







Université du Québec  
à Rimouski

**Enrichissement microbien de consortiums nitrifiants issus de  
l'estuaire du Saint-Laurent, caractérisation de leur activité  
nitrifiante et de leur diversité taxonomique**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR

© SHARON ANDREA FIGUEROA MENDEZ

**Décembre 2022**



**Composition du jury :**

**Jean-Sébastien Deschênes, président du jury, Université du Québec à Rimouski**

**Karine Lemarchand, directrice de recherche, Université du Québec à Rimouski**

**Michel Gosselin, codirecteur de recherche, Université du Québec à Rimouski**

**Jean-Michel Girard, codirecteur de recherche, Centre de recherche sur les  
biotechnologies marines et Université du Québec à Rimouski**

**Denis Groleau, examinateur externe, Université de Sherbrooke**

Dépôt initial le 26 août 2022

Dépôt final le 19 décembre 2022





UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI  
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.





## AVANT-PROPOS

Ce mémoire est le fruit d'un projet collaboratif entre l'Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER), le Centre de recherche sur les biotechnologies marines (CRBM) et une compagnie québécoise, dans le but de développer un produit nitrifiant efficace en eau salée et froide. Cette compagnie québécoise, ayant requis la confidentialité de ses informations personnelles, commercialise déjà un consortium nitrifiant visant les marchés de l'aquariophilie en eau douce ainsi que celui du traitement des eaux usées municipales et industrielles. Cependant, son pouvoir nitrifiant diminue considérablement en eau froide et en eau salée. La zone côtière de l'estuaire du Saint-Laurent a été sélectionnée comme site d'échantillonnage puisqu'elle constitue une excellente source de diversité microbienne. De plus, c'est un milieu froid et salé déjà soumis à des apports d'azote fréquents, ce qui augmente les chances d'y trouver des organismes impliqués dans le cycle de l'azote telles que les bactéries nitrifiantes. Ce projet s'insère dans une initiative de valorisation de la biomasse microbienne de l'estuaire du Saint-Laurent financée par le Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels du Québec (CRIBIQ) et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), sans qui le projet n'aurait pu voir le jour.

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Karine Lemarchand, et mes codirecteurs, Michel Gosselin et Jean-Michel Girard, pour leurs conseils et leur soutien continu. Un merci spécial à Julie Foulon, post-doctorante encadrante, pour son savoir-faire en recherche et sa bonne humeur contagieuse ! Il va sans dire que l'aide technique reçue au CRBM et à l'ISMER fut essentielle. Un merci particulier à Marie-Ève Gauthier et Julien Dugas pour leur expertise et leur temps. Merci à ceux qui ont aidé à la correction de ce mémoire et à ceux qui prendront le temps de le lire.

Bonne lecture !



## RÉSUMÉ

La nitrification est un processus microbien essentiel du cycle de l'azote qui convertit l'azote ammoniacal en nitrate. Ce processus biologique est fréquemment utilisé dans le domaine des biotechnologies industrielles pour éliminer l'ammoniaque présent dans différents systèmes (ex : aquariophilie, traitement des eaux usées). Les consortiums microbiens utilisés pour ces applications, souvent d'origine terrestre ou de milieux aquatiques dulcicoles, présentent toutefois une faible activité nitrifiante à basse température et en milieu salé. L'objectif principal de ce projet de maîtrise est de développer un consortium nitrifiant performant à basse température (10°C) et en eau salée (25 psu) à partir du microbiome de l'estuaire du Saint-Laurent. Les hypothèses sont (1) que l'estuaire du Saint-Laurent possède des souches nitrifiantes fonctionnelles pouvant être performantes à 10°C et 25 psu et (2) que l'augmentation de l'abondance relative des bactéries nitrifiantes, par enrichissement sélectif, induira une activité nitrifiante accrue des consortiums. L'efficacité de la première étape d'enrichissement a été démontrée en étudiant la diversité microbienne des consortiums par métabarcodage (ADNr 16S) avant et après l'enrichissement. Deux genres nitrifiants, *Nitrosomonas* et *Candidatus Nitrotoga*, sont ressortis comme étant les principaux nitrifiants après enrichissement dans tous les échantillons de sédiments et d'eau de mer (abondance relative médiane de 10,5% et 11,2%, respectivement). Après les deux dernières étapes d'enrichissement, le consortium (S2F) a atteint un taux de nitrification 2 fois plus élevé qu'un homologue commercial à 10°C et 25 psu. Avec une telle performance, le consortium S2F présente un potentiel commercial intéressant pour la nitrification en eau salée et froide. De plus, cette étude constitue un exemple mettant en évidence le potentiel de valorisation de la biomasse microbienne de l'estuaire du Saint-Laurent dans le domaine des biotechnologies marines et industrielles.

Mots clés : Enrichissement microbien, métabarcodage, nitrification, cycle de l'azote, bactéries oxydant l'ammoniac, archées oxydant l'ammoniac, bactéries oxydant le nitrite, basse température, milieu marin, estuaire du Saint-Laurent.



## ABSTRACT

Nitrification is an essential microbial process from the nitrogen cycle that converts ammonia into nitrate. This biological process is frequently used in the field of industrial biotechnology to remove ammonia from various systems (e.g. aquariums, wastewater treatment plants). The microbial consortia used for these applications, often of terrestrial or freshwater origin, present however a weak nitrification activity at low temperatures and in salty environments. To overcome this limitation, natural consortia evolving in the cold marine environment of the St. Lawrence Estuary (Quebec, Canada) were targeted to then increase their overall nitrifying activity by microbial enrichment in the laboratory. The main objective of this M. Sc. project was to develop a nitrifying consortium from the microbiome of the St. Lawrence Estuary that performs well in salty (25 psu) and low temperature (10°C) waters. It was hypothesized (1) that the St. Lawrence Estuary harbors functional nitrifying strains that can perform well at 10°C and 25 psu and (2) that increasing the relative abundance of the nitrifying bacteria by selective enrichment will induce an increased nitrifying activity of the consortium. The effectiveness of the first enrichment step was demonstrated by studying the microbial diversity of the consortia by metabarcoding (16S rDNA) before and after enrichment. Two nitrifying genera, *Nitrosomonas* and *Candidatus Nitrotoga*, emerged as the main nitrifiers after enrichment in all sediment and seawater samples (median relative abundance of 10.5% and 11.2%, respectively). After the last two steps of the enrichment strategy, the S2F consortium achieved a 2-fold higher nitrification rate than a commercial counterpart at 10°C and 25 psu. With such a high performance, the S2F consortium exhibited an interesting commercial potential for nitrification in cold and salty waters. In addition, this study is an example of the potential for valorization of the microbial biomass of the St. Lawrence Estuary in the field of marine and industrial biotechnologies.

Keywords: Microbial enrichment, metabarcoding, nitrification, nitrogen cycle, ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea, nitrite-oxidizing bacteria, low temperature, marine environment, St. Lawrence Estuary.



## TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS .....	viii
RÉSUMÉ.....	x
ABSTRACT .....	xii
TABLE DES MATIÈRES .....	xiv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvii
LISTE DES FIGURES.....	xviii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES .....	xxi
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.    LE CYCLE DE L'AZOTE.....	1
1.1    Nitrification.....	3
1.2    Facteurs influençant la nitrification .....	5
2.    LES CARACTÉRISTIQUES DÉSIRÉES D'UN CONSORTIUM NITRIFIANT EFFICACE EN MILIEU FROID ET SALÉ .....	10
2.1    Halotolérance et halophilie .....	10
2.2    Psychrotolérance et psychrophilie .....	11
3.    LE SYSTÈME MARIN DU SAINT-LAURENT .....	13
4.    L'ENRICHISSEMENT MICROBIEN DANS LE DOMAINE DES BIOTECHNOLOGIES MARINES.....	15
5.    OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DU MÉMOIRE .....	16
CHAPITRE 1 : CONSORTIUMS NITRIFIANTS MARINS PERFORMANTS EN EAU FROIDE ET SALÉE OBTENUS PAR ENRICHISSEMENT MICROBIEN.....	18
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE .....	18



ARTICLE: HIGH NITRIFICATION ACTIVITY IN COLD AND SALTY WATER ACHIEVED BY MICROBIAL ENRICHMENT OF MARINE MICROBES .....	20
APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA.....	50
RÉFÉRENCES DE L'ARTICLE .....	54
CONCLUSION GÉNÉRALE .....	64
RÉFÉRENCES DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	68



## LISTE DES TABLEAUX

- Table 1 Environmental conditions of the sampling sites in the St. Lawrence Estuary in 2020. The initial sample treatment in the laboratory was filtration (Filt.) for surface water (W) and either washing (Wash.) or bacterial extraction (B.E.) for surface sediments from the intertidal zone (S). TDN = total dissolved nitrogen;  $\text{NO}_3 + \text{NO}_2$  = nitrate plus nitrite; Chl *a* = chlorophyll *a*. .....47
- Table 2 Mean values ( $\pm 1$  standard deviation) of the richness (total number of unique taxa), Shannon diversity index, and Simpson diversity index of natural and enriched microbial consortia during the 3 phases of the study. Natural and phase 1 (P1) mean values were calculated on all consortia (n=12). Phase 2 (P2) mean values were calculated on 2 consortia: SID and S2F. Phase 3 (P3) mean values were calculated on 3 consortia: SID, S2F and COM. For details, see supplementary information Figures S2 to S5 .....48
- Table 3 Nitrogen in the 150 mL control samples of the standardized nitrification test. The N loss is the difference between the initial N in the culture medium and the dissolved N after a stabilization period of three days. This loss is then detailed according to two hypotheses ; either most N is lost by volatilization or most N is lost by precipitation (see section 3.4.3. for details).....49

## LISTE DES FIGURES

Figure G1 Le cycle de l'azote avec les inventaires globaux, les processus et les flux annuels d'azote. En gris, les inventaires globaux d'azote en teragrammes d'azote. En vert, les flux d'azote annuels d'origine terrestre, en bleu ceux d'origine marine et en orange ceux d'origine anthropique (Tirée de Kuypers et al., 2018). .....	2
Figure G2 Version simplifiée du cycle de l'azote mettant en évidence les processus aérobie et anaérobie (Tirée de Bernhard, 2010). .....	3
Figure G3 Le système hydrologique du Saint-Laurent (Québec, Canada) (Tirée de Explos-Nature, 2011).....	14
Figure 1 Sampling site location of seawater and surface sediments in the St. Lawrence Estuary (Quebec, Canada) .....	41
Figure 2 Diagram of the enrichment process. The top part shows the format of each phase (Erlenmeyer flasks, benchtop bioreactor, and homemade bioreactor). The diagram at the bottom is a summary of the enrichment process used in this study to obtain nitrifying consortia efficient at 10°C and 25 psu. ....	42
Figure 3 Mean relative abundance of nitrifying bacteria genera in each consortium. (a) natural samples and (b) samples at the end of the first step of the enrichment process. OTUs representing less than 0.1% across all samples were removed from the figure for clarity. The results are based on amplicon DNA concentrations normalized before sequencing. The mean values were calculated from duplicate samples. Refer to Table 1 for sample site coding. ....	43
Figure 4 Mean relative abundance of prokaryotic genera present at the end of the first enrichment phase (P1). OTUs representing less than 1% across all samples were removed from the figure for clarity. The results are based on amplicon DNA concentrations normalized before sequencing. The mean value is calculated from duplicate samples. Refer to Table 1 for sample site coding. ....	44
Figure 5 Mean relative abundance of prokaryotic genera present in phase 3 samples of two newly enriched marine sediment-derived nitrifying consortia (S1D and S2F), and a freshwater commercial counterpart (COM). AOB = ammonia oxidizing bacteria, NOB = nitrite oxidizing bacteria, Other = non-nitrifying prokaryotes. OTUs representing less than 1% across all samples were removed from the figure for clarity. The results are based on amplicon	

DNA concentrations normalized before sequencing. The mean values are reported from triplicate sequenced samples. Refer to Table 1 for sample site coding. ....	45
Figure 6 Temporal changes in ammonia (NH <sub>3</sub> -N), nitrite (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N), and nitrate (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N) concentrations for three nitrifying consortia (a) S1D, (b) S2F, (c) COM, and a control incubated without inoculation (d) CTRL-, during the standardized nitrifying activity assay conducted at 10°C and salinity of 25. Left axis is for ammonia and nitrate values, right axis is for nitrite values. Values are presented as means ± 1 standard deviation. (n=3). ....	46
Figure S1 Statistical distribution of read counts of every sequenced sample discussed in this paper. ....	50
Figure S2 Alpha diversity indicators for natural samples. From left to right: richness, Shannon index and Simpson index. ....	51
Figure S3 Alpha diversity indicators for the end of phase 1 samples (P1). From left to right: richness, Shannon index and Simpson index. ....	51
Figure S4 Alpha diversity indicators of phase 2 samples (P2) for SID and S2F marine consortia. From left to right: richness, Shannon index and Simpson index. ....	52
Figure S5 Alpha diversity indicators of phase 3 samples (P3) for SID and S2F marine consortia and the commercial freshwater consortium (COM). From left to right: richness, Shannon index and Simpson index. ....	52
Figure S6 Mean relative abundance of prokaryotic genera present in the natural samples. OTUs representing less than 1.5% across all samples were removed from the figure for clarity. The results are based on amplicon DNA concentrations normalized before sequencing. The mean value is calculated from duplicate samples. Refer to Table 1 for sample site coding. ....	53



## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AMO</b>	Ammoniac monooxygénase / Ammonia monooxygenase
<b>amoA</b>	Gène codant pour la sous-unité A de l'enzyme AMO
<b>Anammox</b>	Oxydation anaérobique de l'ammoniac / Anaerobic ammonia oxidation
<b>AOA</b>	Archées oxydant l'ammoniac / Ammonia-oxidizing archaea
<b>AOB</b>	Bactéries oxydant l'ammoniac / Ammonia-oxidizing bacteria
<b>ADNr 16S</b>	Acide désoxyribonucléique ribosomique, sous-unité 16S
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Ion chlorure
<b>Comammox</b>	Oxydation complète de l'ammoniac / Complete ammonia oxidation
<b>DNRA</b>	Réduction dissimilaire du nitrate en ammonium
<b>DRO</b>	Dérivés réactifs de l'oxygène
<b>H<sup>+</sup></b>	Ion hydrogène
<b>HAO</b>	Hydroxylamine oxydoréductase ou hydroxylamine déshydrogénase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>K<sup>+</sup></b>	Ion potassium
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium

<b>ncyA</b>	Gène codant pour la nitrosocyanine
<b>NH<sub>2</sub>OH</b>	Hydroxylamine
<b>NH<sub>3</sub></b>	Ammoniaque (sous forme aqueuse) ou ammoniac (sous forme gaseuse)
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Ammonium
<b>nirK</b>	Gène codant pour la nitrite réductase
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote
<b>NOB</b>	Bactéries oxydant le nitrite / Nitrite-oxidizing bacteria
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrite
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrate
<b>NXR</b>	Nitrite oxydoréductase
<b>N<sub>2</sub>O</b>	Oxyde nitreux
<b>OD</b>	Oxygène dissous





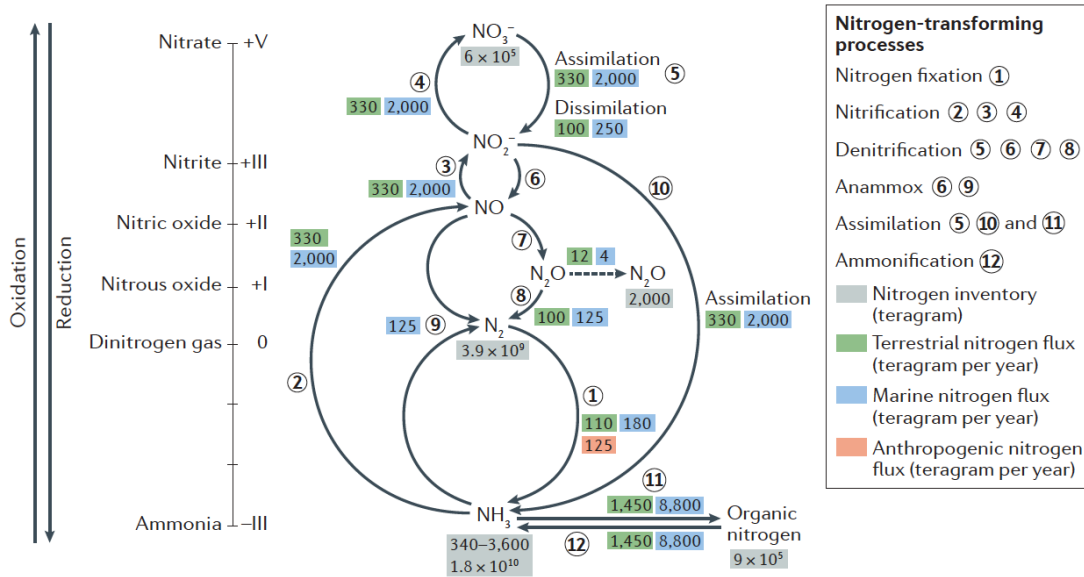


## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### 1. LE CYCLE DE L'AZOTE

L'azote est un élément clé dans la synthèse des acides nucléiques et des protéines, ce qui le rend indispensable aux fonctions du vivant. Tout comme le phosphore, sa disponibilité contrôle la production primaire de plusieurs écosystèmes aquatiques (Clean Coastal Waters, 2000). Cependant, il est considéré comme un polluant à contrôler dans les stations de traitement des eaux usées et dans l'environnement à cause de son implication dans l'eutrophisation et son effet toxique sur les espèces aquatiques (Paredes et al., 2007). Le cycle de l'azote est le cycle biogéochimique le plus complexe, mais aussi le plus étudié (Maier, 2015). Il est constitué d'une succession de molécules azotées très diverses et le passage d'une forme à une autre est généralement effectué par des groupes de microorganismes spécialisés (Thamdrup, 2012). La Terre possède un inventaire dispersé des différentes formes d'azote d'origine terrestre, marine et anthropique. La forme d'azote la plus abondante sur Terre, incluant la croûte terrestre et l'atmosphère, est l'ammoniac estimée à  $1,8 \times 10^{22}$  g N et il se trouve principalement dans les roches ignées, les roches sédimentaires et les sédiments (Canfield et al., 2005). Les échanges entre les inventaires globaux des différentes formes d'azote sont principalement attribués aux six processus suivants ; la fixation de l'azote, la nitrification, la dénitrification, l'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox), l'assimilation et l'ammonification (Figure G1). La fixation de l'azote consiste en la transformation du diazote en ammoniac. Ensuite, l'ammoniac est transformé, soit en nitrate par la nitrification en présence d'oxygène, soit en diazote par anammox en absence d'oxygène. Le processus biologique après la nitrification est la dénitrification qui transforme le nitrate en diazote. L'azote inorganique (ex : ammoniac, nitrite, nitrate) est converti en azote organique (ex : acides aminés) par le processus d'assimilation de l'azote. L'ammonification, quant à elle, génère de l'ammoniac à partir de la dégradation de la matière organique. Sous forme de diazote, qui est naturellement gazeux, l'azote peut quitter un milieu terrestre ou aquatique par diffusion vers l'atmosphère. L'anammox et la dénitrification, qui génèrent du

diazote, sont donc des processus qui permettent de réduire les concentrations d'azote dans un système ouvert.

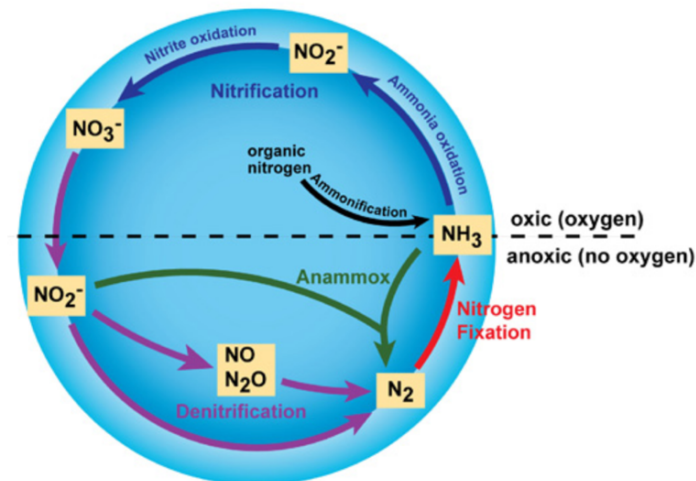


**Figure G1** Le cycle de l'azote avec les inventaires globaux, les processus et les flux annuels d'azote. En gris, les inventaires globaux d'azote en téragrammes d'azote. En vert, les flux d'azote annuels d'origine terrestre, en bleu ceux d'origine marine et en orange ceux d'origine anthropique (Tirée de Kuypers et al., 2018).

Dans les systèmes aquatiques, les processus de recyclage de la matière organique se déroulent principalement dans la colonne d'eau ou dans la zone benthique en fonction du type d'environnement. Dans les environnements océaniques, ils s'effectuent essentiellement dans la colonne d'eau, tandis que dans les environnements côtiers, où l'eau est peu profonde, elle s'effectue principalement au niveau de la zone benthique (Poulin, 2008). Dans la colonne sédimentaire, l'oxygène est rapidement consommé par les microorganismes et lorsqu'il n'y a plus d'oxygène, les bactéries anaérobies utilisent d'autres accepteurs d'électrons tels que le nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), le manganèse (Mn<sup>4+</sup>), le fer (Fe<sup>3+</sup>), les sulfates (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) et les bicarbonates (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). L'utilisation de ces accepteurs d'électrons influence l'environnement sédimentaire et crée des strates de conditions physico-chimiques différentes permettant la cohabitation de communautés microbiennes ayant une activité métabolique complémentaire (Poulin, 2008).

