



HAL
open science

Photo- et biotransformation de composés organiques des nuages. Cas du phénol et des acides aminés

Saly Jaber

► To cite this version:

Saly Jaber. Photo- et biotransformation de composés organiques des nuages. Cas du phénol et des acides aminés. Chimie organique. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2020. Français. NNT : 2020CLFAC079 . tel-03411305

HAL Id: tel-03411305

<https://theses.hal.science/tel-03411305>

Submitted on 2 Nov 2021

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

Spécialité : Chimie organique biologique

par

Saly JABER

Master chimie analytique

**Photo- et biotransformation de composés
organiques des nuages.**

Cas du phénol et des acides aminés

Soutenue le 13 novembre 2020

Rapporteurs :

- Odile Berge, INRA, Avignon
- Khalil Hanna, ENS Chimie Rennes

Examineurs :

- Anne Monod, Université Aix-Marseille
- Gilles Mailhot, Université Clermont Auvergne

Directrice de thèse:

- Anne-Marie DELORT, Université Clermont Auvergne

REMERCIEMENTS

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

J'aimerais remercier ma directrice de thèse, Dr. Anne-Marie Delort, pour toute son aide, sa disponibilité et ses qualités personnelles. Je la remercie pour m'avoir aidée à améliorer mes compétences et mon autonomie dans mon travail, et aussi pour toutes les discussions enrichissantes professionnelles et humaines, sa patience, et pour sa bonne humeur. Dr Delort m'a donné l'espoir durant des moments très difficiles, j'ai vraiment eu la chance de travailler avec une telle personne, assez humbe, gentille...

Tout cela n'aurait pas été possible sans Dr Gilles Mailhot, Dr Barbara Ervens, qui ont beaucoup participé à ce travail de Thèse et à l'obtention de résultats (articles communs). Un grand merci à Maxence Brissy, Martin Leromboure, Aurelie Job, Muriel Joly et sa princesse Alice et tous les autres membres de l'équipe BIOMETA : les enseignant-chercheurs, les doctorants, les techniciens et les stagiaires. C'était un grand plaisir de vous connaître : Mounir, Isabelle, Marie, Martine, Boris, Céline, Pierre, Christelle, Raphaëlle, Gladis, Minghui et beaucoup d'autres... Un grand merci aussi à Amina et Samar pour leur soutien dans les moments pénibles et agréables. Mon séjour à Clermont-Ferrand n'aurait pas été le même sans votre présence.

Merci encore à la fondation Libanaise de Walid Joumblatt d'avoir financée ma thèse, spécialement à Hajj JAMIL Bayram de m'avoir encouragée à faire cette thèse.

Enfin, ma reconnaissance et mes remerciements les plus profonds vont à ma famille qui ont rempli mes chemins d'espoir, de lumière et d'amour : Surtout : Papa, Maman, Zeina (ma première supportrice) et aussi : Leila, Samar, Rawane, Nour, Hamze, Maha, Hussein, Zahraa, ...Merci à Aly Mokdad qui m'a fait croire qu'un jour j'y arriverai, je suis chanceuse de t'avoir dans ma vie.

Merci à Mohamad Mokdad, l'amour de ma vie, qui a partagé avec moi tous les moments de bonheur et de galère. Merci de m'encourager à chaque fois que je baissais les bras, et surtout d'être toujours là pour moi, même lorsque des milliers de miles nous ont séparés. Merci de m'avoir soutenu dans ma vie professionnelle ces 4 dernières années, je ne serais jamais arrivé jusqu'ici sans toi. Merci également d'avoir sublimé mon expérience de la thèse en une véritable aventure, avec notre mariage et l'attente de notre petit bébé Daniel, fruit de notre histoire.

Résumé

Les nuages sont des systèmes multiphasiques complexes (gaz, liquide, solide) dans lesquels la matière organique dissoute est soumise à de multiples processus de transformation. La plupart des études se sont focalisées sur les réactions radicalaires, mais la découverte de microorganismes métaboliquement actifs dans les nuages a mis en évidence leur rôle potentiel en tant que biocatalyseurs dans la transformation des molécules organiques. L'objectif principal de cette thèse était d'évaluer le devenir de polluants (phénol, catéchol) et des acides aminés dans la phase aqueuse du nuage selon des transformations chimiques et microbiologiques.

En ce qui concerne le phénol et le catéchol, les deux processus de transformation ont été décrits en se basant sur deux approches : expérimentale (microcosme simulant les conditions nuageuses) et modélisation (Box model). Les vitesses de bio- et photo-dégradation mesurées sont du même ordre de grandeur. Lorsque le système multiphasique est pris en compte, le modèle montre que le phénol est très majoritairement dégradé dans la phase gaz par des processus radicalaires, seul le catéchol, plus soluble, est transformé par les microorganismes (17%) et la chimie radicalaire (13%) en phase aqueuse.

Pour les AA, les vitesses de transformations biotiques et abiotiques des acides aminés ont été également mesurées en microcosmes, pour ce faire une nouvelle méthode de LC-MS a été développée. Ces mesures ont été complétées par des calculs théoriques basés sur les constantes de réactivité. Les résultats sont complexes et montrent que les AA peuvent être dégradés mais aussi produits, les vitesses dépendent des AA mais aussi des souches microbiennes.

Un travail complémentaire a été réalisé pour décrire le mécanisme de photo-dégradation du complexe Fe(III)-EDDS (EDDS : Ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid) utilisé dans les microcosmes pour créer des radicaux OH. Ce mécanisme est basé sur l'identification structurale de 6 photo-produits par LC-MS.

Mots clés : *Chimie atmosphérique, microorganismes, phénol, catéchol, acides aminés, LC-MS, Fe(III)-EDDS, biotransformation, photo-transformation, modélisation, nuage.*

Summary

Clouds are multiphase systems (gas, liquid, solid) in which dissolved organic matter is subjected to complex transformations processes. Most studies have focused on radical reactions, but the discovery of metabolically active microorganisms in clouds has demonstrated their potential role as biocatalysts in the transformation of organic molecules. The main objective of this thesis was to evaluate the fate of pollutants (phenol, catechol) and amino acids in the cloud aqueous phase by chemical and microbiological transformations.

For phenol and catechol, the two degradation processes have been described based on two approaches: experimental (microcosm simulating cloudy conditions) and modeling (Box model). Measured photo- and biodegradation rates are within the same range of order. When the multiphase cloud system is considered, the model shows that phenol is almost exclusively degraded in the gas phase by radical reactions, while catechol is partially degraded in the aqueous phase by the microorganisms (17%) and radical chemistry (13%).

For the amino acids, the rates of biotic and abiotic transformations have been measured in the same type of microcosms, for this purpose a new LC-MS method has been developed. These experimental measurements have been complemented by theoretical calculations based on reactivity constants. The results are complex and show that AA are both degraded and synthesized, the rates of transformation depend on the type of AA and of microbial strain.

A complementary study was performed to study the mechanism of photochemical degradation of the Fe (III) -EDDS complex (EDDS: Ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid) which was used in the microcosms to produce OH radicals. The proposed mechanism is based on the structural identification of 6 photo-transformation products by LC-MS.

Keywords: *Atmospheric chemistry, microorganisms, phenol, catechol, amino acids, LC-MS, Fe(III)-EDDS, biotransformation, photo-transformation, modelling, cloud.*

Sommaire

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	4
1. Généralités sur les nuages	5
2. Composition chimique du nuage	8
2.1 Variabilité de la composition chimique du nuage	8
2.2 Les composés inorganiques	10
2.3 Les oxydants : Cas du Fer et de H ₂ O ₂	12
2.4 Les composés organiques	18
2.4.1 Les acides carboxyliques	20
2.4.2 Les aldéhydes	21
2.4.3 Les composés aromatiques : l'exemple du phénol	23
2.4.4 Les acides aminés	25
2.4.4.1 Concentration et répartition des Acides Aminés dans la phase aqueuse atmosphérique.....	26
2.4.4.2 Méthodes d'analyses des acides aminés dans les eaux atmosphériques.....	31
3. Les microorganismes des nuages	36
3.1. Introduction	36
3.2. Cycle de vie des microorganismes dans l'atmosphère	37
3.3 Composition microbienne de l'eau des nuages	40
3.4 Variabilité de la composition microbienne de l'eau des nuages	44
4. Les processus de transformations chimiques et microbiologiques dans les nuages	46
4.1 Les processus microbiologiques.....	46
4.1.1 Rôle des microorganismes dans la biotransformation des acides carboxyliques	47
4.1.2 Rôle des microorganismes dans la biotransformation du méthanol et du formaldéhyde ..	51
4.1.3 Rôle des microorganismes dans la biotransformation du phénol	52
4.1.4 Rôle des microorganismes dans la biotransformation des acides aminés	57
4.1.4.1 Variabilité de la composition des protéines en AA selon les organismes	57
4.1.4.2 Voies de biosynthèse et de biodégradation des AA chez les organismes vivants	58
4.1.4.3 Conclusion pour la chimie atmosphérique	73
4.1.5 Rôle des microorganismes dans la biotransformation d'oxydants	75
4.2 Les processus photochimiques et radicalaires	76
4.2.1 Transformation radicalaire des acides carboxyliques et aldéhydes	77
4.2.2 Transformation radicalaire du phénol.....	79

4.2.3 Transformation photochimique et radicalaire des acides aminés	82
4.2.3.1 Constantes de réactivités et temps de vie des AA dans la phase aqueuse de l'atmosphère	82
4.2.3.2 Voies de transformations photochimiques ou radicalaires des AA :	86
4.3 Comparaison entre les processus biotiques et abiotiques	93
4.3.1 Cas des acides carboxyliques	93
4.3.2 Cas du méthanol et du formaldéhyde	96
4.3.3 Cas de H ₂ O ₂	98
Problématique	99
Résultats	102
PARTIE 1 : Transformation biotique et abiotique du Phénol et du Catéchol, dans l'eau de nuage. 103	
1.1-Introduction	103
1.2-Biodegradation of phenol and catechol in cloud water: Comparison to chemical oxidation in the atmospheric multiphase system	106
1.3-Conclusion	107
PARTIE 2 : Mécanisme de photo-dégradation du complexe Fe(III)-EDDS	
2.1-Introduction	110
2.2-Mechanism of photochemical degradation of Fe(III)-EDDS complex.	112
2.3-Conclusion	113
2.4-Annexes	113
PARTIE 3 : Transformations biotique et abiotique des acides aminés dans la phase aqueuse atmosphérique	
3.1-Introduction	121
3.2-Biotic and abiotic transformation of amino acids in cloud water: Experimental studies and atmospheric implications	124
3.3-Conclusion	125
Conclusion générale	127
Perspectives	133
Références	136

LISTE DES ABREVIARIONS

AA : acide aminé

EDDS : acide éthylènediamine-N, N'-disuccinique

CCN : Cloud Condensation Nucleus

COV : Composé organique volatil

COD : Composé organique dissout

US EPA : United States Environmental Protection Agency

CAA : Combined amino acid

AAH : acide aminé hydrolysé

UV : Ultra-violet

TABLE DE FIGURE

Figure 1 : Processus de formation des nuages.....	5
Figure 2 : Influences sur le climat des composés chimiques et des aérosols les plus représentatifs. A chaque indice est associé un niveau de compréhension scientifique.....	7
Figure 3 : Analyse en composantes principales réalisée à partir des paramètres mesurés dans les échantillons d'eau nuageuse (pH, [Na ⁺], [Cl ⁻], [SO ₄ ²⁻], [NO ₃ ⁻], [NH ₄ ⁺]) pour 56 événements nuageux distincts.	9
Figure 4 : 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).	10
Figure 5: Concentrations en Fe(II) et en Fe(III) mesurées dans les différents types de nuage collectés au sommet du puy de Dôme. En rouge les nuages pollués comprenant 15 échantillons individuels de nuage, en vert les nuages continentaux avec 31 échantillons, en bleu clair les 69 échantillons de nuage de type marins et en bleu foncé ceux qui sont hautement marins (14 échantillons). Les symboles représentent les différences statistiques entre les groupes après un test de Kruskal-Wallis (p.value < 0,05)	13
Figure 6: Schéma réactionnel du fer (sous deux formes Fe ²⁺ et Fe ³⁺) dans les eaux atmosphériques ..	15
Figure 7 : Les différentes sources de peroxyde d'hydrogène en phase aqueuse ..	16
Figure 8 : Concentrations en H ₂ O ₂ obtenues au puy de Dôme selon les 4 origines des masses d'air ..	18
Figure 9: Proportion (en %) des acides carboxyliques dans la phase aqueuse des nuages prélevés au puy de Dôme selon l'origine des masses d'air. Les pourcentages sont calculés grâce à la concentration de chaque ion (en µeq.L ⁻¹). n représente le nombre de nuage ayant cette caractéristique.....	21
Figure 10 : Pourcentage des aldéhydes mesurés au puy de Dôme en fonction des types de nuage	23
Figure 11 :Mécanismes de dégradation du benzène en phénol dans la phase gaz	24
Figure 12 : Distribution relative moyenne des acides aminés, des aldéhydes et des acides carboxyliques mesurés dans 25 échantillons nuageux prélevés au sommet du puy de Dôme. Un zoom est fait sur la distribution des acides aminés	30
Figure 13 : Concentration des FAA dans les eaux de nuages prélevées au Cap vert	31
Figure 14 : schéma montrant les différentes étapes nécessaires pour la préparation des échantillons et le dosage des acides aminés.....	32
Figure 15 : Exemple de chromatogrammes HPLC obtenus à partir de deux échantillons de nuage prélevés au puy de Dôme après derivatisation des AA par de l'OPA	35
Figure 16 : Bioaérosols vus en microscopie électronique à balayage et leurs distributions selon leurs tailles. A et B : écailles d'insectes, C et D : spores de champignons, E et F : bactéries, G et H : brochosomes (granules microscopiques sécrétées par les insectes de la famille des Cicadellidae)	37
Figure 17: Cycle de vie des microorganismes dans l'atmosphère	38
Figure 18 : Fréquence d'observation des souches cultivables de bactéries (a) et de levures (b) dans l'eau de nuage prélevée au sommet du puy de Dôme	42
Figure 19: Composition de la communauté microbienne dans les 3 types de nuages récoltés au sommet du puy de Dôme	44
Figure 20 : Composition de la microflore bactérienne cultivable en été et en hiver selon une étude effectuée au puy de Dôme, France	46

Figure 21: Voies métaboliques du cycle de Krebs (voie du citrate ou des acides tricarboxyliques)	47
Figure 22: Processus biologiques exprimés par les communautés des nuages comparés avec ceux d'autres environnements. La taille des bulles décrit le niveau d'expression de la fonction biologique concernée. Les bulles en bleu correspondent au niveau d'expression dans trois échantillons de nuage prélevés au puy de Dôme	50
Figure 23: Principales voies métaboliques impliquées dans la biotransformation du formaldéhyde....	51
Figure 24: Principales voies de biodégradation du phénol décrites pour les microorganismes aérobies	53
Figure 25: Mécanisme catalytique de la dioxygénase intradiol.....	54
Figure 26: Abondance relative des transcrits dans les eaux nuageuses des gènes codant pour les enzymes impliquées dans les voies de dégradation du phénol.....	55
Figure 27: Abondance relative de l'affiliation taxonomique putative des micro-organismes impliqués dans la dégradation du phénol et du catéchol	56
Figure 28 : Biodégradation du phénol par des souches bactériennes isolées des eaux nuageuses. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la biodégradation du phénol mesurée par HPLC après 5 jours d'incubation à 17 °C : a) Résultats obtenus pour les 119 souches de <i>Pseudomonas</i> , les 24 Souches de <i>Rhodococcus</i> et les 2 souches de la famille des Moraxellaceae. (b) Focus sur l'espèce <i>Pseudomonas</i> . Seuls les groupes d'espèces avec un minimum de trois souches sont tracés ici...	57
Figure 29 : Compositions en acides aminés des protéines provenant de différents organismes vivants visualisées sous forme de radar. La valeur pour chaque AA est exprimée comme pourcentage des acides aminés totaux. La Gln et l'Asn ont été incorporés dans le Glu et l'Asp respectivement, parce que les deux premiers sont convertis en ces deux derniers lors de l'hydrolyse acide des protéines	58
Figure 30: Voies de biosynthèse des acides aminés.	59
Figure 31 : Voies de biosynthèse de l'arginine..	60
Figure 32 : Voies de biosynthèse de la lysine.	60
Figure 33: Voies de biosynthèse de la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane.	61
Figure 34 : Biosynthèse de l'isoleucine, la leucine et la valine.....	62
Figure 35 : Métabolisme de l'alanine, l'aspartate et le glutamate.	63
Figure 36: Métabolisme de la glycine, la serine et la thréonine..	64
Figure 37 : Métabolisme de la cystéine et de la méthionine.....	65
Figure 38 : Métabolisme de l'arginine et de la proline.....	66
Figure 39 : Métabolisme de l'histidine.....	67
Figure 40 : Métabolisme de tyrosine..	67
Figure 41 : Métabolisme de la phénylalanine.....	68
Figure 42 : Métabolisme du tryptophane.).	69
Figure 43 : Métabolisme de la D-glutamine et du D-glutamate..	70
Figure 44: Métabolisme de la D-arginine et de la D-ornithine.....	70
Figure 45 : Métabolisme de la D-alanine..	71
Figure 46 : Voies de biodégradation de la lysine.	72
Figure 47 : Voies de biodégradation de la leucine, la valine et l'isoleucine..	73
Figure 48 : Mécanisme simplifié des défenses cellulaires développées face au stress oxydant (présence ROS , Reactive Oxygen Species telles que H ₂ O ₂ et les radicaux OH et superoxyde). A noter le rôle particulier des enzymes SOD (Super Oxyde Dismutases) et catalases qui évitent l'action délétère des ROS sur les constituants cellulaires.....	75
Figure 49: Représentation schématique des voies de fragmentation (en acides carboxyliques et puis minéralisation en CO ₂) et augmentation de la taille (jusqu'à la formation de substances type	

humiques, HULIS et FULIS) de la matière organique présente dans le nuage suite à la réaction avec les radicaux hydroxyles	78
Figure 50 :Processus d'oxydation de composés organiques à deux atomes de carbone dans les phases gazeuse et aqueuse et échanges de ces composés chimiques entre les deux phases ("transfert de masse").	79
Figure 51: Spectre d'absorption du phénol comparé aux flux actiniques mesurés en présence ou en absence de nuages. Le flux actinique mesuré pour un ciel dégagé a été obtenu sur le campus universitaire des Cézeaux, Clermont-Ferrand ; celui mesuré pour un ciel couvert a été acquis au sommet du puy de Dôme.	80
Figure 52 :La réaction du phénol avec le radical hydroxyle	81
Figure 53 :Les voies de réaction du phénol dans la phase aqueuse atmosphérique.	82
Figure 54 : Constantes de réactivité (K) des acides aminés avec le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (pH 6–9; $\lambda > 280 \text{ nm}$). Toutes les constantes K sont données en $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	84
Figure 55: Mécanismes d'oxydation du Trp par absorption directe des UV et voies médiées par $^1\text{O}_2$. Structures des intermédiaires ($\text{R} = \text{CH}(\text{CO}_2\text{H})\text{NH}_2$)	89
Figure 56: Mécanisme de transformation suggéré du TRP (rouge) en solution aqueuse. Structures chimiques proposées pour les produits détectés par LC-MS-ESI (en bleu) et acides carboxyliques détectés par chromatographie ionique (en violet).....	90
Figure 57 : Mécanismes d'oxydation de la tyrosine par absorption directe des UV et voies médiées par $^1\text{O}_2$	91
Figure 58 :L'absorption directe des UV par la Phe conduit à la formation de son état triplet et à la formation de radicaux, ou photo-ionisation suivie d'une hydratation pour former d' isomères ..	92
Figure 59: Oxydation de l'histidine médiée par $^1\text{O}_2$. $\text{R} = \text{CH}(\text{CO}_2\text{H})\text{NH}_2$	92
Figure 60: Contribution relative de l'activité microbienne (en noir) sur la dégradation d'acides organiques par rapport à l'action des radicaux $\text{HO}\bullet$ (gris clair). L'activité microbienne a été mesurée en laboratoire en milieu nuage artificiel à 5°C et 17°C . L'activité radicalaire a été calculée avec des concentrations de $\text{HO}\bullet$ de 10^{-12}M et 10^{-14}M	94
Figure 61 : Comparaison des vitesses de bio-et photo-transformation de divers composés organiques présents dans la phase aqueuse des nuages.	96
Figure 62 : Estimation de l'influence relative de l'activité bactérienne (en noir) et des radicaux libres (hydroxyle $\text{OH}\bullet$ et nitrate $\text{NO}_3\bullet$) sur la dégradation du méthanol et du formaldéhyde dans l'eau des nuages à 5°C et 17°C pendant la journée et la nuit. Pendant la nuit (c'est-à-dire en l'absence de réactivité photochimique), les radicaux $\text{OH}\bullet$ sont considérés comme absents. Les valeurs de concentrations suivantes ont été utilisées pour les calculs : [bactéries] = $8.4 \times 10^4 \text{ cell mL}^{-1}$ [6]; [$\text{HO}\bullet$] = $1.2 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ (day-time); [$\text{NO}_3\bullet$] = $1.5 \times 10^{-14} \text{ mol L}^{-1}$; [methanol] = $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; [formaldéhyde] = $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Constantes de vitesse (298K) pour la réaction de $\text{HO}\bullet$ avec le méthanol: $\text{K} = 1 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Elliot and McCracken, 1989) et avec le formaldéhyde hydraté: $k = 7.8 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Chin and Wine, 2018). Constantes de vitesse (298K) pour la réaction du $\text{NO}_3\bullet$ avec le méthanol: $k = 5.4 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Umschlag et al., 1997)et avec le formaldéhyde hydraté: : $k = 1.0 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$	97
Figure 63 : Evolution temporelle des concentrations en formaldéhyde dans des échantillons de nuages contenant ou non des microorganismes et soumis ou non à l'effet de la lumière	97
Figure 64 : Evolution des concentrations en H_2O_2 mesurées dans un échantillon de nuage réel incubé en présence de microorganismes seuls au noir (vert foncé), de lumière seule (bleu ciel), de lumière et de microorganismes (vert clair) et au noir sans microorganismes (bleu foncé).	98
Figure 65 : Détail des mécanismes de photo-transformation du Fe(III)-EDDS par les voies 1 et 2)..	114

Figure 66 : Chromatogramme de fragmentation de l'ion 263 [M+H] (intermédiaire « d ») et extraction du signal des ions spécifiques (189.0870, 205.0819, 233.0768, 177.087, 201.087).	118
Figure 67: Mécanismes théoriques pour l'obtention des ions 189.087, 205.0819, 233.0768 à partir du composé d1.....	119
Figure 68: Mécanismes théoriques pour l'obtention des ions : 177.087, 201.087 à partir du composé d2.....	119

TABLE DE TABLEAUX

Tableau 1 : Composition en composés inorganiques des différents types de nuages collectés au puy de Dôme exprimés en (%).....	12
Tableau 2 : Concentrations minimales - maximales du peroxyde d'hydrogène mesurées dans différents site de l'eau nuageuse (μM).....	17
Tableau 3 : Concentrations des principaux acides carboxyliques présents dans l'eau de nuage.....	20
Tableau 4 : Concentrations des principaux aldéhydes présents dans l'eau de nuage.	22
Tableau 5 : Concentrations moyennes du phénol mesurées dans la pluie et dans les nuages.	25
Tableau 6 : Concentration des acides aminés dans les eaux atmosphériques.....	26
Tableau 7 : Concentrations des différents AA mesurées dans les eaux de nuage prélevées au puy de Dôme. Concentration moyenne en chaque AA (nM) et concentration moyenne correspondante en carbone exprimée en $\mu\text{g C L}^{-1}$. Les valeurs sont présentées avec l'écart type déterminé en analysant 25 échantillons.....	29
Tableau 8 : Tableau illustrant des exemples de réactifs de dérivation utilisés pour quantifier les AA dans des eaux atmosphériques.....	34
Tableau 9 : Concentration des bactéries et des champignons par mL d'eau de nuage.....	41
Tableau 10 : Constantes de réactivité (K) des 18 acides aminés avec $^{\circ}\text{OH}$, O_3 et $^1\text{O}_2$ (pH=5).....	83
Tableau 11 : Temps de vie ou demi-vie des AA dans des milieux atmosphériques.....	85
Tableau 12 : Principaux produits résultant des voies de transformations abiotiques (oxydation ou absorption directe des UV) des acides aminés.	86
Tableau 13 : Masses des ions spécifiques issus de la fragmentation théorique de d1 et d2.	116

Introduction

Les nuages couvrent plus de 50% de la surface de la terre, ils se trouvent pour la quasi-totalité dans la troposphère. Les gouttelettes de nuage représentent l'un des milieux les plus réactifs et les plus concentrés et de l'atmosphère. Elles sont composées d'une multitude d'espèces inorganiques et organiques, provenant soit du transfert de gaz solubles depuis la phase gazeuse, soit de la dissolution des particules d'aérosols. Beaucoup d'études sur les eaux des nuages cherchaient à caractériser la composition chimique et les sources de ces composés. Pour comprendre les mécanismes de transformation de ces composés, les études se sont focalisées sur les réactions photochimiques et radicalaires, ce qui a permis d'implémenter des modèles de chimie atmosphérique.

La découverte cette dernière décennie de microorganismes (bactéries, champignons dont levures) métaboliquement actifs dans les nuages a mis en évidence leur rôle en tant que biocatalyseurs, dans la transformation des molécules organiques comme alternative aux voies photochimiques. Ces microorganismes survivent aux nombreux stress présents dans ce milieu, tels que la lumière solaire, les faibles températures, les pH acides, les variations de concentration osmotique, la présence d'oxydants, les faibles concentrations en nutriments, etc... (Joly et al., 2015), leur activité est donc conservée dans ce milieu.

Face au potentiel que pouvaient avoir ces microorganismes sur la chimie des nuages, les **études ont cherché à évaluer** l'importance de ce phénomène vis à vis des réactions **photochimiques** déjà connues. **Il a été montré en laboratoire que les vitesses de transformations photochimique et biologique pour certains composés tels que les aldéhydes, les acides carboxyliques, le méthanol, le formaldéhyde et H₂O₂ étaient du même ordre de grandeur**

L'objectif principal de ce projet de thèse est d'évaluer le devenir d'autres composés organiques (spécifiquement le phénol, le catéchol et les acides aminés) dans la phase aqueuse du nuage, *via* des transformations chimiques et microbiologiques. En parallèle il s'agissait de décrypter le mécanisme de transformation photochimique du complexe Fe (III)- EDDS utilisé dans nos expériences pour produire des radicaux OH.

Cette thèse s'intègre dans les projets ANR BIOCAP et MOPGA dont le but est de mesurer l'impact de la photochimie et de la biologie sur les composés organiques des nuages.

La première partie de ce manuscrit de thèse commence par une synthèse bibliographique. Elle introduit tout d'abord le milieu nuageux et sa composition chimique variable (oxydants,

composés inorganiques, composés organiques tels que les acides carboxyliques et les aldéhydes, le phénol et le catéchol et les acides aminés) ainsi que sa composition en microorganismes. Viennent ensuite les mécanismes de transformation de la matière organique des nuages, voies biologiques d'une part, voies radicalaires et photochimiques d'autre part. Enfin une comparaison entre ces deux processus est présentée.

Cette partie est suivie par la présentation des objectifs de la thèse.

Les résultats de cette thèse sont présentés sous la forme de trois chapitres. Le premier s'intéresse à décrire les deux processus de dégradation du phénol et du catéchol photochimique et microbiologique en se basant sur deux approches : expérimentale et modélisation.

Le deuxième chapitre étudie la transformation photochimique du complexe Fe(III)-EDDS (EDDS : Ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid) utilisé pour générer des radicaux $\bullet\text{OH}$ (un mime des sidérophores potentiellement présents dans les nuages), en proposant un mécanisme de photo-dégradation.

Le troisième chapitre rapporte la mesure des vitesses de transformations biotiques et abiotiques des acides aminés dans des microcosmes imitant l'eau de nuage. Ces mesures expérimentales sont complétées par des calculs théoriques utilisant les constantes de réactivité du radical OH, de l'oxygène singulet et de l'ozone.

Enfin, une conclusion générale et quelques perspectives terminent ce manuscrit de thèse.

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les nuages

La première couche atmosphérique dans laquelle nous évoluons est la troposphère, de 0 à 15 km. C'est un milieu complexe dans lequel coexistent des gouttelettes liquides, des particules solides d'aérosol et des espèces gazeuses. Les interactions pouvant avoir lieu entre ces différentes phases sont regroupées sous le terme de chimie multiphasique.

Les nuages occupent 7% du volume total de la troposphère, ils sont la forme la plus abondante de l'eau condensée de cette couche (Pruppacher and Jaenicke, 1995). Les nuages se forment par un processus microphysique appelé condensation, lorsque la concentration en vapeur d'eau devient supérieure à la pression de vapeur d'eau saturante. Cette vapeur d'eau se condense alors sur des particules solides ou liquides en suspension dans l'atmosphère, dites noyaux de condensation (CCN) : les aérosols selon un mécanisme d'activation se transforment en gouttelettes de nuage (Figure 1).

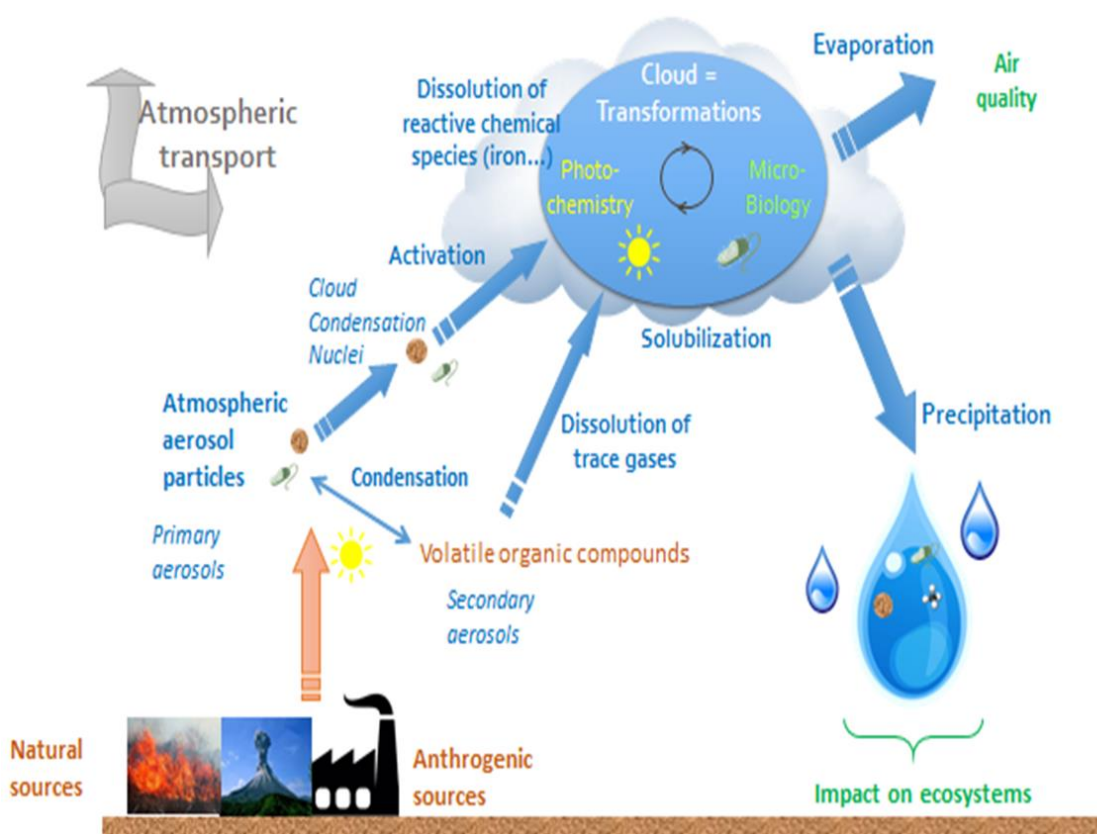


Figure 1 : Processus de formation des nuages (d'après Lebedev et al., 2018).

Selon leurs origines, les aérosols se divisent en deux types (Figure 1) :

-les aérosols « primaires » sont émis depuis la surface de la Terre par des processus naturels divers (feux de biomasse, aérosolisation de particules d'origine biologique, soulèvement des poussières par le vent, formation d'embruns marins, éruptions volcaniques émettant des cendres, etc), ou des activités anthropiques (combustion des carburants, activités industrielles, etc.).

-les aérosols dits « secondaires » sont formés dans l'atmosphère par des processus à la fois physiques et chimiques, soit à partir des aérosols primaires, soit par conversion de composés organiques volatils (COV) en particules.

La composition chimique des aérosols constitue une caractéristique importante de leurs propriétés. Ces propriétés vont déterminer leur hygroscopicité, leur capacité à devenir un CCN ou encore leurs propriétés radiatives. Les principales catégories d'aérosols importantes pour l'étude de l'interaction aérosol-nuage, ainsi que quelque unes de leurs propriétés ou de leurs origines, sont listées ci-dessous (Steinfeld, 1998):

- 1) Les aérosols organiques : les alcools, les alcanes, les alcènes, les acides ... Ces aérosols sont principalement formés par condensation de gaz organiques produit par la biosphère ou directement émis par les plantes.
- 2) Les éléments traces : principalement des métaux lourds.
- 3) Les sels de mers : Na Cl est produit par les embruns marins. Ces particules sont très hygroscopiques et donc très enclin à servir de CCN.
- 4) Les minéraux : principalement des oxydes d'aluminium, silicium, fer, calcium, potassium, magnésium. Ces aérosols d'origine naturelle proviennent principalement les déserts et les régions semi-arides, et sont mis en suspension dans l'atmosphère par le vent. Ces aérosols sont souvent insolubles mais peuvent faire office d'IN (Ice Nuclei).
- 5) Les sulfates : comme des sels inorganiques composés de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et des sels organiques comme le diméthylsulfate. Ces aérosols sulfatés sont très hygroscopiques et donc efficaces en tant que CCN, ils peuvent avoir des sources anthropiques ou des sources naturelles
- 6) La carbone suie : le carbone suie ou Black Carbon (BC) est le produit de processus de combustion, provenant en particulier de procédés industriels et de feux de biomasse. La

plus importante caractéristique du BC réside dans sa capacité à absorber le rayonnement atmosphérique.

Les particules d'aérosols et les nuages jouent donc un rôle crucial dans la troposphère en raison de leur influence sur le bilan radiatif terrestre (Figure 2) : d'une part en réfléchissant le rayonnement solaire vers l'espace ils contribuent au refroidissement de la surface (effet d'albédo), d'autre part en piégeant le rayonnement émis par le sol, ils contribuent au réchauffement de la surface (effet de serre). Toutefois, de fortes incertitudes résident encore sur ces effets (IPCC, 2013).

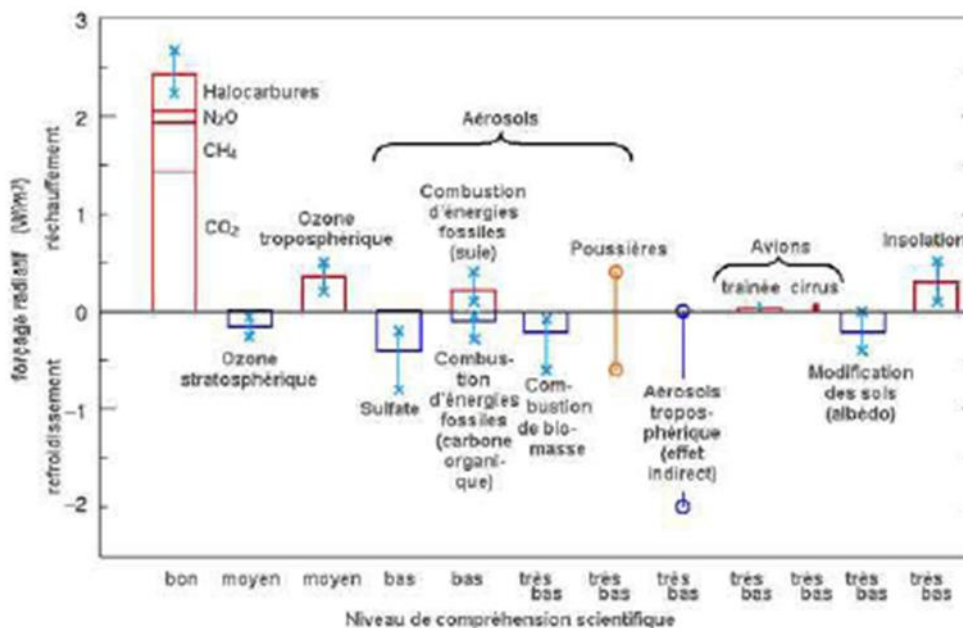


Figure 2 : Influences sur le climat des composés chimiques et des aérosols les plus représentatifs. A chaque indice est associé un niveau de compréhension scientifique. D'après le GIEC, Changements climatiques 2013.

La phase aqueuse des nuages est un mélange complexe de composés chimiques organiques et inorganiques qui résulte de la dissolution des CCN mais aussi du transfert de composés de la phase gaz à la phase aqueuse (COV, gaz) et de la réactivité au sein de la phase aqueuse elle-même (Figure 1). Le nuage peut donc être considéré comme un réacteur chimique extrêmement efficace qui sera le lieu de nombreuses transformations qui peuvent engendrer la formation de nouveaux composés chimiques.

Après évaporation des gouttelettes de nuage, ces composés chimiques se retrouvent à nouveau en phase gaz et peuvent impacter la qualité de l'air. Si au contraire les gouttelettes précipitent sous forme de pluie ou neige, ces composés pourront impacter les écosystèmes récepteurs.

2. Composition chimique du nuage

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. Contrairement à la phase gazeuse qui est beaucoup plus documentée, quelques études s'étaient toutefois attachées à comprendre et expliquer la composition chimique de la phase aqueuse nuageuse. Les premières données relatant la composition chimique de l'eau du nuage 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 and Drozdov, 1966). Ces recherches ont été approfondies au fil des années avec la modernisation des techniques de prélèvements et d'analyse.

2.1 Variabilité de la composition chimique du nuage

La phase aqueuse du nuage présente une grande diversité des espèces chimiques organiques ou inorganiques, ce qui la rend extrêmement complexe (Deguillaume et al., 2014). La concentration ainsi que la variabilité de ces espèces dépendent étroitement de la provenance de la masse d'air impliquée dans la formation du nuage.

En se basant sur divers paramètres : concentration en ions majeurs (Na^+ , Cl^- , NO_3^- , NH_4^+ et SO_2^-), teneur totale en ions, teneur en eau liquide, pH, conductivité, potentiel redox, concentration en fer... (Deguillaume et al., 2014) ont pu définir quatre classes des nuages, parmi un ensemble d'échantillons d'eau nuageuse collectés au sommet du puy de Dôme (1465m, France) : pollué, continentale, marine et hautement marine.

La Figure 3 illustre l'analyse statistique effectuée, analyse en composantes principales (ACP), qui a pu mettre en évidence des discriminations significatives entre ces masses d'air et a permis de définir ces différentes classes des nuages.

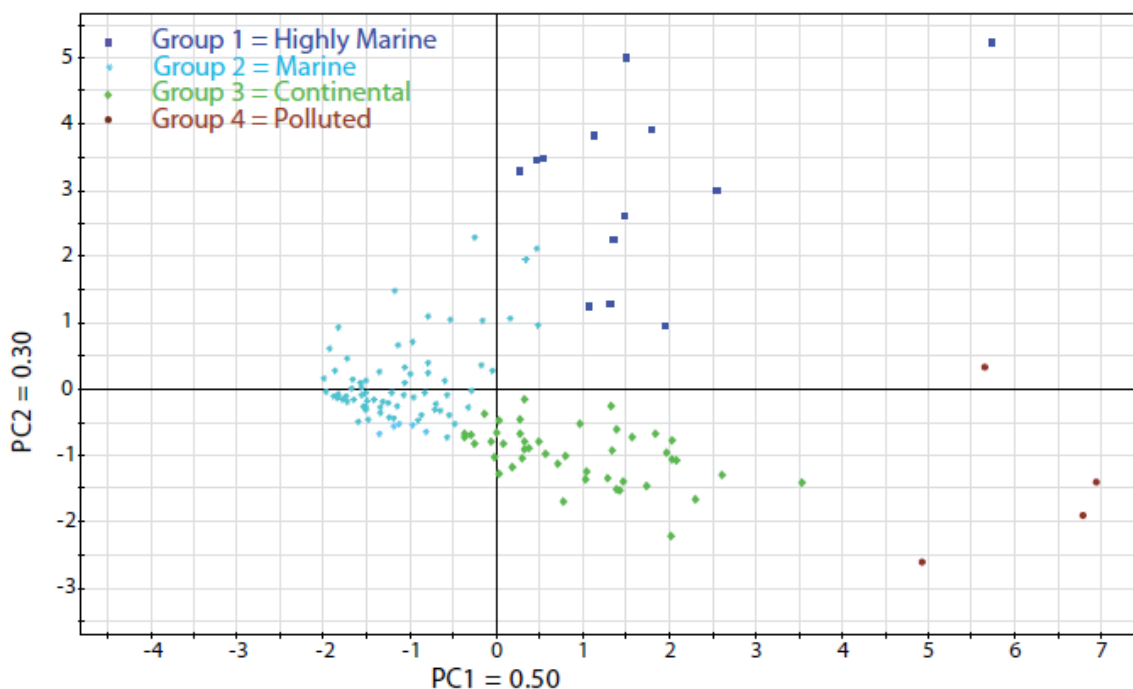


Figure 3 : Analyse en composantes principales réalisée à partir des paramètres mesurés dans les échantillons d'eau nuageuse (pH, [Na⁺], [Cl⁻], [SO₄²⁻], [NO₃⁻], [NH₄⁺]) pour 56 événements nuageux distincts (Deguillaume et al., 2014).

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>.

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 (Figure 4). 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.

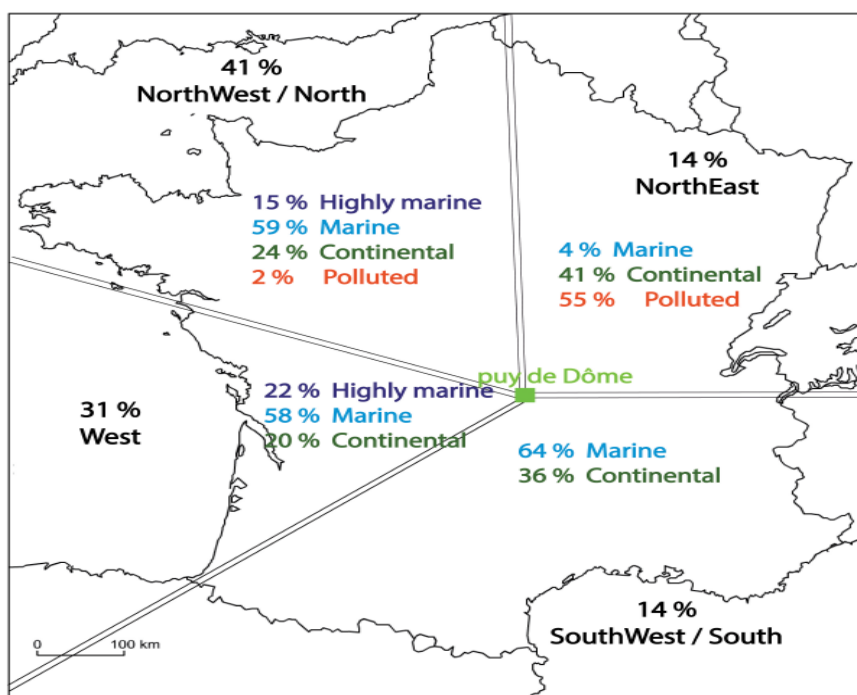


Figure 4 : Secteurs définis par l'analyse des rétro-trajectoires des masses d'air impliquées dans la formation des nuages collectés au sommet du puy de Dôme. Le pourcentage donné en noir représente la proportion des événements nuageux pour chaque secteur. Les pourcentages en couleur représentent la proportion des événements nuageux pour chaque secteur selon leur classe (Deguillaume et al., 2014).

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.

2.2 Les composés inorganiques

Une multitude de composés inorganiques sont présents à des concentrations plus ou moins importantes dans le nuage : NO_3^- , $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}$, Cl^- , Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} (Watanabe et al., 2011). Ces composés gèrent en grande partie le pH de ses gouttelettes par la présence d'acides forts tels que l'acide sulfurique (H_2SO_4) ou l'acide nitrique (HNO_3).

Les sources et puits des composés inorganiques présents dans l'eau du nuage étant multiples: Par exemple, l'ion sodium (Na^+) a plusieurs sources d'émission: 1) des sources anthropiques constituant 26% des émissions totales, 2) des sources naturelles dues à l'érosion du sol constituant encore 26% des émissions totales, 4) une source la plus importante (46%) constituant la majorité du sodium (Na^+) émis dans l'atmosphère sous forme particulaire provient de la mer (cristaux de NaCl),(Bourotte et al., 2011).

Les ions potassium (K^+), magnésium (Mg^{2+}) et calcium (Ca^{2+}) sont émis à partir de sources anthropiques telles que la combustion de carburants fossiles, les feux de biomasse ou les

industries. Ces ions peuvent également être émis naturellement sous forme de cristaux de KCl, de MgCl₂ ou de CaCl₂ d'origine marine (David and Pacyna M. Jozef, 1999).

La source la plus importante d'ions nitrates (NO₃⁻) dans la phase aqueuse des nuages est l'acide nitrique (HNO₃) qui provient de différentes sources, la principale est l'hydrolyse de N₂O₅ (Leriche, 2003). Les ions nitrate et ammonium présents dans les gouttelettes de nuage peuvent également provenir de la dissolution de la fraction soluble de la phase particulaire telle que le nitrate d'ammonium (NH₄NO₃) (Lin et al., 2006). Les ions nitrates peuvent être réduits en nitrites (NO₂⁻) dans la phase aqueuse du nuage par de nombreux processus photochimiques (Mellor and Diekmann, 1992). La photolyse des ions nitrate et nitrite présents dans la goutte du nuage peut être considérée comme une source de radicaux NO₃[•] et NO₂[•] (mais aussi de radicaux [•]OH), qui jouent un rôle important sur l'oxydation de la matière organique dans le nuage (Herrmann et al., 2005).

Les ions sulfates (SO₄²⁻) sont produits selon le processus d'oxydation, les oxydants possibles des sulfites sont : le peroxyde d'hydrogène, l'ozone, les peroxydes organiques et l'oxygène. Cette oxydation est catalysée par le fer et le manganèse et a lieu dans la phase liquide atmosphérique du nuage (Deguillaume et al., 2014).

La majorité du sodium (Na⁺) émis dans l'atmosphère sous forme particulaire provient de la mer (cristaux de NaCl). L'autre source naturelle de Na est l'érosion des sols, qui contribue jusqu'à 26 % des émissions totales de sodium dans l'atmosphère. Le sodium provient encore des sources anthropiques tel que : l'incinération des ordures ménagères (Oooki et al., 2002). Une fois dans la phase particulaire, le sodium peut être solubilisé en Na⁺ dans les gouttelettes de nuage.

Le Tableau 1 montre la composition relative des ions inorganiques ainsi que le pH mesurés dans différents types de nuages collectés au puy de Dôme (Deguillaume et al., 2014). Il apparaît clairement que les concentrations élevées en nitrate et ammonium sont des marqueurs de pollution alors que celles de NaCl reflètent les milieux marins.

Tableau 1 : Composition en composés inorganiques des différents types de nuages collectés au puy de Dôme exprimés en (%) (Deguillaume et al., 2014).

Nuage	% SO ₄ ²⁻	% NH ₄ ⁺	% K ⁺	% Mg ²⁺	% Ca ²⁺	% Cl ⁻	% Na ⁺	% NO ₃ ⁻	pH
Pollué	13	24	1	1	6	4	3	48	4
Continental	21	32	1	3	6	7	7	23	4,9
Marin	18	31	2	3	9	11	10	16	5,7
Hautement marin	9	10	2	5	7	28	33	6	6,2

2.3 Les oxydants : Cas du Fer et de H₂O₂

En plus des composés inorganiques, beaucoup de composés à caractère oxydant sont présents dans l'eau du nuage, particulièrement les métaux de transition et les molécules oxygénées représentées principalement par le peroxyde d'hydrogène H₂O₂.

2.3.1 Cas du Fer

Le fer est l'un des métaux de transition le plus étudié dans les eaux atmosphériques du fait de son abondance, il se trouve principalement sous deux formes : Fe(II) et Fe(III). Ce métal possède donc deux états d'oxydation, il peut être considéré comme un bon catalyseur et peut former de nombreux complexes (Deguillaume et al., 2014). L'état d'oxydation de celui-ci dépend du pH, des processus oxydatifs ou réducteurs et de la présence d'agents complexants (Brigante and Mailhot, 2015). La présence du fer comme de nombreux autres métaux dans le milieu nuage, est liée aux particules en suspension, les aérosols. Le fer est émis dans l'atmosphère après dissolution de la fraction soluble des particules solides, provenant essentiellement de phénomène de combustion, cette solubilité est dépendante du pH du milieu (Deguillaume et al., 2014)

Le Fe(II) est plus présent dans les eaux atmosphériques que le Fe(III), il représente 76% du fer total. Les concentrations en Fe(II) et Fe(III) obtenues pour les différents types de nuages prélevés au sommet du puy de Dôme sont représentées dans la Figure 5.

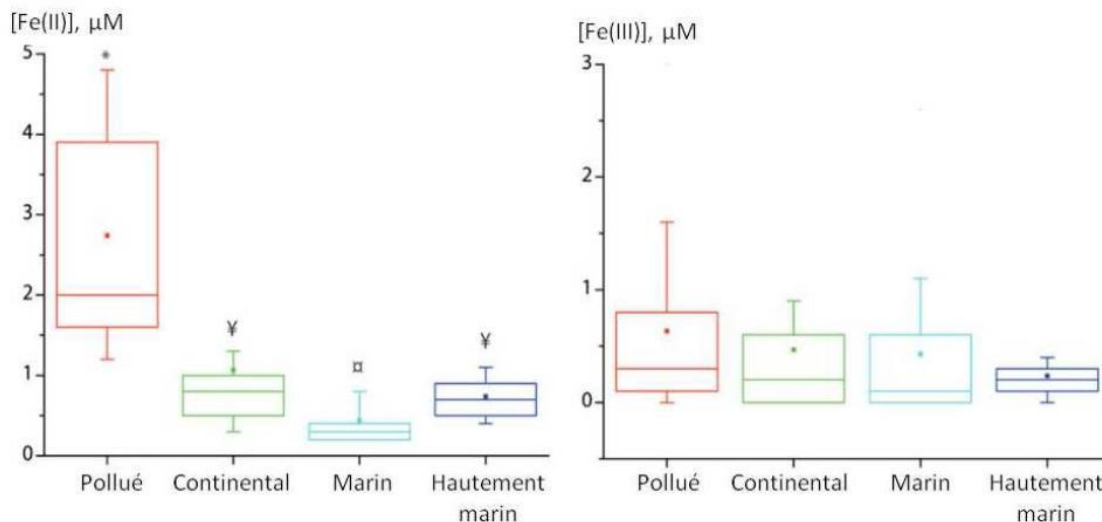


Figure 5: Concentrations en Fe(II) et en Fe(III) mesurées dans les différents types de nuage collectés au sommet du puy de Dôme. En rouge les nuages pollués contenant 15 échantillons individuels de nuage, en vert les nuages continentaux avec 31 échantillons, en bleu clair les 69 échantillons de nuage de type marins et en bleu foncé ceux qui sont hautement marins (14 échantillons). Les symboles représentent les différences statistiques entre les groupes après un test de Kruskal-Wallis (p .value < 0,05) (d'après Deguillaume et al., 2014). Ces 129 échantillons proviennent de 73 évènements nuageux.

Sur 73 nuages analysés, la concentration en Fe(II) fluctue de 0,1 μ M à 5 μ M alors que le Fe(III) est plus faiblement concentré avec des valeurs allant de 0 à 2 μ M. Alors que la concentration en Fe(III) varie peu, la concentration en Fe(II) présente des valeurs différentes selon le type de nuage. Elle augmente au sein d'un nuage pollué et est la plus faible dans un nuage de type marin. Dans tous les cas et pour tous les types de nuages, la valence majoritaire du fer dans les nuages au puy de Dôme est le Fe(II).

La complexation du fer dans l'eau nuageuse reste inconnue, on considère en général l'oxalate comme le ligand organique modèle (Long et al., 2013;Weller et al., 2014) mais les résultats obtenus par modélisation (Bianco et al., 2015) montrent que la production des radicaux \cdot OH ne peut pas être expliquée seulement par la complexation fer-oxalate (la concentration des radicaux hydroxyles mesurée dans l'eau de nuage > celle du modèle proposé). Ceci laisse à penser qu'il existe d'autres ligands organiques complexant fortement le fer. Le Fe (III) pourrait être chélaté par d'autres ligands organiques d'origine biologique, tels que les sidérophores (Herckes et al., 2013).

Les sidérophores sont produits par des micro-organismes pour complexer le fer qui est nécessaire pour soutenir leur métabolisme, en particulier parce qu'il fait partie du site actif des métalloenzymes telles que les mono- et di-oxygénases. Ces systèmes de complexation sont très

efficaces et excrétés dans des environnements extracellulaires pour chélater Fe (III), puis le complexe Fe (III)–sidérophore est internalisé par des micro-organismes. Certains micro-organismes ne sont pas capables de synthétiser des sidérophores mais peuvent utiliser des sidérophores synthétisés par d'autres micro-organismes (Gledhiir and Buck, 2012). Ces molécules biologiques ont une forte affinité pour le fer (constantes complexantes $K > 10^{20}$).

Dans l'eau de pluie, Cheize et al. (2012) ont trouvé des ligands organiques complexant le Fer avec des constantes de stabilité très élevées (log K égal à 21-22), ce qui est cohérent avec la présence de sidérophores. Comme l'eau de pluie résulte de la collision des gouttelettes de nuage, le fer pourrait également être complexé par des sidérophores dans l'eau de nuage.

Une étude effectuée par Vinatier et al. (2016) a permis de mettre en évidence la synthèse de sidérophores par 42% des 450 souches microbiennes (bactéries et levures) isolées de 37 événements nuageuses à la station puy de Dôme. Dans cette étude les bactéries du genre *Pseudomonas* étaient les plus actives et les plus abondantes (elles représentent environ 50% de toutes les souches actives). Les tendances de production des sidérophores ont également été étudiées par type de sidérophores classés en trois groupes selon leur fonction chimique chélatante du fer : parmi les souches actives examinées, 38% ont produit du catéchol, 18% ont produit de l'hydroxamate et 44% ont produit des sidérophores à fonctions mixtes. Parmi ces sidérophores à fonction mixte (catechol + hydroxamate), les pyoverdines sont connues pour être synthétisées par des *Pseudomonas*, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus avec les souches des nuages. Les pyoverdines présentent un intérêt particulier car elles portent un chromophore, elles sont donc des molécules photoactives qui pourraient être facilement phototransformées en phase aqueuse nuageuse, affectant ainsi directement la chimie des nuages. Afin d'évaluer cette hypothèse, une étude complémentaire a été effectuée par Passananti et al. (2016) avec des pyoverdines produites par une souche de *Pseudomonas* des nuages, isolées et caractérisées. Il a été montré que complexe Fe (III)–pyoverdine est beaucoup plus stable que le complexe Fe (III)-oxalate, le log K du complexe Fe (III)–pyoverdine >20 à 27 fois plus important. De plus les auteurs ont montré la conversion du Fe (III) en Fe(II) et la photodégradation du ligand pyoverdine lors de l'irradiation du complexe Fe (III)–pyoverdine en laboratoire. Par conséquent, ce type de sidérophore, si présent dans le nuage, pourrait avoir un impact sur la photoréactivité du fer dans les nuages.

Sous ses formes dissoutes (Fe^{2+} et Fe^{3+}), le fer a la propriété d'être très réactif et peut être impliqué dans la production d'espèces réactives oxygénées (Reactive Oxygen Species, ROS). Cette réactivité dépend du pH du milieu, de leur état d'oxydation et de leur concentration

(Deguillaume et al., 2014). Le fer joue un rôle clé sur la capacité oxydante de la phase aqueuse du nuage car il affecte les concentrations et le cycle des radicaux (par exemple : $\cdot\text{OH}$ et $\text{HO}_2\cdot$) d'un part et des oxydants tels que H_2O_2 d'autre part (Figure 6).

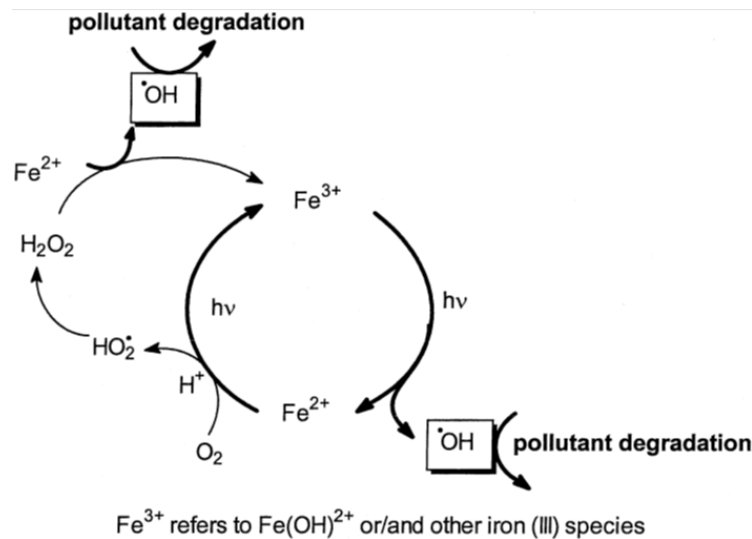


Figure 6: Schéma réactionnel du fer (sous deux formes Fe^{2+} et Fe^{3+}) dans les eaux atmosphériques (Catastini et al., 2002).

2.3.2 Cas de H_2O_2

L'eau de nuage est un environnement oxydant avec un potentiel redox pouvant atteindre 200 mV en raison de la présence de radicaux ($\cdot\text{OH}$ et $\text{HO}_2\cdot/\text{O}_2\cdot^-$) et de leurs précurseurs (H_2O_2 et métaux) (Deguillaume et al., 2014)

Le peroxyde d'hydrogène est un composé oxydant majeur au sein de la goutte d'eau nuageuse, compte-tenu de sa réactivité avec la matière organique, le fer et de sa participation dans un grand nombre de processus. Il est présent à la fois en phase gazeuse et en phase aqueuse et peut jouer le rôle d'oxydant comme de réducteur. Sa concentration, varie en fonction des caractéristiques historiques de la masse d'air.

En phase gazeuse du nuage, le peroxyde d'hydrogène est l'un des produits finaux de la chimie atmosphérique des oxydants. Dans cette phase, il se forme par la réaction radicalaire de l'hydroperoxyde ($\text{HO}_2\cdot$) et / ou hydroperoxyde hydraté ($\text{HO}_2\cdot - \text{H}_2\text{O}$) (Marinoni et al., 2011), qui sont produits par les réactions photochimiques des gaz présents dans l'atmosphère, tels que l'ozone, les oxydants azotés et les composés organiques volatils. Sa formation est donc influencée par la présence de polluants atmosphériques mais aussi par les paramètres météorologiques notamment l'irradiation solaire, la température et le contenu en vapeur d'eau.

Il existe d'autres sources d'émission de peroxyde d'hydrogène dans la phase gazeuse atmosphérique, telles que les feux de biomasse qui conduisent directement à la formation de HCHO et du radical HO₂[•], dont la dismutation forme du peroxyde d'hydrogène.

En phase aqueuse, la source significative du peroxyde d'hydrogène est sa dissolution à partir de la phase gazeuse, ($K_{\text{dissolution}} = 1.0 \times 10^5 \text{ M atm}^{-1}$) (David et al., 2003) qui joue un rôle très important dans le processus d'élimination du H₂O₂ atmosphérique. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour la photoproduction de H₂O₂ dans les eaux atmosphériques comme par exemple l'oxydation des ions métalliques de transition par des espèces radicalaires. C'est le cas du complexe oxalate de fer qui est généralement utilisé comme modèle pour décrire l'action des composés organiques dans la phase aqueuse du nuage (Aleksic et al., 2009). Une autre source de production de peroxyde d'hydrogène, est la photolyse de peroxydes organiques, en particulier de l'hydroperoxyde de méthyle normalement présent dans les gouttelettes d'eau. Cette photolyse est une source de HO[•] qui conduit à la formation de formaldéhyde et HO₂[•] qui sont des sources de H₂O₂ (Guo et al., 2012). De nombreuses autres sources de peroxyde d'hydrogène en phase aqueuse existent telles que la photolyse de l'ozone (O₃) aqueux, la photonucléation de la vapeur d'eau, la dismutation du radical hydroperoxyde aqueux (HO₂[•]) ou encore la réduction de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) par des composés organiques (Figure 7).

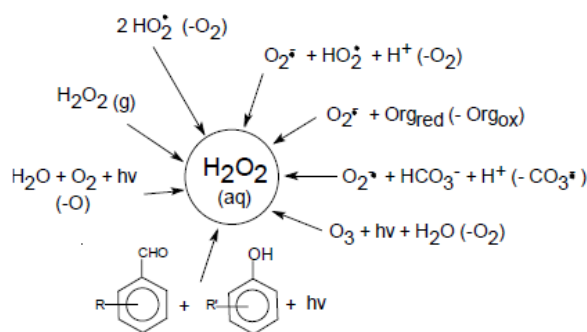


Figure 7 : Les différentes sources de peroxyde d'hydrogène en phase aqueuse (Vione et al., 2003).

Les concentrations en peroxyde d'hydrogène ont été mesurées dans la phase aqueuse de nuages échantillonnés par avions ou sur des sites instrumentés (Tableau 2). Par exemple, des valeurs d'H₂O₂ allant de 0 à 3,2 μm à Kleiner Feldberg (Allemagne) (72) et de 0,1 à 57,7 μm au puy de Dôme (France) avec une moyenne de 7,8 ont été enregistrées (26). Certaines campagnes de terrain ont révélé des concentrations extrêmement élevées (jusqu'à 247 μm) (par exemple, des valeurs rapportées à Whitetop Mountain, États-Unis) (73).

Tableau 2 : Concentrations minimales - maximales du peroxyde d'hydrogène mesurées dans différents site de l'eau nuageuse (μM).

Site d'échantillonnage	Concentrations d' H_2O_2 (μM)	Références
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 and Aneja, 1993)
Mt Mitchell, USA	8-103	(Rao and Collett, 1995)
La Jolla Peak, USA	13-72	(Rao and Collett, 1995)
Los Angeles, USA	1-167	(Willard 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)

Selon des études en laboratoires ou par modélisation, la concentration en H_2O_2 dans l'atmosphère est impactée par une grande variété de paramètres :

- 1- La température et l'humidité relative (paramètres météorologiques) : une faible température et une humidité relative importante favorisent la dissolution d' H_2O_2 de la phase gazeuse du nuage à la phase aqueuse. (Jackson and Hewitt, 1996)
- 2- Les saisons et la présence de la lumière : la concentration de H_2O_2 dans la phase gazeuse nuageuse augmente considérablement pendant la journée et en période estivale où l'activité photochimique est à son maximum (Sakugawa et al., 1993). Au contraire, durant la nuit et l'hiver, la concentration diminue fortement en raison de d'une activité photochimique moindre et de la dissolution de H_2O_2 gazeux en phase aqueuse.
- 3- L'origine de la masse d'air : les concentrations en H_2O_2 étudiés sur le site du puy de Dôme les plus importantes sont retrouvées dans les masses d'air de type continentales, et les plus faibles dans les nuages de type marins, la moyenne la plus basse est obtenue pour les masses d'air ayant une origine polluée (Figure 8) (Deguillaume et al., 2014).

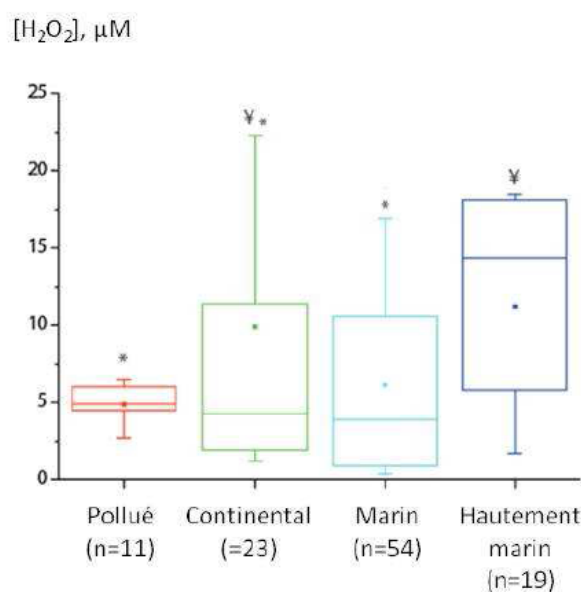
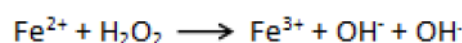
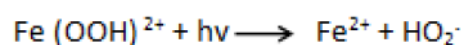
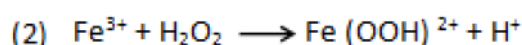
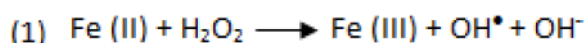


Figure 8 : Concentrations en H₂O₂ obtenues au puy de Dôme selon les 4 origines des masses d'air (d'après Deguillaume et al., 2014).

- 4- La présence d'une forte concentration en oxydes d'azote (NO_x): les NO_x inhibent la formation de H₂O₂ en phase gaz. Les oxydes nitreux représentent un puits pour les radicaux hydroxyles et hydroperoxydes pour finalement former de l'acide nitrique et nitreux (HNO₃, HNO₂).
- 5- La concentration en métaux de transition, comme le fer sous forme dissoute (Fe²⁺ et Fe³⁺) puisqu'impliqué dans la réaction de Fenton (1) et photo-Fenton (2).



2.4 Les composés organiques

Il a été estimé que plus de 10⁴ composés organiques (COVs : composés organiques volatils) différents existeraient dans la phase gazeuse de l'atmosphère (Goldstein and Galbally, 2007). Comme illustré dans notre introduction (Figure 1), deux types de composés organiques peuvent être distingués selon leur sources : a) les composés organiques primaires, c'est-à-dire issus d'émissions d'origine naturelle (émissions de composés biogéniques par les plantes, combustion de biomasse, etc...) ou anthropique, issus de l'activité humaine (rejets industriels,

combustion de carbone fossile, utilisation de pesticides, etc...), b) les composés organiques secondaires résultant de l'oxydation de composés primaires, par des nombreux oxydants présents dans l'atmosphère principalement les radicaux comme $\cdot\text{OH}$, $\text{NO}_3\cdot$, $\text{HO}_2\cdot$ (Kroll and Seinfeld, 2008). Ces oxydations 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 and Turpin, 2000, Lim et al., 2005, Carlton et al., 2006).

La majeure fraction des COV secondaires en phase gaz est fortement hydrosoluble, en raison de la présence de groupements polaires. Il a été montré que la présence de deux fonctions polaires sur la chaîne carbonée est suffisante pour conduire à sa dissolution quasi-totale dans la phase aqueuse lors d'un épisode nuageux (Aumont et al., 2005), à noter que la dissolution de ces espèces dépendent aussi de leur constante de Henry. En terme quantitatif, la matière organique dissoute (COD) représente une fraction significative de la matière soluble totale (Saxena and Hildemann, 1996, Fuzzi et al., 2002).

Cependant la composition chimique exacte de cette matière organique reste largement méconnue. Des méthodes globales récentes de FT-ICRMS, grâce à leur très grande résolution et sensibilité, ont permis de mettre en évidence plusieurs milliers de molécules organiques (3000-5000) (Zhao et al., 2013, Bianco et al., 2018, Luo et al., 2018). Les formules brutes permettent par exemple de classer ces molécules selon leur composition en CHO, CHNO, CHOS et CHNOS, on peut aussi les regrouper en composés de « type biogéniques » (lipides, aliphatiques/ peptides, glucides). Cependant la structure exacte de chaque composé n'est pas identifiée et surtout pas quantifiée car ces approches.

Des méthodes plus classiques et ciblées, basées sur des techniques de séparation chromatographique (HPLC, GC, Chromatographie ionique) couplées en général à des techniques spectroscopiques (UV-Visible, fluorescence, MS) ont permis d'identifier des acides carboxyliques, des aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde, glyoxal, etc.), des alcools (méthanol, éthanol, 2-propanol, phénol, etc.), des composés aromatiques, des alcanes, de alcènes, des alkyles, des composés hydrocarbonés, des acides aminés, des hydroperoxydes organiques, des cétones, des terpénoïdes, des sucres, et des acides aminés. Cependant une faible fraction de ces composée a pu être quantifiée, pour les valeurs mesurées au puy de Dôme cette fraction ne compte que pour 20% de la DOC présente dans les eaux de nuage (Bianco et al., 2018).

2.4.1 Les acides carboxyliques

Les composés organiques les plus abondants recensés dans les gouttelettes de nuages et de brouillard sont de petits acides carboxyliques volatils : formique, acétique, oxalique, succinique, malonique. Les concentrations de ces acides mesurés sur différents sites sont présentées dans le Tableau 3. De manière générale les acides acétiques et formiques sont majoritaires, tandis que les acides maloniques, succiniques et oxaliques sont moins concentrés.

Tableau 3 : Concentrations des principaux acides carboxyliques présents dans l'eau de nuage.

Composé chimique	Concentrations (μM)	Références
Acide acétique $\text{CH}_3\text{CO}(\text{OH})$	4,0 - 37,8 28,3 - 79,0 30,0 - 84,0 3,0 - 173,0 0,6 - 48,7 0.3-57.6	(Loflund et al., 2002) (Decesari et al., 2005) (Watanabe et al., 2001) (Munger et al., 1989) (Marinoni et al., 2004) (Deguillaume et al., 2014)
Acide formique $\text{CHO}(\text{OH})$	1,3 - 34,3 36,0 - 51,2 43,0 - 167,0 12,0 - 103,0 0.2-52.8	(Löflund et al., 2002) (Decesari et al., 2005) (Watanabe et al., 2001) (Marinoni et al., 2004) (Deguillaume et al., 2014)
Acide succinique $\text{CO}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}(\text{OH})$	0,85 - 2,55 0,1 - 4,1	(Löflund et al., 2002) (Deguillaume et al., 2014)
Acide malonique $\text{CO}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CO}(\text{OH})$	0,70 - 2,85 0.3-7	(Loflund et al., 2002) (Deguillaume et al., 2014)
Acide oxalique $\text{CO}(\text{OH})\text{CO}(\text{OH})$	0,65 - 12,65 0,05 - 15,20 0,1 - 17,4 0.2-19.4	(Löflund et al., 2002) (Decesari et al., 2005) (Marinoni et al., 2004) (Deguillaume et al., 2014)

Dans les gouttelettes de nuages prélevés au puy de Dôme ces petits acides représentent 9 à 12% du carbone organique dissous (COD) (Deguillaume et al., 2014), Le pourcentage de chacun d'eux varie selon les différents types de nuages : nuage pollué, nuage continental, nuage marin

et nuage hautement marin (Figure 7). Le pourcentage de l'acide acétique varie de 29 à 71% d'un nuage continental à un nuage pollué, il varie de 15% (nuage pollué) à 47% (nuage marin) pour l'acide formique, de 10% (nuage pollué) à 18% (nuage continental) pour l'acide oxalique. Les pourcentages des acides succinique et malonique sont aux alentours de 2-6%.

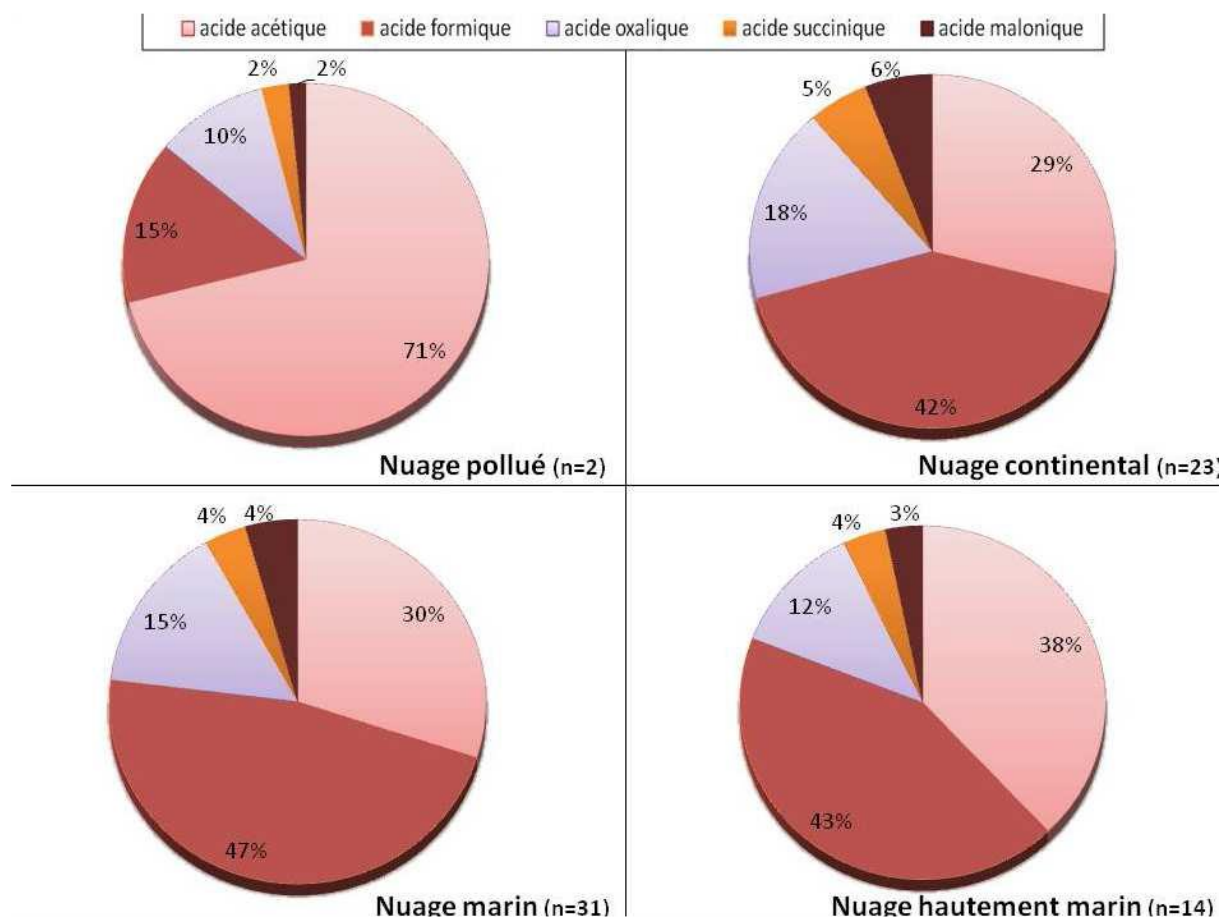


Figure 9: Proportion (en %) des acides carboxyliques dans la phase aqueuse des nuages prélevés au puy de Dôme selon l'origine des masses d'air. Les pourcentages sont calculés grâce à la concentration de chaque ion (en $\mu\text{eq.L}^{-1}$). n représente le nombre de nuage ayant cette caractéristique (d'après Deguillaume et al., 2014).

2.4.2 Les aldéhydes

Les différentes concentrations des aldéhydes mesurés sur différents sites sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Concentrations des principaux aldéhydes présents dans l'eau de nuage.

Composé chimique	Concentrations (μM)	Références
Formaldéhyde HCHO	8,0 - 14,0 < 0,1 - 33, 3,0 - 38,0 13,6 - 61,5 3,3 - 7,0 3,8 - 10,4 0,1-14,2	(Collett et al., 1990) (Munger et al., 1995) (Munger et al., 1989) (Igawa et al., 1989) (Houdier et al., 2011) (Ervens et al., 2013) (Deguillaume et al., 2014)
Acétaldéhyde CH ₃ CHO	1,2 - 5,1 0,7 - 2,3 0.08-0.24	(Igawa et al., 1989) (Houdier et al., 2011) (Deguillaume et al., 2014)
Glyoxal CHOCHO	< 0,15 - 27,0 1,2 - 55,0 0,4 - 2,3 0.03-0.246	(Munger et al., 1995) (Igawa et al., 1989) (Houdier et al., 2011) (Deguillaume et al., 2014)
Méthylglyoxal CH ₃ COCHO	< 0,3 - 7,0 3,7 - 26,9 0,02 - 1,1 0.0024-0.06	(Munger et al., 1995) (Igawa et al., 1989) (Houdier et al., 2011) (Deguillaume et al., 2014)

Les aldéhydes mesurés au puy de Dôme sont le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, le glyoxal, le méthylglyoxal et l'hydroxy-acétaldéhyde. Ils ne représentent que 0,8 à 2% du carbone organique total. La Figure 10 présente la répartition relative de ces aldéhydes (en %) dans différents types de nuage. Le formaldéhyde est l'aldéhyde majoritaire retrouvé dans l'eau de nuage, représentant plus de 50% de cette famille. L'acétaldéhyde est le deuxième carbonyle le plus abondant dans les nuages marins alors que dans les nuages continentaux et pollués c'est l'hydroxy-acétaldéhyde. Enfin le glyoxal ne représente que 10 à 14% et le méthylglyoxal 2 à 4%. Ils sont tous issus de la phase gaz et sont une source potentielle d'acides carboxyliques après leurs oxydations.

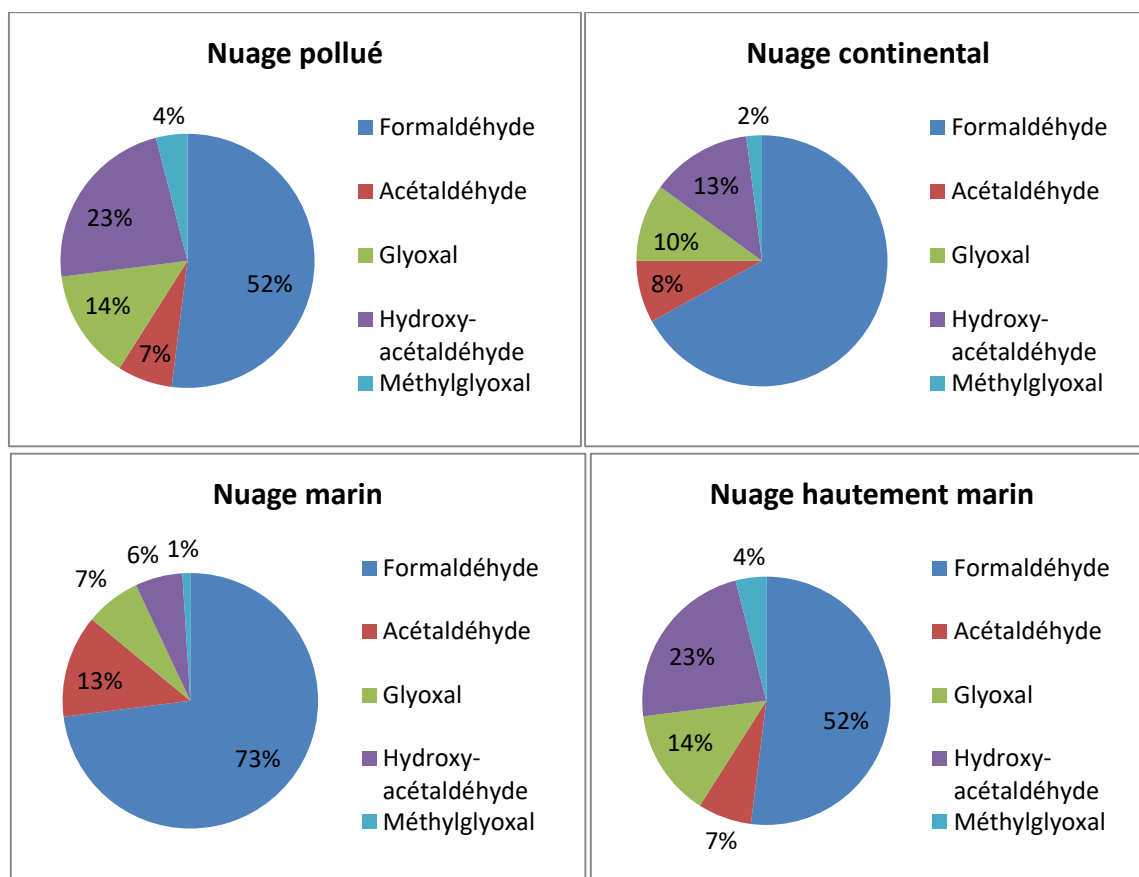


Figure 10 : Pourcentage des aldéhydes mesurés au puy de Dôme en fonction des types de nuage (d'après Deguillaume et al., 2014).

2.4.3 Les composés aromatiques : l'exemple du phénol

La plupart des études ont été sur l'analyse de composés organiques simples (acides, aldéhydes, AA), cependant des composés aromatiques toxiques tels que le phénol ont pu être dosés dans les eaux atmosphériques. L'intérêt pour le phénol est qu'il est défini comme polluant prioritaire par l'US EPA, il est notamment caustique pour la peau et peut provoquer des irritations respiratoires.

La présence du phénol dans la phase gazeuse nuageuse est due à deux sources : a) une source naturelle, présentée principalement par les feux de forêt (2300 Tg.an⁻¹ en 1985) et la décomposition de la matière organique (Schauer et al., 2001), b) une source anthropogénique présentée par les rejets automobiles (1900 Tg.an⁻¹ en 1985) et les processus industriels, surtout dans les zones urbaines et les pays développés. Le phénol peut également résulter de l'oxydation du benzène par le radical hydroxyle (Figure 11).

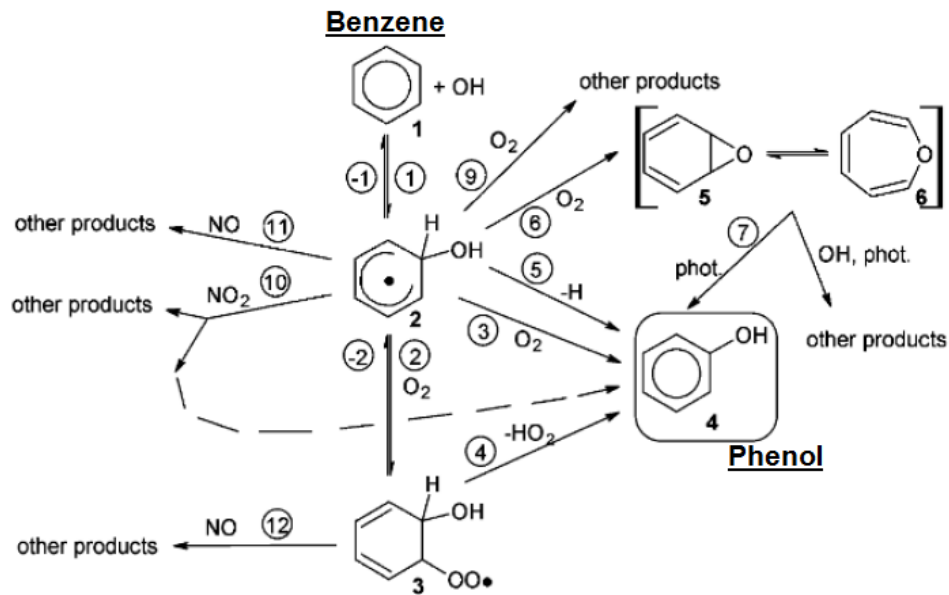


Figure 11 :Mécanismes de dégradation du benzène en phénol dans la phase gaz (Volkamer et al., 2002).

Le benzène (1) réagit avec le radical hydroxyle pour donner l’adduit benzène-OH (2), une fois l’adduit formé, il réagit avec O₂ pour donner un peroxy-hydroxycyclohexadiényle (3), lorsque le produit (3) se forme, il perd l’anion hydroperoxyde (HO₂⁻) pour former le phénol. La formation du phénol à partir du benzène dans la phase gaz peut se faire par divers processus mais toutes nécessitent en premier lieu l’oxydation du benzène par le radical hydroxyle.

Afin d’estimer la quantité du phénol émise dans la phase gazeuse nuageuse, une modélisation globale a été faite par (Cabrera-Perez et al., 2016) : l’oxydation du benzène constitue la source principale du phénol émis dans la phase gazeuse atmosphérique (59% des sources totales), puis les feux de biomasse (32%) et les émissions anthropiques (9%).

Une fois formé le phénol peut passer dans la phase aqueuse due à sa polarité, solubilité et sa constante de Henry= 647 M atm⁻¹) (Lebedev et al., 2018).

Le phénol a été dosé dans les eaux atmosphériques dans différents sites (Tableau 5). Sa concentration varie de 0,0003 à 7,7 µg.L⁻¹ dans les pluies et de 0.15-5.4 µg/L dans les nuages.

Tableau 5 : Concentrations moyennes du phénol mesurées dans la pluie et dans les nuages.

