

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945-GUELMA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et
de l'Univers

Laboratoire de Biologie, Eau et Environnement

Département d'Ecologie et Génie de l'Environnement



THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat 3^{ème} cycle en Sciences Biologiques

Option : Santé, Eau et Environnement

Etude physico-chimique et microbiologique des eaux usées et évaluation du traitement d'épuration

Présentée par :

TABET Mouna

Devant le jury :

Présidente :	D. BENDJEDOU	Prof	Université de Guelma
Directeur de thèse :	D. E. BENOURETH	Prof	Université de Guelma
Examineur :	A. G. DJAHOUDI	Prof	Université d'Annaba
Examinatrice:	D. GACEMI-KIRANE	Prof	Université d'Annaba
Examinatrice :	L. KARA-CHAOUI	Prof	Université d'Annaba
Examinatrice :	L. SOUIKI	M.C.A	Université de Guelma

Année Universitaire : 2014/2015

DEDICACES

A mes très chers parents

Aucune dédicace aussi parfaite et douce soit-elle, ne saurait exprimer toute ma reconnaissance et tout l'amour que je vous porte. Ce travail représente le fruit de votre soutien, vos sacrifices, et vos encouragements. Jamais il n'aurait vu le jour sans les conseils que vous avez consentis pour mon éducation. Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de santé et de bonheur ;

Je dédie ce travail

A mes très chères soeurs : Souhila, Sabrina, Lamia et Sara

A mes très chers frères : Kamel et Abdelhak

A mon cher frère Ahmed pour son extrême serviabilité et compréhension

A mes belles soeurs

Aux anges de ma maison : mes nièces et mes neveux

A mon oncle SENADELA Toufik et sa femme Wahida

A ma chère amie MOUMENE Sara

A tous ceux qui me sont chers

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon Directeur de thèse, le Professeur D. E. BENOVARÉTH, qui a dirigé ce travail, ça ne sera jamais suffisant pour lui exprimer ma grande reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée pour faire avancer ce travail, pour sa patience, sa gentillesse, et son esprit responsable, critique et rigoureux,

Je tiens à remercier Mme D. BENDJEDOU pour avoir accepté de présider le Jury de ma thèse. Je remercie vivement Mr A.G. Jahoudi, Mme D. GACEMI-KIRANE, Mme L. Kara-Chaoui et Mme L. Souikj de bien vouloir accepter de juger mon travail.

Je tiens à remercier Mr KONUK Muhsin, Mr LIMAN Recep et Mr TAHAR Ali pour leur extrême aide dans l'analyse statistiques des résultats obtenus durant cette étude et dans la rédaction de l'article.

Je remercie ma collègue ABDA Ahlem pour son aide au cours de toute la période de mon travail de thèse.

Merci à Mme KHALLEF Messaouda, pour son aide au cours de la réalisation de la partie pratique de ma thèse.

Je remercie également Mr HOUHAMD Moussa, responsable du laboratoire de recherche Biologie, Eau et Environnement pour son aide et serviabilité, je remercie infiniment Mlle ABBAS Leila pour son extrême aide.

Je remercie également les personnes qui ont gravité autour de ce travail :

Messieurs BOUJAHÉM Faycel et KEBIECHE Hacene

Responsables de la station d'épuration des eaux usées de la ville de Guelma et de la direction de la santé respectivement, je vous dois le meilleur accueil que vous m'avez réservé dans vos laboratoires, et la mise à ma disposition tous les moyens pour me permettre de réaliser mes recherches dans les meilleures conditions. Vous m'avez tant aidé et supporté au moment où j'en avais le plus besoin. Aucun mot ne pourrait exprimer mes remerciements et ma vive gratitude, et que le présent

travail soit un faible témoignage de ma très haute reconnaissance et mon profond respect. Merci pour tout.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de la station d'épuration des eaux usées de la ville de Guelma, de la direction de santé et de l'Université 08 Mai 1945, Guelma.

Je remercie très sincèrement Mr HILALI Abd Erraouf, professeur de la faculté des Sciences et Techniques de Settat qui m'a reçu au cours d'un stage effectué à l'Université de Hassan II, Maroc.

Merci à Monsieur BOUJAHM Hocine, pour son extrême serviabilité et son aide, aux messieurs HENAD Salim, RAHIMI Hamza, BENDJAZIA Amar, CHAHAT ISMAÏN, MEFTI Rabie, BOUCHIBRIN Walid,

Je remercie tous mes collègues et ami(e)s de près ou de loin, particulièrement, GUERROUI Yacine et BENSOUILH Taqi Eddine pour leur extrême serviabilité et leur aide, TALBI Ismahen pour son soutien moral, LAYADA Samiha, MOUMENE Meriem, BERGAL Amira et BOUGUENOUN Imen
A toutes les personnes citées et les autres que j'aurais pu oublier, MERCI !!!

Sommaire

Introduction	1
Partie bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur les eaux usées	
1. Définition d'une eau usée	3
2. Origine des eaux usées	3
2.1. Les eaux usées domestiques	3
2.2. Les eaux usées industrielles	4
2.3. Les eaux agricoles	5
2.4. Les eaux pluviales	5
3. Composition des eaux usées	5
3.1. Microorganismes	5
3.1.1. Les virus	6
3.1.2. Les bactéries	6
3.1.3. Les champignons	6
3.1.4. Les protozoaires	8
3.1.5. Les helminthes	8
3.2. Les éléments traces	9
3.2.1. Les métaux lourds	10
3.2.2. Eléments toxiques organiques	10
3.3. Substances nutritives	10
4. Caractéristiques des eaux usées	11
4.1. Les paramètres physicochimiques	11
4.1.1. La température	11
4.1.2. Le potentiel d'Hydrogène (pH)	11
4.1.3. La turbidité	11
4.1.4. Les matières en suspension	12
4.1.5. La conductivité électrique	12
4.1.6. La demande biologique en oxygène (DBO ₅)	12
4.1.7. La demande chimique en oxygène (DCO)	12
4.1.8. La biodégradabilité	13
5. Procédés du traitement des eaux usées	13
5.1. Procédés de désinfections	15
5.1.1. Les traitements chimiques de désinfection	15
5.1.2. Les traitements physiques de désinfection par les ultraviolets	15
Chapitre II : Réutilisation des eaux usées épurées	
1. La réutilisation des eaux usées épurées	17
1.1. Bilan mondial	17

1.2.Réutilisation des eaux usées traitées en Algérie	18
1.2.1. La réutilisation indirecte	18
1.2.2. La réutilisation directe	18
1.3. Avantages de la réutilisation des eaux usées épurées	18
1.4.Risques liés à la réutilisation des eaux usées	19
1.4.1. Risque microbiologique	19
1.4.2. Risque chimique	20
1.4.2.1. Métaux lourds	20
1.4.2.2. Micropolluants organiques	21
1.4.3. Risque environnemental	21
1.5. Les différentes réglementations dans le monde	22
1.5.1. Les recommandations de l'OMS	22
1.5.2. Les recommandations de l'USEPA	23
1.5.3. Directives de la FAO	24

Chapitre III : Tests de génotoxicité

1. Tests de génotoxicité et de mutagénicité	26
1.1.Test d'Ames	27
1.1.1. Protocole expérimental	28
1.1.2. Avantages et inconvénients	29
1.2.Test des aberrations chromosomiques dans les racines	31
1.2.1. Test des aberrations chromosomiques dans les racines d' <i>Allium cepa</i>	31
1.2.1.1. Présentation générale d' <i>Allium</i>	31
1.2.1.2. Les critères de génotoxicité déterminés sur <i>Allium cepa</i>	31
1.2.1.3. Avantages de l'utilisation de la plante <i>Allium cepa</i> dans les tests de génotoxicité	32
1.3.Test des micronoyaux	32
1.3.1. Mécanisme de formation des micronoyaux	33
1.3.2. Principe du test des micronoyaux	34
1.3.3. Avantages et Inconvénients	34

Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes

1. Description de la station d'épuration des eaux usées de la ville de Guelma	36
1.1. Localisation	36
1.2. Etapes du traitement d'épuration	36
1.2.1. Prétraitement	37
1.2.1.1. Dégrillage	37
1.2.1.2. Dessablage	37

1.2.1.3. Dégraissage-Déshuilage	37
1.2.2. Le traitement primaire (décantation primaire)	38
1.2.3. Traitement secondaire (biologique)	39
1.2.4. Décantation secondaire	39
1.2.5. Désinfection	40
2. Modalités de Prélèvement	40
3. Méthodes analytiques	42
3.1. Méthodes d'analyses physicochimiques et microbiologiques	42
3.1.1. Paramètres physicochimiques	42
3.1.1.1. Paramètres in situ	42
3.1.1.2. Mesure de la demande chimique en oxygène	42
3.1.1.3. Mesure de la demande biologique en oxygène	42
3.1.1.4. Mesure des matières en suspension	42
3.1.1.5. Dosage des Orthophosphates	42
3.1.1.6. Dosage des nitrates (NO_3^-)	43
3.1.1.7. Dosage de nitrites (NO_2^-)	43
3.1.1.8. Dosage de l'ammonium (NH_4^+)	43
3.1.1.9. Dosage des métaux lourds	43
a. Principe de fonctionnement de l'ICP-MS	43
b. Préparation des échantillons, des solutions étalons et des blancs pour les éléments traces	44
3.1.2. Paramètres microbiologiques	44
3.1.2.1. Dénombrement	44
a. Dénombrement des germes totaux	45
b. Dénombrement des indicateurs de contamination fécale	45
b.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux	45
b.2. Dénombrement des streptocoques fécaux	45
b.3. Dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs	45
b.4. Abattement des bactéries fécales	45
c. Dénombrement des staphylocoques et des levures	46
3.1.2.2. Isolement des microorganismes	46
3.1.2.3. Purification	46
3.1.2.4. Identification	46
3.2. Tests de génotoxicité des eaux usées	47
3.2.1. Test d'Ames	47
a. Matériel biologique	47
b. Activation des souches bactériennes	48
b.1. La préculture de nuit	48

b.2. Le réisolement des souches tests	48
b.3. Le stockage des souches	48
c. Vérification des caractères génétiques	48
c.1. La culture	48
c.2. Réclamation de l'Histidine	48
c.3. La sensibilité aux UV	49
c.4. La résistance à l'ampicilline et la sensibilité au cristal violet	49
d. Mesure de la mutagénicité des échantillons des eaux usées	49
d.1. Procédure	50
3.2.2. Test des aberrations chromosomiques	51
a. Matériel végétal et conditions de culture	51
b. Traitement des bulbes	52
c. Fixation et coloration des extrémités racinaires	52
d. Examen des cellules des extrémités racinaires	52
3.2.3. Test de micronoyaux	53
a. Matériel biologique	53
b. Prélèvement sanguin	53
c. Mise en culture des cellules lymphocytaires	53
d. Blocage de la division cellulaire	53
e. Traitement cytologique	54
f. Etalement des lames	54
g. Lecture des résultats	54
3.3. Analyses statistiques des résultats	55

Chapitre V : Résultats et discussion

1. Resultats des Analyses physicochimiques	56
1.1. Paramètres physicochimiques	56
1.1.1. Température	58
1.1.2. pH	59
1.1.3. Conductivité	60
1.1.4. Demande chimique de l'oxygène	61
1.1.5. Demande biologique de l'oxygène	63
1.1.6. Matières en suspension	64
1.1.7. Nitrates (NO_2^-)	66
1.1.8. Nitrates (NO_3^-)	67
1.1.9. Ammonium (NH_4^+)	68
1.1.10. Orthophosphates (PO_4^{3-})	70
1.1.11. Métaux lourds	71
1.2. Paramètres bactériologiques	74
1.2.1. Dénombrement	74

1.2.1.1. Recherche et dénombrement des GT	75
1.2.1.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux	76
1.2.1.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux	78
1.2.1.4. Détermination de l'origine de la contamination fécale	79
1.2.1.5. Recherche et dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs	80
1.2.1.6. Abattement des bactéries fécales	81
1.2.1.7. Recherche et dénombrement des staphylocoques	81
1.2.1.8. Recherche et dénombrement des levures	82
1.2.2. Identification des espèces bactériennes	83
2. Résultats des tests de génotoxicité	85
2.1. Test d'Ames	85
2.1.1. Confirmation des caractères génétiques	85
2.1.1.1. Réclamation de l'histidine	85
2.1.1.2. Sensibilité aux UV	85
2.1.1.3. La résistance à l'ampicilline et la sensibilité au Cristal violet	86
2.1.2. Résultats du test d'Ames	87
2.2. Test d' <i>Allium</i>	89
2.2.1. Longueur des racines	89
2.2.2. L'indice mitotique	90
2.2.3. Les aberrations chromosomiques	93
2.3. Test de micronoyaux	96
Conclusion	102
Références bibliographiques	104
Annexes	118

Résumés

Liste des tableaux

Tableau I :	L'effet des virus des eaux usées	7
Tableau II :	Les bactéries pathogènes dans les eaux usées	7
Tableau III :	Les parasites pathogènes dans les eaux usées	9
Tableau IV :	Recommandations microbiologiques révisées de l'OMS pour le traitement des eaux usées avant utilisation en agriculture	24
Tableau V :	Concentrations maximales d'éléments à l'état de trace recommandées pour les eaux d'irrigation	25
Tableau VI :	Les caractères génétiques des souches bactériennes du test d'Ames	28
Tableau VII :	Caractères génétiques des souches TA98 et TA100.	47
Tableau VIII :	Les valeurs limites des paramètres de rejet dans un milieu récepteur et de rejet pour l'irrigation	57
Tableau IX :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée à la température des eaux usées prélevées.	59
Tableau X :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au pH des eaux usées.	60
Tableau XI :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée à la conductivité des eaux usées.	61
Tableau XII :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée à la DCO des eaux usées.	63
Tableau XIII	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée à la DBO5 des eaux usées.	64
Tableau XIV :	rapport de biodégradabilité et MO des échantillons des eaux usées testés	64
Tableau XV :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée aux MES des eaux usées.	66
Tableau XVI :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au NO_2^- des eaux usées.	67
Tableau XVII :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au NO_3^- des eaux usées.	68
Tableau XVIII :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au NH_4^+ des eaux usées.	70
Tableau XIX :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification	71

	appliquée au PO_4^{3-} des eaux usées.	
Tableau XX :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au Cd des eaux usées.	72
Tableau XXI :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au Pb des eaux usées.	73
Tableau XXII :	Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au Cu des eaux usées.	74
Tableau XXIII :	Origine de la contamination fécale des eaux usées brutes prélevées.	80
Tableau XXIV :	Résultats d'abattement des bactéries fécales	81
Tableau XXV :	Résultats de l'identification des espèces bactériennes.	84
Tableau XXVI :	Résultats du test de mutagénèse (test d'Ames).	87
Tableau XXVII :	Résultats de la longueur des racines d' <i>Allium cepa</i> .	90
Tableau XXVIII :	L'effet des eaux usées sur l'IM des racines d' <i>Allium cepa</i>	92
Tableau XXIX :	Pourcentage des phases mitotiques des racines d' <i>Allium cepa</i>	93
Tableau XXX :	Pourcentage des AC détectées dans les racines d' <i>Allium cepa</i>	95
Tableau XXXI :	Fréquence des MN_x dans les lymphocytes humains traités par différentes concentrations d'eaux usées	97
Tableau XXXII :	IP des lymphocytes humains traités par différentes concentrations des eaux usées	98

Listes des figures

Figure 01 :	Aspects de réutilisation des eaux usées dans les différentes régions du monde	17
Figure 02 :	Classification des métaux lourds en fonction des risques et de l'intérêt agronomique	21
Figure 03 :	Principe du test d'Ames	30
Figure 04 :	Mécanisme de formation des MN_x	34
Figure 05 :	Prétraitement	38
Figure 06 :	Décanteur primaire	38
Figure 07 :	Bassin d'aération	39
Figure 08 :	Clarificateur	40
Figure 09 :	Bassin de désinfection	40
Figure 10 :	Localisation du site d'étude	41
Figure 11 :	Protocole du test de mutagenèse (test d'Ames)	51
Figure 12 :	Variation de la température des différents échantillons des eaux usées	58
Figure 13 :	Variation des valeurs du pH des différents échantillons des eaux usées	59
Figure 14 :	Variation des valeurs de la conductivité des différents échantillons des eaux usées	61
Figure 15 :	Variation des valeurs de la DCO des différents échantillons des eaux usées	62
Figure 16 :	Variation des valeurs de la DBO5 des différents échantillons des eaux usées	63
Figure 17 :	Variation des valeurs des MES des différents échantillons des eaux usées	65
Figure 18 :	Variation des valeurs de NO_2^- des différents échantillons des eaux usées	66
Figure 19 :	Variation des valeurs de NO_3^- des différents échantillons des eaux usées	68
Figure 20 :	Variation des valeurs de NH_4^+ des différents échantillons des eaux usées	69
Figure 21 :	Variation des valeurs de PO_4^{3-} des différents échantillons des eaux usées	70
Figure 22 :	Variation du taux de Cd dans les différents échantillons des eaux usées	71
Figure 23 :	Variation du taux de Pb dans les différents échantillons des eaux usées	72
Figure 24 :	Variation du taux du Cu dans les différents échantillons des eaux usées	73
Figure 25 :	Résultats du dénombrement des GT à 22°C	75
Figure 26 :	Résultats du dénombrement des GT à 37°C	76

Figure 27 :	Résultats du dénombrement des CT	77
Figure 28 :	Résultats du dénombrement des CF	78
Figure 29 :	Résultats du dénombrement des SF	79
Figure 30 :	Résultats du dénombrement des streptocoques du groupe D	79
Figure 31 :	Résultats du dénombrement des ASR	80
Figure 32 :	Résultats du dénombrement des Staphylocoques	82
Figure 33 :	Résultats du dénombrement des levures	82
Figure 34 :	Réclamation de l'histidine	85
Figure 35 :	l'effet des UV sur les souches d'Ames et la souche sauvage	86
Figure 36 :	Effet de l'ampicilline et du CV sur les souches d'Ames (TA100/TA98)	86
Figure 37 :	AC détectées dans les racines d' <i>Allium cepa</i>	96
Figure 38 :	IP et la fréquence des MN des lymphocytes traités pendant Avril 2012	99
Figure 39 :	IP et la fréquence des MN des lymphocytes traités pendant Juillet 2012	99
Figure 40 :	IP et la fréquence des MN des lymphocytes traités pendant Novembre 2012	99
Figure 41 :	IP et la fréquence des MN des lymphocytes traités pendant Février 2013	100
Figure 42 :	IP et la fréquence des MN des lymphocytes traités pendant Avril 2013	100
Figure 43 :	Cellules lymphocytaires examinées	101

Liste des abréviations

2AA : 2-aminoanthracene.

2AF : 2-aminofluorene.

AC : Aberrations chromosomiques.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ASR : Anaérobie sulfito-réducteur.

BCPL : Bouillon Lactosé au Pourpre de Bromocrésole.

Cd : Cadmium.

CEAEQ : Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec.

CF : Coliformes fécaux.

CT : Coliformes totaux.

CV : Cristal Violet.

DBO5 : Demande biologique en oxygène.

DCO : Demande chimique en oxygène.

DO : Densité optique.

FAO : Food and agriculture organization.

FAO : Food and Agriculture Organization.

GN : Gélose nutritive.

GNAB : Gélose nutritive alcaline biliée.

GT : Germes totaux.

H₂S: Hydrogène sulfuré.

HAP : hydrocarbures aromatiques polycyclique.

His : Histidine.

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry.

IM : Indice mitotique.

IP : Indice de prolifération.

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne.

MES : Matière en suspension.

MMS: Méthyle méthane sulfonate.

MN_x : Micronoyaux.

NPD : 4-nitro-o-phenylenediamine.

NPP : Nombre le plus probable.

OMS : Organisation Mondiale de la santé.

PAT : Perturbation anaphase-télophase.

Pb : Plomb.

pH : Potentiel d'hydrogène.

S. typhimurium : *Salmonella typhimurium*.

SA : sodium azide.

SF : Streptocoques fécaux.

SS : Salmonella-Shigelle.

STEP: Station d'épuration.

TGEA : Glucose Tryptone Extrait Agar.

UFC : Unité formant colonie.

USEPA : United States Environmental Protection Agency.

UV : Ultra-violet.

VF : Viande Foie.

Introduction

L'eau ne peut être considérée comme un simple produit commercial, elle doit être classée comme un patrimoine universel et donc protégée, défendue et traitée comme tel. Elle est une ressource vitale pour l'homme ; elle l'est également pour ses activités agricoles, économiques et la qualité de son environnement en dépend étroitement. Cependant, elle est le réceptacle universel de tout type de pollution (Eddabra, 2011).

Bien qu'apparemment inépuisable, l'eau est très inégalement répartie sur la planète. Tous les pays auront, à court ou à long terme, à faire face au problème de sa raréfaction. La mobilisation des eaux superficielles a été de tous les temps une préoccupation majeure des pouvoirs publics (Devaux, 1999 ; Ecosse, 2001).

Pour répondre à cette situation d'épuisement des ressources naturelles et à la protection de l'environnement. Le recours à l'épuration des eaux usées urbaines, souvent chargées en éléments nutritifs tels que l'azote et le phosphore, représenterait une source d'eau et d'engrais additionnelle renouvelable et fiable pour l'agriculture d'une part et d'autre part, permettrait d'atténuer la pression sur les ressources conventionnelles plus adaptées à l'alimentation en eau potable des populations (Mohammed Said, 2012).

L'introduction de micropolluants organiques et inorganiques dans l'environnement aquatique par les eaux usées représente un problème majeur pour la préservation des ressources en eau potable comme pour la protection des écosystèmes aquatiques (Jolibois et al., 2009). Certains de ces micropolluants tels que les métaux lourds et les composés organiques possèdent un pouvoir mutagène, ils peuvent être assimilés par les espèces aquatiques et se transmettent à l'Homme et ceci à travers la chaîne alimentaire. Ces mutagènes environnementaux peuvent être un facteur de risque majeur pour la santé humaine et peuvent causer de nombreuses maladies telle que le cancer, l'athérosclérose, les maladies cardio-vasculaires et le vieillissement prématuré (Gana et al., 2008 ; Radić et al., 2010). Bien que les eaux usées soient traitées en station d'épuration, les procédés employés ne sont pas toujours suffisamment efficaces pour éliminer tous les composés génotoxiques. Des études ont ainsi démontré qu'une activité génotoxique pouvait être détectée dans des effluents des stations d'épuration au moyen du test d'Ames (Jolibois et al., 2009) ou au moyen d'un autre test de génotoxicité comme le test umuC (Ono et al., 1996).

En effet, la détermination de la composition chimique et le potentiel génotoxique des eaux usées est essentielle pour la protection de l'environnement et la santé humaine. À ce stade des tests biologiques rapides et peu onéreux peuvent détecter un large éventail de substances qui sont responsables des dommages génétiques et souvent considérés comme cause principale de la mutagenicité cellulaire (Jolibois et al., 2009).

La présente étude a pour but d'évaluer les traitements effectués au niveau de la station d'épuration (STEP) de la ville de Guelma (Nord-Est d'Algérie) et à sa capacité d'éliminer les composés génotoxiques éventuellement présents dans les influents, en étudiant les principaux paramètres physicochimiques, paramètres microbiologiques et en évaluant la génotoxicité et ceci à l'aide de trois tests biologiques, le test de fluctuation d'Ames (Jolibois et Guerebet, 2005), *Allium* test (Tabrez et Ahmed, 2011) et le test de micronoyaux (MN_x).

