant de la molécule et surtout ne permettent pas d'identifier certains sidérophores à fonctions mixtes (Fekete, 1993 ; Pérez-Miranda et al., 2007). L'utilisation du chrome azurol S (CAS) (Figure 22) par Schwyn et Neilands (1987) a révolutionné l'étude des sidérophores.

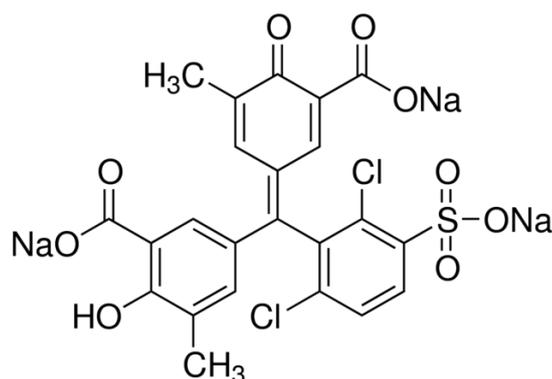


Figure 22: Structure chimique du chrome azurol S (CAS).

Cette technique est basée sur la compétition de complexation pour le fer entre le CAS et les sidérophores. En présence de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (HDTMA), qui est un surfactant, le CAS forme un complexe ternaire avec le fer possédant une couleur bleue intense. En présence d'un sidérophore, ce complexe disparaît ainsi que la couleur bleue associée. En milieu liquide, il est possible de suivre et de quantifier cette disparition par spectrophotométrie visible. Cette technique a été adaptée aux cultures en milieu solide. Un changement de couleur autour d'une colonie met en évidence la production de sidérophores (Pérez-Miranda et al., 2007).

1.2. Le fer dans l'eau de nuage

Le fer est émis dans l'atmosphère sous la forme de particules et va se retrouver dans les gouttelettes de nuage après dissolution de la fraction soluble (Hoffmann et al., 1997 ; Desboeufs et al., 2005 ; Valavanidis et al., 2006). Le fer est une espèce oxydante et très réactive en solution, jouant un rôle très important dans la chimie des nuages, en raison principalement de son impact sur la concentration et le cycle des radicaux tels que les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$) et hydroperoxydes ($\text{HO}_2\cdot$) ainsi que sur des molécules telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). On le retrouve dans les eaux atmosphériques principalement sous deux états d'oxydation, Fe(II) et Fe(III). Dans les gouttelettes de nuage, le fer(III) peut former différents complexes. Les ligands impliqués dans ces réactions de complexation peuvent être de nature variée : inorganiques (sulfate, nitrate ou chlorure, etc.) ou organiques

(acides oxalique, formique ou acétique, etc.). Encore aujourd'hui, une grande incertitude réside quant à ces réactions de complexation impliquant le fer(III). Actuellement les modèles de chimie atmosphérique considèrent le fer(III) complexé par de l'oxalate (Hermann et al., 2015); cependant il a été montré que la production des radicaux $\cdot\text{OH}$ dans l'eau de nuage ne peut pas être expliquée uniquement par la présence de complexe fer-oxalate (Bianco et al., 2015). Dans l'océan, le fer(III) est également complexé par des ligands organiques; certains sont des sidérophores, molécules chélatantes du fer, produits par des microorganismes marins (Gledhill & Buck, 2012, Sandy & Butler, 2009). De plus, les travaux de Cheize et al. (2012) ont mis en évidence dans des eaux de pluie la présence de fer(III) complexé par des ligands organiques avec de hautes constantes de complexation ($K > 10^{20}$ - 10^{22}) ; ce résultat est cohérent avec l'hypothèse de la présence de sidérophores. La présence de sidérophores dans les milieux aquatiques naturels est étayée par le fait que les microorganismes ont besoin de fer pour réaliser un grand nombre de processus biologiques tels que la synthèse d'acides aminés, le transport d'oxygène, la biosynthèse de l'ADN ou même la respiration. Il s'avère que dans un environnement aérobie, l'insolubilité du fer(III) représente une réelle limitation dans la biodisponibilité du fer (Sandy & Butler, 2009). Lors de carence en fer disponible, certains microorganismes vont produire des sidérophores pour extraire le fer de leur environnement proche sous forme d'ions Fe^{3+} et le transporter dans les cellules.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux nous a amené à proposer l'hypothèse suivante. Est-ce que les nuages abritent des microorganismes capables de produire des sidérophores afin de survivre dans ces milieux?

En effet, la pluie étant le résultat des phénomènes de collision-coalescence des gouttelettes de nuage, il serait cohérent de retrouver ce type de molécules également dans les eaux de nuage. Dans l'objectif de confirmer ou de réfuter cette hypothèse, nous avons effectué un large screening de 450 souches comprenant des bactéries et des levures, isolées de 37 prélèvements d'eau nuageuse collectée au sommet du puy de Dôme entre Juillet 2004 et Février 2014, pour leur capacité à produire des sidérophores. Pour cela, une méthode CAS (chrome azurol S) en milieu liquide a été utilisée, qui a été adaptée pour pouvoir travailler en microplaque 96 puits nous permettant de tester un grand nombre de souches simultanément. Ce test mis en place a permis une évaluation quantitative de la production de sidérophores ainsi qu'une détermination qualitative des groupements fonctionnels chélatants tels que les catéchols ou les hydroxamates. Il s'est avéré que 42% des souches microbiennes testées ont été capables de synthétiser des sidérophores. Ces résultats ont ensuite été discutés quant à leur potentiel impact sur la chimie des nuages.

2. Matériel et méthodes

2.1. Isolement et identification des souches microbiennes isolées d'eau de nuage

Les échantillonnages d'eaux de nuage ont été effectués à l'aide d'un impacteur, au sommet du puy de Dôme (1465 m, France) en essayant de conserver le mieux possible un environnement stérile. Au préalable, la partie amovible de l'impacteur a été stérilisée par autoclave (121°C, 20 min) avant chaque prélèvement de nuage tandis que la partie fixe a été rincée à l'alcool 70° juste avant les échantillonnages. Seuls les nuages non précipitants et non convectifs ont été échantillonnés. Le contenu physico-chimique des échantillons d'eau de nuage (acides organiques, H₂O₂, Fe(II), Fe(III), pH, *etc.*) ainsi que les paramètres biologiques (ATP, concentrations en bactéries et champignons, *etc.*) ont été caractérisés. De plus amples détails sur le site de prélèvement, les instruments et les méthodes d'échantillonnage sont donnés dans les travaux de [Deguillaume et al. \(2014\)](#).

Pour chaque échantillon d'eau de nuage, des volumes de 0,1 mL ont été étalés (en triplicat) sur des boîtes de Pétri contenant un milieu R2A (relativement faible en nutriments) (DIFCO) et incubés à l'obscurité dans des conditions aérobies à 5°C et 17°C, représentant les températures moyennes annuelles et maximales des prélèvements effectués au puy de Dôme. Généralement, les boîtes sont laissées en incubation 6 jours pour celles à 17°C et 10 jours pour celles à 5°C. Les colonies sont ensuite isolées et purifiées puis identifiées par séquençage de gène d'ARN ribosomique (16S ou 26S pour les bactéries et les champignons, respectivement) comme il l'a été décrit dans [Vaïtilingom et al. \(2012\)](#). Les souches utilisées dans ces travaux sont au nombre de 450 : 226 souches ont été décrites dans [Vaïtilingom et al. \(2012\)](#), 4 souches dans [Amato et al. \(2007\)](#) et 220 nouvelles souches sont décrites dans cette étude.

2.2. Produits chimiques utilisés

Les réactifs utilisés pour ces travaux sont listés ci-après : bromure d'hexadécyltriméthylammonium (HDTMA ; Sigma-Aldrich), chrome azurol S (CAS ; Acros Organics), chlorure de fer(III) hexahydraté (FeCl₃, 6H₂O ; Sigma-Aldrich), acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique (MES ; Fisher BioReagents), acide 5-sulfosalicylique dihydraté (C₇H₆O₆S, 2H₂O ; Merck), Chelex 100 (Sigma-Aldrich), acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA ; Fluka), DL-sérine hydroxamate (Sigma-Aldrich) et catéchol (Prolabo).

2.3. Conditions de croissance des microorganismes pour le screening des sidérophores

2.3.1. Pré-culture en microplaque 96 puits

Dans un premier temps, une pré-culture de chaque microorganisme testé pour ce screening a été réalisée en microplaque 96 puits, permettant de tester en parallèle un grand nombre de souches. Pour cela, 500 μL de R2A liquide ont été versés dans chacun des puits. Chaque puits a ensuite été ensemencé avec les souches conservées dans du glycérol à -80°C au laboratoire. La plaque a finalement été incubée à 17°C et sous agitation pendant 5 jours.

2.3.2. Repiquage des souches et production de sidérophores

Dans un deuxième temps, 25 μL de chaque pré-culture ont été prélevés et transvasés dans une plaque deepwell 96 puits (**Figure 23**). 500 μL d'une solution de R2A traité au Chelex 100 afin d'éliminer toute trace de fer et permettre ainsi la production de sidérophores, ont été ajoutés. Cette plaque a été incubée pendant 5 jours à 17°C et sous agitation.



Figure 23: Plaque deepwell 96 puits.

2.4. Mesure de la production de sidérophores

Après les 5 jours d'incubation, la plaque a été centrifugée 20 min à 3000 g. Dans chaque puits, 100 μL de surnageant ont été prélevés et transvasés dans une nouvelle plaque et 100 μL de réactif CAS ont été ajoutés. La préparation du réactif CAS est détaillée ci-dessous. Dans un premier temps, 60,5 mg de CAS ont été dissous dans 50 mL d'eau distillée. Sont ajoutés à cette solution de CAS, 10 mL d'une solution de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ à une concentration de 1 mM, préparée au préalable dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 10 mM. Pour finir, 72,9 mg de HDTMA ont été dissous, lentement pour éviter la formation d'une mousse dense, dans 40 mL d'eau distillée et ajoutés aux deux réactifs précédents. Cette solution est ensuite diluée par un facteur 5 dans une solution de tampon MES à une concentration de 0,5 M contenant 5 mM d'acide 5-sulfosalicylique. Le pH de la solution de tampon MES a été ajusté à 5,6 avec une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 50% ou avec quelques gouttes de HCl à 30% si le pH est trop basique.

La plaque a ensuite été homogénéisée et directement analysée. Des spectres ont été enregistrés dans le domaine du visible à l'aide d'un lecteur microplaque (Safire II, Tecan) toutes les 10 min pendant 1 h (**Figure 24**).

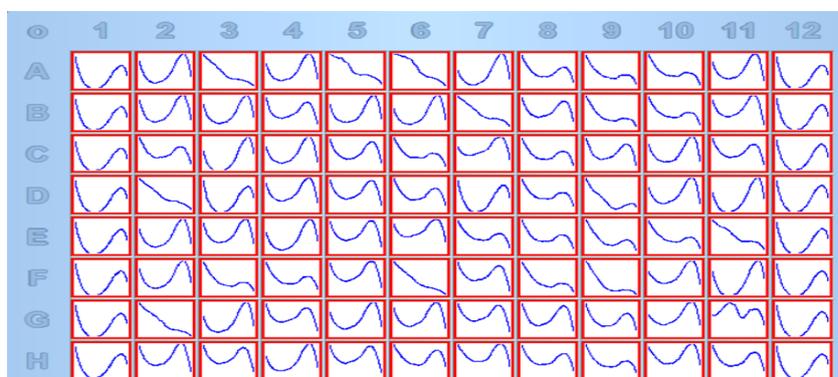


Figure 24: Spectres d'absorbance dans le visible obtenus grâce au lecteur de microplaque (Safire II, Tecan).

La présence de sidérophores a été observée par la diminution de l'absorbance à 650 nm tandis que les fonctions chimiques impliquées dans la chélation du fer ont été identifiées grâce à l'apparition de nouvelles bandes d'absorption (**Tableau 8**).

Tableau 8: Longueur d'onde maximale d'absorption (nm) de chaque groupement fonctionnel.

Fonction	Longueur d'onde absorbance maximale (nm)
Hydroxamate	420
Catéchol	530 ; 590 ; 620
Carboxylate	550 ; 590

3. Résultats

3.1. Introduction

Les résultats de ce chapitre de thèse sont déclinés sous la forme d'une publication parue dans *Environmental Science and Technology* :

V. VINATIER, N. WIRGOT, M. JOLY, M. SANCELME, M.ABRANTES, L. DEGUILLAUME, A.-M. DELORT

Siderophores in Cloud Waters and Potential Impact on Atmospheric Chemistry: Production by Microorganisms Isolated at the Puy de Dôme Station.

Environ. Sci. Technol., 2016, **50**, 9315-9323.

Ma participation dans ces travaux a consisté d'une part à terminer les expériences de screening (80 souches testées) qui avaient débutées avant mon arrivée en thèse, d'autre part à réaliser l'ensemble du traitement des données (analyse des résultats du screening,

analyses statistiques). J'ai également participé à l'écriture de la publication avec Anne-Marie Delort et Virginie Vinatier.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de :

▪ **3 Communications orales :**

N. WIRGOT, V. VINATIER, M. SANCELME, M. JOLY, M.ABRANTES, L. DEGUILLAUME, A.-M. DELORT

Production of siderophores by cloud microorganisms: occurrence and potential impact on cloud chemistry.

American Association for Aerosols Research (AAAR) 34th annual conference, Minneapolis (USA), 12-16 octobre 2015.

N. WIRGOT, V. VINATIER, M. SANCELME, M. JOLY, M.ABRANTES, L. DEGUILLAUME, A.-M. DELORT

Production of siderophores by cloud microorganisms: occurrence and potential impact on cloud chemistry.

EMEC 16, Turin (Italie), 30 novembre - 3 décembre 2015.

N. WIRGOT, I. CANET, V. VINATIER, M.TRAIKIA, M. SANCELME, P. ČAPEK, Y. UHLIARIKOVA, M. MATULOVA, A.-M. DELORT

Production de Biosurfactants et de Sidérophores par des microorganismes isolés des nuages.

11^{ème} Congrès de la SFM (Société Française de Microbiologie), Paris, 23-25 mars 2015.

▪ **1 Poster:**

V. VINATIER, N. WIRGOT, M. JOLY, M. SANCELME, M.ABRANTES, L. DEGUILLAUME, A.-M. DELORT

Production de sidérophores dans l'eau de nuage et impact potentiel sur la chimie du fer.

VII^{ème} Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne, Anglet, 4-6 novembre 2015.

▪ **2 Séminaires invités:**

A.-M. DELORT

Potential role of microorganisms in cloud chemistry.

Department of Environmental Sciences and Department of Biochemistry and Microbiology. Rutgers University, New Brunswick (USA), 14 octobre 2016.

A.-M. DELORT

Rôle potentiel des microorganismes dans la chimie des nuages.

Séminaires de l'ICSN et I2BC, Gif-sur-Yvette, 15 décembre 2016.

**3.2. "Siderophores in Cloud Waters and Potential Impact on
Atmospheric Chemistry: Production by Microorganisms Isolated
at the Puy de Dôme Station."**

Siderophores in Cloud Waters and Potential Impact on Atmospheric Chemistry: Production by Microorganisms Isolated at the Puy de Dôme Station

Virginie Vinatier,^{†,‡} Nolwenn Wirgot,^{†,‡} Muriel Joly,^{†,‡,§,||} Martine Sancelme,^{†,‡} Magali Abrantes,^{†,‡} Laurent Deguillaume,^{§,||} and Anne-Marie Delort^{*,†,‡}

[†]Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

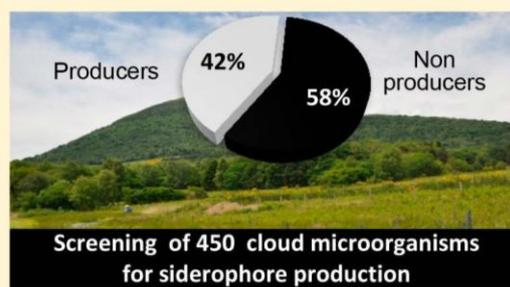
[‡]CNRS, UMR 6296, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), F-63171 Aubiere, France

[§]L'Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand (OPGC), Laboratoire de Météorologie Physique, Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^{||}CNRS, UMR 6016, L'Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand (OPGC), Laboratoire de Météorologie Physique (LaMP/OPGC), BP80026, F-63177 Aubière, France

S Supporting Information

ABSTRACT: A total of 450 bacteria and yeast strains isolated from cloud waters sampled at the puy de Dôme station in France (1465 m) were screened for their ability to produce siderophores. To achieve this, a high-throughput method in 96-well plates was adapted from the CAS (chrome azurol S) method. Notably, 42% of the isolates were siderophore producers. This production was examined according to the phyla of the tested strains and the type of chelating functional groups (i.e., hydroxamate, catechol, and mixed type). The most active bacteria in the clouds belong to the γ -Proteobacteria class, among which the *Pseudomonas* genus is the most frequently encountered. γ -Proteobacteria are produced in the majority of mixed function siderophores, such as pyoverdines, which bear a photoactive group. Finally, siderophore production was shown to vary with the origin of the air masses. The organic speciation of iron remains largely unknown in warm clouds. Our results suggest that siderophores could partly chelate Fe(III) in cloud waters and thus potentially impact the chemistry of the atmospheric aqueous phase.



1. INTRODUCTION

Iron plays a key role in cloud aqueous phase chemistry because it affects the concentrations and cycling of radicals (e.g., HO[•] and HO₂[•]) and oxidants such as H₂O₂. The reactions of reduced iron (Fe²⁺) with H₂O₂ (i.e., the Fenton reaction) and the photolysis of iron(III)–aqua complexes are considered to be important radical sources in the aqueous phase.¹ Additionally, iron could play a role in sulfate formation because Fe²⁺ may catalyze direct SO₂ oxidation by O₂. Moreover, it has been found that sulfate formation rates increase as a function of the direct and indirect iron feedbacks on oxidant budgets. Some measurements of speciated iron in the atmospheric condensed phase are available, but the availability of soluble/dissolved iron has not been fully characterized. These studies show that both Fe(II) and Fe(III) are present, even though the environment is highly oxidized. In the cloud aqueous phase, Fe(III) may be complexed by organic compounds. Thus, the presence of these iron complexes might reduce the amount of ions that are readily available to react with iron. In atmospheric cloud chemistry models, the iron–oxalate complex is used as a proxy

for organic complexes.^{2,3} Many studies have focused on oxalate quantifications and predictions because this compound is considered to be a tracer for aqueous phase processing. However, iron can be chelated by other organic ligands of biological origin^{4,5} in cloud waters such as EPS (exopolymers) or siderophores. Until now, the structure and complexing properties of organic ligands in the cloud aqueous phase have remained largely unknown, and their existence has yet to be firmly established.

In seawater, it has been shown that >99% of dissolved iron is chelated by organic ligands. Some of these ligands are of biological origin, including HS (humic substances), EPS, and siderophores.⁶ Siderophores are ligands with a very high affinity for iron (with very high complexing constants, i.e., $K > 10^{20}$) that are produced by microorganisms and excreted in the

Received: May 10, 2016

Revised: July 27, 2016

Accepted: August 1, 2016

Published: August 1, 2016

extracellular environment to chelate iron, making it bioavailable. The iron(III)–siderophore complex is then transported into the cell. This efficient system allows microorganisms to satisfy their essential iron requirement, which is a necessary ingredient in the active site of metalloenzymes such as mono- and dioxygenases or as an electron transfer agent in aerobic respiration. Siderophores encompass a diverse set of chemical structures, including three main types of structures that serve to chelate Fe(III): catechols, hydroxamates, and carboxylates. Some siderophores bear a specific type of chelating function whereas others can combine two or three types of function within the same molecule.^{6–8}

Recently, Cheize et al. have measured iron speciation in rainwater samples⁹ and demonstrated the presence of organic Fe-complexing ligands with very high stability constants ($K > 10^{20}$ – 10^{22}), which is consistent with the presence of siderophores observed in oceans. Rainwater is caused by the collision/coalescence of cloud droplets in a cloud system. As observed in seawater and rainwater, it is possible that some iron is also complexed in cloud waters. Recent results from Bianco et al.¹⁰ support this possibility; indeed, the photoreactivity of iron in cloudwater is less efficient than that calculated by cloud chemistry models, where iron is only considered to be complexed by oxalate.

Additionally, it has been shown that living microorganisms are present in cloud waters^{11–16} and, thus, potentially must acquire iron from this environment by synthesizing siderophores. Accordingly, some of this iron could be complexed in cloud waters by microbial siderophores.

To test this hypothesis, we have isolated 450 strains (of both bacteria and yeast) from 37 cloudwater samples collected at the puy de Dôme station between July 2004 and February 2014 (1465 m, France). These strains have been identified and screened for their laboratory production of siderophores. For this purpose, the CAS (chrome azurol S) method has been adapted for 96-well microplates to obtain a high-throughput detection method. This test permits a quantitative evaluation of siderophore production and a qualitative determination of the chelating functional groups (i.e., catechol, hydroxamate, and carboxylate). A total of 42% of the tested microbial isolates were able to produce siderophores. Our results are discussed in terms of the implication of the presence of siderophores in clouds on atmospheric chemistry.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Isolation and Identification of Microorganisms from Cloud Waters. Cloud water was collected using droplet impactors sterilized by an autoclave and installed on the summit of the puy de Dôme mountain. Triplicate volumes of 0.1 mL of cloudwater were plated on the low-nutrient R2A agar medium¹⁷ (DIFCO) and incubated at 17 or 5 °C in the dark under aerobic conditions until the appearance of colonies (typically 6 days at 17 °C or 10 days at 5 °C). Colonies were isolated and purified on R2A at 17 °C for further identification by rRNA gene sequencing (16S or 26S rRNA gene sequences for bacteria and yeasts, respectively), as described in Vaitilingom et al.¹⁵ In total, 226 strains were described in Vaitilingom et al.¹⁵, four strains were described in Amato et al.,¹⁸ and 220 strains are described in this study.

2.2. Chemicals. Hexadecyltrimethylammonium bromide ($\geq 98\%$, Sigma, HDTMA), chrome azurol S (AcrosOrganics, CAS), iron(III) chloride hexahydrate ($\geq 99\%$, Sigma), MES buffer ($\geq 98\%$, Fisher BioReagents), 5-sulfosalicylic acid

dihydrate ($>99.5\%$, Merck), ethylenediaminetetraacetic acid diammonium salt ($\geq 99.0\%$, Fluka, EDTA), DL-serine hydroxamate (Sigma), and catechol (Prolabo) were used without further purification.

2.3. Microbial Growth for Siderophore Screening. Microbial cells stored in glycerol at -80 °C were revived for 5 days at 17 °C in R2A broth in 96-deep-well plates. For siderophore production, 500 μ L of sterile Chelex 100 treated R2A broth in 96-deep-well plates were inoculated with 25 μ L of preculture and incubated at 17 °C for 5 days under agitation.

2.4. Measurement of Siderophore Production. The iron–CAS solution was obtained by slowly mixing a solution of 72.9 mg of HDTMA in 40 mL with a mixture of CAS (60.5 mg in 50 mL) and FeCl₃ (10 mL at 1 mM in 10 mM HCl). The resulting solution was diluted 5 times in a 0.5 M MES buffer (pH = 5.6) containing 5 mM of 5-sulfosalicylic acid.

After centrifugation of the culture media (20 min at 3000g), 100 μ L of the supernatants were mixed with 100 μ L of the CAS shuttle reagent and visible spectra were recorded on a microplate reader (Safire II, Tecan) every 10 min for 1 h. Pyoverdine used for calibration was produced by *Pseudomonas fluorescens* 36b5 (JF706526) in our laboratory.

3. RESULTS AND DISCUSSION

A total of 450 strains (of both bacteria and yeast) from 37 clouds were collected at the puy de Dôme station and identified (Supporting Information Table SM1). Major bacterial strains belong to the phylum Proteobacteria (48%), particularly the α - and γ -Proteobacteria classes (21% and 24%) and to the phylum Actinobacteria (25%). The phyla Bacteroidetes (4%) and Firmicutes (2%) are also represented, but to a lesser extent. Concerning the yeast strains, they are distributed between two phyla: Basidiomycota (20%) and Ascomycota (1%). Overall, the phylogeny of the strains isolated here is very consistent with that published previously by our group for strains isolated from the same sampling site.¹⁵

3.1. Production of Siderophores by the Cloud Microbial Isolates. To test a large number of strains for siderophore production an efficient high-throughput protocol has been developed. For siderophore detection, the CAS method¹⁹ was adapted to detect, quantify, and chemically characterize the siderophores in one step. The chelating functional groups hydroxamate, catechol, and carboxylate were characterized on the basis of the identification of specific absorption bands in the visible spectra obtained in the assay (SM). These bands were compared to those obtained with reference compounds in high concentration (Figure SM1). When several functional groups were present, the siderophores were classified as “mixed type”. This can result from the presence of a multifunctional siderophore or to the production of several molecules with different functional groups. The development of the method and identification of the absorption bands are further described in the SM section (Figures SM1, SM2, and SM3).

The 450 isolates from our cloud microbial bank have been tested with this adapted CAS method. Under these conditions, 58% of the strains did not produce any siderophore whereas 42% were able to produce siderophores (see Table SM1).

Production According to the Phylum and Genus. A detailed analysis of the siderophore production is presented according to the phylum of the tested strains (Figure 1). The main siderophore producers belong to the phylum Proteobacteria, with the major contribution arising from γ -Proteobacteria

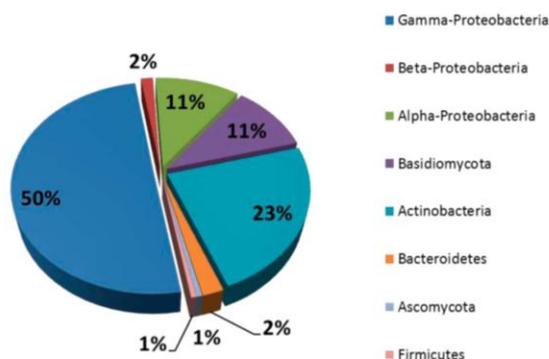


Figure 1. Siderophore producers: 42% of the 450 tested isolates. The distribution of these active strains are expressed as the percentage for each phylum.

(50%), followed by α -Proteobacteria (11%) and an essentially negligible (1%) contribution from β -Proteobacteria. Figure SM4 details the proportion of producing and nonproducing strains according to the genera of the α -, β -, and γ -Proteobacteria classes. The important point is that the α - and γ -Proteobacteria are mainly represented by the genera *Sphingomonas* and *Pseudomonas*, respectively, which are the most often encountered strains in cloud waters.¹⁵ Presently, these strains represent approximately half of the tested strains (i.e., 214 out of 450 strains). It is clear that strains belonging to the genus *Sphingomonas* are largely nonproducers whereas the *Pseudomonas* genus very actively produces siderophores.

Stenotrophomonas, *Erwinia*, and *Xanthomonas* genera, which are closely related to the *Pseudomonas* genus, are also active producers, but their number is limited. Another phylum of interest is Actinobacteria (Figure 1), which accounts for 23% of the siderophore-producing isolates. As opposed to Proteobacteria, the genera of Actinobacteria are more diverse, with the main genera being *Clavibacter*, *Rhodococcus*, *Frigoribacterium*, and *Curtobacterium*. Clearly, the percentage of activity depends on the genus (Figure SM5). The other bacterial phyla (i.e., Firmicutes and Bacteroidetes) represent a very low fraction of the active strains (1% and 2%, respectively). Among the yeasts, the Basidiomycota phylum only represents 11% of the siderophore-producing isolates. It is noteworthy that approximately 80% of the strains belonging to the genera *Dioszegia* and *Udeniomyces*, which are the most frequently found in cloud waters at the puy de Dôme station,¹⁵ are nonproducers of siderophores (Figure SM6). Finally, the yeast phylum Ascomycota represents less than 1% of the producers.

This work is the first to report a description of siderophore-producing microorganisms isolated from clouds. In addition, it is one of the few studies in which a very large collection of strains has been tested to give an overview of the ecosystem's biodiversity. Regarding the phylogeny, the only environmental ecosystem that has been studied in the literature is the rhizosphere. The proportion of siderophore-producing strains in the rhizospheric environment is variable, with 85% (354 tested isolates) in tobacco,²⁰ 36% (47 tested strains) in cotyledonous plants,²¹ and 23% (216 tested isolates) in Thailand rhizospheric soil.²² For a selection of 45 strains belonging to the Actinomycetes phylum (mainly *Streptomyces*) isolated from 16 medicinal plants in rhizospheric soils, 27%

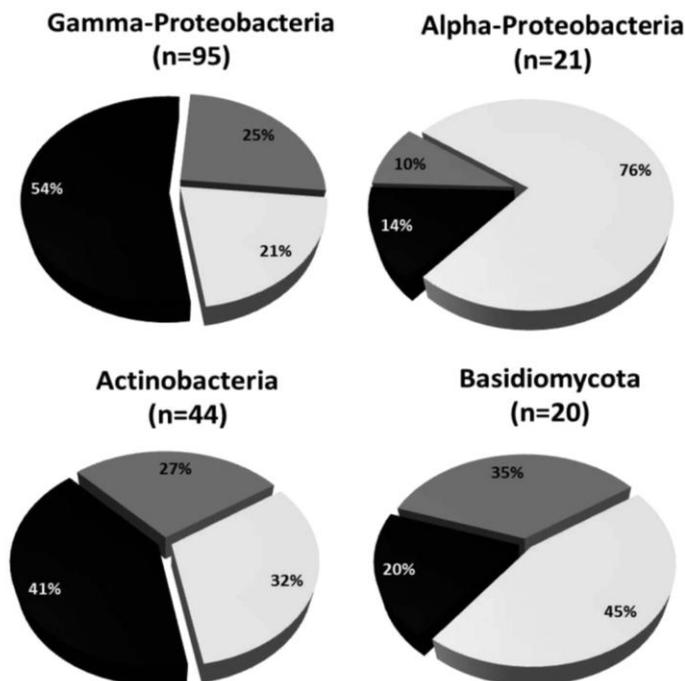


Figure 2. Distribution of siderophore types for each major phylum, with the percentage of mixed production (black), hydroxamate production (gray), and catechol production (white).

were found to be siderophore-producing.²³ Consequently, it can be concluded that, except for tobacco, the percentage of siderophore-producing strains is higher in cloud waters than in the rhizosphere. Tian et al. examined the biodiversity of tobacco rhizosphere,²⁰ concluding that siderophore-producing bacteria were present in 14 different genera. Notably, some of these genera are also producers in our cloud microbial bank, including *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, and *Stenotrophomonas*. These results indicate that the dominant siderophore-producing species in the rhizosphere belong to the *Pseudomonas* genus (75% of the producing isolates), confirming the results of Alexander and Zuberer.²⁴ Similarly, we also found the genus *Pseudomonas* to be predominant and the highest siderophore producer in clouds.

We note that this work is the first to report detailed data in environmental ecosystems with siderophore-producing yeasts. The relevant literature in this area is rather scarce, and yeasts generally appear to be nonproducers of siderophores.^{25,26} The paper of Sullivan et al. refers to the production of siderophore by fungi on African dust, but it does not make reference to the yeast phyla and genera.²⁷

Production According to the Type of Siderophore. Siderophore structures are exceptionally diverse, with many of their structures unknown. However, they share common functional groups such as catecholate, hydroxamate, and carboxylate, which chelate Fe(III). Some siderophores, such as desferrioxamines, contain only the hydroxamate functional group; enterobactin and bacillibactin contain only catechols; and other siderophores, such as aerobactin and pyoverdine, for instance, can combine different functional groups.⁸ The screening of our cloud microbial bank (Table SM1) showed that, among the 192 siderophore-producing strains, 38% of them produce pure catechol, 18% produce pure hydroxamate, and 44% produce mixed type siderophores. In the last category, several functional groups are present. With our technique, however, it was not possible to determine if these functional groups are present on the same or different molecules. Our tests did not reveal the presence of pure carboxylate functional groups as a chelating group, though it was present in the mixed type siderophores.

Figure 2 presents the percentage of siderophores bearing catechol, hydroxamate, and mixed functional groups produced by the main active phyla. γ -Proteobacteria primarily produce mixed functional group siderophores (54%) but also produce siderophores with catechols (21%) and hydroxamates (25%). Actinobacteria primarily produce mixed functional group siderophores, albeit to a lower extent (41%), followed by a relatively higher proportion of catechols (32%) and similar proportion of hydroxamates (27%). This trend is even more pronounced for Basidiomycota (20% of mixed, 35% of hydroxamate, and 45% of catechols). Finally, α -Proteobacteria mainly produce catechols (76%), with relatively low proportions of mixed type and hydroxamates (14% and 10%, respectively).

Sullivan et al. examined the production of catechols, hydroxamate, and carboxylate siderophores using 392 microorganisms isolated from aerosols collected in Africa.²⁷ They showed that 37% were nonproducers whereas the majority of the strains produced carboxylate siderophores (45%), with hydroxamate and catechol siderophores accounting for just 9% each. This situation is quite different to what we observed in cloud waters where no pure carboxylate siderophores were detected. Moreover, catechol siderophore production was

higher (38%), with a large proportion of mixed ligands (44%). This difference could be explained by misinterpretation between carboxylate and mixed type siderophores in the visual examination of the O-CAS assay. Pérez-Miranda et al.²⁸ obtained a yellow color for siderophores that did not respond to the classical chemical assays that could indicate the presence of the mixed type siderophore pyoverdine. Additionally, they described a slightly yellow color with carboxylate siderophores similar to the culture media. It is possible that these similar colorations may have been misinterpreted in the Sullivan study. In our work, several strains gave an intense yellow coloration that was attributed to hydroxamate or mixed type siderophores on account of their visible spectra. Lee et al. studied the production of siderophores by Actinomycetes from different soil sites in Australia.²⁹ Of the 112 tested isolates, this group found 77–86% active species. Further, all of the active strains produced hydroxamate siderophores and 3–17% co-produced catechol siderophores. Khamna et al. also studied the production of siderophores using 11 Actinomycetes isolates from plant rhizospheric soils²³ and found that all of them produced hydroxamate siderophores and 3 of them co-produced catechol siderophores. In our study, we obtained similar results; Actinomycetes are mainly represented by eight strains belonging to the genus *Streptomyces*, of which three are active and produce hydroxamates (Table SM1).

Instead of using the CAS method, which is a general and quantitative approach to detect the typical functional groups of siderophores, other studies have used more targeted and partial approaches to identify specific structures. For instance, one can combine coupled UV–vis/HPLC analysis or LC-MS of the extracted siderophores and match the UV–vis or MS spectra with those of siderophores with known structures (or eventually their precursor or breakdown structures). This approach was applied on soil samples²⁹ and in a marine environment.⁶ In this later case, seawater samples were directly extracted and the siderophores concentrated and analyzed.³⁰ In a recent study, molecular biology was used to detect the genes involved in a specific photoactive siderophore synthesis in seawater.³¹

3.2. Correlation of Siderophore Production with the Origin of Clouds. The screened microbial strains in this study were isolated from 37 cloud events that can be classified according to the air mass origins (i.e., West, North-West/North, North-East, and South-West/South) evaluated from their back-trajectory. Figure SM7 shows that 12 events originated from the North-West/North (88 strains), two events originated from the North-East (31 strains), six events originated from the South-West/South (59 strains), and 17 events originated from the West (272 strains).

A χ^2 statistical approach showed a clear correlation between the number of producing versus nonproducing siderophore strains with the air mass origin of the clouds (P value = 4.95×10^{-7}).

To better understand this correlation, Figure 3A presents the distribution of the different phyla according to the origin of the air masses, and Figure 3B shows the proportion of active and nonactive strains in clouds from these origins. As seen, the relative percentage of the four main phyla (i.e., α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Actinobacteria, and Basidiomycota) varies with the origin of the air masses. The important point to consider is the total percentage of (α -Proteobacteria + Basidiomycota) strains, which are mainly nonactive producers (see Figure 1) compared to the total percentage of the (γ -

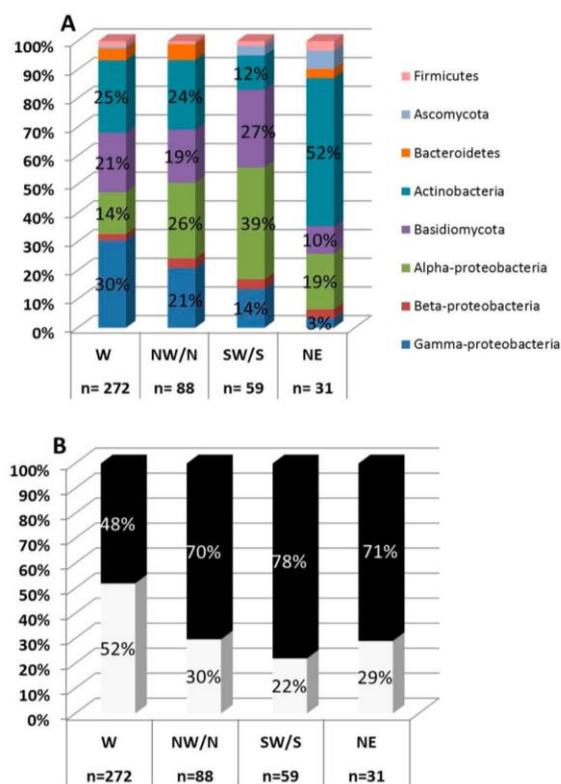


Figure 3. (A) Distribution of strains as a function of their air mass origin. (B) Distribution of siderophore-producing microbial strains as a function of their air mass origin. Percentage of nonactive strains (black) and active strains (white). n = number of strains for each origin.

Proteobacteria + Actinobacteria) strains, which are generally active. For example, the percentage of α -Proteobacteria and Basidiomycota (66%) is much higher in clouds from SW/S compared to the percentage of those from the W origin (35%). As a consequence (Figure 3B), a higher proportion of nonactive strains are present in the SW/S clouds (78%) compared to the W clouds (48%). This is also true when the W clouds are compared to the NW/N clouds, but to a lesser extent. The NE clouds contain fewer active strains (29%) than the W clouds (52%), which may suggest why there are much less γ -Proteobacteria than Actinobacteria in the NE clouds; indeed, we have shown that γ -Proteobacteria had the highest percentage of siderophore-producing strains (Figure 1). Using the multivariate statistical analysis MCA (multiple correspondence analysis), we confirmed that the majority of the producing strains came from the West, while the strains coming from the North-East, from the North-West/North, and especially from the South-West/South were mostly nonproducers.

We also analyzed the distribution of active strains expressed according to their phyla in the different types of clouds (Figure 4A) and the corresponding type of siderophores produced according to the air mass origin (Figure 4B). First, it appears that the active strain compositions of clouds originating from the W and NW/N are rather similar, with a majority of γ -Proteobacteria. Likewise, the percentages of the different types

of siderophore are similar in these two air masses. In contrast, the active strain composition of the NE clouds is very different from that of the W and NW/N clouds. In this case, the amount of γ -Proteobacteria is very low in the NE clouds relative to the other clouds. Mixed function siderophores are essentially absent in the NE clouds whereas they account for 50% of the siderophore type in the W and NW/N clouds. These results are highly consistent with the fact that γ -Proteobacteria is the major phylum that produces mixed function siderophores (Figure 2). Finally, the SW/S clouds contain strains that produce a high proportion of catechol siderophores compared to the other clouds, which is primarily because of the higher proportion of the active catechol siderophore-producing α -Proteobacteria that are present (Figure 2). Additionally, the percentage of mixed function siderophores is slightly lower in the SW/S clouds than in the W and NW/N clouds, which reflects the lower proportion of γ -Proteobacteria.

These results reflect the influence of the air mass origin on the microbial composition of the different clouds and on the siderophore production. The majority of the strains present in the clouds are from the phyllosphere, particularly the Proteobacteria phylum, which includes the *Pseudomonas* (γ -Proteobacteria) and *Sphingomonas* (α -Proteobacteria) genera. Depending on the type of vegetation, different types of microorganisms can be aerosolized and transported in different air masses. The map presented in Figure SM7 shows that the type of vegetation (i.e., forests, grasslands and crops, intensive cultures, and vineyards) is different in the W, NW/N, SW/S, and NE regions of France and can thus impact the distribution of microbial phyla in clouds. Additional influences can be considered, including the Atlantic Ocean for the W and NW/N air masses, the Saharan or Mediterranean regions for the SW/S air masses, and the urban and polluted areas for the NE air masses. Our results suggest a biogeography of siderophore production, although more data must be collected to support this claim. Still, we note that such geographical influence has been observed previously. For instance, Sullivan et al.²⁷ showed that aerosols collected under African dust conditions contained more siderophore-producing strains (65%) than those collected during non-African dust conditions (25%), as supported from air mass back-trajectory analyses. Further, Baakza et al.³² found that fungi of terrestrial origin produced higher amounts of siderophores compared to those from marine habitats.

3.3. Potential Impact of the Occurrence of Siderophores on Cloud Chemistry. The results obtained from the screening of our cloud microbial bank showed that approximately 42% of the tested strains were able to produce siderophores. We also showed that strains belonging to the *Pseudomonas* genus, which is the major group found in warm clouds, were particularly active, with 90% of them being producers. The strains from this genus are well-known for producing mixed function siderophores such as pyoverdines, which contain both hydroxamate and catechol functional groups.³³ Notably, such results have never been reported in such an environment previously and with such a high number of microbial isolates. Although preliminary, our results suggest the eventual presence of siderophores in warm and tropospheric cloud waters as chelates of Fe(III). This speculative hypothesis is supported by the following arguments.

First, the presence of organic Fe(III)-complexing ligands with very high stability constants ($\log K = 21.1-22.8$), which is consistent with the presence of siderophores, have been demonstrated in rainwaters using cathodic stripping voltam-

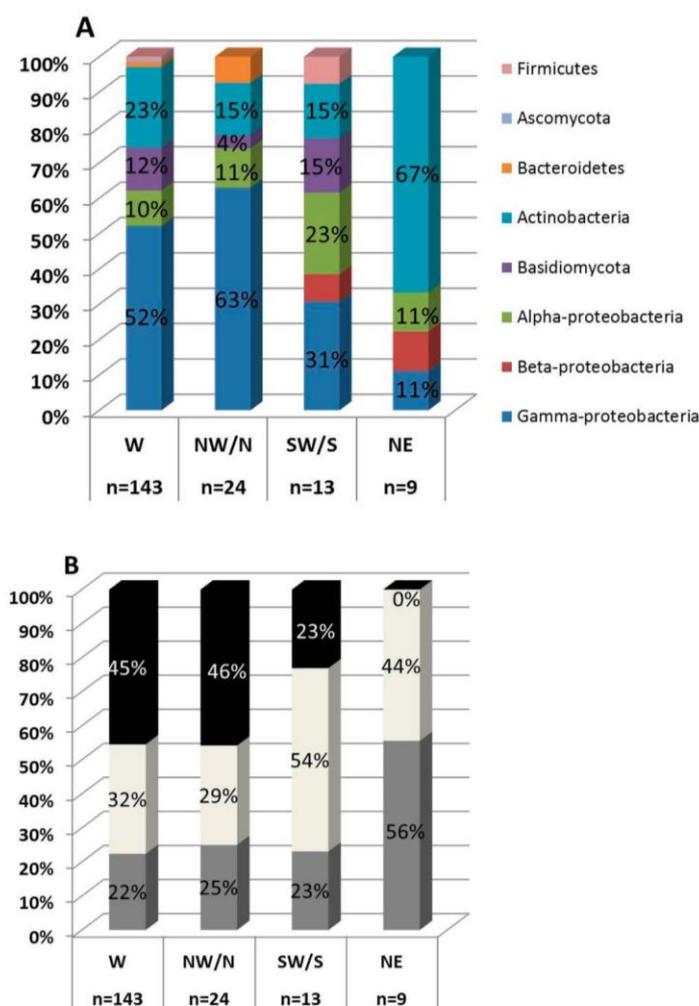


Figure 4. (A) Distribution of active strains as a function of their air mass origin. (B) Distribution of siderophore types as a function of their air mass origin. Percentage of mixed production (black), hydroxamate production (gray), and catechol production (white). *n* = number of active strains for each origin.

metry.⁹ The measured concentrations of these ligands are in the range of 0.104–0.366 μM equivalent of Fe(III), and the dissolved Fe (dFe) concentrations are in the range of 0.073–0.988 μM . Measurements of dissolved iron concentration in cloud samples are in a similar order of magnitude (μM) and are much more concentrated than in seawater (nM). Because rain results from the collision/coalescence of cloud droplets, we can estimate to a first approximation that the siderophore concentration is at least in a similar order of magnitude (μM). To confirm this hypothesis, the presence of siderophores should be assayed directly on cloudwater using the same method. Another strategy developed by Gledhill and co-workers for ocean waters could also be used.^{34,35} In this case, the authors enriched marine samples with nutrients. These additional sources of carbon and/or nitrogen permitted an increase in the number of microbial cells, which increased the siderophore production and hence the detection of the selected types. Similarly, cloudwater samples could also be nutrient enriched to facilitate siderophore detection.

In cloudwater samples, microorganisms have been shown to be metabolically active by direct in situ measurement of ATP (adenosine triphosphate) or CTP (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) without any cultivation.^{15,16,18} Microorganisms can survive in clouds because they can endure strong atmospheric stresses such as cold, strong oxidants like H_2O_2 , UV radiation, freeze–thaw cycles, and evaporation–condensation cycles.³⁶ They can also use carbon and nitrogen sources present in cloud waters or grow even at low temperature.^{37,38} Iron is a key element for microbial activity (e.g., respiration and other redox mechanisms),⁸ so microorganisms must uptake iron from cloudwater. For this reason, such microorganisms can produce and excrete siderophores. Fe(III)–siderophore complexes are then transported into the bacterial cell. Some microbial strains are unable to produce siderophores but they can utilize Fe(III)–siderophores produced by other cells, assimilating them from the medium or directly capturing Fe(II).³⁶ This behavior is consistent with the presence of producing and nonproducing strains among the cloud micro-

organisms presently examined. Laboratory experiments have shown that various strains of *Pseudomonas fluorescens* were able to produce pyoverdine in the first 24 h of culture in a minimum medium (Figure S18). As the residence time of microorganisms in the atmosphere was modeled between 2 and 10 days,³⁹ these metabolically active microorganisms are likely to synthesize siderophores in clouds. In addition, it cannot be excluded that siderophores can be synthesized on the ground and then aerosolized.

Finally, cloud environments are very favorable for siderophore production. Indeed, iron uptake mechanisms are very complex and highly regulated; an important factor is the amount of Fe(III) available in the medium, with siderophore induction being most effective when this concentration is below 10 μM . Siderophore production is also highly favored by exposure to atmospheric stress.²⁷ Of course, these two factors are present in clouds.

The occurrence of siderophores may also have an impact on the chemistry of iron itself in the aqueous phase of clouds. It is currently understood that iron plays a key role in the radical chemistry of the atmospheric liquid phases via the production of HO \cdot radicals by the photolysis of iron(III) complexes and via the redox chemistry of iron with HO $_2\cdot$ /O $_2\cdot$ radicals and H $_2$ O $_2$. In addition, iron catalyzes the sulfur(IV) to sulfur(VI) oxidation by dissolved oxygen in the atmospheric aqueous phase. These reactions are applied in cloud chemistry models, and the ability of iron to control the oxidative budget of the cloud aqueous phase is only modulated by the presence of oxalate, which complexes iron.² Until now, however, the nature of the complexing ligands in cloud waters has remained unknown. Siderophores may be an organic complexing agent such as those observed in the ocean and rainwaters. The very high stability constants of siderophores would make them very competitive toward oxalate⁴⁰ or other organic acids⁴¹ (e.g., acetic acid, formic acid, and so on.) because the concentration of siderophores could be in the range from 0.1 to a few μM . Some siderophores are of special importance for atmospheric photochemistry because they possess photoactive groups; for example, pyoverdines or pyochelins contain a chromophore. These mixed function siderophores are typically produced by *Pseudomonas* strains, which are the dominant siderophore-producing strains in clouds. To date, no studies have been performed to examine the photochemistry of siderophores in cloud waters, though such research has been studied in oceanic systems.⁴² Some siderophores produced by marine bacteria (e.g., aquachelins, vibrioferrin, petrobactin, and aerobactin, etc.) carry an α -hydroxycarboxylate group that is photoreactive.⁷ Barbeau et al.⁴³ studied the photochemical reactivity of aquachelins and showed that Fe(III) was reduced to Fe(II) and a portion of the initial ligand was transformed to a photoproduct that could still chelate Fe(III), though less efficiently. Additionally, Amin et al. investigated the photolysis of vibrioferrin. In that case, the Fe(III) complex was completely destroyed and the photoproduction of Fe(II) was very efficient.⁴⁴ Although these photoreactive siderophores have a very short lifetime and are thus difficult to quantify directly in the photic zone of the ocean, a recent study by Gardes et al.³¹ showed that such siderophores were present in this zone by measuring the number of gene copies coding for these compounds. The copy numbers of the genes coding for vibrioferrin synthesis were more abundant by 1–2 orders of magnitude in the photic zone compared to the rest of the water column, altogether these studies demonstrate the importance of

photolysis of these siderophores and their involvement in iron chemistry and its oceanic cycle.

In conclusion, the organic speciation of iron remains largely unknown in warm clouds. Although preliminary, our results suggest that Fe(III) could be partly chelated by siderophores in addition to organic acids (mainly oxalate) or other macromolecules. The presence of siderophores has been demonstrated in rainwater which closely represents atmospheric media. Our hypothesis is that the production of siderophores can impact the iron cycling in clouds and therefore its oxidative capacity. A noteworthy result concerns photoactive siderophores, such as pyoverdines produced by *Pseudomonas* strains, which represent the major siderophore producer in warm clouds. These siderophores can be phototransformed, leading to the reduction of Fe(III) to Fe(II), as has been observed in the photic zone of the oceans. Such reactivity would influence all of the reactions involving iron species, particularly the Fenton reactions that occur in clouds. This reactivity could eventually be modulated by the type and abundance of siderophores present in cloud waters.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Supporting Information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org/>. The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.est.6b02335.

Details including elements of phylogeny, CAS assay modification, and siderophore quantitation, (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: 00 33 473 40 77 14; email: A-Marie.delort@univ-bpdermont.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge financial support from the Regional Council of Auvergne, from the Observatoire de Physique du Globe de Clermont-Ferrand (OPGC), from the "Fédération de Recherche en Environnement" through the CPER "Environnement" funded by the "Région Auvergne," the French government, FEDER from the European community, and the CNRS program EC2CO and the ANR BIOCAP.

■ REFERENCES

- (1) Deguillaume, L.; Charbouillot, T.; Joly, M.; Vaitilingom, M.; Parazols, M.; Marinoni, A.; Amato, P.; Delort, A.-M.; Vinatier, V.; Flossmann, A.; et al. Classification of Clouds Sampled at the Puy de Dôme (France) Based on 10 Yr of Monitoring of Their Physicochemical Properties. *Atmos. Chem. Phys.* **2014**, *14* (3), 1485–1506.
- (2) Long, Y.; Charbouillot, T.; Brigante, M.; Mailhot, G.; Delort, A.-M.; Chaumerliac, N.; Deguillaume, L. Evaluation of Modeled Cloud Chemistry Mechanism against Laboratory Irradiation Experiments: The HxOy/iron/carboxylic Acid Chemical System. *Atmos. Environ.* **2013**, *77*, 686–695.
- (3) Weller, C.; Tilgner, A.; Bräuer, P.; Herrmann, H. Modeling the Impact of Iron–Carboxylate Photochemistry on Radical Budget and Carboxylate Degradation in Cloud Droplets and Particles. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (10), 5652–5659.

- (4) Herckes, P.; Valsaraj, K. T.; Collett, J. L. A Review of Observations of Organic Matter in Fogs and Clouds: Origin, Processing and Fate. *Atmos. Res.* **2013**, *132–133*, 434–449.
- (5) Herrmann, H.; Schaefer, T.; Tilgner, A.; Styler, S. A.; Weller, C.; Teich, M.; Otto, T. Tropospheric Aqueous-Phase Chemistry: Kinetics, Mechanisms, and Its Coupling to a Changing Gas Phase. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 4259–4334.
- (6) Gledhill, M.; Buck, K. N. The Organic Complexation of Iron in the Marine Environment: A Review. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 69.
- (7) Vraspir, J. M.; Butler, A. Chemistry of Marine Ligands and Siderophores. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **2009**, *1*, 43.
- (8) Sandý, M.; Butler, A. Microbial Iron Acquisition: Marine and Terrestrial Siderophores. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (10), 4580–4595.
- (9) Cheize, M.; Sarthou, G.; Croot, P. L.; Bucciarelli, E.; Baudoux, A.-C.; Baker, A. R. Iron Organic Speciation Determination in Rainwater Using Cathodic Stripping Voltammetry. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *736*, 45–54.
- (10) Bianco, A.; Passananti, M.; Perroux, H.; Voyard, G.; Mouchel-Vallon, C.; Chaumerliac, N.; Mailhot, G.; Deguillaume, L.; Brigante, M. A Better Understanding of Hydroxyl Radical Photochemical Sources in Cloud Waters Collected at the Puy de Dôme Station: Experimental vs. Modeled Formation Rates. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.* **2015**, *15* (10), 13923–13955.
- (11) Delort, A.-M.; Vaitilingom, M.; Amato, P.; Sancelme, M.; Parazols, M.; Mailhot, G.; Laj, P.; Deguillaume, L. A Short Overview of the Microbial Population in Clouds: Potential Roles in Atmospheric Chemistry and Nucleation Processes. *Atmos. Res.* **2010**, *98* (2–4), 249–260.
- (12) Kourtev, P. S.; Hill, K. A.; Shepson, P. B.; Konopka, A. Atmospheric Cloud Water Contains a Diverse Bacterial Community. *Atmos. Environ.* **2011**, *45* (30), 5399–5405.
- (13) Després, V. R.; Huffman, J. A.; Burrows, S. M.; Hoose, C.; Safatov, A. S.; Buryak, G.; Fröhlich-Nowoisky, J.; Elbert, W.; Andreae, M. O.; Pöschl, U.; Jaenicke, R.; et al. Primary Biological Aerosol Particles in the Atmosphere: A Review. *Tellus, Ser. B* **2012**, *64*, 15598.
- (14) Šantl-Temkiv, T.; Finster, K.; Dittmar, T.; Hansen, B. M.; Thyrhaug, R.; Nielsen, N. W.; Karlson, U. G. Hailstones: A Window into the Microbial and Chemical Inventory of a Storm Cloud. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e53550.
- (15) Vaitilingom, M.; Attard, E.; Gaiani, N.; Sancelme, M.; Deguillaume, L.; Flossmann, A. L.; Amato, P.; Delort, A.-M. Long-Term Features of Cloud Microbiology at the Puy de Dôme (France). *Atmos. Environ.* **2012**, *56* (0), 88–100.
- (16) Vaitilingom, M.; Deguillaume, L.; Vinatier, V.; Sancelme, M.; Amato, P.; Chaumerliac, N.; Delort, A.-M. Potential Impact of Microbial Activity on the Oxidant Capacity and Organic Carbon Budget in Clouds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (2), 559–564.
- (17) Reasoner, D. J.; Geldreich, E. E. A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *49* (1), 1–7.
- (18) Amato, P.; Parazols, M.; Sancelme, M.; Laj, P.; Mailhot, G.; Delort, A.-M. Microorganisms Isolated from the Water Phase of Tropospheric Clouds at the Puy de Dôme: Major Groups and Growth Abilities at Low Temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2007**, *59* (2), 242–254.
- (19) Schwyn, B.; Neilands, J. B. Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Anal. Biochem.* **1987**, *160* (1), 47–56.
- (20) Tian, F.; Ding, Y.; Zhu, H.; Yao, L.; Du, B. Genetic Diversity of Siderophore-Producing Bacteria of Tobacco Rhizosphere. *Braz. J. Microbiol.* **2009**, *40* (2), 276–284.
- (21) Laslo, É.; György, É.; Mara, G.; Tamás, É.; Ábrahám, B.; Lányi, S. Screening of Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Potential Microbial Inoculants. *Crop Prot.* **2012**, *40*, 43–48.
- (22) Chaihan, M.; Chunhaleuchanon, S.; Lumyong, S. Screening Siderophore Producing Bacteria as Potential Biological Control Agent for Fungal Rice Pathogens in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25* (11), 1919–1928.
- (23) Khamna, S.; Yokota, A.; Lumyong, S. Actinomycetes Isolated from Medicinal Plant Rhizosphere Soils: Diversity and Screening of Antifungal Compounds, Indole-3-Acetic Acid and Siderophore Production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25* (4), 649–655.
- (24) Alexander, D. B.; Zuberer, D. A. Use of Chrome Azurol S Reagents to Evaluate Siderophore Production by Rhizosphere Bacteria. *Biol. Fertil. Soils* **1991**, *12* (1), 39–45.
- (25) Renshaw, J. C.; Robson, G. D.; Trinci, A. P. J.; Wiebe, M. G.; Livens, F. R.; Collison, D.; Taylor, R. J. Fungal Siderophores: Structures, Functions and Applications. *Mycol. Res.* **2002**, *106* (10), 1123–1142.
- (26) Neilands, J. B. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (45), 26723–26726.
- (27) Sullivan, T. S.; Ramkissoon, S.; Garrison, V. H.; Ramsubhag, A.; Thies, J. E. Siderophore Production of African Dust Microorganisms over Trinidad and Tobago. *Aerobiologia* **2012**, *28*, 391–401.
- (28) Pérez-Miranda, S.; Cabirol, N.; George-Téllez, R.; Zamudio-Rivera, L. S.; Fernández, F. J. O-CAS, a Fast and Universal Method for Siderophore Detection. *J. Microbiol. Methods* **2007**, *70* (1), 127–131.
- (29) Lee, J. C.; Postmaster, A.; Soon, H. P.; Keast, D.; Carson, K. C. Siderophore Production by Actinomycetes Isolates from Two Soil Sites in Western Australia. *BioMetals* **2012**, *25* (2), 285–296.
- (30) Velasquez, L.; Nunn, B. L.; Ibsanmi, E.; Goodlett, D. R.; Hunter, K. A.; Sander, S. G. Detection of Hydroxamate Siderophores in Coastal and Sub-Antarctic Waters off the South Eastern Coast of New Zealand. *Mar. Chem.* **2011**, *126* (1–4), 97–107.
- (31) Gärdes, A.; Triana, C.; Amin, S. A.; Green, D. H.; Romano, A.; Trimble, L.; Carrano, C. J. Detection of Photoactive Siderophore Biosynthetic Genes in the Marine Environment. *BioMetals* **2013**, *26* (3), 507–516.
- (32) Baakza, A.; Vala, A. K.; Dave, B. P.; Dube, H. C. A Comparative Study of Siderophore Production by Fungi from Marine and Terrestrial Habitats. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2004**, *311* (1), 1–9.
- (33) Visca, P.; Imperi, F.; Lamont, I. L. Pyoverdine Siderophores: From Biogenesis to Biosignificance. *Trends Microbiol.* **2007**, *15* (1), 22–30.
- (34) Gledhill, M.; McCormack, P.; Ussher, S.; Achterberg, E. P.; Mantoura, R. F. C.; Worsfold, P. J. Production of Siderophore Type Chelates by Mixed Bacterioplankton Populations in Nutrient Enriched Seawater Incubations. *Mar. Chem.* **2004**, *88* (1–2), 75–83.
- (35) Mawji, E.; Gledhill, M.; Milton, J. A.; Zubkov, M. V.; Thompson, A.; Wolff, G. A.; Achterberg, E. P. Production of Siderophore Type Chelates in Atlantic Ocean Waters Enriched with Different Carbon and Nitrogen Sources. *Mar. Chem.* **2011**, *124* (1–4), 90–99.
- (36) Kosman, D. J. Molecular Mechanisms of Iron Uptake in Fungi. *Mol. Microbiol.* **2003**, *47* (5), 1185–1197.
- (37) Sattler, B.; Puxbaum, H.; Psenner, R. Bacterial Growth in Supercooled Cloud Droplets. *Geophys. Res. Lett.* **2001**, *28* (2), 239–242.
- (38) Amato, P.; Parazols, M.; Sancelme, M.; Mailhot, G.; Laj, P.; Delort, A. M. An Important Oceanic Source of Micro-Organisms for Cloud Water at the Puy de Dôme (France). *Atmos. Environ.* **2007**, *41* (37), 8253–8263.
- (39) Burrows, S. M.; Elbert, W.; Lawrence, M. G.; Pöschl, U. Bacteria in the Global Atmosphere – Part 1: Review and Synthesis of Literature Data for Different Ecosystems. *Atmos. Chem. Phys.* **2009**, *9* (23), 9263–9280.
- (40) Weller, C.; Horn, S.; Herrmann, H. Effects of Fe(III)-Concentration, Speciation, Excitation-Wavelength and Light Intensity on the Quantum Yield of iron(III)-Oxalato Complex Photolysis. *J. Photochem. Photobiol., A* **2013**, *255*, 41–49.
- (41) Weller, C.; Horn, S.; Herrmann, H. Photolysis of Fe(III) Carboxylate Complexes: Fe(II) Quantum Yields and Reaction Mechanisms. *J. Photochem. Photobiol., A* **2013**, *268*, 24–36.
- (42) Barbeau, K. Photochemistry of Organic Iron(III) Complexing Ligands in Oceanic Systems. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82* (6), 1505–1516.

- (43) Barbeau, K.; Rue, E. L.; Bruland, K. W.; Butler, A. Photochemical Cycling of Iron in the Surface Ocean Mediated by Microbial Iron(III)-Binding Ligands. *Nature* **2001**, *413* (6854), 409–413.
- (44) Amin, S. A.; Green, D. H.; Hart, M. C.; Küpper, F. C.; Sunda, W. G.; Carrano, C. J. Photolysis of Iron–siderophore Chelates Promotes Bacterial–algal Mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (40), 17071–17076.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20

Supporting Information

Siderophores in cloud waters and potential impact on atmospheric chemistry: production by microorganisms isolated at the puy de Dôme station.