Sites	Type de sites	Milieux	Moyenne, µg/L	Références
États-Unis (Los Angeles)	Urbain	Pluies	6,0	(Kawamura and Kaplan, 1983)
États-Unis (Portland)	Urbain	Pluies	0,0003	(Leuenberger et al., 1985)
Suisse(Greppen)	Rural	Pluies	5,1	(Czuczwa et al., 1987)
Suisse (Dübendorf)	Urbain	Pluies	7,7	(Leuenberger et al., 1988)
Allemagne (Hannover)	Urbain	Pluies	7,7	(Levsen et al., 1990)
Angleterre (Great Dun Fell)	Continental	Nuages	5,4	(Lüttke and Levsen, 1997)
France (Montagne des Vosges)	Rural	Pluies	1,6	(Harrison et al., 2005)
France (Montagne des Vosges)	non précisé	Nuages	3,5	(Harrison et al., 2005)
Allemagne (Mount Brocken)	Pollué	Nuages	3,0	(Harrison et al., 2005)
France (Erstein)	Rural	Pluies	6,4	(Schummer et al., 2009)
France (Puy de Dôme)	Marin - Continental	Nuages	0,15-0,74	(Lebedev et al., 2018)

2.4.4 Les acides aminés

Beaucoup d'études se sont focalisées sur le carbone atmosphérique, mais la matière organique soluble comprend d'autres composés contenant une fraction substantielle d'hétéroatomes (par exemple : l'azote). Ce sont aussi bien de petites molécules volatiles que des structures multifonctionnelles plus grandes. Des analyses globales par FT-ICRMS (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry) permettent de regrouper les formules moléculaires mono-isotopiques en quatre sous-groupes sur la base de leur composition élémentaire : composés contenant uniquement C, H et O (CHO), composés contenant C, H, N et O (CHNO), composés contenant uniquement C, H, O et S (CHOS) et composés contenant C, H, N, O et S (CHNOS). Une étude de Zhao et al. (2013) montre qu'il existe un grand nombre (environ 50%) de formules moléculaires de type CHNO avec un rapport oxygène / carbone (O/C) inférieur à 0,7. Généralement, ces composés ont une large gamme de rapports hydrogène/carbone (H/C) de 0,2 à 2,2. De plus, il a été constaté que les composés avec un atome d'azote représentent 40% des composés CHNO. Comme les peptides ont un rapport moyen O/C de 0,6 et un rapport H/C de 0,16, ils pourraient représenter une fraction significative des composés organiques

contenant de l'azote-dans l'eau de nuage. Bianco et al. (2019) ont également caractérisé la matière organique d'eau de nuage prélevés au puy de Dôme (France) par FT-ICRMS: Les contributions relatives des composés CHO sont plus élevées pour les échantillons prélevés en hiver (54,6%) que pour échantillons prélevés en 'été / automne (38,8%), où les composés CHNO sont dominants (46,9%). La proportion des CHOS pour les échantillons été /automne était de 10,6% alors qu'elle était de 7,7% dans les échantillons hiver, tandis qu'aucune tendance n'apparaissait pour les composés CHNOS.

Parmi ces molécules azotées on trouve des protéines, des petits peptides (Combined AA) et des AA libres (Free AA) ; ces composés sont d'origine biologique. Au vu du nombre de publications récentes, on note un intérêt croissant de la communauté scientifique pour les AA.

2.4.4.1 Concentration et répartition des Acides Aminés dans la phase aqueuse atmosphérique

Un nombre important d'études ont confirmé la présence d'acides aminés dans les aérosols urbains et suburbains (Barbaro et al., 2011; Di Filippo et al., 2014, Zhu et al., 2020, Yang et al., 2005, Ren et al., 2018), les aérosols ruraux (Song et al., 2017, Barbaro et al., 2020, Helin et al., 2017, Samy et al., 2011) et les aérosols marins (Mace et al., 2003b, Triesch et al., 2020)...et polaire (Feltracco et al., 2019, Mashayekhy Rad et al., 2019, Scalabrin et al., 2012).

Cependant peu d'information existe encore sur la pluie, les nuages et le brouillard. Notre travail de thèse étant centré sur les nuages, nous développerons particulièrement les études relatives aux AAs dans la phase aqueuse atmosphérique (Tableau 6).

Tableau 6 : Concentration des acides aminés dans les eaux atmosphériques.

Site de prélèvements des AA	Type d'échantillon	Saison	Concentration des AA (moyenne)	Acide aminé dominant	Technique d'analyse	Références
California (USA)	Eau de brouillard	Printemps	2,6–99 μM	Glycine, Thréonine	HPLC-fluorescence	Zhang and Anastasio, 2003

Golf de Mexico (Mexique)	Precipitation	Printemps	1.1-15.5 μM (6.5 μM)	Glycine Serine Alanine	HPLC- Fluorescence	Mopper and Zika, 1987
Charlottesville (USA)	Precipitation	Printemps	$\approx 0,4 \mu\text{M}$	Glycine, Glutamate, Serine	HPLC- Fluorescence	Gorzelska et al 1992
Cape Grim (Tasmanie)	Précipitation	hiver	AA=53% de l'azote organique	Arginine	HPLC-UV- Vis	Mace et al., 2003b
Seoul Uljin (Corée)	Précipitation	03/2012 – 04/2014 02/2011 – 01/2012 31	Seoul 23-804 nM (197nM) Uljin 34-4250 nM (885 nM)	Glycine	HPLC- Fluorescence	Yan et al., 2015
Guiyang (Chine)	Précipitation	Eté	Total : 1.1- 10.1 μM (3.7) Summer : 1.3-6.6 μM (2.9) Autumn : 1.1-8.8 μM (4.4) Winter : 1.5-9.9 μM (3.4) Spring: 2.6-10.1 μM (5.2)	Glycine et Proline	HPLC développé base sur la méthode d'analyse des acides aminés décrite par Xu et Xiao (2017)	Xu et al., 2019

Puy de Dôme (France)	Eau de nuage	Printemps -automne	33-563 nM	Phenylalanine, Serine et Tryptophane,	HPLC- fluorescence	Bianco et al., 2016
Cape Verde (Cap vert)	Eau de nuage	hiver	11.2- 489.9 ng.m ⁻³ 17-757 µg C.L ⁻¹	Aspartate, Serine et Alanine	Derivatisation UHPLC - MS (ESI- Orbitrap) calibration externe	Triesch et al., 2020

Dans les eaux de brouillard, selon l'étude de Zhang et Anastasio (2003)), la concentration des acides mesurée dans les échantillons collectés en Californie (USA) varie entre 714±375 pmol.m⁻³ pour les FAA (Free amino acids) et 427±358 pmol.m⁻³ pour les CAA (Combined amino acids). La Glycine et la Thréonine étaient les AAs majoritaires.

Dans les précipitations (pluie), Mopper et Zika (1987) ont été les premiers à mesurer des concentration d'acides aminés dans échantillons prélevés dans le golfe du Mexique, elles étaient de l'ordre de 1.1-15.5 µM (moyenne 6.5 µM). Gorzelska et al. (1992) rapportent des concentrations de l'ordre de 0,4 µM dans des précipitations à Charlottesville (USA). Mace et al.(2003) ont montré que les AA représentent 53% de l'azote organique au site de Cape Grim en Tasmanie. Yan et al. (2015) ont trouvé des concentrations en acides aminés assez variables allant de 23-804 nM à Seoul et de 34-4250 nM à Uljin (Corée). Plus récemment, Xu et al. (2019) ont dosé les acides aminés hydrolysés (AAH), l'azote organique dissous, les nitrates et l'ammonium dans des échantillons de précipitations prélevés dans un site suburbain à Guiyang (China) sur une période de 12 mois. Les concentrations étaient de l'ordre : 3,7 µmol L⁻¹, 151,1 µmol L⁻¹, 68,9 µmol L⁻¹ et 117,3 µmol L⁻¹ respectivement. Dans toutes ces études la glycine est l'AA majoritaire dans les précipitations (sauf au Cape Verde où c'est l'arginine) (Tableau 1). La proline est également très présente dans les échantillons de Chine (Xu et al., 2019) ainsi que le glutamate et la serine aux USA (Gorzelska et al 1992).

Dans les eaux des nuages, Bianco et al. (2016b) ont été les premiers à quantifier des acides aminés dans des échantillons collectés au puy de Dôme (Tableau 7 et Figure 12).

Tableau 7 : Concentrations des différents AA mesurées dans les eaux de nuage prélevées au puy de Dôme. Concentration moyenne en chaque AA (nM) et concentration moyenne correspondante en carbone exprimée en $\mu\text{g C L}^{-1}$. Les valeurs sont présentées avec l'écart type déterminé en analysant 25 échantillons (Bianco et al., 2016b).

Compound	Abbreviation	Molecular weight (g mol^{-1})	Average concentration (nM)	Carbon average concentration ($\mu\text{g C L}^{-1}$)
Alanine	ALA	89.0	188 ± 133	6.8 ± 4.8
Arginine	ARG	174.2	89 ± 95	6.4 ± 6.8
Aspartate	ASP	133.1	139 ± 124	6.7 ± 5.9
Glutamate	GLU	147.1	42 ± 49	2.5 ± 2.9
Glycine	GLY	75.1	151 ± 117	3.6 ± 2.8
Histidine	HIS	155.2	33 ± 28	2.4 ± 2.0
Isoleucine	ILE	131.2	548 ± 532	24.0 ± 8.3
Leucine	LEU	131.2	102 ± 66	7.4 ± 4.8
Lysine	LYS	146.2	125 ± 87	9.0 ± 6.2
Methionine	MET	149.2	100 ± 56	6.0 ± 3.4
Phenylalanine	PHE	165.2	337 ± 152	36.4 ± 16.4
Serine	SER	105.1	281 ± 238	10.1 ± 8.6
Threonine	THR	119.1	133 ± 125	6.4 ± 6.0
Tryptophan	TRP	204.2	563 ± 332	74.3 ± 43.8
Tyrosine	TYR	181.2	45 ± 69	4.9 ± 7.4
Valine	VAL	117.2	61 ± 50	3.7 ± 3.0
Total			2938 ± 167	211 ± 19

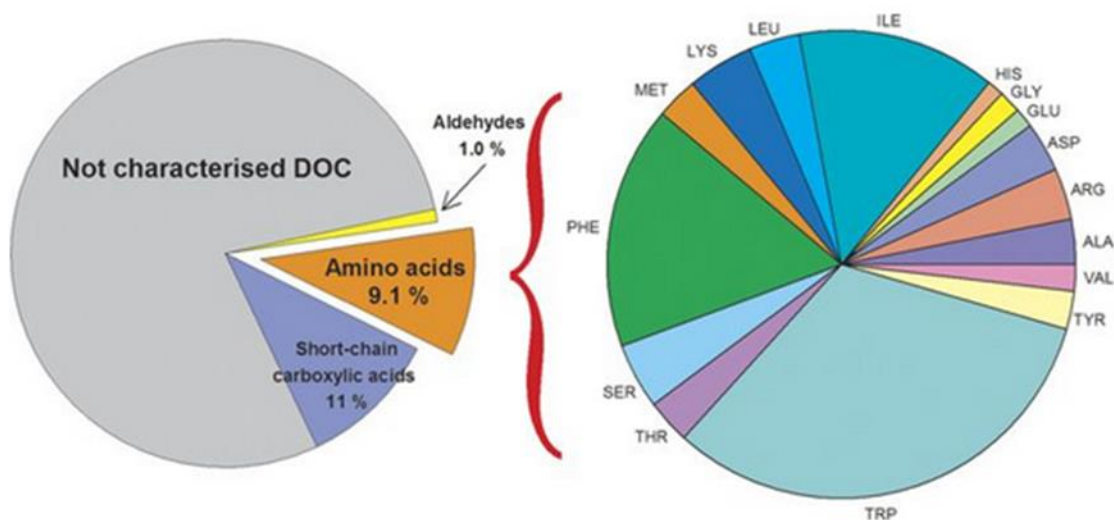


Figure 12 : Distribution relative moyenne des acides aminés, des aldéhydes et des acides carboxyliques mesurés dans 25 échantillons nuageux prélevés au sommet du puy de Dôme. Un zoom est fait sur la distribution des acides aminés (d'après Bianco et al., 2016).

La concentration totale en AA, définie comme la valeur médiane de la somme de la concentration en AA dans chaque échantillon allait de 1 à 4 μM . Exprimée en $\mu\text{g C.L}^{-1}$ (Tableau 7), ces concentrations (2.4 à 74,3 $\mu\text{g C.L}^{-1}$) représentent au total (211 $\mu\text{g C.L}^{-1}$) jusqu'à 9.1 % de la matière organique (Figure 12), c'est à dire presque autant que les acides carboxyliques de courte chaîne (11.%). Une étude récente réalisée par Triesch et al., (2020) sur le montagne du Cape Verde (744 m) montre également une variation importante des concentrations totales d'un échantillons à l'autre (11.2-489.9 ng.m^{-3} ; 17-757 $\mu\text{g C.L}^{-1}$) (Figure13). Ces concentrations sont du même ordre de grandeur que celles mesurées au puy de Dôme. Dans ces deux exemples les concentrations moyennes d'AA dans les échantillons d'eau de nuages sont inférieures à celles mesurées dans les eaux de brouillard (Zhang and Anastasio, 2003) (2,6–99 μM) et dans des échantillons d'eau de rosée en Allemagne (Scheller, 2001) (0,5–110 μM) mais relativement similaires à celles rapportées dans les eaux de pluie (Gorzelska et al., 1992). Le brouillard et l'eau de rosée devraient être plus concentrés que l'eau de nuage car ils sont influencés relativement fortement par des sources locales. Pour les acides aminés caractérisés dans l'eau de nuage collectée au puy de Dôme (Bianco et al., 2016b) la phenylalanine, la serine et le tryptophane sont largement majoritaires, leur concentrations dépassent les 0,25 μM (Figure 13). Dans le cas des échantillons nuageux prélevés au Cap Vert (Triesch et al., 2020, Figure 13), les AAs majoritaires sont l'aspartate, la serine et l'alanine ; la glycine est aussi bien représentée. On peut donc noter des différences importantes quant à la distribution du type d'AA dans ces

deux études sur les nuages. Ces différences pourraient provenir de l'origine des masses d'air, les nuages du Cap vert étant sur un site totalement marin (île) alors que le puy de Dôme est beaucoup plus éloigné des côtes de l'Atlantique. On peut penser aussi que les nuages arrivant au puy de Dôme sont plus vieillies. Enfin les méthodes de dosage utilisées sont très différentes (LC-fluorescence vs LC-MS), ce qui pourrait induire des biais potentiels différents.

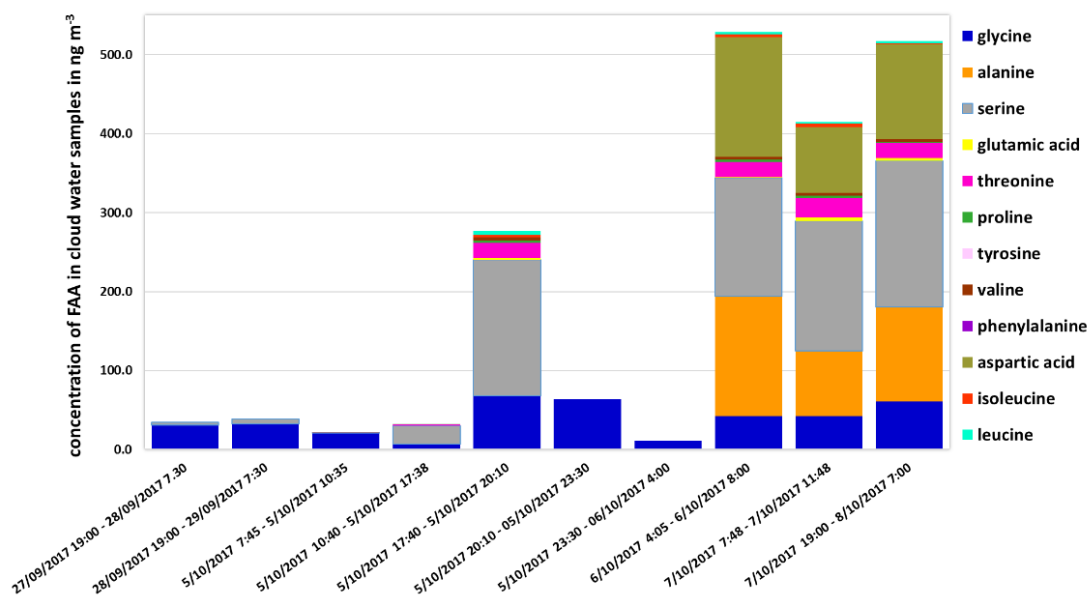


Figure 13 : Concentration des FAA dans les eaux de nuages prélevées au Cap vert exprimée en ng m⁻³ (d'après Triesch et al., 2020).

2.4.4.2 Méthodes d'analyses des acides aminés dans les eaux atmosphériques

Analyser et quantifier les AA dans des matrices atmosphériques est particulièrement compliqué à cause des spécificités suivantes :

- Structures chimiques variées des AA : hydrophiles (sérine, thréonine, asparagine, glutamine), hydrophobes (alanine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane, valine, tyrosine), chargés ou non, chaînes latérales très différentes (methyl, aromatique...), possédant un caractère basique (lysine, arginine, histidine) ou acide (acide glutamique, acide aspartique).
- Concentration faible et allant du nM au μM dans un même échantillon : par exemple 188 nM pour l'alanine et 0,56 μM pour le tryptophane (Bianco et al., 2016b).
- Matrice complexe contenant une grande diversité de molécules dont beaucoup de sels.
- Milieu solide pas directement analysable si aérosols, nécessité d'hydrolyse et d'extraction dans la plupart des cas.

Au final pour pallier ces différents problèmes, les méthodes d'analyses des AA dans les milieux atmosphériques sont assez complexes et variées. Elles comprennent plusieurs étapes : une étape de préparation, suivie d'une de purification et enfin d'analyse (Figure 14).

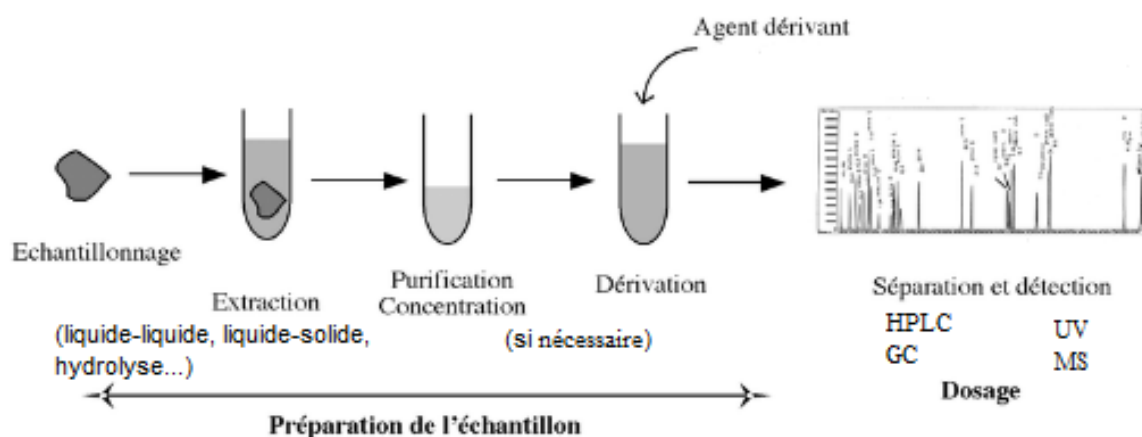


Figure 14 : schéma montrant les différentes étapes nécessaires pour la préparation des échantillons et le dosage des acides aminés.

1-preparation des échantillons :

Extraction des AA

Au cours des dernières décennies, presque toutes les méthodes disponibles pour l'extraction des AA des aérosols atmosphériques englobent les extractions assistées par ultrasons avec de l'eau comme solvant (Barbaro et al., 2015). Samy et al., (2011) ont pu extraire jusqu'à ~ 100% de presque tous les acides aminés étudiés à l'aide de filtres vierges enrichis du matériau de référence standard (NIST SRM 2389) contenant un mélange de 17 acides aminés (en solution). Les exceptions sont certains acides aminés plus hydrophobes (par exemple, phénylalanine, tyrosine ou tryptophane), dont les valeurs d'extraction sont de l'ordre (54–78%). Bien que la procédure d'extraction générale soit la même pour toutes les études, les paramètres tels que le temps (15–60 min) et la température (0–23 ° C) de la procédure de sonication, le type et la porosité du filtre utilisé varient dans différentes études. Néanmoins, au meilleur de nos connaissances, aucune étude comparative sur les effets de ces paramètres sur l'efficacité de l'extraction n'a été réalisée. Récemment, de nombreuses procédures incluent l'utilisation de solvants organiques pour extraire les acides aminés de l'atmosphère. Di Filippo et al. (2014), par exemple, ont développé une méthode dans laquelle l'extraction des acides aminés est réalisée à l'aide d'un mélange eau/méthanol (70:30) avec évaporation partielle ultérieure des extraits pour concentrer la fraction d'acides aminés. A la fin de la procédure d'extraction, les extraits sont chargés sur deux cartouches distinctes d'extraction en phase solide.

Hydrolyse des AA

Afin d'étudier les matières protéiques dans les aérosols, une procédure d'hydrolyse est nécessaire pour convertir tous les CAA (combined amino acid) en FAA (free amino acid). La méthode d'hydrolyse implique la libération de tous les CAA de l'échantillon et leur récupération de manière quantitative. Pour l'extraction des CAA à partir d'aérosols, Li et al. (2013) ont utilisé la procédure dite d'hydrolyse standard. Dans cette étude, les filtres contenant les échantillons d'aérosols sont extraits avec de l'eau pure, mélangée avec HCl 12M, et mis au four pendant 24 h à 110 °C pour obtenir le produit d'hydrolyse. Une procédure d'hydrolyse similaire a été suivie par Wedyan and Preston (2008) mais avec quelques modifications. Zhang and Anastasio (2001) et Zhang et al. (2002) ont utilisé une procédure en phase vapeur dans laquelle l'échantillon déjà extrait dans de l'eau ultrapure par sonication est séché sous courant d'azote et mélangé dans des ampoules contenant un mélange acide (HCl 7 M, 10% d'acide trifluoroacétique et 0,1% de phénol). Ensuite, les ampoules sont scellées sous vide, chauffées dans la phase vapeur (156 °C; 23 min), et séchées à nouveau sous un courant d'azote pour éliminer tout résidu acide.

Dérivatisation des AA

La polarité élevée des AA, leur faible volatilité et l'absence d'un groupe chromophore rendent leur séparation et leur détection très difficile. Afin de résoudre ces problèmes, des réactions de dérivation pré- ou post-colonne ont été développées dans le but i) d'augmenter la volatilité des AA, ce qui permet une analyse en chromatographie gaz par la suite, ii) d'avoir un groupement chromophore détectable par UV-Vis ou fluorescence, iii) de mieux séparer des composés, par exemple des isobares.

Le Tableau 8 illustre des exemples des différents réactifs de dérivation utilisés dans différentes phases aqueuses atmosphériques

Tableau 8 : Tableau illustrant des exemples de réactifs de dérivation utilisés pour quantifier les AA dans des eaux atmosphériques.

Réactifs de dérivation	Eaux atmosphériques	Référence
O-phthaldialdehyde/mercaptoethanol (OPA)	Brouillard	(Zhang et Anastasio, 2003)
(OPA) et N-isobutyryl-L-cysteine	Pluie	(Yan et al., Geochim. Cosmochim., 2015)
(OPA)	Pluie	(Mopper and Zika, 1987)
dimethylaminoazobenzènesulfonyl chloride (DABSCl)	Pluie	(Mace et al., 2003)
(OPA)	Pluie	(Gorzelska et al.,1992).
(OPA)	Nuage	(Bianco et al., 2016b)
Ultra Reagent Powder	Nuage	(Triesch et al., 2020)

Les avantages des méthodes de dérivation :

- La sensibilité de détection (des concentrations injectées de l'ordre de la micromole/l en UV de la nanomole/l en fluorescence) (Mace et al., 2003b)
- La séparation de certains AA isobares comme le LEU et ILE (Figure 15)

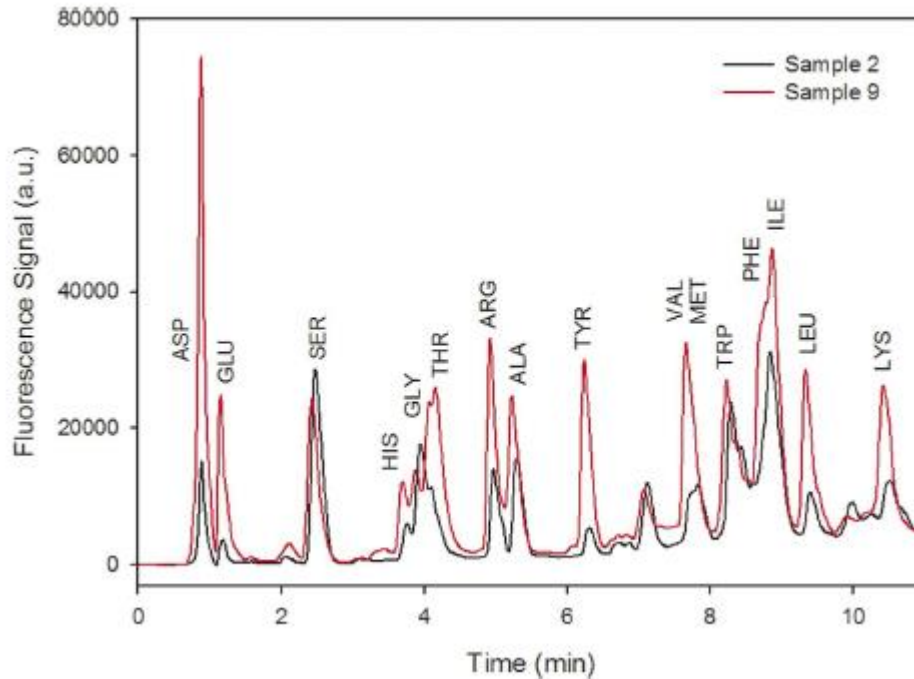


Figure 15 : Exemple de chromatogrammes HPLC obtenus à partir de deux échantillons de nuage prélevés au puy de Dôme après derivatisation des AA par de l'OPA (Bianco et al., 2016b).

- Les systèmes utilisant la chromatographie à polarité de phase inversée peuvent être utilisés pour l'analyse avec les méthodes faisant appel à la derivatisation pré-colonne. La partie fixée sur l'acide aminé en vue de sa détection lui confère un caractère hydrophobe qu'il ne possédait pas avant.

Les inconvénients de ces méthodes :

- La faible stabilité des dérivés finaux lorsque la derivatisation est par l'orthophtaldéhyde (OPA), qui est pourtant une des méthodes de derivatisation les plus utilisées.
- La question de l'universalité de l'étape de derivatisation : les acides aminés - ils tous réagi ? La derivatisation par l'orthophtaldéhyde (OPA) n'est pas du tout adaptée à la détection d'amine secondaire, ce qui la rend inopérante pour les échantillons contenant de la proline.
- La question de la sélectivité de l'étape de derivatisation : des réactions secondaires potentielles peuvent se produire sur d'autres composés que les AA (Samy et al., 2011).

2) Séparation des échantillons

La séparation des échantillons dépend essentiellement du type de colonne utilisée :

- Colonne de phase inverse C18 (Zang and Anastasio, 2003...)
- Colonne échangeuse d'ions (Matsumoto and Uematsu, 2005; Feltracco et al., 2019)
- HILIC (Barbaro et al., 2011)
- Colonne pour la chromatographie en phase gazeuse (Mandalakis et al., 2010).

3) Analyse des échantillons

Plusieurs types d'analyses sont couplés aux méthodes chromatographiques décrites plus haut :

- Spectrométrie UV-Vis (Samy et al., 2011)
- Spectrométrie de fluorescence (Mandalakis et al., 2010)
- Spectrométrie de masse avec différentes technologies : QTOF, Orbitrap, Triple quadrupoles(Samy et al., 2011, Feltracco et al., 2019, Barbaro et al., 2017)

3. Les microorganismes des nuages

3.1. Introduction

La détection de microorganismes dans l'atmosphère remonte au XVIIème siècle avec Antonie van Leeuwenhoek (Gregory, 1971). Il émet 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 milieu du XIXe siècle, ces organismes sont enfin observés, d'abord par Charles Darwin sur des poussières transportées par l'air (Darwin, 1846) puis par Louis Pasteur qui décrit des bactéries et des moisissures viables dans l'air des rues de Paris et, à plus faible concentration, dans l'air des hautes montagnes.

Ces microorganismes aéroportés sont aussi appelés « bioaérosols » et ils appartiennent à la famille plus large des « Aérosols Biologiques Primaires » (PBA, Primary Biological Particle) qui comprennent plusieurs éléments d'origine biologique émis directement de la surface (des sols, des eaux de surface, de la végétation, de l'activité anthropique) vers l'atmosphère.

Dans cette catégorie d'aérosols on retrouve des fragments de végétaux et d'insectes, des pollens ($r > \sim 5 \mu\text{m}$), des microorganismes : algues et champignons/levures ($r > \sim 0,5 \mu\text{m}$), bactéries ($r > \sim 0,2 \mu\text{m}$) et des virus ($\sim 0,005 \mu\text{m} < r < \sim 0,25 \mu\text{m}$). Quelques photos de ces bioaérosols obtenues

par microscopie électronique à balayage sont présentées dans la Figure 16 (Wittmaack et al., 2005).

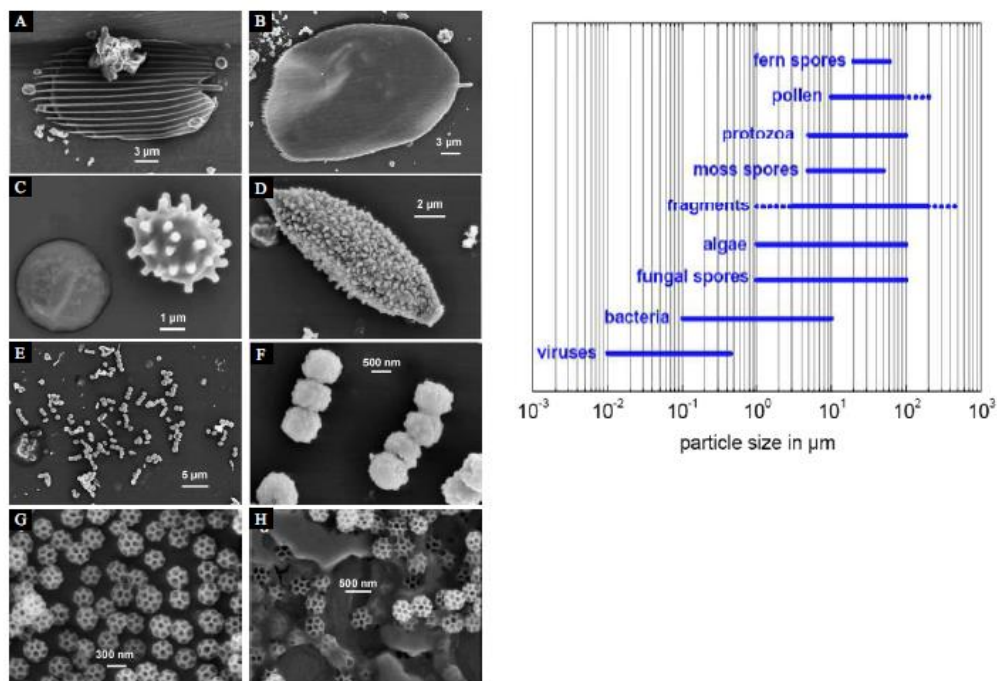


Figure 16 : Bioaérosols vus en microscopie électronique à balayage et leurs distributions selon leurs tailles. A et B : écailles d’insectes, C et D : spores de champignons, E et F : bactéries, G et H : brochosomes (granules microscopiques sécrétées par les insectes de la famille des Cicadellidae) (d’après la thèse de Vaïtilingom (2011), issue de la publication de Wittmaack et al. (2005).

Dans cette thèse nous avons centré notre revue bibliographique sur les bioaérosols ayant les capacités d’influencer la chimie du nuage : les microorganismes ; et particulièrement les bactéries qui ont été les plus étudiées.

3.2. Cycle de vie des microorganismes dans l’atmosphère

Avant de se retrouver dans l’atmosphère, les microorganismes sont d’abord aérosolisés de leurs milieux d’origine : les sols, les surfaces des eaux et des végétaux (Figure 17). Ce phénomène d’aérosolisation dépend de plusieurs facteurs tels que l’altitude, la saison, des facteurs météorologiques (humidité, irradiation solaire, température, vitesse du vent), de la nature du milieu source, ... mais aussi biologiques (la nature du microorganisme comme par exemple sa taille et ses caractéristiques physiologiques : sa pigmentation, sa capacité à être sporulé ou sous forme de biofilm)(Jones and Harrison, 2004).

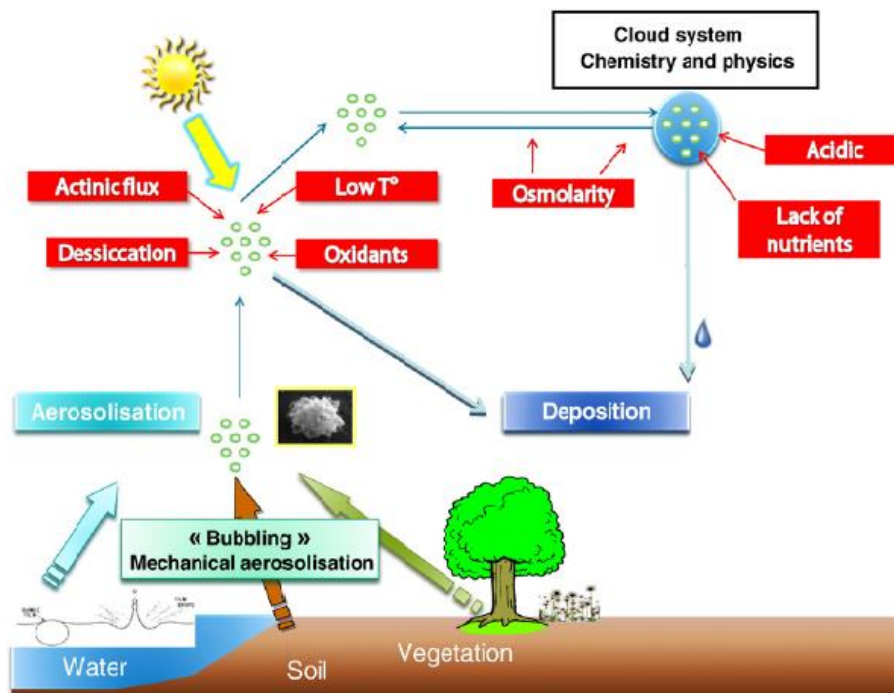


Figure 17: Cycle de vie des microorganismes dans l’atmosphère (d’après Delort et al., 2010).

Parmi les diverses sources possibles de microorganismes dans l’atmosphère, la surface des océans qui couvre 70% du globe, éjecte des microorganismes par des mécanismes de « bubbling » lors de la formation des embruns. (Grammatika and Zimmerman, 2001; Mayol et al., 2014).

Dans la plupart des environnements terrestres, les principaux fournisseurs de bactéries dans l’atmosphère proche de la surface sont les plantes (c’est-à-dire la surface des feuilles appelée “phyllosphère”) et le sol (Jones and Harrison, 2004).

Les concentrations humaines dans les grandes villes, ainsi que les activités agricoles et industrielles (élevage, les cultures intensives, installations de traitement de la tourbe et du bois, installations de traitement des déchets, plates-formes de compostage, tours de refroidissement, etc.) constituent des sources importantes de bioaérosols.

Après leur aérosolisation, les microorganismes vont être transportés dans l’air sur de longues distances dues à leurs tailles. La durée de leur transport a été évaluée par modélisation, elle est de 2 à 10 jours selon les conditions d’humidité (Burrows et al., 2009).

Ils ont 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 et /ou de précipitation. Plusieurs revues ont fait le point sur la connaissance du rôle

potentiel des bioaérosols dans les processus microphysiques au sein du nuage (Sun and Ariya, 2006; Möhler et al., 2007; Morris et al., 2008 ; Delort et al., 2010 ; DeMott and Prenni, 2010; Hoose and Möhler, 2012, Hill et al., 2017).

Leur retour sur terre est surtout assuré par les précipitations s'ils sont intégrés dans les gouttelettes de nuages ou par dépôt sec.

Tout au long de leur voyage dans l'atmosphère les microorganismes vont être soumis à de nombreux stress : dessiccation, exposition aux UV, stress oxydant, manque de nutriments, basses températures, stress osmotique... (Figure 17). Cependant les microorganismes peuvent résister à ces stress grâce à de nombreux mécanismes présentés dans une revue récente (Delort et al., 2017) :

- Par la formation de pigments : environ 50% des isolats de nuages sont pigmentés (jaune, rouge, orange) (Vaïtilingom et al., 2012) comme ceux récupérés dans des régions froides permanentes (Fong et al., 2001 ; Mueller et al., 2005 ; Diesler et al., 2010). Ces pigments sont probablement des caroténoïdes qui pourraient être incorporés dans la membrane microbienne et pourraient avoir un double rôle: (i) ils aident à maintenir la fluidité de la membrane dans le froid; (ii) ils pourraient également agir piège de radicaux libres (Gourmelon et al., 1994).
- Par la formation des spores : certains micro-organismes résistent contre les stress étant sous forme de spores, il peut s'agir de spores fongiques ou d'endospores. Des études antérieures (O'Sullivan et al., 2015) ont estimé les concentrations de spores fongiques de l'ordre 10^4 à 10^6 m^{-3} d'air avec une énorme variabilité spatiale et temporelle. Elbert et al. (2007) signalent qu'une moyenne de 35% de la masse totale des aérosols est des spores fongiques.
- La formation d'un biofilm ou d'agrégats à l'aide de la synthèse de substances d'exopolymère (EPS). La formation de biofilms semble être le moyen typique pour que les microorganismes se développent dans la nature car elle confère de nombreux avantages écologiques (Davey and O'toole, 2000). Cette couche très hydratée entourant les cellules peut les protéger contre la dessiccation et l'exposition aux UV (Davey and O'toole, 2000) ou dans des habitats marins extrêmes (Poli et al., 2010). Monier et Lindow (2003) ont montré une survie différentielle de cellules bactériennes agrégées ou non à la surface des feuilles, les agrégats augmentaient considérablement survie bactérienne en cas de dessiccation.

En dehors de ces stratégies générales, les micro-organismes peuvent modifier spécifiquement leur métabolisme pour faire face à des contraintes spécifiques rencontrées dans les nuages. Un problème majeur pour les micro-organismes est la présence d'oxydants y compris les radicaux OH, H₂O₂, le fer et la lumière solaire.

En laboratoire, Joly et al. (2015) ont mesuré les taux de survie de microorganismes isolés des nuages et exposés à divers stress atmosphériques: exposition à H₂O₂ et à la lumière ultraviolette (stress oxydatif), cycles d'évaporation-condensation (choc osmotique) et cycles de gel-dégel (stress multiples: choc froid, stress oxydatif et stress osmotique). Ces auteurs montrent que les cycles de gel-dégel sont la forme de stress la plus difficile à supporter, que les taux de survie dépendent de la souche. Au contraire l'exposition aux oxydants et à la lumière solaire, dans des conditions proches de celles retrouvées dans les nuages, n'a presque aucun effet négatif quelle que soit la souche.

Les capacités des micro-organismes à survivre dans les nuages les rendent métaboliquement actifs. Sattler et al. (2001) ont été les premiers à montrer que les bactéries peuvent survivre et se développer dans des gouttelettes de nuages en surfusion. Amato et al. (2007b) ont montré que les micro-organismes isolés des nuages peuvent se développer dans l'eau nuageuse incubée en laboratoire. Cette activité métabolique est cohérente avec l'analyse de la teneur en adénosine 5'-triphosphate (ATP) mesurée dans les échantillons d'eau de nuage (Amato et al., 2005). Une étude à long terme de ces mesures *in situ* réalisée à la station de puy de Dôme (France) montre que la teneur en ATP reste assez stable indépendamment de la saison ou des origines géographiques de la masse d'air concernées (Vaïtilingom et al., 2012). Hill et al. (2007) ont également montré que 76% de toutes les bactéries restent vivantes dans les nuages en utilisant le test d'absorption du chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyl tétrazolium.

La présence d'une activité métabolique dans les nuages implique l'utilisation par les cellules de composés carbonés et azotés présents dans les nuages comme nutriments, d'où leur contribution potentielle à la chimie des nuages. En effet, les micro-organismes peuvent être considérés comme des catalyseurs biologiques qui pourraient jouer un rôle alternatif aux réactions chimiques, notamment photochimique, dans les nuages.

3.3 Composition microbienne de l'eau des nuages

On peut distinguer trois types d'approches pour caractériser cette flore microbienne des nuages :

i) un dénombrement total des cellules en utilisant un marqueur fluorescent (DAPI ou cytométrie

en flux), directement *in situ* dans l'eau de nuage, ii) une étude de la biodiversité des microorganismes isolés et cultivés à partir de l'eau de nuage, iii) une approche globale de la biodiversité de l'eau de nuage par métagénomique.

- **Dénombrement total des microorganismes**

La concentration cellulaire des microorganismes dans l'eau de nuage est particulièrement faible, elle est de l'ordre de ce qui est décrit dans l'eau potable. La concentration de cellules a été déterminée dans 31 des 34 événements de nuages récoltés aux puys de Dôme ; elle variait de 3000 à 300 000 bactéries. mL⁻¹ et de 900 à 40,000 les champignons mL⁻¹ (Vaïtilingom et al., 2012). Au Mont Rax dans les Alpes allemandes (1644 m d'altitude), Bauer et al. (2002) ont analysé des échantillons des événements de nuages et ont trouvé des bactéries de l'ordre de 8000 à 81 000 bactéries mL⁻¹ et 1000 à 10 000 spores fongiques mL⁻¹. Dans les Alpes en Autriche (Mont Sonnblick, 3106 m a.s.l), la concentration de bactéries dans plusieurs échantillons de nuages était légèrement inférieure, probablement en raison de la haute altitude de ce site, elle variait de 800 à 2500 cellules mL⁻¹ (Sattler et al., 2001).

Le Tableau 9 résume la concentration des bactéries et des champignons par mL d'eau de nuage dans divers sites.

Tableau 9 : Concentration des bactéries et des champignons par mL d'eau de nuage dans divers sites.

Site	Nombre	Reference
Puys de dôme, France	3000 à 300 000 bactéries mL ⁻¹ 900 à 40000 champignons mL ⁻¹	(Vaïtilingom et al., 2012)
Mont Rax dans les Alpes allemandes	-8000 à 81 000 bactéries mL ⁻¹ -1000 à 10 000 champignons mL ⁻¹	(Bauer et al., 2002)
Alpes en Autriche	800 à 2500 bactéries mL ⁻¹	(Sattler et al., 2001)

- **Biodiversité des microorganismes cultivables**

Si l'on considère les microorganismes cultivables, les études les plus complètes (près de 10 ans d'observation) concernent le site du puy de Dôme (Vaïtilingom et al., 2012 ; Amato et al., 2005, 2007c, Figure 18).

Les genres bactériens les plus souvent retrouvés sont les *Pseudomonas* (Gamma-Protéobactéries), les *Sphingomonas* (Alpha-Protéobactéries), les *Streptomyces*, les *Rhodococcus*, les *Figoribacterium* (3 Actinobactéries) et les *Bacillus* (Firmicutes)(Figure 18 a). Concernant les levures, les genres le plus retrouvés sont : les *Dioszegia*, les *Udeniomyces* et les *Cryptococcus* (Basidiomycota) (Figure 18b), les genres appartenant aux Ascomycetes sont plus minoritaires.

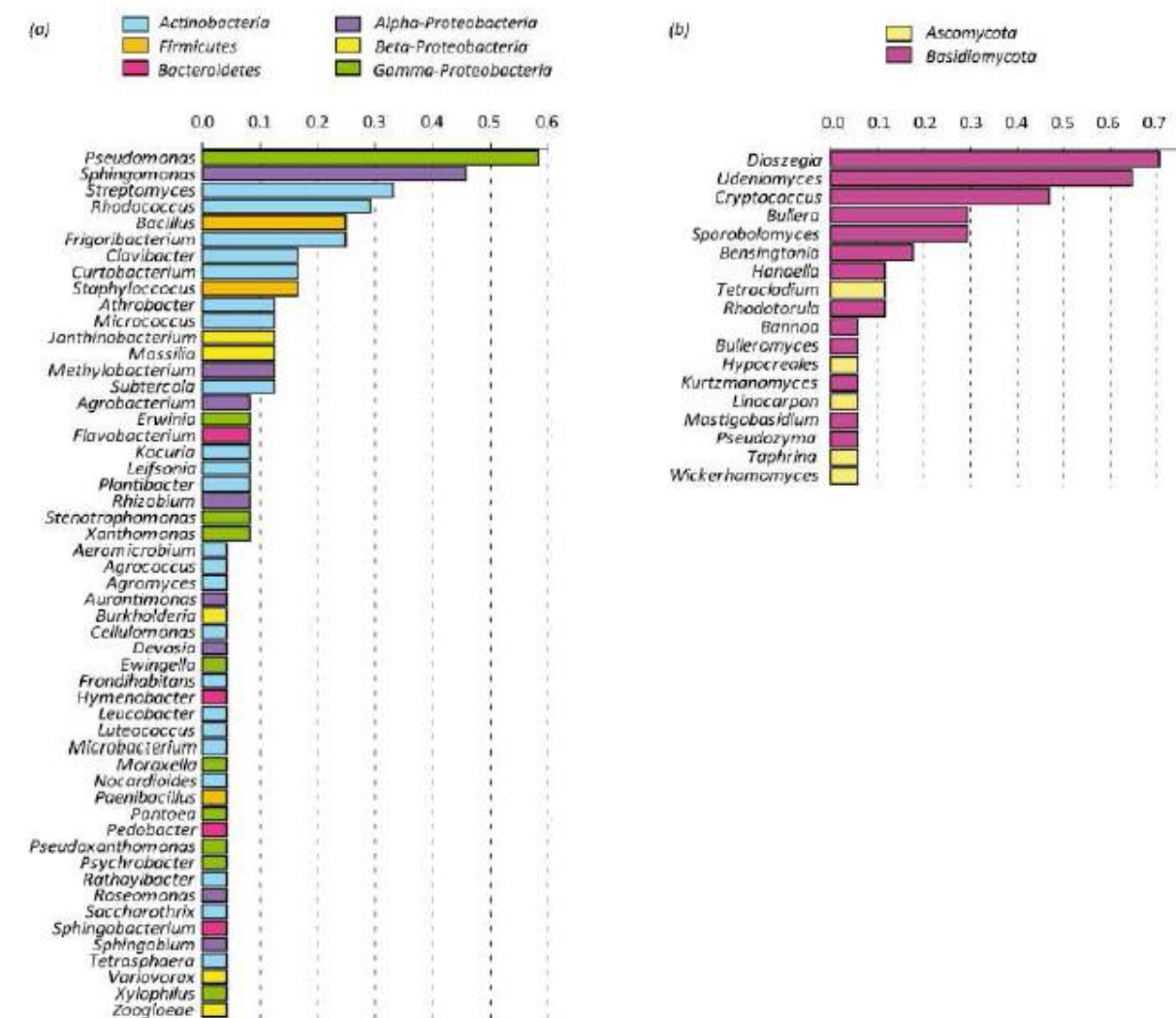


Figure 18 : Fréquence d'observation des souches cultivables de bactéries (a) et de levures (b) dans l'eau de nuage prélevée au sommet du puy de Dôme (D'après la thèse de M. JOLY, 2013).

Certains genres bactériens majoritaires comme les *Bacillus*, *Pseudomonas* ont également été décrits dans l'eau de brouillard en Italie (Fuzzi et al., 1997) et des grêlons et nuages en Slovénie (Temkiv et al., 2012; Šantl-Temkiv et al., 2013), mais d'autres genres importants ont également été décrits dans ces études comme des *Acinetobacter* (brouillard), ou des *Methylobacterium*

(grêlons, nuages). Pour les eucaryotes, Fruzzi et al. (1997) décrivaient la présence d'*Aspergillus*, *Penicillium*, ou encore des *Candida* et *Rhodotorula*.

- **Biodiversité globale des microorganismes**

Pendant de nombreuses années l'étude de la biodiversité des nuages était limitée à l'identification des microorganismes cultivables à cause de la faible biomasse présente. Plus récemment la conjonction du développement de méthodes de prélèvement plus efficaces et de l'évolution des méthodes de biologie moléculaire a permis d'obtenir des données sur une biodiversité globale de l'eau de nuage.

Comme dans le cas des cultivables, les phyla bactériens les plus retrouvés sont les Protéobactéries et les Actinobactéries alors que les Bacteroidetes et les Firmicutes sont les plus minoritaires (Bowers et al., 2009 ; Kourtev et al., 2011 ; DeLeon-Rodriguez et al., 2013 ; Santl-Temkiv et al., 2013 a,b ; Amato et al., 2017 ; Wei et al., 2017 ; Xu et al, 2017). La présence de Cyanobacteries a été également rapportée par Kourtev et al. (2011).

La Figure 19 présente la diversité microbienne identifiée dans trois nuages prélevés au puy de Dôme (Amato et al., 2017). Pour les bactéries (Figure 19A), on retrouve la prédominance des Protéobactéries ; les Firmicutes, Bactéroidetes et Actinobacteries sont ensuite les phyla les plus représentés. Parmi les γ -Protéobactéries (Figure 19 C) il faut souligner la présence de majeure du genre *Pseudomonas*, ce qui conforte les analyses des cultivables. Pour les eucaryotes (Figure 19 B), près de 50% reste non identifié, 25% sont des champignons. Parmi ces champignons des Basidiomycota (38-60%) et des Ascomycota (29-48%) sont dominants, comme pour les cultivables.

Un point important à noter est que les groupes microbiens présents sont également actifs *in situ* comme le montre la présence d'ARN en parallèle à celle d'ADN (Figure 19). Ces analyses sont donc cohérentes avec les mesures d'ATP *in situ* réalisées antérieurement sur des échantillons de nuage (Vaïtilingom et al., 2012).

Un autre point majeur est que la biodiversité globale révélée par des techniques génomiques ne remet pas en cause celle observée avec des cultivables bien que l'on sache que les cultivables reflètent moins d'1% des microorganismes totaux. Ceci est très intéressant car il valide l'utilisation de souches isolées pour des expériences de laboratoire comme modèle de la biodiversité réelle du nuage.

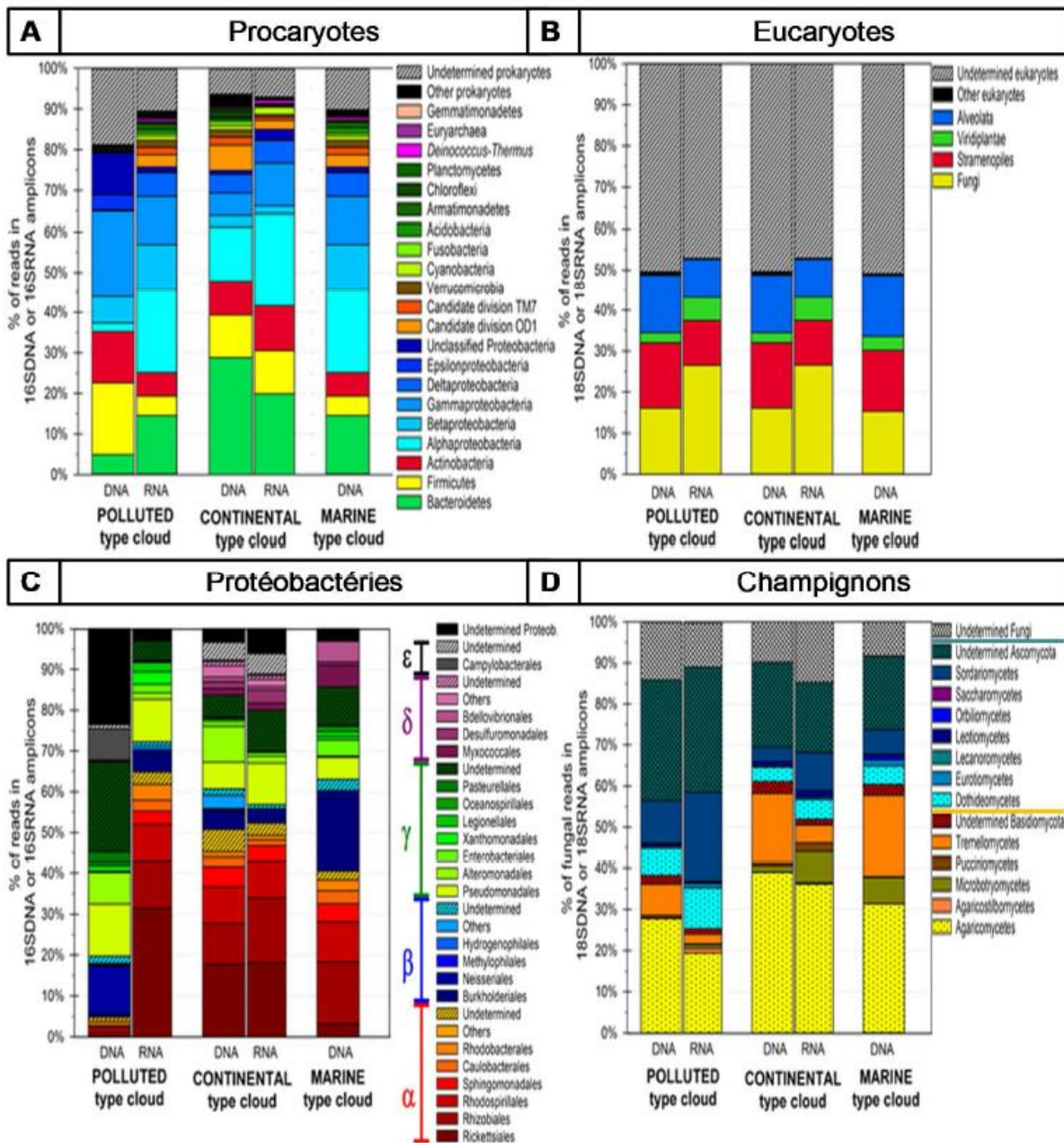


Figure 19: Composition de la communauté microbienne dans les 3 types de nuages récoltés au sommet du puy de Dôme (Amato et al., 2017).

3.4 Variabilité de la composition microbienne de l'eau des nuages

Plusieurs paramètres semblent influencer la concentration et le type de microorganismes dans les nuages, cependant nous manquons de recul et les résultats obtenus sont parfois contradictoires :

- **Influence de l'origine de la masse d'air**

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 2.2 la composition chimique du nuage varie en fonction de l'origine de la masse d'air, définissant ainsi des nuages plutôt pollués, continentaux, océaniques ...

En ce qui concerne la nombre de microorganismes, les nuages issus de masses d'air d'origine continentales tendent à héberger davantage de microorganismes que celles originaires des régions océaniques (Vaïtilingom et al., 2012). Toujours au puy de Dôme, l'étude d'Amato et al. (2007a) avait montré une corrélation positive entre la concentration en microorganismes et le pH, donc en fait avec le degré de pollution du nuage, mais une autre étude menée sur un temps beaucoup plus long (10 ans) n'a pas confirmé cette observation (Vaïtilingom et al., 2012).

En ce qui concerne la biodiversité bactérienne, les types de nuage influence la diversité globale des microorganismes (Amato et al., 2017)(Figure 19). Alors que les Protéobactéries sont présentes majoritairement dans les trois types de nuage, le rapport Firmicutes/ Bacteroidetes est inversé si on compare un nuage pollué avec un nuage marin (Figure 19A). Concernant les eucaryotes, le type de nuage n'a pas beaucoup d'effets sur la distribution des microorganismes, ceci s'explique facilement car plus de 50% de la communauté n'est pas identifiée (Figure 19B). Pour la communauté des champignons (Figure 19C), les genres existants sont identiques pour tous types de nuage mais leurs proportions varient. Ainsi pour les nuages marin et continental, les Agaricomycètes et les Tremellomycètes sont les genres dominants (56 et 51%) alors qu'ils diminuent dans le nuage pollué (46%). Au contraire, les champignons Ascomycètes sont plus présents dans le nuage pollué.

- **Influence des saisons**

La composition bactérienne (analysée à partir des cultivables) de l'eau de nuage varie en fonction des saisons (Figure 20). Selon Amato et al. (2007b) le nombre Gamma-Protéobactéries par exemple augmente de 8 à 37% en passant de l'hiver à l'été, ceci peut s'expliquer par la forte résistance de ces bactéries aux émissions UV et par l'augmentation de leur source d'émission associée principalement à la végétation.

Là encore il nous faut rester très prudent car peu de données existent à ce jour.

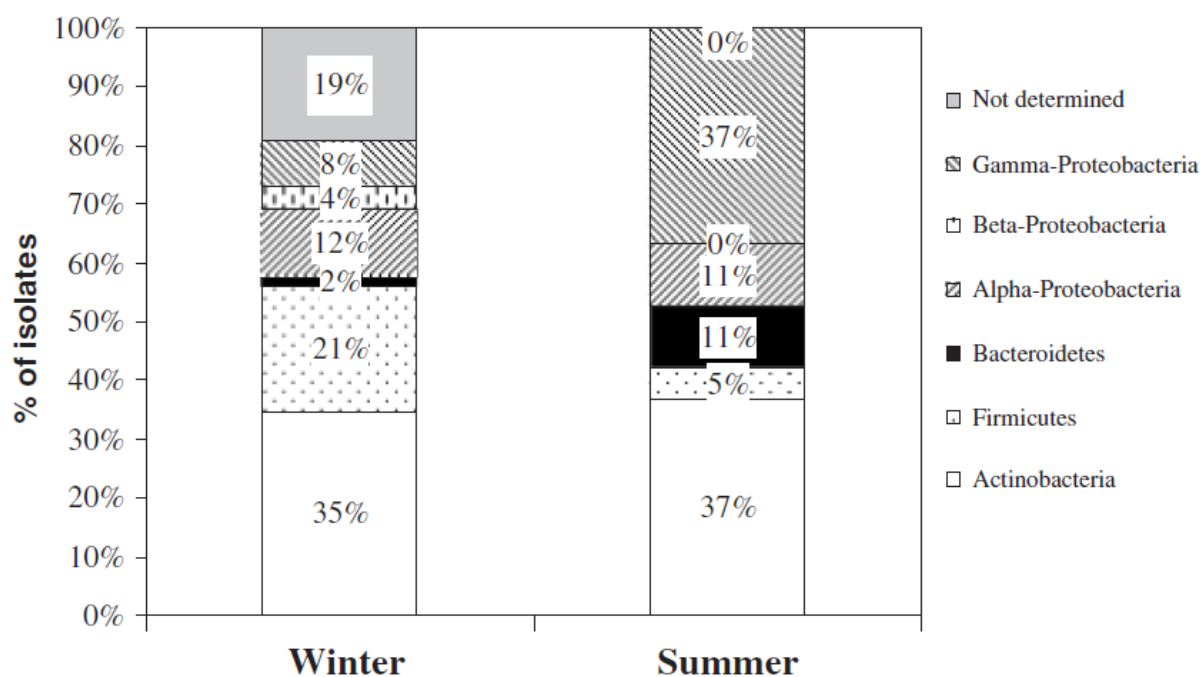


Figure 20 : Composition de la microflore bactérienne cultivable en été et en hiver selon une étude effectuée au puy de Dôme, France (Amato et al., 2007b).

4. Les processus de transformations chimiques et microbiologiques dans les nuages

4.1 Les processus microbiologiques

La découverte récente de microorganismes vivants et potentiellement actifs au sein de l'eau des nuages a ouvert de nouvelles perspectives, puisqu'ils peuvent être alors considérés comme catalyseurs pour transformer la matière organique (ou oxydants) et constituer une voie alternative à la chimie radicalaire.

Afin de démontrer l'impact des microorganismes sur les composés organiques présents dans l'eau du nuage, deux stratégies scientifiques ont été mises en œuvre :

La première est de type expérimental en laboratoire : il s'agit de mesurer des vitesses de biodégradation de composés organiques (ou oxydants) dans des microcosmes mimant au mieux les conditions de l'eau nuageuse. Ces microcosmes ont été de plus en plus complexes, de la molécule pure en présence d'une souche microbienne isolée des nuages en milieu artificiel jusqu'à de vrais échantillons de nuage comportant toute leur complexité chimique et microbienne. Cette stratégie permet de comparer directement les voies de transformation

biotiques et abiotiques dans la phase aqueuse des nuages. Son autre avantage est de pouvoir fournir des valeurs expérimentales pour implémenter des modèles de chimie atmosphérique.

La deuxième stratégie, beaucoup plus récente, est une approche *in situ* en mesurant directement les transcrits (ARNm) de gènes codant pour des enzymes impliquées dans des activités de biotransformation de ces composés organiques (ou oxydants). Son avantage majeur est de prouver de manière directe une activité biologique dans les nuages, mais elle ne permet pas de comparaison avec l'activité chimique.

Ces deux approches sont donc très complémentaires.

4.1.1 Rôle des microorganismes dans la biotransformation des acides carboxyliques

Au vu de leur abondance dans la phase aqueuse des nuages, les études de biotransformation se sont principalement focalisées sur la dégradation des acides mono- et di-carboxyliques.

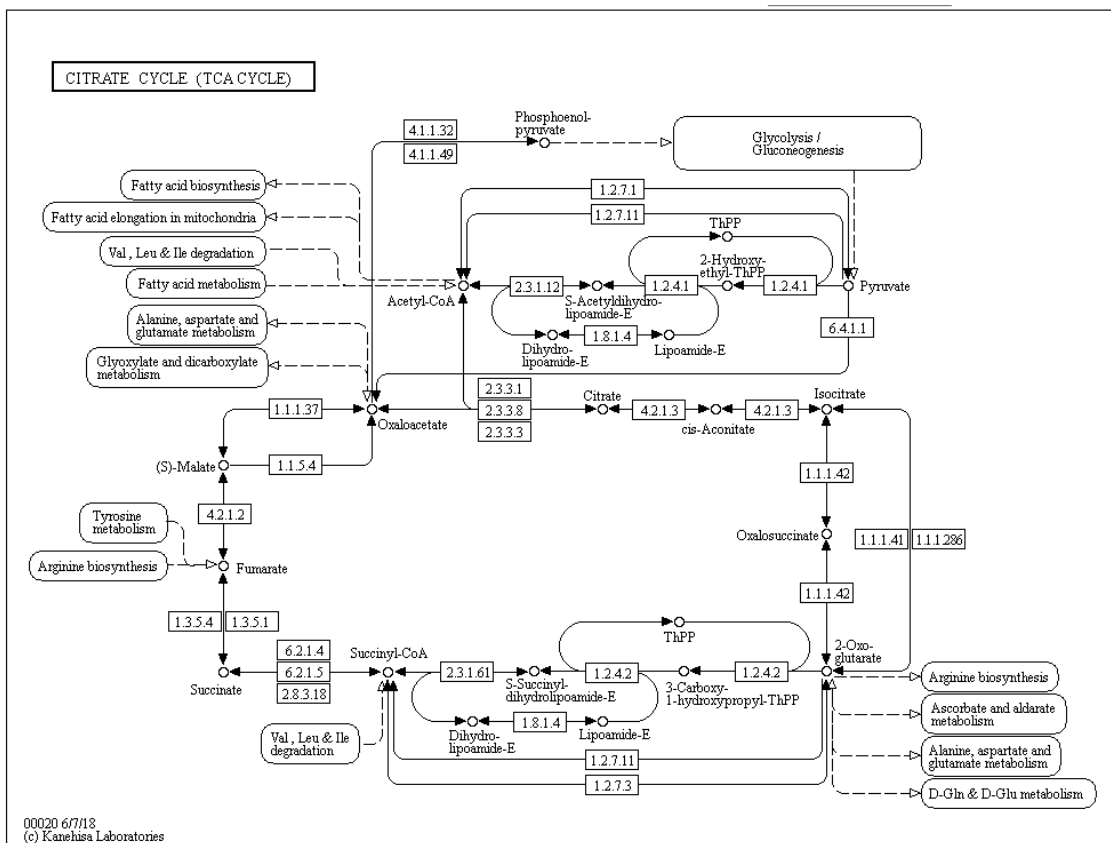


Figure 21: Voies métaboliques du cycle de Krebs (voie du citrate ou des acides tricarboxyliques) obtenues à partir de Kegg(https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ko00020).

La Figure 21 montre le cycle de Krebs (ou cycle du citrate), TCA), grâce auquel les microorganismes peuvent métaboliser certains métabolites d'intérêt pour les nuages tels que le citrate, le succinate, le pyruvate, l'acétate, le malate et le fumarate.

La première étude sur la biodégradation des acides mono-carboxyliques a été faite par Herlihy et al. (1987), qui ont mis en évidence la dégradation des acides formiques et acétiques par les bactéries dans l'eau de pluie. Ont suivi les études d'Ariya et al. (2002) et de Côté et al. (2008) qui ont montré que des acides mono- et di-carboxyliques détectés dans l'atmosphère (succinique, glutarique, formique, acétique, malique, citrique ...) peuvent être efficacement dégradés par des champignons isolés de l'air du genre *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Eurotium*, *Thysanophora*, *Geotrichum*. Par exemple le genre *Thysanophora* est capable de dégrader rapidement une solution d'acide malonique, et la souche *Geotrichum* sp dégrade l'acide succinique. Cependant pour l'acide oxalique, aucune biotransformation n'a été mise en évidence.

Plusieurs études ont été menées avec une soixantaine de souches microbiennes isolées de l'eau de nuage au puy de Dôme (France) (Amato et al. 2005, 2007). Toutes ces souches ont montré une aptitude à transformer des acides carboxyliques allant du C1 au C4 (formiate, acétate, lactate et succinate) avec dans certains cas la synthèse de pyruvate et de fumarate. Là encore l'oxalate n'a été dégradé par aucune des souches microbiennes.

Après avoir identifié ce potentiel de biodégradation des acides carboxyliques, l'enjeu a été de mesurer leurs vitesses de biodégradation. Une série d'expériences a été menée avec une souche pure et un composé organique pur (Vaitilingom et al., 2010), puis des milieux nuages artificiels plus complexes ont été mis au point, mimant au mieux le milieu naturel. Ainsi 17 souches ont été testées par Vaitilingom et al. (2011) dans deux milieux nuageux artificiels (« marin » et « continental ») et à 2 températures (hivernale 5°C, estivale 17°C). Beaucoup de souches étaient capables de dégrader les acides carboxyliques à 17 °C et 5 °C, respectivement. Les taux de biodégradation de l'acétate variaient de 0 à 7×10^{-18} mol cellule⁻¹s⁻¹ (souche 14b10, milieu continental) à 17 °C et à 15 °C, et de 0 à 2×10^{-18} mol cellule⁻¹s⁻¹ (*Pseudomonas* sp 14b10 et *Rhodococcus* sp. 23b5, continentales) à 5 °C. Pour le formiate, les vitesses ont atteint 1×10^{-17} mol cellule⁻¹s⁻¹ (*Pseudomonas* sp. 6b4, milieu continental) à 17 °C, et 5×10^{-18} mol cellule⁻¹s⁻¹ (*Pseudomonas syringae* 12b8, milieu marin) à 5 °C. Pour le succinate, les taux de biodégradation variaient de 0 à 1×10^{-18} mol cellule⁻¹s⁻¹ (*Pseudomonas syringae* 3b1 et 13b2, milieu marin) à 17 °C, et de 0 à 3×10^{-19} mol cellule⁻¹s⁻¹ (*Pseudomonas syringae* 13b2, milieu marin) à 5 et 17 °C.

Sauf dans de rares cas, les souches de *Pseudomonas* et *Rhodococcus* étaient actives envers tous les composés testés. Au contraire, les souches de *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Clavibacter* et *Frigoribacterium* se sont révélées inactives dans toutes les conditions expérimentales. L'une des trois souches de *Sphingomonas* testées a pu dégrader le formiate et le succinate à 17°C, mais pas à 5 °C.

Une conclusion générale de ce travail est que :

- i) L'activité des microorganismes et très genre dépendant, les souches de *Pseudomonas*, genre dominant des nuages, sont très actifs,
- ii) La nature des milieux nuageux, continental ou marin, qui se distinguent notamment par leur pH, a peu d'impact sur la biodégradation. Ceci est sans doute lié à la régulation du pH interne des bactéries dans ces conditions.
- iii) La température (5°C ou 17°C) a également peu d'impact en général
- iv) L'oxalate n'a été dégradé par aucune des souches testées.

Enfin des expériences de biodégradation ont été réalisées directement sur des échantillons d'eau nuageuse réelle prélevée au puy de Dôme et de composition chimique complexe (Vaitilingom et al., 2013). Dans ce cas c'est la totalité de la flore endogène qui a biodégradé les acides carboxyliques tels que l'acétate, le succinate, le malonate et le formiate. A noter que l'oxalate n'a pas été dégradé.

Au final ces dernières expériences ont confirmé les résultats obtenus avec des souches isolées en milieu synthétique. Les vitesses de dégradation moyennes mesurées avec les 17 souches étaient du même ordre de grandeur que celles mesurées en milieu réel (Vaitilingom et al 2013, 2011).

Une étude récente d'Amato et al (2019) confirme une activité *in situ* des microorganismes vis-à-vis de ces voies métaboliques. A noter particulièrement les gènes exprimés correspondant aux fonctions métaboliques regroupées sous le terme « Carbon » dans la Figure 22. Les fonctions « Tricarboxylic Acid cycles » et « carboxylic acid metabolic process » sont bien activées dans le nuage.

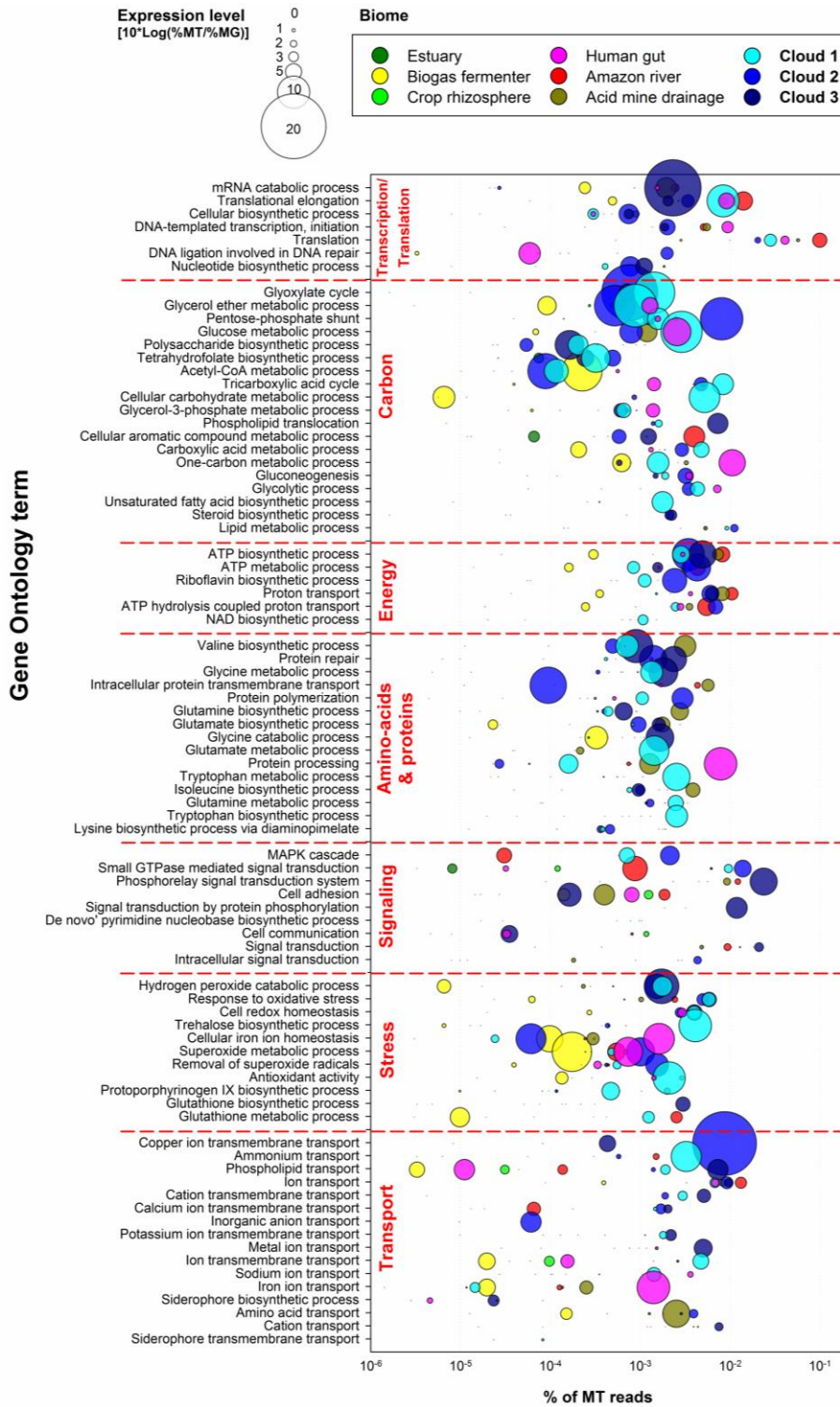


Figure 22: Processus biologiques exprimés par les communautés des nuages comparés avec ceux d'autres environnements. La taille des bulles décrit le niveau d'expression de la fonction biologique concernée. Les bulles en bleu correspondent au niveau d'expression dans trois échantillons de nuage prélevés au puy de Dôme (Amato et al., 2019).

4.1.2 Rôle des microorganismes dans la biotransformation du méthanol et du formaldéhyde

Certaines souches bactériennes sont capables de transformer le méthanol et le formaldéhyde par différentes voies métaboliques (Figure 23) :

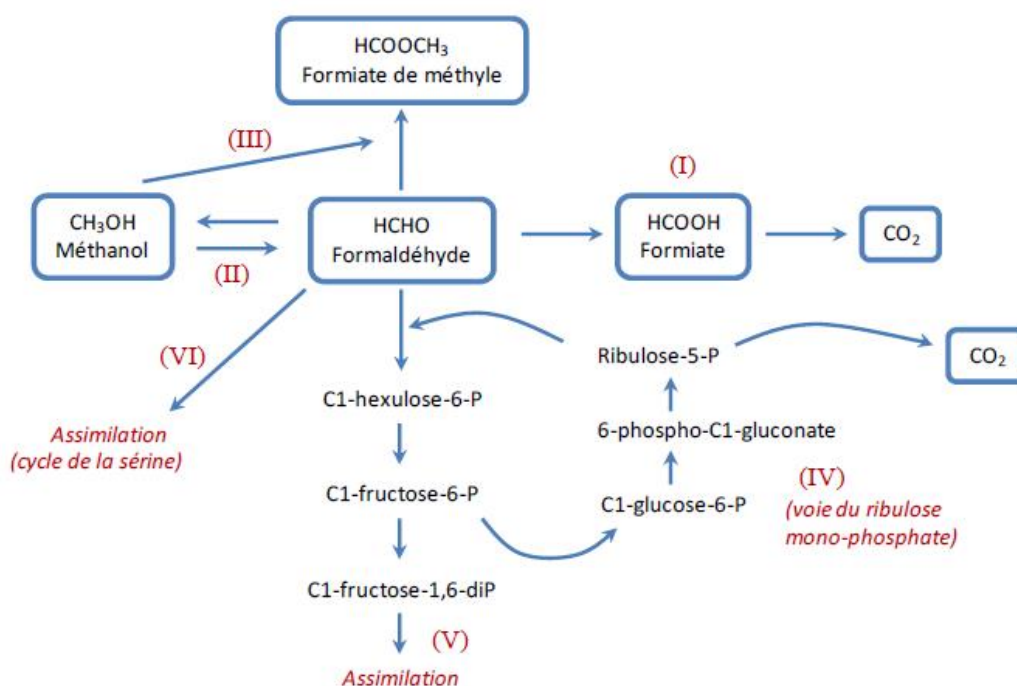


Figure 23: Principales voies métaboliques impliquées dans la biotransformation du formaldéhyde.

Le formaldéhyde peut être transformé en méthanol (voie I), en formiate (voie II) et CO₂, ou en formiate de méthyle. Le méthanol peut également être transformé en formaldéhyde par oxydation. Donc avec ces transformations, le méthanol et le formaldéhyde perdent leurs effets toxiques connus sur de nombreuses espèces microbiennes.

Au contraire, les voies V et VI sont des voies d'assimilation qui permettent aux microorganismes la production des molécules carbonées comme les sucres ou les acides aminés. Ces voies métaboliques sont présentes chez des microorganismes dites « méthylophiles », où la plupart sont des bactéries aérobies appartenant aux classes des α -, β -et γ -Protéobactéries et des bactéries à Gram positif. Ce type de bactéries est très présent dans les nuages (Vaïtilingom et al., 2012). Des souches de *Methylobacterium*, spécialisées dans la dégradation des C1 (en particulier du méthane et du méthanol) ont été identifiées comme une fraction non négligeable des bactéries dans les grêlons (Temkiv et al., 2012) mais reste minoritaire dans les nuages du puy de Dôme (Vaïtilingom et al., 2012),

Amato et al. (2007b) ont montré que la plupart des 60 souches microbiennes isolées à la station du puy de Dôme(France), sont capables de dégrader le formaldéhyde et le méthanol. Husárová et al. (2011) ont mené un étude approfondie avec 4 souches bactériennes (*Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas syringa*, *Frigoribacterium* sp., *Bacillus* sp.) et ont mesuré les vitesses de biodégradation du formaldéhyde et le méthanol à 5°C et 17°C.

À 17 ° C, toutes les souches ont dégradé le méthanol, à des taux allant de 10^{-21} à 10^{-23} mole cell⁻¹ s⁻¹. À 5 ° C, les taux de transformation du méthanol étaient inférieurs et n'ont pu être mesurés que pour deux souches, *P. syringae* et *Frigoribacterium* sp. ; ces vitesses étaient respectivement $5,8 \times 10^{-22}$ et $2,5 \times 10^{-23}$ mol cell⁻¹ s⁻¹. Concernant le formaldéhyde, il a été efficacement dégradé par les quatre souches bactériennes étudiées, avec des valeurs comprises entre 10^{-19} - 10^{-21} mol cell⁻¹ s⁻¹ aux deux températures 17 ° C et 5 ° C. Ainsi, contrairement au méthanol, la basse température n'était pas un facteur limitant pour la biodégradation du formaldéhyde.

Les études en milieux nuageux réels ont également confirmé le potentiel de biodégradation du formaldéhyde par la microflore endogène du nuage (Vaitilingom et al., 2013).

Enfin les études par meta-transcriptomiques récentes (Amato et al., 2019) ont montré que les voies métaboliques du C1 étaient bien actives directement dans l'eau de nuage. C'est ce qui est précisé dans la Figure 23 (voir section « carbon », gènes impliqués dans « One carbon metabolic process »).

4.1.3 Rôle des microorganismes dans la biotransformation du phénol

Un grand nombre d'études ont été menées pour évaluer la biodégradation du phénol par les microorganismes, y compris bactéries, champignons, levures et algues dans un contexte de chimie environnementale et de traitement des eaux. La plupart de ces microorganismes étaient isolés des sols (y compris la rhizosphère) et des eaux (eaux douces et marines, eaux usées et sédiments) contaminés par le phénol (Basha et al., 2010) (Tian et al., 2017). Cependant peu d'études ont été réalisées sur sa biodégradation du phénol dans l'atmosphère.

La biodégradation du phénol peut avoir lieu de façon aérobie ou anaérobie. Dans les nuages, l'oxygène étant omniprésent, donc dans cette partie, nous présentons la biodégradation aérobie.

La dégradation du phénol fait partie de la voie de dégradation du benzoate dans KEGG (Base de données des voies métaboliques https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ec00362) ; Une simplification de cette voie est illustrée dans la Figure 24 :

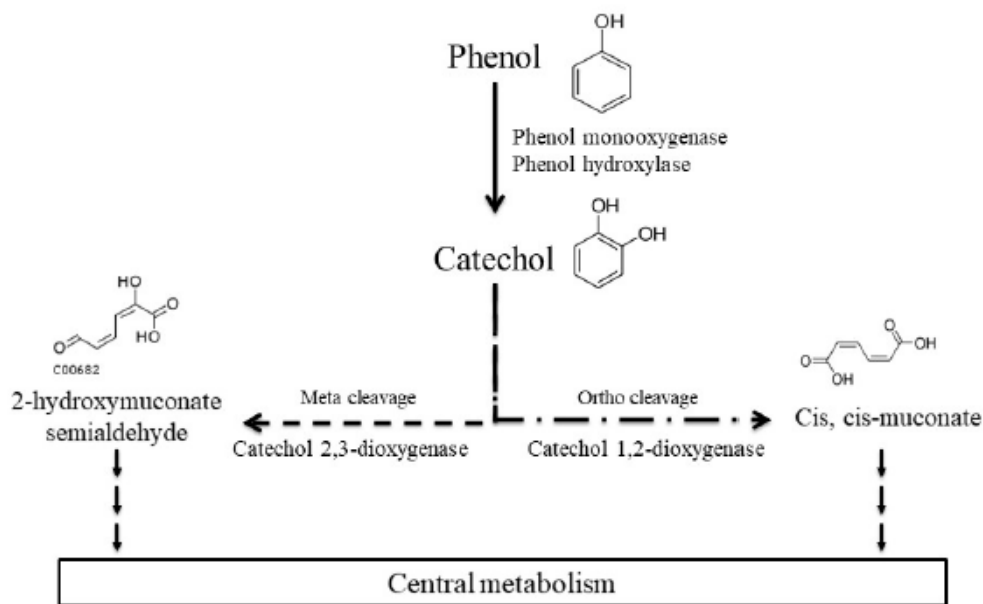
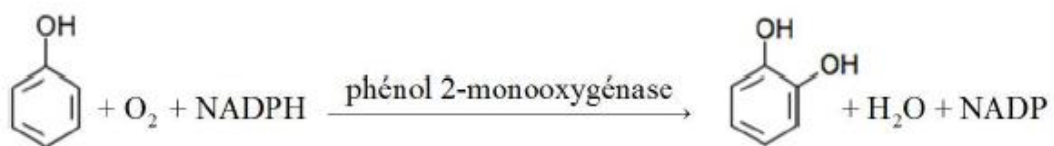


Figure 24: Principales voies de biodégradation du phénol décrites pour les microorganismes aérobies d'après la base de données KEGG (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ec00362). (Lallement et al., 2018).

Tout d'abord, le phénol peut être oxydé en catéchol (même produit obtenu en cas d'oxydation par voie photochimique) par un même enzyme qui porte des différents noms : phénol hydroxylase ou phénol 2-monooxygénase ou phénol o-hydroxylase. Durant cette oxydation et en présence d'un cofacteur nécessaire à la réaction (NADPH), l'enzyme phénol hydroxylase fixe un atome d'oxygène provenant du dioxygène sur le phénol, l'autre oxygène est réduit en eau. La réaction d'oxydation du phénol en catéchol est la suivante :



Ensuite, le catéchol subit une dégradation selon la voie intradiol et la voie extradiol :

a) voie intradiol (position ortho) : produit de succinyl-CoA et d'acétoacétyl-CoA une fois le cycle aromatique ouvert. Cette voie est initiée par le clivage du catéchol sous l'action de la catéchol-1,2-dioxygénase, qui à son tour forme le cis-muconate, par l'ajout d'un groupement hydroxyle.

b) voie extradiol (position méta) : produit l'acétaldéhyde et du pyruvate. Cette voie s'active sous l'action de la catéchol-2,3-dioxygénase, qui forme le 2 hydroxymuconic semialdéhyde.

Une fois formées, ces molécules vont pouvoir intégrer le métabolisme central par le cycle du citrate et la glycolyse.

Pour fonctionner, les enzymes nécessitent du fer dans leurs sites actifs : l'enzyme catéchol-1,2-dioxygénase utilise du Fe(III) alors que la catéchol-2,3-dioxygénase nécessite du Fe(II) :

- Pour la catéchol-1,2-dioxygénase : Le rôle essentiel de Fe(III) est de créer un substrat qui réagit avec O₂. Pour cela le noyau ferrique se lie à l'enzyme par : 2 histidines et 2 tyrosines (acides aminés) ceci entraîne la formation d'une semi-quinone. La semi-quinone formée va subir un réarrangement pour permettre l'ouverture du cycle (Figure 25).

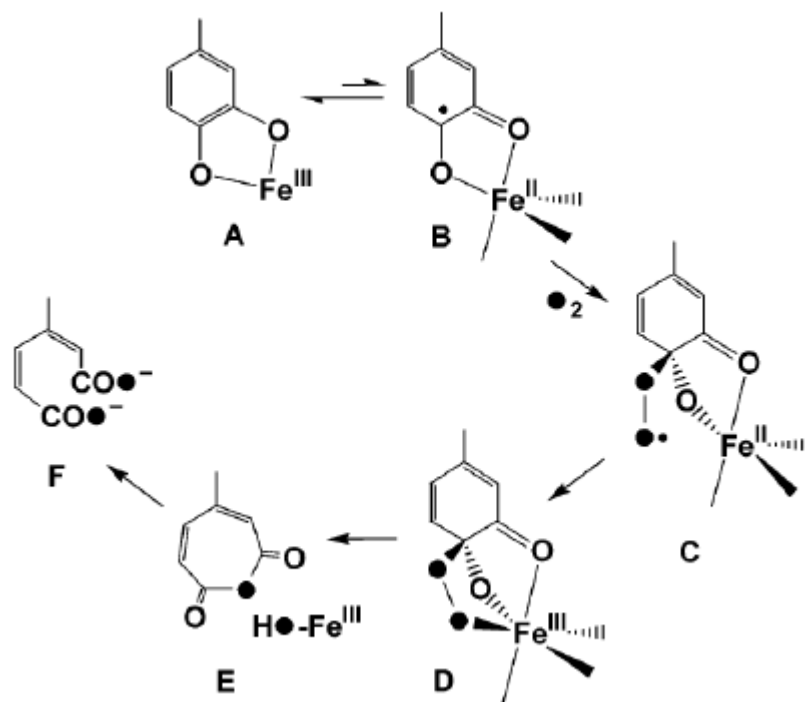


Figure 25: Mécanisme catalytique de la dioxygénase intradiol (Costas et al., 2004).