Ce travail comporte deux parties principales :

I. La partie bibliographique avec trois chapitres qui traitent les eaux usées, leur réutilisation et enfin les tests biologiques utilisés.

II. La partie expérimentale avec deux chapitres :

- Le premier chapitre porte sur la description du site d'étude ainsi que le matériel et les méthodes d'analyse utilisées.
- Le deuxième chapitre sera consacré à la présentation des résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Une conclusion générale clôturera ce travail où sont récapitulés les principaux résultats obtenus.

Les eaux usées sont des milieux extrêmement complexes, altérées par les activités anthropiques à la suite d'un usage domestique, industriel, artisanal, agricole ou autres. Elles sont considérées comme polluées et doivent être donc traitées avant toute réutilisation ou injection dans les milieux naturels récepteurs (Selghi, 2001). C'est pourquoi, dans un souci de respect de ces différents milieux naturels récepteurs, des traitements d'abattement ou d'élimination de ces polluants sont effectués sur tous les effluents urbains ou industriels. Ces traitements peuvent être réalisés de manière collective dans une station d'épuration ou de manière individuelle également par des procédés intensifs ou extensifs (Paulsrud et Haraldsen, 1993).

La dépollution des eaux usées urbaines nécessite une succession d'étapes faisant appel à des traitements physiques, physicochimiques et biologiques. En dehors des plus gros déchets présents dans les eaux usées, l'épuration doit permettre, au minimum, d'éliminer la majeure partie de la pollution carbonée. Le traitement des eaux usées est une alternative susceptible de résoudre les différents problèmes de pollution des milieux aquatiques récepteurs.

Ce chapitre présente l'origine des eaux usées, leur composition, les paramètres caractéristiques de ces eaux et enfin les différents types de procédés du traitement des eaux usées.

1. Définition d'une eau usée

« La pollution de l'eau s'entend comme, une modification défavorable ou nocive des propriétés physicochimiques et biologiques, produite directement ou indirectement par les activités humaines, les rendant impropres à l'utilisation normale établit ». Les eaux usées sont toutes les eaux des activités domestiques, agricoles et industrielles chargées en substances toxiques qui parviennent dans les canalisations d'assainissement. Les eaux usées englobent également les eaux de pluies et leur charge polluante, elles engendrent au milieu récepteur toutes sortes de pollution et de nuisance (Dugniolle, 1980 ; Glanic et Benneton, 1989).

2. Origine des eaux usées

Suivant l'origine et la qualité des substances polluantes, on distingue quatre catégories d'eaux usées :

2.1. Les eaux usées domestiques

Les eaux usées d'origine domestique sont issues de l'utilisation de l'eau (potable dans la majorité des cas) par les particuliers pour satisfaire tous les usages ménagers.

Lorsque les habitations sont en zone d'assainissement collectif, les eaux domestiques se retrouvent dans les égouts. On distingue généralement deux « types » d'eaux usées domestiques qui arrivent toutes deux dans le réseau d'assainissement :

- Les eaux vannes, qui correspondent aux eaux de toilettes ;
- Les eaux grises qui correspondent à tous les autres usages : lave-linge, lave-vaisselle, douche/bain, etc...

La composition des eaux usées d'origine domestique peut être extrêmement variable, et dépend de trois facteurs :

- La composition originelle de l'eau potable, qui elle-même dépend de la composition de l'eau utilisée pour produire l'eau potable, de la qualité du traitement de cette eau, des normes sanitaires du pays concerné, de la nature des canalisations, etc... ;
- Les diverses utilisations par les particuliers qui peuvent apporter un nombre quasi infini de polluants : tous les produits d'entretien, lessives mais aussi, solvants, peintures, mercure de thermomètre, colle, etc... ;
- Les utilisateurs eux-mêmes qui vont rejeter de la matière organique dans les égouts (urines et fèces) ; la matière organique est le polluant majoritaire des eaux domestiques. Ce type de rejets apporte également des micro-organismes et des contaminants divers (médicaments etc...) (Baumont et al., 2009).

2.2. Les eaux usées industrielles

Elles sont très différentes des eaux usées domestiques. Leurs caractéristiques varient d'une industrie à l'autre. En plus des matières organiques, azotées ou phosphorées, elles sont chargées en différentes substances chimiques organiques et métalliques. Selon leur origine industrielle elles peuvent également contenir :

- des graisses (industries agroalimentaires, équarrissage) ;
- des hydrocarbures (raffineries) ;
- des métaux (traitements de surface, métallurgie) ;
- des acides, des bases et divers produits chimiques (industries chimiques divers, tanneries) ;
- de l'eau chaude (circuit de refroidissement des centrales thermiques) ;
- des matières radioactives (centrales nucléaires, traitement des déchets radioactifs).

Avant d'être rejetées dans les réseaux de collecte, les eaux usées industrielles doivent faire l'objet d'un traitement. Elles ne sont mélangées aux eaux domestiques que lorsqu'elles ne présentent plus de danger pour les réseaux de collecte et ne perturbent pas le fonctionnement des stations d'épurations (Mohammed Said, 2012).

2.3. Les eaux agricoles

L'agriculture est une source de pollution des eaux non négligeable car elle apporte les engrais et les pesticides. Elle est la cause essentielle des pollutions diffuses. Les eaux agricoles issues de terres cultivées chargées d'engrais nitrates et phosphates, sous une forme ionique ou en quantité telle, qu'ils ne seraient pas finalement retenus par le sol et assimilés par les plantes, conduisent par ruissellement à un enrichissement en matières azotées ou phosphatées des nappes les plus superficielles et des eaux des cours d'eau (Mohammed Said, 2012).

2.4. Les eaux pluviales

Les eaux de pluie ruissellent dans les rues où sont accumulées polluants atmosphériques, poussières, débris, suies de combustion et hydrocarbures rejetés par les véhicules. Les eaux de pluies, collectées normalement à la fois avec les eaux usées puis déversées dans la canalisation d'assainissement et acheminées vers une station d'épuration, sont souvent drainées directement dans les rivières entraînant ainsi une pollution intense du milieu aquatique (Mohammed Said, 2012).

3. Composition des eaux usées

La composition des eaux usées est extrêmement variable en fonction de leur origine (industrielle, domestique, etc...). Elles peuvent contenir de nombreuses substances, sous forme solide ou dissoute, ainsi que de nombreux micro-organismes. En fonction de leurs caractéristiques physiques, chimiques, biologiques et du danger sanitaire qu'elles représentent, ces substances peuvent être classées en quatre groupes : les micro-organismes, les matières en suspension, les éléments traces minéraux ou organiques, et les substances nutritives (Belaid, 2010).

3.1. Microorganismes

Les eaux usées contiennent tous les microorganismes excrétés avec les matières fécales. Cette flore entérique normale est accompagnée d'organismes pathogènes. Ces microorganismes sont : les bactéries, les champignons, les virus, les protozoaires et les helminthes (Belaid, 2010).

3.1.1. Les virus

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires qui ne peuvent se multiplier que dans une cellule hôte. On estime leur concentration dans les eaux usées urbaines comprise entre 10^3 et 10^4 particules par litre. Leur isolement et leur dénombrement dans les eaux usées restent difficiles, ce qui conduit vraisemblablement à une sous-estimation de leur nombre réel. Les virus entériques sont ceux qui se multiplient dans le trajet intestinal. Parmi les virus entériques humains les plus nombreux il faut citer les entérovirus, les rotavirus, les retrovirus, les adénovirus et le virus de l'Hépatite A (Tab. I). Il semble que les virus soient plus résistants dans l'environnement que les bactéries (Belaid, 2010). Aulicino et al. (1996), ont constaté que, au cours de processus de traitement des eaux usées, les virus sont plus difficiles à éliminer que les bactéries classiques couramment utilisées comme indicateurs de la qualité bactériologique des eaux. De plus les auteurs ont détecté plusieurs virus dans les milieux récepteurs recevant des effluents traités tels que les rivières et les étangs. D'autre part, Blanc et Nasser (1996), ont constaté que les virus sont plus persistants, à température ambiante, dans un sol irrigué par des eaux usées traitées que certains autres bactériophages.

3.1.2. Les bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus communément rencontrés dans les eaux usées (Tab. II). Les eaux usées urbaines contiennent environ 10^6 à 10^7 bactéries/100 ml dont la plupart sont *Proteus* et Entérobactéries, 10^3 à 10^4 streptocoques et 10^2 à 10^3 *Clostridium*s. La concentration en bactéries pathogènes est de l'ordre de 10^4 UFC/l. Parmi les plus détectées sont retrouvées, les Salmonelles, dont celles responsables de la typhoïde, des paratyphoïdes et des troubles intestinaux (Belaid, 2010).

3.1.3. Les champignons

Les champignons constituent un groupe d'organismes extrêmement vaste (de l'ordre d'1.5 millions d'espèces dont 69000 identifiées) et très diversifié. On les rencontre dans de multiples habitats terrestres ou aquatiques. La majorité de ces microorganismes sont saprophytes, d'autres au contraire sont parasites de l'homme, des animaux et des plantes. Dotés de propriétés lytiques importantes, qui en font des agents de dégradation dangereux mais parfois des alliés utiles (production d'enzymes), les champignons jouent un rôle important dans l'équilibre biologique (Belaid, 2010).

Tableau I : L'effet des virus des eaux usées (Baumont et al., 2009).

Agent pathogène	Symptômes, maladie	Nombre pour un litre d'eau usée	Voies de contamination principales
Virus de l'hépatite A	Hépatite A		Ingestion
Virus de l'hépatite E			
Rotavirus	Vomissement, diarrhée	400 à 85 000	Ingestion
Virus de Norwalk	Vomissement, diarrhée		Ingestion
Adénovirus	Maladie respiratoire, conjonctivite, vomissement, diarrhée		Ingestion
Astrovirus	Vomissement, diarrhée		Ingestion
Calicivirus	Vomissement, diarrhée		Ingestion
Coronavirus	Vomissement, diarrhée		Ingestion / inhalation
Réovirus	Affection respiratoire bénigne et diarrhée		Ingestion
Entérovirus :			
Poliovirus	Paralysie, méningite, fièvre	182 à 492 000	Ingestion
Coxsackie A	Méningite, fièvre, pharyngite, maladie respiratoire		Ingestion
Coxsackie B	Myocardite, anomalie congénitale du cœur (si contamination pendant la grossesse), éruption cutanée, fièvre, méningite, maladie respiratoire		Ingestion
Echovirus	Méningite, encéphalite, maladie respiratoire, rash, diarrhée, fièvre		Ingestion

Tableau II : Les bactéries pathogènes dans les eaux usées (Baumont et al., 2009).

Agent pathogène	Syptomes, maladie	Nombre pour un litre d'eau usée	Voies de contamination principales
<i>Salmonella</i>	Typhoïde, paratyphoïde, salmonellose	23 à 80 000	Ingestion
<i>Shigella</i>	Dysenterie bacillaire	10 à 10 000	Ingestion
<i>E. coli</i>	Gastro-entérite		Ingestion
<i>Yersinia</i>	Gastro-entérite		Ingestion
<i>Campylobacter</i>	Gastro-entérite	37 000	Ingestion
<i>Vibrio Choléra</i>	Cholera	100 à 100 000	Ingestion
<i>Leptospira</i>	Leptospirose		Cutanée/Inhalation/Ingestion
<i>Legionella</i>	Légionellose		Inhalation
<i>Mycobacterium</i>	Tuberculose		Inhalation

3.1.4. Les protozoaires

Au cours de leur cycle vital, les protozoaires passent par une forme de résistance, les kystes, qui peuvent être véhiculés par les eaux résiduaires (Tab. III). Ces parasites sont très persistants. Ainsi, selon les conditions du milieu, ces organismes peuvent survivre plusieurs semaines voir même plusieurs années (Campos, 2008). Plusieurs protozoaires pathogènes ont été identifiés dans les eaux usées (Gennaccaro et al., 2003). Parmi les plus importants du point de vue sanitaire, il faut citer *Entamoeba histolytica*, responsable de la dysenterie amibienne, *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum*. En revanche, 10 à 30 kystes, est une dose suffisante pour causer des troubles sanitaires (Campos, 2008).

3.1.5. Les helminthes

Les helminthes sont des parasites intestinaux, fréquemment rencontrés dans les eaux résiduaires. Dans les eaux usées urbaines, le nombre d'œufs d'helminthes peut être évalué entre 10 et 103 germes/l. Beaucoup de ces helminthes ont des cycles de vie complexes comprenant un passage obligé par un hôte intermédiaire (Toze, 2006). Le stade infectieux de certains helminthes est l'organisme adulte ou larve, alors que pour d'autres, ce sont les oeufs. Les oeufs et les larves sont résistants dans l'environnement et le risque lié à leur présence est à considérer pour le traitement et la réutilisation des eaux résiduaires. En effet, la persistance de ces organismes à différentes conditions environnementales ainsi que leur résistance à la désinfection permet leur reproduction, ce qui constitue leur risque potentiel (Campos, 2008). Les helminthes pathogènes rencontrés dans les eaux usées sont : *Ascaris lumbricades*, *Oxyuris vermicularis*, *Trichuris trichuria*, *Taenia saginata* (Tab. III). L'analyse des risques sanitaires liés aux agents pathogènes susceptibles d'être transportés par les eaux usées est le fondement des recommandations proposées par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1989 (OMS, 1989).

Tableau III : Les parasites pathogènes dans les eaux usées (Baumont et al., 2009).

Organisme	Symptômes, maladie	Nombre pour un litre	Voies de contamination Principales
Protozoaires			
<i>Entamoeba histolytica</i>	Dysenterie amibienne	4	Ingestion
<i>Giardia lamblia</i>	Diarrhée, malabsorption	125 à 100 000	Ingestion
<i>Balantidium coli</i>	Diarrhée bénigne, ulcère du colon	28-52	Ingestion
<i>Cryptosporidium</i>	Diarrhée	0,3 à 122	Ingestion
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmose : ganglions, faible fièvre		Inhalation / Ingestion
<i>Cyclospora</i>	Diarrhée, légère fièvre, perte de poids		Ingestion
<i>Microsporidium</i>	Diarrhée		Ingestion
Helminthes			
<i>Ascaris</i>	Ascaridiase : diarrhée, troubles nerveux	5 à 111	Ingestion
<i>Ancylostoma</i>	Anémie	6 à 188	Ingestion / Cutanée
<i>Necator</i>	Anémie		Cutanée
<i>Tænia</i>	Diarrhée, douleurs musculaires		Ingestion de viande mal cuite
<i>Trichuris</i>	Diarrhée, douleur abdominale	10 à 41	Ingestion
<i>Toxocora</i>	Fièvre, douleur abdominale		Ingestion
<i>Strongyloïdes</i>	Diarrhée, douleur abdominale, nausée		Cutanée

3.2. Les éléments traces

Dont les effets sanitaires à long terme sont moins connus, notamment leur implication potentielle dans la survenue de cancers. Les trois voies de contamination que l'on retrouve classiquement sont :

- La contamination par ingestion : c'est la plus commune. D'une part, il y a l'ingestion directe, lorsqu'il y a consommation d'eau. Celle-ci peut être volontaire lors de la consommation d'eau potable, ou involontaire, par exemple « boire la tasse » en natation. D'autre part, il y a l'ingestion indirecte, par exemple quand les eaux épurées sont utilisées pour irriguer des cultures dont les produits sont ensuite consommés ;

- La contamination par inhalation : elle est moins importante et n'est pas possible pour tous les polluants. Elle se produit lors de la formation d'aérosols, dans le cas de l'irrigation par aspersion ou de l'utilisation d'un karcher ;
- La contamination par voie cutanée : un simple contact peut entraîner une contamination, souvent grâce à des microcoupures sur la peau. Seule la bactérie *Leptospira* est vraiment concernée par ce mode de transmission (Baumont et al., 2009).

3.2.1. Les métaux lourds

Les métaux lourds que l'on trouve dans les eaux usées urbaines sont extrêmement nombreux ; les plus abondants (de l'ordre de quelques µg/l) sont le fer, le zinc, le cuivre (Cu) et le plomb (Pb). Les autres métaux (manganèse, aluminium, chrome, arsenic, sélénium, mercure, cadmium (Cd), molybdène, nickel, etc...) sont présents à l'état de traces. Leur origine est multiple : ils proviennent « des produits consommés au sens large par la population, de la corrosion des matériaux des réseaux de distribution d'eau et d'assainissement, des eaux pluviales dans le cas de réseau unitaire, des activités de service (santé, automobile) et éventuellement de rejets industriels » (Baumont et al., 2009).

3.2.2. Eléments toxiques organiques

Les eaux usées contiennent des composés chimiques toxiques très persistants et qui ont une grande lipophilicité. Parmi ces composés, on peut citer les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP), les alkyl-phénols, chlorophénols, phtalates, les pesticides et les résidus pharmaceutiques actifs. Certains composés ont un pouvoir de perturber le système endocrinien tels que les HAP et les alkylphénols (Belgiorno et al., 2007). En effet plusieurs environnements aquatiques ont été pollués par ces composés en plus des autres substances pharmaceutiques dont la principale source est les eaux usées. Il s'est avéré que les stations d'épuration sont des sources potentielles de ces produits toxiques (Belaid, 2010).

3.3. Substances nutritives

Les nutriments se trouvent en grande quantité dans l'eau usée, et constituent un paramètre de qualité important pour la valorisation de ces eaux en agriculture et en gestion des paysages (Hamoda, 2004). Les éléments les plus fréquents dans les eaux usées sont l'azote, le phosphore et parfois le potassium, le zinc et le soufre. Ces éléments se trouvent en quantités appréciables, mais en proportions très variables que ce soit, dans les eaux usées épurées ou brutes (Belaid, 2010).

4. Caractéristiques des eaux usées

Les normes de rejet des eaux usées, fixent des indicateurs de qualité physicochimique et biologique. Ce potentiel de pollution généralement exprimés en mg/l, est quantifié et apprécié par une série d'analyses. Certains de ces paramètres sont indicateurs de modifications que cette eau sera susceptible d'apporter aux milieux naturels récepteurs. Pour les eaux usées domestiques, industrielles et les effluents naturels, on peut retenir les analyses suivantes :

4.1. Les paramètres physicochimiques

Ils résultent de l'introduction dans un milieu des substances conduisant à son altération, se traduisant généralement par des modifications des caractéristiques physicochimiques du milieu récepteur. La mesure de ces paramètres se fait au niveau des rejets, à l'entrée et à la sortie des usines de traitement et dans les milieux naturels.

4.1.1. La température

La température est un facteur écologique important des milieux aqueux. Son élévation peut perturber fortement la vie aquatique (pollution thermique). Elle joue un rôle important dans la nitrification et la dénitrification biologique. La nitrification est optimale pour des températures variant de 28 à 32°C par contre, elle est fortement diminuée pour des températures de 12 à 15°C et elle s'arrête pour des températures inférieures à 5°C (Rodier, 2005).

4.1.2. Le potentiel d'Hydrogène (pH)

Les organismes sont très sensibles aux variations du pH, et un développement correct de la faune et de la flore aquatique n'est possible que si sa valeur est comprise entre 6 et 9. L'influence du pH se fait également ressentir par le rôle qu'il exerce sur les autres éléments comme les ions des métaux dont il peut diminuer ou augmenter leur mobilité en solution biodisponible et donc leur toxicité.

Le pH joue un rôle important dans l'épuration d'un effluent et le développement bactérien. La nitrification optimale ne se fait qu'à des valeurs de pH comprises entre 7,5 et 9 (Rodier, 2005).

4.1.3. La turbidité

La turbidité est inversement proportionnelle à la transparence de l'eau, elle est de loin le paramètre de pollution indiquant la présence de la matière organique ou minérale sous forme

colloïdale en suspension dans les eaux usées. Elle varie suivant les matières en suspension (MES) présentes dans l'eau (Mohammed Said, 2012).

4.1.4. Les matières en suspension (MES)

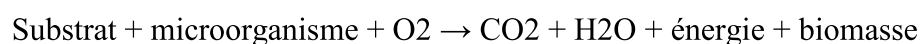
Elles représentent, la fraction constituée par l'ensemble des particules, organiques ou minérales, non dissoutes de la pollution. Elles constituent un paramètre important qui marque bien le degré de pollution d'un effluent urbain ou même industriel (Mohammed Said, 2012).

4.1.5. La conductivité électrique

La conductivité est la propriété que possède une eau à favoriser le passage d'un courant électrique. Elle fournit une indication précise sur la teneur en sels dissous (salinité de l'eau). La mesure de la conductivité permet d'évaluer la minéralisation globale de l'eau (Rodier, 2009). Sa mesure est utile car au-delà de la valeur limite de la salinité correspondant à une conductivité de 2500 $\mu\text{Sm/cm}$, la prolifération de microorganismes peut être réduite d'où une baisse du rendement épuratoire (Mohammed Said, 2012).

4.1.6. La demande biologique en oxygène (DBO₅)

La DBO₅ comme étant la quantité d'oxygène consommée par les bactéries, à 20°C à l'obscurité et pendant 5 jours d'incubation d'un échantillon préalablementensemencé, temps qui assure l'oxydation biologique d'une fraction de matière organique carbonée. Ce paramètre mesure la quantité d'oxygène nécessaire à la destruction des matières organiques grâce aux phénomènes d'oxydation par voie aérobie. Pour la mesurer, on prend comme référence la quantité d'oxygène consommée au bout de 5 jours ; c'est la DBO₅ (Mohammed Said, 2012). Elle se résume à la réaction chimique suivante :



4.1.7. La demande chimique en oxygène (DCO)

La DCO est la mesure de la quantité d'oxygène nécessaire pour la dégradation chimique de toute la matière organique biodégradable ou non contenue dans les eaux à l'aide du bichromate de potassium à 150°C. Elle est exprimée en mg O₂/l. La valeur du rapport DCO/DBO₅ indique le coefficient de biodégradabilité d'un effluent, il permet aussi de définir son origine (Suschka et Ferreira, 1986). Généralement la valeur de la DCO est :

- DCO = 1.5 à 2 fois DBO₅
- DCO = 1 à 10 fois DBO₅

- $DCO > 2.5 \text{ fois } DBO_5$

Pour les eaux usées urbaines ; Pour tout l'ensemble des eaux résiduaires ; Pour les eaux usées industrielles. La relation empirique de la matière organique (MO) en fonction de la DBO_5 et la DCO est donnée par l'équation suivante : $MO = (2 DBO_5 + DCO)/3$.

4.1.8. La biodégradabilité

La biodégradabilité traduit l'aptitude d'un effluent à être décomposé ou oxydé par les microorganismes qui interviennent dans le processus d'épuration biologique des eaux. La biodégradabilité est exprimée par un coefficient K, tel que, $K = DCO / DBO_5$:

- Si $k < 1,5$: cela signifie que les matières oxydables sont constituées en grande partie de matières fortement biodégradable ;
- Si $1,5 < K < 2,5$: cela signifie que les matières oxydables sont moyennement biodégradables.
- Si $2,5 < K < 3$: les matières oxydables sont peu biodégradables.
- Si $K > 3$: les matières oxydables sont non biodégradables.

