



# Effets génotoxiques de l'irrigation à long-terme par des eaux usées traitées : cas du périmètre Cebala-Borj Touil.

Dalila SOUGUIR<sup>1\*</sup>, Georg HÖRMANN<sup>2</sup>, Mohamed HACHICHA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut National de Recherches en Génie Rural, Eaux et Forêts (INRGREF), Université de Carthage, 10 Rue Hédi Karray, Manzeh 4, 2080 Ariana, Tunisie.

<sup>2</sup> Department of Hydrology and Water Resources Management, Institute for Natural Resource Conservation, Kiel University, Olshausenstr, 75, 24118 Kiel, Germany.

\*Auteur correspondant : E-mail: [souguir.dalila@yahoo.com](mailto:souguir.dalila@yahoo.com)

Original submitted in on 10<sup>th</sup> May 2019. Published online at [www.m.elewa.org/journals/](http://www.m.elewa.org/journals/) on 31<sup>st</sup> July 2019  
<https://dx.doi.org/10.4314/jab.v139i1.6>

## RÉSUMÉ

*Objectif* : La réutilisation à long-terme des eaux usées traitées (EUT) pourrait constituer une source de contamination avec un apport cumulé en éléments toxiques. Le but de cette étude est d'évaluer l'impact génotoxique d'une telle irrigation sur les sols du périmètre irrigué Cebala-Borj Touil à travers le test de *Vicia*-micronoyaux.

*Méthodologie et résultats*. Les lixiviats des sols issus de 3 parcelles recevant des EUT depuis 2 (P2), 4 (P4) et 10 (P10) ans ont servi pour l'étude génotoxique. Ces lixiviats sont basiques avec une salinité ne dépassant pas 2,23 dS m<sup>-1</sup> dominée par des ions Cl et Na. La composition métallique a montré des teneurs plus élevées chez les sols ayant reçu des irrigations avec les EUT par rapport à celui du contrôle jamais irrigué (P0). L'étude génotoxique a révélé une activité mitotique importante chez tous les lixiviats, une induction des micronoyaux surtout chez P10, et une apparition des aberrations chromosomiques et nucléaires.

*Conclusion et application*. Bien que l'échantillonnage se soit déroulé pendant la période pluvieuse, supposée lessiver les contaminants en profondeur, le sol de Cebala-Borj Touil semble avoir un potentiel génotoxique. Le transfert de ces contaminants vers les cultures occupées par ces sols, spécialement fourragères, nécessite une attention dans une crainte d'atteindre la chaîne trophique. Le test de micronoyaux à travers une exposition indirecte (à travers les lixiviats) semble être un outil rapide et fiable dans la détection de la toxicité pouvant nuire la santé humaine.

**Mots clés** : contaminants, eaux usées traitées, génotoxicité, lixiviats, long-terme.

## ABSTRACT

**Genotoxic effects of the long-term irrigation with the treated wastewater: case of Cebala-Borj Touil perimeter.**

*Objective*: The treated wastewater (TWW) reuse could be a source of contamination with a cumulative supply of toxic elements. The aim of this work is to assess the effects of such irrigation on the soils of the Cebala-Borj Touil irrigated perimeter through the *Vicia*-micronucleus test.

**Methodology and results:** The soil leachates from 3 plots receiving the TWW since 2 (P2), 4 (P4) and 10 (P10) years were used for the genotoxic study. The leachates were basic and their salinity did not exceed 2.23 dS m<sup>-1</sup>. The metal composition showed higher levels in the TWW irrigated soils compared to the control soil never irrigated (P0). The genotoxic study revealed a significant mitotic activity in the all lixiviates, micronucleus induction especially in P10, and chromosomal and nuclear aberrations appearances.

**Conclusion and application:** Despite sampling carried out in the rainy season, which is expected to leach the contaminants in depth, the surface layers (0 - 40 cm) of the studied soils seem contain contaminants with genotoxic potential. The transfer of such contaminants to the plants, especially forages, requires attention for fear of reaching trophic chain. The micronucleus test through lixiviates appears to be a fast and reliable tool in toxicity detection harming human health.

**Keywords :** contaminants, treated wastewater, genotoxicity, lixiviates, long-term.

## INTRODUCTION

Le recours aux eaux usées traitées (EUT) a été adopté, en Tunisie, au début des années 60 et il est, de plus en plus, encouragé vue la rareté des ressources en eau, leur salinité élevée et leur répartition inégale entre les régions. Aujourd'hui, 8415 ha répartis en 28 périmètres publics sont équipés pour l'irrigation par les EUT. Ces dernières, traitées au niveau secondaire et mises à la disposition de l'agriculture, sont soumises à une réglementation nationale qui, interdit l'utilisation des eaux usées brutes et qui exclues les cultures maraichères de toute irrigation avec les eaux traitées. Deux normes ont été établies fixant les paramètres physico-chimiques et biologiques des EUT destinées à l'irrigation (NT106.03) (INNORPI, 1989) et aux rejets en milieu hydrique qu'il soit maritime, public hydraulique ou à canalisations publiques (NT106.02) (JORT, 2018). La qualité de ces eaux varie en fonction de plusieurs facteurs dont l'état sanitaire de la population qui génère les eaux usées, le nombre et la nature des raccordements au réseau d'assainissement ainsi que la proportion des eaux industrielles par rapport aux eaux domestiques, la filière de traitement et l'état de fonctionnement des stations d'épuration. En 2017, le nombre de stations d'épuration a atteint 119 stations dont seulement 81 stations (68%) ont respecté les normes de point de vue qualité des eaux usées après leur traitement (ONAS, 2017). Bien qu'elles sont riches en éléments fertilisants, ces eaux sont une source de contamination avec une charge importante en sels

et en éléments traces métalliques (ETM). A long-terme, les apports cumulés de ces éléments entraineraient une salinisation des sols, une alcalinité et une réduction de leur perméabilité et une accumulation des ETM et des nutriments dans les couches de sols (FAO, 2003). Avec un lessivage de ces sols et un entrainement des éléments potentiellement toxiques et des nutriments en profondeur, les conséquences sur les eaux souterraines sont non négligeables.

Le suivi des périmètres irrigués recevant des EUT s'est, principalement, reposé sur des analyses physicochimiques. Dans ce cadre, plusieurs travaux tunisiens se sont intéressés aux effets à long-terme de l'irrigation par des effluents secondaires sur le sol et la nappe. Certains de ces travaux se sont focalisés sur l'évolution des profils salins et métalliques dans les différentes couches de sol et le passage de ces contaminants vers la nappe (Klay *et al.*, 2010; Kallel *et al.*, 2012; Dahmouni *et al.*, 2017, 2018), la présence, dans le sol, des traces des xénobiotiques organiques (Mahjoub *et al.*, 2009) et des polluants organiques (Haddaoui *et al.*, 2016). D'autres travaux ont visé les communautés bactériennes et fongiques des sols (Hidri *et al.*, 2010) et le risque d'une éventuelle contamination par la charge bactérienne/parasitaire contenue dans les EUT (Hentati *et al.*, 2014). Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à évaluer le risque réel d'une irrigation à long-terme par des EUT sur l'intégrité structurelle de l'ADN à travers un test de

génotoxicité. De ce fait, une évaluation, première, des effets d'une telle irrigation sur *Vicia faba*, via le test de micronoyaux, a été entamée dans le périmètre irrigué, Cebala-Borj Touil : le plus grand et ancien périmètre recevant des EUT en Tunisie.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

**Description de la zone d'étude et échantillonnage :** Notre étude a concerné des parcelles irriguées par des EUT appartenant au périmètre irrigué Cebala-Borj Touil (Figure 1). C'est le plus grand périmètre irrigué par les EUT en Tunisie, couvrant, environ, 3145 ha. Ce périmètre est alimenté à partir des EUT produites par les trois stations d'épuration de Charguia, Choutrana I et Côtière Nord. Les EUT de ces trois stations

L'échantillonnage a suivi une période de pluie dans un objectif d'évaluer le degré de contamination du sol à travers son pouvoir génotoxique même après un lessivage de ses contaminants en profondeur.

d'épuration sont évacuées par une chaîne de transfert, formée du Canal El Khalij et l'Oued El Khalij vers la mer. Une station de pompage prélève les EUT du Canal El Khalij et les refoule vers le bassin de régulation. Ce bassin assure l'alimentation des agriculteurs en eaux épurées nécessaires à l'irrigation (Ben Brahim-Neji et al., 2014).