Virginie Vinatier^{a,b}, Nolwenn Wirgot^{a,b}, Muriel Joly^{a,b,c,d}, Martine Sancelme^{a,b}, Magali Abrantes^{a,b}, Laurent Deguillaume^{c,d}, Anne-Marie Delort^{a,b*}

^a *Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, FRANCE*

^b *CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63171 AUBIERE, FRANCE*

^c *, Université Clermont Auvergne, Université Blaise Pascal, OPGC, Laboratoire de Météorologie Physique, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand (France)*

^d *CNRS, UMR 6016, LaMP/OPGC, BP80026, F-63177 Aubière*

* Corresponding author e-mail: A-Marie.delort@univ-bpclermont.fr

Key Words: siderophores, iron redox cycle, cloud, microorganisms, atmospheric chemistry

21

22 **Elements of phylogeny**

23 Microorganisms described in this study can be classified in two main groups: Prokaryotes

24 (without a nucleus) and Eukaryotes (with a nucleus), which are further subdivided into phyla

25 and genera

26 **PROKARYOTES**

27 Bacteria

28 PHYLUM

29 Proteobacteria*, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes

30 (*In this study, this phylum is divided into three classes: alpha, beta, gamma)

31 GENERA

32 *Pseudomonas, Sphingomonas, Pedobacter, Bacillus, Rhodococcus, etc.*

33

34 **EUKARYOTES**

35 Yeasts

36 PHYLUM

37 Ascomycota, Basidiomycota

38 GENERA

39 *Taphrina, Dioszegia, Udeniomyces, Cryptococcus, etc.*

40

41 **Modification of the CAS (Chrome Azurol S) assay for siderophore screening**

42 *Color and chemical functions*

43 CAS method ,first developed by Schwyn and Neilands ¹, is based on the spectrophotometric
44 properties of the CAS reagent which forms a blue ternary complex with iron and HDTMA
45 (hexadecyltrimethylammonium bromide). In the presence of siderophore this blue complex
46 disappears.

47 The assay can be realized in liquid or solid medium. In the first one the reading is made with a
48 spectrophotometer. On solid medium the presence of siderophore is visually detected. In this
49 case different colors can be obtained that have been used for chemical identification of
50 chelating functions in the O-CAS method ². However solid culture is not suitable for a high
51 throughput screening. The choice was then made to use the liquid method.
52 First trials with culture have shown that the original method was not buffered enough. Rise in
53 pH was also associated with a dye destabilization. Using the modified method by Alexander
54 and Zuberer³ where MES buffer was used instead of piperazine, permit to keep the pH
55 constant. To increase the reaction rate, 5-sulfosalicylic was added (CAS shuttle method).
56 Colors have not been described in liquid CAS however some authors have notified problem
57 arising with new forming iron siderophore complexes⁴. As CAS reagent has a huge extinction
58 coefficient about $100000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ compared to other iron complexes, the CAS reagent was
59 diluted 5 times. The new reagent was used with trial cultures of different strains in R2A iron
60 depleted and new bands appeared on the visible spectra. Siderophore production was
61 confirmed by the O-CAS method. Interactions of surfactants with our assay was also checked.
62 Addition of $200\mu\text{M}$ of HDTMA or $35 \mu\text{M}$ of SDS had no impact on the spectra.

63 In order to precisely describe the emerging bands we used the assay with concentrated
64 solutions (1mM) of standards for each function. Serine hydroxamate was chosen for its

65 hydroxamate function, catechol for its catechol function and EDTA (ethylenediamine tetra-
66 acetic acid) for its carboxylic acid functions.

67 The CAS reagent (iron + CAS + HDTMA) gives a single peak at 650 nm associated with a
68 blue coloration (Figure SM1 A). The CAS/HDMA mixture (without iron) spectrum has 2
69 bands at 550 nm and 590 nm giving a reddish coloration. The same spectrum is obtained with
70 EDTA (Figure SM1 B). Carboxylate indeed forms uncoloured complexes absorbing in the
71 UV range⁵ so in this case only decomplexation of iron is observed. This reddish colour of iron
72 depleted CAS associated with HDTMA in liquid medium at pH 5.6 is different from that
73 observed on solid medium at neutral pH where carboxylate give a light yellow colour².

74 Catechol (Figure SM1 C) gives a complex pattern with 3 intense peaks at 530, 590 and 620
75 nm corresponding to the different complexes formed with different stoichiometry⁶. Its indigo-
76 blue colour is visually similar to the blue CAS reagent. Supernatants containing high amount
77 of catechols must then be diluted before reading⁴ because of the superposition of the intense
78 band ($\epsilon = 400000\text{M}^{-1}$) at 620 nm with the reagent's one.

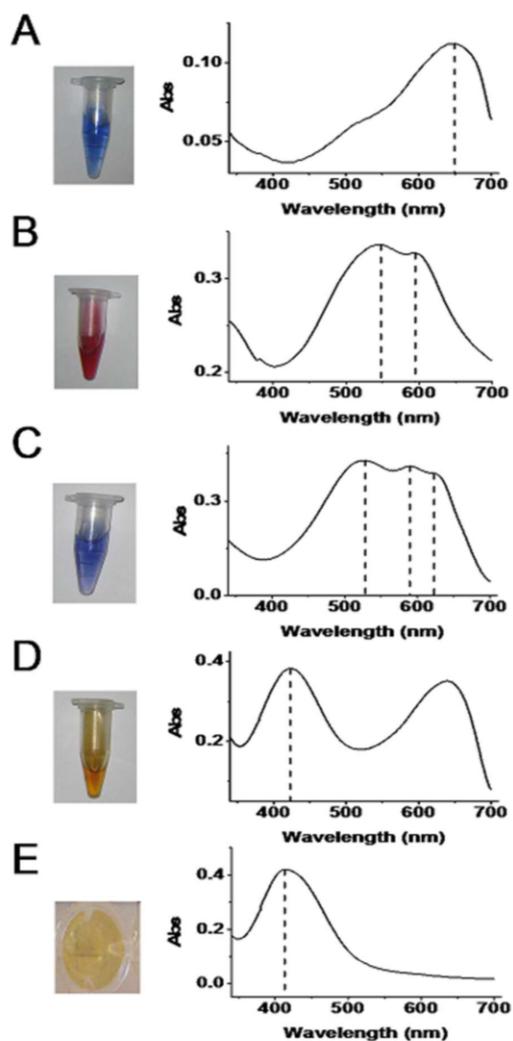
79 Serine hydroxamate (Figure SM1 D) gives an orange colour with a band at 420 nm. No other
80 band than the iron-CAS complex was observed. The same colour is observed on solid
81 medium.

82 With pyoverdin (Figure SM1 E), a siderophore bearing a hydroxamate moiety associated with
83 catechol and hydroxycarboxylate functions, the assay gives a band at 410 nm and a yellow
84 coloration.

85 All these bands only appear in the presence of ligand and CAS reagent. Same experiments
86 without CAS with a mixture of HDTMA and iron in the same buffer only gave complexes
87 with very smaller extinction coefficients around 4000M^{-1} . Bands obtained in the presence of
88 CAS have extinction coefficients of around 100000M^{-1} or even higher with catechols.
89 Moreover colorations increase with the concentration of chelatants while in the same time the

90 band at 650 nm decreases. These results suggest that heterogeneous complexes involving
91 CAS /iron/HDTMA and the chelating function have formed.

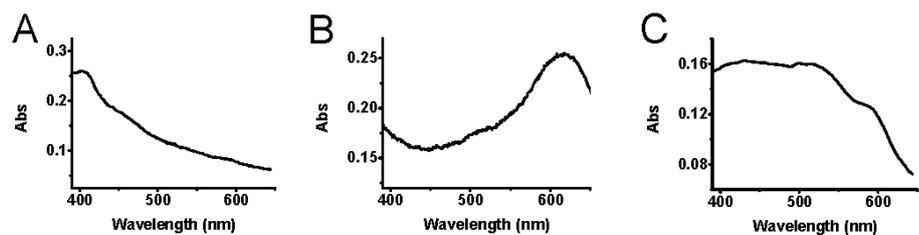
92 These experiments clearly show that we can detect and identify each chelating function
93 unambiguously thanks to its visible spectrum (Figure SM2). Intense ligand to metal charge
94 transfer bands have been previously used for the chemical characterisation of hydroxamate
95 and catechol functions⁸. In the FeCl₃ method hydroxamates give a band between 420 and 450
96 nm whereas at basic pH catechols develop a red coloration ($\lambda_{\text{max}} = 450\text{nm}$). However FeCl₃
97 method requires different pH conditions for catechol and hydroxamate identification whereas
98 in our method it is done with the same reagent. Our method is also more sensitive. In addition
99 pyoverdine (mixed type) and carboxylate functions do not respond positively² to other
100 chemical methods which identify only pure catechols or hydroxamate. Moreover in chemical
101 methods based on identification of chemical function the intensity of the signal does not
102 depend on the chelating capacity of the molecule since they are not based on competition
103 contrary to the CAS method.



104

105 **Figure SM1:** Coloration and visible spectra of main chelating functions (1mM) with the
 106 modified CAS-shuttle assay. A: CAS reagent without siderophore. B: CAS reagent + EDTA
 107 (carboxylic function). C: CAS reagent + catechol. D: CAS reagent + serine hydroxamate. E: CAS
 108 reagent + pyoverdin.

109



110
 111 **Figure SM2:** Type of spectra observed in culture media with the modified CAS shuttle assay.
 112 A: Hydroxamate producing strain (60b24-*Pseudomonas sp.*); B: Catechol producing strain
 113 (32b11-*Shingomonas sp.*); C: “Mixed type” producing strain (63b39-*Pedobacter sp.*)

Maximum absorption wavelength	
Function	(nm)
Hydroxamate	420
Catechol	530; 590; 620
Carboxylate	550; 590

114

115

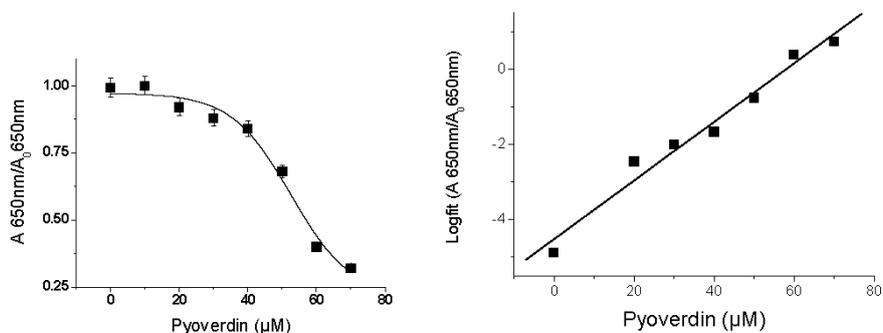
116 **Quantitation of siderophores**

117 The assay was calibrated with standards of pyoverdin giving a sigmoid curve characteristic of
118 a cooperative phenomenon (Figure SM3). This sigmoid was linearized with the logit function:

119
$$\text{logit}(y) = \ln\left(\frac{y}{1-y}\right)$$
 where y is the relative absorbance at 650 nm.

120 The detection limit (signal/noise [S/N] = 3) and quantification limit ([S/N] = 10) were
121 respectively of 21 μ M and 39 μ M equivalent of pyoverdin.

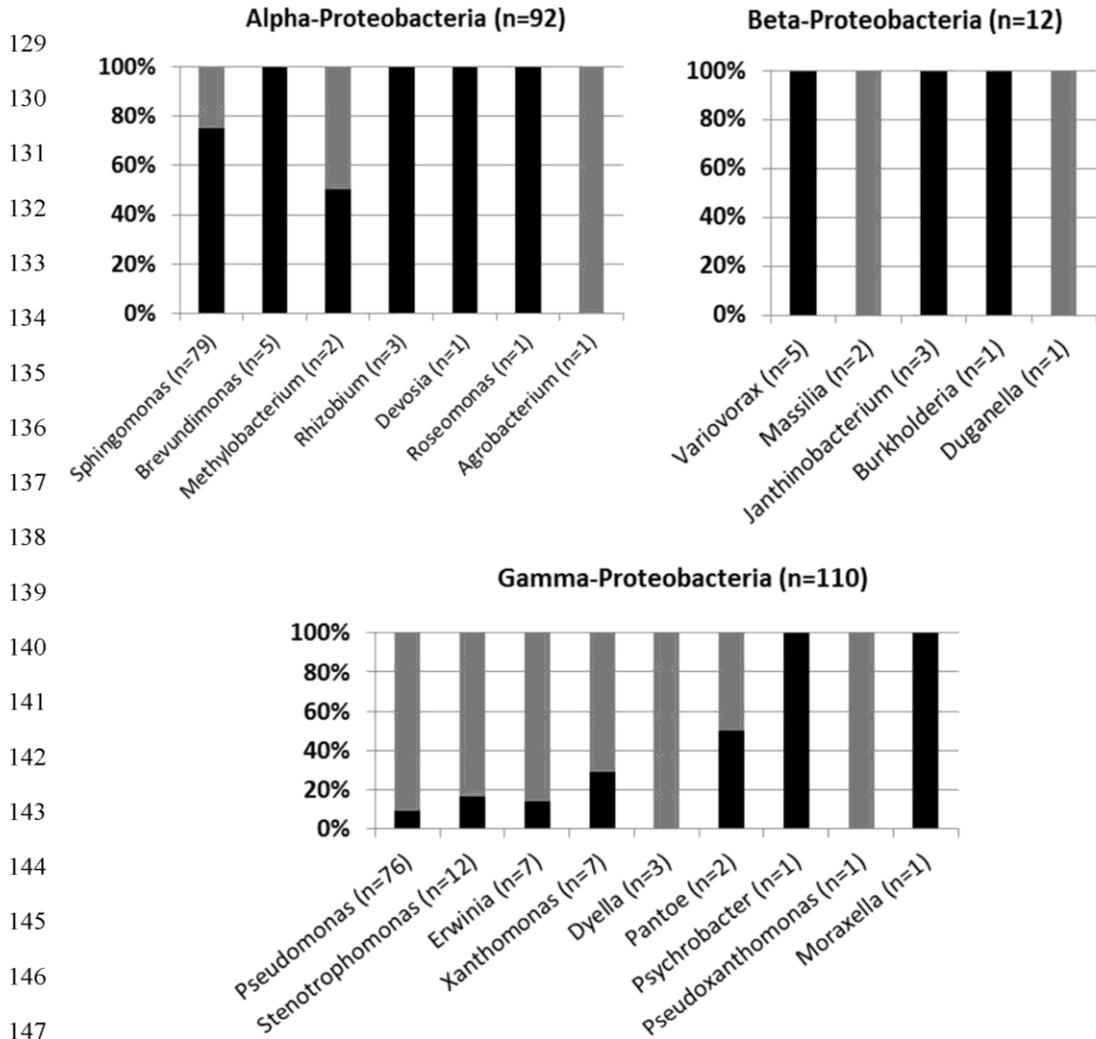
122 Over 70 μ M equivalent of pyoverdin the residual absorbance is too low to get a precise
123 measure. In some wells containing high amount of catechols, the blue color can be more
124 intense than the reference. In this case supernatants must be diluted before reading.



125

126 **Figure SM3:** A: Standard curve for the determination of siderophore activity expressed as
127 pyoverdin equivalents using the modified CAS shuttle assay

128 B: Linearization of the sigmoid calibration curve with the Logit function.



149 **Figure SM4:** Production of siderophores according to the genera of α , β and γ -
 150 proteobacteria classes. Percentage of siderophore non-producing strains (black), producing
 151 strains (grey).

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

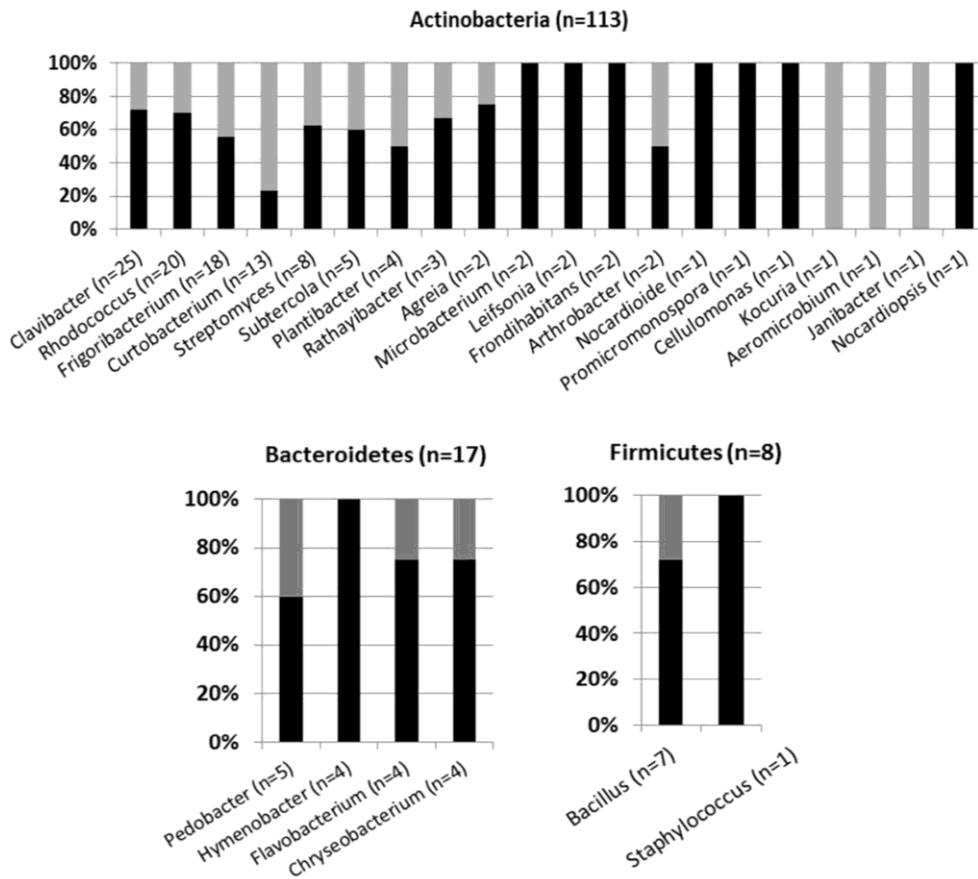


Figure SM5: Production of siderophores according to the genera of the Bacteroidetes, Firmicutes and Actinobacteria phyla. Percentages of siderophore non-producing strains (black), producing strains (grey).

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

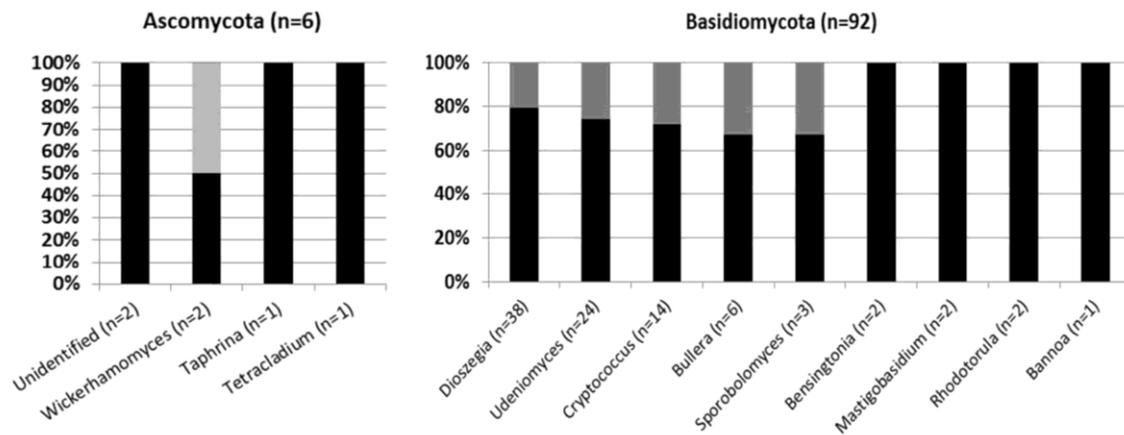
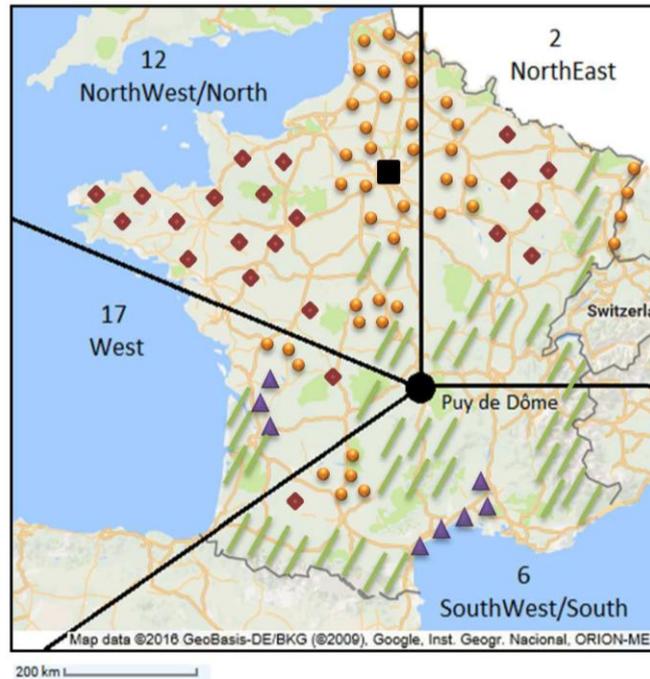


Figure SM6: Production of siderophores according to the genera of the Basidiomycota and Ascomycota phyla. Percentage of siderophore non-producing strains (black), producing strains (grey).

189
190
191
192
193
194
195
196
197

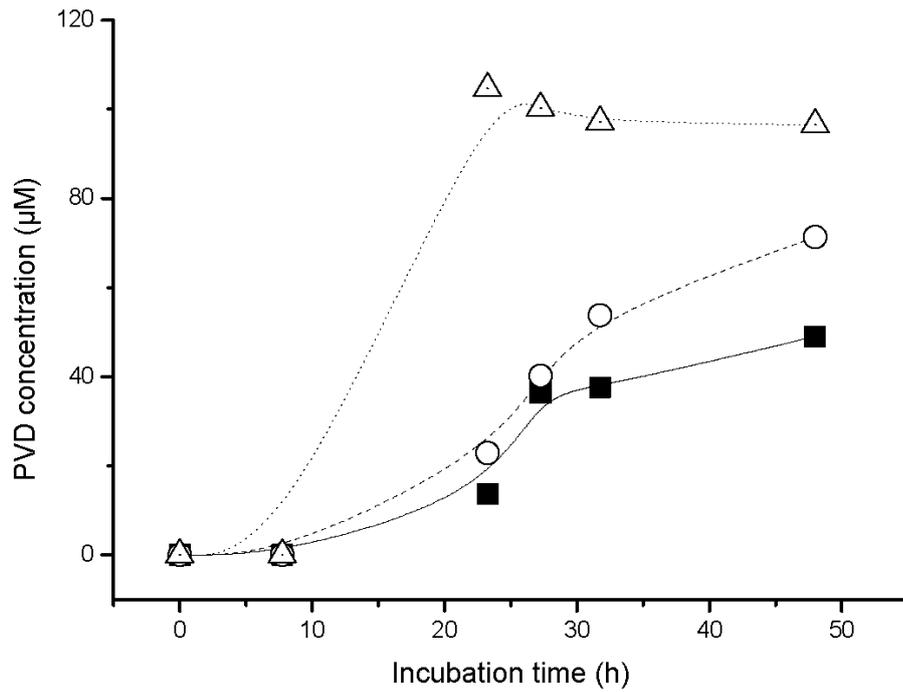
- Intensive cultures
- ▲ Schrub (Vineyards)
- ◆ Grassland and crops
- ▨ Forest (conifer)
- Urban area



198 **Figure SM7:** Distribution of the cloud events according to the air mass origin (West,
199 NorthWest/ North, North East and SouthWest/South as classified by Deguillaume et al
200 (2014)⁹ from their retro-trajectory) and repartition of vegetation in France.

201 Map adapted from <https://www.google.com/maps/@44.9081752,-2.3672489,5.62z>

202
203
204
205
206
207



208

209 **Figure SM8:** Pyoverdinin production by different strains of *Pseudomonas fluorescens* from the
 210 cloud microorganism bank in succinate minimal medium at 25°C: 36b5 (Δ), 36b3 (○) and
 211 37b5 (■). The succinate medium contained per L of distilled water: 6.0 g of K₂HPO₄, 3.0 g of
 212 KH₂PO₄, 1.0 g of (NH₄)₂SO₄, 0.2 g of MgSO₄·7H₂O, 4.0 g of succinic acid. The pH was adjusted
 213 to 7.0 with NaOH before sterilisation.

214

S13

215 **Table SM1:** List of the microbial strains isolated from cloud waters collected at the puy de
 216 Dôme station. Siderophore production: - non producers, + producers. Type of siderophores:
 217 catechol, hydroxamate or mixed type. Air mass origins determined from their back
 218 trajectories and classified as in Deguillaume et al.(2014)⁹: W: West, NE: North East, SW/S :
 219 south west /s, NW/N :North West/ North

Phylum & Strain number	Genus	Accession number (GenBank)	Siderophores production	Type of siderophores	Air mass origin
Yeasts					
Ascomycota					
26b-31 ^②	<i>Taphrina</i>	JF706574	-		SW/S
26b-32 ^②	<i>Tetracladium</i>	JF706575	-		SW/S
23b-2 ^②	<i>Unidentified</i>	JF706544	-		NE
23b-3 ^②	<i>Unidentified</i>	JF706545	-		NE
24b-13 ^②	<i>Wickerhamomyces</i>	JF706551	+	Mixed	W
24b-16 ^②	<i>Wickerhamomyces</i>	JF706554	-		W
Basidiomycota					
28b-2 ^②	<i>Bannoa</i>	JN176592	-		NW/N
28b-4 ^②	<i>Bensingtonia</i>	HQ256887	-		NW/N
29b-1 ^②	<i>Bensingtonia</i>	HQ256892	-		NW/N
24b-2 ^②	<i>Bullera</i>	JF706549	-		W
24b-8 ^②	<i>Bullera</i>	JF706550	-		W
24b-22 ^②	<i>Bullera</i>	JF706557	-		W
25b-1 ^②	<i>Bullera</i>	HQ260318	-		W
26b-19 ^②	<i>Bullera</i>	JF706567	+	Mixed	SW/S
32b-48 ^②	<i>Bullera</i>	JF706585	+	Hydroxamate	W
23b-18 ^②	<i>Cryptococcus</i>	JF706547	-		NE
23b-22 ^②	<i>Cryptococcus</i>	JF706548	-		NE
26b-3 ^②	<i>Cryptococcus</i>	JF706559	-		SW/S

S14

26b-5 ^②	<i>Cryptococcus</i>	JF706561	-		SW/S
26b-8 ^②	<i>Cryptococcus</i>	JF706563	+	Catechol	SW/S
26b-11 ^②	<i>Cryptococcus</i>	JF706565	-		SW/S
28b-3 ^②	<i>Cryptococcus</i>	HQ256886	-		NW/N
28b-7 ^②	<i>Cryptococcus</i>	HQ256890	-		NW/N
28b-13 ^②	<i>Cryptococcus</i>	HQ256884	+	Catechol	NW/N
33b-7 ^②	<i>Cryptococcus</i>	JF706590	+	Catechol	W
35b-4 ^②	<i>Cryptococcus</i>	JN176596	+	Hydroxamate	W
67b-8 ^③	<i>Cryptococcus</i>	KR922308	-		W
67b-21 ^③	<i>Cryptococcus</i>	KR922310	-		W
67b-27 ^③	<i>Cryptococcus(Mrakiella)</i>	KR922313	-		W
23b-13 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706546	-		NE
24b-14 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706552	-		W
24b-15 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706553	-		W
25b-6 ^②	<i>Dioszegia</i>	HQ256878	-		W
25b-8 ^②	<i>Dioszegia</i>	HQ256879	-		W
25b-10 ^②	<i>Dioszegia</i>	HQ256875	-		W
26b-4 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706560	-		SW/S
26b-6 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706562	-		SW/S
26b-9 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706564	-		SW/S
26b-20 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706568	-		SW/S
26b-22 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706569	-		SW/S
26b-24 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706570	-		SW/S
26b-26 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706571	-		SW/S
26b-33 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706576	-		SW/S
26b-34 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706577	-		SW/S
28b-1 ^②	<i>Dioszegia</i>	HQ260319	-		NW/N
28b-5 ^②	<i>Dioszegia</i>	HQ256888	-		NW/N
28b-6 ^②	<i>Dioszegia</i>	HQ256889	-		NW/N

S15

28b-9 ^②	<i>Dioszegia</i>	HQ256891	-		NW/N
32b-9 ^②	<i>Dioszegia</i>	HQ256898	+	Catechol	W
32b-15 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706579	-		W
32b-27 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176593	+	Catechol	W
32b-37 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706581	-		W
32b-41 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706583	-		W
32b-44 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706584	-		W
32b-73 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176595	+	Mixed	W
33b-11 ^②	<i>Dioszegia</i>	JF706591	+	Catechol	W
35b-17 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176597	-		W
35b-19 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176598	+	Mixed	W
35b-28 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176602	+	Catechol	W
35b-29 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176603	-		W
35b-30 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176604	-		W
35b-31 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176605	+	Hydroxamate	W
35b-35 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176606	+	Catechol	W
35b-39 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176607	-		W
35b-42 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176608	-		W
35b-44 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176609	-		W
35b-45 ^②	<i>Dioszegia</i>	JN176610	-		W
35b-21 ^②	<i>Mastigobasidium</i>	JN176599	-		W
35b-23 ^②	<i>Mastigobasidium</i>	JN176600	-		W
26b-27 ^②	<i>Rhodotorula</i>	JF706572	-		SW/S
28b-15 ^②	<i>Rhodotorula</i>	HQ256885	-		NW/N
29b-4 ^②	<i>Sporobolomyces</i>	HQ256893	-		NW/N
32b-70 ^②	<i>Sporobolomyces</i>	JF706588	+	Hydroxamate	W
35b-12 ^②	<i>Sporobolomyces</i>	JF706594	-		W
24b-18 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JF706555	-		W
24b-21 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JF706556	-		W

S16

24b-25 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JF706558	+	Hydroxamate	W
25b-2 ^②	<i>Udeniomyces</i>	HQ256876	-		W
25b-4 ^②	<i>Udeniomyces</i>	HQ256877	+	Catechol	W
25b-9 ^②	<i>Udeniomyces</i>	HQ256880	-		W
26b-18 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JF706566	-		SW/S
28b-10 ^②	<i>Udeniomyces</i>	HQ256881	-		NW/N
28b-11 ^②	<i>Udeniomyces</i>	HQ256882	-		NW/N
28b-12 ^②	<i>Udeniomyces</i>	HQ256883	-		NW/N
29b-5 ^②	<i>Udeniomyces</i>	HQ256894	-		NW/N
29b-6 ^②	<i>Udeniomyces</i>	HQ256895	-		NW/N
32b-5 ^②	<i>Udeniomyces</i>	HQ256897	-		W
32b-12 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JF706578	-		W
32b-21 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JF706580	-		W
32b-40 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JF706582	-		W
32b-64 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JF706586	-		W
32b-68 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JF706587	+	Hydroxamate	W
32b-71 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JN176594	+	Mixed	W
33b-6 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JF706589	-		W
35b-26 ^②	<i>Udeniomyces</i>	JN176601	-		W
67b-20 ^③	<i>Udeniomyces</i>	KR922309	-		W
67b-22 ^③	<i>Udeniomyces</i>	KR922311	-		W
67b-25 ^③	<i>Udeniomyces</i>	KR922312	+	Hydroxamate	W
Bacteria					
Actinobacteria					
24b-9 ^②	<i>Aeromicrobium</i>	HQ256801	+	Catechol	W
30b-4 ^②	<i>Agreia</i>	HQ256818	+	Catechol	W
32b-2 ^②	<i>Agreia</i>	HQ256834	-		W
57b-6 ^③	<i>Arthrobacter</i>	KR922109	-		W
63b-5 ^③	<i>Arthrobacter</i>	KR922212	+	Mixed	NW/N

S17

67b-6 ^③	<i>Cellulomonas</i>	KR922256	-		W
24b-1 ^②	<i>Clavibacter</i>	HQ256789	+	Catechol	W
24b-5 ^②	<i>Clavibacter</i>	HQ256798	+	Hydroxamate	W
24b-17 ^②	<i>Clavibacter</i>	HQ256792	-		W
24b-19 ^②	<i>Clavibacter</i>	HQ260320	-		W
24b-24 ^②	<i>Clavibacter</i>	HQ256795	-		W
25b-3 ^②	<i>Clavibacter</i>	HQ256805	-		W
26b-30 ^②	<i>Clavibacter</i>	HQ256811	+	Hydroxamate	SW/S
32b-13 ^②	<i>Clavibacter</i>	HQ256832	-		W
54b-2 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922091	-		NW/N
56b-8 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922100	+	Mixed	NW/N
57b-3 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922107	-		W
57b-16 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922117	-		W
57b-22 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922119	-		W
57b-26 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922121	+	Catechol	W
57b-27 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922122	+	Catechol	W
59b-30 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922161	-		W
59b-50 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922173	-		W
59b-58 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922179	-		W
63b-9 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922216	-		NW/N
63b-11 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922218	-		NW/N
63b-20 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922224	-		NW/N
63b-38 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922236	-		NW/N
63b-47 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922244	-		NW/N
67b-28 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922268	-		W
67b-30 ^③	<i>Clavibacter</i>	KR922269	+	Hydroxamate	W
24b-6 ^②	<i>Curtobacterium</i>	HQ256799	+	Hydroxamate	W
24b-7 ^②	<i>Curtobacterium</i>	HQ256800	+	Hydroxamate	W
24b-23 ^②	<i>Curtobacterium</i>	HQ256794	+	Catechol	W

S18

32b-36 ^②	<i>Curtobacterium</i>	HQ256840	-		W
32b-46 ^②	<i>Curtobacterium</i>	HQ256845	+	Catechol	W
35b-18 ^②	<i>Curtobacterium</i>	JF706509	+	Mixed	W
35b-20 ^②	<i>Curtobacterium</i>	JF706511	+	Catechol	W
46b-8 ^③	<i>Curtobacterium</i>	KR922054	-		SW/S
46b-9 ^③	<i>Curtobacterium</i>		-		SW/S
57b-12 ^③	<i>Curtobacterium</i>	KR922113	+	Catechol	W
58b-5 ^③	<i>Curtobacterium</i>	KR922127	+	Mixed	W
58b-16 ^③	<i>Curtobacterium</i>	KR922130	+	Mixed	W
59b-36 ^③	<i>Curtobacterium</i>	KR922165	+	Catechol	W
14b-13 ^①	<i>Frigoribacterium</i>	DQ512796	-		NW/N
24b-20 ^②	<i>Frigoribacterium</i>	HQ256793	+	Mixed	W
30b-1 ^②	<i>Frigoribacterium</i>	HQ256816	-		W
31b-8 ^②	<i>Frigoribacterium</i>	HQ256829	-		NE
32b-17 ^②	<i>Frigoribacterium</i>	HQ256833	-		W
32b-35 ^②	<i>Frigoribacterium</i>	HQ256839	-		W
35b-1 ^②	<i>Frigoribacterium</i>	JF706506	+	Mixed	W
35b-13 ^②	<i>Frigoribacterium</i>	JF706507	+	Mixed	W
48b-7 ^③	<i>Frigoribacterium</i>	KR922060	+	Mixed	W
56b-25 ^③	<i>Frigoribacterium</i>	KR922104	-		NW/N
57b-14 ^③	<i>Frigoribacterium</i>	KR922115	+	Mixed	W
58b-4 ^③	<i>Frigoribacterium</i>	KR922126	+	Catechol	W
59b-34 ^③	<i>Frigoribacterium</i>	KR922164	+	Mixed	W
59b-54 ^③	<i>Frigoribacterium</i>	KR922176	+	Mixed	W
60b-4 ^③	<i>Frigoribacterium</i>	KR922183	-		SW/S
63b-2 ^③	<i>Frigoribacterium</i>	KR922209	-		NW/N
63b-3(b) ^③	<i>Frigoribacterium</i>	KR922210	-		NW/N
63b-19 ^③	<i>Frigoribacterium</i>	KR922223	-		NW/N
32b-28 ^②	<i>Fronidhabitans</i>	HQ256836	-		W

S19

63b-8 ^③	<i>Fronidhabitans</i>	KR922215	-		NW/N
67b-15 ^③	<i>Janibacter</i>	KR922262	+	Mixed	W
31b-3 ^②	<i>Kocuria</i>	HQ256825	+	Catechol	NE
23b-16 ^②	<i>Leifsonia</i>	HQ256777	-		NE
32b-20 ^②	<i>Leifsonia</i>	HQ256835	-		W
23b-15 ^②	<i>Microbacterium</i>	HQ256776	-		NE
23b-20 ^②	<i>Microbacterium</i>	HQ256779	-		NE
53b-6 ^③	<i>Nocardioides</i>	KR922090	-		NW/N
30b-3 ^②	<i>Nocardiopsis</i>		-		W
26b-21 ^②	<i>Plantibacter</i>	HQ260322	-		SW/S
32b-63 ^②	<i>Plantibacter</i>	HQ256861	-		W
56b-1 ^③	<i>Plantibacter</i>		+	Mixed	NW/N
56b-14 ^③	<i>Plantibacter</i>	KR922102	+	Mixed	NW/N
67b-16 ^③	<i>Promicromonospora</i>	KR922263	-		W
23b-5 ^②	<i>Rhodococcus</i>	HQ256785	-		NE
23b-25 ^②	<i>Rhodococcus</i>	HQ256782	+	Hydroxamate	NE
23b-27 ^②	<i>Rhodococcus</i>	HQ256783	+	Hydroxamate	NE
23b-29 ^②	<i>Rhodococcus</i>	HQ256784	-		NE
25b-12 ^②	<i>Rhodococcus</i>	HQ256803	-		W
29b-2 ^②	<i>Rhodococcus</i>	HQ256815	-		NW/N
30b-2 ^②	<i>Rhodococcus</i>	HQ256817	-		W
30b-5 ^②	<i>Rhodococcus</i>	HQ256819	-		W
30b-6 ^②	<i>Rhodococcus</i>	HQ256820	-		W
31b-2 ^②	<i>Rhodococcus</i>	HQ256824	-		NE
31b-7 ^②	<i>Rhodococcus</i>	HQ256828	-		NE
35b-2 ^②	<i>Rhodococcus</i>	JF706510	+	Mixed	W
35b-34 ^②	<i>Rhodococcus</i>	JF706515	+	Mixed	W
35b-37 ^②	<i>Rhodococcus</i>	JF706516	+	Hydroxamate	W
35b-43 ^②	<i>Rhodococcus</i>	JF706519	+	Mixed	W

S20

41b-2 ^②	<i>Rhodococcus</i>	JF706542	-		W
52b-2 ^③	<i>Rhodococcus</i>	KR922085	-		SW/S
54b-3 ^③	<i>Rhodococcus</i>	KR922092	-		NW/N
56b-3 ^③	<i>Rhodococcus</i>	KR922098	-		NW/N
59b-29 ^③	<i>Rhodococcus</i>		-		W
32b-3 ^②	<i>Rathayibacter</i>	JF706503	-		W
32b-54 ^②	<i>Rathayibacter</i>	HQ256852	+	Hydroxamate	W
59b-51 ^③	<i>Rathayibacter</i>	KR922174	-		W
23b-9 ^②	<i>Streptomyces</i>	HQ256788	+	Hydroxamate	NE
23b-11 ^②	<i>Streptomyces</i>	HQ256774	+	Hydroxamate	NE
23b-12 ^②	<i>Streptomyces</i>		+	Hydroxamate	NE
24b-3 ^②	<i>Streptomyces</i>	HQ256796	-		W
24b-4 ^②	<i>Streptomyces</i>	HQ256797	-		W
24b-10 ^②	<i>Streptomyces</i>	HQ256790	-		W
31b-9 ^②	<i>Streptomyces</i>	HQ256830	-		NE
67b-13 ^③	<i>Streptomyces</i>	KR922260	-		W
23b-21 ^②	<i>Subtercola</i>	HQ256780	-		NE
26b-23 ^②	<i>Subtercola</i>	HQ256809	+	Catechol	SW/S
32b-51 ^②	<i>Subtercola</i>	HQ256849	+	Catechol	W
63b-41 ^③	<i>Subtercola</i>	KR922239	-		NW/N
63b-42 ^③	<i>Subtercola</i>	KR922240	-		NW/N
Bacteroidetes					
48b-4 ^③	<i>Chryseobacterium</i>	KR922058	+	Mixed	W
61b-10 ^③	<i>Chryseobacterium</i>	KR922207	-		NW/N
63b-34 ^③	<i>Chryseobacterium</i>		-		NW/N
67b-2 ^③	<i>Chryseobacterium</i>	KR922253	-		W
32b-6 ^②	<i>Flavobacterium</i>	HQ256857	-		W
32b-56 ^②	<i>Flavobacterium</i>	HQ256854	+	Catechol	W
57b-18 ^③	<i>Flavobacterium</i>	KR922118	-		W

S21

58b-27 ^③	<i>Flavobacterium</i>	KR922138	-		W
23b-17 ^②	<i>Hymenobacter</i>	HQ256778	-		NE
47b-5 ^③	<i>Hymenobacter</i>	KR922056	-		W
54b-11 ^③	<i>Hymenobacter</i>	KR922095	-		NW/N
58b-19 ^③	<i>Hymenobacter</i>	KR922132	-		W
58b-21 ^③	<i>Pedobacter</i>	KR922134	-		W
58b-22 ^③	<i>Pedobacter</i>	KR922135	-		W
59b-57 ^③	<i>Pedobacter</i>	KR922178	-		W
63b-39 ^③	<i>Pedobacter</i>	KR922237	+	Mixed	NW/N
66b-3 ^③	<i>Pedobacter</i>	KR922248	+	Catechol	NW/N
Firmicutes					
16b-1 ^①	<i>Bacillus</i>		+	Hydroxamate	SW/S
29b-3 ^②	<i>Bacillus</i>	JF706502	-		NW/N
31b-1 ^②	<i>Bacillus</i>	HQ256822	-		NE
35b-14 ^②	<i>Bacillus</i>		-		W
57b-10 ^③	<i>Bacillus</i>	KR922111	-		W
59b-33 ^③	<i>Bacillus</i>	KR922163	-		W
67b-4 ^③	<i>Bacillus</i>	KR922255	-		W
67b-14 ^③	<i>Staphylococcus</i>	KR922261	-		W
Proteobacteria					
Alpha					
32b-65 ^②	<i>Agrobacterium</i>	HQ256862	-		W
59b-20 ^③	<i>Brevundimonas</i>	KR922156	-		W
60b-3 ^③	<i>Brevundimonas</i>	KR922182	-		SW/S
60b-14 ^③	<i>Brevundimonas</i>	KR922192	-		SW/S
60b-15 ^③	<i>Brevundimonas</i>		-		SW/S
67b-11(b) ^③	<i>Brevundimonas</i>	KR922259	-		W
23b-7 ^②	<i>Devosia</i>	HQ256787	-		NE

S22

23b-14 ^②	<i>Methylobacterium</i>	HQ256775	-		NE
35b-27 ^②	<i>Methylobacterium</i>	JF706512	+	Catechol	W
23b-24 ^②	<i>Rhizobium</i>	HQ256781	-		NE
32b-29 ^②	<i>Rhizobium</i>	HQ256837	-		W
67b-7 ^③	<i>Rhizobium</i>	KR922257	-		W
31b-6 ^②	<i>Roseomonas</i>	HQ256827	-		NE
14b-6 ^①	<i>Sphingomonas</i>	DQ512790	+	Hydroxamate	NW/N
23b-1 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256773	+	Catechol	NE
23b-6 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256786	-		NE
26b-16 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256808	-		SW/S
27b-1 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256812	-		SW/S
32b-4 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256841	+	Catechol	W
32b-11 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256831	+	Catechol	W
32b-39 ^②	<i>Sphingomonas</i>	JF706504	+	Catechol	W
32b-45 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256844	+	Catechol	W
32b-49 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256847	+	Hydroxamate	W
32b-50 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256848	+	Catechol	W
32b-57 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256855	+	Catechol	W
32b-61 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256859	+	Catechol	W
33b-9 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256873	+	Mixed	W
33b-12 ^②	<i>Sphingomonas</i>	HQ256874	+	Mixed	W
35b-15 ^②	<i>Sphingomonas</i>	JF706508	+	Catechol	W
35b-32 ^②	<i>Sphingomonas</i>	JF706513	+	Catechol	W
35b-38 ^②	<i>Sphingomonas</i>	JF706517	-		W
47b-1 ^③	<i>Sphingomonas</i>		-		W
47b-3 ^③	<i>Sphingomonas</i>		-		W
48b-8 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922061	-		W
48b-11 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922064	-		W
49b-2 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922065	-		NW/N

S23

52b-3 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922086	+	Catechol	SW/S
52b-8 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922088	-		SW/S
54b-4 ^③	<i>Sphingomonas</i>		-		NW/N
54b-5 ^③	<i>Sphingomonas</i>		-		NW/N
54b-6 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922093	-		NW/N
54b-7 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922094	-		NW/N
56b-4 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922099	-		NW/N
56b-21 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922103	-		NW/N
57b-2 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922106	-		W
57b-4 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922108	-		W
57b-8 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922110	-		W
57b-11 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922112	+	Mixed	W
57b-13 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922114	-		W
57b-15 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922116	-		W
57b-25 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922120	-		W
57b-28 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922123	-		W
59b-19 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922155	-		W
59b-39 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922168	-		W
59b-42 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922171	-		W
60b-6 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922184	-		SW/S
60b-7 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922185	-		SW/S
60b-8 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922186	-		SW/S
60b-9 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922187	-		SW/S
60b-11 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922189	+	Catechol	SW/S
60b-13 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922191	+	Catechol	SW/S
60b-16 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922193	-		SW/S
60b-19 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922194	-		SW/S
60b-20 ^③	<i>Sphingomonas</i>		-		SW/S
60b-22 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922195	-		SW/S

S24

60b-23 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922196	-		SW/S
60b-29 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922200	-		SW/S
60b-30 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922201	-		SW/S
60b-31 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922202	-		SW/S
60b-32 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922203	-		SW/S
60b-33 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922204	-		SW/S
63b-4 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922211	-		NW/N
63b-7 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922214	-		NW/N
63b-10(a) ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922217	-		NW/N
63b-12 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922219	-		NW/N
63b-15 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922221	-		NW/N
63b-26 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922228	-		NW/N
63b-27 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922229	-		NW/N
63b-33 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922232	-		NW/N
63b-35 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922233	-		NW/N
63b-36 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922234	-		NW/N
63b-37 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922235	-		NW/N
63b-40 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922238	-		NW/N
63b-43 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922241	-		NW/N
63b-45 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922242	-		NW/N
66b-11 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922250	+	Catechol	NW/N
66b-14 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922251	+	Catechol	NW/N
67b-3 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922254	-		W
67b-9 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922258	-		W
67b-23 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922265	-		W
67b-24 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922266	-		W
67b-26 ^③	<i>Sphingomonas</i>	KR922267	-		W
Beta					
28b-14 ^②	<i>Burkholderia</i>	HQ256814	-		NW/N

S25

60b-27 ^③	<i>Duganella</i>	KR922199	+	Catechol	SW/S
35b-40 ^②	<i>Janthinobacterium</i>	JF706518	-		W
63b-13 ^③	<i>Janthinobacterium</i>	KR922220	-		NW/N
67b-1 ^③	<i>Janthinobacterium</i>	KR922252	-		W
31b-10 ^②	<i>Massilia</i>	HQ256823	+	Catechol	NE
35b-33 ^②	<i>Massilia</i>	JF706514	+	Catechol	W
26b-25 ^②	<i>Variovorax</i>	HQ256810	-		SW/S
47b-2 ^③	<i>Variovorax</i>	KR922055	-		W
58b-15 ^③	<i>Variovorax</i>	KR922129	-		W
59b-55 ^③	<i>Variovorax</i>	KR922177	-		W
63b-21 ^③	<i>Variovorax</i>	KR922225	-		NW/N
Gamma					
59b-26 ^③	<i>Dyella</i>	KR922158	+	Mixed	W
59b-27 ^③	<i>Dyella</i>	KR922159	+	Mixed	W
59b-28 ^③	<i>Dyella</i>	KR922160	+	Mixed	W
25b-7 ^②	<i>Erwinia</i>	HQ256807	+	Catechol	W
25b-11 ^②	<i>Erwinia</i>	HQ256802	+	Catechol	W
25b-13 ^②	<i>Erwinia</i>	HQ256804	+	Catechol	W
59b-32 ^③	<i>Erwinia</i>	KR922162	-		W
59b-41 ^③	<i>Erwinia</i>	KR922170	+	Catechol	W
32b-58 ^②	<i>Ewingella</i>	JF706505	+	Hydroxamate	W
32b-59 ^②	<i>Ewingella</i>	HQ256856	+	Catechol	W
53b-1 ^③	<i>Moraxella</i>	KR922089	-		NW/N
48b-9 ^③	<i>Pantoe</i>	KR922062	-		W
59b-44 ^③	<i>Pantoe</i>	KR922172	+	Catechol	W
13b-3 ^①	<i>Pseudomonas</i>	DQ512786	+	Hydroxamate	W
24b-12 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ260323	+	Mixed	W
25b-5 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ256806	+	Mixed	W
27b-3 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ256813	-		SW/S

S26

31b-4 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ256826	+	Catechol	NE
32b-31 ^②	<i>Pseudomonas</i>	JN176585	+	Mixed	W
32b-42 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ256842	+	Hydroxamate	W
32b-53 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ256851	+	Mixed	W
32b-55 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ256853	+	Mixed	W
32b-60 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ256858	+	Hydroxamate	W
32b-66 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ256863	+	Mixed	W
32b-67 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ256864	+	Hydroxamate	W
32b-74 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ256872	+	Mixed	W
33b-2 ^②	<i>Pseudomonas</i>	HQ256867	+	Mixed	W
36b-3 ^②	<i>Pseudomonas</i>	JF706525	+	Mixed	NW/N
36b-5 ^②	<i>Pseudomonas</i>	JF706526	+	Mixed	NW/N
37b-5 ^②	<i>Pseudomonas</i>	JF706535	+	Mixed	W
47b-7 ^③	<i>Pseudomonas</i>		+	Hydroxamate	W
48b-1 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922057	+	Hydroxamate	W
48b-2 ^③	<i>Pseudomonas</i>		+	Mixed	W
48b-5 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922059	+	Mixed	W
48b-10 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922063	+	Mixed	W
49b-4 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922066	+	Hydroxamate	NW/N
50b-1 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922067	+	Mixed	W
50b-2 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922068	+	Mixed	W
50b-3 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922069	+	Mixed	W
50b-4 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922070	+	Mixed	W
50b-5 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922071	+	Mixed	W
50b-6 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922072	+	Catechol	W
50b-7 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922073	+	Catechol	W
50b-8 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922074	+	Hydroxamate	W
50b-9 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922075	+	Catechol	W
50b-10 ^③	<i>Pseudomonas</i>		+	Mixed	W

S27

51b-1 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922077	+	Catechol	NW/N
51b-3 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922078	+	Hydroxamate	NW/N
51b-4 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922079	+	Hydroxamate	NW/N
51b-5 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922080	+	Catechol	NW/N
51b-6 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922081	+	Hydroxamate	NW/N
51b-7 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922082	+	Hydroxamate	NW/N
51b-8 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922083	+	Mixed	NW/N
51b-10 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922084	+	Catechol	NW/N
55b-2 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922096	-		NW/N
55b-15 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922097	+	Mixed	NW/N
57b-1 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922105	+	Mixed	W
58b-1 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922124	+	Mixed	W
58b-2 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922125	-		W
58b-20 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922133	+	Mixed	W
58b-25 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922137	+	Mixed	W
58b-28 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922139	+	Mixed	W
59b-1 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922140	+	Hydroxamate	W
59b-2 ^③	<i>Pseudomonas</i>		+	Mixed	W
59b-3 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922141	+	Mixed	W
59b-4 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922142	-		W
59b-5 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922143	+	Mixed	W
59b-6 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922144	+	Hydroxamate	W
59b-7 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922145	+	Hydroxamate	W
59b-8 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922146	-		W
59b-10 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922148	+	Hydroxamate	W
59b-11 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922149	+	Hydroxamate	W
59b-12 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922150	+	Mixed	W
59b-14 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922151	-		W
59b-15 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922152	+	Hydroxamate	W

S28

59b-16 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922153	+	Mixed	W
59b-17 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922154	+	Mixed	W
59b-25 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922157	+	Mixed	W
59b-37 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922166	-		W
59b-38 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922167	+	Catechol	W
59b-40 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922169	+	Catechol	W
59b-53 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922175	+	Mixed	W
60b-1 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922180	+	Mixed	SW/S
60b-12 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922190	+	Mixed	SW/S
60b-24 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922197	+	Hydroxamate	SW/S
63b-30 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922230	+	Mixed	NW/N
66b-1 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922246	+	Mixed	NW/N
66b-2 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922247	+	Mixed	NW/N
66b-5 ^③	<i>Pseudomonas</i>	KR922249	+	Mixed	NW/N
32b-33 ^②	<i>Pseudoxanthomonas</i>	HQ256838	+	Catechol	W
30b-7 ^②	<i>Psychrobacter</i>	HQ256821	-		W
32b-30 ^②	<i>Stenotrophomonas</i>	JN176584	+	Mixed	W
32b-38 ^②	<i>Stenotrophomonas</i>	JN176587	+	Catechol	W
32b-43 ^②	<i>Stenotrophomonas</i>	HQ256843	+	Hydroxamate	W
32b-47 ^②	<i>Stenotrophomonas</i>	HQ256846	+	Mixed	W
32b-69 ^②	<i>Stenotrophomonas</i>	HQ256865	+	Hydroxamate	W
32b-72 ^②	<i>Stenotrophomonas</i>	HQ256871	+	Mixed	W
33b-1 ^②	<i>Stenotrophomonas</i>	HQ256866	+	Catechol	W
33b-5 ^②	<i>Stenotrophomonas</i>	HQ256869	+	Hydroxamate	W
33b-8 ^②	<i>Stenotrophomonas</i>	HQ256870	+	Mixed	W
52b-5 ^③	<i>Stenotrophomonas</i>	KR922087	-		SW/S
52b-7 ^③	<i>Stenotrophomonas</i>		-		SW/S
61b-6 ^③	<i>Stenotrophomonas</i>	KR922206	+	Mixed	NW/N
32b-22 ^②	<i>Xanthomonas</i>	JN176582	-		W

S29

32b-24 ^②	<i>Xanthomonas</i>	JN176583	+	Catechol	W
32b-32 ^②	<i>Xanthomonas</i>	JN176586	+	Mixed	W
32b-52 ^②	<i>Xanthomonas</i>	HQ256850	+	Mixed	W
33b-3 ^②	<i>Xanthomonas</i>	HQ256868	+	Hydroxamate	W
60b-2 ^③	<i>Xanthomonas</i>	KR922181	-		SW/S
60b-10 ^③	<i>Xanthomonas</i>	KR922188	+	Catechol	SW/S

220 ① Isolated by Amato et al., 2007¹⁰

221 ② Isolated by Vaitilingom et al., 2012¹¹

222 ③ This study

223

S30

224 **References**

- 225 (1) Schwyn, B.; Neilands, J. B. Universal Chemical Assay for the Detection and
226 Determination of Siderophores. *Anal. Biochem.* **1987**, *160* (1), 47–56.
- 227 (2) Pérez-Miranda, S.; Cabirol, N.; George-Téllez, R.; Zamudio-Rivera, L. S.; Fernández, F. J.
228 O-CAS, a Fast and Universal Method for Siderophore Detection. *J. Microbiol. Methods*
229 **2007**, *70* (1), 127–131.
- 230 (3) Alexander, D. B.; Zuberer, D. A. Use of Chrome Azurol S Reagents to Evaluate
231 Siderophore Production by Rhizosphere Bacteria. *Biol. Fertil. Soils* **1991**, *12* (1), 39–45.
- 232 (4) Payne, S. M. [25] Detection, Isolation, and Characterization of Siderophores. In
233 *Methods in Enzymology*; Virginia L. Clark, P. M. B., Ed.; Academic Press, 1994; Vol.
234 Volume 235, pp 329–344.
- 235 (5) Glebov, E. M.; Pozdnyakov, I. P.; Grivin, V. P.; Plyusnin, V. F.; Zhang, X.; Wu, F.; Deng, N.
236 Intermediates in Photochemistry of Fe(III) Complexes with Carboxylic Acids in Aqueous
237 Solutions. *Photochem Photobiol Sci* **2011**, *10* (3), 425–430.
- 238 (6) Sever, M. J.; Wilker, J. J. Visible Absorption Spectra of Metal–catecholate and Metal–
239 tironate Complexes. *Dalton Trans.* **2004**, No. 7, 1061–1072.
- 240 (7) Birus, M.; Bradic, Z.; Kujundzic, N.; Pribanic, M.; Wilkins, P. C.; Wilkins, R. G. Stopped-
241 Flow and Rapid-Scan Spectral Examination of the iron(III)-Acetohydroxamic Acid
242 System. *Inorg. Chem.* **1985**, *24* (24), 3980–3983.
- 243 (8) Neilands, J. B. Methodology of Siderophores. In *Siderophores from Microorganisms and*
244 *Plants*; Structure and Bonding; Springer Berlin Heidelberg, 1984; Vol. 58, pp 1–24.
- 245 (9) Deguillaume, L.; Charbouillot, T.; Joly, M.; Vaïtilingom, M.; Parazols, M.; Marinoni, A.;
246 Amato, P.; Delort, A.-M.; Vinatier, V.; Flossmann, A.; et al. Classification of Clouds
247 Sampled at the Puy de Dôme (France) Based on 10 Yr of Monitoring of Their
248 Physicochemical Properties. *Atmospheric Chem. Phys.* **2014**, *14* (3), 1485–1506.
- 249 (10) Amato, P.; Parazols, M.; Sancelme, M.; Laj, P.; Mailhot, G.; Delort, A.-M.
250 Microorganisms Isolated from the Water Phase of Tropospheric Clouds at the Puy de
251 Dôme: Major Groups and Growth Abilities at Low Temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.*
252 **2007**, *59* (2), 242–254.
- 253 (11) Vaïtilingom, M.; Attard, E.; Gaiani, N.; Sancelme, M.; Deguillaume, L.; Flossmann, A. I.;
254 Amato, P.; Delort, A.-M. Long-Term Features of Cloud Microbiology at the Puy de Dôme
255 (France). *Atmos. Environ.* **2012**, *56* (0), 88–100.
- 256

257

4. Conclusion

L'objectif principal de ces travaux était d'évaluer la capacité de souches microbiennes isolées des nuages à produire des sidérophores. Ce travail représente un premier pas pour apporter des éléments de réponse quant à la complexation du Fe(III) qui reste très mal connue dans les nuages.

Pour cela, nous avons effectué un large screening de 450 souches microbiennes, comportant exclusivement des bactéries et des levures, par une méthode CAS qui a été adaptée pour détecter, quantifier et caractériser la nature chimique du sidérophore produit, en une seule étape. Cette méthode nous a également permis de travailler en milieu liquide dans des microplaques 96 puits permettant de tester un grand nombre de souches de manière simultanée. Les résultats obtenus ont montré que 42% des souches testées ont la capacité de produire des sidérophores. Les bactéries du genre *Pseudomonas* (fortement représenté dans les nuages) se sont révélées être les souches les plus actives en termes de production de sidérophores (90% d'entre elles) et les plus abondantes (50% des souches actives). Il a également été montré que parmi les souches actives, 38% sont productrices de sidérophores portant des groupements fonctionnels catéchols, 18% productrices d'hydroxamates et 44% productrices de fonctions mixtes. De plus, il a été observé que les fonctions mixtes ont été produites en majorité par des souches de *Pseudomonas*. Ce résultat est cohérent avec le fait que le genre *Pseudomonas* est connu pour produire des pyoverdines, sidérophores à fonction mixte constitués de catéchols et d'hydroxamates. Il a également été montré à travers des études statistiques que le nombre de souches productrices ou non de sidérophores ainsi que le type de sidérophores étaient corrélés avec l'origine de la masse d'air.

Ces résultats suggèrent l'éventuelle présence de sidérophores dans les eaux de nuage comme molécules chélatantes du fer(III). Ils ne démontrent en rien leur réelle présence ; il faudrait pour cela, comme cela a été fait dans l'océan, rechercher dans l'eau de nuage soit l'empreinte de certains sidérophores connus (par exemple par spectrométrie de masse), soit à minima, montrer qu'il existe des chélatants forts du fer(III) (par voltammétrie cyclique par exemple). Notre hypothèse est cependant cohérente avec le fait que [Herckes et al. \(2013\)](#) et [Herrmann et al. \(2015\)](#) ont émis récemment l'hypothèse que le fer(III) peut être chélaté par des ligands organiques d'origine biologique. Enfin, le nuage est un environnement propice à la production de sidérophores car la synthèse de sidérophores est induite en condition de carence de fer. Or, la concentration en fer(III) dans les eaux de nuage est suffisamment faible (<10 μM) pour que des conditions de carence soient atteintes. La

production de sidérophores est également fortement favorisée lors de l'exposition à des stress atmosphériques (Sullivan et al., 2012).