- Pour la catéchol-2,3-dioxygénase : le noyau ferreux est lié au substrat, à 2 histidines et un acide glutamique. Le changement de la coordination du fer du à la perte d'une molécule d'eau, permet la réaction du centre métallique avec le dioxygène aboutissant à la formation d'un complexe avec un radical anion superoxyde. Un réarrangement électronique permet là encore l'ouverture du cycle.

A notre connaissance, seule la publication de Lallement et al (2018) a étudié l'impact des microorganismes issus des nuages sur la dégradation du phénol dans la phase aqueuse atmosphérique. Afin d'évaluer le potentiel de biodégradation du phénol dans les nuages deux approches ont été menées : une analyse métatranscriptomique d'eau de nuage prélevée au puy de Dôme directement *in situ* et un criblage métabolique réalisé avec 145 souches bactériennes isolées au même site.

Parmi les métatranscriptomes enrichis en ARN messager procaryote obtenus à partir des échantillons d'eau de nuage, ces auteurs ont détecté des transcrits de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation du phénol (phénol monoxygénases et phénol hydroxylases) et son principal produit de dégradation, le catéchol (1,2-dioxygénases de catéchol)(Figure 26).

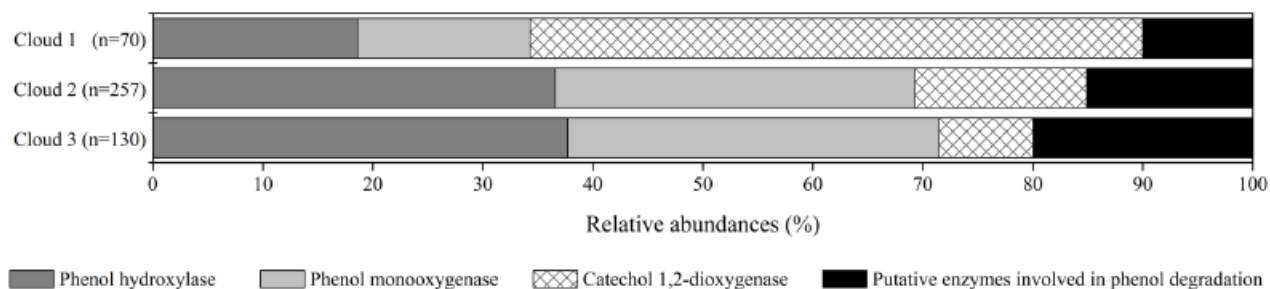


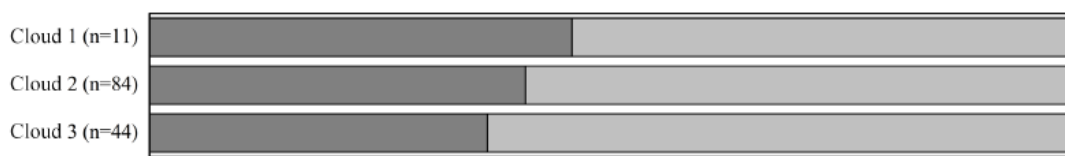
Figure 26: Abondance relative des transcrits dans les eaux nuageuses des gènes codant pour les enzymes impliquées dans les voies de dégradation du phénol (Lallement et al., 2018).

Cette étude a proposé que ces enzymes provenaient probablement des Gamma-Protéobactéries, une classe dominante dans les nuages, plus spécifiquement des genres *Acinetobacter* et *Pseudomonas* correspondant seulement à quatre espèces (*P. fluorescens*, *A. gyllenbergii*, *A. oleivorans* et *A. pitii*)(Figure 27). Les Gamma-Protéobactéries contribuent jusqu'à 21% des séquences ribosomiques identifiées chez les bactéries ciblées lors de requêtes sur le métagénome.

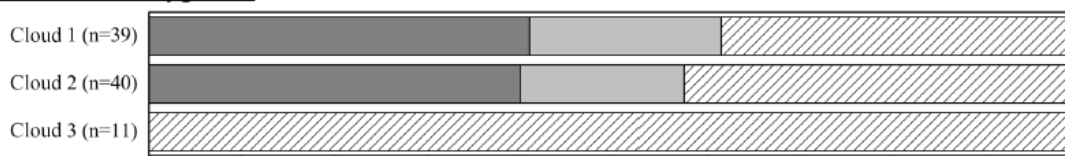
Phenol hydroxylase



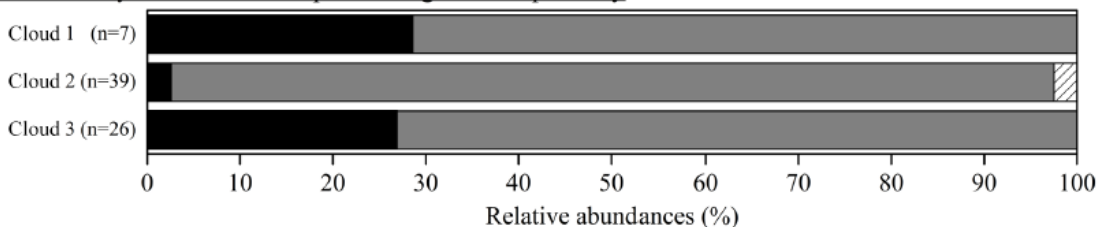
Phenol monooxygenase



Catechol 1,2-dioxygenase



Putative enzymes involved in phenol degradation pathway



■ *Acinetobacter gyllenbergii* ■ *Acinetobacter oleivorans* ■ *Acinetobacter pittii* ▨ *Pseudomonas fluorescens*

Figure 27: Abondance relative de l'affiliation taxonomique putative des micro-organismes impliqués dans la dégradation du phénol et du catéchol (Lallement et al., 2018).

Des isolats bactériens provenant d'échantillons d'eau de nuages du genre *Pseudomonas* *Rhodococcus* et de la famille des Moraxellaceae ont été sélectionnés pour évaluer leur capacité à dégrader le phénol. Parmi les 145 souches testées, 93% d'entre elles ont été positives (Figure 28).

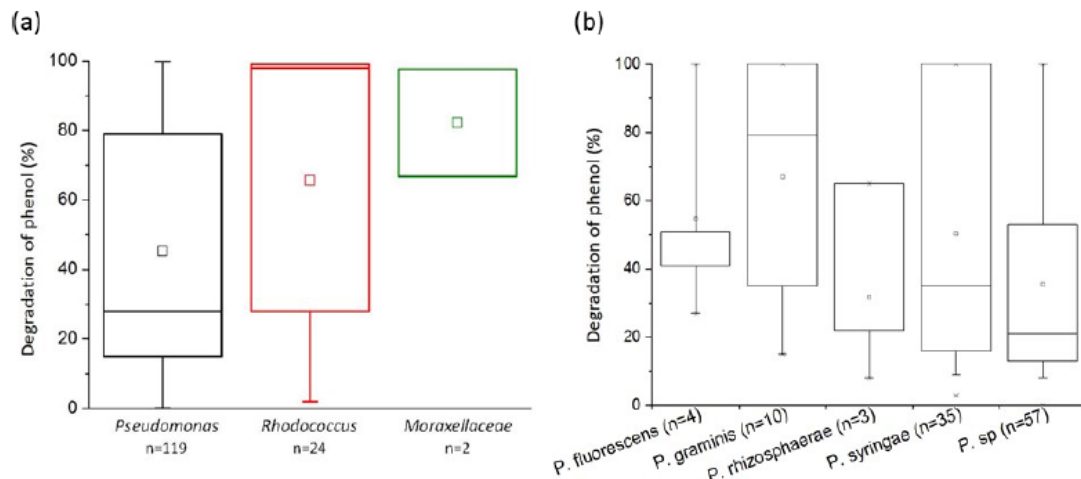


Figure 28 : Biodégradation du phénol par des souches bactériennes isolées des eaux nuageuses. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la biodégradation du phénol mesurée par HPLC après 5 jours d'incubation à 17 °C : a) Résultats obtenus pour les 119 souches de *Pseudomonas*, les 24 souches de *Rhodococcus* et les 2 souches de la famille des *Moraxellaceae*. (b) Focus sur l'espèce *Pseudomonas*. Seuls les groupes d'espèces avec un minimum de trois souches sont tracés ici. (Lallement et al., 2018).

En conclusion, ces découvertes mettent en évidence la possibilité d'une dégradation du phénol et du catéchol par les microorganismes dans les nuages.

4.1.4 Rôle des microorganismes dans la biotransformation des acides aminés

4.1.4.1 Variabilité de la composition des protéines en AA selon les organismes

Les acides aminés constituent les briques fondamentales des protéines qui sont présentes dans tous les organismes vivants, cependant peu de données sont disponibles sur la variation de la composition des AA dans les protéines selon le type d'organismes.

Sorimachi (2009) a étudié la composition des acides aminés cellulaires chez 2 bactéries, une Gram+ (*S. aureus*) et une Gram- (*E. coli*) ainsi que chez l'Homme (*Homo sapiens*). La Figure 29 montre une représentation radar de ces compositions. On peut noter que quels que soient les individus, certains AA semblent majoritaires (Asp, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Leu et Lys) alors que d'autres sont plus minoritaires (Ser, His, Arg, Pro, Tyr, Met, Cys et Phe). Cependant chaque « image radar » est aussi spécifique de chaque espèce (Figure 29). Ceci sous-entend que même si des voies métaboliques de synthèse des AA qui permettent de construire ces protéines sont communes (voir la suite), elles ne sont pas utilisées de la même manière selon les organismes. De même il est plus que probable que les voies de dégradations soient également utilisé de

manière différentielle selon les organismes, ce qui veut dire que les vitesses de biodégradation des AA correspondantes pourront être différentes.

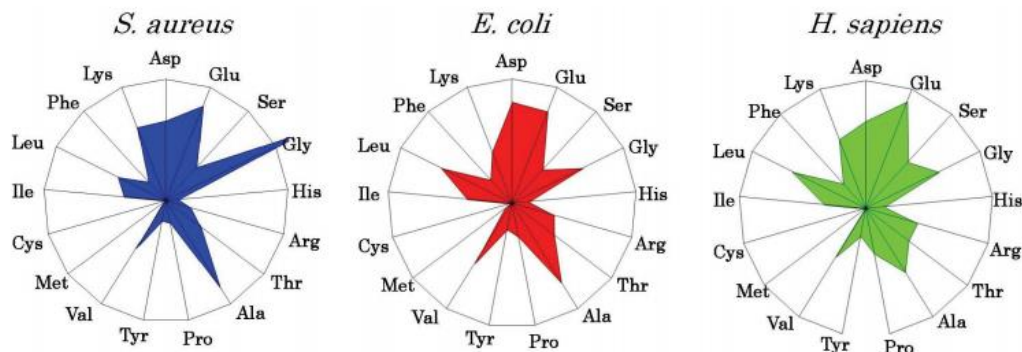


Figure 29 : Compositions en acides aminés des protéines provenant de différents organismes vivants visualisées sous forme de radar. La valeur pour chaque AA est exprimée comme pourcentage des acides aminés totaux. La Gln et l'Asn ont été incorporés dans le Glu et l'Asp respectivement, parce que les deux premiers sont convertis en ces deux derniers lors de l'hydrolyse acide des protéines (Sorimachi, 2009).

4.1.4.2 Voies de biosynthèse et de biodégradation des AA chez les organismes vivants

Les voies de biosynthèse et de biodégradation des AA ont été étudiées depuis de nombreuses années. Ces voies métaboliques sont répertoriées dans la base de données en ligne KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), elles sont décrites pour de très nombreux organismes (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Il faut noter que certaines voies ont spécifique de la biosynthèse ou de la biodégradation alors que d'autre voies intègrent les deux mécanismes.

Voies de biosynthèse des AA

La Figure 30 représente un schéma général des voies de biosynthèse des AA (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map01230). Ce schéma montre clairement l'inter-connexion forte de ces voies métaboliques entre elles ainsi que la connexion des voies de synthèse des AA avec d'autres voies métaboliques : par exemple avec celles des sucres (Fructose-6P, Ribulose-5P etc..), ou bien le cycle de Krebs ou « cycle du citrate » (oxaloacétate, oxoglutarate...). De plus pour un certain nombre d'AA tels que l'arginine, la glutamine, l'asparagine... on peut noter une intégration d'ammonium (voir plus loin).

Les figures suivantes donnent le détail pour la biosynthèse de l'arginine (Figure 31), la lysine (Figure 32), la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine (Figure 33), l'isoleucine, la leucine et la valine (Figure 34) (toutes les figures venant de KEGG).

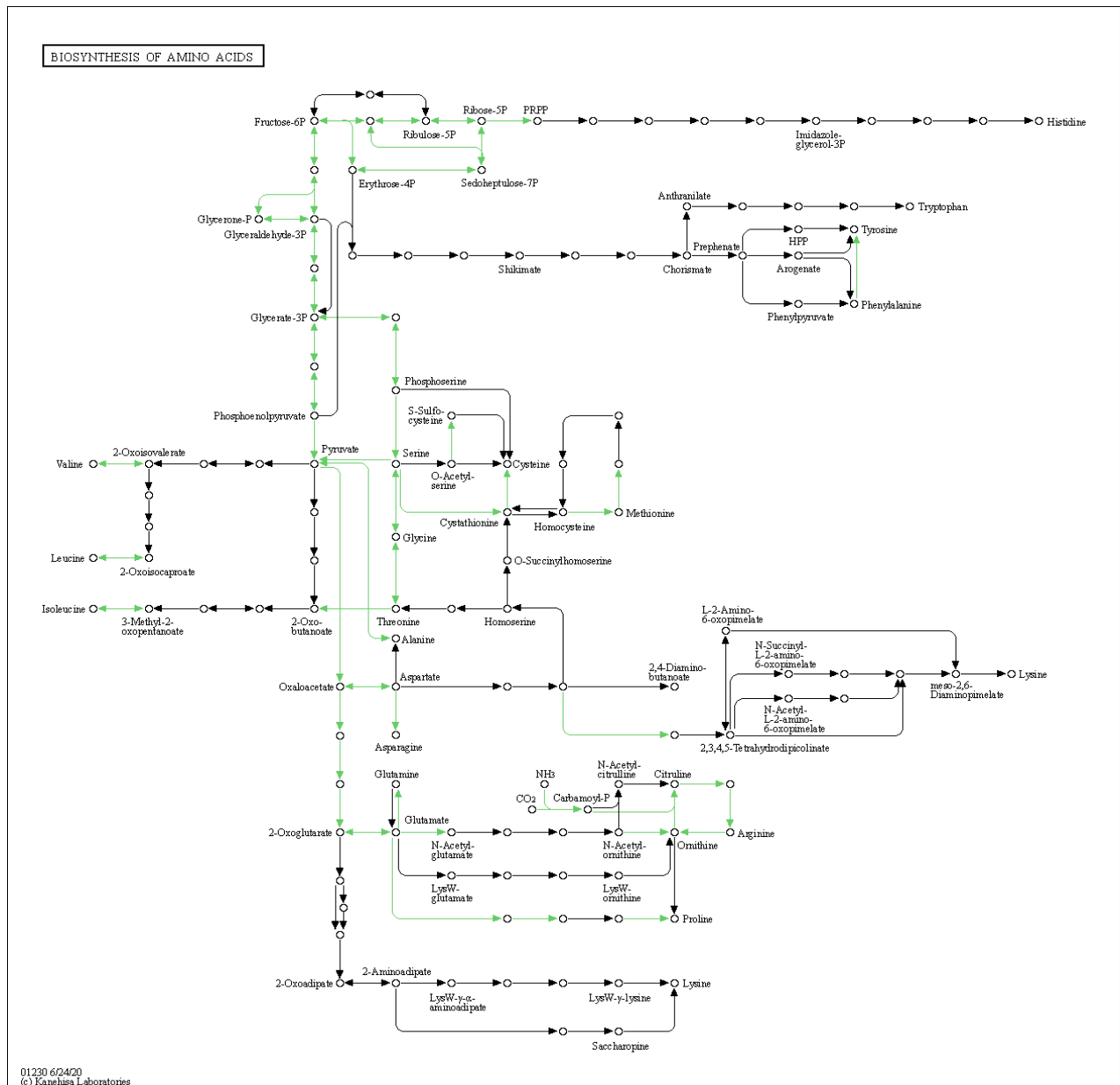


Figure 30: Voies de biosynthèse des acides aminés (D'après la base de données KEGG https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map01230).

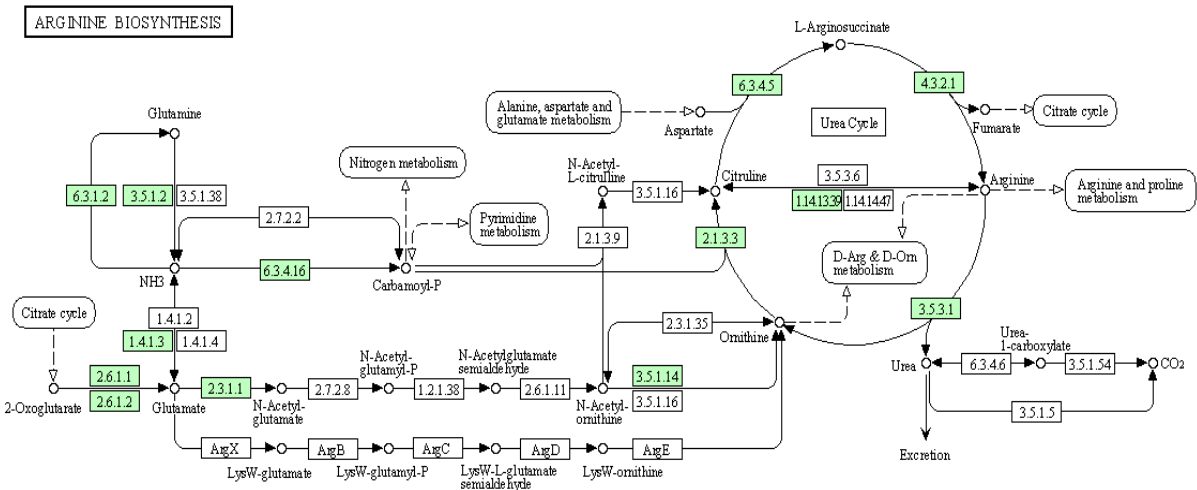


Figure 31 : Voies de biosynthèse de l'arginine. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00220).

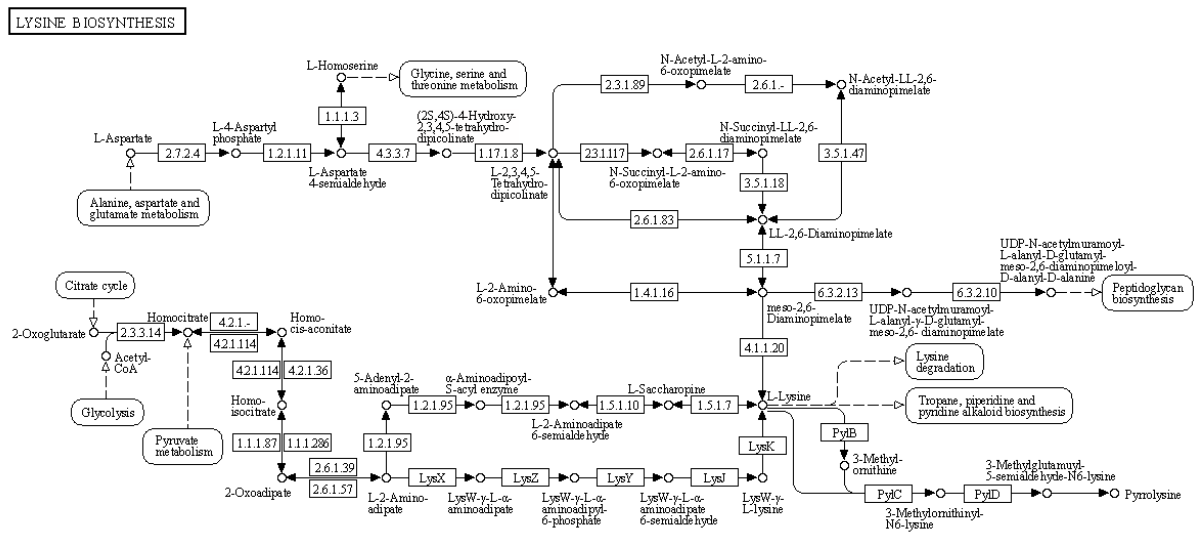


Figure 32 : Voies de biosynthèse de la lysine (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00300).

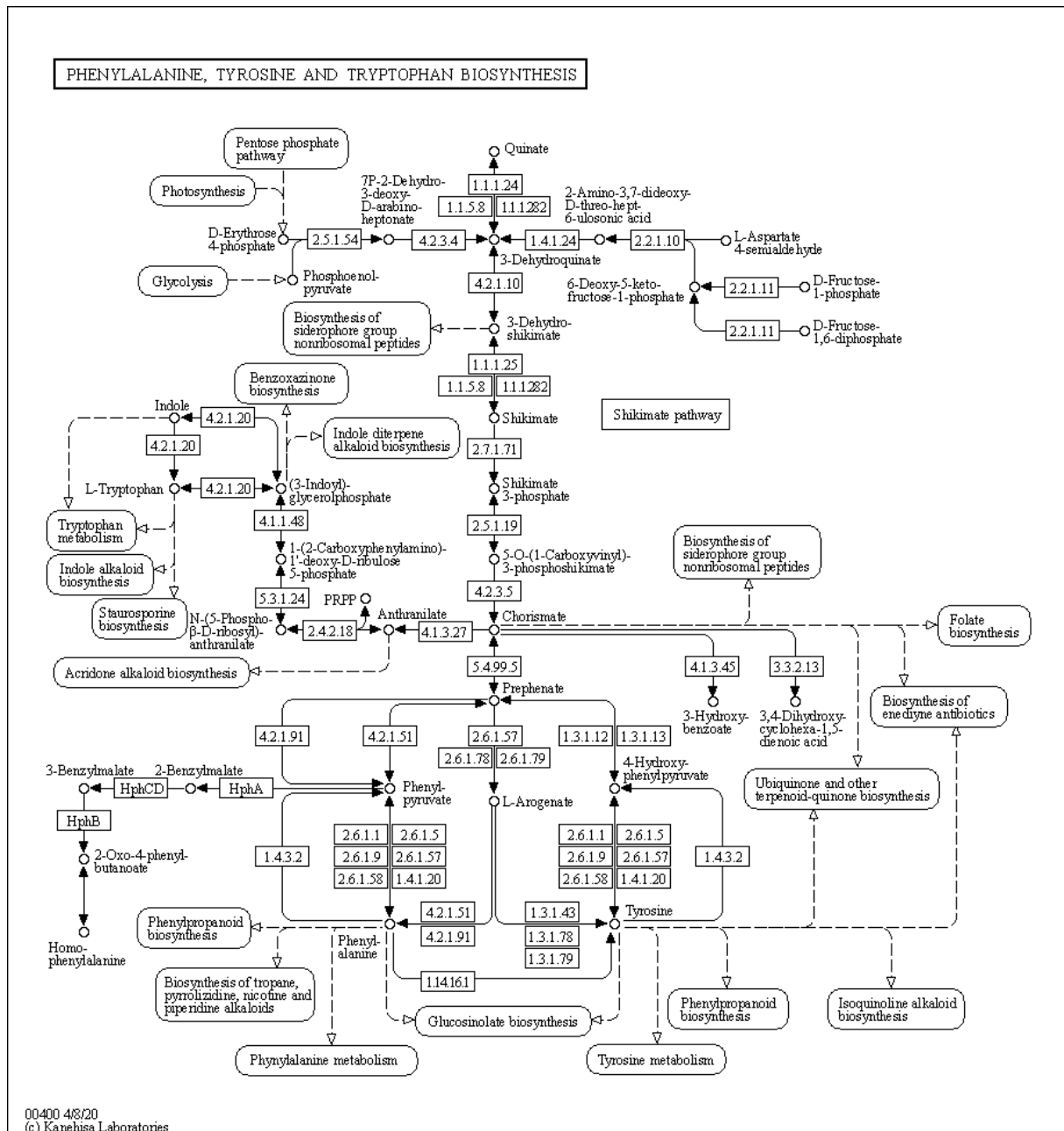


Figure 33: Voies de biosynthèse de la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00400).

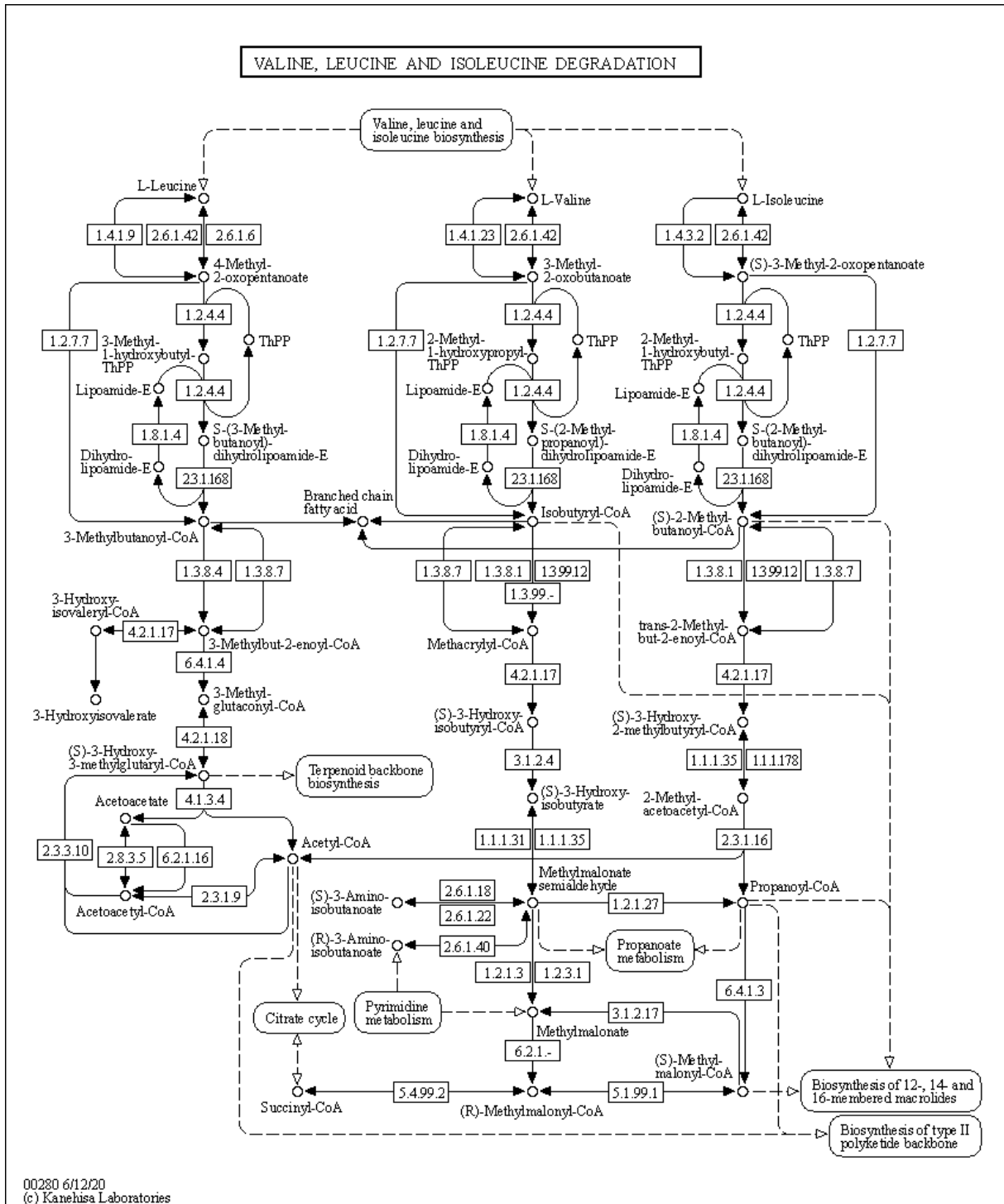


Figure 34 : Biosynthèse de l'isoleucine, la leucine et la valine. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00280).

Voies du métabolisme des acides aminés (synthèse et biodégradation)

Les figures suivantes donnent le détail pour les voies métaboliques (synthèse et dégradation) des AA de configuration L, c.a.d ceux qui sont classiquement dans les protéines :

- alanine, aspartate et glutamate (Figure 35),
- glycine, serine et thréonine (Figure 36),
- cystéine et méthionine (Figure 37),
- arginine et proline (Figure 38),
- histidine (Figure 39)
- tyrosine (Figure 40)
- phénylalanine (Figure 41).

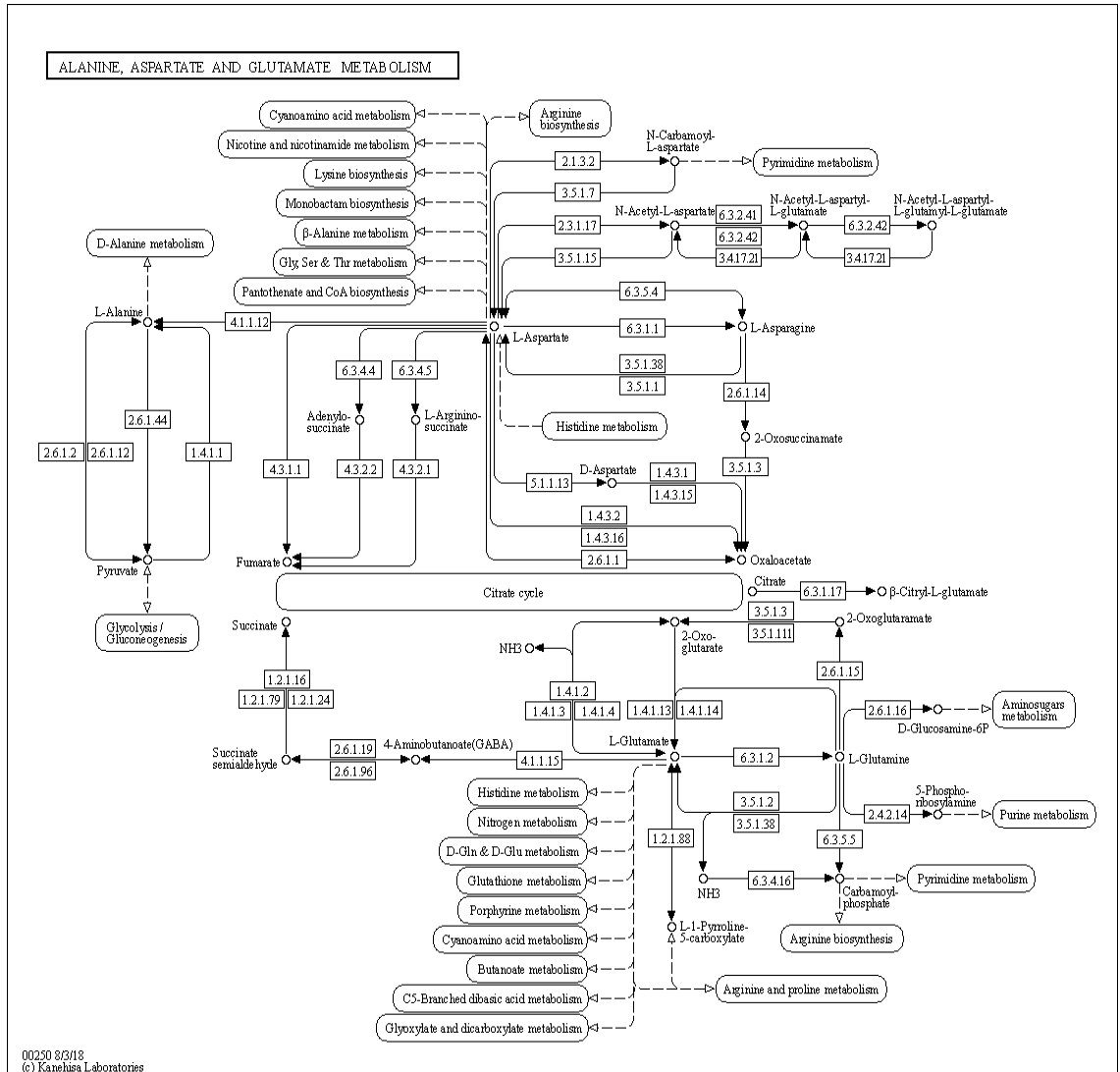


Figure 35 : Métabolisme de l'alanine, l'aspartate et le glutamate. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00250).

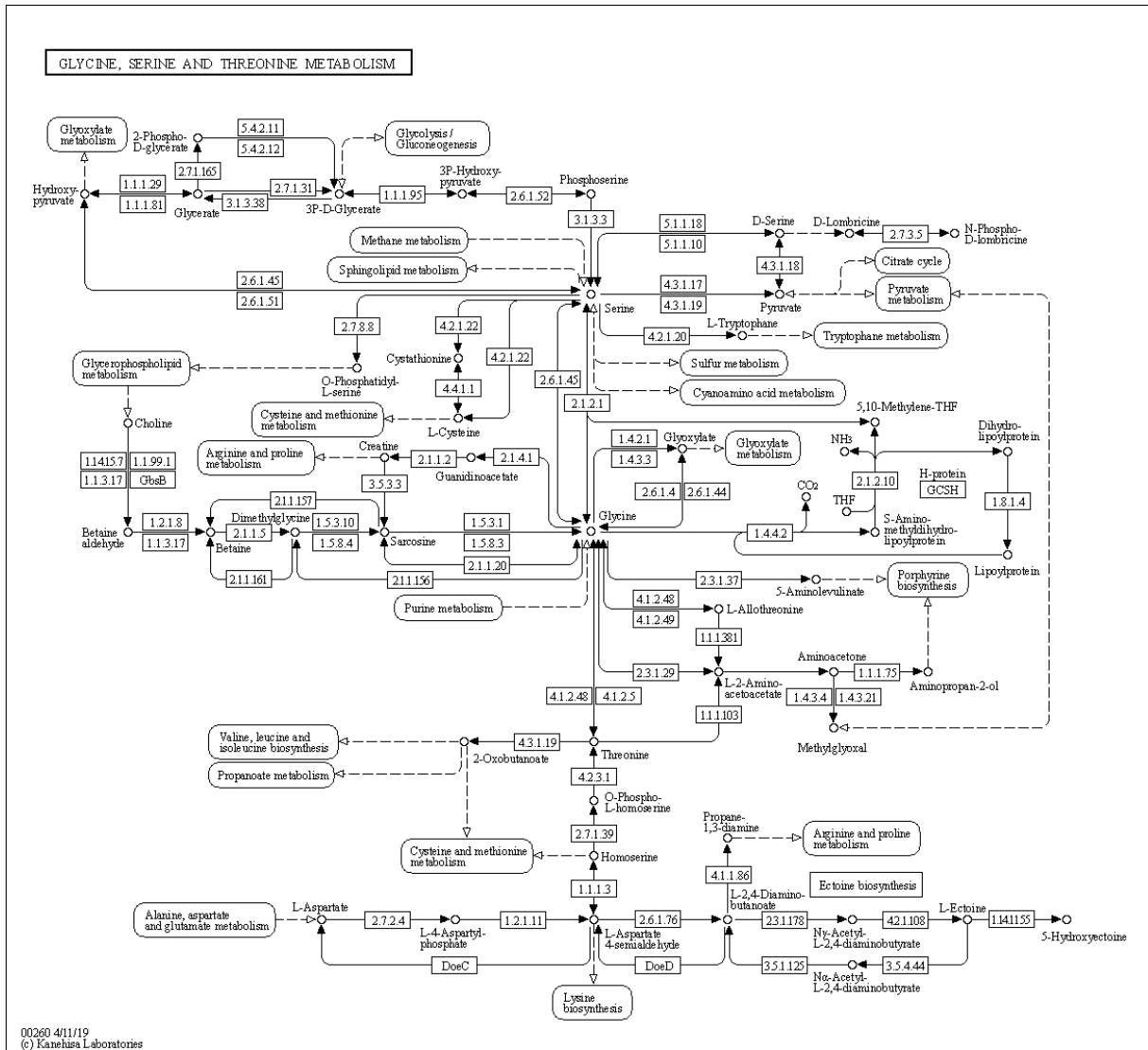


Figure 36: Métabolisme de la glycine, la sérine et la thréonine. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00260).

CYSTEINE AND METHIONINE METABOLISM

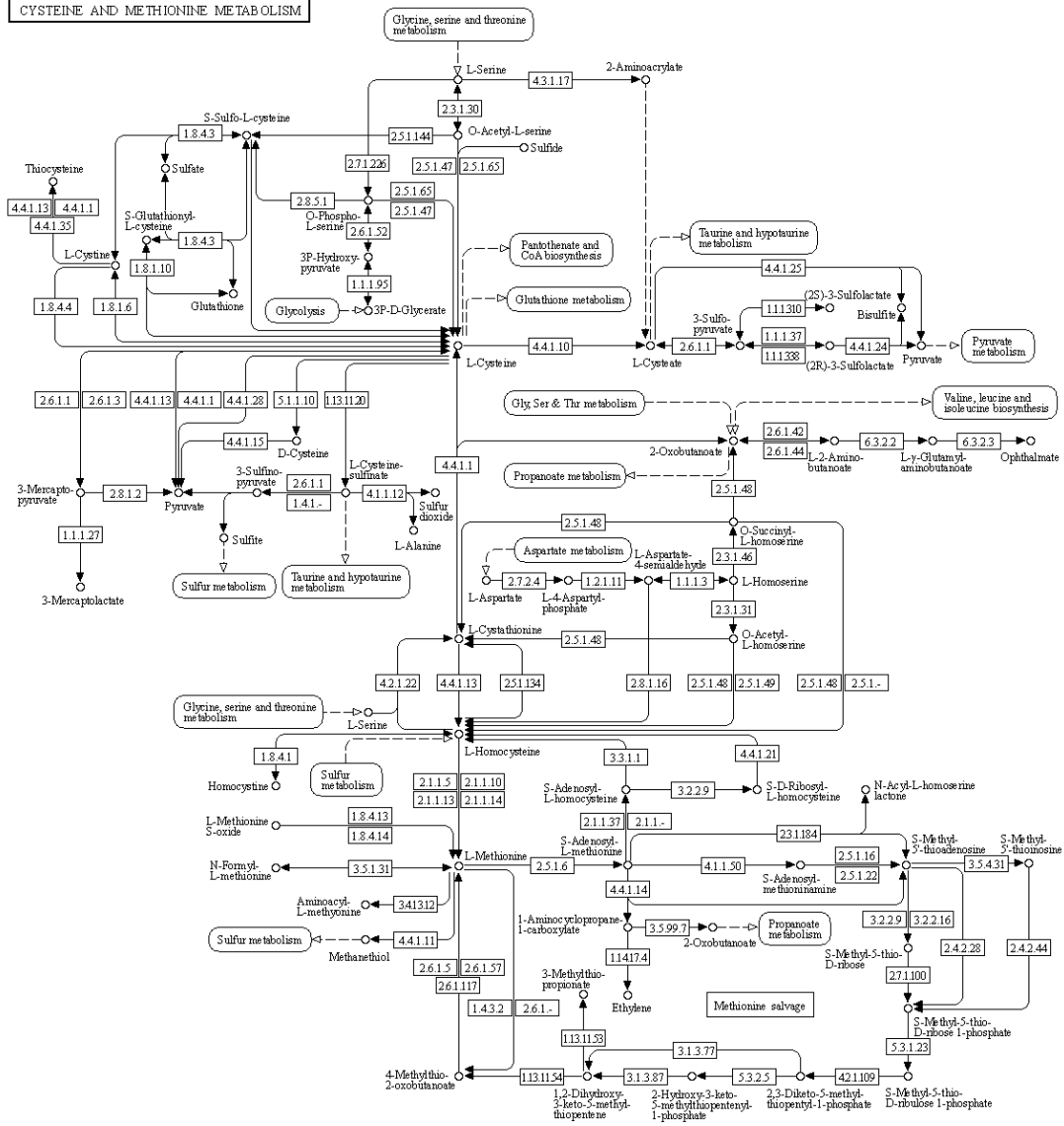


Figure 37 : Métabolisme de la cystéine et de la méthionine. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00270).

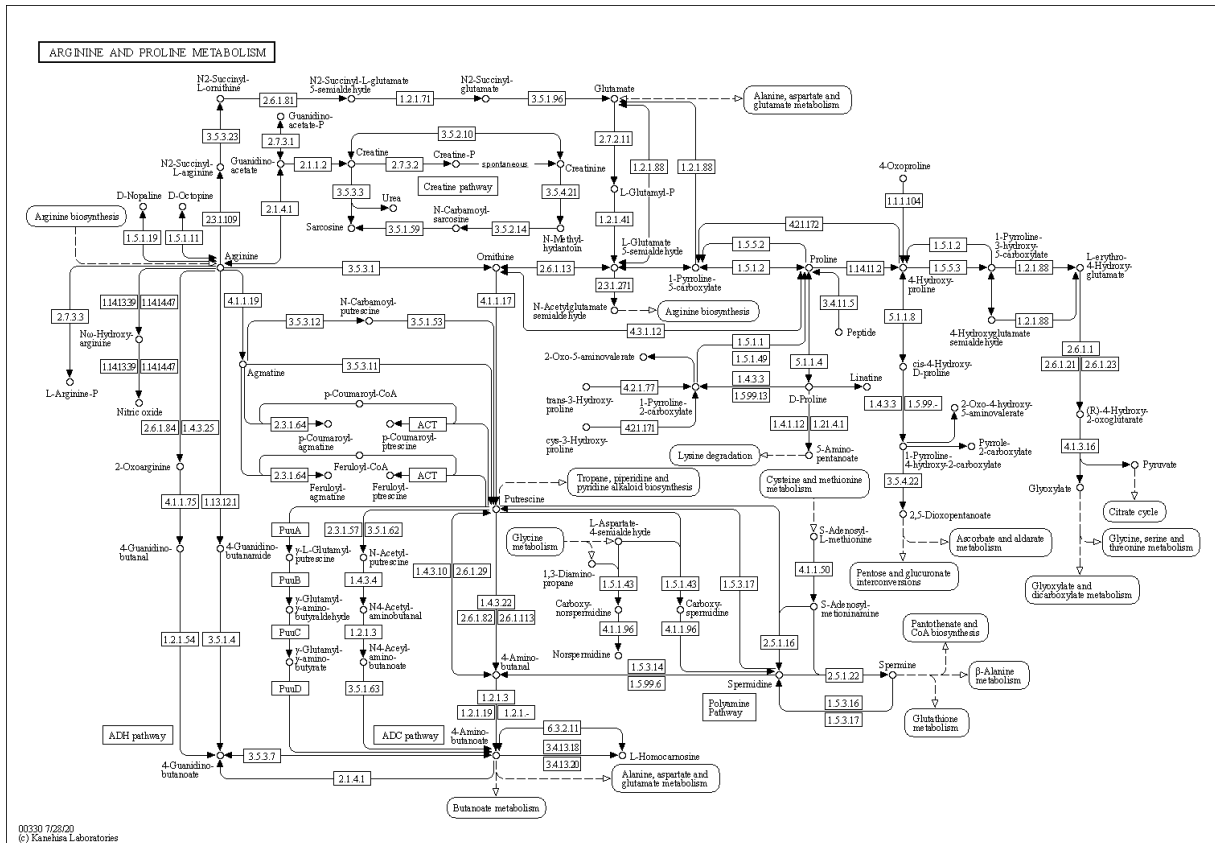


Figure 38 : Métabolisme de l'arginine et de la proline. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00330).

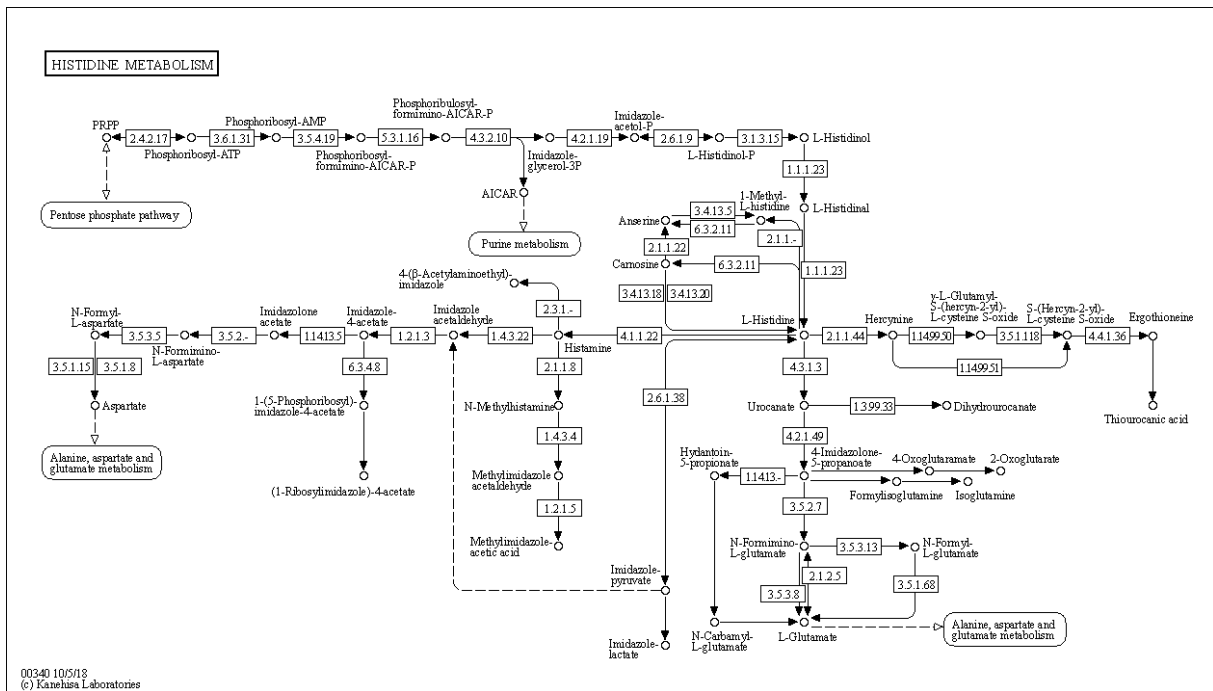


Figure 39 : Métabolisme de l'histidine. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00340).

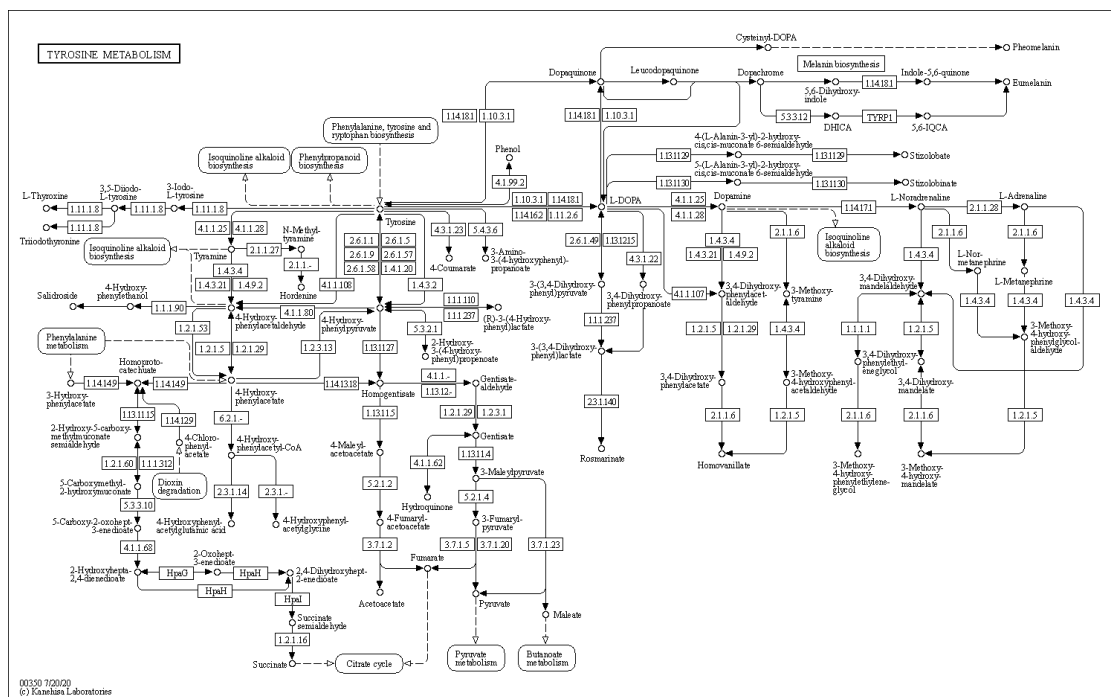


Figure 40 : Métabolisme de tyrosine. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00350).

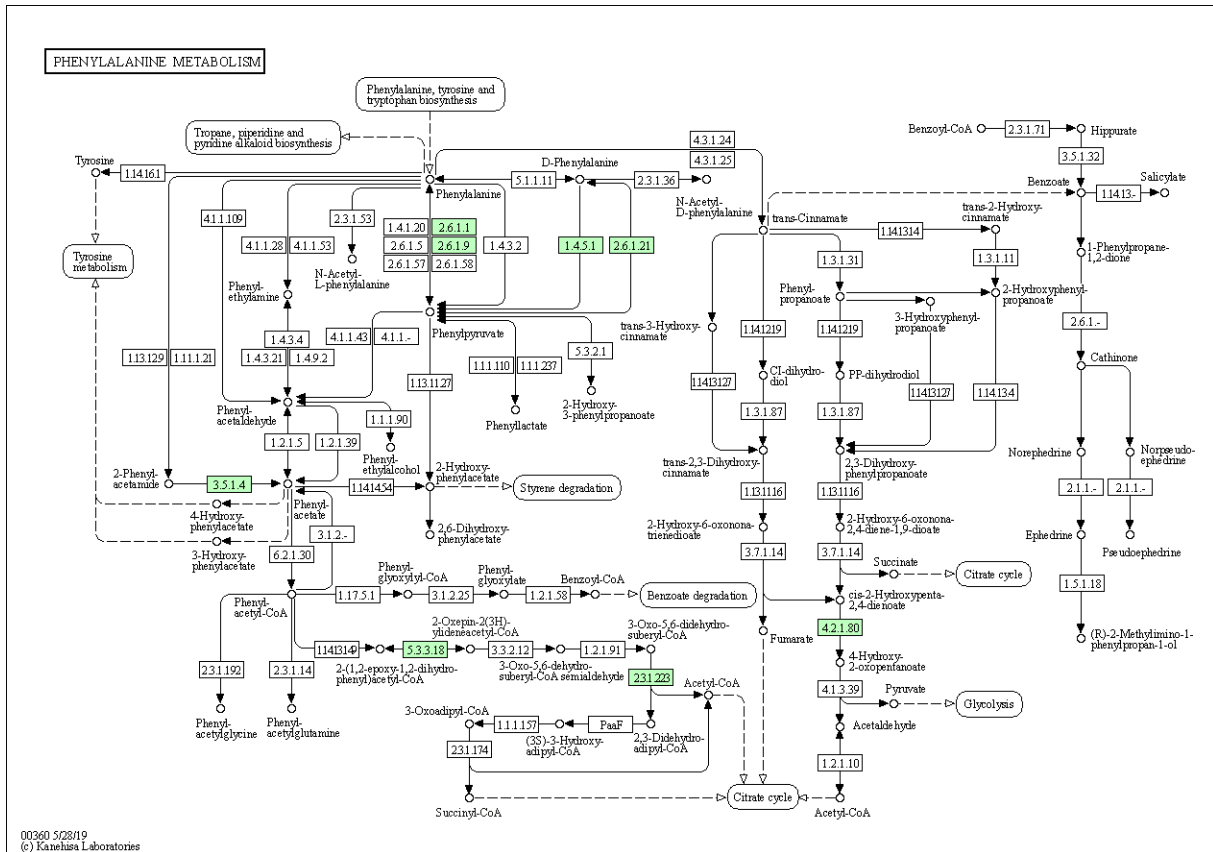


Figure 41 : Métabolisme de la phénylalanine. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00360).

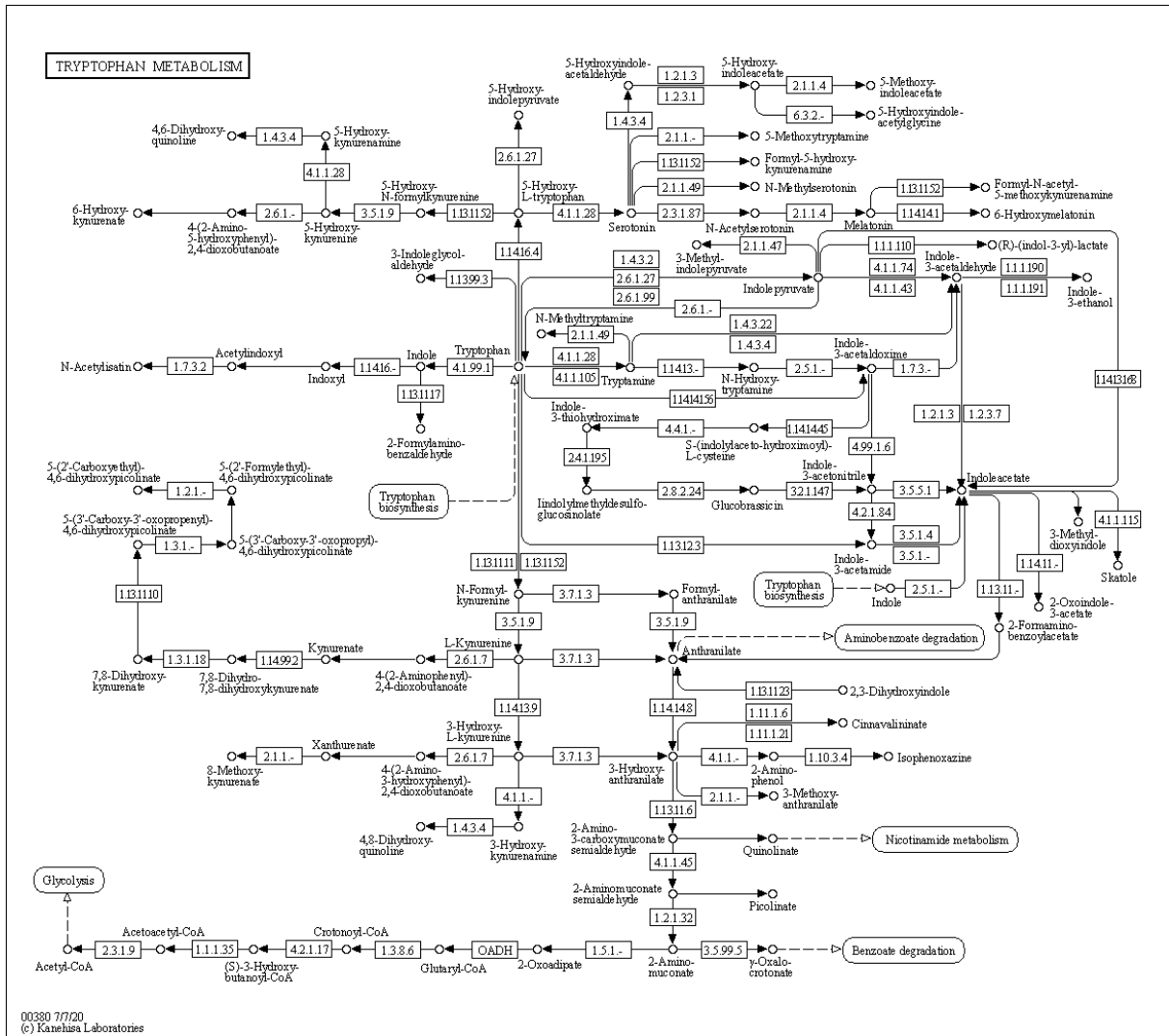


Figure 42 : Métabolisme du tryptophane. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00380).

D'autres voies métaboliques sont impliquées pour les AA de configuration D qui sont plus rares et dont toutes les fonctions ne sont pas encore totalement identifiées (antibiotiques, petits peptides)

- D-glutamine et D-glutamate (Figure 43)
- D-arginine et D-ornithine (Figure 44)
- D-alanine (Figure 45)

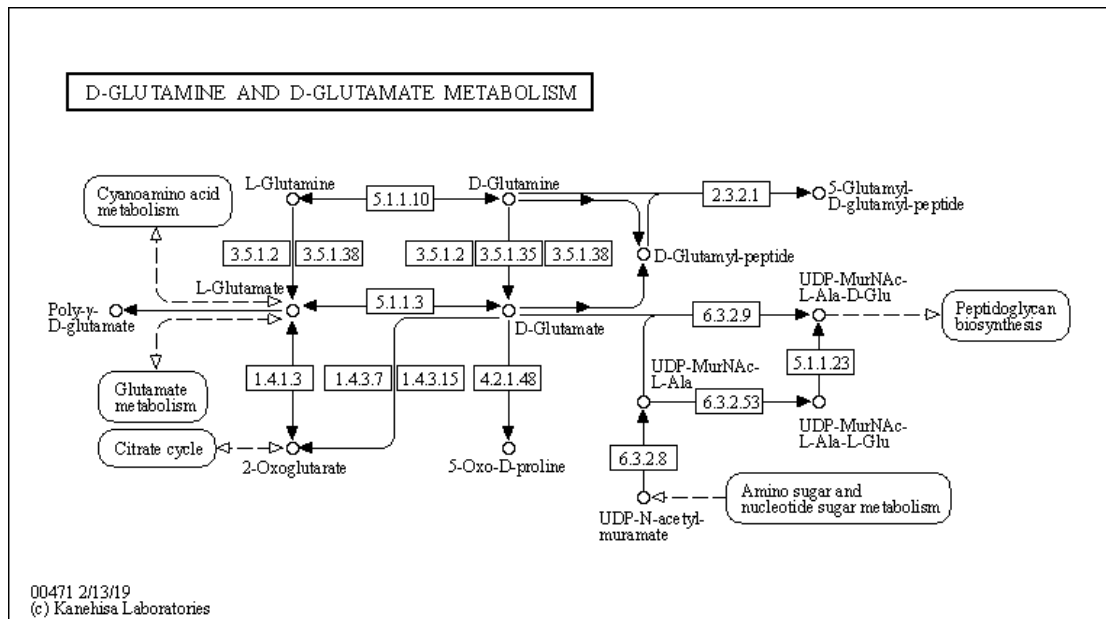


Figure 43 : Métabolisme de la D-glutamine et du D-glutamate. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00471).

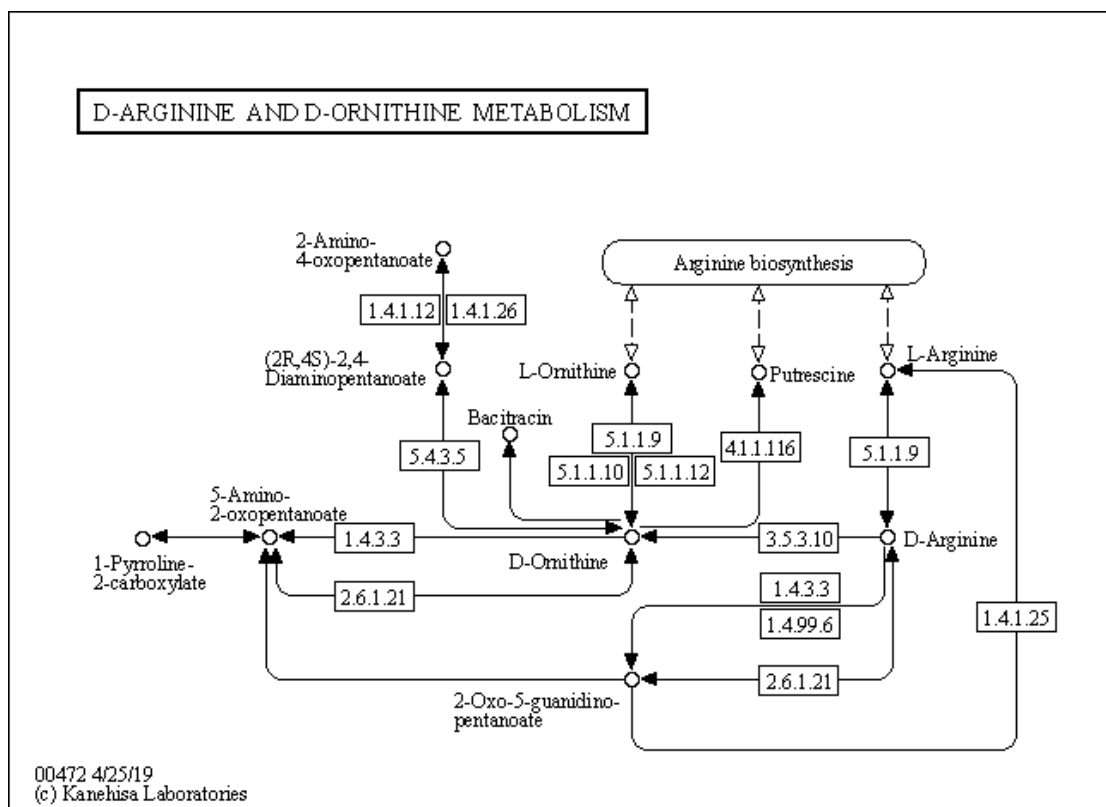


Figure 44: Métabolisme de la D-arginine et de la D-ornithine. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00472).

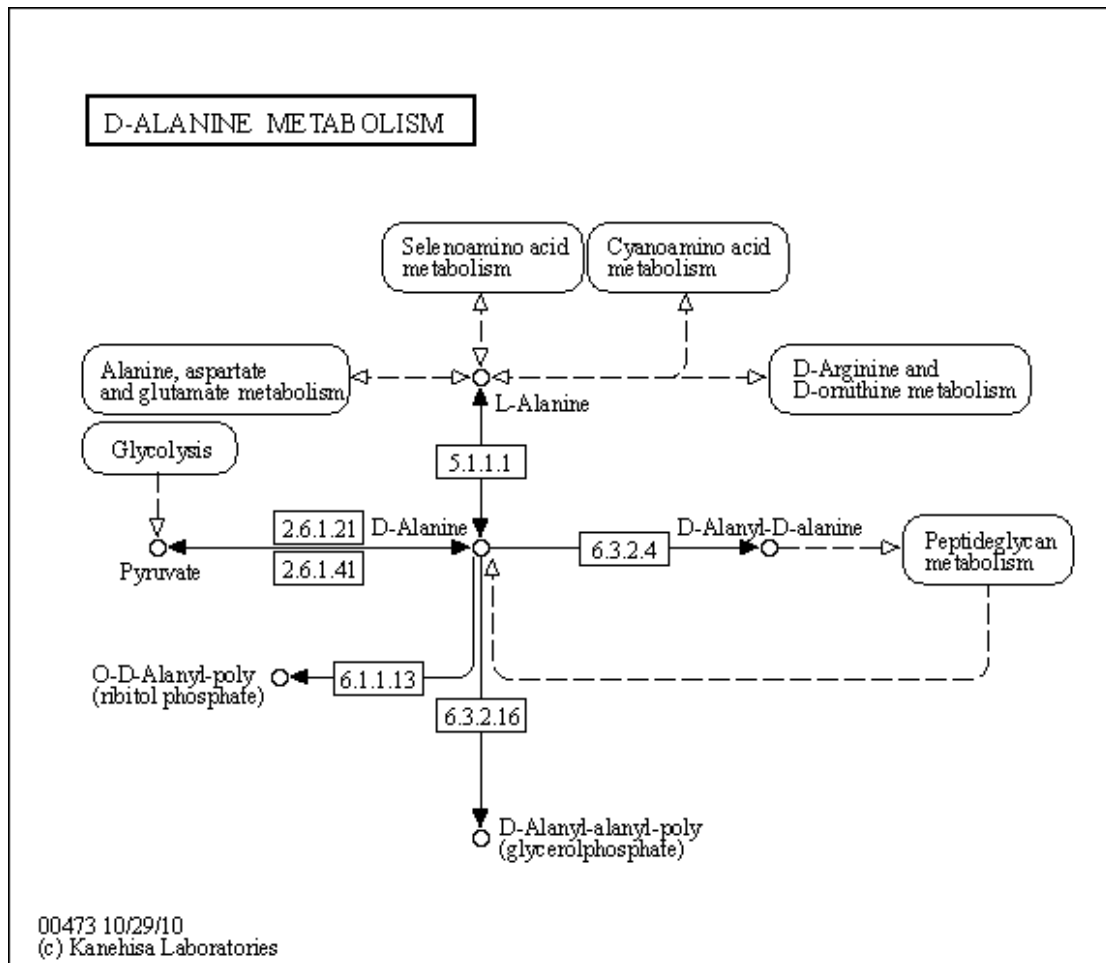


Figure 45 : Métabolisme de la D-alanine. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00473).

Biodégradation des acides aminés

Les figures suivantes présentent les voies de biodégradation de la lysine (Figure 46) et de la leucine, valine et isoleucine (Figure 47).

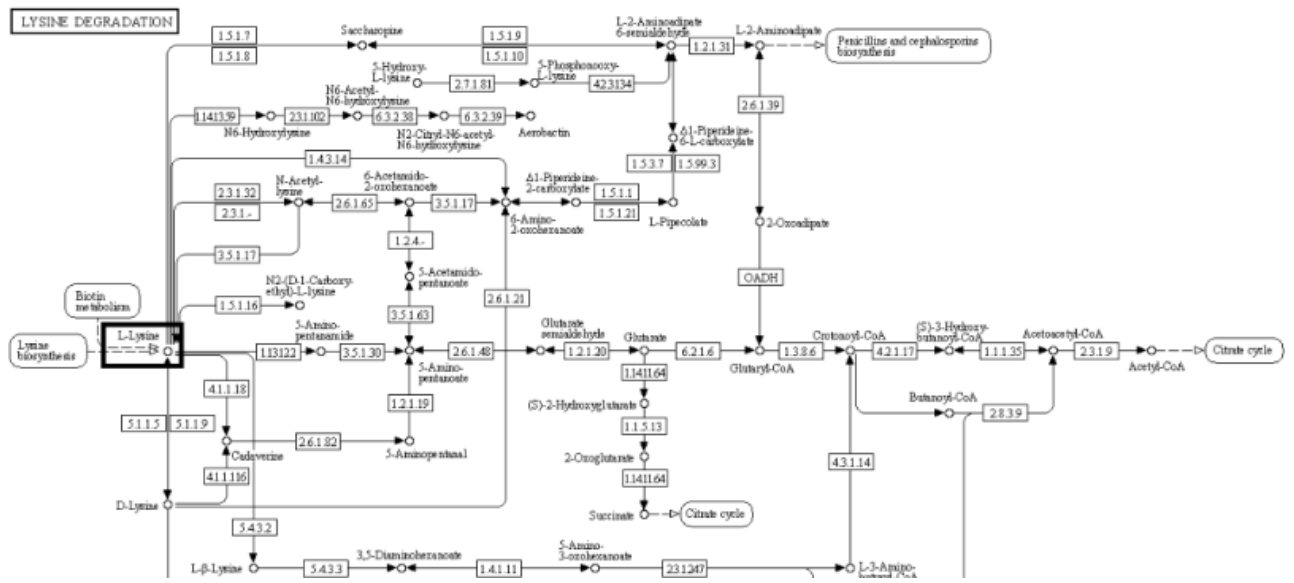


Figure 46 : Voies de biodégradation de la lysine. (D'après la base de données KEGG : https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00310).

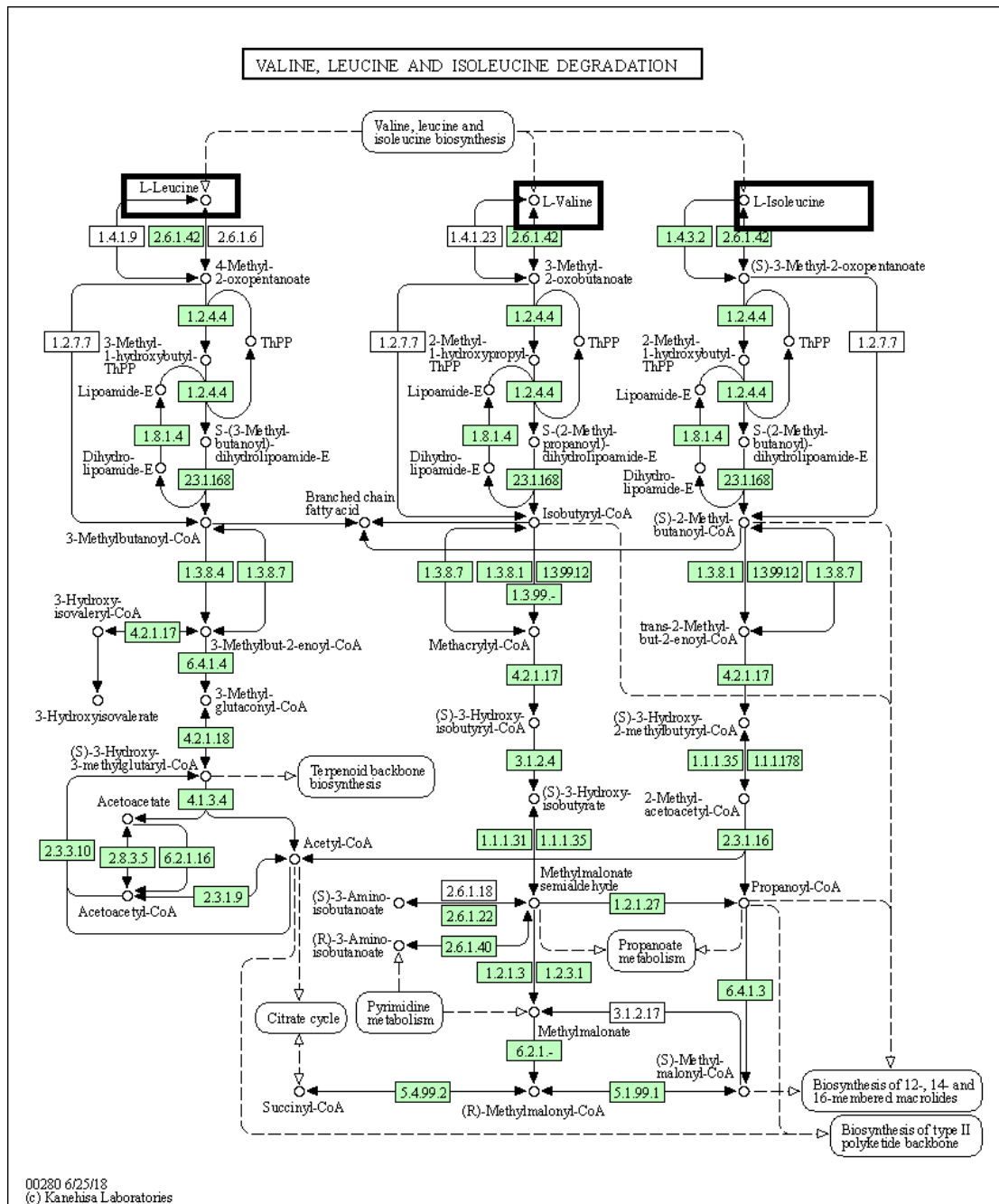


Figure 47 : Voies de biodégradation de la leucine, la valine et l'isoleucine. (D'après la base de données KEGG (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00280&show_description=show)).

4.1.4.3 Conclusion pour la chimie atmosphérique

Les voies de biodégradation et de biosynthèse des AA sont génériques quels que soient les organismes vivants mais l'activité des enzymes peut être différente selon les organismes et peut être régulée de manière différente selon les conditions environnementales (pH, T°, compétition avec d'autres substrats...). De ce fait les flux métaboliques (vitesses de biosynthèse ou de

biodégradation au sein de chaque voie métabolique) peuvent extrêmement varier et ne peuvent pas être prédits *a priori*.

En l'occurrence, le fait marquant est qu'aucune étude n'a été menée dans un environnement atmosphérique réel ou le mimant (microcosme). Il n'existe donc aucune données expérimentales de vitesses de transformation des AA par des microorganismes de l'atmosphère (et donc des nuages) et de fait aucune comparaison avec des vitesses de transformations photochimiques ou radicalaires n'est possible.

Par contre les travaux récents d'Amato et al. (2019) prouvent que les voies métaboliques liées à la synthèse et la biodégradation d'AA sont effectivement actives dans les nuages. Si l'on se reporte à la Figure 19 qui montre l'analyse méta-transcriptomique de trois échantillons nuageux prélevés au puy de Dôme, on observe clairement les transcrits correspondant aux fonctions nommées « Amino-acids and Proteins ». De manière également intéressante le transport de l'ammoniaque est très important, il est même majeur dans les nuages comparés aux autres milieux étudiés (Figure 19).

Enfin deux publications très récentes d'une équipe chinoise évoquent la possibilité d'une dégradation biologique (et aussi de synthèse) de protéines ou AA présents dans des aérosols (Zhu et al., 2020) ou dans la pluie (Xu et al., 2020). Leur approche est originale et se base en particulier sur le calcul de DI (Degradation Index) qui prend en compte le % molaire des AA dans les échantillons. Ils montrent par exemple que le DI de particules fines ($D < 2.5 \mu\text{m}$) est beaucoup plus faible que celui de particules plus grossières ($D > 2.5 \mu\text{m}$) alors que leur source est identique. De plus dans le cas de ces aérosols, ils mesurent le $\delta^{15}\text{N}$ de chaque AA, la valeur de ces shifts (positifs ou négatifs) de l'enrichissement isotopique permet de conclure à une activité biologique associée (Zhu et al., 2020). Pour les échantillons de pluie, ils observent une variation temporelle du DI, ce qui va aussi dans le sens d'une transformation biologique (Xu et al., 2020).

En conclusion, bien qu'aucune mesure directe de taux de biodégradations d'AA dans les eaux atmosphériques n'ait été réalisée jusqu'alors, des approches indirectes semblent conforter la possibilité d'une telle transformation biologique. C'est en tout cas une thématique totalement nouvelle qui s'ouvre dans le domaine du devenir des composés azotés dans les nuages et plus largement dans l'atmosphère.

4.1.5 Rôle des microorganismes dans la biotransformation d'oxydants

Outre le métabolisme de molécules organiques, les microorganismes sont capables de transformer des oxydants. Ainsi ils peuvent transformer le radical superoxyde en H_2O_2 grâce à une enzyme appelée « superoxyde dismutase » (SOD) puis transformer H_2O_2 en H_2O et O_2 grâce à des catalases. Ces réactions enzymatiques sont d'ailleurs impliquées dans les mécanismes de défense des cellules face au stress oxydant (Figure 48).

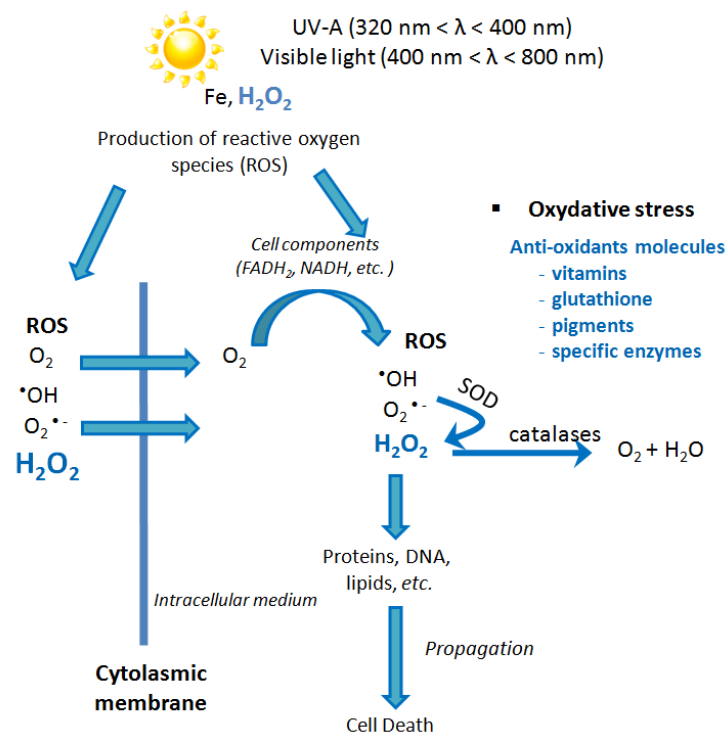


Figure 48 : Mécanisme simplifié des défenses cellulaires développées face au stress oxydant (présence de ROS , Reactive Oxygen Species telles que H_2O_2 et les radicaux OH et superoxyde). A noter le rôle particulier des enzymes SOD (Super Oxyde Dismutases) et catalases qui évitent l'action délétère des ROS sur les constituants cellulaires.

Väitilingom et al (2013) ont été pionniers pour montrer que les microorganismes des nuages pouvaient dégrader H_2O_2 . Des vitesses de biodégradation ont pu être mesurées sur des échantillons d'eau nuageuse prélevées au puy de Dôme. Cette découverte était particulièrement intéressante car elle montrait que non seulement les microorganismes peuvent avoir un impact sur la chimie atmosphérique par une action directe sur la MO mais aussi par une action indirecte en diminuant la concentration de la principale source de radicaux ($\cdot OH$).

Le travail de Wirgot et al. (2017) a confirmé cette aptitude à dégrader H₂O₂ avec des souches isolées des nuages.

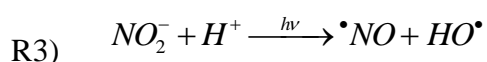
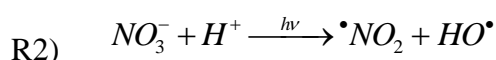
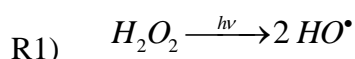
Enfin Amato et al. (2019) ont mis en évidence une activité *in situ* intense des activités catalases et SOD par analyse meta-transcriptomique des 3 nuages prélevés au puy de Dôme. La Figure 19 précise ces activités dans la section « stress » pour les gènes correspondant aux « Hydrogen peroxide catabolic process » (catalase) et « Superoxide metabolic process » (SOD). Il est à noter sur cette figure que l'activité des catalases est bien plus importante dans les nuages que dans les autres milieux, ce qui montre une grande spécificité de ce milieu très oxydant et de l'adaptation des microorganismes des nuages à leur environnement.

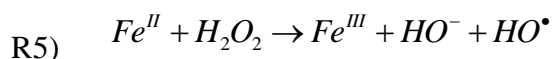
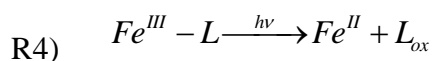
4.2 Les processus photochimiques et radicalaires

Les composés organiques sont transformés dans la phase aqueuse des nuages par des processus photochimique et radicalaires.

Tout d'abord il peut exister un phénomène de photolyse directe : dans ce cas les composés organiques dissous interagissent directement avec les rayons UV du spectre solaire qui sont très énergétiques et peuvent induire la scission des liaisons chimiques et conduire à la formation de composés de taille différente. Ainsi par exemple le tryptophane subit une photolyse directe et sa dégradation est renforcée en présence des espèces présentes capables de photo-générer des radicaux hydroxyles (Bianco et al., 2016a) tout en produisant d'acides carboxyliques à chaîne courte.

Cependant la majeure partie des réactions intervenant dans le nuage sont de type radicalaire. En phase aqueuse, ces radicaux, comme le radical hydroxyle (HO•), peuvent être produits par photolyse de précurseurs comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou les ions nitrate (NO₃⁻) et nitrite (NO₂⁻) (voir réactions R1, R2 et R3) (Bianco et al., 2015). Le radical HO• peut aussi être produit par la réaction de Fenton (R5) déjà décrite en détail dans le chapitre 2.3.2 de cette thèse et fait intervenir les interactions entre le fer et H₂O₂.





On parle souvent du radical HO[•] comme le « détergent de l’atmosphère » car il est très réactif et très peu sélectif, il peut donc transformer la plupart des molécules organiques (Crutzen, 1996). Pendant la journée, le radical hydroxyle est le principal oxydant dans l’eau des nuages et plus généralement dans l’atmosphère, il caractérise la capacité oxydante de ces milieux (Lallement et al., 2018).

Il faut noter que beaucoup de réactions chimiques ont été étudiées en phase gazeuse, la chimie en phase aqueuse reste encore limitée.

Plusieurs revues récentes font le point sur la chimie des nuages, nous ne les détaillerons pas ici (Herrmann et al., 2015 ; Ervens, 2015 ; McNeill, 2015).

Nous focaliserons nos propos sur quelques exemples de transformation abiotiques qui font échos aux voies de transformations microbiologiques évoquées précédemment (chap 4.1).

4.2.1 Transformation radicalaire des acides carboxyliques et aldéhydes

La Figure 49 présente de manière simplifiée les voies de transformation des acides mono- ou di-carboxyliques comprenant de 1 à 5 atomes de carbone suite à des réactions radicalaires mettant en jeu le radical HO[•]. Ces molécules ont été particulièrement étudiées car elles sont les plus abondantes mesurées dans l’eau de nuage et découlent de la dégradation de molécules plus complexes de haut poids moléculaire telles que les HULIS (Humic Like Substances) et FULVIS (Fulvic Like Substances). Des oxydations successives conduisent à des molécules de plus en plus courtes jusqu’au CO₂ (Ervens et al., 2004 ; Tilgner and Herrmann, 2010 ; Charbouillot et al., 2012).

A noter la similarité d’intermédiaires avec des métabolites (substrats ou produits) de voies microbiennes ; citons par exemple les acides succinique, pyruvique, lactique, acétique, formique et le formaldéhyde. La voie des C1, pour ce qui est de sa partie oxydation (formaldéhyde donne formiate puis CO₂), est très proche de la voie métabolique microbienne. Outre ces mécanismes de fragmentations successives, il a été montré que l’oxydation l’acide formique (HCOOH) conduit non seulement à la formation de CO₂ mais aussi à celle d’acide oxalique (poids moléculaire plus grand)(Charbouillot et al., 2011). Même si cette formation

est faible (1%), elle suggère une voie possible de condensations radicalaires pour former des composés de plus haut poids moléculaire comme cela a été déjà montré dans différentes études (Tan et al., 2010).

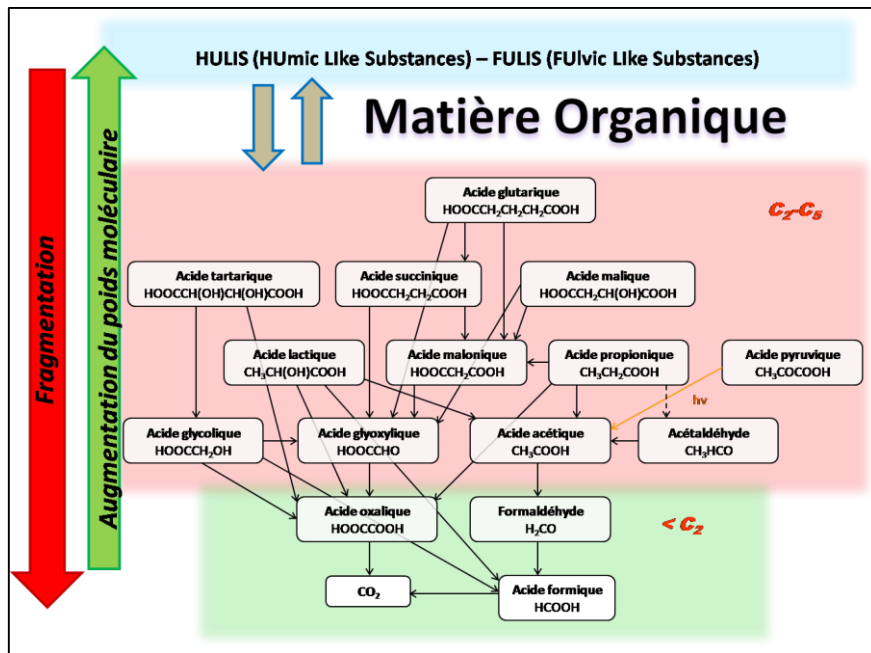


Figure 49: Représentation schématique des voies de fragmentation (en acides carboxyliques et puis minéralisation en CO_2) et augmentation de la taille (jusqu'à la formation de substances type humiques, HULIS et FULIS) de la matière organique présente dans le nuage suite à la réaction avec les radicaux hydroxyles (Figure d'après Delort et al., 2017).

Bien entendu, la formation et la dégradation d'acides carboxyliques et aldéhydes existent aussi dans la phase gaz du nuage, et des transferts ont lieu entre la phase gaz et la phase aqueuse.

La Figure 50 illustre ce processus multiphasique dans le cas de composés organiques à deux atomes de carbone résultant de l'oxydation de l'isoprène, composé biogénique émis à partir de plantes (Ervens et al., 2008). En phase gazeuse, l'isoprène induit la formation d'acide glycolique, d'acide glyoxylique, d'acide acétique, de glycolaldéhyde et de glyoxal. Ces composés sont très solubles et se dissolvent dans la phase aqueuse. Ils s'oxydent ensuite, conduisant à la production d'acides oxalique, acétique et formique comme vu précédemment (Figure 49).