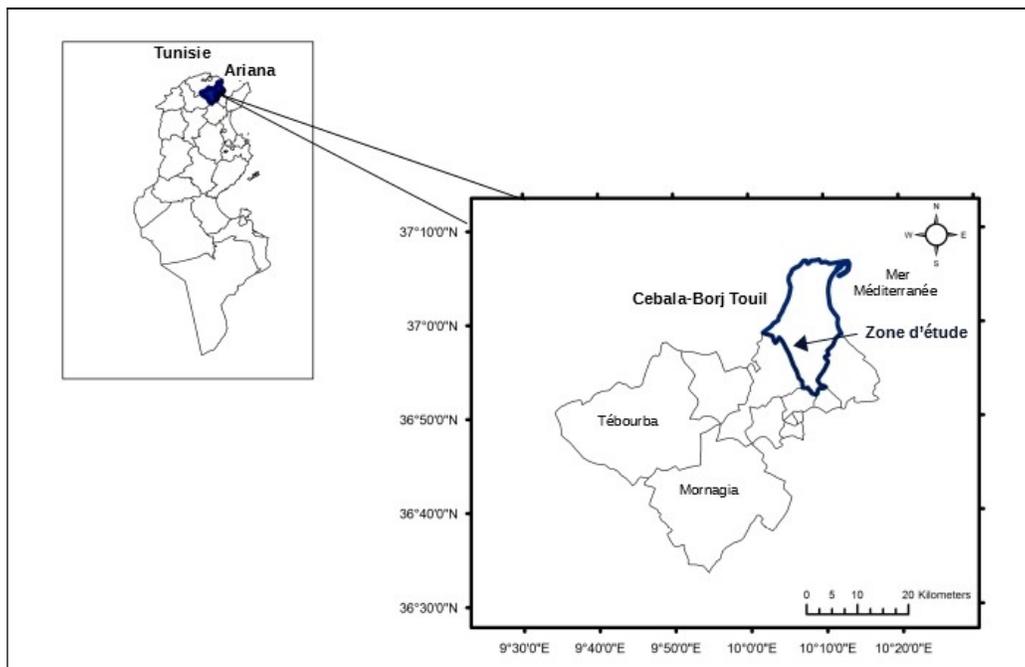


Figure 1. Localisation de la zone d'étude

Les EUT irrigant le périmètre Cebala-Borj Touil est de pH basique (7,7 - 8,2) et de salinité variable entre 3,70 et 5,30 dS m<sup>-1</sup>, respectant, ainsi, la norme tunisienne de la réutilisation des EUT à des fins agricoles (NT106.03). Cette dernière a été, également, respectée pour la composition en éléments métalliques (Cd, Co, Cr Cu, Fe, Mn, Ni, Pb et Zn) (résultats non présentés). L'échantillonnage de sol a été effectué pendant la période pluvieuse (février 2017) et a concerné 3 parcelles du périmètre irrigué Cebala-Borj Touil. Les parcelles choisies, à sol limono-argileux, sont soumises

à différentes durées d'irrigation : la parcelle P2 a reçu des EUT depuis 2 ans pour l'irrigation, goutte à goutte, des jeunes plants d'oliviers. La parcelle P4 est couverte du gazon soumis à une irrigation par aspersion, depuis 4 ans. P10 a reçu des EUT depuis 10 ans et elle est occupée par une culture fourragère, le bersim, irriguée gravitairement. Ajouté aux 3 parcelles d'études, un sol limono-argileux d'une parcelle ne faisant pas partie du périmètre d'étude, jamais irriguée par des EUT ou cultivée, a servi comme un sol témoin (P0). Les échantillons de sols ont été prélevés de la couche

superficielle (0 - 40 cm) à l'aide d'une tarière en raison de 3 répétitions par parcelle. Ils ont été séchés à l'air libre, broyés et tamisés à 2 mm. Les 3 échantillons de sols de la même parcelle ont été mélangés ensemble pour former un échantillon composite. En total, 4 échantillons composites ont été obtenus. 6 kg de chacun d'eux ont été mélangés avec de l'eau distillée en raison de 1 l d'eau pour 1 kg de sol (1 m/1 v). Après 8 h d'agitation rotative (120 rpm), les échantillons ont été centrifugés à 3500 rpm pendant 10 min. Les surnageants ont été récupérés et filtrés. Les lixiviats obtenus ont fait l'objet d'une analyse physico-chimique et ont servi au traitement des graines de fève.

**Analyses sur les lixiviats :** Le pH et la conductivité électrique (CE) des lixiviats ont été mesurés à l'aide d'un pH-mètre (Lutron pH-211) et un conductimètre (Cond. /TDS, AZ 8361), respectivement. Les ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> ont été dosés par spectrophotométrie de flamme (Jenway, PFP7). La quantification des ions Cl<sup>-</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a été réalisée par titrage en utilisant une solution de nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>) et l'acide chlorhydrique (HCl), respectivement. Les ions SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ont été dosés selon la méthode néphélométrique et ceux Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup> par titrage complexométrique. Les concentrations des ETM (Ni, Co, Cu Mn, Cd, Pb et Cr) ont été déterminées par spectrométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer).

**Matériel végétal et traitements :** Le matériel végétal utilisé est la fève (*Vicia faba*, variété locale Chahbi). Les graines nous ont été fournies par le Laboratoire des Légumineuses de l'Institut National de Recherches Agronomiques de Tunis (INRAT). Les graines ont été désinfectées à l'eau de Javel (10 %), lavées abondamment, puis mises dans de l'eau distillée pendant une nuit. Pour faciliter leur germination, une partie du tégument a été enlevée délicatement. La germination a eu lieu à une température de 25 ± 1°C et à l'obscurité pendant 2 - 3 jours. Atteignant une longueur racinaire de 3 cm, les graines de fève ont été transférées dans des bacs contenant 300 ml de chacun des lixiviats. Un autre traitement avec de l'hydrazide maléique (HM, 3 10<sup>-4</sup> M) a été ajouté pour l'étude génotoxique. Il s'agit d'un herbicide connu par son pouvoir génotoxique et couramment utilisé en tant

qu'un témoin positif dans le test de micronoyaux (Souguir *et al.*, 2008 ; Foltête *et al.*, 2011). Les graines traitées par les différentes solutions ont été placées à une température de 25 ± 1°C pendant 48 h.