La présence de sidérophores dans les nuages, si elle est confirmée, pourrait alors impacter la chimie du fer dans la phase aqueuse des nuages. En effet, le fer est connu pour tenir une place importante dans la chimie radicalaire en raison principalement de la production de radicaux hydroxyles par photolyse des complexes de fer(III) et également *via* des réactions rédox impliquant les radicaux hydroperoxydes et superoxydes ainsi que le peroxyde d'hydrogène. Ces réactions sont détaillées dans les modèles de chimie atmosphérique et l'implication du fer dans la capacité oxydante de la phase aqueuse des nuages est uniquement modulée par la présence d'oxalate comme modèle de complexation du fer. Or, si l'hypothèse de la présence de sidérophores est avérée, ces molécules en raison de leur haute valeur de complexation peuvent entrer en compétition avec d'autres ligands comme l'oxalate ; leur concentration peut aller de 0,1 à quelques micromolaires. De plus, certains sidérophores représentent un fort intérêt pour la photochimie atmosphérique car ils portent des groupements photoactifs. On peut donner l'exemple des pyoverdines qui sont des sidérophores contenant des groupements chromophores. Comme il a été montré dans cette étude, ces sidérophores sont produits majoritairement par des *Pseudomonas*. Ces sidérophores peuvent être transformés menant à la réduction du fer(III) en fer(II). Ce type de réactivité pourrait influencer toutes les réactions impliquant le fer, notamment la réaction de Fenton que l'on retrouve dans les nuages.

Pour illustrer ces hypothèses, une collaboration a été menée entre notre équipe et l'équipe de photochimie de notre institut (Passananti et al., 2016). Une molécule de pyoverdine a été produite par une souche de *Pseudomonas* screenée lors de nos travaux, purifiée et caractérisée. Une étude de photochimie du complexe Pyoverdine-Fe(III) a été menée et a conduit au schéma réactionnel présenté dans la **Figure 25**, à noter particulièrement la conversion du Fe(III) en Fe(II) ainsi que la dégradation du ligand pour former de l'acide acétique (composé retrouvé en abondance dans les nuages). Un autre point important de cette étude a été de comparer la complexation du Fe(III) par la pyoverdine et par l'oxalate (**Figure 26**) ; même lorsque l'oxalate est 500 fois plus concentré que la pyoverdine, le complexe pyoverdine-fer(III) est toujours d'intérêt.

Finalement, à notre connaissance, cette étude est originale car c'est la première à avoir effectué un si large screening de souches microbiennes dans l'objectif d'évaluer leur capacité à produire des sidérophores afin d'étayer leur présence dans les eaux de nuage.

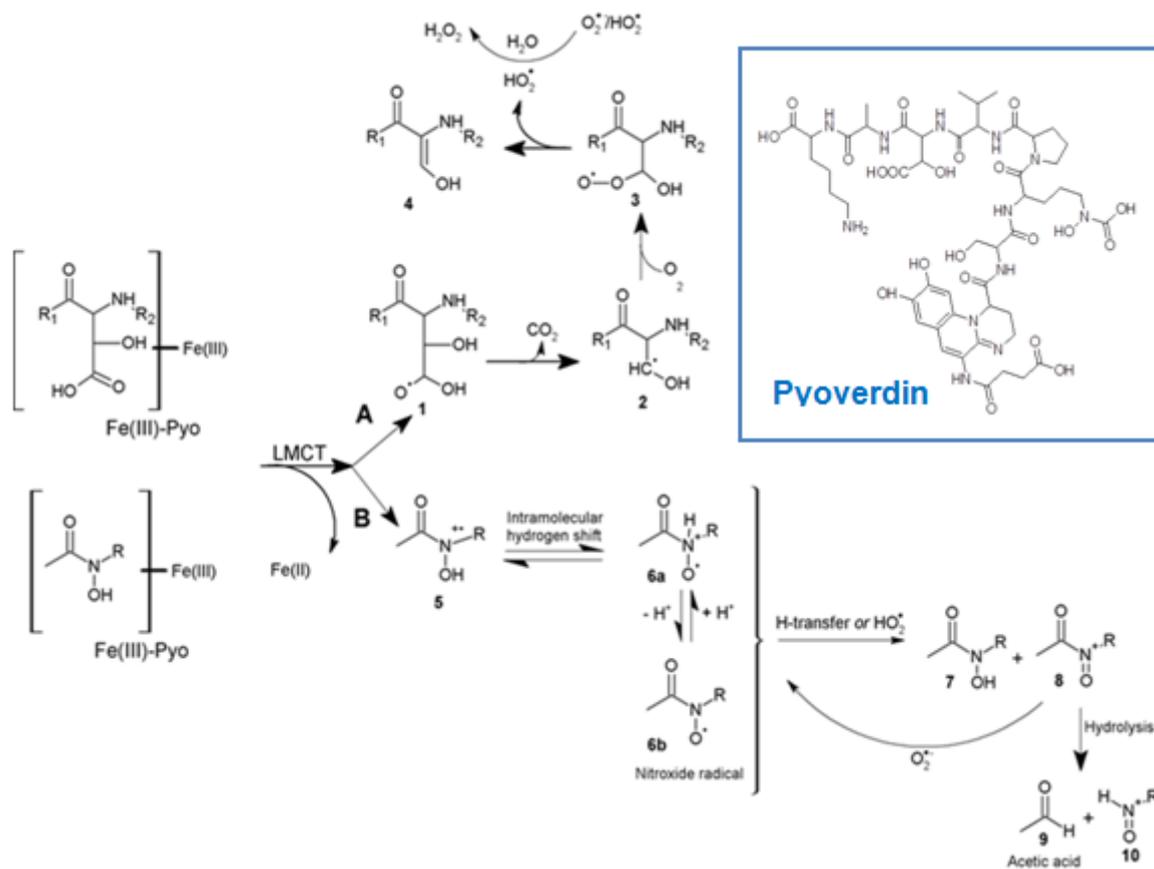


Figure 25: Proposition de mécanismes du complexe fer(III)-Pyo sous irradiation polychromatique (Passananti et al., 2016).

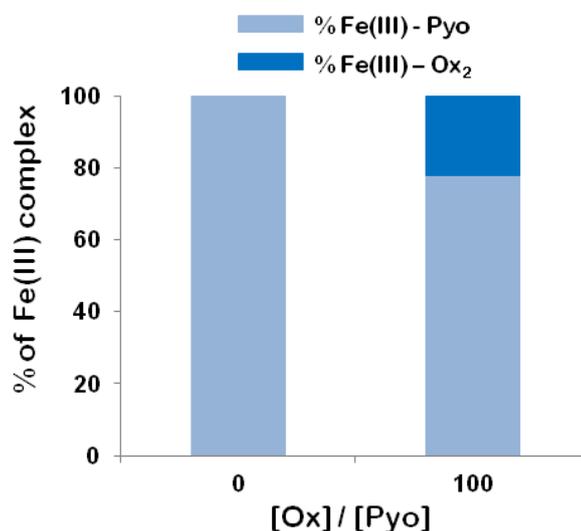


Figure 26: Proportions de complexes de fer(III) exprimé en pourcentage, à différents ratios oxalate/pyoverdine ([Ox]/[Pyo]) considérant une concentration initiale en fer(III) de 2 μ M et une concentration initiale de 2 μ M à pH 4 en oxalate et en pyoverdine (Passananti et al., 2016).

Chapitre III :

Interactions entre les microorganismes et le peroxyde d'hydrogène dans les nuages

1. Introduction

Le peroxyde d'hydrogène, molécule oxydante de la famille des hydroperoxydes, est retrouvé dans l'atmosphère en phase gazeuse et en phase aqueuse à des concentrations de l'ordre du micromolaire. En raison de son implication dans de nombreux processus importants tels que l'oxydation du S(IV) en S(VI), connue dans les phénomènes de pluie acide, ou les réactions de Fenton et photo-Fenton, faisant également intervenir le fer, le peroxyde d'hydrogène a une position centrale dans la chimie atmosphérique. En tant que réservoir de radicaux ($\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$ et autres $\text{RO}_2\cdot$) (Gunz & Hoffmann, 1990), il se révèle être un indicateur fiable du niveau des oxydants dans l'atmosphère. Ainsi, il est clair que H_2O_2 joue un grand rôle sur la capacité oxydante de l'atmosphère. De plus, il a été montré que le peroxyde d'hydrogène est impacté par une grande variété de paramètres météorologiques et notamment par l'activité photolytique, entraînant une variabilité journalière et saisonnière de sa concentration dans l'atmosphère (Vione et al., 2003). Pour toutes ces raisons, une quelconque évolution de la concentration de H_2O_2 peut mener à des modifications de la chimie de l'atmosphère.

Les travaux de Vaïtilingom et al. (2013) et Joly et al. (2015) ont montré que les microorganismes des nuages ont la capacité de dégrader de manière efficace H_2O_2 , et même en présence de lumière, et de ce fait de radicaux (notamment $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$) ; aucun effet n'a été observé sur leur vitesse de dégradation et aucune altération de leur viabilité n'a été observé. Ces résultats suggèrent fortement la mise en place du métabolisme du stress oxydant chez les microorganismes dans un contexte de nuage. Le peroxyde d'hydrogène produit des radicaux, par photolyse ou réaction de Fenton et photo-Fenton, qui sont extrêmement nocifs pour les microorganismes s'ils se retrouvent à des concentrations trop élevées dans les cellules. Ils peuvent endommager des composants cellulaires majoritaires tels que les protéines, l'ADN ou les lipides et induire la mort cellulaire. Paradoxalement, à dose raisonnable, ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont nécessaires à la cellule car elles interviennent dans divers mécanismes physiologiques. Il existe dans la cellule un équilibre entre les productions de ces ROS (pro-oxydants) et les systèmes de régulation mis en place (antioxydants); une situation de stress oxydant apparaît lorsque cette balance redox est modifiée en faveur des espèces activées de l'oxygène. Pour ces raisons, les microorganismes ont mis en place un arsenal de défense (production de pigments, de molécules antioxydantes ou d'enzymes spécifiques) pour combattre ces agressions rencontrées dans les nuages.

Dans ce cadre, il a été question dans un premier temps de compléter et d'affiner les travaux de Vaïtilingom et al. (2013) sur la biodégradation du peroxyde d'hydrogène entrepris

à partir d'échantillons réels. La dégradation de H₂O₂ observée était par conséquent globale car dépendante de plusieurs facteurs ; en effet, le fait de travailler en milieu naturel implique la présence d'un grand nombre de composés inorganiques et organiques, reflétant la complexité chimique du nuage, ainsi qu'une variabilité microbienne importante. Afin d'étudier plus finement la dégradation du peroxyde d'hydrogène par les microorganismes des nuages, il a été décidé d'isoler chacun des facteurs pouvant avoir un effet sur la dégradation du peroxyde d'hydrogène afin de préciser les mécanismes mis en jeu. Pour cela, des expériences en microcosme, ayant pour objectif de mimer au plus proche les conditions réelles de nuage, ont été réalisées en présence ou en absence de cellules, de complexe de fer(III), de peroxyde d'hydrogène et de lumière solaire artificielle. Des mesures précises de la concentration en H₂O₂ ont été effectuées dans chacune des conditions étudiées afin de déterminer des vitesses de dégradation et évaluer quels paramètres étaient impliqués dans la biotransformation du peroxyde d'hydrogène. De plus, l'impact de H₂O₂ sur l'état énergétique des cellules a été évalué par des mesures de concentrations d'ATP en présence et absence de celui-ci. Pour finir, des études statistiques (univariées et multivariées), dont un test de corrélation entre H₂O₂ et ATP, ont été réalisées à partir de données de 37 prélèvements de nuage collectés au sommet du puy de Dôme.

Après avoir mis en évidence que le peroxyde d'hydrogène modulait le métabolisme énergétique des bactéries des nuages, nous avons décidé dans le cadre d'une deuxième approche d'approfondir nos connaissances quant aux modalités de survie des bactéries aux conditions très oxydantes rencontrées dans les eaux de nuage. En effet, en plus de la production de pigments, de molécules antioxydantes ou de la production d'enzymes spécifiques, les bactéries exposées aux ROS sont suspectées de modifier une partie de leur métabolisme. Dans ce cadre, la métabolomique est apparue comme une approche performante pour évaluer les changements au niveau du métabolome des bactéries des nuages quand celles-ci sont en condition de stress oxydant. Pour cela, nous avons étudié par métabolomique la réponse d'une souche de *Pseudomonas graminis* (13b-3), choisie comme souche modèle des prélèvements nuageux effectués au puy de Dôme, au stress engendré par le peroxyde d'hydrogène. En combinant des analyses RMN et LC-MS, l'objectif a été d'identifier un maximum de métabolites discriminants afin de mettre en évidence les différentes voies métaboliques impactées par ce stress. La métabolomique nous a permis également de mettre en évidence la résilience du métabolome de cette souche après l'exposition à ce stress.

2. Impact de H₂O₂ sur le métabolisme microbien dans les nuages

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Souches bactériennes utilisées

Dans le cadre de cette étude, trois souches bactériennes appartenant à la classe des Gamma-Protéobactéries (*Pseudomonas*) et Alpha-Protéobactéries (*Sphingomonas*) ont été sélectionnées. Ces souches ont été choisies afin de représenter les genres microbiens majoritairement rencontrés dans les prélèvements d'eau de nuage collectés au sommet du puy de Dôme (1465 m, France) (Vaitilingom et al., 2012). Le nombre de souches a été fixé à trois en raison de la durée relativement longue des expériences et du nombre de conditions différentes à étudier. Le **Tableau 9** décrit brièvement chacune d'entre elles.

Tableau 9: Descriptif des souches étudiées.

N° souche	Classe	Espèce	N° d'accèsion GenBank
13b-2	Gamma-Protéobactérie	<i>Pseudomonas syringae</i>	DQ512785
13b-3	Gamma-Protéobactérie	<i>Pseudomonas graminis</i>	DQ512786
14b-5	Alpha-Protéobactérie	<i>Sphingomonas sp.</i>	DQ512789

Les souches ont été cultivées en milieu R2A liquide, relativement pauvre en nutriments, (Reasoner & Geldreich, 1985) sous agitation (200 r.p.m) et à 17°C pendant le temps nécessaire pour que les cellules soient en phase exponentielle de croissance (entre 17 et 48h, selon la souche). Les cellules ont été centrifugées à 10481 g pendant 3 min et rincées deux fois dans le milieu artificiel de nuage (voir section 2.1.2.). Pour l'inoculation des microcosmes, la concentration en cellules a été fixée à 10⁶ cellules.mL⁻¹, concentration estimée par mesure de densité optique à 575 nm. Finalement, celle-ci a été déterminée de manière plus précise par cytométrie en flux (BD Facscalibur Becton-Dickinson; λ_{exc}= 488 nm; λ_{em} = 530 nm) en fin d'expérience.

2.1.2. Milieu nuage artificiel de composition marine

La composition des nuages prélevés au sommet du puy de Dôme est à 51% de composition dite marine, c'est-à-dire principalement caractérisée par de fortes concentrations en ions Na⁺, et Cl⁻, un pH neutre, une plus faible concentration en ions NO₃⁻, NH₄⁺ et SO₄²⁻ (Deguillaume et al., 2014). Pour cette raison, il nous a semblé judicieux d'effectuer les expériences en milieu nuage artificiel de composition marine afin de se rapprocher au mieux de la composition chimique de la phase aqueuse des nuages la plus souvent rencontrée. La composition du nuage artificiel marin a été déterminée d'après l'étude de 101 évènements nuageux prélevés au puy de Dôme. Le

Tableau 10 récapitule les concentrations des espèces chimiques majeures constituant ce milieu (Vaïtilingom et al., 2011).

Tableau 10: Composition chimique (1X) et pH du milieu de nuage artificiel marin utilisé pour les expériences de biodégradation (Vaïtilingom et al., 2011).

Espèces chimiques	Concentration (μM)
Acétate	20
Formiate	15
Succinate	1,5
Oxalate	3
Cl^-	250
NO_3^-	200
SO_4^{2-}	50
Na^+	250
NH_4^+	200
K^+	10
Mg^{2+}	10
Ca^{2+}	40
pH	6,0

Pour cette étude, le milieu de nuage artificiel marin a été concentré par 10 (dit 10X) par rapport au réel, afin de stabiliser le pH. Il en a été de même pour la concentration en bactéries, fixée à 10^6 cellules.mL⁻¹, pour conserver une proportion bactéries/substrats identique à celle des nuages. Il a été démontré que lorsque ce ratio est maintenu, la vitesse de dégradation des espèces présentes l'est également (Vaïtilingom et al., 2010). Finalement, le milieu nuage artificiel obtenu a été ajusté à pH 6 (quelques gouttes de NaOH à 1,38 M et de H₂SO₄ à 0,39 M) et stérilisé par filtration sur une membrane polyéthersulfone (PES) de porosité 0,20 μm (Fisher Scientific) avant utilisation.

2.1.3. Expériences de biodégradation réalisées en microcosme

2.1.3.1. Dispositif expérimental

Les expériences de biodégradation ont consisté à incuber du milieu de nuage artificiel de composition marine en bioréacteur (Infors HT Multitron II), permettant de contrôler à la fois la température (17°C) et la vitesse d'agitation (130 r.p.m). De plus, cette enceinte est équipée de lampes émettant dans l'ultraviolet (Sylvania Reptistar; 15W; 6500K; UVA (jusqu'à 30%), UVB (jusqu'à 5%)) pour mimer la lumière solaire dans les nuages. Les expériences ont ainsi été réalisées dans différentes conditions : en présence ou absence de peroxyde d'hydrogène, de complexe de fer et de lumière.

Pour travailler en présence de bactéries et de lumière, des dispositifs spécifiques mis en place au laboratoire ont été utilisés (voir Vaïtilingom et al., 2013) permettant de rester en condition stérile tout en laissant passer les UV et l'air permettant aux bactéries de respirer.

Concernant les conditions à l'obscurité, elles ont été réalisées dans des erlenmeyers ambrés ne laissant pas passer les UV et bouchés par des cotons stériles permettant à l'air de passer (**Figure 27**). Chaque dispositif incubé à température et vitesse d'agitation constantes contenait 100 mL de milieu artificiel de nuage et a été inoculé à 10^6 cellules par millilitre.

L'ensemble de la verrerie a été, au préalable, stérilisé par autoclave (121 °C, 20 min). Des prélèvements ont été réalisés en condition stérile à intervalles réguliers puis ont été conservés à -20°C ou à 4°C jusqu'à leur analyse.



Figure 27: Photographie du dispositif expérimental.

2.1.3.2. Préparation des solutions de peroxyde d'hydrogène et de complexe de fer

Une solution de 20 mM de peroxyde d'hydrogène a été préparée par dilution dans l'eau ultra-pure d'une solution commerciale non stabilisée (51 μ L dans 25 mL) (H_2O_2 , 30%; Fluka Analytical). Une solution à 0,8 mM de complexe de fer(III), de stœchiométrie 1:1, a été préparée à partir de chlorure de fer(III) hexahydraté ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$; Sigma-Aldrich) et d'acide éthylènediamine -N, N' - disuccinique ((S,S)-EDDS ; 35% dans l'eau ; Sigma-Aldrich).

Ces deux solutions ont été préparées juste avant chaque expérience. Les concentrations finales de travail étaient de 20 μ M pour le peroxyde d'hydrogène et 4 μ M pour le complexe de fer(III). Ces concentrations ont été choisies, afin d'être cohérent avec les concentrations réelles détectées dans les échantillons collectés au sommet du puy de Dôme ([Deguillaume et al., 2014](#)).

2.1.4. Analyses

2.1.4.1. Dosage du peroxyde d'hydrogène

L'évolution de la concentration en peroxyde d'hydrogène a été suivie à l'aide d'une méthode fluorimétrique miniaturisée ([Lazrus et al., 1985](#) ; [Väitilingom et al., 2013](#)) basée sur

la réaction entre le peroxyde d'hydrogène avec la peroxydase de raifort (horseradish peroxydase, HRP) et l'acide p-hydroxyphénylacétique (HPAA). Les composés phénoliques sont connus pour leur capacité à dimériser ainsi que pour leurs propriétés fluorescentes liées à cette oxydation. L'acide p-hydroxyphénylacétique, utilisé dans le cas présent, joue le rôle de titrant. La HRP oxyde l'acide p-hydroxyphénylacétique en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme agent d'oxydation. Le radical formé subit alors une dimérisation pour finalement donner un produit fluorescent (**Figure 28**).

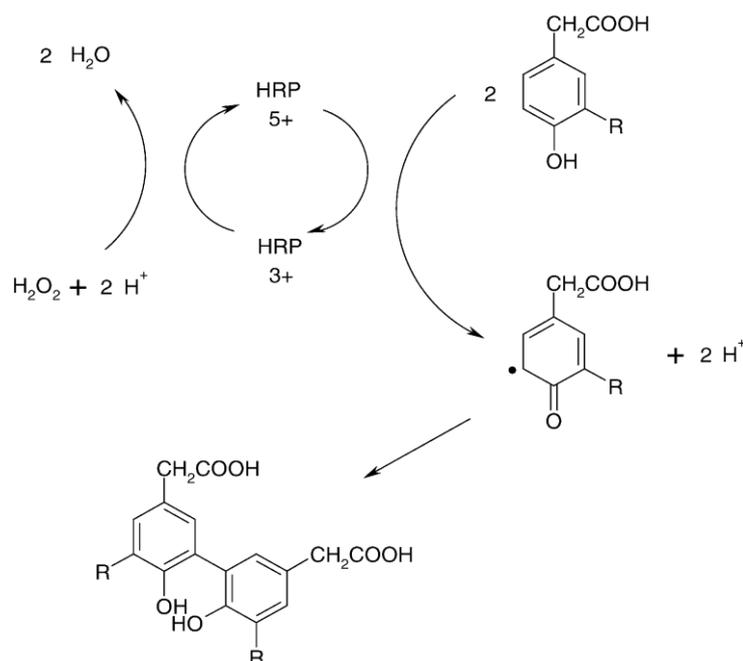


Figure 28: Principe et mécanisme réactionnel du dosage de H_2O_2 (Svensson et al., 2004).

C'est ce dimère dont la formation est directement proportionnelle à la quantité de peroxyde d'hydrogène présent dans le milieu, qui a été suivi par fluorimétrie. Le complexe fluorescent est excité à une longueur d'onde λ_{ex} de 320 nm et réémet à λ_{em} égale à 390 nm. Les mesures ont été effectuées dans un lecteur de plaques 96 puits (**Figure 29**) à fluorescence (Safire II TECAN®). Le système est piloté par le logiciel Magellan 6 qui a permis l'acquisition et le traitement des données.

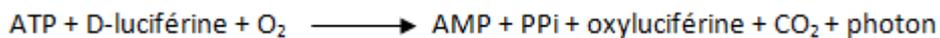


Figure 29: Plaque noire 96 puits utilisée en fluorescence.

Pour réaliser ces analyses, une solution de dosage a été préparée en ajoutant 10 µL de peroxydase (HRP ; 380 U.mL⁻¹) à 990 µL d'une solution de HPAA préparée à une concentration de 1,5 mM dans du tampon phosphate à 100 mM et à un pH de 7,4 (Na₂HPO₄, 2H₂O, NaH₂PO₄, 2H₂O ; Fluka Analytical). Cette solution est à préparer avant chaque série d'analyse et doit être conservée au frais à l'abri de la lumière. Finalement, 200 µL de cette solution de travail sont ajoutés à 50 µL de la solution que l'on cherche à doser. En attente de l'analyse, l'échantillon est congelé à -25°C.

2.1.4.2. Dosage de l'adénosine triphosphate (ATP)

Les concentrations en adénosine triphosphate ont été déterminées par bioluminescence. Cette technique est basée sur une réaction enzymatique impliquant la luciférine et luciférase. L'ATP intervient dans l'étape d'activation du complexe luciférase-luciférine dont l'oxydation est à l'origine d'une émission lumineuse. Ainsi, la lumière émise par cette réaction enzymatique de bioluminescence est mesurée.



Le dosage utilisé pour les analyses a été adapté du protocole du kit commercial Biothema[®] (Koutny et al., 2006). Un volume égal d'échantillon et de solution d'extractant B/S du kit commercial Biothema[®] (ATP Biomass Kit HS), sont mélangés et fortement agités (1 min au vortex), puis le mélange est conservé à -25°C avant analyse.

2.1.4.3. Détermination du nombre de cellules

2.1.4.3.1. La cytométrie en flux

La concentration en cellules, à la fin de chaque expérience, a été déterminée précisément par cytométrie en flux. Cette technique permet de faire défiler des cellules dans le faisceau d'un laser dans l'objectif de les compter et de les caractériser. Les cellules bactériennes étudiées ne possédant pas de propriétés d'autofluorescence, l'ajout d'un fluorochrome (SYBR Green I ; 10,000 X dans du DMSO ; Invitrogen), molécule capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation, est nécessaire. Le SYBR-Green I (**Figure 30**) est composé de plusieurs noyaux aromatiques conjugués ; il possède une longueur d'onde d'excitation maximale de 497 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm. Ce fluorochrome est ajouté avant analyse à l'échantillon pour se lier à la cellule.

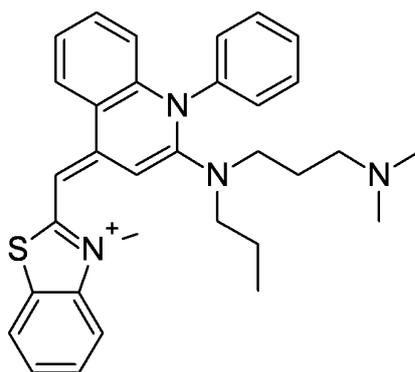


Figure 30: Structure du SYBR-Green I.

2.1.4.3.2. Le dénombrement sur boîte

Afin de déterminer le taux de survie des cellules en présence de peroxyde d'hydrogène, la méthode des dilutions successives a été appliquée (**Figure 31**). Un dénombrement sur boîte est ainsi réalisé sur des boîtes de R2A gélosé à différents temps : au début de l'expérience et après 3, 7 et 24 heures d'incubation à 17°C, le comptage des colonies formées étant réalisé lui-même après 3 jours d'incubation. Pour cela, 100 µL de l'échantillon sont dilués en série dans 900 µL d'une solution de NaCl à 0,8% (m/m) stérile. Le chlorure de sodium a pour rôle d'empêcher une variation trop importante de la pression osmotique des cellules lors des dilutions, ce qui entrainerait leur éclatement.

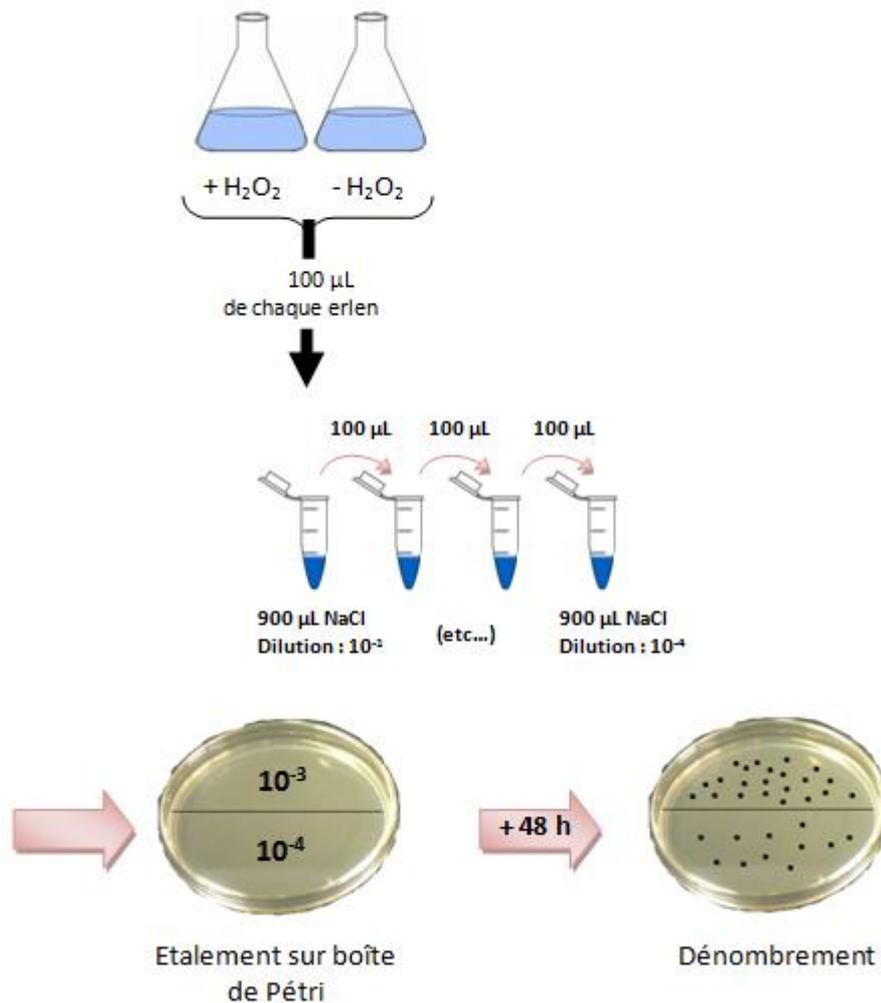


Figure 31: Schématisation de la méthode des dilutions successives.

2.1.5. Détermination des vitesses initiales de dégradation du peroxyde d'hydrogène.

Pour chaque expérience, la concentration de H_2O_2 en fonction du temps a été représentée. La partie initiale de la représentation graphique (concentration de H_2O_2 en fonction du temps) a été linéarisée par une fonction de type affine avec le logiciel Origin 6.1 afin d'avoir accès à la valeur de vitesse de dégradation du peroxyde d'hydrogène.

Trois réplicats ont été effectués et les barres d'erreurs sur les graphiques représentent l'erreur standard.

2.1.6. Tests statistiques

L'analyse en composantes principales a été réalisée avec le logiciel R 3.1.2. Quant au test statistique de significativité, il a été réalisé avec le logiciel PAST (Hammer et al., 2001). Une différence a été considérée comme significative pour une p-valeur strictement inférieure au seuil de 0,05 (soit 5%).

3. Réponse au stress oxydant par une bactérie modèle des nuages : le cas de H₂O₂

Avant d'entrer dans les détails des expériences effectuées en laboratoire, une présentation générale d'une approche métabolomique et des différentes étapes la constituant, est donnée ci-dessous en guise d'introduction.

3.1. La métabolomique

Par définition, la métabolomique est l'étude chimique du métabolome, ensemble des métabolites (petites molécules organiques tels que les lipides, les acides aminés, les sucres, *etc.*) présents dans un système biologique (bactéries, par exemple) à un instant donné. Cette approche découle des études en « omiques » de plus en plus utilisées :

Génomique (ADN) □ Transcriptomique (ARNm) □ Protéomique (protéines) ■ **Métabolomique**

La génomique, la transcriptomique et la protéomique reflètent ce qui peut se passer tandis que la métabolomique reflète ce qu'il se passe.

La **Figure 32** illustre les six étapes types d'une approche métabolomique.



Figure 32: Différentes étapes d'une expérience type en métabolomique.

La métabolomique est une approche différentielle c'est-à-dire qu'elle a pour objectif principal de comparer un même type d'échantillons, issu de deux conditions différentes, afin de déterminer quels sont les métabolites qui peuvent expliquer que ces deux populations d'échantillons sont significativement différentes.

La métabolomique peut alors être utilisée pour mettre en évidence des marqueurs diagnostiques d'un état donné et/ou, en donnant une image du métabolisme à un instant donné, pour comprendre les modifications des voies métaboliques liées à une différence de conditions.

La première étape d'une approche métabolomique consiste à établir un protocole biologique qui se doit d'être d'une extrême rigueur pour que toutes les expériences se déroulent exactement avec les mêmes paramètres expérimentaux à l'exception de la condition modifiée. Cet aspect est particulièrement important dans la préparation de l'échantillon analytique. Celui-ci peut être composé de plusieurs étapes de préparation des échantillons (centrifugation, extraction des métabolites, évaporation, *etc.*).

Une fois que les échantillons sont générés, la deuxième étape consiste à les analyser. Les techniques analytiques les plus classiquement utilisées sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (SM). La spectrométrie de masse peut être couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) ou en phase liquide (LC-MS).

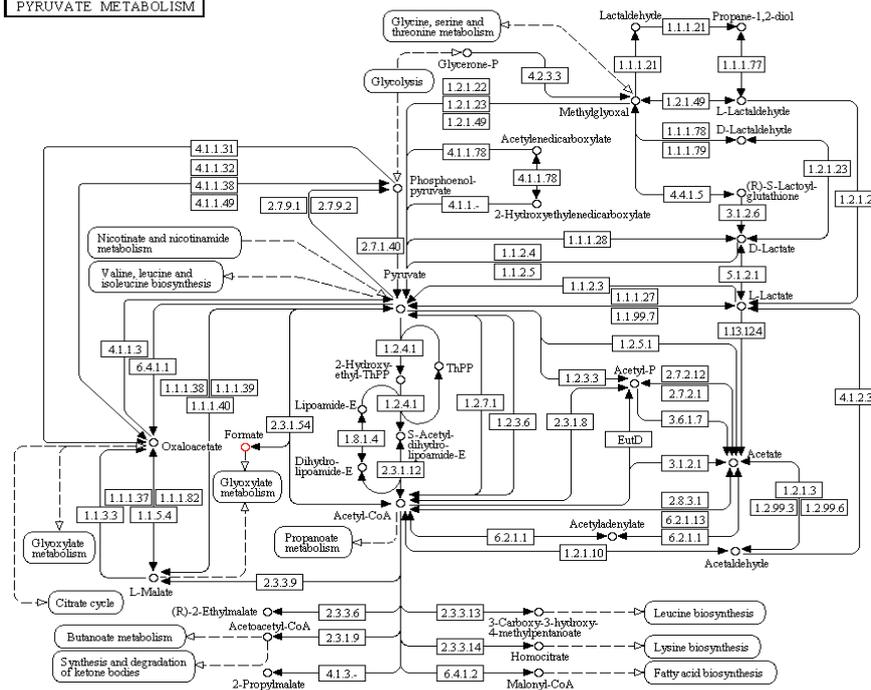
Il existe deux types d'approche: la métabolomique ciblée et la métabolomique non-ciblée. La métabolomique ciblée recherche un métabolite ou une famille de métabolites particuliers. Elle permet de viser des voies métaboliques précises et d'éventuellement de quantifier plusieurs métabolites de structure connue. L'acquisition des données dans le cadre d'une approche ciblée peut être réalisée aussi bien par SM que par RMN. La métabolomique non-ciblée, elle, consiste en la comparaison du métabolome entier.

Les données obtenues, par approche ciblée ou non-ciblée, sont ensuite soumises à une étude statistique (univariée et/ou multivariée). Cette étape a pour rôle de mettre en évidence une potentielle discrimination significative entre les deux populations étudiées. La différence peut être qualitative (un ou plusieurs métabolites se trouvent dans une population mais pas dans l'autre) ou quantitative (la différence entre les populations est basée sur une concentration relative différente d'un ou plusieurs métabolites).

L'étape suivante, à savoir la caractérisation structurale des métabolites, reste la difficulté majeure dans les études métabolomiques et est très demandeuse en temps. Elle est effectuée en utilisant des bases de données disponibles (Kegg, HMDB, MassBank, etc.). Ces banques de données donnent accès à une liste de composés potentiels, dont il faut ensuite confirmer la structure chimique exacte. Cette confirmation est généralement faite soit par comparaison du spectre expérimental avec un standard, soit en utilisant des expériences complémentaires d'analyse structurale : en RMN, expériences à 2 dimensions (J-résolution, corrélations ^1H - ^1H et ^1H - ^{13}C), en SM expériences haute résolution pour l'obtention de masses précises exactes (Orbitrap) et expériences tandem pour l'obtention de schémas de fragmentation (MS/MS).

La finalité d'une étude métabolomique est d'avoir accès aux différentes voies métaboliques impliquées dans l'étude considérée, on fait appel alors à des bases de données telles que KEGG, qui permettent d'insérer les biomarqueurs identifiés dans les voies impliquées (**Figure 33**).

PYRUVATE METABOLISM



00620 6/6/12

Figure 33: Exemple de voies métaboliques (métabolisme du pyruvate) obtenu avec Kegg (<http://www.kegg.jp/kegg/>).

3.2. Matériel et méthodes

Trois expériences indépendantes ont été réalisées afin d'avoir un nombre suffisant de réplicats biologiques (trois lots de 12 échantillons). Ces expériences ont été menées en milieu de nuage artificiel de composition marine pour les mêmes raisons qu'évoquées au paragraphe 2.1.2 de ce chapitre. La biodégradation du peroxyde d'hydrogène et l'évolution de la quantité d'ATP ont également été suivies au cours du temps dans un erlenmeyer indépendant pour chacune des expériences effectuées. Les conditions de culture de la souche utilisée ainsi que la préparation du milieu nuage sont identiques à celles décrites précédemment (Chapitre III, paragraphes 2.1.1. et 2.1.2., page 113 et 114) ; elles ne seront pas rappelées ci-dessous.

3.2.1. Souche utilisée

Pour ces expériences, nous avons sélectionné une souche de *Pseudomonas graminis* (13b-3 ; DQ512786) appartenant à la classe des Gamma-Protéobactéries ; c'est le genre le plus représenté dans les échantillons de nuage (Vaïtilingom et al., 2012) collectés au sommet du puy de Dôme. La concentration en cellules a été fixée à 10^7 cellules.mL⁻¹. Cette souche fait également partie des 3 souches pour lesquelles nous avons montré une corrélation entre ATP et H₂O₂ (cf. paragraphe 2 de ce chapitre, page 113).

3.2.2. Espèces chimiques

La solution de peroxyde d'hydrogène a été préparée à partir d'une solution commerciale non stabilisée (30% ; Fluka Analytical). La concentration a été fixée à 200 µM.

Concernant l'extraction des métabolites, un mélange ternaire 1 :2 :2 (v/v/v) d'eau (H₂O; Optima LC-MS; Fisher Scientific), d'acétonitrile (CH₃CN; 99,99%; Optima LC-MS; Fisher Scientific) et de méthanol (CH₃OH; 99,9%; Fluka Analytical) a été utilisé.

Les analyses par RMN ont été réalisées dans de l'eau deutérée (D₂O; 99,96%D; Eurisotop), dont le pH est ajusté à 7 par l'ajout de tampon phosphate (KH₂PO₄; 99,50%, K₂HPO₄; 99,50%; Sigma Aldrich), en présence d'azoture de sodium (NaN₃; 99,99% ; Sigma-Aldrich).

La phase mobile utilisée pour les analyses LC-MS était composée d'eau (H₂O; ULC-MS; Biosolve), d'acétonitrile (CH₃CN; ULC-MS; 99,97%) et d'acide formique (HCOOH; ULC-MS; 99%; Biosolve).

3.2.3. Conditions d'incubation et extraction des métabolites

Pour chaque expérience (**Figure 34**), 12 erlenmeyers ambrés (pour se protéger de la lumière et éviter la photolyse de H₂O₂), ont été incubés à 17°C et à une vitesse d'agitation de 110 r.p.m. Chaque erlenmeyer contenant 150 mL de solution artificielle de nuage a été inoculé à 10^7 cellules.mL⁻¹. Avant incubation, 200 µM de peroxyde d'hydrogène ont été ajoutés (150 µL) à la moitié des échantillons. Après 50 min et 24 h d'incubation, la moitié des erlenmeyers (3 avec et 3 sans H₂O₂) ont été extraits : pour chaque erlenmeyer, le culot bactérien a été isolé par deux étapes de centrifugation (5 min, 4°C, 12000 g) et de lavages successifs par une solution de NaCl à 0,8%. Les métabolomes des culots bactériens ont ensuite été extraits par 1,2 mL du solvant ternaire préalablement refroidi dans un bain de glace (Lin et al., 2007; Rabinowitz & Kimball, 2007). Après une dernière étape de centrifugation, les surnageants ont été fractionnés afin de pouvoir les analyser à la fois en RMN (750 µL) et en LC-MS (4 aliquots de 50 µL). De plus, 10 µL des extraits de chaque erlenmeyer ont été rassemblés pour effectuer des contrôles qualité.

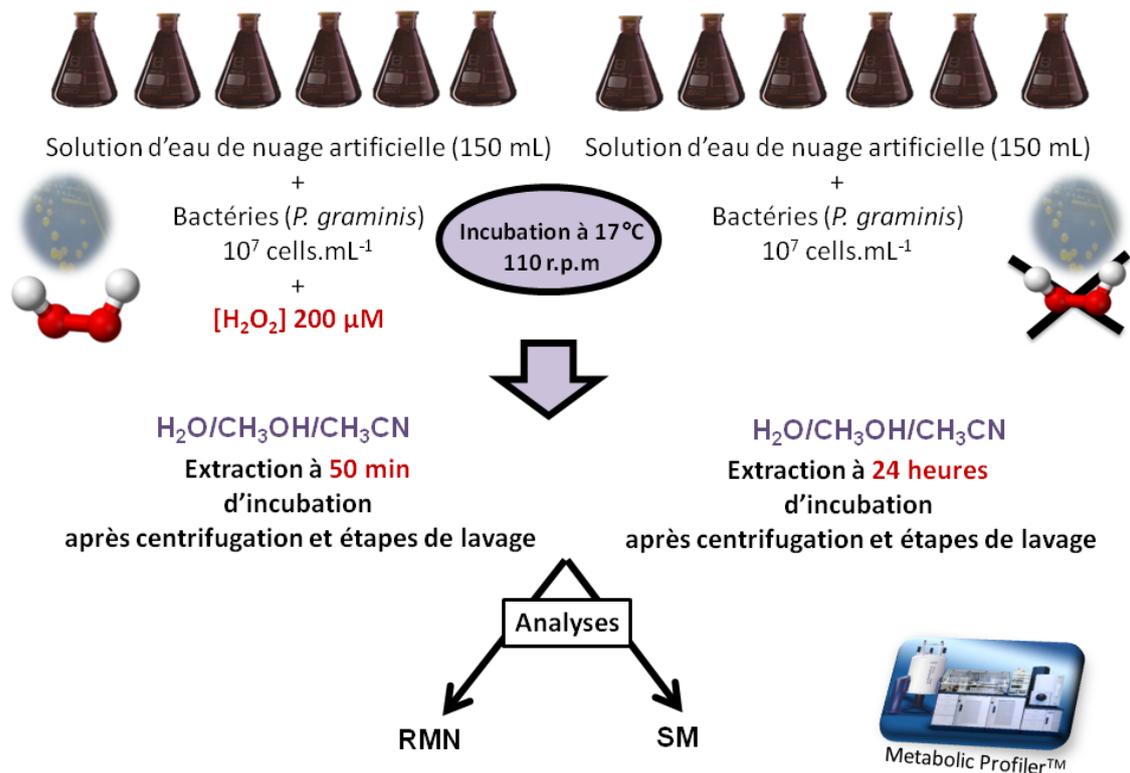


Figure 34: Démarche expérimentale adoptée pour les expériences de métabolomique.

Tous les échantillons stressés par la présence de H₂O₂ ou les échantillons référence ont ainsi été traités exactement dans les mêmes conditions de manière à s'assurer que les métabolites qui seront par la suite identifiés comme marqueurs seront liés uniquement en raison du stress engendré par H₂O₂ et non pas à cause de biais expérimentaux.

En parallèle, une culture bactérienne supplémentaire a été effectuée pour les analyses RMN 2D qui requièrent plus de sensibilité.

3.2.4. Biodégradation du peroxyde d'hydrogène et évolution de la quantité d'ATP

Les méthodes d'analyse du peroxyde d'hydrogène et de l'ATP ont été décrites en détail dans les paragraphes 2.1.4.1. et 2.1.4.2. de ce chapitre.

Concernant les parties 3.2.5., 3.2.6. et 3.2.7., de plus amples informations sont données dans la publication associée (voir partie Résultats 4.2., page 129).

3.2.5. Analyses par LC-MS et LC-MS/MS

3.2.5.1. Préparation des échantillons

Pour chaque échantillon, trois réplicats techniques (10 µL) ont été effectués et analysés de manière consécutive pour vérifier qu'aucune dérive analytique ne venait fausser les résultats. Enfin, cinq pools de l'ensemble des extraits ont été analysés et utilisés pour contrôler la qualité des données.

3.2.5.2. Analyses par LC-MS pour le profilage des métabolites

Les analyses par LC-MS ont été effectuées sur la plateforme du Metabolic Profiler (Bruker). Le profileur métabolique est constitué d'un système chromatographique en phase liquide (Agilent 1200 series) couplé à un spectromètre de masse MicroTof équipé d'une source d'ionisation de type électrospray (Bruker).

La colonne de séparation qui a été utilisée est une colonne de type C18 (HSST 3, 150*2,1 mm 1,8 µm; Waters). Deux phases mobiles (A et B) composées d'eau et d'acétonitrile contenant toutes deux 0,1% d'acide formique ont été utilisées à un débit de 0,2 mL/min. Le gradient d'élution utilisé est le suivant: 0-2 min, 100% de phase A; entre 2 et 15 min, gradient linéaire jusqu'à 0% de phase A; entre 15- et 22 min, 100% de phase B; entre 22-22,10 min gradient linéaire pour revenir à 100% de phase A et 4 min d'équilibre avec 100% de phase A. Le spectromètre de masse a été utilisé en mode d'ionisation positive et négative. Les logiciels OtofControl 3.2 et Hystar 3.2 ont été utilisés pour l'acquisition des données.

3.2.5.3. Analyses par UPLC-MS/MS pour l'identification structurale des métabolites

Quelques échantillons représentatifs des éléments du modèle statistique ont été analysés sur un LTQ Orbitrap MS avec des conditions chromatographiques similaires au profilage LC-MS expliquées précédemment (gradient, colonne). Le rapport m/z de chaque composant a été recherché dans les chromatogrammes résultants pour obtenir une précision de masse supérieure. L'ion parent a été identifié à partir de fragments et d'adduits en source, et des informations structurales supplémentaires sur les composants ont été obtenues en effectuant une fragmentation en mode tandem sur des ions pertinents en utilisant la UPLC-qTOF-MS/MS. Lorsque des standards étaient disponibles, ceux-ci ont été analysés pour confirmer des identifications hypothétiques. Ces analyses et identifications sont toujours en cours.

3.2.6. Analyses par RMN 1D et 2D

3.2.6.1. Préparation des échantillons

Les échantillons ont été évaporés à 10°C à l'aide d'un concentrateur à vide (LabConco; ThermoScientific) pendant environ 48 h pour éliminer toute trace d'eau. Les extraits ont ensuite été resuspendus dans 300 µL de D₂O puis réévaporés. Cette opération a été répétée deux fois. Finalement pour l'analyse, les extraits ont été resuspendus dans un mélange de 90% de D₂O et de 10% de tampon phosphate (300 mM préparé dans du D₂O) auquel on a ajouté 40 mg d'azoture de sodium pour éviter que des microorganismes ne se développent.

3.2.6.2. Analyses par RMN 1D pour le profilage des métabolites

Les expériences de profilage ont été effectuées par RMN ¹H (séquence noesygppr 1D avec présaturation de l'eau) à l'aide d'un spectromètre Avance III 500 MHz équipé d'une sonde (¹H/¹⁹F/¹³C/¹⁵N) avec une cellule de mesure de 60 µL (Bruker Biospin Wissenbourg, France). Des tubes de 5 mm ont été utilisés. Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un passeur automatique réfrigéré (Sample Jet).

3.2.6.3. Analyses par RMN 1D et 2D pour l'identification structurale des métabolites-

Un spectromètre de RMN Avance III 950 MHz équipé d'une cryosonde (¹H/¹³C/¹⁵N/²H) a été utilisé. Cet instrument à très haut champ magnétique et équipé d'une sonde très sensible a permis l'acquisition de spectres RMN 2D de qualité sur nos échantillons très peu concentrés. Les spectres 1D (¹H) et 2D, (¹H-¹H COSY, ¹H-¹H TOCSY, ¹H JRES, ¹H-¹³C HSQC et ¹H-¹³C HMBC) ont été enregistrés à 300 K puis traités par le logiciel Topspin version 3.5pl5. Un exemple de spectre 2D obtenu est donné ci-dessous afin d'illustrer la complexité du système (**Figure 35**).

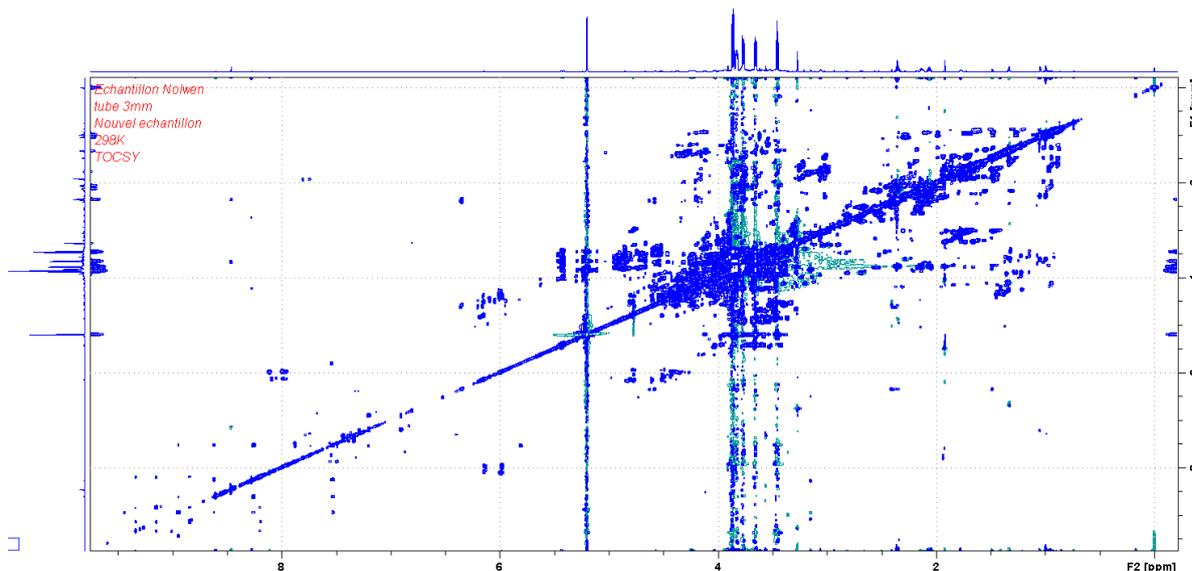


Figure 35: Illustration du spectre ^1H - ^1H TOCSY obtenu.

3.2.7. Analyse des données

3.2.7.1. Traitement des données

Les données de spectrométrie de masse ont été traitées avec la plateforme web Galaxy. Les différentes étapes ont consisté à effectuer un pré-processing des données, une normalisation et des étapes de contrôle qualité. Concernant le traitement des données de RMN, les étapes sont moins nombreuses. Les spectres de RMN ^1H ont été divisés en régions, appelées buckets, de 0,01 ppm à l'aide du logiciel Amix (Bruker GmbH). Le découpage a été réalisé de 0,5 à 10 ppm, à l'exclusion de la zone comprenant le signal de l'eau (4,6 à 5,1 ppm). L'intensité du signal pour chaque bucket a été déterminée par intégration en utilisant la méthode de la somme des intensités.

Ainsi, deux matrices de données d'intensités relatives ont été obtenues, caractérisées par des rapports m/z et des temps de rétention pour la spectrométrie de masse et par des déplacements chimiques pour la RMN.

Ces deux matrices ont ensuite été soumises à des tests statistiques (univariés et multivariés). Des analyses multivariées (ACP, PLS-DA) ont d'abord été effectuées afin de mettre en évidence une potentielle discrimination entre les échantillons incubés en présence de peroxyde d'hydrogène et les autres échantillons, et ce pour les deux temps d'extraction (50 min et 24 h). Ces analyses peuvent également mettre en évidence de potentiels « outliers » qui sont des échantillons distants des autres échantillons du même groupe pouvant résulter de biais expérimentaux. Par cette méthode, des listes d'ions (LC-MS) et de buckets (RMN) discriminants ont été obtenues. Pour réduire le nombre d'éléments discriminants, une sélection a été effectuée, basée sur le score VIP (Variable Importance in Projection). Plus cette valeur est importante plus l'ion ou le bucket considéré est

discriminant. Ainsi, les ions et buckets dont les valeurs étaient strictement supérieures à 1 ont été conservés pour l'étape d'identification. Pour finir, des analyses univariées ont été réalisées afin de savoir si les ions et les buckets discriminants, en considérant l'entièreté du groupe, avaient également une influence individuelle.

L'étape d'identification des métabolites discriminants a été effectuée en utilisant des bases de données telles que KEGG, HMDB et des publications référentes du domaine telles que [Nicholson et al. \(1995\)](#), [Fan \(1996\)](#) et [Willker et al. \(1996\)](#).

4. Résultats

4.1. Introduction

Les résultats de ce chapitre de thèse sont présentés sous la forme de deux publications.

La première publication est en cours de finalisation et sera très prochainement soumise à Atmospheric Chemistry and Physics.

N. WIRGOT, V. VINATIER, M. SANCELME, A.M. DELORT*.

H₂O₂ modulates the energetic metabolism of the cloud microbiome.

La deuxième publication sera soumise à Scientific Reports. Le travail n'est pas totalement achevé car certains bio-marqueurs obtenus par spectrométrie de masse sont en cours d'identification par Orbitrap et MS/MS.

N. WIRGOT, M. LAGREE, M. TRAIKIA, I. CANET, M. SANCELME, C. JOUSSE, B. LYAN, A.M. DELORT*.

Modulation and resilience of the metabolome of *Pseudomonas graminis*, a cloud bacterium, facing H₂O₂ atmospheric stress.

Ma participation dans ces travaux a été d'effectuer l'ensemble des expériences en laboratoire, allant de la réalisation au traitement des données. Pour l'étude de métabolomique, je suis intervenue à tous les stades (y compris pour les analyses statistiques et l'interprétation des données de RMN) sauf pour l'acquisition des données (spectres de RMN et SM) et pour l'identification des ions m/z discriminants. J'ai également participé activement à l'écriture des deux publications avec Anne-Marie Delort, Virginie Vinatier et Isabelle Canet.

Les résultats obtenus, concernant l'aspect ATP et H₂O₂, ont fait l'objet de :

▪ **1 Conférence invitée :**

A.-M. DELORT, N. WIRGOT, A. LALLEMENT, M. VAITILINGOM, L. DEGUILLAUME, M. SANCELME, P. AMATO, V. VINATIER.

Microorganisms from clouds: Interactions with H₂O₂.

European Aerosol Conference (EAC), Tours, 4-9 septembre 2016.

Les résultats obtenus, concernant la démarche métabolomique, ont fait l'objet de :

▪ **2 Présentations posters :**

N. WIRGOT, M. LAGREE, M. SANCELME, M. TRAIKIA, C. JOUSSE, I. CANET, A.-M. DELORT.

Impact of atmospheric stresses on clouds microorganism's metabolome: The case study of H₂O₂.

Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique (RFMF), Montpellier (FR), 31 mai - 2 juin 2016.

N. WIRGOT, M. LAGREE, M. SANCELME, M. TRAIKIA, C. JOUSSE, I. CANET, A.-M. DELORT

Impact of Atmospheric Stresses on Clouds Microorganism's Metabolome: The Case Study of H₂O₂.

17th European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC17), Inverness (UK), 29 novembre - 3 décembre 2016.

A venir:

▪ **1 Conférence invitée :**

N. WIRGOT, M. LAGREE, M. TRAIKIA, I. CANET, M. SANCELME, C. JOUSSE, B. LYAN, A.M. DELORT

Modulation and resilience of the metabolome of Pseudomonas graminis, a cloud bacterium, facing H₂O₂ atmospheric stress.

9th International Conference & Exhibition on Metabolomics & Systems Biology, Prague (CS), 29 - 30 août 2017.

4.2. « H₂O₂ modulates the energetic metabolism of the cloud microbiome »

H₂O₂ modulates the energetic metabolism of the cloud microbiome

N. Wirgot¹, V. Vinatier¹, L. Deguillaume², M. Sancelme¹, and A.-M. Delort¹

¹Université Clermont Auvergne, CNRS, Sigma-Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France

²Université Clermont Auvergne, CNRS, Laboratoire de Météorologie Physique, 63000 Clermont-Ferrand, France

Correspondence to: A.-M. Delort (A-marie.delort@uca.fr)

Abstract. Chemical reactions in clouds lead to oxidation processes driven by radicals (mainly HO[•], NO₃[•] or HO₂[•]) or strong oxidants such as H₂O₂, O₃, nitrate and nitrite. Among those species, hydrogen peroxide plays a central role in the cloud chemistry by driving its oxidant capacity. In cloud droplets, H₂O₂ is transformed by microorganisms which are metabolically active. Biological activity can therefore impact the cloud oxidant capacity. The present article aims at highlighting the interactions between H₂O₂ and microorganisms within the cloud system.

First, experiments were performed with selected strains studied as reference isolated from clouds in microcosms designed to mimic the cloud chemical composition, including the presence of light and iron. Biotic and abiotic degradation rates of H₂O₂ were measured and results showed that biodegradation was the most efficient process together with photo-Fenton process. H₂O₂ strongly impacted the microbial energetic state as shown by adenosine triphosphate (ATP) measurements in the presence and absence of H₂O₂. This ATP depletion was not due to the loss of cell viability. Secondly, correlation studies were performed based on real cloud measurements from 37 clouds samples collected at the puy de Dôme station (1465 m a.s.l., France). The results supported a strong correlation between ATP and H₂O₂ concentrations and confirmed that H₂O₂ modulates the energetic metabolism of the cloud microbiome. The modulation of microbial metabolism by H₂O₂ concentration could thus impact cloud chemistry, in particular the biotransformation rates of carbon compounds and consequently can perturb the way the cloud system is modifying the global atmospheric chemistry.

1 Introduction

The atmosphere is an oxidizing medium where trace gases are transformed/removed by oxidation including methane and other organic compounds, carbon monoxide, nitrogen oxides, and sulfur gases. Evaluating the oxidizing power of the atmosphere is crucial since it controls pollutant formation, aerosol production and greenhouse radiative forcing (Thompson, 1992).

In this context, hydroperoxides (ROOH) contribute to the oxidizing power of the troposphere (Lee et al., 2000) by controlling the cycling of HO_x radicals (HO[•], HO₂[•]). They can serve as temporary reservoirs of HO_x radical since, for example, their photolysis and reactivity will regenerate HO radicals. Among hydroperoxide, hydrogen peroxide is a key gas phase atmospheric component (Vione et al., 2003) with concentration in the gas phase in the ppbv level or less. The atmospheric concentration of H₂O₂ is impacted by a variety of meteorological parameters (*e.g.* actinic flux, temperature and relative humidity) and is affected by the levels of chemical species such as VOCs, CO, O₃, and NO_x (Lee et al., 2000). One of the significant parameter controlling the evolution of

H₂O₂ concentration is the actinic flux intensity. Diurnal and seasonal variations of hydrogen peroxide are shown by field measurements with higher concentrations during the day and in summer than during the night and in winter. This is linked to the atmospheric formation of H₂O₂ that results from a series of photochemical reactions creating free radicals followed by corresponding radical reactions with appropriate precursor substances.

In the presence of atmospheric liquid water (cloud, fog, rain), H₂O₂ is rapidly dissolved because of its high Henry's law constant ($7.7 \cdot 10^4$ M/atm at 298K; Sander, 2014). In this liquid phase, it is also produced by aqueous phase reactivity (Möller, 2009). Several field campaigns have reported H₂O₂ concentrations in atmospheric water in the μ M range (Gunz and Hoffmann, 1990; Marinoni et al., 2011; Deguillaume et al., 2014). Hydrogen peroxide plays a central role in various important chemical processes in clouds. First, H₂O₂ is considered as the most important oxidant for the conversion of sulfite to sulfate for pH lower than 5.5, therefore contributing significantly to the acidification of clouds and precipitations (Deguillaume et al., 2004). Second, the photolysis of H₂O₂ will lead to an efficient production of the hydroxyl radical HO• and recent study have shown that this can be a dominant aqueous source (Bianco et al., 2015). They can also directly oxidize organic compounds in the aqueous phase (Schöne and Herrmann, 2015). Finally, H₂O₂ is involved in redox processes leading to the conversion of reactive free radicals and trace metals such as iron (Kieber et al., 2001; Deguillaume et al., 2005). Consequently, H₂O₂ is a key chemical compound controlling the aqueous phase oxidant capacity and leading to the transformation of inorganic and organic compounds present in the atmospheric aqueous phase. The resulting inorganic and organic products can contribute to the aerosol phase when the cloud evaporates leading to climatic effect.

A few decades ago, microorganisms have been found alive in cloud water (Sattler et al., 2001; Amato et al., 2005, 2007a,b). Particularly through measurements of adenosine triphosphate (ATP) and anabolic precursors or nutrients incorporation rates, it has been shown that cloud microorganisms are metabolically active and play an important role in cloud chemical reactivity (Sattler et al., 2001; Amato et al., 2007a; Hill et al., 2007; Väitilingom et al., 2012, 2013). Few studies performed on simplified or real microcosms have demonstrated that cloud microorganisms are able to degrade carbon compounds (Ariya et al., 2002; Amato et al., 2005, 2007c; Husarova et al., 2011; Väitilingom et al., 2010, 2011, 2013; Matulová et al., 2014).

Microorganisms are also in direct interaction with oxidant species in clouds (iron, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, *etc.*). Väitilingom et al. (2013) have demonstrated that microorganisms present in real cloud water are able to degrade efficiently hydrogen peroxide. This suggests that cloud microorganisms have found strategies to survive and resist to the stresses encountered in this medium and in particular to the oxidative stress. In this context, Joly et al. (2015) have conducted laboratory experiments to investigate the survival of selected strains (bacteria and yeast) isolated from cloud waters, in the presence of various concentrations of hydrogen peroxide. The results showed that the survival rates of the studied strains were not affected by H₂O₂ exposure. In addition, the strains were exposed to artificial UV-visible light mimicking the natural solar irradiation inside clouds. No significant impact on the survival of the bacterial strains is observed.