Un coefficient K très élevé traduit la présence dans l'eau d'éléments inhibiteur de la croissance bactérienne, tels que, les sels métalliques, les détergents, les phénols, les hydrocarbures etc... La valeur du coefficient K détermine le choix de la filière de traitement à adopter, si l'effluent est biodégradable on applique un traitement biologique, sinon on applique un traitement physicochimique (Mohammed Said, 2012).

5. Procédés du traitement des eaux usées

Il existe différents types de traitement, mais le choix des procédés de traitement doit être adéquat du point de vue climatique, des applications attendues et du coût d'investissement (Werther et Ogada, 1999). Ces procédés nécessitent un ensemble cohérent de traitements effectués après des prétraitements tels que le dégrillage, le dessablage et le dégraissage. On distingue les procédés intensifs dont les boues activées, les disques biologiques et les lits bactériens et les procédés extensifs dont le lagunage et l'infiltration-percolation.

- Les boues activées dont le principe consiste à favoriser le développement des bactéries épuratrices dans un bassin brassé et aéré, alimenté en eau à épurer. La qualité microbiologique du rejet et les rendements épuratoires peuvent atteindre des niveaux très élevés. Il est habituel

d'obtenir des rendements d'élimination de la matière organique supérieurs à 95% (Duchène et Vanier, 2002).

- Le lagunage naturel où la dégradation de la pollution est assurée par des bactéries épuratrices en suspension dans l'eau. Le procédé permet d'obtenir des rendements d'élimination de la pollution organique de l'ordre de 70 à 80 % et un très bon abattement de la pollution bactériologique (Alexandre et al., 1997).

- Le filtre en terre ou le sol, généralement reconstitué (pouzzolane ou sable), constitue un support sur lequel se fixent les bactéries épuratrices. L'aération du massif filtrant, indispensable à un bon fonctionnement, est assurée grâce aux principes de l'alimentation par bâchées (à-coups hydrauliques à fort débit après un stockage temporaire), la ré-oxygénation du massif filtrant se fait par effet d'aspiration de l'air avec l'eau qui s'infiltre, et de l'alternance de phases d'alimentation et de repos (Wanko et al., 2005).

- L'infiltration-percolation sur sable est un traitement biologique par fixation naturelle des bactéries sur les grains du sable (Eddabera, 2011). Après une décantation anaérobie des eaux usées, celles-ci sont déversées et étalées sur les lits du sable, les eaux sont d'abord débarrassées des matières en suspension par filtration superficielle, puis leur matière organique est dégradée et leurs composés azotés sont oxydés sous forme de nitrates par les bactéries qui colonisent le sable. Les phénomènes physiques, chimiques et biologiques mis en jeu pour l'épuration par le système infiltration-percolation sont :

- La filtration et la sédimentation des particules au niveau des pores du sol ;
- L'échange ionique, l'adsorption et la précipitation de sels dissous ;
- La biodégradation de la matière organique.
- Le fonctionnement du système est basé sur la succession de périodes d'inondation et de dessiccation, ces dernières étant destinées à éviter la prolifération d'algues et à maintenir des conditions aérobies dans le sol pour permettre l'oxydation de la matière organique et entretenir une capacité d'infiltration élevée. En effet, les dépôts accumulés dans les pores, entravant l'aération du sol et favorisant la prolifération de bactéries anaérobies, peuvent entraîner un colmatage limitant fortement le fonctionnement du système (Eddabera, 2011).

5.1. Procédés de désinfections

A l'issue des procédés décrits précédemment, les eaux sont normalement rejetées dans le milieu naturel. Dans le cadre d'une réutilisation, les eaux usées nécessitent des traitements supplémentaires, essentiellement pour éliminer les microorganismes qui pourraient poser des problèmes sanitaires. Ce ne sont pas des traitements d'épuration classiques ; par contre ils sont fréquemment utilisés dans les usines de production d'eau potable. On peut donc supposer qu'ils constituent l'aménagement technique minimum d'une station d'épuration en vue d'une réutilisation (Mohammed Said, 2012).

5.1.1. Les traitements chimiques de désinfection

- Le chlore est un oxydant puissant qui réagit à la fois avec des molécules réduites et organiques, et avec les microorganismes. Les traitements de purification et de clarification en amont ont une très grande importance pour permettre une bonne efficacité du traitement, et éviter d'avoir à utiliser trop de chlore. D'autant plus que le coût de la déchloration, qui permet de limiter considérablement l'effet toxique de certains produits dérivés formés lors du traitement, est élevé (Monarca et al., 2000 ; Mohammed Said, 2012).
- L'ozone est un procédé de désinfection utilisé aux États-Unis, en Afrique du Sud et au Moyen-Orient essentiellement. Il permet l'élimination des bactéries, des virus et des protozoaires. C'est le seul procédé vraiment efficace contre les virus (Lazarova, 2003). Les tests de toxicité effectués sur des poissons, des crustacés et des algues n'ont pas permis de mettre en évidence une quelconque toxicité (Cauchi, 1996). On peut également utiliser l'acide péracétique, le dioxyde de chlore et les ferrates (Mohammed Said, 2012).

5.1.2. Les traitements physiques de désinfection par les ultraviolets (UV)

Le traitement par rayons ultraviolets utilise des lampes à mercure disposées parallèlement ou perpendiculairement au flux d'eau. Leur rayonnement s'attaque directement aux microorganismes. Ce traitement est très simple à mettre en œuvre, car il n'y a ni stockage, ni manipulation de substances chimiques et les caractéristiques chimiques de l'effluent ne sont pas modifiées. La durée d'exposition nécessaire est très courte (20 à 30 seconde). L'efficacité du traitement dépend essentiellement de deux paramètres :

- Les lampes, doivent être remplacées régulièrement : elles sont usées au bout d'un an et demi. De plus, elles doivent être nettoyées car elles ont tendance à s'encrasser ;
- La qualité de l'effluent, dont les MES et certaines molécules dissoutes absorbent les UV, ce qui diminue l'efficacité des lampes.

Les désinfections utilisant des produits chimiques (chlore, ozone, etc...) sont efficaces, sauf contre *Cryptosporidium*. Il a été montré que des kystes de *Cryptosporidium* pouvaient résister à des traitements à pH = 11,2, à la chloration et à d'autres traitements chimiques (Rose et al., 1999). Cependant, la plus grande partie des kystes de *Cryptosporidium* sont éliminés pendant les phases primaires de décantation et coagulation/floculation. Par ailleurs, il faut trouver l'équilibre entre le risque posé par les désinfectants en eux-mêmes, et le risque lié aux microorganismes pathogènes (Asano, 1998). C'est essentiellement le cas pour le chlore dont l'utilisation crée des dérivés halogénés potentiellement cancérigènes. Pour les ultraviolets, ce problème ne se pose pas. Leur action sur les virus et les coliformes fécaux est bonne. Seules les formes de résistances, comme les oeufs d'helminthes, ne sont pas trop affectées (Cauchi et al, 1996). Le traitement aux rayons UV est plus économique et pose moins de problèmes de toxicité que le chlore. Il est beaucoup utilisé aux États-Unis et au Canada (Mohammed Said, 2012).

Devant l'augmentation des besoins en eau, la multiplication démographique, l'amélioration du niveau de vie des populations et la rareté des précipitations dans les zones arides et semi-arides; la réutilisation des eaux usées constitue une solution incontournable pour faire face à la pénurie en eau. Les eaux usées sont recyclées depuis longtemps dans les zones arides comme la Namibie, où elles s'avèrent même être la ressource la plus fiable (Wintgens et al., 2005).

Ce chapitre présente un bilan mondial de la réutilisation des eaux usées épurées, la situation de la réutilisation de ces eaux en Algérie, les avantages et les risques liés à ce type de réutilisation et enfin les différentes réglementations mondiales pour l'usage de ces eaux.

1. La réutilisation des eaux usées épurées

1.1. Bilan mondial

La réutilisation des eaux usées est répandue dans le monde entier avec plusieurs types de valorisation. Il existe des milliers de projets utilisant des eaux usées (Bixio et al., 2008), mais dans la plupart des cas, les eaux usées sont utilisées à l'état brut ou après un traitement minimal, et pratiquement aucune mesure n'est prise pour protéger la santé (OMS, 1989).

Bixio et al., (2005) ont classés les différents types de réutilisation selon 4 catégories (1) usage agricole, (2) usage urbain et périurbain et recharge des nappes, (3) usage industriel, (4) usages mixte. Sur le plan mondial, la réutilisation des eaux usées traitées pour l'agriculture, l'industrie et les usages domestiques couvrent respectivement 70 %, 20 %, 10 % de leur demande en eau (Ecosse, 2001). Cependant, ces proportions varient selon les régions dans le monde (Fig. 01).

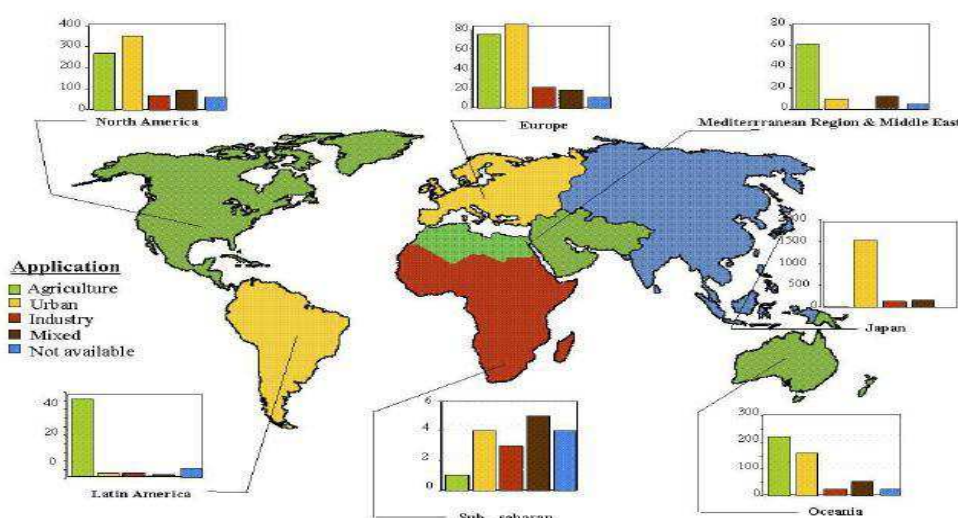


Figure 01 : Aspects de réutilisation des eaux usées dans les différentes régions du monde (Bixio et al., 2005).

1.2. Réutilisation des eaux usées traitées en Algérie

Actuellement l'Algérie se penche vers cette technique et sa réutilisation en agriculture. Ceci nécessite dans un premier temps d'identifier et de quantifier les volumes d'eaux usées rejetés par les agglomérations à travers le pays. Le volume d'eaux usées rejetées annuellement par les agglomérations dépassant 20.000 habitants est estimé à 58 300 m³ par an. La réutilisation des eaux usées pour l'irrigation concerne en priorité les zones déficitaires en eau naturelle qui devient de plus en plus rare (Yazid, 2014).

Un vaste programme consiste à réutiliser les eaux usées épurées en aménageant des périmètres à l'aval de chaque station d'épuration et lagune. Le potentiel de cette ressource est estimé à 750 millions de m³ et atteindra le volume de 1,5 milliards de m³ à l'horizon 2020 (Tamrabet, 2011). Le nombre de STEP en cours d'étude et de réalisation est de 12 pour l'irrigation de plus de 8 000 hectares (ha) de terres agricoles.

Le potentiel de la réutilisation des eaux usées traitées à des fins agricoles évolue d'une manière significative et le nombre de stations concernées sera de 25 STEP à l'horizon 2014 (ONA, 2011).

1.2.1. La réutilisation indirecte

Elle se fait après passage de l'eau dans le milieu naturel (oued, rivière, lac, barrage etc...). Sur les 75 stations d'épuration exploitées en Algérie à travers les 43 wilayas, 14 seulement sont concernées par la réutilisation des eaux usées épurées en agriculture. A la fin de 2011, le volume réutilisé est estimé à 17 millions de m³ par an pour ces 14 STEP et plus de 10 000 ha de superficie agricoles sont irrigués (ONA, 2011).

1.2.2. La réutilisation directe

La mobilisation des eaux usées épurées est très faible actuellement, le seul ouvrage existant est celui situé à l'aval de la station d'épuration de Bordj Bou Arreridj d'une capacité de 2 500 m³/jour destiné à l'irrigation d'un périmètre de 100 hectares de superficie. Selon le programme 2009-2013, ce volume sera de 554 512 m³/jour (Benbraika, 2013).

1.3. Avantages de la réutilisation des eaux usées épurées

La réutilisation des eaux usées permet de fournir des quantités d'eau supplémentaires et d'assurer l'équilibre du cycle naturel de l'eau et une protection de l'environnement (Ouanouki, 2009). Elle constitue en outre, une alternative aux rejets dans les milieux récepteurs qui peuvent présenter des capacités d'absorption limitées. Par ailleurs, le contenu de ces eaux en fertilisants, notamment l'azote, le potassium et le phosphore incite les agriculteurs à les

utiliser. L'utilisation des eaux usées traitées peut également prévenir l'eutrophisation et éviter la croissance des algues dans les étendues d'eau fermées, telles que lacs et étangs (Yazid, 2014).

1.4. Risques liés à la réutilisation des eaux usées

Les eaux usées sont soumises à diverses sources de contaminants, limitant ainsi leur potentiel de réutilisation (BRGM, 2010). Elles peuvent contenir un grand éventail de constituants biologiques, organiques et inorganiques, dont certains peuvent être nocifs pour la santé et la sécurité des êtres humains en fonction de leur concentration et de la durée d'exposition (US NRC, 2012). Cependant, le niveau de préoccupation va surtout varier en fonction de l'usage qui est fait des eaux usées traitées, et donc des risques de contact entre ceux-ci et la population (US NRC, 2012). Les risques liés à la réutilisation des eaux usées sont :

- Le risque microbiologique ;
- Le risque chimique ;
- Le risque environnemental.

1.4.1. Risque microbiologique

La plus grande préoccupation associée à la réutilisation des eaux usées, même traitées, est la transmission potentielle de maladies infectieuses, essentiellement, les pathogènes entériques. Les fèces des personnes et des animaux infectés représentent la source principale des pathogènes présents dans les eaux usées. De ce fait, la nature et la concentration des microorganismes pathogènes des eaux usées dépendent de la santé des populations sources (Tamrabet et al., 2003). Dans le cas de l'agriculture, il est prouvé depuis longtemps que les micro-organismes pathogènes des animaux ne peuvent ni pénétrer ni survivre à l'intérieur des plantes (Sheikh et al., 1999). Les micro-organismes se retrouvent donc à la surface des plantes et sur le sol. Les feuilles et la plante créent un environnement frais, humide et à l'abri du soleil. Il peut donc y avoir une contamination pendant la croissance des plantes ou la récolte.

Les pathogènes survivent plus longtemps sur le sol que sur les plantes (Asano, 1998). Le mode d'irrigation a une influence directe sur le risque : ainsi, l'irrigation souterraine ou gravitaire peut nuire à la qualité des eaux souterraines et de surface. Des contaminations directes peuvent avoir lieu lors de la maintenance du système d'irrigation. L'irrigation par aspersion crée des aérosols contaminants qui peuvent être transportés sur de longues distances. Alors que l'irrigation gravitaire à la raie et par inondation exposent les travailleurs à des hauts risques sanitaires, notamment lorsque le travail de la terre se fait sans protection

(Peasey et al., 2000). Les nouvelles recommandations de l'OMS ont prévu des niveaux de risque selon la technique d'irrigation et les types des cultures (OMS, 2006).

1.4.2. Risque chimique

Il est lié aux éléments traces. La seule voie de contamination préoccupante pour les éléments traces est la consommation des plantes cultivées, dans lesquelles ils s'accumulent. L'accumulation des micropolluants dans les plantes est plus problématique, quoique certains de ces micropolluants soient d'intérêt en tant que facteurs de croissance des végétaux. Le compromis entre le risque sanitaire et l'intérêt agronomique doit être trouvé (Baumont et al., 2004).

1.4.2.1. Métaux lourds

Ils constituent, le problème principal pour la réutilisation des eaux usées traitées. A faibles concentrations, les métaux sont des éléments essentiels et indispensables pour les êtres vivants comme constituant et cofacteur de différentes enzymes, ils interviennent également dans diverses voies métaboliques comme catalyseurs (Fig. 02). Cependant, à des concentrations plus importantes que celles nécessaires à un développement optimal, les métaux inhibent la croissance et plusieurs processus cellulaires incluant la photosynthèse, la respiration, l'activité enzymatique mais également la synthèse de pigments et de protéines. La division cellulaire peut, également, être affectée. Les éléments métalliques surveillés sont le fer, le chrome, le zinc, le nickel, qui sont utiles au monde vivant en très faible quantité. Les métaux lourds ont un fort caractère bioaccumulatif et ont la particularité de ne pouvoir être éliminés. Ils changent simplement de forme (Cauchi et al., 1996). Les métaux lourds non indispensables au développement des végétaux, et qui sont dangereux d'un point de vue sanitaire sont l'arsenic, le nickel, et le Cd. Le nickel est peu toxique, mais il s'accumule facilement dans les tissus végétaux. Le Cd est le polluant non organique le plus préoccupant. Il est parfois présent à des concentrations importantes dans les eaux usées et il est très mobile dans le sol. Il s'accumule dans les plantes à de fortes concentrations engendrant la phytotoxicité (Gupta et al., 2007). Il peut s'accumuler dans l'organisme et provoquer de graves intoxications (Yang et al., 2008). L'OMS (1997) préconise un apport alimentaire moyen de 0.057 à 0.071 mg/j/individu. La FAO (2000) fixe comme un taux maximal dans les aliments de 0.1 mg/kg pour les légumes et 0.05 mg/kg pour les céréales et leurs dérivés (Eddabra, 2010).

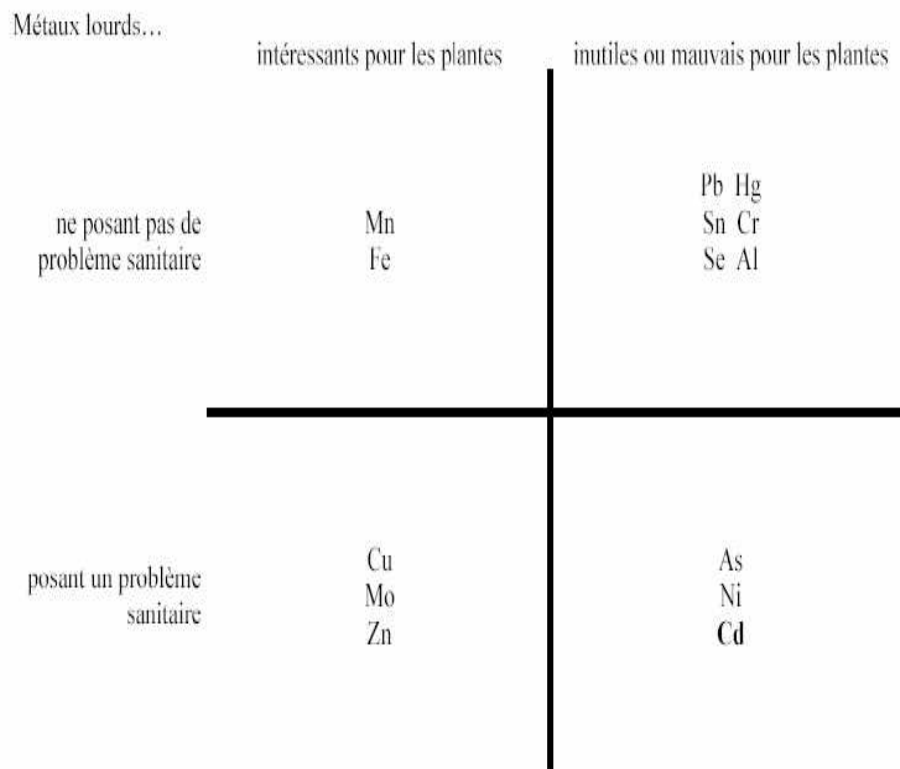


Figure 02: Classification des métaux lourds en fonction des risques et de l'intérêt agronomique (Tamrabet et al., 2003).

1.4.2.2. Micropolluants organiques

Le risque posé par les effets à long terme des micropolluants organiques est encore très peu étudié ainsi que celui d'apparition de nouvelles substances toxiques (Garban et al., 2003). L'existence de tels risques potentiels ne conduit, cependant, pas à une interdiction de l'utilisation d'eaux usées épurées pour l'irrigation (Jiries et al., 2002). La plupart des éléments traces sont peu solubles, et le traitement des eaux usées par décantation les élimine efficacement. On les retrouve plutôt dans les boues que dans les eaux usées épurées (Cauchi, 1996). Les concentrations infimes dans les effluents d'origine urbaine et leur absorption limitée par les végétaux réduisent le risque sanitaire dans le cas d'une réutilisation agricole (Cauchi, 1996). Le problème des pesticides et des métaux lourds est plus préoccupant dans le cas du recyclage des boues (Miquel, 2003).

1.4.3. Risque environnemental

Il réside dans la dégradation de la qualité des sols, des eaux souterraines et de surface. Les sols qui ont une bonne capacité de rétention assurent une bonne assimilation par les plantes et un étalement de la pollution dans le temps. La capacité d'épuration des sols est assurée par la fixation des substances polluantes (adsorption, précipitation), par la

transformation des molécules organiques par des micro-organismes et par l'exportation par les végétaux. Les sols ayant une perméabilité interstitielle (gravier, sable) permettent une bonne épuration à l'inverse des sols fissurés (calcaire, dolomies, granit, etc.). Les nappes libres sont les plus exposées à la contamination, non seulement parce qu'elles ne bénéficient pas d'une protection naturelle vers la surface, mais encore parce qu'elles sont en général peu profondes. Les nappes captives sont plus protégées mais peuvent être éventuellement contaminées par des forages ou un autre aquifère pollué. La réutilisation des eaux usées épurées peut donc être remise en cause dans des zones qui cumulent ces facteurs de risque. Les bactéries, les protozoaires et les helminthes sont très rapidement éliminés, par les phénomènes d'adsorption et de compétition trophiques selon les mêmes processus des traitements par percolation/infiltration. Seuls les virus posent des problèmes. Asano (1998) mentionne qu'au-delà de 3 m de profondeur, la quasi-totalité des virus est éliminée. D'après le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, les nitrates et les dérivés halogénés sont les plus préoccupants, parce qu'ils migrent en profondeur. Les eaux provenant de puits de moins de 30 m de profondeur sont plus polluées par l'azote que les eaux plus profondes (Froese, 1998). Les rejets directs d'eaux épurées posent des problèmes d'eutrophisation des cours d'eau, de qualité de l'eau destinée à la production d'eau potable et de contamination microbiologique des zones de conchyliculture. C'est pourquoi une réutilisation des eaux usées épurées est quasiment toujours préférable à un rejet direct dans le milieu (Tamrabet et al., 2003).

1.5. Les différentes réglementations dans le monde

1.5.1. Les recommandations de l'OMS

Les recommandations de l'OMS sont source d'inspiration pour de nombreux pays à travers le monde. Ces recommandations (Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture) ou « Recommandations sanitaires pour l'utilisation des eaux usées en agriculture et en aquaculture » (1989) sont les seules à l'échelle internationale (Tab. IV). Elles ne concernent que l'usage agricole et sont ciblées sur des paramètres exclusivement microbiologiques.