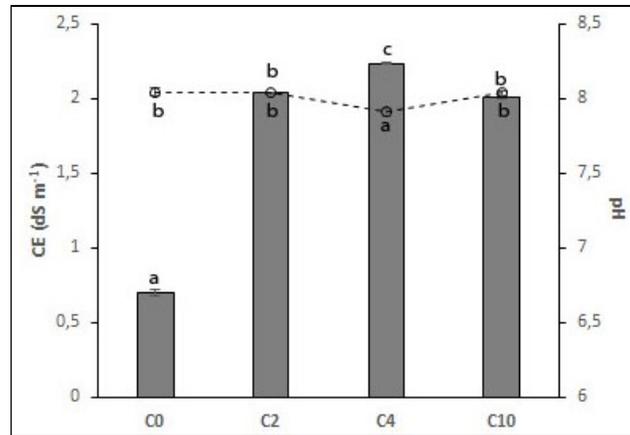
**Test de micronoyaux : Cellules en division et cellules micronucléées :** Cet essai de génotoxicité est basé sur la détection de micronoyaux dans les cellules des extrémités racinaires de *V. faba* après l'exposition aux différents traitements. Il permet, aussi, de dénombrer les cellules en division et de visualiser les altérations chromosomiques survenues dans les noyaux cellulaires. Après 48 h de traitement, les racines ont été rincées avec de l'eau distillée et transférées dans une solution de Carnoy formée d'acide acétique et d'éthanol pendant une nuit et à l'obscurité puis conservées dans l'alcool 70 %. Les extrémités racinaires hydrolysées (1N HCl) ont été étalées entre lame et lamelle. La lecture s'est effectuée sous un microscope Leica (Leica DM2500) après coloration à l'acéto-orcine 1%. Le nombre de cellules en division et celui de micronoyaux ont été notés parmi 1000 cellules comptées. Un micronoyau est considéré lorsqu'il présente les caractéristiques suivantes (Cotelle, 1999) : (i) être situé dans le cytoplasme de la cellule, entre la membrane nucléaire et la membrane cytoplasmique, (ii) ne pas être en contact avec le noyau ou bien être lié à celui-ci par une fraction de chromatine très fine, (iii) être de forme arrondie, (iv) et avoir un aspect comparable à celui du noyau après modification de la mise au point du microscope (même réfraction de la lumière). Les aberrations chromosomiques et nucléaires ont été photographiées à l'aide d'une caméra (Canon EOS 1100, Tokyo, Japan).

**Analyse statistique :** Afin de déterminer la significativité entre le contrôle (P0) et les lixiviats des sols pour les paramètres étudiés (pH, CE, compositions ionique et métallique, indice mitotique et nombre de cellules micronucléées), nous avons procédé à une analyse de la variance et à une comparaison des moyennes, à l'aide du test de Tukey à α = 5 %. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel SPSS (IBM SPSS statistics, v20).

## RÉSULTATS

**Caractérisation des lixiviats :** Le pH de tous les lixiviats est basique oscillant entre 7,90 et 8,04 (Figure 2). La salinité, mesurée par la CE, est de l'ordre de 0,67 dS m<sup>-1</sup> chez le lixiviat de sol ne recevant aucune

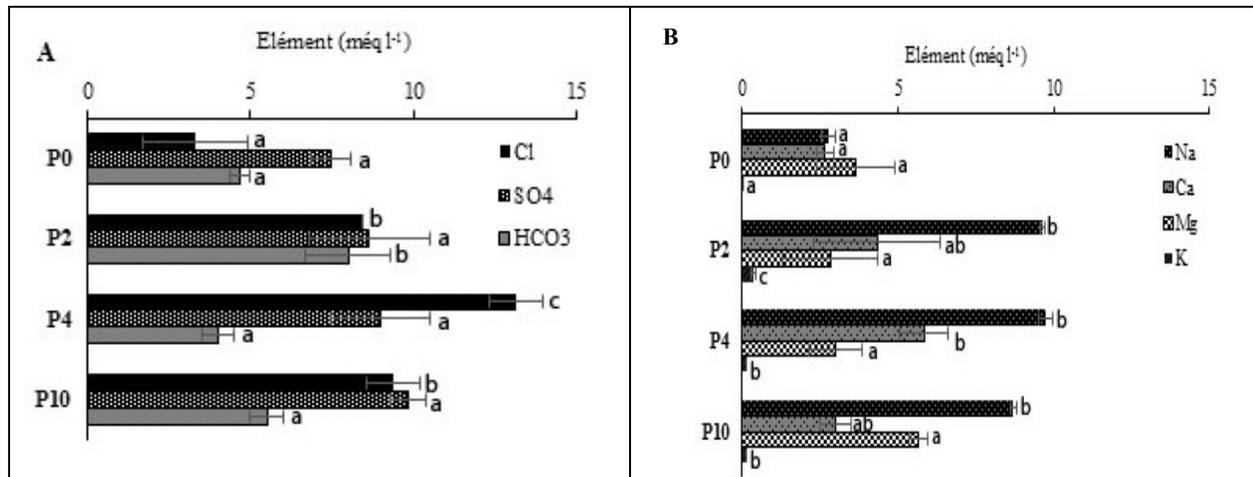
irrigation par les EUT (P0) (Figure 2). Cette salinité a augmenté chez P2, P4 et P10 soumis à des irrigations de 2, 4 et 10 ans, respectivement, sans pour autant dépasser 2,23 dS m<sup>-1</sup>.



**Figure 2.** Variation du pH moyen et de la conductivité électrique moyenne (CE) des lixiviats issus des sols irrigués par des EUT et faisant partie du périmètre irrigué Cebala-Borj Touil : P0- sol jamais irrigué ; P2- sol irrigué depuis 2 ans ; P4- sol irrigué depuis 4 ans et P10- sol irrigué depuis 10 ans. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  Ecart types. Pour chaque paramètre, les lettres différentes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  selon le test de Tukey.

La composition ionique des lixiviats de différents sols est illustrée dans la figure 3. La composition anionique est dominée par les ions Cl<sup>-</sup> (8,46 - 13,16 méq/l) et celle

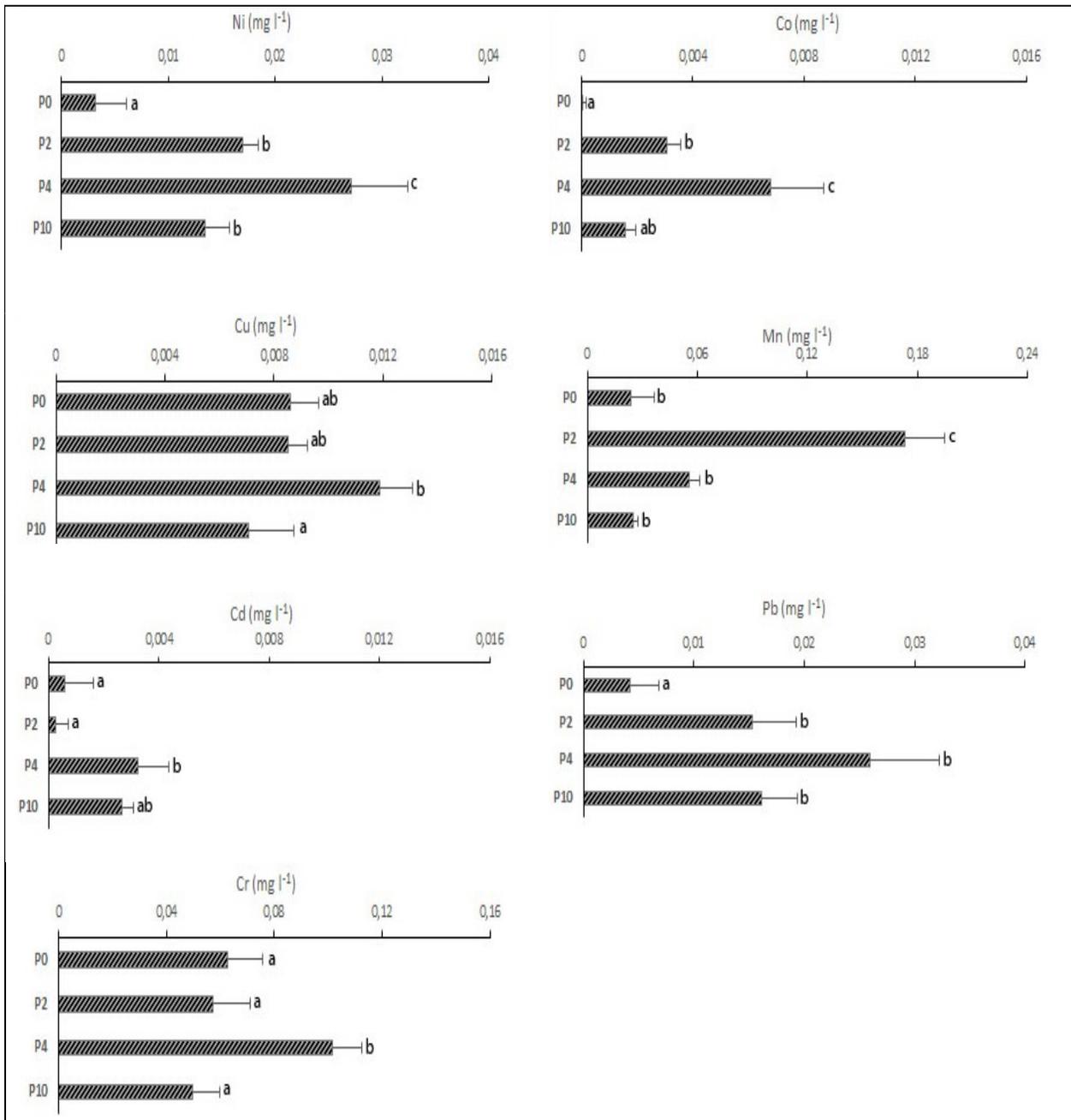
cationique est dominée par les ions Na<sup>+</sup> (8,71 - 11,90 méq/l).