These results have been confirmed in real cloud water, including the microflora and chemical complexity (iron, H₂O₂, *etc.*), incubated in a photo-bioreactor specifically designed to reproduce cloud conditions (Väitilingom et al., 2013). Thanks to ADP/ATP ratio measurements, reflecting the metabolic status of microorganisms, in the presence or absence of light, it has been shown that microorganisms were not impacted by artificial light and consequently by the generation of radicals from H₂O₂ photo-reactivity. In addition, H₂O₂ is efficiently degraded

thanks to the production of specific enzymes of the oxidative metabolism such as catalases that can act directly on H_2O_2 . The degradation rates of H_2O_2 were not lowered in the presence of light, showing no inhibition of the biological process by light and radicals.

Indeed solar light can indirectly impact the cell viability by producing reactive oxygenated species (ROS) including HO^\bullet and $\text{O}_2^{\bullet-}$ radicals. These radicals are produced mainly by the photolysis of H_2O_2 or by Fenton and photo-Fenton reactions involving iron (Fe) and H_2O_2 . Most of these compounds 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. Thanks to the fact that microorganisms usually protect against these ROS, they can specifically modify part of their metabolism to face oxidative stress encountered in clouds. Therefore, microorganisms utilize various mechanisms involved in the oxidative stress metabolism such as i) the production of pigments and of antioxidant molecules (vitamins, glutathione, *etc.*) which can scavenge radicals or ii) the production of specific enzymes such as superoxide dismutase which can transform $\text{O}_2^{\bullet-}$ into H_2O_2 . H_2O_2 can be dismutated or reduced respectively by catalases and other peroxidases.

The studies from Vařtilingom et al. (2013) and Joly et al. (2015) highlighted the interactions between biological activity and oxidants in clouds. In the present work, we artificially reproduced cloud conditions in microcosms to study the biotic and abiotic transformation of H_2O_2 and, conversely, the impact of hydrogen peroxide on the metabolism of cloud microorganisms. For this purpose, we decided to study individually the effect of parameter interacting with H_2O_2 : UV radiation, iron and bacteria. Under various experimental conditions, the degradation rates of H_2O_2 are followed to highlight how individual parameters control its transformation. Moreover, the impact of H_2O_2 on the energetic state of the bacterial cells was evaluated by measuring the ATP concentration over time when the cells were exposed or not to H_2O_2 . In order to confirm our laboratory results on the interaction between microorganisms and H_2O_2 , we performed a correlation analysis considering bio-physico-chemical parameters measured in real cloud samples collected at the puy de Dôme station. This work will lead to a better description of the mechanisms linking biological activity and cloud reactivity. This is crucial to consider all the sinks and sources of H_2O_2 , especially in atmospheric chemistry models, since H_2O_2 impacts a lot of atmospheric relevant processes in the atmosphere.

2 Material and methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

Three bacterial strains belonging to the Gamma-Proteobacteria (*Pseudomonas graminis*, 13b-3, DQ512786; *Pseudomonas syringae*, 13b-2, DQ512785) and Alpha-Proteobacteria classes (*Sphingomonas sp.*, 14b-5, DQ512789) were selected as model strains for these experiments.

Bacteria were grown in 10 mL of R2A medium (Reasoner and Geldreich, 1985) under stirring (200 r.p.m) at 17°C for approximately 17 h, 24 h or 48 h, depending on the strain. Cells in the exponential growth phase were collected by centrifugation for 3 min at 10481 g. The supernatant was removed and the bacterial pellet was suspended and washed twice with an artificial cloud solution (2.2). The concentration of cells was estimated by optical density at 575 nm to obtain a concentration close to 10^6 cell mL^{-1} . Finally, the concentration of cells was

precisely determined by flow cytometry analysis (BD FacsCalibur Becton-Dickinson; $\lambda_{exc} = 488$ nm; $\lambda_{em} = 530$ nm) using a method based on the addition of a fluorochrome (SYBR-green) for their counting.

2.2 Biodegradation assays

Biodegradation assays were performed in marine artificial cloud solution that mimics real cloud conditions as described in Vaïtilingom et al. (2011). Stock solutions were prepared with the following concentrations : 200 μ M for acetic acid (CH_3COOH ; Acros organics), 145 μ M for formic acid (HCOOH ; Fluka), 30 μ M for oxalic acid ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$; Fluka), 15 μ M for succinic acid ($\text{H}_6\text{C}_4\text{O}_4$; Fluka), 800 μ M for ammonium nitrate ($\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3$; Fluka), 100 μ M for magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich), 50 μ M for potassium sulfate (K_2SO_4 ; Fluka), 400 μ M for calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich), 2000 μ M for sodium chloride (NaCl ; Sigma-Aldrich), 1100 μ M for sodium hydroxide (NaOH ; Merck), 315 μ M for sulfuric acid (H_2SO_4 ; Sigma-Aldrich). Finally, the obtained solution was adjusted to pH 6 and sterilized by filtration (Polyethersulfone membrane, 0.20 μ m; Fisher Scientific) before use. The artificial cloud water solution was ten times more concentrated than a real cloud water solution in order to stabilize the pH. This was also the case for bacteria concentration because the bacteria/substrate ratio should be kept identical to that of real cloud. Indeed, it has been demonstrated that if this ratio is maintained, the degradation rate remains constant (Vaïtilingom et al., 2010).

The equipment was sterilized by autoclaving at 121°C for 20 minutes and all manipulations were performed under sterile conditions. Biodegradation assays consisted in marine artificial cloud solutions inoculated with bacterial cells and incubated in a bioreactor (Infors HT Multitron II) at 17°C in the presence or absence of hydrogen peroxide solution, of iron complex solution and under irradiation or obscurity condition. At regular intervals, samples were taken and stored at -20 °C.

For irradiation condition the bioreactor was equipped with lamps that emit UV-radiation (Sylvania Reptistar; 15W; 6500K; UVA (up to 30%), UVB (up to 5%)) to mimic solar irradiation in clouds (Fig. SM1). The incubation flasks were Pyrex crystallizers covered with a Pyrex filter and equipped with Teflon tubes of 8 mm \varnothing plugged with sterile cotton, letting air and light pass. They contained 100 mL of artificial cloud solution under agitation (130 r.p.m) and inoculated at 10^6 bacterial cells per mL (Vaïtilingom et al., 2013).

For dark condition the incubation flasks were amber Erlenmeyer flasks plugged with sterile cotton letting air pass and containing 100 mL of artificial cloud solution also inoculated at 10^6 cell mL^{-1} .

Hydrogen peroxide solution was prepared from a commercial solution (H_2O_2 , 30%; not stabilized Fluka Analytical). 1:1 stoichiometry iron complex solution was prepared from iron (III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich) and from (S,S)- ethylenediamine- $\text{N,N}'$ -disuccinic acid trisodium salt (EDDS, 35% in water). The hydrogen peroxide solution and the iron complex solution were freshly prepared before each experiment and the final working concentrations were fixed at 20 μ M and 4 μ M respectively, in agreement with the real concentrations detected in samples collected at the puy de Dôme (Deguillaume et al., 2014).

2.3 Analyses

Hydrogen peroxide was quantified with a miniaturised Lazrus fluorimetric assay (Lazrus et al., 1985; Vaïtilingom et al., 2013). This method is based on a reaction between hydrogen peroxide, Horse Radish

Peroxidase (HRP) and 4-hydroxyphenylacetic acid that produces a fluorescent dimeric compound. Fluorescence readings (Safire II TECAN[®]; λ_{exc} = 320 nm, λ_{em} = 390 nm) were made in a 96 well plate format.

Bioluminescence was used to analyse adenosine triphosphate (ATP) concentrations (Glomax[®] 20/20 single tube luminometer from Promega). This technique is based on an enzymatic reaction involving luciferin and luciferase. The protocol used was adapted from Biothema[®] commercial kit instructions (Koutny et al., 2006).

In order to determine the survival rate of microorganisms in the presence of hydrogen peroxide (20 μ M), plate-counts were performed on R2A agar medium at the beginning of each experiment and after 3, 7 and 24 hours of incubation. Plates were incubated 3 days at 17°C before CFU counts.

2.4 Determination of the initial degradation rates of hydrogen peroxide

The linear parts of kinetics were fit linearly (affine function) with the Origin 6.1 software. Three replicates were done. Error bars represent the standard errors (SEs) of the enzymatic assay (5%). In order to quantify the degradation rates of hydrogen peroxide in all studied conditions the initial degradation rate was used.

2.5 Statistical analysis

The R software was used to process the data in order to carry out principal component analysis (PCA). Statistical significance test was evaluated using PAST software (Hammer et al., 2001). Mean difference was considered to be statistically significant for a p-value inferior to 0.05.

2.6 Cloud sampling

Cloud water sampling was performed on the summit of the puy de Dôme station (1465 m) while maintaining a sterile environment as much as possible. The detachable part of the impactor was beforehand sterilized by autoclave at 121°C during 20 min and the fixed part was rinsed with alcohol at 70° just before sampling. The physical-chemical characteristics of the liquid cloud samples and the biological parameters were measured (concentrations of organic acids, inorganic ions, H₂O₂, Fe(II) and Fe(III), pH value, ATP concentration, bacteria and fungi concentrations, *etc.*). More details about the sampling site, instrumentation and procedures for cloud sampling are given in Deguillaume et al. (2014).

3 Results

The interactions between H₂O₂, which is one of the major oxidant present in clouds, and microorganisms were investigated. First of all, experiments were conducted under laboratory conditions in microcosms mimicking cloud composition including the main carbon compounds, ions, H₂O₂, iron and also mimicking cloud condition with the presence of light. We decided to isolate each parameter that could have an impact on H₂O₂ to evaluate their potential effects. In a second step, in order to consolidate that H₂O₂ and ATP are two parameters strongly linked, correlation studies were performed considering the database linking biological and chemical parameters of real clouds sampled at the puy de Dôme station.

3.1 Experiments in artificial cloud water microcosms

Microcosms consisted of photobioreactors containing artificial cloud water in the presence or absence of artificial solar light (Fig. SM1) and in the presence or absence of bacterial strains.

Artificial cloud water mimicks cloud chemical composition from cloud samples classified as “marine” following the work from Deguillaume et al. (2014) at the puy de Dôme station. The major part of the collected cloud samples were classified as marine (52%) supporting our choice for the artificial cloud composition. The working temperature was fixed at 17°C which is the average temperature of cloud samples in summer and the pH was fixed at 6.

The three selected strains (*Pseudomonas* and *Sphingomonas*) were isolated from cloud water and are representative of the genera most frequently found in cloud water samples (Väitilingom et al., 2012) collected at the puy De Dôme site (1465 m a.s.l, Central France).

Hydrogen peroxide and iron complex (Fe-[EDDS]) were added or not to the solution in the incubators. These two compounds are present in marine cloud water at average concentrations of 7.5 µM (with a dispersion of mean values ranging from 0.1 – 20.8 µM) for H₂O₂ and 0.5 µM (with a dispersion of mean values ranging from BDL. – 4.9) for Fe(III) (Deguillaume et al., 2014).

In the cloud aqueous phase, Fe(III) may be complexed by organic compounds. Recently, it has been hypothesized than iron can be chelated by other organic ligands of biological origin (Herckes et al., 2013; Herrmann et al., 2015), and in particular by siderophores (Vinatier et al., 2016) that are ligands characterized by high complexing constants ($K > 10^{20}$).

Consequently, Fe-[EDDS] was chosen as an iron(III) complex model because this ligand has a complexing constant for iron very close to the values for siderophores. Moreover, it is known to be stable at the working pH of 6.

Hydrogen peroxide degradation in artificial cloud water

H₂O₂ degradation was monitored periodically over an 8 h period. The kinetic profiles were similar for the three strains. Results obtained with *Pseudomonas graminis* (13b-3) are illustrated in Figure 1 whereas the results obtained with the other strains are presented for information in Figure SM2.

Under abiotic condition, the degradation of hydrogen peroxide is clearly effective in the presence of artificial solar light and Fe-[EDDS] complex, due to the photo-Fenton reaction, with an initial degradation rate of $1.07 \cdot 10^9 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Table 1(a)). After 150 min this degradation rate decreases in parallel with EDDS by oxidation occurs (Li et al., 2010). In the presence of the Fe-[EDDS] complex alone and in the absence of light, hydrogen peroxide is almost not degraded. Indeed, the degradation rate of H₂O₂ due to the Fenton reaction is much lower ($2.23 \cdot 10^{-10} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) than the value obtained with the photo-Fenton reaction. Exposing the microcosm only to our light conditions, the photolysis reaction of H₂O₂ is extremely slow ($1.38 \cdot 10^{-10} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$) due to the low absorption of H₂O₂ in the solar spectrum measured inside a cloud. Its absorption is also low with the lamp used for these experiments that mimic the reality as close as possible (Fig. SM1).

For the biotic conditions, three selected strains were tested: *Pseudomonas graminis* (13b-3), *Pseudomonas syringae* (13b-2) and *Sphingomonas sp.* (14b-5). Initial biodegradation rates are summarized in Table 1(b). These results show that, under our experimental conditions, hydrogen peroxide was degraded more efficiently in the presence of bacteria even if the values obtained stay in the same order of magnitude compared to the abiotic

conditions with artificial light and Fe-[EDDS] complex. *Pseudomonas graminis* (13b-3) and *Pseudomonas syringae* (13b-2) are the most active strains followed by *Sphingomonas sp* (14b-5). For each strain, biodegradation rates are in the same order of magnitude without wide variations depending on the tested conditions, *i.e.* in the presence or absence of artificial light and of Fe-[EDDS] complex.

These results show that artificial light and Fe-[EDDS] and thus HO• radicals have no effect on H₂O₂ biodegradation. In addition, among the selected strains all degrade H₂O₂ in the same order of magnitude (average value for the three strains and for the condition with iron and light $1.76 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and with iron without light $1.40 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$). In Vařtilingom et al. (2013), the same order of magnitude for the biodegradation rates of H₂O₂ was found (average value for two distinct clouds with light $9.77 \cdot 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ and without light $2.93 \cdot 10^{-10} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$). The results obtained are in the same order of magnitude than values in real cloud environment thereby validating our approach to analyse separately each parameter. This demonstrates that under our experimental conditions, the selected strains behave like the microflora of real cloud for the degradation of H₂O₂.

Impact of the H₂O₂ on the microbial energetic states in artificial marine cloud solution

The impact of the presence of H₂O₂ on the energetic state of the bacterial cells was evaluated by measuring the time evolution of ATP concentration for the three strains (Fig. 2).

It appears that the concentration of ATP was measured in the presence (Fig. 2a, b, c - black square) or absence (Fig. 2a, b, c - white square) of H₂O₂. In the absence of H₂O₂, a strong increase of ATP concentration was observed reflecting an active metabolism of the bacteria. On the contrary, in the presence of H₂O₂, the results were clearly different and can be described in two phases. In the first phase, a decrease of ATP concentration was observed while in a second phase a progressive increase (*Pseudomonas graminis*, 13b-3) or stagnation (*Pseudomonas syringae*, 13b-2, *Sphingomonas sp.*, 14b-5) of ATP concentration is seen. The time at which the lowest level of ATP concentration was observed and the H₂O₂ kinetic degradation were closely linked. As discussed earlier (Fig. 1), the H₂O₂ initially present (20 μM) was entirely degraded in approximately 3 hours (depending on the strains); this corresponds exactly to the end of the ATP decrease. Complementary experiments were performed with incubations of the cells in the presence or absence of light and/or iron complex (Fe-[EDDS]) under conditions similar to that described previously. The results obtained for the three strains are reported in Figure SM3 (*Pseudomonas graminis*), Figure SM4 (*Pseudomonas syringae*) and Figure SM5 (*Sphingomonas sp.*).

The results show that light and iron complex have no impact on the ATP concentration decrease. The measured ATP concentration in the presence or absence of artificial light and/or iron(III) complex is similar to that observed in the presence of H₂O₂ alone. The ATP concentration is thus only linked to the presence of H₂O₂.

Impact of H₂O₂ on the survival of the microbial strains

We also controlled that the decrease of ATP in the presence of H₂O₂ was not due to cell mortality. Samples of artificial cloud medium inoculated at $10^6 \text{ cell mL}^{-1}$ were incubated at 17°C with and without H₂O₂ (at 20 μM) and the concentration of cells were determined by plate-counting. Figure 3 illustrates the results for all strains. This figure shows the concentration of cells at different time of incubation for samples with or without H₂O₂. It appears that the evolution of the cells concentration was not significantly different when cells were incubated in the presence or absence of hydrogen peroxide. The decrease of ATP is therefore not linked to a lower

concentration of cells but to a modification of metabolic pathways due to H_2O_2 presence. The total number of cells was multiplied by a factor 5 to 10 after 24h showing that bacteria were also able to divide and grow.

3.2 Impact of H_2O_2 on the microbial energetic metabolism in real cloud environment

In the previous section, we showed that H_2O_2 had a strong impact on the energetic metabolism of cells under our microcosm conditions. To go further, we looked at the potential impact of H_2O_2 on microbial energetic states in real cloud samples by carrying out statistical analyses based on data measured on real cloud water collected at the puy de Dôme station.

On the one hand, principal component analysis (PCA) was used. In order to perform this multivariate statistical analysis, Table SM1 was built in such a way that lines and columns did not contain more than 10% of missing values. 37 clouds samples satisfied these criteria and were used for the PCA. These cloud events were collected between 2004 and 2013 at the puy de Dôme station. Various parameters were measured including ATP, bacteria and fungi concentration, inorganic and organic species concentration (H_2O_2 , SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- , acetate, formate, oxalate, Na^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+}), temperature and pH (see Table SM1 for details). The origin of these clouds can be analyzed according to their back trajectories in four sectors (North/West, South/West, West and North/East). They can be also considered in four different categories considering their chemical composition (marine, continental, highly marine and polluted) as described in Deguillaume et al., 2014.

The result of PCA is presented in Figure 4. First, we can see directly that the first two dimensions contain practically 50% of the total inertia (total variance of the data table) reflecting the validity and reliability of the result. The PCA shows that if we consider all important parameters in the collected cloud samples a strong correlation appears between ATP and H_2O_2 concentrations (longer vectors and very close on the PCA). There is no correlation between ATP concentration and the number of bacteria (vectors practically orthogonal); this shows that H_2O_2 is linked to the energetic state of the cells and not their concentration. Also, there is no correlation between ATP and markers of pollution such as the pH values, the NO_3^- , SO_4^{2-} and NH_4^+ concentrations or even the temperature that could impact microbial metabolism.

In addition, Spearman rank correlation test (non-parametric test) was performed based on the 37 cloud samples to confirm the correlation between H_2O_2 and ATP. The values used for this test are presented in Table SM1. A p-value of 0.0047 was obtained with a Spearman's coefficient of 0.45 (Zar, 1972). This shows an extremely strong correlation between H_2O_2 and ATP as theoretically the Spearman's coefficient must be greater than 0.27 for 37 observations and the p-value inferior to 0.05 (significance threshold). To confirm that, ATP depletion due to H_2O_2 impact was not linked with the mortality of cells, a Spearman rank correlation test was also performed to evaluate the correlation between ATP and total microorganisms concentrations (sum of bacteria and fungi concentrations in Table SM1) (p-value superior to 0.37).

Figure 4 suggested that ATP or H_2O_2 could be also correlated to formate and oxalate as the vectors were relatively close. A Spearman rank correlation test (non-parametric test) was thus performed based on data extracted from the 37 cloud samples (Table SM1). A strong correlation was obtained between ATP and formate (p-value=0.0043, Spearman's coefficient = 0.46), and between H_2O_2 and formate (p-value = 0.00015, Spearman's coefficient= 0.58). ATP-oxalate correlation is rather weak (p-value = 0.030, Spearman's coefficient= 0.36) and much lower than the ATP- H_2O_2 correlation, similar values were obtained for oxalate and H_2O_2 (p-value = 0.035, Spearman's coefficient = 0.35).

4 Discussion

Our objective was to study in detail the interactions between cloud microorganisms and H₂O₂.

First we looked at the mechanisms involved in H₂O₂ transformations under laboratory conditions by isolating each parameter to determine its impact on H₂O₂ (artificial light, Fe-[EDDS] complex and bacteria). Degradation rates of hydrogen peroxide were precisely determined for different microbial strains frequently found in cloud water samples collected to the puy de Dôme site. The results show that all bacterial strains studied under these conditions degrade H₂O₂ in the same order of magnitude as abiotic conditions. The degradation rates of H₂O₂ by bacteria are not impacted by the presence of light and Fe-[EDDS] and consequently by the generation of HO[•] radicals. On the opposite, in these laboratory experiments mimicking real cloud conditions, we have shown that H₂O₂ has a strong impact on the microbial energetic state of the cells. This strong decrease of ATP concentration is not linked to the number of cells as bacteria are able to divide and grow in the presence of H₂O₂. This reveals that microorganisms are able to manage the stress induced by H₂O₂ through their metabolism in particular by the involvement of enzymes (*e.g.* catalases, peroxidases, *etc.*) and other antioxidant molecules (glutathione, *etc.*). A few studies report the decrease of ATP concentration in microorganisms (Perricone et al., 2003), plants (Tiwari et al., 2002) or mammalian cells (Spragg et al., 1985; Josephson et al., 1991; Sporn and Peters-Goldenwhen, 1988; Hyslop et al., 1988; Oka et al., 2012) exposed to H₂O₂. ATP is a global marker of the energetic state of the cell. It is formed by oxidative phosphorylation at the ATP synthase complex thanks to the proton gradient generated by the electron transport chain. Electrons are provided by NADH (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide) so ATP synthesis is highly dependent on NADH availability in the cell (Haddock and Jones, 1977).

The decrease of ATP can be explained by the inhibition of ATPase impacting the ATP synthesis by the presence of H₂O₂ (Tamarit et al., 1998) and by the fact that H₂O₂ impacts the concentration of NAD/NADH as a consequence of NAD depletion involved in oxidoreduction reactions in order to control the damage caused by the presence of H₂O₂ (Fig. SM6).

The reductive power of the antioxidant metabolism is NADPH which regenerates the glutathione system. It is synthesized from NAD⁺ and ATP by NADkinase (Singh et al., 2007). In presence of an oxidative stress NADPH synthesis raises, increasing in the same time ATP consumption and diminishing the concentration of NADH. ATP synthesis decreases as a result of this NAD consumption. ATP synthesis is also impacted by the inhibition of ATPase by H₂O₂ (Tamarit et al., 1998). The observed decrease in ATP is then the result of an increase of ATP consumption and a decrease of its production.

The couple (NAD⁺/NADH) mediates electron transfers in many enzymatic reactions and defines a great part of the redox potential of the cell. NAD⁺ is reduced to NADH particularly in glycolysis pathway and tricarboxylic acid cycle (TCA). When the cell is exposed to reactive oxidant species (ROS) such as H₂O₂, damages can be induced to DNA; it is thus a priority for the cell to repair it to avoid the cell death. DNA repair is involving NAD⁺-dependent enzymes, this process induces NAD⁺ depletion in the cell and consequently ATP depletion (Oka et al., 2012). This depletion in ATP and in NAD⁺ then impacts all the metabolic pathways involving these compounds, a complete change in the metabolome can be expected.

We have shown, thanks to statistical analyses, that there was also a very strong correlation between H₂O₂ and ATP concentrations in real cloud samples collected over under various environmental conditions. We suggest thus that hydrogen peroxide modulates the global metabolism of cloud microorganisms.

Another interesting correlation was obtained between H₂O₂ and formate as well as ATP with formate. This could result from different concomitant processes. First formate is the most oxidized carbon molecule before CO₂ generated from successive oxidations of the organic matter by radicals issued from H₂O₂. Second it could reveal the impact of H₂O₂ on the C1 metabolism; it is known that C1 compounds can be transformed by cloud microorganisms (Husàrovà et al., 2011, Vaitilingom et al., 2010, 2011, 2013). In addition a recent paper reports the overproduction of formate in a strain of *Pseudomonas fluorescens* exposed to H₂O₂ (Thomas et al., 2016). Finally, this work brings new insights into the interactions between H₂O₂ and the cloud microbiome and its potential consequences on cloud chemistry (see Fig. 5).

First it confirms that cloud microorganisms are able to efficiently degrade hydrogen peroxide and potentially impact the global carbon budget and the oxidant capacity of clouds as already shown in Vaitilingom et al. (2013). By decreasing H₂O₂ concentration, radical chemistry is less efficient to degrade the organic matter. Second we show here for the first time that H₂O₂ impacts the energetic metabolism of the cloud microbiome and thus potentially modulates its carbon metabolism. As a consequence it can modify the final transformation of the organic matter in clouds. This reciprocal interaction between H₂O₂ and microorganisms and its subsequent impact on cloud chemistry is clearly dependent on H₂O₂ concentration.

To go further in the understanding of the modulation of the metabolic pathways (including carbon, nitrogen, amino-acids or sugars) induced by H₂O₂, a metabolomic approach could be used. The next step could be to integrate biological data in numerical atmospheric models to better quantify consequence of this modulation on atmospheric chemistry.

Acknowledgments. N. Wirgot is a recipient of a PhD fellowship from the MESR (French government). Part of this work was supported by the french ANR program BIOCAP. The authors are very grateful to the OPGC/LaMP staff for collecting the cloud samples at the puy de Dôme station, see the database of cloud biological and chemical composition www.obs.univ-bpclermont.fr/SO/beam/index.php.

References

- Amato, P., Ménager, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., Delort, A.-M.: Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds, *Atmos. Environ.*, 39, 4143-4153, doi:10.1016/j.atmosenv.2005.04.002, 2005.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., Delort, A. M.: An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the Puy de Dôme (France), *Atmos. Environ.*, 41, 8253-8263, doi:10.1016/j.atmosenv.2007.06.022, 2007a.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., Delort, A. M.: Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59, 242-254, doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00199, 2007b.
- Amato, P., Demeer, F., Melaouhi, A., Fontanella, S., Martin-Biesse, A.-S., Sancelme, M., Delort, A.-M.: A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by micro-organisms, *Atmos. Chem. Phys.*, 7, 5253-5276, doi:10.5194/acp-7-4159-2007, 2007c.

- Ariya, P. A., Nepotchaykh, O., Ignatova, O., Amyot, M.: Microbiological degradation of atmospheric organic compounds, *Geophys. Res. Lett.*, 29, 34.1-34.4, doi:10.1029/2002GL015637, 2002.
- Bianco, A., Passananti, M., Perroux, H., Voyard, G., Mouchel-Vallon, C., Chaumerliac, N., Mailhot, G., Deguillaume, L., Brigante, M.: 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, 9191-9202, doi:10.5194/acp-15-9191-2015, 2015.
- Deguillaume, L., Leriche, M., Desboeufs, K., Mailhot, G., George, C., Chaumerliac, N.: Transition metals in atmospheric liquid phases: sources, reactivity, and sensitive parameters, *Chem. Rev.*, 105, 9, 3388-3431, doi:10.1021/cr040649c, 2005.
- 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., Mailhot, G.: Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) based on 10 yr of monitoring of their physicochemical properties, *Atmos. Chem. Phys.*, 14, 1485-1506, doi:10.5194/acp-14-1485-2014, 2014.
- Gunz, D. W., and Hoffmann, M. R.: Atmospheric chemistry of peroxides: a review, *Atmos. Environ. Part A. General Topics*, 24, 1601-1633, doi:10.1016/0960-1686(90)90496-A, 1990.
- Haddock, B.A., and Jones, C.W.: Bacterial respiration, *Bacteriol. Rev.*, 41, 47-99, 1977.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T, Ryan, P.D.: PAST: palaeontological statistics software package for education and data analysis, *Palaeontol. Electron.*, 4, 178, 2001.
- Hill, K. A., Shepson, P. B., Galbavy, E. S., Anastasio, C., Kourtev, P. S., Konopka, A., Stirm, B. H.: Processing of atmospheric nitrogen by clouds above a forest environment, *J. Geophys. Res.*, 112, doi: 10.1029/2006JD008002, 2007.
- Husárová, S., Vaïtilingom, M., Deguillaume, L., Traikia, M., Vinatier, V., Sancelme, M., Amato, P., Matulová, M., Delort, A.-M.: Biotransformation of methanol and formaldehyde by bacteria isolated from clouds. Comparison with radical chemistry, *Atmos. Environ.*, 45, 6093-6102, doi:10.1016/j.atmosenv.2011.06.035, 2011.
- Hyslop, P.A., Hinshawz, D.B., Halsey, W.A., Schraufstatter, I.U., Sauerhebery, R.D., Roger G. Spraggj, R.G., Jackson, J.H., Cochrane, C.G.: Mechanisms of oxidant-mediated cell injury the glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.*, 263, 1665-1675, 1988.
- Joly, M., Amato, P., Sancelme, M., Vinatier, V., Abrantes, M., Deguillaume, L., Delort, A.-M.: Survival of microbial isolates from clouds toward simulated atmospheric stress factors, *Atmos. Environ.*, doi: 10.1016/j.atmosenv.2015.07.009, 2015.
- Josephson, R.A., Silverman, H.S., Lakatta, E.G., Stern, M.D., Zweier, J.L.: Study of the mechanisms of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced cellular injury and calcium overload in cardiac myocytes, *J. Biol. Chem.*, 266, 2354-2361, 1991.

- Kieber, R.J., Peake, B., Willey, J.D., Jacobs, B.: Iron speciation and hydrogen peroxide concentrations in New Zealand rainwater, *Atmos. Environ.*, 35, 6041-6048, doi:10.1016/S1352-2310(01)00199-6, 2001.
- Kok, G.L.: Measurements of hydrogen peroxide in rainwater, *Atmos. Environ.*, 14, 653-656, doi:10.1016/0004-6981(80)90048-7, 1980.
- Koutny, M., Sancelme, M., Dabin, C., Pichon, N., Delort, A.-M., Lemaire, J.: Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives, *Polym. Degrad. Stabil.*, 91, 1495-1503, doi:10.1016/j.polymdegradstab.2005.10.007, 2006.
- Kroll, J. H., and Seinfeld, J. H.: Chemistry of secondary organic aerosol: formation and evolution of low-volatility organics in the atmosphere, *Atmos. Environ.*, 42, 3593-3624, doi:10.1016/j.atmosenv.2008.01.003, 2008.
- Lazrus, A. L., Kok, G. L., Gitlin, S. N., Lind, J. A., McLaren, S. E.: Automated fluorimetric method for hydrogen peroxide in atmospheric precipitation, *Anal. Chem.*, 57, 917-922, doi:10.1021/ac00281a031, 1985.
- Lee, M., Heikes, B.G., O'Sullivan, D.W.: Hydrogen peroxide and organic hydroperoxide in the troposphere: a review, *Atmos. Environ.*, 34, 3475-3494, doi:10.1016/S1352-2310(99)00432-X, 2000.
- Li, J., Mailhot, G., Wu, F., Deng, N.: Photochemical efficiency of Fe(III)-EDDS complex: OH radical production and 17 β -estradiol degradation, *J. Photoch. Photobio. A.*, 212, 1-7, doi:10.1016/j.jphotochem.2010.03.001, 2010.
- Marinoni, A., Parazols, M., Brigante, M., Deguillaume, L., Amato, P., Delort, A.-M., Laj, P., Mailhot, G.: Hydrogen peroxide in natural cloud water: sources and photoreactivity, *Atmos. Res.*, 101, 1-2, 256-263, doi:10.1016/j.atmosres.2011.02.013, 2011.
- Matulová, M., Husárová, S., Capek, P., Sancelme, M., Delort, A. M.: Biotransformation of various saccharides and production of exopolymeric substances by cloud-borne *Bacillus sp.* 3B6, *Environ. Sci. Technol.*, 48, 14238-14247, doi:10.1021/es501350s, 2014.
- Möller, D.: Atmospheric hydrogen peroxide: evidence for aqueous-phase formation from a historic perspective and one-year measurement campaign, *Atmos. Chem. Phys.*, 43, 5923-5936, doi:10.1016/j.atmosenv.2009.08.013, 2009.
- Oka, S.I., Hsu, C.P., Sadoshima, J.: Regulation of cell survival and death by pyridine nucleotides., *Circ. Res.*, 111, 611-627, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.247932, 2012.
- Perricone, C.D., Park, S., Imlay, J.A., Weiser, J.N.: Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the Fenton reaction, *J. Bacteriol.*, 185, 6815-6825, doi:10.1128/JB.185.23.6815-6825.2003, 2003.
- Pruppacher, H. R., and Jaenicke, R.: The processing of water vapor and aerosols by atmospheric clouds, a global estimate, *Atmos. Res.*, 38, 283-295, doi:10.1016/0169-8095(94)00098-X, 1995.
- Ravishankara, A.R.: Heterogeneous and multiphase chemistry in the troposphere, *Science*, 276, 1058-1065, doi:10.1126/science.276.5315.1058, 1997.

- Reasoner, D.J., Geldreich, E.E.: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Appl. Environ. Microb.*, 49, 1-7, 1985.
- Sander, R.: Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent, *Atmos. Chem. Phys.*, 15, 4399-4981, doi:10.5194/acp-15-4399-2015, 2015.
- Sattler, B., Puxbaum, H., Psenner, R.: Bacterial growth in supercooled cloud droplets, *Geophys. Res. Lett.*, 28, 239-242, doi :10.1029/2000GL011684, 2001.
- Schöne, L. and Herrmann, H.: Kinetic measurements of the reactivity of hydrogen peroxide and ozone towards small atmospherically relevant aldehydes, ketones and organic acids in aqueous solutions, *Atmos. Chem. Phys.*, 14, 4503-4514, doi:10.5194/acp-14-4503-2014, 2014.
- Singh, R., Mailloux, R.J., Puiseux-Dao, S., Appanna, V.D.: Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*, *J. Bacteriol.*, 189, 6665-6675, doi:10.1128/JB.00555-07, 2007.
- Sporn, P.H. and Peters-Golden, M.: Hydrogen peroxide inhibits alveolar macrophages 5-lipoxygenase metabolism in association with depletion of ATP, *J. Biol. Chem.*, 263, 14776-14783, 1988.
- Spragg, R.G., Hinshaw, D.B., Hyslop, P.A., Schraufstatter, I.U., Cochrane, C.G.: Alterations in adenosine triphosphate and energy charge in cultured endothelial and P388D1 cells after oxidant injury, *J. Clin. Invest.*, 76, 1471-1476, doi:10.1172/JCI112126, 1985.
- Tamarit, J., Cabisco, E., Ros, J.: Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, 273, 3027-3032, doi:10.1074/jbc.273.5.3027, 1998.
- Thomas, S.C., Alhasawi, A., Auger, C., Omri, A., Appanna, V.D.: The role of formate in combatting oxidative stress, *J. Microbiol.*, 109, 263-271, doi:10.1007/s10482-015-0629-6, 10.1007/s10482-015-0629-6, 2016.
- Thompson, A. M.: The oxidizing capacity of the Earth's atmosphere: probable past and future changes, *Science*, 256(5060), 1157-1165, doi:10.1126/science.256.5060.1157, 1992.
- Tiwari, B.S., Belenghi, B., Levine, A.: Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death, *Plant Physiol.*, 128, 1271-1281, doi:10.1104/pp.010999, 2002.
- Vaïtilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Laj, P., Leriche, M., Delort, A. M.: Contribution of microbial activity to carbon chemistry in clouds. *Appl. Environ. Microb.*, 76, 23-29, doi:10.1128/AEM.01127-09, 2010.
- Vaïtilingom, M., Charbouillot, T., Deguillaume, L., Maisonobe, R., Parazols, M., Amato, P.; Sancelme, M., Delort, A.-M.: Atmospheric chemistry of carboxylic acids: microbial implication versus photochemistry, *Atmos. Chem. Phys.*, 11, 8721-8733, doi:10.5194/acp-11-8721-2011, 2011.
- Vaïtilingom, M., Attard, E., Gaiani, N., Sancelme, M., Deguillaume, L., Flossmann, A. I., Amato, P., Delort, A. M.: 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, 2012.

- Vařtilingom, M., Deguillaume, L., Vinatier, V., Sancelme, M., Amato, P., Chaumerliac, N., Delort, A.-M.: Potential impact of microbial activity on the oxidant capacity and organic carbon budget in clouds, *P. Natl. Acad. Sci USA*, 110, 559-564, doi:10.1073/pnas.1205743110, 2013.
- Vione, D, Maurino, V,; Minero, C., Pelizzetti, E.: The atmospheric chemistry of hydrogen peroxide: a review, *Ann. Chim-Rome*, 93, 477-488, 2003.
- Zar, J.H.: Significance testing of the Spearman rank correlation coefficient, *J. Am. Stat. Assoc.*, 67, 578-580, doi:10.2307/2284441, 1972.

Table 1: Initial rates of abiotic degradation (a) and of biotic degradation (b) of H₂O₂ measured in artificial cloud water. Values are expressed in 10⁻⁹ mol L⁻¹ s⁻¹. Standard errors were calculated.

(a)	Light + Fe-EDDS]	Fe-[EDDS]	Light
	1.07	0.22	0.14

(b)	Light + Fe-[EDDS] + Bacteria	Fe-[EDDS] + Bacteria	Light + Bacteria	Bacteria
<i>Pseudomonas graminis</i> 13b-3	1.55 ± 0.25	1.93 ± 0.18	2.15 ± 0.018	2.07 ± 0.0093
<i>Pseudomonas syringae</i> 13b-2	1.75 ± 0.15	1.27 ± 0.042	1.72 ± 0.14	1.18 ± 0.080
<i>Sphingomonas sp.</i> 14b-5	1.97 ± 0.062	1.01 ± 0.21	0.87 ± 0.043	0.76 ± 0.11

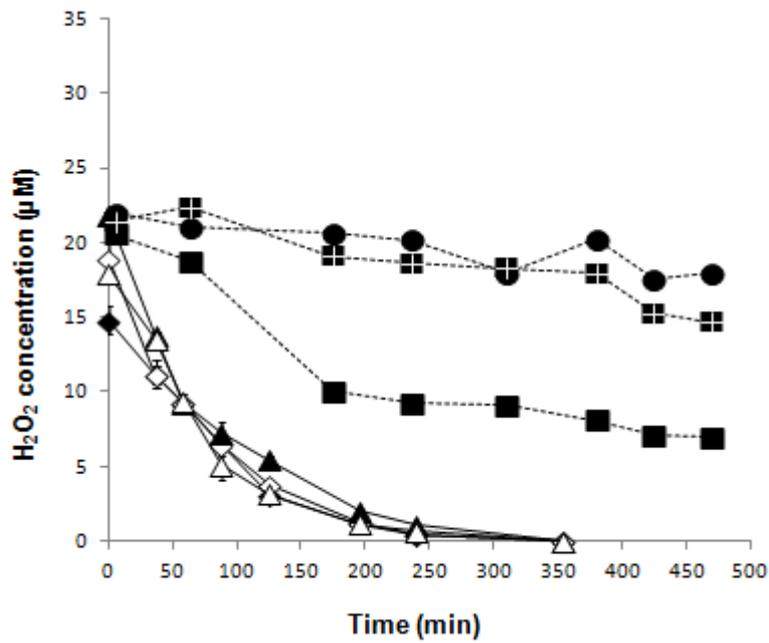


Figure 1: Evolution of H_2O_2 concentration as a function of time (min) under abiotic conditions: Light + Fe-[EDDS] (black square), Light (black circle), Fe-[EDDS] (black square with white cross) and biotic conditions: Light + Fe-[EDDS] + *Pseudomonas graminis* (13b-3) (black diamond), Fe-[EDDS] + *Pseudomonas graminis* (13b-3) (white diamond), Light + *Pseudomonas graminis* (13b-3) (black triangle), *Pseudomonas graminis* (13b-3) (white triangle). Three replicates were done. Error bars (very low values) represent the standard errors (SEs) of the enzymatic assay (5%).

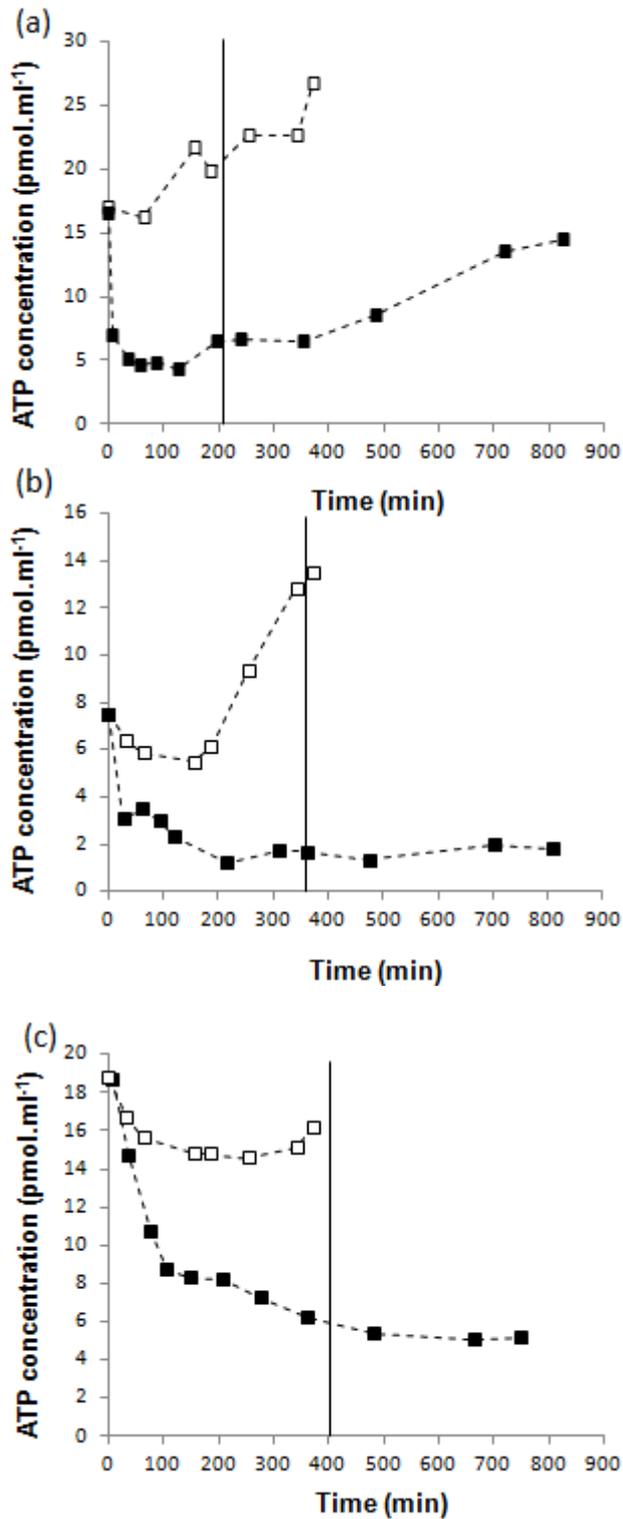


Figure 2: ATP concentration (μM) as a function of time (min) in the presence (black square) or the absence (white square) of H_2O_2 for the three strains: (a) *Pseudomonas graminis* (13b-3), (b) *Pseudomonas syringae* (13b-2), (c) *Sphingomonas sp.* (14b-5).

The vertical bar illustrates the time corresponding to the total degradation of H_2O_2 .

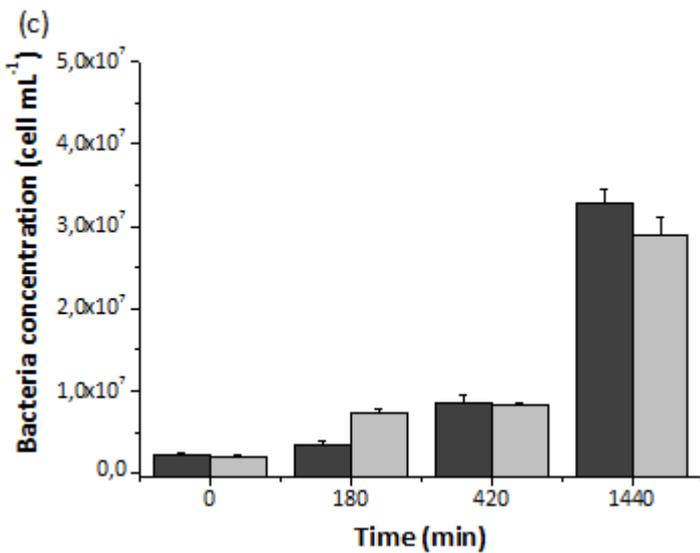
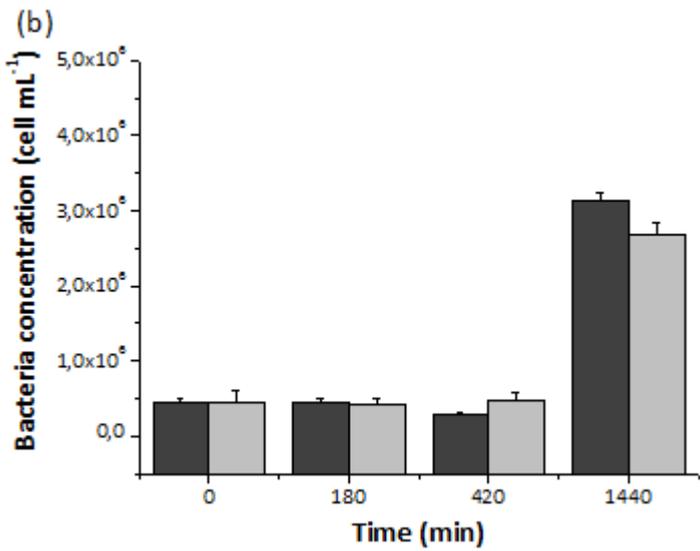
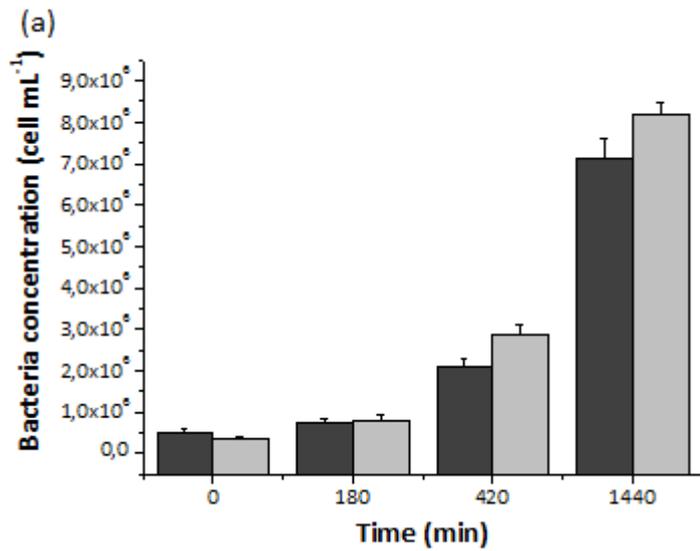


Figure 3: Bacterial cell numbers measured by plate-counting in the absence (light grey) and the presence (dark grey) of H₂O₂ at 20 μM for the three strains: (a) *Pseudomonas graminis* (13b-3), (b) *Pseudomonas syringae* (13b-2) and (c) *Sphingomonas sp.* (14b5). Error bars represent standard deviation from the means (n=3).

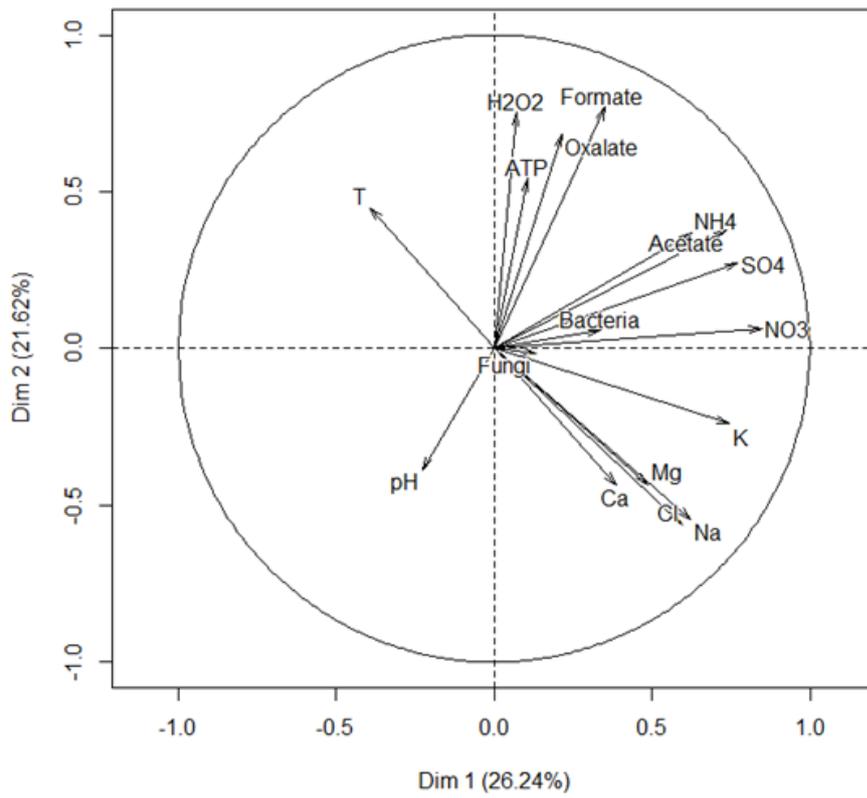


Figure 4: Variables factor map (PCA) of the 37 cloud events on the plane PC1-PC2 based on 17 variables.

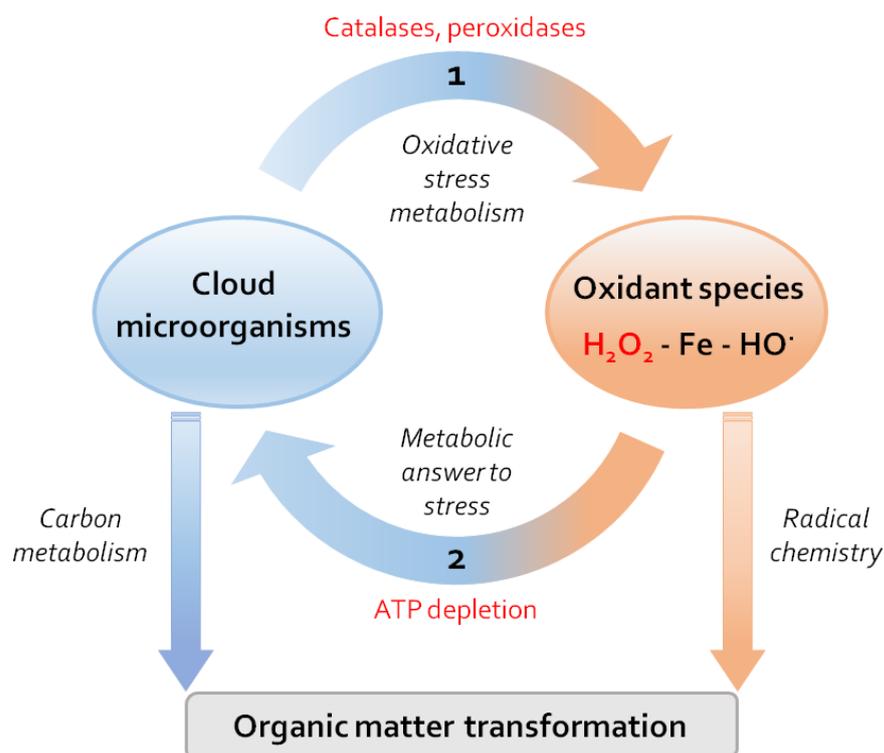


Figure 5: Interaction between H_2O_2 and cloud microorganisms and its potential consequences on atmospheric chemistry. (1) Cloud microorganisms degrade H_2O_2 thanks to their catalases and peroxidases (oxidative stress metabolism) as a result it impacts the oxidant capacity of clouds. The concentration of radicals issued from H_2O_2 is decreased and radical chemistry is less efficient to transform the organic matter. (2) H_2O_2 impacts the energetic metabolism of microorganisms that react to this stress. The depletion of ATP modulates the global carbon metabolism of the microorganisms, and consequently the transformation of the organic matter. These processes are modulated by the H_2O_2 concentration that varies depending on atmospheric scenari.

Table SM1: Summary of values extracted from 37 cloud samples collected at the puy de Dôme station used for principal component analysis (PCA). The values in grey were used to perform the Spearman's rank correlation test.

Date	Cloud N°	Origin	Composition	ATP	Bacteria	Fungi	H ₂ O ₂	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	Cl ⁻	Acetate	Formate	Oxalate	Na ⁺	NH ₄ ⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Ca ²⁺	T	pH
				pmol ml ⁻²	cell ml ⁻²	cell ml ⁻²	μmol L ⁻¹										°C			
17/11/04	31	North/West	Marine	0.36	1.58 10 ³	4.84 10 ³	9.90	17.51	48.31	24.70	6.14	9.53	1.33	52.95	46.92	8.80	3.63	15.07	-0.20	5.10
16/12/04	32	South/West	Continental	0.27	6.84 10 ⁴	3.52 10 ³	1.20	11.86	6.56	73.03	0.31	1.88	0.31	107.64	24.36	7.94	3.30	53.12	-0.10	6.70
19/01/05	33	North/West	Highly marine	0.35	7.61 10 ⁴	1.33 10 ³	2.00	31.79	24.22	393.98	5.11	4.44	0.81	329.00	49.24	47.92	12.52	54.70	-3.40	6.70
18/04/05	34	South/West	Marine	0.04	7.68 10 ⁴	2.99 10 ³	5.80	7.98	9.91	10.07	8.42	7.16	1.24	8.29	28.71	0.40	3.78	11.99	3.10	6.10
06/06/05	36	West	Marine	0.29	9.99 10 ⁴	1.55 10 ³	17.03	25.20	32.34	9.50	7.37	9.33	3.76	21.13	75.54	1.43	1.19	4.45	8.20	5.70
28/09/05	37	North/West	Highly marine	0.96	1.04 10 ³	1.89 10 ⁴	16.64	37.57	102.30	113.61	20.94	28.71	2.66	214.94	125.76	15.47	5.23	35.93	5.30	5.90
03/10/05	38	North/East	Continental	0.80	5.42 10 ⁴	8.34 10 ³	10.35	64.81	144.99	30.36	6.71	8.88	2.50	49.89	138.62	3.70	3.01	14.14	2.40	4.30
13/12/07	42	North/East	Continental	0.06	NA	NA	1.20	39.72	198.40	20.24	10.24	5.79	2.93	19.14	148.17	3.54	11.86	58.00	-6.10	4.70
29/02/08	44	West	Continental	0.30	NA	NA	18.00	24.55	65.92	17.22	26.80	17.99	1.28	15.16	148.54	1.80	5.75	22.29	1.50	5.20
21/04/08	45	South/West	Continental	0.26	4.50 10 ⁴	1.10 10 ⁴	11.40	44.69	65.52	31.68	17.73	17.92	2.78	33.32	122.45	4.89	9.66	53.62	2.80	4.60
24/02/09	52	North	Continental	0.02	5.80 10 ⁴	8.40 10 ³	1.80	28.55	148.59	37.78	4.33	6.45	1.13	35.73	145.14	17.12	16.33	12.98	-0.10	4.10
30/03/09	53	North/East	Polluted	0.01	6.80 10 ⁴	1.60 10 ³	2.70	73.80	516.51	193.83	41.22	13.67	3.45	171.86	363.23	13.51	71.57	52.28	1.00	3.98
03/11/09	54	West	Marine	0.19	2.20 10 ⁴	9.20 10 ³	0.90	2.34	13.33	30.47	4.40	14.95	1.68	36.99	6.64	12.09	20.51	NA	7.90	5.16
23/11/09	55	West	Marine	0.15	3.80 10 ⁴	2.80 10 ³	3.90	9.29	34.81	97.51	6.66	10.14	3.25	95.12	31.07	12.60	17.22	NA	5.60	5.84
01/06/10	62	West	Marine	0.50	2.80 10 ⁴	9.02 10 ³	3.60	3.49	4.48	2.25	3.44	6.19	1.44	1.82	5.99	NA	NA	NA	NA	6.11
08/06/10	63	South	Continental	2.37	8.07 10 ⁴	2.55 10 ³	33.40	51.42	74.53	7.25	22.89	42.04	9.50	8.35	210.10	NA	NA	NA	13.60	5.38
16/06/10	64	North/East	Continental	0.99	4.42 10 ⁴	2.24 10 ³	22.30	46.10	70.60	7.70	25.40	42.70	9.70	10.10	100.30	2.10	1.50	3.80	9.60	6.17
18/06/10	65	North/East	Continental	2.13	8.94 10 ⁴	3.00 10 ³	57.70	64.00	228.70	11.30	23.20	33.20	9.30	8.80	122.30	2.70	2.20	3.80	NA	3.90
16/09/10	66	West	Marine	0.42	2.71 10 ⁴	4.53 10 ³	16.90	3.97	17.80	1.49	7.10	8.60	2.60	2.30	32.42	0.24	0.65	0.50	11.60	5.71
19/01/11	68	North	Continental	0.24	9.15 10 ³	2.01 10 ³	1.40	42.01	288.09	80.07	30.26	6.10	1.08	180.86	134.44	3.16	65.27	223.08	-3.00	7.06
02/02/11	69	West	Marine	0.05	5.41 10 ³	1.12 10 ³	4.10	4.47	48.80	11.08	0.24	2.65	0.22	34.32	4.24	0.48	7.64	146.72	NA	5.79
24/02/11	70	West	Marine	0.23	8.37 10 ³	4.83 10 ³	0.80	1.28	3.31	8.18	8.47	2.17	12.93	12.46	6.34	0.12	4.80	28.20	5.20	5.30
28/03/11	71	South/West	Marine	1.15	8.02 10 ³	4.52 10 ³	5.00	3.48	6.57	6.22	7.05	4.16	2.23	6.92	42.51	0.07	3.60	5.05	5.50	5.93
31/03/11	72	West	Marine	1.11	7.95 10 ³	4.52 10 ³	20.80	12.67	25.97	26.39	16.55	12.74	1.82	40.21	75.12	0.36	12.51	15.24	9.00	6.96

Table SM1(end): Summary of values extracted from 37 cloud samples collected at the puy de Dôme station used for principal component analysis (PCA). The values in grey were used to perform the Spearman's rank correlation test.

Date	Cloud N°	Origin	Composition	ATP	Bacteria	Fungi	H ₂ O ₂	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	Cl ⁻	Acetate	Formate	Oxalate	Na ⁺	NH ₄ ⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Ca ²⁺	T	pH
				pmol ml ⁻²	cell ml ⁻¹	cell ml ⁻¹							µmol L ⁻¹						°C	
20/07/11	78	North/West	Marine	1.28	1.24 10 ⁴	6.59 10 ³	7.43	7.08	10.43	24.09	3.31	11.29	3.05	22.72	32.68	12.29	9.15	7.10	8.30	5.50
07/11/11	79	South/East	Marine	0.62	1.08 10 ⁴	6.00 10 ³	0.91	1.31	5.01	0.30	4.29	5.60	1.03	0.64	52.65	0.82	1.55	3.23	7.00	4.57
20/01/12	80	North/West	Marine	1.03	1.77 10 ⁴	8.01 10 ³	5.86	1.78	2.15	13.35	7.44	5.30	1.11	80.56	39.25	12.02	6.13	5.22	-0.40	4.90
23/01/12	81	North/West	Marine	2.29	6.00 10 ⁴	8.20 10 ³	3.38	4.84	11.18	23.38	15.26	15.61	6.69	145.72	188.64	20.26	6.20	9.34	-1.20	5.82
19/03/12	82	North	Marine	0.49	1.65 10 ³	1.71 10 ³	3.66	1.63	1.96	0.16	4.23	6.16	2.97	1.02	75.44	0.95	0.06	6.11	-1.50	5.25
04/04/12	83	North/West	Continental	5.62	1.49 10 ⁴	1.32 10 ³	10.42	10.68	49.93	12.16	NA	38.98	6.47	93.54	531.13	14.26	10.71	34.63	-0.40	5.60
18/04/12	84	West	Marine	2.06	3.90 10 ³	1.14 10 ³	4.65	1.64	1.87	5.95	3.91	7.66	1.23	36.03	38.10	6.00	1.44	5.20	0.20	5.47
25/06/12	85	West	Marine	2.07	4.47 10 ³	1.09 10 ³	31.76	1.15	3.02	0.93	NA	18.23	3.32	5.99	77.85	2.22	4.02	4.33	NA	5.52
13/09/12	86	West	Marine	0.64	5.20 10 ³	1.96 10 ³	5.99	0.49	1.01	1.03	3.23	3.24	1.04	8.81	16.82	1.35	5.53	4.51	7.20	5.89
10/10/12	87	South/West	Marine	1.55	1.97 10 ⁴	1.97 10 ⁴	1.88	5.33	10.95	26.73	4.00	13.58	0.74	21.22	39.31	8.33	7.57	2.34	NA	6.22
28/11/12	88	North	Polluted	1.71	6.50 10 ³	6.50 10 ³	1.24	111.09	346.50	47.55	18.46	13.08	6.45	17.64	59.26	15.84	53.58	6.55	-2.70	4.55
22/05/13	90	North	Marine	1.52	1.16 10 ⁴	8.30 10 ³	30.82	43.39	43.16	9.58	11.94	14.86	3.19	6.03	90.83	5.16	2.40	14.06	2.40	4.90
29/05/13	91	North/West	Marine	2.06	6.64 10 ³	1.57 10 ³	5.25	28.51	9.33	16.25	21.83	9.76	3.33	13.27	57.44	6.22	8.01	22.21	0.00	5.48

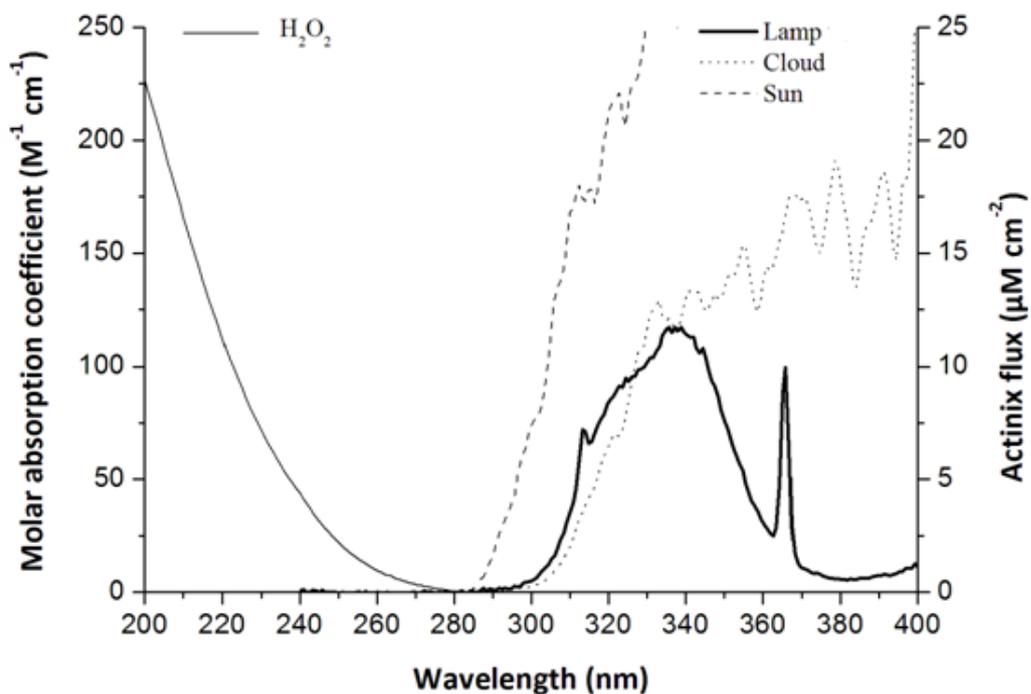


Figure SM1: Light spectrum of the lamp (Sylvania Reptistar) used for experiments compared to spectra of solar light measured on a sunny day and inside a cloud. Solar light and solar light inside a cloud were measured on the top of the puy de Dôme. H₂O₂ absorbance spectrum.