Ces strates de conditions physico-chimiques différentes favorisent le couplage des processus aérobie et anaérobie du cycle de l'azote (Figure G2).

Dans les environnements aquatiques côtiers, l'ammonification et la nitrification se produisent principalement dans les premiers centimètres des sédiments. Le nitrite et le nitrate résultants diffusent dans les sédiments plus profonds et dans la colonne d'eau. Dans les sédiments plus profonds, ces ions sont transformés à nouveau par la dénitrification, l'anammox et la réduction dissimilatoire du nitrate en ammonium (DNRA) pour recycler ou évacuer l'azote du système (Stief, 2013).



**Figure G2** Version simplifiée du cycle de l'azote mettant en évidence les processus aérobie et anaérobie (Tirée de Bernhard, 2010).

## 1.1 Nitrification

La nitrification est un processus biologique qui transforme l'azote ammoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub>) en nitrate. À la suite de la première isolation du microorganisme nitrifiant *Nitrosomonas europaea* par Winogradsky (1890), et aux études subséquentes sur la nitrification, il était assumé que ce processus biologique se faisait en deux étapes ;

l'oxydation de l'ammoniac en nitrite et l'oxydation du nitrite en nitrate (Lehtovirta-Morley, 2018). Il était aussi assumé que la première étape était effectuée uniquement par les bactéries oxydant l'ammoniac (AOB), telle que *Nitrosomonas europaea* qui est le modèle en recherche de ce groupe de bactéries, et que la deuxième étape était effectuée uniquement par les bactéries oxydant le nitrite (NOB). Il a fallu plus d'un siècle pour découvrir que ces connaissances sur la nitrification et les microorganismes impliqués étaient incomplètes. En 2005, la culture de la première archée oxydant l'ammoniac (AOA), provenant d'un aquarium marin (Könneke et al., 2005), a remis en question notre compréhension de la nitrification. Puis, il a été démontré que les AOA étaient en fait abondantes et très répandues, se trouvant entre autres dans l'eau de mer et les sédiments (Francis et al., 2005), l'eau douce, les sols et les stations d'épuration (You et al., 2009). Ensuite, la découverte et la culture de microorganismes capables d'effectuer l'oxydation de l'ammoniac jusqu'au nitrate (Daims et al., 2015; Van Kessel et al., 2015) a fait connaître à la communauté scientifique les bactéries comammox (*complete oxidation of ammonia to nitrate*), dont l'existence avait été prédite par un modèle cinétique près de 10 ans auparavant (Costa et al., 2006). Grâce à ces découvertes, il est maintenant connu qu'il y a au moins trois groupes de microorganismes autotrophes capables d'oxyder l'ammoniac en nitrite, soit les AOB, les AOA et les comammox, et au moins deux groupes de microorganismes autotrophes pouvant oxyder les nitrites en nitrates, soit les NOB et les commammox.

Les avancées dans la recherche ont également permis de mettre en évidence l'existence de deux autres molécules intermédiaires dans la nitrification ; l'hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) et l'oxyde nitrique ( $\text{NO}$ ) (Caranto et Lancaster, 2017; Kozłowski et al., 2016). Les bactéries et archées oxydant l'ammoniac expriment l'enzyme ammoniac monooxygénase (AMO) qui oxyde  $\text{NH}_3$  en  $\text{NH}_2\text{OH}$  en présence d'oxygène. Chez les AOB et les bactéries comammox,  $\text{NH}_2\text{OH}$  est ensuite transformée en  $\text{NO}$  par l'hydroxylamine déshydrogénase, aussi appelée hydroxylamine oxydoréductase (HAO). Chez les AOA, il n'y a pas de gène homologue à celui codant pour HAO, mais la présence des intermédiaires  $\text{NH}_2\text{OH}$  et  $\text{NO}$  sous-entend qu'une enzyme encore inconnue serait impliquée (Lehtovirta-Morley, 2018). Pour

transformer NO en  $\text{NO}_2^-$ , il faut une troisième réaction dont l'enzyme responsable est encore inconnue (Lehtovirta-Morley, 2018 ; Kuypers et al., 2018; Stein, 2019). Des propositions de gènes impliqués dans cette dernière réaction circulent, tel que le gène codant pour la protéine nitrosocyanine (*ncyA*), se trouvant dans la majorité des AOB (Lancaster et al., 2018), et le gène codant pour la nitrite réductase (*nirK*) qui est impliquée dans la dénitrification pour la réaction inverse (Caranto et Lancaster, 2017). Cependant, cette question n'a pas encore été résolue. Du côté de l'oxydation du  $\text{NO}_2^-$ , le passage du  $\text{NO}_2^-$  au  $\text{NO}_3^-$  est effectué par l'enzyme nitrite oxydoréductase (NXR) chez les NOB et les bactéries comammox (Caranto et Lancaster, 2017; Park et al., 2020).

## 1.2 Facteurs influençant la nitrification

Plusieurs facteurs physico-chimiques peuvent influencer l'activité nitrifiante dans les environnements aquatiques tels que la température, la salinité, le pH, la lumière ainsi que la concentration en substrats et en oxygène dissous. L'effet limitant de ces facteurs peut être direct, tel qu'une atteinte à la survie ou un ralentissement du métabolisme global, ou indirect, tel que contribuer à la prolifération d'espèces prédatrices ou à la génération d'espèces chimiques toxiques. Il existe également des inhibiteurs qui entravent l'activité des enzymes impliquées dans la nitrification (ex : nitrapyrine, allylthiourée, chlorate) utilisés couramment en laboratoire pour mesurer l'activité nitrifiante dans les sédiments marins côtiers (Herbert, 1999). Il est important de noter que ces facteurs considérés limitants pour la nitrification ne le sont pas de la même manière pour tous les microorganismes nitrifiants. Les microorganismes nitrifiants sont omniprésents dans les environnements naturels et anthropiques et leur sensibilité aux facteurs environnementaux est variable d'une souche à l'autre. À titre d'exemple, des microorganismes nitrifiants ont été retrouvés dans l'eau douce, les environnements marins, l'Arctique sibérien, les égouts, les filtres d'aquariums, les stations de traitement d'eaux usées, des matériaux de construction ainsi que dans les sols neutres, alcalins et acides (Alawi et al., 2007; He et al., 2012; Kowalchuck et Stephen, 2001).

Puisqu'il n'est pas possible de généraliser sur l'ensemble des nitrifiants, vu leur diversité, la section suivante aborde quelques paramètres physico-chimiques qui influencent, de manière directe ou indirecte, l'activité nitrifiante des souches nitrifiantes communes (mésophiles, non-halophiles, d'origine terrestre ou d'eau douce).

a) *L'effet de la température, du pH et de la salinité*

Les bactéries mésophiles impliquées dans la nitrification ont un optimum de croissance entre 30 et 37°C (Yao et al., 2013). Un maximum du taux de nitrification est souvent observé autour de 30°C (Shammas, 1986). Sous 15°C, il y a une baisse significative du taux de nitrification avec une réduction de 50% à 12°C (Shammas, 1986). Une autre étude rapporte une diminution de 21% à 7°C et de 53% à 5°C du taux de croissance comparé à la prolifération observée à 26°C de microorganismes nitrifiants provenant de systèmes à boue unique pour le retrait d'azote (« single-sludge nitrogen removal systems ») (Sutton et al., 1978). Une température trop basse réduit également la fluidité de la membrane, ralentit l'activité enzymatique et entrave la transcription (voir section 2.2. *Psychrotolérance et psychrophilie*). La température peut également agir de manière indirecte sur la nitrification en modifiant la solubilité des sels, de l'oxygène ou d'autres substances modifiant ainsi les concentrations des substances dissoutes dans l'eau.

Le pH optimal pour la nitrification se situe généralement entre 7 et 8 (Tarre et Green, 2004). En dessous de 6,5 les cultures liquides pures de AOB ne prolifèrent généralement pas, mais la nitrification a été observée dans des sols acides à des pH aussi bas que 3,7 (Burton et Prosser, 2001). La sensibilité néfaste à l'acidité des microorganismes oxydant l'ammoniac est souvent attribuée à la diminution, en conditions acides, de la disponibilité de  $\text{NH}_3$  (De Boer et Kowalchuk, 2001) qui est le substrat direct de l'enzyme AMO (He et al., 2012). Le pH module l'équilibre des formes d'azote ammoniacal ( $\text{NH}_3$  et  $\text{NH}_4^+$ ) en fonction de leur point isoélectrique et lorsque le pH diminue, c'est la forme  $\text{NH}_4^+$  qui est privilégiée au détriment de la forme  $\text{NH}_3$ . Cependant, l'existence de souches nitrifiantes actives à pH bas pourrait davantage s'expliquer par la présence de microsites alcalins, où le pH est favorable,



ou à des mécanismes d'approvisionnement en  $\text{NH}_3$  à partir d'urée (Burton et Prosser, 2001; De Boer et Kowalchuk, 2001). Par ailleurs, la transformation de l'ammoniac en nitrate génère des ions  $\text{H}^+$  ce qui favorisent l'acidification du milieu. La présence de molécules favorisant l'alcalinité du milieu, tel que les carbonates, est donc également considéré un facteur important pour la nitrification (Biesterfeld et al., 2003). En effet, les besoins stœchiométriques ont été estimés à 4,3 g d' $\text{O}_2$  et 7,1 g d'alcalinité consommée par gramme d'ammoniac converti en nitrate (Biesterfeld et al., 2003). Pour ces raisons, il est nécessaire de balancer l'alcalinité avec la concentration d'ammoniaque présent dans le milieu pour conserver un pH favorable à la nitrification.

La salinité est considérée comme un facteur de stress récurrent dans les stations de traitement des eaux usées (Aslan et Simsek, 2012). De plus, le retrait de l'azote est le processus le plus difficile à effectuer comparativement au retrait d'autres polluants lors du traitement biologique d'eaux usées salines (Cui et al., 2016). Lorsque les microorganismes ne possèdent pas les mécanismes de protection nécessaires (voir section 2.1. *Halotolérance et halophilie*) ils peuvent subir une plasmolyse ou une perte d'activité cellulaire (Kargi et Uygur, 1996). À une concentration supérieure à 3% NaCl, la salinité a un effet néfaste significatif sur le taux de nitrification de souches provenant de boues d'épuration (Dinçer and Kargi, 2001). La salinité peut aussi engendrer une accumulation de nitrite (Catalan-Sakairi et al., 1997) et d'oxyde nitreux (Tsuneda et al., 2005), un puissant gaz à effet de serre contribuant au réchauffement climatique global.

#### *b) L'effet de la lumière*

La littérature rapporte que les AOB et les AOA ont une sensibilité à la lumière qui leur est néfaste (Merbt et al., 2012). Les NOB seraient également affectées, mais il n'y a pas de consensus sur lequel des deux groupes bactériens, AOB ou NOB, est le plus photosensible (Guerrero et Jones, 1996). La dose de lumière et la longueur d'onde menant à une photoinhibition de la nitrification dépend de l'espèce (Guerrero et Jones, 1996). Plusieurs théories circulent quant aux mécanismes responsables de la diminution des taux de

nitrification dans les environnements éclairés (ex : eaux de surface des océans), tels que l'inhibition des enzymes responsables de la nitrification, la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO ou « ROS » en anglais) et la compétition avec des espèces d'algues pour la disponibilité des nutriments. Hyman et Arp (1992) ont démontré que la lumière pouvait complètement inhiber la production de nitrite des cultures de AOB et qu'après une exposition à la lumière les AOB devaient synthétiser de nouvelles enzymes AMO pour oxyder l'ammoniac en nitrite à nouveau. Lu et al. (2020) expliquent en détail différents mécanismes possibles de photoinhibition de AMO chez les AOB, qui s'appliqueraient potentiellement aux AOA également.

La sensibilité à la lumière observée chez les microorganismes nitrifiants pourrait également s'expliquer par une sensibilité aux DRO qui sont produites en présence d'ondes lumineuses (Tolar et al., 2016). Dans les eaux de surface éclairées par le soleil, il y a 2 voies importantes de production de DRO ; par production photochimique et par synthèse biologique. La production photochimique quotidienne de DRO induite par la lumière (ex :  $H_2O_2$ , superoxyde, oxygène singulet, radical hydroxyle) augmente la concentration de DRO de 1-2 ordres de grandeur dans les eaux de surface (Tolar et al., 2016). La lumière peut également induire la génération de DRO d'origine biologique par l'intermédiaire du phytoplancton qui produit du  $H_2O_2$  durant la photosynthèse et la respiration (Palenik et al., 1987). De plus, les microorganismes ne possédant pas de mécanismes détoxifiants contre les DRO et/ou de réparation de l'ADN sont défavorisés en présence de lumière. Tolar et al. (2016) avancent que la faible abondance en eaux de surface de Thaumarchaeota (AOA dominants dans les océans) pourrait potentiellement être attribuée à son manque de séquences de gènes impliqués dans les mécanismes de protection contre les DRO. Cependant, il existe des preuves de la présence de AOA actives dans les eaux de surface (Church et al., 2010; Hollibaugh et al., 2011).

Une autre théorie pouvant expliquer la baisse de nitrification induite par la lumière est la compétition entre les microorganismes nitrifiants et le phytoplancton pour l'azote ammoniacal dans la zone photique. La lumière est un régulateur majeur de la prolifération

du phytoplancton qui est de nature photosynthétique. Dans la zone photique des systèmes aquatiques, c'est la pénurie de nutriments (ex : azote, phosphore) qui limite leur prolifération. Une compétition pour ces nutriments s'impose donc entre le phytoplancton et les autres microorganismes de la même niche écologique. L'étude de Smith et al. (2014) démontre que dans la zone photique la compétition pour l'azote ammoniacal entre le phytoplancton et les AOA serait un régulateur de la nitrification plus important que l'effet direct du rayonnement lumineux.

c) *L'effet de la concentration des substrats et de l'oxygène dissous*

Des concentrations en azote ammoniacal de 2 à 10 mM (28-140 mg N L<sup>-1</sup>) et en nitrite de 2 à 30 mM (28-420 mg N L<sup>-1</sup>) seraient optimales pour les microorganismes nitrifiants (Bock et al., 1986). Lorsqu'il y a de trop fortes concentrations d'un substrat ou d'un produit d'oxydation, il peut se produire une inhibition. Par exemple, NH<sub>3</sub> peut inhiber l'oxydation des nitrites dès une concentration de 0,1-1,0 mg L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> (Anthonisen et al., 1976), mais il a été démontré que les NOB peuvent s'acclimater à des concentrations allant jusqu'à 26,7 mg L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub> (Turk et Mavinic, 1989). À des concentrations encore plus élevées (10–150 mg L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>), même l'oxydation de l'ammoniac peut être inhibée (Anthonisen et al., 1976). Le nitrite aussi serait inhibiteur à des concentrations de 20 mM NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N pour le genre *Nitrosomonas* et le nitrate serait inhibiteur à 285 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N pour le genre *Nitrobacter* (Bock et al. 1989). Une concentration adéquate d'oxygène est aussi indispensable à la nitrification. La concentration en oxygène dissous (OD) optimale pour une culture pure serait entre 0,5 et 4 mg L<sup>-1</sup> (Josserand, 1983; cité par Cébron, 2004). En dessous de 0,5 mg L<sup>-1</sup> OD, l'oxydation du nitrite est entravée, mais l'oxydation de l'ammoniaque peut encore avoir lieu (Hanaki et al., 1990; Laanbroek et al. 1994). La nitrification partielle, qui s'arrête au nitrite au lieu du nitrate, est donc favorisée en conditions microaérobiques. Ceci permet de bénéficier d'un meilleur taux de dénitrification ainsi que d'une diminution de la demande en carbone organique et en oxygène dans un couplage nitrification-dénitrification pour le retrait de l'azote en milieu aqueux (Bernet et al., 2001).

Comme mentionné précédemment, les souches étudiées pour déterminer ces plages de concentrations de substrats et de OD favorables, ainsi que les effets observés, sont « communes ». Ceci n'exclut pas que d'autres souches issues d'environnement particuliers puissent avoir une réponse différente dans les mêmes conditions. Ces valeurs peuvent néanmoins servir de point de départ pour mettre en place des conditions favorables à la nitrification.

## **2. LES CARACTÉRISTIQUES DÉSIRÉES D'UN CONSORTIUM NITRIFIANT EFFICACE EN MILIEU FROID ET SALÉ**

### **2.1 Halotolérance et halophilie**

Les microorganismes halotolérants et halophiles sont capables de croître à des salinités plus élevées que ce que peut tolérer la moyenne des microorganismes. Ils peuvent se diviser en catégories en fonction de la concentration de sels pour une croissance optimale : il y a les halotolérants qui n'ont pas besoin de sels pour proliférer, mais peuvent supporter des concentrations de sel allant jusqu'à 2,5 M NaCl, les halophiles modérés (concentration optimale de 0,5–2,5 M NaCl), les halophiles intermédiaires (concentration optimale de 1,5–4,0 M NaCl) et les halophiles extrêmes (concentration optimale de 2,5–5,2 M NaCl) (Kushner, 1978; cité par Oren, 2008). Lorsque la concentration de sels dans un milieu aqueux est élevée, la pression osmotique crée un environnement hypertonique et les cellules ont tendance à perdre leur eau par osmose. Les bactéries halophiles possèdent des mécanismes spécifiques leur permettant d'équilibrer la pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule et ainsi éviter les pertes d'eau. Deux stratégies connues sont (1) l'accumulation d'ions dans la cellule et (2) la synthèse d'osmoprotectants. La première stratégie est utilisée par les halophiles extrêmes. Ceux-ci vont accumuler des ions inorganiques dans leur cytoplasme, surtout  $K^+$  et  $Cl^-$ , et vont bénéficier d'enzymes et de structures ayant évoluées

pour fonctionner à une telle salinité (De Lourdes Moreno et al., 2013; Margesin et Schinner, 2001). La seconde stratégie est utilisée par les halophiles modérés et elle consiste en la synthèse et l'accumulation de molécules organiques dissoutes permettant de balancer la pression osmotique sans soumettre le cytoplasme à de fortes concentrations de sels (De Lourdes Moreno et al., 2013; Margesin et Schinner, 2001).

Les souches halophiles peuvent être intéressantes d'un point de vue biotechnologique pour leur activité microbienne adaptée en milieu salé, pour leurs enzymes résistantes à une haute salinité ou pour des molécules particulières qu'elles produisent (Margesin et Schinner, 2001). Par exemple, les microorganismes non-halophiles sont peu efficaces dans le recyclage des polluants organiques en environnements salins, alors l'utilisation des halophiles est une avenue intéressante pour la bioremédiation de ces environnements (Le Borgne et al., 2008). Il existe des méthodes pour acclimater des souches d'eau douce à la salinité désirée, mais les souches d'eau douce acclimatées demeurent peu efficaces à une salinité supérieure à 2% (Cui et al., 2016), ce qui justifie leur remplacement par des halophiles dans les procédés industriels. Les enzymes halophiles sont également d'intérêt puisqu'elles sont plus stables que leurs équivalents chez les non-halophiles et elles seraient plus résistantes face à des solvants organiques (De Lourdes Moreno et al., 2013). Les enzymes halophiles pourraient donc permettre à l'enzymologie de prendre une plus grande place dans les procédés industriels puisque la stabilité des enzymes est un enjeu limitant leur utilisation (Le Borgne et al., 2008). Ces enzymes seraient utiles notamment dans la transformation alimentaire et la biosynthèse de diverses molécules telles que des pigments, des stabilisateurs osmotiques organiques et des surfactants (De Lourdes Moreno et al., 2013; Le Borgne et al., 2008).

## **2.2 Psychrotolérance et psychrophilie**

Environ 80% de la surface de la Terre, incluant les régions polaires et les océans, est exposée à des températures égales ou inférieures à 5°C (Larcher, 2003; Morita, 1975). Les environnements froids représentent la plus grande biosphère sur Terre et celle-ci héberge une vaste diversité de microorganismes psychrophiles (Margesin et Miteva, 2011). Il existe des

microorganismes psychrophiles et d'autres psychrotolérants. Il arrive que les deux termes soient confondus, mais le plus courant est de les classer en fonction de leurs températures cardinales de croissance, soit leurs températures minimale, optimale et maximale de croissance (Morita, 1975). Pour les psychrophiles, ces valeurs sont égales ou inférieures à 0, 15 et 20°C, respectivement, tandis que les psychrotolérants possèdent des valeurs supérieures à celles-ci (Helmke et Weyland, 2004; Morita, 1975). Cette définition est largement utilisée aujourd'hui, mais elle est remise en question considérant la diversité d'habitat et le large spectre phylogénétique des microorganismes adaptés au froid (Helmke et Weyland, 2004). Les microorganismes psychrophiles forment un groupe très diversifié, composé de plusieurs grands groupes taxonomiques tels que les levures, les bactéries, les archées, les mycètes filamenteux et les microalgues (Margesin et Miteva, 2011). Ceux-ci se retrouvent dans divers environnements tels que l'atmosphère (jusqu'à la mésosphère), la neige, les glaciers, la glace marine, les lacs alpins et polaires, les océans profonds, les sols froids et le pergélisol (Margesin et Miteva, 2011).