**Figure 3.** Compositions anionique (A) et cationique (B) des lixiviats issus des sols irrigués par des EUT et faisant partie du périmètre irrigué Cebala-Borj Touil : P0- sol jamais irrigué ; P2- sol irrigué depuis 2 ans ; P4- sol irrigué depuis 4 ans et P10- sol irrigué depuis 10 ans. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  Ecart types. Pour chaque élément, les lettres différentes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  selon le test de Turkey.

Quant aux teneurs en ETM (Figure 4), ils ont signalé des hausses dans les lixiviats issus des sols irrigués comparé au sol considéré comme témoin. En effet, dans ce dernier (P0), les teneurs en éléments essentiels sont de 0,0032 mg l<sup>-1</sup> pour le Ni, trop faible pour le Co, 0,0086 mg l<sup>-1</sup> pour le Cu et 0,023 mg l<sup>-1</sup> pour le Mn. Les teneurs en Cd sont insignifiantes, celles de Pb sont de 0,0042 mg l<sup>-1</sup>, alors que les concentrations de Cr n'ont pas excédé 0,062 mg l<sup>-1</sup>. Les hausses signalées chez les lixiviats subissant une

irrigation avec des EUT ont marqué tous les éléments étudiés. Les augmentations les plus importantes ont caractérisé le lixiviat P4 issu de sol irrigué par les EUT depuis 4 ans (excepté le Mn). Dans ce lixiviat, les éléments non essentiels (Cd, Pb et Cr) sont les plus concernés par ces augmentations. Le Cd et le Pb ont enregistré des hausses de 5 à 6 fois plus importantes que celle détectées chez le contrôle. Le Cr est 1,5 fois plus prononcé que la teneur contenue dans le sol jamais irrigué.



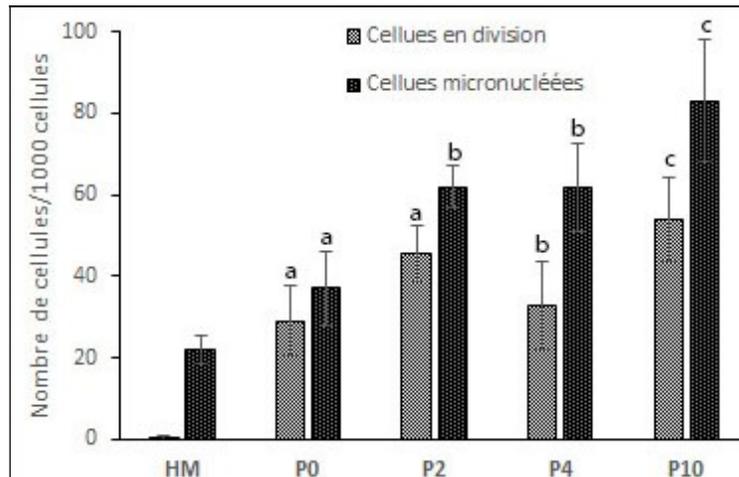
**Figure 4.** Teneurs en éléments traces métalliques dans les lixiviats issus des sols irrigués par des EUT et faisant partie du périmètre irrigué Cebala-Borj Touil : P0- sol jamais irrigué ; P2- sol irrigué depuis 2 ans ; P4- sol irrigué depuis 4 ans et P10- sol irrigué depuis 10 ans. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  Ecart types. Pour chaque élément, les lettres différentes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  selon le test de Tukey.

**Potentiel génotoxique :** Le nombre des cellules en division et celui des cellules supportant un micronoyau sont déterminés parmi 1000 cellules. Les résultats de comptage sont présentés dans la figure 5. Ajouté aux lixiviats, le HM a servi comme témoin positif pour l'analyse génotoxique. Cet herbicide a induit un arrêt de

la division cellulaire à travers un nombre très faible de cellules aux différentes phases mitotiques ( $< 1$  phase cellulaire/1000 cellules). Le nombre de cellules en division est important chez P0, le lixiviat témoin, et a surpassé 30 phases mitotiques/1000 cellules comptées. Une telle abondance a été, aussi, observée

chez les lixiviats P2, P4 et P10 (32 - 45 cellules/1000 cellules comptées). Concernant les micronoyaux, leur nombre est de 38 micronoyaux/1000 cellules chez le sol témoin, un nombre plus élevé que celui provoqué par le HM (22 micronoyaux/1000 cellules). Les Lixiviats P2, P4 et P10 ont induit une formation significative des