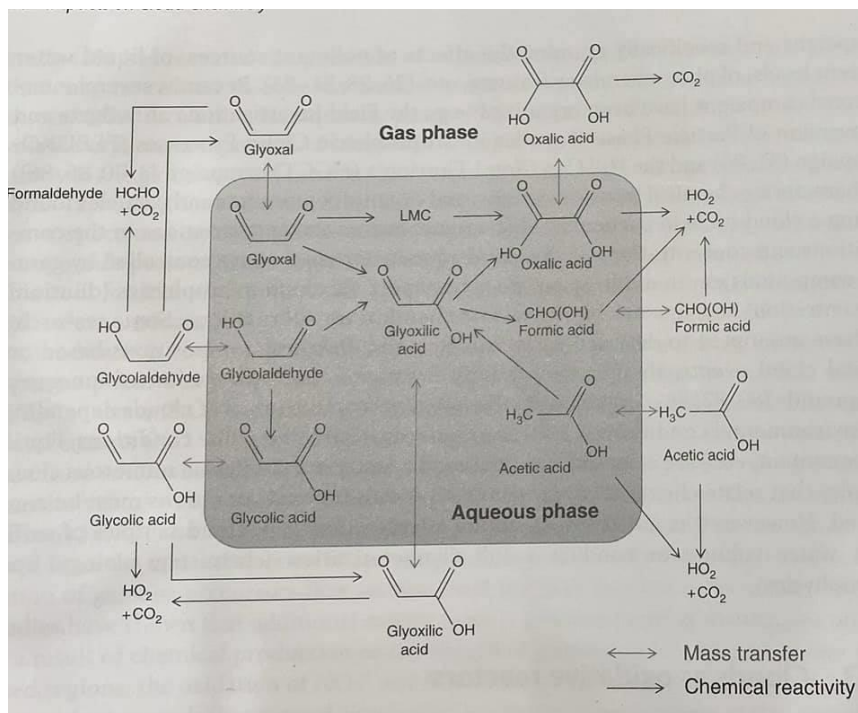


Figure 50 :Processus d'oxydation de composés organiques à deux atomes de carbone dans les phases gazeuse et aqueuse et échanges de ces composés chimiques entre les deux phases ("transfert de masse").(Ervens et al., 2008).

4.2.2 Transformation radicalaire du phénol

Dans l'atmosphère, la chimie radicalaire va contrôler la réactivité photochimique du phénol, puisque sa photolyse ne va pas être importante, même inexistante (les longueurs d'onde d'émission du spectre solaire et celles d'absorption du phénol ne se recouvrent pas) (Figure 51).

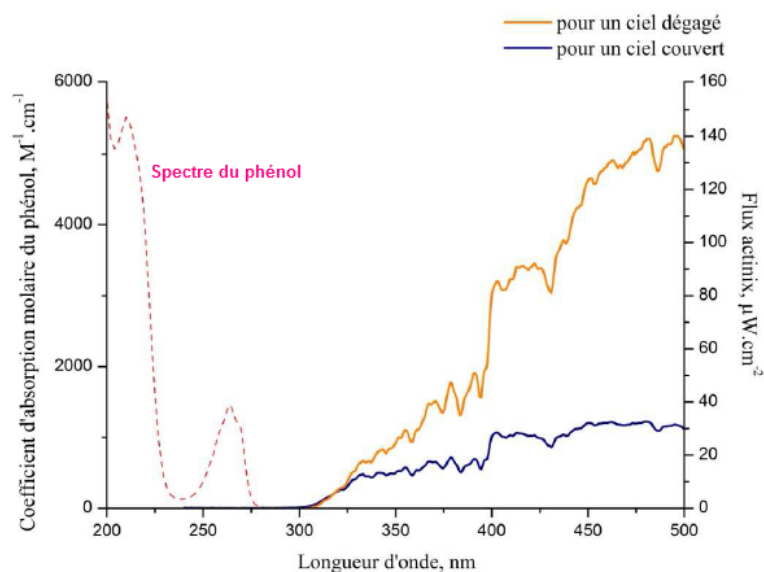


Figure 51: Spectre d'absorption du phénol comparé aux flux actiniques mesurés en présence ou en absence de nuages. Le flux actinique mesuré pour un ciel dégagé a été obtenu sur le campus universitaire des Cézeaux, Clermont-Ferrand ; celui mesuré pour un ciel couvert a été acquis au sommet du puy de Dôme.

Dans la phase gazeuse du nuage, le phénol va réagir avec le radical OH[•] le jour (constante de réactivité= $2,81 \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Berndt and Böge, 2001) et avec le radical NO₃[•] le nuit (constante de réactivité= $5,8 \times 10^{-12} \text{ cm}^3 \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Bolzacchini et al., 2001).

Deux réactions entre le phénol et le radical OH[•] sont possibles :

- a) Une addition réversible (mécanisme dominant) qui entraîne la formation d'un adduit phénol-OH. Cet adduit peut réagir avec O₂, NO₂ et NO₃, mais dans l'atmosphère (température ambiante), la réaction exclusive est celle de l'adduit phénol-OH avec O₂ donnant du catéchol (1,2-dihydroxybenzène) suite à une abstraction d'hydrogène (Figure 52).
- b) L'abstraction d'un hydrogène du phénol, donne un radical phénoxy, qui à son tour réagit préférentiellement avec NO₂ ou NO₃ et donne majoritairement de l'o-nitrophénol (Figure 52) (Berndt et al., 2003).

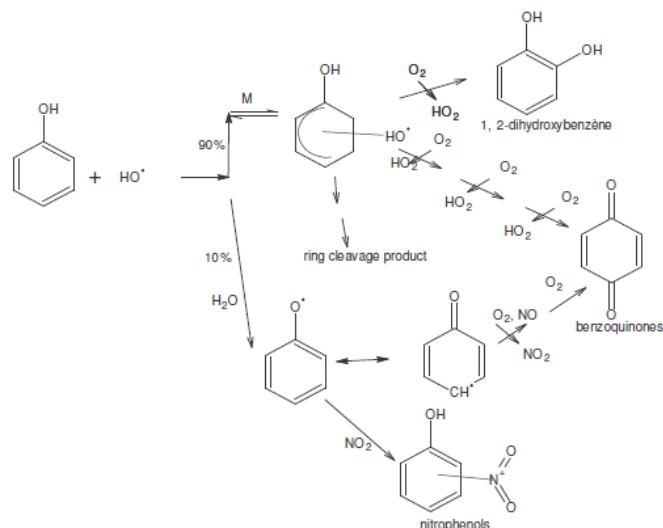


Figure 52 :La réaction du phénol avec le radical hydroxyle (Olariu et al., 2002).

Dans la phase aqueuse du nuage, la constante de réactivité du phénol avec le radical hydroxyle est de l'ordre $1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Herrmann, 2010), à 20°C et pH 2. Celle avec le radical nitrate est de l'ordre $1,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, à 25°C et pH 0.5 (Herrmann et al., 2005b).

La réactivité du phénol dans la phase aqueuse est présentée dans la Figure 53 (Barzaghi and Herrmann, 2002).

a) l'oxydation avec le radical OH (R-6) pour donner tout d'abord le radical phénoxy, qui à son tour réagit avec le dioxygène pour former le catéchol (4).

b) La nitration avec le radical nitrate (R-3 ; R-4 ; R-5) donne tout d'abord les radicaux (5, 6,9) selon des réactions d'addition /d'élimination, une fois formés ces radicaux réagissent avec le nitrite pour donner le 2-nitrophénol (2) et le 4-nitrophénol (3).

En conclusion les processus de transformations du phénol sont les mêmes dans la phase gazeuse et aqueuse atmosphériques. Son produit majoritaire de la dégradation est, là aussi, le catéchol (4) ; les composés nitrés ((2) et (3)) ne représentant que 6 à 17% des produits formés (Herrmann et al., 2002). La réactivité dans la phase aqueuse du nuage joue donc un rôle important dans la dégradation de ce composé (Monod et al., 2005).

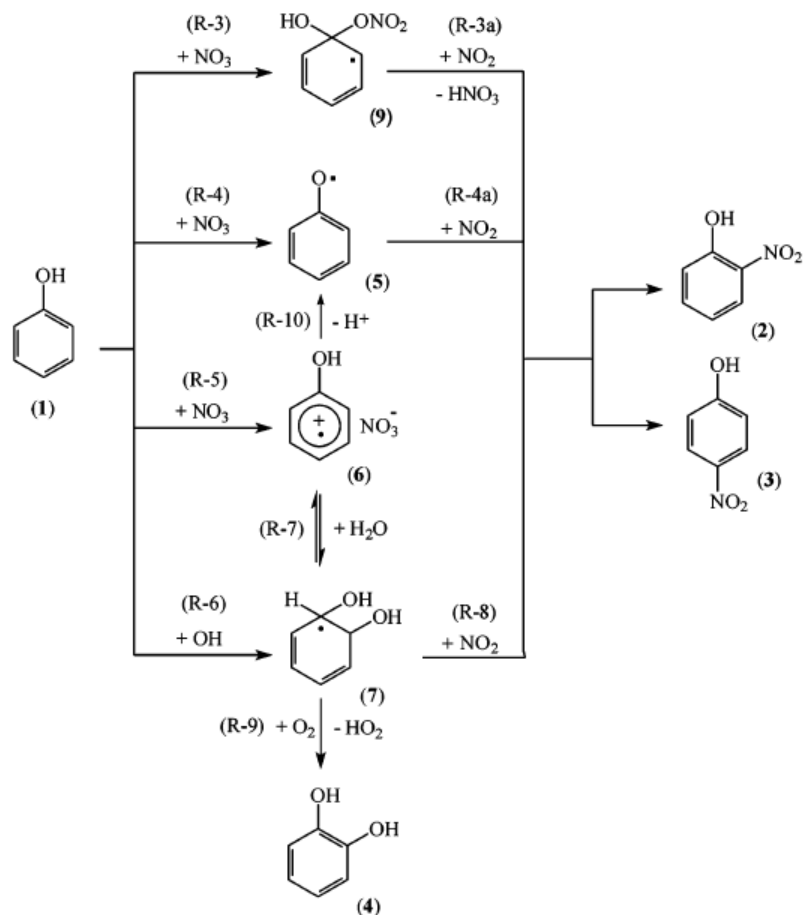


Figure 53 :Les voies de réaction du phénol dans la phase aqueuse atmosphérique (Barzaghi and Herrmann, 2002).

4.2.3 Transformation photochimique et radicalaire des acides aminés

Certains AA absorbent directement la lumière solaire et subissent donc des réactions de photolyse directe ; c'est le cas d'AA dont la chaîne latérale est un aromatique (TRP, TYR, PHE, HIS). Cependant de manière plus générale, les AA sont transformés de manière abiotique par des radicaux hydroxyles, l'ozone et l'oxygène singulet. Le radical nitrate est peu réactif. La plupart des études rapportent des mesures de constantes de réactivité (K) des AA avec ces espèces alors que peu de travaux sont consacrés à l'étude des mécanismes détaillés de leur transformation.

4.2.3.1 Constantes de réactivités et temps de vie des AA dans la phase aqueuse de l'atmosphère

1. Constantes de réactivité (K)

Tableau 10 : Constantes de réactivité (K) des 18 acides aminés avec °OH, O₃ et ¹O₂ (pH=5).

	$k_{OH} /$ $M^{-1} s^{-1}$	Référence	$k_{O_3} /$ $M^{-1} s^{-1}$	Référence	$k_{^{1}O_2} /$ $M^{-1} s^{-1}$	Référence
ALA	$7.7 \cdot 10^7$	(Scholes et al., 1965)	$2.5 \cdot 10^1$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$2 \cdot 10^6$	(Matheson and Lee, 1979)
ARG	$3.5 \cdot 10^9$	(Buxton et al., 1988)	$2.8 \cdot 10^2$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$< 1 \cdot 10^6$	(Kraljić and Sharpatyi, 1978)
ASN	$4.9 \cdot 10^7$	(Masuda et al., 1973)	$7.0 \cdot 10^1$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		
ASP	$4.9 \cdot 10^7$	(Masuda et al., 1973)	$5.0 \cdot 10^1$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		
GLN	$5.4 \cdot 10^8$	(Masuda et al., 1973)	$8.0 \cdot 10^1$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		
GLU	$1.6 \cdot 10^8$	(Scholes et al., 1965)	$2 \cdot 10^{-1}$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$5.0 \cdot 10^5$	(McGregor and Anastasio, 2001)
GLY	$1.7 \cdot 10^7$	(Scholes et al., 1965)	$2.1 \cdot 10^1$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$< 1 \cdot 10^5$	(Michaeli and Feitelson, 1994)
HIS	$5 \cdot 10^9$	(Motohashi and Saito, 1993)	$3.9 \cdot 10^3$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$6 \cdot 10^7$	(McGregor and Anastasio, 2001)
ILE	$1.8 \cdot 10^9$	(Masuda et al., 1973)				
LYS	$3.5 \cdot 10^8$	(Masuda et al., 1973)	$1.2 \cdot 10^2$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		
MET	$8.5 \cdot 10^9$	(Adams et al., 1965)	$4 \cdot 10^6$	(Pryor et al., 1984)	$2.1 \cdot 10^7$	(Miskoski and García, 1993)
PHE	$6.5 \cdot 10^9$	(Buxton et al., 1988)	$1.3 \cdot 10^3$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$7 \cdot 10^5$	(Michaeli and Feitelson, 1994)

Le tableau 10 rassemble les valeurs des constantes de réactivité (K) des 18 acides aminés avec les radicaux OH, l'O₃ et l'¹O₂ calculées pour un pH =5, ce qui est compatible avec les conditions

atmosphériques en phase aqueuse. Il apparaît clairement de très grandes différences de réactivité selon les AA et selon les oxydants considérés. Pour le radical OH, les valeurs de K_{OH} varient de $1.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour la glycine à $1.3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour la tyrosine et le tryptophane. Pour l’ozone, les valeurs de K_{O_3} sont beaucoup plus faibles (jusqu’à 6 ordres de grandeur), le tryptophane reste le plus réactif ($5.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et la Glycine, la moins réactive ($2.1 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Enfin peu de valeurs sont disponibles pour la réactivité de l’oxygène singulet, la glycine reste faiblement réactive ($K_{^1O_2} < 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) et le tryptophane le plus réactif ($k_{^1O_2} = 4.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

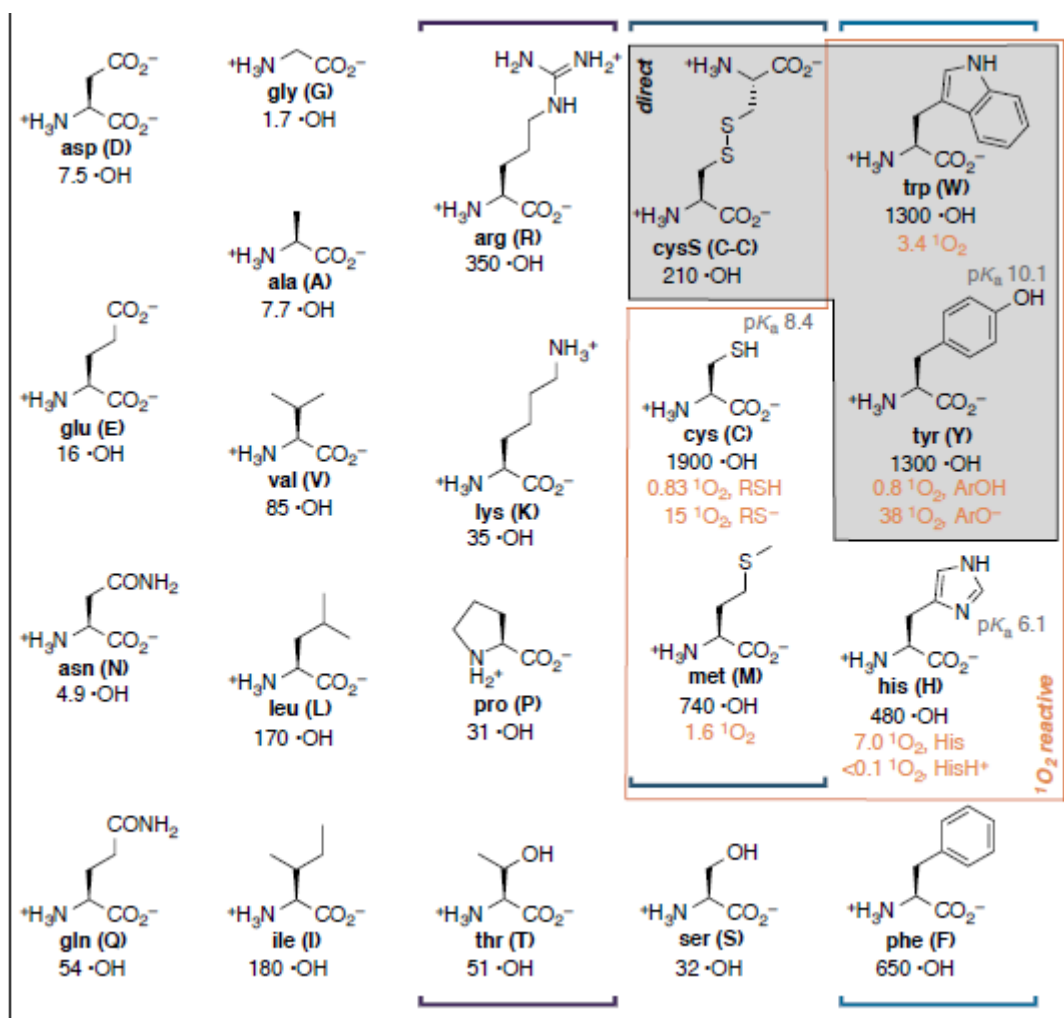


Figure 54 : Constantes de réactivité (K) des acides aminés avec le radical hydroxyle ($\bullet OH$) et l’oxygène singulet (1O_2) (pH 6–9; $\lambda > 280 \text{ nm}$). Toutes les constantes K sont données en $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Lundeen et al., 2014).

D’autres valeurs de K rapportées par Lundeen et al (2014) sont visualisée dans la Figure 54 et exprimées en $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Bien que les mesures aient été effectuées dans des conditions

différentes, on retrouve la cystéine, le tryptophane et la tyrosine comme étant les plus réactifs avec le radical OH, la méthionine, la phénylalanine et l’histidine ont également une K_{OH} élevée alors que la glycine reste très peu réactive.

2. Temps de vie des AA dans les eaux atmosphériques

En utilisant les constantes de réactivité, certains auteurs ont pu calculer les temps de vie ou demi-vie de divers AA dans des milieux nuage (Triesch et al., 2020) et brouillard (McGregor and Anastasio, 2001) en considérant la réactivité avec le radical OH ou bien un ensemble d’oxydants ($^{\circ}OH$, O_3 et 1O_2) (Tableau 11).

Tableau 11 : Temps de vie ou demi-vie des AA dans des milieux atmosphériques (nuage et brouillard).

Milieu et référence	Nuage Cap Vert (Triesch et al., 2020)	Brouillard Californie (McGregor and Anastasio, 2001)	Brouillard Californie (McGregor and Anastasio, 2001)
Oxydant	$[^{\circ}OH]_{aq}$ $2.210^{-14}M$	$[^{\circ}OH]_{aq}$ $5.9 \pm 0.43 10^{16}M$	Ensemble d’oxydants ($^{\circ}OH$, O_3 et 1O_2)*
Acides Aminés	Temps de vie (jour)	Temps de demi-vie (heure)	Temps de demi-vie (heure)
ALA	6,83	>44	
ARG		>44	
ASN		>44	
ASP		29	
GLN	0,97		
GLU	3,29	27	450
GLY	3,09	>44	>2040
HIS		[12-22]	2,5
ILE	0,29	>44	
LYS		>44	
MET	0,06	[0,063-6,3]	0,12
PHE	0,08	>44	21
PRO	1,7		
SER	1,64	>44	
THR	1,03		
TRP		[1,3-4,6]	0,075
TYR	0,04	[0,025-0,047]	0,62
VAL	8,0	>44	
CYS		>44	0,0017
LEU	0,31	50	80

* $[^{\circ}OH]_{aq} = 5 \cdot 10^{-16}M$, $[^{\circ}OH]_{gas \rightarrow aq} = 8,5 \cdot 10^{-16}M$, $[^1O_2]_{aq} = 2,2 \cdot 10^{-13}M$, $[O_3]_{aq \rightarrow gas} = 3,5 \cdot 10^{-10}M$

Selon l’étude menée par McGregor and Anastasio (2001) sur l’eau de brouillard à Davis en Californie, la méthionine, la tyrosine et le tryptophane sont dégradés très rapidement par le

radical OH, les temps de ½ vie vont de 0.025 à 6.3 heures, viennent ensuite l’histidine ($\tau_{1/2}$ de 12 à 22 h), puis l’aspartate et le glutamate ($\tau_{1/2}$ de 27 à 29 h). L’ensemble des autres AA se dégradent extrêmement lentement avec un $\tau_{1/2} > 44$ heures (Tableau 11). Ces résultats confirment ceux déjà obtenus par la même équipe dans de l’eau de brouillard collectée également en Californie et irradiée en laboratoire (Anastasio and McGregor, 2000). Lorsque l’ensemble des oxydants ($^{\circ}\text{OH}$, O_3 et $^1\text{O}_2$) sont pris en compte, les temps de ½ vie restent les plus faibles pour le tryptophane (0.075 h), la tyrosine (0.62 h) mais également pour la méthionine (0.0017h) (Tableau 11).

De leur côté Triesch et al (2020) ont calculé les temps de vie des AA qui réagiraient avec le radical OH dans des eaux de nuage prélevées au Cap Vert (Tableau 11). Les AA les plus rapidement dégradés sont la méthionine, la phénylalanine et la tyrosine ($\tau=0,004$ à $0,008$ jours). (A noter qu’aucune valeur n’est rapportée pour le tryptophane). Ce sont donc les mêmes AA que dans l’étude précédente qui sont très réactifs. Viennent ensuite la glutamine, la leucine et l’isoleucine ($\tau=0,29$ à $0,99$ jours), puis la proline, serine et thréonine ($\tau=1,03$ à 1.7 jours), et enfin l’alanine, la glutamine, la glycine et la valine ($\tau=3,09$ à $8,0$ jours).

4.2.3.2 Voies de transformations photochimiques ou radicalaires des AA :

Le Tableau 12 récapitule les différentes études menées jusqu’alors sur les voies de transformation abiotiques des AA soit par voies radicalaires (oxydation) soit par absorption UV directe. Notez que les conditions expérimentales n’étaient pas nécessairement pertinentes du point de vue atmosphérique. Les produits sont uniquement répertoriés pour démontrer la grande variété des voies de réactions et de produits possibles.

Tableau 12 : Principaux produits résultant des voies de transformations abiotiques (oxydation ou absorption directe des UV) des acides aminés.

Amino acid	Oxidant/ reaction	Main product(s)	Reference
ARG	Fenton chemistry	glutamic semialdehyde	(Stadtman, 1993),(Stadtman and Levine, 2004) and references therein
ASP	OH	NH_3 , Malonic, oxalic and formic acids	(Marion et al., 2018)
CYS	Fenton chemistry	-S-S-disulfide cross-links	(Stadtman, 1993),(Stadtman and

			Levine, 2004) and references therein
GLY	OH	Oxalic, formic, oxamic acids	(Berger et al., 1999)
GLY	O ₃	Nitrate, nitrites	(Berger et al., 1999)
GLY-ALA-VAL-PRO peptides	OH	Hydroperoxides, alcohols	(Morgan et al., 2012)
HIS	O ₃	PRO	(Mudd et al., 1969)
HIS	Fenton chemistry	ASP, ASN, 2-oxoimidazoline	(Stadtman, 1993),(Stadtman and Levine, 2004) and references therein
LEU	OH	Isovaleric acid and other carbonyl compound	
LYS	Fenton chemistry	2-amino-adipicsemialdehyde	(Stadtman, 1993),(Stadtman and Levine, 2004) and references therein
MET	O ₃	Methionine sulfoxide	(Mudd et al., 1969) (McGregor and Anastasio, 2001)
PHE	ROS	TYR	(Stadtman and Levine, 2004)
PHE	Direct UV absorption	Benzyl radical	(Pattison et al., 2012)
PHE	Direct UV absorption	TYR	(Pattison et al., 2012)
PRO	Fenton chemistry	GLU, pyroglutamate, Cis/trans-4-hydroxyproline, 2-pyrrolidone, glutamic semialdehyde	(Stadtman, 1993),(Stadtman and Levine, 2004) and references therein
SER	OH O ₃	carbonyl and carboxylic acid nitrate	(Le Lacheur and Glaze, 1996)
THR	Fenton chemistry	2-amino-3-ketobutyric acid	(Stadtman, 1993),(Stadtman and Levine, 2004) and references therein
THR	O ₃	Dihydroxyphenylalanine	(Mudd et al., 1969)
TRP	OH/H ₂ O ₂	Formic and acetic acids, many aromatic intermediates	(Bianco et al., 2016b)
TRP	¹ O ₂	3 α -hydroxypyrrroloindole; <i>N</i> -formylkynurenine, kynurenine, 3 α -dihydroxypyrrroloindole.	(Pattison et al., 2012)
TYR	OH	Enedial	(Prasse et al., 2018)
TYR	Fenton chemistry	Tyr-Tyr cross-links	(Stadtman, 1993),(Stadtman and Levine, 2004) and references therein

TYR	¹ O ₂ or direct UV absorption	3a-hydroxy-6-oxo-2,3,3a,6,7,7a-hexahydro-1H-indol-2-carboxylic acid	(Pattison et al., 2012)
TYR	Dessimination	free ammonium	(Berto et al., 2016)

La majeure partie des études (Tableau 12) ont montré la formation de petits acides tels que les acides formique, acétique, oxalique et malonique résultants de mécanismes d'oxydation, comme c'est le cas de la matière organique atmosphérique en général, ou encore de libération d'ammonium, de nitrate ou nitrite (Berto et al., 2016 ; Berger et al., 1999 ; Le Lacheur and Glaze, 1996).

Dans quelques cas précis, il a été montré la conversion d'un AA en un autre AA : ainsi l'histidine peut se convertir en proline sous l'action de l'ozone (Mudd et al., 1969), la phénylalanine en tryptophane sous l'action de ROS ou par absorption directe des UV (Pattison et al., 2012 ; Stadtman and Levine, 2004).

Dans d'autres cas des molécules aux structures variées sont obtenues (Tableau 12).

Enfin les voies de transformation abiotique de quelques AA comme le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine et l'histidine ont été décrites dans le détail, en particulier dans des études sur les protéines (Pattison et al., 2012), elles sont explicitées ci-après.

1. Le tryptophane

La chaîne latérale indolique du tryptophane (Trp) est le chromophore UV le plus puissant des AA, il peut donc subir une photolyse directe. Il peut aussi réagir avec l'oxygène singulet, des radicaux OH ou subir des mécanismes d'hydrolyse.

Différents mécanismes impliquant de nombreux intermédiaires ont été mis en évidence par Pattison et al. (2012) (Figure 55) et par Bianco et al. (2016) (Figure 56).

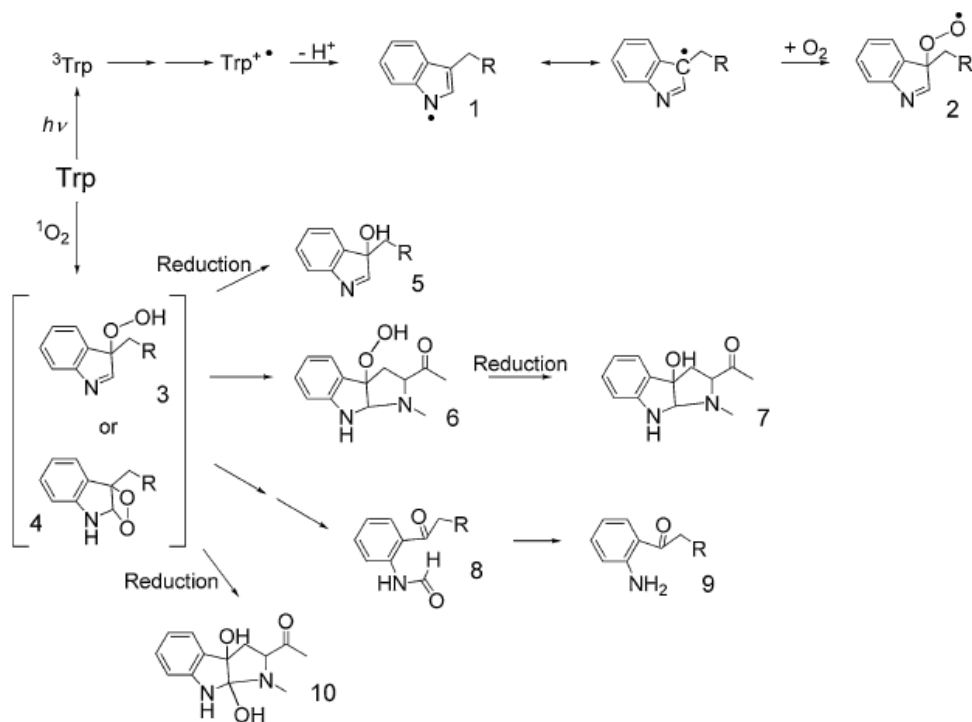


Figure 55: Mécanismes d'oxydation du Trp par absorption directe des UV et voies médiées par ${}^1\text{O}_2$. Structures des intermédiaires (R = CH(CO₂H)NH₂) (Pattison et al., 2012).

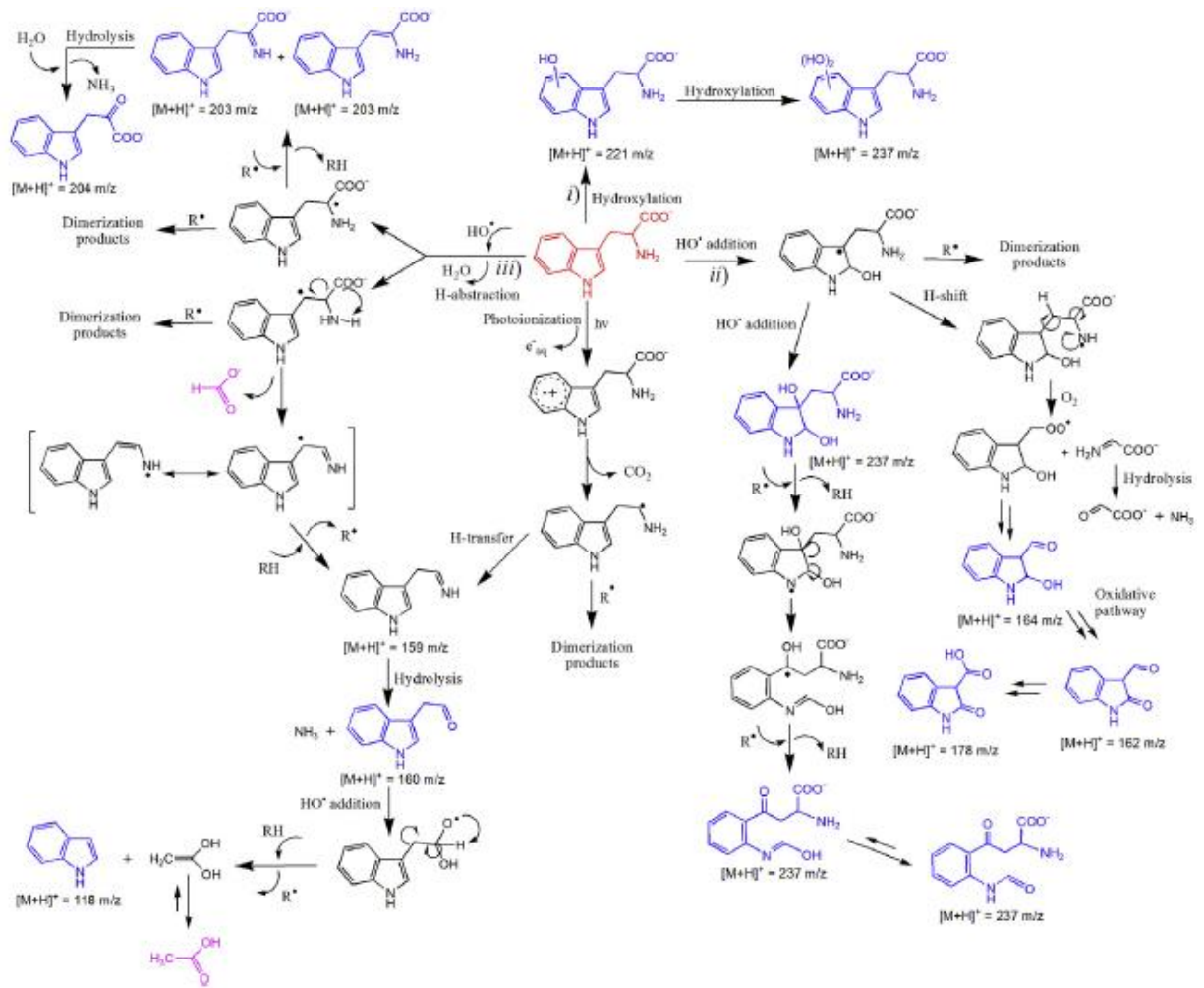


Figure 56: Mécanisme de transformation suggéré du TRP (rouge) en solution aqueuse. Structures chimiques proposées pour les produits détectés par LC-MS-ESI (en bleu) et acides carboxyliques détectés par chromatographie ionique (en violet) (Bianco et al., 2016).

2. La tyrosine

Tout comme le tryptophane, la tyrosine possède un noyau aromatique sur sa chaîne latérale et absorbe directement les UV. Elle peut aussi réagir avec 1O_2 . Les mécanismes impliqués sont décrits dans la Figure 57 (Pattison et al., 2012).

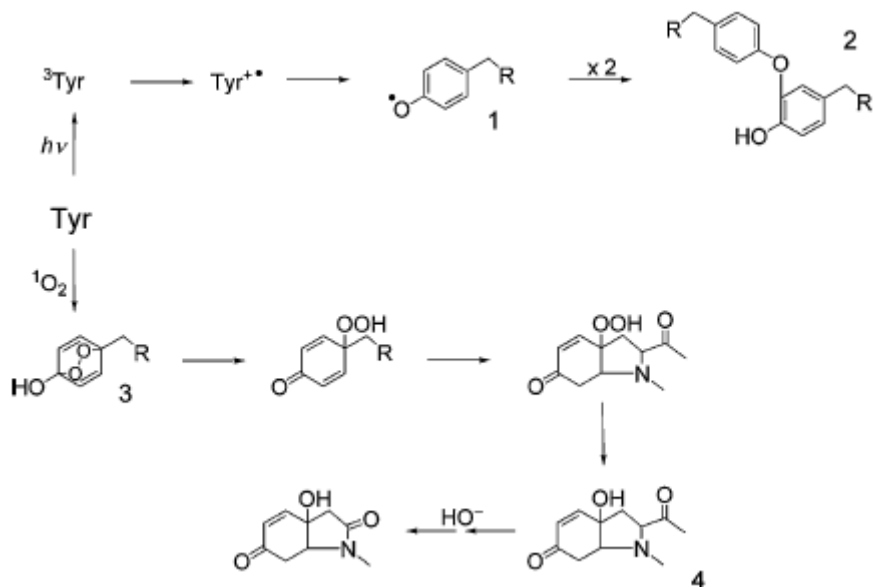


Figure 57 : Mécanismes d'oxydation de la tyrosine par absorption directe des UV et voies médiées par $^1\text{O}_2$. (Pattison et al., 2012).

Berto et al. (2016) ont montré que la phototransformation de la L-tyrosine conduit à une libération d'ammonium libre, à l'hydroxylation du cycle aromatique, cette dernière étant vraisemblablement déclenchée par la formation de radicaux tyrosyle qui ont tendance à se dimériser.

3. La phénylalanine

L'oxydation UV-médiée de la phénylalanine est relativement simple par rapport aux autres acides aminés aromatiques. Après passage par l'état triplet (^3Phe), il se produit une simple réaction de photo-dissociation qui conduit au radical benzyle. Une photo-ionisation peut aussi se produire, suivie d'une hydratation pour former des isomères de la Tyr (Pattison et al., 2012) (Figure 58) .

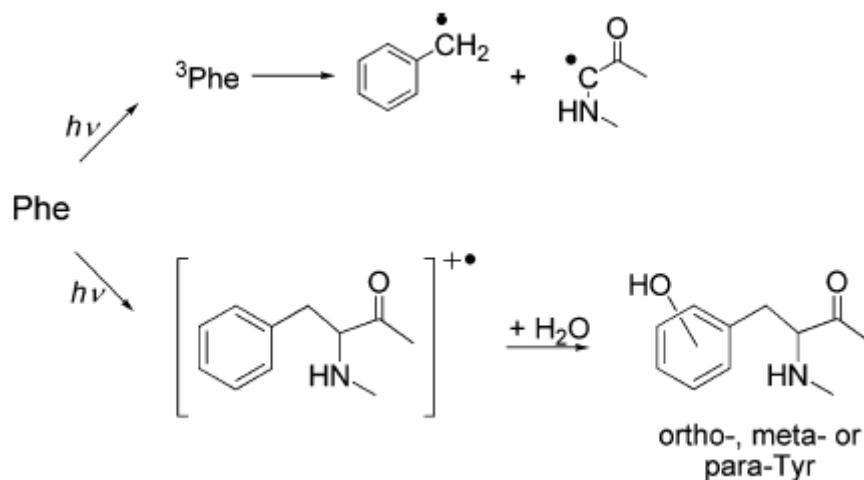


Figure 58 :L'absorption directe des UV par la Phe conduit à la formation de son état triplet et à la formation de radicaux, ou photo-ionisation suivie d'une hydratation pour former d' isomères (Pattison et al., 2012).

4. L'histidine

L'absorption directe des UV ou de la lumière visible n'est pas la voie majeure de transformation de l'Histidine. Le principal mécanisme de transformation décrit par Pattison et al (2012) fait intervenir l' $^1\text{O}_2$ (Figure 59).

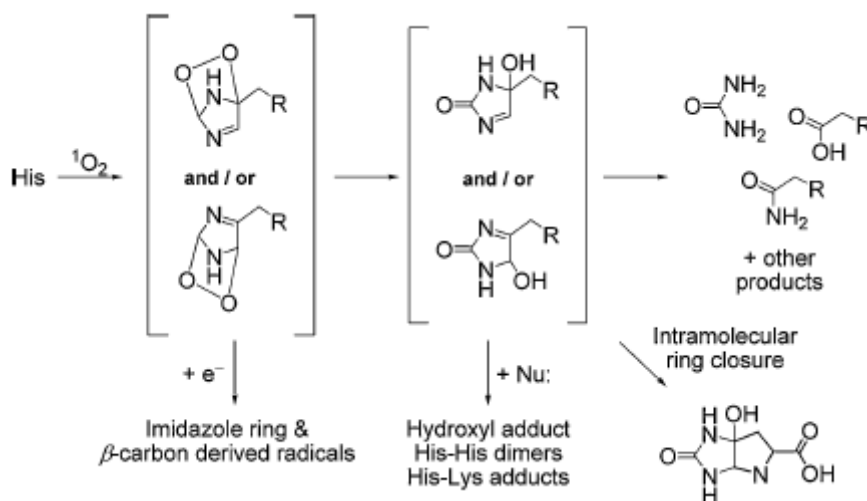


Figure 59: Oxydation de l'histidine médiée par $^1\text{O}_2$. $\text{R} = \text{CH}(\text{CO}_2\text{H})\text{NH}_2$. (Pattison et al., 2012).

4.3 Comparaison entre les processus biotiques et abiotiques

Nous venons de voir que beaucoup de composés organiques trouvés dans les nuages comme les acides mono- et di-carboxyliques, le méthanol, le formaldéhyde, le phénol, les acides aminés et le peroxyde d'hydrogène pouvaient être transformés par des voies photochimiques ou radicalaires mais aussi biotransformés par des microorganismes .

La principale question scientifique restante concerne l'évaluation des contributions relatives de ces processus biologiques par rapport aux processus abiotiques pour déterminer les effets réels des micro-organismes sur la chimie des nuages. Il est donc nécessaire de comparer les taux de transformation des composés organiques *via* la biodégradation par rapport à la chimie radicalaire. À cet effet, deux stratégies principales ont été employées :

- ✓ La première consiste à comparer les taux de biodégradation mesurés avec les taux de transformation abiotique déterminés sur la base des constantes de réactivité de $\bullet\text{OH}$, $\text{NO}_3\bullet$ et $\text{HO}_2\bullet$ et d' O_3 .
- ✓ La seconde stratégie consiste à concevoir des expériences où les taux de dégradation biotique et abiotique peuvent être mesurés expérimentalement. Il est également possible de combiner la photo- et la biodégradation en utilisant des photo-bioréacteurs spécifiques.

A ce jour, seules des études comparatives sont été menées concernant la transformation des acides carboxyliques, du méthanol, du formaldéhyde et de H_2O_2 . Le cas du phénol et des acides aminés ont fait l'objet de mes travaux de thèse et seront présentés dans la partie « Résultats ».

4.3.1 Cas des acides carboxyliques

Ariya et al. (2002) ont mesuré les taux de biodégradation des acides dicarboxyliques (malonate, succinate, adipate, pimelate et pinate) par une souche *Geotrichum* sp. isolée de l'air et ont déterminé leurs durées de vie (1,5 à 10 jours). Ces durées de vie étaient du même ordre que celles calculées à partir de la réactivité du radical hydroxyle (0,03- 24 jours) mais étaient beaucoup plus courtes que celles calculés pour l'ozone (> 771 jours).

En utilisant la même approche, Vaïtilingom et al. (2010) ont mené une étude avec 4 souches bactériennes des nuages (*Sphingomonas* sp., *Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas* sp, *Pseudomonas viridiflava*). Les vitesses de biodégradation du formiate, acétate, succinate, et

lactate (D et L) à 5°C et 17°C ont été comparées avec celles issues de l'activité des radicaux $\bullet\text{OH}$ ($1.2 \cdot 10^{-13} \text{ M}$) et $\text{NO}_3\bullet$ ($1.5 \cdot 10^{-14} \text{ M}$). Les résultats montrent clairement que les contributions bactériennes sont dominantes la nuit lorsque seuls les radicaux $\text{NO}_3\bullet$ sont présents.

Vaïtilingom et al. (2011) ont mené une étude approfondie sur 17 souches isolées à la station du puy de Dôme (France), couvrant une grande variété de souches bactériennes appartenant aux genres *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Frigoribacterium* et *Rhodococcus*. Les chercheurs ont mesuré les taux de biodégradation de l'acétate, du succinate et du formiate, et les valeurs moyennes calculées pour les 17 souches ont été comparées à celles obtenues sur la base de la réactivité des radicaux hydroxyles pour deux températures (5°C et 17°C). Deux concentrations différentes de radicaux $\bullet\text{OH}$ ont été considérées (10^{-12} M et 10^{-14} M) (Figure 60). Ces résultats montrent que l'activité microbienne est surtout favorable pour la concentration la plus faible en radical hydroxyle (10^{-14} M).

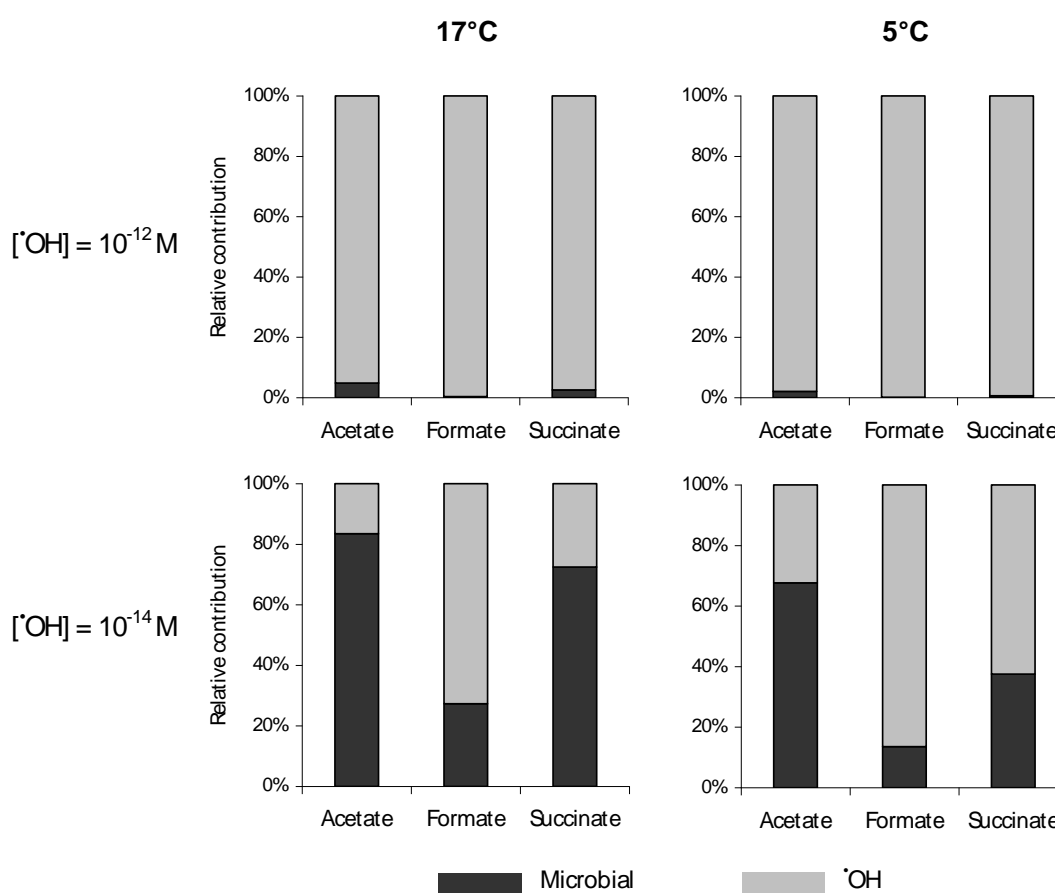


Figure 60: Contribution relative de l'activité microbienne (en noir) sur la dégradation d'acides organiques par rapport à l'action des radicaux HO• (gris clair). L'activité microbienne a été mesurée en laboratoire en milieu nuage artificiel à 5°C et 17°C. L'activité radicalaire a été calculée avec des concentrations de HO• de 10^{-12} M et 10^{-14} M . (Vaïtilingom et al., 2011).

Le principal problème associé à l'utilisation de cette approche théorique est que les concentrations des radicaux sont dérivées de travaux de modélisation qui donnent des valeurs qui varient de quelques ordres de grandeur.

Pour cette raison, il est intéressant de mesurer directement les taux de dégradation utilisant des microcosmes spécialement conçus pour être utilisés dans des expériences de photo- et de biodégradation

Dans la même étude que précédemment (Vaïtilingom et al., 2011), des expériences de photo-dégradation ont été menées en laboratoire, les taux de photo-dégradation mesurés ont donné des résultats très similaires à ceux trouvés en utilisant des concentrations de radicaux modérés. Ces résultats ont confirmé que les vitesses de bio- et de photo-transformation de l'acétate, du succinate et du formiate étaient du même ordre de grandeur.

Pour aller encore plus loin, des expériences comparant photo- et biodegradation d'acides carboxyliques (acétate, formiate, succinate, oxalate, malate) ont été effectuées en microcosmes contenant des échantillons de nuage réel prélevés au puy de Dôme (Vaïtilingom et al., 2013). Les échantillons filtrés (0.22 μ m) ne comprenaient pas de microorganismes alors que ceux non filtrés en contenaient et étaient exposés ou non à la lumière. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 61. Là encore les vitesses de photo- et biodégradation sont comparables ; ces résultats obtenus avec un milieu nuage réel confortent ceux obtenus dans des conditions modèles (souches et composés purs).

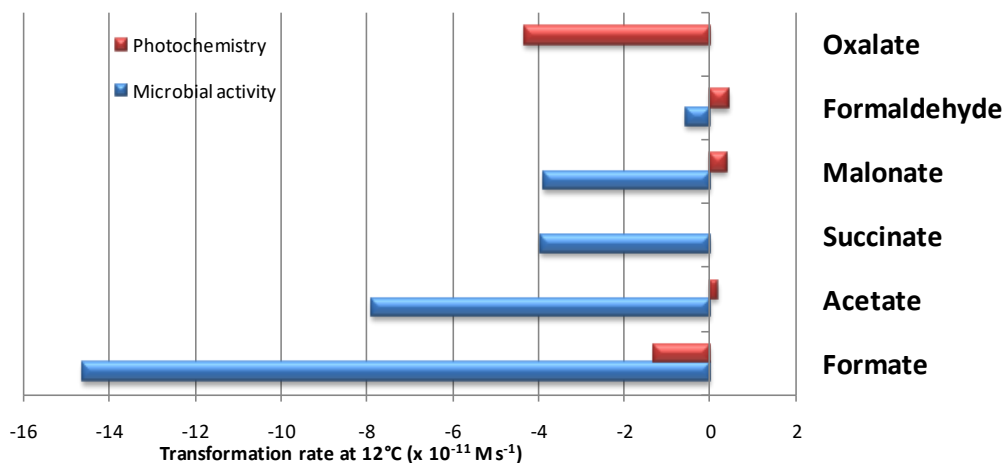


Figure 61 : Comparaison des vitesses de bio-et photo-transformation de divers composés organiques présents dans la phase aqueuse des nuages. (d'après Vaïtilingom et al., 2013).

4.3.2 Cas du méthanol et du formaldéhyde

Husárová et al. (2011) ont mesuré les taux de biodégradation du méthanol et du formaldéhyde en utilisant quatre souches (deux souches de *Pseudomonas*, une de *Bacillus* et une de *Frigoribacterium*) isolées à partir d'échantillons de nuages à la station de puy de Dôme (France). Ces taux de biodégradation ont été comparés à ceux résultant de réactions entre méthanol /formaldéhyde et radicaux libres hydroxyle et nitrate (Figure 62). Cette étude a montré que pendant la nuit durant laquelle seuls les radicaux nitrate sont actifs, les contributions des micro-organismes à la chimie des nuages sont plus importantes. Pendant la journée, la réactivité des radicaux hydroxyles est dominante. Les contributions des micro-organismes se sont révélées plus importantes dans les nuages pollués où les concentrations de radicaux nitrates sont plus élevées que celles des nuages non pollués.

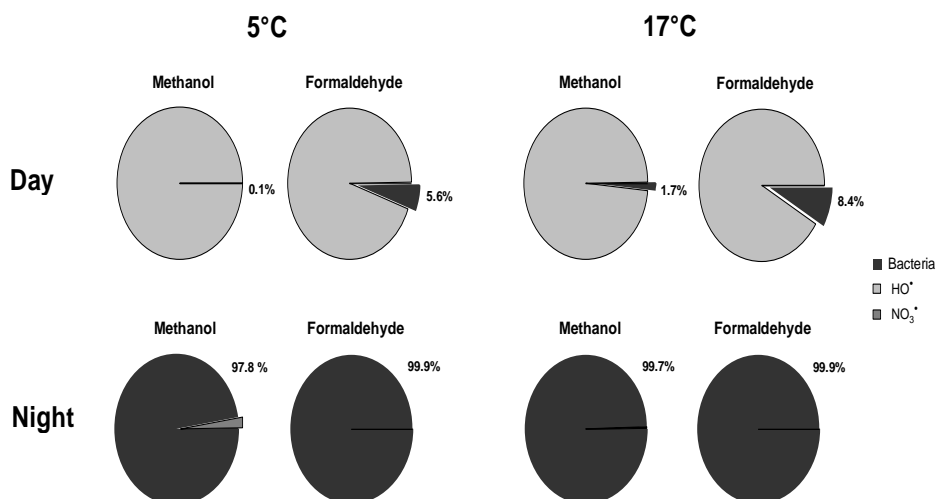


Figure 62 : Estimation de l'influence relative de l'activité bactérienne (en noir) et des radicaux libres (hydroxyle OH[•] et nitrate NO₃[•]) sur la dégradation du méthanol et du formaldéhyde dans l'eau des nuages à 5°C et 17°C pendant la journée et la nuit. Pendant la nuit (c'est-à-dire en l'absence de réactivité photochimique), les radicaux OH[•] sont considérés comme absents. Les valeurs de concentrations suivantes ont été utilisées pour les calculs : [bactéries] = 8.4 × 10⁴ cell mL⁻¹ [6]; [HO[•]] = 1.2 × 10⁻¹³ mol L⁻¹ (day-time); [NO₃[•]] = 1.5 × 10⁻¹⁴ mol L⁻¹; [methanol] = 1 × 10⁻⁷ mol L⁻¹; [formaldéhyde] = 5 × 10⁻⁷ mol L⁻¹. Constantes de vitesse (298K) pour la réaction de HO[•] avec le méthanol: K= 1 × 10⁹ L mol⁻¹ s⁻¹ (Elliot and McCracken, 1989) et avec le formaldéhyde hydraté: k = 7.8 × 10⁸ L mol⁻¹ s⁻¹ (Chin and Wine, 2018). Constantes de vitesse (298K) pour la réaction du NO₃[•] avec le méthanol: k = 5.4 × 10⁵ L mol⁻¹ s⁻¹ (Umschlag et al., 1997) et avec le formaldéhyde hydraté: : k = 1.0 × 10⁶ L mol⁻¹ s⁻¹. (Husárová et al., 2011).

D'autres expériences ont été réalisées dans des microcosmes contenant des échantillons d'eau nuageuse prélevée au puy de Dôme et ont montré que lorsqu'il y avait un mélange complexe chimique et microbiologique la situation était plus compliquée (Vaïtilingom et al., 2013). En effet on observait une photo-production de formaldéhyde en présence de lumière seule et une biodégradation en présence de microorganismes seuls. Dans des conditions de photobiodégradations combinées, la concentration en formaldéhyde restait stable montrant que formation et consommation s'équilibraient (Figure 61 et Figure 63).

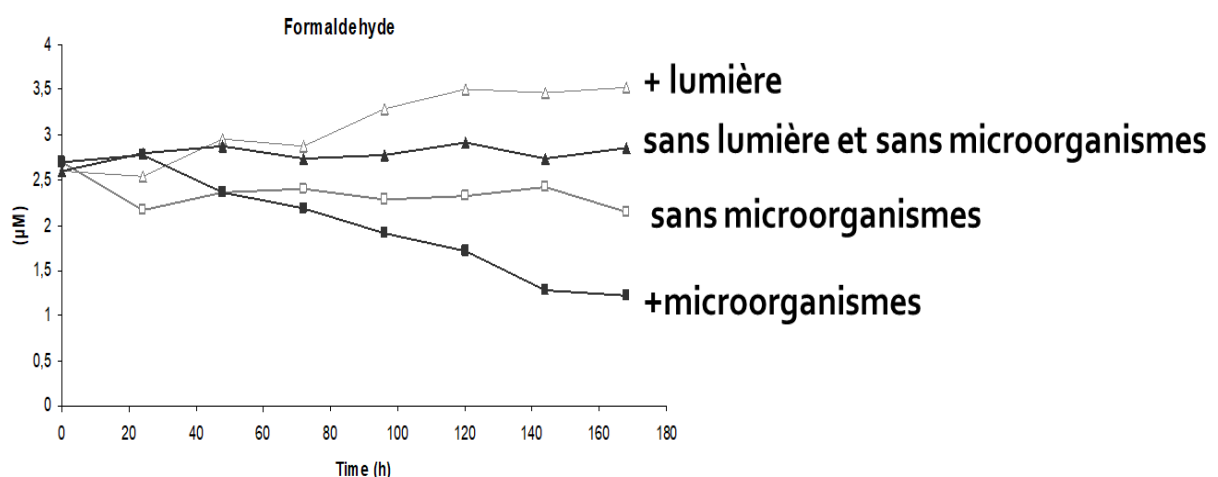


Figure 63 : Evolution temporelle des concentrations en formaldéhyde dans des échantillons de nuages contenant ou non des microorganismes et soumis ou non à l'effet de la lumière (d'après Vaïtilingom et al., 2013).

4.3.3 Cas de H_2O_2

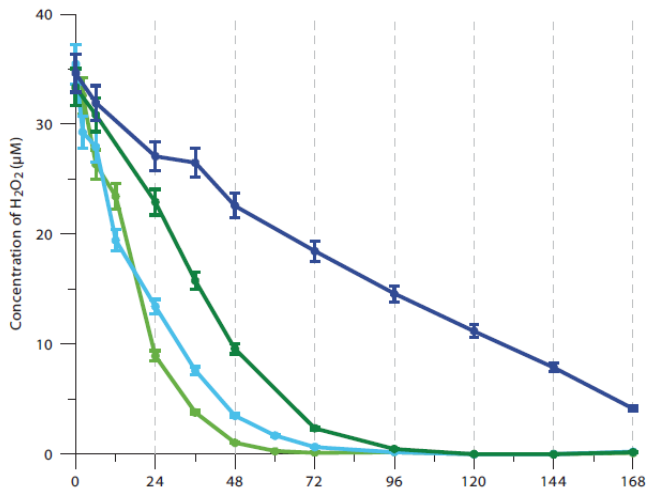


Figure 64 : Evolution des concentrations en H_2O_2 mesurées dans un échantillon de nuage réel incubé en présence de microorganismes seuls au noir (vert foncé), de lumière seule (bleu ciel), de lumière et de microorganismes (vert clair) et au noir sans microorganismes (bleu foncé). D'après (Vaïtilingom et al., 2013).

La Figure 64 montre l'évolution des concentrations en H_2O_2 mesurées dans un échantillon de nuage réel, prélevé au puy de Dôme et incubé en présence de microorganismes seuls ou lumière seule (Vaïtilingom et al., 2013). Il est clair que les vitesses de bio- et photo-transformations de H_2O_2 sont très similaires. Lorsque photo- et bio-transformation sont combinées, la vitesse est augmentée, par contre elle est très faible dans des conditions au noir sans microorganismes ce qui montre que les réactions de type Fenton sont beaucoup plus lentes.

Ces résultats ont été confirmés en utilisant des souches bactériennes pures en milieu artificiel nuage par Wirgot et al. (2017).

Problématique

Les nuages sont un milieu complexe et jouent un rôle essentiel dans la chimie atmosphérique puisqu'ils participent à la transformation des composés organiques. Deux processus interviennent potentiellement :

- des processus photochimique et radicalaires induits notamment par la présence des radicaux hydroxyles et nitriles, de l'oxygène singulet et de l'ozone
- des processus biologiques liés aux activités enzymatiques des microorganismes des nuages récemment découverts.

Pour l'instant un nombre très limité de travaux se sont focalisés sur la comparaison entre dégradations biotique et abiotique de quelques composés des nuages (acides mono- et dicarboxyliques, aldéhyde, méthanol, H₂O₂). La limitation majeure étant l'absence de données sur la biodégradation d'autres composés des nuages.

Dans cette thèse nous nous sommes donc intéressés à des composés organiques pour lesquels aucune donnée de vitesse de biotransformation n'était disponible et qui présentaient un intérêt pour l'atmosphère.

Nous avons choisi de travailler sur la biodégradation du phénol et du catéchol au vu de leur impact potentiel sur la qualité de l'air et la santé humaine en tant que polluants très toxiques.

L'autre famille de composés étudiés concerne les acides aminés, récemment mis en évidence comme des composés parmi les plus concentrés de l'eau nuageuse. Ces molécules, briques des protéines ubiquitaires dans le monde du vivant, représentent une des sources d'azote les plus facilement assimilables.

Notre démarche a été aussi de confronter ces vitesses de biodégradation expérimentales avec des vitesses de transformation abiotiques expérimentales et théoriques. Des approches par modélisation ont été également utilisées pour prendre en compte la chimie multiphasique des nuages, ce qui n'est pas encore abordé dans la littérature.

Une partie de la thèse, montre les voies de photo dégradation du complexe FeEDDS (complexe utilisé comme mime de sidérophores dans nos travaux de thèse), qui a son tour très utilisé dans la littérature pour contaminer les eaux. Le complexant EDOS est hautement biodégradable quelle que soit sa spéciation, complexé avec du métal ou libre et donc est considéré comme un produit chimique sûr et respectueux de l'environnement.

L'objectif final de nos travaux de thèse est d'apporter de nouvelles données sur la transformation de la matière organique dans le milieu nuageux et particulièrement de mieux évaluer l'impact des mécanismes de biodégradation.

Résultats

PARTIE 1 : Transformation biotique et abiotique du Phénol et du Catéchol, dans l'eau de nuage.

1.1-Introduction

Le phénol est un polluant particulièrement toxique et peut être trouvé dans de nombreux environnements, dont l'atmosphère, en raison de sa forte volatilité. Il peut être émis directement par les processus de fabrication ou de sources naturelles mais peut également résulter de l'oxydation *in situ* du benzène dans la phase gaz. Une fois dans cette phase gazeuse, le phénol peut passer dans la phase aqueuse. Le catéchol (produit d'oxydation du phénol) est encore plus soluble dans la phase aqueuse du nuage, il se retrouve donc majoritairement dans cette phase.

Récemment Lallement et al. (2018) ont montré une activité potentielle des microorganismes des nuages à dégrader le phénol et le catéchol. D'une part des transcrits de gènes codant pour les enzymes responsables de la transformation de ces composés ont été mis en évidence *in situ*, directement dans l'eau de nuage. D'autre part un screening large de 145 souches bactériennes isolées des nuages a montré l'efficacité des genres *Pseudomonas* et *Rhodococcus* pour cette biodégradation. Cependant aucune vitesse précise de biodégradation du phénol et du catéchol n'avait été décrite. La question reste ouverte de l'importance relative du processus de biodégradation par rapport aux processus photochimiques dans les nuages.

L'objectif de cette partie de la thèse était donc de mesurer des vitesses de biodégradation de ces deux composés aromatiques afin de comparer l'efficacité des voies biologiques et photochimique au sein des nuages. Pour cela deux approches ont été utilisées : une expérimentale et une autre par modélisation.

- **Approche expérimentale**

Les expériences ont été menées dans un microcosme simulant les conditions nuageuses : lumière artificielle reproduisant le spectre solaire dans un nuage, production des radicaux hydroxyles par le complexe Fe(III)-EDDS, température basse (17°C, température en été au puy de Dôme). Pour les expériences de biodégradation, nous avons utilisé la souche *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 qui s'est révélée être la plus active dans la dégradation du phénol et du

catéchol lors du screening précédent. Les concentrations en phénol et en catéchol ont été mesurées par LC-UV-vis et LC-MS respectivement.

- **Approche par modélisation**

Afin de simuler les activités dans les nuages, nous avons modélisé le système en considérant les réactions dans les phases gazeuse et aqueuse et le transfert de masse entre elles. Les vitesses de biodégradation du phénol et du catéchol sont celles mesurées lors de nos expériences en microcosmes. Pour les réactions radicalaires, les constantes de réaction des deux radicaux $\cdot\text{OH}$ et $\text{NO}_3\cdot$ et les constantes de Henry correspondent au transfert entre les 2 phases (gaz-liquide), sont issues de la littérature. Deux scénarios (nuit et jour) ont été pris en compte.

Les expériences de biodégradation ont été réalisées en collaboration avec le service de microbiologie, celles de photo-dégradation grâce aux conseils avisés de Gilles Mailhot. Les analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec Martin Lereboure, et le travail de modélisation avec Barbara Ervens.

Nos résultats ont fait l'objet d'un poster présenté dans un congrès national :

S. JABER, A. LALLEMENT, A.T. LEBEDEV, O.V. POLYAKOVA, L. DEGUILLAUME, I. CANET, P. AMATO, M. SANCELME G. MAILHOT, B. ERVENS, and A-M. DELORT. Potential biodegradation of phenol and catechol by cloud microorganisms. Comparison with radical chemistry. Colloque Chimie Atmosphérique, Lyon, 11-13 June 2019.

Trois communications orales ont été également présentées dans des colloques internationaux

A. LALLEMENT, S. JABER, A.T. LEBEDEV, O.V. POLYAKOVA, L. DEGUILLAUME, I. CANET, P. AMATO, M. SANCELME G. MAILHOT, B. ERVENS, and A-M. DELORT. Detection of phenols and phthalates as priority pollutants in cloud waters by GC×GC-TOF-MS. Potential biodegradation of phenol and catechol by cloud microorganisms. IUPAC, Paris, 7-12 July 2019.

A. LALLEMENT, S. JABER, A.T. LEBEDEV, O.V. POLYAKOVA, L. DEGUILLAUME, I. CANET, P. AMATO, M. SANCELME G. MAILHOT, B. ERVENS, and A-M. DELORT. Potential biodegradation of phenol and catechol by cloud microorganisms. Comparison with Photochemistry. EMEC20, Lodz, (Poland) 2-5 December 2019.

S. JABER, A. LALLEMENT, M. SANCELME, M. LEREMBOURE G. MAILHOT, B. ERVENS, and A-M. DELORT. Biodegradation of Phenol and Catechol in Cloud Water: Comparison to Chemical Oxidation in the Atmospheric Multiphase System. AAAR 38th Annual Conference. virtual event, 5-9 October 2020.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'une publication parue dans Atmospheric Chemistry and Physics:

S. JABER, A. LALLEMENT, M. SANCELME, M. LEREMBOURE G. MAILHOT, B. ERVENS, and A-M. DELORT. **Biodegradation of phenol and catechol in cloud water: Comparison to chemical oxidation in the atmospheric multiphase system**, *Atmos. Chem. Phys.*, doi:10.5194/acp-2019-1048, 2020.

1.2-Biodegradation of phenol and catechol in cloud water: Comparison to chemical oxidation in the atmospheric multiphase system



Biodegradation of phenol and catechol in cloud water: comparison to chemical oxidation in the atmospheric multiphase system

Saly Jaber, Audrey Lallement, Martine Sancelme, Martin Lereboure, Gilles Mailhot, Barbara Ervens, and Anne-Marie Delort

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

Correspondence: Anne-Marie Delort (a-marie.delort@uca.fr) and Barbara Ervens (barbara.ervens@uca.fr)

Received: 13 November 2019 – Discussion started: 13 January 2020

Revised: 25 March 2020 – Accepted: 27 March 2020 – Published: 28 April 2020

Abstract. The sinks of hydrocarbons in the atmosphere are usually described by oxidation reactions in the gas and aqueous (cloud) phases. Previous lab studies suggest that in addition to chemical processes, biodegradation by bacteria might also contribute to the loss of organics in clouds; however, due to the lack of comprehensive data sets on such biodegradation processes, they are not commonly included in atmospheric models. In the current study, we measured the biodegradation rates of phenol and catechol, which are known pollutants, by one of the most active strains selected during our previous screening in clouds (*Rhodococcus enclensis*). For catechol, biodegradation is about 10 times faster than for phenol. The experimentally derived biodegradation rates are included in a multiphase box model to compare the chemical loss rates of phenol and catechol in both the gas and aqueous phases to their biodegradation rate in the aqueous phase under atmospheric conditions. Model results show that the degradation rates in the aqueous phase by chemical and biological processes for both compounds are similar to each other. During day time, biodegradation of catechol is even predicted to exceed the chemical activity in the aqueous phase and to represent a significant sink (17 %) of total catechol in the atmospheric multiphase system. In general, our results suggest that atmospheric multiphase models may be incomplete for highly soluble organics as biodegradation may represent an unrecognized efficient loss of such organics in cloud water.

1 Introduction

Monocyclic aromatic compounds in the atmosphere are of great interest due to their influence on ozone formation (Hsieh et al., 1999) and their potential to form secondary organic aerosol (Ng et al., 2007). Their main sources include combustion processes of coal, oil and gasoline. Substituted monocyclic aromatics are semivolatile and partition between the atmospheric gas and particulate phases. Among those, phenol is of particular interest for air quality as it is considered one of the main pollutants listed by the US Environmental Protection Agency (US EPA list) since it represents a risk for both humans and the environmental biota (TOXNET Toxicology Data Network, 2019). Measurements of gas-phase mixing ratios of phenol in the atmosphere are sparse. The few available measurements show rather low values, with 4–40 ppt at the Great Dun Fell continental site (Lüttke and Levsen, 1997) and 0.4, 2.6 and 2.7 ppt at suburban, rural and urban locations (Delhomme et al., 2010), respectively. However, phenol's much higher water solubility ($K_H = 647 \text{ M atm}^{-1}$) as compared to benzene ($K_H \sim 0.2 \text{ M atm}^{-1}$) leads to nanomolar levels in cloud water: 5.5–7.7 nM at the Puy de Dôme (France) (Lebedev et al., 2018), 30–95 nM at Great Dun Fell (Lüttke et al., 1997), and 37 nM in the Vosges Mountains (Levsen et al., 1993). The further hydroxylated catechol is even less volatile and more water soluble and, based on its Henry's law constant of $K_H = 8.3 \times 10^5 \text{ M atm}^{-1}$, expected to be nearly fully dissolved (> 80 %) in cloud water, which might explain the lack of its detection in the gas phase. Phenolic compounds have been shown to comprise 2 %–4 % of the total organic particulate matter at several locations in the northeastern US (Ba-

hadur et al., 2010). In the same study, a strong correlation between seawater-derived organics and phenolic compounds was found, which suggests direct sources in addition to hydroxylation of the unsubstituted aromatics.

The oxidation of phenol by $\cdot\text{OH}$ radicals leads to catechol in the gas (Xu and Wang, 2013) and aqueous (Hoffmann et al., 2018) phases and at the gas–aqueous interface (Pillar et al., 2014); further $\cdot\text{OH}$ oxidation of catechol leads to ring-opening products. A recent multiphase model study suggests that the main aqueous-phase loss processes of aromatics with two hydroxyl groups include not only $\cdot\text{OH}$ and NO_3 reactions in clouds, but also reactions with O_3 and HO_2 (Hoffmann et al., 2018). The nitration of phenols represents the major atmospheric source of nitrophenols in the gas phase (Yuan et al., 2016) and aqueous phase (Harrison et al., 2005; Vione et al., 2003). Nitrophenols can be phytotoxic (Harrison et al., 2005) and also contribute to light absorption of atmospheric particles (“brown carbon”; Xie et al., 2017). They have been found in atmospheric particles (Chow et al., 2016) and in the aqueous phases of clouds, fog and lakes (Lebedev et al., 2018). In addition, phenols add to secondary organic aerosol formation in the aqueous phase by oligomerization reactions (Yu et al., 2014).

Not only chemical reactions, but also microbial processes in the aqueous phase of clouds, act as sinks for organic compounds (Delort et al., 2010). Biodegradation rates for several bacteria strains and aliphatic mono- and di-carboxylic acids/carboxylates as well as for formaldehyde and methanol (Ariya et al., 2002; Fankhauser et al., 2019; Husárová et al., 2011; Vaitilingom et al., 2010, 2011, 2013) have been measured in laboratory experiments. Comparison of such rates to those of chemical radical ($\cdot\text{OH}$ or NO_3) reactions in the aqueous phase show comparable rates of chemical and microbial processes under atmospherically relevant conditions. Such a comparison has not been performed yet for phenolic compounds in the aqueous phase due to the lack of data on their biodegradation rates.

Our previous metagenomic and metatranscriptomic study, directly performed on cloud water samples collected at the Puy de Dôme station in France, showed convincing evidence of the in-cloud expression of gene coding for enzymes involved in phenol biodegradation (Lallement et al., 2018b). We found transcripts for phenol monooxygenases and phenol hydroxylases responsible for the hydroxylation of phenol into catechol and transcripts for catechol 1,2-dioxygenases leading to the opening of the aromatic ring. These genes originated from the genera *Acinetobacter* and *Pseudomonas* belonging to Gamma-proteobacteria, a major class of bacteria in clouds (Lallement et al., 2018b). In the same study, a large screening of bacteria in parallel isolated from cloud water samples (*Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp. and strains from the Moraxellaceae family) showed that 93% of the strains could biodegrade phenol. Altogether, these results indicate a high potential of cloud microorganisms to biotransform phenol and catechol in cloud water.

In the current study, we designed lab experiments in microcosms mimicking cloud water conditions in terms of light, bacteria and temperature. Under these conditions, we measured the biodegradation rates of phenol and catechol by *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28, isolated from cloud water and one of the most efficient strains able to degrade phenol during our previous screening (Lallement et al., 2018b). The derived biodegradation rates for *Rhodococcus*, together with literature data on phenol and catechol biodegradation by *Pseudomonas*, were implemented in a box model to compare chemical and microbial degradation rates in the atmospheric multiphase system.

2 Materials and methods

2.1 Experiments in microcosms

The transformation rates of phenol and catechol were measured in microcosms mimicking cloud water conditions at the Puy de Dôme station (1465 m). Solar light was fitted to that measured directly under cloudy conditions (Fig. S1 in the Supplement); 17 °C is the average temperature in the summer at this location. *Rhodococcus* bacterial strains belong to the most abundant bacteria in cloud waters and are very active phenol biodegraders (Lallement et al., 2018b; Vaitilingom et al., 2012). Fe(EDDS) was used to mimic organic ligands of Fe(III), in particular siderophores (Vinatier et al., 2016). In addition, this complex is stable at the working pH of 6.0 (Li et al., 2010).

2.1.1 Cell preparation for further incubations

Rhodococcus enclensis PDD-23b-28 was grown in 25 mL of R2A medium for 48 h at 17 °C, 130 rpm (Reasoner and Geldreich, 1985). Then cultures were centrifuged at 4000 rpm for 15 min at 4 °C. Bacteria pellets were rinsed first with 5 mL of NaCl 0.8% and after with Volvic® mineral water (pH = 7.0), previously sterilized by filtration under sterile conditions using a 0.22 μm PES filter. The bacterial cell concentration was estimated by optical density at 600 nm using a UV3100 spectrophotometer to obtain a concentration close to 10^9 cell mL^{-1} . Finally, the concentration of cells was precisely determined by counting the colonies on R2A Petri dishes.

2.1.2 Phenol transformation

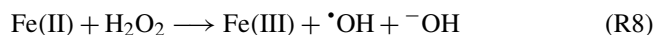
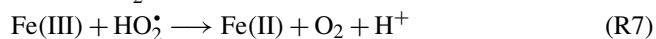
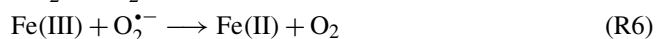
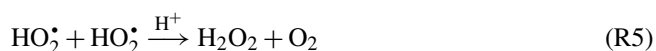
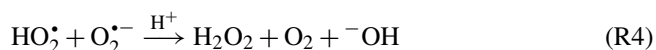
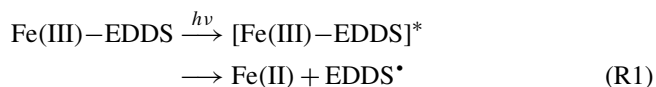
Biotransformation. *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 cells were re-suspended in 5 mL of 0.1 mM phenol (Fluka > 99%) solution, prepared in Volvic® mineral water, and incubated at 17 °C, 130 rpm agitation for 48 h in the dark; 0.5 mL of this culture was incubated in 25 mL of the same medium and under the same conditions. In order to determine the concentration, the optical density for each strain was measured at 600 nm during the experiment. The strain

concentration was $\sim 10^9$ cells mL $^{-1}$. The concentration ratio of bacterial cells to phenol was kept similar to that as measured in cloud water (Lallement et al., 2018b). We showed in the past that in repeated experiments identical cell / substrate ratios lead to the same biodegradation rates (Väitilingom et al., 2010).

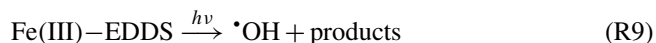
A control experiment was performed by incubating phenol without bacteria; phenol concentration remained stable over time (0.1 mM of phenol was obtained at the end of the experiment). For phenol quantification over time in the incubation experiments, 600 μ L samples were centrifuged at 12 500 rpm for 3 min and the supernatants were kept frozen until HPLC analysis. Complementary experiments were also performed consisting of incubation of the cells and 0.1 mM phenol in the presence of light without Fe(EDDS).

Phototransformation. A 0.1 mM phenol solution (Fluka > 99 %), prepared in Volvic[®] mineral water, was incubated at 17 °C, 130 rpm agitation for 48 h in photo-bioreactors designed by Väitilingom et al. (2011). OH radicals were generated by photolysis adding 0.5 mM Fe(EDDS) complex solution. The Fe(EDDS) solution (iron complex with 1 : 1 stoichiometry) was prepared from iron(III) chloride hexahydrate (FeCl₃ · 6H₂O; Sigma-Aldrich) and (S,S)-ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid trisodium salt (EDDS, 35 % in water). A complementary experiment was also performed consisting of incubation of a 0.1 mM phenol solution in the presence of light without an Fe(EDDS) complex.

The experimental conditions of the irradiation experiments (Sylvania Reptistar lamps; 15 W; 6500 K) are described by Wirgot et al. (2017). They mimic the solar light measured under cloudy conditions at the Puy de Dôme station (Fig. S1). The mechanism of the \cdot OH radical production under light irradiation is as follows (Brigante and Mailhot, 2015).



Using the specifications of the lamp, an overall rate constant of the photolysis of the Fe(III)-EDDS complex $j_{\text{R9}} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ was calculated (Sect. S2).



Assuming steady-state conditions for \cdot OH at the beginning of the experiments (i.e., equal \cdot OH production and loss

rates), an \cdot OH concentration of $8.3 \times 10^{-13} \text{ M}$ can be calculated. This concentration is at the upper limit of \cdot OH concentrations as derived from various measurements and model studies (Arakaki et al., 2013; Lallement et al., 2018a).

Photo-biotransformation. The protocols for biotransformation and photo-transformation of phenol in the presence of Fe(EDDS) as described above were combined.

2.1.3 Catechol transformation

Biotransformation. As for phenol, *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 cells were re-suspended in 5 mL of 0.1 mM catechol (Fluka > 99 %) solution, prepared in Volvic[®] mineral water, and incubated at 17 °C, 130 rpm agitation for 48 h in the dark. Four experiments were carried out with different cell concentrations (10^9 , 10^8 , 10^7 and 10^6 cell mL $^{-1}$). For catechol quantification over time in the incubation experiments, 600 μ L samples were centrifuged at 12500 rpm for 3 min and the supernatants were kept frozen until LC-HRMS analysis.

2.2 Analytical methods

2.2.1 Phenol HPLC analysis

Before analysis, all samples were filtered on an H-PTFE filter (pore size at 0.2 μ m and diameter of 13 mm from Macherey-Nagel, Germany). Phenol detection was done on an HPLC VWR Hitachi Chromaster apparatus fitted with a DAD detector and driven by Chromaster software. Isocratic mode was used with a reverse-phase end-capped column (LiChrospher[®] RP-18, 150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, 100 Å). The mobile phase was composed of acetonitrile and filtered water (Durapore[®] membrane filters, 0.45 μ m HVLP type, Ireland) in 25/75 ratio with a flow rate at 1.2 mL min $^{-1}$. Sample injection volume was 50 μ L, spectra were recorded at 272 nm and the runtime was 10 min.

2.2.2 Catechol LC-HRMS analyses

LC-HRMS analyses of catechol were performed using an RSLCnano UltiMate[™] 3000 (Thermo Scientific[™]) UHPLC equipped with an Q-Exactive[™] Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap[™] Mass Spectrometer (Thermo Scientific[™]) ionization chamber. The same conditions were used for analyzing EDDS. Chromatographic separation of the analytes was performed on a Kinetex[®] EVO C18 (1.7 μ m, 100 mm \times 2.1 mm, Phenomenex) column with a column temperature of 30 °C. The mobile phases consisted of 0.1 % formic acid and water (A) and 0.1 % formic acid and acetonitrile (B). A three-step linear gradient of 95 % A and 5 % B in 7.5 min, 1 % A and 99 % B in 1 min, and 95 % A and 5 % B in 2.5 min was used throughout the analysis. This device was associated with a Thermo Scientific[™] Dionex[™] UltiMate[™] DAD 3000 detector (200–400 nm).

The Q-Exactive ion source was equipped with an electrospray ionization (ESI) and the Q-Orbitrap™. The Q-Exactive was operated in either full MS-SIM; the full MS scan range was set from m/z 80 to 1200. The mass resolution was set to 70 000 fwhm, and the instrument was tuned for maximum ion throughput. The AGC (automatic gain control) target or the number of ions to fill the C-Trap was set to 10^6 with a maximum injection time (IT) of 50 ms. The C-Trap is used to store ions and then transfer them to the Orbitrap mass analyzer. Other Q-Exactive generic parameters were gas (N_2) flow rate set at 10 a.u. (arbitrary units), sheath gas (N_2) flow rate set at 50 a.u., sweep gas flow rate set at 60 a.u., spray voltage at 3.2 kV in positive mode and 3 kV in negative mode, capillary temperature at 320 °C, and heater temperature at 400 °C. Analysis and visualization of the data set were performed using Xcalibur™ 2.2 software from Thermo Scientific™.

2.2.3 Derivation of phenol and catechol degradation rates

The degradation rates of phenol and catechol were calculated after normalization based on the ratio of the concentration at time t (C) and the concentration at time $t = 0$ (C_0). The pseudo-first-order rate constants (k_{phenol} and k_{catechol}) were determined using Eq. (1):

$$\ln(C/C_0) = f(t) = -k_{\text{phenol}} \text{ (or } k_{\text{catechol}}) t. \quad (1)$$

2.3 Description of the multiphase box model

2.3.1 Chemical and biological processes

We use a multiphase box model to compare the loss rates of phenol and catechol in the gas and aqueous phases by radicals ($\cdot\text{OH}$, NO_3^{\cdot}) in both phases and bacteria only in the aqueous phase over a processing time of 15 min to simulate chemical and biological processing in a single cloud cycle. For each set of processes ($\cdot\text{OH}/\text{NO}_3^{\cdot}$, phenol/catechol), the three terms in the following equation are calculated and the relative importance of each process is determined:

$$\frac{d[\text{Aromatic}]}{dt} \left[\frac{\text{molec}}{\text{cm}^3_{\text{gas}} \text{ s}} \right] = \underbrace{-k_{\text{chem,gas}} [\text{Radical}(\text{gas})] [\text{Aromatic}(\text{gas})]}_{\text{loss by gas-phase chemistry}} - \underbrace{\left[k_{\text{chem,aq}} [\text{Radical}(\text{aq})] [\text{Aromatic}(\text{aq})] \right]}_{\text{loss by aqueous-phase chemistry}} + \underbrace{k_{\text{bact,aq}} [\text{Cell}] [\text{Aromatic}(\text{aq})]}_{\text{loss by microbial processes in the aqueous phase}} \left. \right] \text{LWC } N_A 0.001, \quad (2)$$

where [Aromatic] denotes the phenol or catechol concentration, [Radical] the $\cdot\text{OH}$ or NO_3^{\cdot} concentration in the gas or aqueous phase, respectively, and $k_{\text{chem,gas}}$, $k_{\text{chem,aq}}$ and k_{bact} are the rate constants as listed in Table S1 in the Supplement. The units of the aqueous-phase processes are converted into the same units as the gas-phase processes ($\text{molec cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$), with LWC (liquid water content = $9.7 \times 10^{-7} \text{ L}(\text{aq}) \text{ L}(\text{gas})^{-1}$), $N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ molecules mol}^{-1}$ (Avogadro constant) and 0.001 to convert from L to cm^3 .

The pH value of cloud water is assumed to be constant (pH = 4) to represent conditions of a continental, moderately polluted cloud. It should be pointed out that the choice of the pH value in the simulations does not affect the results for a wide range of pH values ($3 < \text{pH} < 6$), as this is typical of clouds influenced by marine and continental air masses (Deguillaume et al., 2014). None of the parameters in Eq. (2) is pH dependent within the range relevant for cloud water (cf. Sect. S3.3). In addition to the data for *Rhodococcus* obtained in the current study, we also include literature data on the biodegradation of phenol and catechol by *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa* (Sect. 3.2), which are usually more abundant in the atmosphere than *Rhodococcus*.

The processes considered in the gas and aqueous phases are summarized in Table S1 and Fig. 1. In both phases, the reaction of phenol with $\cdot\text{OH}$ is assumed to yield 50 % catechol; other products of these reactions are not further tracked in the model. The reaction of phenol with NO_3^{\cdot} results in nitrophenols (Bolzacchini et al., 2001; Harrison et al., 2005); the loss of these products is not explicitly included in the model either as we solely focus on the comparison of the degradation rates. Recently, it was suggested that the reactions with ozone and $\text{HO}_2^{\cdot}/\text{O}_2^{\cdot-}$ might represent major sinks ($\sim 50\%$ and $\sim 20\%$, respectively) of catechol in the aqueous phase (Hoffmann et al., 2018). However, the only available rate constant for the ozone reaction was derived at pH = 1.5 by Guro and Nekouinaini (1984), who postulate that at higher pH (~ 5 – 6), the reaction with $\cdot\text{OH}$ likely dominates the overall loss. Therefore, in our base case simulations, we limit the reactions of phenol and catechol to the reactions with $\cdot\text{OH}$ and NO_3^{\cdot} radicals. Sensitivity studies including the $\text{HO}_2^{\cdot}/\text{O}_2^{\cdot-}$ and O_3 reactions are discussed in the Supplement (Sect. S4).

