**Title of the thesis:**

*In* vitro assessment of the toxicity of pesticides on ammonia-oxidizing microorganisms

**Titre de la these:**

Évaluation *in vitro* de la toxicité des pesticides sur les micro-organismes oxydant l'ammoniac.

**Key words :** ammonia-oxidizing bacteria, ammonia-oxidizing archaea, nitrite-oxidizing bacteria, ecotoxicity, pesticides

**Mots clés :** bactéries oxydant l'ammoniac, archées oxydant l'ammoniac, bactéries oxydant les nitrites, écotoxicité, pesticides

# **Abstract**

The use of pesticides is essential for boosting agricultural yields, but much of these chemicals miss their targets, accumulating in soil and harming ecosystems and microorganisms. Despite the importance of soil microbes in ecosystem health, traditional pesticide risk assessments have not fully addressed the toxicity of pesticides on them. To address this, recent studies proposed a tiered system to assess pesticide effects on the key microbial group of ammonia-oxidizing microorganisms (AOM). The system progresses from *in vitro* toxicity tests (Tier I) to soil microcosms or pot studies (Tier II), and finally to field-scale evaluations (Tier III). The main objectives of this thesis were to i) develop and validate an *in vitro* bioassay using AOM and functionally related NOB as a standard Tier I assay, related to the single-species tests commonly used in aquatic ecotoxicology, ii) compare the toxicity of pesticides on AOM with an existing toxicity assessment assay, the Microbial Assay for Risk Assessment (MARA) kit from NCIMB (Scotland), and iii) characterize the physiology of *Ca*. Nitrobacter laanbroekii NHB1, one of the most sensitive strains identified in this thesis. The toxicity of representative pesticides—covering insecticides, fungicides, and herbicides— was assessed on several ammonia-oxidizing microorganisms (AOM), including ammonia-oxidizing bacteria (AOB), ammonia-oxidizing archaea (AOA), and nitrite-oxidizing bacteria (NOB). Toxicity endpoints (EC50) were determined for each strain-pesticide combination, with *Nitrosotalea sinensis* Nd2 (AOA), *Nitrosospira briensis* (AOB), and *Ca.* Nitrobacter laanbroekii NHB1 (NOB) identified as the most sensitive strains and suitable bioindicators for the proposed single species bioassay. Fungicides and insecticides were generally more toxic to AOM than NOB, while herbicides showed variable toxicity across all nitrifier groups. This testing approach proved valuable for Tier I ecotoxicity assessments of pesticides on soil microbial communities. Building on these findings, toxicity of additional pesticides from different categories on the three most sensitive strains was assessed. Using the proposed single-species *in vitro* assay, EC50 values confirmed these strains as effective bioindicators for Tier I testing framework. *N. sinensis* was the most sensitive strain, followed by *N. briensis* and *Ca. N. laanbroekii NHB1*, indicating these strains are promising bioindicators for pesticide toxicity in soil. Fungicides were most toxic to *N. sinensis*, causing significant inhibition at agronomical concentration levels. The differential sensitivities of these strains to various pesticide classes highlight the need for a comprehensive approach that captures a broad spectrum of microbial responses. The evaluation of pesticides toxicity using the MARA kit, which uses 11 heterotrophic microbial strains to detect toxicity, demonstrated relatively low sensitivity, with pesticides affecting these strains only at high concentrations, in contrast to AOM which showed much higher sensitivity to pesticides. The physiology of *Ca. Nitrobacter laanbroekii* NHB1, one of the identified bioindicator was also characterised. The strain demonstrated an acidotolerant physiology with optimal growth at pH 6.0 and detectable growth down to pH 3.5. In co-culture, *Ca. N. laanbroekii* NHB1 enhanced the growth of acidophilic ammonia-oxidizing archaea (AOA), such as *Nitrosotalea devaniterrae* Nd1 and *N. sinensis*, by removing inhibitory nitrite. This cross-feeding mechanism underscores the importance of substrate concentrations in microbial interactions in acidic soils.