En 2000, elles ont été révisées, en intégrant les résultats de nouvelles études épidémiologiques (Blumenthal et al., 2000). Les modifications ont essentiellement porté sur la norme "œufs d'helminthes" qui pour certaines catégories est passée de 1 à 0,1 œuf/L. Ces recommandations sont destinées à une utilisation internationale et sont donc adaptées aux

pays en voie de développement. Elles représentent la limite au-delà de laquelle la santé publique n'est plus assurée (Belaid, 2010).

L'OMS a publié en 2006 de nouvelles lignes directrices sur l'utilisation des eaux usées (WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater), qui tiennent compte des situations locales et privilégient les moyens à prendre pour réduire au minimum les risques sanitaires posés par ces eaux. L'approche innove surtout parce qu'elle encourage l'adoption de mesures relativement simples pour protéger la santé à tous les maillons de la chaîne alimentaire. Il s'agit d'une approche à barrières multiples qui cherche à protéger la santé des consommateurs avant que les aliments irrigués au moyen d'eaux usées n'atteignent leur assiette. Cette approche peut inclure la combinaison des éléments suivants: le traitement des eaux usées, la restriction des cultures, les techniques d'irrigation, le contrôle de l'exposition aux EU ainsi que le lavage, la désinfection et la cuisson des produits (OMS, 2006).

1.5.2. Les recommandations de l'USEPA

L'USEPA (United States Environmental Protection Agency) a publié en 1992, en collaboration avec l'USAID (United States Agency of International Development), ses propres recommandations sur la REUE, intitulées "Guidelines for Water Reuse" (USEPA, 1992). Contrairement à l'OMS, ces normes ne sont pas basées sur des études épidémiologiques et une estimation du risque, mais sur un objectif de zéro pathogène dans les eaux réutilisées. Les normes microbiologiques sont donc beaucoup plus strictes. Ces normes concernent tous les usages envisageables des eaux usées épurées (usage urbain, agricole, industriel, recharge de nappe, etc.) ce qui en fait un outil important. Précisons que chaque État américain peut lui même fixer ses propres recommandations, en s'inspirant plus ou moins de celles de l'USEPA.

Les recommandations de l'USEPA portent sur plusieurs paramètres notamment : le pH, la DBO₅, la turbidité ou les MES et les coliformes fécaux (CF). Il faut retenir que seul le facteur " CF " permet de juger de la qualité microbiologique. Le pH est toujours fixé entre 6 et 9. La turbidité ne doit pas dépasser en général 2 NTU. La DBO₅ maximale est fixée soit à 10 mg/L, soit à 30 mg/L, selon les usages.

Les CF doivent être soit en concentration inférieure à 200 CF/100 mL (pour l'irrigation avec restriction, les usages paysagers, industriels et environnementaux), soit à un niveau de non détectabilité (pour l'irrigation sans restriction, la baignade et la réutilisation indirecte pour l'eau potable).

Tableau IV: Recommandations microbiologiques révisées de l'OMS pour le traitement des eaux usées avant utilisation en agriculture (Blumenthal et al., 2000).

Catégorie	Conditions de réutilisation	Groupe exposé	Nématodes Intestinaux (nombre d'œuf par litre-moyenne aréthmique)	Coliformes intestinaux nombre par 100ml moyenne géométrique	Procédé de traitement susceptible d'assurer la qualité microbiologique voulue
A	Irrigation de culture destinée à être consommée crue, de terrain de sport, des jardins publics ^d	Ouvriers agricoles, consommateurs, public	≤1	≤1000	Une série de bassins de stabilisation conçue de manière à obtenir la qualité microbiologique voulue ou tout autre procédé de traitement équivalent
B	Irrigation des cultures céréales, industrielles et fourragères des pâturages et des plantations d'arbres	Ouvriers agricoles	≤1	Aucune norme n'est recommandée	Rétention en bassins de stabilisation pendant 8-10 jours au tout autre procédés d'élimination des helminthes et des coliformes intestinaux
C	Irrigation localisée de la catégorie B, si les ouvriers agricole et le public ne sont pas exposés	Néant	Sans objet	Sans objet	Traitement préalable en fonction de la technique d'irrigation mais au moins sédimentation primaire

^a Dans certains cas, il faut tenir compte des conditions locales épidémiologiques, socio-culturelles et environnementales et modifier les directives en conséquence.

^b Espèces *Ascaris* et *Trichuris* et ankylostomes.

^c Pendant la période d'irrigation.

^d Une directive plus stricte (≤200 coliformes intestinaux par 100ml) est justifiée pour les pelouses avec lesquelles le public peut avoir un contact direct, comme les pelouses d'hôtels.

^d Dans le cas des arbres fruitiers. L'irrigation doit cesser deux semaines avant la cueillette et les fruits tombés ne doivent jamais être ramassés. Il faut éviter l'irrigation par aspersion.

1.5.3. Directives de la FAO

La FAO établit en 1974 des directives concernant la qualité physicochimique et d'éléments traces métalliques de l'eau d'irrigation dans lesquelles l'accent était mis sur l'influence à long terme de la qualité de l'eau, sur la production agricole, sur les conditions du

sol et les techniques culturales (Ayers et Westcot, 1988). Ces directives générales sont présentées dans le tableau V.

Tableau V : Concentrations maximales d'éléments à l'état de trace recommandées pour les eaux d'irrigation (Pescod, 1992; Ayers and Westcot, 1994).

Elément	Concentration maximale mg/l	Observation
Aluminium	5.0	Peut provoquer la stérilité des sols acides pH < 5.5, mais les sols sodiques précipiteront l'ion et élimineront la toxicité à pH >7.0
Arsenic	0.1	La toxicité à l'égard des plantes varie de 12 mg/l pour le Sudan à 0.05 mg/l pour le riz
Béryllium	0.1	La toxicité vis-à-vis des cultures varie de 5 mg/l pour le chou à 0.5 mg/l pour le haricot
Cadmium	1.0	Toxique pour les haricots, les betteraves et les navets à des faibles concentrations (0.1 mg/l dans la solution nutritive). Des limites prudentes sont recommandées en raison des possibilités des concentrations dans les sols et les végétaux, dangereuses pour l'Homme
Cobalt	0.05	Toxique pour la tomate à 0.1 mg/l dans la solution nutritive
Chrome	0.1	N'est en général pas considéré comme un élément essentiel pour la croissance, en raison d'un manque d'information sur ses effets toxiques, on recommande des limites prudentes
Cuivre	0.2	Toxique pour un certain nombre de plantes à partir des concentrations de 0.1 à 1 mg/l
Fer	5.0	Pas toxique pour les plantes dans les sols aérés, mais peut contribuer à l'acidification des sols et à la baisse de la disponibilité du phosphore et de molybdène essentiels, peut provoquer en aspersions hautes, Des dépôts peu esthétiques sur les plantes, l'équipement et les bâtiments
Lithium	2.5	Toléré par les cultures jusqu'à 5mg/l, mobile dans le sol, toxique pour les agrumes à des concentrations faibles 0.075 mg/l agit comme le bore
Manganèse	0.2	Toxique pour un certain nombre de plantes à partir de quelques dixièmes de mg/l à quelques mg/l mais en général dans les sols acides
Molybdène	0.01	Non toxiques pour les cultures à des concentrations normales dans le sol et l'eau peut être toxique pour le bétail lorsque le fourrage pousse sur des sols à forte concentration de molybdène disponible
Nickel	0.2	Toxique pour un certain nombre de plantes à partir de concentration variant de 0.5 à 1.0 mg/l, toxicité réduite avec un pH neutre et alcalin
Plomb	5.0	Peut inhiber la croissance des cellules végétales
Sélénium	0.02	Toxique pour les cultures à des concentrations aussi faibles que 0.025 mg/l et toxique pour le bétail si le fourrage est cultivé sur des sols avec un niveau relativement élevé de sélénium apporté, essentiel aux animaux mais à des concentrations très basses
Etain		Exclu efficacement pour les plantes ; tolérance spécifique inconnue
Vanadium	0.1	Toxique vis-à-vis de nombreux végétaux à des concentrations faibles

Si la performance des méthodes analytiques actuelles s'est sensiblement accrue ces dernières années, la détection simultanée dans des échantillons de tous les contaminants présents s'avère irréalisable. En outre, ces méthodes d'analyse se limitent à la détection des seuls flux de polluants sans évaluer l'effet de ces pollutions sur les organismes. De ce constat sont nés différents outils biologiques tels que les tests de génotoxicité pour surveiller la qualité des eaux et détecter d'éventuelles pollutions.

Dans ce chapitre, on va présenter les différents tests de génotoxicité choisis dans cette étude, leurs principes, les avantages et les inconvénients de leurs utilisations.

1. Tests de génotoxicité et de mutagénicité

Les tests de génotoxicité et de mutagénicité ont pour but de mettre en évidence l'induction de modifications (dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN), mutations, transformations cellulaires *in vitro* etc...) considérées comme plus ou moins prédictives d'un potentiel mutagène et donc cancérigène. Les tests les plus fréquemment utilisés sont les tests d'Ames, la mesure des adduits à l'ADN, les tests des comètes, des micronoyaux (MN_x), et le test des aberrations chromosomiques (AC). Parmi ces tests, il faut distinguer ceux qui permettent de mesurer le potentiel génotoxique de ceux qui mesurent le pouvoir mutagène d'une substance (Tarantini, 2009).

Le pouvoir génotoxique d'une substance correspond à sa capacité à altérer le matériel génétique d'une cellule en se fixant de manière covalente à l'ADN, en produisant des espèces réactives de l'oxygène qui peuvent générer des dommages au niveau de l'ADN (oxydation de bases, cassures de brins d'ADN etc...) ou encore en inhibant les systèmes de réparation. Le test des comètes et la mesure des adduits à l'ADN permettent de détecter ces lésions dites primaires à l'ADN. D'autres modifications touchent les chromosomes, en entraînant soit des anomalies de structures, et on parle alors de mutations chromosomiques, soit des anomalies de nombres, ce sont les mutations génomiques. Le test des MN_x et la mesure des aberrations chromosomiques permettent de mesurer ce type d'anomalies. Le pouvoir mutagène d'une substance correspond à sa capacité à générer des mutations, c'est à- dire des transformations permanentes du nombre ou de la structure des gènes. Ces mutations peuvent altérer la séquence d'un gène par la modification d'un ou plusieurs nucléotides (additions, délétions, substitutions de nucléotides etc...). On parle alors de mutations géniques. Ce type d'anomalies peut être en mis en évidence par le test d'Ames (Tarantini, 2009).

1.1. Test d'Ames

Le test d'Ames fut décrit en 1973 par Bruce Ames. Ce test consiste à examiner si une substance toxique est capable d'induire des mutations sur l'opéron histidine (His^-) chez une bactérie : *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) (Cheriot, 2007).

Les souches de *S. typhimurium* utilisées sont porteuses d'une mutation sur l'un des gènes gouvernant pour la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation (His^-) rend les souches incapables de se développer sur milieu de culture dépourvu d'histidine (souches auxotrophes). Avec une fréquence propre à chaque souche, ces mutations (His^-) peuvent reverser spontanément vers (His^+) (souches prototrophes). Les bactéries porteuses de cette mutation, peuvent alors pousser sur milieu dépourvu de cet acide aminé. La fréquence de ces mutations peut être considérablement augmentée en exposant les bactéries à un agent mutagène. Le test d'Ames permet de quantifier l'induction de ces mutations reverses His^+ (Cheriot, 2007).

Les souches bactériennes de nature génétique différente utilisées sont porteuses de mutations His^- différentes qui permettent de tester des agents mutagènes variés (Tab.VI). En plus de ces mutations spécifiques sur l'opéron His, ces souches possèdent des caractères génétiques qui permettent d'augmenter leur sensibilité à l'agression génotoxique (Mortelmans et Zeiger, 2000).

- ❖ **Mutation his D 3052** : mutation dans TA1538 et TA98, ces bactéries sont déficientes à l'enzyme histidinol déshydrogénase. La TA1538 et sa dérivée r-factor TA98, détectent des mutagènes de type « frameshift ». Cette mutation à la séquence (CGCGCGCG), est reversée par le frameshift (GCGCGCGC.) mutagènes tel que 2-nitrosofluorène et le daunomycine ce qui conduit à la restauration du cadre de lecture correct pour la synthèse de l'histidine.
- ❖ **Mutation his G 46** : mutation présente dans TA100 et TA1535, ces bactéries sont déficientes à la première enzyme qui entre dans la synthèse de l'histidine. Elle est déterminée par la séquence -GGG- CCC-La TA1535 et sa dérivée r-factor TA100, détectent les mutagènes qui causent des substituants des paires de base.
- ❖ **Mutation his C 3076** : C'est une mutation frameshift dans TA1537, elle n'est pas séquencée mais il est connu qu'elle contient une cytosine de plus dans une série d'au moins 4 cytosines.

- ❖ **Mutation rfa** : cette mutation cause la perte partielle des polysaccharides à la surface de la barrière cellulaire de la bactérie ce qui augmente sa perméabilité aux grandes molécules qui sont incapables de pénétrer dans la cellule normale.
- ❖ **Mutation uvrB** : c'est une délétion du gène codant pour le système de réparation « excision resynthèse », conférant une augmentation de la sensibilité à la détection des mutagènes. Pour des raisons techniques la délétion du gène uvrB s'étend jusqu'au gène biotine et par conséquent, la bactérie est aussi auxotrophe à la biotine pour croître.
- ❖ **Plasmide pKM 101** : Ce plasmide porte le gène de résistance à l'ampicilline, il est présent dans les souches TA98 et TA100. ces souches portant le facteur de résistance se reversent par des mutagènes qui sont faiblement détectés par les autres souches. pKM 101 qui contient deux gènes amplifiant le processus SOS de réparation responsable de la mutagenèse induite.

Tableau VI : Les caractères génétiques des souches bactériennes du test d'Ames (Mortelmans et Zeiger, 2000).

Souches	Gènes affectés	Mutations additionnelles			Types de mutation
		Réparation	LPS	plasmide	
TA 1535	His G46	uvrB ⁻	rfa	-	substitution
TA1537	HisC3076	uvrB ⁻	rfa	-	frameshift
TA1538	His D3052	uvrB ⁻	rfa	-	frameshift
TA97	His O1242 His D6610	uvrB ⁻	rfa	PKM101	frameshift
TA98	His D3052	uvrB ⁻	rfa	PKM101	frameshift
TA100	His G46	uvrB ⁻	rfa	PKM101	substitution
TA102	His G428	+	rfa	PKM101 (pAQ1)	substitution

1.1.1. Protocole expérimental

Ce test consiste à réaliser une série de mélange de la souche bactérienne et de quantités croissantes de la substance à tester et à les étaler sur un milieu gélosé ou seul les révertants His⁺ pourront se développer. Certains agents mutagènes n'agissant que sur des bactéries en croissance, des traces d'histidine sont ajoutées au milieu de culture afin de permettre deux à trois cycles de division de bactéries. Après incubation 48h à 72h à 37° C, les révertants His⁺ apparaissant sous forme de colonies sont dénombrées (Mortelmans et Zeiger, 2000).

Une substance peut ne pas être mutagène sous sa forme primitive, mais peut agir par l'intermédiaire de l'un ou de plusieurs de ses métabolites. Dans le test d'Ames cette métabolisation est assurée en ajoutant au mélange souche/substance un activateur métabolique appelé S9Mix (homogénat de foie de rat contenant les enzymes plus du NADPH).

Lors de chaque essai, des contrôles doivent être réalisés pour chacune des souches utilisées :

- Taux de réversion spontanée ;
- Absence de réponse du solvant utilisé témoin négatif ;
- Réponse à des mutagène de référence avec et sans S9Mix (témoin positif) (Cheriot, 2007).

Les techniques disponibles pour effectuer le test d'Ames sont :

* **Le spot-test** : Qui est un pré-test. Le produit en solution est déposé sous forme de goutte sur le milieu minimal préalablementensemencé avec la souche. Cette technique permet d'évaluer rapidement les doses à tester par les autres techniques.

* **La méthode standard** : Le mélange produit-bactéries est étalé directement sur boîte de Pétri. C'est la méthode de référence.

* **La méthode avec pré-incubation en milieu liquide** : Les bactéries sont placées en contact avec le produit en milieu liquide. Cette méthode permet de détecter certains produits qui sont négatifs par la méthode standard (30-90minutes) (Mortelmans et Zeiger, 2000).

1.1.2. Avantages et inconvénients

Le succès du test d'Ames vient de sa simplicité d'exécution et de son coût modique. De plus, ce test est rapide (48h) et sensible. Il donne une réponse quantitative permettant des études comparatives. Sa souplesse dans les différents protocoles lui permet de s'adapter à des échantillons variés. Son pouvoir prédictif (mutagènes qui sont cancérogènes) est de 70-90 % selon les études. De par sa simplicité et son faible coût de revient, le test d'Ames est le plus utilisé des tests de Toxicologie Génétique. Parmi tous les tests disponibles, sa banque de données est certainement la plus importante. Enfin, il a été validé dans de nombreux pays.

Cependant, le test d'Ames est un test bactérien. Il représente une simulation approximative de ce qui peut se passer chez l'homme (métabolisme, système de réparation de l'ADN, systèmes de toxification, conditions d'exposition et de diffusion des produits dans l'organisme cible).

La présence d'histidine dans des échantillons biologiques peut induire de fausses réponses positives et certains produits bactéricides (antibiotiques) peuvent induire des fausses réponses négatives. La sensibilité (cancérigènes qui sont mutagènes) est de 40-50%. Les souches bactériennes sont génétiquement instables. Ce test exige un équipement de laboratoire qui est propre à un laboratoire de bactériologie. Ceci peut être un investissement initial important pour un laboratoire non équipé (Mortelmans et Zeiger, 2000).

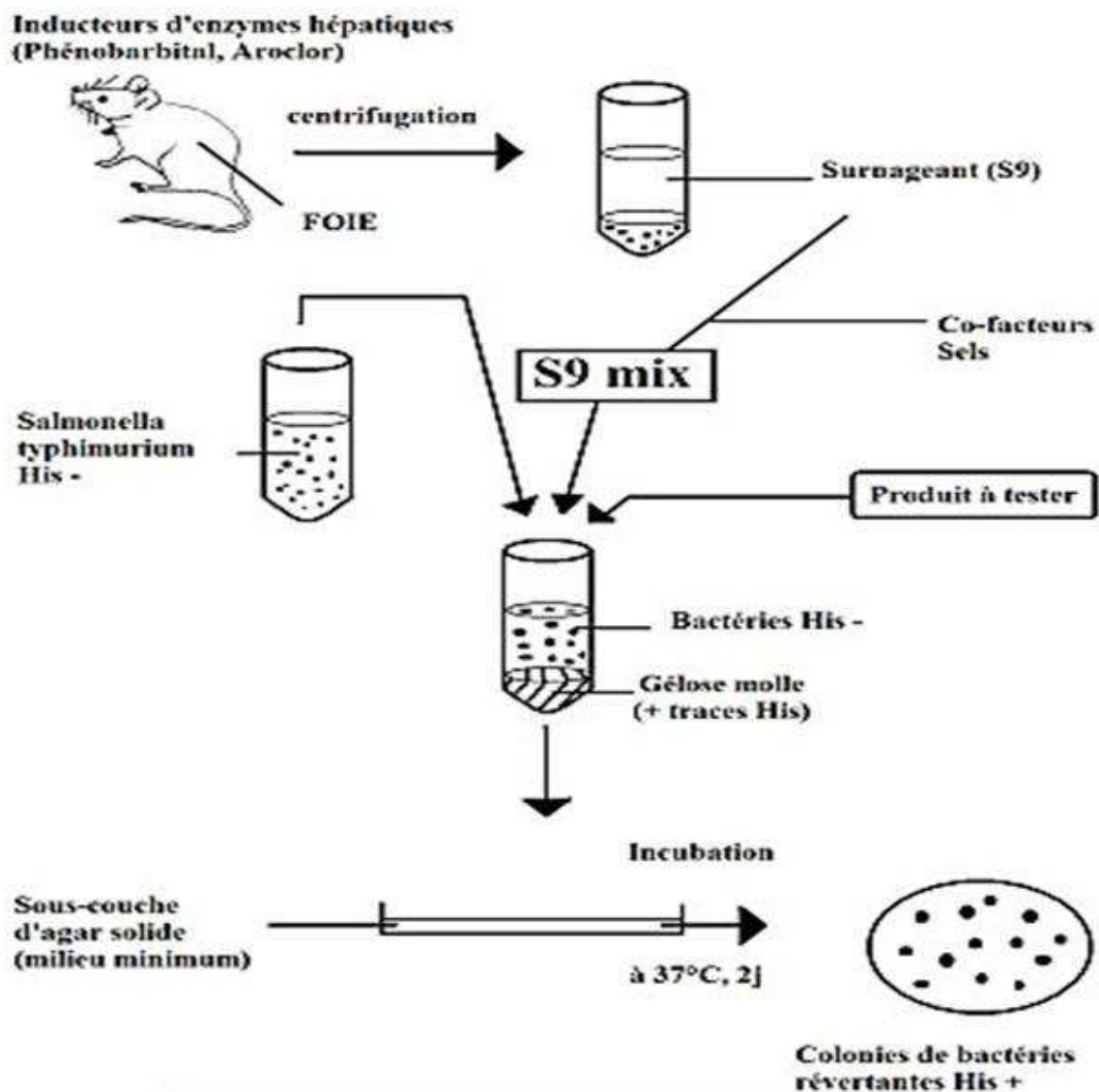


Figure 03 : Principe du test d'Ames (Mortelmans et Zeiger, 2000).

1.2. Test des aberrations chromosomiques dans les racines

Le test des AC consiste à examiner au microscope optique et déceler des anomalies telles que des cassures de chromosomes avec ou sans délétion, des modifications de structures et d'appariements, des erreurs survenues en cours de mitose (échanges entre chromatides sœurs etc...). Cet examen se fait au cours de la métaphase de la mitose. La fréquence des aberrations est évaluée sur 200 mitoses par lames de microscope. L'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques est prédictive de la survenue de cancers (Tarantini, 2009).

1.2.1. Test des aberrations chromosomiques dans les racines d'*Allium cepa*

1.2.1.1. Présentation générale d'*Allium*

Allium cepa ($2n=16$), l'oignon, fait partie de la famille des alliacées. Cette plante est cultivée dans de trois nombreux pays pour son usage alimentaire. Le caryotype présente cinq paires de chromosomes (de 8 à 16 m) avec des centromères situés de façon médiane à submédiane, deux paires dans lesquelles les centromères sont submédians et une paire de chromosomes satellites (Cotelle, 1999).

Différentes variétés d'oignon peuvent être utilisées dont notamment une variété à petits bulbes, une variété américaine à gros bulbes jaunes et une troisième variété mexicaine à petits bulbes appelés, en France, oignon blanc printaniers. *Allium cepa* permet l'évaluation de divers critères de toxicité et de génotoxicité. Pour ce qui est de la toxicité, l'élongation racinaire d'*Allium cepa* est très souvent déterminée en parallèle avec les études de génotoxicité. Ce critère présente une bien meilleure répétabilité et une plus grande facilité de mesure (les racines d'*Allium* poussent de façon très homogène et forment un ensemble de racines de longueur égale (Cotelle, 1999).