Microbial activity in the aqueous phase by *Rhodococcus* and *Pseudomonas* is usually expressed as rates (mol per cell per hour) (Väitilingom et al., 2013). We converted these experimentally derived rates into “rate constants” (liters per cell per hour) in order to adjust them to the substrate and cell concentrations as assumed in the aqueous phase in the model (Sect. S3.2), equivalent to the treatment of chemical processes. In order to account for the numerous additional loss processes of $\cdot\text{OH}(\text{aq})$ and $\text{NO}_3^{\cdot}(\text{aq})$ in clouds, sinks for both radicals have been added: a general rate constant of $\cdot\text{OH}$ with total water-soluble organic carbon (WSOC) ($k_{\text{OH,WSOC}} = 3.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) lumps the main loss processes of $\cdot\text{OH}$ in cloud water (Arakaki et al., 2013); assuming an average WSOC concentration of

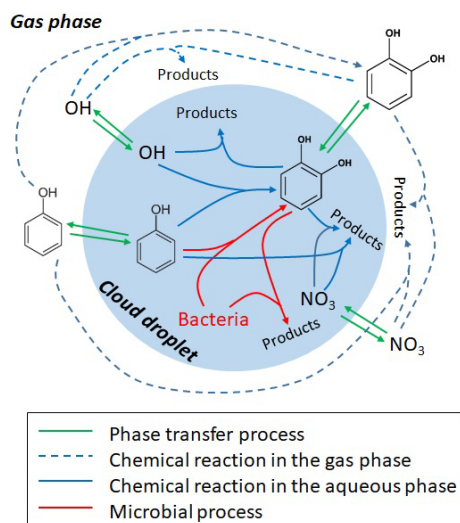


Figure 1. Schematic of the multiphase system in the box model.

5 mM results in a first-order loss process of $k_{\text{OH}} = 2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. The main losses of $\text{NO}_3^*(\text{aq})$ are likely reactions with halides (Herrmann et al., 2000); as a proxy, we assume here a first-order loss process ($k_{\text{NO}_3} = 10^5 \text{ s}^{-1}$), reflecting the sum of the major $\text{NO}_3^*(\text{aq})$ sinks. These lumped sink processes lead to aqueous-phase radical concentrations of $[\cdot\text{OH}(\text{aq})]_{\text{day}} \sim 10^{-15} \text{ M}$ and $[\text{NO}_3^*(\text{aq})]_{\text{night}} \sim 10^{-14} \text{ M}$, respectively, in agreement with predictions from previous model studies (Ervens et al., 2003). Kinetic-phase transfer processes between the two phases are described for the radicals and aromatics based on the resistance model by Schwartz (1986); all phase transfer parameters (Henry's law constants K_{H} , mass accommodation coefficients α and gas-phase diffusion coefficients D_{g}) are summarized in Table S1.

2.3.2 Initial concentrations

Initial concentrations of 4 ppt catechol and phenol are assumed in the gas phase that partition between both phases and are chemically consumed over the course of the simulation (15 min). These initial mixing ratios correspond to equivalent aerosol mass concentrations on the order of several 10s ng m^{-3} , in agreement with measurements of phenol compounds in aerosol samples (Bahadur et al., 2010; Delhomme et al., 2010) and nanomolar concentrations in cloud water (Lebedev et al., 2018). It should be noted that the assumption about the initial aromatic concentrations does not affect any conclusions of our model studies, as we compare the loss fluxes of all processes in a relative sense. Two simulations are performed for each set of conditions to simulate day- or night-time conditions, respectively, that only differ by the radical concentrations ($[\cdot\text{OH}]_{\text{day}} = 5 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$; $[\text{NO}_3^*]_{\text{night}} = 5 \times 10^8 \text{ cm}^{-3}$) that are constant throughout the simulations. Two types of bacteria are assumed (*Rhodococcus* and *Pseudomonas*). They have been found to contribute

3.6% and 19.5% to the total number concentration of bacteria cells isolated from cloud waters and present in our lab collection. Using a typical cell concentration in cloud water of $6.8 \times 10^7 \text{ cell L}^{-1}$ (Amato et al., 2017), the assumed bacteria cell concentrations in the model are $2.7 \times 10^6 \text{ cell L}^{-1}$ and $1.3 \times 10^7 \text{ cell L}^{-1}$ for *Rhodococcus* and *Pseudomonas*, respectively. The simulations are performed for the conditions for monodisperse droplets with a diameter of $20 \mu\text{m}$. The drop number concentration of 220 cm^{-3} results in a total liquid water content of 0.9 g m^{-3} . These parameters do not change over the course of the simulation.

3 Results

3.1 Incubations in microcosms

The transformation rates described in this work were measured at $\text{pH} = 7.0$ as observed at the Puy de Dome ($3.8 < \text{pH} < 7.6$, Deguillaume et al., 2014), but we expect that our results can be extrapolated to the full range of pH values as encountered in clouds. In our previous studies, we have demonstrated that pH variation has a low impact on microbial biodegradation ability, as was shown in the case of carboxylic acids by 17 strains isolated from clouds (Väitilingom et al., 2011) or phenol by *Pseudomonas aeruginosa* (Razika et al., 2010). This insensitivity to the solution pH can be explained by the fact that the biodegradation experiments are performed with bacteria and not purified enzymes. The enzymatic activities take place inside the cell and are not impacted by the external pH. It is well known that bacteria are able to regulate their internal pH (which is usually in the range of $6.5 < \text{pH} < 7$ when exposed to external pHs between 4 and 8). Yeasts, molds or acidophilic and alcalinophilic bacteria are even active in a range of pH of $2 < \text{pH} < 11$ (Beales, 2004). The mechanisms involved in the intracellular pH regulation of microorganisms facing acid stress are very complex and have been reviewed recently (Guan and Liu, 2020).

3.1.1 Transformation of phenol

Abiotic degradation. In the presence of light and Fe(EDDS), phenol concentration decreases with time in the first 2 h of the experiments and then remains rather stable (Fig. 2). In parallel, catechol, the first intermediate of phenol transformation, is formed (Fig. S2a) and accumulates over time. Catechol concentration is quite low because it is further oxidized over time to yield CO_2 . Phenol degradation slows down after 2 h due to the lack of OH radical production resulting from the destruction of the EDDS ligand with time (Fig. S2b). Phenol is not directly photolyzed in the presence of light, while it is oxidized in the presence of Fe(EDDS) complex (Figs. 2 and S2).

Biotic degradation. In the dark, phenol is biotransformed by *Rhodococcus enclensis* cells (Fig. 2) and completely degraded after 5.5 h. A lag time of about 2.5 h is observed,

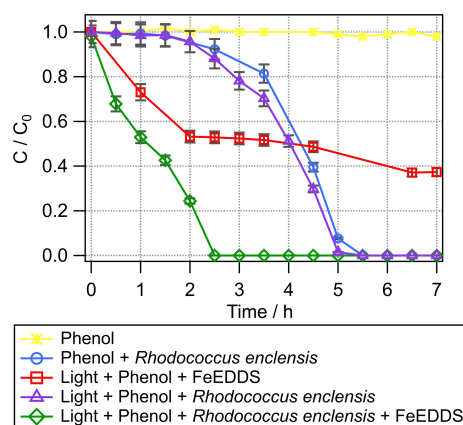


Figure 2. Transformation of phenol with time under different conditions. Phenol + light + Fe(EDDS) (red squares), phenol + *R. enclensis* + dark (blue circles), phenol + *R. enclensis* + light (purple triangles), and phenol + *R. enclensis* + light + Fe(EDDS) (green line). *Rhodococcus enclensis* cell concentration was 10^9 cells mL^{-1} .

during which phenol is degraded extremely slowly. This is a well-known phenomenon under lab conditions corresponding to the induction period of the gene expression (Al-Khalid and El-Naas, 2012). Catechol is slowly formed in parallel until $t = 3.5$ h and is further biodegraded when bacteria have started to be more active (Fig. S2a).

Abiotic and biotic combined transformation. When light (in the absence of Fe(EDDS)) is present, no major change is observed for the biodegradation of phenol by *Rhodococcus enclensis* (Fig. 2); the lag time is still observed. When light and Fe(EDDS) are present, the lag time is no longer observed and the degradation of phenol is completed within 2.5 h instead of 5.5 h when the bacteria are in the dark. The microbial activity compensates for the limitation of radical processes due to the destruction of the Fe(EDDS) complex (after 2 h). In parallel, the production of catechol is increased compared to biotic or abiotic conditions alone (Fig. S2a). Catechol accumulates over approximately 3 h, after which it decreases. As observed previously, this decrease is likely a result of the bacterial activity.

Comparison of the rates of phenol transformation under the different conditions. If we consider the numerous uncertainties, the rates of transformation under abiotic, biotic and combined conditions are within the same order of magnitude, namely $\sim 10^{-5}$ mol L^{-1} h^{-1} (Table 1). Biotic and combined conditions can be further compared in more detail by normalizing the transformation rates with the exact number of cells present in the different incubations (three biological replicates for each condition). Note that the number of cells varied from 4×10^8 to 8×10^9 cell mL^{-1} . After normalisation to the cell concentration used in the individual experiments, it is evident that the rates of phenol transformation are very close to each other and in the range of 10^{-16} mol per cell per hour (Table 2).

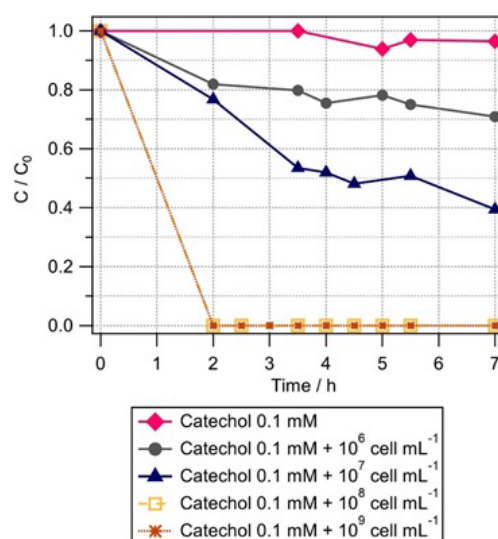


Figure 3. Biotransformation of catechol with time by different concentrations of *Rhodococcus enclensis*: 10^9 cell mL^{-1} (brown stars), 10^8 cell mL^{-1} (brown squares), 10^7 cell mL^{-1} (blue triangles), and 10^6 cell mL^{-1} (black circles). C : phenol concentration at time t ; C_0 : initial phenol concentration. C/C_0 was extrapolated from the ratio of the integrals of the catechol signal $m/z = 110.03678$ detected in mass spectra at time $t = 0$ and t , respectively. Initial catechol concentration was 0.1 mM.

3.1.2 Biotransformation of catechol

As catechol is an intermediate of phenol transformation, we measured its biotransformation rate by *Rhodococcus enclensis* under dark conditions. When the cell concentration was 10^8 or 10^9 cell mL^{-1} , the catechol biodegradation was too fast to be detected within the time resolution of the experiments (Fig. 3). We performed various experiments with reduced cell concentrations, from 10^7 to 10^6 cell mL^{-1} (Fig. 3). Finally, we used the results corresponding to 10^7 cell mL^{-1} to derive the initial rate of catechol biotransformation. It was estimated as $(15 \pm 0.5) \times 10^{-16}$ mol per cell per hour. This value is 8.5 times higher than the biodegradation rate of phenol and was used in the model (Sect. 3.2).

Straube (1987) showed that the activity of the catechol-1, 2-dioxygenase of *Rhodococcus* sp. P1 was higher than that of its phenol hydroxylase. This trend is in agreement with our results, as we know from the genome sequencing of our *Rhodococcus enclensis* strain that a catechol-1,2-dioxygenase is involved (and not a catechol-2,3-dioxygenase) (Lallement et al., 2017). As opposed to the results for phenol in Fig. 2, it can be seen in Fig. 3 that no lag time is observed for catechol biodegradation. This suggests that the first step of oxidation of phenol to catechol by a phenol hydroxylase might be a limiting step as it needs to be induced, while the second step – corresponding to the

Table 1. Transformation rates ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) of catechol and phenol under abiotic and biotic conditions. The rates were measured from three biological or chemical replicates (independent experiments), respectively. They were derived based on the steepest slopes in Fig. 2.

Phenol Light + Fe(EDDS)	Phenol <i>Rhodococcus</i> <i>enclensis</i> (dark)	Phenol <i>Rhodococcus</i> <i>enclensis</i> + light	Phenol <i>Rhodococcus</i> <i>enclensis</i> Light + Fe(EDDS)	Catechol <i>Rhodococcus</i> <i>enclensis</i> (dark)
3.1 ± 0.9	14 ± 6.4	4.7 ± 3.2	5.7 ± 0.5	15 ± 0.5

Table 2. Biodegradation rates (mol per cell per hour) of catechol and phenol of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains normalized to the exact number of cells present in the incubations. The calculations of biodegradation rates for the *Pseudomonas* strains are detailed in Sect. S1.

Bacterial strain (experimental condition)	Biodegradation rate of phenol (10^{-16} mol per cell per hour)	Biodegradation rate of catechol (10^{-16} mol per cell per hour)	References
<i>Rhodococcus enclensis</i> PDD-23b-28 (dark)	1.8 ± 0.5	15.0 ± 0.5	This work
<i>Rhodococcus enclensis</i> PDD-23b-28 (light)	1.2 ± 0.5	ND ^a	This work
<i>Rhodococcus enclensis</i> PDD-23b-28 (light + Fe(EDDS))	1.0 ± 0.3	ND ^a	This work
<i>Pseudomonas putida</i> EKII (dark)	0.2	2.4	Hinteregger et al. (1992)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (dark)	5.9	70.7 ^b	Phenol experiments (Razika et al., 2010)
<i>Pseudomonas</i> (average)	Average: 3.0	Average: 36.6	

^a Not determined. ^b This rate was estimated based on the value for phenol (Razika et al., 2010) and the ratio (~ 12) for phenol/catechol biodegradation rates as determined for *Pseudomonas putida* by Hinteregger et al. (1992) (cf. also Sect. S1 in the Supplement).

opening of the ring cycle by a catechol-dioxygenase – is not induced and, thus, is faster.

3.2 Comparison of biodegradation rates by *Rhodococcus* to literature data for *Pseudomonas* strains

As we previously have shown that *Pseudomonas* is one of the most dominant and active genera in cloud waters (Amato et al., 2019) and that these strains are very active for phenol biodegradation (Lallement et al., 2018b, and references therein), we compare in the following biodegradation rates of *Pseudomonas* from the literature (Table 2) to the data for *Rhodococcus* derived in the current study (Sect. 4). These rates differ among *Pseudomonas* strains: for *Pseudomonas putida* EKII a value of 0.199×10^{-16} mol per cell per hour was found (Hinteregger et al., 1992), while it was 5.89×10^{-16} mol per cell per hour for *Pseudomonas aeruginosa* (Razika et al., 2010). These values are both on the same order of magnitude as the one measured here for *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28. Finally, we used an average value (3.044×10^{-16} mol per cell per hour) for *Pseudomonas* strains to derive the rates used in the model (Sect. S3.2).

As in the case of phenol, we also calculated catechol biodegradation rates with *Pseudomonas* strains based on lit-

erature data (Table 2). Values are only available for *Pseudomonas putida* EKII (Hinteregger et al., 1992) and show a biodegradation rate that is 12 times higher compared to that of phenol biodegradation. This confirms that catechol dioxygenases are much more active than phenol hydroxylases, as observed for *Rhodococcus enclensis*. Similarly to phenol, catechol biodegradation rates for *Pseudomonas* are within the same order of magnitude as those for *Rhodococcus*. The same ratio (~ 12) as for the *Pseudomonas putida* was applied to estimate the biodegradation rate of catechol by *Pseudomonas aeruginosa*, for which only the rate for phenol was experimentally determined by Razika et al. (2010).

3.3 Model results

Model results are expressed as the relative contributions of each loss pathway in the gas and aqueous phases; they are summarized in Table S4. Both during day and night, the gas-phase reactions of $\cdot\text{OH}$ and NO_3^{\cdot} dominate the loss of phenol by $> 99\%$ (light red and blue bars in Fig. 4a and b, respectively). The contributions of *Pseudomonas* to the phenol loss are approximately a factor of 3 higher than those of *Rhodococcus*, in accordance with their higher cell concentration and comparable microbial activity (Table S3). However, during day time, the contribution of bacteria to the total loss

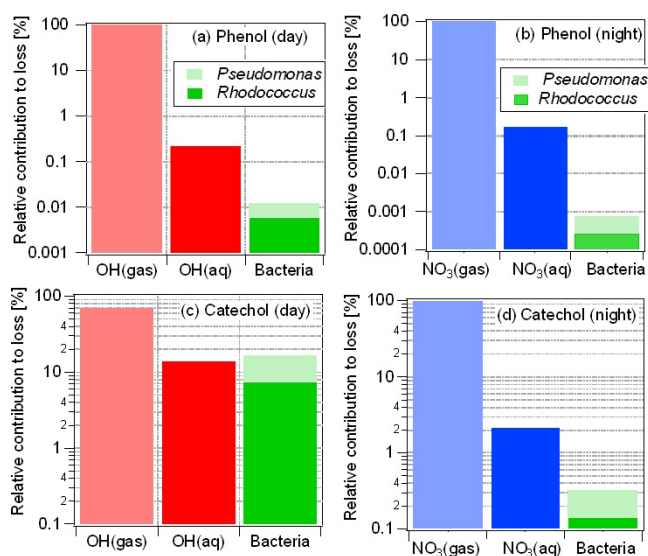


Figure 4. Relative contributions of multiphase processes to total loss of phenol (**a, b**) and catechol (**c, d**) during day (**a, c**) and night (**b, d**) time. Loss by bacteria processes only occurs in the aqueous phase. Note that the ordinate is shown as a logarithmic scale which might falsely lead to the impression of larger contributions of *Rhodococcus* compared to *Pseudomonas*.

in the aqueous phase is about 1 order of magnitude smaller than that of the chemical ($\cdot\text{OH}(\text{aq})$) reactions; during night time, this difference is even larger and the $\text{NO}_3^*(\text{aq})$ reactions dominate by far (factor > 100) the loss in the aqueous phase (Fig. 4b).

While the microbial activity is the same during day and night time (i.e., there were no significant differences in experiments with and without light, respectively; Fig. 2), the night-time $\text{NO}_3^*(\text{aq})$ concentration is about 10 times higher ($\sim 10^{-14}$ M) than that of $\cdot\text{OH}(\text{aq})$ ($\sim 10^{-15}$ M) during the day, and the chemical rate constants also differ by a factor of 4 ($k_{\text{OH},\text{phenol}} = 1.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_{\text{NO}_3^*,\text{phenol}} = 8.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Table S1). These differences in radical concentrations and rate constants lead to much higher radical reaction rates during night than during the day and, thus, to a relatively lower importance of microbial activity during night time. Overall, the loss in the aqueous phase by both chemical and microbial processes contributes $\sim 0.1\%$ to the total loss of phenol during night time.

The catechol fraction dissolved in the aqueous phase is much greater ($\geq 85\%$) as its Henry's law constant is about 1000 times larger than that of phenol (Table S1), of which only $\sim 2\%$ partitions to the aqueous phase. Its enhanced solubility leads to a more important role of aqueous-phase processes. During day time, the loss by aqueous-phase processes (chemical and microbial) is $> 30\%$ for catechol (Fig. 4c), with contributions by $\cdot\text{OH}(\text{aq})$, *Pseudomonas* and *Rhodococcus* of 14%, 10% and 7%, respectively, when $\cdot\text{OH}$ as the only oxidant for the phenols in the aqueous phase is

considered. Thus, for this case, the total microbial activity in the aqueous phase exceeds that of the chemical reactions (Fig. 4c) and contributes up to 17% to the total loss of catechol in the multiphase system. The relatively higher gas-phase rate constants and NO_3^* concentrations as compared to the corresponding values for $\cdot\text{OH}$ during day time are reflected in the much higher contributions by the gas-phase reactions to catechol loss during night ($> 97\%$) than during day time (Fig. 4d).

The model results in Fig. 4 imply that the only chemical loss reactions of phenol and catechol are the reactions with the $\cdot\text{OH}$ and NO_3^* radicals. In agreement with findings from a recent multiphase modeling study that discussed possible contributions of aqueous-phase reactions with additional oxidants (O_3 and $\text{HO}_2^*/\text{O}_2^{*-}$) (Hoffmann et al., 2018), we show that including these reactions might add significant sinks for catechol (Sect. S4). However, we caution that these results of the model sensitivity study including the ozone and $\text{HO}_2^*/\text{O}_2^{*-}$ reactions likely represent an upper estimate. The rate constant used in the model was determined at $\text{pH} = 1.5$. In the original study, a decreasing trend with increasing pH was suggested; however, the exact pH dependence was not given. Thus, the prediction shown in Fig. S3 might not correspond to the moderate pH values as encountered in clouds and thus might be an overestimate of the role of the ozone reaction.

4 Atmospheric implications

Both experimental and modeling approaches show that, in the water phase of clouds, phenol and catechol degradation by microbial and chemical $\cdot\text{OH}(\text{aq})$ processes may be within 1 order of magnitude. When the complete multiphase system is taken into account, phenol chemical transformation is largely dominant in the gas phase, whereas the more water-soluble catechol is efficiently biodegraded in the aqueous phase.

Our estimates are only based on a limited number of cloud microorganisms (*Pseudomonas* and *Rhodococcus*). These microorganisms represent strains which are very efficient, and previous works showed that these genera are active in clouds (Amato et al., 2017; Lallement et al., 2018b). However, they only comprise a fraction of the total microfora, i.e., about 22% of all prokaryotes in clouds. Even if other bacterial genera are less metabolically active, their combined metabolic activity might contribute substantially to the total biodegradation of phenols (and likely other water-soluble organics) in clouds. In addition, other microorganisms could be active as well, such as fungi and yeasts. The relative importance of radical chemistry compared to biodegradation will also depend on the radical concentrations in both phases which, in turn, are a function of numerous factors such as air mass characteristics, pollution levels that affect OH concentrations and of microphysical cloud properties (e.g.,

drop diameters, liquid water content) (Ervens et al., 2014). In general, the importance of aqueous-phase processes increases with increasing solubility (Henry's law constants). Our recent FT-ICR-MS analyses of cloud water samples have shown that about 50 % of ~ 2100 identified compounds were utilized by cloud microorganisms (Bianco et al., 2019). Thus, microbial processes in cloud water may represent efficient sinks for numerous organics and might even result in products different from those of chemical reactions (Husárová et al., 2011). Thus, atmospheric models may be incomplete in describing the loss of some organic compounds and should be complemented by microbial processes in order to give a complete representation of the atmospheric multiphase system. While it has been recognized for a long time that microbial remediation in the environment is a common process (Kumar et al., 2011; Watanabe, 2001), we suggest that the atmosphere represents an additional medium for such processes.

5 Summary and conclusions

The newly derived biodegradation data for *Rhodococcus* with phenol and catechol were implemented in a multiphase box model, together with additional literature data for *Pseudomonas* degradation of the two aromatics and their chemical radical processes in the gas and aqueous phases. Model results reveal that for the chosen model conditions ($[\cdot\text{OH}]_{\text{gas}} = 5 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$; $[\text{NO}_3^*]_{\text{gas}} = 5 \times 10^8 \text{ cm}^{-3}$; $[\cdot\text{OH}]_{\text{aq}} \sim 10^{-15} \text{ M}$; $[\text{NO}_3^*]_{\text{aq}} \sim 10^{-14} \text{ M}$; $[\text{Bacteria cell}] = 1.7 \times 10^7 \text{ cell mL}^{-1}$) the chemical and microbial activities in the aqueous phase are comparable. However, for catechol the loss processes in the aqueous phase are relatively more important (~ 30 % of total loss) than for phenol (0.1 % of total loss) due to its much greater water solubility ($K_{\text{H,Phenol}} = 647 \text{ M atm}^{-1}$; $K_{\text{H,catechol}} = 8.3 \times 10^5 \text{ M atm}^{-1}$). It can be concluded that under some atmospheric conditions, the loss of highly soluble organics may be underestimated by chemical reactions only as the biodegradation of these organics by bacteria (and possibly other microorganisms) could represent additional sinks resulting in different products. Our model approach is highly simplified and limited in terms of biological, chemical and cloud microphysical conditions. More comprehensive experimental and model studies are needed to explore parameter spaces for relevant cloud water constituents (highly water soluble, relatively low chemical reactivity) in order to better quantify the role of bacteria and other microorganisms in clouds as active entities that take part in the conversion of organics in the atmospheric multiphase system.

Data availability. All experimental and additional model data can be obtained from the authors upon request.

Supplement. The supplement related to this article is available online at: <https://doi.org/10.5194/acp-20-4987-2020-supplement>.

Author contributions. AMD and GM designed the experiments in microcosms. SJ, AL, MS and ML performed the experiments. BE performed the model simulations. BE and AMD wrote the manuscript.

Competing interests. The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial support. This research has been supported by a school grant to the first author from the Walid Joumblatt Foundation for University Studies (WJF), Beirut, Lebanon, and the French National Research Agency (ANR) (grant nos. ANR-17-MPGA-0013 and ANR-13-BS06-004-01).

Review statement. This paper was edited by Ryan Sullivan and reviewed by two anonymous referees.

References

- Al-Khalid, T. and El-Naas, M. H.: Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 42, 1631–1690, <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.569872>, 2012.
- Amato, P., Joly, M., Besaury, L., Oudart, A., Taib, N., Moné, A. I., Deguillaume, L., Delort, A., and Debross, D.: Active microorganisms thrive among extremely diverse communities in cloud water, PLOS One, 12, e0182869, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182869>, 2017.
- Amato, P., Besaury, L., Joly, M., Penaud, B., Deguillaume, L., and Delort, A.-M.: Metatranscriptomic exploration of microbial functioning in clouds, Sci. Rep., 9, 4383, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41032-4>, 2019.
- Arakaki, T., Anastasio, C., Kuroki, Y., Nakajima, H., Okada, K., Kotani, Y., Handa, D., Azechi, S., Kimura, T., Tsuchi, A., and Miyagi, Y.: A general scavenging rate constant for reaction of hydroxyl radical with organic carbon in atmospheric waters, Environ. Sci. Technol., 47, 8196–8203, <https://doi.org/10.1021/es401927b>, 2013.
- Ariya, P. A., Nepotchatykh, O., Ignatova, O., and Amyot, M.: Microbiological degradation of atmospheric organic compounds, Geophys. Res. Lett., 29, 2077, <https://doi.org/10.1029/2002GL015637>, 2002.
- Bahadur, R., Uplinger, T., Russell, L. M., Sive, B. C., Cliff, S. S., Millet, D. B., Goldstein, A., and Bates, T. S.: Phenol Groups in Northeastern U.S. Submicrometer Aerosol Particles Produced

- from Seawater Sources, *Environ. Sci. Technol.*, 44, 2542–2548, <https://doi.org/10.1021/es9032277>, 2010.
- Beales, N.: Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review, *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 3, 1–20, <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>, 2004.
- Bianco, A., Deguillaume, L., Chaumerliac, N., Vaïtilingom, M., Wang, M., Delort, A.-M., and Bridoux, M. C.: Effect of endogenous microbiota on the molecular composition of cloud water: a study by Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS), *Sci. Rep.*, 9, 7663, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44149-8>, 2019.
- Bolzacchini, E., Bruschi, M., Hjorth, J., Meinardi, S., Orlandi, M., Rindone, B., and Rosenbohm, E.: Gas-Phase Reaction of Phenol with NO₃, *Environ. Sci. Technol.*, 35, 1791–1797, <https://doi.org/10.1021/es001290m>, 2001.
- Brigante, M. and Mailhot, G.: Chapter 9: Phototransformation of Organic Compounds Induced by Iron Species, in: *Surface Water Photochemistry*, edited by: Calza, P. and Vione, D., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 167–195, 2015.
- Chow, K. S., Huang, X. H. H., and Yu, J. Z.: Quantification of nitroaromatic compounds in atmospheric fine particulate matter in Hong Kong over 3 years: field measurement evidence for secondary formation derived from biomass burning emissions, *Environ. Chem.*, 13, 665–673, 2016.
- Deguillaume, L., Charbouillot, T., Joly, M., Vaïtilingom, M., Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Delort, A.-M., Vinatier, V., Flossmann, A., Chaumerliac, N., Pichon, J. M., Houdier, S., Laj, P., Sellegri, K., Colomb, A., Brigante, M., and Mailhot, G.: Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) based on 10 yr of monitoring of their physicochemical properties, *Atmos. Chem. Phys.*, 14, 1485–1506, <https://doi.org/10.5194/acp-14-1485-2014>, 2014.
- Delhomme, O., Morville, S., and Millet, M.: Seasonal and diurnal variations of atmospheric concentrations of phenols and nitrophenols measured in the Strasbourg area, France, *Atmos. Pollut. Res.*, 1, 16–22, <https://doi.org/10.5094/APR.2010.003>, 2010.
- Delort, A.-M., Vaïtilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Parazols, M., Mailhot, G., Laj, P., and Deguillaume, L.: A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes, *Atmos. Res.*, 98, 249–260, <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2010.07.004>, 2010.
- Ervens, B., George, C., Williams, J. E., Buxton, G. V., Salmon, G. A., Bydder, M., Wilkinson, F., Dentener, F., Mirabel, P., Wolke, R., and Herrmann, H.: CAPRAM2.4 (MODAC mechanism): An extended and condensed tropospheric aqueous phase mechanism and its application, *J. Geophys. Res.*, 108, 4426, <https://doi.org/10.1029/2002JD002202>, 2003.
- Ervens, B., Sorooshian, A., Lim, Y. B., and Turpin, B. J.: Key parameters controlling OH-initiated formation of secondary organic aerosol in the aqueous phase (aqSOA), *J. Geophys. Res.-Atmos.*, 119, 3997–4016, <https://doi.org/10.1002/2013JD021021>, 2014.
- Fankhauser, A. M., Antonio, D. D., Krell, A., Alston, S. J., Banta, S., and McNeill, V. F.: Constraining the Impact of Bacteria on the Aqueous Atmospheric Chemistry of Small Organic Compounds, *ACS Earth Space Chem.*, 3, 1485–1491, <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.9b00054>, 2019.
- Guan, N. and Liu, L.: Microbial response to acid stress: mechanisms and applications, *Appl. Microbiol. Biot.*, 104, 51–65, <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10226-1>, 2020.
- Gurol, M. D. and Nekouinaini, S.: Kinetic behavior of ozone in aqueous solutions of substituted phenols, *Ind. Eng. Chem. Fund.*, 23, 54–60, <https://doi.org/10.1021/i100013a011>, 1984.
- Harrison, M. A. J., Barra, S., Borghesi, D., Vione, D., Arsene, C., and Olariu, R. I.: Nitrated phenols in the atmosphere: A review, *Atmos. Environ.*, 39, 231–248, 2005.
- Herrmann, H., Ervens, B., Jacobi, H.-W., Wolke, R., Nowacki, P., and Zellner, R.: CAPRAM2.3: A Chemical Aqueous Phase Radical Mechanism for Tropospheric Chemistry, *J. Atmos. Chem.*, 36, 231–284, 2000.
- Hinteregger, C., Leitner, R., Loidl, M., Ferschl, A., and Streichsbier, F.: Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII, *Appl. Microbiol. Biot.*, 37, 252–259, <https://doi.org/10.1007/BF00178180>, 1992.
- Hoffmann, E. H., Tilgner, A., Wolke, R., Böge, O., Walter, A., and Herrmann, H.: Oxidation of substituted aromatic hydrocarbons in the tropospheric aqueous phase: kinetic mechanism development and modelling, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20, 10960–10977, <https://doi.org/10.1039/C7CP08576A>, 2018.
- Hsieh, C.-C., Chang, K.-H., and Kao, Y.-S.: Estimating the ozone formation potential of volatile aromatic compounds in vehicle tunnels, *Chemosphere*, 39, 1433–1444, [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00045-4), 1999.
- Husárová, S., Vaïtilingom, M., Deguillaume, L., Traikia, M., Vinatier, V., Sancelme, M., Amato, P., Matulová, M., and Delort, A.-M.: Biotransformation of methanol and formaldehyde by bacteria isolated from clouds. Comparison with radical chemistry, *Atmos. Environ.*, 45, 6093–6102, <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.06.035>, 2011.
- Kumar, A., Bisht, B. S., Joshi, V. D., and Dhewa, T.: Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool, *Int. J. Environ. Sci.*, 1, 1079–1093, 2011.
- Lallement, A., Besaury, L., Eyheraguibel, B., Amato, P., Sancelme, M., Mailhot, G., and Delort, A. M.: Draft Genome Sequence of *Rhodococcus enclensis* 23b-28, a Model Strain Isolated from Cloud Water, *Genome Announc.*, 5, e01199-17, <https://doi.org/10.1128/genomeA.01199-17>, 2017.
- Lallement, A., Vinatier, V., Brigante, M., Deguillaume, L., Delort, A. M., and Mailhot, G.: First evaluation of the effect of microorganisms on steady state hydroxyl radical concentrations in atmospheric waters, *Chemosphere*, 212, 715–722, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.128>, 2018a.
- Lallement, A., Besaury, L., Tixier, E., Sancelme, M., Amato, P., Vinatier, V., Canet, I., Polyakova, O. V., Artaev, V. B., Lebedev, A. T., Deguillaume, L., Mailhot, G., and Delort, A.-M.: Potential for phenol biodegradation in cloud waters, *Biogeosciences*, 15, 5733–5744, <https://doi.org/10.5194/bg-15-5733-2018>, 2018b.
- Lebedev, A. T., Polyakova, O. V., Mazur, D. M., Artaev, V. B., Canet, I., Lallement, A., Vaïtilingom, M., Deguillaume, L., and Delort, A.-M.: Detection of semi-volatile compounds in cloud waters by GC×GC-TOF-MS. Evidence of phenols and phthalates as priority pollutants, *Environ. Pollut.*, 241, 616–625, <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.089>, 2018.
- Levsen, K., Behnert, S., Mußmann, P., Raabe, M., and Prieß, B.: Organic Compounds In Cloud And Rain Water, *Int. J. Environ. An.*

- Ch., 52, 87–97, <https://doi.org/10.1080/03067319308042851>, 1993.
- Li, J., Mailhot, G., Wu, F., and Deng, N.: Photochemical efficiency of Fe(III)-EDDS complex: OH radical production and 17 β -estradiol degradation, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 212, 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.03.001>, 2010.
- Lüttke, J. and Levsen, K.: Phase partitioning of phenol and nitrophenols in clouds, *Atmos. Environ.*, 31, 2649–2655, [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(96\)00228-2](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(96)00228-2), 1997.
- Lüttke, J., Scheer, V., Levsen, K., Wünsch, G., Neil Cape, J., Hargreaves, K. J., Storeton-West, R. L., Acker, K., Wieprecht, W., and Jones, B.: Occurrence and formation of nitrated phenols in and out of cloud, *Atmos. Environ.*, 31, 2637–2648, [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(96\)00229-4](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(96)00229-4), 1997.
- Ng, N. L., Kroll, J. H., Chan, A. W. H., Chhabra, P. S., Flagan, R. C., and Seinfeld, J. H.: Secondary organic aerosol formation from *m*-xylene, toluene, and benzene, *Atmos. Chem. Phys.*, 7, 3909–3922, <https://doi.org/10.5194/acp-7-3909-2007>, 2007.
- Pillar, E. A., Camm, R. C., and Guzman, M. I.: Catechol Oxidation by Ozone and Hydroxyl Radicals at the Air–Water Interface, *Environ. Sci. Technol.*, 48(24), 14352–14360, <https://doi.org/10.1021/es504094x>, 2014.
- Razika, B., Abbes, C., Messaoud, C., and Soufi, K.: Phenol and Benzoic Acid Degradation by *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Water Resour. Prot.*, 2, 788–791, 2010.
- Reasoner, D. J. and Geldreich, E. E.: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Appl. Environ. Microb.*, 49, 1–7, 1985.
- Schwartz, S.: Mass transport considerations pertinent to aqueous phase reactions of gases in liquid water clouds, in: *Chemistry of Multiphase Atmospheric Systems*, vol. 6, edited by: Jaeschke, W., Springer, Berlin, Germany, 415–471, 1986.
- Straube, G.: Phenol hydroxylase from *Rhodococcus* sp. P 1, *J. Basic Microbiol.*, 27, 229–232, <https://doi.org/10.1002/jobm.3620270415>, 1987.
- TOXNET Toxicology Data Network: TOXNET, Toxicol. Data Netw, available at: <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm>, last access: 6 November 2019.
- Väitilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Laj, P., Leriche, M., and Delort, A.-M.: Contribution of Microbial Activity to Carbon Chemistry in Clouds, *Appl. Environ. Microb.*, 76, 23–29, <https://doi.org/10.1128/AEM.01127-09>, 2010.
- Väitilingom, M., Charbouillot, T., Deguillaume, L., Maisonobe, R., Parazols, M., Amato, P., Sancelme, M., and Delort, A.-M.: Atmospheric chemistry of carboxylic acids: microbial implication versus photochemistry, *Atmos. Chem. Phys.*, 11, 8721–8733, <https://doi.org/10.5194/acp-11-8721-2011>, 2011.
- Väitilingom, M., Attard, E., Gaiani, N., Sancelme, M., Deguillaume, L., Flossmann, A. I., Amato, P., and Delort, A.-M.: Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France), *Atmos. Environ.*, 56, 88–100, <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.03.072>, 2012.
- Väitilingom, M., Deguillaume, L., Vinatier, V., Sancelme, M., Amato, P., Chaumerliac, N., and Delort, A.-M.: Potential impact of microbial activity on the oxidant capacity and organic carbon budget in clouds, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 559–564, <https://doi.org/10.1073/pnas.1205743110>, 2013.
- Vinatier, V., Wirgot, N., Joly, M., Sancelme, M., Abrantes, M., Deguillaume, L., and Delort, A.-M.: Siderophores in Cloud Waters and Potential Impact on Atmospheric Chemistry: Production by Microorganisms Isolated at the Puy de Dôme Station, *Environ. Sci. Technol.*, 50, 9315–9323, <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02335>, 2016.
- Vione, D., Maurino, V., Minero, C., Vincenti, M., and Pelizzetti, E.: Aromatic photolysis in homogeneous and heterogeneous aqueous systems, *Environ. Sci. Pollut. R.*, 10, 321–324, <https://doi.org/10.1065/espr2001.12.104.1>, 2003.
- Watanabe, K.: Microorganisms relevant to bioremediation, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 237–241, [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00205-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00205-6), 2001.
- Wirgot, N., Vinatier, V., Deguillaume, L., Sancelme, M., and Delort, A.-M.: H₂O₂ modulates the energetic metabolism of the cloud microbiome, *Atmos. Chem. Phys.*, 17, 14841–14851, <https://doi.org/10.5194/acp-17-14841-2017>, 2017.
- Xie, M., Chen, X., Hays, M. D., Lewandowski, M., Offenberg, J., Kleindienst, T. E., and Holder, A. L.: Light Absorption of Secondary Organic Aerosol: Composition and Contribution of Nitroaromatic Compounds, *Environ. Sci. Technol.*, 51, 11607–11616, <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03263>, 2017.
- Xu, C. and Wang, L.: Atmospheric Oxidation Mechanism of Phenol Initiated by OH Radical, *J. Phys. Chem. A*, 117, 2358–2364, <https://doi.org/10.1021/jp308856b>, 2013.
- Yu, L., Smith, J., Laskin, A., Anastasio, C., Laskin, J., and Zhang, Q.: Chemical characterization of SOA formed from aqueous-phase reactions of phenols with the triplet excited state of carbonyl and hydroxyl radical, *Atmos. Chem. Phys.*, 14, 13801–13816, <https://doi.org/10.5194/acp-14-13801-2014>, 2014.
- Yuan, B., Liggio, J., Wentzell, J., Li, S.-M., Stark, H., Roberts, J. M., Gilman, J., Lerner, B., Warneke, C., Li, R., Leithead, A., Osthoff, H. D., Wild, R., Brown, S. S., and de Gouw, J. A.: Secondary formation of nitrated phenols: insights from observations during the Uintah Basin Winter Ozone Study (UBWOS) 2014, *Atmos. Chem. Phys.*, 16, 2139–2153, <https://doi.org/10.5194/acp-16-2139-2016>, 2016.

Supplement of Atmos. Chem. Phys., 20, 4987–4997, 2020
<https://doi.org/10.5194/acp-20-4987-2020-supplement>
© Author(s) 2020. This work is distributed under
the Creative Commons Attribution 4.0 License.



Supplement of

Biodegradation of phenol and catechol in cloud water: comparison to chemical oxidation in the atmospheric multiphase system

Saly Jaber et al.

Correspondence to: Anne-Marie Delort (a-marie.delort@uca.fr) and Barbara Ervens (barbara.ervens@uca.fr)

The copyright of individual parts of the supplement might differ from the CC BY 4.0 License.

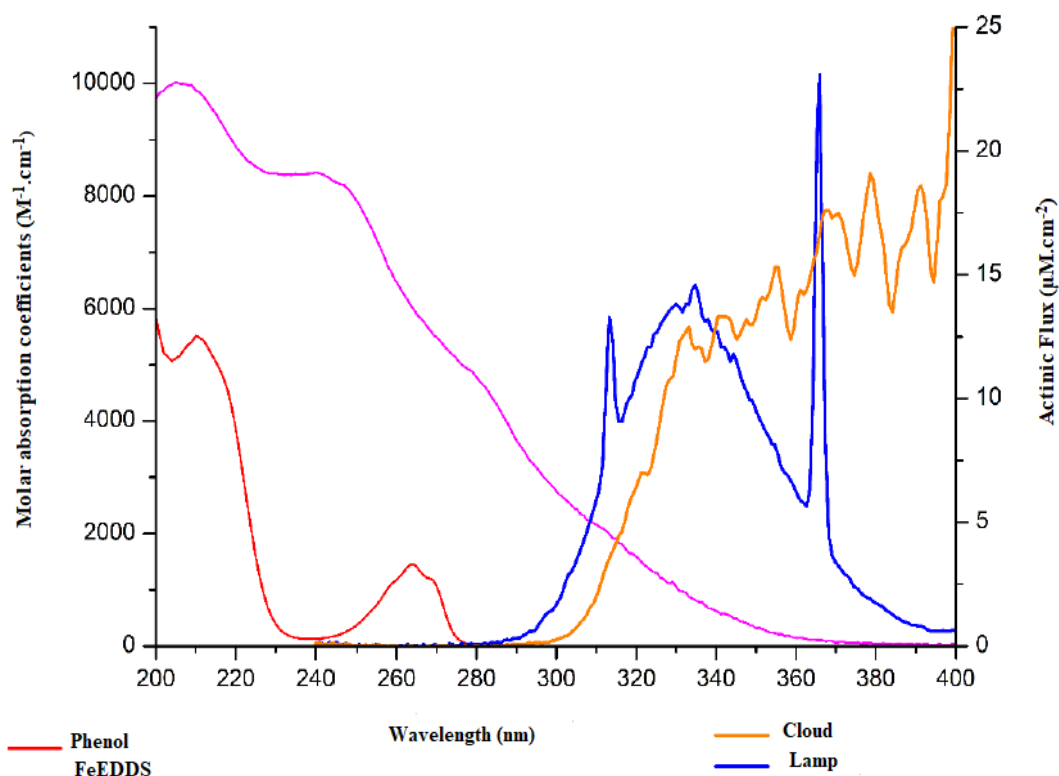


Figure S1 : Comparison of the actinic fluxes of the lamps used and the emission of the solar spectrum measured in-cloud at the puy de Dôme station. The blue line represents the actinic flux of the lamp; the brown line corresponds to the actinic flux of the solar emission spectrum in cloud. The pink line represents the molar absorption coefficient of the Fe-EDDS complex. The red line represents the molar absorption coefficient of phenol.

Section S1 Calculation of the biodegradation rates for the *Pseudomonas* strains

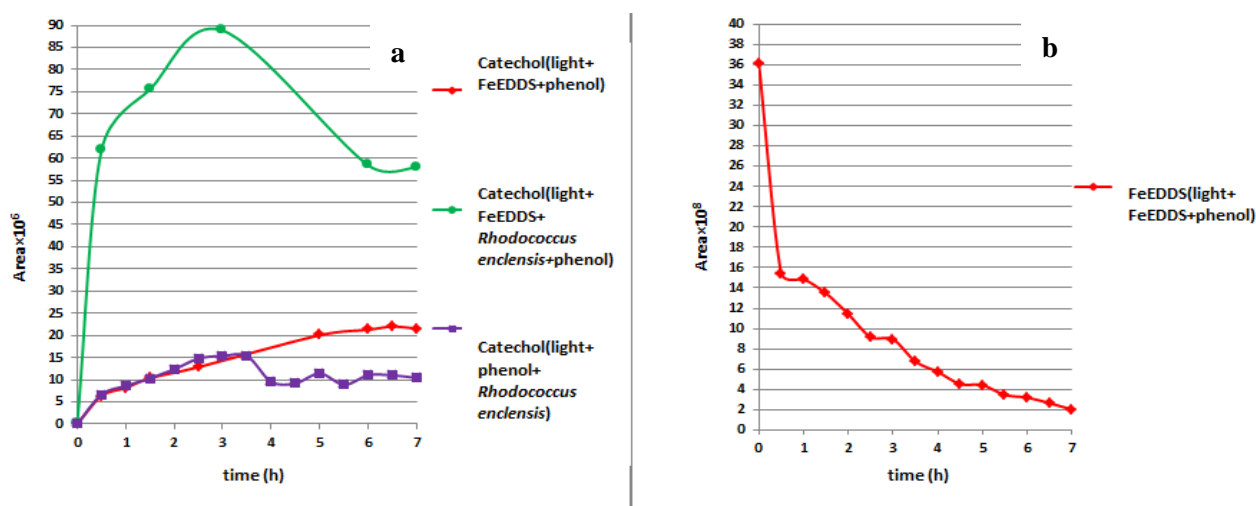


Figure S2 : a) time dependence of the integral of catechol signal ($m/z = 110.03678$) detected in mass spectra of incubations with Fe(EDDS)+light and Phenol (red), Fe(EDDS)+ light, Phenol and *R. enclensis* (green), light + Phenol and *R. enclensis* without Fe(EDDS)(violet). b) Time dependence of the integral of Fe(EDDS) signal ($m/z = 346.0086$) detected in the mass spectrum, recorded during the incubation with Fe(EDDS)+light and Phenol.

SI.1 *Pseudomonas putida* EKII

To calculate the biodegradation rate of phenol and catechol by *Pseudomonas putida* EKII, based on experiments performed at pH = 7.0, we used the following data from Hinteregger et al. (1992):

Phenol: Biodegradation of 654 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$, number of cells: $3.3 \cdot 10^9 \text{ cell L}^{-1}$

5 **Biodegradation rate of phenol: $1.98 \cdot 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$**

Catechol: Biodegradation rate of catechol is twelve times higher than of phenol (ratio = $2.4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} / 0.2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, expressed per mg of cells)

Biodegradation of catechol: $1.98 \cdot 10^{-17} \cdot 12 = 23.78 \cdot 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$

10

SI.2 *Pseudomonas aeruginosa*

To calculate the biodegradation rate of phenol and catechol by *Pseudomonas aeruginosa*, based on experiments performed at pH=7.0, we used the following data from Razika et al. (2010):

Phenol: Biodegradation of 10 mg L^{-1} during 96 hours, number concentration of cells: $4.7 \cdot 10^9 \text{ cell L}^{-1}$

15 **Biodegradation rate of phenol: $23.49 \cdot 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$**

Biodegradation of 50 mg L^{-1} during 120 hours, number concentration of cells: $4.7 \cdot 10^9 \text{ cell L}^{-1}$

Biodegradation rate of phenol: $94.31 \cdot 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Biodegradation rate of phenol (average value) taken into account: $58.9 \cdot 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$

20 **Catechol:** No information is available in Razika et al (2010), so we multiplied the biodegradation rates of phenol with a factor of twelve as it is within the same order of magnitude of what we found in our study (Factor ~ 10)

Biodegradation rate of catechol (average value): $58.9 \cdot 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1} \cdot 12 = 706.8 \cdot 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1}$.

25

Section S2: Calculation of photolysis rate $j(\text{Fe(EDDS)})$ and resulting $\bullet\text{OH}$ concentration in the experiments

$$j = \int_{250}^{400} I_{0,\lambda} \cdot \varepsilon_{\lambda} \cdot \phi_{\lambda} \cdot d\lambda \frac{\text{photons}}{\text{cm}^2 \text{ s nm molec cm}} \frac{\text{cm}^3}{\text{molec cm}} \frac{\text{nm}}{\text{cm}} \quad [\text{s}^{-1}]$$

30 $I_{0,\lambda}$ = spectral actinic flux [photons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1} \text{nm}^{-1}$]

ε_{λ} = extinction coefficient [$\text{cm}^3 \text{molec}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

ϕ_{λ} = Quantum yield [dimension less]

Experimental data

Irradiance $E(\lambda)$ [$\mu\text{W cm}^{-2}$]; convert into SI units $E'[\text{W/m}^2] = E \cdot 10^{-6} \text{ W}/\mu\text{W} \cdot 10^4 \text{ cm}^2/\text{m}^2 = E \cdot 0.01$

35 Convert irradiance $E(\lambda)$ [$\mu\text{W cm}^{-2}$] to actinic flux I [photons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$]:

$$\text{Actinic flux} \quad I' = \frac{E' \lambda}{h \cdot c} \left[\frac{\text{W m}}{\text{m}^2} \frac{\text{s}}{\text{J s m}} \right] = \frac{E' \lambda}{h \cdot c} \left[\frac{\text{kg m}^2 \text{m}}{\text{s}^3 \text{m}^2} \frac{\text{s}^2}{\text{kg m}^2 \text{s m}} \right] = \frac{\text{photons}}{\text{m}^2 \text{ s}}$$

$$\text{Spectral actinic flux} \quad I_{\lambda} = \frac{I'}{\lambda} \cdot 10^{-4} = \frac{E(\lambda)}{h \cdot c} \left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2} \frac{\text{s}}{\text{J s m}} \right] = \frac{E \lambda}{h \cdot c} \left[\frac{\text{kg m}^2 \text{m}}{\text{s}^3 \text{m}^2} \frac{\text{s}^2}{\text{kg m}^2 \text{s m}} \right] = \frac{\text{photons}}{\text{cm}^2 \text{ s nm}}$$

$$h = 6.62606 \times 10^{-34} \text{ J s}$$

$$c = 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$$

40 ε' molar absorption coefficient ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) = extinction coefficient

$$\varepsilon_{\lambda} = \varepsilon' \frac{\text{L}}{\text{mol cm}} \cdot \frac{1000 \text{ cm}^3}{\text{L}} \cdot \frac{\text{mol}}{6.022 \times 10^{23} \text{ molec}} = \varepsilon' \cdot 1000/N_A [\text{cm}^3 \text{molec}^{-1} \text{cm}^{-1}]$$

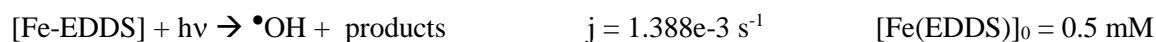
Quantum yield: $\phi_{\lambda} = 0.025$ (at $290 < \lambda < 400 \text{ nm}$)

$$j = \int_{250}^{400} I_{\lambda} \cdot \varepsilon_{\lambda} \cdot \phi_{\lambda} \cdot d\lambda \frac{\text{photons}}{\text{cm}^2 \text{ s nm molec cm}} \frac{\text{cm}^3}{\text{molec cm}} \frac{\text{nm}}{\text{cm}} = \mathbf{0.001388 \text{ s}^{-1}}$$

45

Calculation of steady-state $\bullet\text{OH}(\text{aq})$ concentration

$\bullet\text{OH}$ formation:



$$-\frac{d[\text{Fe(EDDS)}]}{dt} = \frac{d[\bullet\text{OH}]}{dt} = j [\text{Fe(EDDS)}]$$

50 $\bullet\text{OH}$ loss



$$\frac{d[\bullet\text{OH}]}{dt} = -k [\bullet\text{OH}][\text{Phenol}]$$

→ Steady-state OH concentration at the beginning of experiment

$$k [\bullet\text{OH}][\text{Phenol}] = j [\text{Fe(EDDS)}]$$

$$55 \quad [\text{OH}] = \frac{j [\text{Fe(EDDS)}]}{k [\text{Phenol}]} = \frac{1.388 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot 5 \times 10^{-4} \text{ M}}{8.41 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1} \cdot 1 \times 10^{-4} \text{ M}} = 8.3 \times 10^{-13} \text{ M}$$

Section S3: Input data to the multiphase box model

S3.1: Multiphase processes

Table S1: Chemical and microbial processes in the multiphase model

Gas Phase				
	Chemical rate constant [cm ³ s ⁻¹]	Reference		
•OH + Phenol → 0.5 Catechol + 0.5 Prod ^{a)}	2.81 · 10 ⁻¹¹	(Berndt and Böge, 2001)		
NO ₃ • + Phenol → Products	5.8 · 10 ⁻¹²	(Bolzacchini et al., 2001)		
•OH + Catechol → Products	1.1 · 10 ⁻¹⁰	(Olariu et al., 2000)		
NO ₃ • + Catechol → Products	9.8 · 10 ⁻¹¹	(Olariu et al., 2004)		
Aqueous phase				
	Chemical rate constant [M ⁻¹ s ⁻¹]	Reference		
•OH + Phenol → 0.5 Catechol + 0.5 Prod ^{b)}	8.41 · 10 ⁹	(Raghavan and Steenken, 1980)		
NO ₃ • + Phenol → Products	1.9 · 10 ⁹	(Umschlag et al., 2002)		
•OH + Catechol → Products	4.7 · 10 ⁹	(Hoffmann et al., 2018)		
NO ₃ • + Catechol → Products	1.9 · 10 ⁹	(Hoffmann et al., 2018)		
•OH + WSOC → Products	2 · 10 ⁶ s ⁻¹	Based on (Arakaki et al., 2013), assuming [WSOC] = 5 mM		
NO ₃ • → Products	10 ⁵ s ⁻¹	Based on (Exner et al., 1992; Zellner and Herrmann, 1994); assuming 1 mM Cl ⁻ , 0.01 mM Br ⁻		
The following three reactions are only considered in sensitivity simulations, Figure S-4				
O ₃ + Phenol → Products	1300	(Hoigné and Bader, 1983)		
O ₃ + Catechol → Products	3.1 · 10 ⁵	(Gurol and Nekouinaini, 1984)		
HO ₂ •/O ₂ • + Catechol → Products	7.8 · 10 ⁴	Rate constant for HO ₂ /O ₂ • ratio at pH = 4 (pK _a (HO ₂ •) = 4.8) calculated based on k _{HO2} , k _{O2•} by (Bielski et al., 1985)		
		Microbial rate constant [L cell ⁻¹ s ⁻¹]		
<i>Rhodococcus</i> + Phenol → Catechol		1.8 · 10 ⁻¹³	d)	
<i>Rhodococcus</i> + Catechol → Products		1.5 · 10 ⁻¹²	d)	
<i>Pseudomonas</i> + Phenol → Catechol		1 · 10 ⁻¹³	d)	
<i>Pseudomonas</i> + Catechol → Prod		1.2 · 10 ⁻¹²	d)	
Phase transfer processes				
	K _H [M atm ⁻¹]	Reference	α ^{c)}	D _g [cm ² s ⁻¹] ^{e)}
•OH(aq) ↔ •OH(gas)	25	(Kläning et al., 1985)	0.05	0.15
NO ₃ • (aq) ↔ NO ₃ • (gas)	0.6	(Rudich et al., 1996)	0.1	0.1
Phenol(aq) ↔ Phenol(gas)	647	(Feigenbrugel et al., 2004)	0.027	0.09
Catechol(aq) ↔ Catechol(gas)	8.31 · 10 ⁵	(Sander, 2015)	0.1	0.08

^{a)} Catechol yield likely represents an upper estimate for the total of all dihydroxybenzene compounds ^{b)} Initial formation of the phenoxy radical and the subsequent reaction with O₂ are lumped here, leading to 0.5 catechol into one step since the second reaction is diffusion controlled; ^{c)} These values were taken from CAPRAM (Ervens et al., 2003; Hoffmann et al., 2018) ^{d)} See calculation of values in Section S-3.2

5

S3.2 Calculation of microbial rate constants from experimentally derived rates

Experimentally-derived rates R of microbial activity towards phenol and catechol are summarized in Table 2 of the main part of the manuscript, together with the bacteria type (*Rhodococcus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*) and aqueous phase concentrations of substrate (phenol, catechol) and bacteria cells. Strictly, the measured rates might be only valid for the same substrate-to-cell ratio as the substrate availability determines the cell activity. Since these concentrations differ greatly, we derive the first-order rate constant k' [h^{-1}]

$$k' = R [\text{Cell}] / [\text{Substrate}] \quad (\text{Eq-S1})$$

Ambient cell concentrations in cloud water are on the order of $10^6 - 10^8 \text{ cell L}^{-1}$. We assume a total cell concentration of $6.8 \cdot 10^7 \text{ cell L}^{-1}$ of which 3.6% are *Rhodococcus* ($C_{\text{Rh,cloud}} = 2.7 \cdot 10^6 \text{ cell L}^{-1}$) and 19.5% *Pseudomonas* ($C_{\text{Ps,cloud}} = 1.3 \cdot 10^7 \text{ cell L}^{-1}$). Phenol concentrations in cloud water are in the range of 5.5 - 7.7 nM (Lebedev et al., 2018). Using the lower value of this range yields phenol-to-cell ratios in cloud water of $2 \cdot 10^{-15} \text{ mol cell}^{-1}$ and $4.2 \cdot 10^{-16} \text{ mol cell}^{-1}$ for *Rhodococcus* and *Pseudomonas*, respectively, which is within two orders of magnitude of the ratios as used in the experiments. Corresponding cloud water measurements for catechol are not available.

In the multiphase model, we describe the microbial processes analogous to chemical reactions, i.e. with a formal second-order rate constant in units of $\text{L cell}^{-1} \text{ s}^{-1}$ using the constant cell concentrations in the aqueous phase.

$$k_{2\text{nd}} [\text{L cell}^{-1} \text{ s}^{-1}] = k' / [\text{Cell}]_{\text{cloud}} / 3600 \text{ s h}^{-1} \quad (\text{Eq-S2})$$

The resulting $k_{2\text{nd}}$ are then used in the model studies for the assumed (constant) cell concentrations in cloud water.

S3.3 Considerations of potential pH dependence of the chemical and biodegradation rates

It can be expected that none of the rates in Eq-2 shows any significant dependence on cloud relevant pH values due to the following reasoning:

$k_{\text{chem,gas}}$: The gas phase rate constants describe chemical processes in the gas phase and, thus, are independent of any solution properties, such as pH.

$k_{\text{chem,aq}}$: The rate constants of NO_3^\bullet and $^\bullet\text{OH}$ reactions with the phenolic aromatics are not expected to show any pH dependence since the reactions occur via H-abstraction and thus the rate constants are a function of the bond strength of the hydrogen bonds (e.g. discussion in (Herrmann, 2003)). Even though the rate constant of NO_3^\bullet and $^\bullet\text{OH}$ with phenol and catechol have not been investigated as a function of pH, the small variability of rate constants of other alcohols (e.g. NIST solution data base), suggests that our assumption of a pH-independent $k_{\text{chem,aq}}$ is reasonable. Only if the pH value increases to very high pH values, i.e. near the acid dissociation values of phenols ($\text{pK}_a \sim 10$), differences in the reaction mechanisms (e.g. electron transfer) and, thus, in rate constants may be expected.

$k_{\text{bact,aq}}$: We have shown in previous studies that the biodegradation rates for several organics and bacteria strains do not show any systematic dependence on pH within a range of $\sim 5 < \text{pH} < \sim 6.3$ (Väitilingom et al., 2011). This insensitivity to the surrounding solution pH is expected: Unlike chemical reactions, the biodegradation does not occur in the surrounding water phase, but within the bacteria cells which self-regulate their pH values to a range of 6.5-7, even if the surrounding pH varies over wide ranges. Only at very acidic ($\text{pH} < 2$) or very alkaline ($\text{pH} > 10$) solutions, the internally buffered pH value within the cells might be different.

[Radical]: For both radicals, $\bullet\text{OH}$ and $\text{NO}_3\bullet$, the main source in the aqueous phase is the direct uptake from the gas phase, e.g. (Ervens et al., 2003; Tilgner et al., 2013). Since gas phase processes are independent of pH, the radical gas phase concentration is not affected by the solution pH. Other source processes of the $\bullet\text{OH}(\text{aq})$ radical include aqueous phase reactions, such as the direct photolysis of H_2O_2 or Fenton reactions (reactions of iron(II) with hydroperoxides), which also do not show any pH dependence over the range of relevant values ($\sim 2 < \text{pH} < \sim 7$)

[Aromatic]: The concentrations of the aromatics are initial values of the model. Given that [Aromatic] is included in all three terms in Eq-R1, they cancel anyway in the comparison of the three terms for a given simulation.

K_{H} : Henry's laws constants for the radicals or aromatics, respectively, do not show any pH dependence. Admittedly, there are only very few pH dependent measurements available for these and related compounds. Only at very high pH values, i.e. near the pK_a values of the phenols ($\text{pH} \sim 10$), the effective Henry's law constants for the aromatics may be higher than the physical Henry's law constants. As pH value of cloud water is significantly below this threshold, it is safe to neglect this dissociation.

α : The mass accommodation coefficient describes the probability of a molecule to 'stick' on a surface upon collision. There is no physical reason why this process should pH dependent and there is no data that corroborate such a dependency.

D_{g} : Gas phase diffusion is a process that occurs only in the gas phase and thus is independent of any solution properties (including pH).

Table S2: Summary of literature data on microbial activity towards phenol and catechol by *Rhodococcus* and *Pseudomonas*. For the estimates of unknown rates, refer to Section 3.2 (Comparison to literature data) in the main part of the manuscript

Substrate	Bacteria type	R / mol cell ⁻¹ h ⁻¹	[Substrate] / M	[Cell] _{experiment} / (cell L ⁻¹)	Ref	[Substrate]/ [Cell] / mol cell ⁻¹	k' / h ⁻¹	[Cell] _{cloud}	k _{2nd} / L cell ⁻¹ s ⁻¹
Phenol	<i>Rhodococcus</i>	1.76·10 ⁻¹⁶	10 ⁻⁴	10 ⁹	a	10 ⁻¹³	1.76·10 ⁻³	2.7·10 ⁶	1.8·10 ⁻¹³
Catechol	<i>Rhodococcus</i>	1.5·10 ⁻¹⁵	10 ⁻⁴	10 ⁹	b	10 ⁻¹³	1.5·10 ⁻²	2.7·10 ⁶	1.5·10 ⁻¹²
Phenol	<i>Pseudomonas putida</i>	1.99·10 ⁻¹⁷	6.54·10 ⁻⁴	3.3·10 ⁹	c	2·10 ⁻¹³	1·10 ⁻⁴		
Catechol	<i>Pseudomonas putida</i>	2.39·10 ⁻¹⁶			c		2.4·10 ⁻³		
Phenol	<i>Pseudomonas</i>	2.35·10 ⁻¹⁶	1.06·10 ⁻⁴	4.7·10 ⁹	d	2.3·10 ⁻¹⁴	1·10 ⁻²		
	<i>aeruginosa</i>	9.43·10 ⁻¹⁶	5.31·10 ⁻⁴	4.7·10 ⁹		1.1·10 ⁻¹³	8.3·10 ⁻³		
Catechol	<i>Pseudomonas</i>				e		0.11		
	<i>aeruginosa</i>								
Phenol	<i>Pseudomonas</i> (Average)						5·10 ⁻³	1.3·10 ⁷	1·10 ⁻¹³
Catechol	<i>Pseudomonas</i> (Average)							1.3·10 ⁷	1.2·10 ⁻¹²

^{a)} (Lallement et al., 2018), ^{b)} This study, ^{c)} (Hinteregger et al., 1992) ^{d)} (Razika et al., 2010), ^{e)} Scaled up from data for phenol by reference ^{d)} using the same ratio of activities to phenol and catechol (12) as for the average value for *Pseudomonas putida*

Section S4: Model sensitivity study including the aqueous phase reactions of phenol with ozone and of catechol with ozone and HO₂[•]/O₂^{•-}

In a recent model study by (Hoffmann et al., 2018), it was suggested that catechol (and other dihydroxybenzenes) are efficiently oxidized not only by •OH but also by ozone and the hydroperoxy (HO₂[•]/O₂^{•-}) radical. Also the reaction of phenol with ozone was included in this model study. In that latter model study, a rate constant of $k(\text{O}_3 + \text{Catechol}) = 5.2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ was estimated. This rate constant is similar to an experimentally-derived value of $k(\text{O}_3 + \text{Catechol}) = 3.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Gürol and Nekouinaini, 1984). This latter study was performed at very acidic conditions (pH = 1.5) and a strong pH dependence of the rate constant was pointed out leading to a decreasing rate constant with increasing pH and resulting in the predominance of the •OH reaction at atmospherically-relevant pH values (~5).

Since the exact pH dependence is not available, we show in the following model results from a sensitivity studies including the HO₂[•] and O₃ reactions in order to provide an upper estimate of their role in the multiphase system. Initial concentrations of 0.1 ppt HO₂[•] and 40 ppb ozone in the gas phase are assumed and held constant throughout the simulation. In agreement with the model results by Hoffmann et al. (2018), we find large contributions of the ozone reactions in the aqueous phase to the total loss. The relative contributions of the ozone (57 – 68%) and HO₂[•]/O₂^{•-} (16 – 19%) reactions with catechol predicted here are also similar as predicted in the previous model study.

S4.2 Model results

All model results [relative contribution to total loss [%]] are summarized in Table S-3. The upper part of the table contains results for the base simulations as shown in Figure 4 (microbial aqueous phase processes and •OH and NO₃[•] reactions in gas and aqueous phases); the bottom part of the table includes results for the sensitivity simulations that also include HO₂[•](aq) and O₃(aq) reactions (Figure S3).

Table S3: Model results of base case and sensitivity simulations: Relative contributions to total loss of phenol and catechol, respectively

		•OH(g)	NO ₃ [•] (g)	•OH(aq)	NO ₃ [•] (aq)	O ₃ (aq)	HO ₂ [•] (aq)	<i>Rhodococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Base case									
Day	Phenol	99.8	0	0.22	0	-	-	0.01	0.006
	Catechol	69.3	0	14	0	-	-	9.3	7.4
Night	Phenol	0	99.8	0	0.18	-	-	0.0005	0.00027
	Catechol	0	97.5	0	2.2	-	-	0.18	0.14
Sensitivity simulation including aqueous phase reactions of O₃ (phenol, catechol) and HO₂[•]/O₂^{•-} (catechol)									
Day	Phenol	99.7	0	0.22	0	0.02	0	0.01	0.0056
	Catechol	6.1	0	1.2	0	58.9	33	0.81	0.65
Night	Phenol	0	99.8	0	0.18	0.0007	0	0.0005	0.00027
	Catechol	0	86.4	0	2	11.4	0	0.16	0.13

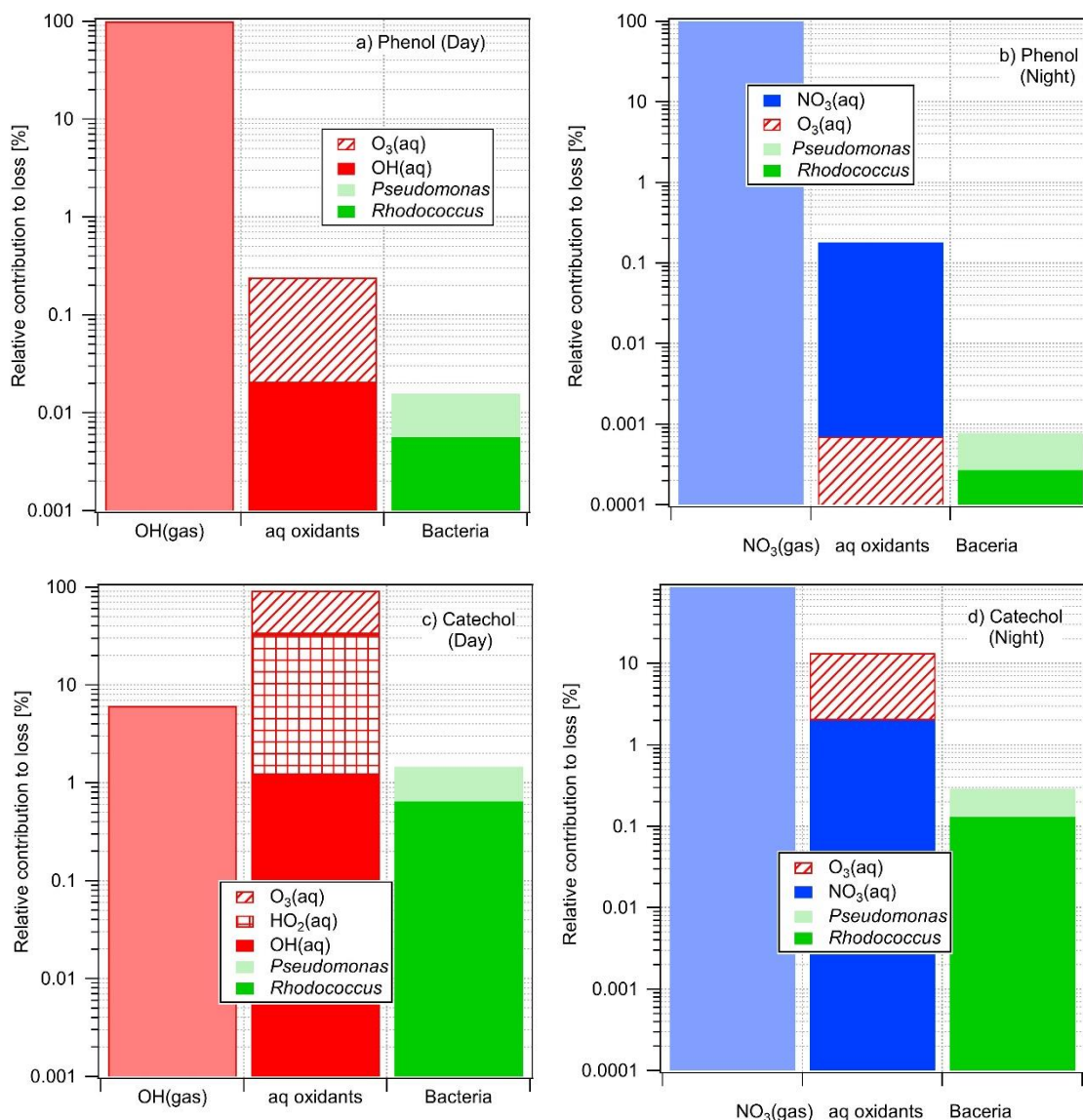


Figure S3 : Relative contributions to total loss of phenol (a, b) and catechol (c, d) in the multiphase system including HO₂[•] and O₃ reactions in the aqueous phase (Table S-3).

References

- Arakaki, T., Anastasio, C., Kuroki, Y., Nakajima, H., Okada, K., Kotani, Y., Handa, D., Azechi, S., Kimura, T., Tshako, A. and Miyagi, Y.: A general scavenging rate constant for reaction of hydroxyl radical with organic carbon in atmospheric waters, *Env. Sci Technol*, 47(15), 8196–8203, doi:10.1021/es401927b, 2013.
- Berndt, T. and Böge, O.: Gas-phase reaction of OH radicals with benzene: products and mechanism, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3(22), 4946–4956, 2001.
- Bielski, B. H. J., Cabell, D. E., Arudi, R. L. and Ross, A., . B.: Reactivity of HO₂/O₂- radicals in aqueous solution, *J Phys Chem Ref Data*, 14(4), 1041–1100, 1985.
- Bolzacchini, E., Bruschi, M., Hjorth, J., Meinardi, S., Orlandi, M., Rindone, B. and Rosenbohm, E.: Gas-Phase Reaction of Phenol with NO₃, *Environ. Sci. Technol.*, 35(9), 1791–1797, doi:10.1021/es001290m, 2001.
- Ervens, B., George, C., Williams, J. E., Buxton, G. V., Salmon, G. A., Bydder, M., Wilkinson, F., Dentener, F., Mirabel, P., Wolke, R. and Herrmann, H.: CAPRAM2.4 (MODAC mechanism): An extended and condensed

- tropospheric aqueous phase mechanism and its application, *J Geophys Res*, 108(D14), 4426, doi:doi:10.1029/2002JD002202, 2003.
- Exner, M., Herrmann, H. and Zellner, R.: Laser-based studies of reactions of the nitrate radical in aqueous solution, *Berichte Bunsenges Phys Chem*, 96, 470–477, 1992.
- 5 Feigenbrugel, V., Le Calvé, S., Mirabel, P. and Louis, F.: Henry's law constant measurements for phenol, o-, m-, and p-cresol as a function of temperature, *Atmos. Environ.*, 38(33), 5577–5588, doi:10.1016/j.atmosenv.2004.06.025, 2004.
- Gurol, M. D. and Nekouinaini, S.: Kinetic behavior of ozone in aqueous solutions of substituted phenols, *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 23(1), 54–60, doi:10.1021/i100013a011, 1984.
- 10 Hinteregger, C., Leitner, R., Loidl, M., Ferschl, A. and Streichsbier, F.: Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37(2), 252–259, doi:10.1007/BF00178180, 1992.
- Hoffmann, E. H., Tilgner, A., Wolke, R., BÄ¶lge, O., Walter, A. and Herrmann, H.: Oxidation of substituted aromatic hydrocarbons in the tropospheric aqueous phase: kinetic mechanism development and modelling, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20(16), 10960–10977, doi:10.1039/C7CP08576A, 2018.
- 15 Hoigné, J. and Bader, H.: Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water—I: Non-dissociating organic compounds, *Water Res.*, 17(2), 173–183, doi:10.1016/0043-1354(83)90098-2, 1983.
- Kläning, U. K., Sehested, K. and Holcman, J.: Standard Gibbs energy of formation of the hydroxyl radical in aqueous solution. Rate constants for the reaction $\text{ClO}_2^- + \text{O}_3 = \text{O}_3^- + \text{ClO}_2$, *J Phys Chem*, 89, 760–763, 1985.
- 20 Lallement, A., Besaury, L., Tixier, E., Sancelme, M., Amato, P., Vinatier, V., Canet, I., Polyakova, O. V., Artaev, V. B., Lebedev, A. T., Deguillaume, L., Mailhot, G. and Delort, A.-M.: Potential for phenol biodegradation in cloud waters, *Biogeosciences*, 15(18), 5733–5744, doi:10.5194/bg-15-5733-2018, 2018.
- Lebedev, A. T., Polyakova, O. V., Mazur, D. M., Artaev, V. B., Canet, I., Lallement, A., Väitilingom, M., Deguillaume, L. and Delort, A.-M.: Detection of semi-volatile compounds in cloud waters by GC×GC-TOF-MS.
- 25 Evidence of phenols and phthalates as priority pollutants, *Environ. Pollut.*, 241, 616–625, doi:10.1016/j.envpol.2018.05.089, 2018.
- Olariu, R. I., Barnes, I., Becker, K. H. and Klotz, B.: Rate coefficients for the gas-phase reaction of OH radicals with selected dihydroxybenzenes and benzoquinones, *Int. J. Chem. Kinet.*, 32(11), 696–702, doi:10.1002/1097-4601(2000)32:11<696::AID-KIN5>3.0.CO;2-N, 2000.
- 30 Olariu, R. I., Bejan, I., Barnes, I., Klotz, B., Becker, K. H. and Wirtz, K.: Rate Coefficients for the Gas-Phase Reaction of NO₃ Radicals with Selected Dihydroxybenzenes, *Int. J. Chem. Kinet.*, 577–583, 2004.
- Razika, B., Abbes, B., Messaoud, C. and Soufi, K.: Phenol and Benzoic Acid Degradation by *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Water Resour. Prot.*, 788–791, 2010.
- Rudich, Y., Talukdar, R. K., Fox, R. W. and Ravishankara, A. R.: Reactive Uptake of NO₃ on pure Water and Ionic Solutions, *J Geophys Res*, 101, 21023–21031, 1996.
- 35 Sander, R.: Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent, *Atmos Chem Phys*, 15(8), 4399–4981, doi:10.5194/acp-15-4399-2015, 2015.
- Umschlag, T., Zellner, R. and Herrmann, H.: Laser-based studies of NO₃ radical reactions with selected aromatic compounds in aqueous solution, *Phys Chem Chem Phys*, 4, 2975–2982, 2002.
- 40 Zellner, R. and Herrmann, H.: Free Radical Chemistry of the Aqueous Atmospheric Phase, in *Advances in Spectroscopy*, vol. 24, edited by R. J. H. Clark and R. E. Hester, pp. 381–451, Wiley, London., 1994.

1.3-Conclusion

Nos résultats montrent que les vitesses de dégradation déterminées expérimentalement en microcosmes, qu'elles découlent de processus photochimiques ou biologiques, sont du même ordre de grandeur ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). On peut noter que la vitesse de biodégradation du catéchol est 10 fois plus rapide que celle du phénol. Cela suggère que la première étape d'oxydation du phénol en catéchol par un phénol hydroxylase pourrait être une étape limitante.

Ces résultats expérimentaux obtenus en phase aqueuse indiquent clairement que les deux mécanismes (biologique et chimique) de transformation de ces polluants sont compétitifs, cependant ils ne reflètent pas totalement la réalité d'un système multiphasique tel que le nuage. Il faut tenir compte de la réactivité en phase gaz et en phase aqueuse ainsi que du transfert de masse entre les phases. C'est pourquoi nous avons fait appel à la modélisation (Box Model).

Pour la paramétrisation du modèle nous avons utilisé les constantes de réactivité des radicaux OH et NO₃ dans les deux phases ainsi que les constantes de Henry décrites dans la littérature. Pour la biodégradation en phase aqueuse (nous l'avons considérée comme nulle en phase gaz) nous avons utilisé nos valeurs expérimentales mesurées avec *Rhodococcus enclensis*. Nous avons aussi intégré des valeurs de vitesses décrites dans la littérature pour deux souches de *Pseudomonas* car ce genre est majoritaire dans les nuages. Nous avons ensuite pondéré le nombre de microorganismes actifs par la proportion des souches de *Rhodococcus* et *Pseudomonas* isolées au Puy de Dôme.

Les résultats du modèle confirment que les dégradations biotiques et abiotiques du phénol sont comparables dans la phase aqueuse du nuage.

Pour le phénol c'est la réactivité en phase gaz qui domine les processus de transformation, que ce soit le jour ou la nuit, la perte totale du phénol en phase aqueuse dus aux mécanismes de transformation biotique et abiotique ne représente que 0.1% de la perte totale de ce composé. Pour le catéchol, sa solubilité dans l'eau étant beaucoup plus grande que celle du phénol, ($KH, \text{Phenol} = 647 \text{ M atm}^{-1}$; $KH, \text{catechol} = 8.3 \cdot 10^5 \text{ M atm}^{-1}$), les processus de dégradation (biotique + abiotique) en phase aqueuse sont plus importants; le jour ils peuvent contribuer jusqu'à ~30% de la perte totale du catéchol, dont 17% sont dus à l'activité microbienne.

On peut donc conclure que dans certaines conditions atmosphériques, la perte de composés très solubles est peut-être sous-estimée dans les modèles de chimie atmosphérique car l'activité

microbiologique pourrait être un puits non négligeable. Or les modèles actuels n'intègrent pas les mécanismes biologiques.

Au final nos travaux représentent à la fois la première mesure de vitesses de biotransformation du catéchol et du phénol par une bactérie des nuages, mais également une première tentative d'intégrer des paramètres biologiques dans un modèle de chimie multiphasique.

On sache depuis longtemps que la thérapie microbienne dans l'environnement est un processus courant, nous suggérons que l'atmosphère est un milieu supplémentaire pour les processus de bioremédiation. Donc dans l'avenir, il faut tenir compte de cette activité microbienne importante dans l'atmosphère.

PARTIE 2 : Mécanisme de photo-dégradation du complexe Fe(III)-EDDS

2.1-Introduction

Dans les expériences précédentes mises en place pour étudier la dégradation du phénol, le complexe Fe(III)-EDDS (EDDS : Ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid) a été utilisé pour générer des radicaux $\bullet\text{OH}$. C'est un mime des sidérophores produits par les microorganismes qui pourraient complexer le Fer dans les nuages (Vinatier et al., 2016).

En fait, le complexe Fe(III)-EDDS est surtout utilisé dans le processus AOP (Advanced Oxidation Processes), pour décontaminer les eaux, son principal intérêt est sa stabilité jusqu'à pH= 9 (Li et al., 2010). Malgré son utilisation intensive, le mécanisme de photo-dégradation du ligand organique (EDDS), n'avait jamais été étudié.

C'est pourquoi, au vu de l'intérêt de ce composé pour des applications en décontamination des eaux, nous avons décidé de faire un aparté et d'étudier sa dégradation photochimique. Après irradiation du complexe Fe(III)-EDDS en solution aqueuse dans nos microcosmes nous avons analysé les produits de décomposition du complexe par HPLC-HRMS

L'objectif de cette partie de la thèse était de proposer un mécanisme de photo-dégradation du Fe(III)-EDDS basé sur l'identification de ces produits intermédiaires.

Ce travail a été mené en étroite collaboration avec Gilles Mailhot, spécialiste du complexe Fe(III)-EDDS et de photochimie, Martin Lereboure, responsable du service de spectrométrie de masse et Vincent Theyry pour la partie modélisation.

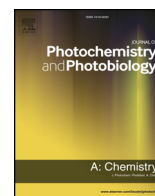
Ce travail a été le sujet d'un poster dans un congrès international :

S. JABER, M. LEREMBOURE, A.-M. DELORT, G. MAILHOT. Mechanism of Photochemical Degradation of Fe(III)-EDDS Complex. *19th European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC 19), Royat (France), 3-6 december 2018.*

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'une publication parue dans le journal Photochemistry and Photobiology A. :

S. JABER, M. LEREMBOURE, V. THERY, A.-M. DELORT, G. MAILHOT. Mechanism of photochemical degradation of Fe(III)-EDDS complex. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 399 (2020) 112646.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112646>.

2.2-Mechanism of photochemical degradation of Fe(III)-EDDS complex.



Mechanism of photochemical degradation of Fe(III)-EDDS complex

S. Jaber^a, M. Lereboure^{a,b}, V. Thery^a, A.-M. Delort^a, G. Mailhot^{a,*}

^a Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut De Chimie De Clermont-Ferrand (ICCF), 63000 Clermont-Ferrand, France

^b Université Clermont Auvergne, UCA-PARTNER, Mass Spectrometry Facility, 63000 Clermont-Ferrand, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Iron complex
EDDS
Photochemistry
Oxidation
Radical chemistry
Mass spectrometry

ABSTRACT

In this work, we investigated the photochemical degradation of the complex Fe(III)-EDDS which is increasingly used in studies of advanced oxidation processes. After irradiation of the aqueous solution, HPLC-HRMS analyses are used to identify the degradation products of EDDS. Six different products are separated and identified with specific chemical formulas. Proposed mechanisms based on the initial photo-redox process can explain the formation of all the products. They correspond to oxidized products with a shorter carbon chain and aldehyde and/or carboxylic acid functions. Among, them the formation of formaldehyde is also proposed in the mechanisms. This study is the first one that identifies degradation products of Fe(III)-EDDS complex and proposes a complete mechanism of degradation that can be applied for other iron complexes.

1. Introduction

Chelating agents, chemical compounds in which two or more electron donor groups form a complex with polyvalent metal, are increasingly used for a long time in different applications. The first application was in medicine and developed after the Second World War for treating arsenic contamination by war gas poisoning [1]. This first application was shortly followed by the use of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) which was used to remove heavy metals (aluminum, lead, mercury, copper, etc.) from the human body [2]. So the interest for the chelation therapy in the removal of metal was strongly developed to treat different pathologies between the 60's and the 80's. After this period, chelating agents were mainly used for non-invasive diagnostic medicine in different applications such as the vectorization of cations to specific part of the body and in the manipulation of nucleic acids. Environmental contamination by metals and use in detergents or pulp and paper industry were the second domain of applications of organic chelating agents more particularly with EDTA [3]. In the soil treatment the addition of chelating agent improves the metal accumulation in the plants and aminopolycarboxylic acids (APCAs) have been used in various phytoextraction experiments [4]. For water treatments, and more precisely in the advanced oxidation processes (AOPs), chelating agents were used due to the low or non-efficiency of the Fenton or photo-Fenton process at pH higher than 4.5. The presence of chelating agent avoids the precipitation of iron and the Fenton process can be observed at pHs until 9.0 [5]. Moreover, it is observed that the efficiency in terms of organic pollutant degradation was higher at higher pHs when Fe-

Chelating agent complexes were involved [5,6]. However, EDTA, the most used synthetic chelating agent, shows a high toxicity and very poor biodegradability while the biodegradable ethylenediamine-*N,N'*-disuccinic acid (EDDS) has been proposed as an alternative to EDTA and other persistent APCAs [4,7]. In fact, different studies demonstrated that EDDS is highly biodegradable whatever its speciation, complexed with metal or free [8–11] and so EDDS is considered as a safe and friendly chemical product for the environment. As a consequence, EDDS was used increasingly in consumer products (washing powders) or in soil washing effluent to favor the extraction of metals.

So due to the environmental and physicochemical properties of Fe(III)-EDDS complex, different research groups all over the world started to introduce this complex in AOPs especially in Fenton and photo-Fenton processes. The first studies started in the beginning of this century with 1–5 papers per year until 2010. Since that date we observe a strong increase of the number of papers with the words “EDDS” and “Fenton” in the topic of the paper (Fig. 1). This trend is confirmed by two recent review articles of Clarizia et al. [12] and of Zhang and Zhou [13] on the Fenton or photo-Fenton processes at near neutral pH. In all these papers, the effect of the complex Fe(III)-EDDS on the Fenton and photo-Fenton processes was investigated in order to produce more radical species (hydroxyl radicals) with the goal to increase the degradation of organic pollutants in aquatic compartments [5,6,14]. The efficiency of the complex Fe(III)-EDDS was also tested for the treatment of municipal wastewater, for the disinfection of water but also for the photo-generation of sulfate radicals [15–17]. The effects of different parameters were studied and more particularly the pH and the natural

* Corresponding author

E-mail address: gilles.mailhot@uca.fr (G. Mailhot).