Les basses températures peuvent engendrer une perte de fluidité de la membrane cellulaire (ce qui nuit aux échanges intra/extracellulaires), une perte de souplesse des structures secondaires des acides nucléiques (ce qui nuit à la synthèse de protéines), une diminution de l'activité enzymatique (ce qui ralentit le métabolisme) et la formation de cristaux de glace dans la cellule (ce qui nuit à la viabilité). Pour survivre et prospérer en conditions froides, les psychrophiles et les psychrotolérants ont développé des adaptations telles que la synthèse de protéines spécialisées (antigel et « *cold shock* »), des modifications au niveau de la membrane cellulaire pour augmenter sa fluidité à basse température, des enzymes actives à basse température et la synthèse de solutés compatibles cryoprotectants (D'Amico et al., 2006; Deming, 2002; Keto-Timonen et al., 2016; Muñoz et al., 2017; Piette et al., 2011; Russell, 1997; Santiago et al., 2016; Tribelli et Lopez, 2018). À titre d'exemple, leur membrane cellulaire possède des lipides et des pigments qui contribuent au maintien de sa flexibilité et de sa stabilité malgré la baisse de température (Deming, 2002). Un autre mécanisme important est la synthèse de protéines « *cold shock* ». Celles-ci sont synthétisées

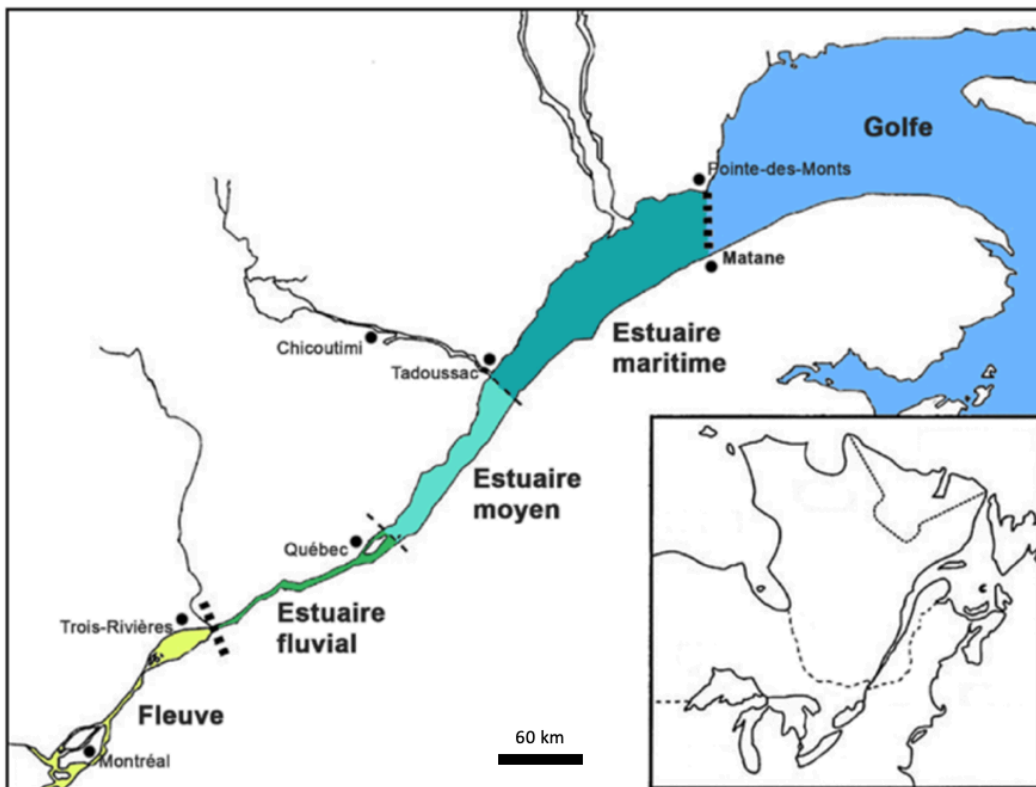
lors d'une baisse rapide de température pour servir de molécules chaperonnes aux acides nucléiques. Cette intervention est désirable, car elle favorise l'initiation de la traduction dans la synthèse de protéines qui est autrement limitée par les structures secondaires des acides nucléiques (Keto-Timonen et al., 2016).

Les enzymes psychrophiles sont utiles pour plusieurs industries. En 2007, le principal marché des enzymes psychrophiles était celui des détergents (Margesin et al., 2007). De nos jours, c'est surtout le domaine de la protection environnementale qui s'intéresse aux psychrophiles, entre autres, pour la dégradation de polluants en environnements froids (Jin et al., 2022). D'autres domaines qui s'intéressent aux psychrophiles et à leurs enzymes sont le domaine médical (ex : production de médicaments et antioxydants (Soldatou et Baker, 2017); protéases à usage thérapeutique (Fornbacke et Clarsund, 2013)), l'agroalimentaire (ex : protéines inhibant la nucléation de la glace (Białkowska et al., 2020; Chen et al., 2021) ; lipases psychrophiles comme additifs alimentaires (Su et al., 2016)), ainsi que les industries du textile et des cosmétiques (Margesin et al., 2007; Silva et al., 2021).

### **3. LE SYSTÈME MARIN DU SAINT-LAURENT**

Le système hydrologique du Saint-Laurent possède un bassin versant d'environ 1 320 000 km<sup>2</sup> (El-Sabh et Silverberg, 1990). Il prend sa source dans les Grands Lacs qui alimentent le tronçon fluvial, puis l'estuaire, suivi du golfe du Saint-Laurent, pour aboutir à l'océan Atlantique. Le système marin du Saint-Laurent est composé de l'estuaire et du golfe. L'estuaire du Saint-Laurent est quant à lui subdivisé en trois sections en fonction de la salinité et autres propriétés hydrologiques: l'estuaire fluvial, l'estuaire moyen et l'estuaire maritime (Figure G3). Les secteurs d'intérêt dans le cadre de cette étude sont les estuaires moyen et maritime du St-Laurent puisqu'ils constituent des milieux marins accessibles et qu'ils hébergent potentiellement une vaste diversité microbienne, tant génétique que fonctionnelle, encore peu explorée (Romano et al., 2017 ; Singh, 2010). L'estuaire moyen (« Upper

Estuary ») s'étend de l'île d'Orléans jusqu'à Tadoussac et est caractérisé par un important gradient de salinité et un maximum de turbidité (El-Sabh et Silverberg, 1990). L'estuaire maritime (« Lower Estuary ») s'étend de Tadoussac, à la tête du chenal Laurentien, jusqu'à Pointe-des-Monts. La colonne d'eau y est fortement stratifiée (Mucci et al, 2011) et la couche de surface (25-50 m de profondeur) subit de grandes variations saisonnières de température (température annuelle moyenne de 6.2°C; Dinauer et Mucci, 2017) et de salinité (27 à 32). La tête du chenal Laurentien est une zone d'upwelling (Gratton et al., 1988). La remontée des eaux profondes riches en nutriments engendre un milieu productif à la surface qui attire plusieurs mammifères marins et autres espèces animales de la chaîne alimentaire (Dufour and Ouellet, 2007). De plus, l'estuaire maritime a un caractère plus océanique que la plupart des estuaires à cause de sa grande dimension et sa connexion sans entraves aux eaux provenant de l'océan Atlantique (El-Sabh et Silverberg, 1990).



**Figure G3** Le système hydrologique du Saint-Laurent (Québec, Canada) (Tirée de Explos-Nature, 2011).



#### 4. L'ENRICHISSEMENT MICROBIEN DANS LE DOMAINE DES BIOTECHNOLOGIES MARINES

De nombreux microorganismes sont utilisés dans l'industrie des bioprocédés afin de générer des molécules à valeur ajoutée ou pour dégrader de la matière résiduelle. Ceux-ci proviennent essentiellement de milieux terrestres ou d'eau douce, comme dans le cas des secteurs de la fermentation, du traitement des eaux usées et des produits nettoyants écologiques (Bouassida et al, 2018). L'industrie se tourne de plus en plus vers le milieu marin qui héberge une vaste diversité microbienne, tant génétique que fonctionnelle, encore peu explorée (Singh, 2010; Romano et al., 2017) pour développer des produits innovants ou plus performants. Les récentes avancées dans le domaine de la génomique microbienne et de l'enrichissement sélectif (Dionisi et al., 2012; Lozada et Dionisi, 2015), permettent aujourd'hui d'explorer davantage le potentiel de ces microorganismes marins dans une perspective d'utilisation industrielle. À titre d'exemple, Cho et al. (2018) sont parvenus à isoler 23 souches marines nitrifiantes performantes ( $> 8 \text{ mg NH}_3\text{-N L}^{-1}$  consommés en 3 jours) à partir de 960 isolats d'eau de mer et de sédiments issus des côtes de la Corée du Sud. En outre, l'utilisation de consortiums au lieu de monocultures montre plusieurs avantages intéressants (Losoi et al., 2019). En effet, les consortiums microbiens peuvent effectuer des transformations moléculaires complexes et résistent mieux aux fluctuations environnementales que les monocultures. Ceci est attribuable à la communication intra- et inter-espèces et à la division du travail (Brenner et al., 2008). La communication entre les membres d'une communauté microbienne se fait au moyen de molécules de signalisation et de métabolites. Les membres de la communauté détectent et répondent ainsi à la présence des autres. Grâce à cette communication, la division du travail entre populations aux métabolismes différents peut alors s'opérer. La diversité des espèces dans un consortium contribue à la diversité des voies métaboliques, ce qui contribue aussi à la robustesse de la communauté. La capacité des membres de la communauté à partager leurs métabolites est un autre élément clé qui améliore la survie de la communauté (Brenner et al., 2008). Une communauté microbienne complexe serait également plus résistante à l'invasion d'autres espèces microbiennes qu'une monoculture (Burmølle et al., 2006).

Pour optimiser les fonctions désirées d'un consortium naturel, il est possible d'augmenter l'abondance relative des microorganismes impliqués dans cette fonction. L'enrichissement microbien, ou sélection artificielle, consiste à exercer une pression sélective favorisant la survie des populations fonctionnelles recherchées. Pour un enrichissement microbien réussi, certains critères de base doivent être respectés (Lee et al., 2013). D'abord, la population initiale doit contenir des souches qui sont performantes dans les conditions désirées. Ensuite, la pression de sélection doit être suffisante et constante pour induire une adaptation de la communauté. Puis, la communauté initiale doit être composée d'une population fonctionnelle dans les conditions désirées et d'une population non-fonctionnelle pour permettre une sélection (Lee et al., 2013). La population « non-fonctionnelle » ne possède pas les voies métaboliques (ou celles-ci sont entravées) qui lui permettraient de survivre dans les conditions d'enrichissement choisies. Cet élément de différenciation facilite l'augmentation de la proportion de la population « fonctionnelle » dans un contexte d'enrichissement microbien. Finalement, les souches fonctionnelles doivent aussi être moins susceptibles à la pression de sélection que les souches non-fonctionnelles.

## **5. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DU MÉMOIRE**

Bien que certaines études aient examiné et développé des consortiums nitrifiants enrichis pour le traitement des eaux usées à faible salinité (Cho et al., 2018; Cui et al., 2016) et à basse température (Ducey et al., 2010; Ishii et al., 2017), aucune à notre connaissance ne s'est penchée sur le développement de méthode pour obtenir des communautés bactériennes nitrifiantes actives et efficaces en environnements froids et à forte salinité. Les données génomiques sur les microorganismes nitrifiants marins sont également rares, en particulier pour le système marin du Saint-Laurent (Québec, Canada). Par conséquent, davantage de données sur ces communautés microbiennes sont nécessaires pour améliorer le traitement des eaux riches en azote (salées et/ou à basses températures) et apporter de nouvelles opportunités dans le domaine de la valorisation des communautés microbiennes marines.

L'objectif principal du projet de maîtrise est de développer un consortium nitrifiant performant à basse température (10°C) et en eau salée (25 psu) à partir du microbiome de l'estuaire du Saint-Laurent. Afin d'atteindre cet objectif, trois sous-objectifs de recherche ont été établis :

- Développer une stratégie d'enrichissement sélectif de souches nitrifiantes actives en eau salée et à basse température ;
- Déterminer la composition taxonomique de la communauté microbienne constituant les consortiums avant et après l'enrichissement sélectif ;
- Déterminer quel consortium enrichi possède l'activité nitrifiante, en eau salée et à basse température, la plus performante.

Les hypothèses soutenant ces objectifs de recherche sont que (1) l'estuaire du Saint-Laurent héberge des souches nitrifiantes performantes à 10°C et 25 psu et que (2) l'augmentation de l'abondance relative des bactéries nitrifiantes, par enrichissement sélectif, induira une activité nitrifiante accrue dans le consortium.

**CHAPITRE 1 :**  
**CONSORTIUMS NITRIFIANTS MARINS PERFORMANTS EN EAU FROIDE**  
**ET SALÉE OBTENUS PAR ENRICHISSEMENT MICROBIEN**

**Résumé en français de l'article**

Les basses températures et la salinité sont reconnues comme des facteurs environnementaux réduisant l'efficacité de la nitrification. Pour pallier cette limitation, des consortiums naturels déjà adaptés à l'environnement froid et salé de l'estuaire du Saint-Laurent (Québec, Canada) ont été ciblés pour ensuite augmenter leur activité nitrifiante par enrichissement microbien. L'efficacité de la première étape d'enrichissement a été démontrée en étudiant la composition microbienne des consortiums avant et après l'enrichissement par métagénomique ciblée (ADNr 16S), aussi appelé métabarcodage. Deux genres bactériens nitrifiants, *Nitrosomonas* et *Candidatus Nitrotoga*, sont ressortis comme étant les nitrifiants dominants dans tous les échantillons de sédiments et d'eau de mer (abondance relative médiane de 10,5% et 11,2%, respectivement). Les autres genres majoritaires étaient des non-nitrifiants tels que *Sulfitobacter* et *Neptuniibacter*. Après la dernière étape d'enrichissement, un consortium (S2F) a atteint un taux de nitrification 2 fois plus élevé qu'un homologue commercial à 10°C et 25 psu en utilisant les mêmes concentrations de biomasse. Ce consortium a démontré un potentiel commercial intéressant à des fins de nitrification dans ces conditions, comme le traitement d'eaux usées salées et l'entretien d'aquariums.

Cet article, intitulé « *High nitrification activity in cold and salty water achieved by microbial enrichment of marine microbes* », sera soumis pour publication dans la revue *Bioresource Technology*. En tant que première auteure, j'ai contribué à l'essentiel de la recherche, la rédaction de l'article, au développement des méthodes et à l'exécution des analyses en laboratoire. Julie Foulon, deuxième auteure, a grandement contribué à l'exécution des analyses au laboratoire, à la campagne d'échantillonnage, au développement de méthodes ainsi qu'à la révision de l'article. Jean-Michel Girard a contribué à l'idée originale, a aidé à l'exécution des analyses en laboratoire, au développement des méthodes

ainsi qu'à la révision de l'article. Les professeurs Karine Lemarchand et Michel Gosselin ont contribué à l'idée originale, à la recherche sur l'état de la question, au développement des méthodes ainsi qu'à la révision de l'article. Marie-Ève Gauthier a grandement contribué à l'exécution des analyses en laboratoire. Charles-Logan Tilney a aidé à la révision de l'article. Une version abrégée de l'article a été présentée à la Réunion scientifique annuelle (RSA) de *Québec-Océan* au printemps 2021 et les résultats préliminaires ont été présentés à la RSA du printemps 2020.

## HIGH NITRIFICATION ACTIVITY IN COLD AND SALTY WATER ACHIEVED BY MICROBIAL ENRICHMENT OF MARINE MICROBES

### ABSTRACT

Nitrification rate is known to be drastically reduced in cold and salty environments. An eco-friendly solution to this limitation was developed by targeting microorganisms naturally adapted to low temperatures and high salinity from the St. Lawrence Estuary (Quebec, Canada), and then increasing the nitrification activity of the natural microbial community by microbial enrichment. The efficiency of the first phase of the enrichment strategy was demonstrated by studying the prokaryotic community composition of the samples before and after the enrichment using 16S rDNA sequencing. *Nitrosomonas* and *Candidatus Nitrotoga* were the main nitrifiers after enrichment in all sediment and seawater samples with a median relative abundance of 10.5% and 11.2%, respectively. The other major genera after enrichment were non-nitrifiers and varied from one sample to the other with genera such as *Sulfitobacter* and *Neptuniibacter*. After the last phase of the enrichment strategy, one marine nitrifying consortium (S2F) was capable of nitrification rates 2 times higher than a commercial counterpart at 10°C and 25 psu when using the same biomass concentrations. The S2F consortium proved to show an interesting commercial potential for nitrification purposes, such as salty wastewater treatment and aquarium maintenance.

## 1. INTRODUCTION

Nitrification is a key microbial process in the nitrogen cycle. It reduces ammonia concentrations, a nitrogen form that can be toxic to aquatic life (Ip et al., 2001), and is part of the nitrogen removal pathways. This microbial process converts ammonia to nitrate with three main microbial groups involved; ammonia-oxidizing bacteria (AOB) and ammonia-oxidizing archaea (AOA) which transform ammonia into nitrite, and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) which transform nitrite into nitrate. There is also the newly studied comammox microbial group, which can transform ammonia to nitrate by itself (Shi et al., 2020). Nitrification is involved in water quality control with applications such as wastewater treatment (Yao and Peng, 2017) and aquarium maintenance (Seo et al., 2001). Currently, industrial biotechnology strains used in the market, such as those for water quality control, are mostly derived from terrestrial or freshwater environments (Bouassida et al., 2018). These nitrifying strains are not adapted to high salinity and are therefore sensitive to high salt levels, which significantly hinders their nitrification activity in the treatment of saline wastewater (Campos et al., 2002). Nitrification is also severely inhibited by cold temperatures (Yao et al., 2013) which makes the potential isolation and identification of cold-adapted or psychrotolerant strains an interesting avenue to explore.

Industry is increasingly looking into the marine environment to develop innovative and more effective products, because this ecosystem harbors vast and underexplored microbial diversity, both genetic and functional (Romano et al., 2017; Singh, 2010). Current genomics and selective enrichment techniques now make it possible to further explore the potential of microorganisms adapted to cold marine environments for biotechnology applications (Dionisi et al. 2012; Lozada and Dionisi, 2015). Microbial strains can acclimate and adapt to a wide range of physicochemical conditions thanks to phenomena such as horizontal gene transfer (Van Elsas et al., 2003) and phenotypic plasticity (West-Eberhard, 1989). For example, in marine ecosystems, halotolerant microorganisms possess osmoregulatory mechanisms that help them overcome osmotic pressure caused by salts (De Lourdes Moreno et al., 2013). In cold environments, psychrophiles are active and able to

proliferate despite the known effects of cold on metabolism and microbial cell integrity (Keto-Timonen et al., 2016). The evolutionary advantages of psychrophilic strains lie in their highly specific enzymes with low activation energies as well as the presence of lipids and pigments, which contribute to the maintenance of cell membrane fluidity and stability (Deming, 2002).

In the field of wastewater treatment, some studies have investigated and developed enriched nitrifying consortia for low temperature (Ducey et al., 2010; Ishii et al., 2017) and low salinity (Cho et al., 2018; Cui et al., 2016). However, very little data is available on active and efficient nitrifying communities in both cold and salty environments. Therefore, generating data on cold-adapted and halotolerant nitrifying communities enriched from natural samples could contribute to the improvement of biological wastewater treatment. In this study, we developed and characterized twelve enriched nitrifying consortia with microorganisms from the St. Lawrence Estuary (Quebec, Canada). The nitrification activity of these consortia was enhanced by an efficient microbial enrichment strategy, which favored the growth of nitrifying genera capable of converting ammonia into nitrate in cold (10°C) and salty (25 psu) waters. We then compared the nitrification activity of two marine enriched consortia to a commercial counterpart and one of the two marine consortia showed nitrification rates over 2 times higher than the commercial one at 10°C and 25 psu.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Sampling sites and collection**

Sampling was conducted at different locations along the south shore of the St. Lawrence Estuary from May to August 2020 (Figure 1). Seawater samples were collected at 3 coastal sites and stored in acid-washed (10% HCl) polypropylene bottles. Sediment samples were taken from the intertidal zone at 9 sites during low tide and transferred into sterile Whirl-Pak bags. Samples were transported in a cooler with Ice-Pak to the laboratory within 2 hours.



Once in the laboratory, 2 L of each seawater sample were filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  porosity Durapore PVDF membrane filter (diameter 47 mm, MilliporeSigma). Three-grams subsamples of each sediment sample were weighted with a microbalance. Filters and sediment subsamples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and at  $-20^{\circ}\text{C}$ , respectively, for metabarcoding analysis.

Subsamples for total dissolved nitrogen (TDN) and nitrate plus nitrite ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ ) were filtered through a precombusted ( $450^{\circ}\text{C}$  for 5 h) 25 mm Whatman GF/F filters. For TDN, filtrates were collected in 9 mL Kimble Brand vials with Teflon-lined caps previously cleaned following the protocol of Burdige and Homstead (1994). The samples were then acidified with 100  $\mu\text{l}$  of 2 N HCl and kept in the dark at  $4^{\circ}\text{C}$  until analysis (see section 2.2.). The rest of the filtrate was collected in 15 mL polypropylene tubes and stored at  $-20^{\circ}$  for later  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  analysis (see section 2.2.). The rest of the seawater and sediments were kept at  $4^{\circ}\text{C}$  in the dark until the start of the enrichment process the following day (see section 2.3.).

## **2.2. Environmental and biological analyses**

The salinity, temperature, and pH of seawater were measured on-site with a calibrated multiparametric probe (YSI 650, Xylem, Yellow Springs). Once in the laboratory, a sediment-Nanopure-water mixture was prepared with a 1:2.5 mass ratio to measure the salinity of sediments with the same probe. TDN measurements were made with a Shimadzu TOC-V<sub>CPN</sub> analyzer equipped with a total nitrogen measuring unit (TNM-1), following the precautions given by Benner and Strom (1993). Potassium nitrate was used to standardize TDN measurements. The mean TDN of three replicate injections of each water sample showed a typical coefficient of variation of 1%.  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  measurements were done with a Bran-Luebbe 3 nutrient autoanalyzer (adapted from Grasshoff et al., 1999). *In vivo* fluorescence of chlorophyll *a* (Chl *a*) was measured with a Turner Designs fluorometer 10-AU, after 20 min of dark acclimation. Moisture content was measured gravimetrically on 5-10 g of fresh sediments air-dried to constant weight on an analytical balance.