1.2.1.2. Les critères de génotoxicité déterminés sur *Allium cepa*

Allium cepa est utilisé depuis longtemps dans les études sur les chromosomes et en particulier sur les effets des rayons X (Marshak, 1937) mais c'est levan qui fut, en 1938, le premier scientifique à évaluer les effets du traitement d'*Allium cepa* à un produit chimique, à savoir la colchicine, la modification du comportement mitotique due à la colchicine fut baptisé c-mitose qui se traduit d'*Allium cepa* ont surtout été utilisées pour évaluer le nombre d'AC. Ce critère s'est avéré très sensible pour détecter le potentiel génotoxique de produits chimiques (Fiskesjo, 1988), métaux (Borboa et De la Torre, 2006), produits phytosanitaires ou autres substances organiques.

D'autres critères ont aussi été étudiés dans les racines d'*Allium cepa* : les échanges de chromatides sœurs, la formation des MN_x etc...(Cotelle, 1999).

1.2.1.3. Avantages de l'utilisation de la plante *Allium cepa* dans les tests de génotoxicité

Selon nombreux auteurs, les tests de génotoxicité sur plantes devraient davantage être intégrés dans les études écotoxicologiques en complémentarité avec d'autres tests ou en tant que première étape de la détection de la génotoxicité potentielle des substances chimiques et des matrices complexes (Grant, 1994). Les avantages de l'utilisation des plantes supérieures dans ce type de tests sont :

- Le nombre et la structure des chromosomes de certaines plantes supérieures. Les anomalies mitotiques sont faciles à détecter lorsque les chromosomes sont longs et en nombre réduit. Par exemple: *Allium cepa* ($2n = 16$), offrent d'excellents systèmes de cytogénicité et permettent la détection des aberrations chromosomiques lors de la méiose et de la mitose ainsi que l'endommagement de l'ADN (Grant, 1999).
- Le cycle de développement très court de certaines espèces (*Arabidopsis*).
- Evaluation aisée de la génotoxicité des polluants chimiques utilisés purs ou en mélange.
- Evaluation de la pollution des sols. En effet, ces plantes participent au transfert des composés polluants le long de la chaîne alimentaire.
- La facilité de manipulation (Cotelle, 1999).

1.3. Test des micronoyaux

Le test de MN est pratiqué *in vivo* chez des mammifères en vue de détecter des lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes résultant de l'action d'une substance d'essai. Il est basé sur l'analyse d'érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse et/ou dans les cellules du sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs. Le test de MN a pour but de détecter des substances qui engendrent des lésions cytogénétiques et des MN_x dans lesquels il reste des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers. Lorsqu'un érythroblaste de moelle osseuse se transforme en érythrocyte polychromatique, le noyau principal est expulsé et chaque micronoyau qui s'est formé peut subsister dans le cytoplasme par ailleurs anucléé. La visualisation des MN_x est facilitée par l'absence du noyau principal.

Un accroissement de la fréquence des MN_x dans les érythrocytes polychromatiques des animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique (Schmid, 1997).

1.3.1. Mécanisme de formation des micronoyaux

Les MN sont de petites entités nucléaires qui peuvent être constituées :

- De chromosomes entiers, perdus au cours de la mitose précédente. Ils représentent alors la conséquence d'une altération des structures cellulaires impliquées dans la disjonction, la ségrégation et la migration des chromosomes. Les divers systèmes protéiques impliqués sont représentés par l'appareil mitotique, constitué de diverses catégories de microtubules gérant l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique puis la migration des chromosomes à l'anaphase, les centrosomes, à partir desquels se structure l'ensemble des microtubules, et les kinétochores (Fenech et al., 2005). La formation de ces micronoyaux est consécutive à l'action d'agents aneugènes.

-De fragments chromosomiques acentriques. Ils représentent alors la conséquence d'une cassure double brin non réparée de la molécule d'ADN, l'extrémité du bras chromosomique cassé n'étant plus rattachable au fuseau mitotique, faute de centromère. Les cassures double brin qui résultent de ces modifications représentent des lésions primaires de l'ADN particulièrement sévères car difficilement réparables. La non réparation d'une cassure double brin peut mener à un réarrangement asymétrique des chromosomes donnant un chromosome dicentrique et un fragment acentrique (Mateuca et al., 2006). Les centromères des chromosomes dicentriques sont tirés aux pôles opposés de la cellule en anaphase formant un pont nucléoplasmique entre les deux cellules filles et un fragment acentrique qui formera un MN (Thomas et al., 2003 ; Fenech, 2005). Ces MN_x peuvent être directement induits par des agents génotoxiques dits clastogènes, les plus connus d'entre eux étant les rayonnements ionisants et les composés chimiques, tels que la bléomycine, considérés comme des agents radiomimétiques. Ces deux types de contenu correspondent à des mécanismes de formation fondamentalement différents. En conséquence, les MN_x témoignent de la survenue d'événements aneugènes et/ou clastogènes.

La Figure 04 représente schématiquement les mécanismes de formation des MN_x après blocage en cytodiérèse. Le dénombrement des cellules micronucléées au sein de la population de cellules binucléées permet de ne quantifier que les anomalies chromosomiques de nombre et/ou de structure qui n'ont pas empêché la cellule de se diviser.

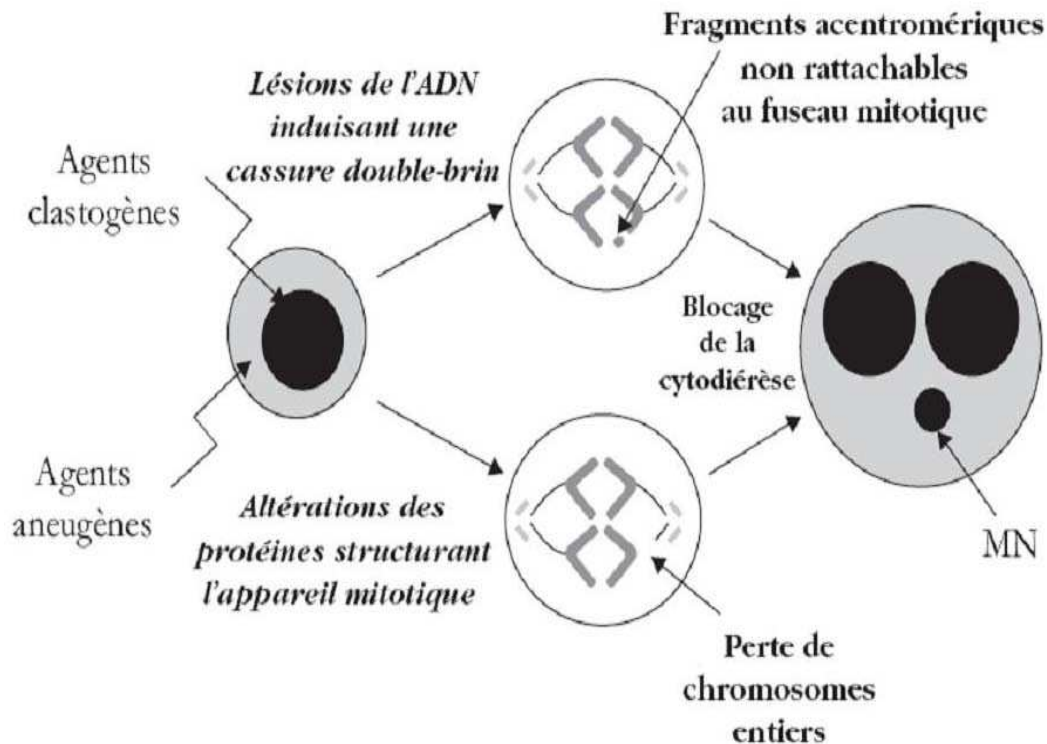


Figure 04 : Mécanisme de formation des MN_x (Darolles, 2010).

1.3.2. Principe du test des micronoyaux

Ce test est susceptible d'être mis en œuvre sur toutes les cellules eucaryotes capable d'effectuer une division cellulaire en culture (cellules vésicales, endobuccales, fibroblastes, kératinocytes, etc...). Il est surtout actuellement appliqué aux lymphocytes en culture utilisés comme « cellules modèles » : il consiste alors à dénombrer les MN_x présents dans les lymphocytes binucléés obtenus par blocage de la division cytoplasmique par de la cytochalasine B (inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine) après une division nucléaire complète (Fenech et Morley, 1985 ; OCDE, 2007). Cette méthode permet de distinguer les cellules mononucléées, qui ne se sont pas divisées, et les cellules binucléées, qui ont réalisées une division nucléaire complète.

1.3.3. Avantages et Inconvénients

Ce test présente un certain nombre d'avantages :

- Mise en évidence des mutations chromosomiques et/ou génomiques ;
- Détection à la fois des substances clastogènes et aneugènes et ne met en évidence que les mutations non létales pour la cellule ;

- Associable à une étude de la qualité du matériel génétique contenu dans le MN (présence ou non de centromères, type de chromosome altéré, nature exacte de l'altération) par hybridation " in situ " fluorescente ce qui apporte des éléments mécanistiques fondamentaux à l'interprétation des résultats.

Comme il présente certains inconvénients :

- Des résultats variables en raison de facteurs de confusion, tels le tabac qui augmente le nombre de MN_x, ou les médicaments comme les rétinoïdes qui les diminuent, mais aussi des différences de qualité dans les protocoles de préparations (Darolles, 2010).

Les eaux usées constituent un milieu complexe dans lequel il est presque impossible d'identifier, et plus encore de doser, tous les composés potentiellement toxiques, en raison de leur nombre élevé et de la faible concentration à laquelle ils sont généralement présents. Bien que ces eaux soient traitées en STEP, les procédés employés ne sont pas toujours suffisamment efficaces pour éliminer tous les polluants notamment les composés génotoxiques (Ono et al., 1996 et Jolibois et al., 2009).

L'objectif de notre travail pratique est d'évaluer l'efficacité du traitement d'épuration de la STEP de la ville de Guelma. Cette étude est composée de deux parties :

- La première partie concerne la caractérisation physicochimique et microbiologique des échantillons des eaux usées prélevés de la STEP de la ville de Guelma.
- La deuxième partie sera consacré à l'évaluation de la génotoxicité des échantillons d'eaux usées et ceci par différents tests biologiques.

1. Description de la STEP des eaux usées de la ville de Guelma

1.1. Localisation

La STEP de Guelma est située sur la route nationale N°21, pont Héliopolis près d'Oued Seybouse. Elle est fonctionnelle depuis le 18 Février 2008 à raison d'un traitement d'environ 32000 m³/jour au temps sec et 43000 m³/jour au temps de pluie.

La station est implantée sur un terrain agricole de 7.8 hectares avec une capacité de 200000 équivalent / habitant. Elle utilise le procédé de culture libre (boue activée) comme procédé d'épuration. Les eaux usées urbaines de la ville de Guelma sont collectées sur deux bassins versant par un ensemble de réseaux d'assainissement existant. La STEP est alimentée par 02 conduites de refoulement :

- SR1 : alimentée par Oued El Maiz, avec un débit de 1575 m³/h.
- SR2 : alimentée par Oued Skhoun, avec un débit de 1125 m³/h.

1.2. Etapes du traitement d'épuration

L'épuration des eaux usées dans la STEP de la ville de Guelma consiste à un prétraitement (dégrillage, dessablage et déshuilage), un traitement primaire par décantation, des traitements biologiques secondaires par boues activées et un traitement tertiaire par chloration.

1.2.1. Prétraitement

Les dispositifs de prétraitement sont présents dans toutes les stations d'épuration, quels que soient les procédés mis en œuvre en aval (Fig. 05). Le prétraitement comporte une succession d'opérations physiques ou mécaniques destinées à séparer les eaux usées des matières volumineuses, en suspension ou flottantes, qu'elles véhiculent, (ONA, 2011).

Ces opérations consistent aux :

1.2.1.1. Dégrillage

Il consiste à faire passer les eaux usées à travers d'une grille dont les barreaux, plus au moins espacés, retiennent les éléments les plus grossiers: L'effluent passe pour cela entre les barreaux métalliques dont le nettoyage se fait soit automatiquement, soit manuellement, l'espacement de barreaux varie de 6 à 100 mm et sont placés verticalement ou inclinés de 60 à 80° sur l'horizontale.

Le nettoyage de la grille est généralement mécanique, il est réalisé par un râteau solidaire d'un chariot qui se déplace de bas en haut le long d'une crémaillère ou entraîné par deux câbles. Après nettoyage des grilles, les déchets sont évacués avec les ordures ménagères. (ONA, 2011).

1.2.1.2. Dessablage

Réalisé par décantation, le dessablage vise à éliminer les sables et les graviers. L'écoulement de l'eau à une vitesse réduite dans un bassin appelé « dessableur » entraîne leur dépôt au fond de l'ouvrage. Ces particules sont ensuite aspirées par une pompe. Les sables récupérés sont essorés, puis lavés avant d'être envoyés en décharge, soit réutilisés, selon la qualité du lavage (ONA, 2011).

1.2.1.3. Dégraissage-Déshuilage

Les opérations dégraissage-déshuilage consistent à séparer de l'effluent brut, les huiles et les graisses par flottation. Ces derniers étant des produits de densité légèrement inférieure à l'eau. L'injection des micro bulles d'air permet d'accélérer la flottation des graisses. Souvent ces opérations sont combinées dans un même ouvrage où la réduction de vitesse dépose les sables et laisse flotter les graisses. On enlève ainsi de l'eau les éléments grossiers et les sables de dimension supérieure à 200 microns ainsi que 80 à 90 % des graisses et matières flottantes (ONA, 2011).



Figure 05: Prétraitement (ONA, 2012).

1.2.2. Le traitement primaire (décantation primaire)

Après les prétraitements, il reste dans l'eau une charge polluante dissoute et des matières en suspension. Les traitements primaires ne portent que sur les matières décantables (décantation primaire).

Dans ce cas, la séparation qui s'effectue par gravité ne concerne que les particules de diamètre supérieur à 100 micromètre, celle de diamètre inférieur à 100 micromètres ne décantent pas, mais seront entraînées vers les unités ultérieures de traitement.

Les bassins de décantation sont des bassins à ciel ouvert, le plus souvent cylindriques, l'effluent brut arrive par un point central, les matières décantables en suspension dans l'eau vont se séparer de l'effluent et se déposer au fond du bassin ou elles seront raclées par un pont radial tournant et les eaux de surface seront déversées (Fig. 06). Les matières décantables ainsi obtenues par séparation de l'effluent appelées les boues primaires, seront récupérées et orientées vers le traitement des boues (ONA, 2011).



Figure 06 : Décanteur primaire (ONA, 2012).

1.2.3. Traitement secondaire (biologique)

Les traitements secondaires recouvrent les techniques d'élimination des matières polluantes solubles (carbone, azote et phosphore). Dans la majorité des cas, l'élimination des polluants carboné et azoté s'appuie sur des procédés de nature biologique. Le traitement biologique par « culture libre » est actuellement la technique utilisée pour l'épuration des eaux usées de la station de Guelma (Fig. 07). Le terme « culture libre » regroupe les procédés où l'on provoque pour le développement d'une culture bactérienne dispersée sous forme de floccs au sein du liquide à traiter.

Le principe général de ce procédé consiste à accélérer le processus d'oxydation naturelle de la matière organique qui survient dans les milieux récepteurs. Il est principalement mis en œuvre par la technique des boues activées. Cette technique consiste à mettre en contact les eaux usées avec un mélange riche en bactéries par brassage pour dégrader la matière organique en suspension ou dissoute. Il y a une aération importante pour permettre l'activité des bactéries et la dégradation de ces matières, suivies d'une décantation à partir de laquelle on renvoie les boues riches en bactéries vers le bassin d'aération (ONA, 2011).



Figure 07 : Bassin d'aération (ONA, 2012).

1.2.4. Décantation secondaire

Une décantation permet de recueillir sous forme de boues les matières agglomérées par les bactéries (les boues plus denses que l'eau, tombent au fond du bassin ou elles sont raclées). Un clarificateur (Fig. 08) permet de séparer par décantation l'eau épurée déversant. Tandis que les boues (secondaire) dont une partie sont évacuées vers le traitement des boues, et l'autre sont recyclées pour maintenir une masse biologique suffisante pour l'épuration (ONA, 2011).



Figure 08: Clarificateur (ONA, 2012).

1.2.5. Désinfection

Après la récupération des eaux clarifiées, ces dernières seront envoyées vers un bassin rectangulaire formé des chicanes afin de recevoir des doses de Javel qui sont préparés dans deux cuves de préparations de Javel à partir de l'hypochlorite de calcium (Fig. 09), cette javellisation permet de détruire les germes avant le rejet. Un contrôleur de chlore est installé à la sortie du bassin pour pouvoir contrôler le taux du chlore résiduel (ONA, 2011).



Figure 09: Bassin de désinfection (ONA, 2012).

2. Modalités de Prélèvement

Au niveau de la STEP de la ville de Guelma, des prélèvements instantanés sont réalisés après chaque niveau du traitement pour les paramètres physicochimiques et au niveau de trois points : entrée de la station, sortie du clarificateur et la sortie de la station et ceci pour les paramètres microbiologiques, génotoxiques et le dosage des métaux lourds. Les points de prélèvement des eaux usées sont représentés dans la figure 10.

Les prélèvements des eaux usées ont été réalisés durant les périodes suivantes : Avril 2012 (P1), Juillet 2012 (P2), Novembre 2012 (P3), Février 2013 (P4) et Avril 2013 (P5). Les flacons contenant les échantillons d'eaux usées à analyser sont transportés dans des conditions isothermes à 4°C. Les échantillons d'eau destinés à des analyses d'ions métalliques sont acidifiés à l'acide nitrique concentré 65% (Rodier, 2009)

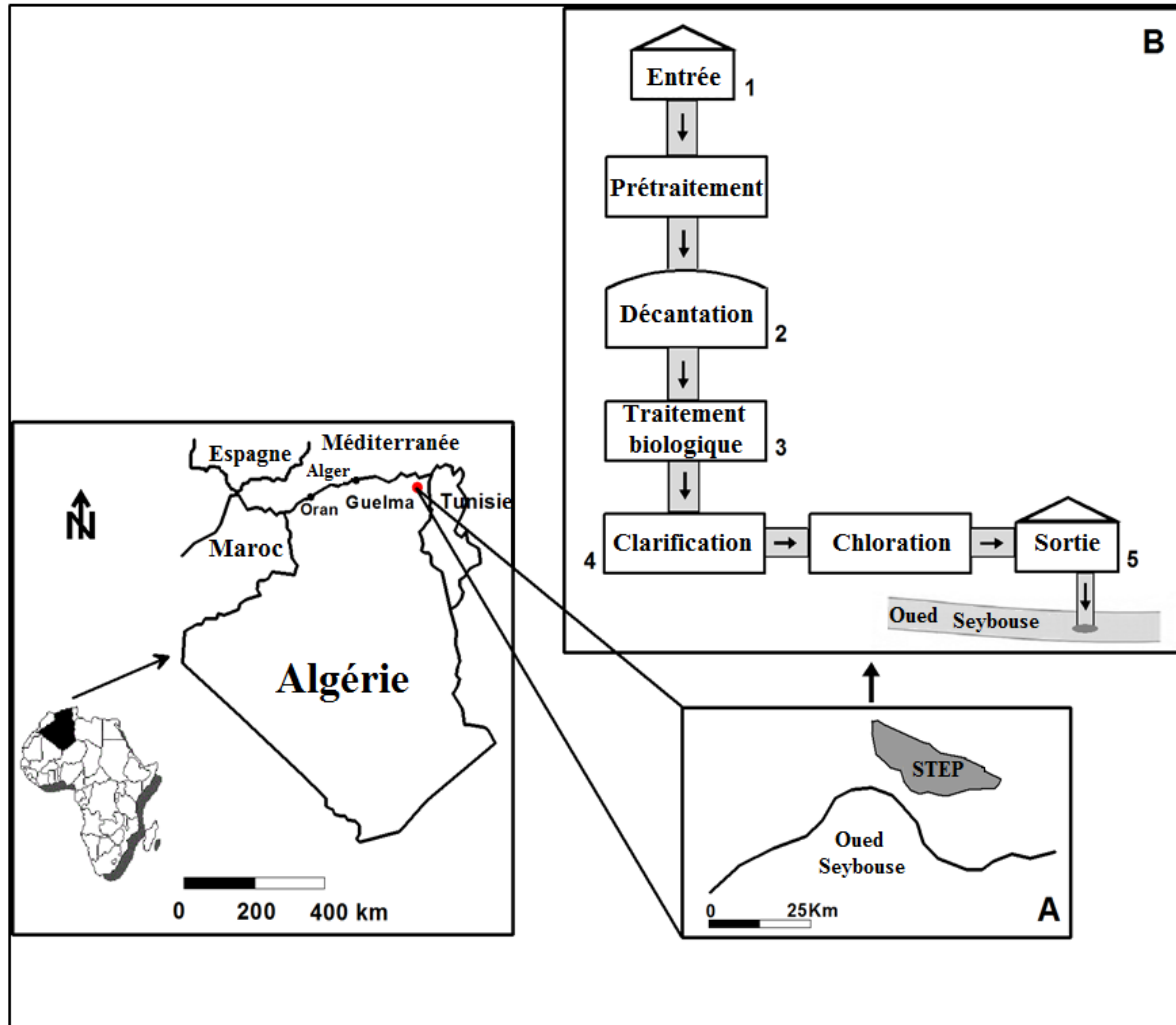


Figure 10 : Localisation du site d'étude (latitude 36°28'45,67" N, longitude 7°26'30,8" E).

(A) localisation de la station d'épuration de la ville de Guelma, (B) points de prélèvement (S1, S2, S3, S4 et S5).

3. Méthodes analytiques

3.1. Méthodes d'analyses physicochimiques et microbiologiques

3.1.1. Paramètres physicochimiques

3.1.1.1. Paramètres in situ

Le pH, la température et la conductivité électrique sont déterminés à l'aide d'un multi-paramètre analyser Type Eutech instrument.

3.1.1.2. Mesure de la demande chimique de l'oxygène

Le principe de mesure de la DCO consiste à faire bouillir à reflux pendant 2 heures, une prise de l'échantillon, en milieu acide, en présence d'une quantité de bichromate de potassium (oxydant), de sulfate d'argent (jouant le rôle d'un catalyseur d'oxydation) et de sulfate de mercure II (permettant de complexer les ions chlorures). On dose ensuite l'excès de bichromate de potassium. La méthode appliquée est celle de la norme française (NF T 90-101).

3.1.1.3. Mesure de la demande biologique de l'oxygène

Le principe de mesure de la DBO₅ consiste à déterminer la quantité d'oxygène consommée au bout de cinq jours d'incubation, dans les conditions d'essai, à 20°C dans une solution diluée de l'échantillon. Pour déterminer la DBO₅, deux mesures de l'oxygène dissout doivent être effectuées :

- A l'instant $t=0$, au moment d'incubation
- A l'instant $t=5$ jours, après 5 jours

La DBO₅ est déterminée par la méthode respiratoire à l'aide d'un DBO-mètre INOLAB selon la technique décrite par NFT 90-103.