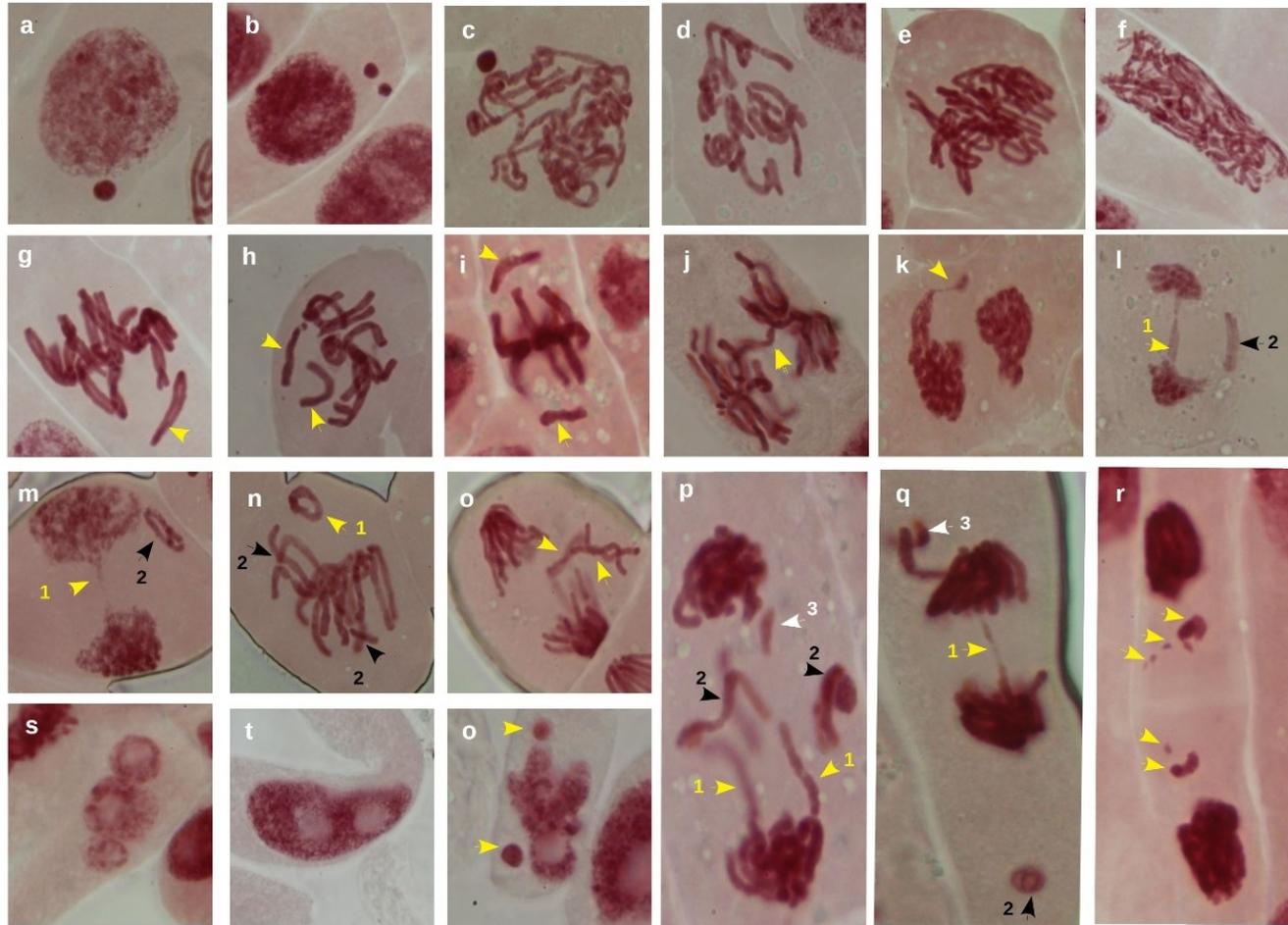
micronoyaux comparée à P0. Le lixiviat P10, issu du sol irrigué pendant 10 ans par des EUT, est le sujet de l'induction la plus prononcée de ces entités nucléaires où les cellules interphasiques supportant un micronoyau ont dépassé 83 cellules/1000 cellules.



**Figure 5.** Nombre moyen des cellules en division et des micronoyaux parmi 1000 cellules comptées chez les racines de *V. faba* soumises, pendant 48 h, à l'hydrazide maléique (HM) et aux différents lixiviats issus des sols irrigués par des EUT et faisant partie du périmètre irrigué Cebala-BorjTouil : P0- sol jamais irrigué ; P2- sol irrigué depuis 2 ans ; P4- sol irrigué depuis 4 ans et P10- sol irrigué depuis 10 ans. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  Ecart types. Pour chaque paramètre, les lettres différentes indiquent une différence significative à  $p < 0,05$  selon le test de Turkey.

Les aberrations chromosomiques et nucléaires fréquemment observées dans les préparations microscopiques sont illustrées dans la figure 6. En plus des micronoyaux, les cellules en division ont décrit des anomalies clastogéniques et aneugéniques. Les aberrations clastogéniques sont, majoritairement, représentées par des ponts anaphasiques, des

anneaux et des fragments de chromosomes. Celles aneugéniques ont inclus la perte d'un ou plusieurs chromosomes en méta-anaphase et/ou la perte d'une chromatide suite à une mauvaise migration en anaphase. Les bourgeons nucléaires, les noyaux bivacuolés et lobulés sont les principales anomalies touchant les noyaux cellulaires de *V. faba*.



**Figure 6.** Aberrations chromosomiques et nucléaires détectées dans les racines de *V. faba* soumises aux lixiviats des sols irrigués par des EUT et faisant partie du périmètre irrigué Cebala-Borj Touil. **Aberrations chromosomiques :** **a-** cellule avec un micronoyau ; **b-** cellule avec deux micronoyaux ; **c-** micronoyau en prophase ; **d-e-f-** chromatine collante ; **g-** perte d'un chromosome en métaphase ; **h-i-** perte de deux chromosomes en métaphase ; **j-** pont anaphasique ; **k-** rupture du pont anaphasique ; **l-** pont anaphasique (1) et perte d'une chromatide (2) ; **m-** rupture du pont anaphasique (1) et anneau (2) ; **n-** anneau (1) et perte de deux chromosomes en métaphase (2) ; **o-** perte d'un chromosome en anaphase ; **p-** ruptures de deux ponts (1), perte de deux chromosomes (2) et fragment chromosomique (3) en anaphase ; **q-** rupture d'un pont (1), micronoyau (2) et perte d'un chromosome (3) en anaphase ; **r-** fragments. **Aberrations nucléaires :** **s-** bourgeons nucléaires, **t-** noyau bivaccuolé ; **q-** noyau lobulé avec deux micronoyaux.

## DISCUSSION

L'étude de l'impact environnemental de l'irrigation à long-terme par les EUT a été portée sur le périmètre irrigué de Cebala-Borj Touil. Cette étude a nécessité de disposer, en plus des analyses chimiques, des outils biologiques permettant de mieux évaluer les effets d'une telle irrigation sur l'ADN génomique. L'évaluation s'est reposée sur *V. faba* comme outil biologique, une légumineuse facile à cultiver avec un cycle végétatif court et une rapidité et facilité de germination, en plus de longs chromosomes avec un nombre réduit (Cotelle, 1999). Cette plante a servi pour le test de micronoyau appliqué au niveau de ses extrémités racinaires dans un but d'évaluer la génotoxicité induite par des EUT suite à des irrigations à court et à long-termes. Les sols choisis ont reçu des effluents secondaires depuis 2, 4 et 10 ans par goutte à goutte (P2), aspersion (P4) et gravité (P10). Les EUT utilisées en irrigation sont basiques et de salinité variable entre 3,70 et 5,03 dS m<sup>-1</sup>. Une telle salinité est en étroite liaison avec le caractère salin des ressources en eau tunisiennes. En effet, à peine 50% des ressources en eau conventionnelles présentent une salinité inférieure à 1,5 g l<sup>-1</sup> réparties au niveau de 72% des eaux de surface, 20% des nappes profondes et 8% au niveau des nappes phréatiques. Nous avons conduit cette étude en période pluvieuse dans un objectif de mieux déceler les effets de l'irrigation avec les EUT sur les couches superficielles des sols, tout en supposant un lessivage des contaminants en profondeur et probablement vers la nappe. Bien que les EUT respectent la norme tunisienne relative à la qualité des EUT destinées à l'irrigation (NT106.03) (INNORPI, 1989), ces eaux pourraient avoir, à long-terme, un impact négatif sur le sol et la nappe, ajouté à un risque à travers la chaîne trophique. L'augmentation de la salinité est la principale menace pouvant atteindre les sols recevant des EUT. L'accumulation des sels a été signalée dans plusieurs périmètres irrigués en Tunisie, tels que celui de Sfax recevant des EUT de salinité dépassant 5 dS m<sup>-1</sup> (Kallel *et al.*, 2012), et ceux de Mornag et Zaouit Sousse irrigués par des EUT d'une salinité inférieure à 4 dS m<sup>-1</sup> (Klay *et al.*, 2010 ; Charef *et al.*, 2011). De telles irrigations combinées à une grande mobilité des ions Na<sup>+</sup> dans le profil du sol sont suggérées être les principaux facteurs de l'augmentation de la sodicité de sol entraînant la dispersion des argiles, la déstabilisation des agrégats et la perte de la perméabilité du sol (Leal *et al.*, 2009 ; Xu *et al.*, 2010). Dans notre étude, les lixiviats issus des sols irrigués par des EUT ont présenté une salinité légèrement plus