### 2.3. Initial culture processing

Enrichment cultures from seawater and sediment were initiated 24 h after sampling. The whole enrichment process was realized using the *Nitrosomonas europaea* culture medium (Atlas, 2005) modified by the addition of 28.3 g L<sup>-1</sup> *Instant Ocean Sea Salt* (Instant Ocean, Blacksburg) to obtain a salinity of 25, and by using 0.024 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.01 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> for ammonia and nitrite concentrations. The culture medium was sterilized by filtration with 0.22 µm porosity polyethersulfone (PES) disposable bottle top filters. All cultures were maintained at 10°C in a shaker at 100 rpm and in the dark to inhibit the growth of photosynthetic organisms.

For seawater-derived cultures, 500 mL of seawater samples collected in the St. Lawrence were filtered onto a 0.2 µm porosity Durapore PVDF membrane filter. This filter was then used to inoculate 100 mL of culture media. For sediment-derived cultures, two methods were used. The first method, the washing, consisted of adding 2 g of sediments into 5 mL of fresh culture medium incubated in the dark without shaking for 48 hours. The gravity-formed supernatant was replaced with fresh medium and the culture was incubated again until complete ammonia consumption (measured by colorimetry, see section 2.4.1). After 3 weeks, or once the ammonia was consumed, the whole sediment culture was transferred to a sterile Erlenmeyer flask with 95 mL of fresh culture media. The second method, the bacterial extraction, consisted of extracting the bacteria from 5 g of sediments with a 10 mL solution of 0.1M NaPPi, 0.1% Tween-80, and culture medium. The sediment mixture was vortexed, incubated in a shaker (room temperature, 250 rpm, 30 min), then centrifuged (room temperature, 5 min at 1000 G). The resulting supernatant was set aside, and the cycle was repeated 3 times to obtain 30 mL of bacterial extract which was then used to inoculate 70 mL of culture media.

## 2.4. Enrichment strategy of nitrifying consortia

The enrichment strategy consisted of three consecutive phases (Figure 2). The conditions were the same throughout the whole enrichment process: 10°C, 25 psu, 80-100% dissolved oxygen, pH setpoint at 8, and kept in the dark. The main differences between the phases were the volume of the cultures and the vessels in which they were placed.

### 2.4.1 Phase 1: Erlenmeyer flask cell culture (100 mL)

This phase aimed to (1) eliminate leftover debris and dead cells and (2) promote the growth of nitrifying bacteria. The first aim was achieved by making six successive cultures of each consortium. The second aim achieved by adding 5 mg NH<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> each time the ammonia had been consumed. Ammonia consumption was monitored 2-3 times per week using a Fluval Ammonia colorimetric test kit (Hagen group, Mansfield). When needed, 1M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was used to maintain the culture's pH between 7.6 and 8.2. To compensate for evaporation and sampling, 10 mL of fresh culture medium was added each week. When a culture transfer was due, 10% was used to inoculate the next subculture. The previous culture was then filtered on a 0.22 µm porosity Durapore PVDF membrane filter and kept at -80°C for metabarcoding analyses.

### 2.4.2. Phase 2: Benchtop bioreactor cell culture (2 L)

To determine which culture would continue onto phase 2, the consortia were screened based on three criteria, by order of importance: ammonia consumption rate, absence of nitrite accumulation, and visibility of biomass. Ammonia consumption and nitrite accumulation were monitored using the Fluval Ammonia colorimetric test kit. Nitrite accumulation was defined by a concentration of 1.6 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup> L<sup>-1</sup> or more, 48 h after the last ammonia addition. Biomass was not always visible in the medium during phase 1. When it was, it indicated a faster growth rate than other cultures with a limpid medium, devoid of aggregates or turbidity. Once selected, the cultures were transferred into a bench-top bioreactor (Labfors 4 Lux, INFORS HT, Basel; see Phase 2 in Figure 2). Half of the flask cell culture (50 mL) was used to inoculate 950 mL of fresh culture media. The other half was filtered and

frozen for metabarcoding analysis as described in Phase 1. To promote flocculation in the culture, 25 mg L<sup>-1</sup> of bentonite powder (Sigma-Aldrich, Darmstadt) was added to the bioreactor to serve as physical support for cells. The pH was kept at 7.8 with periodical 1M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> injections managed by an integrated control loop. A significant rise in pH was indicative of the consumption of all the ammonia in the medium. A Fluval Ammonia colorimetric test was performed when the pH rise was not clearly distinguishable from regular pH fluctuations induced by base addition. Fresh medium and a concentrated ammonia solution (100 g L<sup>-1</sup> of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) were added when needed and those cumulative additions helped the culture reach a volume of 2 L over a period of 1-2 months. This enrichment phase was completed when there was visible biomass in the 2 L culture, and it had reached an ammonia consumption rate of at least 50 mg NH<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>.

#### *2.4.3. Phase 3: Homemade bioreactor cell culture (7 L)*

Scale-up propagation of nitrifying consortia was done in a homemade, 10 L capacity bioreactor under aseptic conditions (see Phase 3 in Figure 2). A volume of 400 mL of the 2 L culture in the bench-top bioreactor was used for all metabarcoding analysis and to determine biomass concentration (on a dry weight basis) by gravimetry. The Neukermans et al. (2012) method was used, with an extra step: rinsing the biomass on the filter with 100 mL Nanopure water to remove salts before drying at 70°C overnight. Approximately 1.5 L of the 2 L culture was used to inoculate 4 L of fresh sterile medium in the homemade bioreactor (5.5 L initial culture volume). The homemade bioreactor was designed with a 60 GPH aquarium air pump, an aquarium controller including pH, conductivity, and temperature probes (Apex controller, Neptune Systems, Morgan Hill), and a dosing system (DOS Dosing and Fluid Metering System, Neptune Systems, Morgan Hill) for base (1M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) and ammonia (100 g L<sup>-1</sup> of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) injections. This bioreactor was kept in a cold chamber at 10°C in the dark and was connected to the internet for remote control. When the ammonia consumption rate decreased significantly in this 5.5 L culture for the first time, the volume was completed to 7 L with fresh sterile medium. The culture had regular additions of ammonia according to its ammonia consumption. The pH variation of the culture served as a proxy for ammonia

consumption; when the pH increased significantly, it indicated that the ammonia had been completely consumed. The supernatant of the cultures was replaced with fresh medium to dilute metabolites such as nitrate. If the flocculation of the culture allowed it, the culture was decanted for 3 to 24 hours to remove the old medium. If not, the medium was removed by centrifugation in sterile conditions. Phase 3 was complete when two nitrifying consortia were scaled to 7 L and their nitrification activity was stable.

## 2.5. Standardized nitrification test

A standardized test was developed to compare the nitrifying activity at 10°C and 25 psu of two enriched marine consortia with a commercially available nitrifying consortium of terrestrial origin. This commercial consortium is marketed as a liquid nitrifying biomass solution with > 600 mg biomass L<sup>-1</sup> active in fresh and salt water. For confidentiality reasons, the name of the product is not disclosed. The same culture medium described earlier (*N. europaea* medium at 25 psu, see section 2.3.) was used but with initial concentrations of 0.47 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.048 g L<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>, and 5% phosphate buffer (pH = 8). The biomass concentration was measured the previous day by gravimetry (as described in section 2.4.3.) to calculate the inoculation volumes needed to obtain 25 mg DW L<sup>-1</sup> from each culture. The inoculation volumes, ranging from 20 to 70 mL, were centrifuged (5000 G, 5 min) to remove the supernatant and the resulting pellets were used to inoculate 150 mL of medium in sterile 500 mL Erlenmeyer flasks with foam caps. The experiment was performed in triplicates. The Erlenmeyer flasks were incubated in a shaker at 10°C, 150 rpm, in the dark and their pH was adjusted daily to 7.8-8.0 with a 1 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution. They were sampled daily, and the subsamples were centrifuged (10 000 G, 5 min) to keep only their supernatant at -20°C until analysis. Ammonia concentrations of those subsamples were later measured using the Cedex Bio Analyzer (Roche CustomBiotech) with the ammonia reagent kit (NH<sub>3</sub> Bio, Roche CustomBiotech) following the supplier's guidelines. Nitrite and nitrate were quantified by ionic chromatography (Dionex ICS-6000, Thermo Scientific). The Dionex

IonPac AS11-HC 4  $\mu\text{m}$  anionic column was used with an eluent gradient of 10 to 40 mM KOH.

## 2.6. Precipitate characterization

During the standardized nitrification test, an insoluble white precipitate was formed when combining the phosphate buffer and the culture medium. The precipitation was amplified by the addition of 1 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  when adjusting the pH. Padrao et al. (2019) reported a similar precipitate composed of magnesium, phosphate, and ammonia called struvite. To explore the hypothesis that the precipitate in our experiment was struvite, further analyses were performed. Phosphorus and magnesium were measured by ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) and ammonia was measured with the Kjeldahl method adapted from the American Public Health Association (2017) protocol. For the ICP-MS quantification, 0.05 g dry samples were mineralized with 10 mL of concentrated nitric acid and microwaved (MARS 6 Microwave Digestion System, CEM, Matthews, US) at  $180^\circ\text{C}$  for 20 minutes (with a 30 min heating ramp), before being loaded into an Agilent 8900 Triple Quadrupole ICP-MS instrument by the automated sampler (PrepFAST) following the suppliers' guidelines. Ionization and atomization of the samples were done with helium plasma. For the Kjeldahl quantification, samples were first dried by lyophilization, then 0.5 g dry samples were mineralized with 5 g potassium sulfate, 0.5 g copper (II) sulfate pentahydrate, and 20 mL standardized 0.1 N sulfuric acid in a Kjeldatherm KT 8s-BS unit (Gerhardt, Königswinter). Fifty mL of water and a couple of zinc granules were added to the sample, which was then loaded into a Vapodest 30s unit (Gerhardt, Königswinter) following the supplier's guidelines for distillation. Methyl red was added to the distillate, which was then titrated with 0.1 N sulfuric acid to a bright red color.

## **2.7. Metabarcoding analysis**

### *2.7.1. DNA extraction and quantification*

Right before DNA extraction, the filters holding the samples were cut into small pieces. DNA was extracted using the Macherey-Nagel's NucleoSpin DNA extraction kit according to the supplier's guidelines. DNA was quantified using AccuClear™ Ultra High sensitivity dsDNA Quantitation Kit with 1 DNA Standard 2000 Assays (Biotium).

### *2.7.2. 16S rDNA amplification and sequencing*

PCR was performed with 2× KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche) and universal bacterial/archaeal 16S rDNA targeting primers with Illumina adapters included. The original primers used were from Klindworth et al. (2013) (A519F: 5'-CAGCMGCCGCGGTAA-3' and 802R: 5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'). To confirm amplicon library size and concentration, a capillary electrophoresis commercial kit (ScreenTape D1000, Agilent) was used with an automated workstation (TapeStation 4150, Agilent). The PCR product was then purified with AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter) following the supplier's guidelines. Following Illumina's "16S Metagenomic Sequencing Library Preparation" guide, DNA libraries were indexed, normalized to 4 nM, pooled, and denatured to obtain single-stranded DNA. Sequencing was performed on a MiSeq sequencer with Illumina's v3 Reagent Kit (600-cycle) and Flow Cell. A concentration of 20% of PhiX sequencing control was used.

### *2.7.3. Bioinformatics*

Taxonomic affiliation of the output sequences was performed with the FROGS pipeline (version 3.2) hosted on Galaxy (Escudie et al., 2018). Merged reads with a mismatch rate of up to 10% in the overlap region were kept. Sequences were then clustered by the *swarm* algorithm with an aggregation distance of one, enabling the fastidious option of the algorithm. OTUs (Operational Taxonomic Units) with less than 2 sequences were filtered out. Taxonomy affiliation was performed with blastn+ (Camacho et al., 2009) and the SILVA

16S 138.1 database. Subsequent data analyses and statistics were performed using RStudio and the *Phyloseq* package on the taxonomically affiliated OTU table output from FROGS.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Sample site characteristics

Between May and August 2020, seawater (n=3) and surface sediment (n=9) samples were collected from the St. Lawrence Estuary. The environmental characteristics of the sample sites are described in Table 1. The temperature and salinity of the seawater samples ranged from 16 to 20°C and from 15 to 27 psu, respectively. Lower temperature (down to 5°C) and higher salinity (up to 29 psu) have been recorded in offshore surface waters during summer (Annane et al., 2015; Mucci et al., 2011). The mean pH of the water samples was  $7.5 \pm 0.1$ , a value lower than  $7.96 \pm 0.02$  measured by Annane et al. (2015) in the surface layer of the Lower Estuary from mid-spring to early fall. Total dissolved nitrogen and  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  concentrations ranged from 0.21 to 0.99 mg N L<sup>-1</sup> and from 0.05 to 0.55 mg N L<sup>-1</sup>, respectively. The most nitrogen-rich site was the Aquaculture station of Pointe-au-Père (sample W3A) but the most productive location, based solely on *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence, was the Kamouraska River site (sample W5C). It is important to note that the sample taken at the Aquaculture station came from the backwash wastewater of the aquaculture station's filtration system. It was expected for that sample to have a higher nitrogen charge than the other environmental samples. Sediment samples were composed of a mix of sand and mud and were spatially heterogeneous. Their moisture content varied from 17%, for samples with higher sand and gravel composition, up to 86% for muddier samples.



### **3.2. Metabarcoding raw data**

A total of 11.5 million raw reads were obtained from 69 DNA samples (including replicates) and represent the sequencing data from all the samples discussed in this article. After quality filtering and targeted extraction, 69.2 % of initial reads remained and 97.9% of OTUs were successfully assigned a phylogenetic affiliation at the genus level. Overall, 38.8 thousand bacterial and archaeal OTUs were assigned to the sample pool. The archaeal OTUs represent only 2.8% of all OTUs obtained. The median number of reads per sample across the sample pool was 99,715 reads (Supplementary information Figure S1). Genus-level affiliations were used instead of species-level because there were fewer unknowns at the genus level (20.3% of unknown reads vs 68.3%). Natural samples had an overall mean richness of  $6772 \pm 2402$  OTUs, a mean Shannon diversity index of  $6.4 \pm 0.8$ , and a mean Simpson diversity index of  $0.99 \pm 0.01$  (Table 2). The natural sample with the highest species richness was W3A, from the Aquaculture station (9872 OTUs), and the one with the lowest species richness was W4B, from the Rimouski marina (2005 OTUs) (Supplementary information Figure S2).

### **3.3. Progression of the first enrichment phase**

As expected, the microbial diversity of every sample decreased from its natural state to its enriched state. At the end of phase I (P1 samples), the twelve marine enriched consortia had a global mean richness of  $323 \pm 66$ , a mean Shannon diversity index of  $2.7 \pm 0.4$ , and a mean Simpson diversity index of  $0.87 \pm 0.06$  (Table 2). The enriched sample with the highest species richness was S4I from the South-West River in Le Bic (429 OTUs), and the ones with the lowest species richness were W4B and S5K from the Rimouski marina and the Kamouraska River, respectively (234 OTUs for both) (Supplementary information Figure S3). This decreasing diversity tendency can in part be attributed to the isolation effect of these consortia from their natural environment (Hammes et al., 2010). Nevertheless, the transition from the natural habitat to a lab setting is considered a selective pressure part of this enrichment strategy, selecting culturable strains over unculturable ones. Furthermore,

accompanying the decrease of diversity, certain microbial groups were repeatedly favored during the enrichment process, which leads us to believe that the enrichment strategy succeeded in inducing the selection of these groups as discussed below.

### 3.3.1. Major nitrifying genera in enriched consortia

The nitrifying bacterial communities of the enriched samples were all composed of two major genera: *Candidatus Nitrotoga* and *Nitrosomonas* with median relative abundance values of 11.2% and 10.5%, respectively, at the end of phase 1 (Figure 3B). All enriched marine samples had these two major nitrifying genera regardless of the sampling site or the sample type (seawater or sediment). Other nitrifying genera, when present in these enriched samples, were barely detectable (relative abundance below 0.02%). In natural samples, *Candidatus Nitrotoga* and *Nitrosomonas* had initial median relative abundance values of, respectively, 0.02 % and 0.05% and were usually not the most abundant nitrifiers in the natural communities. Nevertheless, these two genera were substantially enriched during the enrichment process over the other nitrifying bacteria present in the natural communities such as *Nitrosospira*, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, and *Candidatus Nitrosomupilus*, which had median relative abundance values below 0.045% across all P1 samples (Figure 3). Overall, the median relative abundance of all nitrifying bacteria combined increased from 0.2% in natural microbial communities to 24.3% in P1 enriched microbial communities. In summary, the primary enrichment phase proved to be effective in increasing the relative abundance of the nitrifying population, especially of *Candidatus Nitrotoga* and *Nitrosomonas* genera.

The *Nitrosomonas* genus is composed of lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria (AOB) (Pommerening-Roser et al., 1996). Species of this genus are usually the most dominant AOB found in activated sludge (Itoh et al., 2013). The strong presence of *Nitrosomonas* in the enriched consortia could be due to the use of the *Nitrosomonas europaea* culture medium (Atlas, 2005) during the enrichment process. The original culture medium was specifically formulated for culturing *N. europaea* species in freshwater conditions. Despite the increase of salinity to 25 psu from the original recipe, this medium may still have

promoted the growth of the *Nitrosomonas* genus in enriched cultures. The species of *Nitrosomonas* in the enriched cultures are unknown because of the limited phylogenetic resolution of the amplicon region. Nevertheless, we suspect the presence of *N. europaea* and *N. eutropha* which are known to be halotolerant, as well as *N. aestuarii*, *N. cryotolerans*, *N. halophila*, and *N. marina* which are halophilic species (Koops et al., 1991; Koops & Pommerening-Roser, 2001).

*Candidatus Nitrotoga* is a recognized nitrite-oxidizing bacteria (NOB) genus active at low temperature first isolated from permafrost soil (Alawi et al., 2007). The low temperatures and harsh culture conditions in this experiment fits with *Candidatus Nitrotoga*'s previously reported successful enrichment conditions and environmental conditions, such as freshwater and rivers (Fan et al., 2016; Kinnunen et al., 2017; White et al., 2012), subglacial Antarctic lake (Christner et al., 2014), seawater (Na et al., 2011), glacial soils (Sattin et al., 2009; Schmidt et al., 2009) and wastewater treatment plants (Figdore et al., 2018; Karkman et al., 2011; Lücker et al., 2015; Saunders et al., 2016). Its presence in both freshwater and seawater suggests that this genus is composed of halotolerant microorganisms. Lücker et al. (2015) also demonstrated that *Nitrotoga*-like NOB from activated sludge were able to remain active at temperatures between 4 and 27°C. It was also reported that *Candidatus Nitrotoga* had a relatively high resistance to nitrous acid and free ammonia, two effective biocides commonly found in wastewater treatment facilities, compared to other NOB (Zheng et al., 2020). This demonstration of flexibility and higher resistance to toxic compounds is ideal for applications such as wastewater treatment, which is an inhospitable and seasonally fluctuating environment (Comber et al., 2019).

### 3.3.2. Major non-nitrifying genera in enriched consortia

Aside from the nitrifying prokaryotic community, *Sulfitobacter* and *Neptuniibacter* were also enriched significantly in most samples (Figure 4). The *Sulfitobacter* genus belongs to the *Rhodobacteraceae* family and was first described by Sorokin (1995) as a group of aerobic, Gram-negative, sulfur-oxidizing chemolithoheterotrophic bacteria. *Sulfitobacter* is widespread within the marine environment and this genus is found naturally in seawater and

sediments (Zeng et al., 2020). This genus is involved in the sulfur cycle and most strains can oxidize sulfide (Park et al., 2007a; Sorokin 1995). Ammonia in the form of ammonium sulfate was added frequently to the cultures during the enrichment, making sulfate available for bacterial growth. *Sulfitobacter* species probably benefited from the supplied sulfur and recycled it.

The *Neptuniibacter* genus, first described by Arahal et al. (2007), is a group of strictly aerobic, slightly halophilic, mesophilic, Gram-negative, motile chemoorganotrophic bacteria. Their preferred carbon sources are organic acids and amino acids, they do not ferment carbohydrates, and produce poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) granules (Arahal et al., 2007; Diéguez et al., 2017). PHB is a polyhydroxyalkanoate which are known to increase fitness in changing environments to bacteria that can accumulate and degrade those carbon compounds (Tribelli and López, 2011). PHB production was found to be important for freezing survival and cold growth in an Antarctic *Pseudomonas* (Ayub et al., 2009). Those benefits might also be applicable for the *Neptuniibacter* that thrived at 10°C in our cultures. However, the role of PHB in *Neptuniibacter* still needs to be studied and better understood.

The culture medium used in this experiment was depleted of any form of organic carbon and amino acids, which seem essential for the growth of *Sulfitobacter* and *Neptuniibacter*. However, as biomass grows in these batch cultures, the number of dead cells increases as well, and consequently the contents of these cells become more and more available as a source of amino acids and organic carbon. According to our observations, the main role of the enriched non-nitrifying genera, *Sulfitobacter* and *Neptuniibacter*, in the microbial community, seems to be as sulfur and carbon recyclers, respectively. The recycling processes performed by these non-nitrifying genera could contribute to the robustness of the consortia by reducing the accumulation of metabolites.