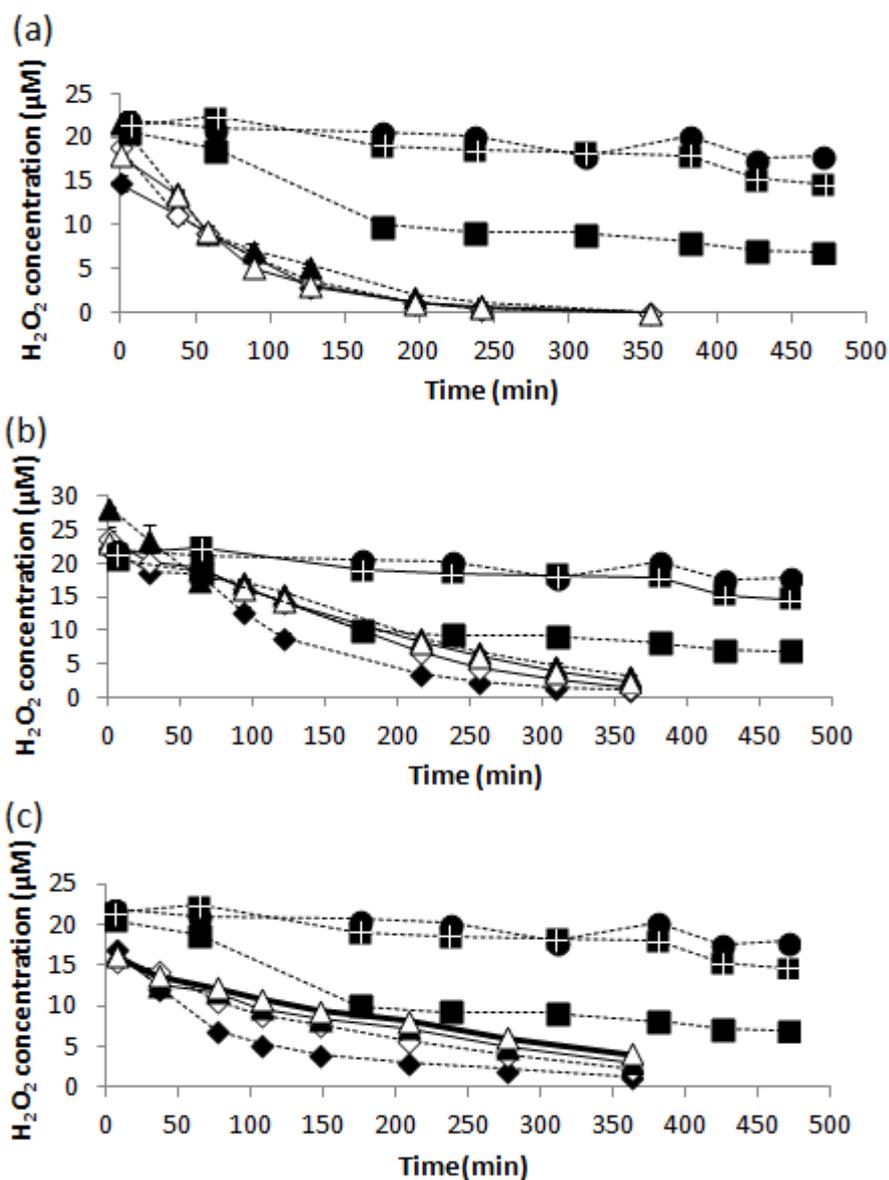


Figure SM2: Initial degradation of H₂O₂ (µM) as a function of time (min) summarizing abiotic conditions: Light + Fe-[EDDS] (black square), Light (black circle), Fe-[EDDS] (black square with white cross) and biotic conditions: Light + Fe-[EDDS] + Bacteria^(a,b,c) (black diamond), Fe-[EDDS] + Bacteria^(a,b,c) (white diamond), Light + Bacteria^(a,b,c) (black triangle), Bacteria^(a,b,c) (white triangle). (a) *Pseudomonas graminis* 13b-3 (b) *Pseudomonas syringae* 13b-2 (c) *Sphingomonas sp.* 14b-5. Three replicates were done. Error bars (very low values) represent the standard errors (SEs) of the enzymatic assay (5%).

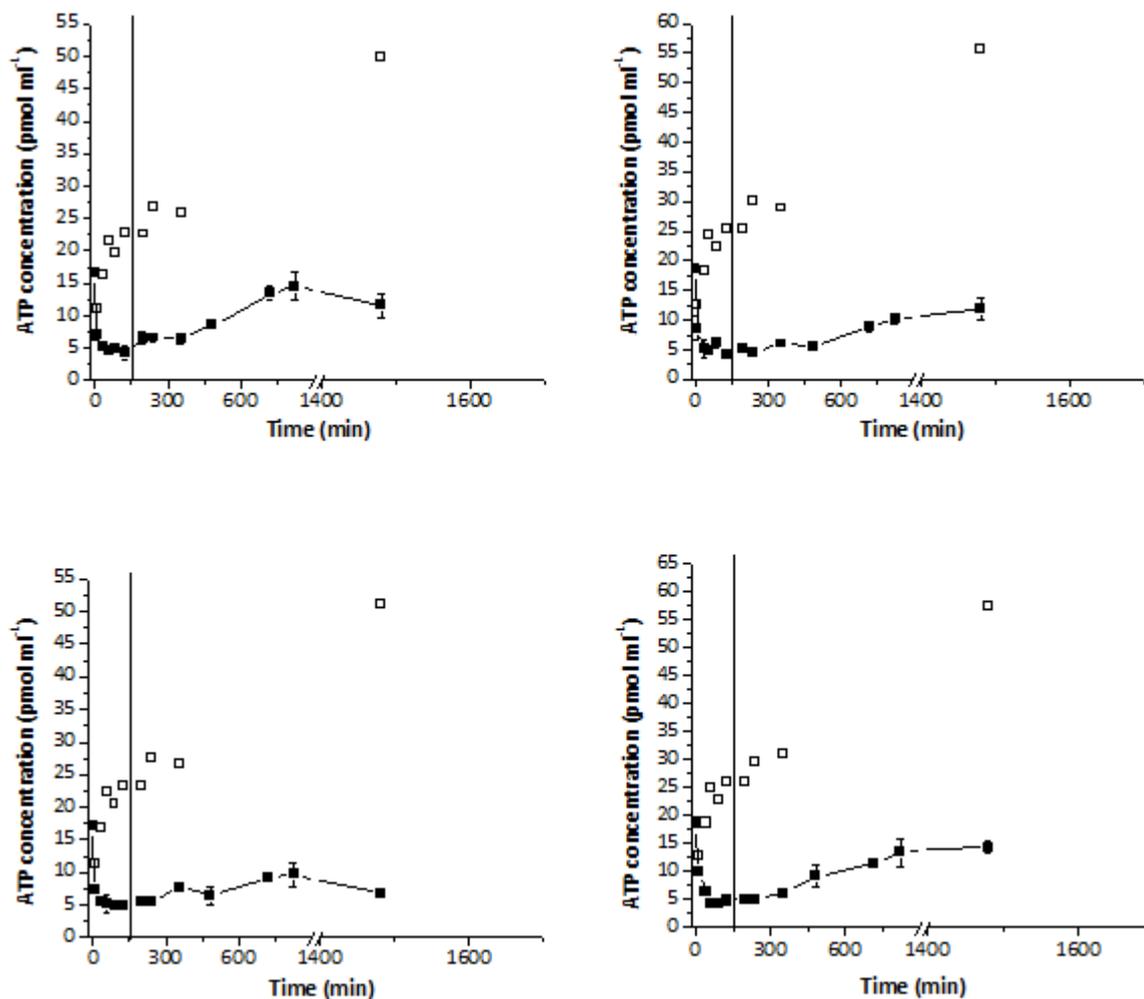


Figure SM3: ATP concentration (μM) for the *Pseudomonas graminis* (13b-3) strain as a function of time (min) in the absence (white square) and the presence (black square) of H_2O_2 at $20 \mu\text{M}$: (a) Cloud + Bacteria + H_2O_2 ; (b) Cloud + Bacteria + H_2O_2 + Light; (c) Cloud + Bacteria + H_2O_2 + Fe-[EDDS]; (d) Cloud + Bacteria + H_2O_2 + Fe-[EDDS] + Light.

The vertical bar illustrates the time corresponding to the total degradation of H_2O_2 .

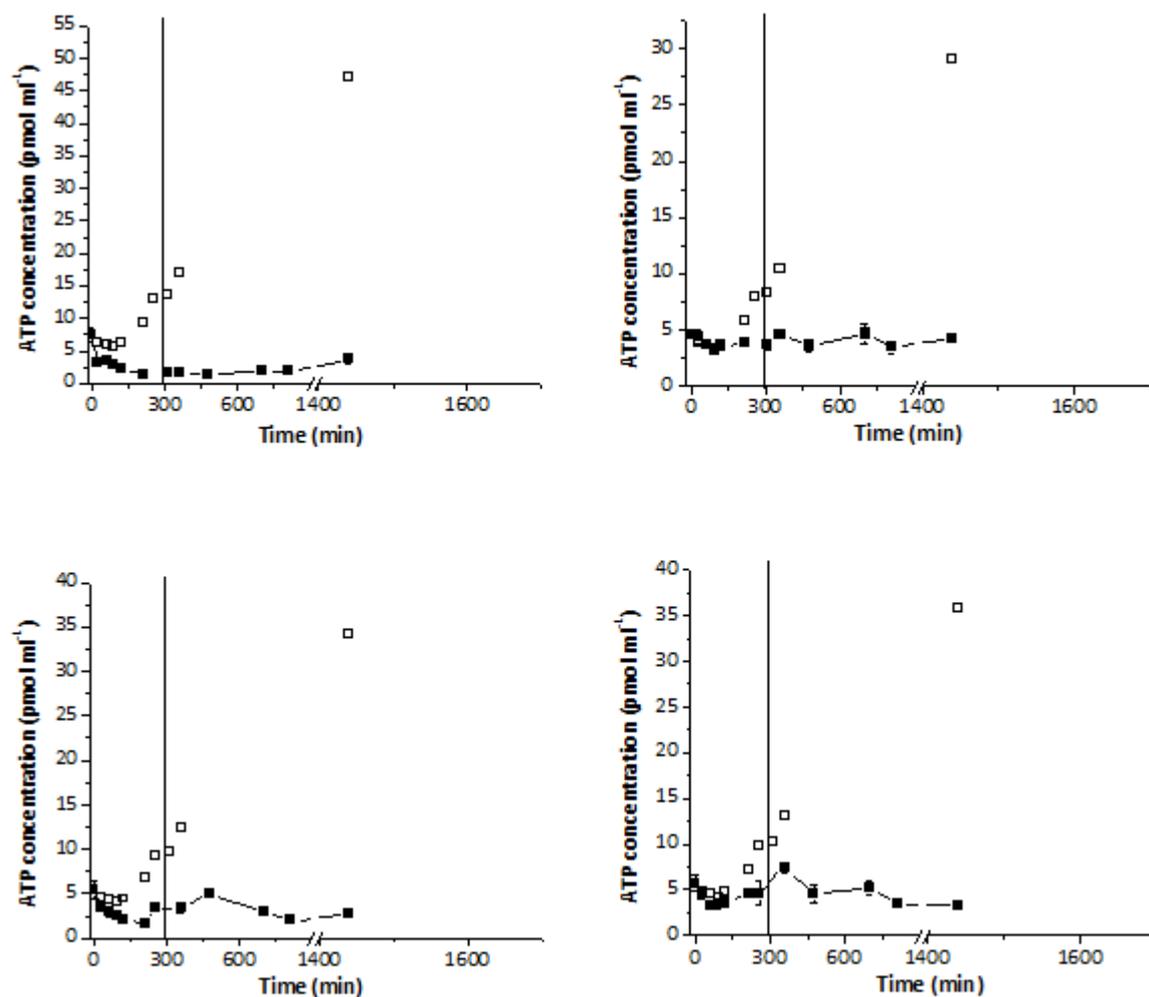


Figure SM4: ATP concentration (μM) for the *Pseudomonas syringae* (13b-2) strain as a function of time (min) in the absence (white square) and the presence (black square) of H_2O_2 at $20 \mu\text{M}$: (a) Cloud + Bacteria + H_2O_2 ; (b) Cloud + Bacteria + H_2O_2 + Light; (c) Cloud + Bacteria + H_2O_2 + Fe-[EDDS]; (d) Cloud + Bacteria + H_2O_2 + Fe-[EDDS] + Light. The vertical bar illustrates the time corresponding to the total degradation of H_2O_2 .

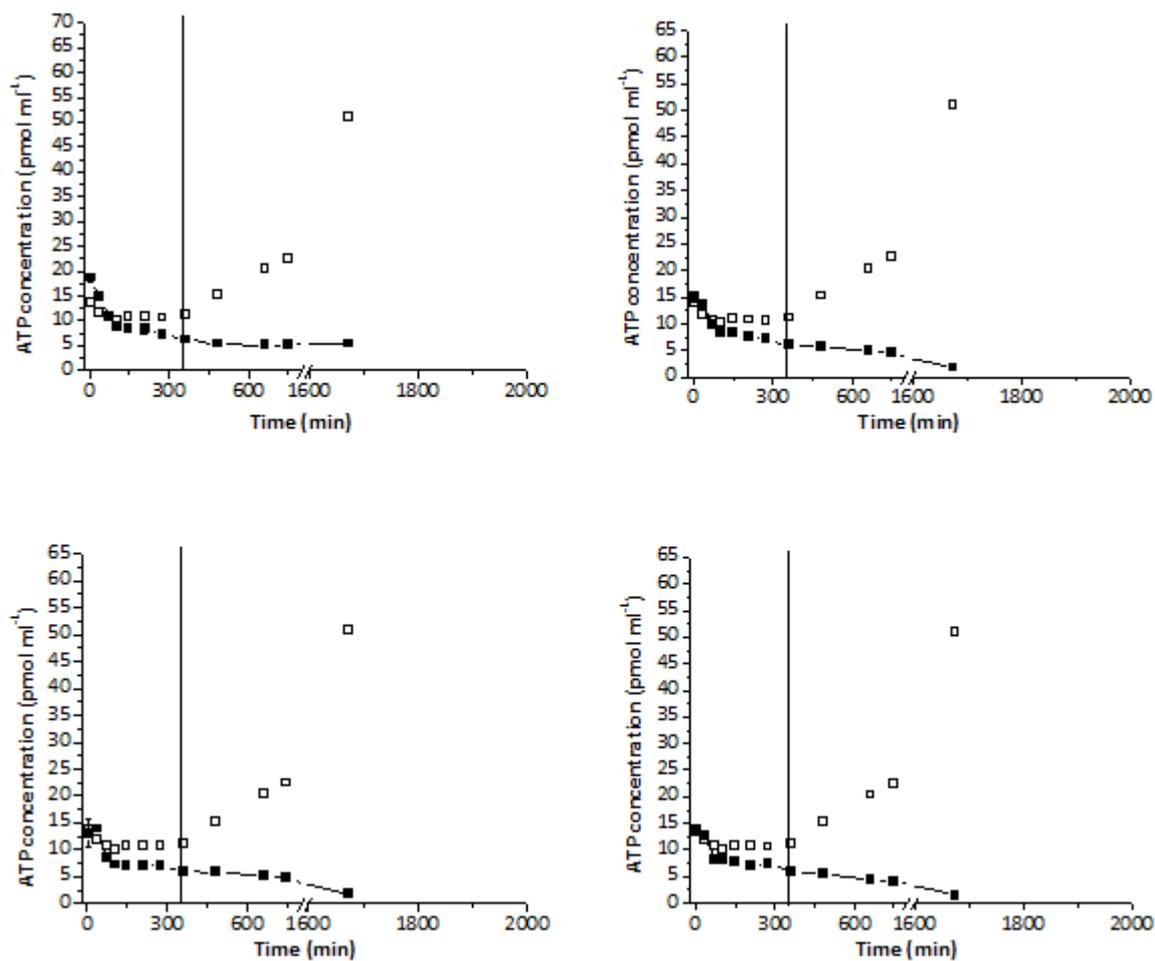


Figure SM5: ATP concentration (μM) for the *Spingomonas sp.* (14b-5) strain as a function of time (min) in the absence (white square) and the presence (black square) of H_2O_2 at $20 \mu\text{M}$: (a) Cloud + Bacteria + H_2O_2 ; (b) Cloud + Bacteria + H_2O_2 + Light; (c) Cloud + Bacteria + H_2O_2 + Fe-[EDDS]; (d) Cloud + Bacteria + H_2O_2 + Fe-[EDDS] + Light. The vertical bar illustrates the time corresponding to the total degradation of H_2O_2 .

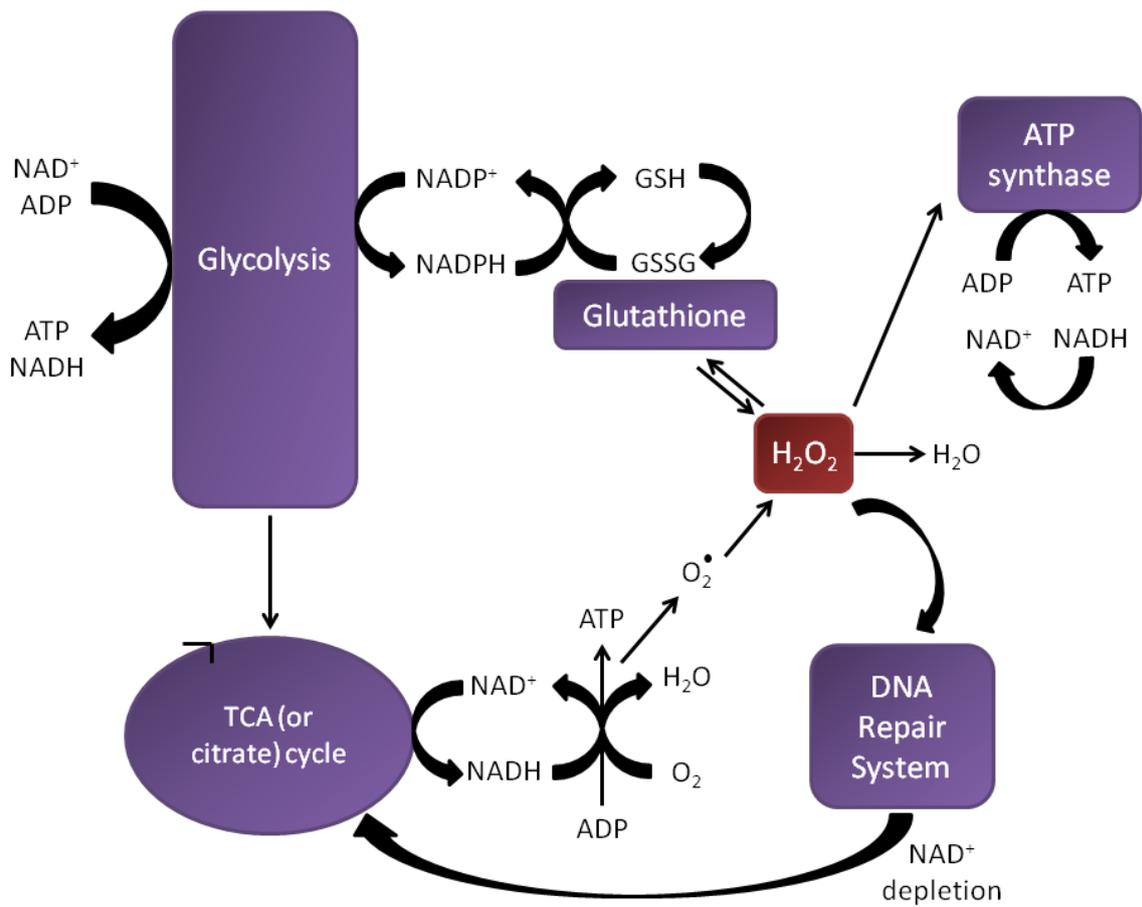


Figure SM6: Impact of H_2O_2 on cells and specific repair systems.
Adapted from Oka et al. 2012.

4.3. « Modulation and resilience of the metabolome of *Pseudomonas graminis*, a cloud bacterium, facing H₂O₂ atmospheric stress »

Modulation and resilience of the metabolome of *Pseudomonas graminis*, a cloud bacterium, facing H₂O₂ atmospheric stress.

Nolwenn Wirgot ¹, Marie Lagrée ^{1,2}, Mounir Traïkia ^{1,2}, Isabelle Canet ¹, Martine Sancelme ¹, Cyril Jousse ^{1,2}, Bernard Lyan ² et Anne-Marie Delort ^{1,2}.

1 - Université Clermont Auvergne, CNRS, Sigma-Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand F-63000 Clermont-Ferrand, France

2 - Plateforme d'Exploration du Métabolisme, Université Clermont Auvergne & I.N.R.A site de Theix, Clermont-Ferrand, France.

Corresponding author: A-marie.delort@uca.fr

Abstract

In cloud waters microorganisms are metabolically active although they are exposed to very strong stresses, especially due to the presence of reactive oxygenated species, including H_2O_2 and radicals. In order to understand how microorganisms can modulate their metabolism facing H_2O_2 stress, we have investigated by a metabolomics approach the response of a *Pseudomonas graminis* strain, isolated from cloud waters, to hydrogen peroxide exposure. For this purpose *P. graminis* cells were incubated in microcosms containing artificial cloud waters in the presence or absence of H_2O_2 . Metabolites were extracted at two time points (50 min and 24 h) that were important regarding the evolution of ATP cellular content and H_2O_2 degradation over time. These bacterial extracts were analyzed by LC-MS and $^1\text{H-NMR}$ using the Metabolic Profiler[®] facility (Bruker). Metabolic profiles were converted into matrices and statistical analyses (PCA, PLS-DA) were performed; key markers of this oxidative stress were identified by 2D NMR and LC-MS-Orbitrap.

At time 50 min, when H_2O_2 was still present in the incubations, the bacteria adapted and modulated their metabolome facing this stress. The major metabolic pathways of *Pseudomonas graminis* (13b-3) impacted by the presence of hydrogen peroxide were the carbohydrate pathway, glutathione, energy, lipid and amino-acid metabolisms. Unexpectedly, the concentration of a few dipeptides containing mainly Ala, Val, Leu (Ile) was also highly modified in the presence of H_2O_2 . These dipeptides are reported here for the first time as biomarkers of oxidative stress. Interestingly, at time 24 h, when H_2O_2 has been completely biodegraded by the cells, no more significant difference was observed between the metabolites of exposed and non-exposed cells to H_2O_2 . This shows the resilience of this bacterium metabolome after H_2O_2 stress exposure. These results are discussed in terms of impacts on cloud chemistry.

Key words: hydrogen peroxide, metabolomics, cloud waters, *Pseudomonas*, NMR, MS, oxidative stress.

1. Introduction

The cloud system is a complex chemical reactor containing a great variety of organic and inorganic species, exhibiting a redox potential of up to more than 200 mV and is thus considered as a very oxidant medium (Deguillaume et al., 2014). The oxidant capacity of the atmosphere is often evaluated from the concentrations of H_2O_2 both in the gas and aqueous phases of clouds. Hydrogen peroxide plays a major role in cloud chemistry as it is the main source of hydroxyl radicals generated from direct photolysis, Fenton or photo-Fenton reactions for instance (Hermann et al., 2015). As a result the organic matter is oxidized in shorter molecules such as organic acids, aldehydes and CO_2 . H_2O_2 concentration is highly variable depending on different atmospheric scenarios, including seasons, day-night time but also the degree of air pollution (Vione et al., 2003).

Although the cloud medium is a very stressing environment, in particular due to the presence of reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 , microorganisms have been discovered alive and metabolically active in cloud waters. This metabolic activity has been proven both by measuring *in situ* ATP concentration and by showing that microorganisms have the ability to biodegrade carbon molecules in cloud water samples (Sattler et al., 2001; Bauer et al., 2002; Amato et al., 2005, 2007b; Hill et al., 2007, Ahern et al., 2007; Vaitilingom et al., 2012, 2013). Recently, it has been shown that cloud microorganisms can survive to high concentrations of H_2O_2 (Joly et al., 2015) and can degrade efficiently hydrogen peroxide thanks to catalases (Vaitilingom et al., 2013). This microbial metabolic activity in clouds suggests that i) microorganisms could play a role in atmospheric chemistry as biocatalysts (Ariya and Amyot, 2004; Delort et al., 2010), ii) they are able to resist to H_2O_2 stress.

In fact, this ability to fight against ROS should be not surprising as it is a daily problem for aerobic microorganisms that use molecular oxygen for respiration or oxidation of nutrients to obtain energy. Reactive by-products of oxygen, such as superoxide anion radical, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide, are generated continuously in cells grown aerobically. But in addition to these cellular processes, the microorganisms present in the atmosphere,

including in clouds, are in the presence of numerous compounds that generate intracellular O_2^- and can therefore suffer oxidative stress - defined as a disbalance in favor of the prooxidants and disfavoring the antioxidants (Sies, 1985 and 1991) - which arises when the concentration of active oxygen increases to a level that exceeds the cell's defense capacity. Such damage may afflict all types of biological molecules present in bacteria, including DNA, lipids, proteins and carbohydrates. Thus, oxidative stress may be involved in processes such as mutagenesis, membrane damage, lipid peroxidation, protein oxidation and fragmentation. In addition to the activity of specific enzymes such as catalases, superoxide dismutases and the production of antioxidant molecules (glutathione, vitamins, pigments, etc.), bacteria exposed to ROS are suspected to reorganize their entire metabolome to face oxidative stress. In a recent study, Wirgot et al. (2017) highlighted that H_2O_2 modulated the global metabolism of cloud microorganisms as evidenced by the strong observed correlation between ATP (adenosine triphosphate) concentration and the presence of H_2O_2 . The objective of this work was to go further and understand how airborne microorganisms can resist to the very oxidative conditions present in cloud waters. Metabolomics appeared as a powerful approach to assess these metabolome changes although it has been applied only in a few cases of an exposure to oxidative stress, in plants (Noctor et al., 2015) and in *E. coli* (Jozefczuk et al., 2010).

In the present study we investigated through a metabolomics study the response of *Pseudomonas graminis* 13b-3 (a model bacterial strain isolated from clouds collected at the puy de Dôme station) to hydrogen peroxide stress. The combination of NMR and LC-MS analyses allowed identifying discriminant metabolites and thus to highlight metabolic pathways impacted by this stress. Metabolomics was also used to bring out the resilience of this bacterium metabolome after this stress exposure.

2. Materials and methods

Three independent experiments were performed in order to have a reasonable number of biological replicates (three batches of 12 samples). Biodegradation of hydrogen peroxide as well as evolution of adenosine triphosphate concentration were monitored over time for each experiment in one independent Erlenmeyer. All experiments were conducted in marine artificial cloud solution as described in Vaïtilingom et al., (2011) to mimic real cloud conditions (See Table SM1).

2.1. Strain conditions

One bacterial strain of *Pseudomonas graminis* (PDD-13b-3, DQ512786), belonging to the Gamma-Proteobacteria class, was selected as model strain as *Pseudomonas* is the genus the most frequently found in cloud water samples (Vaïtilingom et al., 2012) collected at the puy de Dôme site (1465 m a.s.l, Central France).

Bacteria were grown in 100 mL of R2A medium (Reasoner and Geldreich, 1985) under stirring (200 r.p.m) at 17°C for precisely 17 hours. It was important to be accurate in the preparation of cells, especially for the culturing time, to ensure that the cells were in the same physiological state. Cells in the exponential growth phase were then collected by centrifugation for 3 min at 10481 g. The supernatant was removed and the bacterial pellet was suspended and washed twice in artificial cloud solution.

The concentration of cells was estimated by optical density measurement at 575 nm to obtain for each sample a concentration close to 10^7 cell.mL⁻¹ and was finally determined by flow cytometry analysis (BD Facscalibur Becton-Dickinson; λ_{exc} = 488 nm; λ_{em} = 530 nm) using (SYBR-green) fluorochrome for their counting.

2.2. Chemical reagents

Stock solutions of artificial cloud water were prepared in ultrapure water (resistivity of 18.2 M Ω .cm⁻¹) from acetic acid (CH₃COOH; Acros organics), formic acid (HCOOH; Fluka Analytical), oxalic acid (C₂H₂O₄; Fluka Analytical), succinic acid (C₄H₆O₄; Fluka Analytical),

ammonium nitrate ($\text{N}_2\text{H}_4\text{O}_3$; Fluka Analytical), magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich), potassium sulfate (K_2SO_4 ; Fluka Analytical), calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich), sodium chloride (NaCl ; Sigma-Aldrich), sodium hydroxide (NaOH ; Merck), sulfuric acid (H_2SO_4 ; Sigma-Aldrich). The solution was 10 times more concentrated than a real cloud solution, adjusted to pH 6 and sterilized by filtration (Polyethersulfone membrane, 0.20 μm ; Fisher Scientific) before use.

Hydrogen peroxide solution was freshly prepared i.e. just before each experiment from a commercial solution (H_2O_2 ; 30%; not stabilized; Fluka Analytical). The final concentration was fixed at 200 μM .

Solvent used for the metabolites extraction was a ternary mixture (1:2:2, v/v/v) of water (H_2O ; Optima LC-MS; Fisher Scientific), acetonitrile (CH_3CN ; 99.99%; Optima LC-MS; Fisher Scientific) and methanol (CH_3OH ; 99.9%; Fluka Analytical).

Deuterium oxide (D_2O ; 99.96%D) and phosphate buffer (KH_2PO_4 ; 99.50%, K_2HPO_4 ; 99.50%, NaN_3 ; 99.99%) used for NMR analyses were purchased from Eurisotop and Sigma Aldrich, respectively.

The mobile phase used for LC-MS analyses was composed of water (H_2O ; ULC-MS; Biosolve), acetonitrile (CH_3CN ; ULC-MS; 99.97%) and formic acid (HCOOH ; ULC-MS; 99%; Biosolve).

2.3. Incubation of samples for the metabolomics study and extraction of the metabolites

For each experiment, twelve amber Erlenmeyer flasks containing 150 mL of cloud water solution and inoculated at $10^7 \text{cells.mL}^{-1}$ were incubated at 17°C and 110 r.p.m. 150 μL of a 20 mM hydrogen peroxide solution (final concentration of 200 μM) were added in half of them. Incubation was stopped after 50 minutes for one half of the samples (3 with and 3 without H_2O_2) and after 24 hours for the other ones. For each flask, bacterial pellets were obtained by centrifugation and rinsed with a 0.8% solution of sodium chloride. This operation was repeated twice. Finally, metabolomes of the bacterial pellets were extracted using 1.2

mL of the water/methanol/acetonitrile mixture kept in ice bath (Lin et al., 2007; Rabinowitz and Kimball, 2007). After a last step of centrifugation (5 min, 4°C, 12000 g), each supernatant was fractioned as follows: 750 µL were kept for NMR studies, four aliquots of 50 µL for LC-MS analyses and 10 µL were pooled with the aliquots of all other samples in order to prepare quality controls for LC-MS analyses.

An additional experiment was performed for 2D NMR analyses which require more sensitivity.

2.4. Hydrogen peroxide biodegradation and monitoring of ATP concentration

In addition to the twelve samples for the metabolomics study, two Erlenmeyer were incubated in parallel in the same conditions to analyse hydrogen peroxide and ATP concentrations over time.

Hydrogen peroxide concentrations were analysed by fluorescence spectroscopy (Safire II TECAN[®]; λ_{exc} = 320 nm, λ_{em} = 390 nm) using a method based on the reaction between hydrogen peroxide, peroxidase (Horse Radish Peroxidase) and p-hydroxyphenylacetic acid (Lazrus et al., 1985).

Bioluminescence obtained from the enzymatic reaction involving luciferin and luciferase, was used to determine ATP concentration (Glomax[®] 20/20 single tube luminometer from Promega). The protocol used in this case was adapted from Biothema[®] commercial kit instructions (Koutny et al., 2006).

2.5. LC-MS and LC-MS/MS analyses

Standard solutions and sample preparation

Stock standard solutions were prepared for each standard compound in a 1:1 v/v mixture of water and acetonitrile, containing 0.1% formic acid at a concentration of 0.5 mg/mL, and stored at -20°C. Working standard solutions were prepared by diluting stock standard solutions at a concentration of 5 µg/mL before use.

For each sample, three technical replicates were prepared, each of them was consecutively

and directly injected without further treatment to check that there was no analytical drift.

In addition to the samples, five pools (aliquots of 10 μ L of each sample combining all different conditions) were analyzed and used as quality controls.

FAST LC-MS analyses for metabolite profiling

LC-MS analyses were performed on the Metabolic profiler® platform (Bruker) using a fast LC system (Agilent 1200 series) coupled to a MicroToF mass spectrometer equipped with electrospray ionization (ESI) (Bruker).

Chromatography separation was performed on an Acquity HSST3 C18 column (150*2.1 mm 1.8 μ m; Waters). The flow rate was fixed at 0.2 mL/min using 1L of water or acetonitrile, both containing 0.1% of formic acid, for mobile phase A and B, respectively.

The gradient elution was carried out as follows: 0-2 min, 100% A; 2-15 min linear gradient to 0% A; 15-22 min, 0% A; 22-22.10 min linear gradient back to 100% A; 4 min equilibration wash with 100% A.

The injection volumes for all samples and standards were 6 μ L and the column temperature was set at 30°C. The mass spectrometer operated with full scan (50-1000 m/z) in positive and negative ion mode. Nitrogen was used as the drying gas. The gas nebulizer (nitrogen) pressure was 40 psi, the desolvation gas flow rate was 9 L/min and desolvation temperature was maintained at 200°C. Capillary tension was 4500 V.

Softwares used for data acquisition were OtofControl 3.2 and Hystar 3.2.

UPLC-MS/MS analyses for structural identification of the metabolites

A few samples that were representative for the features in the model were analyzed in full scan mode on an LTQ Orbitrap Velos MS with similar chromatography conditions (gradient, column) as for UPLC-MS profiling. The m/z ratio of each feature was searched for in the resulting chromatograms to obtain a better mass accuracy of the features, which was used to determine the most probable molecular formulas. The parent ion was identified from in-source fragments and adducts, and additional structural information on the features was obtained by performing MS/MS fragmentation on relevant ions using UPLC-qTOF-MS/MS in

product ion scan mode with different collision energies depending on metabolites. When standards were available, these were analyzed to confirm putative identifications.

2.6. 1D and 2D NMR analyses

Sample preparation

The supernatants (750 μL) were evaporated at 10°C for approximately 48 hours using a refrigerated centrivap concentrator equipped with a centrivap cold trap at -50°C (LabConco; ThermoScientific). The extracts were resuspended into 300 μL of deuterium oxide (D_2O , 99.96%D) and evaporated again. This operation, which aims to eliminate the signal corresponding to H_2O for the analyses, was repeated twice. Finally, the extracts were suspended in 90% of phosphate buffer (30 mM) prepared in D_2O and 10% of pure D_2O .

1D NMR analyses for metabolite profiling

One-dimensional ^1H NMR experiments were performed with an Avance III 500 MHz NMR spectrometer using a 5 mm Prodigy TCI z-gradient ($^1\text{H}/^{19}\text{F}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) probe with a 60 μL flow cell (Bruker Biospin Wissenbourg, France). Short tubes of 5 mm were used and were analyzed using a refrigerated (6°C) auto-sampler (Sample Jet).

A standard noe spectroscopy sequence (noesygppr1d with water presaturation and gradients) was used with low power irradiation of the water resonance during the recycle delay of 2 s and the mixing time of 10 ms. 1024 scans were collected with an 90° impulsion time of 8.70 μs , a power level for pulse of 9.29 dBW and for presaturation of 50 dBW, an acquisition time of 3.3 s, a spectral window of 10 000 Hz and 64 K data points zero-filled to 128 K before Fourier transformation with 0.3 Hz line broadening. All NMR spectra were recorded at 298 K and treated with Topspin version 3.5pl5.

1D and 2D NMR analyses for structural identification of the metabolites

The NMR spectrometer used was an Avance III 950 MHz equipped with a 5 mm TCI ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$) cryoprobe with z-gradient coil probe (Bruker Biospin Wissenbourg, France). For 1D ^1H -spectra, a standard one dimensional spectroscopy sequence (noesygppr1d) was

used with low power irradiation of the water resonance during the recycle delay of 4 s and the mixing time of 10 ms. For each spectrum, 8 scans were collected with an 90° impulsion time of 7.7 μ s, an acquisition time of 3.3 s, a spectral window of 10 000 Hz and 64 K data points zero-filled to 128 K before Fourier transformation with 0.3 Hz line broadening. All 2D homonuclear (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^1H JRES) and heteronuclear (^1H - ^{13}C HSQC and HMBC) experiments were performed with quadrature phase detection in dimensions, using state-TPPI or QF detection mode in the indirect one. For each 512 increments in the indirect dimension, 2 K data points were collected and 32 or 64 transients were accumulated in the direct dimension. A ^{13}C decoupling (GARP) was performed during acquisition time for heteronuclear experiments. A $\pi/2$ shifted square sine-bell function was applied in the both dimensions before Fourier transformation. All NMR spectra were recorded at 300 K and treated with Topspin version 3.5pl5.

2.7. Data analyses

MS and NMR data treatments

MS raw data were processed using the web-based platform **Galaxy** framework including preprocessing, normalization and quality control steps. The preliminary step involved to zip the MS data (CDF files) and upload them to the Galaxy server.

Data preprocessing was done in several steps. Data were extracted by XCMS (various forms (X) of Chromatography Mass Spectrometry) R package. The extraction method used for peaks detection was the matched filter algorithm based on applying a filter whose coefficients are equal to the expected shape of the signal. For a chromatographic peak a matched filter would use coefficients equal to a Gaussian function whose width was the same as the expected peak width (Danielsson et al., 2002; A. Smith et al., 2006). After their identification, the peaks that represent the same analyte across samples – using overlapping m/z bins and calculation of smoothed peak distribution in chromatographic time – were grouped (matching peaks). These groups were used to identify and correct correlated drifts in retention time from run to run to take into account the chromatography time shift evolution

along analytical experiments. Then, CAMERA R package (Collection of Algorithms for MEtabolite pRofile Annotation) was used to extract compound spectra in positive and negative mode, annotate adduct peaks, isotopes and in-source fragments. In other words, this module groups together the ions originating from the same metabolite (for instance due to an isotopic relation) with a Pearson correlation and annotates them isotopes, adducts or in-source fragments. This is especially useful to screen adducts and isotopes to perform statistical analyses in order to reduce information redundancy. Finally, CAMERA proposes the accurate compound mass (Kuhl et al., 2012).

The second important step was to achieve data normalization by correcting intensities for signal drift and batch effects. The strategy (regression by pools) is based on the measurement of a pooled sample, periodically injected. A regression model is fitted to the values of the pool peaks and used to adjust the intensities for the samples of interest (van der Kloet et al., 2009).

Finally, the quality of data was checked before statistical analyses using the Quality metrics tool (Quality control tab) - (Figure SM1). This tool provides quality metrics of the obtained variables, for the pools as for the samples, allowing notably to check the origin of their variability (CV, Coefficient of Variation). Indeed, if the discrimination is caused by a biological effect and not by an analytical variability, the pools variation should be low contrary to the coefficient of variation of samples (the ratio is calculated). As shown in Figure SM1, the pools are centered near to zero while the samples are distributed homogeneously, validating that their variability is due to biological effects.

At the end of the MS data treatment, is generated two data matrices for positive and negative ion mode. The rows and columns of these data matrices represent the samples and the variables characterized by a mass to charge ratio (m/z) and a retention time (RT), respectively. The content provides the relative intensities.

Concerning NMR analyses, ^1H spectra were divided into regions (buckets) of 0.01 ppm wide in the chemical shift range of 0.5 to 10 ppm excluding the area around residual water signal

(4.6 to 5.1 ppm). Bucketing was performed using the AMIX software (Bruker GmbH). The signal intensity in each bucket was integrated using the sum intensities method and spectra were scaled to total intensity.

Finally, a data matrix of relative intensities (samples and variables) characterized by chemical shifts, was obtained.

Statistical analyses

The data matrices obtained from LC-MS (positive and negative ion mode) and ^1H NMR were subjected to multivariate and univariate analyses. First, multivariate analyses were performed using SIMCA-P software (v12, Umetrics) to verify if there was an obvious discrimination between the samples incubated in the presence and absence of H_2O_2 and for the two times of extraction. This step was also useful to highlight the presence of potential outliers (samples distant from the group and able of producing misleading results). For these reasons, a Principal Component Analysis (PCA), which is a statistical procedure without preconceived ideas, was firstly done. Discrimination seemed to appear but not enough clearly between the samples for both analyses according to the two effects, H_2O_2 (stressed and control samples) and time (50 min and 24 h). In a second step, Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) was performed by considering a supplementary matrix "Y" (classes defined). This second analysis allowed refining the separation between groups of observation – by rotating the PCA components such that a maximum separation among classes was obtained – and to understand what variables carried the class separating information.

The chosen method for normalisation of data was the scaling (the multivariate role of ions or buckets in the model) and more precisely UV scaling which is classically used.

The validity of the obtained model was tested by permuting randomly the Y variable to assess the relevance of the model discriminating power (Blaise et al., 2009) through comparisons between observed Y values and predicted ones. Two parameters were thus determined, Q^2 and R^2 (X, Y), which have a great importance to conclude on the reliability of

the model. The Q^2 value refers to a technique called the cross-validation that allows estimating the performance of the predictive model. The R^2X and the R^2Y represent the validity (as a percentage) of the dataset and the proportion of Y well predicted, respectively. The higher the amount out of these three parameters, the more reliable the model.

Thus, lists of discriminant ions (LC-MS) and buckets (NMR) were obtained. Due to their large number, a selection was done based on VIP values (Variable Importance in Projection). The values strictly greater than 1 were kept for the identification step.

Data bases

Identification of discriminant metabolites were done using web database searches (KEGG, HMDB) and relevant publications (Nicholson J.K. et al, 1995; Fan, 1996; Willker W. et al, 1996). MS/MS fragmentation patterns were compared to simulations through Massfrontier (v.7; Thermo Scientific) software.

3. Results

In order to evaluate the impact of H_2O_2 , the major atmospheric oxidant, on the metabolome of *Pseudomonas graminis* 13b-3, a bacterial strain isolated from cloud water, a microcosm was design to mimic cloud conditions. For that *Pseudomonas graminis* 13b-3 was incubated in the presence or absence of H_2O_2 in artificial marine cloud water at 17°C. This artificial marine cloud water previously described by Vaitiligom et al. (2011) contains the major carbon and nitrogen compounds and salts present in clouds originating from the ocean and is representative of the samples collected at the puy de Dôme station in France (1465 m). The temperature of 17°C is the average temperature in the summer at the sampling site. Solar light was not introduced in these microcosms as we previously showed that this parameter had not impact on this bacterial metabolism and viability (Wirgot et al., 2017, Joly et al., 2015). The present metabolomics study was performed based on combined NMR and LC-MS analyses of intracellular metabolites extracted from the reference samples (R, without

H₂O₂) or stressed samples (S, with H₂O₂). In parallel H₂O₂ and ATP concentrations were monitored over time.

3.1. Monitoring of hydrogen peroxide and ATP concentrations.

In a previous work (Wirgot et al., 2017) it has been shown from laboratory experiments and statistical analyses that H₂O₂ modulated the global metabolism of cloud microorganisms as evidenced by the cellular ATP concentration that was strongly correlated with the concentration of hydrogen peroxide. To go further in the understanding of this correlation, a metabolomics approach was performed. However, it requires, due to the selected analyses notably for NMR studies, sufficient concentrations of metabolites to have an exploitable signal. For this principal reason, experimental conditions were slightly modified compared to the experiments performed in Wirgot et al. (2017). The concentration of bacteria, and thus the concentration of metabolites produced, was increased by ten. In order to keep the same ratio between bacteria and H₂O₂ quantity, hydrogen peroxide concentration was also increased by the same order of magnitude. In order to confirm the correlation between ATP and H₂O₂ observed in the previous work, the evolution of their concentrations over time were checked in the experimental conditions of this present work (Figure 1).

The H₂O₂ degradation by bacteria was monitored periodically over a 6 hours period (Figure 1a); H₂O₂ was completely biodegraded after 2 hours. The associated biodegradation rate was calculated: the value obtained was of $(5.72 \pm 1.29) \times 10^{-17} \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$. In the previous work (Wirgot et al., 2017), the rate value was very close: $(4.01 \pm 0.12) \times 10^{-17} \text{ mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cell}^{-1}$. This result confirms that if the ratio between bacteria and H₂O₂ concentrations is kept, the biodegradation rate is similar.

The ATP concentration was monitored continuously over a 13 hours period with a sampling at 24 hours (Figure 1b). The presence of H₂O₂ caused a brutal decrease in the ATP concentration (170 pM to 25 pM in approximately 30 min) until the time when H₂O₂ was totally degraded (represented on the graph with a vertical bar around 120 min). After 400 min *P. graminis* 13b-3 recovered an ATP concentration similar to its initial level; after 24 h the

ATP concentrations for the two samples, with and without hydrogen peroxide, reached a close value. These results are very consistent with those obtained previously by Wirgot et al. (2017). They show that the energetic metabolism of *P. graminis* is impacted very differently at the beginning and at the end of the incubation with H₂O₂.

To assess these two different response phases, we decided to perform metabolomics experiments after 50 min and 24 h of incubation. The first point has been chosen as it represented the end of the first phase, a time for which ATP concentration is around the lowest value and almost all H₂O₂ has disappeared, the second one to the end of the second phase illustrating the time evolution of each incubation.

3.2. Metabolomics experiments on samples collected at 50 min.

3.2.1 Statistical analyses

In order to evaluate the effect of hydrogen peroxide on bacteria, statistical analyses based on NMR and LC-MS data (positive and negative mode) were performed. For MS results, and because of redundancy of informations, only the positive mode is illustrated. Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), for which two classes were defined by separating the reference samples and the stressed ones was done and the obtained results are illustrated in Figure 2. The score plots issued from this statistical analysis distinguished clearly samples with a first main component (horizontal axes on Figures 2a and 2b) discriminating according to the presence of hydrogen peroxide, while the second one (vertical axes) seemed more related to biological variability. These results confirmed that H₂O₂ had a significant effect on the metabolome of bacteria. Using one or two main component(s), the reliability of the model was quite stable as for NMR and LC-MS data, the percentage of variability explanation (R²X) was equal to 44% and 33%, the R²Y coefficient to 0.96 and 0.99 and the Q² coefficient to 0.85 and 0.84, respectively. These values were highly satisfactory. In addition, a permutation test was also performed to test and confirm the robustness of the studied model.

Finally, lists of Variable Importance in Projection (VIP) scores were obtained from this statistical model. 338 discriminating buckets (NMR), 119 and 79 discriminating ions (LC-MS, positive and negative mode respectively) were selected for the identification of metabolites (VIP value > 1).

However, multivariate analysis gave information on the group effect of discriminating buckets or ions. In order to know if the VIPs had also an individual effect, univariate analysis was realized using the Galaxy web platform. The Mann-Whitney Wilcoxon rank test (non-parametric test) was selected. For each ion or bucket, boxplots were obtained with an associated p-value (threshold < 0.05) to verify if there is a discrimination between the stressed sample and the reference. Through this analysis, all the VIPs with a value superior to 1 appeared significant. These results reinforced our choice to have selected VIPs with a threshold superior to 1 ; this latter could have been increased to 1.5 or 2 if more buckets or ions had been obtained.

3.2.2. Identification of the metabolites

The use of two different and complementary analytical techniques (NMR and LC-MS, see Table SM2) led to the detection of various metabolites which were key markers of the hydrogen peroxide stress in *P. graminis* 13b-3. The identified metabolites are presented in Table 1 and were divided into six different classes: amino acids, saccharides, amines, lipids, peptides and miscellaneous compounds. NMR analysis allowed detecting most of miscellaneous metabolites such as AMP, ATP, NADH, betaine, acetate, lactate and most of the saccharides while LC-MS allowed the identification of lipids, peptides and some various metabolites such as phosphoric acid or glycerol-3P. Some metabolites were detected from both NMR and LC-MS analyses.

In addition, for each identified compound, the ratio between its amount in stressed (S) and reference (R) samples was determined from the average relative intensities measured in the analytical profiles. This parameter precises if the metabolite is over- or under-expressed in a sample depending on the culture conditions. It is interesting to note here that for metabolites

detected from both techniques, the values of the calculated ratios varied in the same way. It is the case for amino acids (leucine, valine, methionine, phenylalanine and tyrosine, glutamate and methionine), saccharide (trehalose) and miscellaneous compounds (pantothenate).

3.3. Metabolomics experiments on samples collected at 24 hours.

For the PLS-DA analyses, classes were first defined based on the different studied conditions. A model containing all the samples (stressed and reference) for the two extraction times (50 min and 24 h) i.e. with four different classes was then tested. The Q^2 and R^2 coefficients values were not good and the permutation test confirmed that this model was not robust. In addition, in the PLS-DA the samples at 24 h (stressed and reference) appeared at a single group.

Hence, PLS-DA analyses of MS (Figure 3a) and NMR data (Figure 3b) were performed considering only 3 groups: group 1 (cells incubated with H_2O_2 at 50 min), group 2 (cells incubated without H_2O_2 at 50 min) and group 3 (cells incubated with or without H_2O_2 after 24 h of incubation). This model was relevant. Indeed, it is clearly visible that the samples extracted at 24 h are not discriminated as there is no separation between the samples.

From these multivariate analyses, and as shown in the obtained score plots, the main discrimination between samples appeared clearly as an effect of incubating time, with groups 1 and 2 separated from the group 3 along the first main component axis, showing that the metabolomes of *P. graminis* are very different at time 50 min and 24 h. This is likely because the bacteria are incubated in a marine artificial cloud medium containing carbon and nitrogen sources that have been used over time by the cells. In a previous work (Wirgot et al., 2017) we showed that cells are growing during this 24 h period.

On the other hand and outstandingly, although the metabolomes of the cells incubated with or without H_2O_2 were different at time 50 min (Groups 1 and 2 in Figure 3, see also Figure 2) no more significant difference remained between the two groups of cells at time 24 h, whatever their previous exposure to the oxidant (Group 3 in Figure 3).

4. Discussion and conclusion

4.1. Modulation of *Pseudomonas graminis* 13b-3 metabolome facing hydrogen peroxide stress.

From the list of identified metabolites, metabolic pathways of *Pseudomonas graminis* impacted by the hydrogen peroxide stress (Figure 4, 5 and 6) were mapped using Kegg databases to visualize and interpret the results more easily. The metabolites which concentration was increased in the presence of hydrogen peroxide are indicated in red boxes, while those which concentration was decreased are indicated in grey boxes. Putative metabolic intermediates are indicated in white boxes with dotted line.

Carbohydrate pathway: Carbohydrates play several important roles in the metabolic processes of living organisms. They are an important source of the energy that drives many reactions to maintain life processes. Carbohydrate metabolism is highly impacted in the presence of H₂O₂ (Figure 4). This metabolism is complex showing interconversion of various poly-, oligo-, di- and mono-saccharides. Glycogen and trehalose (as well as its derivative trehalose-6-phosphate) concentrations were decreased in the presence of H₂O₂ while those of maltose, glucose, cellobiose and fructose were increased. It shows that this bacterium accelerate the biodegradation of its storage compounds (glycogen and trehalose) into maltose and glucose. Glucose can further be transformed in cellobiose, a dimeric form of glucose. Glucose and maltose enter the glycolysis and form fructose from fructose-6-phosphate.

Soluble sugars especially glucose and fructose are involved in the responses to a number of stresses including oxidative stress and are related to important changes in reactive oxygen species. It was suggested that sugar signalling and sugar modulated gene expression are related to the control of oxidative stress (Couée et al., 2006). Trehalose can be found in many organisms including bacteria and is known to be able to protect the integrity of the cell against a variety of environmental injuries and nutritional limitations. It is maybe the reason why its relative concentration in the presence of hydrogen peroxide is lowered to serve that

function. Trehalose-6P can be cleaved by an enzyme to form glucose and glucose-6P, which can also explain the large amount of glucose in our conditions (Argüelles, 2000).

All these links place soluble carbohydrates in a pivotal role in the prooxidant and antioxidant balance and must have constrained the selection of adaptive mechanisms involving soluble sugars and preventing deregulation of reactive oxygen species production.

Carboxylic acid metabolism: In the presence of H₂O₂ carboxylic acid concentrations are modified: lactate, citrate and succinate are produced in higher amounts while acetate concentration is decreased. This result is consistent from that observed in *E. coli* exposed to H₂O₂ where fumaric acid, succinic and malic acids were also overexpressed (Joefczuk et al., 2010).

Lipid metabolism: Three classes of lipids were detected thanks to LC-MS analysis (palmitoleic acid, three lyso PE and two lyso PC). Palmitoleic acid is part of fatty acid metabolism, while lyso PC and lyso PE are part of glycerophospholipid metabolism (Figure 5). Except for one type of lyso PC, all the VIP scores are high (average around 1.80) so lipids are discriminating metabolites in this oxidative stress. In addition, the values for the ratio S/R (50 min) are very low for all lipids, indicating that these metabolites concentrations are lowered in the presence of hydrogen peroxide (Table 1, Figure 5). In the same way, the concentration of glycerol and glycerol-3-phosphate, two intermediates of the phospholipid metabolism, are decreased under oxidative conditions. This observation is consistent with the fact that lipids are major targets of oxidative stress. Free radicals can attack directly polyunsaturated fatty acids in membranes and initiate lipid peroxidation. A primary effect of lipid peroxidation is a decrease in membrane fluidity, which alters membrane properties and can disrupt membrane-bound proteins significantly (Dempfle, 1991). Membrane damage disrupts cellular integrity, causing loss of the proton motive force that drives ATP formation and the uptake of many nutrients (Farr et al., 1988). Further studies should be undertaken in the future to explore more precisely lipid metabolism – as this requires different extraction

and HPLC conditions that those used in this study - and should give more information about the oxidative state of lipids under oxidative conditions.

Energy metabolism: Energy metabolism is strongly impacted by the presence of hydrogen peroxide. In fact, the amount of adenosine monophosphate (AMP) and adenosine triphosphate (ATP) were decreased at 50 min (Table 1, Figure 5). Inosinic acid (or IMP), an intermediate of ATP and AMP synthesis is also decreased. This observation is consistent with the results obtained by bioluminescence assay in Wirgot et al. (2017) and in this work (Figure 1b). Indeed, at 50 min the difference on ATP concentration was extremely large between the reference and the sample incubated with hydrogen peroxide. A few studies also reported a decrease of ATP concentrations in cells exposed to H₂O₂, they include *Streptomyces pneumoniae* (Pericone et al., 2003) and cultured mammalian and plant cells (Spragg et al., 1985, Sporn and Peters-Golden, 1988, Hyslop et al., 1988, Josephson et al. 1994, Tiwari et al., 2002, Oka et al., 2012). Different mechanisms can explain the global decrease of ATP concentration. First, H₂O₂ can inhibit the ATP synthase, and thus directly the ATP production (Tamarit et al., 1998). Second, H₂O₂ can produce cellular damages, especially on DNA. To repair these damages, NAD⁺ dependent enzymes are required. As ATP synthesis is highly dependent on NADH availability in the cells ATP depletion can result from this repair process (Oka et al., 2012). This last mechanism is consistent with the observed decrease of NADH (Table 1).

Amino acid metabolism: A large number of amino acids were identified in this study (Table 1, Figure 5). At 50 min under oxidative stress conditions, 70% of the detected amino acids (isoleucine, leucine, valine, lysine, arginine, methionine, aspartate and cyclic compounds like tryptophan, phenylalanine, and tyrosine) have increased their concentrations indicating a global augmentation of amino acid metabolism. Some compounds that are connected to amino acid metabolism are also overproduced, for instance carnitine and pipercolate – linked to lysine metabolism – or betaine – linked to glycine metabolism. Betaine concentration is particularly increased and presents a high VIP value. On the contrary some amino acid

concentrations were decreased in the presence of H₂O₂, including alanine, glutamate, glutamine, citrulline and proline. Interestingly, some amino acids such as valine, leucine, isoleucine, glutamate, tyrosine and tryptophan have a high VIP values compared to the others, suggesting that they are key markers of the response of *P. graminis* to H₂O₂ stress. Jozefczuk et al. (2010) also observed an overproduction of most of the amino acids in *E. coli* exposed to H₂O₂, although some differences can be noticed concerning the exact nature of these amino acids (for instance alanine is overproduced in *E. coli* while it is under produced in our case).

Some amino acids (glutamate, glycine) or amines linked to amino-acid pathways (carnitine, betaine) are well-known to be osmo- or cryo-protectants, these compatible solutes accumulate in the cells facing osmotic or cold shocks. Carnitine is also known as an antioxidant compound (Davies et al., 2000). Except for glutamate whose concentration is decreasing, glycine, carnitine and betaine are accumulating in *P. graminis* 13b-3 in the presence of H₂O₂. This is consistent with studies that report a concomitant response to oxidative stress and cold shock (Zhang et al 2012).

Apart from these specific compounds, the modulation of amino acid pathways seems connected to that of peptide metabolism (see below).

Peptide metabolism: Interestingly the variations of amino acid concentrations were accompanied by the modulation of dipeptide concentrations (Table 1, Figure 5). Ala-Ala, Val-Ser, Thr-Gly concentrations decreased under stress conditions while the concentration of Val-Asp, IleHis, Ile-Asp, Val-Ile. It is worth noting that i) these dipeptides contained at least one of the amino acids whose concentration varied in the presence of H₂O₂, ii) some of these peptides have the highest VIP and S/R values of all the metabolites of interest. These dipeptides seem thus of major interest and might be the most important key markers of H₂O₂ stress for *Pseudomonas graminis* 13b-3. The discovery of dipeptides was unexpected, as they have never been described as an answer to oxidative stress. Only a very few papers report the presence of short peptides in bacterial cells. Thanks to a metabolomics approach,

Kol et al. (2010) reported an overproduction of one dipeptide (Gly-Pro) and four tripeptides (Arg-Gly-Pro, Lys-Gly-Pro, Glu-Gly-Pro and Ala-Gly-Pro) in response to a salt shock in *Streptomyces coelicolor*. The increased concentration of these peptides all containing proline under osmotic stress was consistent with the increase of concentration of proline, a known osmoprotectant. The presence of proline-containing short peptides was also described earlier in *Listeria monocytogenes* (Amezaga et al., 1995), *Lactobacillus casei* (Piuri et al., 2003), *Oenococcus oeni* (Le Marrec et al., 2007) and *Bacillus subtilis* (Zaprasis et al., 2013) facing osmotic shocks. Using a metabolomics approach, Jousse et al (2017) observed the presence of short peptides in *Pseudomonas syringae* 13b-74 under cold shock. However in this later case these peptides were not specifically containing proline and there were not all overproduced. One dipeptide (Ser-Val) and a tetrapeptide (Gln-Ser-Ala-Gln) accumulated under stress while all other 8 dipeptides (Ala-Leu, Leu-Leu, Ala-Arg, Glu-Ala, Pro-Phe, Pro-Ile, Leu-Phe, Val-Val) were underproduced. In parallel, the amino acid concentrations were mainly decreased under cold conditions. The authors suggested that they could play a different role than cryoprotectant and could be involved in unknown regulation pathways. In the present study, most of the dipeptides are overproduced in *Pseudomonas graminis* 13b-3 in the presence of H₂O₂ but there are non-proline dipeptides as they rather contain Ile, Leu, Val as major amino-acids. Their accumulation could protect the cells against oxidative damages. For instance, it was shown that linear glycine-containing dipeptides could scavenge radicals in Human erythrocytes when exposed to oxidative stress (Zheng et al., 2016). Another hypothesis would be that, as in the case of *Pseudomonas syringae* 13b-74 (Jousse et al., 2017), the modulation of these peptide concentrations could reflect more complex and unknown regulation pathways.