3.1.1.4. Mesure des matières en suspension

Les MES sont déterminées par filtration d'un volume d'eau usée sur filtre cellulosique (de 0,45 μm) selon la méthode (NFT 90-105).

3.1.1.5. Dosage des Orthophosphates

La concentration des orthophosphates est déterminée par la méthode colorimétrique par formation en milieu acide d'un complexe avec le molybdate d'ammonium et le tartrate double d'antimoine et de potassium selon la méthode ISO 6878.

3.1.1.6. Dosage des nitrates (NO_3^-)

Le dosage des nitrates est déterminé par la méthode photométrique au salicylate de sodium (NFT 90-012).

3.1.1.7. Dosage des nitrites (NO_2^-)

Les nitrites sont déterminés par spectrométrie d'absorption moléculaire selon la méthode (ISO 5667).

3.1.1.8. Dosage de l'ammonium (NH_4^+)

La détermination de l'azote ammoniacal (NH_4^+) est effectuée par colorimétrie suite à une catalyse en milieu alcalin par une solution de nitroprussiate de sodium selon la méthode ISO 7150.

3.1.1.9. Dosage des métaux lourds

Les niveaux de Cd, de Cu et de Pb sont déterminés par ICP-MS (inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry). Cette technique permet une analyse multi-éléments rapide et précise d'échantillons en solution. Elle possède des limites de détection très basses, varient selon les éléments et les matrices.

a. Principe de fonctionnement de l'ICP-MS

L'analyse des échantillons par ICP-MS est divisée en quatre étapes:

- (1) Introduction-nébulisation ;
- (2) Ionisation ;
- (3) Séparation en masse et charge ;
- (4) Détection.

Une pompe périlstatique permet l'introduction de l'échantillon dans une chambre de vaporisation où le nébuliseur le transforme en un aérosol liquide composé de microgouttelettes de quelques μm à l'aide d'argon. L'aérosol ainsi formé est envoyé dans une torche à plasma d'argon (15 l.min^{-1}) à très haute température (entre 6000 et 10.000 °C), suffisante pour vaporiser, dissocier, atomiser et ioniser complètement la plupart des éléments. La partie détection s'effectue grâce à un multiplicateur d'électron à dynodes discrètes. Les ions aspirés dans les ouvertures de deux cônes en Nickel pur, sont focalisés par un système de lentilles électrostatiques vers le quadripôle. Le spectromètre de masse quadripolaire les sépare sous l'influence de 4 barreaux soumis à des variations de potentiels selon leur rapport masse/charge. Un analyseur multi-canaux enregistre les signaux électriques produits.

Le signal se traduit en nombre de coups (nombre d'impulsions), une interface informatique assure le transfert des données afin qu'elles soient traitées. Les nombres de coups sont convertis en concentrations grâce à l'utilisation de deux types de calibrations : externe (solutions étalons) et interne. Les étalons internes utilisés pour corriger la dérive instrumentale sont le bismuth et l'indium (Rabiet, 2006).

b. Préparation des échantillons, des solutions étalons et des blancs pour les éléments traces

Chaque échantillon destiné à l'analyse des éléments traces est préparé de la façon suivante :

- 9.65 ml d'échantillon ;
- 0.25 ml de HNO_3 ;
- 0.1 ml d'une solution de Bsmuthi-Indium à 1 mg/l (étalon interne).

Selon les niveaux de concentration, l'échantillon est dilué afin de se trouver dans la gamme de la droite de calibration. Un blanc analytique est systématiquement passé en début de chaque série analytique pour évaluer le bruit de fond de l'appareil. Il est préparé de la même manière et au même moment que les échantillons avec de l'eau ultrapure et les mêmes réactifs. Il est systématiquement soustrait des valeurs mesurées pour chaque échantillon (Rabiet, 2006).

3.1.2. Paramètres microbiologiques

Les analyses microbiologiques des eaux usées ont porté dans un premier temps sur le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale, des coliformes totaux (CT), des coliformes (CF), des streptocoques fécaux (SF), des anaérobies sulfito-réducteurs (ASR), des staphylocoques et des levures. Dans un second temps, l'isolement, la purification et l'identification de bactéries pathogènes ont été réalisés.

3.1.2.1. Dénombrement

L'analyse microbiologique des échantillons a été réalisée dès réception au laboratoire, afin d'éviter toute modification éventuelle de la concentration microbienne initiale. Une série de dilutions dans de l'eau distillée stérile est réalisée. Seules les dilutions 10^{-2} et 10^{-3} sont utilisées pour le dénombrement des germes totaux (GT) et les indicateurs de contamination fécale (CF et SF).

a. Dénombrement des germes totaux

La recherche et le dénombrement des germes revivifiables se réalise sur milieu Glucose Tryptone Extrait Agar (TGEA) à deux températures différentes afin de cibler à la fois les microorganismes à tendance psychrophiles soit à 22°C et ceux franchement mésophiles soit à 37°C (Rodier, 2009).

b. Dénombrement des indicateurs de contamination fécale

La recherche et le dénombrement des CF et des SF ont été effectués selon la méthode de dénombrement en milieu liquide par détermination du nombre le plus probable (NPP). Les résultats de dénombrement sont déterminés à partir de la table de Mac Grady (Rodier, 2009).

b.1. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux

La colimétrie consiste à déceler et dénombrer les germes coliformes dont les CF, Elle se réalise en deux étapes :

- La recherche présomptive des coliformes sur milieu Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésolé (BCPL).
- La recherche confirmative des CF sur milieu Schubert (Abouelouafa, 2002).

b.2. Dénombrement des streptocoques fécaux

Les SF sont dénombrés en milieu liquide à l'aide de deux bouillons de culture (milieu de Rothe et le milieu Eva-Litsky). Cette méthode fait appel à deux tests consécutifs à savoir: test de présomption suivi du test de confirmation (Abouelouafa, 2002).

b.3. Dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs

Les ASR se présentent sous forme de bactéries Gram positif, se développant en 24 à 48 heures sur une gélose viande foie (VF) en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium (Na_2SO_3) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe^{2+} donne FeS (sulfure de fer) de couleur noire. Les spores des ASR constituent généralement des indices de contamination ancienne (Eddabra., 2011).

b.4. Abattement des bactéries fécales

L'abattement des différents types d'indicateurs de contamination fécale a été étudié sur la STEP de la ville de Guelma. L'abattement considéré par cette étude est la différence des concentrations entre l'entrée et la sortie de la STEP. Il est exprimé en pourcentage (Eddabra, 2011). On le calcule selon la formule suivante :

- $\text{Abatement} = ((E - S) / E) \times 100$
- E : Concentration à l'entrée de la station.
- S : Concentration à la sortie de la station

c. Dénombrement des staphylocoques et des levures

Le dénombrement des staphylocoques et des levures s'effectue par étalement en surface. Un faible volume d'échantillon est réparti avec un étaleur stérile (pipette Pasteur repliée « en râteau ») sur la surface d'une gélose sélective en boîte de Pétri (Abouelouafa, 2002 ; Rodier, 2009).

3.1.2.2. Isolement des microorganismes

Les géloses employées sont : Hektoen, Salmonelles-Schigelles (SS), Chapman, Citrimide, Gélose nutritive alcaline biliée (GNAB) et Gélose nutritive (GN). L'ensemencement par stries sur boîtes de Pétri est pratiqué le plus souvent dans un but d'isolement. L'inoculum est prélevé directement à partir de l'eau à analyser et est déposé sur un point périphérique de la gélose puis disséminé par stries sur toute la surface. Les boîtes sont codées puis incubées à 37°C pendant 24-48 heures (Aissam, 2003).

3.1.2.3. Purification

Une fois isolées, les souches sont purifiées par repiquages successifs sur le milieu d'isolement convenable (Aissam, 2003).

3.1.2.4. Identification

Les colonies de bactéries isolées et purifiées sont ensemencées sur des milieux de culture sélectifs (Hektoen, SS, Chapman, GNAB et Citrimide). Ensuite, l'identification est effectuée par le système des plaques Api 20 E, Api 20 NE et Api Staph (Biomérieux, France). Elle est basée sur l'assimilation de 12 sources de carbone et l'utilisation de 8 tests biochimiques par des bactéries à Gram-négatif entériques et non entériques. L'identification se fait par le logiciel API WEB (Aissam, 2003).

3.2. Tests de génotoxicité des eaux usées

L'activité mutagène et génotoxique des échantillons des eaux usées prélevés à partir de différents sites choisis durant notre étude a été réalisée par plusieurs tests de génotoxicité.

3.2.1. Test d'Ames

Tous les échantillons des eaux usées utilisés pour le test d'Ames ont été immédiatement filtrés sur filtre 0,45 µm en acétate de cellulose afin d'éliminer les particules susceptibles de perturber les mesures puis congelés à – 25 °C dans l'attente de la mise en œuvre du test (Jolibois et al., 2009).

a. Matériel biologique

Deux souches bactériennes de nature génétique différente *S. typhimurium* (TA98 et TA100) sont utilisées pour cette étude, ces souches ont été obtenues à partir du département de Biologie, (Turquie). Elles sont porteuses de mutations His⁻ différentes qui permettent de tester des agents mutagènes variés. En plus des mutations spécifiques sur l'opéron His, ces souches possèdent des caractères génétiques qui permettent d'augmenter leur sensibilité à l'agression génotoxique. Les caractéristiques génotypiques de ces deux souches sont résumées dans le tableau VII.

Tableau VII : Caractères génétiques des souches TA98 et TA100.

Souche	Génotype	Nature de la mutation	Défaut de la membrane lipopolysaccharidique	plasmide
TA98	HisD3052	Mutation par délétion	Rfa	pKM101
TA100	HisG 46	Mutation par substitution de bases	Rfa	pKM101

Ces deux souches portent la mutation *rfa* qui affecte la structure de la membrane externe lipopolysaccharidique et augmente la perméabilité des souches aux molécules de masses moléculaires élevées.

De plus, l'introduction du plasmide pKM101 dans ces souches augmente leur sensibilité aux mutations induites par une exposition aux UV et aux produits chimiques tout en leur conférant une résistance à l'ampicilline, ce qui permet de détecter facilement la présence du plasmide. Une mutation par délétion du gène de la biotine rend les souches TA98 et TA100 biotine-dépendantes, et la mutation dans le gène *uvrB*-biotine dans ces souches bloque le processus de réparation par excision-synthèse des lésions de l'ADN. La souche TA98 donne des informations sur des mutations portant sur la séquence de l'ADN tandis que la souche TA100 détecte les mutagènes qui causent des substitutions de paires de bases (Cheriot, 2007).

L'intégrité génétique et le taux de mutation spontané des souches de *S. typhimurium* ont été vérifiés selon le protocole publié par Mortelmans et Zeiger (2000) et ceci avant l'utilisation de ces colonies comme matériel biologique.

b. Activation des souches bactériennes

b.1. La préculture de nuit

A partir des souches conservées dans une gélose sélective Master black, des colonies bien isolées sont inoculées dans 5ml de bouillon nutritif. L'incubation se fait à 37°C avec agitation dans un bain Marie pendant 16 h. A côté des souches tests, on utilise un témoin qui est la souche *S. typhimurium* sauvage dans les mêmes conditions.

b.2. Le réisolement des souches tests

A partir de la culture de nuit des souches et avec une anse de platine faire des stries dans des boîtes contenant du milieu Master Black et incubé à 37°C pendant 48h-72h. Les boîtes sont ensuite placées dans un réfrigérateur et serviront comme source de bactéries pour des tests ultérieurs. Cette conservation dura jusqu'à 2 mois.

b.3. Le stockage des souches

Le stockage se fait dans des ependorffs de 1,2ml. 1ml de la culture bactérienne est mélangé au 90µl de glycérol, la conservation se fait à -80°C. Le mélange est à renouveler chaque 6 mois.

c. Vérification des caractères génétiques

c.1. La culture

Le but de cette culture est d'arriver à la phase exponentielle de croissance c'est à dire 2.10^9 et qui correspond à une densité optique (DO= 0,4) à une longueur d'onde égale à 650 nm. A partir de la culture de nuit, on prélève 20µl quand dilué dans 5ml de bouillon nutritif. On les incube à nouveau à 37° pendant 2 heures avec agitation (Maron et Ames, 1983).

c.2. Réclamation de l'Histidine

La mutation his- rend les bactéries auxotrophes à cet acide aminé dans un milieu sélectif contenant obligatoirement la biotine. Avec un écouvillon ou une anse de platine faire une seule strie de chaque souche sur :

- Des boîtes de contrôle contenant uniquement 100µl d'une solution (0,5mM) stérile de biotine par boîte appliquée à la surface de la gélose minimale agar, avec un râteau.

- Des boîtes his / biotine.

L'incubation se fait à 37°C pendant 24h (Maron et Ames, 1983).

c.3. La sensibilité aux UV

Le but de ce test est de vérifier l'existence de la mutation *uvrB*. Les souches testées et la bactérie sauvage sont déposées en stries sur des boîtes de gélose nutritive. La moitié de la boîte est couverte par une plaque en verre ensuite irradiée par une lampe à UV à une distance de 30 cm et ceci pendant 8 secondes. L'incubation dure 24h à 37°C (Maron et Ames, 1983).

c.4. La résistance à l'ampicilline et la sensibilité au cristal violet (CV)

Il faut s'assurer de la résistance à l'ampicilline pour vérifier la présence du plasmide pKM101 chez la TA98 et TA100 qui est instable. La sensibilité au CV est le résultat de la mutation *rfa*. Ces deux caractéristiques sont testées simultanément. On prépare 3 disques de papier Whatman, chaque disque est déposé sur boîte de gélose nutritive imbibé de 10 µl d'une des solutions suivantes :

- Solution à 1 mg/ml de CV ;
- Solution à 10 mg/ml d'ampicilline ;
- L'eau distillée stérile est utilisée comme témoin.

L'incubation se fait à 37°C pendant 24h (Maron et Ames, 1983).

d. Mesure de la mutagénicité des échantillons des eaux usées

Le protocole utilisé est adapté de Maron et Ames (1983) avec une pré-incubation de 25 min à 37 °C. La pré-incubation est utilisée pour permettre un contact plus étroit entre les souches et les composés à tester. Certains composés ne sont mutagènes qu'après activation métabolique ou au contraire sont inactivés lors de leur métabolisation. Il est donc important de tester le pouvoir mutagène des composés chimiques en présence et en l'absence d'activation métabolique. Les bactéries ne possédant pas de système d'oxydation métabolique, une source exogène d'origine mammifère d'activation métabolique doit être ajoutée lors du contact entre les bactéries et les mutagènes potentiels. Pour cela, un système d'oxydation métabolique extrait de rongeurs a été introduit dans le test d'Ames (Mortelmans et Zeiger, 2000). Ce système d'activation métabolique est composé du surnageant après centrifugation (9000 g) de foie de rats préalablement traités à l'Aroclor 1254 (fraction microsomale notée S9). Dans le test, le S9 est ajouté en présence de NADP et de cofacteurs nécessaires à l'oxydation (Maron et Ames, 1983). L'utilisation de composés chimiques dont

l'activité mutagénique est connue (contrôles positifs), spécifiques des souches utilisées et des conditions de test permettent de confirmer la spécificité, les propriétés de réversion des souches ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique. Pour les deux souches utilisées (TA98 et TA100), le 4-nitro-o-phenylenediamine (NPD), 2-aminofluorene (2AF), sodium azide (SA) et 2-aminoanthracene (2AA) ont été utilisés comme contrôles positifs sans et avec activation métabolique respectivement. Le contrôle négatif a été réalisé avec de l'eau distillée stérile (Cheriot, 2007).

d.1. Procédure

Pour un test standard de mutagénicité, les différentes substances mélangées sont :

- En absence d'activation métabolique :
 - 100 µl de la culture de nuit (TA100 ou TA98).
 - 100 µl de l'échantillon à tester (échantillon d'eau usée).
- En présence d'activation métabolique :
 - 100 µl de la culture de nuit (TA100 ou TA98).
 - 50µl de l'échantillon à tester.
 - 500µl de S9 Mix.

Ce mélange est ensuite incubé pendant 25 min à 37 °C puis 2 ml de « top Agar » et 200 µl de la solution histidine-biotine sont ajoutés juste avant dépôt sur les boîtes de Pétri. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37 °C pendant 48 h (Mortelmans et Zeiger, 2000 ; Cheriot, 2007).

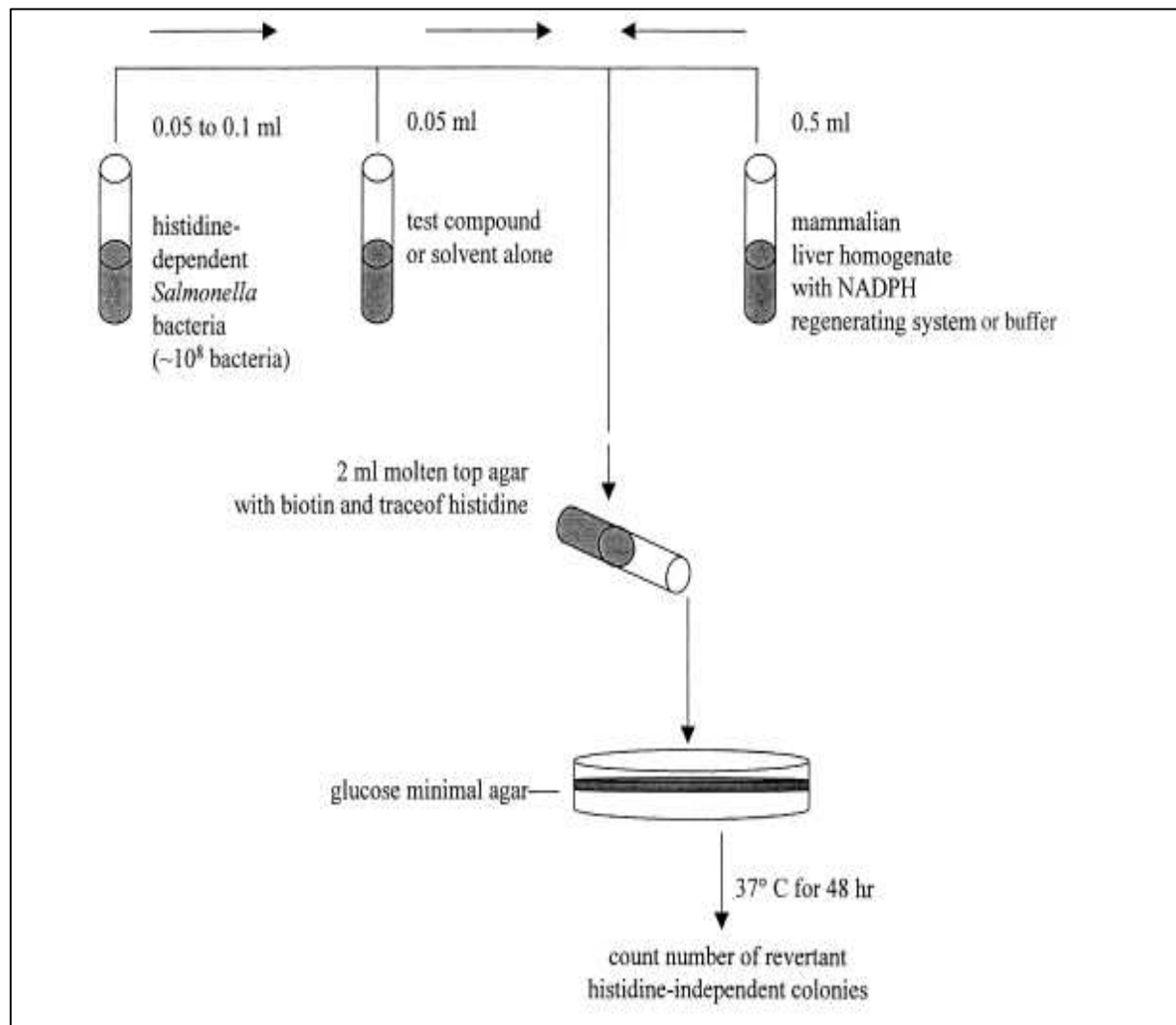


Figure 11 : Protocole du test de mutagenèse (test d'Ames) (Mortelmans et Zeiger, 2000).

3.2.2. Test des aberrations chromosomiques

Cet essai est basé sur la détection des AC dans les racines d'*Allium cepa*, le protocole de ce test est inspiré de celui de Fiskesjö (1985).

a. Matériel végétal et conditions de culture

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est la plante *Allium cepa*. Les bulbes de l'oignon *A. cepa* ($2n = 16$) ont été achetés auprès d'un supermarché turc et sont cultivées dans de l'eau distillée pendant 48h à l'obscurité.

b. Traitement des bulbes

Il s'agit de placer les bulbes germés dans des tubes à essai contenant l'échantillon à tester de façon à ce que seules les racines soient immergées. Le Methyl methanesulfonate (MMS) est utilisée comme contrôle positif et l'eau distillée comme contrôle négatif. La durée de l'exposition est de 24h. Afin de limiter la variabilité intra-individuelle, cinq répliques par échantillon ont été réalisés mais seuls les 5 organismes présentant la plus forte croissance racinaires sont conservés pour les critères étudiés.

c. Fixation et coloration des extrémités racinaires

Les racines sont nettoyées à l'eau distillée et les deux derniers centimètres sont prélevés et fixés à 4°C pendant une durée minimale d'une nuit dans un mélange éthanol/acide acétique glacial (3v :1v) préparé ex-temporairement. Ce mélange appelé solution de Carnoy est très instable. Il peut se produire une estérification s'il n'est pas préparé au moment de l'utilisation.

L'éthanol a pour effet de précipiter et dénaturer les protéines, de dissoudre certains lipides et de durcir les tissus. L'acide acétique est un bon fixateur des chromosomes, il précipite les protéines du noyau.

Les extrémités racinaires peuvent ensuite être conservées à long terme dans de l'éthanol à 70% pour une observation différée ou bien être hydrolysées dans le cas d'une observation immédiate. Les extrémités racinaires sont alors placées dans de l'eau distillée pendant 10 min, hydrolysées dans HCL 1N pendant 8 min et à nouveau transférées dans de l'eau distillée pendant 5 min, changer l'eau distillée 3fois (5min/fois). Les racines sont ensuite colorées à l'obscurité avec le réactif Feulgen pendant 20min à 25min. après la coloration, les racines sont ensuite transférées dans de l'eau distillée pendant 2min.

Il s'agit ensuite de poser les racines sur les lames et couper la partie claire de la partie foncée et cette dernière est coupée en très petits morceaux. Mettre sur chaque racine une goutte de 45% d'acide acétique glacial couvrir par une lamelle, appuyer par papier filtre. Après cette étape, utiliser le vernis à ongle transparent pour fermer les lamelles et éviter l'évaporation de l'eau (Liman et al., 2010).

d. Examen des cellules des extrémités racinaires

L'observation des cellules racinaires a été effectuée au microscope optique (objectif×960). L'indice mitotique (IM) et la fréquence des AC ont été déterminés selon Saxena et al. (2005) et Liman et al. (2010). Pour le l'IM, les différentes phases de mitose ont

été comptées dans un total de 5000 cellules (1000 cellules / lame) et exprimées en pourcentage. Pour les AC, 100 cellules par lame étaient examinées.