### 3.4. Comparison of two enriched marine consortia and a commercial counterpart

Samples S1D and S2F were selected to continue to phases 2 and 3 of the enrichment process based on their high ammonia consumption rate, lowest nitrite accumulation, and visible biomass. The S1D and S2F consortia were sampled from intertidal surface sediments. The S1D consortium originated from the Pointe-à-Pouliot shoreline, while S2F originated from a beach shore in Rimouski (Figure 1).

#### 3.4.1. Comparison of the prokaryotic communities of S1D, S2F, and COM

The microbial composition of the two marine nitrifying consortia S1D and S2F (enriched to the third enrichment phase) and that of a commercial freshwater counterpart (COM) was determined immediately prior to the standardized nitrification test (Figure 5). The major ammonia-oxidizing genus in consortia S1D and S2F was *Nitrosomonas* (relative abundance of 28.7% and 11.9%, respectively), and was *Nitrospira* for consortium COM (relative abundance of 32.1%). The major nitrite-oxidizing genus in consortia S1D and S2F was *Candidatus Nitrotoga* (relative abundance of 8.9% and 16.6%, respectively), and was *Nitrobacter* for consortium COM (relative abundance of 4.6%). The total relative abundance of nitrifying microorganisms in each of these three consortia amounted to 37.5%, 28.5%, and 37.3% for S1D, S2F, and COM, respectively. The S1D and S2F consortia were enriched at 10°C and 25 psu while the COM consortium has a terrestrial origin and was enriched under ambient conditions and a freshwater medium. Consequently, the major differences in environmental origins and enrichment conditions could explain the differences observed in the dominant nitrifying genera in the commercial consortium (COM) as compared with the two marine sediment derived consortia (S1D and S2F). Likewise, the similarities observed in the major nitrifying genera in the two marine-sediment-derived consortia (S1D and S2F) most likely due to their similar environmental source, their close geographic proximity (~8 km), and the protocol used for sampling and enrichment.

### 3.4.2. Nitrification performance at 10°C and 25 psu

The standardized nitrification test was performed at 10°C and 25 psu over 20 days with an initial biomass of 25 mg DW/L. It revealed temporal changes in ammonia, nitrite, and nitrate concentrations for each consortium (Figure 6). The control sample (i.e., sterile medium, CTRL-) showed a decrease in ammonia concentration from  $109 \pm 0.4$  mg NH<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> on day 0 to  $50 \pm 1.7$  mg NH<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> on day 3 after which the ammonia level remained the same (Figure 6d). This decrease in ammonia coincided with the formation of a white precipitate in the medium. The possible causes for this ammonia loss in the negative control of the experiment are discussed in section 3.4.3. The S2F and S1D consortia consumed all available ammonia within 5 days whereas the commercial consortium (COM) needed 11 days to do so (Figure 6a-c). S1D and S2F had an ammonia consumption rate of 21.3 mg NH<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> which was 2.2 times higher than COM's conversion rate (9.7 mg NH<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) under these experimental conditions. The S2F consortium converted all the ammonia into nitrate with no observed nitrite accumulation in contrast to COM, which showed an intermediate nitrite peak on day 9 (Figure 6b, c). The S1D consortium exhibited nitrite accumulation with a maximum of 8 mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup> on day 9 and nitrate concentrations increased over time with a maximum of 23 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N L<sup>-1</sup>. It was observed that the final dissolved nitrogen mass balance ( $8 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1} + 23 \text{ mg NO}_3^- \text{-N L}^{-1} = 31 \text{ mg N L}^{-1}$  on day 20) did not add up to the initial nitrogen balance (107 mg NH<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> on day 0) for S1D samples. This indicated that some nitrogen was lost through another reaction. It is plausible that nitrogen assimilation and conversion into amino acids by psychrotolerant, aerobic, chemoheterotrophic bacteria, such as the genus *Aequovita* of the family *Flavobacteriaceae* (Bowman and Nichols, 2002) present in S1D samples, might be responsible for the loss in the final dissolved inorganic nitrogen mass balance.

When looking at their microbial composition (Figure 5), there are several differences that could potentially explain the better or worse performance of a consortium in the nitrifying activity test. Firstly, as mentioned previously, the commercial consortium nitrifiers are different from those in the marine-derived consortia. COM has a significant proportion

of *Nitrosospira* (32%) and *Nitrobacter* (4.6%) which are genera that were not found in the marine counterparts. The *Nitrosospira* and *Nitrobacter* strains in the COM samples seem to be less adapted to cold and salty conditions than *Candidatus Nitrotoga*, which is known to be a cold-adapted nitrifier. Secondly, the presence of numerous non-nitrifying procaryotes suggests that some of these taxa may have an important role in the holistic functioning of the consortium that could influence the extent of nitrification. For example, the poor final nitrate concentration in the SID samples may be explained by nitrogen assimilation by the flavobacteria *Aequorivita* (relative abundance of 14.9%) as mentioned before. In addition, the S2F samples had a very high proportion of *Halomonas* (24.3%), a halophilic genus (Dobson and Franzmann, 1996). Thirdly, the NOB/AOB ratio is the value that stood out the most for S2F samples when compared to the other consortia. Despite not having the highest relative abundance of nitrifiers (28.7% compared to 37.3% and 37.7% for the COM and SID consortia, respectively), S2F's NOB/AOB ratio is 7 times higher than the other's (1.4 compared to 0.1 and 0.3 for COM and SID, respectively). NOB tend to be more sensitive and have a narrower range of optimal conditions than AOB (Bernet et al., 2005; Kim et al., 2005; Park et al., 2007b). Consequently, a higher NOB/AOB ratio could have contributed to enhance conversion of ammonia to nitrate.

#### 3.4.3. Ammoniacal nitrogen mass balance

In the standardized nitrification test, the supernatant of the control samples (i.e., CTRL-), showed a loss of ammonia of 59 mg NH<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> (or 8.9 mg N in the 150 mL culture medium for the standardized nitrification test) after three days of incubation (Figure 6d). It was unexpected in sterile controls and likely associated with the observed formation of a white precipitate. This precipitate matched the description of struvite in *Nitrosomonas europaea* medium made by Padrão et al. (2019). Struvite is an insoluble complex formed in an aqueous solution that is made of magnesium, phosphate, and ammonium in equimolar quantities (Barbosa et al., 2016). When analyzing the composition of the white precipitate by ICP-MS (elements tested: Na, Mg, Al, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo), it was observed that the main elements present in it were magnesium and phosphorus in equimolar quantities

(0.477 mmol Mg (11.6 mg Mg) and 0.471 mmol P (14.6 mg P) in the 150 mL culture precipitate). The corresponding value of ammonium would be 8.55 mg  $\text{NH}_4$  (6.64 mg N). This value represents 75% of the N loss observed (Table 3). Thus, it is plausible that the white precipitate observed in the CTRL- samples is struvite and that most of the dissolved N was lost by precipitation.

To confirm that the precipitate was struvite, the nitrogen content in the precipitate was determined with the Kjeldahl method. To have enough precipitate for this method, the precipitate was recreated with 1 L sterile culture media in the same conditions as the CTRL- samples. Only 2.9% of the recreated precipitate mass was measured as being nitrogen, which would represent 2.0 mg N in the 150 mL CTRL- sample (precipitate mass of 70.1 mg). The Kjeldahl method results do not confirm that most of the N was lost by precipitation. Instead, it implies there is 6.9 mg N missing from the nitrogen mass balance after three days of incubation of the CTRL- (Table 3). The Kjeldahl method was originally developed in 1883 for the analysis of protein nitrogen (Bradstreet, 1954). It was later modified and extended to N determination in soils, sediments, sedimentary rocks, plant materials, biological tissues, wastewater matrices, and more (Sáez-Plaza et al., 2013). The N content measurement of the precipitate was the first and only done, because of material constraints, with the method previously described. Further research should be done to determine the accuracy of the method in this medium.

Another source of nitrogen loss is ammonia volatilization, which is its conversion into a gaseous form followed by its escape into the atmosphere. Ammonia is present in two forms when in an aqueous solution: ionized ( $\text{NH}_4^+$ ) and un-ionized ( $\text{NH}_3$ ) which is a gaseous form. The proportion of  $\text{NH}_3$ , relative to the sum of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NH}_3$ , increases with higher temperature and pH and decreases to a lesser extent with higher salinities (Bower and Bidwell, 1978). During the first three days of the standardized nitrification test, the daily pH measurement varied between 7.5 and 8.2, then the pH stabilized at 8.2 in the controls. Based on the analytical tables presented by Bower and Bidwell (1978),  $\text{NH}_3\%$  values vary from 0.492 to 2.42 at pH 7.5 to 8.2 for a temperature of 10°C and salinities of 23-27 psu, which

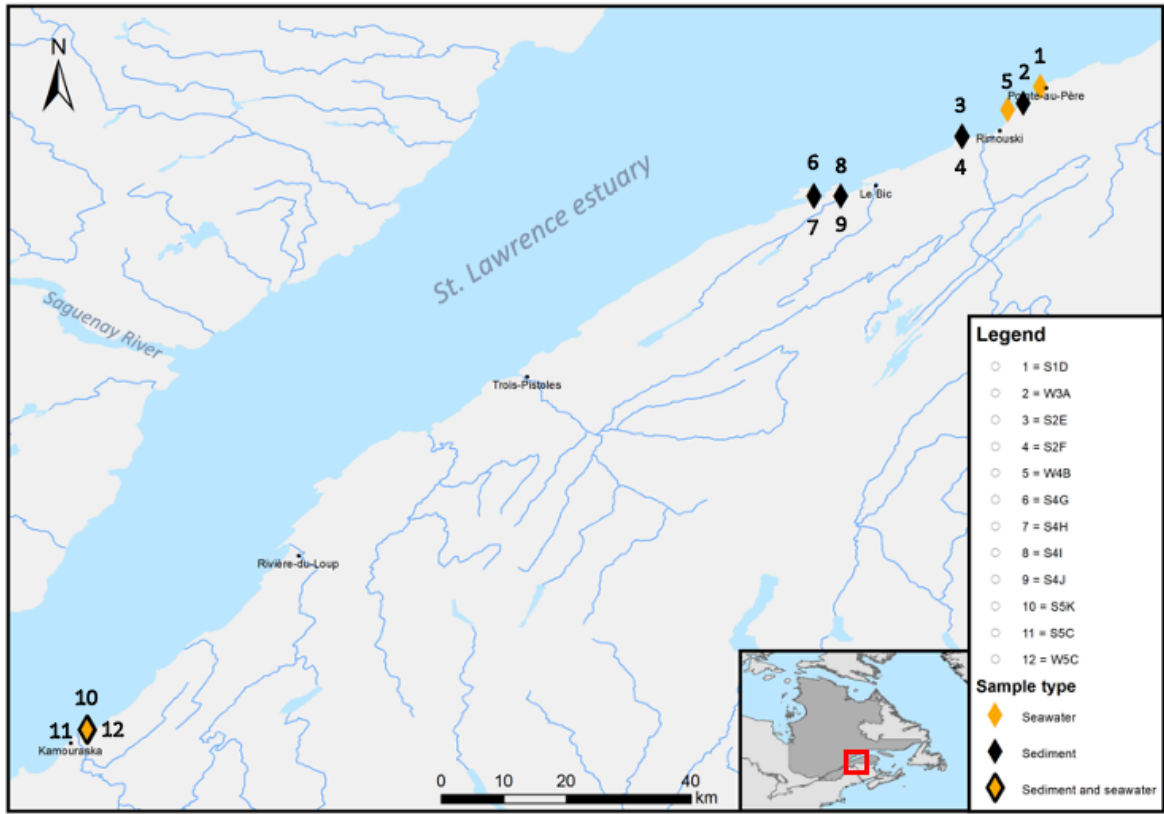


represents a very low proportion of theoretical volatile  $\text{NH}_3$  in the cultures. The other factor that strongly affects  $\text{NH}_3$  volatilization is the transfer rate of gaseous  $\text{NH}_3$  from the culture medium to the air. This rate is unknown in our experimental setting, but the cultures were well aerated which contributes to a good gas transfer rate. Even if we consider a high transfer rate to the air of a very low proportion of volatile  $\text{NH}_3$  in the culture, 42% N loss of the initial N by  $\text{NH}_3$  volatilization in three days is a lot. Furthermore, the S2F consortium was able to convert all the ammonia to nitrate in a 5-day timeframe, which means that during that timeframe the dissolved ammonia stayed in the culture and thus did not volatilize. It seems unlikely that the control sample would lose 42% of total N by volatilization and the other test samples would not. We also suspect that the ammonia measured in the precipitate with the Kjeldahl method was underestimated since the precipitate used for this was recreated in a 1 L culture medium (not the original 150 mL sample used in the standardized nitrification test). Thus, the struvite hypothesis explaining most N loss from precipitation, appears to be the most parsimonious explanation considering the methods used. More investigation is needed to conclude on the causes of N loss in the sterile negative controls. To avoid complications in industrial processes due to this precipitate, we would recommend using a different buffer than a phosphate-based one when a high magnesium concentration is needed in a culture medium with ammonium because ammonium, phosphate, and magnesium together form struvite.

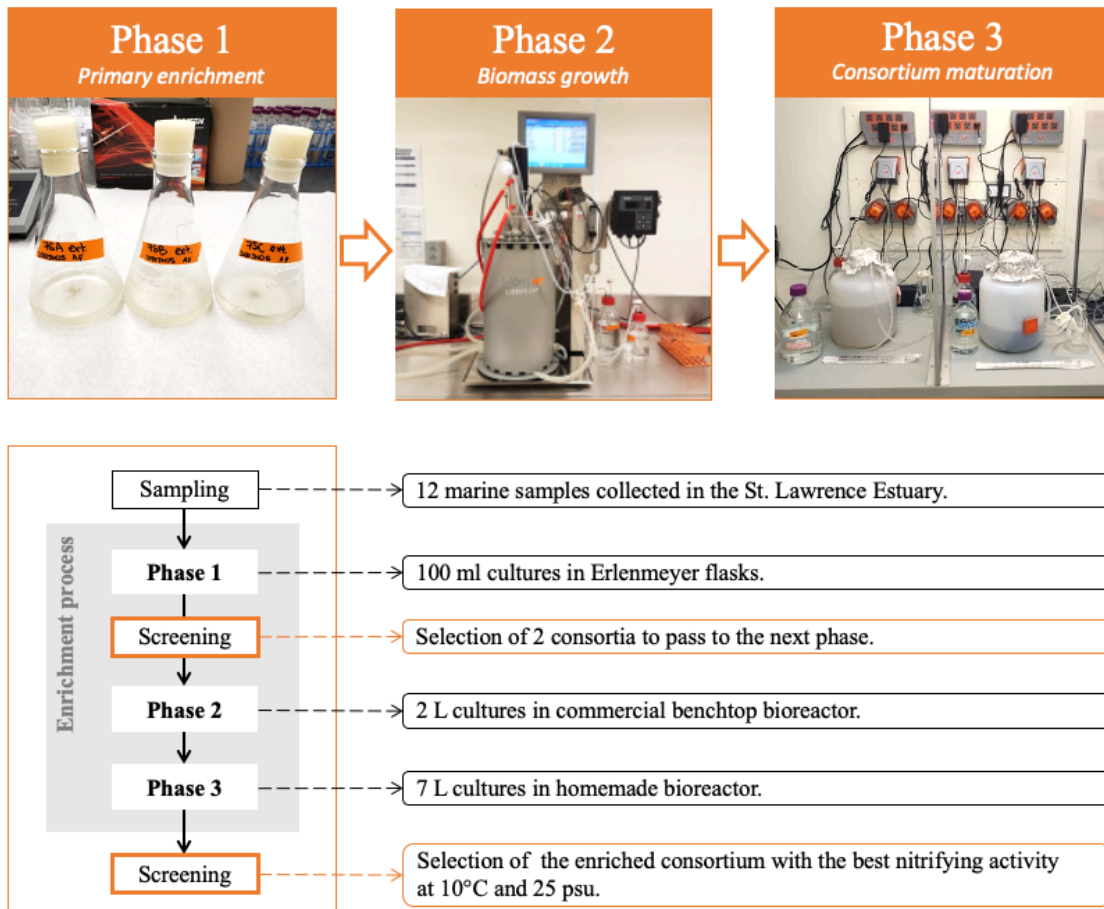
#### 4. CONCLUSION

The main objective of this study was to develop, by selective enrichment, a nitrifying consortium performing nitrification efficiently in cold (10°C) and salty (25 psu) waters, using the microbiome of the St. Lawrence Estuary. The median relative abundance of nitrifying prokaryotes in 12 natural marine samples was 0.2%. It increased to 24.3% at the end of the first enrichment phase. In the enriched consortia, the two major nitrifying genera were *Candidatus Nitrotoga* and *Nitrosomonas*, making up between 7.4%-37.2% and 2.4%-17.4% of the total prokaryote abundance, respectively. The best consortia in terms of ammonia consumption rate, lowest nitrite accumulation, and visible biomass were S1D and S2F, both originating from surface sediment samples from the intertidal zone of the St. Lawrence Estuary. The nitrification rate of S2F at 10°C and 25 psu was 21 mg NH<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, a rate over 2 times higher than that of the commercial freshwater counterpart (COM) with the same initial biomass and under the same environmental conditions. The S2F consortia proved to have an interesting commercial potential for nitrification purposes in cold and salty waters, such as aquarium maintenance and wastewater treatment. The development of these marine nitrifying consortia represents an eco-friendly solution for saline and cold wastewater treatment to help prevent the eutrophication of natural environments. Additionally, these marine nitrifying consortia represent a form of valorization of microbial resources of marine origin, which is currently understudied.

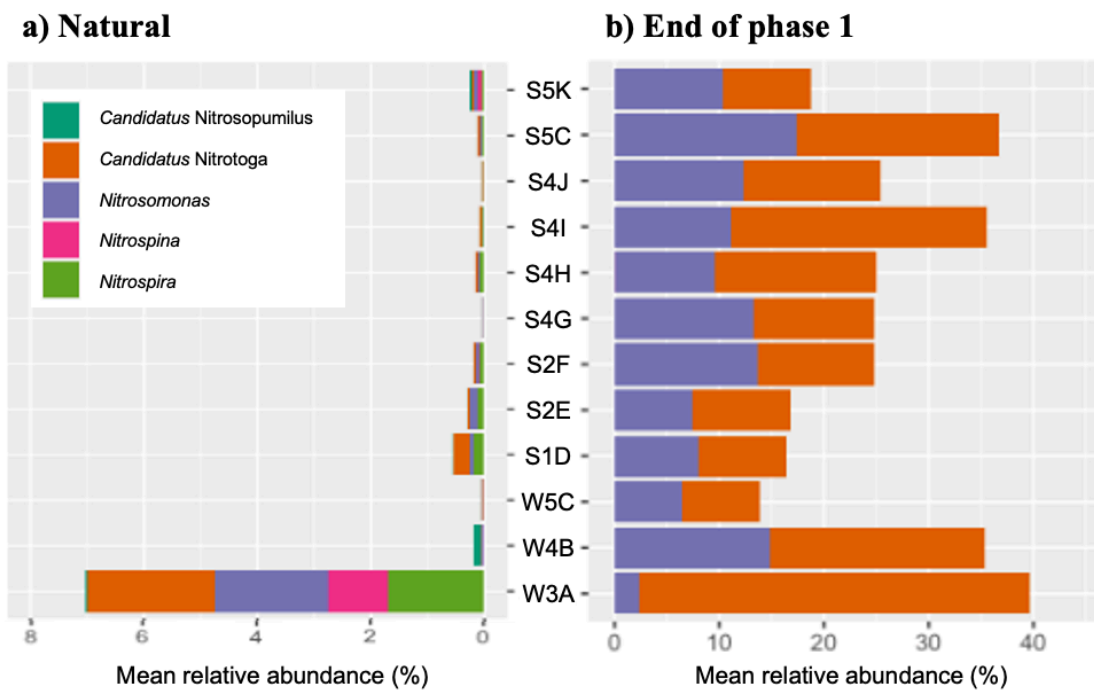
## FIGURES AND TABLES



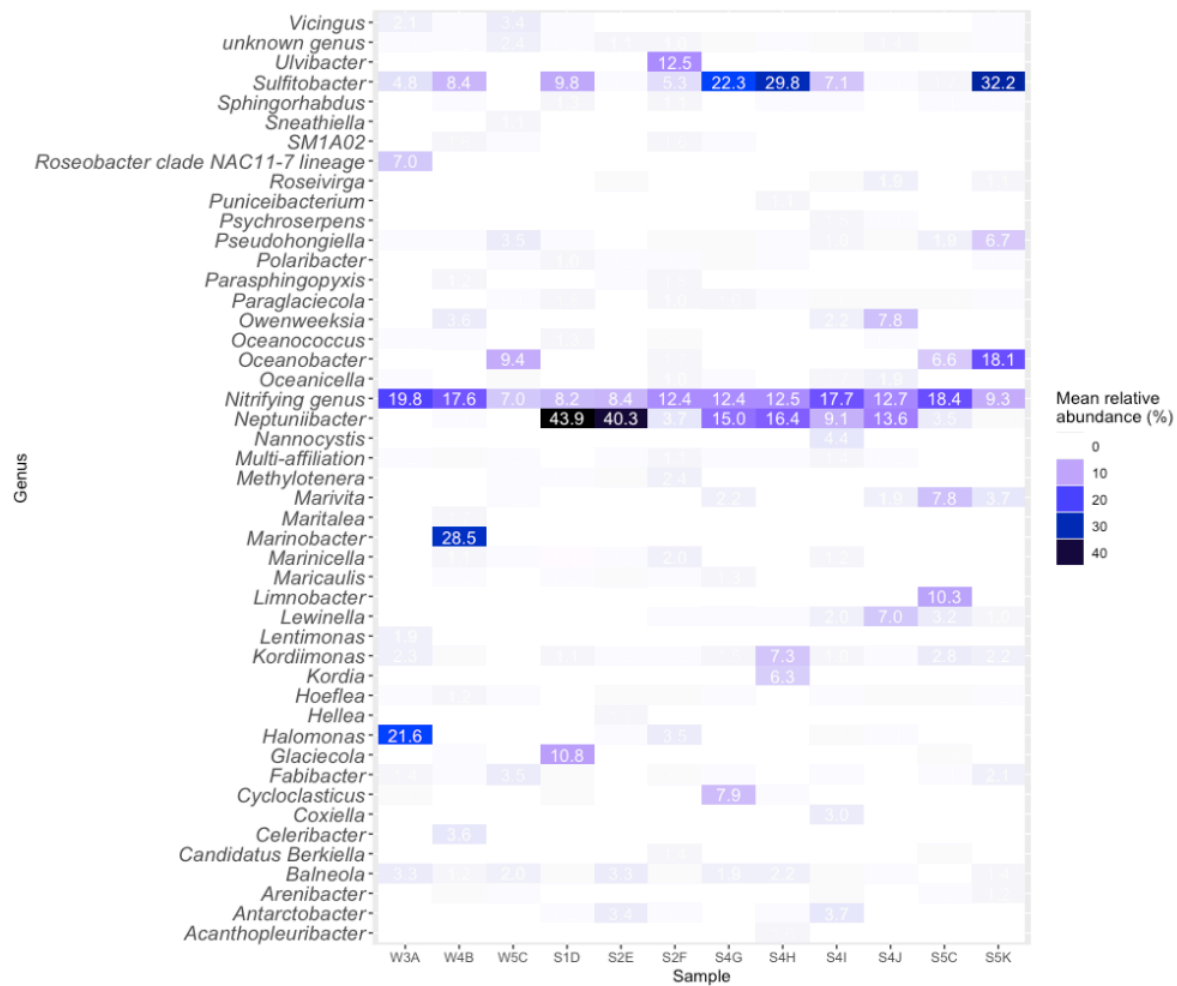
**Figure 1** Sampling site locations of seawater and surface sediments in the St. Lawrence Estuary (Quebec, Canada).