<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112646>

Received 22 November 2019; Received in revised form 18 May 2020; Accepted 19 May 2020

Available online 27 May 2020

1010-6030/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

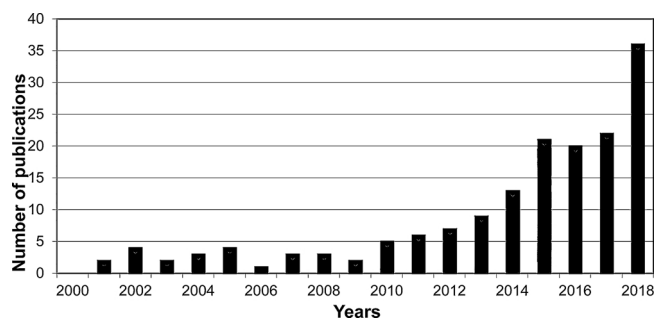


Fig. 1. Productivity of scientific papers with the words “Fenton” and “EDDS” in the main topic (data source: ScienceDirect).

inorganic ions (carbonate, chloride ions, ...). The generation of different radical species ($\cdot\text{OH}$, $\text{SO}_4^{\cdot-}$, $\text{HO}_2^{\cdot}/\text{O}_2^{\cdot-}$) was also well identified and characterized. Moreover, the chemical structure of Fe(III)-EDDS complex, the predominance of the different species and their photochemical efficiency were very well described [18]. However, to our knowledge, any study presents the fate of EDDS after the primary photoredox process involved in such iron complexes. One of the main study, and perhaps the only one, describing the first step of the photochemical process and the fate of the chelating agent is a work on the photochemical impact of the Fe(III)-nitrilotriacetic acid (NTA) complex on the 4-chlorophenol. Abida et al. [19] describe detailed mechanisms as a function of the irradiation wavelength including the fate of the chelating agent. They identified the main transformation products of NTA, i.e. iminodiacetic acid and formaldehyde.

The objective of this work was to identify the primary transformation products of EDDS obtained after the photoredox process and describe the unknown photo-degradation pathways of this compound. The fate of the chelating agent is a crucial point of which the scientific community must be concerned if we want to generalize this type of iron complexes in the AOPs used for wastewater treatment.

2. Materials and methods

2.1. Chemical

Ferric perchlorate hexahydrate 97 % and S,S'-ethylenediamine-*N,N'*-disuccinic acid trisodium salt (EDDS-3Na) solution (35 % in water) were obtained from Sigma Aldrich, sodium hydroxide (NaOH) and perchloric acid (HClO_4) were obtained from Merck and used to adjust the pH of the solutions.

2.2. Complex Fe(III)-EDDS preparation

Fe(III)-EDDS complex 0.5 mM was prepared in Volvic® water, using an equimolar solution of Ferric perchlorate hexahydrate (100 mM) and S,S'-ethylenediamine-*N,N'*-disuccinic acid trisodium salt (100 mM). This preparation was performed in dark conditions to avoid potential photochemical reactions. The pH was adjusted to 6, using NaOH and HClO_4 solutions, and the complex solution was stored also in dark conditions for the same reason.

Before all the experiments, the concentration of the iron complex was controlled and evaluated by UV-visible spectroscopy by measuring the wavelength at 239 nm, one maximum of the Fe(III)-EDDS spectrum, corresponding to a molecular absorption coefficient ϵ equal to $8400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [20].

All the complex solutions were prepared in Erlenmeyer flasks, and the experiments were performed in an Infors® system at 17 °C with shaking at 130 rpm. This system also allows irradiation.

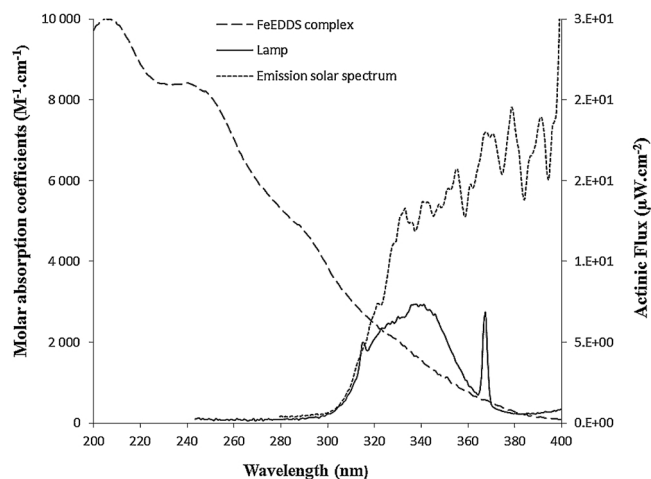


Fig. 2. Comparison of the actinic flux of the lamps used and the emission of the solar spectrum below 400 nm. Molar absorption coefficients of the aqueous solution of Fe(III)-EDDS complex.

2.3. Irradiation set up

The irradiations were performed in the Infors® system equipped with lamps Sylvania Reptistar (15 W). The actinic flux was measured with an optical fiber and a charge-coupled device (CCD) spectrophotometer (Ocean Optics USD 2000 + UV-vis). Lamps actinic flux was compared with emission solar spectrum (Fig. 2). The main advantage of using this kind of lamps was the good superimposition of the spectra in the shorter wavelength but also a lower intensity than the solar emission. Indeed, this lower intensity allows decreasing the rate of degradation of the Fe(III)-EDDS complex, in order to be able to detect more easily the primary products.

2.4. UPLC-HRMS analysis

HPLC-HRMS (High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry) analysis of Fe(III)-EDDS aqueous solution were performed using an UPLC RSLC (Ultra Performance Liquid Chromatography-Rapid Separation Liquid Chromatography) UltiMate™ 3000 (Thermo Scientific™) equipped with an Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ High Resolution Mass Spectrometer (Thermo Scientific™) ionization chamber.

2.4.1. Chromatographic conditions

Chromatographic separation of the analytes was performed on a Kinetex® EVO C18 (1.7 μm , 100 mm \times 2.1 mm, Phenomenex) column with column temperature of 30 °C. The mobile phase was a mixture of water and acetonitrile, in gradient mode, at a flow-rate of 0.45 mL min^{-1} , with an injected volume of 5 μL . The gradient elution program conditions are given in Table S1. This device was coupled with a Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ DAD 3000 UV-vis detector, using a wavelength range between 200–400 nm.

2.4.2. ESI Q-ORBITRAP™ parameters

The Q-Exactive ion source is equipped with electrospray ionization (ESI) and operates in full MS. The full MS scanning range is set between m/z 80 and 1200. The mass resolution was set to 70,000 fwhm, the target AGC (automatic gain control) or the number of ions to be filled C-Trap has been set to 10^6 with a maximum injection time (IT) of 50 ms. The other generic Q-Exactive parameters were: N_2 gas flow rate set at 10 a.u., N_2 sheath gas flow rate set at 50 a.u., sweep gas flow rate set at 60 a.u. The spray voltage is of the order of 3.2 kV in positive mode and 3 kV in negative mode. The capillary temperature is at 320 °C and the temperature of the heating element is at 400 °C. Both positive and

negative ionization modes are used.

2.4.3. Data analysis and visualization

Analysis and visualization of the data set were performed using Xcalibur™ 2.2 software; this software controls and processes data from Thermo Scientific™ LC-MS systems and associated instruments.

2.5. Molecular modeling study

All computations were performed with GAUSSIAN 16 rev B01 [21]. The Functional Theory (DFT) [22,23] level with unrestricted B3LYP [24–26] hybrid functional and 6–31 G basis sets were used. The Implicit solvent method PCM [27] in water was applied. The thermo-dynamic corrections have been taken into account. All energy values presented in the results and discussion part are Gibbs free energy. For both minima, no imaginary frequencies were found.

The chemical structure retained is the neutral form of the system with a formal charge of 0 and the multiplicity of spin equal to 2.

3. Results and discussion

3.1. Photodegradation of the iron complex

The kinetics of Fe(III)-EDDS photodegradation and of the by-products formation are presented on the Fig. 3. The detection of the compounds was performed using an UPLC-HRMS device.

Without irradiation, in the dark condition no significant degradation of the complex Fe(III)-EDDS is observed after 24 h. On the contrary, under irradiation the Fe(III)-EDDS complex is decomposed with 60 % and 80 % of degradation after 3 and 5 h of irradiation respectively. The degradation of the complex Fe(III)-EDDS is almost complete after 24 h of irradiation.

During the irradiation, the formation of different photoproducts is observed by UPLC-HRMS, it is concomitant to the degradation of Fe(III)-EDDS. The UPLC chromatogram shows the appearance of several peaks among them two majors (c and d) and four smaller peaks (f, g, k and a) that we can measure easily (figures S1-S7). All of them have a very short retention time, lower than 1 min and close to that of Fe(III)-EDDS (0.64 min) (Table 1). According to the UPLC-HRMS analysis, four of the photo-products respond to the same ionization mode than EDSS (positive mode), two of them respond to the negative mode and all of

them have a mass lower than that of the Fe(III)-EDDS complex ($\approx 346 \text{ g mol}^{-1}$) and EDSS ($\approx 292 \text{ g mol}^{-1}$) (Table 1 and Fig. S1-S7).

All these observations confirm that the six main photo-products are fragments of EDSS, the organic ligand of the iron complex. All the information obtained by UPLC-HRMS on Fe(III)-EDDS complex, EDSS and the six photo-products are depicted in the Table 1. The molecular formulas of the six photo-products have been identified, they still contain the two nitrogen atoms of EDSS. This result show that the primary (photo)-reactivity in the complex Fe(III)-EDDS does not involve the ethylene-diamine group. This observation is completely consistent with mechanism described previously for Fe(III)-NTA complex [19]. The authors of this paper show that the first stage of the photochemical mechanism is the photoredox process between Fe(III) and one carboxylate group of NTA followed by a fast decarboxylation of the primary radical. In our case, the primary mechanism is thus located on the carboxylate groups and does not interfere on the center part of EDSS structure.

According to the results of LC-MS, two photoproducts are mainly formed: (c) and (d) (Fig. 3). After 4 h of irradiation of the Fe(III)-EDDS complex, the relative percentages of the formation of these fragments are within the range of 10 % and 4% of the initial amount of the Fe(III)-EDDS complex. Other photoproducts are formed, but compared with photoproducts (c) and (d); the MS signals have a lower intensity. This can be explained by the potential mechanism detailed in the following part of the paper, showing all the pathways of Fe(III)-EDDS photodegradation mechanism and is supported by the theoretical calculation.

3.2. Mechanism of Fe(III)-EDDS photodegradation

Taking into account the first published results on the octahedral structure of the complex Fe(III)-EDDS [18], on the photo-reactivity of iron complexes [19] and the chemical structure of EDSS with the two different environments of carboxylate groups (...HC-COO^-) and ($\text{...HC-CH}_2\text{-COO}^-$), we propose a mechanism of EDSS oxidation with two different ways.

The primary step, after the absorption of a photon by the Fe(III)-EDDS complex, implies a redox process between Fe(III) and one carboxylate group (ligand to metal charge transfer (LMCT) process), yielding to Fe(II) and two different carboxylate radicals (...HC-COO^\bullet) and ($\text{...HC-CH}_2\text{-COO}^\bullet$). These two radicals undergo a very fast decarboxylation giving rise to two radicals centered on a carbo atom,

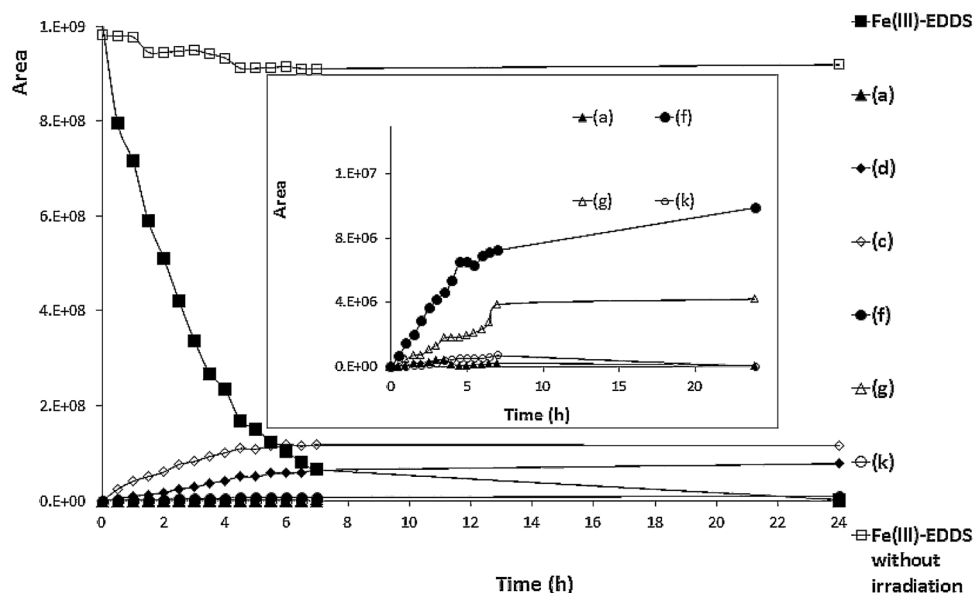


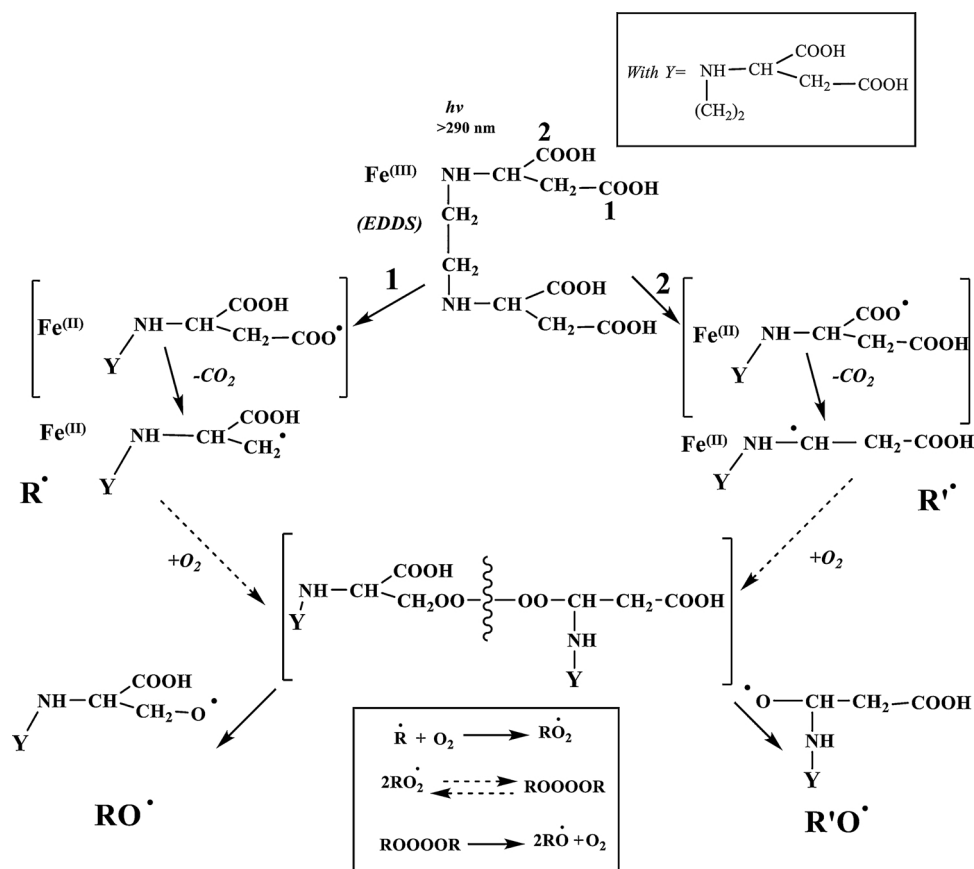
Fig. 3. Kinetics of the photodegradation of the complex Fe(III)-EDDS and of the formation of the detected byproducts. Insert: zoom on the formation of the lowest detected byproducts. Initial [Fe(III)-EDDS] = 0.5 mM.

Table 1

Characterization of the Fe(III)-EDDS complex, EDDS and the six main photo-products from UPLC-HRMS analyses.

Name	Molecular Formula	Exact mass	Retention time (mm)	ionization Mode	Adduct	Isotopic Ratio
FeEDDS ¹	FeC ₁₀ H ₁₃ O ₈ N ₂	345.00209	0.64	M+H 346.0086		344.0131(5.9) ; 346.0082(100)
EDDS	C ₁₀ H ₁₆ O ₈ N ₂	292.09067	0.6	M+H 293.0959		347.0109(13.54) ; 348.0124(2.83) ²
(d)	C ₉ H ₁₄ O ₇ N ₂	262.0801	0.63	M-H 261.0726	M+Cl 298.0567	261.0726(100); 262.0759(9.75) ²
(c)	C ₈ H ₁₂ O ₇ N ₂	248.06445	0.65	M+H 249.071	M+NH ₄ 265.091	249.0710(100); 250.07461(8.72) ²
(a)	C ₈ H ₁₄ O ₆ N ₂	234.08519	0.61	M-H 233.0307	M+Cl 270.0429	233.0307(100) ; 234.0346(5.81) ²
(k)	C ₆ H ₁₀ O ₄ N ₂	174.06406	0.59	M+H 175.0707	M+Na 196.1076	Not detected
(g)	C ₅ H ₁₀ O ₃ N ₂	146.06914	0.61	M+H 147.076	M+NH ₄ ;M+K 163.1224; 184.152	147.0760(100); 148.0605(7.70) ²
(f)	C ₄ H ₈ O ₂ N ₂	116.05858	0.8	M+H 117.0659	M+NH ₄ ;M+Na 133.0759; 138.0574	117.0659(100); 118.0502(2.7) ²

¹ Fe(III)-EDDS is the standard used in UPLC-HRMS measurements. ² The isotopic distribution of iron and carbon, for Fe(III)-EDDS complex and their photo-products are presented in the form of spectra in the supplementary material section (Figures S8-S13).

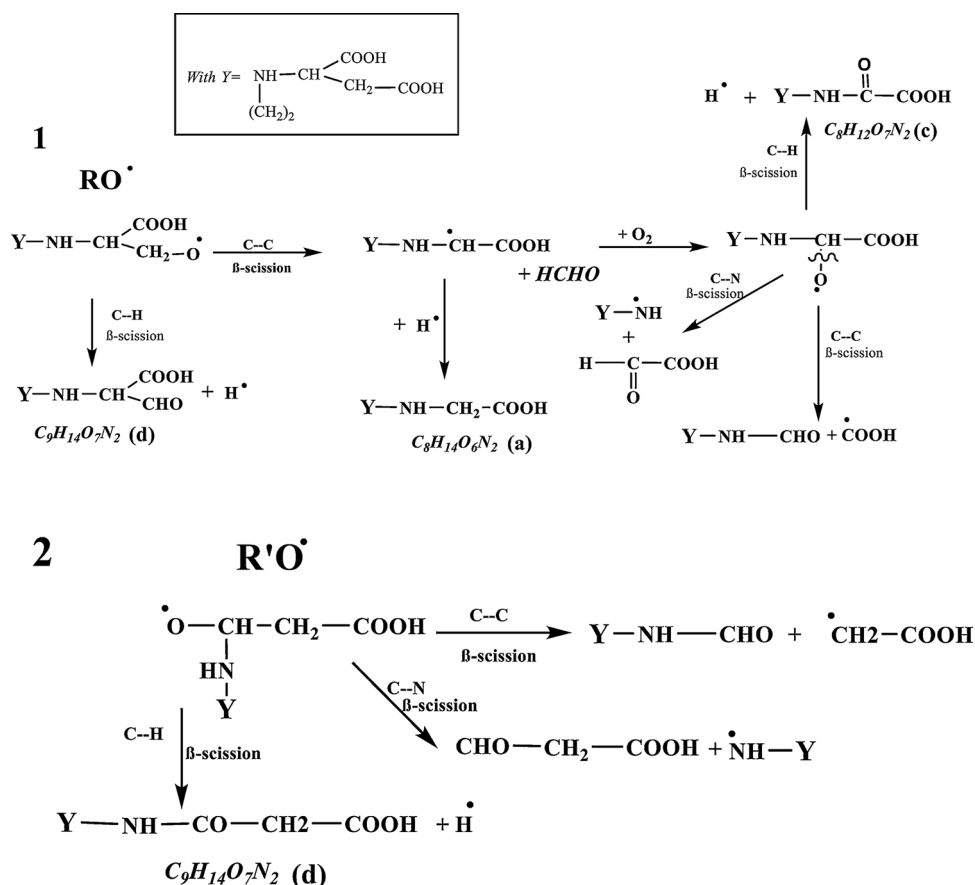


one primary radical ($\cdot\text{CH}-\text{CH}_2 = \text{R}'$) and one secondary radical ($\dots\text{HC} = \text{R}''$) and these radicals react with oxygen to form peroxy radicals $\text{ROO}\cdot$. From these peroxy radical, mono and bimolecular reactions are described in detail [28]. The hypothesis, that bimolecular reaction is favored in aqueous solution for primary and secondary peroxy radicals leading to the formation of intermediate compound called tetroxide, is strongly supported [29]. The decomposition of this unstable intermediate to give molecular oxygen and two alkoxy radicals is a well-known reaction [28]. The first part of the mechanism is detailed in the following mechanism (scheme 1).

The two alkoxy radicals $\text{RO}\cdot$ and $\text{R}'\text{O}\cdot$ from the primary and

secondary radical generated in ways 1 and 2 respectively can undergo β -scissions [28].

From the radical $\text{RO}\cdot$ (Scheme 2, way 1), the β -scission of the C-H bond gives rise to the formation of one compound with an aldehyde function corresponding to the molecular formula of the product (d) identified by MS analysis and a H \cdot radical. The scission of the C-C bond of the radical $\text{RO}\cdot$ (Scheme 2, way 1) leads to the formation of a new secondary radical. The recombination of this radical with the H radical corresponds to the formation of product with the molecular formula of the identified product (a) (Scheme 2, way 1). This new secondary radical can also react with oxygen to give a new peroxy radical, and with



Scheme 2. Mechanism from alkoxy radicals (RO^\bullet and $\text{R}'\text{O}^\bullet$) formed in the ways 1 and 2 (Scheme 1).

the same reactions sequence than in Scheme 1, a new alkoxy radical. Finally, β -scissions of C–C bonds of this alkoxy radical gives rise to the formation of one compound with an aldehyde function and two compounds with acid carboxylic function. One of these two compounds has a molecular formula of the product (c) identified by HRMS analysis (Scheme 2, way 1).

From the radical $\text{R}'\text{O}^\bullet$ (Scheme 2, way 2), the β -scission of the C–H bond leads to the formation of a product with one amide function corresponding to m/z mass and the molecular formula of the product (d) like in the way 1 from the radical A. However, the chemical formula is not the same; it is a regio-isomer. The two other β -scissions from C–N and C–C bonds of the radical $\text{R}'\text{O}^\bullet$ (Scheme 2, way 2) lead to two products with aldehyde function but not identified during our MS analysis.

The other detected by-products, with a lower intensity by HRMS analysis, cannot be explained with the first part of the mechanism. The molecular formulas of products f, g and k can be found from the photochemical degradation of the product $\text{Y}-\text{NH}-\text{CHO}$ formed from both the primary and secondary radicals i.e. ways 1 and 2 (Scheme 2). The same reactivity with the two radicals (primary and secondary) can be proposed on the two carboxylic functions still present in the compound $\text{Y}-\text{NH}-\text{CHO}$. The detailed of this mechanism is depicted in Scheme 3.

3.3. Molecular modeling studies on radical stability

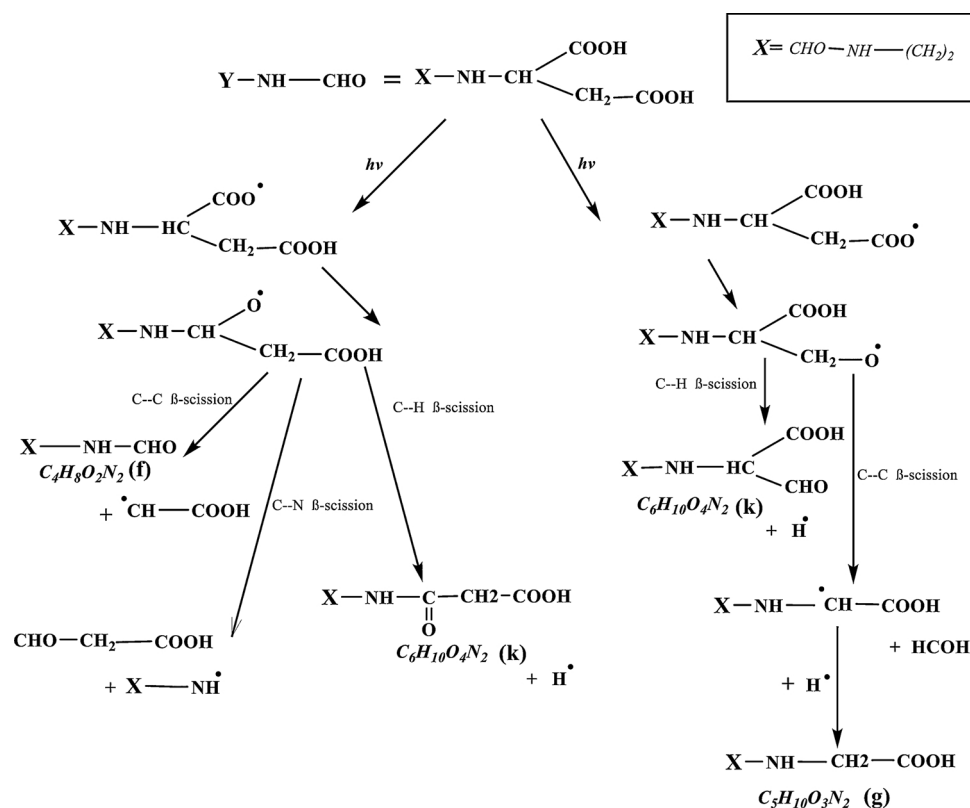
The molecular modeling studies were performed on the stability of primary R^\bullet and secondary R'^\bullet radicals obtained after the LMCT process and the very fast decarboxylation. The molecular structures obtained from the calculations are presented in Fig. 4. DFT calculations demonstrate that the secondary radical is the most stable with a difference of -64.2 kJ relative to the primary radical (Table 2). So, the primary

radical will be more reactive than the secondary radical, however this result does not give information on the relative rates of formation of these two radicals. The predominant product will be the one that will be formed with the higher rate during the photo redox process.

4. Conclusion

We present here the first scheme of the mechanism of photochemical degradation of Fe(III)-EDDS complex which remained unknown in spite an intensive use of this iron complex.

All the main by-products formed and identified by HRMS analysis can be explained by the photochemical mechanism involving a LMCT process. These results demonstrate the transfer of electron between the metal and the ligand through the carboxylic acid function. After that the ligand is oxidized leading to the formation of different compounds. Two different oxidation pathways can be distinguished depending on the type of carboxylic acid involved in the redox process. Even if the primary radical is more stable and leads to the formation of the 2 most intense products in HRMS analysis (c) and (d) it is not possible to conclude about the priority in the course of the mechanism. Further modeling studies should be performed to better understand the decarboxylation process of the excited states and determine which radical is formed first. The formation of the more intense by-product (c) detected by HRMS analysis can be only explained from the primary radical (R^\bullet). Finally, all the by-products identified have a lower molecular mass than EDDS and correspond to shorter oxidized products with formation of new aldehyde, carbonyl or carboxylic acid functions. We are in the presence of a multi-step process of chain fragmentation with a shortening by oxidation. The proposed mechanism, based on HRMS data show that it is similar to that proposed for Fe(NTA) photo-transformation. Among to the shorter oxidized products, formaldehyde



Scheme 3. Mechanism from the product Y-NH-CHO formed in the first part in the two ways of EDDS transformation (Scheme 2). Note that Y-NH-CHO (Scheme 2) and X-NH-CH(COOH)-(CH₂COOH) (Scheme 3) are the same compound CHO-NH-(CH₂)₂-NH-CH(COOH)-(CH₂-COOH).

is produced (Schemes 2 and 3) which is likely to be further oxidized to formic acid. These C1-compounds are more easily biodegradable and so less toxic for aquatic environment. This study suggests that the use of EDDS involved in the different advanced oxidation processes using iron like Fenton or photo-Fenton for water treatments would not induce major toxicity risk for the aquatic environment.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was funded by the French ANR program BIOCAP (N° ANR-13-BS06-004-01). It was also supported by the French Ministry

Table 2

Energies and energy gaps of the two radicals.

	Primary alkyl radical (R [•])	Secondary alkyl radical (R' [•])
E _{B3LYP/6-31g} (Hartree)	-912.503969653	-912.529111078
E _{Free Gibbs} (Hartree)	-912.303341	-912.327837
Δ E _{Free Gibbs} (kJ)	0.0	-64.25

and CNRS. The authors acknowledge the financial support from the Fédération des Recherches en Environnement through the CPER founded by Région Auvergne Rhône-Alpes, the French ministry, and FEDER from the European community. S. Jaber is recipient of a grant from the Walid Joumlatt Foundation (WJF) for University Studies, Beirut, Lebanon. Computations have been performed on the super-computer facilities of the Mésocentre Clermont-Auvergne.

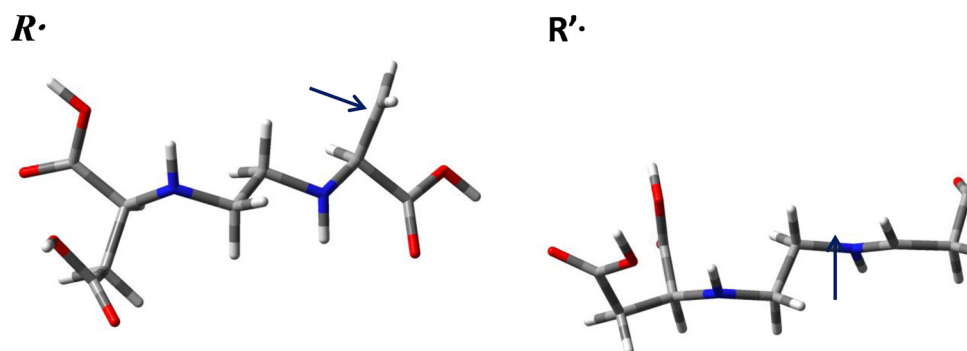


Fig. 4. Representation of the molecular structure of the two alkyl radicals (primary R[•] and secondary R'[•] in scheme 1) used for the calculations. The localization of the radical is indicated by an arrow.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112646>.

References

- [1] R.A. Peters, L.A. Stocken, R.H.S. Thompson, British Anti-Lewisite (BAL), *Nature* 156 (1945) 616–619.
- [2] S.P. Bessman, H. Ried, M. Rubin, Treatment of lead encephalopathy with calcium disodium versenate; report of a case, *Med. Annals of the District of Columbia* 21 (6 June) (1952) 312–315.
- [3] C. Oviedo, J. Rodriguez, EDTA: The chelating agent under environmental scrutiny, *Quim. Nova* 26 (6) (2003) 901–905.
- [4] M.W.H. Evangelou, M. Ebel, A. Shaeffer, Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents, *Chemosphere* 68 (2007) 989–1003.
- [5] J. Li, G. Mailhot, F. Wu, N. Deng, Photochemical efficiency of Fe(III)-EDDS complex: OH radical production and 17 β -estradiol degradation, *J. Photochem. Photobiol. A:Chem.* 212 (2010) 1–7.
- [6] W. Huang, M. Brigante, F. Wu, C. Mousty, K. Hanna, G. Mailhot, Assessment of the Fe(III)-EDDS complex in Fenton-like processes from the radical formation to the degradation of bisphenol A, *Environ. Sci. Technol.* (2013) 471952–471959.
- [7] B. Kos, D. Leštan, Influence of a biodegradable ([S,S]-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogel modified soil water sorption capacity on Pb phytoextraction and leaching, *Plant Soil* 253 (2003) 403–411.
- [8] J.S. Jaworska, D. Schowanek, T.C.J. Feijtel, Environmental risk assessment for trisodium [S,S]-ethylene diamine disuccinate, a biodegradable chelator used in detergent applications, *Chemosphere* 38 (1999) 3597–3625.
- [9] M. Bucheli-Witschel, T. Egli, Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids, *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (2001) 69–106.
- [10] S. Tandy, A. Ammann, R. Schulin, B. Nowack, Biodegradation and speciation of residual SS-ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS) in soil solution left after soil washing, *Environ. Pollut.* 142 (2006) 191–199.
- [11] P.C. Vandevivere, H. Saveyn, W. Verstraete, T.C.J. Feijtel, D.R. Schowanek, Biodegradation of metal-[S,S]-EDDS complexes, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1765–1770.
- [12] L. Clarizia, D. Russo, I. Di Somma, R. Marotta, R. Andreozzi, Homogeneous photo-Fenton processes at near neutral pH: a review, *Appl. Catal. B* 209 (2017) 358–371.
- [13] Y. Zhang, M. Zhou, A critical review of the application of chelating agents to enable Fenton and Fenton-like reactions at high pH values, *J. Hazard. Mater.* 362 (2019) 436–450.
- [14] Y. Wu, M. Passananti, M. Brigante, W. Dong, G. Mailhot, Fe(III)-EDDS complex in Fenton and photo-Fenton processes: from the radical formation to the degradation of a target compound, *Environ. Sci. Pollut. Res. - Int.*, 204, 21, 12154–12162.
- [15] N. Klamerth, S. Malato, A. Aguear, A. Fenandez-Alba, G. Mailhot, Treatment of municipal wastewater treatment plant effluents with modified photo-Fenton as a tertiary treatment for the degradation of micro pollutants and disinfection, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 2885–2892.
- [16] A. Bianco, M.I. polo-Lopez, P. Fernandez-Ibanez, M. Brigante, G. Mailhot, Disinfection of water inoculated with *Enterococcus faecalis* using solar/Fe(III)EDDS-H₂O₂ or S₂O₈²⁻-process, *Water Res.* 118 (2017) 249–260.
- [17] Y. Wu, A. Bianco, M. Brigante, W. Dong, P. de Sainte Claire, K. Hanna, G. Mailhot, Sulfate radical photogeneration using Fe-EDDS: influence of critical parameters and naturally occurring scavengers, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 14343–14349.
- [18] Y. Wu, M. Brigante, W. Dong, G. Mailhot, toward a better understanding of Fe(III)-EDDS photochemistry: theoretical stability calculation and experimental investigation of 4-*tert*-butylphenol degradation, *J. Phys. Chem. A* 118 (2014) 396–403.
- [19] O. Abida, G. Mailhot, M. Litter, M. Bolte, Impact of iron-complex (Fe(II)-NTA) on photoinduced degradation of 4-chlorophenol in aqueous solution, *Photochem. Photobiol. Sci.* 5 (2006) 395–402.
- [20] W. Huang, Homogeneous and heterogeneous Fenton and photo-Fenton processes: impact of iron complexing agent Ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid (EDDS), PhD Thesis, no DU 2241, Université blaise pascal, clermont-ferrand (France). http://gaussian.com/citation_b01/.
- [21] P. Hohenberg, W. Kohn, Inhomogeneous electron gas, *Phys. Rev.* 136 (1964) B864–B871.
- [22] W. Kohn, L.J. Sham, Self-consistent equations including exchange and correlation effects, *Phys. Rev.* 140 (1965) A1133–A1138.
- [23] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.
- [24] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev.* 37 (1988) B785–B789.
- [25] S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis, *Can. J. Phys.* 58 (1980) 1200–1211.
- [26] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, Quantum mechanical continuum solvation models, *Chemical Review* 105 (2005) 2999–3093.
- [27] C. Von Sonntag, H.-P. Schuchmann, The elucidation of peroxy radical reactions in aqueous solution with the help of radiation-chemical methods, *Angew. Chemie Int. Ed.* 30 (1991) 1229–1253.
- [28] J.E. Bennett, J.A. Howard, Bimolecular self-reaction of proxy radicals, An oxygen-18 isotope study 95 (12) (1973) 4008–4010.

Mechanism of photochemical degradation of Fe(III)-EDDS complex

S. Jaber ¹, M. Lereboure ^{1,2}, V. Theyry ¹, A.-M. Delort ¹, G. Mailhot ^{1*}.

(1) Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), 63000 Clermont-Ferrand, France.

(2) Université Clermont Auvergne, UCA-PARTNER, Mass Spectrometry Facility, 63000 Clermont-Ferrand, France.

* Corresponding author:

E-mail address: gilles.mailhot@uca.fr

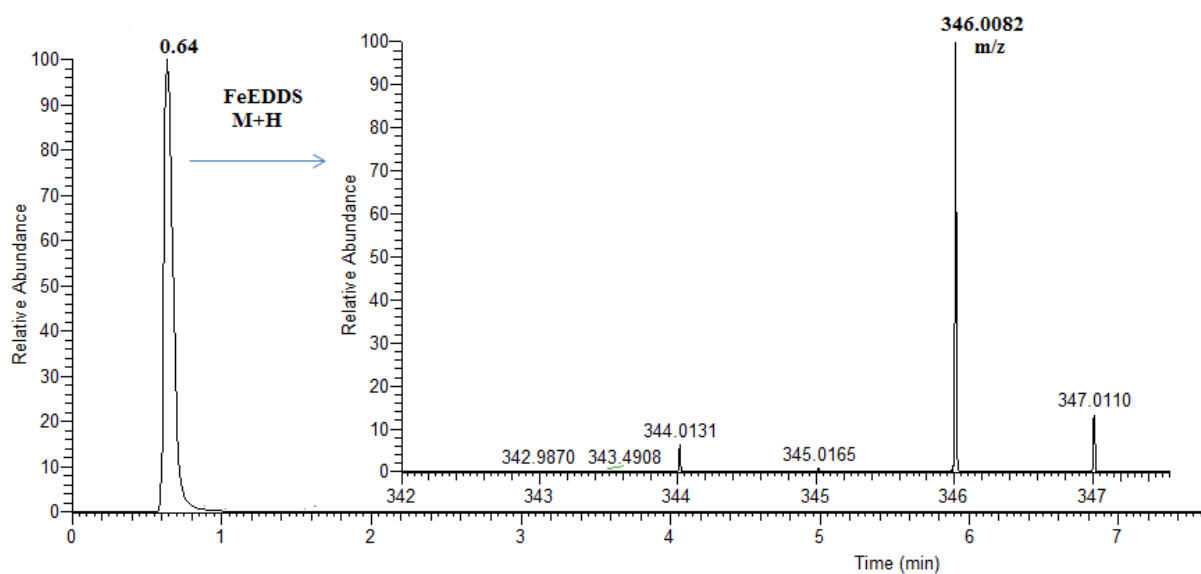
Keywords: Iron complexes, photochemistry, processes,

Table S1: Gradient elution program.

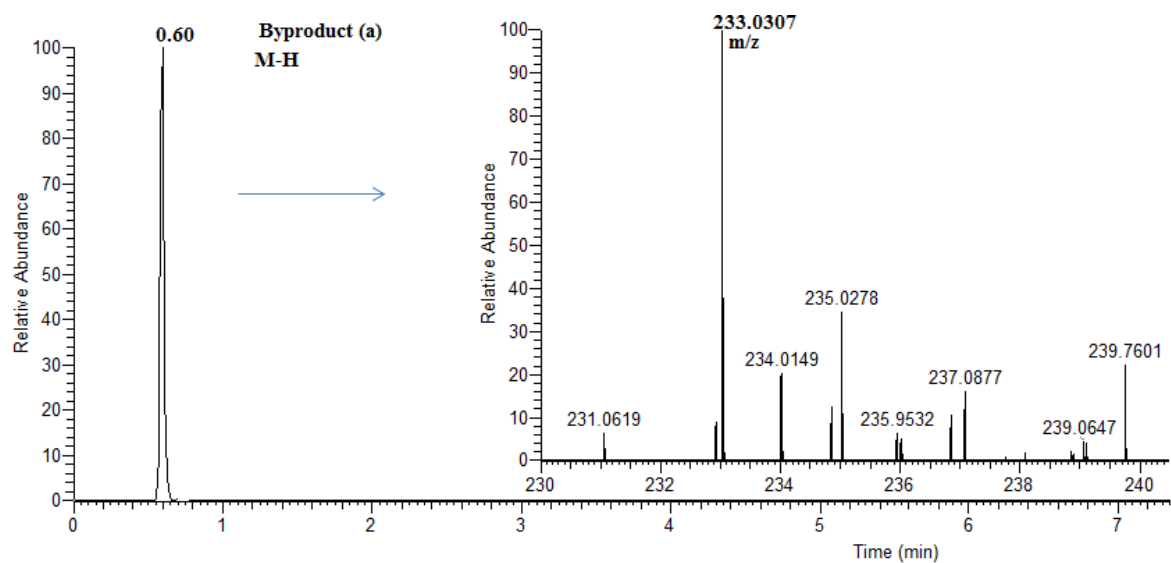
Time (min)	Percentage of water + 0.1% of formic acid	Percentage of acetonitrile + 0.1% of formic acid
0	95	5
7.5	1	99
8.5	1	99
9	95	5
11	95	5

In following figures are presented the HPLC chromatograms and the MS spectra of Fe(III)-EDDS complex and of six by-products.

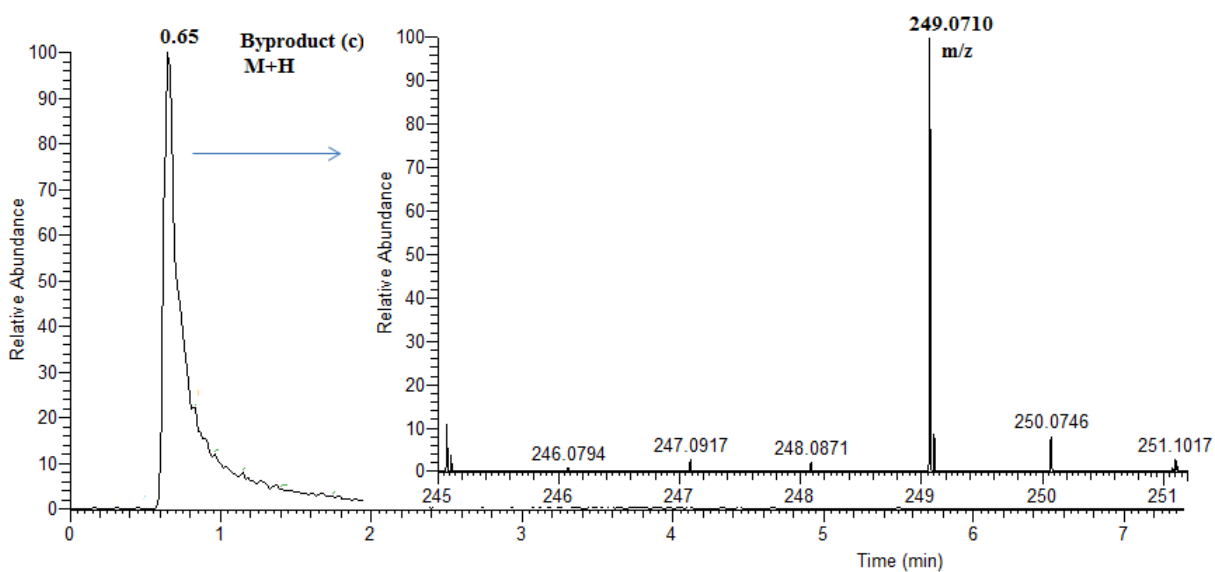
Figures S1: Chromatogram and mass spectrum of the complex Fe(EDDS) in positive ionization mode



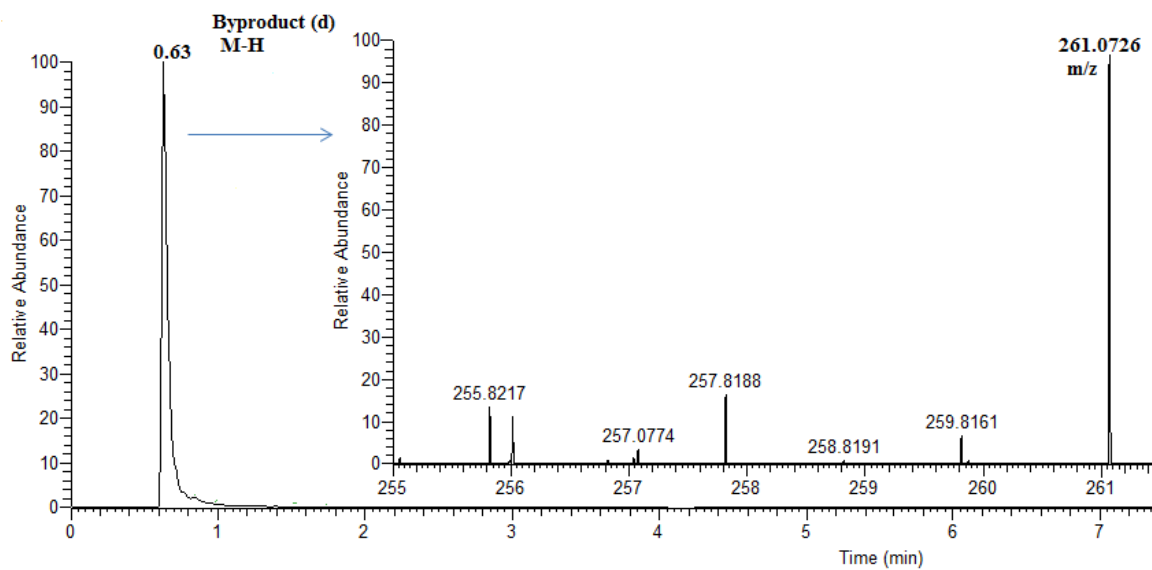
Figures S2: Chromatogram and mass spectrum of the by-product (a) in negative ionization mode



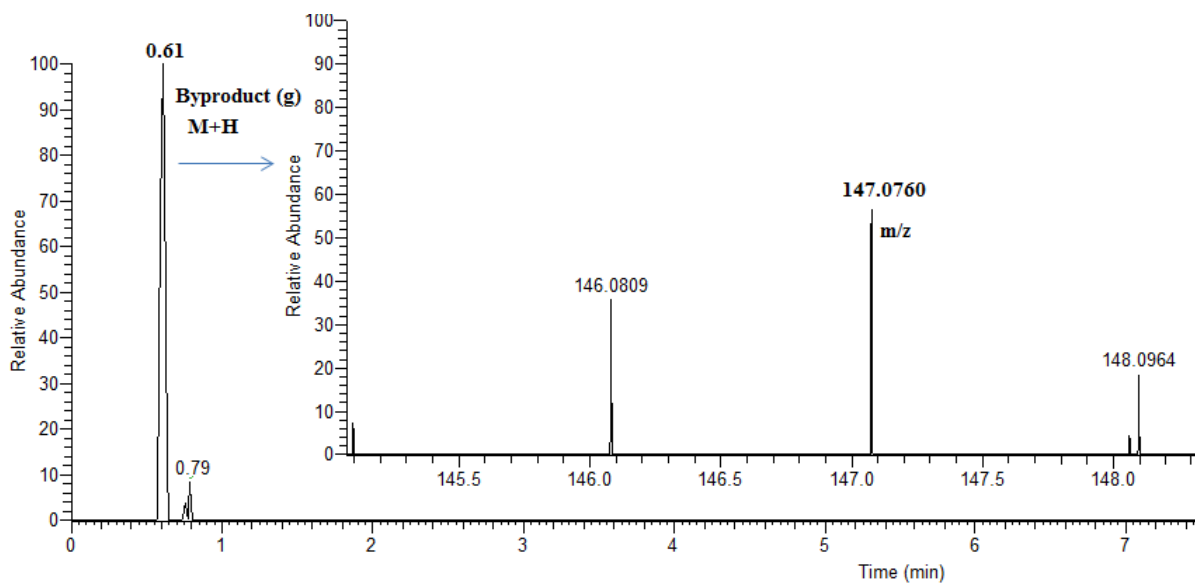
Figures S3: Chromatogram and mass spectrum of the by-product (c) in positive mode ionization



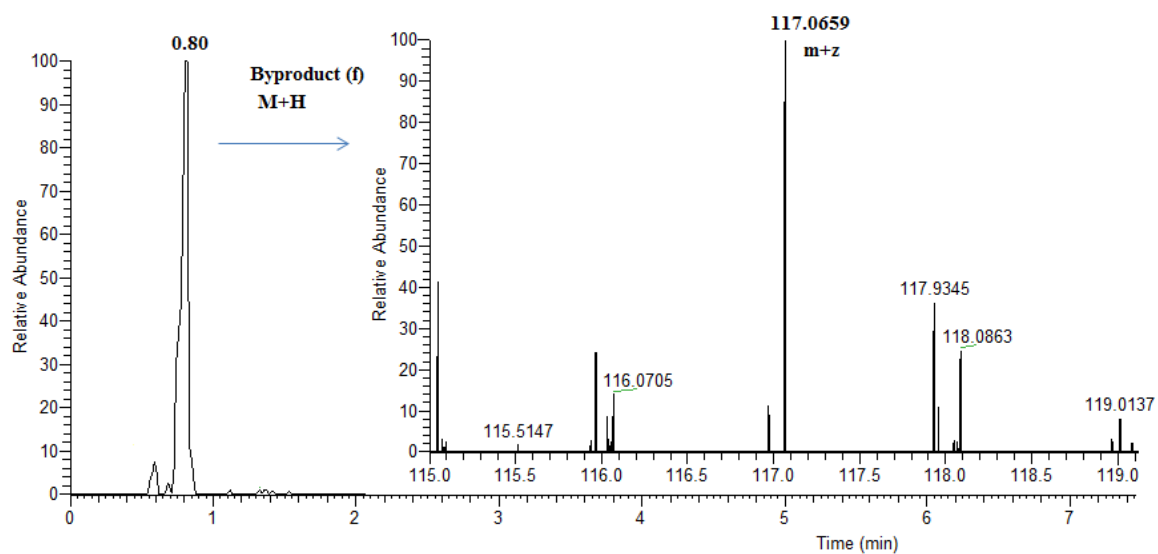
Figures S4: Chromatogram and mass spectrum of the by-product (d) in negative ionization mode



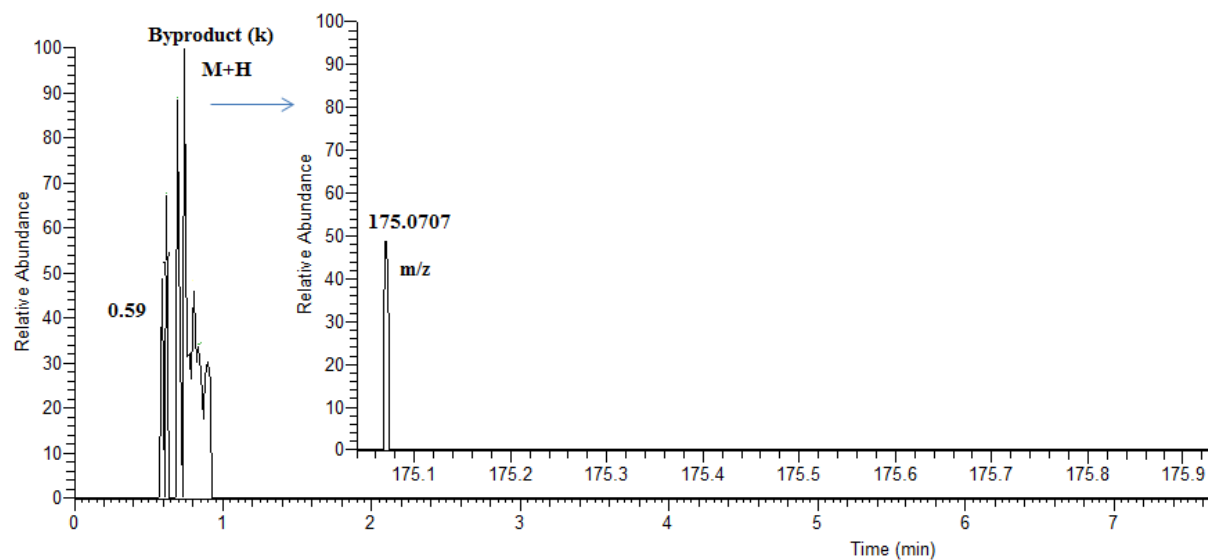
Figures S5: Chromatogram and mass spectrum of the by-product (g) in positive ionization mode



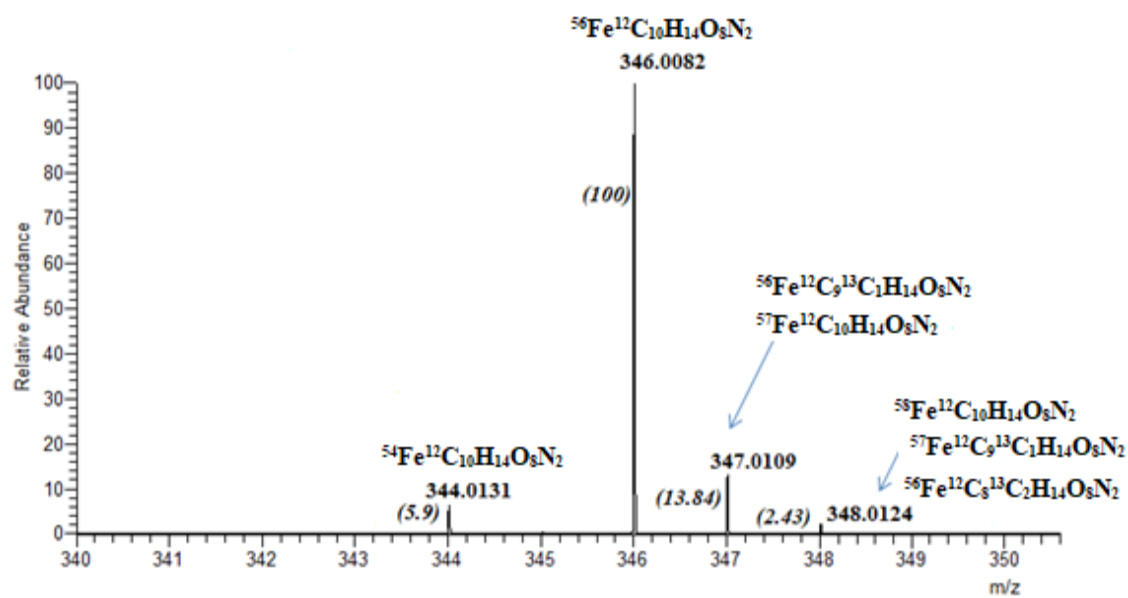
Figures S6: Chromatogram and mass spectrum of the by-product (f) in positive ionization mode



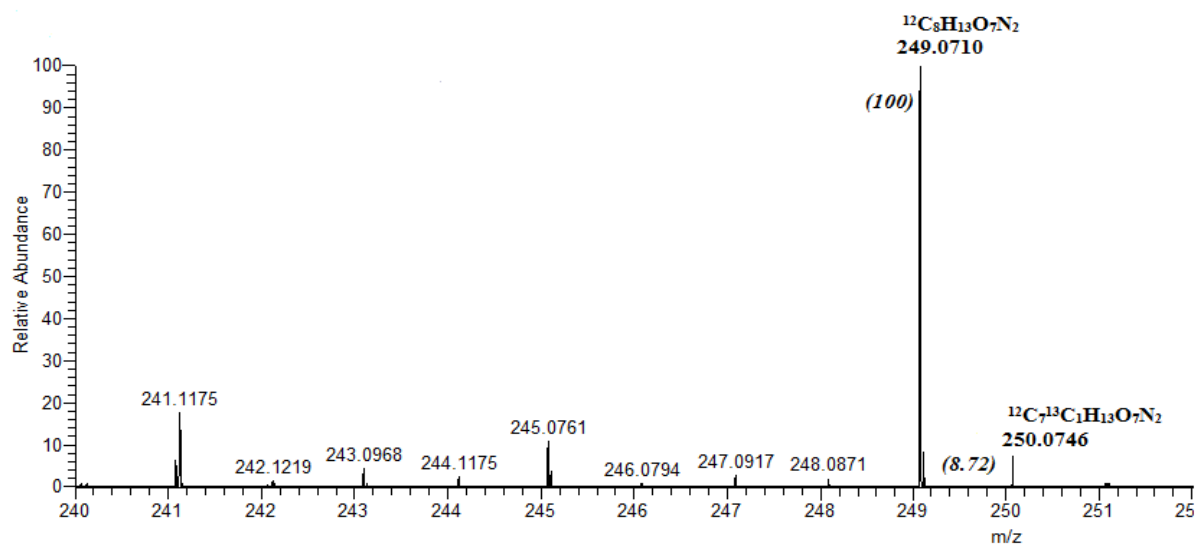
Figures S7: Chromatogram and mass spectrum of the by-product (k) in positive ionization mode



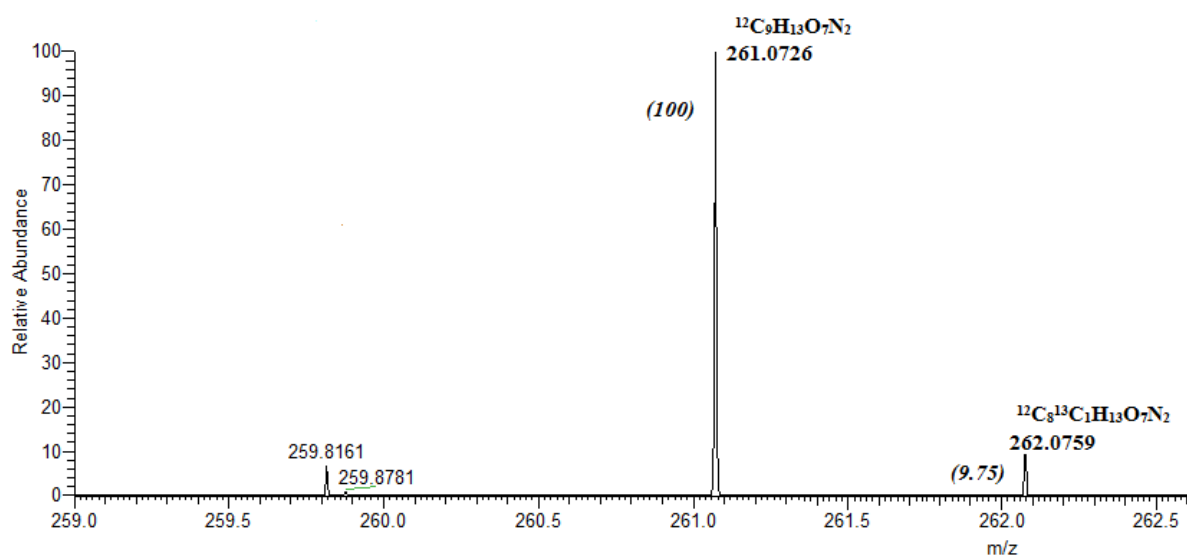
Figures S8: isotopic distribution of the complex FeEDDS



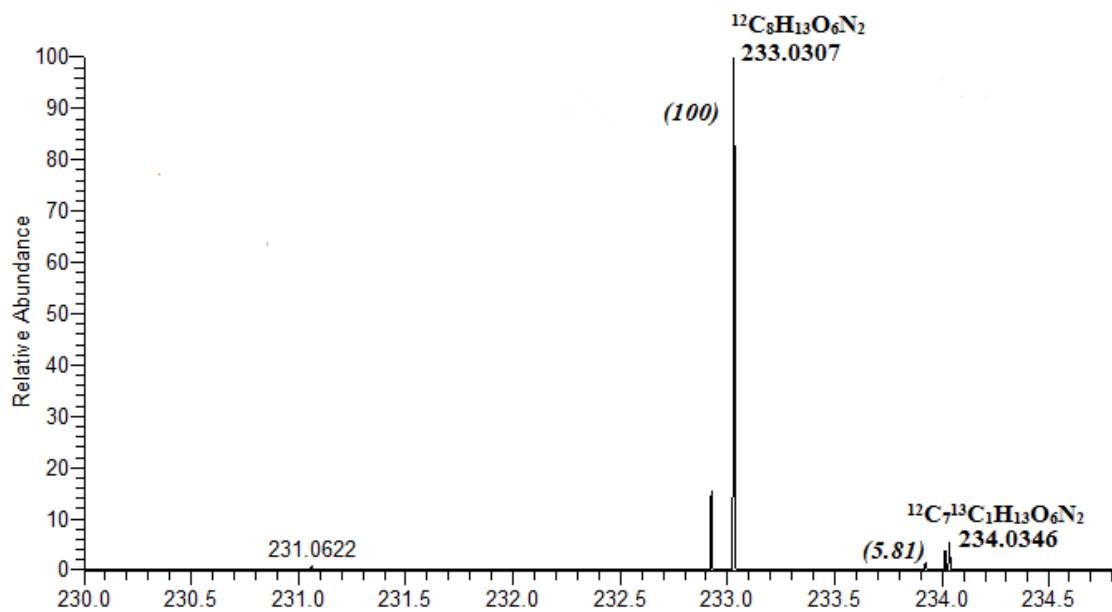
Figures S9: Isotopic distribution of the byproduct (c)



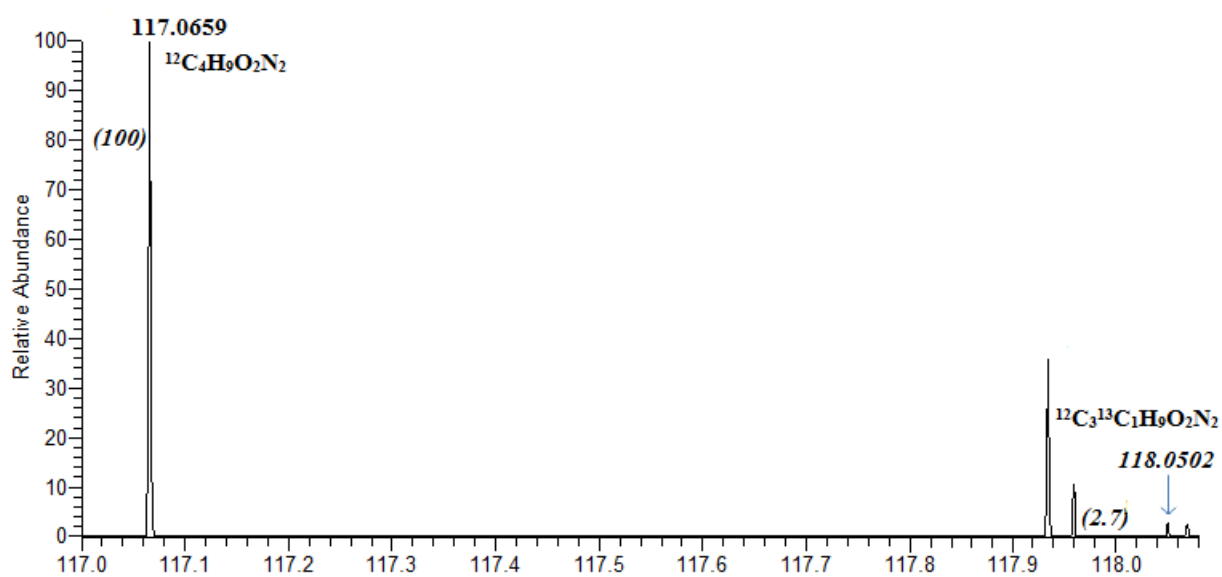
Figures S10: Isotopic distribution of the byproduct (d)



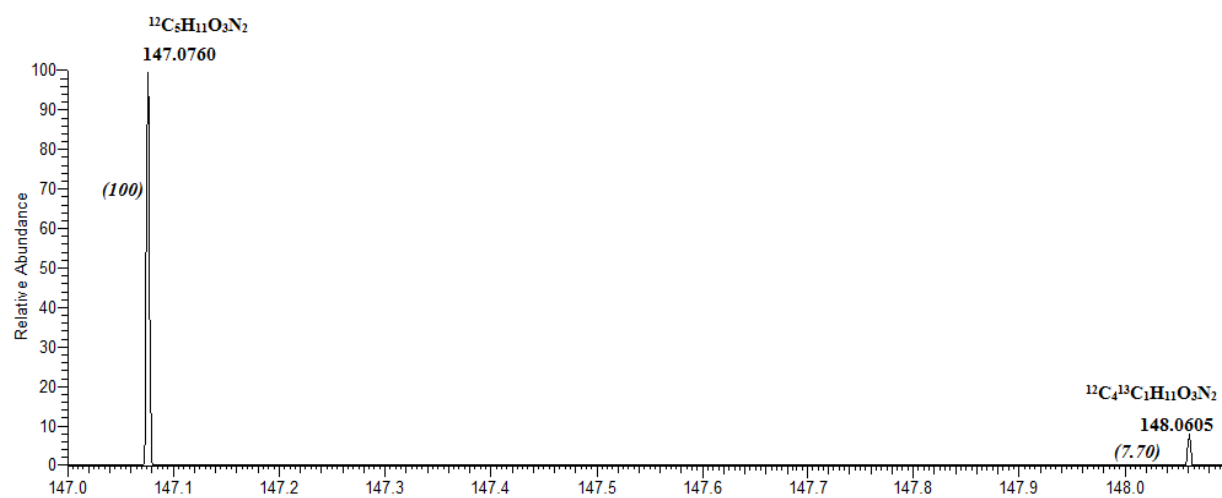
Figures S11: Isotopic distribution of the byproduct (a)



Figures S12: Isotopic distribution of the byproduct (f)



Figures S13: Isotopic distribution of the byproduct (g)



2.3-Conclusion

Les analyses par UPLC-HRMS des échantillons aqueux de Fe(III)-EDDS irradiés ont permis l'identification structurale de 6 produits de photo-transformation. Tous les sous-produits identifiés ont un poids moléculaire plus faible que l'EDDS et correspondent à des produits oxydés plus courts avec la formation de nouvelles fonctions aldéhyde, carbonyle ou acide carboxylique.

Ces produits ont pu être replacés dans deux voies de photo-transformation du complexe, les mécanismes proposés présentent des similarités avec celui déjà suggéré pour la photo-transformation du complexe Fe(III)-NTA (acide nitrilotriacétique) (Abida et al., 2006).

Ces résultats démontrent que nous sommes en présence d'un processus de photo(oxydoréduction) de type LMCT (ligand to metal charge transfer) avec un transfert d'électron entre le métal (réduction en Fe(II)) et le ligand (oxydation) *via* une fonction acide carboxylique. Les deux voies d'oxydation peuvent être distinguées en fonction du type d'acide carboxylique impliqué dans le processus redox. Une première étude de modélisation moléculaire a montré quel radical formé initialement est le plus stable. Cependant, des modélisations complémentaires devraient être effectuées pour mieux comprendre le processus de décarboxylation des états excités et déterminer quel radical est formé le premier.

2.4-Annexes

1. Introduction

Dans le chapitre 2 des résultats, nous avons proposé un mécanisme de photo-transformation du Fe(III)-EDDS qui a été publié dans l'article intitulé « Mechanism of photochemical degradation of Fe(III)-EDDS complex » dans le journal *Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*. Ce mécanisme implique deux voies différentes suivant la nature de l'acide carboxylique (Figure 65). Dans ce mécanisme un intermédiaire « d » a été détecté par spectrométrie de masse à la fois dans les voies 1 et 2. Cependant cette analyse en LC-MS ne permet pas de distinguer les deux isomères de constitution possibles d1 et d2 découlant des voies de photo-transformation 1 et 2 respectivement (Schéma 1) car ils ont la même formule brute $C_9H_{14}O_7N_2$. Afin de préciser la structure de ces isomères nous avons utilisé le logiciel Mass Frontier™ qui permet de proposer des mécanismes théoriques de fragmentation d'un composé lors d'une analyse en

MS2. Nous avons ensuite recherché les masses des fragments spécifiques des formes d1 et d2 dans les spectres LC-MS-MS que nous avons réalisés sur les solutions irradiées du Fe(III)-EDDS. C'est l'ensemble de ce travail complémentaire que nous présentons dans cette annexe.

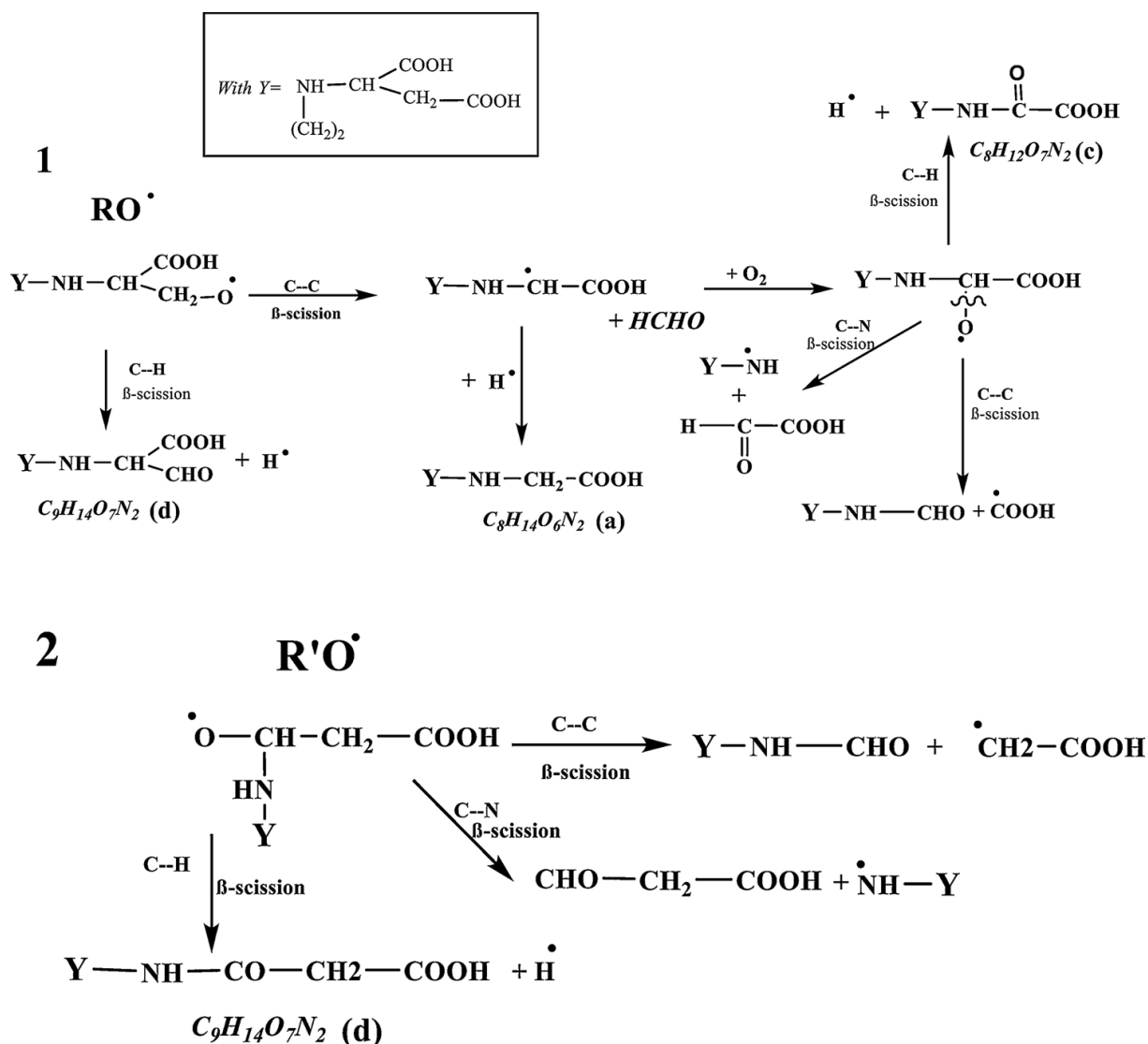
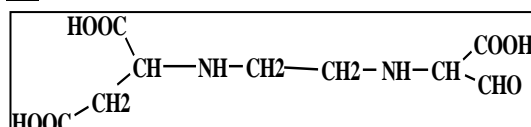


Figure 65 : Détail des mécanismes de photo-transformation du Fe(III)-EDDS par les voies 1 et 2 (d'après Jaber et al. , 2020).

d1



d2

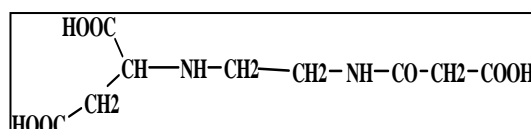


Schéma 1 : Structure des deux isomères de constitution d1 et d2 résultant respectivement des voies 1 et 2 de photo-transformation du complexe Fe(III)-EDDS noté « d » dans la figure 65.

2. Matériels et méthodes

2.1 Etude théorique.

Mass Frontier TM 7.0 est un logiciel ThermoFisher Scientific permettant l'identification et l'élucidation structurale de petites molécules inconnues.

Il permet à partir d'une structure connue d'une molécule de prédire la masse des ions théoriques obtenus par MS/MS en suivant les règles de fragmentations.

Il permet également de faire de l'identification par comparaison des spectres full scan et MS/MS avec des bases de données.

Enfin le logiciel Mass FrontierTM 7.0 permet de proposer les mécanismes théoriques conduisant aux sous fragments obtenus.

2.2 Analyse par UPLC-HRMS

Les analyses sont réalisées sur un appareil UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) UltiMate TM 3000 (Thermo Scientific TM) couplé à un spectromètre de masse haute résolution Orbitrap Q Exactive TM (Thermo Scientific TM) équipé d'une source électrospray.

La séparation chromatographique des analytes a été réalisée sur un Colonne Kinetex® EVO C18 (1,7 µm, 100 mm × 2,1 mm, Phenomenex) avec une température de colonne de 30 ° C. La phase mobile était un mélange d'eau et d'acétonitrile avec ajout d'acide formique à 0.1%, en mode gradient (voir tableau ci-dessous), à un débit de 0,45 mL min⁻¹, avec un volume injecté de 5 µL.

Tps (min)	% H₂O + 0.1%AF	% ACN + 0.1%AF
0	95	5
7.5	1	99
8.5	1	99
9	95	5
11	95	5

La détection est réalisée en mode électrospray positif. Les conditions MS sont les suivantes : AGC Target à 10^5 , temps d'injection maximum (IT) de 50 ms, débit Aux gaz N₂ de 10 a.u, de Sheath gaz N₂ de 50 a.u, de Sweep gaz de 60 a.u. La tension du capillaire est de 3,2 kV. La température du capillaire est de 320 °C et celle du gaz de nébulisation de 400 °C. Sélection à l'aide du quadripôle de l'ion 263 [M+H] de l'intermédiaire « d » et fragmentation avec une énergie de collision normalisée (NCE) de 10.

Le pilotage de l'instrument, l'analyse et la visualisation de l'ensemble des données ont été effectués en utilisant le logiciel Xcalibur™ 4.0.

3. Résultats

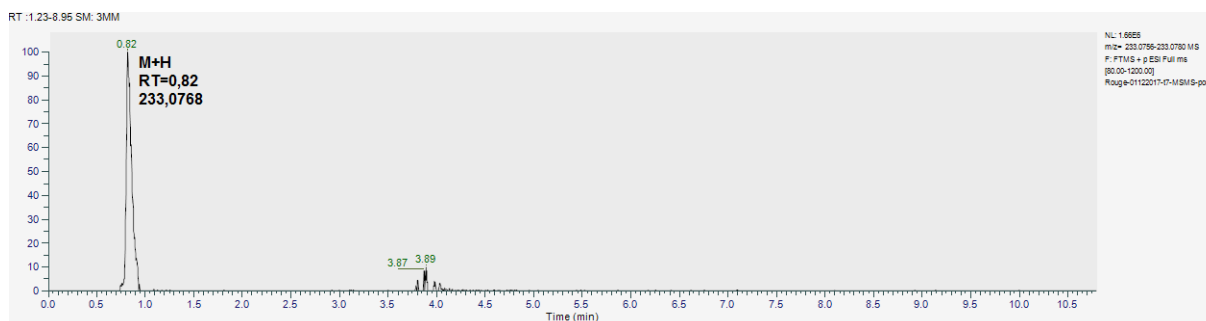
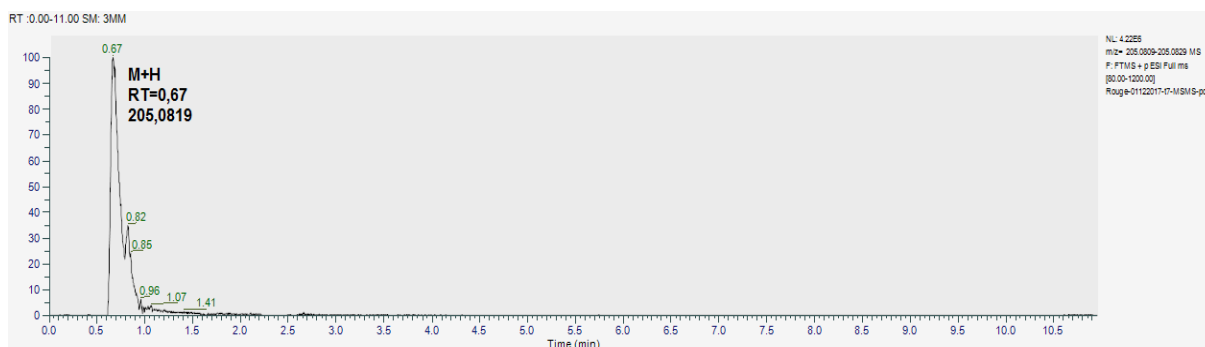
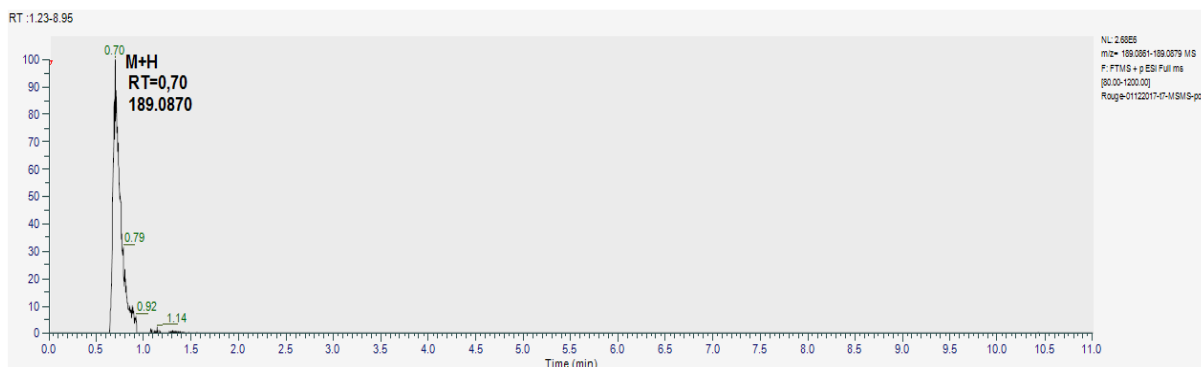
L'analyse théorique de la fragmentation des composé **d1** et **d2** (voir schéma 1) à l'aide du logiciel MassFrontier™ conduit à un certain nombre de fragments potentiels. Seules les masses des fragments spécifiques des composés d1 et d2 sont reprises dans le Tableau 13 car elles seules permettent de distinguer les deux isomères de constitution.

Tableau 13 : Masses des ions spécifiques issus de la fragmentation théorique de d1 et d2.

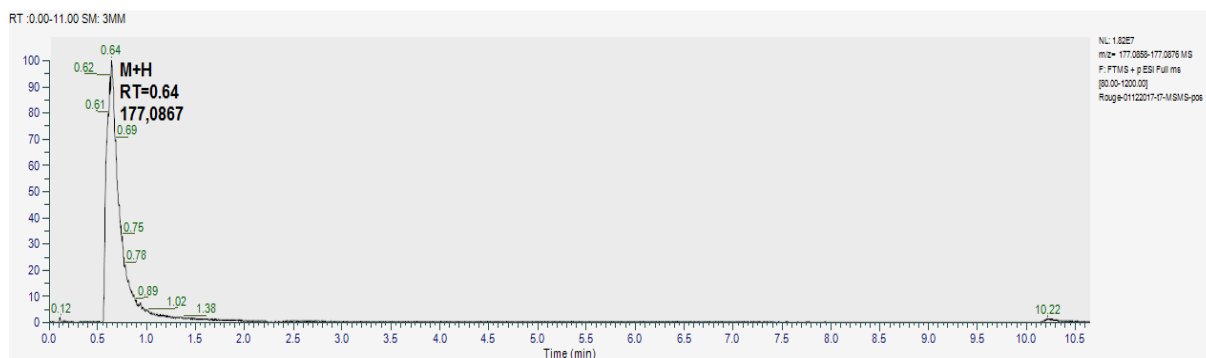
d1	d2
189.087	149.0921
205.0819	161.0921
233.0768	177.087
	201.087

Seules les masses des ions en **gras** ont été détectées dans les analyses MS/MS réalisées (Figure 66).

Fragments spécifiques du composé chimique d1 :



Fragments spécifiques du composé chimique d2:



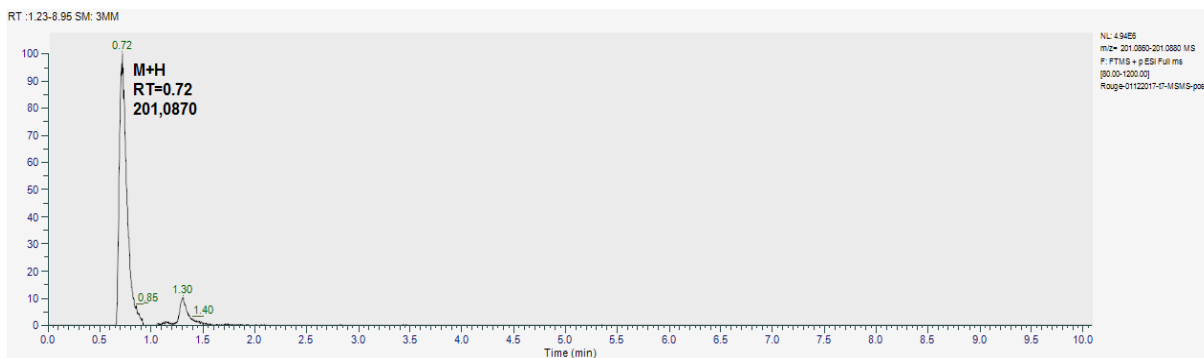
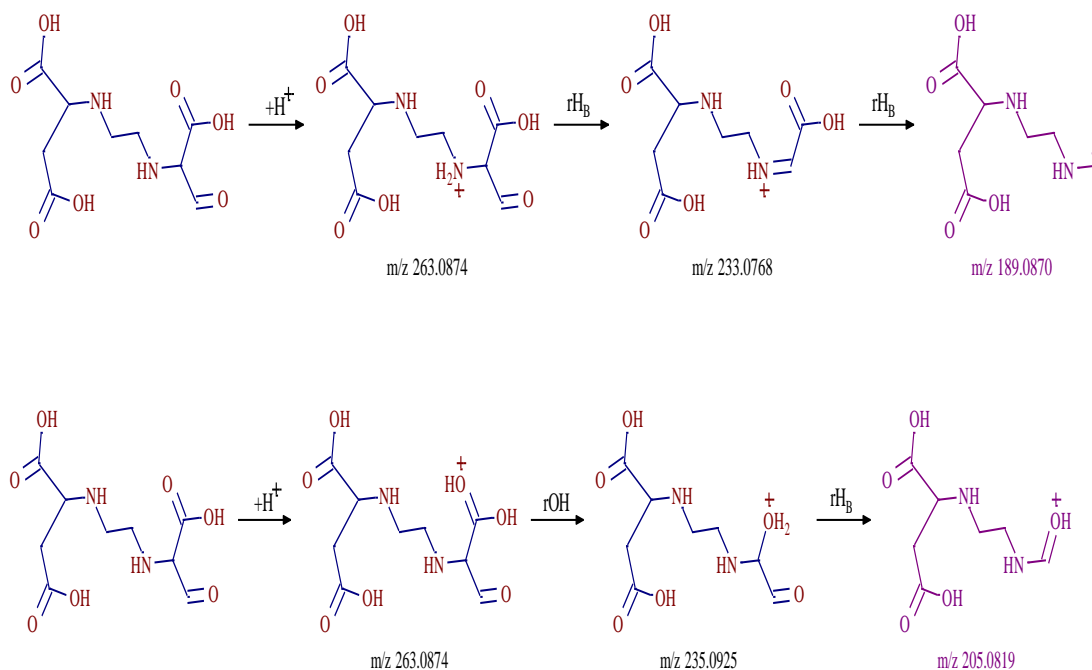


Figure 66 : Chromatogramme de fragmentation de l'ion 263 [M+H] (intermédiaire « d ») et extraction du signal des ions spécifiques (189.0870, 205.0819, 233.0768, 177.087, 201.087).

Dans les Figure 67 et 68, nous présentons les mécanismes théoriques de fragmentation de d1 et d2 pour obtenir les fragments : 189.087, 205.0819, 233.0768, 177.087, 201.087

Fragmentation de d1



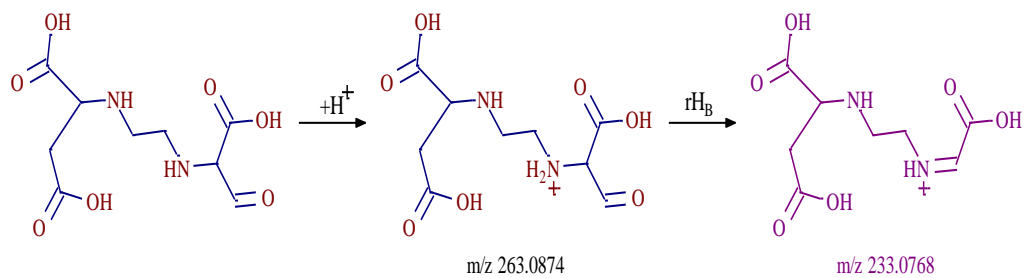


Figure 67: Mécanismes théoriques pour l'obtention des ions 189.087, 205.0819, 233.0768 à partir du composé d1.