3.2.3. Test de micronoyaux

Ce test a été réalisé durant un stage au sein du laboratoire de cytogénétique au Maroc, ce test consiste à mettre en évidence des anomalies chromosomiques de nombre et/ou de structure par la détermination et le dénombrement, au sein d'une population cellulaire en interphase, de cellules présentant une ou plusieurs entités nucléaires indépendantes du noyau principal (Carine, 2010).

a. Matériel biologique

Le modèle cellulaire utilisé est les lymphocytes du sang périphérique humain (Amahdar, 2009).

b. Prélèvement sanguin

Les prélèvements ont été réalisés par ponction veineuse sur tubes héparine-lithium, sur des donneurs volontaires qui répondent aux critères suivants : des hommes en bonne santé, non-fumeurs, non drogueur et ils ne prennent pas des médicaments (Carine, 2010).

c. Mise en culture des cellules lymphocytaires

A partir de chaque échantillon de sang prélevé, 0,5 ml de sang total ont été mis en culture dans des tubes stériles dans : 4,5 ml de Milieu RPMI (RPMI 1640 medium 1X, sans glutamine) supplémenté avec 20 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1 % d'antibiotiques (Pénicilline 10 000 U.ml⁻¹ et Streptomycine 10000 µg.ml⁻¹), 1 % de L-Glutamine et 1 % de Phytohémagglutinine, agent mitogène spécifique des lymphocytes. Des concentrations croissantes des échantillons des eaux usées filtrés sur membrane 0,22 µm (0,3ml, 0,6ml et 0,9ml) sont ajoutés au mélange. Les tubes sont inclinés et incubés dans un bain Marie pendant 72h à 37°C (Amahdar, 2009).

d. Blocage de la division cellulaire

Après 44h de la culture, 0,1 ml de la cytochalasine B est ajouté dans chaque tube. Après une homogénéisation manuelle, les tubes sont remis au bain marie à 37°C pendant 28 heures (Amahdar, 2009).

e. Traitement cytologique**❖ Choc hypotonique**

Après une culture de 72h, les tubes sont centrifugés pendant 8 min à 800 tours/minute. Le surnageant est éliminé par aspiration à la pipette pasteur en laissant quelques gouttes du milieu au-dessus du culot, ce dernier est remis en suspension dans la solution hypotonique (chlorure de potassium à 0,075M). L'homogénéisation se fait à l'aide d'un vortex (Amahdar, 2009).

❖ Fixation

Une fois le choc hypotonique effectué, les tubes sont centrifugés à 800t/minutes, pendant 8 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension en ajoutant le fixateur (3 volumes de méthanol pour 1 volume d'acide acétique) goutte à goutte jusqu'à ce que la suspension devienne noire puis on complète jusqu'à 5 ml avec le fixateur, tout en homogénéisant au vortex (Amahdar, 2009).

f. Etalement des lames

L'étalement se fait à l'aide d'une pipette pasteur sur des lames codées, propres et dégraissées.

g. Lecture des résultats

La lecture est effectuée au microscope optique (Objectifx960). Pour l'indice de prolifération (IP), les cellules mononuclées, binuclées, trinuclées et les tétranuclées ont été comptées. Seuls les lymphocytes binuclés entourés d'un cytoplasme bien délimité sont observés pour la détection des MN_x (Amahdar, 2009).

➤ Indice de prolifération cellulaire

L'IP est une mesure indirecte de la durée du cycle cellulaire. Il dépend du taux de cellules mononuclées, binuclées, trinuclées et tétranuclées. Il est défini par la formule suivante (Glouib et al., 2006) :

$$IP = (1 \times N1) + (2 \times N2) + (3 \times N3) + (4 \times N4) / 1000 \text{ cellules examinées avec :}$$

N1: nombre de cellules mononuclées;

N2: nombre de cellules binuclées ;

N3 : nombre de cellules trinuclées ;

N4 : nombre de cellules tétranuclées.

3.3. Analyses statistiques des résultats

L'analyse statistique des paramètres physicochimiques et le test de MN a été réalisée par le logiciel MINITAB 16, en utilisant le test de comparaison à un facteur ANOVA. Les résultats du test d'Ames ont été analysés statistiquement en utilisant SPSS pour Windows, et pour cela, le test de Mann-Whitney a été réalisé. Les données de la longueur des racines, IM et AC ont été exprimés en pourcentages et les niveaux de signification dans les différents groupes de traitement ont été analysés par les tests de gamme multiple de Duncan en utilisant l'analyse d'une manière de la variance (ANOVA).

Ce chapitre présente les résultats et la discussion des analyses physicochimiques et microbiologiques effectuées durant notre étude suivis de l'ensemble des résultats relatifs aux tests de génotoxicité sur cellules procaryotiques (test d'Ames) et eucaryotiques (*Allium* test et test de MN) réalisés sur les échantillons des eaux usées prélevés à partir de différents sites choisis.

1. Résultats des Analyses physicochimiques et microbiologiques

1.1. Paramètres physicochimiques

Avant que les eaux usées soient rejetées dans le milieu naturel, elles doivent impérativement obéir à des normes établies pour protéger les milieux récepteurs contre tout type de pollution.

Pour cela, elles sont acheminées vers une station d'épuration où elles subissent plusieurs phases de traitement en fonction du flux de leur charge polluante et de la sensibilité du milieu aquatique récepteur, les valeurs guides sont consignées dans l'annexe III.

Les résultats des paramètres physicochimiques des eaux usées prélevées sont présentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Propriétés physicochimiques des eaux usées prélevées.

Paramètre		Avril 2012	Juillet 2012	Novembre 2012	Février 2013	Avril 2013
pH±SD	S1	7.63±0.20*	7.43±0.05	7.52±0.02*	7.73±0.14	7.66±0.2
	S2	7.16±0.15*	7.21±0.21	7.24±0.21*	7.70±0.17	7.30±0.5
	S3	7.03±0.05*	7.14±0.12	7.05±0.05*	7.45±0.21	7.40±0.36
	S4	7.00±0.10*	7.11±0.12	7.15±0.05*	7.40±0.26	7.40±0.3
	S5	7.06±0.15*	7.27±0.06	7.24±0.04*	7.53±0.05	7.43±0.32
T°C±SD	S1	16.60±0.65*	24.33±0.57***	16.9±0.17	11.9±0.17*	20.93±1
	S2	17.16±0.15*	21.30±0.60***	16.13±1.2	11.9±0.17*	20.96±0.05
	S3	17.33±0.66*	20.10±0.10***	16.23±0.49	12.43±0.46*	20.66±0.57
	S4	17.46±0.55*	20.43±0.51***	15.93±0.95	12.33±0.28*	20.33±0.57
	S5	16.13±0.23*	24.66±0.40***	15.46±0.28	11.46±0.56*	21.03±0.057
Conductivité ms/cm±SD	S1	1.27±0.09	1.21±0.02*	1.28±0.15*	1.37±0.18	1.62±0.15***
	S2	1.20±0.01	1.23±0.03*	1.52±0.06*	1.39±0.04	1.31±0.08***
	S3	1.26±0.03	1.13±0.02*	1.21±0.10*	1.38±0.09	1.21±0.06***
	S4	1.20±0.03	1.05±0.03*	1.26±0.03*	1.25±0.03	1.22±0.01***
	S5	1.18±0.02	1.10±0.1*	1.19±0.06*	1.28±0.02	1.17±0.07***
DCO mg/l±SD	S1	435.7±40.10***	440.3±62.30***	333.5±149.30*	455.83±11.060***	429.90±20.60***
	S2	43±6.08***	62.33±6.81***	249.3±44*	359.7±36.2***	337.30±33.3***
	S3	32±1.00***	24.67±5.03***	188±58.6*	321.30±18.70***	77.67±16.77***
	S4	7.93±2.76***	28.33±2.89***	58.00±8.54*	56.67±4.93***	43.33±2.52***
	S5	1.80±0.26***	27.33±2.52***	11.07±3.41*	35.69±2.55***	29.26±1.55***
DBO5 mg/l±SD	S1	247.67±16.17***	214 ± 4.58***	247±52.70***	279.96±10.76***	220±11.36***
	S2	37.67±3.21***	15.67 ± 4.04***	37±7***	148±20.7***	122.33±2.08***
	S3	15±5.00***	11.66 ± 1.52***	14.33±5.13***	32.67±8.74***	24.00±3.61***
	S4	18±2.65***	11 ± 3***	9.66±1.15***	19.67±5.51***	26.00±1.00***
	S5	17.50±0.86***	9.66 ± 1.15***	12.66±1.52***	16.87±2.73***	20.53±2.34***
MES mg/l±SD	S1	349.3±27.2***	273±42.8***	202.3±73.3***	223.33±11.37***	519.30±18.00***
	S2	42.00±2.00***	43.33±2.89***	69±1***	70.30±19.50***	234.00±2.00***
	S3	17.00±1.00***	26.67±2.08***	45.33±3.21***	38.00±2.65***	50.33±9.50***
	S4	10.67±2.31***	14.67±3.06***	25.33±2.31***	21.00±2***	25.00±3***
	S5	3.83±1.76***	9.33±4.73***	11.33±2.08***	15.00±3***	11.00±3***
NO ₂ ⁻ mg/l±SD	S1	3.10±3.38	2.033±0.89***	1.00±1	49.00±2***	1.60±0.1
	S2	0.25±0.02	0.16±0.07***	0.50±0.1	12.00±4***	1.16±0.35
	S3	0.03±0.05	0.06±0.11***	1.00±0.2	9.00±1***	5.00±3
	S4	1.78±0.20	0.07±0.02***	1.50±0.20	7.33±3.51***	4.4±0.10
	S5	0.83±0.57	0.14±0.21***	0.40±0.34	2.50***	4.00±3
NO ₃ ⁻ mg/l±SD	S1	4.00±20.00***	3.83±1.25***	1.20±0.10***	5.20±0.10*	2.00±1.00*
	S2	3.46±0.25***	3.70±0.20***	6.70±0.30***	5.00±2.00*	1.2±0.00*
	S3	2.00±10.00***	2.40±0.40***	3.00±1.00***	10.00±4.00*	8.67±3.51*
	S4	1.30±0.20***	10.00±20.00***	4.00±1.00***	10.70±0.10*	5.00±3.00*
	S5	16.00±20.00***	13.83±0.76***	11.33±0.57***	12.10±0.30*	10.33±3.06*
NH ₄ ⁺ mg/l±SD	S1	47.20±7.54***	33.67±3.21***	55.49±5.28***	41.67±6.66***	24.19±1.83***
	S2	32.40±0.40***	15.00±30.00***	27.45±0.55***	29.00±4.00***	20.33±2.52***
	S3	26.40±0.40***	1.30±0.30***	1.32±0.77***	10.00±4.00***	14.00±50***
	S4	5.20±0.10***	0.79±0.29***	0.92±0.00***	3.20±0.00***	10.3±0.70***
	S5	3.33±0.57***	1.30±0.60***	1.87±1.44***	2.83±0.28***	2.53±1.62***
PO ₄ ⁻³ mg/l±SD	S1	0.83±0.76	1.16±0.35*	1.76±0.03***	0.10±0.01***	0.12±0.02
	S2	0.03±0.05	0.6±0.30*	1.20±0.10***	0.08±0.02***	0.10±0.01
	S3	0.02±0.01	0.33±0.15*	1±0.50***	0.03±0.01***	0.09±0.03
	S4	0.02±0.02	1.03±0.05*	0.46±0.20***	0.03±0.02***	0.07±0.01
	S5	0.46±0.45	0.72±0.23*	0.22±0.00***	0.01±0.005***	0.22±0.36

* Résultat significatif, ** résultat très significatif, *** résultat hautement significatif, p≤0,05, SD : écart type, S1 : entrée de la station, S2 : sortie du décanteur, S3 : sortie du bassin d'aération, S4 : sortie du clarificateur et S5 : sortie de la station.

1.1.1. Température

La température est un facteur abiotique important. Sa mesure est nécessaire, étant donné le rôle qu'elle joue dans la solubilité des gaz, dans la dissociation des sels dissous et dans la détermination du pH (Who, 1987). L'augmentation de ce paramètre favorise l'auto-épuration et accroît la vitesse de sédimentation, ce qui présente un intérêt dans les stations d'épuration. Par ailleurs, avec la température les réactions chimiques et biochimiques s'accroissent (Rodier, 1996).

La figure 12 représente les variations saisonnières de la température au niveau de chaque site de prélèvement.

Durant cette étude, Les valeurs moyennes de la température varient entre $11,467 \pm 0,569$ °C et $24,333 \pm 0,577$ °C avec une légère différence entre les sites d'étude. Les fortes valeurs de la température ont été enregistrées pendant Juillet 2012 tandis que les plus faibles valeurs ont été détectées pendant Février 2013. Ces résultats mettent en évidence une différence saisonnière de la température entre les périodes d'étude. Les valeurs moyennes de la température détectées durant notre étude sont inférieures à la valeur limite des rejets directs dans le milieu récepteur (JORA, 2006), et également elles sont inférieures à 35°C, considérée comme valeur limite indicative pour les eaux destinées à l'irrigation des cultures.

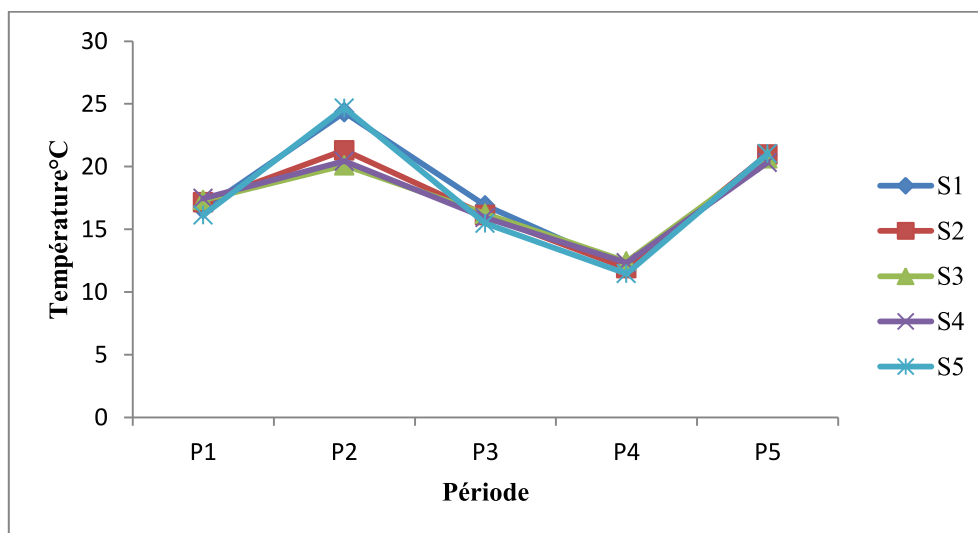


Figure 12 : Variation de la température des différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes de la température des cinq sites sont présentés dans le tableau IX.

L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences significatives entre les moyennes de la température des cinq sites sauf pour les périodes

suivantes : Novembre 2012 et Avril 2013 où il n'existe pas de différences entre les moyennes de ce paramètre.

Tableau IX : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée à la température des eaux usées prélevées.

Période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	4	3,749	0,937	3,74	0,041 [*]
P2	4	56,913	14,228	62,40	0,000 ^{***}
P3	4	3,247	0,812	1,50	0,275 ^{ns}
P4	4	1,809	0,452	3,33	0,05 [*]
P5	4	1,004	0,251	0,74	0,584 ^{ns}

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,05$: (^{*}) ; différences significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (^{***}) ; différences très hautement significatives, $P > \alpha = 0,05$ (^{ns}) : différences non significatives.

1.1.2. pH

Le pH influence la plupart des mécanismes chimiques et biologiques dans les eaux. Ce paramètre est un élément important pour l'interprétation de la corrosion dans les canalisations des installations de l'épuration (Eddabra, 2011). La figure 13 représente les valeurs du pH obtenues durant cette étude. Les valeurs du pH des échantillons d'eau prélevés étaient neutres et variées entre $7,000 \pm 0,100$ et $7,736 \pm 0,148$, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par El Guamri et Belghity (2006). Ces valeurs sont également proches de celles des normes algériennes de la qualité des eaux destinées à l'irrigation (FAO, 2003). De même, ces valeurs sont généralement comprises entre 6,5 et 8,5 considérées comme valeurs limites de rejets directs dans le milieu récepteur (JORA, 2006).

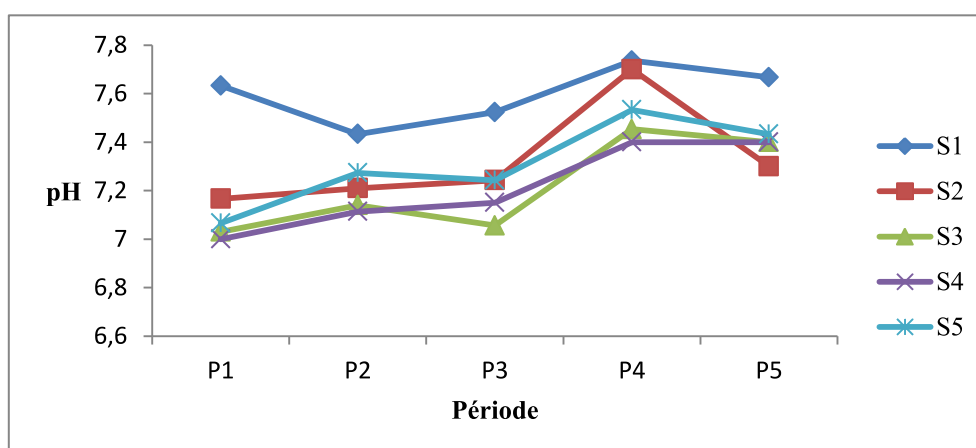


Figure 13 : Variation des valeurs du pH des différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes du pH des cinq sites sont présentés dans le tableau X.

L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences significatives entre les moyennes du pH des cinq sites sauf pour les périodes Juillet 2012, Février 2013 et Avril 2013 où il n'existe pas de différences entre les moyennes de ce paramètre, ceci est probablement dû à l'absence systématique de déversements fortement acides ou alcalins durant ces périodes (Tamrabet, 2011).

Tableau X : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au pH des eaux usées.

Période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	4	0,8173	0,2043	9,89	0,002 [*]
P2	4	0,1958	0,0489	2,94	0,076 ^{ns}
P3	4	0,3659	0,0915	8,43	0,003 [*]
P4	4	0,2652	0,0663	1,93	0,182 ^{ns}
P5	4	0,223	0,056	0,45	0,770 ^{ns}

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,05$: (^{*}) ; différences significatives, $P > \alpha = 0,05$ (^{ns}) : différences non significatives.

1.1.3. Conductivité

La valeur de la conductivité électrique est probablement l'une des plus simples et des plus importantes pour le contrôle de la qualité des eaux usées. Elle traduit le degré de minéralisation globale, et renseigne sur le taux de salinité (Eddabra, 2011). Les résultats obtenus de la conductivité électrique des échantillons des eaux prélevés sont présentés dans la figure 14.

D'une manière générale, les valeurs moyennes de la conductivité détectées varient entre $1,05 \pm 0,03$ ms/cm et $1,620 \pm 0,158$ ms/cm. Ces résultats mettent en évidence une forte minéralisation due principalement à la charge organique (Chafai, 1996 ; Yazid, 2014). La comparaison des valeurs de la conductivité électrique au niveau des eaux usées analysées avec les normes de qualité des eaux destinées à l'irrigation permet de déduire que ces eaux usées sont acceptables pour l'irrigation (FAO, 2003).

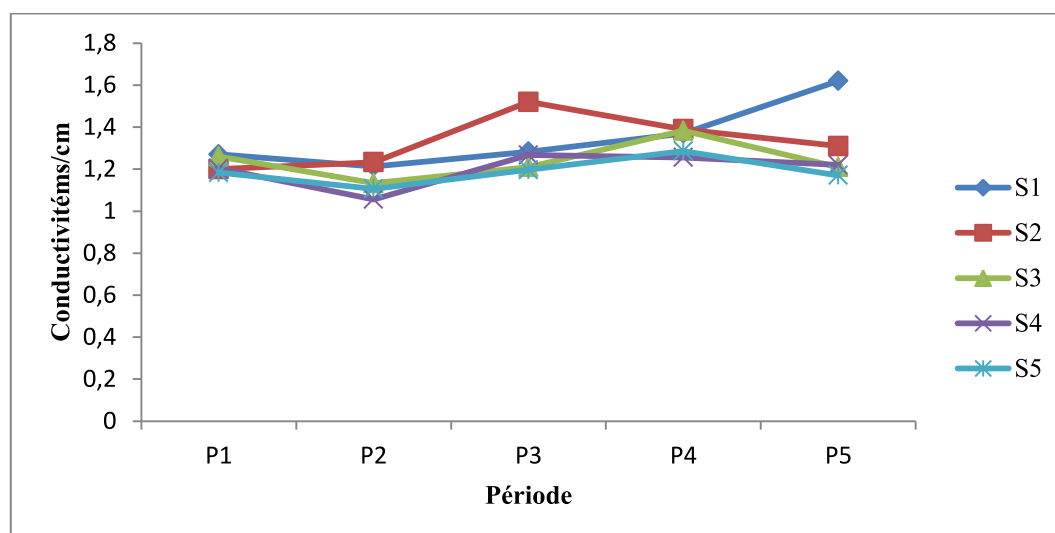


Figure 14 : Variation des valeurs de la conductivité des différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes de la conductivité des cinq sites sont présentés dans le tableau XI.

L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences significatives entre les moyennes de la conductivité des cinq sites sauf pour les périodes Avril 2012 et Février 2013 où il n'existe pas de différences entre les moyennes de ce paramètre.

Tableau XI : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée à la conductivité des eaux usées.

Période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	4	0,01820	0,00455	1,73	0,220 ^{ns}
P2	4	0,06544	0,01636	5,82	0,011 ^{**}
P3	4	0,20537	0,05134	5,89	0,011 ^{**}
P4	4	0,04509	0,01127	1,19	0,371 ^{ns}
P5	4	0,40116	0,10029	12,00	0,001 ^{***}

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,01$: (**); différences hautement significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (***) ; différences très hautement significatives, $P > \alpha = 0,05$: (ns); différences non significatives.

1.1.4. Demande chimique en oxygène

La DCO correspond à la quantité d'oxygène qui a été consommée par voie chimique pour oxyder l'ensemble des matières oxydables présentes dans l'eau. La DCO est particulièrement indiquée pour mesurer la pollution d'un effluent industriel (Rodier, 2005).

La figure 15 représente les résultats obtenus de la DCO des échantillons des eaux usées prélevés. Les plus fortes concentrations de la DCO ont été enregistrées au niveau du S1 avec des valeurs moyennes 435.7 ± 40.10 mg/l, 440.3 ± 62.30 mg/l, 333.5 ± 149.30 mg/l, 455.83 ± 11.060 mg/l et 429.90 ± 20.60 mg/l pendant Avril 2012, Juillet 2012, Novembre 2012, Février 2013 et Avril 2013 respectivement. Une diminution significative a été enregistrée au niveau des autres stades du traitement d'épuration. Les valeurs obtenues au S5 sont comprises entre 1.800 ± 0.265 mg/l et $35,69 \pm 2,55$ mg/l. Elles sont inférieures aux normes fixées par l'OMS pour les eaux destinées à l'irrigation et restent dans les normes fixées à 120 mg/l considérée comme valeur limite de rejet direct pour les stations d'épuration.