# **Résumé**

L'utilisation de pesticides est essentielle pour augmenter les rendements agricoles, mais ces produits chimiques peuvent manquer leurs cibles, s'accumuler dans le sol et nuire aux micro-organismes qui sont importants pour la santé de l'écosystème. Les évaluations traditionnelles des risques liés aux pesticides n'ont pas entièrement pris en compte la toxicité des pesticides pour les micro-organismes. Pour remédier à cette situation, un système à plusieurs niveaux a été proposé pour évaluer les effets des pesticides sur un groupe microbien clé, les micro-organismes oxydant l'ammoniac (AOM). Le système comprend des tests de toxicité *in vitro* (niveau I) aux microcosmes de sol puis aux études en pots (niveau II), et enfin aux évaluations à l'échelle du terrain (niveau III). Les principaux objectifs de cette thèse étaient de i) développer et valider un essai biologique *in vitro* utilisant l'AOM et des bactéries oxydantes des nitrites (NOB) fonctionnellement apparentées comme essai standard de niveau I, lié aux tests monospécifiques couramment utilisés en écotoxicologie aquatique, ii) comparer la toxicité des pesticides sur l'AOM avec un kit d'évaluation de la toxicité disponible dans le commerce, et iii) caractériser la physiologie de la souche de NOB *Ca*. Nitrobacter laanbroekii NHB1, l'une des souches les plus sensibles aux pesticides identifiés dans cette thèse. La toxicité de pesticides représentatifs (insecticides, fongicides et herbicides) a été évaluée sur plusieurs AOM, y compris des bactéries oxydant l'ammoniac (AOB), des archées oxydant l'ammoniac (AOA) et des NOB. Les seuils de toxicité (EC50) ont été déterminés pour chaque combinaison souche-pesticide, *Nitrosotalea sinensis* Nd2 (AOA), *Nitrosospira briensis* (AOB) et *Ca*. Nitrobacter laanbroekii NHB1 (NOB) ont été identifiées comme les souches les plus sensibles et les bioindicateurs appropriés pour l'essai biologique proposé sur une seule espèce. Les fongicides et les insecticides étaient généralement plus toxiques pour AOM que pour NOB, tandis que les herbicides présentaient une toxicité variable pour tous les groupes de nitrifiants. Sur la base de ces résultats, la toxicité d'autres pesticides de différentes catégories sur les trois souches les plus sensibles a été évaluée. En utilisant l'essai *in vitro* proposé pour une seule espèce, les valeurs EC50 ont confirmé que ces souches étaient des bioindicateurs efficaces pour les essais de toxicité de niveau I. Les fongicides étaient les plus toxiques pour les AOM que pour les NOB. Les fongicides ont été les plus toxiques pour *N. sinensis*, provoquant une inhibition significative à des niveaux de concentration agronomiques. Les sensibilités différentes de ces souches à diverses classes de pesticides soulignent la nécessité d'une approche globale qui saisisse un large spectre de réponses microbiennes. L'évaluation de la toxicité des pesticides à l'aide du kit MARA (Microbial Assay for Risk Assessment), qui utilise 11 souches microbiennes hétérotrophes pour détecter la toxicité des pesticides, a montré une sensibilité relativement faible, les pesticides n'affectant ces souches qu'à des concentrations élevées, contrairement à l'AOM qui a montré une sensibilité beaucoup plus élevée aux pesticides. La physiologie de *Ca.* Nitrobacter laanbroekii NHB1, l'un des bioindicateurs identifiés, a montré une tolérance à l'acide avec une croissance optimale à un pH de 6,0 et une croissance détectable jusqu'à un pH de 3,5. En co-culture, cette souche a favorisé la croissance d'AOA acidophiles, telles que *Nitrosotalea devaniterrae* Nd1 et *N. sinensis*, en éliminant les nitrites inhibiteurs. Ce mécanisme de mutualisme trophique souligne l'importance des concentrations de substrat dans les interactions microbiennes dans les sols acides.