élevée que celle du sol témoin (P0). Cette salinité, dominée par des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>, est faiblement variable entre les lixiviats malgré la différence dans la durée d'irrigation (2, 4 ou 10 ans). Ceci est en étroite relation avec la période d'échantillonnage des sols qui a suivi des pluies supposées entraîner les sels et les ETM en profondeur. La mobilité, l'adsorption et la précipitation de ces derniers (ETM) dans le profil de sol sont fortement liées aux variabilités structurales et texturales des sols, leur composition et propriétés physico-chimiques (Bansal *et al.*, 1992 ; Liu *et al.*, 2005). L'entraînement des ETM vers la nappe provoquant sa contamination a été, récemment, signalée dans une étude portant sur le périmètre d'étude Cebala-Borj Touil. La contamination a été, principalement, élucidée par des dépassements de Co, Pb, Cr et Cd les concentrations requises dans la NT106.02, norme tunisienne relative aux rejets des EUT (Dahmouni *et al.* 2017 ; 2018). Malgré le lessivage, les teneurs en ETM restent élevées dans la couche superficielle du sol comparé au sol témoin (P0). Les augmentations ont concerné le Ni, le Co, le Cu, le Mn, le Cd, le Pb et le Cr, et ont, principalement, marqué le lixiviat P4. Ce lixiviat est issu d'un sol couvert du gazon et irrigué depuis 4 ans par aspersion. Ceci pourrait être expliqué, en partie, par l'insuffisance d'infiltration des eaux de pluies à travers la culture existante pour lessiver les éléments métalliques, de même les sels (la salinité la plus élevée a caractérisé P4). Le potentiel génotoxique, évalué par le test de micronoyaux, de différents sols étudiés a été établi à travers leurs lixiviats. Les résultats ont révélé une activité mitotique chez le sol non irrigué et ceux soumis à 2, 4 et 10 ans d'irrigation avec des EUT. Cette activité ne semble pas être affectée par les différents contaminants contenus dans les lixiviats contrairement aux micronoyaux, dont l'induction est plus sensible et a marqué tous les traitements. La présence la plus importante de ces entités nucléaires (83 cellules micronuclées/1000 cellules comptées) a été signalée chez P10, sol soumis à la plus longue durée d'irrigation (10 ans) par les EUT. La génotoxicité des lixiviats a été, également, marquée par des anomalies au niveau des chromosomes et du noyau cellulaire. Ces anomalies, clastogéniques et aneugéniques sont issues d'une atteinte de la structure des chromosomes et/ou du fonctionnement de fuseau mitotique. Elles sont présentées sous forme de ponts anaphasiques, des anneaux, des fragments chromosomiques et des chromosomes/chromatides perdus lors de la métaphase. Quant aux altérations nucléaires, elles se

sont manifestées par des bourgeonnements, des bivaccualations et des lobulations du noyau principal. L'atteinte de l'ADN suite à l'exposition aux différents lixivats semble être le résultat des effets directs ou indirects des contaminants contenus dans les lixivats et/ou des interactions entre eux. Ces contaminants, malgré leurs faibles teneurs, ont engendré des signes génotoxiques. De tels signes ont été observés dans plusieurs travaux sous stress salin ou métallique. Le caractère génotoxique attribué à la salinité a été, récemment, signalé dans les travaux de Teerarak *et al.* (2009) et Souguir *et al.* (2018), testant les effets de de 13 et 25 dS m<sup>-1</sup> de NaCl sur les graines d'*Allium cepa* et *V. faba*. La baisse du nombre de cellules en division, la forte induction de micronoyaux et l'apparition des anomalies chromosomiques et nucléaires ont suivi l'exposition à ce type de stress. L'atteinte du génome, en présence de NaCl, a été, aussi, observée dans les travaux de Teerarak *et al.* (2009) chez *Allium cepa* suite à 48 h d'exposition à une salinité plus faible (~ 3,31 dS m<sup>-1</sup>) et proche de celles observée dans les lixivats. Concernant les métaux, certains d'entre eux (Ni, Co, Cu et Mn) sont essentiels à la croissance et au développement de la plante à des concentrations appropriées. A des teneurs élevées, ils pourraient altérer l'ADN et causer des anomalies génomiques. Le Ni se trouve dans tous les types de sols de diverses zones climatiques du globe. La marge recommandée de cet élément dans le sol est de 30 à 75 mg kg<sup>-1</sup> (Directive 86/278/ CEE, 1986). Son pouvoir génotoxique a été testé à travers une exposition de 15 jours à un sol amendé par 25, 50 et 100 mg kg<sup>-1</sup> de Ni et les résultats ont montré une absence des tous signes génotoxiques (Citterio *et al.*, 2002). Cependant, la génotoxicité des nanoparticules d'oxide de nickel (NiO-NPs), a été prouvée chez *Allium cepa* (Manna et Bandyopadhyay, 2017). Chez les mammifères, la génotoxicité de Ni a été aussi discutée par Stannard *et al.* (2017) suite à la classification de NiCl<sub>2</sub> en tant qu'un « carcinogène non-génotoxique », sans effets directs sur l'ADN et sur le nombre et la structure des chromosomes. Sa cancérogénicité a été, plutôt, attribuée aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites sous ce stress métallique. Quant au Co, son effet mitodépresseur et sa capacité d'induire des anomalies chromosomiques et des cassures simples brins ont été décrits dans les travaux de Yildiz *et al.* (2009). La génotoxicité de Cu a été évalué par le test de micronoyaux et de comète chez *V. faba*, *Pisum sativum* (Souguir *et al.*, 2008; Marcato-Romain *et al.*, 2009) et *Allium cepa* (Yildiz *et al.*, 2009). Cet élément, dont les

teneurs limites dans le sol sont comprises entre 50 et 140 mg kg<sup>-1</sup> (Directive 86/278/CEE, 1986) a été dépourvu de ce caractère génotoxique dans des travaux antérieurs de Steinkellner *et al.* (1998) menés sur *V. faba*, *Allium cepa* et *tradescantia*. Pour le Mn, les concentrations moyennes peuvent atteindre 1000 mg kg<sup>-1</sup> dans le sol (Adriano, 2001 ; Pendias, 2000). Les études menées sur ce métal du point de vue potentiel génotoxique ont été, principalement, conduites sur des bactéries et des lymphocytes humains. Cette génotoxicité a été observée en présence de 25 µM de Mn chez des cultures lymphocytaires et 0,05 M chez les bactéries (Lima *et al.* 2011). Le Cd, le Pb et le Cr sont non-essentiels pour la plante et leur présence dans le sol, même à des faibles doses, peut nuire les plantes et la santé humaine. Dans les lixivats, ces 3 éléments sont les plus concernés par l'augmentation de leurs teneurs comparés au sol témoin. En général, les concentrations moyennes dans le sol varient entre 0,05 et 1 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cd, 10 et 30 mg kg<sup>-1</sup> pour le Pb et 10 et 50 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cr (Adriano, 2001 ; Pendias, 2000). La Directive 86/278/CEE (1986) a fixé des concentrations maximales de Cd (1 à 3 mg kg<sup>-1</sup>) et de Pb (50 à 300 mg kg<sup>-1</sup>) dans le sol sans tenir compte de celles de Cr. Ces trois métaux (Cd, Pb, et Cr) ont été testés pour leur potentiel génotoxique en hydroponie ou en sol enrichi. Le Cd a été, largement, étudié et son pouvoir d'induire des micronoyaux a été signalé chez plusieurs plantes (Zhang *et al.*, 2008 ; Souguir *et al.*, 2011 ; Foltête *et al.*, 2012). Cette induction est visible à partir d'une concentration de 7,5 10<sup>-2</sup> µM (Béraud *et al.*, 2007) alors que la division cellulaire est sensible à des doses plutôt élevées (à partir de 2,5 10<sup>-1</sup> µM). Une concentration de 5 µM de Pb a été, aussi, à l'origine de la formation des micronoyaux. Cette formation est directement liée à la forme libre de cet élément métallique (Shahid *et al.*, 2011). La génotoxicité de Pb est atténuée par l'utilisation de l'EDTA comme chélateur permettant de former des complexes solubles, stables et non toxiques avec les ions Pb (Shahid *et al.*, 2011). Etudiant les effets de Cr sur la croissance et la division cellulaire, Liu *et al.* (1992) ont montré une inhibition de la croissance racinaire et des irrégularités mitotiques comprenant des c-mitoses, des ponts anaphasiques, des fragmentations et un collage et un retard des chromosomes en présence d'un stress chromique. Ces effets ont été détectés à partir de 0,2 µM de nitrate de chrome et de dichromate de potassium. La génotoxicité observée dans les racines de fève pourrait avoir comme origine l'augmentation de la biodisponibilité des ions métalliques en présence de