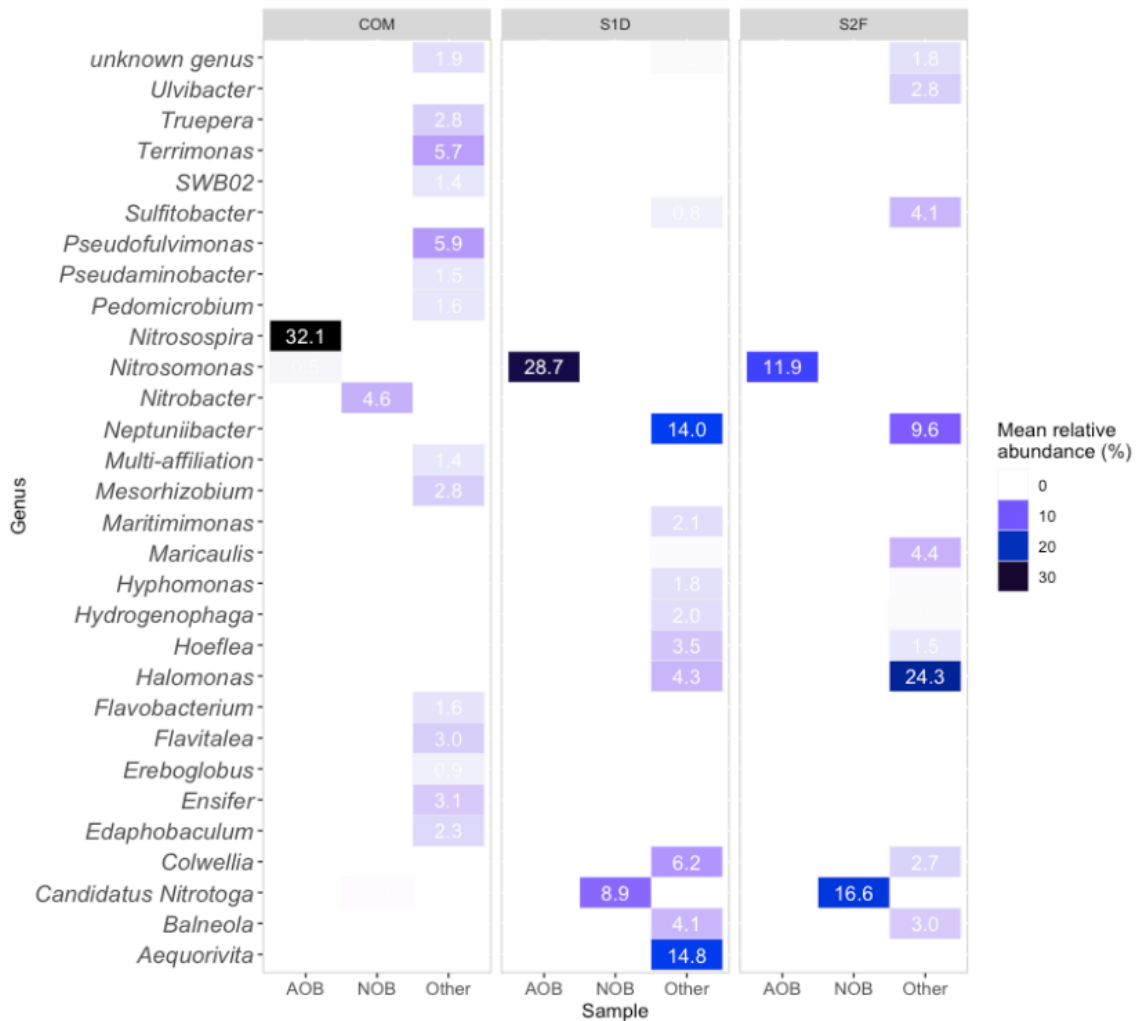
**Figure 2** Diagram of the enrichment process. The top part shows the format of each phase (Erlenmeyer flasks, benchtop bioreactor, and homemade bioreactor). The diagram at the bottom is a summary of the enrichment process used in this study to obtain nitrifying consortia efficient at 10°C and 25 psu.



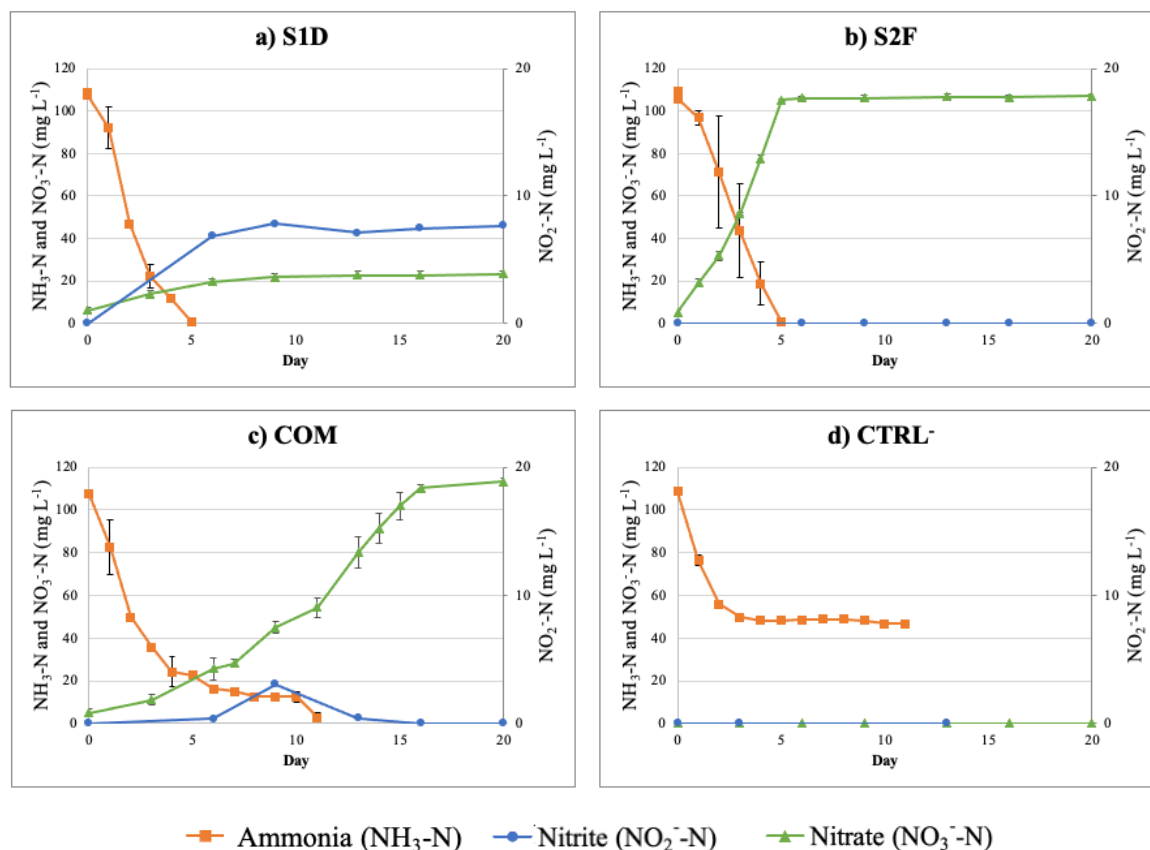
**Figure 3** Mean relative abundance of nitrifying bacteria genera in each consortium. (a) natural samples and (b) samples at the end of the first phase of the enrichment process. OTUs representing less than 0.1% across all samples were removed from the figure for clarity. The results are based on amplicon DNA concentrations normalized before sequencing. The mean values were calculated from duplicate samples. Refer to Table 1 for sample site coding.



**Figure 4** Mean relative abundance of prokaryotic genera present at the end of the first enrichment phase (P1). OTUs representing less than 1% across all samples were removed from the figure for clarity. The results are based on amplicon DNA concentrations normalized before sequencing. The mean value is calculated from duplicate samples. Refer to Table 1 for sample site coding.



**Figure 5** Mean relative abundance of prokaryotic genera present in phase 3 samples of two newly enriched marine sediment-derived nitrifying consortia (S1D and S2F) and a freshwater commercial counterpart (COM). AOB = ammonia oxidizing bacteria, NOB = nitrite oxidizing bacteria, Other = non-nitrifying prokaryotes. OTUs representing less than 1% across all samples were removed from the figure for clarity. The results are based on amplicon DNA concentrations normalized before sequencing. The mean values are reported from triplicate sequenced samples. Refer to Table 1 for sample site coding.



**Figure 6** Temporal changes in ammonia (NH<sub>3</sub>-N), nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N), and nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) concentrations for three nitrifying consortia (a) S1D, (b) S2F, (c) COM, and a control incubated without inoculation (d) CTRL-, during the standardized nitrifying activity assay conducted at 10°C and salinity of 25. Left axis is for ammonia and nitrate values, right axis is for nitrite values. Values are presented as means ± 1 standard deviation (n=3).



**Table 1** Environmental conditions of the sampling sites in the St. Lawrence Estuary in 2020. The initial sample treatment in the laboratory was filtration (Filt.) for surface water (W) and either washing (Wash.) or bacterial extraction (B.E.) for surface sediments from the intertidal zone (S). TDN = total dissolved nitrogen;  $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$  = nitrate plus nitrite; Chl *a* = chlorophyll *a*.

	Sample	Sampling site	Date	Treatment	Water temperature	pH	Salinity	TDN	NO <sub>3</sub> +NO <sub>2</sub>	Chl <i>a</i> fluorescence
	-	-	-	-	(°C)	-	(ppt)	(mg N L <sup>-1</sup> )	(mg N L <sup>-1</sup> )	(relative unit)
<b>Seawater</b>	W3A	Aquaculture station	16 June	Filt.	17.7	7.4	24.8	0.99	0.55	1.1
	W4B	Rimouski marina	13 August	Filt.	15.8	7.6	26.5	0.21	0.07	0.7
	W5C	Kamouraska River	20 August	Filt.	19.5	7.5	15.1	0.46	0.05	2.3
	Sample	Sampling site	Date	Treatment	Water content					
	-	-	-	-	(%)					
<b>Sediments</b>	S1D	Pointe-à-Pouliot	21 May	Wash.	17.5					
	S2E	Rimouski beach	4 June	B. E.	27.7					
	S2F			B. E.	38.7					
	S4G	Ferme Rioux	13 August	B. E.	54.8					
	S4H			B. E.	29.6					
	S4I	Sud-Ouest River	13 August	B. E.	78.0					
	S4J			B. E.	86.4					
	S5C	Kamouraska River	20 August	B. E.	30.2					
	S5K			B. E.	35.4					

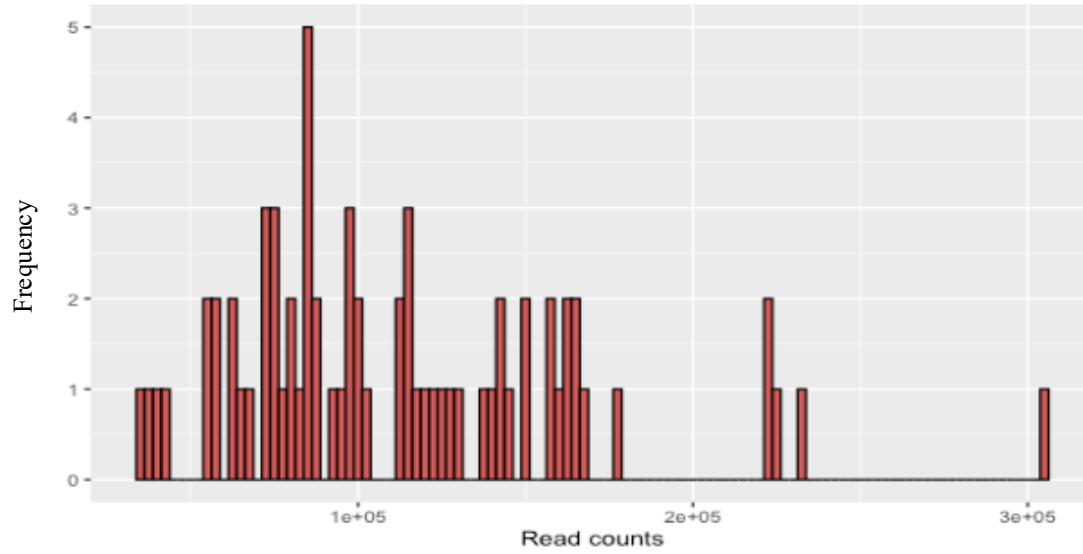
**Table 2** Mean values ( $\pm 1$  standard deviation) of the richness (total number of unique taxa), Shannon diversity index, and Simpson diversity index of natural and enriched microbial consortia during the 3 phases of the study. Natural and phase 1 (P1) mean values were calculated on all consortia (n=12). Phase 2 (P2) mean values were calculated on 2 consortia: SID and S2F. Phase 3 (P3) mean values were calculated on 3 consortia: SID, S2F and COM. For details, see supplementary information Figures S2 to S5.

Consortium state	Richness	Shannon index	Simpson index
Natural	6772 $\pm$ 2402	6.4 $\pm$ 0.8	0.99 $\pm$ 0.01
End of phase 1 (P1)	323 $\pm$ 66	2.7 $\pm$ 0.4	0.87 $\pm$ 0.06
End of phase 2 (P2)	290 $\pm$ 77	2.5 $\pm$ 0.2	0.86 $\pm$ 0.04
End of phase 3 (P3)	429 $\pm$ 66	2.8 $\pm$ 0.3	0.87 $\pm$ 0.01

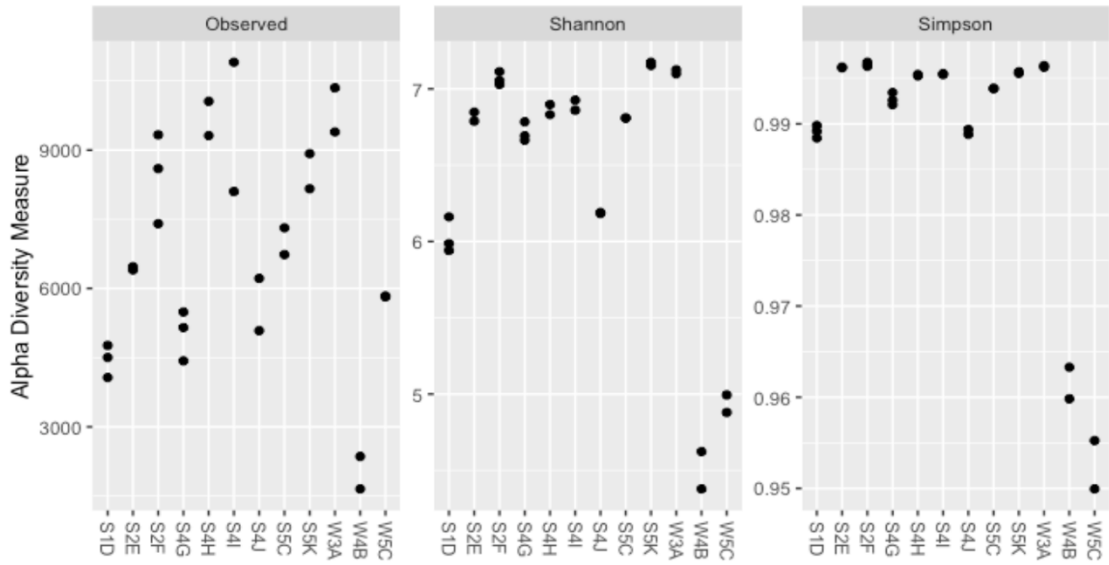
**Table 3** Nitrogen in the 150 mL control samples of the standardized nitrification test. The N loss is the difference between the initial N in the culture medium and the dissolved N after a stabilization period of three days. This loss is then detailed according to two hypotheses ; either most N is lost by volatilization or most N is lost by precipitation (see section 3.4.3. for details).

<b>Hypothesis</b>	<b>Description</b>	<b>N state</b>	<b>mg N</b> (in 150 mL)
-	N loss	-	8.9
Most N loss by volatilization	Measured N in the precipitate (Kjeldhal method)	Solid	2.0
	N escaped in the atmosphere	Gaseous	6.9
Most N loss by precipitation	Calculated N in the precipitate (ICP-MS method)	Solid	6.6
	N escaped in the atmosphere	Gaseous	2.3

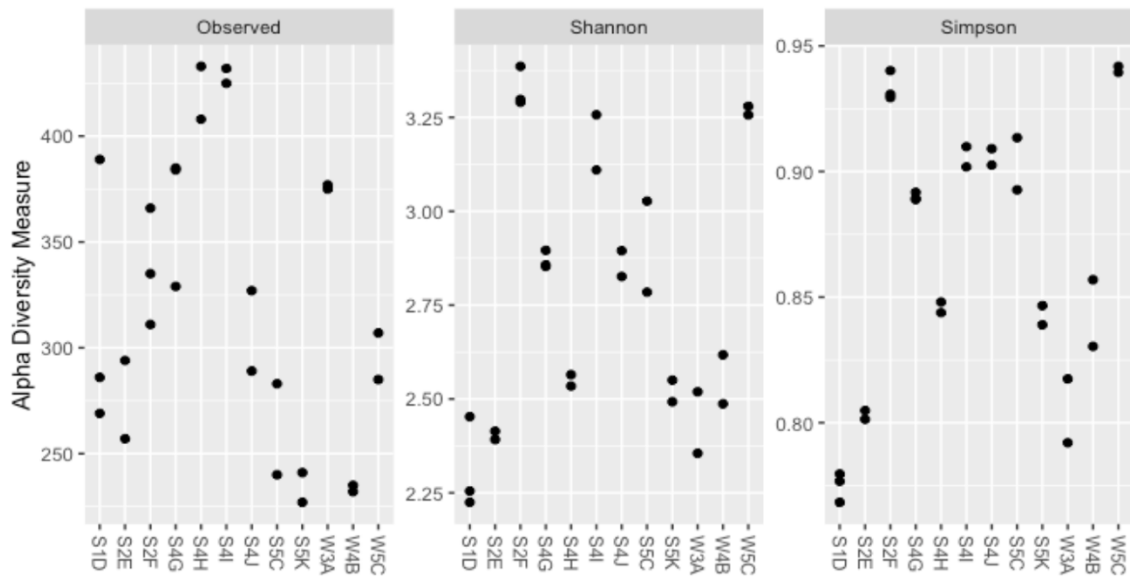
## APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA



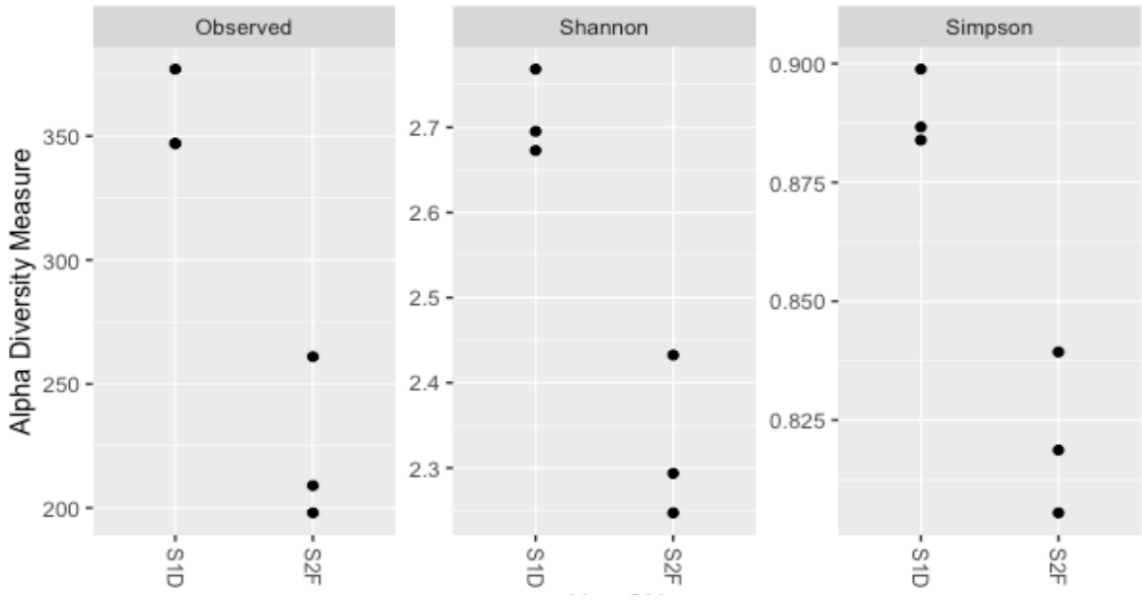
**Figure S1** Statistical distribution of read counts of every sequenced sample discussed in this paper.