Fragmentation de d2

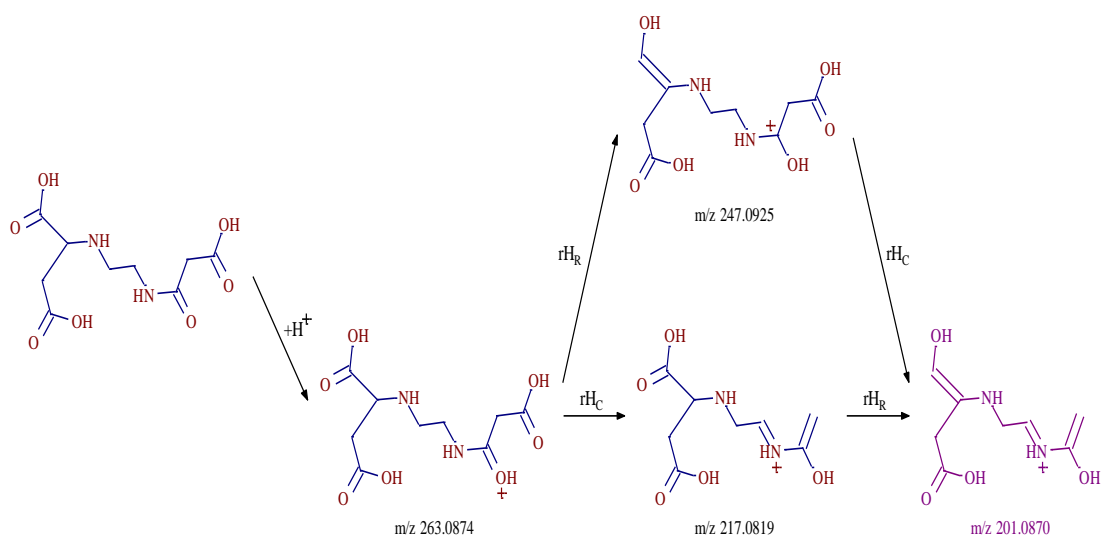
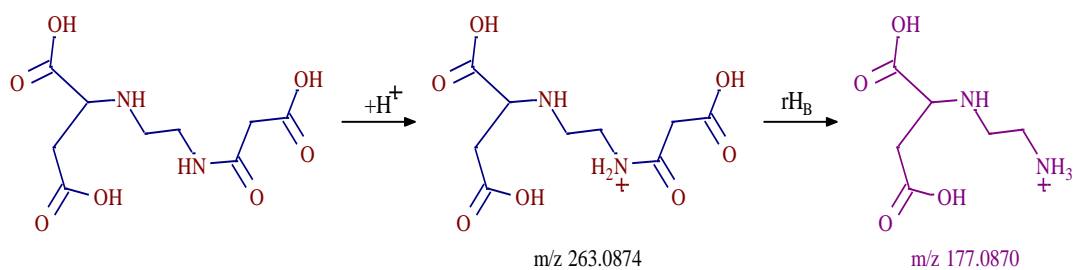


Figure 68: Mécanismes théoriques pour l'obtention des ions : 177.087, 201.087 à partir du composé d2.

3. Conclusion

Grâce à ce travail, nous avons pu montrer la présence effective des deux isomères de constitution d1 et d2, ce qui conforte les mécanismes de transformation photochimique du complexe Fe(III)-EDDS proposés dans les voies 1 et 2 de notre publication (Jaber et al., 2020). Cette étude supplémentaire réalisée en spectrométrie de masse confirme également la présence du processus photoredox (LMCT) entre le Fe(III) et le ligand EDDS *via* les fonctions acides carboxyliques.

PARTIE 3 : Transformations biotique et abiotique des acides aminés dans la phase aqueuse atmosphérique

3.1-Introduction

La composition de la matière organique (MO) de la phase aqueuse des nuages est très complexe; elle a été décrite en utilisant la spectrométrie de masse par résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR MS)(Bianco et al., 2018; Zhao et al., 2013). Ces méthodes analytiques globales ont révélé un très grand nombre de composés organiques carbonés, soufrés et azotés. Parmi ces molécules azotées, les acides aminés (AA) ont été récemment analysés et quantifiés dans des gouttelettes de nuages collectées au puy de Dôme (Bianco et al., 2016) et sur les îles du Cap-Vert (Triesch et al., 2020). En raison de leur faible volatilité, on peut supposer qu'ils ne sont pas présents dans la phase gazeuse des nuages.

Dans l'eau atmosphérique (nuages, brouillard, pluie), ils sont sujets à des transformations, cependant les processus impliqués restent peu connus.

Concernant la transformation abiotique dans les eaux atmosphériques, certaines études ont déterminé les constantes de réactivité (K) des AA avec des radicaux (par exemple OH), l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) ou l'ozone (O_3). Sur la base de ces constantes, certaines études ont rapporté la durée de vie des acides aminés dans le brouillard (McGregor and Anastasio, 2001) ou dans l'eau de nuage (Triesch et al., 2020). D'après ces études, il est clair que certains AA sont transformés très rapidement, tandis que d'autres ne sont presque jamais transformés pendant la durée de vie du brouillard ou des nuages.

Un autre aspect manquant concerne la biotransformation potentielle de ces AA dans l'eau atmosphérique. On sait depuis longtemps que les micro-organismes ont des réseaux enzymatiques capables de biodégrader ou de bio-synthétiser les acides aminés. Ces voies sont complexes et très interconnectées (base de données des voies KEGG). Récemment Amato et al (2019) ont mis en évidence la présence de transcrits codant pour des enzymes du métabolisme des AA directement *in situ* dans de l'eau de nuage. D'autres auteurs ont calculé des DI (Degradation Index) suggérant des mécanismes de biodégradation dans l'eau de pluie.

Ces travaux suggèrent une biotransformation effective des AA dans les eaux atmosphériques. Cependant aucune mesure de vitesse de biodégradation des AA avec des microorganismes des nuages n'a été réalisée jusqu'alors ; il n'est donc pas possible d'évaluer l'impact de ce processus biologique par rapport aux processus chimiques dans les nuages.

L'objectif de cette partie de thèse était d'une part de mesurer les vitesses de biotransformation des AA par des souches bactériennes isolées des nuages et d'autre part de comparer l'efficacité biologique et chimique de transformation des AA dans la phase aqueuse des nuages.

Pour atteindre ces objectifs nous avons opté pour une démarche relativement analogue à celle développée pour la dégradation du phénol et du catéchol avec une approche expérimentale et une approche théorique.

- **Approche expérimentale**

Nous avons mesuré les vitesses de transformation biotiques et abiotiques des AA dans des microcosmes imitant les conditions nuageuses :

- milieu d'incubation contenant 19 AA, d'autres sources de carbone (acétate, succinate, formiate, oxalate) et d'azote (NH_4^+ , NO_3^-) ainsi que de sels majeurs (par exemple, Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) présents dans l'eau des nuages collectée à la station du puy de Dôme.
- irradiation en lumière artificielle et en présence de complexe Fe(III)-EDDS pour la création de radicaux OH.
- incubation à 17°C mimant la température moyenne estivale au puy de Dôme.
- bitransformation par quatre souches de bactéries (*Pseudomonas graminis* PDD-13b-3, *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28, *Sphingomonas* PDD-32b-11 et *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74) isolées du l'eau de nuage au puy de Dôme et représentatives de cet environnement.

Pour cette partie notre première tâche a été de développer une méthode d'analyse en UPLC-HRMS pour quantifier les AA libres, directement dans le milieu nuage artificiel sans concentration ni dérivation.

- **Approche théorique**

Des taux de transformation abiotique ont été calculés en utilisant les constantes de réactivité des AA en phase aqueuse avec le radical OH, $^1\text{O}_2$ et O_3 rapportées dans la littérature.

Dans ce cas nous n'avons pas utilisé de modélisation (Box Model) pour appréhender la chimie multiphasique du nuage car nous avons considéré que les AA ne sont pas présents dans la phase gaz à cause de leur très forte solubilité.

Les taux de transformations biotiques et abiotiques mesurés expérimentalement ont été ensuite comparés avec les taux calculés théoriquement. Ces résultats ont été discutés en termes d'implication pour l'atmosphère.

Ce travail a été mené en collaboration avec Muriel Joly pour la microbiologie, Maxence Brissy et Martin Lereboure pour la spectrométrie de masse, Amina Khaled et Barbara Ervens pour les calculs théoriques.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'une publication actuellement en discussion dans Biogeosciences :

S. JABER, M. JOLY, M. BRISSY, M. LEREMBOURE, A. KHALED, B. ERVENS, and A-M. DELORT. Biotic and abiotic transformation of amino acids in cloud water: Experimental studies and atmospheric implications. *Biogeosciences Discuss.*, <https://doi.org/10.5194/bg-2020-250-RC1>, 2020.

3.2-Biotic and abiotic transformation of amino acids in cloud water: Experimental studies and atmospheric implications.



Biotic and abiotic transformation of amino acids in cloud water: Experimental studies and atmospheric implications.

5 Saly Jaber, Muriel Joly, Maxence Brissy, Martin Lereboure, Amina Khaled, Barbara Ervens, and Anne-Marie Delort*

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

10

*Corresponding author: A-Marie.delort@uca.fr

Abstract

The interest for organic nitrogen and particularly for quantifying and studying the fate of amino acids (AA) has been growing in the atmospheric science community. However very little is
15 known about biotic and abiotic transformation mechanisms of amino acids in clouds.

In this work, we measured the biotransformation rates of 18 amino acids with four bacterial strains (*Pseudomonas graminis* PDD-13b-3, *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28, *Sphingomonas* PDD-32b-11 and *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74) isolated from cloud water and representative of this environment. At the same time, we also determined the abiotic
20 (chemical, OH radical) transformation rates within the same solutions mimicking the composition of cloud water. We used a new approach by UPLC-HRMS to quantify free AA directly in the artificial cloud water medium without concentration and derivatization.

The experimentally-derived transformation rates were used to compare their relative importance under atmospheric conditions and compared to the chemical loss rates based on
25 kinetic data of amino acid oxidation in the aqueous phase. This analysis shows that previous estimates overestimated the abiotic degradation rates, and thus underestimated the lifetime of amino acids in the atmosphere as they only considered loss processes but did not take into account the potential transformation of amino acids into each other.

30 1. Introduction

The organic matter (OM) content of the cloud water phase is very complex; it has been described using Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FT-ICR MS) (Bianco et al., 2018; Zhao et al., 2013). These global analytical methods revealed a very large number of organic carbon, organic sulfur and organic nitrogen compounds. For instance, in
35 cloud water at the puy de Dôme, 5258 monoisotopic molecular formulas were assigned to CHO,



CHNO, CHSO, and CHNSO (Bianco et al., 2018). Organic nitrogen compounds contribute a significant fraction to the total nitrogen in cloud water (18%) (Hill et al., 2007) and in aerosol particles 7 – 10% in urban areas (Xu et al., 2017) or even exceed other nitrogen contributions in marine aerosol (Miyazaki et al., 2011). Among these organic nitrogen molecules, amino acids (AA) have been recently analyzed and quantified in cloud droplets collected at the puy de Dôme station (Bianco et al., 2016a) and on the Cape Verde Islands (Triesch et al., 2020). AA were also quantified in rain collected in marine and sub-urban sites (Mace et al., 2003b, 2003a; Mopper and Zika, 1987; Sidle, 1967; Xu et al., 2019; Yan et al., 2015), and in fog samples in Northern California (Zhang and Anastasio, 2003). In cloud water, free AA concentrations range from 2.4±2.0 to 74.3±43.8 $\mu\text{g C L}^{-1}$ at the rural site of the puy de Dôme (Bianco et al., 2016a) and from 17 to 757 $\mu\text{g C. L}^{-1}$ at the marine site of Cape Verde (Triesch et al., 2020). These AA are from biological origin and are building blocks of peptides (also called ‘combined AA’) and proteins. They are initially present in aerosols which are further dissolved in atmospheric waters (Matos et al., 2016). Primary and secondary atmospheric sources of AAs are discussed in previous reviews (Cape et al., 2011; Sutton et al., 2011). Biomass burning (Zhu et al., 2020), grassland (Scheller, 2001), ocean (Triesch et al., 2020) and agricultural activities (Song et al., 2017) were identified as major emission sources of amino acids.

Although organic carbon has been studied for a long time by atmospheric scientists, the interest for organic nitrogen and particularly for quantifying and studying the fate of AAs has been growing these last decades due to their specific properties. Some AA can act as ice nuclei, for instance L-leucine nucleates ice at -4.5°C (Szyrmer and Zawadzki, 1997). Their mass can also add to the hygroscopic fraction of cloud condensation nuclei due to their high water-solubility (Kristensson et al., 2010). Another point concerns the participation of AA in the global nitrogen and carbon cycles. For example, it has been estimated that organo-nitrogen compounds are a significant fraction (28%) of the total nitrogen deposited (Zhang et al., 2012). Their ubiquity in living organisms makes their presence in atmospheric deposition very important for both terrestrial and aquatic ecosystems as AA represent the most bioavailable form of nitrogen (Cornell, 2011).

Finally, as part of the atmospheric OM, AA are expected to undergo chemical processes in the atmospheric water phase (clouds, fog, aerosol). Due to their low volatility, it can be assumed that they are not present in the gas phase. However little is known on their transformation processes occurring in the atmospheric compartments, and particularly in clouds.

Concerning abiotic transformation (phototransformation and radical chemistry) in atmospheric waters, some studies determined kinetic rate constants (k) of AAs with radicals (e.g. OH)



(Scholes et al., 1965; Motohashi and Saito, 1993; Prütz and Vogel, 1976) , singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) (Kraljić and Sharpatyi, 1978; Matheson and Lee, 1979; McGregor and Anastasio, 2001; Michaeli and Feitelson, 1994; Miskoski and García, 1993 ; McGregor and Anastasio, 2001) or ozone (O_3) (Ignatenko and Cherenkevich, 1985 ; Pryor et al., 1984). Based on such kinetic data, some studies have reported the time of life of amino acids in fog (McGregor and Anastasio, 2001) or in cloud water (Triesch et al., 2020). From these studies it is clear that some amino acids are transformed very rapidly, while others are almost never transformed within the time scale of fog or cloud life. When additional effect of $^1\text{O}_2$ was considered, MET, TRP, TYR and HIS remained the most degraded AA (McGregor and Anastasio, 2001). Among other mechanisms, this fast degradation could explain why these AA are usually among the less concentrated in aerosols (Barbaro et al., 2011, 2015; Helin et al., 2017; Mace et al., 2003a; Mashayekhy Rad et al., 2019; Matsumoto and Uematsu, 2005; Samy et al., 2013; Yang et al., 2004), in rain (Mace et al., 2003a; Xu et al., 2019; Yan et al., 2015) or in clouds (Triesch et al., 2020). The characterization of amino acids in dew showed differences depending on seasons, meteorological parameters and irradiation conditions (Scheller, 2001). Even less is known about the abiotic transformation pathways of these amino acids, as only some AA have been studied in detail. Most mechanistic studies are limited to the transformation of AA (GLY, TRP, ASP, SER) into small carboxylic acids such as acetic, oxalic, malonic or formic acids (Berger et al., 1999; Bianco et al., 2016b; Marion et al., 2018). In some cases, an amino acid can be converted into another one or into very different molecules (Bianco et al., 2016b; Mudd et al., 1969; Prasse et al., 2018; Stadtman, 1993; Stadtman and Levine, 2003). The main concern with these mechanistic studies, is that they were performed under conditions rather far from atmospheric conditions. Incubation media did not contain a mixture of AA or real atmospheric samples. More they were sometimes measured with proteins in which the peptidyl bond might change the reactivity compared to free AA (Pattison et al., 2012). Another missing aspect concerns the potential biotransformation of these AAs in atmospheric waters. The microbial community which is present in cloud waters is metabolically active (Amato et al., 2017, 2019; Vařtilingom et al., 2012) and has been shown the biotransform mono and dicarboxylic acids, methanol, formaldehyde, phenol and catechol (Ariya et al., 2002; Husárová et al., 2011; Jaber et al., 2020; Vařtilingom et al., 2010, 2011, 2013). It is well-known that microorganisms have enzymatic networks able to biodegrade or biosynthesize amino acids. These pathways are complex and very interconnected (KEGG pathway database) . However, no data exist about the biotransformation rates and metabolic pathways of AAs in cloud water.



The aim of the present study is thus to measure biotic and abiotic rates of transformation of free AA in microcosms mimicking cloud water with an incubation medium containing 19 AA, other major carbon (acetate, succinate, formate, oxalate) and nitrogen sources (NH_4^+ , NO_3^-) as well as major salts (e.g., Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-}) present in cloud water collected at the puy de Dôme station (Deguillaume et al., 2014). In addition, abiotic transformation rates are calculated based on rate constants of oxidation reactions with OH^\cdot , $^1\text{O}_2$ and O_3 as reported in the literature. These experimental and theoretical rates of transformation are compared with each other and to previous literature studies and are discussed in terms of their atmospheric implications.

2. Materials and Methods

2.1 Experiments in microcosms

The experiments of biotic and abiotic transformation of amino acids were performed in microcosms mimicking cloud conditions at the puy de Dôme station (1465 m). Solar light was fitted to that measured directly under cloudy conditions and the temperature (17°C) was representative of the average temperature in the summer. Incubations were performed in an artificial cloud water medium containing inorganic ions, carboxylic acids and amino acids within the same range of concentrations as those measured in clouds that were impacted by marine air masses collected at the puy de Dôme station (Table S1, $\text{pH} = 6.0$) (Bianco et al., 2016a; Deguillaume et al., 2014). *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28, *Pseudomonas graminis* PDD-13b-3, *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74 and *Sphingomonas* sp. PDD-32b-11 bacterial strains were chosen because they belong to the most abundant and active bacterial genera in cloud water (Amato et al., 2017; Vaïtilingom et al., 2012). In addition, the complete genome sequences of *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28, *Pseudomonas graminis* PDD-13b-3, *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74 have been published recently giving access to their metabolic pathways in more detail (Besaury et al., 2017a, 2017b; Lallement et al., 2017). Bacterial cell concentrations used in the experiments ($\sim 5 \times 10^5$ cells mL^{-1}) for biotransformation were consistent with those present in cloud water (Vaïtilingom et al., 2012). All experiments were performed in triplicates.

2.1.1 Cell preparation for further incubations

Rhodococcus enclensis PDD-23b-28, *Pseudomonas graminis* PDD-13b-3, *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74 and *Sphingomonas* sp. PDD-32b-11 were grown in 10 mL of R2A medium for 16 h at 17°C , 130 rpm (Reasoner and Geldreich, 1985). Then 1 mL of cultures were centrifuged at 12500 rpm for 3 min. Bacteria pellets were rinsed two times with 1 mL of



artificial marine cloud water, previously sterilized by filtration under sterile conditions using a 0.22 μm PES filter. The bacterial cell concentration was estimated by optical density at 600 nm using a spectrophotometer UV3100 to obtain a concentration close to 5×10^5 cell mL^{-1} . Finally, the concentration of cells was precisely determined by counting the colonies on R2A Petri dishes or by flow cytometry technique.

2.1.2 Biotransformation of amino acids

Rhodococcus enclensis PDD-23b-28, *Pseudomonas graminis* PDD-13b-3, *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74 and *Sphingomonas* sp. PDD-32b-11 cells were each resuspended in a 50 mL flask of 1 μM amino acids (19 amino acids namely alanine (ALA, SIGMA), arginine (ARG SIMAFEX), asparagine (ASN, SIGMA), aspartate (ASP, Aldrich-Chemie), glutamine (GLN, SIGMA), glutamic acid (GLU), glycine (GLY, MERCK), histidine (HIS, SIGMA), isoleucine (ILE SIGMA-ALDRICH), lysine (LYS, SIGMA-ALDRICH), methionine (MET, SIGMA), phenylalanine (PHE, ACROS organics), proline (PRO, SIGMA-ALDRICH), serine (SER, SIGMA), threonine (THR, SIGMA), tryptophan (TRP, SIGMA), tyrosine (TYR, SIGMA-ALDRICH), valine (VAL, SIGMA-ALDRICH), cysteine (CYS, SIGMA-ALDRICH)/ 1 μM of each amino acid), prepared in artificial cloud water (Table S1) and incubated at 17 °C, 130 rpm agitation for 7 hours in the dark. A control experiment was performed by incubating amino acids without bacteria; AA concentration remained stable over time (1 μM for each amino acid was obtained at the end of the experiment).

2.1.3 Abiotic transformation of amino acids

The same 19 amino acids, at a concentration of 1 μM each in the artificial cloud medium (Table S1) were incubated at 17°C, 130 rpm agitation for 7 hours in photo-bioreactors designed by Vařtilingom et al. (2011). OH radicals were generated by photolysis adding 0.5 mM Fe-Ethylenediamine-*N,N'*-disuccinic acid (EDDS) complex solution. The Fe(EDDS) solution (iron complex with 1:1 stoichiometry) was prepared from iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich) and (S,S)-ethylenediamine-*N,N'*-disuccinic acid trisodium salt (EDDS, 35% in water). A complementary experiment was also performed consisting of incubation of this solution in the presence of light without Fe(EDDS) complex. The experimental conditions of the irradiation experiments (Sylvania Reptistar lamps; 15 W; 6500 K) and the mechanism of the $\bullet\text{OH}$ radical production under light irradiation are described by Jaber et al. (2020). Assuming steady-state conditions for $\bullet\text{OH}$ at the beginning of the experiments (i.e., equal $\bullet\text{OH}$ production and loss rates), an $\bullet\text{OH}$ concentration of $8.3 \cdot 10^{-13}$ M was calculated as described by



Jaber et al. (2020). This concentration is at the upper limit of $\cdot\text{OH}$ concentrations in cloud water as derived from various model studies (Arakaki et al., 2013; Lallement et al., 2018).

2.2 Analytical methods

2.2.1 Amino acid UPLC-HRMS Analyses

5 During the experiments in microcosms, 600 μL of the incubation medium were sampled regularly and centrifuged at 10 500 $\times g$ for 3 min and the supernatants were kept frozen until analyses. In order to quantify the amino acid concentrations in the incubations we developed here a new approach using a LC-HRMS technique based on a direct measurement by injection of the incubation medium without derivatization. All AAs could be quantified under these
10 conditions, except cysteine.

LC-HRMS analyzes of amino acids were performed using an UltiMate™ 3000 (Thermo Scientific™) UHPLC equipped with a Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer (Thermo Scientific™) ionization chamber. Chromatographic separation of the analytes was performed on BEH Amide/HILIC (1.7 μm , 100 mm \times 2.1 mm) column with
15 column temperature of 30°C. The mobile phases consisted of 0.1% formic acid and water (A) and 0.1% formic acid and acetonitrile (B) with a flow rate 0.4 mL min^{-1} . A four-step linear gradient of 10% A and 90% B in 8 min, 42% A and 58% B in 0.1 min, 50% A and 50% B for 0.9 min, 10% A and 90% B for 3 min was used throughout the analysis.

The Q Exactive ion source was composed of an electrospray ionization (ESI+) and the Q-Orbitrap™. Flow injection analyses were performed for individual amino acid solutions in order to obtain the mass spectra, from which ions were selected using the SIM (Selected Ion Monitoring) mode. The instrument was set for maximum ion throughput, the automatic gain control target or the number of ions to fill C-Trap was set to 10^5 for a maximum injection time of 100 ms. Gas (N_2) flow rate and sheath gas (N_2) flow rate were set at 13 a.u. and 50 a.u.
20 respectively. Other parameters were as follows: 2 a.u. for the sweep gas flow rate, 3.2 kV for the spray voltage in positive mode, 320°C and 425°C for the capillary temperature and the heater temperature, respectively. Under these conditions the mass resolution was 35000 fwhm. Analysis and visualization of the mass data were performed using Xcalibur™ 2.2 software (Thermo Scientific™).

30 Table S2 presents the retention times and values of m/z for the ions $[\text{M}+\text{H}]$ measured under these conditions for each amino acid.



2.2.2 Calibration curves, LOD and LOQ determination

In order to quantify the amino acid concentrations, calibration curves were established for each experimental series of LC-HRMS analyses. In standard solutions, six concentrations of amino acids (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 μM) were used for these external standard multipoint calibrations. This range of concentrations is appropriate considering that the initial amino acid concentration in the biotic and abiotic transformation experiments is $1\mu\text{M}$. Figure S1 presents an example of calibration curves for the 18 amino acids. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the response (S_a) and on the slope of the calibration curves (b) (technical triplicate).

$$\text{LOD}=3S_a/b \mu\text{M}$$

$$\text{LOQ}=6S_a/b \mu\text{M}$$

The obtained values of LOD and LOQ were considered to be fit-for-purpose (Table S2).

2.2.3 Calculation of amino acids degradation rates in microcosms

The degradation rates of amino acids were calculated after normalization based on the ratio of the concentration at time t (C_t) and the concentration at time $t = 0$ (C_0). The pseudo-first-order rate constants ($k_{\text{isoleucine}}$, k_{valine} , k_{proline} ...) were determined using Equation 1:

$$\text{Ln}(C_t/C_0) = f(t) = -k_{\text{amino acid}} t \quad [\text{Eq-1}]$$

The slopes at the origin were used to calculate the corresponding degradation rates. For biotransformation, the rates were corrected by the precise number of bacterial cells present in the incubations and are expressed in the form of $\text{mol cell}^{-1} \text{h}^{-1}$. An example is given in Figure S2a and b for the case of the biodegradation of GLN.

3. Results and discussion

3.1 Biotransformation of amino acids in microcosms

3.1.1 Biotransformation rates of the 18 amino acids by the different bacterial strains

The biotransformation of alanine, arginine, asparagine, aspartate, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tryptophan, tyrosine, valine and glutamine by four different bacterial strains isolated from cloud water at the puy de Dôme station in a marine artificial cloud medium was monitored in four independent microcosms containing only one of the strains. Figure 1 shows the results obtained for each amino acid and each bacterial strain (*Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28, *Pseudomonas graminis* PDD-13b-3, *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74 and *Sphingomonas* sp. PDD-32b-



11). The standard error bars reflect significant biological variability measured from three triplicates (independent incubations). Note that the biotransformation rates of valine, isoleucine and glycine could be obtained only for one replicate due technical problems. Table 1 summarizes the average values of the biodegradation rates of the 18 amino acids for the four bacterial strains. These average values for biodegradation (negative values) range from $-1.03 \times 10^{-14} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ to $-8.02 \times 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$, i.e. spanning a range of almost two orders of magnitude depending on the amino acid and the bacteria strain. Note that in the case of glycine and the strain *Pseudomonas graminis* PDD-13b-3, and of aspartate and the strain *Sphingomonas* sp. PDD-32b-11, the values are positive, indicating a net synthesis and not a net loss. The incubations were performed in a complex medium containing all AA, and as a consequence the rate values are actually net values as all the AA are connected through metabolic pathways corresponding to both biodegradation and biosynthetic pathways (Figure S3).

Overall *Pseudomonas graminis* PDD-13b-3 appears to be the most active strain followed by *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 (Figure 1, Table 1). However, for some amino acids, this order is reversed, *Rhodococcus enclensis* degrades alanine, asparagine, phenylalanine and tryptophan more efficiently than *P. graminis* does. For all amino acids, *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74 is less active than *R. enclensis* and *P. graminis* followed by *Sphingomonas* sp. PDD-32b-1.1

Considering the best degrading strains (Figure 1 and Table 1), the most efficiently biodegraded amino acids are in the order valine > alanine > arginine > glutamate > glutamine > lysine > proline > asparagine > arginine > serine > tryrosine > aspartate, with biodegradation rates within the range of 10^{-14} to $10^{-15} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A second group of AA have lower biodegradation rates in the range of 10^{-16} to $10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in the following order: phenylalanine > threonine > histidine > methionine > glycine > isoleucine > tryptophan.

25

3.1.2 Link of the biodegradation rates with metabolic pathways

In bacteria many amino acids are connected within the same metabolic pathways *via* the enzymatic activities of their biosynthesis or biodegradation. Figure S3 presents a simplified network of the AA metabolic pathways as described in KEGG pathway database where the AA belonging to the same pathway are shown in the same color. We investigated the hypothesis of a potential link between the rates of biodegradation for each amino acid by the four strains with their connection in specific metabolic pathways (Figures S3 and S4). Glutamate, glutamine, proline and arginine metabolic pathways are closely linked (blue boxes in Figure S3) and in parallel their biodegradation rates are on the same order of magnitude (Figure S4). This is also

30



true for the group of serine, threonine glycine and methionine (yellow boxes in Figure S3), and for the group tyrosine, phenylalanine and tryptophan (green boxes in Figure S3), respectively. Alanine, asparagine and aspartate (purple boxes in Figure S3) are also related in the network, although the rate of biodegradation of aspartate is lower compared to the other two. Valine and isoleucine biodegradation rates are quite different; this can be explained by two divergent routes: valine is produced from pyruvate, while isoleucine is formed from 2-oxobutanoate. Histidine has a unique metabolic pathway, while lysine is also a special case as two metabolic routes exist: one is linked to 2-oxoadipate, the other is connected to alanine, aspartate and asparagine. To conclude, the rates of biodegradation can be grouped according to their presence in common metabolic pathways. This could explain, as suggested by (Scheller, 2001), why in dew, the concentrations ARG, PRO and GLU, three AA belonging to the same pathway and connected to the urea cycle (Figure S3), were increasing simultaneously.

3.1.3 Dependence of the selectivity of AA biodegradation on the bacterial phylogeny

The rates of biodegradation of the different amino acids expressed as a percentage of the highest rate for each strain are presented in the form of a radar plot in Figure S5. A clear difference is observed between *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 belonging to Actinobacteria (Figure S5a) and the other strains belonging to Proteobacteria (Figure S5b and c). Within Proteobacteria, it is possible to distinguish *Sphingomonas* sp PDD-32b-11 (Figure S5b) belonging to α -Proteobacteria from *Pseudomonas graminis* PDD-13b-3 (grey, Figure S5c) and *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74 (yellow, Figure S5c) belonging to γ -Proteobacteria. In addition, the two *Pseudomonas* strains share very similar trends. So, although the biodegradation rates of *P. syringae* are much lower than those of *P. graminis*, they seem to transform preferentially the same type of amino acids. This should be confirmed with a larger set of isolates. It suggests that the selectivity of AA biodegradation could be related to the phylogeny of the bacterial strains.

3.2 Abiotic transformation of amino acids in microcosms

The abiotic transformation rates of the amino acids measured in the experiments in our microcosms are shown in Table 2 and Figure 2. The first important result is that some amino acids are degraded (TYR, THR, MET, TRP, SER, GLU, VAL, HIS, ALA, ILE) while others are produced (ASN, PRO, GLY, ARG, LYS, GLN, ASP). Abiotic degradation rates (negative values of the transformation rates) were within the range of $-7.98 \cdot 10^{-8}$ to $-9.70 \cdot 10^{-7} \text{ mol h}^{-1} \text{ L}^{-1}$. Net abiotic production rates (positive values) were within the range of $7.69 \cdot 10^{-8}$ to $1.05 \cdot 10^{-6} \text{ mol h}^{-1} \text{ L}^{-1}$, except for ASP whose rate was very high ($3.79 \cdot 10^{-5} \text{ mol h}^{-1} \text{ L}^{-1}$). As mentioned in the context of biotic transformations (Section 3.1.1), the incubations are performed in artificial



cloud media containing the mixture of the 19 AA, and, thus, the measured rates of abiotic transformations are net values, integrating various mechanisms.

3.3 Comparison of amino acid biotic and abiotic transformation rates

5 3.3.1 Kinetic rate constants for chemical oxidation reactions

In order to assess the atmospheric importance for the transformation of individual amino acids, we make the following assumptions. Loss by OH reactions occur with the rate constants listed in Table S3 and an OH(aq) concentration of $1 \cdot 10^{-14}$ M (Arakaki et al., 2013). For the oxidation by ozone, ozone has a concentration in cloud water of 0.5 nM which corresponds to a gas phase mixing ratio of 50 ppb, using $K_H(\text{O}_3) \sim 10^{-3}$ M atm⁻¹ (Sander, 2015). It has been shown previously that the rate constants of amino acids with ozone are strongly pH dependent, with smaller values for the protonated amino form (McGregor and Anastasio, 2001). Since the first acid dissociation constants (pK_{a1}) for all amino acids are in the range of 2 – 2.5 and the second acid dissociation constants (pK_{a2}) (de/protonation of the amino group) in the range of 9 – 9.5 (Haynes, 2010), it can be assumed that at cloud-relevant pH values ($3 < \text{pH} < 6$) the amino acids are present as carboxylates with protonated amine groups. In addition, we also consider the oxidation by singlet oxygen ¹O₂. Kinetic rate constants for only about half of the amino acids are available (Table S3). The estimates for ¹O₂ concentrations in the atmospheric aqueous phase are much sparser and less constrained than for the other oxidants. However, several studies agree that its concentration may be two to three orders of magnitude higher than the OH radical in clouds, fogs and aerosol particles, respectively (Faust and Allen, 1992; Manfrin et al., 2019). Therefore, we assume an aqueous concentration of [¹O₂(aq)] = 10⁻¹² M here. Other oxidants (e.g. HO₂/O₂⁻, NO₃) are not included in our analysis as based on the few available kinetic data, it can be estimated that reaction rates may be too slow to represent an efficient sink (McGregor and Anastasio, 2001).

3.3.2 Comparison of biotic and abiotic transformation rates

In order to compare the relative importance of biotic (microbial) and abiotic (chemical) transformations under atmospheric conditions, we weight the experimentally derived biotransformation rates by the relative abundance of the various bacteria strains as found in cloud water. An average concentration of $6.8 \cdot 10^7$ bacterial cells per liter of cloud water was identified in cloud water samples at the puy de Dôme (France) (Vařtilingom et al., 2012). Further characterization of these samples showed that Actinobacteria (*Rhodococcus enclensis*



PDD-23b-28), α -Proteobacteria (*Sphingomonas* sp PDD-32b-1) and γ -Proteobacteria (*Pseudomonas graminis* PDD-13b-3 and *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74) contributed to 6.3%, 16.2% and 29.8%, respectively, to the total cell concentration (Amato et al., 2017); the remaining 47.7% belonged to other phyla or classes (Bacteroidetes, beta-Proteobacteria, Firmicutes...).

Using these relative contributions, the loss rates as observed in our experiments (Section 3.1 and 3.2) were used to compare the loss rates under atmospheric conditions. For this comparison, we calculated the biotransformation rates in cloud water as

$$\frac{d[AA]}{dt} = -0.063 \cdot 1.91 - 0.162 \cdot 1.91 - \frac{29.8}{2} \cdot 1.91 - \frac{29.8}{2} \cdot 1.91 \quad [\text{Eq-2}]$$

We scaled each contribution by a factor 1.91 (= 100/52.3) implying that the four bacteria types are representative for the remainder (47.7%) of the bacteria population.

We compare these rates to the photochemical rates derived in the experiments (Section 3.2).

However, since the experiments were conducted with OH concentrations likely higher than ambient ones in cloud water, we correct these rates to OH(aq) concentrations in clouds by

$$\left(\frac{d[AA]}{dt}\right)_{photo,exp} = -k_{photo,exp} \cdot \frac{[OH(aq)]_{photo,exp}}{[OH(aq)]_{cloud}} \quad [\text{Eq-3}]$$

with $[OH(aq)]_{photo,exp} = 8.3 \cdot 10^{-13}$ M and $[OH(aq)]_{cloud} = 1 \cdot 10^{-14}$ M.

Finally, these experimentally-based abiotic transformation rates based on the experiments are compared to those calculated based on kinetic data only.

$$\left(\frac{d[AA]}{dt}\right)_{cloud} = -k_{OH} [OH]_{cloud} - k_{O_3} [O_3]_{cloud} - k_{HO_2} [HO_2]_{cloud} \quad [\text{Eq-4}]$$

In previous studies, the reactivity towards the OH radical and/or other oxidants was compared in terms of half-lives τ . However, we chose not to present half-lives here because net production terms as observed in the experiments cannot be represented and would result in unphysical, negative values for τ .

The comparison between the rates calculated by Equations 2 - 4 is shown in Figure 3. For some of the acids (ALA, GLU, THR) the predicted losses by OH from both approaches (photochemical experiments and based on kinetic data) are similar. For some AAs, it is predicted that the oxidation by ozone might contribute significantly more to their loss. For



several of the acids, biotransformation is predicted to exceed the loss by chemical reactions (e.g. ALA, ASN, GLU, PRO, VAL), for the bacteria cell and oxidant concentrations considered here. Note that the loss rates calculated by Equation 4 cannot reproduce the observed production of the various acids as observed in the experiments with the mixture of all amino acids.

5

3.3.3 Amino acid conversions

The oxidation of amino acids by a variety of oxidants has been performed in lab experiments. Results of such experiments are summarized in Table S4. It is obvious that generally most oxidation reactions lead to smaller fragmentation products and not to amino acids, independent
10 of the oxidant. A detailed discussion of the previously suggested reaction mechanisms of OH and/or HO₂/O₂⁻ initiated amino acid oxidation has been given by Stadtman and Levine (2003). The studies summarized in Table S4 were not motivated by the investigation of amino acid oxidation pathways in the atmospheric aqueous phase. However, our experimental results suggest that some of the amino acids may be the product of oxidation reactions from precursor
15 amino acids, in qualitative agreement with some of the experiments listed in Table S4. The products and their distributions, however, are different than in the metabolic pathways shown in the KEGG mechanism (Figure S3). There are some similarities between the biotransformation and oxidation products, such as the formation of aspartic acid and asparagine from histidine, tyrosine formation from phenylalanine and glutamic acid formation from
20 proline. However, as the yields in the oxidation reactions were not reported, the efficiency of the various pathways for the formation of these acids cannot be estimated.

Our experiments suggest that amino acids can not only be chemically degraded in cloud water but also produced. While such transformation cycles are known from biological systems (KEGG mechanism, Figure S3), the production of amino acids by oxidation reactions in cloud
25 water has not been discussed in the literature. Previous model studies of amino acids in the atmospheric aqueous phase only compared the half-life times of the acids to each other or for different oxidants, solely based on kinetic data (McGregor and Anastasio, 2001; Triesch et al., 2020). Our study suggests that such estimates underestimate the concentrations of amino acids in the atmosphere since they ignore any production. These findings are qualitative as the product
30 yields and distributions are not known. Many of the experiments listed in Table S4 were performed under conditions that are not necessarily atmospherically relevant.



4. Summary, conclusions and atmospheric implications

We measured the biotic (microbial) transformation rates of 18 amino acids with four bacteria strains (*Pseudomonas graminis* PDD-13b-3, *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28, *Sphingomonas* sp. PDD-32b-11 and *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74) that have been previously identified as being representative of the microbial communities in cloud water. At the same time, we also determined the abiotic (chemical, OH radical) transformation rates within the same solutions that resembled the composition of cloud water. We used a new approach by UPLC-HRMS to quantify free AA directly in the artificial cloud water medium without concentration and derivatization, improving the technique used in cloud water by (Triesch et al., 2020). This direct MS method avoids time-consuming and potential biases.

We used our experimentally-derived transformation rates to compare their relative importance under atmospheric conditions, i.e., for atmospherically relevant bacteria cell and OH concentrations in cloud water. These rates were compared to the chemical loss rates based on kinetic data of oxidation reactions of amino acids in the aqueous phase, as they were used previously to derive lifetimes of amino acids in the atmosphere. Our experiments show that previous estimates overestimated the degradation rates, and thus underestimated the lifetime of amino acids in the atmosphere as they only considered kinetic data describing loss processes but did not take into account the transformation of amino acids into each other. While such transformation cycles are well known for metabolic pathways (KEGG pathways), the mechanisms for chemical transformations are poorly constrained.

Our study qualitatively suggests that the sources and distribution of amino acids in the atmospheric particle and aqueous phases can be modified by metabolic and chemical transformation pathways. The distribution and abundance of specific amino acids in particles has been used in previous studies to conclude on aerosol sources (Barbaro et al., 2014, 2015). However, efficient abiotic and or biotic amino acid transformations during aerosol transport might alter the distribution and concentrations of amino acids so that source contributions might be more complex.

Free amino acids can represent up to 5% of WSOC in submicron sized particles but only 0.04% of WSOC in supermicron sized particles (Triesch et al., 2020), or 9.1% of DOC in cloud water (Bianco et al., 2016a). Free AA can also represent 0.4% and 0.05% of WSON in submicron and supermicron sized particles (Triesch et al., 2020). Total hydrolysed AA (THAA) can account for 0.7 to 1.8% of DOC and from 3.8 to 6.0% of DON in rain samples (Yan et al., 2015) and from 6.2 to 23 % of DOC in fog sample (Zhang and Anastasio, 2003). Considering that WSON contributes to 25% of TDN of ambient aerosols (Lesworth et al., 2010) and WSOC contributes



to 20% of TOC (Saxena and Hildemann, 1996), the understanding of the lifetime and transformation rates of amino acids are essential, in order to characterize their atmospheric abundance and residence time. Our study highlights the need for further mechanistic investigations of the biotic (metabolic) and abiotic (chemical) transformations of amino acids under conditions relevant for the atmospheric aqueous phases (clouds, fogs, aerosols). Such data should be used in atmospheric multiphase models to explore the role and competition of biotic and abiotic processes for the transformation and loss of amino acids and related compounds.



Data availability: All data can be obtained from the authors upon request.

Ethics statements: This work does not involve human or animal subject. There is no ethical problem.

Author contributions: AMD designed the experiments in microcosms. SJ, MB, MJ performed
5 the experiments. BE and AK made the calculations for the abiotic and biotic transformations. AMD, MJ and BE wrote the manuscript. All the authors read and corrected the manuscript.

Competing interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements: This work was funded by the French National Research Agency (ANR)
10 in the framework of the ‘Investment for the Future’ program, ANR-17-MPGA-0013. S. Jaber is recipient of a school grant from the Walid Joumblatt Foundation for University Studies (WJF), Beirut, Lebanon and M. Brissy from Clermont Auvergne Metropole. The authors also thank the I-Site CAP 20-25.

References

- 15 Amato, P., Joly, M., Besaury, L., Oudart, A., Taib, N., Moné, A. I., Deguillaume, L., Delort, A. M. and Debroas, D.: Active microorganisms thrive among extremely diverse communities in cloud water, PLoS One, doi:10.1371/journal.pone.0182869, 2017.
- 20 Amato, P., Besaury, L., Joly, M., Penaud, B., Deguillaume, L. and Delort, A. M.: Metatranscriptomic exploration of microbial functioning in clouds, Sci. Rep., doi:10.1038/s41598-019-41032-4, 2019.
- 25 Arakaki, T., Anastasio, C., Kuroki, Y., Nakajima, H., Okada, K., Kotani, Y., Handa, D., Azechi, S., Kimura, T., Tshako, A. and Miyagi, Y.: A general scavenging rate constant for reaction of hydroxyl radical with organic carbon in atmospheric waters, Environ. Sci. Technol., doi:10.1021/es401927b, 2013.
- 30 Ariya, P. A., Nepotchatykh, O., Ignatova, O. and Amyot, M.: Microbiological degradation of atmospheric organic compounds, Geophys. Res. Lett., doi:10.1029/2002gl015637, 2002.
- Barbaro, E., Zangrando, R., Moret, I., Barbante, C., Cescon, P. and Gambaro, A.: Free amino acids in atmospheric particulate matter of Venice, Italy, Atmos. Environ., doi:10.1016/j.atmosenv.2011.01.068, 2011.
- 35 Barbaro, E., Zangrando, R., Vecchiato, M., Piazza, R., Capodaglio, G., Barbante, C. and Gambaro, A.: Amino acids in Antarctica: evolution and fate of marine aerosols, Atmos. Chem. Phys. Discuss., doi:10.5194/acpd-14-17067-2014, 2014.
- Barbaro, E., Zangrando, R., Vecchiato, M., Piazza, R., Cairns, W. R. L., Capodaglio, G.,



- Barbante, C. and Gambaro, A.: Free amino acids in Antarctic aerosol: Potential markers for the evolution and fate of marine aerosol, *Atmos. Chem. Phys.*, doi:10.5194/acp-15-5457-2015, 2015.
- 5 Berger, P., Karpel Vel Leitner, N., Doré, M. and Legube, B.: Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine, *Water Res.*, doi:10.1016/S0043-1354(98)00230-9, 1999.
- Besaury, L., Amato, P., Wirgot, N., Sancelme, M. and Delort, A. M.: Draft genome sequence of *Pseudomonas graminis* PDD-13b-3, a model strain isolated from cloud water, *Genome Announc.*, doi:10.1128/genomeA.00464-17, 2017a.
- 10 Besaury, L., Amato, P., Sancelme, M. and Delort, A. M.: Draft genome sequence of *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74, a model strain for ice-nucleation studies in the atmosphere, *Genome Announc.*, doi:10.1128/genomeA.00742-17, 2017b.
- 15 Bianco, A., Voyard, G., Deguillaume, L., Mailhot, G. and Brigante, M.: Improving the characterization of dissolved organic carbon in cloud water: Amino acids and their impact on the oxidant capacity, *Sci. Rep.*, doi:10.1038/srep37420, 2016a.
- 20 Bianco, A., Passananti, M., Deguillaume, L., Mailhot, G. and Brigante, M.: Tryptophan and tryptophan-like substances in cloud water: Occurrence and photochemical fate, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/j.atmosenv.2016.04.034, 2016b.
- 25 Bianco, A., Deguillaume, L., Vaïtilingom, M., Nicol, E., Baray, J. L., Chaumerliac, N. and Bridoux, M.: Molecular Characterization of Cloud Water Samples Collected at the Puy de Dôme (France) by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *Environ. Sci. Technol.*, doi:10.1021/acs.est.8b01964, 2018.
- 30 Cape, J. N., Cornell, S. E., Jickells, T. D. and Nemitz, E.: Organic nitrogen in the atmosphere - Where does it come from? A review of sources and methods, *Atmos. Res.*, doi:10.1016/j.atmosres.2011.07.009, 2011.
- 35 Cornell, S. E.: Atmospheric nitrogen deposition: Revisiting the question of the importance of the organic component, *Environ. Pollut.*, doi:10.1016/j.envpol.2010.11.014, 2011.
- 40 Deguillaume, L., Charbouillot, T., Joly, M., Vaïtilingom, M., Parazols, M., Marinoni, A., Amato, P., Delort, A. M., Vinatier, V., Flossmann, A., Chaumerliac, N., Pichon, J. M., Houdier, S., Laj, P., Sellegri, K., Colomb, A., Brigante, M. and Mailhot, G.: Classification of clouds sampled at the puy de Dôme (France) based on 10 yr of monitoring of their physicochemical properties, *Atmos. Chem. Phys.*, doi:10.5194/acp-14-1485-2014, 2014.
- 45 Faust, B. C. and Allen, J. M.: Aqueous-phase photochemical sources of peroxy radicals and singlet molecular oxygen in clouds and fog, *J. Geophys. Res.*, doi:10.1029/92jd00843, 1992.
- Haynes W.-M.-, M. an L. D. R.: {CRC} {H}andbook of {C}hemistry and {P}hysics, 94th {E}dition [{O}nline]., 2010.
- 50 Helin, A., Sietiö, O. M., Heinonsalo, J., Bäck, J., Riekkola, M. L. and Parshintsev, J.: Characterization of free amino acids, bacteria and fungi in size-segregated atmospheric aerosols in boreal forest: Seasonal patterns, abundances and size distributions, *Atmos. Chem. Phys.*, doi:10.5194/acp-17-13089-2017, 2017.



- 5 Hill, K. A., Shepson, P. B., Galbavy, E. S., Anastasio, C., Kourtev, P. S., Konopka, A. and Stirm, B. H.: Processing of atmospheric nitrogen by clouds above a forest environment, *J. Geophys. Res. Atmos.*, doi:10.1029/2006JD008002, 2007.
- Husárová, S., Vařtilingom, M., Deguillaume, L., Traikia, M., Vinatier, V., Sancelme, M., Amato, P., Matulová, M. and Delort, A. M.: Biotransformation of methanol and formaldehyde by bacteria isolated from clouds. Comparison with radical chemistry, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/j.atmosenv.2011.06.035, 2011.
- 10 Ignatenko, A. V. and Cherenkevich, S. N.: reactivity of amino acids and proteins in reaction with ozone, *Kinet. Catal.*, 1985.
- Jaber, S., Lallement, A., Sancelme, M., Leremboure, M., Mailhot, G., Ervens, B. and Delort, A.-M.: Biodegradation of phenol and catechol in cloud water: Comparison to chemical oxidation in the atmospheric multiphase system, *Atmos. Chem. Phys.*, doi:10.5194/acp-2019-1048, 2020.
- 15 KEGG pathway databas. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map012
- 20 Kraljić, I. and Sharpatyi, V. A.: Determination of singlet oxygen rate constants in aqueous solutions, *Photochem. Photobiol.*, doi:10.1111/j.1751-1097.1978.tb06973.x, 1978.
- Kristensson, A., Rosenørn, T. and Bilde, M.: Cloud droplet activation of amino acid aerosol particles, *J. Phys. Chem. A*, doi:10.1021/jp9055329, 2010.
- 25 Lallement, A., Besaury, L., Eyheraguibel, B., Amato, P., Sancelme, M., Mailhot, G. and Delort, A. M.: Draft genome sequence of *Rhodococcus enclensis* 23b-28, a model strain isolated from cloud water, *Genome Announc.*, doi:10.1128/genomeA.01199-17, 2017.
- 30 Lallement, A., Vinatier, V., Brigante, M., Deguillaume, L., Delort, A. M. and Mailhot, G.: First evaluation of the effect of microorganisms on steady state hydroxyl radical concentrations in atmospheric waters, *Chemosphere*, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.08.128, 2018.
- 35 Lesworth, T., Baker, A. R. and Jickells, T.: Aerosol organic nitrogen over the remote Atlantic Ocean, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/j.atmosenv.2010.02.021, 2010.
- Mace, K. A., Kubilay, N. and Duce, R. A.: Organic nitrogen in rain and aerosol in the eastern Mediterranean atmosphere: An association with atmospheric dust, *J. Geophys. Res. D Atmos.*, doi:10.1029/2002jd002997, 2003a.
- 40 Mace, K. A., Duce, R. A. and Tindale, N. W.: Organic nitrogen in rain and aerosol at Cape Grim, Tasmania, Australia, *J. Geophys. Res. D Atmos.*, doi:10.1029/2002jd003051, 2003b.
- 45 Manfrin, A., Nizkorodov, S. A., Malecha, K. T., Getzinger, G. J., McNeill, K. and Borduas-Dedekind, N.: Reactive Oxygen Species Production from Secondary Organic Aerosols: The Importance of Singlet Oxygen, *Environ. Sci. Technol.*, doi:10.1021/acs.est.9b01609, 2019.
- 50 Marion, A., Brigante, M. and Mailhot, G.: A new source of ammonia and carboxylic acids in cloud water: The first evidence of photochemical process involving an iron-amino acid



- complex, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/j.atmosenv.2018.09.060, 2018.
- 5 Mashayekhy Rad, F., Zurita, J., Gilles, P., Rutgeerts, L. A. J., Nilsson, U., Ilag, L. L. and Leck, C.: Measurements of Atmospheric Proteinaceous Aerosol in the Arctic Using a Selective UHPLC/ESI-MS/MS Strategy, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, doi:10.1007/s13361-018-2009-8, 2019.
- 10 Matheson, I. B. C. and Lee, J.: Chemical reaction rates of amino acids with singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.*, doi:10.1111/j.1751-1097.1979.tb07786.x, 1979.
- 15 Matos, J. T. V., Duarte, R. M. B. O. and Duarte, A. C.: Challenges in the identification and characterization of free amino acids and proteinaceous compounds in atmospheric aerosols: A critical review, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, doi:10.1016/j.trac.2015.08.004, 2016.
- 20 Matsumoto, K. and Uematsu, M.: Free amino acids in marine aerosols over the western North Pacific Ocean, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/j.atmosenv.2004.12.022, 2005.
- 25 McGregor, K. G. and Anastasio, C.: Chemistry of fog waters in California's Central Valley: 2. Photochemical transformations of amino acids and alkyl amines, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/S1352-2310(00)00282-X, 2001.
- 30 Michaeli, A. and Feitelson, J.: Reactivity of singlet oxygen towards amino acids and peptides, *Photochem. Photobiol.*, doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05035.x, 1994.
- 35 Miskoski, S. and García, N. A.: Influence of the peptide bond on the singlet molecular oxygen-mediated ($O_2[g]$) photooxidation of histidine and methionine peptides, *Photochem. Photobiol.*, doi:10.1111/j.1751-1097.1993.tb02317.x, 1993.
- 40 Miyazaki, Y., Kawamura, K., Jung, J., Furutani, H. and Uematsu, M.: Latitudinal distributions of organic nitrogen and organic carbon in marine aerosols over the western North Pacific, *Atmos. Chem. Phys.*, doi:10.5194/acp-11-3037-2011, 2011.
- 45 Mopper, K. and Zika, R. G.: Free amino acids in marine rains: evidence for oxidation and potential role in nitrogen cycling, *Nature*, doi:10.1038/325246a0, 1987.
- 50 Motohashi, N. and Saito, Y.: Competitive Measurement of Rate Constants for Hydroxyl Radical Reactions Using Radiolytic Hydroxylation of Benzoate, *Chem. Pharm. Bull.*, doi:10.1248/cpb.41.1842, 1993.
- 55 Mudd, J. B., Leavitt, R., Ongun, A. and McManus, T. T.: Reaction of ozone with amino acids and proteins, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/0004-6981(69)90024-9, 1969.
- 60 Pattison, D. I., Rahmanto, A. S. and Davies, M. J.: Photo-oxidation of proteins, *Photochem. Photobiol. Sci.*, doi:10.1039/c1pp05164d, 2012.
- 65 Prasse, C., Ford, B., Nomura, D. K. and Sedlak, D. L.: Unexpected transformation of dissolved phenols to toxic dicarbonyls by hydroxyl radicals and UV light, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, doi:10.1073/pnas.1715821115, 2018.
- 70 Prütz, W. A. and Vogel, S. V.: Specific Rate Constants of Hydroxyl Radical and Hydrated



- Electron Reactions Determined by the RCL Method, *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci.*, doi:10.1515/znb-1976-1115, 1976.
- 5 Pryor, W. A., Giamalva, D. H. and Church, D. F.: Kinetics of Ozonation. 2. Amino Acids and Model Compounds in Water and Comparisons to Rates in Nonpolar Solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, doi:10.1021/ja00335a038, 1984
- Reasoner, D. J. and Geldreich, E. E.: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water, *Appl. Environ. Microbiol.*, doi:10.1128/aem.49.1.1-7.1985, 1985.
- 10 Samy, S., Robinson, J., Rumsey, I. C., Walker, J. T. and Hays, M. D.: Speciation and trends of organic nitrogen in southeastern U.S. fine particulate matter (PM_{2.5}), *J. Geophys. Res. Atmos.*, doi:10.1029/2012JD017868, 2013.
- 15 Sander, R.: Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent, *Atmos. Chem. Phys.*, doi:10.5194/acp-15-4399-2015, 2015.
- Saxena, P. and Hildemann, L. M.: Water-soluble organics in atmospheric particles: A critical review of the literature and application of thermodynamics to identify candidate compounds, *J. Atmos. Chem.*, doi:10.1007/BF00053823, 1996.
- 20 Scheller, E.: Amino acids in dew - Origin and seasonal variation, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/S1352-2310(00)00477-5, 2001.
- 25 Scholes, G., Shaw, P., Wilson, R. L. and Ebert, M.: Pulse radiolysis studies of aqueous solutions of nucleic acid and related substances., in *Pulse Radiolysis*, in *Pulse radiolysis* ., pp. 151–164, M. Ebert, J.P. Keene, A.J. Swallow and J.H. Baxendale, Academic Press, London, New York., 1965.
- 30 Sidle, A. B.: Amino acid content of atmospheric precipitation, *Tellus*, doi:10.3402/tellusa.v19i1.9757, 1967.
- Song, T., Wang, S., Zhang, Y., Song, J., Liu, F., Fu, P., Shiraiwa, M., Xie, Z., Yue, D., Zhong, L., Zheng, J. and Lai, S.: Proteins and Amino Acids in Fine Particulate Matter in Rural Guangzhou, Southern China: Seasonal Cycles, Sources, and Atmospheric Processes, *Environ. Sci. Technol.*, doi:10.1021/acs.est.7b00987, 2017.
- 40 Stadtman, E. R.: Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions, *Annu. Rev. Biochem.*, doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.004053, 1993.
- Stadtman, E. R. and Levine, R. L.: Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids*, doi:10.1007/s00726-003-0011-2, 2003.
- 45 Sutton, M., Howard, C. and Erisman, J.: The European nitrogen assessment: sources, effects and policy perspectives, Cambridge Univ. Press, doi:10.1017/CBO9780511976988, 2011.
- Szyrmer, W. and Zawadzki, I.: Biogenic and Anthropogenic Sources of Ice-Forming Nuclei: A Review, *Bull. Am. Meteorol. Soc.*, doi:10.1175/1520-0477(1997)078<0209:BAASOI>2.0.CO;2, 1997.
- 50



- 5 Triesch, N., van Pinxteren, M., Engel, A. and Herrmann, H.: Concerted measurements of free amino acids at the Cape Verde Islands: High enrichments in submicron sea spray aerosol particles and cloud droplets, *Atmos. Chem. Phys.*, doi:10.5194/acp-2019-976, 2020.
- 10 Vaïtilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Laj, P., Leriche, M. and Delort, A. M.: Contribution of microbial activity to carbon chemistry in clouds, *Appl. Environ. Microbiol.*, doi:10.1128/AEM.01127-09, 2010.
- 15 Vaïtilingom, M., Charbouillot, T., Deguillaume, L., Maisonobe, R., Parazols, M., Amato, P., Sancelme, M. and Delort, A. M.: Atmospheric chemistry of carboxylic acids: Microbial implication versus photochemistry, *Atmos. Chem. Phys.*, doi:10.5194/acp-11-8721-2011, 2011.
- 20 Vaïtilingom, M., Attard, E., Gaiani, N., Sancelme, M., Deguillaume, L., Flossmann, A. I., Amato, P. and Delort, A. M.: Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France), *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/j.atmosenv.2012.03.072, 2012.
- 25 Vaïtilingom, M., Deguillaume, L., Vinatier, V., Sancelme, M., Amato, P., Chaumerliac, N., and Delort, A.-M.: Potential impact of microbial activity on the oxidant capacity and organic carbon budget in clouds, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 559–564, <https://doi.org/10.1073/pnas.1205743110>, 2013.
- 30 Xu, W., Sun, Y., Wang, Q., Du, W., Zhao, J., Ge, X., Han, T., Zhang, Y., Zhou, W., Li, J., Fu, P., Wang, Z. and Worsnop, D. R.: Seasonal Characterization of Organic Nitrogen in Atmospheric Aerosols Using High Resolution Aerosol Mass Spectrometry in Beijing, China, *ACS Earth Sp. Chem.*, doi:10.1021/acsearthspacechem.7b00106, 2017.
- 35 Xu, Y., Wu, D., Xiao, H. and Zhou, J.: Dissolved hydrolyzed amino acids in precipitation in suburban Guiyang, southwestern China: Seasonal variations and potential atmospheric processes, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/j.atmosenv.2019.05.011, 2019.
- 40 Yan, G., Kim, G., Kim, J., Jeong, Y. S. and Kim, Y. Il: Dissolved total hydrolyzable enantiomeric amino acids in precipitation: Implications on bacterial contributions to atmospheric organic matter, *Geochim. Cosmochim. Acta*, doi:10.1016/j.gca.2015.01.005, 2015.
- 45 Yang, H., Xu, J., Wu, W. S., Wan, C. H. and Yu, J. Z.: Chemical characterization of water-soluble organic aerosols at Jeju Island collected during ACE-Asia, *Environ. Chem.*, doi:10.1071/EN04006, 2004.
- 50 Zhang, Q. and Anastasio, C.: Free and combined amino compounds in atmospheric fine particles (PM_{2.5}) and fog waters from Northern California, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/S1352-2310(03)00127-4, 2003.
- Zhang, Y., Song, L., Liu, X. J., Li, W. Q., Lü, S. H., Zheng, L. X., Bai, Z. C., Cai, G. Y. and Zhang, F. S.: Atmospheric organic nitrogen deposition in China, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/j.atmosenv.2011.09.080, 2012.
- Zhao, Y., Hallar, A. G. and Mazzoleni, L. R.: Atmospheric organic matter in clouds: Exact



masses and molecular formula identification using ultrahigh-resolution FT-ICR mass spectrometry, *Atmos. Chem. Phys.*, doi:10.5194/acp-13-12343-2013, 2013.

- 5 Zhu, R. guo, Xiao, H. Y., Zhu, Y., Wen, Z., Fang, X. and Pan, Y.: Sources and Transformation Processes of Proteinaceous Matter and Free Amino Acids in PM_{2.5}, *J. Geophys. Res. Atmos.*, doi:10.1029/2020JD032375, 2020.



Figure captions

Figure 1: Biotransformation rates obtained for each amino acid and each bacterial strain (*Pseudomonas graminis* PDD-13b-3 (black), *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 (blue),
5 *Sphingomonas* sp. PDD-32b-11 (red) and *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74 (orange). The experiments were performed in microcosms containing the mixture of the 19 AA in a cloud artificial medium. The standard error bars reflect the significant biological variability measured from 3 triplicates (independent incubations).

10 **Figure 2:** Abiotic transformation rates ($\text{mol h}^{-1} \text{L}^{-1}$) obtained for each amino acid in microcosms containing the mixture of the 19 AA in a cloud artificial medium under irradiation in the presence of Fe(EDDSS) as source of OH radicals. The standard error bars reflect the variability measured from 3 triplicates (independent experiments). Negative values represent abiotic degradation while positive values represent abiotic production.

15

Figure 3: Reaction rates for 18 amino acids as observed based on experiments in the present study, scaled to atmospheric conditions (Eqs. 2 and 3) and rates for loss reactions by OH(aq), O₃(aq) and ¹O₂(aq) (Eq-4)

20



Figure 1

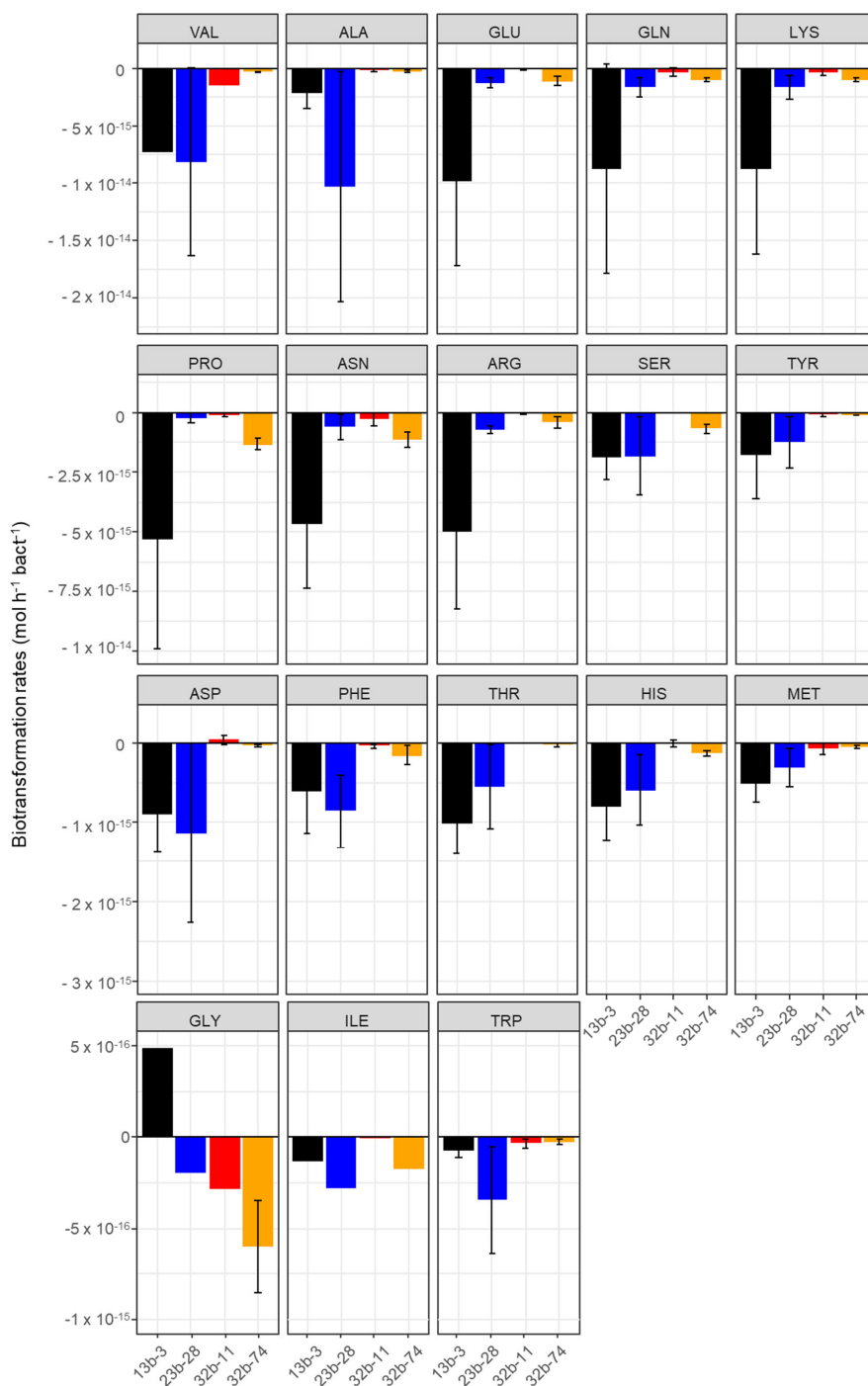




Figure 2

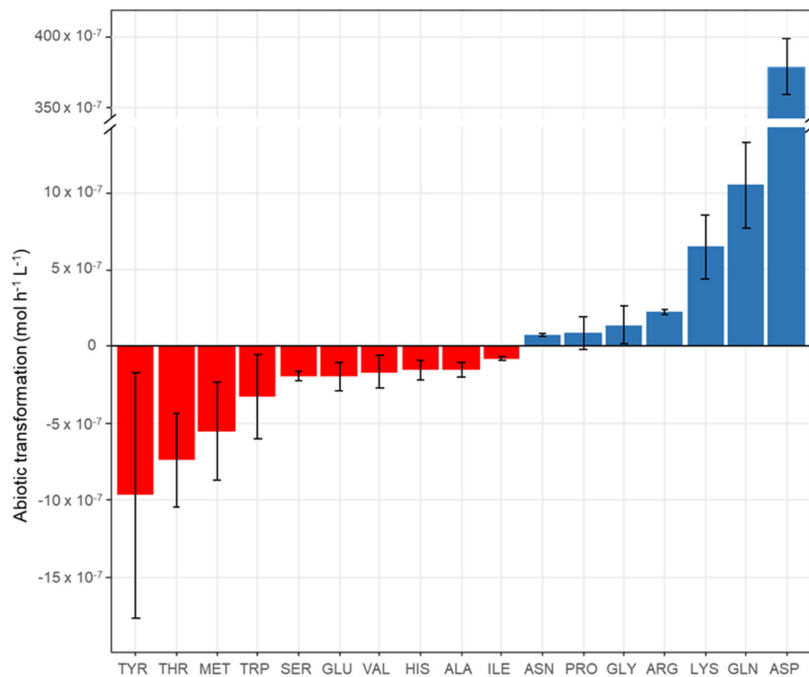




Figure 3

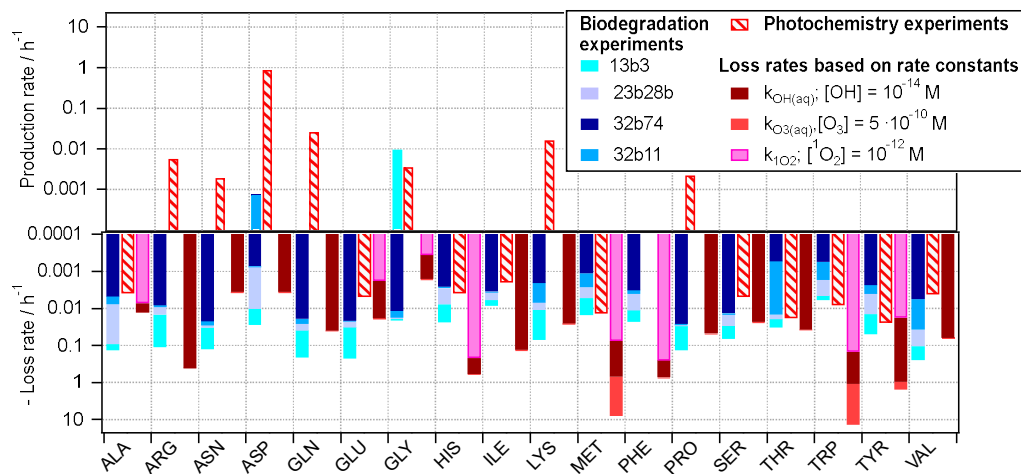




Table 1: Average values of the biotransformation rates ($\text{mol bact}^{-1} \text{h}^{-1}$) of 18 amino acids by the four bacterial strains (*Pseudomonas graminis* PDD-13b-3, *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28, *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74 and *Sphingomonas* sp. PDD-32b-11) and by the combination of these strains as representative of the biodiversity in a real cloud (named “Cloud”) as described in section 3.3.2.

Positive values correspond to a net biosynthesis, while negative ones correspond to a net biodegradation.

	VAL	ALA	GLU	GLN	LYS	PRO	ASN	ARG	SER
13b-3 <i>Pseudomonas graminis</i>	-7.29 x 10 ⁻¹⁵	-2.19 x 10 ⁻¹⁵	-9.89 x 10 ⁻¹⁵	-8.72 x 10 ⁻¹⁵	-3.05 x 10 ⁻¹⁵	-5.29 x 10 ⁻¹⁵	-4.67 x 10 ⁻¹⁵	-4.99 x 10 ⁻¹⁵	-1.90 x 10 ⁻¹⁵
23b-28 <i>Rhodococcus enclensis</i>	-8.11 x 10 ⁻¹⁵	-1.03 x 10 ⁻¹⁴	-1.27 x 10 ⁻¹⁵	-1.62 x 10 ⁻¹⁵	-5.07 x 10 ⁻¹⁶	-2.33 x 10 ⁻¹⁶	-6.14 x 10 ⁻¹⁶	-7.03 x 10 ⁻¹⁶	-1.81 x 10 ⁻¹⁵
32b-11 <i>Sphingomonas</i> sp.	-1.48 x 10 ⁻¹⁵	-1.46 x 10 ⁻¹⁶	-3.91 x 10 ⁻¹⁷	-3.22 x 10 ⁻¹⁶	-2.31 x 10 ⁻¹⁶	-1.08 x 10 ⁻¹⁶	-2.89 x 10 ⁻¹⁶	-3.98 x 10 ⁻¹⁷	-6.82 x 10 ⁻¹⁷
32b74 <i>Pseudomonas syringae</i>	-2.91 x 10 ⁻¹⁶	-2.40 x 10 ⁻¹⁶	-1.09 x 10 ⁻¹⁵	-9.87 x 10 ⁻¹⁶	-1.05 x 10 ⁻¹⁶	-1.33 x 10 ⁻¹⁵	-1.14 x 10 ⁻¹⁵	-4.21 x 10 ⁻¹⁶	-6.88 x 10 ⁻¹⁶
Cloud	-3.60 x 10 ⁻¹⁵	-1.97 x 10 ⁻¹⁵	-3.29 x 10 ⁻¹⁵	-3.06 x 10 ⁻¹⁵	-1.03 x 10 ⁻¹⁵	-1.95 x 10 ⁻¹⁵	-1.82 x 10 ⁻¹⁵	-1.64 x 10 ⁻¹⁵	-9.75 x 10 ⁻¹⁶

	TYR	THR	ASP	HIS	PHE	MET	GLY	ILE	TRP
13b-3 <i>Pseudomonas graminis</i>	-1.79 x 10 ⁻¹⁵	-6.83 x 10 ⁻¹⁶	-9.07 x 10 ⁻¹⁶	-8.08 x 10 ⁻¹⁶	-6.19 x 10 ⁻¹⁶	-5.14 x 10 ⁻¹⁶	4.85 x 10 ⁻¹⁶	-1.35 x 10 ⁻¹⁶	-7.48 x 10 ⁻¹⁷
23b-28 <i>Rhodococcus enclensis</i>	-1.23 x 10 ⁻¹⁵	-5.53 x 10 ⁻¹⁶	-1.14 x 10 ⁻¹⁵	-5.91 x 10 ⁻¹⁶	-8.57 x 10 ⁻¹⁶	-3.12 x 10 ⁻¹⁶	-1.96 x 10 ⁻¹⁶	-2.78 x 10 ⁻¹⁶	-3.45 x 10 ⁻¹⁶
32b-11 <i>Sphingomonas</i> sp.	-8.02 x 10 ⁻¹⁷	-6.76 x 10 ⁻¹⁶	3.41 x 10 ⁻¹⁷	-1.42 x 10 ⁻¹⁷	-4.42 x 10 ⁻¹⁷	-7.40 x 10 ⁻¹⁷	-2.89 x 10 ⁻¹⁶	-7.50 x 10 ⁻¹⁸	-5.50 x 10 ⁻¹⁷
32b74 <i>Pseudomonas syringae</i>	-1.19 x 10 ⁻¹⁶	-2.71 x 10 ⁻¹⁷	-3.69 x 10 ⁻¹⁷	-1.31 x 10 ⁻¹⁶	-1.64 x 10 ⁻¹⁶	-5.78 x 10 ⁻¹⁷	-6.01 x 10 ⁻¹⁶	-1.78 x 10 ⁻¹⁶	-2.85 x 10 ⁻¹⁷
Cloud	-7.16 x 10 ⁻¹⁶	-4.78 x 10 ⁻¹⁶	-3.96 x 10 ⁻¹⁶	-3.43 x 10 ⁻¹⁶	-3.40 x 10 ⁻¹⁶	-2.23 x 10 ⁻¹⁶	-1.46 x 10 ⁻¹⁶	-1.25 x 10 ⁻¹⁶	-8.80 x 10 ⁻¹⁷



Table 2: Abiotic transformation rates of the 17 AA (mole h⁻¹ L⁻¹) measured in microcosms containing the mixture of the all AAs in a cloud artificial medium under irradiation in the presence of Fe(EDDSS) as source of OH radicals. Positive values represent degradation while negative values represent production. Mean values were calculated from 3 triplicates (independent experiments) except for ASN, GLN, GLY and PRO. No value could be obtained for PHE (technical problem).

	TYR	THR	MET	TRP	SER	GLU	VAL	HIS	ALA	ILE
Degradation	-9.70 x 10 ⁻⁷	-7.41 x 10 ⁻⁷	-5.55 x 10 ⁻⁷	-3.29 x 10 ⁻⁷	-1.97 x 10 ⁻⁷	-1.96 x 10 ⁻⁷	-1.67 x 10 ⁻⁷	-1.53 x 10 ⁻⁷	-1.53 x 10 ⁻⁷	-7.98 x 10 ⁻⁸
Production	ASN	PRO	GLY	ARG	LYS	GLN*	ASP			
	7.69 x 10 ⁻⁸	8.82 x 10 ⁻⁸	1.40 x 10 ⁻⁷	2.25 x 10 ⁻⁷	6.47 x 10 ⁻⁷	1.05 x 10 ⁻⁶	3.79 x 10 ⁻⁵			

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Biotic and abiotic transformation of amino acids in cloud water:

5 Experimental studies and atmospheric implications.

S. Jaber, M. Joly, M. Brissy, M. Lereboure, A. Khaled, B. Ervens, and A-M. Delort*

10 Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, F-63000 Clermont-Ferrand, France

*Corresponding author: A-Marie.delort@uca.fr

Table S1: Composition of the artificial cloud medium used for biotic and abiotic transformation of amino acids in microcosms.

Chemical species	Concentration (μM)	Chemical species	Concentration (μM)
Acetate	100	cysteine	1
Formiate	72.5	glutamic acid	1
Succinate	7.5	glycine	1
Oxalate	15	histidine	1
Cl^-	200	isoleucine	1
NO_3^-	400	lysine	1
SO_4^{2-}	25	methionine	1
Na^+	1000	phenylalanine	1
NH_4^+	400	proline	1
K^+	25	serine	1
Mg^{2+}	50	threonine	1
Ca^{2+}	200	tryptophan	1
alanine	1	tyrosine	1
arginine	1	valine	1
asparagine	1	glutamine	1
aspartic acid	1	pH ^a	6

15

^a The pH of the artificial cloud medium was adjusted to 6 (a few drops of NaOH at 1.38 M and of 0.39M H_2SO_4) and the medium was sterilized by filtration on a polyethersulphone (PES) membrane of 0.20 μm porosity (Fisher Scientific) before use. Note that cysteine was present in the medium but it could not be assayed by LC-HRMS, neither leucine that cannot be distinguished from isoleucine by LC-HRMS.

20

Table S2: Retention times, exact masses and LODs and LOQs measured for the 18 AA measured by UPLC-HRMS

Amino acid	Molecular formula	Retention time (min)	m/z [M+H]	LOD (μM)	LOQ (μM)
ALA	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	4.25	90.0550	0.237	0.474
ARG	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	7.41	175.1190	0.072	0.143
ASN	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$	5.57	133.0608	0.143	0.286
ASP	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	5.09	134.0448	0.148	0.295
GLN	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$	5.35	147.0764	0.234	0.468
GLU	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	4.8	148.0526	0.111	0.222
GLY	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	4.6	76.0393	0.242	0.483
HIS	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	7.47	156.0768	0.094	0.188
ILE	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	2.59	160.1081	0.179	0.359
LYS	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	7.62	147.1128	0.069	0.139
MET	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$	2.69	150.0584	0.072	0.144
PHE	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	2.64	166.0863	0.061	0.122
PRO	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	3.05	116.0706	0.140	0.281
SER	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$	5.36	106.0499	0.135	0.268
THR	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	4.87	120.0655	0.163	0.327
TRP	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	2.65	205.0972	0.058	0.117
TYR	$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$	7.46	182.0812	0.072	0.143
VAL	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	2.61	118.0863	0.237	0.475

30 **Table S3:** Rate constants for 18 amino acids for the OH, O₃ and ¹O₂ reactions

	$k_{OH} /$ $M^{-1} s^{-1}$	Reference	$k_{O_3} /$ $M^{-1} s^{-1}$	Reference	$k_{^1O_2} /$ $M^{-1} s^{-1}$	Reference
ALA	$7.7 \cdot 10^7$	(Scholes et al., 1965)	$2.5 \cdot 10^1$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$2 \cdot 10^6$	(Matheson and Lee, 1979)
ARG	$3.5 \cdot 10^9$	(Buxton et al., 1988)	$2.8 \cdot 10^2$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$< 1 \cdot 10^6$	(Kraljić and Sharpatyi, 1978)
ASN	$4.9 \cdot 10^7$	(Masuda et al., 1973)	$7.0 \cdot 10^1$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		
ASP	$4.9 \cdot 10^7$	(Masuda et al., 1973)	$5.0 \cdot 10^1$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		
GLN	$5.4 \cdot 10^8$	(Masuda et al., 1973)	$8.0 \cdot 10^1$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		
GLU	$1.6 \cdot 10^8$		$2 \cdot 10^{-1}$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$5.0 \cdot 10^5$	(McGregor and Anastasio, 2001)
GLY	$1.7 \cdot 10^7$		$2.1 \cdot 10^1$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$< 1 \cdot 10^5$	(Michaeli and Feitelson, 1994)
HIS	$5 \cdot 10^9$	(Motohashi and Saito, 1993)	$3.9 \cdot 10^3$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$6 \cdot 10^7$	(McGregor and Anastasio, 2001)
ILE	$1.8 \cdot 10^9$	(Masuda et al., 1973)				
LYS	$3.5 \cdot 10^8$	(Masuda et al., 1973)	$1.2 \cdot 10^2$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		
MET	$8.5 \cdot 10^9$		$4 \cdot 10^6$		$2.1 \cdot 10^7$	(Miskoski and García, 1993)
PHE	$6.5 \cdot 10^9$	(Buxton et al., 1988)	$1.3 \cdot 10^3$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$7 \cdot 10^5$	(Michaeli and Feitelson, 1994)
PRO	$6.5 \cdot 10^8$	(Masuda et al., 1973)	$4.8 \cdot 10^2$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		
SER	$2.5 \cdot 10^8$		$1.8 \cdot 10^2$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		
THR	$5.1 \cdot 10^8$	(Masuda et al., 1973)	$2.6 \cdot 10^2$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		
TRP	$1.3 \cdot 10^{10}$	(Buxton et al., 1988)	$5.6 \cdot 10^4$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$4.1 \cdot 10^7$	(McGregor and Anastasio, 2001)
TYR	$1.3 \cdot 10^{10}$	(Solar et al., 1984)	$4.8 \cdot 10^3$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)	$5 \cdot 10^6$	(McGregor and Anastasio, 2001)

VAL	$8.5 \cdot 10^8$	(Prütz and Vogel, 1976)	$4 \cdot 10^1$	(Ignatenko and Cherenkevich, 1985)		

Table S4: Selected experimental studies of amino acid oxidation by various oxidants. Note that the experimental conditions were not necessarily atmospherically-relevant. Products are only listed to demonstrate the wide variety of possible reaction pathways and products.