Glutathione metabolism: As expected during an oxidative stress, the concentration of glutathione (GSH) was increased in *P. graminis* exposed to H₂O₂ (Figure 6, Table 1). Glutathione is widely found in many living organisms including microorganisms. It has various functions involved in the defense against oxidative stress (Davies, 2000). More

generally the concentrations of the metabolite linked with glutathione such as spermidine, beta-alanine, pantothenate, UMP, putrescine, glycine and methionine, are also increasing in the presence of H₂O₂.

Putrescine and spermidine are among the most widely distributed cellular polyamines and are essential for normal cellular growth and multiplication of both prokaryotic and eukaryotic cells (Cohen, 1997). Putrescine can be synthesized from ornithine, which is a putative pathway in our study, and linked to arginine which is also overproduced. Spermine and spermidine can act as free radical scavengers and reduce DNA strand breakage and cellular damages induced by oxygen radicals (Ha *et al.*, 1998). Polyamines therefore seem to play an important adjunctive role in protecting cells from the toxic effects of reactive oxygen species.

4.2. Resilience of *P. graminis* 13b-3 metabolome after exposure to H₂O₂

As shown in the previous section *Pseudomonas graminis* metabolome was greatly modified in the presence of H₂O₂. First its energetic metabolism was slowed down as shown by the strong decrease in ATP concentration (Figure 1 and Figure 5), reflecting a global change of the metabolic state of the cells. Facing H₂O₂ stress, *Pseudomonas graminis* was able to adapt its metabolome to this oxidative stress and to modify many of its metabolic pathways concerning carbohydrates, lipids, amino acids, amines, glutathione; peptides (see section 4.1.).

However one of the most striking result was the fact that when H₂O₂ had been totally biodegraded, *P. graminis* was able to synthesize again large quantity of ATP with a concentration going back to a level quite similar to the initial one (Figure 1). Furthermore, we were able to demonstrate that after 24h, it was no longer possible to discriminate the metabolome between cells exposed and not exposed to H₂O₂ proving thus the ability of *P. graminis* to recover the same metabolic pathways than the reference strains, not exposed to the stress (Figure 3). These results clearly demonstrate the resilience of *P. graminis* metabolome facing H₂O₂ exposure. This resilience, observed from a molecular point of view,

is consistent with our previous results, showing that this bacterium and other model strains isolated from clouds could survive to H₂O₂ high concentrations (Joly et al., 2015) and were even able to grow normally after H₂O₂ exposure (Wirgot et al., 2017).

4.3. Potential impacts on atmospheric chemistry

We have shown that *P. graminis* has a great flexibility of its metabolome and a capacity of adaptation to changing conditions, namely H₂O₂ concentrations. This is quite important regarding atmospheric context as hydrogen peroxide is a key component in the atmosphere, driving most of the radical reactions as the major source of hydroxyl radicals. H₂O₂ concentration is highly variable depending on various meteorological parameters (e.g. photolytical activity, temperature and relative humidity) and trace gases (VOCs, CO, O₃, and NO_x). Sunlight effect is particularly important; as a result diurnal and seasonal variations of H₂O₂ concentration are observed (Vione et al., 2003). On the long term, the atmospheric concentration of H₂O₂ might increase due to the increasing concentration of pollutants such as NO_x and SO₂ (Vione et al., 2003, Watanabe et al., 2001). The modulation of the metabolic pathways by H₂O₂ concentration could have an impact on cloud chemistry. Indeed, we have shown in the past that cloud microorganisms can transform organic compounds as efficiently as radical chemistry (Delort et al., 2010, Vaïtilingom et al., 2011, 2013). For instance microorganisms can degrade carboxylic acids such as acetate, lactate, citrate and succinate in cloud waters (Amato et al., 2007, Vaïtilingom et al., 2011, 2013). These acids result from the oxidation of larger organic compounds by photooxidation or by Fenton and Photo-Fenton processes (Charbouillot et al., 2011) and are present in large proportions in cloud waters, representing about 10% of the organic matter (Deguillaume et al., 2014). In this work, we have demonstrated that the intracellular concentrations of these acids were changed when *P. graminis* was facing H₂O₂ stress, meaning that the rates of transformation of these compounds were changed. As a consequence the efficiency of biotransformation of these acids in clouds could be also modified depending on atmospheric scenarios. Carbohydrate metabolism was greatly impacted by the presence of H₂O₂, this could also have an impact on

cloud chemistry as cloud microorganisms were shown to transform a large number of these saccharides highly present on aerosols (Matulova et al. 2014, Šantl-Temkiv et al 2012). In the same way the modulation of amino acid metabolism by H₂O₂ might have a great importance for cloud chemistry as Bianco et al. (2016) have recently shown that amino acids represent about 9% of the organic matter in clouds. We can suspect that cloud microorganisms could impact the source and fate of these compounds which were completely ignored up to now.

4.4. Conclusion

To the best of our knowledge, this work is the first reporting from a molecular point of view and in details the impact of oxidative stress, illustrated by hydrogen peroxide, on cloud bacteria metabolome. It is important to deepen our knowledge on the effect of hydrogen peroxide as it is a key component in the atmospheric chemistry present both in the gas and in the aqueous phase of clouds. A metabolomics approach combining LC-MS and NMR analyses allowed us to detect and identify key markers of hydrogen peroxide stress in *P. graminis* 13b-3, including dipeptides that had never been described before. This bacterium is able to adapt its metabolome facing this oxidative stress but presents also high resilience properties. This study shows that *Pseudomonas graminis* 13b-3 is very well adapted to survive in cloud water that is a oxidizing environment with a redox potential near to 200 mV (Deguillaume et al., 2014). To conclude this work highlights the reciprocal interaction between cloud microorganisms and hydrogen peroxide; and its potential consequence on atmospheric chemistry. On the one hand, microorganisms are able to degrade H₂O₂ and could thus impact directly the oxidant capacity of the clouds. On the other hand, H₂O₂ modulates the metabolism of the cloud microbiome and could thus impact the carbon budget of the clouds.

Acknowledgments

N.Wirgot is a recipient of a PhD fellowship of french government (MESR).

Financial support from the TGIR-RMN-THC Fr3050 CNRS for conducting the research is gratefully acknowledged. N. Wirgot thanks the French Ministry of Research for her PhD scholarship. Part of the work was funded in the frame of the ANR BIOCAP French program.

Acknowledgment to people developing the web-based platform Galaxy. We used this platform for LC-MS data treatment and also for the statistical analyses.

References

- Ahern H., Walsh K., Hill T., Moffett B. (2007). Fluorescent *Pseudomonads* isolated from hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation, *Biogeosciences*, 4, 115-124.
- Amato P., Menager M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. et Delort A. M. (2005). Microbial population in cloud water at the puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds, *Atmospheric Environment*, 39, 4143-4153.
- Amato P., Parazols M., Sancelme M., Mailhot G., Laj P. et Delort A. M. (2007b). An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the puy de Dôme (France), *Atmospheric Environment*, 41, 8253-8263.
- Amezaga M-R, Davidson I, McLaggan D, Verheul A, Abee T, Booth IR. (1995). The role of peptide metabolism in the growth of *Listeria monocytogenes* ATCC 23074 at high osmolarity. *Microbiology*, 141, 41-49.
- Argüelles, J.C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Archives of Microbiology*, 174, 217-224.
- Ariya P. A. & Amyot M. (2004). New directions: The role of bioaerosols in atmospheric chemistry and physics, *Atmospheric Environment*, 38, 1231-1232.

- Bauer H., Kasper-Giebl A., Löflund M., Giebl H., Hitzemberger R., Zibuschka F. et Puxbaum H. (2002). The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols, *Atmospheric Research*, 64, 109-119.
- Bianco, A., Vuyard, G., Deguillaume, L., Mailhot, G. 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, 37420.
- Blaise, B.J., Shintu, L., Elena, B., Emsley, L., Dumas, M-E., Toulhoat, P. (2009). Statistical Recoupling Prior to Significance Testing in Nuclear Magnetic Resonance Based Metabonomics. *Analytical Chemistry*, 81, 6242-6251.
- Cohen, D.M. (1997). Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades and the Signaling of Hyperosmotic Stress to immediate Early Genes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117, 291-299.
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57, 449-459.
- Danielsson, R., Bylund, D., Markides, K.E. (2002). Matched filtering with background suppression for improved quality of base peak chromatograms and mass spectra in liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 454, 167-184.
- Davies, K.J.A. (2000). Oxidative stress antioxidant defenses and damage removal repair and replacement systems. *IUBMB Life*, 50: 279-289.
- 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., 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.
- Delort A.-M., Vaïtilingom M., Amato P., Sancelme M., Parazols M., Mailhot G., Laj P. et Deguillaume L. (2010). A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes, *Atmospheric Research*, 98: 249-260.
- Demple, B. (1991). Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annual Reviews of Genetics*, 25, 315-337.

- Fan W-M. (1996). Metabolite profiling by one-and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 28,161-219.
- Farr, S.B., Touati, D., Kogoma, T. (1988). Effects of oxygen stress on membrane functions in *Escherichia coli*: role of HPI catalase. *Journal of Bacteriology*, 170, 1837-1842.
- Ha, H.C., Sirisoma, N.S., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., Woster, P.M., Casero, R.A. (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 11140-11145.
- Herrmann, H., Schaefer, T., Tilgner, A., Styler, S. A., Weller, C., Teich, M., 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., Stirm B. H. (2007). Processing of atmospheric nitrogen by clouds above a forest environment, *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 112. 10.1029/2006JD008002.
- Hyslop, P.A., Hinshawz, D.B., Halsey, W.A, Schraufstatter, I.U., Sauerhebery, R.D., Spraggj, R.G., Jackson, J.H., Cochrane, C.G. (1988). Mechanisms of Oxidant-mediated Cell Injury the glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 1665-1675.
- 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. *Atmospheric Environment*, 117, 92-98.
- Josephson, R.A., Silverman, H.S., Lakatta, E.G., Stern, M.D., Zweier, J.L. (1991). Study of the Mechanisms of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Free Radical-induced Cellular Injury and Calcium Overload in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 2354-2361.
- Jousse, C., Dalle, C., Canet, I., Lagrée, M., Traïkia, M., Lyan, B., Sancelme, M., Amato, P., Delort, A-M. (2017). Metabolomic study of the response to cold shock in a strain of *Pseudomonas syringae* isolated from cloud water. *Submitted*.

- Jozefczuk, S., Klie, S., Catchpole, G., Szymanski, J., Cuadros-Inostroza, A., Steinhäuser, D., Selbig, J., Willmitzer, L. (2010). Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. *Molecular System Biology*, 6. doi 10.1038/msb.2010.18.
- Kol, S., Merlo, M.E., Scheltema, R.A., de Vries, M., Vonk, R.J., Kikkert, N.A., Dijkhuizen, L., Breitling, R., Takano, E. (2010). Metabolomic Characterization of the Salt Stress Response in *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2574-2581.
- Koutny, M., Sancelme, M., Dabin, C., Pichon, N., Delort, A-M., Lemaire, J. (2006). Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability*, 91, 1495-1503.
- Kuhl, C Tautenhahn, R., Böttchert, C., Larson, T.R., Neumann, S. (2012). CAMERA: An Integrated Strategy for Compound Spectra Extraction and Annotation of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Data Sets. *Analytical Chemistry*, 84, 283-289.
- Lazrus, A. L., Kok, G. L., Gitlin, S. N., Lind, J. A., McLaren, S. E. (1985). Automated fluorimetric method for hydrogen peroxide in atmospheric precipitation. *Analytical Chemistry*, 57, 917-922.
- Le Marrec C, Bon E, Lonvaud-Funel A. (2007). Tolerance to high osmolality of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* and identification of potential osmoprotectants. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 335-42.
- Lin, C. Y., Wu, H., Tjeerdema, R. S., Viant, M. R. (2007). Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics*, 3, 55-67.
- 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. *Environmental Science and Technology*, 48, 14238-14247.
- Nicholson J.K., Foxall P.J., Spraul M., Farrant R.D., Lindon J.C. (1995). 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Analytical Chemistry*, 67, 793-811.
- Noctor, G., Lelarge-Trouverie, C., Mhamdi, A. (2015). The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry*, 112, 33-53.
- Oka, S.I., Hsu, C.P., Sadoshima, J. (2012). Regulation of Cell Survival and Death by Pyridine Nucleotides. *Circulation Research*, 111, 611-627.

- Perricone, C.D., Park, S., Imlay, J.A., Weiser, J.N. (2003). Factors Contributing to Hydrogen Peroxide Resistance in *Streptococcus pneumoniae* Include Pyruvate Oxidase (SpxB) and Avoidance of the Toxic Effects of the Fenton Reaction. *Journal of Bacteriology*, 185, 23, 6815-6825.
- Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM. (2003). Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 372-9.
- Rabinowitz, J. D., & Kimball, E. (2007). Acidic acetonitrile for cellular metabolome extraction from *Escherichia coli*. *Analytical Chemistry*, 79, 6167-6173.
- Reasoner, D., & Geldreich, E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1-7.
- Šantl-Temkiv T., Finster K., Hansen B. M., Nielsen N. W., Karlson U. G. (2012). The microbial diversity of a storm cloud as assessed by hailstones, *FEMS Microbiology Ecology*, 81, 684-695.
- Sattler B., Puxbaum H. et Psenner R. (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets, *Geophysical Research Letters*, 28, 239-242.
- Sies, H. (1985). Oxidative Stress: Introductory Remarks. *Academic Press Inc*.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91, S31-S38.
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry*, 78, 779-787.
- Sporn, P.H.S. & Peters-Golden, M. (1988). Hydrogen peroxide inhibits alveolar macrophages 5-lipoxygenase metabolism in association with depletion of ATP. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 14776-14783.
- Spragg, R.G., Hinshaw, D.B., Hyslop, P.A., Schraufstatter, I.U., Cochrane, C.G. (1985). Alterations in Adenosine Triphosphate and Energy Charge in Cultured Endothelial and P388D1 Cells after Oxidant Injury. *Journal of Clinical Investigation*, 76, 1471-1476.
- Tamarit, J., Cabisco, E., Ros, J. (1988). Identification of the Major Oxidatively Damaged Proteins in *Escherichia coli* Cells Exposed to Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 3027-3032.

- Tiwari, B.S., Belenghi, B., Levine, A. (2002). Oxidative Stress Increased Respiration and Generation of Reactive Oxygen Species, Resulting in ATP Depletion, Opening of Mitochondrial Permeability Transition, and Programmed Cell Death. *Plant Physiology*, 128, 1271-1281. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.010999>.
- Vaïtilingom M., Attard E., Gaiani N., Sancelme M., Deguillaume L., Flossmann A. I., Amato P., Delort A.-M. (2012). Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France), *Atmospheric Environment*, 56, 88-100.
- 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, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 559-564.
- Van der Kloet, F.M., Bobeldijk, I., Verheij, E.R., Jellema, R.H. (2009). Analytical Error Reduction Using Single Point Calibration for Accurate and Precise Metabolomic Phenotyping. *Journal of Proteome Research*, 8, 5132-5141.
- Vione, D., Maurino, V., Minero, C., Pelizzetti, E. (2003). The atmospheric chemistry of hydrogen peroxide: a review. *Annali Di Chimica*, 93, 477-488.
- Watanabe, K.; Ishizaka, Y.; Minami, Y.; Yoshida, K. (2001). Peroxide concentrations in fog water at mountainous sites in Japan. *Water, Air and Soil Pollution*, 130, 1559-1564.
- Willker, W., Engelmann, J., Brand, A., Leibfritz, D. (1996). Metabolite identification in cell extracts and culture media by proton detected 2D-H-C-NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Analytical*, 2, 21-32.
- Wirgot, N., Vinatier, V., Sancelme, M., Delort, A.-M. (2017). H₂O₂ modulates the energetic metabolism of the cloud microbiome. *In prep.*
- Zaprasis A, Brill J, Thüring M, Wünsche G, Heun M, Barzantny H, Hoffmann T, Bremer E. (2013). Osmoprotection of *Bacillus subtilis* through import and proteolysis of pro-line-containing peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 576-587.
- Zhang, J., Li, Y., Chen, W., Du, G.C., Chen, J. (2012). Glutathione improves the cold resistance of *Lactococcus sanfranciscensis* by physiological regulation. *Food microbiology*, 31, 285-292.

Zheng L, Dong H, Su G, Zhao Q, Zhao M. (2016). Radical scavenging activities of Tyr-Trp-Cys- and Met-Gly and their protective effects against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes. *Food Chemistry*, 197, 807-813.

Table 1: Identified metabolites according to LC-MS and NMR analyses. VIP score gives the influence of metabolites in the discrimination between groups for both analytical techniques. Ratios S (Stressed)/R (reference) were determined from relative intensities into profiles at 50 min. ND: not determined.

Identified VIP metabolite	NMR		LC/MS		
	VIP Score	Ratio S/R (50 min)	Ionization mode	VIP Score	Ratio S/R (50 min)
Amino-acids					
Isoleucine	1.82-1.89-1.12	1.61-1.67-1.16			
Leucine	1.11-1.43-1.17	1.23-1.32-1.18	Pos-Pos-Neg	2.40-2.25-1.91	2.44-14.29-4.55
Valine	2.15-1.93-2.10	2.44-4.35-4.55	Pos-Pos-Neg	2.70-2.67-2.18	5.26-5.00-11.11
Lysine	1.12-1.03-1.49	1.12-1.13-1.33			
Arginine	1.16-1.49	1.16-1.47			
Proline	1.23-1.49	0.75-0.63			
Glutamate	1.43-1.39-2.05	0.68-0.71-0.80	Pos-Pos-Neg	1.27-1.12-1.48	0.74-0.72-0.70
Methionine	1.33	1.22	Pos-Pos-Neg	1.70-1.83-1.60	1.33-1.41-1.52
Alanine	1.81	0.88	Pos	1.33	0.72
Beta-Alanine	1.10	1.41			
Aspartate	1.03-1.13-2.13	1.11-1.16-4.46			
Asparagine	1.21	0.82			
Phenylalanine	1.49-1.43	1.47-1.50	Pos-Neg	2.57-2.13	2.27-2.08
Tyrosine	1.40-1.53-1.19	1.44-1.52-1.26	Neg	1.58	2.08
Glycine	Detected but not VIP		Pos	1.73	1.39
Citrulline	1.01-2.00	0.84-0.81	Pos	2.15	ND
Tryptophan	2.17	6.98			
Saccharides					
Trehalose	1.74-1.69-1.50	0.85-0.85-0.88	Pos	1.96	0.74
Trehalose 6-P			Pos-Neg-Neg	2.27-2.04-1.99	0.54-0.52-0.51
Cellobiose	1.82-1.01-1.69	1.71-1.21-2.19			
Glycogen	1.80-1.76	0.84-0.65			
Alpha-glucose	1.71-1.69	1.52-2.19			
Fructose	1.15-1.22	1.59-1.79			
Maltose	1.40	1.65			
Xylose			Neg	1.54	0.45
Amines					
Putrescine	1.16-1.23	1.16-1.32			
Carnitine	1.16	0.86	Pos	1.48	1.75
Spermidine			Pos	1.04	1.47

Identified VIP metabolite	NMR		LC/MS		
	VIP Score	Ratio S/R (50 min)	Ionization mode	VIP Score	Ratio S/R (50 min)
Amines					
Thiamine	1.29-1.05	1.99-1.23			
N-Alpha-Acetyl-Glutamine				1.77-1.13	0.55-0.74
Lipids					
Palmitoleic acid			Pos-Pos-Neg	1.77-1.69-1.52	0.36-0.61-0.41
Lyso PE (0:0/16:1(9Z))			Pos-Neg	2.07-1.71	0.44-0.50
Lyso PC (16:1)			Pos-Pos	1.59-1.87	0.65-0.61
Lyso PE (16:0)			Pos-Pos-Neg	1.97-2.03-1.72	0.41-0.43-0.36
Lyso PE (18:1)			Pos-Pos-Neg	2.07-1.98-1.55	0.40-0.44-0.39
Miscellaneous					
Acetate	1.01	0.84			
Lactate	1.09	1.41			
Succinate	1.05	1.40			
Citrate	1.33-1.28	1.22-1.15			
Beta-hydroxybutyrate	1.59-1.44	1.25-1.26			
Pipecolic acid	1.96-1.59	1.46-1.25			
Pantothenic acid	1.05-1.02	1.40-1.21	Pos-Neg	2.31-1.76	1.89-1.92
Inosinic acid	1.73-1.41	0.72-0.71			
Phosphoric acid			Pos	2.47	0.48
Glutathione (GSH)	1.10-1.08	1.41-1.28	Detected but not VIP		
Nicotinamide ribotide	1.19-1.03	1.33-0.86			
AMP	1.73-1.38-2.09	0.72-0.76-0.43			
ATP	1.53-2.09-2.17	0.73-0.43-0.40			
NADH	1.43-1.37-1.38	0.72-0.75-0.76			
Uridine 5' monophosphate	1.37-2.04-1.92	0.58-0.43-0.45			
Glycerol	1.03	0.90			
Glycerol 3-P			Neg	1.65	0.49
Betaine	2.15-2.17-2.13	10.85-6.98-4.46			
Peptides					
Alanyl-alanine			Pos	2.01	0.65
Isoleucyl-histidine			Pos	1.99	2.33
Isoleucyl-aspartic acid			Pos	2.58	6.25
Valyl-isoleucine			Pos	1.74	5.00
Threoninyl-glycine			Pos	1.73	0.63
Valyl-serine			Pos	1.17	0.70

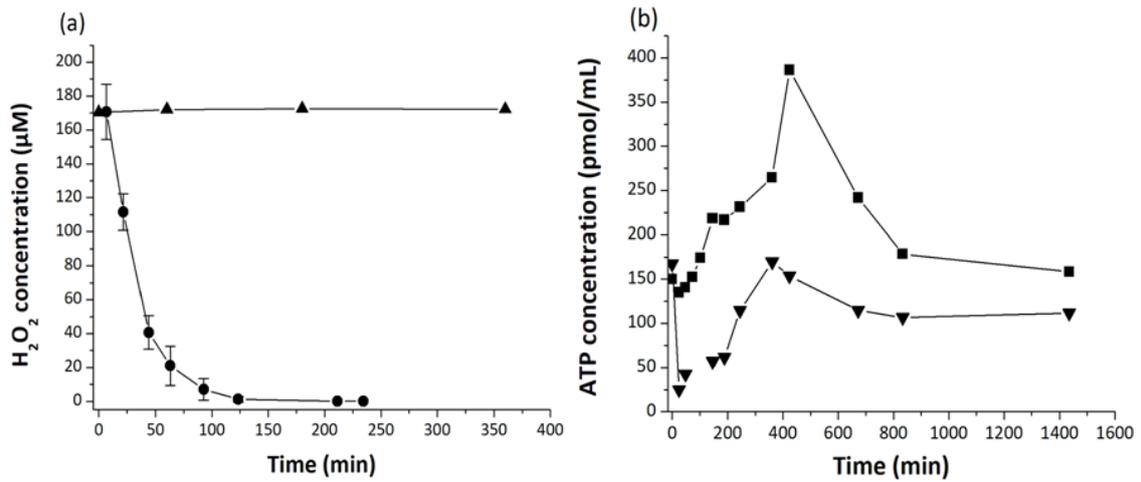


Figure 1: a) Time evolution of H₂O₂ concentration in the incubation with *P. graminis* 13b-3 (circles) or without *P. graminis* 13b-3 (triangles). b) Evolution of ATP concentration in *P. graminis* 13b-3 incubated with H₂O₂ (triangles) or without H₂O₂ (squares). Standard errors were obtained by averaging three replicates (independent experiments). Where error bars are not visible, they are smaller than the symbol because of the scale of time.

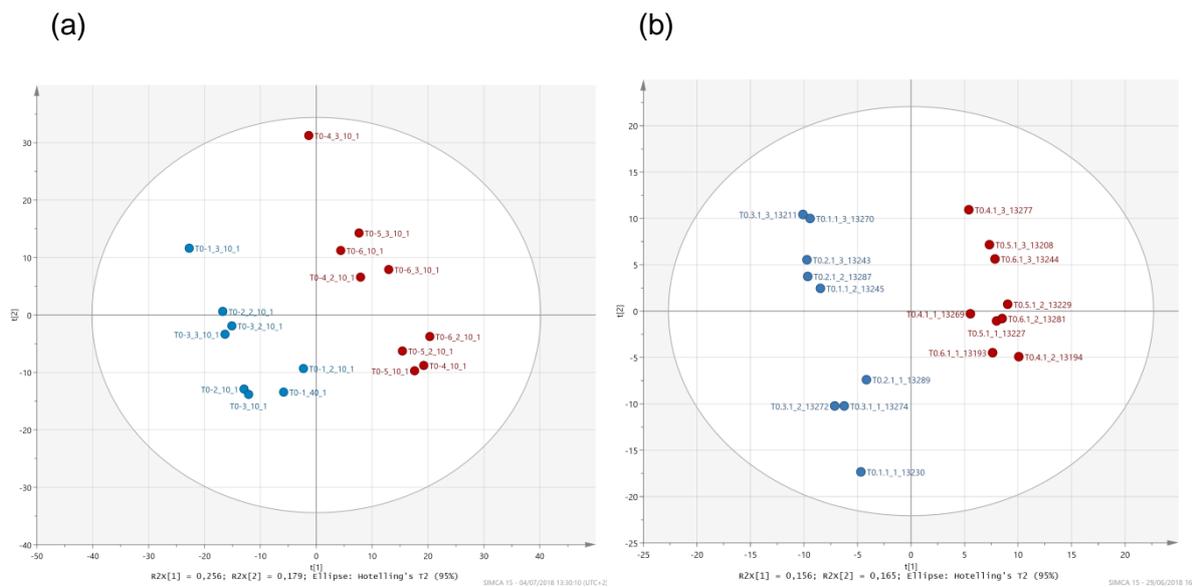


Figure 2: PLS-DA analyses. Score plots (UV scaling) obtained for bacteria metabolomes extracted at 50 min of incubation in the presence (blue circles) or in the absence (red circles) of H₂O₂: (a) NMR and (b) LC-MS (example of the positive ionization mode).

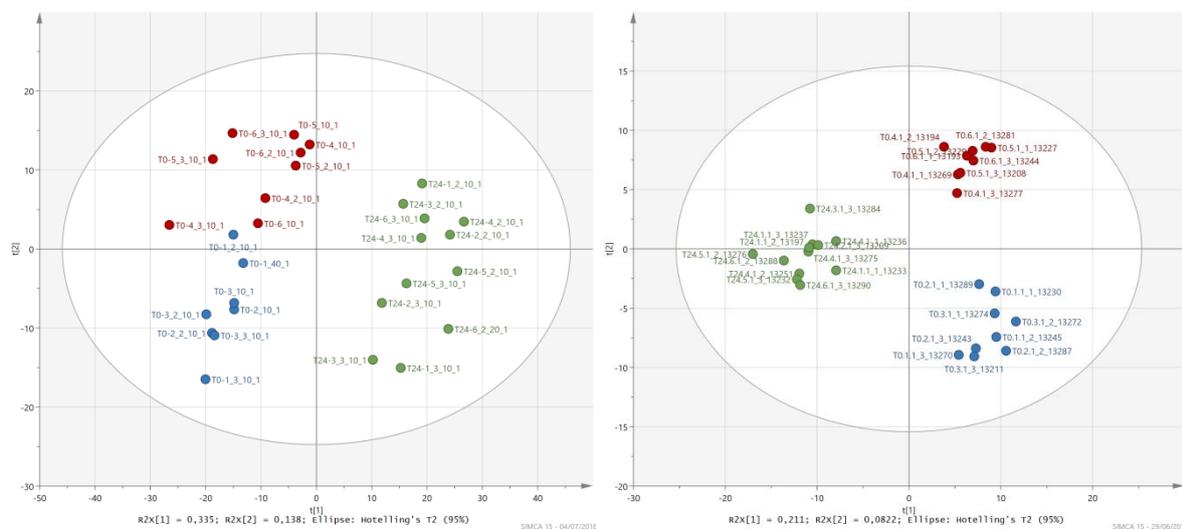


Figure 3: PLS-DA analyses (UV scaling). Score plots obtained: (a) NMR and (b) LC-MS (example of the positive ionization mode). Blue circles correspond to the samples incubated in the presence of H_2O_2 and extracted at 50 min; red circles correspond to the samples incubated in the absence of H_2O_2 and extracted at 50 min; green circles correspond to the samples extracted at 24 hours with and without H_2O_2 .

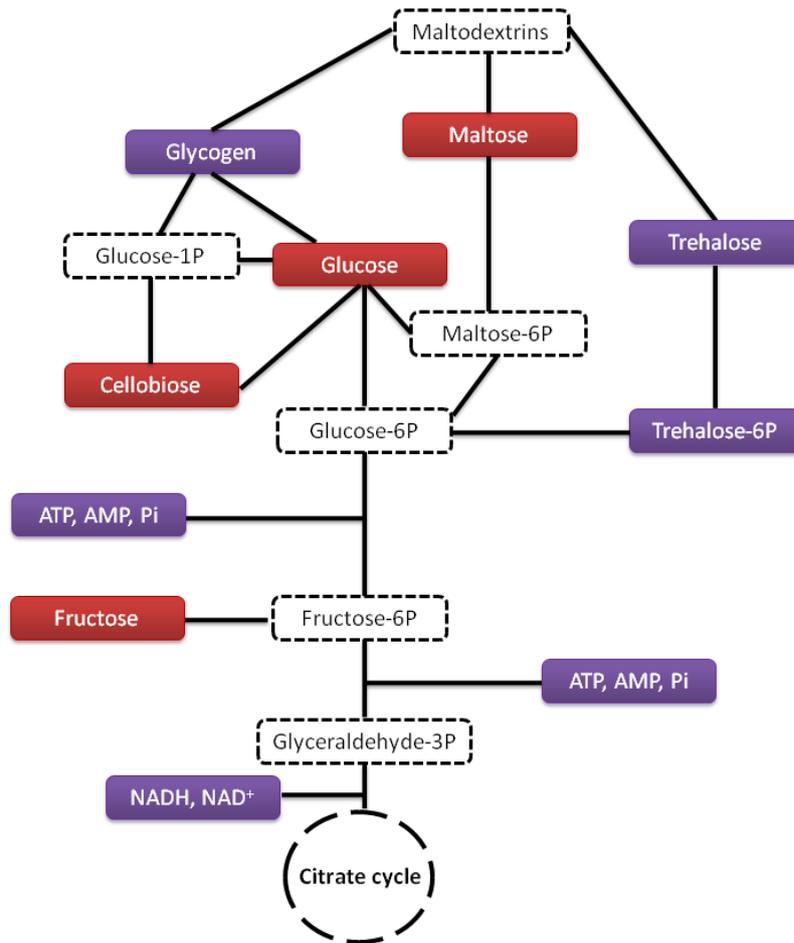
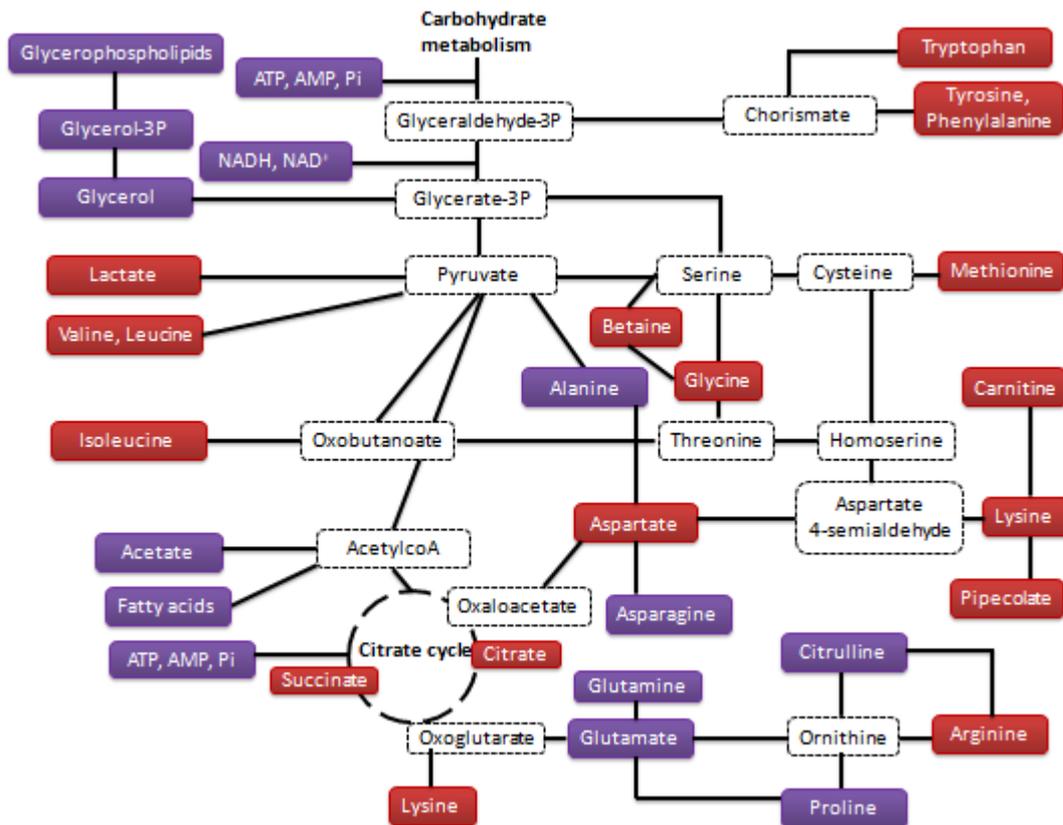


Figure 4: Carbohydrate metabolism showing metabolites overrepresented in the presence of hydrogen peroxide (red boxes) and those underrepresented (purple boxes). Likely metabolic intermediates are indicated in white boxes with dotted line.



Ile/Leu-His; Ile/Leu-Asp; Val-Ile/Leu; Val-Asp; [Gln-Asp-Thr-Pro]
 Ala-Ala; Val-Ser; [Arg-Cys-Ser-Trp];

Figure 5: Central metabolism: Citrate cycle, lipids, amino acids and peptides. The metabolites which are overproduced in the presence of hydrogen peroxide are indicated in red boxes, while those which are underproduced are indicated in purple boxes. Putative metabolic intermediates are indicated in white boxes with dotted line.

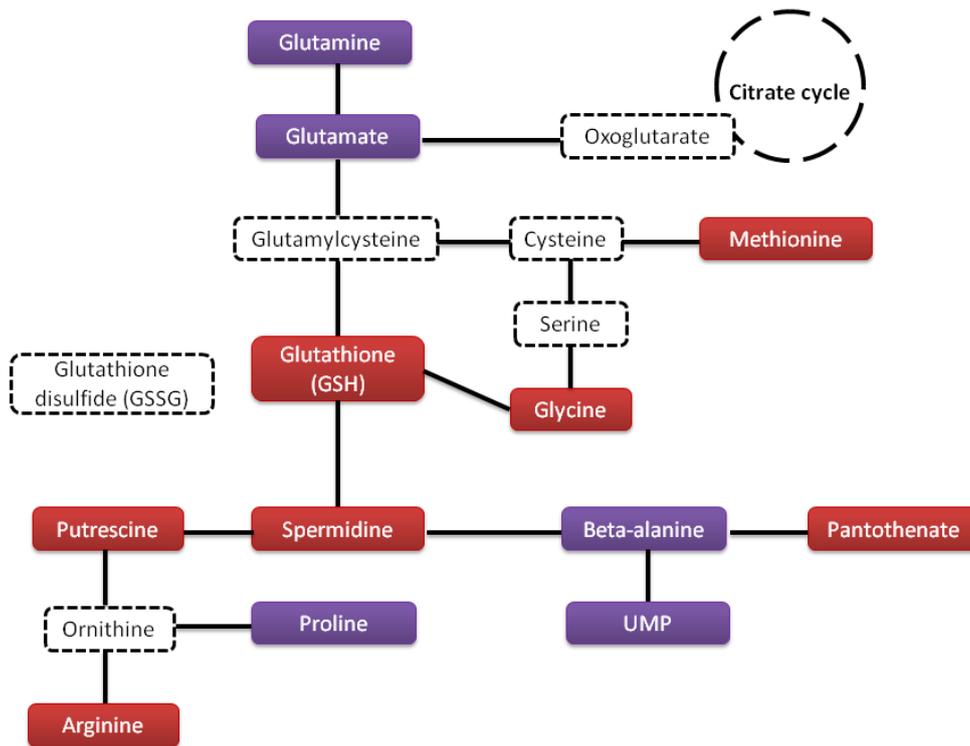


Figure 6: Glutathione metabolism. The metabolites which are overproduced in the presence of hydrogen peroxide are indicated in red boxes, while those which are underproduced are indicated in purple boxes. Putative metabolic intermediates are indicated in white boxes with dotted line.

Table SM1: Summary of chemical species and their concentrations, constituting the marine artificial cloud solution used for the experiments.

Chemicals	Concentration (μM)
Acetate	20.0
Formate	14.5
Oxalate	3.0
Succinate	1.5
$\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3$	80.0
$\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	10.0
K_2SO_4	5.0
$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	40.0
NaCl	200.0
NaOH	110.0
H_2SO_4	31.5
pH	6.0

Table SM2: Identification criteria for metabolites considering MS and NMR experiments, and according to relevant databases (or standard when mentioned). MS experiments: TOF, accurate mass measurement on LC-ToF (Time of Flight); STD, comparison using pure chemical standard (at least parent ion mass and retention time). NMR experiments (validation mark for at least one result in the following experiment): ¹H: chemical shift on proton NMR experiment; Jres, chemical shift and coupling constant on J-resolved experiment; COSY, chemical shift and correlation on Correlation Spectroscopy experiment; TOCSY, chemical shift and correlation on TOtal Correlation Spectroscopy experiment; ¹³C: HSQC, chemical shift and correlation on Heteronuclear Single Quantum Correlation experiment.

Identified VIP Metabolite	MS		NMR				
	TOF	STD	¹ H	Jres	COSY	TOCSY	HSQC
Isoleucine			X	X	X		X
Leucine	X	X	X	X	X	X	X
Valine	X	X	X	X	X	X	X
Lysine			X	X	X	X	X
Arginine				X		X	
Proline				X	X	X	
Glutamate	X	X	X	X	X		X
Methionine	X	X	X	X	X	X	X
Alanine	X	X	X	X	X	X	X
Beta-Alanine			X	X	X	X	
Aspartate			X	X	X	X	X
Asparagine			X	X	X	X	X
Phenylalanine	X	X	X	X	X	X	X
Tyrosine	X	X		X	X	X	X
Glycine	X	X	X	X	X	X	X
Citrulline	X	X		X	X	X	X
Tryptophan				X	X	X	

Identified VIP Metabolite	MS		NMR				
	TOF	STD	¹ H	Jres	COSY	TOCSY	HSQC
Trehalose	X	X	X	X	X	X	X
Trehalose 6-P	X	X					
Cellobiose				X	X	X	X
Glycogen			X	X	X	X	X
Alpha-glucose			X	X	X	X	X
Fructose						X	X
Maltose					X	X	X
Xylose	X	X					
Putrescine					X	X	X
Carnitine	X	X			X		
Spermidine	X	X					
Thiamine				X		X	X
N-Alpha-Acetyl-Glutamine	X						
Palmitoleic acid	X	X					
Lyso PE (0:0/16:1(9Z))	X	X					
Lyso PC (16:1)	X						
Lyso PE (16:0)	X	X					
Lyso PE (18:1)	X						

Identified VIP Metabolite	MS		NMR				
	TOF	STD	¹ H	Jres	COSY	TOCSY	HSQC
Acetate			X	X			X
Lactate			X	X	X		X
Succinate			X	X			X
Citrate				X	X	X	
Beta-hydroxybutyrate				X		X	
Pipecolic acid				X		X	X
Pantothenic acid	X	X		X	X	X	X
Inosinic acid				X	X	X	X
Phosphoric acid	X						
Glutathione (GSH)	X	X	X	X	X	X	X
Nicotinamide ribotide				X		X	
AMP					X	X	X
ATP					X	X	X
NADH					X	X	X
Uridine 5'monophosphate					X	X	X
Glycerol			X	X	X	X	X
Glycerol 3-P	X	X					
Betaine			X	X			X
Alanyl-alanine	X	X					
Isoleucyl-histidine	X	X					
Isoleucyl-aspartic	X						

acid							
Valyl-isoleucine	X	X					
Threoninyl-glycine	X						
Valyl-serine	X	X					

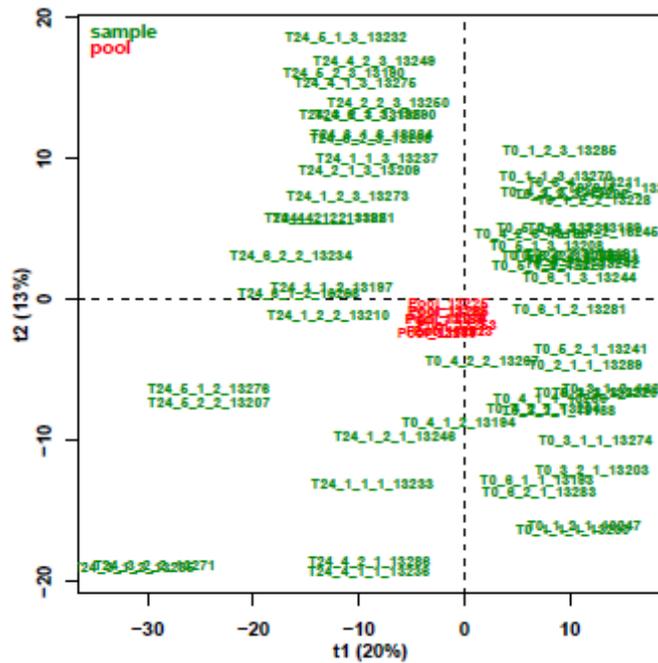


Figure SM1: Visualization of data quality (Quality metrics tool). Distribution of all variables after batch correction. Samples are represented in green and pools in red. The coefficient of variation determined for the pools is inferior to 30%.

5. Conclusion

L'objectif principal de ces deux études était d'étudier plus en détail les interactions entre les microorganismes et le peroxyde d'hydrogène.

Il a été question dans la première partie de ces travaux, d'une part, d'étudier plus finement les mécanismes impliqués dans la transformation de H_2O_2 dans différentes conditions de laboratoire (lumière artificielle, Fe[EDDS], bactéries) en isolant chacun de ces paramètres afin de déterminer leur impact sur H_2O_2 . Pour cela, des vitesses de dégradation ont été déterminées pour différentes souches microbiennes représentatives des bactéries retrouvées dans les prélèvements de nuage collectés au sommet du puy de Dôme. Les résultats ont montré que toutes les souches bactériennes sélectionnées pour cette étude ont dégradé le peroxyde d'hydrogène avec le même ordre de grandeur que les conditions abiotiques. Ceci a montré que les vitesses de dégradation de H_2O_2 par les bactéries ne sont pas impactées par la présence de lumière et du complexe de Fe[EDDS], et par conséquent par la production des radicaux hydroxyles.

Nous avons également montré que dans nos conditions expérimentales, mimant les conditions réelles de nuage, le peroxyde d'hydrogène a un fort impact sur l'état énergétique des cellules. Il a été vérifié que cet impact sur la quantité d'ATP n'était pas lié à une mortalité des cellules. Ce résultat a révélé que les microorganismes sont capables de gérer une condition de stress oxydant généré par H_2O_2 mais qu'en même temps, ce stress induit une réorganisation de leur métabolisme comme le suggère la modification de leur statut énergétique.

De plus, à travers des analyses statistiques effectuées à partir des données de 37 prélèvements nuageux, une très forte corrélation a été observée entre le peroxyde d'hydrogène et la quantité d'ATP dans les nuages. Cette observation tend à prouver que la corrélation entre H_2O_2 et ATP observée à un niveau cellulaire chez quelques souches bactériennes en laboratoire serait un phénomène général à l'échelle du nuage. Ainsi, nous avons suggéré que le peroxyde d'hydrogène module le métabolisme énergétique global des microorganismes des nuages.

Afin de mieux comprendre comment H_2O_2 impactait le métabolisme des microorganismes des nuages, une étude métabolomique a été effectuée dans des conditions modèles. Nous avons étudié en détail la réponse d'une souche de *Pseudomonas graminis* face au stress oxydant, illustré par le peroxyde d'hydrogène. Ainsi, différentes voies métaboliques impactées par ce stress oxydant ont pu être mises en évidence telles que le métabolisme des sucres, acides carboxyliques, lipides, acides aminés, peptides et glutathion. Un fait

original a été d'identifier des dipeptides comme marqueurs du stress engendré par H_2O_2 , ce qui à notre connaissance n'avait jamais été décrit. Il a été montré également que le métabolisme énergétique est fortement impacté par la présence de H_2O_2 , ce qui vient confirmer les résultats obtenus dans l'étude précédente.

La métabolomique nous a également permis de mettre en évidence un phénomène de résilience de la souche après exposition au peroxyde d'hydrogène. En effet, il a été observé que durant les premières minutes d'exposition au peroxyde d'hydrogène, le métabolisme énergétique des cellules est largement freiné comme le montre la diminution brutale de la concentration d'ATP reflétant un changement du métabolisme global. Le résultat le plus frappant a été que lorsque les bactéries ont dégradé la totalité du peroxyde d'hydrogène présent, elles sont capables de synthétiser à nouveau une importante quantité d'ATP allant quasiment jusqu'à la concentration en ATP initiale. De plus, nous avons montré lors des analyses statistiques qu'il n'y avait plus de discrimination entre les échantillons incubés en présence et en absence de peroxyde d'hydrogène après 24 h d'exposition. Ce résultat montre que les bactéries exposés à H_2O_2 retrouvent le même métabolisme que celles incubées en absence de H_2O_2 . Ce phénomène de résilience mis en évidence est cohérent avec des études antérieures qui ont montré que ces bactéries ainsi que d'autres isolées de prélèvement nuageux peuvent survivre à de hautes concentrations en peroxyde d'hydrogène (Joly et al., 2015) et ont une croissance normale après l'exposition à cette molécule.

En conclusion, l'ensemble de nos travaux a apporté de nouveaux éléments précis sur les interactions entre le peroxyde d'hydrogène et les microorganismes des nuages et leurs conséquences potentielles sur la chimie atmosphérique.

Tout d'abord il a été confirmé que les microorganismes des nuages ont la capacité de dégrader efficacement le peroxyde d'hydrogène et peuvent potentiellement impacter le bilan du carbone et la capacité oxydante des nuages comme il l'a été montré dans [Vaïtilingom et al. \(2013\)](#). En faisant diminuer la concentration en H_2O_2 , les microorganismes contribuent à rendre la chimie radicalaire moins efficace dans la dégradation de la matière organique.

Par ailleurs, il a été montré pour la première fois que le peroxyde d'hydrogène impacte le métabolisme énergétique du microbiome nuageux et peut potentiellement moduler le métabolisme carboné. Comme le métabolisme microbien peut représenter une alternative aux voies photochimiques dans la transformation de composés carbonés dans les nuages ([Delort et al., 2010](#), [Husarova et al 2011](#), [Vaïtilingom et al., 2011, 2013](#), [Matulova et al., 2014](#)), la modulation des voies métaboliques causée par la présence de peroxyde d'hydrogène peut avoir un effet direct sur la chimie atmosphérique. Les composés d'intérêt pour la chimie atmosphérique qui sont aussi des substrats pour les microorganismes,

seraient les acides carboxyliques (acétate, lactate, succinate ou citrate, composés majeurs de l'eau atmosphérique (Deguillaume et al., 2014), les acides aminés (récemment mis en évidence par Bianco et al., 2016) et les sucres (composés abondants sur les aérosols). Nous avons en effet montré que les voies métaboliques de ces composés étaient modulées en présence de H₂O₂.

Or, il est connu que la concentration du peroxyde d'hydrogène dans l'atmosphère subit de fortes fluctuations en raison de variabilités journalières et saisonnières. De plus, il est estimé que la concentration en H₂O₂ devrait globalement augmenter dans l'atmosphère principalement en raison de l'augmentation de la concentration en oxydants atmosphériques comme conséquence des activités anthropiques (Vione et al., 2003). L'activité microbienne dans les nuages serait donc modulée en fonction de différents scénarios atmosphériques.

Une des perspectives les plus importantes à envisager est d'intégrer ces données biologiques dans des modèles de chimie atmosphérique pour améliorer la quantification de cette modulation sur la chimie atmosphérique.

Chapitre IV :

Vers l'intégration de données biologiques dans un modèle de chimie atmosphérique :

Détermination de constantes cinétiques de
biodégradation du formiate, formaldéhyde, acétate
et peroxyde d'hydrogène

1. Introduction

Une grande variété de composés organiques provenant de différentes sources, allant de l'activité naturelle à l'activité humaine, est retrouvée dans l'atmosphère. Dans le nuage, ces composés sont présents dans les trois phases et peuvent subir de nombreuses transformations chimiques. Il a été longtemps considéré, et encore aujourd'hui, que ces transformations sont régies essentiellement par l'action de la chimie radicalaire. Or, la découverte, il y a quelques décennies, de microorganismes métaboliquement actifs dans l'eau de nuage soulève la question de leur rôle en tant que potentiels biocatalyseurs dans la transformation de composés organiques comme alternative aux voies radicalaires. Il a été mis en évidence que dans l'eau de nuage réelle, la microflore endogène pouvait dégrader ces composés de façon aussi efficace voire plus que les voies d'oxydation de la photochimie (Vaïtilingom et al., 2013).

Cependant, les expériences réalisées en laboratoire atteignent des limitations car une vraie condition nuageuse ne peut pas être atteinte. La principale différence repose sur les volumes étudiés. En effet, les nuages sont des milieux multiphasiques polydispersés et les microorganismes sont retrouvés au sein de microgouttelettes dont le volume est proche de 10^{-9} mL alors que les volumes liquides nécessaires en laboratoire pour observer une biodégradation sont de l'ordre de quelques dizaines de millilitres. En conditions réelles, la réactivité des composés chimiques est modifiée par les transferts dynamiques de composés chimiques ayant lieu entre la phase gazeuse et la phase liquide et également par le fait que le nuage est un milieu évoluant par les processus microphysiques. D'autre part, en raison de la complexité des manipulations à mettre en œuvre et du temps que cela requiert, seul un faible nombre de conditions peut être étudiées en parallèle (une à deux températures au maximum par exemple).

De ce fait, seule la modélisation apparaît comme une solution pour franchir ces limitations et simuler des nuages plus réalistes en introduisant la réactivité biologique en complément de la réactivité radicalaire déjà prise en compte. Pour cela nous avons collaboré avec Laurent Deguillaume du laboratoire de Météorologie Physique (LaMP) de Clermont-Ferrand, qui a développé un modèle numérique qui permet la simulation de la complexité de la réactivité chimique ayant lieu dans les phases aqueuse et gazeuse des nuages, ainsi que du transfert de masse. De plus, des paramètres tels que le flux actinique, le degré de pollution de la masse d'air constituant le nuage, le rayon des gouttelettes, le contenu en eau ou la pression peuvent être considérés et faire l'objet de variations.

1.1. Présentation du modèle de chimie du nuage du LaMP

Le modèle M2C2 (Model of Multiphase Cloud Chemistry) développé au LaMP simule la réactivité chimique multiphasique au sein du nuage. Un nuage étant composé de deux phases en équilibre (gaz/eau), il simule la réactivité chimique dans chacune des phases ainsi que le transfert de masse des espèces chimiques entre ces mêmes phases.

L'objectif à plus long terme est de coupler ce modèle de processus de chimie des nuages avec un modèle 3D méso-échelle. Des améliorations techniques ont donc été apportées récemment au modèle de chimie du nuage en utilisant le préprocesseur KPP (Kinetic PreProcessor), plus souple à interfacer avec un modèle Eulérien. Cela permet notamment de considérer la dernière version du mécanisme chimique en phase gazeuse MCM 3.3.1 et d'y intégrer le mécanisme en phase aqueuse CLEPS (Cloud Explicit Physico-chemical Scheme) développé récemment par le LaMP (Mouchel-Vallon et al., 2017) (voir **Figure 36**).

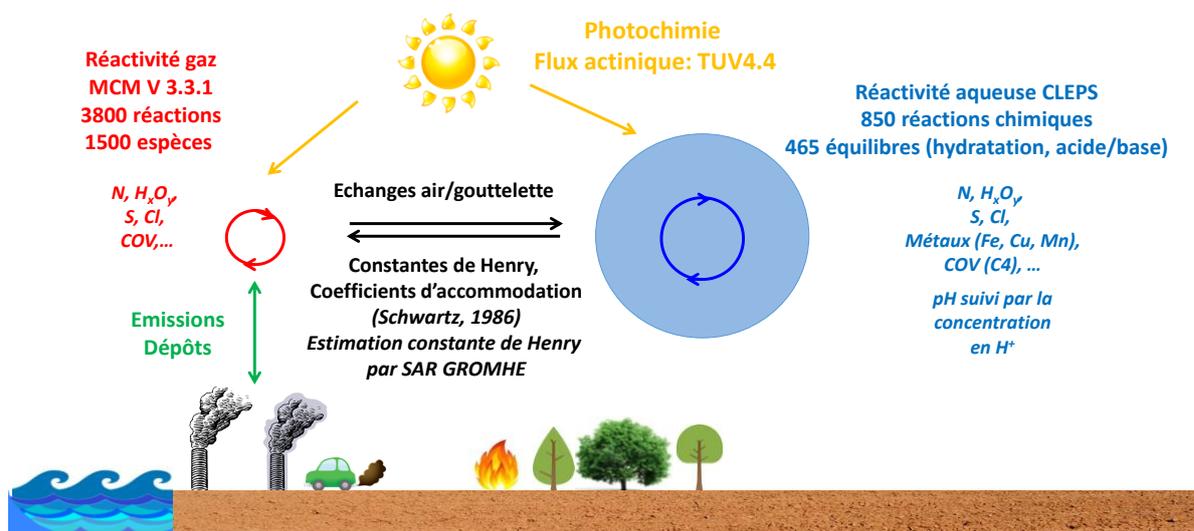


Figure 36: Représentation des processus physico-chimiques du module de chimie.

Le modèle a également été couplé à un module de microphysique chaude pour simuler des nuages réels. Ce module décrit l'activation d'un spectre de particules en gouttelettes de nuage ainsi que les transformations qui affectent ces gouttelettes, conduisant notamment à la formation de gouttes de pluie. La fraction soluble de la masse des particules qui s'activent, permet d'initialiser en phase aqueuse la concentration de certains composés chimiques qui ne proviennent que de la phase particulaire (ex : métaux, acides di-carboxyliques). Ce couplage fournit un outil de simulation unique validé sur un cas d'étude simple représentatif d'un nuage orographique non précipitant au puy de Dôme. Dans le cadre de ma thèse, le module de chimie multiphase du nuage a été utilisé seul, sans la microphysique, afin d'évaluer l'effet des microorganismes du nuage dans un contexte simplifié avec une

microphysique nuageuse ne variant pas temporellement (taille des gouttes et contenu en eau constants).

Les principaux éléments pris en compte dans le modèle de chimie multiphase du nuage utilisé sont les suivants :

Réactivité en phase gaz : Le modèle considère la réactivité en phase gazeuse qui décrit les transformations chimiques se déroulant dans la troposphère, notamment les phénomènes d'oxydation de la matière organique et le cycle de l'ozone. Le mécanisme chimique en phase gaz est le mécanisme MCM (Master Chemical Mechanism). Il comporte un schéma chimique explicite qui permet la dégradation de 142 hydrocarbures en CO₂ et H₂O (v3.3.1 [Jenkin et al., 2015](#)). Il comprend environ 6 700 espèces et 17 000 réactions.

Réactivité en phase aqueuse : Le modèle décrit 850 réactions chimiques en phase aqueuse et 465 équilibres. La réactivité des composés inorganiques est décrite pour 67 espèces chimiques. Pour les composés organiques, 87 espèces chimiques sont considérées dans le mécanisme correspondant à 657 formes chimiques différentes suivies individuellement (formes hydratées, formes anioniques) ([Mouchel-Vallon et al., 2017](#)).

Transfert des composés chimiques entre les phases du nuage : L'échange entre les deux phases du nuage est un transfert de masse qui se fait rarement selon l'équilibre de Henry (basé sur la solubilité des composés chimiques). Le modèle prend en compte la cinétique du transfert de masse qui régit les échanges entre la phase gazeuse et les gouttes de nuage et qui a été étudiée par [Schwartz \(1986\)](#).

Au final, le modèle de chimie du nuage du LaMP permet de simuler les profils temporels de concentrations (calculs effectués à chaque pas de temps) de toutes les molécules chimiques qui évoluent en fonction de la réactivité chimique et du transfert entre les phases. Cet outil numérique permet surtout d'estimer la contribution relative des réactions chimiques et du transfert de masse dans la production et la destruction de ces espèces chimiques. Cela permet donc de faire un « bilan chimique » pour chaque molécule.

1.2. Comment introduire des réactions biologiques dans le modèle de chimie du nuage ?

La problématique de l'introduction de paramètres biologiques dans le modèle s'est révélée très complexe. Il nous a fallu faire des choix et des hypothèses pour simplifier les données à introduire :

Choix des composé chimiques : Nous ne nous sommes focalisés que sur un nombre limité de composés chimiques, à savoir i) le formaldéhyde, le formiate, l'acétate car ce sont les composés organiques les plus concentrés dans l'eau de nuage et dont nous avons étudié la biodégradabilité par le passé, ii) H_2O_2 car c'est la source majeure des radicaux en phase aqueuse, et que c'est aussi un substrat du métabolisme microbien que nous avons étudié.

Choix des souches microbiennes : Il n'est pas possible d'étudier en laboratoire un nombre exhaustif de souches microbiennes représentant la biodiversité microbienne totale des nuages. Nous avons donc décidé d'utiliser trois souches qui étaient parmi les plus actives dans le panel testé par [Vaïtilingom et al. \(2011\)](#). L'idée est que, si les « meilleures souches » n'impactent pas au final le bilan donné par le modèle, alors nul besoin d'aller plus loin. Si le bilan est positif, nous pourrions faire varier la proportion de bactéries actives dans le nuage ou même aller sur des systèmes plus complexes.

Simplification du système cellulaire : Le métabolisme microbien est extrêmement complexe, avec de nombreuses réactions intermédiaires (Voir KEGG PATHWAY Database – GenomeNet <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), qui sont régulées tant au niveau génomique que directement au niveau des enzymes (inhibition, activation). Les réactions enzymatiques sont intracellulaires, les substrats et produits de réaction doivent donc passer la (ou les) membranes cellulaires. Les vitesses de transport peuvent donc être un facteur limitant, notamment si ces transports dépendent d'un transporteur membranaire (protéine) - ce n'est pas le cas d' H_2O_2 . Afin de simplifier ce système complexe, nous avons choisi d'entrer dans le modèle les réactions enzymatiques sous la forme de simples « puits » (disparition de chacun de substrats) en globalisant l'ensemble des mécanismes (transport, réseau métabolique, réaction) et en faisant l'hypothèse qu'on pouvait assimiler la cellule entière à une simple enzyme de dégradation de substrat.

Spécificité des réactions enzymatiques : La grande spécificité d'une réaction enzymatique par rapport à une réaction chimique classique est qu'on ne peut pas la définir uniquement

avec une constante de réactivité. En effet la vitesse de biotransformation varie avec la concentration en substrat jusqu'à ce que l'enzyme devienne limitante ou le substrat saturant, on atteint alors une vitesse de biodégradation maximale (V_{max}). Cette « saturation » peut être évaluée à partir de la constante d'affinité de l'enzyme pour son substrat (K_M). (Toutes ces notions sont détaillées dans la partie « Matériels et Méthodes »). Il faut donc envisager de mesurer des vitesses de dégradation pour différentes concentrations de substrat. Les cinétiques de biodégradation sont ensuite entrées dans le modèle par l'intermédiaire d'une table dans laquelle on trouve les évolutions des vitesses de biodégradation ($M \cdot min^{-1} \cdot cell^{-1}$) en fonction de la concentration en substrats (acide formique, acide acétique, formaldéhyde, H_2O_2). Comme les vitesses de biodégradation dépendent de la concentration des espèces chimiques biodégradées, pour chaque pas de temps, en fonction de la concentration en substrat, le modèle interpole linéairement pour évaluer la vitesse de biodégradation pour chaque espèce chimique par cellule. En fonction du nombre de bactéries vivantes, qui est un nouveau paramètre d'entrée du modèle, il calcule alors une vitesse de dégradation liée à la présence des bactéries.

Les déterminations des K_M permettront de savoir sur quelle gamme de concentrations l'extrapolation peut être faite et donc si ce modèle est applicable pour des concentrations réalistes présentes dans le nuage.

Choix des scénarios pour la simulation : Nous avons dû faire également des choix pour la simulation d'un évènement nuageux. Différentes simulations ont ainsi été considérées sur la base de : (1) différents scénarios chimiques (marin, continental) ; (2) différentes saisons (été, hiver) présentant des flux actiniques très différents (10 fois plus forts en été) et des températures de 17°C l'été à 5°C l'hiver (moyennes au puy de Dôme). Pour nos expériences de détermination de vitesses de dégradation en laboratoire, nous avons seulement considéré l'influence de la température car nous savons que c'est un facteur qui peut être déterminant pour le métabolisme microbien (Vaitilingom et al 2011, 2010, Husarova et al 2011). Par contre nous savons que le pH ne doit pas modifier de manière drastique les vitesses de dégradation car les enzymes sont intracellulaires et que le pH interne est fortement régulé (autour de pH = 6.5) quel que soit le pH externe (en tout cas pour les pH rencontrés dans les nuages allant de 4 à 6). Ce fait a été vérifié expérimentalement (Vaitilingom et al., 2011, Wirgot, cette thèse). Enfin nous avons montré que la lumière avait peu d'influence sur le métabolisme microbien des nuages (Vaitilingom et al., 2013 ; Joly et al., 2015), les expériences ont donc été réalisées à l'obscurité, pour éliminer les réactions photochimiques potentielles.