la salinité. En effet, le NaCl a été accusé d'augmenter les concentrations de Cu, Zn et Cd dans l'extrait de sol et leur absorption par des plantes de maïs (Helal *et al.*, 2008). D'autres travaux s'intéressant à l'interaction NaCl-Cd ont bien montré une élévation de la concentration du Cd dans les organes végétatifs (Mühling et Läuchli, 2003). L'augmentation est plus importante en présence d'une salinité faible ( $9 \text{ dS m}^{-1}$ ) plutôt qu'élévée ( $18 \text{ dS m}^{-1}$ ) (Zurayk *et al.*, 2001) et elle résulte de la diminution de la sorption du Cd sur les particules d'argiles et la formation concomitante d'un complexe mobile  $\text{CdCl}^+$  (Garcia-Miragaya et Page, 1976 ; Bingham *et al.*, 1984). Une étude menée par Acosta *et al.* (2001) sur les effets de la salinité, induite par  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ , NaCl et  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , sur la mobilité de 4 métaux lourds (Cu, Cd, Pb et Zn) a révélé que les principaux mécanismes régulant la mobilité de ces métaux sont : la compétition avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$  pour les sites de sorption, la chloro-complexation, la complexation avec les sulfates et la compétition avec ions  $\text{Mg}^{2+}$  et/ou  $\text{Ca}^{2+}$ . La génotoxicité pourrait être issue d'autres contaminants contenus dans les EUT et non caractérisés dans ce présent travail. Dans ce sens, le transfert des xénobiotiques actives des effluents secondaires vers le sol et leur persistance relative dans le périmètre irrigué d'Oued Souhil (Nabeul-Tunisie) ont été démontrés, précédemment. Dans le même périmètre, des accumulations des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des pesticides organochlorés, dont 94% représenté par le DDT, ont

été détectées dans les couches superficielles de sol (0 - 20 cm) avant et à la fin de cycle d'irrigation par des EUT. Les HAP et le DDT sont connus pour leur capacité d'altérer l'ADN. En effet, plusieurs travaux réalisés sur des plantes et des cultures cellulaires humaines ont montré des effets génotoxiques et cytotoxiques des HAP et DDT à travers une installation d'un stress oxydatif, une augmentation des échanges des chromatides sœurs et une formation des micronoyaux et des aberrations chromosomiques (Lal et Saxena, 1980 ; Canales-Aguirre *et al.*, 2011 ; Genies *et al.*, 2004 ; Turkez *et al.*, 2014). Bien que l'échantillonnage se soit déroulé pendant la période pluvieuse, supposée lessiver les contaminants en profondeur, le sol de Cebala-Borj Touil semble avoir un potentiel génotoxique. En effet, les lixiviats issus des sols étudiés contiennent des contaminants, qui malgré leurs teneurs faibles, ont entraîné une diminution du nombre des phases mitotiques et une induction des micronoyaux et des anomalies chromosomiques et nucléaires. Les signes génotoxiques observés pourraient résulter des effets directs ou indirects de ces contaminants sur l'ADN et/ou des interactions entre eux. Leur transfert vers les cultures occupées par ces sols, spécialement fourragères, nécessite une attention dans une crainte d'atteindre la chaîne trophique. Le test de micronoyaux semble être un outil fiable dans la détection de cette toxicité pouvant nuire la santé humaine.

## REMERCIEMENTS

Ce travail mené dans le « Laboratoire de Valorisation des Eaux Non-Conventionnelles » s'est effectué dans le cadre de la coopération tuniso-allemande «Agricultural Water Integrated Management in Arid

Environment: Science and Education (AGRI-WATER) ». Ce projet est supporté par le MESRS (Tunisie) et le BMBF (Allemagne).

## REFERENCES

- Acosta J.A., Jansen B., Kalbitz K., Faz A., Martínez-Martínez S. (2011). Salinity increases mobility of heavy metals in soils. *Chemosphere* 85:1318-1324.
- Adriano D.C., 2001. *Trace elements in terrestrial environments, bioavailability, and risks of metals*. Second edition. New York: Springer-Verlag.
- Bansal R. L., Nayyar V. K., Takkar P. N. (1992). Accumulation and bioavailability of Zn, Cu, Mn and Fe in soils polluted with industrial wastewater. *Journal of the Indian Society of Soil Science* 40:796-799.
- Ben Brahim-Neji H., Ruiz-Villaverde A., González-Gómez F. (2014). Decision aid supports for evaluating agricultural water reuse practices in Tunisia: The Cebala perimeter. *Agricultural Water Management* 143:113-121.
- Béraud E., Cotelle S., Leroy P., Féraud J. F. (2007). - Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutation Research* 633:112-116.
- Bingham F. T., Strong J. E., Sposito G. (1983). Influence of chloride salinity on cadmium