Amino acid	Oxidant	Main product(s)	Reference
ARG	Fenton chemistry	glutamic semialdehyde	(Stadtman, 1993; Stadtman and Levine, 2003) and reference therein
ASP	OH	NH ₃ , Malonic, oxalic and formic acids	(Marion et al., 2018)
CYS	Fenton chemistry	-S-S-disulfide cross-links	(Stadtman, 1993; Stadtman and Levine, 2003)
GLY	OH	Oxalic, formic, oxamic acids	(Berger et al., 1999)
GLY	O ₃	Nitrate, nitrites	(Berger et al., 1999)
GLY-ALA-VAL-PRO peptides	OH	Hydroperoxides, alcohols	(Morgan et al., 2012)
HIS	O ₃	PRO	(Mudd et al., 1969)
HIS	Fenton chemistry	ASP, ASN, 2-oxoimidazoline	(Stadtman, 1993; Stadtman and Levine, 2003) and references therein
LEU	OH	Isovaleric acid and other carbonyl compounds	
LYS	Fenton chemistry	2-amino-adipic semialdehyde	(Stadtman, 1993; Stadtman and Levine, 2003) and references therein
MET	O ₃	Methionine sulfoxide	(Mudd et al., 1969)
PHE	ROS	TYR	(Stadtman, 1993; Stadtman and Levine, 2003)
PHE	Direct UV absorption	TYR	(Pattison et al., 2012)
PRO	Fenton chemistry	GLU, pyroglutamate, Cis/trans-4-hydroxyproline, 2-pyrrolidone, glutamic semialdehyde	(Stadtman, 1993; Stadtman and Levine, 2003) and reference therein
SER	OH	carbonyl and carboxylic acid	
THR	Fenton chemistry	2-amino-3-ketobutyric acid	(Stadtman, 1993; Stadtman and Levine, 2003) and references therein
THR	O ₃	Dihydroxyphenylalanine	(Mudd et al., 1969)

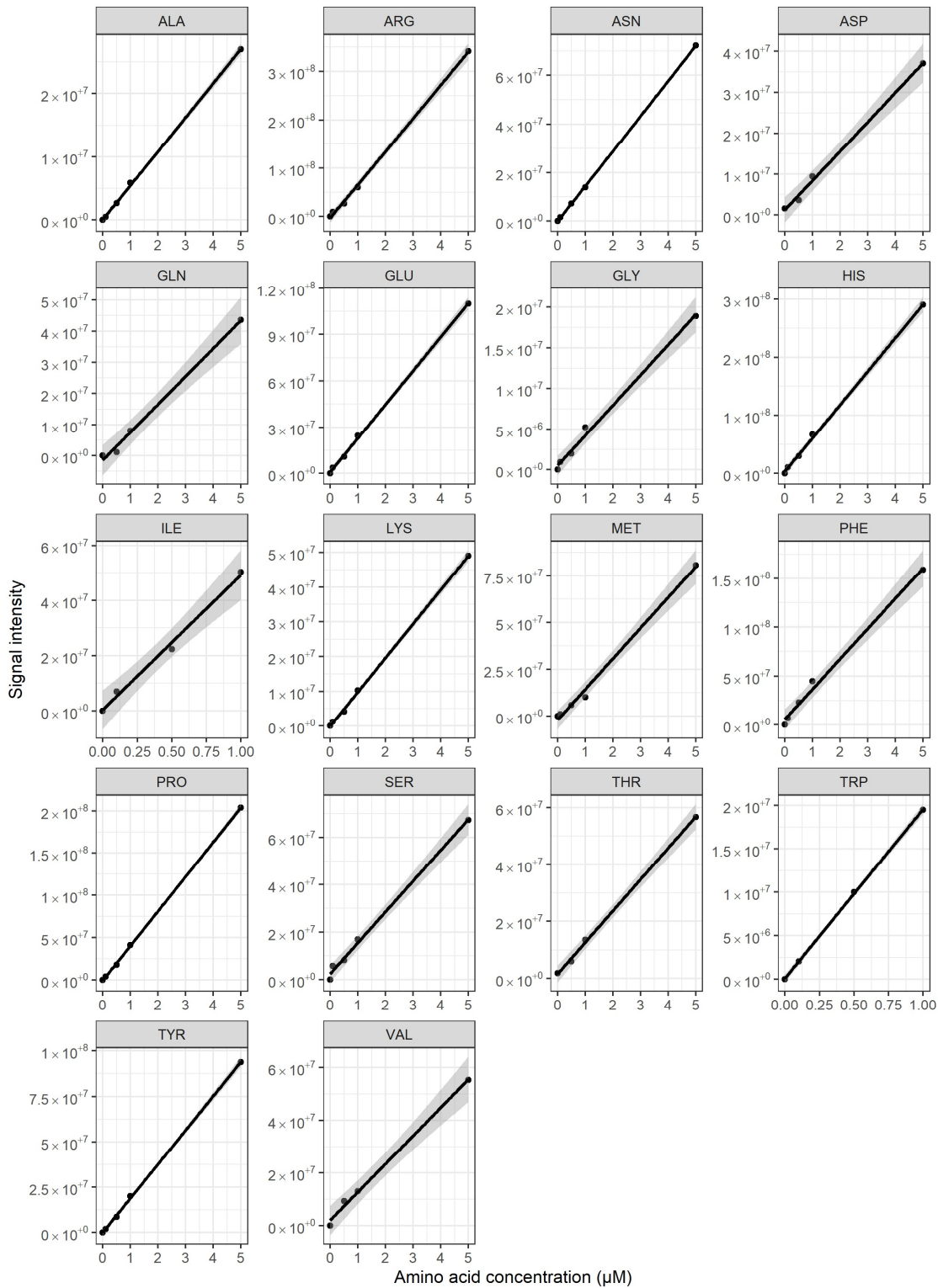
TRP	OH	Formic and acetic acids, many aromatic intermediates	(Bianco et al., 2016)
TRP	¹ O ₂	3 α -hydroxypyrrroloindole; <i>N</i> -formylkynurenine, kynurenine, 3 α -dihydroxypyrrroloindole.	
TYR	OH	Enedial	(Prasse et al., 2018)
TYR	Fenton chemistry	Tyr-Tyr cross-links	(Stadtman, 1993; Stadtman and Levine, 2003) and references therein
TYR	¹ O ₂ or direct UV absorption	3 α -hydroxy-6-oxo-2,3,3 α ,6,7,7 α -hexahydro-1H-indol-2-carboxylic acid	

40

45

50

55



60 **Figure S1:** Calibration curves for LC-HRMS experiments

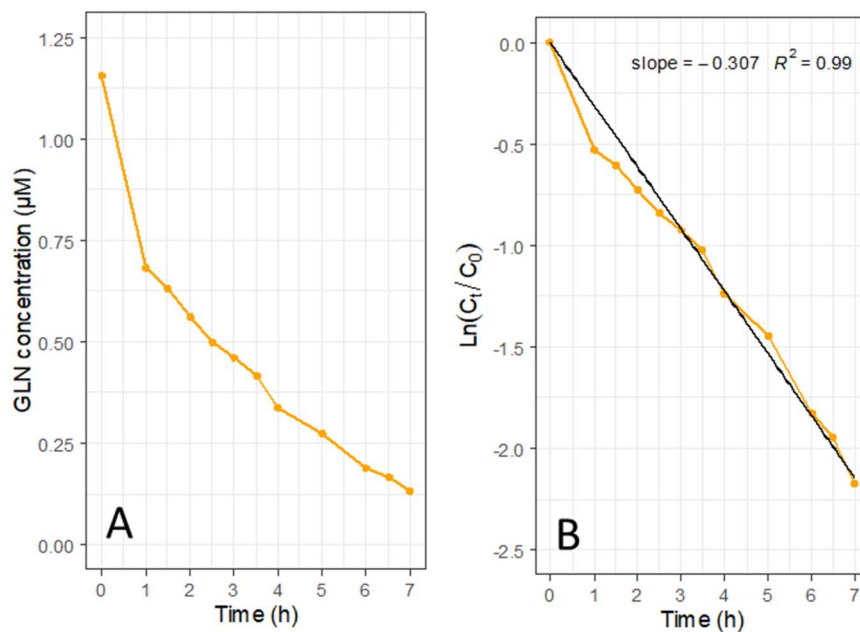
Example of biodegradation rate calculation:

Bacterial degradation of amino acids follows a first order decay equation as $C_t = C_0 \cdot e^{-kt}$ with t the incubation time, C_0 and C_t the initial concentration and concentration at t respectively and k the first order decay constant.

First, concentration of each amino acid is followed through time (Figure S2A) by LC-HRMS as described in the Materials and Methods section. Values are converted to determine k corresponding to the slope of $\ln(C_t/C_0) = f(t)$ (Figure S2B)

Biodegradation rates are then calculated as follows: $V_b = \frac{k \times C_0}{N_{cell}}$ with V_b the biodegradation rate (in $\text{mol h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$), k the first order decay constant (in h^{-1}), C_0 the initial concentration in amino acid (in mol L^{-1}) and N_{cell} the bacterial concentration (in cell L^{-1}).

In this example, $N_{cell} = 4 \cdot 10^8 \text{ cell L}^{-1}$ and $C_0 = 1.16 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ so $V_b = 8.88 \cdot 10^{-16} \text{ mol h}^{-1} \text{ cell}^{-1}$



Figures S2: Example of calculation of the biodegradation rate of GLN. A) time dependence of GLN concentration with time measured by LC-HRMS. B) $\ln(C_t/C_0)=f(t)$, degradation rates are calculated from the slope at the origin.

C_t : GLN measured concentration at time = t , C_0 :GLN measured concentration at time zero.

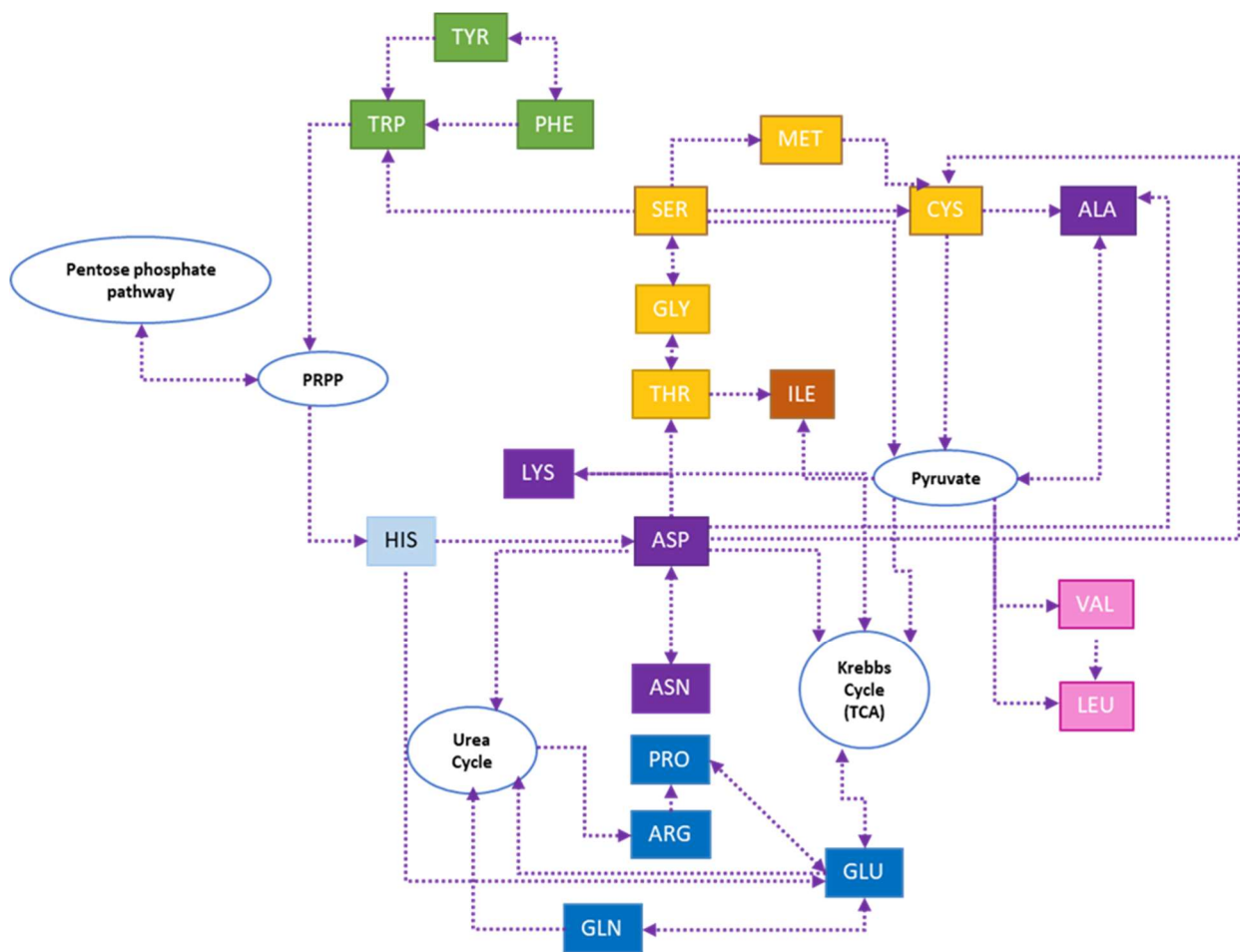


Figure S3: Main metabolic routes for AA metabolism according to KEGG pathway database.

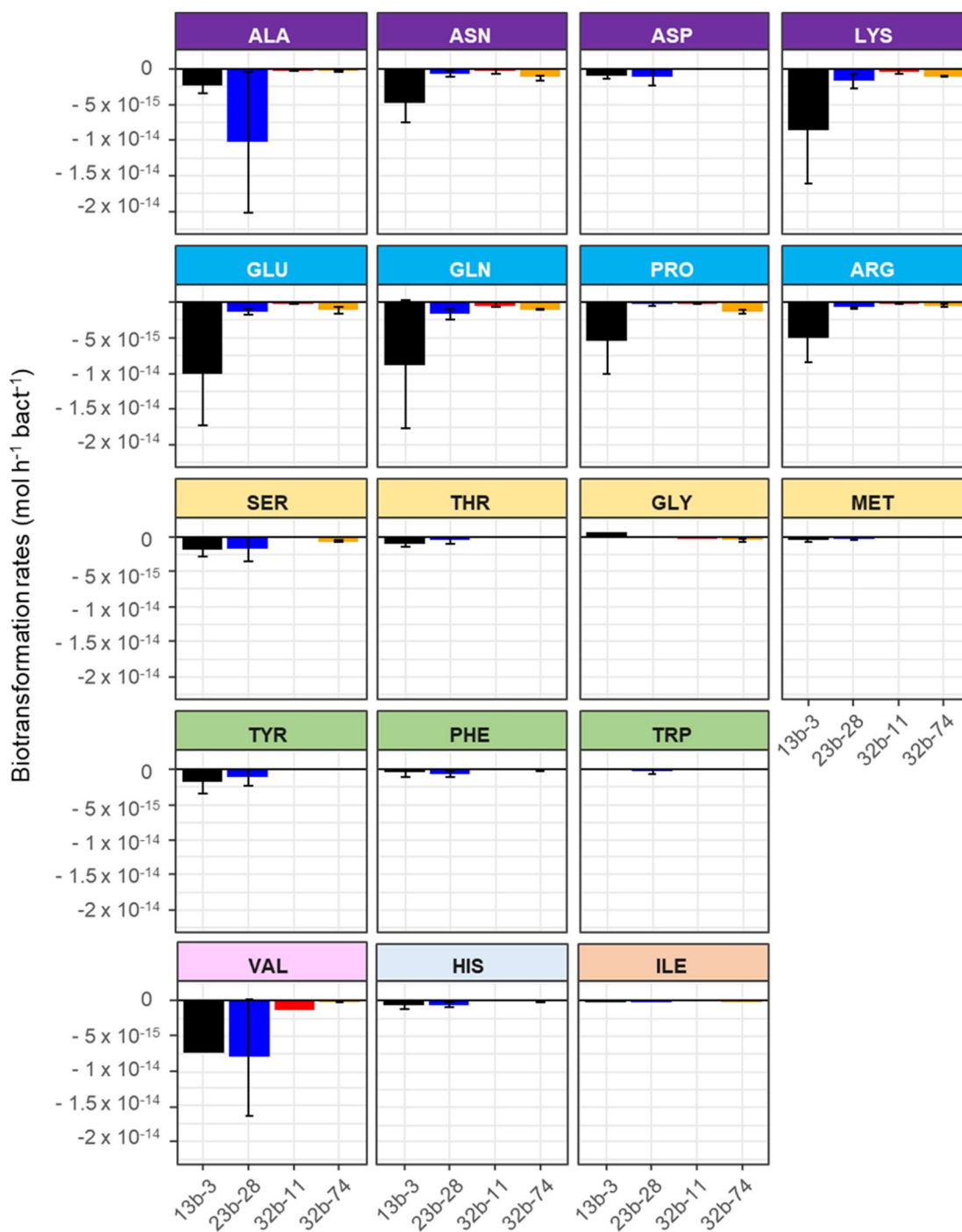


Figure S4: Biotransformation rates ($\text{mol bact}^{-1} \text{h}^{-1}$) of AA by the four bacterial strains grouped according the metabolic pathways of the AA (see Figure S3). *Pseudomonas graminis* PDD-13b-3 in black, *Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 in blue, *Sphingomonas* sp. PDD-32b-11 in red and *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74 in orange). The standard error bars reflect the rather important biological variability measured from 3 triplicates (independent incubations). Positive values correspond to a biosynthesis process, negative values to a biodegradation process.

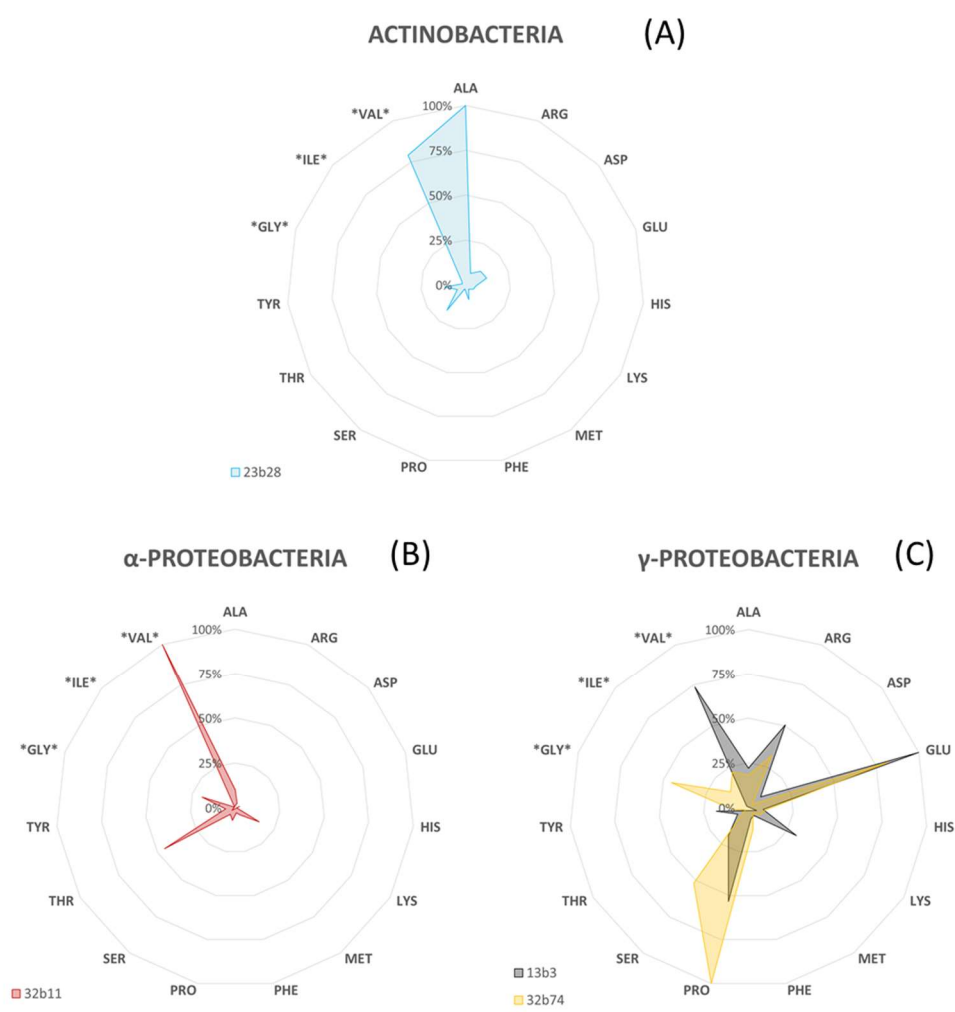


Figure S5: Comparison of the ability of the different strains to metabolize amino acids according to their phylogeny: (A) Actinobacteria (*Rhodococcus enclensis* PDD-23b-28 in blue), (B) α -Proteobacteria (*Spingomonas* sp PDD-32b-11 in red), (C) γ -Proteobacteria (*Pseudomonas graminis* PDD-13b-3 in black and *Pseudomonas syringae* PDD-32b-74 in yellow). The rates of biodegradation (average from 3 replicates) are presented as a % for each amino acid in the form of a radar plot. For each strain the highest rate is put at 100%. (* only one replicate value was available).

References

- Berger, P., Karpel Vel Leitner, N., Doré, M. and Legube, B.: Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine, *Water Res.*, doi:10.1016/S0043-1354(98)00230-9, 1999.
- Bianco, A., Passananti, M., Deguillaume, L., Mailhot, G. and Brigante, M.: Tryptophan and tryptophan-like substances in cloud water: Occurrence and photochemical fate, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/j.atmosenv.2016.04.034, 2016.
- Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P. and Ross, A. B.: Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$ in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, doi:10.1063/1.555805, 1988.
- Ignatenko, A. V. and Cherenkevich, S. N.: reactivity of amino acids and proteins in reaction with ozone, *Kinet. Catal.*, 1985.
- KEGG pathway database. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map012
- Kraljić, I. and Sharpatyi, V. A.: Determination of singlet oxygen rate constants in aqueous solutions, *Photochem. Photobiol.*, doi:10.1111/j.1751-1097.1978.tb06973.x, 1978.
- Marion, A., Brigante, M. and Mailhot, G.: A new source of ammonia and carboxylic acids in cloud water: The first evidence of photochemical process involving an iron-amino acid complex, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/j.atmosenv.2018.09.060, 2018.
- Masuda, T., Nakano, S. and Kondo, M.: Rate Constants for the Reactions of OH Radicals with the Enzyme Proteins as Determined by the p-Nitrosodimethylaniline Method, *J. Radiat. Res.*, doi:10.1269/jrr.14.339, 1973.
- Matheson, I. B. C. and Lee, J.: Chemical reaction rates of amino acids with singlet oxygen, *Photochem. Photobiol.*, doi:10.1111/j.1751-1097.1979.tb07786.x, 1979.
- McGregor, K. G. and Anastasio, C.: Chemistry of fog waters in California's Central Valley: 2. Photochemical transformations of amino acids and alkyl amines, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/S1352-2310(00)00282-X, 2001.
- Michaeli, A. and Feitelson, J.: Reactivity of singlet oxygen towards amino acids and peptides, *Photochem. Photobiol.*, doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05035.x, 1994.
- Miskoski, S. and García, N. A.: Influence of the peptide bond on the singlet molecular oxygen-mediated ($\text{O}_2[\text{g}]$) photooxydation of histidine and methionine peptides, *Photochem. Photobiol.*, doi:10.1111/j.1751-1097.1993.tb02317.x, 1993.
- Morgan, P. E., Pattison, D. I. and Davies, M. J.: Quantification of hydroxyl radical-derived oxidation products in peptides containing glycine, alanine, valine, and proline, *Free Radic. Biol. Med.*, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.448, 2012.
- Motohashi, N. and Saito, Y.: Competitive Measurement of Rate Constants for Hydroxyl Radical Reactions Using Radiolytic Hydroxylation of Benzoate, *Chem. Pharm. Bull.*, doi:10.1248/cpb.41.1842, 1993.
- Mudd, J. B., Leavitt, R., Ongun, A. and McManus, T. T.: Reaction of ozone with amino acids and proteins, *Atmos. Environ.*, doi:10.1016/0004-6981(69)90024-9, 1969.
- Pattison, D. I., Rahmanto, A. S. and Davies, M. J.: Photo-oxidation of proteins, *Photochem.*

Photobiol. Sci., doi:10.1039/c1pp05164d, 2012.

Prasse, C., Ford, B., Nomura, D. K. and Sedlak, D. L.: Unexpected transformation of dissolved phenols to toxic dicarbonyls by hydroxyl radicals and UV light, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., doi:10.1073/pnas.1715821115, 2018.

Prütz, W. A. and Vogel, S. V.: Specific Rate Constants of Hydroxyl Radical and Hydrated Electron Reactions Determined by the RCL Method, Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci., doi:10.1515/znb-1976-1115, 1976.

Scholes, G., Shaw, P., Wilson, R. L. and Ebert, M.: pulse radiolysis studies of aqueous solutions of nucleic acid and related substances., in Pulse Radiolysis, in Pulse radiolysis ., pp. 151–164, M. Ebert, J.P. Keene, A.J. Swallow and J.H. Baxendale, Academic Press, London, New York., 1965.

Solar, S., Solar, W. and Getoff, N.: Reactivity of OH with tyrosine in aqueous solution studied by pulse radiolysis, J. Phys. Chem., doi:10.1021/j150654a030, 1984.

Stadtman, E. R.: Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions, Annu. Rev. Biochem., doi:10.1146/annurev.bi.62.070193.004053, 1993.

Stadtman, E. R. and Levine, R. L.: Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, Amino Acids, doi:10.1007/s00726-003-0011-2, 2003.

3.3-Conclusion

L'objectif principal de ce travail était de comparer les taux de transformation biotiques et abiotiques des acides aminés dans la phase aqueuse des nuages par une approche expérimentale en microcosme (nuage artificiel) et par une approche théorique (pour la partie abiotique). Ce travail représente un premier pas pour apporter des éléments de réponse quant à la comparaison entre des processus de transformation des AA qui restent peu connus dans les nuages.

Les taux de transformations biotique et abiotique ont pu être mesurés expérimentalement grâce à une nouvelle approche en UPLC-HRMS qui permet de quantifier les concentrations en AA sans traitement ni concentration préalable. L'avantage de cette méthode est d'éviter des biais liés au traitement comme la dérivation ou encore de gagner beaucoup de temps.

L'étude de la biotransformation des 18 AA avec 4 souches bactériennes différentes isolées des nuages a mis en évidence plusieurs points importants :

- Dans nos conditions expérimentales la plupart des AA sont biodégradés mais la glycine et l'aspartate peuvent être bio-synthétisés par certaines souches bactériennes. Ceci reflète la complexité des voies métaboliques, souvent interconnectées des microorganismes.
- Les vitesses de biotransformations mesurées peuvent varier de plusieurs ordres de grandeur en fonction des souches bactériennes et du type d'AA ($1.03 \cdot 10^{-14} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ à $8.02 \cdot 10^{-17} \text{ mol cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
- Ces vitesses de transformation semblent reliées aux voies métaboliques impliquées, ainsi si plusieurs AA sont dans des voies fortement connectées, leurs vitesses de transformation restent du même ordre de grandeur.
- Si on considère les vitesses relatives exprimées en % (et non absolue) de transformation des AA pour chaque souche, il semble se dégager le fait que des souches proches phylogénétiquement se comportent de la même manière (sélection préférentielles d'AA par rapport à d'autres). Ces résultats seraient à confirmer avec un plus grand panel d'isolats.

L'étude de photo-transformation en microcosme des AA, menée dans le même milieu nuage artificiel que précédemment pour la biotransformation, a apporté des résultats intéressants et plutôt inattendus :

- Dans nos conditions expérimentales, certains acides aminés sont photo-dégradés (TYR, THR, MET, TRP, SER, GLU, VAL, HIS, ALA, ILE) mais d'autres sont photo-produits (ASN, PRO, GLY, ARG, LYS, GLN, ASP). Ce dernier point n'était pas attendu car en fait les études de photochimie des acides aminés rapportés dans la littérature sont réalisées avec des AA purs et non en mélange comme c'est le cas dans nos expériences. De plus nous avons d'autres sources de C et d'N dans le milieu. Ces résultats suggèrent que, comme c'est le cas pour le métabolisme des AA, des voies interconnectées pourraient être effectives pour les transformations abiotiques.
- Les vitesses de transformation des AA sont très différentes d'un AA à l'autre.

Lorsqu'on compare les vitesses de transformations biotiques et abiotiques mesurées, les conclusions dépendent beaucoup des AA concernés et des souches microbiennes. Cependant globalement on est dans les mêmes ordres de grandeur quand on normalise les résultats en pondérant par le nombre et le rapport entre les souches utilisées et par la concentration réelle de radicaux dans les nuages.

Enfin il n'a pas été possible de comparer directement les taux de transformation mesurés expérimentalement avec ceux calculés de manière théorique en prenant en compte les constantes de réactivité du radical OH, de l'oxygène singulet et de l'ozone. En effet ces calculs théoriques, basés sur des données obtenues avec des AA individuels, ne peuvent conduire qu'à des photo-dégradations. Or nous observons dans nos conditions des mécanismes de photo-production et de photo-dégradation, les taux de transformation des AA mesurés sont donc des taux nets prenant en compte les deux mécanismes. Il en est de même pour les transformations biologiques, ce qui est observé est la résultante de mécanismes de biodégradation et bio-production.

En conclusion, nos travaux mettent en évidence la nécessité d'étudier plus à fond les transformations biotiques et abiotiques des acides aminés dans des conditions pertinentes pour les phases aqueuses atmosphériques (nuages, brouillards, aérosols). Notamment il faudra décrypter les voies de transformation abiotique des AA en mélange, ce qui n'a pas été fait pour l'instant.

Conclusion générale

L'objectif général de notre thèse était de mieux décrire les mécanismes de transformation biotique et abiotique de la matière organique des nuages, et plus particulièrement du phénol et du catéchol, polluants très toxiques et des acides aminés, constituants majeurs des organismes vivants. Il s'agissait ensuite de comparer l'efficacité de transformation de ces composés dans les nuages par ces deux types de mécanisme, l'enjeu majeur étant d'évaluer l'impact potentiel de l'activité microbienne, très largement ignorée en chimie atmosphérique.

Notre stratégie a été de combiner à la fois des approches expérimentales et théoriques, ce qui nous a amenés à faire un certain nombre de développements.

Mise en place d'un microcosme mimant au mieux la phase aqueuse du nuage :

Nous avons dû choisir des conditions expérimentales qui permettent de mesurer des vitesses de transformation dans des conditions compatibles avec les conditions environnementales (choix et concentrations des souches bactériennes, concentration des substrats, concentration en Fe(III)-EDDS et lumière artificielle, calcul de la concentration en radicaux OH produits). Cette mise au point a été utile pour nos différentes études et restera un acquis pour des études futures au laboratoire.

Mise au point d'une méthode analytique pour quantifier les AA dans le milieu nuage artificiel :

Nous avons développé une approche par UPLC-HRMS basée sur une injection directe du milieu qui permet de s'affranchir de la préparation d'échantillons qui est couteuse en temps et qui induit souvent des biais (dérivatisation non homogène, perte de certains AA pour des pré-concentrations ou pré-purification). Nous avons évalué les LOD et LOQ qui se sont révélées compatibles avec nos expériences. Cette méthode est maintenant utilisée en routine au laboratoire.

Cette approche par UPLC-HRMS a été également utilisée pour quantifier les concentrations en catéchol et également analyser la structure des produits de photo-dégradation du Fe(III)-EDDS.

Intégration de données biologiques dans un modèle de chimie multiphasique des nuages :

Cette approche est originale et encore très peu développée par les chimistes de l'atmosphère. A notre connaissance très peu de groupes ont démarré des études par modélisation intégrant des paramètres biologiques : le groupe de Faye McNeill aux USA, le groupe de Laurent Deguillaume au LaMP avec qui nous collaborons activement. Pour ce projet c'est Barbara

Ervens dans notre équipe qui a effectué le travail. Cette évolution vers des modèles est fondamentale pour évaluer et quantifier l'impact des mécanismes biologiques dans le milieu nuage car on ne peut pas reproduire des processus multiphasiques en laboratoire pour l'instant, ni tester un grand nombre de conditions atmosphériques.

Quelles sont les avancées majeures de notre thèse concernant la compréhension des mécanismes de transformations biotique et abiotique des composés que nous avons étudiés ?

Les transformations biologiques :

Le cas du phénol et du catéchol est assez simple car les voies de biotransformations comprennent peu d'étapes et sont bien connues. Notre travail fait suite aux travaux de la thèse d'A. Lallement (Lallement et al., 2018) qui avait déjà démontré l'activité *in situ* de la biodégradation de ces polluants (présence d'ARNm dans des échantillons d'eau de nuage) et qui avait réalisé un large screening de souches dégradantes. Nous avons centré notre étude sur la souche bactérienne la plus efficace, *Rhodococcus enclensis*. Les vitesses mesurées en microcosmes montrent que le phénol et le catéchol sont dégradés rapidement. La vitesse de biodégradation du catéchol est 10 fois plus rapide que celle du phénol. Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus dans la littérature avec 2 souches de *Pseudomonas* même si les conditions expérimentales étaient très différentes. De ce fait on peut penser que beaucoup de souches de *Pseudomonas* et de *Rhodococcus* notamment, seront efficaces en milieu nuage réel ; d'autres types d'organismes (levures, champignons) pourraient aussi être très actifs.

Dans un modèle de chimie multiphasique (Box model), seule l'activité biologique est considérée en phase aqueuse car nous avons admis que les microorganismes n'agissaient pas en phase gaz. La biotransformation du phénol est négligeable car peu soluble dans la phase aqueuse, pour le catéchol beaucoup plus soluble, l'activité microbienne n'est pas négligeable dans certains scénarios (jour) et compte pour 17% de la perte totale de ce composé.

Le cas des AA est beaucoup plus complexe puisqu'il implique 19 composés de structure différente, appartenant à des voies métaboliques différentes, parfois interconnectées. Ces réseaux métaboliques comprennent de nombreuses enzymes différentes, certaines peuvent

intervenir dans des voies de biosynthèse, d'autres dans des voies de biodégradation, d'autres dans les deux ; certaines voies sont reliées aussi aux voies de l'azote. Même si ces voies sont communes à de nombreux organismes, les flux métaboliques peuvent être très différents d'un organisme à l'autre et d'un AA à l'autre. C'est ce que nous montrons ici en mesurant les vitesses de biotransformation de 18 AA dans un milieu nuage artificiel comportant également de l'azote (NH_4^+ , NO_3^-) et des acides carboxyliques (acétique, formique, oxalique et succinique) avec 4 souches bactériennes différentes isolées du nuage et représentatives de ce milieu (*Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas syringae*, *Rhodococcus enclensis* et *Sphingomonas* sp.). Nous avons observé à la fois des mécanismes de biosynthèse et de biodégradation, avec des vitesses très différentes selon les AA et les souches allant jusqu'à 4 ordres de grandeur.

La transformation effective des AA par ces microorganismes des nuages conforte les observations d'Amato et al (2019) qui avait montré la présence de transcrits du métabolisme des AA directement *in situ* dans l'eau nuageuse. On comprend qu'il sera difficile d'extrapoler des résultats à d'autres souches microbiennes des nuages ou à des conditions atmosphériques très variables.

Comme les AA ne sont pas (ou peu) volatils et très solubles dans l'eau, nous avons considéré qu'ils n'étaient pas présents dans la phase gaz des nuages. Nous n'avons donc pas utilisé le modèle de chimie multiphasique (Box model).

Les transformations photochimiques et radicalaires :

Là encore le **cas du phénol et du catéchol** est le plus simple car les voies de transformation abiotique dans la phase gaz et dans la phase aqueuse ont bien été étudiés.

Nous avons mesuré expérimentalement des vitesses de transformation de ces deux composés dans un système contrôlé (lumière + Fe(III)-EDDS). Ces mesures expérimentales sont surtout utiles pour comparer les dégradations biotique et abiotique dans un même milieu (voir plus loin).

En parallèle les transformations dans un système multiphasique ont pu être modélisées (Box Model) en tenant compte de la réactivité en phase aqueuse et gazeuse (K de réactivité des radicaux OH et NO_3) et du transfert entre ces phases (Constantes de Henry), en mimant des

scénarios jour/nuit (concentration en radicaux différente). Dans ces conditions, le fait majeur est que le phénol est dégradé presque totalement dans la phase gaz (99.9%) car il est peu soluble dans la phase aqueuse, au contraire le catéchol qui est oxydé passe plus facile dans la phase aqueuse, la chimie radicalaire dans ce compartiment intervient alors pour 13% environ pendant le jour.

Pour les AA notre approche expérimentale en milieu complexe (milieu nuage artificiel) s'est révélée très utile car elle a apporté des informations inattendues. En effet non seulement certains AA se dégradent mais d'autres sont également produits. Ceci suggère des mécanismes multi-étapes complexes et sans doute interconnectés. Or la littérature ne rapporte que des phénomènes de dégradations radicalaires (ou photochimiques) car les expériences ne sont menées que dans des milieux très simples (pas d'autres sources d'N et de C) avec un seul AA à la fois. Les vitesses de transformation mesurées sont, comme pour la biologie, très variables selon les AA et reflètent des flux nets, résultants de photo-production/ photo-dégradation. Dans ces conditions nous n'avons pas pu directement comparer ces résultats expérimentaux avec les taux de dégradations calculés avec les constantes de réactivité des AA avec le radical OH, l'ozone et l'oxygène singulet (valeurs de la littérature).

Transformations biotiques vs abiotiques:

Un enjeu majeur de notre travail est de comparer l'efficacité des transformations biotiques et abiotiques de la matière organique dans les nuages. En effet l'étude de l'activité métabolique des microorganismes des nuages est une thématique récente dans les sciences de l'atmosphère. Il devient évident que cette activité existe, mais est-elle compétitive par rapport à la chimie radicalaire et la photochimie ? Au final faut-il la prendre en compte dans les modèles de chimie atmosphérique qui pour l'instant l'ignorent ?

Il est souvent difficile de comparer des résultats expérimentaux quand les conditions utilisées dans la littérature sont très différentes et pas forcément cohérentes avec le milieu atmosphérique. Dans notre travail de thèse nous nous sommes attachés à travailler dans un microcosme qui mime au mieux la phase aqueuse des nuages et nous avons mesuré des vitesses de transformation biotique et abiotique dans ce même milieu. Ainsi il nous est possible de

comparer nos expériences de bio- et photo-transformations des composés aromatiques étudiés mais aussi des AA.

En microcosmes il apparaît que les vitesses de transformation sont du même ordre de grandeur. L'activité microbienne est similaire à l'activité radicalaire pour le phénol, elle est même un peu plus importante pour le catéchol. Cependant comme déjà discuté il est difficile d'établir des généralités dans le cas des AA puisque l'activité microbienne est variable non seulement selon les AA mais aussi les souches.

En ce qui concerne **la comparaison de l'activité microbienne expérimentale avec une activité chimique calculée**. Nous avons expliqué précédemment qu'on ne peut pas faire cette comparaison pour les AA car les données de la littérature ne le permettent pas. Pour le phénol et le catéchol la modélisation montre que l'activité microbienne est compétitive par rapport à l'activité radicalaire uniquement pour le catéchol. La biodégradation participe à 17% du taux de perte totale du catéchol contre 13% pour les radicaux. Ceci est bien sûr très dépendant du scénario atmosphérique envisagé, notamment de la balance OH/NO₃.

En conclusion, nos résultats confortent les résultats obtenus précédemment pour d'autres composés (acides mono- et di-carboxyliques, composés en C1, H₂O₂). En phase aqueuse et dans certains scénarios, l'activité microbienne pourrait jouer un rôle en chimie atmosphérique, au même titre que la chimie radicalaire.

Perspectives

Plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagées à la suite de nos travaux de thèse :

Dosage des AA en milieu atmosphérique réel par UPLC-HRMS :

La méthode d'analyse directe *in situ* des AA par UPLC-HRMS s'est révélée très efficace. C'est pourquoi il s'est avéré très intéressant de l'adapter à la mesure de concentration des AA dans des milieux atmosphériques réels. C'est un développement que nous avons démarré avec Maxence Brissy dans le cadre de sa thèse en collaboration avec Martin Lereboure. Pour éviter les effets matrices dus à la variabilité des échantillons naturels, nous avons mis au point une méthode de dosage par LC-MS par ajout dosé. Ce travail est maintenant en cours d'application sur de nombreux échantillons de nuages et pluies prélevés au puy de Dôme et à La Réunion et est réalisé par Maxence BRISSY.

Biotransformation des AA par les microorganismes dans des échantillons nuageux réels :

Nous avons montré que les mécanismes de biodégradation mis en jeu étaient très complexes et surtout dépendaient fortement du type de souche microbienne. Or il ne semble pas raisonnable de tester une multitude de souches au vu de la lourdeur des expériences et le nombre potentiel de micro-organismes actifs dans les nuages. La stratégie à venir serait plutôt de travailler sur des échantillons réels d'eau de nuage qui contiennent une large biodiversité et une composition chimique complexe. Une simple filtration du milieu permet d'éliminer les microorganismes et ainsi de comparer milieu filtré et non filtré et d'évaluer ainsi la contribution des microorganismes. La méthode d'analyse par UPLC-HRMS de la concentration en AA permettra d'avoir des valeurs quantitatives de vitesses de biotransformation et de voir s'il y a des processus de biodégradation et/ou de bio-production. Sur le long terme, une fois que de nombreuses expériences seront réalisées avec des échantillons variés, il sera possible de comparer ces vitesses de biotransformation, de voir si finalement elles sont du même ordre de grandeur ou non en fonction du type d'échantillons, d'étudier des corrélations potentielles avec la composition chimique et biologique des échantillons, l'origine des masses d'air, les saisons ...C'est tout un champ d'étude qui s'annonce, ce travail sera démarré dans le cadre de la thèse de Maxence Brissy.

Photo-transformation des AA en milieux complexes :

Une révélation de notre travail a été de montrer qu'en milieu nuage artificiel, non seulement des AA étaient dégradés mais que d'autres étaient produits. Nos recherches bibliographiques ont souligné que la littérature était pauvre dans le domaine des mécanismes de transformation abiotique des AA. La plupart des études se limitent à mesurer des constantes de réactivité dans un milieu simple avec un seul AA ; de plus, peu de voies ont été décrites dans le détail. Au final il manque des données sur les milieux complexes, naturels ou non. Dans le futur il faudra donc faire des études approfondies sur les mécanismes de transformation abiotique des AA en milieux plus réalistes. Ce sont clairement des équipes de photochimistes experts qui devront prendre ces études en charge.

Dans notre groupe, des premières études pourront être menées sur des échantillons de nuages réels par la même approche que celle proposée pour la biotransformation, le plus efficace serait de réaliser ces expériences sur les mêmes échantillons : on pourrait comparer des expériences purement biologiques (nuage non filtré contenant les microorganismes au noir), transformations non photochimiques (nuage filtré au noir), réactions photochimiques (nuage filtré exposé à la lumière) et photo-biotransformations combinées (nuage non filtré exposé à la lumière). Là encore, ces expériences devront être réalisées sur de nombreux échantillons d'origines et de saisons variées.

Impact des microorganismes des nuages sur le devenir de polluants dans l'atmosphère :

Nos travaux, ainsi que ceux obtenus précédemment par A. Lallement, ont montré le potentiel de biodégradation du phénol et du catéchol, molécules peu concentrées mais particulièrement toxiques, par les microorganismes des nuages. Ils ont ouvert la voie à une thématique nouvelle : quel est l'impact des microorganismes des nuages sur le devenir de polluants dans l'atmosphère ? En d'autres termes, participent-ils à la décontamination de l'atmosphère, et ainsi jouent-ils un rôle dans la qualité de l'air ? Ces thématiques sont particulièrement d'actualité et méritent de s'y consacrer un peu plus. Pour cela il faudra réfléchir à des cibles potentielles d'intérêt.

Références

- Abida, O., Mailhot, G., Litter, M., Bolte, M., 2006. Impact of iron-complex (Fe(III)–NTA) on photoinduced degradation of 4-chlorophenol in aqueous solution. *Photochem. Photobiol. Sci.* <https://doi.org/10.1039/b518211e>
- Adams, G.E., Boag, J.W., Currant, J., Michael, B.D., 1965. Absolute rate constants for the reaction of the hydroxyl radical with organic compounds, *Pulse Radiolysis*, in: Ebert, M. (Ed.), . Academic Press, New York, pp. 131–143.
- 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, 2709–2716. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.02.053>
- Amato, P., Besaury, L., Joly, M., Penaud, B., Deguillaume, L., Delort, A.M., 2019. Metatranscriptomic exploration of microbial functioning in clouds. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41032-4>
- Amato, P., Joly, M., Besaury, L., Oudart, A., Taib, N., Deguillaume, L., Delort, A., Debroas, D., Mone, I., 2017. Active microorganisms thrive among extremely diverse communities in cloud water 3, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182869>
- 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, 4143–4153. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.04.002>
- Amato, P., F. Demeer, A. Melaouhi, S. Fontanella, A.-S. Martin-Biesse, M. Sancelme, P. Laj, and A.-M. Delort, 2007a. A fate of organic acids, formaldehyde and methanol in cloud water: their biotransformation by micro-organisms. *Atmos. Chem. Phys.* 7:4159-4169. <https://doi.org/10.5194/acp-7-4159-2007>.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., Delort, A., 2007b. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme : major groups and growth abilities at low temperatures 59, 242–254. *FEMS Microbiology Ecology* 59, 242–254. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00199.x>
- Anastasio, C., McGregor, K.G., 2000. Photodestruction of dissolved organic nitrogen species in fog waters. *Aerosol Sci. Technol.* 32, 106–119. <https://doi.org/10.1080/027868200303812>
- Ariya, P.A., Nepotchatykh, O., Ignatova, O., Amyot, M., 2002. Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. *Geophys. Res. Lett.* 29, 34-1-34-4. <https://doi.org/10.1029/2002gl015637>
- Aumont, B., Szopa, S., Madronich, S., 2005. Modelling the evolution of organic carbon during its gas-phase tropospheric oxidation: development of an explicit model based on a self generating approach. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.* 5, 703–754. <https://doi.org/10.5194/acpd-5-703-2005>
- Barbaro, E., Morabito, E., Gregoris, E., Feltracco, M., Gabrieli, J., Vardè, M., Cairns, W.R.L., Dallo, F., De Blasi, F., Zangrando, R., Barbante, C., Gambaro, A., 2020. Col Margherita Observatory: A background site in the Eastern Italian Alps for investigating the chemical composition of atmospheric aerosols. *Atmos. Environ.* 221. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.117071>

- Barbaro, E., Spolaor, A., Karroca, O., Park, K.T., Martma, T., Isaksson, E., Kohler, J., Gallet, J.C., Bjorkman, M.P., Cappelletti, D., Spreen, G., Zangrando, R., Barbante, C., Gambaro, A., 2017. Free amino acids in the Arctic snow and ice core samples: Potential markers for paleoclimatic studies. *Sci. Total Environ.* 607–608, 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.041>
- Barbaro, E., Zangrando, R., Moret, I., Barbante, C., Cescon, P., Gambaro, A., 2011. Free amino acids in atmospheric particulate matter of Venice, Italy. *Atmos. Environ.* 45, 5050–5057. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.01.068>
- Barbaro, E., Zangrando, R., Vecchiato, M., Piazza, R., Cairns, W.R.L., Capodaglio, G., Barbante, C., Gambaro, A., 2015. Free amino acids in Antarctic aerosol: Potential markers for the evolution and fate of marine aerosol. *Atmos. Chem. Phys.* 15, 5457–5469. <https://doi.org/10.5194/acp-15-5457-2015>
- 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 B, 61–69. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0889.1989.tb00125.x>
- Barzagli, P., Herrmann, H., 2002. A mechanistic study of the oxidation of phenol by OH/NO₂/NO₃ in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* <https://doi.org/10.1039/b201652d>
- Basha, K., Rajendran, A., Thangavelu, V., 2010. Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. *Asian J Exp Biol Sci* 1, 219–234.
- 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. *Atmos. Res.* 64, 109–119. [https://doi.org/10.1016/S0169-8095\(02\)00084-4](https://doi.org/10.1016/S0169-8095(02)00084-4)
- Berger, P., KarpelvelLeitner, N., Doré, M., Legube, B., 1999. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. *Water Res.* 33, 433–441. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00230-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00230-9)
- Berndt, T., Böge, O., 2001. Gas-phase reaction of OH radicals with benzene: Products and mechanism. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3, 4946–4956. <https://doi.org/10.1039/b106667f>
- Berndt, T., Böge, O., Stratmann, F., 2003. Gas-phase ozonolysis of α -pinene: Gaseous products and particle formation. *Atmos. Environ.* 37, 3933–3945. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(03\)00501-6](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(03)00501-6)
- Berto, S., De Laurentiis, E., Tota, T., Chiavazza, E., Daniele, P.G., Minella, M., Isaia, M., Brigante, M., Vione, D., 2016. Properties of the humic-like material arising from the photo-transformation of l-tyrosine. *Sci. Total Environ.* 545–546, 434–444. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.047>
- Bianco, A., Deguillaume, L., Vaïtilingom, M., Nicol, E., Baray, J.L., Chaumerliac, N., Bridoux, M., 2018. Molecular Characterization of Cloud Water Samples Collected at the Puy de Dôme (France) by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 52, 10275–10285. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01964>

- Bianco, A., Passananti, M., Deguillaume, L., Mailhot, G., Brigante, M., 2016a. Tryptophan and tryptophan-like substances in cloud water: Occurrence and photochemical fate. *Atmos. Environ.* 137, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.04.034>
- 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, 9191–9202. <https://doi.org/10.5194/acp-15-9191-2015>
- Bianco, A., Riva, M., Baray, J.L., Ribeiro, M., Chaumerliac, N., George, C., Bridoux, M., Deguillaume, L., 2019. Chemical Characterization of Cloudwater Collected at Puy de Dôme by FT-ICR MS Reveals the Presence of SOA Components. *ACS Earth Sp. Chem.* 3, 2076–2087. <https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.9b00153>
- 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. *Sci. Rep.* 6, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep37420>
- Blando, J.D., Turpin, B.J., 2000. Secondary organic aerosol formation in cloud and fog droplets: A literature evaluation of plausibility. *Atmos. Environ.* 34, 1623–1632. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(99\)00392-1](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(99)00392-1)
- Bolzacchini, E., Bruschi, M., Hjorth, J., Meinardi, S., Orlandi, M., Rindone, B., Rosenbohm, E., 2001. Gas-phase reaction of phenol with NO₃. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1791–1797. <https://doi.org/10.1021/es001290m>
- Bourotte, C.L.M., Sánchez-Ccoyllo, O.R., Forti, M.C., Melfi, A.J., 2011. Chemical composition of atmospheric particulate matter soluble fraction and meteorological variables in São Paulo state, Brazil. *Rev. Bras. Meteorol.* 26, 419–432. <https://doi.org/10.1590/S0102-77862011000300008>
- Brigante, M., Mailhot, G., 2015. Chapter 9. Phototransformation of Organic Compounds Induced by Iron Species. pp. 167–195. <https://doi.org/10.1039/9781782622154-00167>
- 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. *Atmos. Chem. Phys.* <https://doi.org/10.5194/acp-9-9263-2009>
- Buxton, G. V., Greenstock, C.L., Helman, W.P., Ross, A.B., 1988. Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}/\cdot\text{O}^-$ in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 17, 513–886. <https://doi.org/10.1063/1.555805>
- 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. *Geophys. Res. Lett.* 33, 2–5. <https://doi.org/10.1029/2005GL025374>
- Charbouillot, T., Brigante, M., Mailhot, G., Maddigapu, P.R., Minero, C., Vione, D., 2011. Performance and selectivity of the terephthalic acid probe for $\cdot\text{OH}$ as a function of temperature, pH and composition of atmospherically relevant aqueous media. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 222, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2011.05.003>

- Charbouillot, T., Gorini, S., Voyard, G., Parazols, M., Brigante, M., Deguillaume, L., Delort, A.M., Mailhot, G., 2012. Mechanism of carboxylic acid photooxidation in atmospheric aqueous phase: Formation, fate and reactivity. *Atmos. Environ.* 56, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.03.079>
- Cheize, M., Sarthou, G., Croot, P.L., Bucciarelli, E., Baudoux, A.C., Baker, A.R., 2012. Iron organic speciation determination in rainwater using cathodic stripping voltammetry. *Anal. Chim. Acta* 736, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.011>
- Chin, M., Wine, P.H., 2018. A temperature-dependent competitive kinetics study of the aqueous-phase reactions of OH radicals with formate, formic acid, acetate, acetic acid, and hydrated formaldehyde, in: *Aquatic and Surface Photochemistry*. <https://doi.org/10.1201/9781351069847>
- Claiborn, C.S., Aneja, V.P., 1993. Transport and Fate of Reactive Trace Gases in Red Spruce Needles. 1. Uptake of Gaseous Hydrogen Peroxide as Measured in Controlled Chamber Flux Experiments. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2585–2592. <https://doi.org/10.1021/es00048a042>
- Collett, J.L., Daube, B.C., Hoffmann, M.R., 1990. The chemical composition of intercepted cloudwater in the Sierra Nevada. *Atmos. Environ. Part A, Gen. Top.* 24, 959–972. [https://doi.org/10.1016/0960-1686\(90\)90298-2](https://doi.org/10.1016/0960-1686(90)90298-2)
- Costas, M., Mehn, M.P., Jensen, M.P., Que, L., 2004. Dioxygen Activation at Mononuclear Nonheme Iron Active Sites: Enzymes, Models, and Intermediates. *Chem. Rev.* <https://doi.org/10.1021/cr020628n>
- Côté, V., Kos, G., Mortazavi, R., Ariya, P.A., 2008. Microbial and “de novo” transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi. *Sci. Total Environ.* 390, 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.10.035>
- Crutzen, P.J., 1996. The role of particulate matter in ozone photochemistry (stratosphere and troposphere), in: *Nucleation and Atmospheric Aerosols 1996*. pp. 268–270. <https://doi.org/10.1016/b978-008042030-1/50065-2>
- Czuczwa, J., Leuenberger, C., Tremp, J., Giger, W., Ahel, M., 1987. Determination of trace levels of phenol and cresols in rain by continuous liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 403, 233–241. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96357-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96357-X)
- Darwin, C., 1846. An account of the Fine Dust which often falls on vessels in the Atlantic Ocean. *Q. J. Geol. Soc. London* 2, 26–30. <https://doi.org/10.1144/GSL.JGS.1846.002.01-02.09>
- Davey, M.E., O’toole, G.A., 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867. <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.4.847-867.2000>
- David, L.S., Pacyna M. Jozef, 1999. An industrial emissions inventory of calcium for Europe David. *Atmos. Environ.* 33, 1687–1697.
- Decesari, S., Facchini, M.C., Fuzzi, S., McFiggans, G.B., Coe, H., Bower, K.N., 2005. The water-soluble organic component of size-segregated aerosol, cloud water and wet depositions from Jeju Island during ACE-Asia. *Atmos. Environ.* 39, 211–222.

<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.09.049>

- 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. *Atmos. Chem. Phys.* 14, 1485–1506. <https://doi.org/10.5194/acp-14-1485-2014>
- Delort, A.M., Vaïtilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Parazols, M., Mailhot, G., Laj, P., Deguillaume, L., 2010. A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes. *Atmos. Res.* 98, 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2010.07.004>
- Delort, A.M., Vaïtilingom, M., Joly, M., Amato, P., Wirgot, N., Lallement, A., Sancelme, M., Matulova, M., Deguillaume, L., 2017. Clouds: A transient and stressing habitat for microorganisms, in: *Microbial Ecology of Extreme Environments*. pp. 215–245. https://doi.org/10.1007/978-3-319-51686-8_10
- DeMott, P.J., Prenni, A.J., 2010. New Directions: Need for defining the numbers and sources of biological aerosols acting as ice nuclei. *Atmos. Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.02.032>
- Di Filippo, P., Pomata, D., Riccardi, C., Buiarelli, F., Gallo, V., Quaranta, A., 2014. Free and combined amino acids in size-segregated atmospheric aerosol samples. *Atmos. Environ.* 98, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.08.069>
- Dieser, M., Greenwood, M., Foreman, C.M., 2010. Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arctic, Antarct. Alp. Res.* 42, 396–405. <https://doi.org/10.1657/1938-4246-42.4.396>
- Elliot, A.J., McCracken, D.R., 1989. Effect of temperature on O{circled division slash} reactions and equilibria: A pulse radiolysis study. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part.* [https://doi.org/10.1016/1359-0197\(89\)90096-9](https://doi.org/10.1016/1359-0197(89)90096-9)
- Ervens, B., 2015. Modeling the Processing of Aerosol and Trace Gases in Clouds and Fogs. *Chem. Rev.* <https://doi.org/10.1021/cr5005887>
- Ervens, B., Carlton, A.G., Turpin, B.J., Altieri, K.E., Kreidenweis, S.M., Feingold, G., 2008. Secondary organic aerosol yields from cloud-processing of isoprene oxidation products. *Geophys. Res. Lett.* 35. <https://doi.org/10.1029/2007GL031828>
- Ervens, B., Feingold, G., Frost, G.J., Kreidenweis, S.M., 2004. A modeling of study of aqueous production of dicarboxylic acids: 1. Chemical pathways and speciated organic mass production. *J. Geophys. Res. D Atmos.* <https://doi.org/10.1029/2003JD004387>
- 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. *Atmos. Chem. Phys.* 13, 5117–5135. <https://doi.org/10.5194/acp-13-5117-2013>
- Feltracco, M., Barbaro, E., Kirchgeorg, T., Spolaor, A., Turetta, C., Zangrando, R., Barbante, C., Gambaro, A., 2019. Free and combined L- and D-amino acids in Arctic aerosol.

Chemosphere 220, 412–421. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.147>

- Fong, N.J.C., Burgess, M.L., Barrow, K.D., Glenn, D.R., 2001. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 750–756. <https://doi.org/10.1007/s002530100739>
- Fuzzi, S., Facchini, M.C., Decesari, S., Matta, E., Mircea, M., 2002. Soluble organic compounds in fog and cloud droplets: What have we learned over the past few years? *Atmos. Res.* 64, 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0169-8095\(02\)00082-0](https://doi.org/10.1016/S0169-8095(02)00082-0)
- Gledhiir, M., Buck, K.N., 2012. The organic complexation of iron in the marine environment: A review. *Front. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00069>
- Goldstein, A.H., Galbally, I.E., 2007. Known and unexplored organic constituents in the earth's atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1514–1521. <https://doi.org/10.1021/es072476p>
- Gorzelska, K., Galloway, J.N., Watterson, K., Keene, W.C., 1992. Water-soluble primary amine compounds in rural continental precipitation. *Atmos. Environ. Part A, Gen. Top.* 26, 1005–1018. [https://doi.org/10.1016/0960-1686\(92\)90032-G](https://doi.org/10.1016/0960-1686(92)90032-G)
- Gourmelon, M., Cillard, J., Pommepuy, M., 1994. Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 105–112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03051.x>
- Grammatika, M., Zimmerman, W.B., 2001. Microhydrodynamics of flotation processes in the sea surface layer. *Dyn. Atmos. Ocean.* 34, 327–348. [https://doi.org/10.1016/S0377-0265\(01\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0377-0265(01)00073-2)
- Gregory, P.H., 1971. Airborne microbes: their significance and distribution. *Proc. R. Soc. London. Ser. B. Biol. Sci.* 177, 469–483.
- Guo, J., Wang, Y., Shen, X., Wang, Z., Lee, T., Wang, X., Li, P., Sun, M., Collett, J.L., Wang, W., Wang, T., 2012. Characterization of cloud water chemistry at Mount Tai, China: Seasonal variation, anthropogenic impact, and cloud processing. *Atmos. Environ.* 60, 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.07.016>
- Harrison, M.A.J., Barra, S., Borghesi, D., Vione, D., Arsene, C., Iulian Olariu, R., 2005. Nitrated phenols in the atmosphere: A review. *Atmos. Environ.* 39, 231–248. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.09.044>
- Helin, A., Sietiö, O.M., Heinonsalo, J., Bäck, J., Riekkola, M.L., Parshintsev, J., 2017. Characterization of free amino acids, bacteria and fungi in size-segregated atmospheric aerosols in boreal forest: Seasonal patterns, abundances and size distributions. *Atmos. Chem. Phys.* 17, 13089–13101. <https://doi.org/10.5194/acp-17-13089-2017>
- Herckes, P., Valsaraj, K.T., Collett, J.L., 2013. A review of observations of organic matter in fogs and clouds: Origin, processing and fate. *Atmos. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2013.06.005>
- Herlihy, L.J., Galloway, J.N., Mills, A.L., 1987. Bacterial Utilization of Formic in Rainwater. *Atmos. Environ.* 21, 2397–2402.
- Herrmann, H., Barzaghi, P., Böge, O., Brüggemann, E., Ervens, B., Donati, A., Hesper, J., Gnauk, T., Iinuma, Y., Müller, K., Neusüß, C., Plewka, A., 2002. Tropospheric Multiphase

- Chemistry in Field, Modelling and Laboratory Studies, in: *Global Atmospheric Change and Its Impact on Regional Air Quality*. pp. 31–36. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0082-6_6
- 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. *Chem. Rev.* <https://doi.org/10.1021/cr500447k>
- Herrmann, H., Tilgner, A., Barzagli, P., Majdik, Z., Gligorovski, S., Poulain, L., Monod, A., 2005a. Towards a more detailed description of tropospheric aqueous phase organic chemistry: CAPRAM 3.0. *Atmos. Environ.* 39, 4351–4363. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.02.016>
- Herrmann, H., Wolke, R., Müller, K., Brüggemann, E., Gnauk, T., Barzagli, P., Mertes, S., Lehmann, K., Massling, A., Birmili, W., Wiedensohler, A., Wieprecht, W., Acker, K., Jaeschke, W., Kramberger, H., Svrcina, B., Bächmann, K., Collett, J.L., Galgon, D., Schwirn, K., Nowak, A., Van Pinxteren, D., Plewka, A., Chemnitzer, R., Rüd, C., Hofmann, D., Tilgner, A., Diehl, K., Heinold, B., Hinneburg, D., Knoth, O., Sehili, A.M., Simmel, M., Wurzler, S., Majdik, Z., Mauersberger, G., Müller, F., 2005b. FEBUKO and MODMEP: Field measurements and modelling of aerosol and cloud multiphase processes. *Atmos. Environ.* 39, 4169–4183. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.02.004>
- Herrmann, J.M., 2010. Photocatalysis fundamentals revisited to avoid several misconceptions. *Appl. Catal. B Environ.* 99, 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.05.012>
- 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. *J. Geophys. Res. Atmos.* 112. <https://doi.org/10.1029/2006JD008002>
- Hill, T.C.J., DeMott, P.J., Conen, F., Möhler, O., 2017. Impacts of Bioaerosols on Atmospheric Ice Nucleation Processes, in: *Microbiology of Aerosols*. pp. 195–219. <https://doi.org/10.1002/9781119132318.ch3a>
- Hoose, C., Möhler, O., 2012. Heterogeneous ice nucleation on atmospheric aerosols: A review of results from laboratory experiments. *Atmos. Chem. Phys.* <https://doi.org/10.5194/acp-12-9817-2012>
- 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, 162–173. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.002>
- Igawa, M., Munger, J.W., Hoffmann, M.R., 1989. Analysis of Aldehydes in Cloud- and Fogwater Samples by HPLC with a Postcolumn Reaction Detector. *Environ. Sci. Technol.* 23, 556–561. <https://doi.org/10.1021/es00063a007>
- Ignatenko, A., Cherenkevich, S., 1985. Reactivity of amino acids and proteins in reactions with ozone. *KINET. KATAL.* 26, 1332–1335.
- Jackson, A. V., Hewitt, C.N., 1996. Hydrogen peroxide and organic hydroperoxide concentrations in air in a eucalyptus forest in central Portugal. *Atmos. Environ.* 30, 819–830. [https://doi.org/10.1016/1352-2310\(95\)00348-7](https://doi.org/10.1016/1352-2310(95)00348-7)

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.07.009>
- Jones, A.M., Harrison, R.M., 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations - A review. *Sci. Total Environ.* 326, 151–180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.11.021>
- Kawamura, K., Kaplan, I.R., 1983. Organic Compounds In the Rainwater of Los Angeles. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/es00114a011>
- Kelly, T.J., Daum, P.H., Schwartz, S.E., 1985. Measurements of peroxides in cloudwater and rain. *J. Geophys. Res.* 90, 7861–7871. <https://doi.org/10.1029/JD090iD05p07861>
- Kraljić, I., Sharpatyi, V.A., 1978. DETERMINATION OF SINGLET OXYGEN RATE CONSTANTS IN AQUEOUS SOLUTIONS. *Photochem. Photobiol.* 28, 583–586. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1978.tb06973.x>
- Kroll, J.H., Seinfeld, J.H., 2008. Chemistry of secondary organic aerosol: Formation and evolution of low-volatility organics in the atmosphere. *Atmos. Environ.* 42, 3593–3624. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.01.003>
- Lallement, A., Besaury, L., Tixier, E., Sancelme, M., Amato, P., Vinatier, V., Canet, I., Polyakova, O. V., Artaev, V.B., Lebedev, A.T., Deguillaume, L., Mailhot, G., Delort, A.M., 2018. Potential for phenol biodegradation in cloud waters. *Biogeosciences* 15, 5733–5744. <https://doi.org/10.5194/bg-15-5733-2018>
- Le Lacheur, R.M., Glaze, W.H., 1996. Reactions of ozone and hydroxyl radicals with serine. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1072–1080. <https://doi.org/10.1021/es940544z>
- Lebedev, A.T., Polyakova, O. V., Mazur, D.M., Artaev, V.B., Canet, I., Lallement, A., Vaïtilingom, M., Deguillaume, L., Delort, A.M., 2018. Detection of semi-volatile compounds in cloud waters by GC×GC-TOF-MS. Evidence of phenols and phthalates as priority pollutants. *Environ. Pollut.* 241, 616–625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.089>
- Leriche, M., 2003. Modeling study of strong acids formation and partitioning in a polluted cloud during wintertime. *J. Geophys. Res.* 108, 4433. <https://doi.org/10.1029/2002JD002950>
- Leuenberger, C., Czuczwa, J., Tremp, J., Giger, W., 1988. Nitrated phenols in rain: Atmospheric occurrence of phytotoxic pollutants. *Chemosphere* 17, 511–515. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(88\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0045-6535(88)90026-4)
- Leuenberger, C., Ilgockl, M.P., Pankow, J.F., 1985. Trace Organic Compounds in Rain. 4. Identities, Concentrations, and Scavenging Mechanisms for Phenols in Urban Air and Rain. *Environ. Sci. Technol.* 19, 1053–1058. <https://doi.org/10.1021/es00141a005>
- Levsen, K., Behnert, S., Prieß, B., Svoboda, M., Winkeler, H.D., Zietlow, J., 1990. Organic compounds in precipitation. *Chemosphere* 21. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(90\)90127-F](https://doi.org/10.1016/0045-6535(90)90127-F)
- Li, J., Mailhot, G., Wu, F., Deng, N., 2010. Photochemical efficiency of Fe(III)-EDDS complex: {radical dot}OH radical production and 17β-estradiol degradation. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 212, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2010.03.001>

- Li, Y.C., Yu, J.Z., Ho, S.S.H., Schauer, J.J., Yuan, Z., Lau, A.K.H., Louie, P.K.K., 2013. Chemical characteristics and source apportionment of fine particulate organic carbon in Hong Kong during high particulate matter episodes in winter 2003. *Atmos. Res.* 120–121, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2012.08.005>
- Lim, H.J., Carlton, A.G., Turpin, B.J., 2005. Isoprene forms secondary organic aerosol through cloud processing: Model simulations. *Environ. Sci. Technol.* 39, 4441–4446. <https://doi.org/10.1021/es048039h>
- Lin, Y.C., Cheng, M.T., Ting, W.Y., Yeh, C.R., 2006. Characteristics of gaseous HNO₂, HNO₃, NH₃ and particulate ammonium nitrate in an urban city of Central Taiwan. *Atmos. Environ.* 40, 4725–4733. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.04.037>
- Loflund, M., Kasper-Giebl, A., Schuster, B., Giebl, H., Hitzenberger, R., Puxbaum, H., 2002. Concentrations and Their Contribution To Organic Carbon in Cloud Water. *Atmos. Environ.* 36, 1553–1558.
- Long, Y., Charbouillot, T., Brigante, M., Mailhot, G., Delort, A.M., Chaumerliac, N., Deguillaume, L., 2013. Evaluation of modeled cloud chemistry mechanism against laboratory irradiation experiments: The HxOy/iron/carboxylic acid chemical system. *Atmos. Environ.* 77, 686–695. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.05.037>
- Lundeen, R.A., Janssen, E.M.L., Chu, C., McNeill, K., 2014. Environmental photochemistry of amino acids, peptides and proteins. *Chimia (Aarau)*. <https://doi.org/10.2533/chimia.2014.812>
- Luo, L., Kao, S.J., Bao, H., Xiao, Huayun, Xiao, Hongwei, Yao, X., Gao, H., Li, J., Lu, Y., 2018. Sources of reactive nitrogen in marine aerosol over the Northwest Pacific Ocean in spring. *Atmos. Chem. Phys.* 18, 6207–6222. <https://doi.org/10.5194/acp-18-6207-2018>
- Lüttke, J., Levsen, K., 1997. Phase partitioning of phenol and nitrophenols in clouds. *Atmos. Environ.* 31, 2649–2655. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(96\)00228-2](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(96)00228-2)
- Mace, K.A., Duce, R.A., Tindale, N.W., 2003a. Organic nitrogen in rain and aerosol at Cape Grim, Tasmania, Australia. *J. Geophys. Res. D Atmos.* 108. <https://doi.org/10.1029/2002jd003051>
- Mace, K.A., Kubilay, N., Duce, R.A., 2003b. Organic nitrogen in rain and aerosol in the eastern Mediterranean atmosphere: An association with atmospheric dust. *J. Geophys. Res. D Atmos.* 108. <https://doi.org/10.1029/2002jd002997>
- Mandalakis, M., Apostolaki, M., Stephanou, E.G., 2010. Trace analysis of free and combined amino acids in atmospheric aerosols by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.021>
- 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. Discuss.* 4, 849–886. <https://doi.org/10.5194/acpd-4-849-2004>
- 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.* 101, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2011.02.013>
- Mashayekhy Rad, F., Zurita, J., Gilles, P., Rutgeerts, L.A.J., Nilsson, U., Ilag, L.L., Leck, C.,

2019. Measurements of Atmospheric Proteinaceous Aerosol in the Arctic Using a Selective UHPLC/ESI-MS/MS Strategy. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 30, 161–173. <https://doi.org/10.1007/s13361-018-2009-8>
- Masuda, T., Nakano, S., Kondo, M., 1973. Rate Constants for the Reactions of OH Radicals with the Enzyme Proteins as Determined by the p-Nitrosodimethylaniline Method. *J. Radiat. Res.* 14, 339–345. <https://doi.org/10.1269/jrr.14.339>
- Matheson, I.B.C., Lee, J., 1979. CHEMICAL REACTION RATES OF AMINO ACIDS WITH SINGLET OXYGEN. *Photochem. Photobiol.* 29, 879–881. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07786.x>
- Matsumoto, K., Uematsu, M., 2005. Free amino acids in marine aerosols over the western North Pacific Ocean. *Atmos. Environ.* 39, 2163–2170. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.12.022>
- 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. *Front. Microbiol.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00557>
- McGregor, K.G., Anastasio, C., 2001. Chemistry of fog waters in California's Central Valley: 2. Photochemical transformations of amino acids and alkyl amines. *Atmos. Environ.* 35, 1091–1104. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(00\)00282-X](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(00)00282-X)
- McNeill, V.F., 2015. Aqueous organic chemistry in the atmosphere: Sources and chemical processing of organic aerosols. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/es5043707>
- R. Mellor, J. Ronnenberg, W. Campbell, S. Diekmann less, 1992.Reduction oof nitrate and ntrite in water by immobilized enzymes. *Lett. to Nat. Chemistry Nature.* DOI:10.1038/355717a0
- Michaeli, A., Feitelson, J., 1994. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and peptides. *Photochem. Photobiol.* 59, 284–289. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05035.x>
- Miskoski, S., García, N., 1993. Influence of the peptide bond on the singlet molecular oxygen-mediated (O₂[1 delta g]) photooxidation of histidine and methionine dipeptides. A kinetic study. *Photochem. Photobiol.* 57, 447–452. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1993.tb02317.x>
- Möhler, O., DeMott, P.J., Vali, G., Levin, Z., 2007. Microbiology and atmospheric processes: The role of biological particles in cloud physics. *Biogeosciences.* <https://doi.org/10.5194/bg-4-1059-2007>
- Monod, A., Poulain, L., Grubert, S., Voisin, D., Wortham, H., 2005. Kinetics of OH-initiated oxidation of oxygenated organic compounds in the aqueous phase: New rate constants, structure-activity relationships and atmospheric implications. *Atmos. Environ.* 39, 7667–7688. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.03.019>
- Mopper, K., Zika, R.G., 1987. Free amino acids in marine rains: evidence for oxidation and potential role in nitrogen cycling. *Nature* 325, 246–249. <https://doi.org/10.1038/325246a0>
- Morgan, P.E., Pattison, D.I., Davies, M.J., 2012. Quantification of hydroxyl radical-derived oxidation products in peptides containing glycine, alanine, valine, and proline. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.448>

- 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. *ISME J.* 2, 321–334. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.113>
- Motohashi, N., Saito, Y., 1993. Competitive Measurement of Rate Constants for Hydroxyl Radical Reactions Using Radiolytic Hydroxylation of Benzoate. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 41, 1842–1845. <https://doi.org/10.1248/cpb.41.1842>
- Mudd, J.B., Leavitt, R., Ongun, A., McManus, T.T., 1969. Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmos. Environ.* 3, 669–681. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(69\)90024-9](https://doi.org/10.1016/0004-6981(69)90024-9)
- Mueller, D.R., Vincent, W.F., Bonilla, S., Laurion, I., 2005. Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem, in: *FEMS Microbiology Ecology*. pp. 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.11.001>
- MUNGER, J.W., COLLETT, J., DAUBE, B.C., HOFFMANN, M.R., 1989. Carboxylic acids and carbonyl compounds in southern California clouds and fogs. *Tellus B* 41 B, 230–242. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0889.1989.tb00303.x>
- Munger, J.W., Jacob, D.J., Daube, B.C., Horowitz, L.W., 1995. Formaldehyde, glyoxal, and methylglyoxal in air and cloudwater at a rural mountain site in central Virginia. *JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH*, VOL. 100, NO. D5, PAGES 9325–9333, MAY 20, 1995. <https://doi.org/10.1029/95JD00508>
- O’Sullivan, D., Murray, B.J., Ross, J.F., Whale, T.F., Price, H.C., Atkinson, J.D., Umo, N.S., Webb, M.E., 2015. The relevance of nanoscale biological fragments for ice nucleation in clouds. *Sci. Rep.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep08082>
- Olariu, R.I., Klotz, B., Barnes, I., Becker, K.H., Mocanu, R., 2002. FT-IR study of the ring-retaining products from the reaction of OH radicals with phenol, o-, m-, and p-cresol. *Atmos. Environ.* 36, 3685–3697. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(02\)00202-9](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(02)00202-9)
- Olszyna, K.J., Meagher, J.F., Bailey, E.M., 1988. Gas-phase, cloud and rain-water measurements of hydrogen peroxide at a high-elevation site. *Atmos. Environ.* 22, 1699–1706. [https://doi.org/10.1016/0004-6981\(88\)90398-8](https://doi.org/10.1016/0004-6981(88)90398-8)
- Ooki, A., Uematsu, M., Miura, K., Nakae, S., 2002. Sources of sodium in atmospheric fine particles. *Atmos. Environ.* 36, 4367–4374. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(02\)00341-2](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(02)00341-2)
- 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. *Environ. Sci. Technol.* 50, 9324–9332. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02338>
- Pattison, D.I., Rahmanto, A.S., Davies, M.J., 2012. Photo-oxidation of proteins. *Photochem. Photobiol. Sci.* <https://doi.org/10.1039/c1pp05164d>
- PETRENUCHUK, O.P., DROZDOVA, V.M., 1966. On the chemical composition of cloud water. *Tellus* 18, 280–286. <https://doi.org/10.1111/j.2153-3490.1966.tb00238.x>

- Poli, A., Anzelmo, G., Nicolaus, B., 2010. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities. *Mar. Drugs*. <https://doi.org/10.3390/md8061779>
- Prasse, C., Ford, B., Nomura, D.K., Sedlak, D.L., 2018. Unexpected transformation of dissolved phenols to toxic dicarbonyls by hydroxyl radicals and UV light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 2311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715821115>
- Pruppacher, H.R., Jaenicke, R., 1995. The processing of water vapor and aerosols by atmospheric clouds, a global estimate. *Atmos. Res.* 38, 283–295. [https://doi.org/10.1016/0169-8095\(94\)00098-X](https://doi.org/10.1016/0169-8095(94)00098-X)
- Prütz, W.A., Vogel, S., 1976. Specific Rate Constants of Hydroxyl Radical and Hydrated Electron Reactions Determined by the RCL Method. *Zeitschrift für Naturforsch. B* 31, 1501–1510. <https://doi.org/10.1515/znb-1976-1115>
- Rao, X., Collett, J.L., 1995. Behavior of S(IV) and Formaldehyde in a Chemically Heterogeneous Cloud. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1023–1031. <https://doi.org/10.1021/es00004a024>
- Ren, L., Bai, H., Yu, X., Wu, F., Yue, S., Ren, H., Li, L., Lai, S., Sun, Y., Wang, Z., Fu, P., 2018. Molecular composition and seasonal variation of amino acids in urban aerosols from Beijing, China. *Atmos. Res.* 203, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2017.11.032>
- 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. *Atmos. Environ. Part B, Urban Atmos.* 27, 203–219. [https://doi.org/10.1016/0957-1272\(93\)90006-R](https://doi.org/10.1016/0957-1272(93)90006-R)
- Samy, S., Robinson, J., Hays, M.D., 2011. An advanced LC-MS (Q-TOF) technique for the detection of amino acids in atmospheric aerosols. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 3103–3113. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5238-2>
- Šantl-Temkiv, T., Finster, K., Dittmar, T., Hansen, B.M., Thyraug, R., Nielsen, N.W., Karlson, U.G., 2013. Hailstones: A Window into the Microbial and Chemical Inventory of a Storm Cloud. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053550>
- Sattler, B., Puxbaum, H., Psenner, R., 2001. Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophys. Res. Lett.* 28, 239–242. <https://doi.org/10.1029/2000GL011684>
- Saxena, P., Hildemann, L.M., 1996. Water-soluble organics in atmospheric particles: A critical review of the literature and application of thermodynamics to identify candidate compounds. *J. Atmos. Chem.* 24, 57–109. <https://doi.org/10.1007/BF00053823>
- Scalabrin, E., Zangrando, R., Barbaro, E., Kehrwald, N.M., Gabrieli, J., Barbante, C., Gambaro, A., 2012. Amino acids in Arctic aerosols. *Atmos. Chem. Phys.* 12, 10453–10463. <https://doi.org/10.5194/acp-12-10453-2012>
- Schauer, J.J., Kleeman, M.J., Cass, G.R., Simoneit, B.R.T., 2001. Measurement of emissions from air pollution sources. 3. C1-C29 organic compounds from fireplace combustion of wood. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1716–1728. <https://doi.org/10.1021/es001331e>
- Scheller, E., 2001. Amino acids in dew - Origin and seasonal variation. *Atmos. Environ.* 35, 2179–2192. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(00\)00477-5](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(00)00477-5)

- Scholes, G., Shaw, P., Wilson, R.L., Ebert, M., 1965. Pulse radiolysis studies of aqueous solutions of nucleic acid and related substances., in: *Pulse Radiolysis*. Academic Press, pp. 151–164.
- Schummer, C., Groff, C., Al Chami, J., Jaber, F., Millet, M., 2009. Analysis of phenols and nitrophenols in rainwater collected simultaneously on an urban and rural site in east of France. *Sci. Total Environ.* 407, 5637–5643. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.051>
- Solar, S., Solar, W., Getoff, N., 1984. Reactivity of hydroxyl with tyrosine in aqueous solution studied by pulse radiolysis. *J. Phys. Chem.* 88, 2091–2095. <https://doi.org/10.1021/j150654a030>
- Song, T., Wang, S., Zhang, Y., Song, J., Liu, F., Fu, P., Shiraiwa, M., Xie, Z., Yue, D., Zhong, L., Zheng, J., Lai, S., 2017. Proteins and Amino Acids in Fine Particulate Matter in Rural Guangzhou, Southern China: Seasonal Cycles, Sources, and Atmospheric Processes. *Environ. Sci. Technol.* 51, 6773–6781. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00987>
- Sorimachi, K., 2009. Evolution from Primitive Life to Homo sapiens Based on Visible Genome Structures: The Amino Acid World. *Nat. Sci.* 01, 107–119. <https://doi.org/10.4236/ns.2009.12013>
- Stadtman, E.R., 1993. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 797–821.
- Stadtman, E.R., Levine, R., 2004. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207–18. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>
- Steinfeld, J.I., 1998. Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change. *Environ. Sci. Policy Sustain. Dev.* 40, 26–26. <https://doi.org/10.1080/00139157.1999.10544295>
- Sun, J., Ariya, P.A., 2006. Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review. *Atmos. Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.05.052>
- Tan, Y., Carlton, A.G., Seitzinger, S.P., Turpin, B.J., 2010. SOA from methylglyoxal in clouds and wet aerosols: Measurement and prediction of key products. *Atmos. Environ.* 44, 5218–5226. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.08.045>
- Temkiv, T.Š., Finster, K., Hansen, B.M., Nielsen, N.W., Karlson, U.G., 2012. The microbial diversity of a storm cloud as assessed by hailstones. *FEMS Microbiol. Ecol.* 81, 684–695. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01402.x>
- Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., Xu, W., Su, Z., 2017. AgriGO v2.0: A GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 45, W122–W129. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx382>
- Tilgner, A., Herrmann, H., 2010. Radical-driven carbonyl-to-acid conversion and acid degradation in tropospheric aqueous systems studied by CAPRAM. *Atmos. Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.07.050>
- Triesch, N., van Pinxteren, M., Engel, A., Herrmann, H., 2020. Concerted measurements of free amino acids at the Cape Verde Islands: High enrichments in submicron sea spray aerosol

- particles and cloud droplets. *Atmos. Chem. Phys.* 1–24. <https://doi.org/10.5194/acp-2019-976>
- Umschlag, T., Herrmann, H., Zellner, R., 1997. A kinetic study of aqueous phase nitrate (NO₃-) radical reactions with aldehydes and their impact on atmospheric clouds and aerosols chemistry. *Sect. Title Air Pollut. Ind. Hyg.* 97–02, 47–49.
- Väitilingom, 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, 23–29. <https://doi.org/10.1128/AEM.01127-09>
- Väitilingom, M., Attard, E., Gaiani, N., Sancelme, M., Deguillaume, L., Flossmann, A.I., Amato, P., Delort, A., 2012. Long-term features of cloud microbiology at the puy de Dôme (France) 56. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.03.072>
- Väitilingom, M., Charbouillot, T., Deguillaume, L., Maisonobe, R., Parazols, M., Amato, P., Sancelme, M., Delort, A.-M., 2011. Atmospheric chemistry of carboxylic acids: microbial implication *versus* photochemistry. *Atmos. Chem. Phys. Discuss.* 11, 4881–4911. <https://doi.org/10.5194/acpd-11-4881-2011>
- Valverde-Canossa, J., Wieprecht, W., Acker, K., Moortgat, G.K., 2005. H₂O₂ and organic peroxide measurements in an orographic cloud: The FEBUKO experiment. *Atmos. Environ.* 39, 4279–4290. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.02.040>
- Vinatier, V., Wirgot, N., Joly, M., Sancelme, M., Abrantes, M., Deguillaume, L., Delort, A., 2016. Siderophores in Cloud Waters and Potential Impact on Atmospheric Chemistry : Production by Microorganisms Isolated at the Puy de Dôme Station. *Environ. Sci. Technol.* 50, 17, 9315–9323 <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02335>
- Vione, D., Valter, M., Minero, C., 2003. THE ATMOSPHERIC PEROXIDE : A REVIEW CHEMISTRY OF HYDROGEN 477–488.
- Volkamer, R., Volkamer, R., Volkamer, R., Klotz, B., Klotz, B., Barnes, I., Imamura, T., Wirtz, K., Washida, N., Becker, K.H., Platt, U., 2002. OH-initiated oxidation of benzene: Part I. Phenol formation under atmospheric conditions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4, 1598–1610. <https://doi.org/10.1039/b108747a>
- Watanabe, K., Honoki, H., Iwama, S., Iwatake, K., Mori, S., Nishimoto, D., Komori, S., Saito, Y., Yamada, H., Uehara, Y., 2011. Chemical composition of fog water at Mt. Tateyama near the coast of the Japan sea in central Japan. *Erdkunde* 65, 233–245. <https://doi.org/10.3112/erdkunde.2011.03.02>
- 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, 645–655. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(00\)00358-7](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(00)00358-7)
- Wedyan, M.A., Preston, M.R., 2008. The coupling of surface seawater organic nitrogen and the marine aerosol as inferred from enantiomer-specific amino acid analysis. *Atmos. Environ.* 42, 8698–8705. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.04.038>
- 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, 5652–5659. <https://doi.org/10.1021/es4056643>
- Willard Richards, L., 1995. Airborne chemical measurements in nighttime stratus clouds in the Los Angeles Basin. *Atmos. Environ.* 29, 27–46. [https://doi.org/10.1016/1352-2310\(94\)00218-A](https://doi.org/10.1016/1352-2310(94)00218-A)
- Wirgot, N., Vinatier, V., Deguillaume, L., Sancelme, M., Delort, A.M., 2017. H₂O₂ modulates the energetic metabolism of the cloud microbiome. *Atmos. Chem. Phys.* 17, 14841–14851. <https://doi.org/10.5194/acp-17-14841-2017>
- Wittmaack, K., Wehnes, H., Heinzmann, U., Agerer, R., 2005. An overview on bioaerosols viewed by scanning electron microscopy. *Sci. Total Environ.* 346, 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.11.009>
- Xu, Y., Wu, D., Xiao, H., Zhou, J., 2019. Dissolved hydrolyzed amino acids in precipitation in suburban Guiyang, southwestern China: Seasonal variations and potential atmospheric processes. *Atmos. Environ.* 211, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.05.011>
- Xu, Y., Xiao, H., Wu, D., Long, C., 2020. Abiotic and Biological Degradation of Atmospheric Proteinaceous Matter Can Contribute Significantly to Dissolved Amino Acids in Wet Deposition. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00421>
- Yan, G., Kim, G., Kim, J., Jeong, Y.S., Kim, Y. Il, 2015. Dissolved total hydrolyzable enantiomeric amino acids in precipitation: Implications on bacterial contributions to atmospheric organic matter. *Geochim. Cosmochim. Acta* 153, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.01.005>
- Yang, H., Jian, Z.Y., Hang Ho, S.S., Xu, J., Wu, W.S., Chun, H.W., Wang, Xiaodong, Wang, Xiaorong, Wang, L., 2005. The chemical composition of inorganic and carbonaceous materials in PM_{2.5} in Nanjing, China. *Atmos. Environ.* 39, 3735–3749. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.03.010>
- Zhang, Q., Anastasio, C., 2003. Free and combined amino compounds in atmospheric fine particles (PM_{2.5}) and fog waters from Northern California. *Atmos. Environ.* 37, 2247–2258. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(03\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(03)00127-4)
- Zhang, Q., Anastasio, C., 2001. Chemistry of fog waters in California's Central Valley - Part 3: Concentrations and speciation of organic and inorganic nitrogen. *Atmos. Environ.* 35, 5629–5643. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(01\)00337-5](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(01)00337-5)
- Zhang, Q., Anastasio, C., Jimenez-Cruz, M., 2002. Water-soluble organic nitrogen in atmospheric fine particles (PM_{2.5}) from northern California. *J. Geophys. Res. D Atmos.* 107. <https://doi.org/10.1029/2001jd000870>
- Zhao, Y., Hallar, A.G., Mazzoleni, L.R., 2013. Atmospheric organic matter in clouds: Exact masses and molecular formula identification using ultrahigh-resolution FT-ICR mass spectrometry. *Atmos. Chem. Phys.* 13, 12343–12362. <https://doi.org/10.5194/acp-13-12343-2013>
- Zhu, R. guo, Xiao, H.Y., Zhu, Y., Wen, Z., Fang, X., Pan, Y., 2020. Sources and Transformation Processes of Proteinaceous Matter and Free Amino Acids in PM_{2.5}. *J. Geophys. Res.*

Atmos. 125. <https://doi.org/10.1029/2020JD032375>

Zhu, R., Xiao, Hua-yun, Luo, L., Xiao, Hongwei, Wen, Z., Zhu, Y., Fang, X., Pan, Y., Chen, Z., 2020. Measurement report : Amino acids in fine and coarse atmospheric aerosol : concentrations , compositions , sources and possible bacterial degradation state.