1.3. Objectifs

L'objectif de ce chapitre de thèse était donc de fournir des données expérimentales pouvant être prises en compte dans ce modèle et permettant la comparaison des contributions relatives des radicaux et des microorganismes dans la dégradation de composés dans les nuages. Pour cela, des constantes cinétiques de biodégradation de quatre composés présents dans les nuages par trois souches bactériennes isolées de nuages ont été mesurées : formiate, acétate, formaldéhyde et peroxyde d'hydrogène.

Ma participation dans ce travail a été dans un premier temps de réaliser l'ensemble des expériences en laboratoire, allant de la réalisation au traitement des données, afin de fournir des vitesses de biodégradation pour quatre substrats et pour deux températures. Ceci a eu pour principal objectif d'incrémenter ces différentes vitesses dans le modèle de chimie atmosphérique (collaboration avec Laurent Deguillaume, Physicien adjoint au Laboratoire de Météorologie Physique et Hélène Perroux, Doctorante). Les résultats obtenus pour les simulations ne seront pas présentés ici car les expériences sont en cours de finalisation et une publication en cours d'écriture. J'ai participé à la rédaction de cette publication pour la partie microbiologie.

Les résultats obtenus et préliminaires concernant l'aspect modélisation ont fait l'objet de :

- **2 présentations posters :**

N. WIRGOT, M. JOLY, L. DEGUILLAUME, V. VINATIER, A-M. DELORT

Role of bacteria in atmospheric chemistry: biodegradation rates of compounds present in cloud water

4^{ème} congrès international Sino-French Joint Workshop on Atmospheric Environment (SFJW), Lyon, 10-13 décembre 2014.

N. WIRGOT, H. PERROUX, M. JOLY, L. DEGUILLAUME, V. VINATIER, A-M. DELORT

Role of bacteria in atmospheric chemistry: biodegradation rates of compounds present in cloud water

European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC16), Turin (Italie), décembre 2015. Bien que le titre soit identique, un nouveau poster a été réalisé avec des résultats plus détaillés pour la partie de modélisation.

- **1 conférence invitée :**

A-M. DELORT

Gordon Conference “Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism” à Waterville Valley (USA), en juillet 2016 sous le titre « Microbial C1 metabolism in clouds: Potential impact on atmospheric chemistry » (Conférence invitée, Présentée par A.-M.Delort).

2. Matériels et méthodes

2.1. Substrats et souches bactériennes utilisés

Dans le cadre de cette étude, trois composés organiques, appartenant à la famille des acides carboxyliques et des aldéhydes, ont été étudiés : le formiate, l'acétate (bases conjuguées respectives de l'acide formique et acétique) et le formaldéhyde. En plus de ces trois composés carbonés, le peroxyde d'hydrogène, appartenant à la famille des hydroperoxydes et étant connu principalement pour son caractère oxydant, a également été étudié.

Il a été décidé de sélectionner ces quatre composés en raison de leur relativement haute concentration dans la phase aqueuse des nuages. Les concentrations moyennes mesurées au puy de Dôme (1465 m, France) sont reportées dans le **Tableau 11**.

Tableau 11: Concentrations moyennes, exprimées en μM , des quatre composés d'intérêts, mesurées au puy de Dôme (Deguillaume et al., 2014).

Composés	Origine du nuage			
	Hautement marine	Marine	Continentale	Polluée
Formiate	13,0	6,3	13,5	7,3
Acétate	12,0	4,9	11,0	16,8
Formaldéhyde	2,0	1,8	5,0	5,0
Peroxyde d'hydrogène	11,2	6,2	9,9	4,9

Des sels d'acétate et de formiate de sodium (CH_3COONa , 99%, Sigma Aldrich ; HCOONa , 99%, Sigma Aldrich) ainsi que des ampoules de formaldéhyde non stabilisées au méthanol (CH_3OH , ThermoScientific, 16% (m/v)) et une solution commerciale de peroxyde d'hydrogène non stabilisé (H_2O_2 , Fluka Analytical, 30%), ont été utilisées dans le cadre de cette étude.

Dans l'objectif de réaliser des tests de biodégradation, trois souches bactériennes, isolées à partir d'eau de nuage prélevée au sommet du puy de Dôme, ont été sélectionnées et associées à chacun des composés chimiques d'étude. Elles ont été sélectionnées parmi 17 souches en raison de leur capacité à dégrader le plus rapidement les composés étudiés

(Vaïtilingom et al. 2011). Les couples souches/substrats associés sont présentés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12: Correspondance Souches/Substrats.

N° souche	Espèce	N° d'accension GenBank	Substrat étudié
12b-8	<i>Pseudomonas syringae</i>	DQ512783	Formaldéhyde
13b-3	<i>Pseudomonas graminis</i>	DQ512786	Formiate/H ₂ O ₂
14b-10	<i>Pseudomonas sp.</i>	DQ512794	Acétate

Les bactéries ont été cultivées dans 10 mL de milieu nutritif R2A liquide, relativement pauvre en nutriments (Reasoner & Geldreich, 1985), sous agitation (200 rpm) à 17°C pendant environ 15 h. Les cellules en phase exponentielle de croissance¹ ont été centrifugées pendant 3 min à 12500 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot repris et lavé deux fois dans le milieu nuage 100X (voir la section 2.2.). La concentration en cellules a été estimée par la mesure de la densité optique afin d'obtenir une valeur en concentration de 10⁷ cell.mL⁻¹ pour la dégradation des composés carbonés et 10⁵ cell.mL⁻¹ pour le peroxyde d'hydrogène. Par la suite, la concentration a été déterminée précisément par la méthode des dilutions successives en début et en fin d'expérience (voir Chapitre III, Figure 31).

2.2. Milieu nuage artificiel de composition marine

En ce qui concerne la préparation du milieu nuage, elle est expliquée au Chapitre III (paragraphe 2.1.2., Tableau 10). Dans le cadre de cette étude, les composés carbonés (acétate, formiate, oxalate et succinate) ont été supprimés du milieu nuageux artificiel afin que le substrat dont la biodégradation est suivie soit la seule source de carbone disponible pour les bactéries. Avant utilisation, le milieu a été stérilisé par filtration à 0,20 µm à l'aide d'un filtre hydrophile stérile en polyéthersulfone (PES).

Pour le suivi de la biodégradation des composés carbonés, le milieu de nuage artificiel a été concentré par 100 (dit 100X) afin de stabiliser le pH. Il en a été de même pour la concentration en bactéries qui a été fixée à 10⁷ cellules.mL⁻¹ pour conserver une proportion bactéries/substrats identique à celle des nuages. Il a été démontré que lorsque ce ratio est maintenu, la vitesse de dégradation des espèces présentes l'est également (Vaïtilingom et al., 2010). Les conditions sont un peu différentes dans le cas du peroxyde d'hydrogène où le milieu de nuage n'a pas été concentré et la concentration en bactéries a été fixée à 10⁵ cellules.mL⁻¹ pour que la dégradation ne se fasse pas trop rapidement et puisse être suivie.

¹ Phase exponentielle de croissance : phase de croissance pendant laquelle les cellules se divisent de façon optimale conduisant à une population homogène quant à la viabilité des cellules.

2.3. Expériences de biodégradation

Toutes les manipulations effectuées ont été réalisées en conditions stériles sous un poste de sécurité microbiologique (PSM), à flux d'air laminaire et vertical, permettant d'assurer la protection de l'utilisateur, de la manipulation et de l'environnement. Le matériel utilisé a été au préalable stérilisé à l'autoclave (121°C, 20 min). En outre, chacune des expériences de biodégradation a été réalisée en trois réplicats biologiques.

30 mL de milieu nuage artificiel 100X ou 1X ont été incubés dans différents erlenmeyers afin de suivre la biodégradation de concentrations croissantes en substrat. Les concentrations étudiées sont récapitulées dans le **Tableau 13**.

Tableau 13: Récapitulatif des concentrations en substrat étudiées.

Substrat	Concentration (μM)								
H ₂ O ₂	0	3	5	10	15	20	50	100	150
Formiate/Acétate	0	100	200	400	700	1000			
Formaldéhyde	0	50	100	200	300	400			

En parallèle, la concentration en substrat a également été suivie en l'absence de bactéries afin de s'assurer de la stabilité du composé étudié (1 mM pour l'acétate et le formiate, 400 μM pour le formaldéhyde et 20 μM pour le peroxyde d'hydrogène).

La dégradation de ces composés a été suivie à 5°C et 17°C, température moyenne annuelle et maximale de prélèvement d'eau nuageuse. Des prélèvements ont été effectués toutes les heures sur 8 h (avec des points supplémentaires à 12 h et 24 h pour l'acétate), sauf pour le cas du formaldéhyde où 6 h étaient suffisantes. Dans le cas des composés carbonés, 1 mL (pour les acides carboxyliques) et 1,4 mL (pour le formaldéhyde) de chaque erlenmeyer ont été prélevés puis centrifugés 3 min à 12500 rpm afin de retirer les cellules du milieu. Un volume de 600 μL ou 1 mL de surnageant a été conservé et congelé à -25°C dans l'attente de l'analyse. Pour le peroxyde d'hydrogène, 200 μL de chaque erlenmeyer ont été additionnés à 200 μL d'une solution d'acide p-hydroxyphénylacétique (HPAA) et de peroxydase de raifort (HRP) puis ont été congelés à -25°C. En début et en fin d'expérience, 1 mL de chaque erlenmeyer a été prélevé pour réaliser un suivi de pH afin de contrôler ses variations.

2.4. Analyses des échantillons

2.4.1. Acides carboxyliques

Le suivi des concentrations au cours du temps du formiate et de l'acétate a été réalisé par chromatographie ionique. Les échantillons ont été analysés par un système Dionex DX320 pour anions, muni d'une colonne de séparation AS11 et d'un suppresseur ASRS 4 mm

(Anion Self Regenerating Suppressor) ayant pour rôle de supprimer la conductivité de l'éluant.

Les anions ont été élués par un gradient de KOH (0,20 mM à 33,5 mM) à un débit de 1 mL.min⁻¹. Le système chromatographique était piloté par le logiciel Chromeleon permettant l'acquisition et le traitement des données.

De plus amples informations concernant l'analyse sont données dans le **Tableau 14**.

2.4.2. Formaldéhyde

La chromatographie liquide à haute performance a été utilisée pour suivre l'évolution en concentration du formaldéhyde. Le protocole de dosage du formaldéhyde a été adapté à partir de celui décrit par [Vander Heyden et al. \(2002\)](#) dans lequel le formaldéhyde est dérivatisé par la réaction suivante (**Figure 37**):

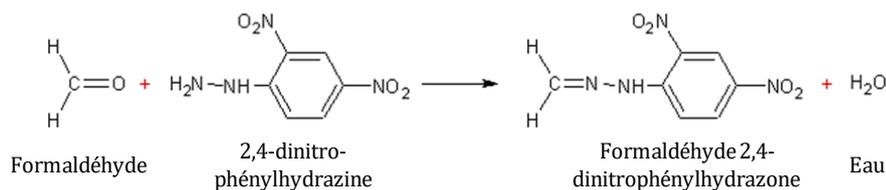


Figure 37: Réaction entre le formaldéhyde et le 2,4 DNPH.

La dérivatisation a été effectuée de la manière suivante : 1 mL d'échantillon a été additionné à 0,4 mL de 2,4-dinitrophenylhydrazine à 0,1% (en excès). Le mélange a été agité à l'aide d'un vortex pendant 1 min puis laissé à température ambiante pendant 5 min. La solution a ensuite été stabilisée par l'ajout de 0,4 mL de tampon phosphate à 0,1 M (pH 6,8) et 0,7 mL de NaOH à 1 M. L'incertitude de mesure par dérivation a été estimée à environ 7% (trois réplicats de mesure à quatre concentrations différentes).

Un système Dionex UV (UVD 340) a été utilisé avec une colonne de séparation, Interchim Uptisphere Strategy 100 Å; 5 µm ; 4,6 x 250 mm, de type C18 constituée d'un gel de silice sur lequel sont greffées des chaînes de 18 atomes de carbone, en phase inverse. Les produits les plus polaires sont donc élués en premier alors que les produits les plus hydrophobes restent fixés sur la silice plus longtemps. L'éluant choisi était constitué d'un mélange tampon phosphate (0,025 M ajusté à pH 4) et d'acétonitrile dans des proportions 45/55 (v/v) à un débit de 0,8 mL.min⁻¹ en mode isocratique².

Le système chromatographique était piloté par le logiciel Chromeleon qui a permis l'acquisition, le traitement et l'analyse des données. La mesure a été réalisée à une longueur d'onde de détection de 345 nm.

De plus amples informations concernant l'analyse sont données dans le **Tableau 14**.

² Mode isocratique : la proportion des éluants de la phase mobile n'est pas modifiée au cours de l'acquisition

Tableau 14: Conditions d'analyse du formiate, acétate et formaldéhyde par chromatographie.

	Formiate/Acétate	Formaldéhyde
Système utilisé	Dionex DX320	Dionex UV (UVD 340)
Type de colonne	IonPac AS11 <10 A° ; 13 µm ; 4x25 mm	C18 Interchim Uptisphere Strategy 100 A° ; 5 µm ; 4,6x250 mm
Temps d'analyse total	18 min	15 min
Volume injecté	750 µL	20 µL
Débit	1 mL/min	0,8 mL/min
Solvants d'élution	KOH et eau ultra-pure	Tampon phosphate 0,025 M (pH 4) et acétonitrile
Mode de travail	Gradient d'élution	Mode isocratique
Gradient	0 min : 0,2 mM 4,5 min : 0,43 mM 10 min : 5 mM 13 min : 33,5 mM 14 min : 33,5 mM 14,1 min : 0,2 mM	45% tampon phosphate/ 55% acétonitrile
Temps de rétention	Formiate : 7,5 min Acétate : 7 min	10,5 min
Mode de détection	Conductivité	Absorbance (345 nm)

2.4.3. Peroxyde d'hydrogène

La méthode utilisée pour suivre l'évolution du peroxyde d'hydrogène a été détaillée dans le Chapitre III Section 2.1.4.

2.5. Calcul de constantes cinétiques

Dans l'objectif de déterminer les constantes cinétiques de dégradation des différents substrats étudiés, une hypothèse centrale a été formulée (voir introduction). En effet, nous avons assimilé les cinétiques de dégradation à une cinétique enzymatique de type Michaelienne. Ce type de cinétique est généralement appliqué à une enzyme (catalyseur biologique) et fonctionne selon le mode suivant : un substrat se lie à une enzyme pour donner un intermédiaire qui va se dissocier pour donner lieu finalement à la formation d'un produit avec régénération de l'enzyme. Dans notre cas, la cinétique Michaelienne est appliquée à une cellule entière (voir introduction) en simplifiant à l'extrême le système.

La cinétique Michaelienne fait intervenir deux paramètres clés (**Figure 38**):

- la vitesse maximale notée V_{\max} exprimée en $M \cdot s^{-1} \cdot cell^{-1}$ correspondant à la vitesse maximale de dégradation qui intervient lorsque les cellules se trouvent en condition saturante de substrat.
- le coefficient d'affinité noté K_M exprimé en molarité correspondant à la concentration nécessaire en substrat pour que la vitesse de dégradation soit la moitié de la vitesse maximale.

Pour chaque concentration en substrat, la vitesse de dégradation est définie par l'équation de Michalis-Menten telle que :

$$V_i = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

où V_i est la vitesse initiale ($M.s^{-1}.cell^{-1}$) et $[S]$ la concentration en substrat (M).

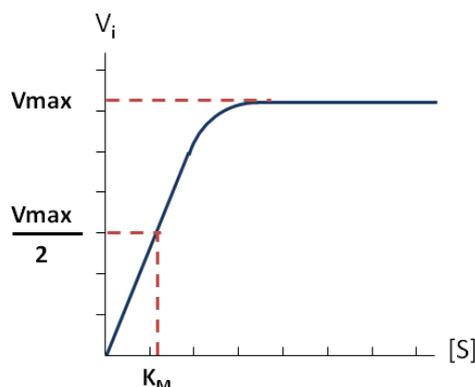


Figure 38: Représentation graphique d'une cinétique de type Michaelienne.

La vitesse de dégradation est clairement dépendante de la concentration en substrat. En effet, dans un premier temps la vitesse augmente avec la concentration en substrat jusqu'à atteindre une concentration à partir de laquelle la vitesse est constante et maximale (V_{\max}). Ce scénario diffère d'une cinétique classique chimique où aucun effet de saturation n'est observé.

Afin de déterminer ces constantes V_{\max} et K_M pour chaque substrat, une étude cinétique doit être effectuée. Pour cela, une détermination par méthode graphique a été effectuée selon la démarche suivante : après avoir déterminé par l'expérience les vitesses de biodégradation pour différentes concentrations en substrat, les données ont été traitées par deux méthodes mathématiques, la plus connue étant la méthode de Lineweaver-Burk. Parmi les multiples méthodes de traitement existantes, celle de Cornish-Bowden-Eisenthal (Eisenthal, 1974 ; Berges, 1994) offre le meilleur compromis entre la facilité de réalisation et la justesse des estimations. Cette dernière a été utilisée dans le cas des composés carbonés. Cette méthode n'étant pas satisfaisante dans le cas du peroxyde d'hydrogène (valeur de K_M trop éloignée des concentrations testées), la méthode de Lineweaver-Burk a été utilisée.

La méthode de Cornish-Bowden-Eisenthal (**Figure 39**) a donc été utilisée pour déterminer les constantes cinétiques V_{\max} et K_M de l'acétate, du formiate et du formaldéhyde. Pour cela, une droite est tracée pour chaque point expérimental ayant comme abscisse l'opposé de la concentration en substrat ($-[S]$) et comme ordonnée à l'origine la vitesse de dégradation V_i . Autrement dit, pour chaque point expérimental la droite tracée passe par les coordonnées ($-[S]$; 0) et (0 ; V_i). L'intersection de l'ensemble des droites permet la détermination des deux

constantes cinétiques. Dans le cas où plusieurs intersections sont définies, les constantes sont déterminées par la médiane des valeurs des intersections.

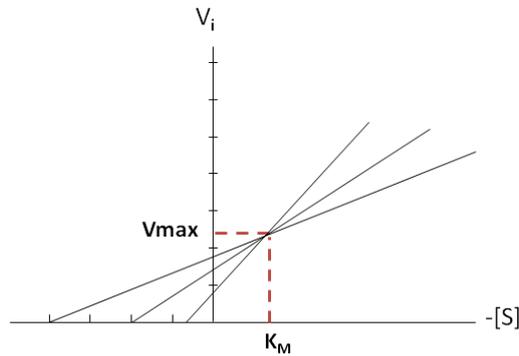


Figure 39: Détermination des constantes cinétiques V_{\max} et K_M par la méthode de Cornish-Bowden-Eisenthal.

Dans le cas du peroxyde d'hydrogène, la méthode de Lineweaver-Burk (**Figure 40**) a été utilisée. Cette méthode est également appelée la représentation des doubles inverses. En effet, on détermine les deux constantes à l'aide de la droite qui a pour équation

$$\frac{1}{V_i} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

De ce fait, V_{\max} et K_M peuvent être estimés à l'aide des relations suivantes : $V_{\max} = \frac{1}{\text{Ordonnée}}$

et $K_M = \frac{\text{Pente}}{\text{Ordonnée}}$.

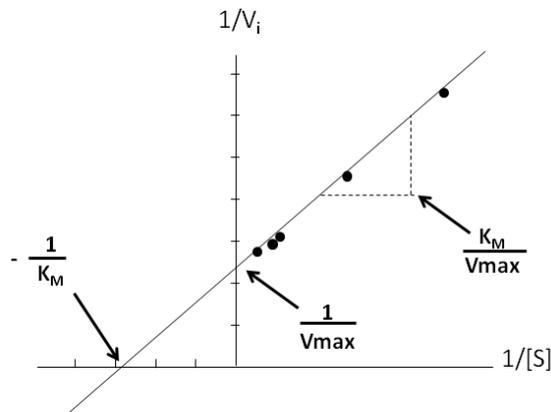


Figure 40: Détermination des constantes cinétiques V_{\max} et K_M par la méthode de Lineweaver-Burk.

3. Résultats et discussion

3.1. Biodégradation des substrats

3.1.1. Les composés carbonés

Le suivi de la concentration des espèces carbonées a été réalisé par chromatographie ionique (formiate et acétate) et par chromatographie en phase liquide à haute performance (formaldéhyde). Un exemple de chromatogramme pour chacun des substrats étudiés à différents temps d'analyse et à une température donnée est présenté sur la **Figure 41**.

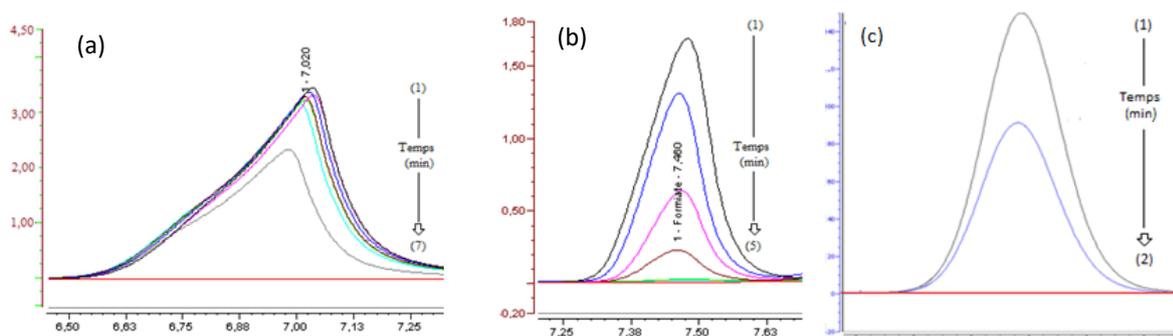


Figure 41: Exemple de chromatogrammes obtenus. (a) concentration initiale en acétate de 0,7 mM (temps de rétention de 7,01 min), (1): t= 0 et (7): t= 24 h, température : 5°C; (b) concentration initiale en formiate de 0,1 mM (temps de rétention de 7,46 min), (1): t= 0 et (5): t= 5 h, température : 5°C; (c) concentration initiale en formaldéhyde de 400 µM (temps de rétention de 10,60 min), (1) : t= 0 et (2): t= 20 min, température: 17°C.

Les trois composés carbonés ont été dégradés intégralement ou en partie par les bactéries dans le temps imparti et aux deux températures testées (5°C et 17°C). La dégradation de ces substrats a également été testée en absence de bactéries afin de s'assurer que la dégradation observée est bien d'origine biologique. Ceci a été confirmé pour les trois substrats.

En ce qui concerne la dégradation de l'acétate et du formiate, il apparaît que les bactéries n'utilisent pas le substrat immédiatement (**Figure 41**) mais connaissent auparavant un temps de latence de durée variable (0 à 60 min pour le formiate, 60 à 120 min et 180 à 480 min pour l'acétate à 17°C et 5°C respectivement). Il s'agit du temps nécessaire aux bactéries pour s'accoutumer au nouveau milieu qui leur est proposé.

La dégradation de l'acétate par la souche 14b-10 génère au cours du temps un produit de dégradation se traduisant par la présence d'un épaulement au pic correspondant à l'acétate, à un temps de rétention proche de 6,75 min. Deux composés apparaissent comme pouvant être à l'origine de l'épaulement observé et pouvant résulter de la dégradation de l'acétate par des microorganismes : le lactate ($\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$) et le pyruvate ($\text{CH}_3\text{COCOO}^-$) (**Figure 42**). Afin de déterminer la nature du composé mis en jeu, des échantillons de concentration

connue en lactate et pyruvate ont été analysés dans les mêmes conditions chromatographiques. L'hypothèse du pyruvate a pu être écartée car le temps de rétention du pyruvate (aux alentours de 8 min) est trop éloigné de la valeur de 6,75 appartenant à l'épaulement. En revanche, le lactate, dont l'élution est proche de 6,80 min, pourrait correspondre au métabolite formé. Il faudrait envisager des analyses supplémentaires comme la résonance magnétique nucléaire (^1H) afin de confirmer cette hypothèse.

Dans le cas de la dégradation du formiate, aucun nouveau métabolite n'apparaît sur les chromatogrammes.

Un scénario différent est observé lors de la dégradation du formaldéhyde par la souche 12b-8. En effet, deux phases distinctes sont mises en évidence. La première phase se caractérise par une dégradation du formaldéhyde qui se maintient pendant les 20 à 100 premières minutes. Après cela, une seconde phase apparaît, reflétant une production de formaldéhyde qui perdure jusqu'à ce que sa concentration se stabilise. Cette dualité dégradation/production du formaldéhyde est probablement le résultat de réactions enzymatiques réversibles telles que, par exemple, la production de méthanol qui peut être ensuite reconverti en formaldéhyde jusqu'à ce qu'un équilibre s'installe entre ces deux composés (**Figure 42**). Une caractérisation par résonance magnétique nucléaire pourrait être envisagée afin de mettre en évidence les métabolites produits.

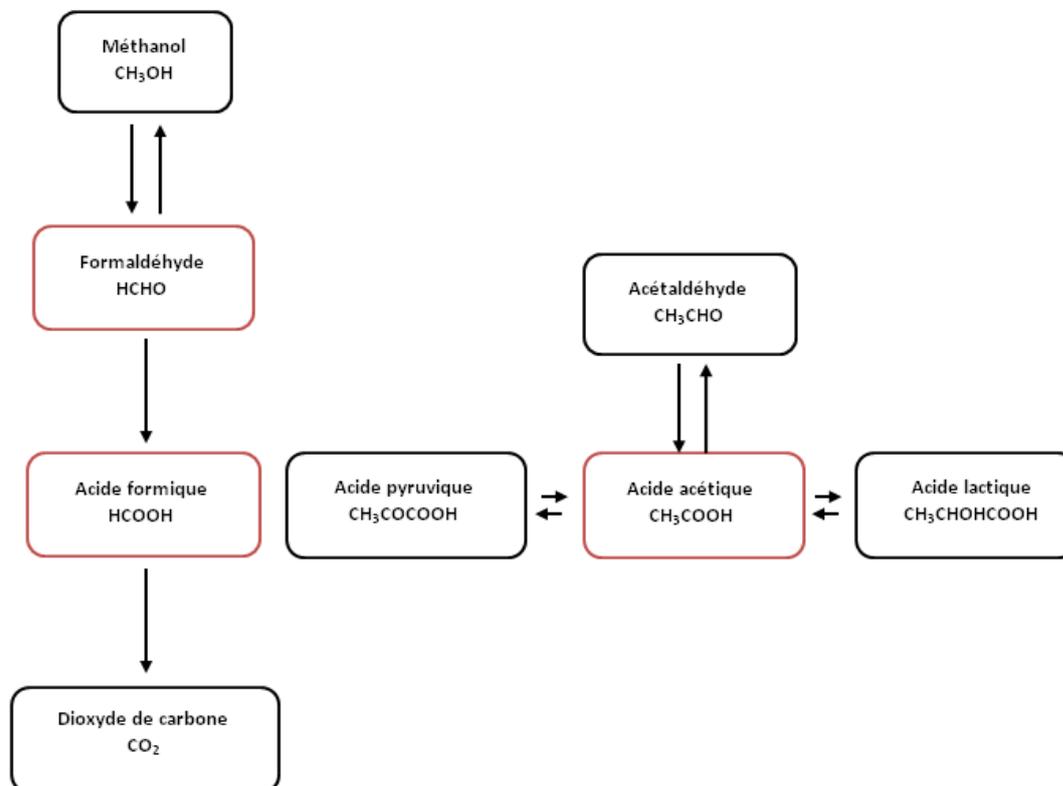


Figure 42: Principales voies métaboliques d'oxydation de composés à trois atomes de carbone. Les flèches traduisent des étapes régies par des enzymes.

3.1.2. Le peroxyde d'hydrogène

Le suivi de la concentration en peroxyde d'hydrogène a été réalisé par fluorimétrie. Un exemple de dégradation obtenue est présenté sur la **Figure 43**.

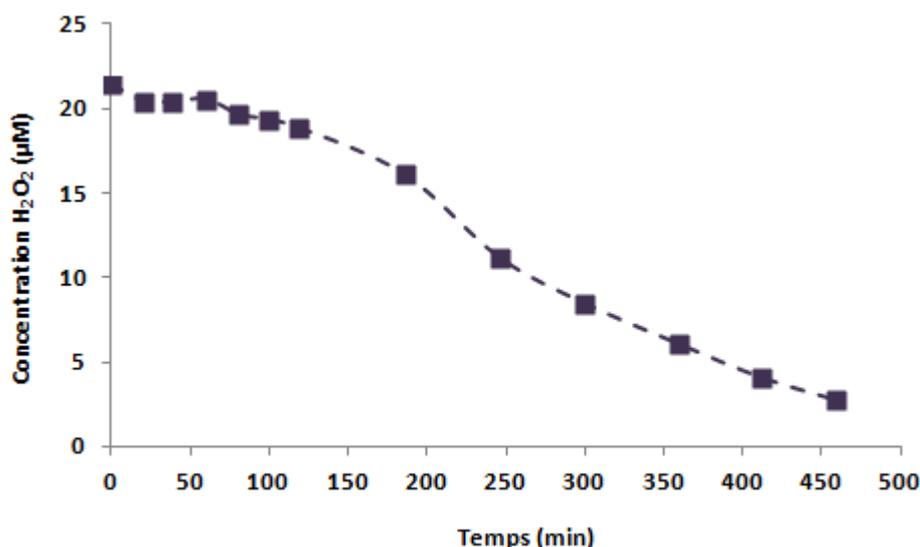


Figure 43: Représentation graphique d'un exemple de biodégradation obtenue pour le peroxyde d'hydrogène pour une concentration initiale de 20 μM , température: 17°C.

Le peroxyde d'hydrogène a été dégradé efficacement par les bactéries dans le temps imparti et aux deux températures testées. La dégradation a également été testée en absence de bactéries afin de s'assurer que la dégradation observée est bien d'origine biologique. Chez les microorganismes le peroxyde d'hydrogène est principalement dégradé par des peroxydases (Eq.1) et des catalases (Eq.2) (**Figure 44**) :



Figure 44: Réaction entre le peroxyde d'hydrogène et les bactéries.

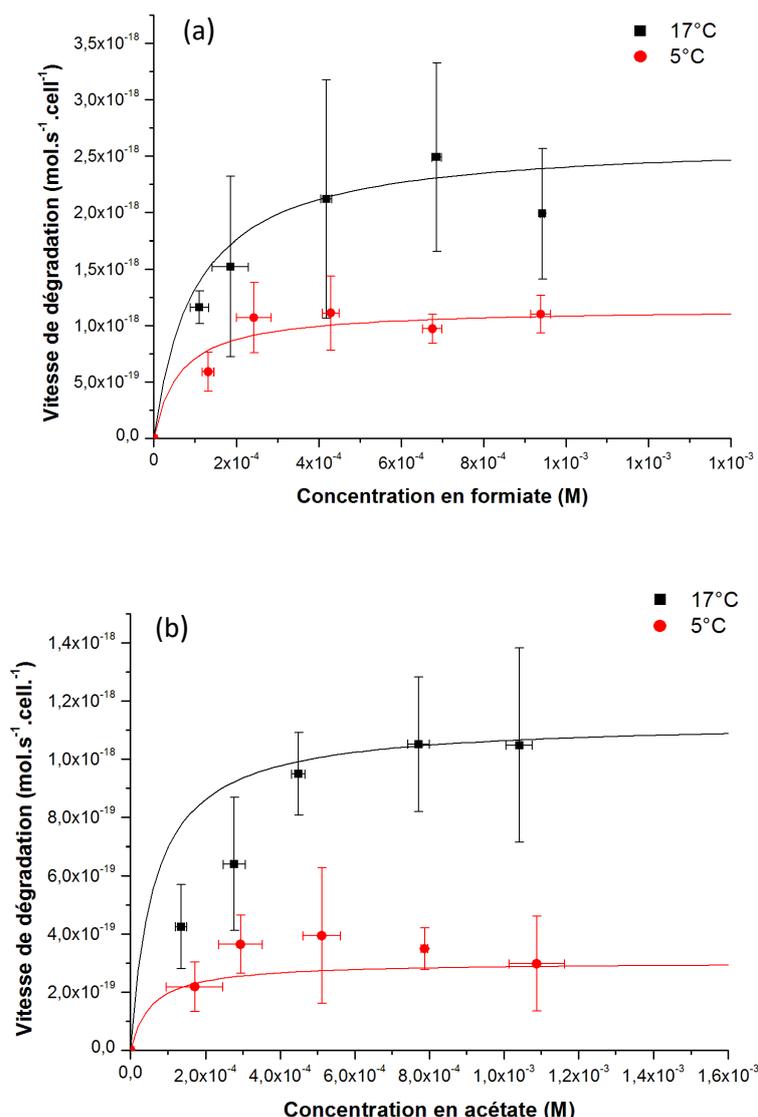
3.2. Détermination des vitesses de biodégradation

Les vitesses de biodégradation des substrats ont été quantifiées dans la période où les bactéries sont au maximum de leur activité, c'est-à-dire après la période de latence pour le formiate et l'acétate. Les représentations graphiques de la vitesse de dégradation en fonction de la concentration en chacun des substrats sont présentées sur la **Figure 45**.

Deux types de courbes ont été mis en évidence. Pour le formiate et l'acétate, la vitesse de dégradation augmente avec la quantité de substrat jusqu'à une certaine concentration à partir de laquelle la vitesse atteint un plateau maximal (aux environs de 0,4 mM et 0,3 mM

pour le formiate à 17°C et à 5°C respectivement et aux environs de 0,5 et 0,3 mM pour l'acétate à 17°C et à 5°C respectivement). En ce qui concerne la dégradation du formaldéhyde et du peroxyde d'hydrogène, la vitesse est dépendante de la concentration en substrat quelles que soient les conditions testées.

L'hypothèse qui avait été faite a été vérifiée. En effet, ces cinétiques sont assimilables à celles décrites pour des enzymes Michaeliennes (**Figure 38**). Dans le cas du formiate et de l'acétate, les concentrations saturantes en substrat sont atteintes, ce qui permet d'observer une vitesse maximale de dégradation. En revanche, en ce qui concerne le formaldéhyde et le peroxyde d'hydrogène, les concentrations initiales en substrat proposées aux bactéries semblent trop faibles pour atteindre la vitesse maximale. Il semblerait donc qu'assimiler une cellule entière à une cinétique généralement décrite pour des enzymes soit cohérent. La principale différence repose sur le fait que les enzymes sont intracellulaires et par conséquent, le substrat doit être transporté à travers la membrane avant d'être transformé en produit.



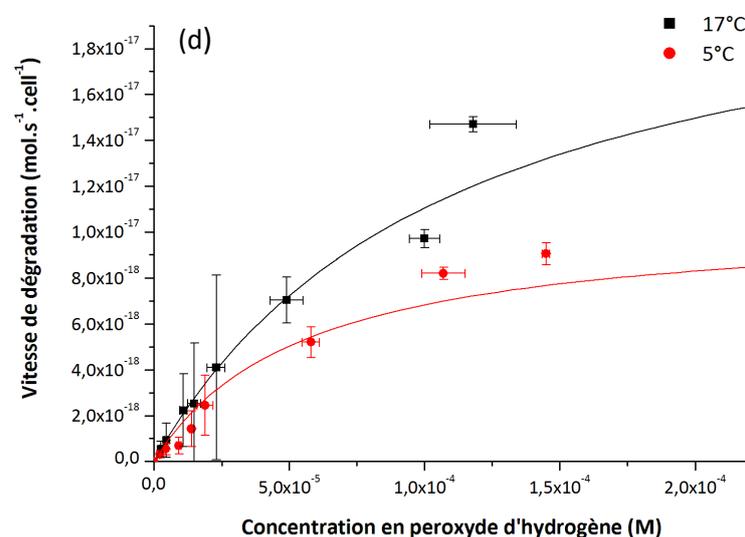
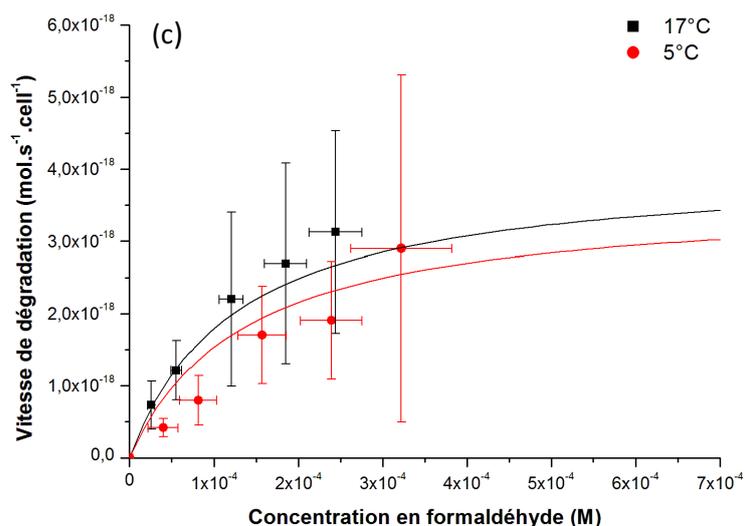


Figure 45: Représentation graphique de la vitesse de dégradation en fonction de la concentration en substrat à 17°C et 5°C : (a) Formiate (b) Acétate (c) Formaldéhyde (d) Peroxyde d'hydrogène. Les barres d'erreurs illustrent les écarts-types entre les trois réplicats effectués illustrant trois expériences indépendantes (trois cultures différentes).

3.3. Détermination de constantes cinétiques

La détermination des constantes cinétiques a été réalisée par la méthode de Cornish-Bowden-Eisenthal (acétate, formiate et formaldéhyde) et de Lineweaver-Burk (peroxyde d'hydrogène). Pour chacun des composés et chacune des températures, les constantes cinétiques K_M et V_{max} sont présentées dans le **Tableau 15**.

Tableau 15: Constantes cinétiques déterminées par la méthode de Cornish-Bowden-Eisenthal et Lineweaver-Burk. Les écarts-types ont été calculés (n=3).

		V_{\max} (mol.s ⁻¹ .cell ⁻¹)	K_M (M)
Formiate	5°C	$(1,15 \pm 0,17). 10^{-18}$	$(6,24 \pm 7,94). 10^{-5}$
	17°C	$(2,64 \pm 1,17). 10^{-18}$	$(9,92 \pm 10,60). 10^{-5}$
Acétate	5°C	$(3,02 \pm 1,88). 10^{-19}$	$(5,45 \pm 0,77). 10^{-5}$
	17°C	$(1,13 \pm 0,36). 10^{-18}$	$(6,25 \pm 6,88). 10^{-5}$
Formaldéhyde	5°C	$(4,04 \pm 1,55). 10^{-18}$	$(1,25 \pm 0,86). 10^{-4}$
	17°C	$(3,61 \pm 4,65). 10^{-18}$	$(1,35 \pm 1,64). 10^{-4}$
Peroxyde d'hydrogène	5°C	$(1,06 \pm 0,39). 10^{-17}$	$(5,50 \pm 1,87). 10^{-5}$
	17°C	$(2,32 \pm 0,83). 10^{-17}$	$(1,11 \pm 0,35). 10^{-4}$

Les vitesses maximales calculées sont comprises entre $3,02.10^{-19}$ et $2,32.10^{-17}$ mol.s⁻¹.cell⁻¹. On peut noter que les vitesses de dégradation du peroxyde d'hydrogène sont les plus importantes et ce, pour les deux températures. En ce qui concerne les valeurs du coefficient d'affinité K_M , elles varient entre $5,45.10^{-5}$ (soit 54,5 µM) et $1,35.10^{-4}$ M (soit 135,0 µM). Comme les valeurs des K_M sont supérieures aux concentrations des composés mesurées dans l'eau des nuages (voir tableau 1, concentrations moyennes allant de 4.9 µM à 13,5 µM), on peut en conclure que les bactéries ne se situent pas en conditions saturantes dans ce milieu et que les vitesses maximales pour dégrader ces composés ne sont pas atteintes. Dans les nuages, les bactéries ne sont donc pas au maximum de leur efficacité pour dégrader ces composés et leur vitesse est, par conséquent, dépendante de la concentration en substrat. Les interpolations réalisées dans le modèle sont donc valables (voir introduction).

Malgré le fait qu'une différence entre les deux températures soit visible sur les courbes de cinétique (**Figure 45**), la température ne semble pas avoir d'effet majeur sur les vitesses en termes d'ordre de grandeur.

Ces données expérimentales ont été déterminées afin de les incrémenter dans un modèle de chimie atmosphérique. Les sorties du modèle ne sont pas présentées ici car elles sont actuellement en cours.

4. Conclusion

Dans ce chapitre de thèse nous nous sommes intéressés à la dégradation de quatre composés présents en concentration relativement importante, dans les nuages (le formiate, l'acétate, le formaldéhyde et le peroxyde d'hydrogène) par trois souches bactériennes isolées de prélèvements nuageux effectués au puy de Dôme. Des constantes cinétiques de biodégradation ont pu être mesurées à différentes températures. Il apparaît que les températures d'étude (5°C et 17°C) ont peu d'impact sur l'affinité des cellules envers ces substrats et donc sur leur vitesse maximale de dégradation.

Ces vitesses de biodégradation ont été déterminées dans le but de les incrémenter dans un modèle de chimie atmosphérique afin de prendre en considération l'impact des microorganismes dans un cadre plus réaliste des conditions réelles nuageuses.

A notre connaissance, ce travail apporte une vraie originalité car jamais des données biologiques n'avaient été considérées dans des modèles de chimie atmosphérique. Jusqu'à maintenant, seule l'étude de l'influence de la réactivité chimique sur la composition chimique des nuages et de façon plus générale de l'atmosphère, avait été prise en compte. Des expériences de simulation intégrant ces paramètres biologiques sont actuellement en cours, le modèle est bien opérationnel et fonctionnel. Les sorties du modèle nous permettront de mieux évaluer l'impact du métabolisme microbien sur la chimie des nuages.

Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion

L'impact des nuages sur le climat soulève encore aujourd'hui de nombreux questionnements quant à leur formation et leurs propriétés microphysiques/chimiques sujettes à de fortes variations temporelles et spatiales. Une des principales problématiques est la compréhension des processus chimiques multiphasiques se produisant dans les nuages. Jusqu'à récemment, seule la chimie radicalaire a été étudiée dans les réactions de transformation de la matière organique en phase aqueuse. Cette chimie est très complexe et implique la présence d'oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène ou le fer, et d'espèces radicalaires comme les radicaux hydroxyles ($\cdot\text{OH}$). La plupart de ces réactions mène à l'oxydation de la matière organique, générant notamment des aldéhydes ou des acides carboxyliques. La présence de microorganismes métaboliquement actifs dans les nuages a soulevé de toutes nouvelles interrogations quant à leur impact potentiel sur la chimie des nuages. **Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail de thèse a été d'élargir nos connaissances sur les interactions entre les espèces oxydantes et les microorganismes dans la phase aqueuse des nuages afin de mieux évaluer la contribution des microorganismes dans les mécanismes impliqués dans la chimie atmosphérique (Figure 46).**

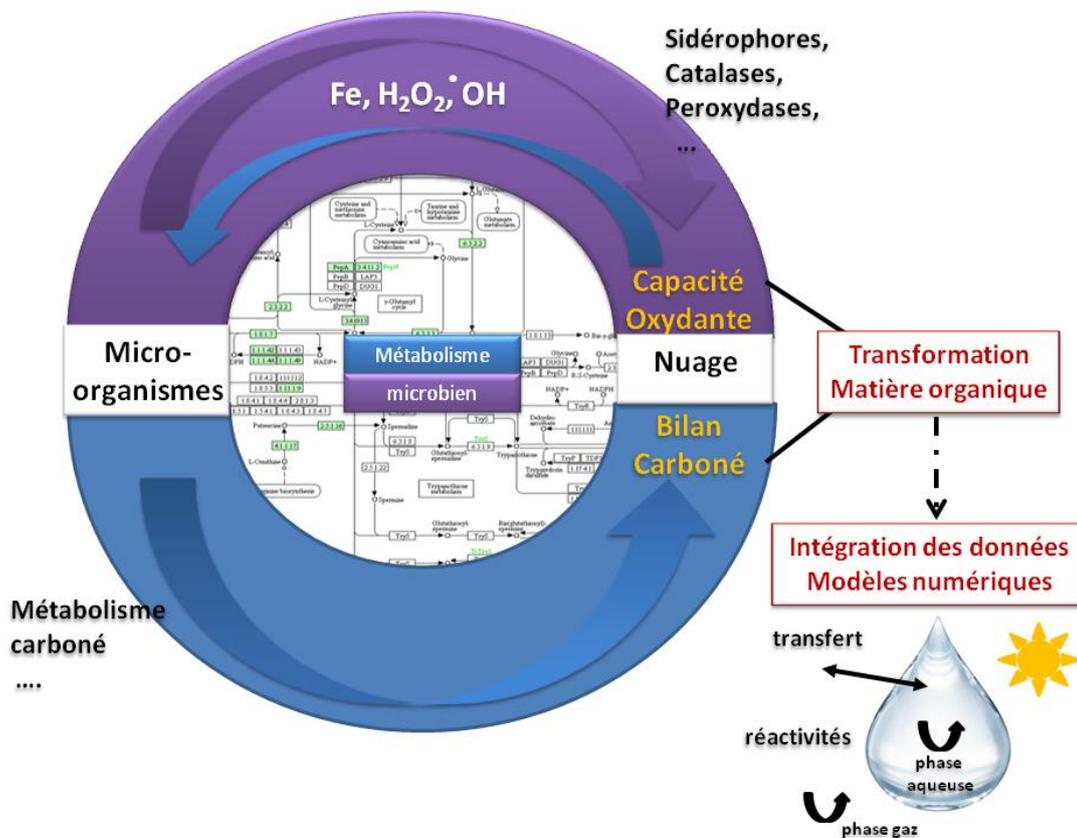


Figure 46: Interactions entre les microorganismes et les espèces oxydantes des nuages : impact potentiel sur la chimie atmosphérique.

Plus précisément, nous avons cherché à évaluer l'impact des microorganismes sur la capacité oxydante des nuages. Pour cela, nous sommes partis des résultats observés dans les travaux de [Vaitilingom et al. \(2013\)](#) et [Joly et al. \(2015\)](#). D'une part des mesures de rapports ADP/ATP ont montré que les microorganismes résistaient à la présence de H₂O₂ et des radicaux [•]OH. D'autre part il a été observé que le peroxyde d'hydrogène était biodégradé *via* l'activité d'enzymes spécifiques comme les catalases ou peroxydases. Les microorganismes étaient donc suspectés d'agir, à travers différents processus, sur la concentration en espèces oxydantes, principalement le peroxyde d'hydrogène, le fer et par conséquent les radicaux hydroxyles dans les nuages.

Nous avons montré pour la première fois par criblage que certains microorganismes, isolés d'eau nuageuse collectée au sommet du puy de Dôme, ont la capacité de produire des sidérophores dans des conditions de carence en fer (42% des souches sur 450 souches étudiées). Si la présence de ce type de molécules est avérée dans les eaux de nuage, alors ces composés pourraient entrer en compétition, dans la complexation du fer, avec l'oxalate qui est actuellement le ligand de référence dans les modèles de chimie atmosphérique, et modifier la réactivité du fer.

De même, les microorganismes des nuages ont la capacité de jouer sur la concentration en peroxyde d'hydrogène et peuvent potentiellement avoir un impact sur le bilan carboné. Nous avons confirmé dans nos travaux que le peroxyde d'hydrogène est biodégradé et, de ce fait, en abaissant la concentration en H₂O₂, les microorganismes peuvent participer à la diminution de la production de radicaux. Cette baisse de la capacité oxydante du milieu peut ensuite entraîner un ralentissement de la dégradation de la matière organique dans les nuages. Par ailleurs, nous avons montré pour la première fois que le peroxyde d'hydrogène impacte fortement le métabolisme énergétique du microbiome nuageux et peut potentiellement moduler le métabolisme carboné. En effet, il a été montré qu'un certain nombre de composés carbonés pouvant avoir un effet direct sur la chimie atmosphérique, tels que des acides carboxyliques, des sucres et des acides aminés voyait leur teneur modifiée en présence de peroxyde d'hydrogène.

Afin d'évaluer la contribution de l'activité microbiologique sur les processus atmosphériques, nous avons déterminé dans une première approche expérimentale, les constantes cinétiques de biodégradation de composés majoritaires de l'eau de nuage (acétate, formiate, formaldéhyde et peroxyde d'hydrogène) afin de les implémenter en tant que paramètres d'un modèle de chimie atmosphérique.

L'ensemble de ces travaux converge sur le fait que le métabolisme du stress oxydant est efficace dans des conditions similaires à celles rencontrées dans la phase aqueuse de

nuage. Les résultats étayent fortement l'hypothèse de l'action des microorganismes sur la capacité oxydante des nuages. D'une part les microorganismes sont suspectés d'impacter la capacité oxydante en agissant sur des molécules telles que le fer et H_2O_2 . D'autre part les microorganismes montrent une propension à gérer une condition de stress oxydant exercée par H_2O_2 en réorganisant leur métabolisme, et particulièrement leur métabolisme carboné; ce phénomène peut avoir un effet direct sur le bilan carboné Cette modulation dépendra des scénarios atmosphériques puisque la concentration de H_2O_2 en est très dépendante.

2. Perspectives

Les travaux de cette thèse ont permis d'apporter de nouveaux éléments précis sur les interactions entre les microorganismes des nuages et les espèces oxydantes et leurs conséquences potentielles sur la chimie atmosphérique. Nos résultats ouvrent de larges perspectives pour des travaux futurs.

En ce qui concerne la production de sidérophores, il est maintenant fondamental de confirmer ou infirmer l'hypothèse de leur présence dans les eaux de nuage. Pour cela, il est prévu de récolter des échantillons d'eau nuageuse au sommet du puy de Dôme dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin (LEMAR) à Brest. Cette collaboration a pour objectif principal de mettre en évidence par une méthode de voltammétrie cyclique (Cheize et al., 2012) la présence potentielle de ligands caractérisés par de fortes valeurs de complexation pour le fer(III), ce qui traduirait la présence de sidérophores.

D'autres pistes sont également à explorer, elles s'inspirent notamment de travaux réalisés dans l'océan (par exemple Gledhill & Buck 2012, Gärdes et al., 2013). Il serait notamment envisageable de faire des recherches plus spécifiques en cherchant les empreintes de composés type et/ou de leurs dérivés dans les eaux de nuage en utilisant la spectrométrie de masse. Dans un premier temps, il serait intéressant de se focaliser sur un sidérophore comme la pyoverdine, cette molécule étant majoritairement produite par les souches bactériennes de *Pseudomonas* qui sont fortement représentées dans les eaux de nuage collectées au sommet du puy de Dôme. Une démarche plus systématique pourrait être adoptée en se basant sur une recherche bibliographique intensive des sidérophores pouvant être produits dans d'autres compartiments (sols, eaux ou végétation) par des souches appartenant aux mêmes genres que celles rencontrées dans les nuages. Leur présence pourrait alors être recherchée de manière systématique par un criblage par spectrométrie de masse. Enfin, il serait également intéressant d'étudier les produits de dégradation (notamment photochimiques) de sidérophores, certaines molécules de plus petite taille pouvant également avoir une capacité chélatante pour le fer.

D'autres méthodes analytiques que la spectrométrie de masse pourraient être également utilisées. Ainsi, la spectroscopie de fluorescence, méthode analytique très sensible, peut se révéler intéressante mais pour la pyoverdine, elle n'est malheureusement pas applicable sur la forme complexée du sidérophore. Dans le cadre d'une collaboration avec l'université de Nova-Gorica en Slovénie, une méthode très originale basée sur la spectrométrie à lentille thermique, a été mise au point pour quantifier à la fois la forme libre et la forme complexée de la pyoverdine. Comme elle nécessite un très faible volume d'échantillon, elle pourrait être appliquée à des échantillons d'eau de nuage ce qui représente un atout majeur par rapport à la nature précieuse de nos échantillons.

Finalement, des approches biomoléculaires pourraient être utilisées telles que la métagénomique et la métatranscriptomique. De telles analyses s'effectuent directement sur les échantillons et permettent de prendre en considération l'ensemble de la biodiversité contenue dans les eaux de nuage (souches cultivables et non cultivables). La métagénomique et la métatranscriptomique pourraient mettre en évidence des gènes impliqués dans la synthèse de sidérophores et décrire l'ensemble des ARN messagers synthétisés dans ce milieu afin de déterminer l'expression de ces gènes.

En ce qui concerne les travaux sur le peroxyde d'hydrogène, nous avons étudié la biodégradation de H_2O_2 dans des conditions mimant celles rencontrées dans les nuages. Dans ces expériences, nous avons utilisé le complexe Fe[EDDS] comme modèle. Il serait judicieux de réaliser ces mêmes expériences en changeant le ligand impliqué dans la complexation du fer par de la pyoverdine, sidérophore qui pourrait être utilisé comme modèle de ligand, beaucoup plus pertinent que l'EDDS.

Concernant l'adaptation des microorganismes aux conditions oxydantes du nuage, qui a été étudiée par une approche métabolomique, et dans l'objectif de fournir davantage d'informations, deux démarches pourraient être envisagées : la première serait d'extraire de manière ciblée les composés d'une famille donnée, par exemple par la sélection d'un solvant d'extraction spécifique. Cet aspect fera l'objet prochainement d'une collaboration avec l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Theix dans le cadre d'une thèse où il sera question de se focaliser principalement sur l'oxydation des lipides.

La deuxième approche serait d'étudier l'exométabolome, c'est-à-dire identifier les molécules excrétées par les bactéries dans le milieu d'incubation. Il serait notamment intéressant de voir si l'on retrouve également dans le milieu extracellulaire de petits peptides, molécules d'intérêt peu étudiées dans ce cadre, et dont nous avons montré l'importance en tant que marqueurs du stress oxydant. De manière plus générale, la connaissance de la composition du milieu extracellulaire, par exemple l'excrétion de molécules telles que des

acides aminés ou des sucres, ferait un lien direct avec l'influence que les microorganismes peuvent avoir sur la composition chimique des nuages, notamment sur le bilan carboné.

Nos résultats ont apporté de premiers éléments quant à l'impact potentiel du peroxyde d'hydrogène sur le métabolisme microbien mais les expériences ont été effectuées en laboratoire avec une souche pure. Il est maintenant essentiel de travailler sur le milieu de nuage dans son intégralité. Dans ce cadre, il est envisagé de travailler sur du milieu de nuage naturel et d'effectuer une étude métabolomique et transcriptomique sur l'ensemble de sa biodiversité. Pour cela, l'ensemble des microorganismes présents dans l'échantillon de nuage sera récupéré et mis à incuber dans du milieu de nuage artificiel. Différentes conditions seront ainsi être testées : présence ou absence de peroxyde d'hydrogène et de lumière. Ceci permettra alors de comparer nos résultats avec cette étude en conditions plus réalistes du nuage.

Concernant l'intégration de données biologiques dans des modèles de chimie atmosphérique, nous savons qu'il est nécessaire d'intégrer les voies de dégradation biologique dans des modèles de chimie atmosphérique pour définir l'importance de l'activité des microorganismes dans des conditions plus réalistes que celles obtenues en laboratoire. Dans ce contexte, nous avons déterminé les constantes cinétiques de quatre composés majeurs de la phase aqueuse des nuages mais dans ces travaux, nous avons considéré les microorganismes comme puits unique de ces composés sans tenir compte que pour certains d'entre eux (acétate, formaldéhyde, etc.), différentes étapes enzymatiques peuvent conduire à la modification d'autres métabolites intermédiaires. Dans l'avenir, il va donc être essentiel pour ces cas d'introduire dans le modèle des voies métaboliques plus complexes et de quantifier avec précision les proportions de chacun des produits transformés ; ceci pourrait être réalisé par fluxomique en utilisant des molécules marquées par au ^{13}C . Dans ce cadre, il est envisagé de travailler sur du milieu de nuage réel et d'illustrer cette approche en premier lieu avec le formaldéhyde qui, on le sait, peut soit i) être oxydé en formiate et CO_2 , ii) être réduit en méthanol, iii) rentrer dans le métabolisme central *via* la voie de la sérine ou le cycle RuMP.

De plus il serait intéressant d'introduire la modulation des vitesses de réactions dans diverses voies métaboliques, notamment celles du métabolisme des composés carbonés en C1, lorsque les microorganismes des nuages sont exposés à des concentrations variables de H_2O_2 . Là encore, des approches en "omiques" sur nuage entier sont envisageables et notamment des approches de fluxomique.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis d'apporter quelques éléments de réponse sur les interactions entre les microorganismes et les espèces oxydantes et leur impact potentiel sur la capacité oxydante des nuages mais de nombreuses voies restent encore à explorer.

Références bibliographiques

- Ahern H., Walsh K., Hill T. Moffett B. (2007). Fluorescent *Pseudomonads* isolated from hebridean cloud and rain water produce biosurfactants but do not cause ice nucleation, *Biogeosciences*, 4, 115-124.
- Amann, R. I., Ludwig, W., 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., 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. (2006). Thèse de Doctorat. Les communautés microbiennes de l'eau des nuages : Implication dans le chimie atmosphérique. Université Clermont-Ferrand II (France).
- Amato, P., Demeer, F., Melaouhi, A., Fontanella, S., Martin-Biesse, A.-S., Sancelme, M., Delort, A.-M. (2007a). A fate for organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by micro-organisms. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 7, 5253–5276.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., Delort, A. M. (2007b). Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: Major groups and growth abilities at low temperatures. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 242-254.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., Delort, A. M. (2007c). An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the Puy de Dôme (France). *Atmospheric Environment*, 41, 8253–8263.
- Anastasio, C., Faust, B. C., Allen, J. M. (1994). Aqueous phase photochemical formation of hydrogen peroxide in authentic cloud waters. *Journal of Geophysical Research*, 99, 8231.
- Ariya, P. A., Nepotchaykh, O., Ignatova, O., Amyot, M. (2002). Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. *Geophysical Research Letters*, 29, 2077.
- Ariya, P. A., & Amyot, M. (2004). New Directions: The role of bioaerosols in atmospheric chemistry and physics. *Atmospheric Environment*, 38, 1231-1232.
- Barth, M. C., Hegg, D. A., Hobbs, P. V., Walega, J. G., Kok, G. L., Heikes, B. G., 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.
- Bauer, H., Kasper-Giebl, A., Löflund, M., Giebl, H., Hitzemberger, R., Zibuschka, F., Puxbaum, H. (2002). The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. *Atmospheric Research*, 64, 109-119.
- Bauer, H. (2003). Airborne bacteria as cloud condensation nuclei. *Journal of Geophysical Research*, 108, 1-5.
- Becker, K.H.; Brockmann, K.J.; Bechara, J. (1990). Production of hydrogen peroxide in forest air by reaction of ozone with terpenes. *Nature*, 346, 256-258.
- Berges, J.A., Montagnes, D.J.S., Hurd, C.L., Harrison, P.J. (1994). Fitting ecological and physiological data to rectangular hyperbolae: a comparison of methods using Monte Carlo simulation. *Marine Ecology Progress Series*, 114, 175-183.
- Bernard, L., Schäfer, H., Joux, F., Courties, C., Muyzer, G., Lebaron, P. (2000). Genetic diversity of total, active and culturable marine bacteria in coastal seawater. *Aquatic Microbial Ecology*, 23, 1-11.
- Bianco, A., Passananti, M., Perroux, H., Voyard, G., Mouchel-Vallon, C., Chaumerliac, N., 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., Passananti, M., Deguillaume, L., Mailhot, G., Brigante, M. (2016a). Tryptophan and tryptophan-like substances in cloud water: Occurrence and photochemical fate. *Atmospheric Environment*, 137, 53-61.
- Bianco, A., Voyard, G., Deguillaume, L., Mailhot, G., Brigante, M. (2016b). Improving the characterization of dissolved organic carbon in cloud water: Amino acids and their impact on the oxidant capacity. *Scientific Reports*, 6, 37420.
- Blanchard, D. C. (1989). The Ejection of Drops from the Sea and with Bacteria and Their Enrichment A Review Other Materials: *Estuaries*, 12, 127-137.
- Blando, J. D., & Turpin, B. J. (2000). Secondary organic aerosol formation in cloud and fog droplet: A literature evaluation of plausibility. *Atmospheric Environment*, 34, 1623-1632.
- Bowers, R. M., McCubbin, I. B., Hallar, A. G., Fierer, N. (2012). Seasonal variability in

- airborne bacterial communities at a high-elevation site. *Atmospheric Environment*, 50, 41-49.
- Branzei, D., & Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 297-308.
- Burrows, S. M., Elbert, W., Lawrence, M. G., 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.
- Carlton, A. G., Turpin, B. J., Lim, H. J., Altieri, K. E., Seitzinger, S. (2006). Link between isoprene and secondary organic aerosol (SOA): Pyruvic acid oxidation yields low volatility organic acids in clouds. *Geophysical Research Letters*, 33, 2-5.
- Carmel-Harel, O., & Storz, G. (2000). Roles of the Glutathione- and Thioredoxin-Dependent Reduction Systems in the *Escherichia Coli* and *Saccharomyces Cerevisiae* Responses to Oxidative Stress. *Annual Review of Microbiology*, 54, 439-461.
- Charbouillot, T. (2011). Thèse de Doctorat. Physico-chimie de la phase aqueuse des nuages prélevée au sommet du puy de Dôme: caractérisation et réactivité photochimique, Université de Clermont-Ferrand II, Clermont-Ferrand (France). Disponible à l'adresse : <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00697018>
- Chebbi, A., & Carlier, P. (1996). Carboxylic acids in the troposphere, occurrence, sources, and sinks: A review. *Atmospheric Environment*, 30, 4233-4249.
- Cheize, M., Sarthou, G., Croot, P. L., Bucciarelli, E., Baudoux, A. (2012). Iron organic speciation determination in rainwater using cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 736, 45-54.
- Cini, R., Prodi, F., Santachiara, G., Porcù, F., Bellandi, S., Stortini, A.M., Oppo, C., Udisti, R., Pantani, F. (2002) "Chemical characterization of cloud episodes at a ridge site in Tuscan Appennines, Italy" *Atmospheric Research*, 61, 311-334.
- Claiborn, C. S., & Aneja, V. P. (1991) Measurements of Atmospheric Hydrogen Peroxide in the Gas Phase and in Cloud Water at Mt. Mitchell, North Carolina, *Journal of Geophysical Research*, 96, 18771-18787.
- Coohill, T. P., & Sagripanti, J. L. (2009). Bacterial inactivation by solar ultraviolet radiation compared with sensitivity to 254 nm radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 85, 1043-1052.