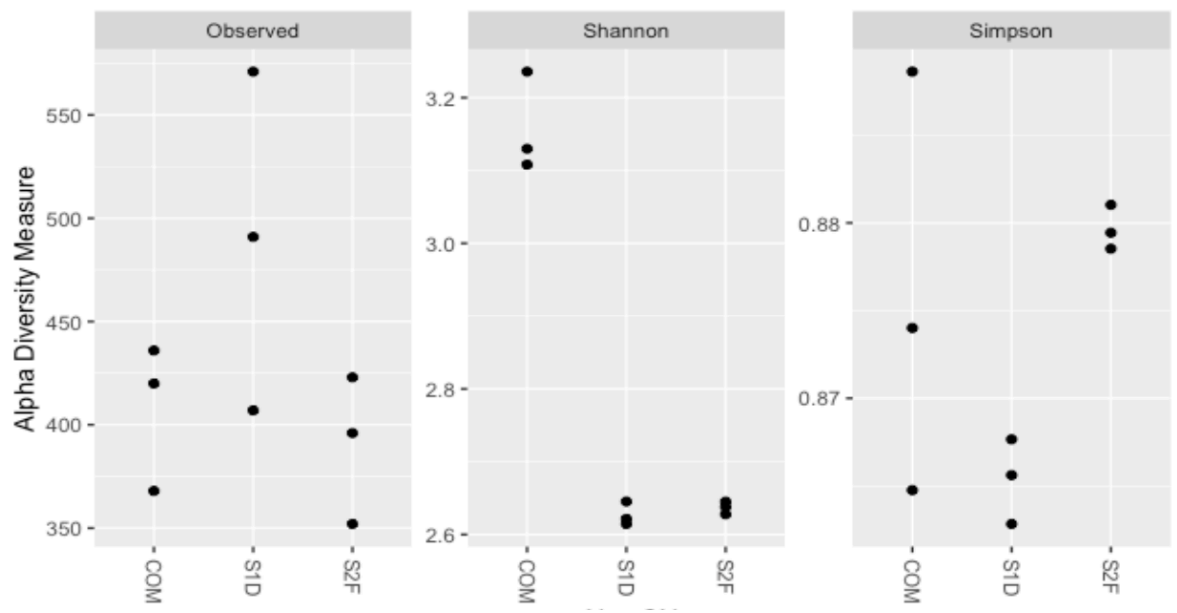
**Figure 4** Alpha diversity indicators for natural samples. From left to right: richness, Shannon index and Simpson index.



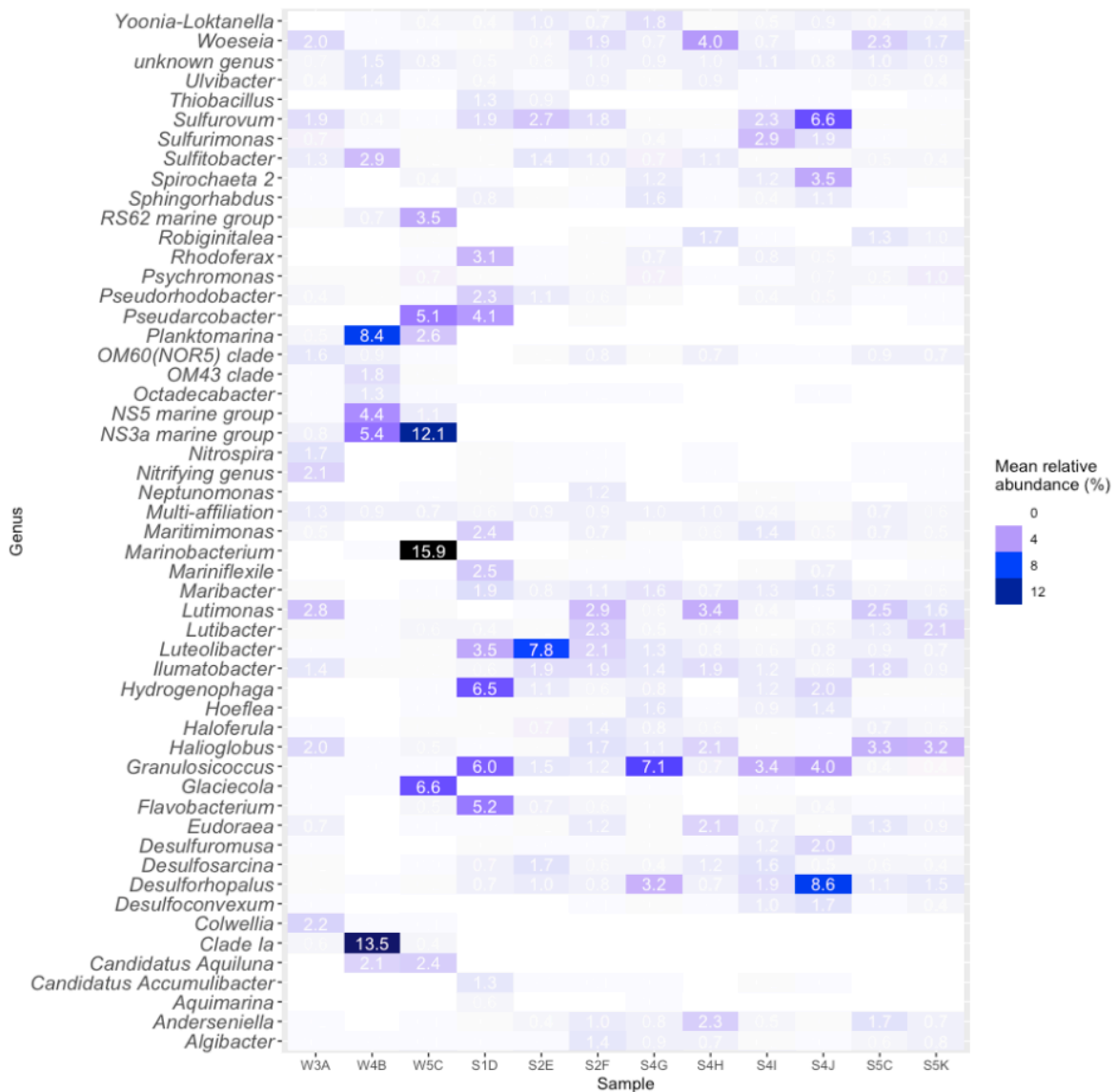
**Figure S3** Alpha diversity indicators for the end of phase 1 samples (P1). From left to right: richness, Shannon index and Simpson index.



**Figure S4** Alpha diversity indicators of phase 2 samples (P2) for SID and S2F marine consortia. From left to right: richness, Shannon index and Simpson index.



**Figure S5** Alpha diversity indicators of phase 3 samples (P3) for SID and S2F marine consortia and the commercial freshwater consortium (COM). From left to right: richness, Shannon index and Simpson index.



**Figure S6** Mean relative abundance of prokaryotic genera present in the natural samples. OTUs representing less than 1.5% across all samples were removed from the figure for clarity. The results are based on amplicon DNA concentrations normalized before sequencing. The mean value is calculated from duplicate samples. Refer to Table 1 for sample site coding.

## RÉFÉRENCES DE L'ARTICLE

- Alawi, M., Lipski, A., Sanders, T., Spieck, E., 2007. Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *ISME J.* 1, 256-264.
- American Public Health Association (Eds.), 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Annane, S., St-Amand, L., Starr, M., Pelletier, E., Ferreyra, G., 2015. Contribution of transparent exopolymeric particles (TEP) to estuarine particulate organic carbon pool. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 529, 17-34.
- Atlas, R. M. (Eds.), 2005. Handbook of Media for Environmental Microbiology. Taylor & Francis, Boca Raton.
- Ayub, N.D., Tribelli, P.M., López, N.I., 2009. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles* 13, 59-66.
- Barbosa, S.G., Peixoto, L., Meulman, B., Alves, M.M., Pereira, M.A., 2016. A design of experiments to assess phosphorous removal and crystal properties in struvite precipitation of source separated urine using different Mg sources. *Chem. Eng. J.* 298, 146-153.
- Belzile, C., Brugel, S., Nozais, C., Gratton, Y., Demers, S., 2008. Variations of the abundance and nucleic acid content of heterotrophic bacteria in Beaufort Shelf waters during winter and spring. *J. Mar. Syst.* 74, 946-956.
- Benner, R., Strom, M., 1993. A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation. *Mar. Chem.* 41, 153-160.



- Bernet, N., Sanchez, O., Cesbron, D., Steyer, J.-P., Delgenes, J.-P., 2005. Modeling and control of nitrite accumulation in a nitrifying biofilm reactor. *Biochem. Eng. J.* 24, 173-183.
- Bouassida, M., Fourati, N., Ghazala, I., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D., 2018. Potential application of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactants in laundry detergent formulations: compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Eng. Life Sci.* 18, 70-77.
- Bowman, J.P., Nichols, D.S., 2002. *Aequorivita* gen. nov., a member of the family Flavobacteriaceae isolated from terrestrial and marine Antarctic habitats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1533-1541.
- Bradstreet, R.B., 1954. Kjeldahl method for organic nitrogen. *Anal. Chem.* 26, 185-187.
- Burdige, D.J., Homstead, J., 1994. Fluxes of dissolved organic carbon from Chesapeake Bay sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 58, 3407-3424.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform.* 10, 1-9.
- Cho, S., Kim, J., Kim, S., Lee, S.-S., 2018. Nitrogen and phosphorus treatment of marine wastewater by a laboratory-scale sequencing batch reactor with eco-friendly marine high-efficiency sediment. *Environ. Tech.* 39, 1721-1732.
- Christner, B.C., Priscu, J.C., Achberger, A.M., Barbante, C., Carter, S.P., Christianson, K., Michaud, A.B., Mikucki, J.A., Mitchell, A.C., Skidmore, M.L., 2014. A microbial ecosystem beneath the West Antarctic ice sheet. *Nature* 512, 310-313.

- Comber, S., Gardner, M., Ellor, B., 2019. Seasonal variation of contaminant concentrations in wastewater treatment works effluents and river waters. *Environ. Tech.* 41, 2716-2730.
- Cui, Y.-W., Zhang, H.-Y., Ding, J.-R., Peng, Y.-Z., 2016. The effects of salinity on nitrification using halophilic nitrifiers in a Sequencing Batch Reactor treating hypersaline wastewater. *Sci Rep.* 6, 1-11.
- De Lourdes Moreno, M., Pérez, D., García, M.T., Mellado, E., 2013. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life* 3, 38-51.
- Deming, J.W., 2002. Psychrophiles and polar regions. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 301-309.
- Dionisi, H.M., Lozada, M., Olivera, N.L., 2012. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. *Rev. Argent. Microbiol.* 44, 49-60.
- Dobson, S., Franzmann, P., 1996. Unification of the genera *Deleya* (Baumann et al. 1983), *Halomonas* (Vreeland et al. 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family Halomonadaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 46, 550-558.
- Ducey, T.F., Vanotti, M.B., Shriner, A.D., Szogi, A.A., Ellison, A.Q., 2010. Characterization of a microbial community capable of nitrification at cold temperature. *Bioresour. Technol.* 101, 491-500.
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinform.* 34, 1287-1294.

- Fan, L., Song, C., Meng, S., Qiu, L., Zheng, Y., Wu, W., Qu, J., Li, D., Zhang, C., Hu, G., 2016. Spatial distribution of planktonic bacterial and archaeal communities in the upper section of the tidal reach in Yangtze River. *Sci. Rep.* 6, 1-11.
- Figdore, B.A., Stensel, H.D., Winkler, M.-K.H., 2018. Comparison of different aerobic granular sludge types for activated sludge nitrification bioaugmentation potential. *Bioresour. Technol.* 251, 189-196.
- Koops, H.P., Bottcher, B., Moller, U.C., Pommerening-Roser, A., Stehr, G., 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *N. J. Gen. Microbiol.* 137, 1689–1699
- Koops, H.P., Pommerening-Roser, A., 2001. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiol.* 37, 1–9.
- Grasshoff K, Kremling K, Ehrhardt M. (Eds.), 1999. *Methods of seawater analysis*. Wiley-VCH, New York, NY.
- Grossart, H.-P., Kjørboe, T., Tang, K., Ploug, H., 2003. Bacterial colonization of particles: growth and interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3500-3509.
- Hammes, F., Vital, M., Egli, T., 2010. Critical evaluation of the volumetric “bottle effect” on microbial batch growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1278-1281.
- Ip, Y., Chew, S., Randall, D., 2001. Ammonia toxicity, tolerance, and excretion. *Fish Physiol.* 20, 109-148.

- Ishii, K., Fujitani, H., Soh, K., Nakagawa, T., Takahashi, R., Tsuneda, S., 2017. Enrichment and physiological characterization of a cold-adapted nitrite-oxidizing *Nitrotoga* sp. from an eelgrass sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e00549-17.
- Itoh, Y., Sakagami, K., Uchino, Y., Boonmak, C., Oriyama, T., Tojo, F., Matsumoto, M., Morikawa, M., 2013. Isolation and characterization of a thermotolerant ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas* sp. JPCCT2 from a thermal power station. *Microbes Environ.* 28, 432-435.
- Karkman, A., Mattila, K., Tamminen, M., Virta, M., 2011. Cold temperature decreases bacterial species richness in nitrogen-removing bioreactors treating inorganic mine waters. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 2876-2883.
- Keto-Timonen, R., Hietala, N., Palonen, E., Hakakorpi, A., Lindström, M., Korkeala, H., 2016. Cold shock proteins: A minireview with special emphasis on Csp-family of enteropathogenic *Yersinia*. *Front. Microbiol.* 7, 1151.
- Kim, D.-J., Lee, D.-I., Keller, J., 2006. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresour. Technol.* 97, 459-468.
- Kinnunen, M., Gülay, A., Albrechtsen, H.J., Dechesne, A., Smets, B.F., 2017. *Nitrotoga* is selected over *Nitrospira* in newly assembled biofilm communities from a tap water source community at increased nitrite loading. *Environ. Microbiol.* 19, 2785-2793.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, e1.

- Lapoussière, A., Michel, C., Starr, M., Gosselin, M., Poulin, M., 2011. Role of free-living and particle-attached bacteria in the recycling and export of organic material in the Hudson Bay system. *J. Mar. Syst.* 88, 434-445.
- Losoi, P.S., Santala, V.P., Santala, S.M., 2019. Enhanced population control in a synthetic bacterial consortium by interconnected carbon cross-feeding. *ACS Synth. Biol.* 8, 2642-2650.
- Lozada, M., Dionisi, H.M., 2015. Microbial bioprospecting in marine environments, in: *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, Springer, 307-326.
- Lücker, S., Schwarz, J., Gruber-Dorninger, C., Spieck, E., Wagner, M., Daims, H., 2015. Nitrotoga-like bacteria are previously unrecognized key nitrite oxidizers in full-scale wastewater treatment plants. *ISME J.* 9, 708-720.
- Mucci, A., Starr, M., Gilbert, D., Sundby, B., 2011. Acidification of Lower St. Lawrence Estuary bottom waters. *Atmos. Ocean* 49, 206-218.
- Na, H., Kim, O.-S., Yoon, S.-H., Kim, Y., Chun, J., 2011. Comparative approach to capture bacterial diversity of coastal waters. *J. Microbiol.* 49, 729-740.
- Neukermans, G., Ruddick, K., Loisel, H., Roose, P., 2012. Optimization and quality control of suspended particulate matter concentration measurement using turbidity measurements. *Limnol. Oceanogr. Methods* 10, 1011-1023.
- Padrão, J., Tortella, G., Cortez, S., Dias, N., Nicolau, A., Mota, M., 2019. Nitrifying soil bacterium *Nitrosomonas europaea*: Operational improvement of standard culture medium. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 19, 270-276.

- Park, J.R., Bae, J.-W., Nam, Y.-D., Chang, H.-W., Kwon, H.-Y., Quan, Z.-X., Park, Y.-H., 2007a. *Sulfitobacter litoralis* sp. nov., a marine bacterium isolated from the East Sea, Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 692-695.
- Park, S., Bae, W., Chung, J., Baek, S.-C., 2007b. Empirical model of the pH dependence of the maximum specific nitrification rate. *Process Biochem.* 42, 1671-1676.
- Pommerening-Röser, A., Rath, G., Koops, H.-P., 1996. Phylogenetic diversity within the genus *Nitrosomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 344-351.
- Romano, G., Costantini, M., Sansone, C., Lauritano, C., Ruocco, N., Ianora, A., 2017. Marine microorganisms as a promising and sustainable source of bioactive molecules. *Mar. Environ. Res.* 128, 58-69.
- Sáez-Plaza, P., Michałowski, T., Navas, M.J., Asuero, A.G., Wybraniec, S., 2013. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 43, 178-223.
- Sattin, S.R., Cleveland, C.C., Hood, E., Reed, S.C., King, A.J., Schmidt, S.K., Robeson, M.S., Ascarrunz, N., Nemergut, D.R., 2009. Functional shifts in unvegetated, perhumid, recently-deglaciated soils do not correlate with shifts in soil bacterial community composition. *J Microbiol.* 47, 673-681.
- Saunders, A.M., Albertsen, M., Vollertsen, J., Nielsen, P.H., 2016. The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. *ISME J.* 10, 11-20.
- Schmidt, S., Nemergut, D., Miller, A., Freeman, K., King, A., Seimon, A., 2009. Microbial activity and diversity during extreme freeze–thaw cycles in periglacial soils, 5400 m elevation, Cordillera Vilcanota, Perú. *Extremophiles* 13, 807-816.

- Seo, J.-K., Jung, I.-H., Kim, M.-R., Kim, B.J., Nam, S.-W., Kim, S.-K., 2001. Nitrification performance of nitrifiers immobilized in PVA (polyvinyl alcohol) for a marine recirculating aquarium system. *Aquac. Eng.* 24, 181-194.
- Shi, Y., Jiang, Y., Wang, S., Wang, X., Zhu, G., 2020. Biogeographic distribution of comammox bacteria in diverse terrestrial habitats. *Sci. Total Environ.* 717, 137257.
- Singh, B.K., 2010. Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. *Trends Biotechnol.* 28, 111-116.
- Smith, J.M., Chavez, F.P., Francis, C.A., 2014. Ammonium uptake by phytoplankton regulates nitrification in the sunlit ocean. *PLoS One* 9, e108173.
- Sorokin, D.Y., 1995. *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov.- a new heterotrophic bacterium from the Black Sea, specialized on sulfite oxidation. *Microbiol.* 64, 295-295.
- Sudarno, U., Bathe, S., Winter, J., Gallert, C., 2010. Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 2017-2030.
- Tribelli, P.M., López, N.I., 2011. Poly (3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles* 15, 541-547.
- Van Elsas, J.D., Turner, S., Bailey, M.J., 2003. Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New Phytol.* 157, 525-537.
- West-Eberhard, M.J. 1989. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20, 249-278.
- White, C.P., DeBry, R.W., Lytle, D.A., 2012. Microbial survey of a full-scale, biologically active filter for treatment of drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 6390-6394.

- Yao, H., Gao, Y., Nicol, G.W., Campbell, C.D., Prosser, J.I., Zhang, L., Han, W., Singh, B.K., 2011. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4618-4625.
- Yao, Q., Peng, D.-C., 2017. Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. *AMB Express*, 7, 1-11.
- Yao, S., Ni, J., Chen, Q., Borthwick, A.G., 2013. Enrichment and characterization of a bacteria consortium capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature. *Bioresour. Technol.*, 127, 151-157.
- Zeng, Y.-X., Zhang, Y.-H., Li, H.-R., Luo, W., 2020. Complete genome of *Sulfitobacter* sp. BSw21498 isolated from seawater of Arctic Kongsfjorden. *Mar. Genom.* 53, 100769.
- Zheng, M., Li, S., Ni, G., Xia, J., Hu, S., Yuan, Z., Liu, Y., Huang, X., 2020. Critical factors facilitating *Candidatus Nitrotoga* to be prevalent nitrite-oxidizing bacteria in activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* 54, 15414-15423.





## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les hypothèses soutenant ces objectifs de recherche étaient que (1) l'estuaire du Saint-Laurent possède des souches nitrifiantes fonctionnelles pouvant être performantes à 10°C et 25 psu et que (2) l'augmentation de l'abondance relative des bactéries nitrifiantes, par enrichissement sélectif, induira une activité nitrifiante accrue dans le consortium. La première hypothèse a été confirmée puisque nous avons bel et bien enrichi des microorganismes nitrifiants performants à 10°C et 25 psu à partir du microbiome de l'estuaire du St-Laurent. La première phase d'enrichissement a permis d'enrichir en procaryotes nitrifiants les 12 échantillons naturels marins récoltés. L'abondance relative médiane des bactéries nitrifiantes dans les échantillons naturels était de 0,2% et a augmenté à 24,3% à la fin de la phase 1. Les deux principaux genres bactériens nitrifiants étaient *Candidatus Nitrotoga* et *Nitrosomonas*, avec des abondances relatives moyennes variant de 7,4% à 37,2% et de 2,4% à 17,4%, respectivement. Les souches « québécoises » constituant les consortiums enrichis ont su s'acclimater aux conditions de laboratoire et de mise à l'échelle et exhiber des taux de nitrification intéressants pour l'industrie. Cette augmentation de l'activité nitrifiante s'est accompagnée d'une augmentation de l'abondance relative des bactéries nitrifiantes, laissant croire que la seconde hypothèse a également été validée. Après les phases 2 et 3 de la méthode d'enrichissement, l'activité nitrifiante du consortium S2F à 10°C et 25 psu était de 21.3 mg NH<sub>3</sub>-N L<sup>-1</sup> jr<sup>-1</sup> avec un poids de biomasse sèche standardisée à 25 mg L<sup>-1</sup>. Ce consortium s'est avéré avoir un taux de nitrification plus de 2 fois supérieur à celui d'un homologue commercial d'eau douce (COM) dans les mêmes conditions.

Le développement des consortiums enrichis à basse température a été un long processus: l'enrichissement d'un consortium à travers les trois phases a duré jusqu'à 17 mois. Toutefois, la phase 1 a duré plus longtemps que nécessaire par contraintes d'équipements (ex : nombre de bioréacteurs) et l'intercalage des nombreuses campagnes d'échantillonnage.

Le transférer d'un consortium provenant d'une flasque Erlenmeyer (phase 1) au bioréacteur commercial (phase 2) aurait pu se faire après seulement 4 semaines puisque l'activité nitrifiante était déjà observable et constante dans la plupart des cultures en flasques. L'augmentation et la maturation de la biomasse en conditions froides et salées (phases 2 et 3) ont été les étapes les plus chronophages. La propagation d'un consortium nitrifiant requiert un investissement en temps important directement corrélé au temps de génération de la biomasse du consortium qui tend à diminuer avec la température. Malgré cette limitation, le consortium S2F, avec un potentiel commercial intéressant pour le traitement des eaux usées, l'aquariophilie et l'aquaculture, a été obtenu. À 10°C et 25 psu, ce consortium a tendance à flocculer, ce qui est désirable pour le traitement des eaux usées, et n'a montré aucun signe d'accumulation de nitrite, ce qui est essentiel pour le bien-être de la vie aquatique en aquarium. Finalement, cette étude a démontré que le développement de consortiums nitrifiants marins constitue une solution écologique pour les applications faisant recours à la nitrification en eaux froides et salines.

Pour approfondir cette étude, il serait intéressant de mieux comprendre l'effet des conditions d'enrichissement sur la diversité et la composition finale des consortiums. Les résultats de l'étude montrent que la méthodologie d'enrichissement utilisée a eu un effet de sélection de certaines espèces abondantes (*Candidatus Nitrotoga*, *Nitrosomonas*, *Sulfitobacter* et *Neptuniibacter*) malgré la variabilité de l'échantillonnage. Est-ce que les espèces abondantes des consortiums finaux auraient été les mêmes si, par exemple, la température d'enrichissement était de 15°C et que de l'eau de mer synthétique avait été utilisée comme base du milieu de culture ? C'est une avenue à explorer. De plus, l'étude de ces consortiums ouvre également une nouvelle voie de valorisation de la biomasse microbienne de l'estuaire du Saint-Laurent. Les microorganismes marins sont souvent convoités pour leurs enzymes et autres molécules synthétisées. Les cas où la biomasse microbienne marine est convoitée pour son activité métabolique sont plus rares. Pourtant, la biomasse microbienne de l'estuaire du Saint-Laurent se présente comme un puits de diversité qui héberge potentiellement des souches plus performantes que les souches terrestres et d'eau

douce. Une belle opportunité pour des entrepreneurs cherchant à développer des produits microbiens locaux ou uniques.





## RÉFÉRENCES DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE

- Alawi, M., Lipski, A., Sanders, T., & Spieck, E. (2007). Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic. *ISME*, 1(3), 256-264.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S., & Srinath, E. G. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Water Pollution Control Federation*, 835-852.
- Aslan, S., & Simsek, E. (2012). Influence of salinity on partial nitrification in a submerged biofilter. *Bioresource technology*, 118, 24-29.
- Bernet, N., Dangcong, P., Delgenès, J. P., & Moletta, R. (2001). Nitrification at low oxygen concentration in biofilm reactor. *Journal of Environmental Engineering*, 127(3), 266-271.
- Bernhard, A. (2010). The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge* 3(10), 25.
- Białkowska, A., Majewska, E., Olczak, A., & Twarda-Clapa, A. (2020). Ice binding proteins: Diverse biological roles and applications in different types of industry. *Biomolecules*, 10(2), 274.
- Biesterfeld, S., Farmer, G., Russell, P., & Figueroa, L. (2003). Effect of alkalinity type and concentration on nitrifying biofilm activity. *Water environment research*, 75(3), 196-204.
- Bock E, Koops H. P., Harms H. (1986). Cell biology of nitrifying bacteria. In *Nitrification*, pp. 17-38. Prosser J. I.(ed.), IRL Press, Oxford.
- Bock E, Koops H. P., Harms H. (1989). Nitrifying bacteria. In *Autotrophic bacteria*, pp. 81-96. Schlegel H. G. et Bowien B. (ed.), Springer-Verlag, Berlin.
- Brenner, K., You, L., & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: A new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 26(9), 483-489.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3916-3923.

- Burton, S. A., & Prosser, J. I. (2001). Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2952-2957.
- Camargo, J. A., & Alonso, A. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32(6), 831-849.
- Canfield, D. E., Kristensen, E., & Thamdrup, B. (2005). The nitrogen cycle. In *Aquatic geomicrobiology* (48, pp. 205-266). Elsevier Academic Press.
- Caranto, J. D., & Lancaster, K. M. (2017). Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(31), 8217-8222.
- Catalan-Sakairi, M. A. B., Wang, P. C., & Matsumura, M. (1997). Nitrification performance of marine nitrifiers immobilized in polyester-and macro-porous cellulose carriers. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(6), 563-571.
- Cébron, A. (2004). Nitrification, bactéries nitrifiantes et émissions de N<sub>2</sub>O: la seine en aval de Paris (Doctoral dissertation, Paris 6).
- Chen, X., Shi, X., Cai, X., Yang, F., Li, L., Wu, J., & Wang, S. (2021). Ice-binding proteins: a remarkable ice crystal regulator for frozen foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(20), 3436-3449.
- Cho, S., Kim, J., Kim, S., & Lee, S. S. (2018). Nitrogen and phosphorus treatment of marine wastewater by a laboratory-scale sequencing batch reactor with eco-friendly marine high-efficiency sediment. *Environmental Technology*, 39(13), 1721-1732.
- Church, M. J., Wai, B., Karl, D. M., & DeLong, E. F. (2010). Abundances of crenarchaeal amoA genes and transcripts in the Pacific Ocean. *Environmental Microbiology*, 12(3), 679-688.
- Clean Coastal Waters: Understanding and reducing the effects of nutrient pollution. (2000). National Academy of Science.
- Costa, E., Pérez, J., & Kreft, J. U. (2006). Why is metabolic labour divided in nitrification?. *Trends in Microbiology*, 14(5), 213-219.
- Cui, Y. W., Zhang, H. Y., Ding, J. R., & Peng, Y. Z. (2016). The effects of salinity on nitrification using halophilic nitrifiers in a Sequencing Batch Reactor treating hypersaline wastewater. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.
- Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., von Berger, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H. & Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504-509.



- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G., Gerday, C., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports*, 7(4), 385-389.
- De Boer, W., & Kowalchuk, G. A. (2001). Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7-8), 853-866.
- De Lourdes Moreno, M., Pérez, D., García, M. T., & Mellado, E. (2013). Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*, 3(1), 38-51.
- Deming, J. W. (2002). Psychrophiles and polar regions. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 301-309.
- Dinauer, A., & Mucci, A. (2017). Spatial variability in surface-water pCO<sub>2</sub> and gas exchange in the world's largest semi-enclosed estuarine system: St. Lawrence Estuary (Canada). *Biogeosciences*, 14(13), 3221-3237.
- Dinçer, A. R., & Kargi, F. (2001). Salt inhibition kinetics in nitrification of synthetic saline wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(7-8), 661-665.
- Ducey, T. F., Vanotti, M. B., Shriner, A. D., Szogi, A. A., & Ellison, A. Q. (2010). Characterization of a microbial community capable of nitrification at cold temperature. *Bioresource Technology*, 101(2), 491-500.
- Dufour, R., & Ouellet, P. (2007). Estuary and Gulf of St. Lawrence marine ecosystem overview and assessment report. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2744E: vii + 112 p.
- Driscoll, C., Whitall, D., Aber, J., Boyer, E., Castro, M., Cronan, C., Goodale, C., Groffman, P., Hopkinson, C., Lambert, K., Lawrence, G., & Ollinger, S. (2003). Nitrogen pollution: Sources and consequences in the US northeast. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, 45(7), 8-22.
- El-Sabh, M. I., & Silverberg, N. (1990). The St. Lawrence Estuary: Introduction. In *Oceanography of a large-scale estuarine system*. (pp. 1-9) Springer.
- Explos-Nature (2011). Guide Découverte: L'Estuaire maritime (Report ISBN 978-2-9812806-0-2). Explos-Nature. <http://www.explosnature.ca/wp-content/uploads/2017/04/Guide-Découverte-Section-Divisions-du-Saint-Laurent.pdf>
- Fornbacke, M., & Clarsund, M. (2013). Cold-adapted proteases as an emerging class of therapeutics. *Infectious Diseases and Therapy*, 2(1), 15-26.
- Francis, C. A., Roberts, K. J., Beman, J. M., Santoro, A. E., & Oakley, B. B. (2005). Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41), 14683-14688.

- Gratton, Y., Mertz, G., & Gagné, J. A. (1988). Satellite observations of tidal upwelling and mixing in the St. Lawrence Estuary. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 93(C6), 6947-6954.
- Guerrero, M. A., & Jones, R. D. (1996). Photoinhibition of marine nitrifying bacteria. I. Wavelength-dependent response. *Marine Ecology Progress Series*, 141, 183-192.
- Hanaki, K., Wantawin, C., & Ohgaki, S. (1990). Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Water Research*, 24(3), 297-302.
- Hatzenpichler, R. (2012). Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7501-7510.
- He, J. Z., Hu, H. W., & Zhang, L. M. (2012). Current insights into the autotrophic thaumarchaeal ammonia oxidation in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 55, 146-154.
- Helmke, E., & Weyland, H. (2004). Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria-occurrence and significance in polar and temperate marine habitats. *Cellular and molecular Biology*, 50(5), 553-561.
- Herbert, R. A. (1999). Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS microbiology reviews*, 23(5), 563-590.
- Herndl, G. J., Reinthaler, T., Teira, E., van Aken, H., Veth, C., Pernthaler, A., & Pernthaler, J. (2005). Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2303-2309.
- Hollibaugh, J. T., Gifford, S., Sharma, S., Bano, N., & Moran, M. A. (2011). Metatranscriptomic analysis of ammonia-oxidizing organisms in an estuarine bacterioplankton assemblage. *The ISME journal*, 5(5), 866-878.
- Hyman, M. R., & Arp, D. J. (1992).  $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$ - and  $^{14}\text{C}_2\text{O}_2$ -labeling studies of the de novo synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 1534-1545.
- Ishii, K., Fujitani, H., Soh, K., Nakagawa, T., Takahashi, R., & Tsuneda, S. (2017). Enrichment and physiological characterization of a cold-adapted nitrite-oxidizing *Nitrotoga* sp. from an eelgrass sediment. *Applied and environmental microbiology*, 83(14), e00549-17.
- Jin, S., Wang, Y., & Zhao, X. (2022). Cold-adaptive mechanism of psychrophilic bacteria in food and its application. *Microbial Pathogenesis*, 105652.

- Josserand, A. (1983). Apport de l'immunofluorescence à l'étude écologique des germes nitrifiants (genre *Nitrobacter*) (Doctoral dissertation, Université Lyon I).
- Kargi, F., & Uygur, A. (1996). Biological treatment of saline wastewater in an aerated percolator unit utilizing halophilic bacteria. *Environmental Technology*, 17(3), 325-330.
- Keto-Timonen, R., Hietala, N., Palonen, E., Hakakorpi, A., Lindström, M., & Korkeala, H. (2016). Cold shock proteins: A minireview with special emphasis on Csp-family of enteropathogenic *Yersinia*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1151.
- Könneke, M., Bernhard, A. E., de La Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., & Stahl, D. A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437(7058), 543-546.
- Kowalchuk, G. A., & Stephen, J. R. (2001). Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual review of microbiology*, 55, 485.
- Kozłowski, J. A., Stieglmeier, M., Schleper, C., Klotz, M. G., & Stein, L. Y. (2016). Pathways and key intermediates required for obligate aerobic ammonia-dependent chemolithotrophy in bacteria and Thaumarchaeota. *ISME*, 10(8), 1836-1845.
- Kushner, D.J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. *Microbial Life in Extreme Environments*. London: Academic Press, 317-368.
- Kuypers, M. M., Marchant, H. K., & Kartal, B. (2018). The microbial nitrogen-cycling network. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 263-276.
- Laanbroek, H. J., Bodelier, P. L., & Gerards, S. (1994). Oxygen consumption kinetics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter hamburgensis* grown in mixed continuous cultures at different oxygen concentrations. *Archives of Microbiology*, 161(2), 156-162.
- Lancaster, K. M., Caranto, J. D., Majer, S. H., & Smith, M. A. (2018). Alternative bioenergy: updates to and challenges in nitrification metalloenzymology. *Joule*, 2(3), 421-441.
- Larcher, W. (2003). *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media.
- Le Borgne, S., Paniagua, D., & Vazquez-Duhalt, R. (2008). Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Microbial Physiology*, 15(2-3), 74-92.
- Lee, D. J., Show, K. Y., & Wang, A. (2013). Unconventional approaches to isolation and enrichment of functional microbial consortium – A review. *Bioresource Technology*, 136, 697-706.

- Lehtovirta-Morley, L. E. (2018). Ammonia oxidation: ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together. *FEMS Microbiology Letters*, 365(9), fny058.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C. & Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442(7104), 806-809.
- Losoi, P. S., Santala, V. P., et Santala, S. M. (2019). Enhanced population control in a synthetic bacterial consortium by interconnected carbon cross-feeding. *ACS Synthetic Biology*, 8(12), 2642-2650.
- Lu, S., Liu, X., Liu, C., Cheng, G., & Shen, H. (2020). Influence of photoinhibition on nitrification by ammonia-oxidizing microorganisms in aquatic ecosystems. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(3), 531-542.
- Maier, R. M. (2015). Biogeochemical cycling. In Pepper, I.L., Gerba C.P. & Gentry, T. (Eds.), *Environmental Microbiology* (3<sup>rd</sup> ed., pp. 339-373.) Academic Press.
- Margesin, R. (2009). Effect of temperature on growth parameters of psychrophilic bacteria and yeasts. *Extremophiles*, 13(2), 257-262.
- Margesin, R., & Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 162(3), 346-361.
- Margesin, R., Neuner, G., & Storey, K. B. (2007). Cold-loving microbes, plants, and animals—fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*, 94(2), 77-99.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83.
- Merbt, S. N., Stahl, D. A., Casamayor, E. O., Martí, E., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2012). Differential photoinhibition of bacterial and archaeal ammonia oxidation. *FEMS Microbiology Letters*, 327(1), 41-46.
- Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, 39(2), 144-167.
- Mucci, A., Starr, M., Gilbert, D., & Sundby, B. (2011). Acidification of Lower St. Lawrence Estuary bottom waters. *Atmosphere-Ocean*, 49(3), 206-218
- Muñoz, P. A., Márquez, S. L., González-Nilo, F. D., Márquez-Miranda, V., & Blamey, J. M. (2017). Structure and application of antifreeze proteins from Antarctic bacteria. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1-13.
- Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4(1), 1-13.

- Palenik, B., Zafiriou, O. C., & Morel, F. M. (1987). Hydrogen peroxide production by a marine phytoplankton 1. *Limnology and Oceanography*, 32(6), 1365-1369.
- Paredes, D., Kuschik, P., Mbwette, T. S. A., Stange, F., Müller, R. A., & Köser, H. (2007). New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment - A review. *Engineering in Life Sciences*, 7(1), 13-25.
- Park, S. J., Andrei, A. Ş., Bulzu, P. A., Kavagutti, V. S., Ghai, R., & Mosier, A. C. (2020). Expanded diversity and metabolic versatility of marine nitrite-oxidizing bacteria revealed by cultivation-and genomics-based approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(22), e01667-20.
- Piette, F., Struvay, C., & Feller, G. (2011). The protein folding challenge in psychrophiles: facts and current issues. *Environmental Microbiology*, 13(8), 1924-1933.
- Poulin, P. (2008). Cycle biogéochimique de l'azote dans l'estuaire du Saint-Laurent; rôle des marais côtiers (Doctoral dissertation, Université du Québec à Rimouski).
- Rodrigo-Baños, M., Garbayo, I., Vilchez, C., Bonete, M. J., & Martínez-Espinosa, R. M. (2015). Carotenoids from Haloarchaea and their potential in biotechnology. *Marine Drugs*, 13(9), 5508-5532.
- Russell, N. J. (1997). Psychrophilic bacteria—molecular adaptations of membrane lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118(3), 489-493.
- Santiago, M., Ramírez-Sarmiento, C. A., Zamora, R. A., & Parra, L. P. (2016). Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1408.
- Saucier, F., Roy, F., Senneville, S., Smith, G., Lefavre, D., Zakardjian, B., & Dumais, J. F. (2009). Modélisation de la circulation dans l'estuaire et le golfe du Saint-Laurent en réponse aux variations du débit d'eau douce et des vents. *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science*, 22(2), 159-176.
- Shammas, N. K. (1986). Interactions of temperature, pH, and biomass on the nitrification process. *Water Pollution Control Federation*, 52-59.
- Shen, D., Langenheder, S., & Jürgens, K. (2018). Dispersal modifies the diversity and composition of active bacterial communities in response to a salinity disturbance. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2188.
- Shen, Q. R., Ran, W., & Cao, Z. H. (2003). Mechanisms of nitrite accumulation occurring in soil nitrification. *Chemosphere*, 50(6), 747-753.
- Silva, T. R. E., Silva, L. C. F., de Queiroz, A. C., Alexandre Moreira, M. S., de Carvalho Fraga, C. A., de Menezes, G. C. A., Rosa, L. H., Bicas, J., de Oliveira, V. M. & Duarte,

- A. W. F. (2021). Pigments from Antarctic bacteria and their biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(6), 809-826.
- Smith, J. M., Chavez, F. P., & Francis, C. A. (2014). Ammonium uptake by phytoplankton regulates nitrification in the sunlit ocean. *PloS one*, 9(9), e108173.
- Soldatou, S., & Baker, B. J. (2017). Cold-water marine natural products, 2006 to 2016. *Natural Product Reports*, 34(6), 585-626.
- Stein, L. Y. (2019). Insights into the physiology of ammonia-oxidizing microorganisms. *Current opinion in chemical biology*, 49, 9-15.
- Stief, P. (2013). Stimulation of microbial nitrogen cycling in aquatic ecosystems by benthic macrofauna: Mechanisms and environmental implications. *Biogeosciences*, 10(12), 7829-7846.
- Su, H., Mai, Z., Yang, J., Xiao, Y., Tian, X., & Zhang, S. (2016). Cloning, expression, and characterization of a cold-active and organic solvent-tolerant lipase from *Aeromicrobium* sp. SCSIO 25071. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 1067-1076.
- Sudarno, U., Bathe, S., Winter, J., & Gallert, C. (2010). Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 2017-2030.
- Sutton, P. M., Murphy, K. L., & Jank, B. E. (1978). Kinetic studies of single sludge nitrogen removal systems. *Progress in Water Technology*, 241-253.
- Tarre, S., & Green, M. (2004). High-rate nitrification at low pH in suspended-and attached-biomass reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6481-6487.
- Thamdrup, B. (2012). New pathways and processes in the global nitrogen cycle. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 407-428.
- Tolar, B. B., Powers, L. C., Miller, W. L., Wallsgrove, N. J., Popp, B. N., & Hollibaugh, J. T. (2016). Ammonia oxidation in the ocean can be inhibited by nanomolar concentrations of hydrogen peroxide. *Frontiers in Marine Science*, 3, 237.
- Tribelli, P. M., & López, N. I. (2018). Reporting key features in cold-adapted bacteria. *Life*, 8(1), 8.
- Turk, O., & Mavinic, D. S. (1989). Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia. *Water Research*, 23(11), 1383-1388.
- Van Kessel, M. A., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op den Camp, H. J., Kartal, B., Jetten, M. S. & Lücker, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528(7583), 555-559.

- Vitousek, P. M., & Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur?. *Biogeochemistry*, 13(2), 87-115.
- Winogradsky, S. (1890). Recherches sur les organismes de la nitrification. *Institut Pasteur*, 4, 213-231.
- Yao, S., Ni, J., Ma, T., & Li, C. (2013). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature by a newly isolated bacterium, *Acinetobacter* sp. HA2. *Bioresource Technology*, 139, 80-86.
- You, J., Das, A., Dolan, E. M., & Hu, Z. (2009). Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Research*, 43(7), 1801-1809