- uptake by Swiss chard. *Soil Science* 135:160-165.
- Canales-Aguirre A., Padilla-Camberos E., Gómez-Pinedo U., Salado-Ponce H., Feria-Velasco A., De Celis R. (2011). Genotoxic effect of chronic exposure to DDT on lymphocytes, oral mucosa and breast cells of female rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8:540-553.
- Charef A., Ayed L., Rim Azzouzi R. (2011). Irrigation water qualities-soil pollution (heavy metals and salinity) in mornag irrigated perimeter (SW Tunis, North Tunisia). In: *Fifteenth International Water Technology Conference, 31 March -2 April, 2011. Alexandria, Egypt*.
- Citterio S., Aina R., Labra M., Ghiani A., Fumagalli P., Sgorbati S., Santagostino A. (2002). Soil Genotoxicity Assessment: A New strategy based on biomolecular tools and plant bioindicators. *Environmental Science and Technology* 36:2748-2753.
- Cotelle S. (1999). Etude de la génotoxicité de matrices complexes à l'aide des plantes supérieures. Thèse de Doctorat : Université de Metz- U.R Écotoxicologie, Biodiversité et Santé environnementale (France).
- Dahmouni M., Hörmann G., Hachicha M. (2017). The Environmental impact of TWW on groundwater and drainage water in Tunisia. *Water Treatment* 8:1-2.
- Dahmouni M., Hörmann G., Jouzdan O., Hachicha M. (2018). Export of salt and heavy metals in an area irrigated with treated wastewater: a case study from Cebala-Borj Touil (Tunisia). *Desalination and Water Treatment* 102:61-70.
- Directive 86/278/CEE du conseil du 12 juin 1986. Protection de l'environnement et notamment des sols lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture. *Journal Officiel de la Communauté Européenne*, JO L 181/7, 7p.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003. *L'irrigation avec des eaux usées traitées, manuel d'utilisation*, 73p.
- Foltête A. S., Masfarau J. F., Féraud J. F. Cotelle S. (2012). Is there a relationship between early genotoxicity and life-history traits in *Vicia faba* exposed to cadmium-spiked soils? *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 747(2):159-163.
- Foltête A. S., Dhyèvre A., Féraud J. F. Cotelle S. (2011). - Improvement of *Vicia* micronucleus test for assessment of soil quality: A proposal for international standardization. *Chemosphere* 85:1624-1629.
- Garcia-Miragaya J., Page A. L. (1976). - Influence of ionic strength and inorganic complex formation on the sorption of trace amounts of Cd by montmorillonite. *Soil Science Society of America Journal* 40:658-663.
- Genies C., Maître A., Lefèbre E., Jullien A., Chopard-Lallier M., Douki T. (2013). The extreme variety of genotoxic response to benzo[a]pyrene in three different human cell lines from three different organs. *PloS ONE* 8(11):1-11.
- Haddaoui I., Mahjoub O., Mahjoub B., Boujelben A., Di Bella G. (2016). Occurrence and distribution of PAHs, PCBs, and chlorinated pesticides in Tunisian soil irrigated with treated wastewater. *Chemosphere* 146:195-205.
- Hentati O., Chaker S., Ahmed Wali., Ayoub T., Ksibi M. (2014). Effects of long-term irrigation with treated wastewater on soil quality, soil-borne pathogens, and living organisms: case study of the vicinity of El Hajeb (Tunisia). *Environmental Monitoring and Assessment* 186:2671-2683.
- Hidri Y., Bouziri L., Maron P. A., Anane M., Jedidi N., Hassan A., Ranjard L. (2010). - Soil DNA evidence for altered microbial diversity after long-term application of municipal wastewater. *Agronomy for Sustainable Development* 30:423-431.
- INNORPI, Institut National de la Normalisation et de la Propriété Industrielle (1989). Protection de l'environnement - Utilisation des eaux usées traitées à des fins agricoles, Spécifications physico-chimiques et biologiques, NT 106.03, 2p.
- JORT, Journal Officiel de la République Tunisienne (2018). Arrêté du ministre des affaires locales et de l'environnement et du ministre de l'industrie et des petites et moyennes entreprises du 26 mars 2018, fixant les valeurs limites des rejets d'effluents dans le milieu récepteur, NT106.02 : 822 - 837.
- Kallel M., Belaid N., Ayoub T., Ayadi A., Ksibi A. 2012. Effects of Treated Wastewater Irrigation on Soil Salinity and Sodicity at El Hajeb Region

- (Sfax-Tunisia). Journal of Arid Land Studies 22(1):65-68.
- Klay S., Charef A., Ayed L., Houman B., Rezgui F. (2010). Effect of irrigation with treated wastewater on geochemical properties (saltiness, C, N and heavy metals) of isohumic soils (Zaouit Sousse perimeter, Oriental Tunisia). Desalination 253:180-187.
- Lal R., Saxena D. M. (1980). - Effect of DDT on cell population growth, cell division, and DNA synthesis in *Stylonychia notophora* (Stokes). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 9(2):163-170.
- Leal R. M. P., Herpin U., da Fonseca A. F., Firme L. P., Montes C. R., Melfi A. J. (2009). - Sodidity and salinity in a Brazilian Oxisol cultivated with sugarcane irrigated with wastewater. Agricultural Water Management 96:307-316.
- Lima P. D. L., Vasconcellos M. C., Montenegro R. C., Bahia M. O., Costa E. T., Antunes L. M. G., Burbano R. R. (2011). Genotoxic effects of aluminum, iron and manganese in human cells and experimental systems: A review of the literature. Human and Experimental Toxicology 30(10):1435-1444.
- Liu D., Jiang W., Li M. (1992). Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. Hereditas 11(7):23-29.
- Liu W. H., Zhao J. Z., Ouyang Z.Y., Söderlund L., Liu G. H. (2005). Impact of sewage irrigation on heavy metals distribution and contamination in Beijing, China. Environment International 31(6):805-812.
- Mahjoub O., Leclercq M., Bachelot M., Casellas C., Escande A., Balaguer P., Bahri A., Gomez E., Fenet H. (2009). Estrogen, aryl hydrocarbon and pregnane X receptors activities in reclaimed water and irrigated soils in Oued Souhil area (Nabeul, Tunisia). Desalination 248:104-113.
- Manna I., Bandyopadhyay M. (2017). Engineered nickel oxide nanoparticles affect genome stability in *Allium cepa* (L.). Plant Physiology and Biochemistry 121:206-215.
- Marcato-Romain C., Pinelli E., Pourrut B., Silvestre J., Guisresse M. (2009). Assessment of the genotoxicity of Cu and Zn in raw and anaerobically digested slurry with the *Vicia faba* micronucleus test. Mutation Research 672:113-118.
- ONAS, Office National d'Assainissement, 2017. Rapport annuel, 34p.
- Pendias A. 2000. Trace elements in soils and plants. Third edition. London: CRC Press.
- Shahid M., Pinelli E., Pourrut B., Silvestre J., Dumat C. (2011). Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. Ecotoxicology and Environmental Safety 74:78-84.
- Souguir D., Abd-Alla H. I., Hörmann G., Hachicha M. (2018). Chromosomal and nuclear alterations in the root-tip cells of *Vicia faba* induced by sodium chloride. Water Environment Research 90(2):164-171.
- Souguir D., Ferjani E., Goupil P., Ledoigt G. (2011). Sequential effects of cadmium on genotoxicity and lipoperoxidation in *Vicia faba* roots. Ecotoxicology, 20:329-336.
- Souguir D., Ferjani E., Goupil P., Ledoigt G. (2008). Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper- induced genotoxicity. Protoplasma, 233:203-207.
- Stannard L., Doak S. H., Doherty A., Jenkin G. J. (2017). Is Nickel Chloride really a Non-Genotoxic Carcinogen?. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 121:10-15.
- Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma C., Ecker S., Ma T., Horak O., Kundi M., Knasmüller S. (1998). Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. Environmental and Molecular Mutagenesis 31:183-191.
- Teerarak M., Bhinija K., Thitavasanta S., Laosinwattana C. (2009). The impact of sodium chloride on root growth, cell division, and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in root tip cells of *Allium cepa* L. Scientia Horticulturae 121:228-232.
- Turkez H., Yousef M. I., Sönmez E., Togar B., Bakan F., Sozio P., Stefano A. D. (2014). Evaluation of cytotoxic, oxidative stress and genotoxic responses of hydroxyapatite nanoparticles on human blood cells. Journal of Applied Toxicology 34(4):373-379.
- Xu J., Wu L., Chang A. C., Zhang Y. (2010). Impact of long-term reclaimed wastewater irrigation on agricultural soils: A preliminary assessment. Journal of Hazardous Materials 183:780-786.
- Yildiz M., Cigerci I. H., Konuk M., Fidan A. F., Terzi H. (2009). - Determination of genotoxic effects of

- copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere 75:934-938.
- Zhang S., Zhang H., Qin R., Jiang W., Liu D. (2009). - Cadmium induction of lipid peroxidation and effects on root tip cells and antioxidant enzyme activities in *Vicia faba* L. Ecotoxicology 18:814-823.
- Zurayk R. A., Khoury N. F., Talhouk S. N., Baalbaki R. Z. (2001). Salinity-heavy metal interactions in four salt-tolerant plant species. Journal of Plant Nutrition 24(11):1773-1786.