- Côté, V., Kos, G., Mortazavi, R., Ariya, P. A. (2008). Microbial and “de novo” transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi. *Science of the Total Environment*, 390, 530-537.
- Dalatre, J., Beaudoux, J., Bonnefont-Rousselot, D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant: Aspects biologiques et pathologiques. Editions Tec & Doc, Paris, France, 549.
- Deguillaume, L., Leriche, M., Monod, A., 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., Chaumerliac, N. (2005). Transition metals in atmospheric liquid phases: Sources, reactivity, and sensitive parameters. *Chemical Reviews*, 105, 3388–3431.
- Deguillaume, L., Desboeufs, K. V., Leriche, M., Long, Y., 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., 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., Latham, T. L., Rodriguez-R, L. M., Barazesh, J. M., Anderson, B. E., Beyersdorf, A. J., Ziemba, L.D., Bergin, M., Nenes, A., 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 of the United States of America*, 110, 2575-2580.
- 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. *Atmospheric Research*, 98, 249-260.
- Delort, A.M., Bianco, A., Brigante, M. (2016). Les microorganismes : acteurs oubliés de la chimie des nuages. Compétition avec les voies de phototransformation. *Revue des questions scientifiques*, 187, 473-476.
- DeMott P. J. & Prenni A. J. (2010). New directions: need for defining the numbers and

- sources of biological aerosols acting as ice nuclei, *Atmospheric Environment*, 44, 1944-1945.
- Desboeufs, K. V., Sofikitis, A., Losno, R., Colin, J. L., Ausset, P. (2005). Dissolution and solubility of trace metals from natural and anthropogenic aerosol particulate matter. *Chemosphere*, 58, 195-203.
- Deutsch, F., Hoffmann, P., Ortner, H. M. (2001). Field experimental investigations on the Fe(II)- and Fe(III)-content in cloudwater samples, *Journal of Atmospheric Chemistry*, 40, 87-105.
- Eisenthal R. (1974). The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters, *Biochemical Journal*, 139, 715-720.
- Ekström, S., Nozière, B., Hultberg, M., Alsberg, T., Magnér, J., Nilsson, E. D., Artaxo, P. (2010). A possible role of ground-based microorganisms on cloud formation in the atmosphere. *Biogeosciences*, 7, 387–394.
- Erel, Y., Pehkonen, S. O., Hoffmann, M. R. (1993). Redox chemistry of iron in fog and stratus clouds. *Journal of Geophysical Research*, 98, 18423.
- Ervens, B., George, C., Williams, J. E., Buxton, G. V, Salmon, G. A., Bydder, M., Wilkinson, F., Dentener, F., Mirabel, P., Wolke, R., Herrmann, H. (2003). CAPRAM 2.4 (MODAC mechanism): An extended and condensed tropospheric aqueous phase mechanism and its application. *Journal of Geophysical Research*, 108, 4426.
- Ervens, B., Feingold, G., Clegg, S. L., Kreidenweis, S. M. (2004). A modeling study of aqueous production of dicarboxylic acids: 2. Implications for cloud microphysics. *Journal of Geophysical Research D: Atmospheres*, 109, 1–12.
- Ervens, B., Wang, Y., Eagar, J., Leaitch, W. R., Macdonald, A. M., Valsaraj, K. T., Herckes, P. (2013). Dissolved organic carbon (DOC) and select aldehydes in cloud and fog water: The role of the aqueous phase in impacting trace gas budgets. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 13, 5117–5135.
- Ervens, B. (2015). Modeling the Processing of Aerosol and Trace Gases in Clouds and Fogs. *Chemical Reviews*, 115, 4157–4198.
- Fahlgren, C., Hagström, Å., Nilsson, D., Zweifel, U. L. (2010). Annual variations in the diversity, viability, and origin of airborne bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3015–3025.

- Fan W-M. (1996). Metabolite profiling by one-and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 28,161-219.
- Farr, S. B., & Kogoma, T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews*, 55, 561–585.
- Fekete, F. A. (1993). Assays for microbial siderophores. In L. B. C. Hemming (Ed.), *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms*. Academic Press, 399–417.
- Feng, J., & Möller, D. (2004). Characterization of water-soluble macromolecular substances in cloud water. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 48, 217–233.
- Fuzzi, S., Mandrioli, P., Perfetto, A. (1997). Fog droplets-an atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmospheric Environment*, 31, 287–290.
- Gärdes, A., Triana, C., Amin, S. A., Green, D. H., Romano, A., Trimble, L., Carrano, C. J. (2013). Detection of photoactive siderophore biosynthetic genes in the marine environment. *BioMetals*, 26, 507–516.
- Gledhill, M., & Buck, K. N. (2012). The organic complexation of iron in the marine environment: A review. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–17.
- Gourmelon, M., Cillard, J., Pommepuy, M. (1994). Visible-Light Damage To *Escherichia-Coli* in Seawater - Oxidative Stress Hypothesis. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 105–112.
- Grabovsky, R.I. (1951). On chloride concentration in precipitation and cloud water, *Vestnik LAGU*, 10.
- Gregory, P. H. (1970). Airborne Microbes: Their Significance and Distribution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 177, 469-483
- Grosjean, D., & Wright, B. (1983). Carbonyls in urban fog, ice fog, cloudwater and rainwater. *Atmospheric Environment (1967)*, 17, 2093–2096.
- Gu, M., & Imlay, J. A. (2013). Superoxide poisons mononuclear iron enzymes by causing mismetallation: Superoxide poisons mononuclear iron enzymes. *Molecular Microbiology*, 89, 123–134.
- Gunz, D. W., & Hoffmann, M. R. (1990). Atmospheric chemistry of peroxides: a review. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics*, 24, 1601-1633.

- Haddock, B. A., & Jones, C. W. (1977). Bacterial respiration. *Bacteriological Reviews*, 41, 47.
- Halliwell, B. (1978). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS Letters*, 92, 321-326.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001). Past Palaeontological Statistics, ver. 1.79., (1999), 1–66. Retrieved from <http://folk.uio.no/ohammer/past>.
- Hassan, H. M., & Fridovich, I. (1978). Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 253, 8143–8148.
- Hegg, D. A., Gao, S., Jonsson, H. (2002). Measurements of selected dicarboxylic acids in marine cloud water. *Atmospheric Research*, 62, 1–10.
- Herckes, P., Valsaraj, K. T., Collett, J. L. (2013). A review of observations of organic matter in fogs and clouds: Origin, processing and fate. *Atmospheric Research*, 132–133, 434–449.
- Herlihy, L.J., Galloway, J.N., Mills, A.L. (1987) Bacterial utilization of formic and acetic acid in rainwater, *Atmospheric Environment*, 21, 2397-2402.
- Herrmann, H., Schaefer, T., Tilgner, A., Styler, S. A., Weller, C., Teich, M., Otto, T. (2015). Tropospheric Aqueous-Phase Chemistry: Kinetics, Mechanisms, and Its Coupling to a Changing Gas Phase. *Chemical Reviews*, 115, 4259–4334.
- Hewitt, C.N.; Kok, G.L.; Fall, R. (1990). Hydroperoxides in plants exposed to ozone mediate air pollution damage to alkene emitters. *Nature*, 344, 56-58.
- Hewitt, C.N. & Kok, G.L. (1991). Formation and occurrence of organic hydroperoxides in the troposphere: Laboratory and field observation. *Journal of Atmospheric Chemistry*. 1991, 12, 181-194.
- Hill, K. A., Shepson, P. B., Galbavy, E. S., Anastasio, C., Kourtev, P. S., Konopka, A., Stirm, B. H. (2007). Processing of atmospheric nitrogen by clouds above a forest environment. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 112, 1–16.

- Hill, T.C.J., DeMott, P.J., Conen, F. and Möhler, O. (2017). Chapter 3.1 Impacts of bioaerosols on atmospheric ice nucleation processes, *Microbiology of aerosols*, in press. Ed A-M Delort, P. Amato, Wiley.
- Hoffmann, P., Dedik, A.N., Deutsch, F., Sinner, T., Weber, S., Eichler, R., Sterkel, S., Sastri, C.S., Ortner, H.M. (1997). Solubility of single chemical compounds from an atmospheric aerosol in pure water. *Atmospheric Environment*, 31, 2777–2785.
- Hoose, C., & Möhler, O. (2012). Heterogeneous ice nucleation on atmospheric aerosols: a review of results from laboratory experiments. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 1, 9817-9854.
- Husárová, S., Vařtilingom, M., Deguillaume, L., Traikia, M., Vinatier, V., Sancelme, M., Amato, P., Matulová, M., 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., Triplett Kingston, J., 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.
- Igawa M., Munger, J.W., Hoffmann, M. R. (1989). Analysis of aldehydes in cloud- and fogwater samples by HPLC with a postcolumn reaction detector. *Environmental Science and Technology*, 23, 556–561.
- Imlay, J. A. (1995). A Metabolic Enzyme That Rapidly Produces Superoxide, Fumarate Reductase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 19767–19777.
- Jackson, A. V., & Hewitt, C. N. (1996). Hydrogen peroxide and organic hydroperoxide concentrations in air in a eucalyptus forest in central Portugal. *Atmospheric Environment*, 30, 819–830.
- Jenkin, M. E., Young, J. C., Rickard, A. R. (2015). The MCM v3.3.1 degradation scheme for isoprene. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 15, 11433–11459.
- Joly, M. (2013). Thèse de Doctorat. Interactions Microorganismes-Nuage : Activité Glaçogène et Survie. Université Clermont-Ferrand II (France).
- 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. *Atmospheric Environment*, 117, 92–98.

- Keene, W. C., & Galloway, J. N. (1986). Considerations regarding sources for formic and acetic acids in the troposphere. *Journal of Geophysical Research*, 91, 14466–14474.
- Kelly, T. J., Daum, P. H., Schwartz, S. E. (1985). Measurements of Peroxides in Cloudwater and Rain. *Journal of Geophysical Research - Atmospheres*, 90, 7861–7871.
- Khare, P., Kumar, N., Kumari, K. M., Srivastava, S. S. (1999). Atmospheric formic and acetic acids: An Overview. *Reviews of Geophysics*, 37, 227-248.
- Khwaja, H. A. (1995). Atmospheric Concentrations Acids and Related Compounds Site of Carboxylic At a Semiurban. *Atmospheric Environment*, 29, 127–139.
- Kieber, R. J., Rhines, M. F., Willey, J. D., Avery, G. B. (1999). Rainwater formaldehyde: Concentration, deposition and photochemical formation. *Atmospheric Environment*, 33, 3659–3667.
- Koppenol, W.H. (2001). The Haber-Weiss cycle - 70 years later. *Redox Report Communications in Free Radical Research*, 6, 229-234.
- Kourtev, P. S., Hill, K. A., Shepson, P. B., Konopka, A. (2011). Atmospheric cloud water contains a diverse bacterial community. *Atmospheric Environment*, 45, 5399–5405.
- Koutny, M., Sancelme, M., Dabin, C., Pichon, N., Delort, A-M., Lemaire, J. (2006). Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability*, 91, 1495-1503.
- Kroll, J. H., & Seinfeld, J. H. (2008). Chemistry of secondary organic aerosol: Formation and evolution of low-volatility organics in the atmosphere. *Atmospheric Environment*, 42, 3593–3624.
- Kume, A., Arakaki, T., Tsuboi, N., Suzuki, M., Kuramoto, D., Nakane, K., Sakugawa, H. (2001). Harmful effects of radicals generated in polluted dew on the needles of Japanese Red pine (*Pinus densiflora*). *New Phytologist*, 152, 53–58.
- Lazrus, A. L., Kok, G. L., Gitlin, S. N., Lind, J. A., McLaren, S. E. (1985). Automated fluorimetric method for hydrogen peroxide in atmospheric precipitation. *Analytical Chemistry*, 57, 917–922.
- Leclair, J. P., Collett, J. L., Mazzoleni, L. R. (2012). Fragmentation analysis of water-soluble atmospheric organic matter using ultrahigh-resolution FT-ICR mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, 46, 4312–4322.

- Li, J., Mailhot, G., Wu, F., Deng, N. (2010). Photochemical efficiency of Fe(III)-EDDS complex: OH radical production and 17 β -estradiol degradation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 212, 1–7.
- Lighthart, B. (1997). The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere, *FEMS Microbiology Ecology*, 23, 263-274.
- Lim, H. J., Carlton, A. G., Turpin, B. J. (2005). Isoprene forms secondary organic aerosol through cloud processing: Model simulations. *Environmental Science and Technology*, 39, 4441–4446.
- Lin, C. Y., Wu, H., Tjeerdema, R. S., Viant, M. R. (2007). Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics*, 3, 55–67.
- Lindemann, J., & Upper, C. D. (1985). Aerial Dispersal of Epiphytic Bacteria over Bean Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 1229–32.
- Löflund, M., Kasper-Giebl, A., Schuster, B., Giebl, H., Hitzemberger, R., 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.
- MacRae, E. a., & Ferguson, I. B. (1985). Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. *Physiologia Plantarum*, 65, 51–56.
- Mahowald, N. M., Engelstaedter, S., Luo, C., Sealy, A., Artaxo, P., Benitez-Nelson, C., Bonnet, S., Chen, Y., Chuang, P.Y., Cohen, D.D., Dulac, F., Herut, B., Johansen, A.M., Kubilay, N., Losno, R., Maenhaut, W., Paytan, A., Prospero, J.M., Shank, L.M., Siefert, R. L. (2009). Atmospheric iron deposition: global distribution, variability, and human perturbations. *Annual Review of Marine Science*, 1, 245–278.
- Marinoni, A., Laj, P., Sellegri, K., Mailhot, G. (2004). Cloud chemistry at the Puy de Dôme: variability and relationships with environmental factors. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 4, 715–728.
- 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. *Atmospheric Research*, 101, 256–263.

- Marks, R., Kruczalok, K., Jankowska, K., Michalska, M. (2001). Bacteria and fungi in air over the Gulf of Gdańsk and Baltic sea. *Journal of Aerosol Science*, 32, 237–250.
- Masuch, G., Kettrup, A., Mallant, R.K.A.M.; Slanina, J. (1986). Effects of H₂O₂ Containing Acidic For on Young Trees. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 27, 183-213.
- 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. *Environmental Science and Technology*, 48, 14238–14247.
- Matus, A. V., & L'Ecuyer, T. S. (2017). The role of cloud phase in Earth's radiation budget. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*. DOI: 10.1002/2016JD025951.
- Mayol, E., Jiménez, M.A., Herndl, G.J., Duarte, C.M., Arrieta, J.M. (2014). Resolving the abundance and air-sea fluxes of airborne microorganisms in the North Atlantic Ocean. *Frontiers in Microbiology Aquatic Microbiology*, doi.org/10.3389/fmicb.2014.00557.
- Meier, F. C., & Lindbergh, C. A. (1935). Collecting Micro-Organisms from the Arctic Atmosphere: With Field Notes and Material, *The Scientific Monthly*, 40, 5-20.
- Miller, A.-F. (2012). Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters*, 586, 585–595.
- Möhler, O., DeMott, P. J., Vali, G., Levin, Z. (2007). Microbiology and atmospheric processes: the role of biological particles in cloud physics. *Biogeosciences Discussions*, 4, 2559–2591.
- Monks, P. S. (2005). Gas-phase radical chemistry in the troposphere. *Chemical Society Reviews*, 34, 376–395.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. a, Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., Yan, S., Dominguez, H., Thompson, B. M. (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME Journal*, 2, 321–334.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Bardin, M., Jaenicke, R., Vogel, B., Leyronas, C., Ariya, P.A., 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.

- Mouchel-Vallon, C., Deguillaume, L., Monod, A., Perroux, H., Rose, C., Ghigo, G., Long, Y., Leriche, M., Aumont, B., Patryl, L., Armand, P. Chaumerliac, N. (2017). CLEPS: A new protocol for cloud aqueous phase oxidation of VOC mechanisms. *Geoscientific Model Development*. doi: 10.5194/gmd-2016-250.
- Nicholson J.K., Foxall P.J., Spraul M., Farrant R.D., Lindon J.C. (1995). 750 MHz ^1H and ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Analytical Chemistry*, 67, 793-811.
- Ogilby, R. (2010). Singlet oxygen: there is indeed something new under sun. *Chemical Society Reviews*, 39, 3181-3209.
- Oka, S.I., Hsu, C.-P., Sadoshima, J. (2012). Regulation of Cell Survival and Death by Pyridine Nucleotides. *Circulation Research*, 111, 611–627.
- Okita, T.& Ohta, S. (1979). Measurements of nitrogenous and other compounds in the atmosphere and in cloudwater - A study of the mechanism of formation of acid precipitation. *Environmental Sciences Ann Arbor Science Publishers*, 14, 289–305.
- Olszyna, K. J., Meagher, J. F., Bailey, E. M., Branch, A. Q., Authority, T. V., Shoals, M. (1988). Gas- phase, cloud and rain water measurements of hydrogen peroxide at a high-elevation, *Atmospheric Environment*, 22, 1699 –1706.
- Ortiz, V., Rubio, M.A., & Lissi, E. A. (2000). Hydrogen peroxide deposition and decomposition in rain and dew waters. *Atmospheric Environment*, 34, 1139–1146.
- Padan, E., Bibi, E., Ito, M., Krulwich, T. A. (2005). Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1717, 67–88.
- Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Abida, O., Laj, P., Mailhot, G. (2006). Speciation and role of iron in cloud droplets at the puy de Dôme station. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 54, 267–281.
- Passananti, M., Vinatier, V., Delort, A. M., Mailhot, G., Brigante, M. (2016). Siderophores in cloud waters and potential impact on atmospheric chemistry: Photoreactivity of iron complexes under sun-simulated conditions. *Environmental Science and Technology*, 50, 9324–9332.
- Pasteur, L. (1861). Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent en suspension dans l'atmosphère. Examen de la doctrine des générations spontanées, *Compte Rendu de l'Academie des Sciences*, 2.

- Pehkonen, S. O., Erel, Y., Hoffmann, M. R. (1992). Simultaneous spectrophotometric measurement of iron(II) and iron(III) in atmospheric water, *Environmental Science and Technology*, 26, 1731-1736.
- Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, L. S., Fernández, F. J. (2007). O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 127–131.
- Petrenchuk, O.P & Drozdova, V.M. (1966). On the chemical composition of cloud water, Voeikov Main, *Geophysical Observatory*, 18, 280-286.
- Pruppacher, H. R., & Jaenicke, R. (1995). The processing of water vapor and aerosols by atmospheric clouds, a global estimate. *Atmospheric Research*, 38, 283–295.
- Rabinowitz, J. D., & Kimball, E. (2007). Acidic acetonitrile for cellular metabolome extraction from *Escherichia coli*. *Analytical Chemistry*, 79, 6167–6173.
- Raes, F., Dingenen, R. Van, Vignati, E., Wilson, J., Putaud, J.-P., Seinfeld, J. H., Adams, P. (2000). Formation and cycling of aerosols in the global troposphere. *Atmospheric Environment*, 34, 4215–4240.
- Rao, X., & Collett, J. L., Jr. (1995). Behavior of S(IV) and Formaldehyde in a Chemically Heterogeneous Cloud, *Environmental Science and Technology*, 29, 1023-1031.
- Ravishankara, A. R. (1997). Heterogeneous and Multiphase Chemistry in the Troposphere. *Science*, 276, 1058–1065.
- Reasoner, D., & Geldreich, E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1–7.
- Richards L.W. (1995). Airborne chemical measurements in nighttime stratus clouds in the Los Angeles basin. *Atmospheric Environment*, 29, 27-46.
- Sakugawa, H., Kaplan, I. R., Tsai, W., Cohen, Y. (1990). Atmospheric hydrogen peroxide. *Environmental Science and Technology*, 10, 29–32.
- Sakugawa, H., Kaplan, I. R., Shepard, L. S. (1993). Measurements of H₂O₂, Aldehydes and Organic-Acids in Los-Angeles Rainwater - Their Sources and Deposition Rates. *Atmospheric Environment Part B-Urban Atmosphere*, 27, 203–219.

- Sandy, M., & Butler, A. (2009). Microbial iron acquisition: Marine and terrestrial siderophores. *Chemical Reviews*, 109, 4580–4595.
- Šantl-Temkiv T., Finster K., Hansen B. M., Nielsen N. W., Karlson U. G. (2012). The microbial diversity of a storm cloud as assessed by hailstones, *FEMS Microbiology Ecology*, 81, 684-695.
- Šantl-Temkiv, T., Finster, K., Dittmar, T., Hansen, B. M., Thyrhaug, R., Nielsen, N. W., Karlson, U. G. (2013). Hailstones: A Window into the Microbial and Chemical Inventory of a Storm Cloud. *PLoS ONE*, 8. doi:10.1371/journal.pone.0053550.
- Sattler, B., Puxbaum, H., Psenner, R. (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophysical Research Letters*, 28, 239–242.
- Sawerysyn, J.-P. (2008). Chimie mutiphase du formaldéhyde dans la troposphère. *Air Pur*, 74.
- Shaffer B. T. & Lighthart B. (1997). Survey of culturable airborne bacteria at four diverse locations in Oregon: urban, rural, forest, and coastal, *Microbial Ecology*, 34, 167–177.
- Shmeter, S.M. (1952). On content of chloride in cloud water in connection with fine-scale structure, *Trudy ZAO*, 9.
- Schwartz., S.E. (1986). Mass-transport considerations pertinent to aqueous phase reactions of gases in liquid water clouds. *Chemistry of Multiphase Atmospheric Systems*, 415–471.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, 47–56.
- Sedlak, D. L., & Hoigné, J. (1993). The role of copper and oxalate in the redox cycling of iron in atmospheric waters. *Atmospheric Environment Part A, General Topics*, 27, 2173–2185.
- Sedlak, D.L., Hoigné, J., David, M.M., Colville, R.N., Seyffer, E., Acker, K., Wiepercht, W., Lind, J.A. (1997). "The cloudwater chemistry of iron and copper at Great Dun Fell, U.K". *Atmospheric Environment*, 31, 2515–2526.
- Sellegri, K., Laj, P., Marinoni, A., Dupuy, R., Legrand, M., Preunkert, S. (2003). Contribution of gaseous and particulate species to droplet solute composition at the Puy de Dome, France. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 3, 1509–1522.

- Simonaitis, R., Olszyna, K.J.; Meagher, J.F. (1991). Production of hydrogen peroxide and organic peroxide in the gas phase reactions of ozone with natural alkenes. *Geophysical Research Letters*, 18, 9-12.
- Singh, R., Mailloux, R. J., Puisseux-Dao, S., Appanna, V. D. (2007). Oxidative Stress Evokes a Metabolic Adaptation That Favors Increased NADPH Synthesis and Decreased NADH Production in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 189, 6665–6675.
- Sullivan, T. S., Ramkissoon, S., Garrison, V. H., Ramsubhag, A., Thies, J. E. (2012). Siderophore production of African dust microorganisms over Trinidad and Tobago. *Aerobiologia*, 28, 391–401.
- Sun, J., & Ariya, P. (2006). Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review. *Atmospheric Environment*, 40, 795–820.
- Svensson, S., Olin, A.-C., Lärstad, M., Ljungkvist, G., Torén, K. (2004). Determination of hydrogen peroxide in exhaled breath condensate by flow injection analysis with fluorescence detection. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 809, 199–203.
- Tamarit, J., Cabisco, E., Ros, J. (1998). Identification of the Major Oxidatively Damaged Proteins in *Escherichia coli* Cells Exposed to Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 3027–3032.
- Tanaka, K., Otsubo, T., Kondo, N. (1982). Participation of Hydrogen Peroxide in the Inactivation of Calvin-Cycle SH Enzymes in SO₂-Fumigated Spinach Leaves, *Plant and Cell Physiology*, 23, 1009–1018.
- Tanaka, K., Suda, Y., Kondo, N., Sugahara, K. (1985). O₃ Tolerance and the Ascorbate-Dependent H₂O₂ Decomposing System in Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 26, 1425–1431.
- Tilgner, A., & Herrmann, H. (2010). Radical-driven carbonyl-to-acid conversion and acid degradation in tropospheric aqueous systems studied by CAPRAM. *Atmospheric Environment*, 44, 5415–5422.
- Tong, Y., & Lighthart, B. (1997). Solar radiation has a lethal effect on natural populations of culturable outdoor atmospheric bacteria. *Atmospheric Environment*, 31, 897–900.

- Tremmel, H. G., Junkermann, W., Slemr, F., Platt, U. (1993). On the distribution of hydrogen peroxide in the lower troposphere over the northeastern United States during late summer 1988. *Journal of Geophysical Research*, 98, 1083–1099.
- Tremmel, H. G., Junkermann, W., Slemr, F. (1994). Distribution of organic hydroperoxides during aircraft, *Journal of Geophysical Research*, 99, 5295–5307.
- Vaïtilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Laj, P., Leriche, M., Delort, A. M. (2010). Contribution of microbial activity to carbon chemistry in clouds. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 23–29.
- Vaïtilingom, M., Charbouillot, T., Deguillaume, L., Maisonobe, R., Parazols, M., Amato, P., ... 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., 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., 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.
- Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlahogianni, T., Bakeas, E. B., Triantafillaki, S., Paraskevopoulou, V., Dassenakis, M. (2006). Characterization of atmospheric particulates, particle-bound transition metals and polycyclic aromatic hydrocarbons of urban air in the centre of Athens (Greece). *Chemosphere*, 65, 760–768.
- Valverde-Canossa, J., Wieprecht, W., Acker, K., Moortgat, G. K. (2005). H₂O₂ 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., Svrčina, B., Bächmann, K., Jaeschke, W., Mertes, S., Collett J.r J.L., Herrmann, H. (2005). Schmücke hill cap cloud and valley stations aerosol characterisation during FEBUKO (II): Organic compounds. *Atmospheric Environment*, 39, 4305–4320.

- Vander Heyden, Y., Nguyen Minh Nguyet, A., Detaevernier, M. R., Massart, D. L., Plaizier-Vercammen, J. (2002). Simultaneous determination of ketoconazole and formaldehyde in a shampoo: liquid chromatography method development and validation. *Journal of Chromatography A*, 958, 191–201.
- Vione, D., Maurino, V., Minero, C., Pelizzetti, E. (2003). The atmospheric chemistry of hydrogen peroxide: a review. *Annali Di Chimica*, 93, 477–488.
- Wang, X., Fang, H., Huang, Z., Shang, W., Hou, T., Cheng, A., Cheng, H. (2013). Imaging ROS signaling in cells and animals. *Journal of Molecular Medicine*, 91, 917–927.
- Watanabe, K.; Ishizaka, Y.; Takenaka, C. (1999). Chemical composition of fog water near the summit of Mt. Norikura in Japan. *Journal. of Meteorological Society of Japan*, 77, 997-1006.
- Watanabe, K.; Ishizaka, Y.; Minami, Y.; Yoshida, K. (2001). Peroxide concentrations in fog water at mountainous sites in Japan. *Water, Air and Soil Pollution*, 130, 1559-1564.
- Watkins, B.A.; Parrish, D.D.; Trainer, M.; Norton, R.B.; Yee, J.E.; Fehsenfeld, F.C., Heikes, B.G. (1995a) Factors influencing the concentration of gas phase hydrogen peroxide during the summer at Niwot Ridge, Colorado. *Journal of Geophysical Research*, 100, 22831-22840.
- Watkins, B.A.; Parrish, D.D.; Burh, S.; Norton, R.B.; Trainer, M., Yee, J.E.; Fehsenfeld, F.C. (1995b) Factors influencing the concentration of gas phase hydrogen peroxide during the summer at Kinterbish, Alabama. *Journal of Geophysical Research*, 100, 22841-22851.
- Wilkinson, J., Reynolds, B., Neal, C., Hill, S., Neal, M. Harrow, M. (1997) "Major, minor and trace element composition of cloudwater and rainwater at Plynlimon" *Hydrology and Earth System Sciences*, 1, 557-569
- Williams, J., de Reus, M., Krejci, R., Fischer, H., Ström, J. (2002). Application of the variability-size relationship to atmospheric aerosol studies: estimating aerosol lifetimes and ages. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 2, 43–74.
- Willker, W., Engelmann, J., Brand, A., Leibfritz, D. (1996). Metabolite identification in cell extracts and culture media by proton detected 2D-H-C-NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance Analytical*, 2, 21-32.

- Wittmaack, K., Wehnes, H., Heinzmann, U., Agerer, R. (2005). An overview on bioaerosols viewed by scanning electron microscopy. *Science of the Total Environment*, 346, 244–255.
- Xu, C., Wei, M., Chen, J., Sui, X., Zhu, C., Li, J., Zheng, L., Sui, G., Li, W., Wang, W., Zhang, Q., Mellouki, A. (2017). Investigation of diverse bacteria in cloud water at Mt Tai, China. *Science of the Total Environment*, 580, 258-265.
- Yamashita, T.; Sakugawa, H.; Fujiwara, K. (1994). Measurements of hydrogen peroxide in the atmosphere and rainwater in Hiroshima and Higashi-Hiroshima, Japan. *Nippon Kagaku Kaishi*, 12, 1127.

Table des illustrations

Figures

- Figure 1:** Analyse en composantes principales réalisée à partir des paramètres mesurés dans les échantillons d'eau nuageuse (pH, [Na⁺], [Cl⁻], [SO₄²⁻], [NO₃], [NH₄⁺]) pour 56 événements nuageux distincts. 12
- Figure 2:** Secteurs définis par l'analyse des rétro-trajectoires des masses d'air impliquées dans la formation des nuages collectés au sommet du puy de Dôme. Le pourcentage donné en noir représente la proportion des événements nuageux pour chaque secteur. Les pourcentages en couleur représentent la proportion des événements nuageux pour chaque secteur selon leur classe. 13
- Figure 3:** Représentation schématique des possibles voies de fragmentation (en acides carboxyliques puis minéralisation en CO₂) et d'augmentation de la taille (jusqu'à la formation de substances type humiques, HULIS et FULIS) de la matière organique présente dans le nuage suite aux réactions avec les radicaux hydroxyles. 15
- Figure 4:** Principales voies de production/destruction des H_xO_y en phase gazeuse et aqueuse. 18
- Figure 5:** Les différentes sources de peroxyde d'hydrogène en phase aqueuse..... 20
- Figure 6:** A gauche : Images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) de différents types de bioaérosols. A et B : Ecailles d'insectes ; C et D : Spores de champignons filamenteux ; E et F : Bactéries ; G et H : Brochosome ; A droite : Distribution en taille des bioaérosols (µm). 25
- Figure 7:** Schématisation du cycle des microorganismes dans l'atmosphère. Les facteurs représentant des sources de stress sont indiqués en orange. 26
- Figure 8:** Fréquences des genres bactériens majoritaires cultivables déterminées à partir de 24 prélèvements nuageux indépendants collectés au sommet du puy de Dôme (2003-2010). 29
- Figure 9:** Fréquences des levures majoritaires cultivables déterminées à partir de 17 prélèvements nuageux indépendants collectés au sommet du puy de Dôme (2007-2010)... 30
- Figure 10:** Voies métaboliques du cycle de Krebs (voie du citrate) obtenu à partir de Kegg (<http://www.kegg.jp/kegg/>). 32
- Figure 11:** Transformation des composés organiques en C1. A gauche, par voie radicalaire et à droite par voie biologique. 34
- Figure 12:** Evolution de la démarche utilisée pour étudier la dégradation des composés carbonés de l'eau de nuage..... 34
- Figure 13:** Approche expérimentale adoptée dans les travaux de Vaïtilingom et al. (2013). 37
- Figure 14:** Schématisation de la balance oxydative. Un bon équilibre entre les pro-oxydants produits et l'action des antioxydants contribue au maintien de l'homéostasie (processus de

régulation par lequel l'organisme maintient les différentes constantes du milieu intérieur). Lorsque cette balance est déséquilibrée, par une production en excès de pro-oxydants et/ou une trop faible activité antioxydante, l'équilibre redox de la cellule est rompu, engendrant des dommages sur cette dernière : on parle de stress oxydant..... 44

Figure 15: Exposition des microorganismes dans les nuages aux dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). 46

Figure 16: Illustration des différentes défenses antioxydantes mises en jeu lors du stress oxydant..... 47

Figure 17: (A) Structures schématiques du NAD(H) et NADP(H). (B) Formes oxydées et réduites du groupe nicotinamide. Le groupe nicotinamide du NAD⁺ et NADP⁺ acquière deux électrons pour se convertir en NADH et NADPH, respectivement. (C) Aperçu des rôles biologiques des nucléotides à base de pyridine comme porteur d'électrons et médiateurs de signal. Le NADP⁺ est réduit par la voie du pentose phosphate. Le NADPH est utilisé pour piéger les ROS aussi bien par réduction de protéines oxydées *via* les systèmes Trx et GSH. Le NAD⁺ est réduit par plusieurs processus cataboliques (voie de la glycolyse, cycle de Krebs). L'électron provenant du NADH est transféré à la chaîne de transport des électrons pour convertir l'ADP en ATP..... 49

Figure 18: Fonctions chélatantes des trois grandes classes de sidérophores. (a) catécholate ; (b) hydroxamate et (c) carboxylate. 56

Figure 19: Structures de l'entérobactine, la salmochéline S4 et la bacillibactine..... 56

Figure 20 : Exemples de structure de trihydroxamates : lesferrioxamines. 57

Figure 21 : Structure de sidérophores appartenant à la classe des carboxylates et des fonctions mixtes. 57

Figure 22: Structure chimique du chrome azurol S (CAS)..... 58

Figure 23: Plaque deepwell 96 puits. 61

Figure 24: Spectres d'absorbance dans le visible obtenus grâce au lecteur de microplaque (Safire II, Tecan)..... 62

Figure 25: Proposition de mécanismes du complexe fer (III)-Pyo sous irradiation polychromatique. 107

Figure 26: Proportions de complexes de Fer(III) exprimé en pourcentage, à différents ratios oxalate/pyoverdine ([Ox]/[Pyo]) considérant une concentration initiale en Fer(III) de 2 µM et une concentration itiniiale de 2 µM à pH 4 en oxalate et en pyoverdine. 107

Figure 27: Photographie du dispositif expérimental..... 115

Figure 28: Principe et mécanisme réactionnel du dosage de H₂O₂. 116

Figure 29: Plaque noire 96 puits utilisée en fluorescence. 116

Figure 30: Structure du SYBR-Green I. 118

Figure 31: Schématisation de la méthode des dilutions successives.....	119
Figure 32: Différentes étapes d'une expérience type en métabolomique.....	120
Figure 33: Exemple de voies métaboliques (métabolisme du pyruvate) obtenu avec Kegg (http://www.kegg.jp/kegg/).....	122
Figure 34: Démarche expérimentale adoptée pour les expériences de métabolomique.....	124
Figure 35: Illustration du spectre ^1H - ^1H TOCSY obtenu.....	127
Figure 36: Représentation des processus physico-chimiques du module de chimie.....	236
Figure 37: Réaction entre le formaldéhyde et le 2,4 DNPH.....	244
Figure 38: Représentation graphique d'une cinétique de type Michaelienne.....	246
Figure 39: Détermination des constantes cinétiques V_{max} et K_M par la méthode de Cornish-Bowden-Eisenthal.....	247
Figure 40: Détermination des constantes cinétiques V_{max} et K_M par la méthode de Lineweaver-Burk.....	247
Figure 41: Exemple de chromatogrammes obtenus. (a) concentration initiale en acétate de 0,7 mM (temps de rétention de 7,01 min), (1): $t= 0$ et (7): $t= 24\text{h}$, température : 5°C ; (b) concentration initiale en formiate de 0,1 mM (temps de rétention de 7,46 min), (1): $t= 0$ et (5): $t= 5\text{h}$, température : 5°C ; (c) concentration initiale en formaldéhyde de 400 μM (temps de rétention de 10,60 min), (1) : $t= 0$ et (2): $t= 20\text{min}$, température: 17°C	248
Figure 42: Principales voies métaboliques d'oxydation de composés à trois atomes de carbone. Les flèches traduisent des étapes régies par des enzymes.....	249
Figure 43: Représentation graphique d'un exemple de biodégradation obtenue pour le peroxyde d'hydrogène pour une concentration initiale de 20 μM , température: 17°C	250
Figure 44: Réaction entre le peroxyde d'hydrogène et les bactéries.....	250
Figure 45: Représentation graphique de la vitesse de dégradation en fonction de la concentration en substrat à 17°C et 5°C : (a) Formiate (b) Acétate (c) Formaldéhyde (d) Peroxyde d'hydrogène. Les barres d'erreurs illustrent les écarts-types entre les trois réplicats effectués illustrant trois expériences indépendantes (trois cultures différentes).....	252
Figure 46: Interactions entre les microorganismes et les espèces oxydantes des nuages : impact potentiel sur la chimie atmosphérique.....	257

Tableaux

Tableau 1: Concentrations minimales - maximales de l'acide formique et acétique mesurées dans de l'eau nuageuse (μM).....	14
Tableau 2: Concentrations minimales - maximales du formaldéhyde mesurées dans de l'eau nuageuse (μM).....	16
Tableau 3: Concentrations minimales - maximales du peroxyde d'hydrogène mesurées dans de l'eau nuageuse (μM).....	19
Tableau 4: Concentrations minimales - maximales du Fe (II) et Fe (III) mesurées dans de l'eau nuageuse. LD ^a pour Limite de Détection.....	23
Tableau 5: Concentrations minimales - maximales des microorganismes (Bactéries et Champignons/Levures) mesurées dans de l'eau nuageuse (ND pour Non Déterminé).	27
Tableau 6: Récapitulatif des vitesses de dégradation de H_2O_2 ($\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$) dans différentes conditions pour trois prélèvements d'eau nuageuse.....	39
Tableau 7: Aperçu des dérivés réactifs de l'oxygène présents dans les cellules vivantes....	43
Tableau 8: Longueur d'onde maximale d'absorption (nm) de chaque groupement fonctionnel.	62
Tableau 9: Descriptif des souches étudiées.....	113
Tableau 10: Composition chimique (1X) et pH du milieu de nuage artificiel marin utilisé pour les expériences de biodégradation.	114
Tableau 11: Concentrations moyennes, exprimées en μM , des quatre composés d'intérêts, mesurées au puy de Dôme.....	241
Tableau 12: Correspondance Souches/Substrats.....	242
Tableau 13: Récapitulatif des concentrations en substrat étudiées.	243
Tableau 14: Conditions d'analyse du formiate, acétate et formaldéhyde par chromatographie.....	245
Tableau 15: Constantes cinétiques déterminées par la méthode de Cornish-Bowden-Eisenthal et Lineweaver-Burk. Les écarts-types ont été calculés ($n=3$).	253

Annexe

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, Université 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

215

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 (SO₄²⁻), chloride (Cl⁻) and nitrate (NO₃⁻) anions and the alkali and alkaline Earth metals cations (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺), in addition to ammonium (NH₄⁺). These chemical compounds result 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 HNO₃ and NH₃; the sulfate arises from the oxidation of gaseous precursors that are dissolved into cloud droplets such as SO₂. In polluted region, the oxidation of SO₂ and NO₂ is a major source of strong acids H₂SO₄ and HNO₃ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $710 \text{ }\mu\text{M}$ (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 ($\cdot\text{OH}$ and HO_2/O_2^-) and their precursors (H_2O_2 , metals) (Table 10.1). H_2O_2 concentrations are ranging from 0 to $3.2 \text{ }\mu\text{M}$ at Kleiner Feldberg [Germany; Sauer et al. (1996)], from 0.1 to $57.7 \text{ }\mu\text{M}$ at the puy de Dôme, with an average of $7.8 \text{ }\mu\text{M}$

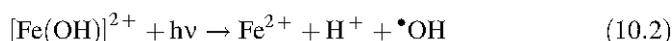
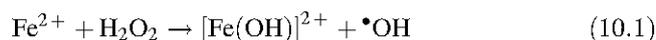
Table 10.1 Observed concentration of carboxylic acids, formaldehyde, hydrogen peroxide, iron and dissolved organic carbon in cloud samples

Chemical compounds	Concentrations (μM)	References
Acetic acid	30.0–84.0	Watanabe et al. (2001)
$\text{CH}_3\text{CO}(\text{OH})$	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)
$\text{CHO}(\text{OH})$	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)
$\text{CO}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}(\text{OH})$	0.1–4.1	Deguillaume et al. (2014)
Malonic acid	0.7–2.9	Löflund et al. (2002)
$\text{CO}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}(\text{OH})$	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)
$\text{CO}(\text{OH})\text{CO}(\text{OH})$	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)
Dissolved Organic Carbon (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. $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $[\text{Fe}(\text{OH})]^{2+}$ aqua-complex that is dominant for atmospheric pH between 3 and 5) accelerating the formation of $\cdot\text{OH}$ in the aqueous phase (Eq. 10.2).



The photolysis of H_2O_2 , NO_3^- and iron(III)-hydroxy complexes are also effective sources of $\cdot\text{OH}$ 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 $\text{HO}_2^*/\text{O}_2^{\cdot-}$ 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

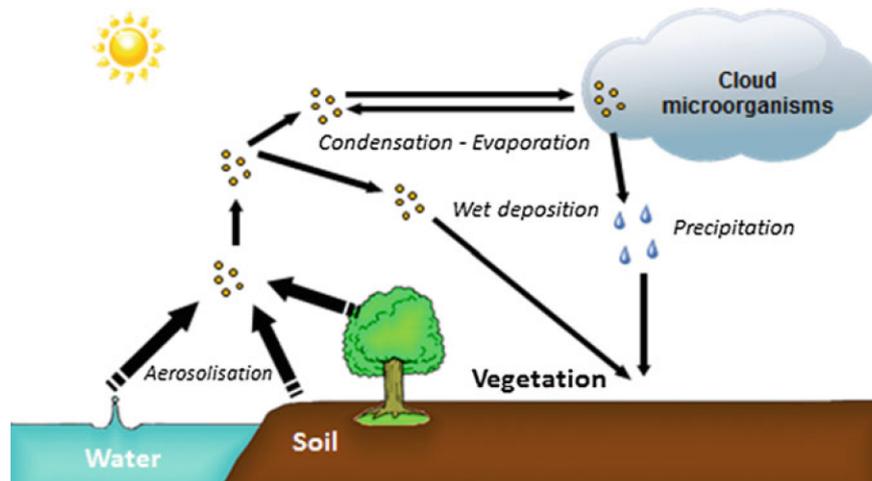


Fig. 10.1 Clouds acts as a transient habitat during the life cycle of microorganisms. Microorganisms are aerosolized, transported *vertically* and *horizontally*, integrated in clouds by condensing water and shuttled down to the ground mainly by precipitation

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 $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ over agricultural areas, Burrows et al. (2009a, b) has evaluated emission rates as low as ~ 1 CFU $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 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 ($>10\ \mu\text{m}$ in diameter) can settle by dry deposition. For particles in the range of $0.1\text{--}10\ \mu\text{m}$ the prominent process of deposition is wet: it requires the presence of condensed water. Finally small particles (from 10^{-4} to $10^{-1}\ \mu\text{m}$) 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 $1\ \mu\text{m}$ 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 $-12\ ^\circ\text{C}$) 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; Vařtilingom 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.) (Vařtilingom 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), Vařtilingom 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)

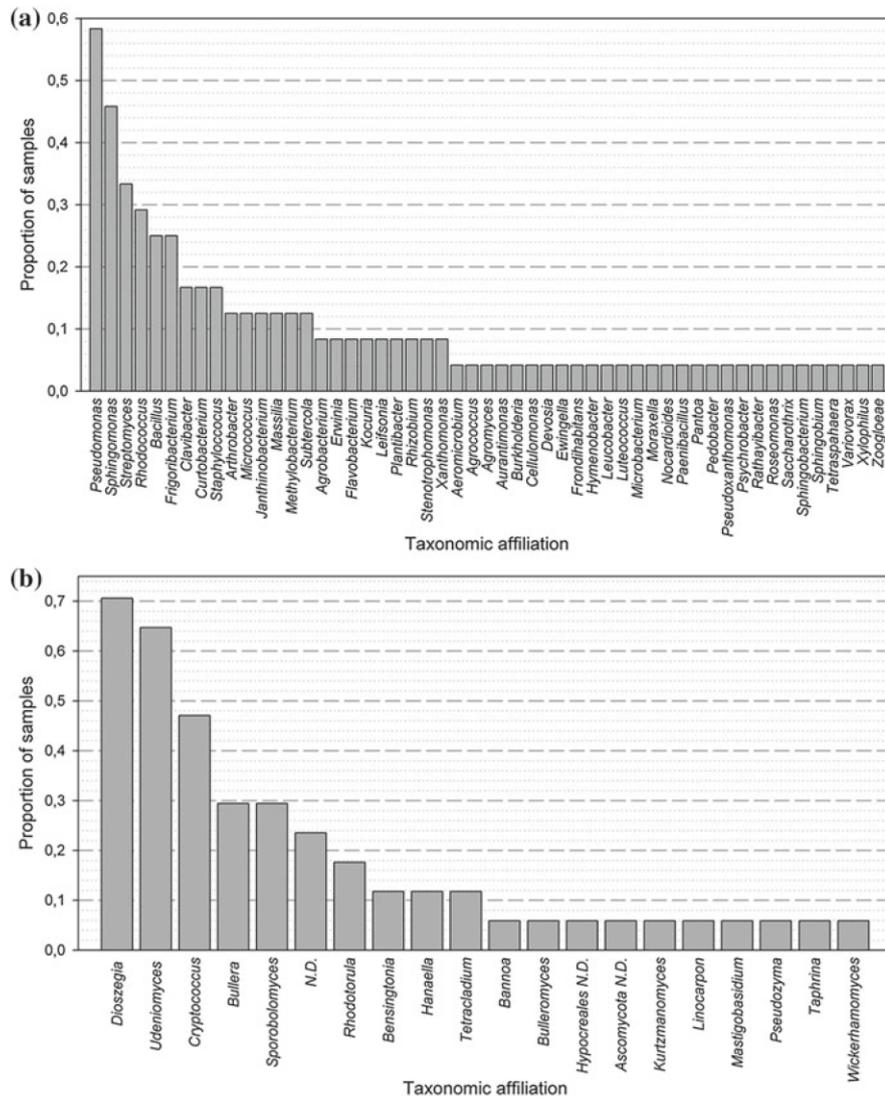


Fig. 10.2 The frequency of cloud events collected at the puy de Dôme submit in which the different genera of bacteria (a) or yeasts (b) were detected viable by culture over the period 2003–2010 (adapted from Väitilingom et al. 2012)

(α -Proteobacteria), *Streptomyces* (Actinobacteria), *Rhodococcus* (Actinobacteria), and *Bacillus* (Firmicutes), while for yeasts *Dioszegia* (Basidiomycota), *Udeniomyces* (Basidiomycota) and *Cryptococcus* (Basidiomycota) 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 *Methylobacteriaceae* 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-³H]thymidine and [¹⁴C]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 studies 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 CO₂ have been identified in 60 cloud strains using ¹H-NMR (Amato et al. 2007b). A more detailed study on a *Bacillus* strain by ¹³C NMR showed that ¹³C-formaldehyde was both reduced to methanol, oxidized to formate and CO₂ 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 methylotroph 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 these sugars measured by ¹H-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; Väitilingom 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 carotenoids 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; Väitilingom 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 (Väitilingom 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 $\cdot\text{OH}$ radicals, H_2O_2 , iron, and solar light. Joly et al. (2015) have investigated the survival of 5 strains isolated from cloud waters towards $100\ \mu\text{M}$ 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 $247\ \mu\text{M}$ (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* (Väitilingom et al. 2012). The results showed that under these conditions close (or slightly overestimating) to what is found in clouds, i.e. $100\ \mu\text{M}$ 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

Taxonomic affiliation and type of microorganism	Survival rates to stresses				Occurrence in clouds ^a (%)
	H ₂ O ₂ (90 min, 100 µM) (%)	Solar light (10 h) (%)	Osmotic shock (1 M NaCl) (%)	Freeze-thaw (10 ⁶ cells mL ⁻¹ , per cycle) (%)	
<i>Dioszegia hungarica</i>	84	37	56	80	71
Yeast					
<i>Sphingomonas</i> sp.	70	101	15	71	46
Gram negative bacterium					
<i>Pseudomonas syringae</i> 32b-74	77	104	78	51	58
Gram negative bacterium					
<i>Pseudomonas syringae</i> 13b-2	94	104	63	45	
Gram negative bacterium					
<i>Arthrobacter</i> sp.	129	96	101	16	13
Gram positive bacterium					

Adapted from Joly et al. (2015)

^aProportion of clouds samples from which representatives of the corresponding genus were detected by culture (data from Vařtilingom 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 (Vařtilingom 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 + H₂O₂) and photochemical reactions (iron + H₂O₂ + light); these reactions generate hydroxyl radicals from H₂O₂ source.
- *biotic + abiotic reactions*: iron + H₂O₂ + 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 H₂O₂ present in the cloud samples, suggesting the presence of very active catalases. In addition the degradation rates of H₂O₂ 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 ($\lambda = 260$ 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 $\cdot\text{OH}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ radicals (Fig. 10.3). These extracellular radicals are produced mainly by direct photolysis of H₂O₂ or by photo-Fenton reactions (Fe + H₂O₂) and can diffuse into the cell across the cytoplasmic membrane. The same type of radicals can also be produced intracellularly when O₂ 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.), glutathione, and pigments (carotenoids) (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; Vaitilingom 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

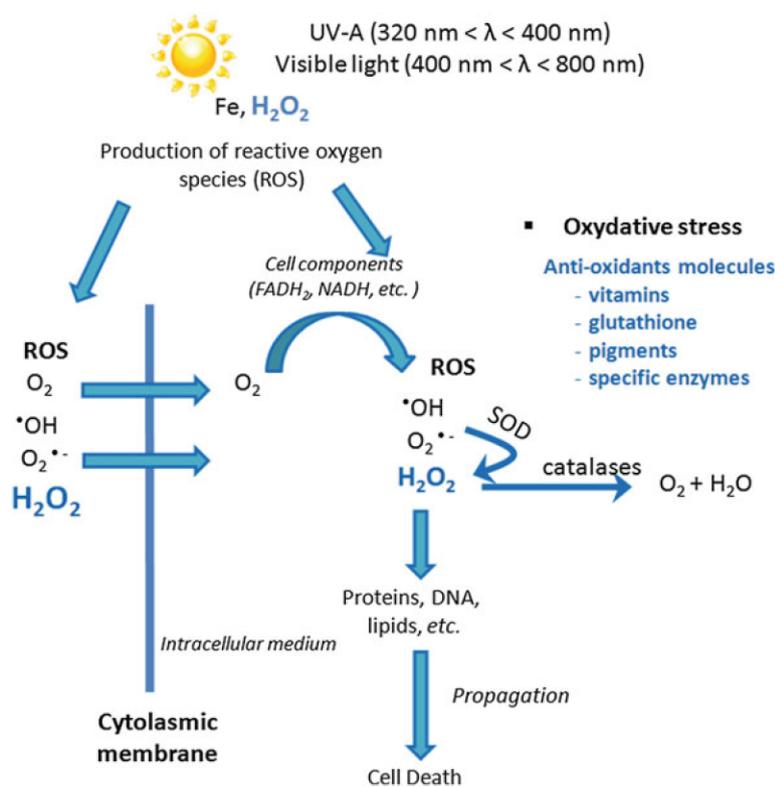


Fig. 10.3 In clouds, microbial cells are exposed to reactive oxygen species (ROS) produced by the uptake of O_2 during respiration or by chemical reactions (photolysis of H_2O_2 , Fenton or photo-Fenton reactions) occurring in cloud water. Cells react to this oxidative stress thanks to the production of vitamins, glutathione, pigments or specific enzymes

oxide dismutase (SOD) is able to transform $\text{O}_2^{\cdot-}$ 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*

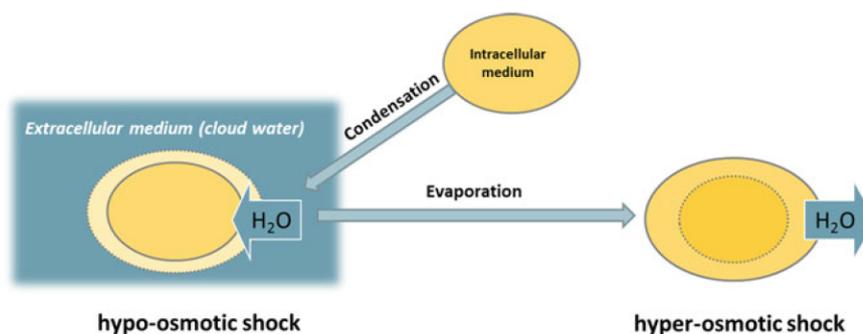


Fig. 10.4 During the evaporation-condensation cycles of cloud droplets, microbial cells experience hyper-osmotic and hypo-osmotic shocks due to the change of solute concentrations surrounding the cells. Cells answer by water efflux or influx modifying the cellular volume

and the *Arthrobacter* 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 *Pseudomonas 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; *Väitilingom 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 (glutathione). 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 ($O_2^{\bullet -}$ and $^{\bullet}OH$) 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 ($-40\text{ }^{\circ}C/+5\text{ }^{\circ}C$) 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.

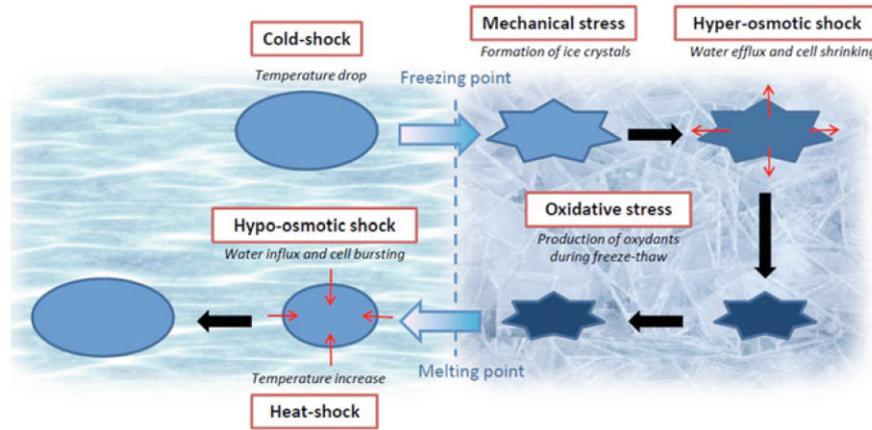


Fig. 10.5 Freeze-thaw cycles: a combination of multiple stresses

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 meta-transcriptomics 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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, Eltoumy 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](https://doi.org/10.1080/01442350802597438)
- Bauer H, Kasper-Giebl A, Löflund M, Giebl H, Hittenberger 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, Hittenberger 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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, Latham 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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.1029/2002jd002202)
- Ervens B, Wang Y, Eagar J, Leitch 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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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 dansylacetamidooxamine 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 al fresco 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, Amy DC, Upper CD (1978) Distribution of ice nucleation-active bacteria on plants in nature. *Appl Environ Microbiol* 36(6):831–838
- Löfflund M, Kasper-Giebl A, Schuster B, Giebl H, Hitznerberger 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, Kruczalac 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 exopolymers by cloud-borne *Bacillus* sp. 3B6. *Environ Sci Technol* 48(24):14238–14247. doi:10.1021/es501350s
- Mayol E, Jiménez MA, Hemdl 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 H₂O₂ 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 Jogadhen 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
- Vaütilingom 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, Maissonobe 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) H₂O₂ 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, Svrčina 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, Bohannon 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

Résumé

La phase aqueuse de l'atmosphère et plus précisément les gouttelettes de nuage est un des milieux les plus concentrés et réactifs de l'atmosphère au sein duquel les composés présents peuvent subir de nombreuses transformations, principalement par voie photochimique. De plus, elle a la propriété d'être oxydante due à la présence d'espèces radicalaires telles qu'OH ou HO₂ et de composés tels que le peroxyde d'hydrogène et le fer. La présence avérée de microorganismes métaboliquement actifs dans l'atmosphère a soulevé de nombreuses questions et plus récemment sur leur rôle dans les processus atmosphériques. Ces organismes pourraient modifier la composition des nuages en utilisant comme substrat les composés carbonés représentant une part importante des composés présents dans les nuages. De plus, ils sont suspectés de jouer un rôle dans la capacité oxydante des nuages en impactant des composés clés de la réactivité chimique tels que le fer ou le peroxyde d'hydrogène. L'objectif de ces travaux de thèse était de se focaliser sur les interactions des microorganismes avec deux espèces oxydantes de la phase aqueuse des nuages, le fer et le peroxyde d'hydrogène.

Tout d'abord, un intérêt particulier a été porté au cycle du fer et à sa complexation dans les nuages, de nature encore très incertaine à ce jour. Dans l'idée d'apporter des premiers éléments de réponse quant à cette complexation, un large screening réalisé sur des microorganismes des nuages a été effectué afin d'évaluer leur capacité à produire des sidérophores. Les résultats obtenus suggèrent l'éventuelle présence de sidérophores dans les eaux de nuage comme molécules chélatantes du fer(III) ce qui pourrait impacter la chimie du fer dans la phase aqueuse des nuages.

Il a ensuite été question de s'intéresser au peroxyde d'hydrogène. Dans une première approche, les paramètres et mécanismes responsables de la transformation biotique et abiotique de H₂O₂ dans les eaux de nuage ont été étudiés, ainsi que ses effets sur le métabolisme énergétique des microorganismes. Dans une deuxième approche, les modifications du métabolisme microbien face à H₂O₂ ont été approfondies à travers une approche métabolomique. Les résultats ont ainsi suggéré que le peroxyde d'hydrogène module fortement le métabolisme énergétique des microorganismes des nuages. Les microorganismes sont capables de gérer une condition de stress oxydant mais qu'en même temps ce stress induit une réorganisation de leur métabolisme. Il a également été montré que diverses voies métaboliques telles que le métabolisme des sucres, acides carboxyliques, lipides, acides aminés, peptide et glutathion sont impactées.

Intégrer ces données biologiques dans des modèles de chimie atmosphérique pour améliorer la quantification de cette modulation sur la chimie atmosphérique apparaît comme une des perspectives les plus importantes à envisager. Pour cela, des constantes cinétiques de biodégradation de quatre composés majeurs des nuages ont été déterminées. Les sorties du modèle nous permettront de mieux évaluer l'impact du métabolisme microbien sur la chimie des nuages.

Mots-clés : sidérophores, cycle du fer, microorganismes des nuages, chimie atmosphérique, ATP, H₂O₂, stress oxydant, métabolomique, biodégradation

Abstract

The aqueous phase of the atmosphere and, more precisely, cloud droplets is one of the most reactive environments of the atmosphere within which the compounds present can be transformed especially by photochemical reactions. In addition, it contains many radical species such as HO, HO₂, hydrogen peroxide or iron which explains its oxidizing power.

The presence of metabolically active microorganisms in the atmosphere raised many questions and, currently, on their role in atmospheric processes. These organisms could modify the composition of clouds using carbon compounds as substrate that represented an important part of compounds present in clouds. They are also suspected to play a role in the oxidative capacity of clouds by impacting key compounds of chemical reactivity such as iron or hydrogen peroxide.

The objective of this work was to focus on the interactions between cloud microorganisms and two oxidant species of clouds aqueous phase, iron and hydrogen peroxide.

First, the cycling of iron and its complexation still very uncertain was studied. In order to provide responses we achieved a screening to evaluate the capacity of cloud microorganisms to produce siderophores. The results obtained suggest the possible presence of siderophores in cloud water as chelating molecules of iron (III) which could have a strong impact on iron chemistry in cloud aqueous phase. Then, we focused on hydrogen peroxide. The parameters and mechanisms responsible for the biotic and abiotic transformation of H₂O₂ in cloud water were studied, as well as its effects on energetic metabolism of microorganisms. The modifications of the microbial metabolism in the presence of H₂O₂ were pursued using metabolomics. The results suggest that H₂O₂ strongly modulate the energetic metabolism of cloud microorganisms. They are able to handle oxidative stress conditions but at the same time this stress induces a reorganization of their metabolism. Various metabolic pathways such as sugar, carboxylic acids, lipids, amino acids, peptide and glutathione metabolism are impacted.

One of the important perspectives to consider is the integration of these biological data into atmospheric chemistry models in order to improve the quantification of this modulation on atmospheric chemistry. For this, biodegradation rate constants of four major compounds present in clouds were determined. The output will allow us to assess better the impact of microbial metabolism on clouds chemistry.

Keywords: siderophores, cycling of iron, cloud microorganisms, atmospheric chemistry, ATP, H₂O₂, oxidative stress, metabolomics, biodegradation