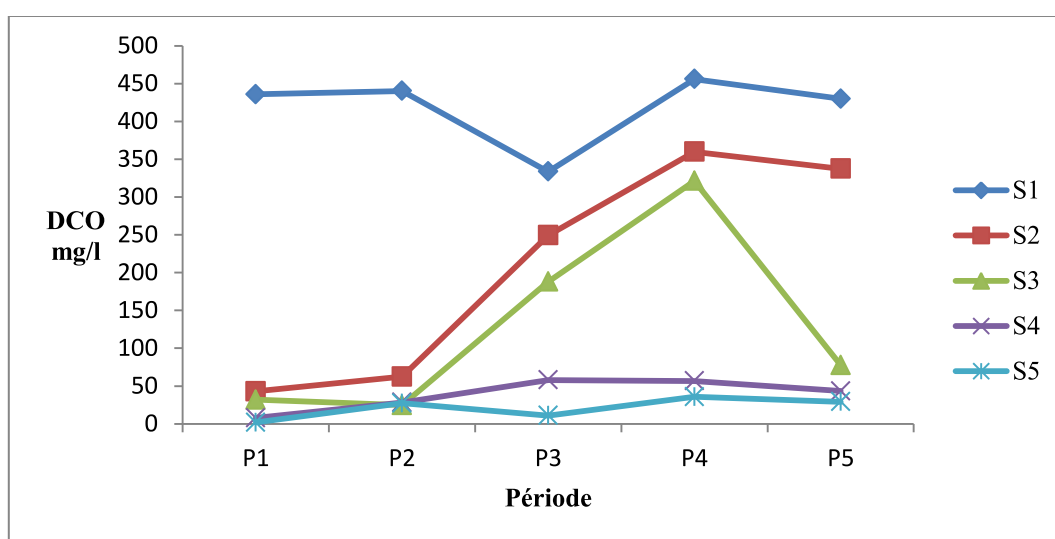


Figure 15 : Variation des valeurs de la DCO des différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes de la DCO sont présentés dans le tableau XII.

L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences hautement significatives entre les moyennes de la DCO des cinq sites et ceci quelle que soit la période d'étude.

Tableau XII : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée à la DCO des eaux usées.

Période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	4	415744	103936	314,57	0,000***
P2	4	395878	98970	124,75	0,000***
P3	4	213367	53342	9,61	0,002**
P4	4	428095	107024	295,02	0,000***
P5	4	417088	104272	286,65	0,000***

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (***) ; différences très hautement significatives.

1.1.5. Demande biologique en oxygène

La DBO exprime la quantité d'oxygène nécessaire à la destruction ou à la dégradation des matières organiques d'une eau par les microorganismes du milieu. Ce paramètre est un bon indicateur de la teneur en matière organique biodégradable d'une eau au cours des procédés d'autoépuration (Rejsek, 2002).

La figure 16 représente les résultats obtenus de la DBO₅ des échantillons des eaux usées prélevés. Les valeurs maximales des concentrations de la DBO₅ ont été détectées à l'entrée de la station 247.67 ± 16.17 mg/l, 214 ± 4.58 mg/l, $247 \pm 52,70$ mg/l, 279.96 ± 10.76 mg/l et 220 ± 11.36 mg/l avec une diminution très significative de celles-ci au niveau des autres sites et ceci quelle que soit la période d'étude.

Les valeurs des DBO₅ obtenues à la sortie de la station oscillent entre 9.667 ± 1.155 et $20,53 \pm 2,34$ mg/l. La valeur maximale enregistrée dans les eaux usées traitées indique que le traitement biologique effectué sur l'eau usée est acceptable selon la norme de la FAO qui exige une DBO₅ inférieure à 25 mg/l.

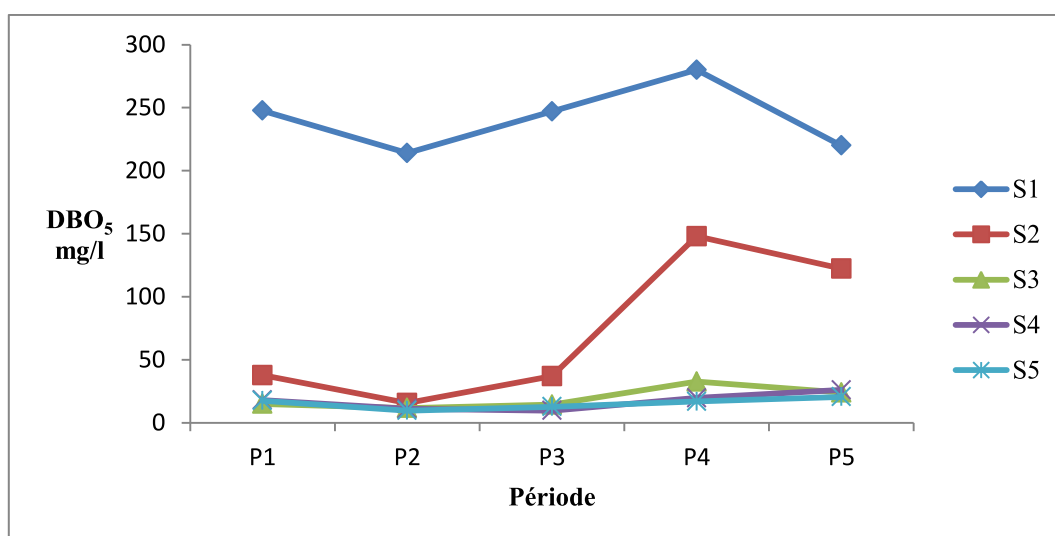


Figure 16 : Variation des valeurs de la DBO₅ des différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes de la DBO₅ des cinq sites sont présentés dans les tableaux XIII.

L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences très hautement significatives entre les moyennes de la DBO₅ des cinq sites et ceci quelle que soit la période d'étude.

Tableau XIII : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée à la DBO₅ des eaux usées.

Période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	4	123168,0	30792,0	505,75	0,000***
P2	4	97989,6	24497,4	2449,74	0,000***
P3	4	126816	31704	55,54	0,000***
P4	4	157763	39441	300,25	0,000***
P5	4	92841,9	23210,5	759,57	0,000***

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (***) ; différences très hautement significatives.

Le rapport de biodégradabilité DCO/DBO₅ des eaux usées brutes est compris entre 1,35 et 2,05 (Tab. XIV), ce rapport se trouve dans l'intervalle (2-2,5), qui selon Rodier (2009) caractérise les eaux usées urbaines, ce qui indique que la matière oxydable ($MO = 1/3 DCO + 2/3 DBO_5$) de ces eaux est facilement dégradable (El Guamri et Belghyti, 2006 ; Tamrabet, 2011). Les résultats obtenus du rapport des eaux usées traitées indiquent que ces eaux possèdent une bonne biodégradabilité (Tamrabet, 2011).

Tableau XIV : Rapport de biodégradabilité et MO des échantillons des eaux usées testés.

Sites	DCO/DBO ₅					MO				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
Site1	1.75	2.05	1.35	1.62	1.95	310,34	298,4	275,8	338,5	289,6
Site5	0.1	2.82	0.87	2.11	1.42	12,26	15,55	12,13	23,14	23,44

1.1.6. Matières en suspension

Les MES, représentent l'ensemble des particules minérales et organiques contenues dans les eaux usées (N'diaye et al., 2011). L'abondance des MES dans l'eau favorise la réduction de la luminosité et abaisse la production biologique du fait, en particulier, d'une chute de l'oxygène dissous consécutive à une réduction des phénomènes de photosynthèse (CREPA, 2007).

La figure 17 illustre la quantité des MES dans les eaux usées prélevées. Les résultats obtenus montrent que les eaux usées brutes sont caractérisées par des concentrations moyennes en MES assez élevées : 349.3 ± 27.2 mg/l, 273 ± 42.8 mg/l, 202.3 ± 73.3 mg/l, 223.33 ± 11.37 mg/l et 519.30 ± 18.00 mg/l et ceci pendant Avril 2012, Juillet 2012, Novembre 2012, Février 2013 et Avril 2013 respectivement.

Ces résultats sont liés souvent à la charge importante en matières organiques des eaux usées urbaines qui arrivent à la station, ces résultats se concordent avec ceux obtenus par El Guamri et Belghity (2006), étude réalisée au Maroc sur les eaux usées brutes de la commune urbaine de Saknia. La diminution observée des MES aux niveaux des autres stades du traitement est due au système d'épuration utilisée dans la STEP. Les teneurs en MES enregistrées dans les eaux traitées sont en accord avec les normes de la FAO fixées à un maximum de 30 mg/l.

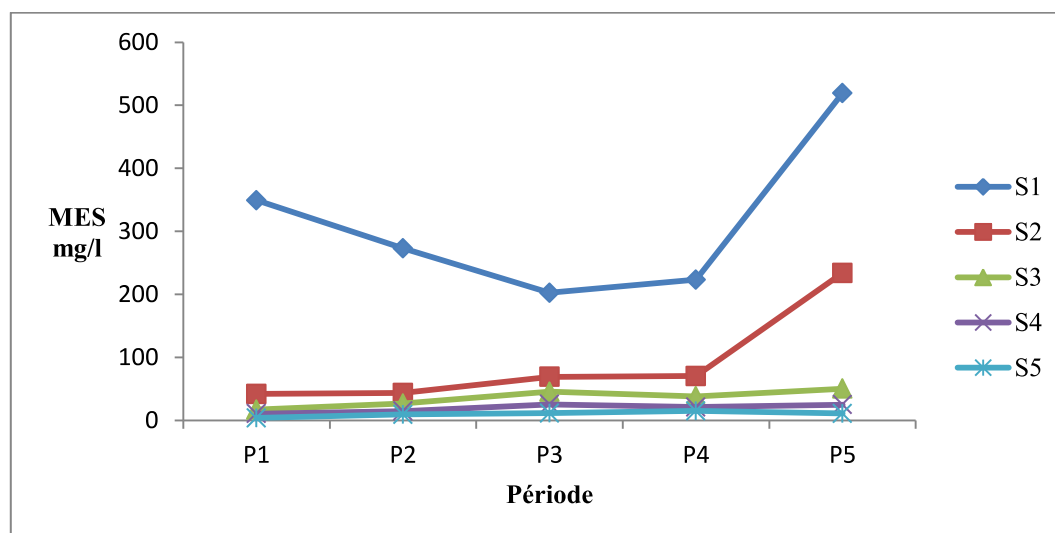


Figure 17 : Variation des valeurs des MES des différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes des MES des cinq sites sont présentés dans le tableau XV. Ces résultats montrent qu'il existe des différences très hautement significatives les moyennes des MES des cinq sites et ceci quelle que soit la période d'études.

Tableau XV : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée aux MES des eaux usées.

Période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	4	265373	66343	439,50	0,000***
P2	4	151447	37862	101,11	0,000***
P3	4	70669	17667	16,38	0,000***
P4	4	89696	22424	211,68	0,000***
P5	4	560204	140051	840,98	0,000***

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (***) ; différences très hautement significatives.

1.1.6. Nitrites (NO_2^-)

Les nitrites représentent la forme la moins oxygénée et la moins stable des composés azotés. Leur présence est due, soit à l'oxydation bactérienne de l'ammoniaque, soit à la réduction des nitrates (Rejsek, 2002).

La figure 18 représente la variation des concentrations des nitrites dans les échantillons des eaux usées prélevés. Les plus fortes concentrations des nitrites ont été détectées au niveau du site S1, ces valeurs sont : 3.10 ± 3.38 mg/l, 2.033 ± 0.89 mg/l, 1.00 ± 1 mg/l, 49.00 ± 2 mg/l et 1.60 ± 0.1 mg/l et ceci pendant Avril 2012, Juillet 2012, Novembre 2012, Février 2013 et Avril 2013 respectivement.

Les teneurs en nitrite enregistrées au niveau du site S5 varient de 0.147 ± 0.219 à $4,00 \pm 3,00$ mg/l. les valeurs observées pendant Avril 2012, Juillet 2012, Novembre 2012 et Février 2013 sont inférieures aux normes fixées par la FAO (3 mg/l), tandis que la valeur maximale détectée dans ce site pendant Avril 2013 dépasse légèrement cette norme.

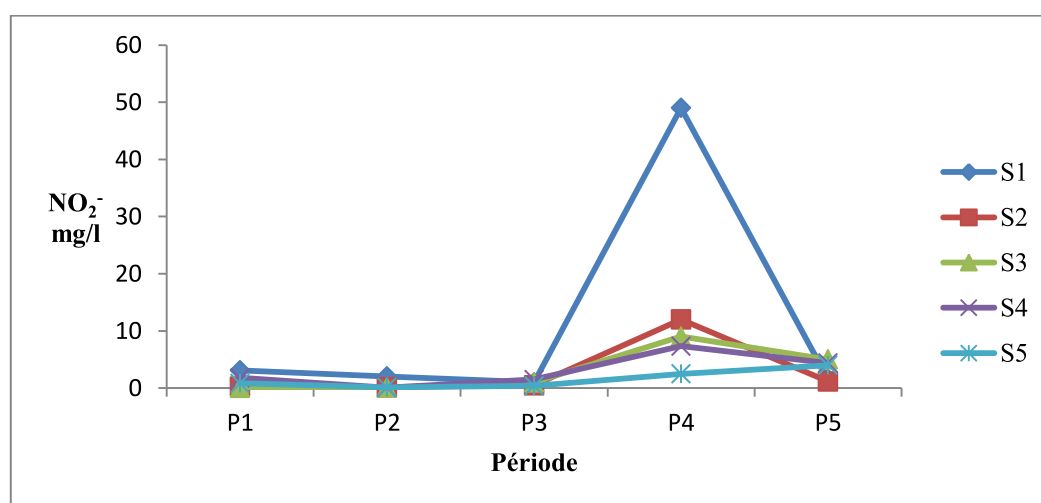


Figure 18 : Variation des valeurs de NO_2^- des différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes de NO_2^- des cinq sites sont présentés dans le tableau XVI.

L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences significatives entre les moyennes de NO_2^- des cinq sites sauf pour les périodes Avril 2012 et Février 2013 et Avril 2013 où il n'existe pas de différences entre les moyennes de ce paramètre.

Tableau XVI : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au NO_2^- des eaux usées.

Période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	4	19,04	4,76	2,02	0,168 ^{ns}
P2	4	8,879	2,220	12,74	0,001 ^{***}
P3	4	2,364	0,591	2,44	0,115 ^{ns}
P4	4	4234,07	1058,52	158,78	0,000 ^{***}
P5	4	36,03	9,01	2,48	0,111 ^{ns}

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (***) ; différences très hautement significatives, $P > \alpha = 0,05$: (^{ns}) ; différences non significatives.

1.1.7. Nitrates (NO_3^-)

Les nitrates constituent la forme oxydée finale de l'azote. Leur présence dans l'eau atteste d'une bonne récupération en cas de pollution organique. L'activité humaine est indubitable dès que l'on observe des concentrations dépassant 12 mg/l (Bremond et Perrodon, 1979).

La figure 19 illustre la variation des concentrations des nitrates dans les échantillons des eaux usées prélevés. Les plus fortes concentrations en nitrates ont été enregistrées au niveau du site S5 avec des valeurs moyennes : 16.00 ± 20.00 mg/l, 13.83 ± 0.76 mg/l, 11.33 ± 0.57 mg/l, 12.10 ± 0.30 mg/l et 10.33 ± 3.06 mg/l pendant Avril 2012, Juillet 2012, Novembre 2012, Février 2013 et Avril 2013 respectivement. L'augmentation dans les teneurs en nitrates durant cette étude peut être expliqué par le métabolisme des composés azotés, transformation de l'ammoniaque en nitrate (Bengoumi et al., 2004 ; Khalid et al., 2011 ; Yazid, 2014). Cependant, ces teneurs dans les eaux usées traitées ne dépassent pas la norme fixée par l'OMS pour l'utilisation des eaux usées en irrigation.

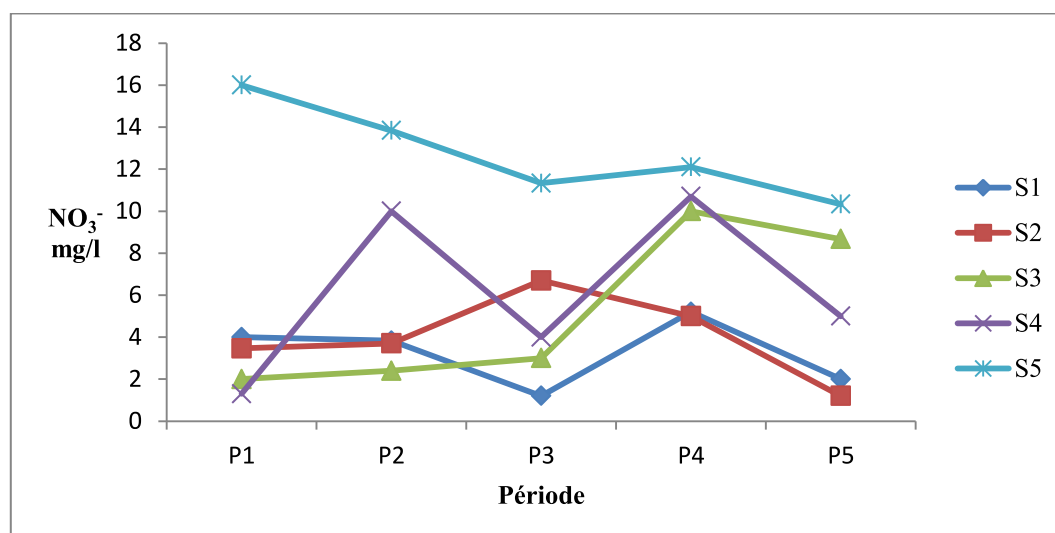


Figure 19 : Variation des valeurs de NO_3^- des différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes de NO_3^- des cinq sites sont présentés dans le tableau XVII.

L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences hautement significatives entre les moyennes de NO_3^- des cinq sites et ceci quelle que soit la période d'étude.

Tableau XVII : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au NO_3^- des eaux usées.

Période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	4	439,25	109,81	60,31	0,000***
P2	4	292,40	73,10	57,41	0,000***
P3	4	186,411	46,603	95,76	0,000***
P4	4	129,42	32,35	8,04	0,004**
P5	4	193,08	48,27	7,62	0,004**

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (***) ; différences très hautement significatives.

1.1.8. Ammonium (NH_4^+)

L'ammonium est la forme d'azote la plus toxique. Sa présence dans l'eau est liée soit aux rejets urbains et industriels, soit par réduction des formes azotées (nitrates et nitrites) en conditions réduites (Debieche, 2002).

La figure 20 représente la variation des concentrations de l'ammonium dans les échantillons des eaux usées prélevés. Les teneurs les plus élevées de l'azote ammoniacal ont été détectées au niveau du site S1, ces valeurs sont : 47.20 ± 7.54 mg/l, 33.67 ± 3.21 mg/l,

55.49±5.28 mg/l, 41.67±6.66 mg/l et 24.19±1.83 mg/l pour l'ammonium et ceci pendant Avril 2012, Juillet 2012, Novembre 2012, Février 2013 et Avril 2013 respectivement.

Les résultats obtenus de l'ammoniaque dans les eaux usées traitées varient entre 1.300±0.600 et 3.333 ±0.577 mg/l. Ces valeurs sont inférieures à la norme des eaux d'irrigation recommandées par la FAO qui exige des teneurs <3 mg/l (FAO, 2003). Certains auteurs comme Ayers et Westcot (1985) trouvent que ces teneurs en ammoniaque sont incluses dans la gamme habituelle d'une eau destinée à l'irrigation (0-5 mg/l). L'évaluation de la qualité d'une eau est en rapport avec l'évaluation quantitative de sa charge en matière azotées. L'azote joue un rôle primordial dans le métabolisme des plantes (Skiredje, 2005).

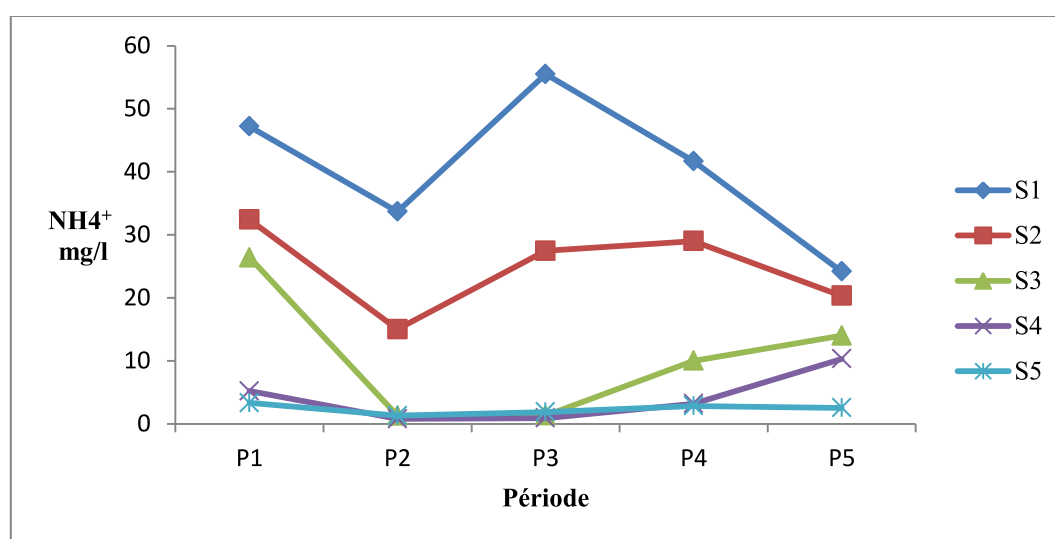


Figure 20 : Variation des valeurs de NH_4^+ des différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes de NH_4^+ des cinq sites sont présentés dans le tableau XVIII.

L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences très hautement significatives entre les moyennes de NH_4^+ des cinq sites et ceci quelle que soit la période d'étude.

Tableau XVIII : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au NH_4^+ des eaux usées.

Période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	4	4167,4	1041,9	90,46	0,000***
P2	4	2461,41	615,35	154,83	0,000***
P3	4	6970,22	1742,55	282,43	0,000***
P4	4	3576,0	894,0	58,50	0,000***
P5	4	866,22	216,56	28,64	0,000***

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (***) ; différences très hautement significatives.

1.1.9. Orthophosphates (PO_4^{3-})

La grande partie du phosphore organique provient des détergents, des déchets du métabolisme des protéines et de son élimination sous forme de phosphates dans les urines par l'homme (N'diaye et al., 2011).

La figure 21 représente les résultats des orthophosphates détectées dans les échantillons des eaux usées prélevés durant cette étude. Les plus fortes concentrations détectées sont : $0,83 \pm 0,76$ mg/l, $1,16 \pm 0,35$ mg/l, $1,76 \pm 0,03$ mg/l et $0,10 \pm 0,01$ mg/l pendant Avril 2012, Juillet 2012, Novembre 2012 et Février 2013 respectivement et ceci au niveau du site S1 et $0,22 \pm 0,36$ mg/l au niveau du site S5. Les teneurs obtenues des orthophosphates dans les eaux usées traitées ne dépassent pas la valeur limite acceptable d'un rejet direct dans le milieu récepteur (2 mg/l) (JORA, 2006).

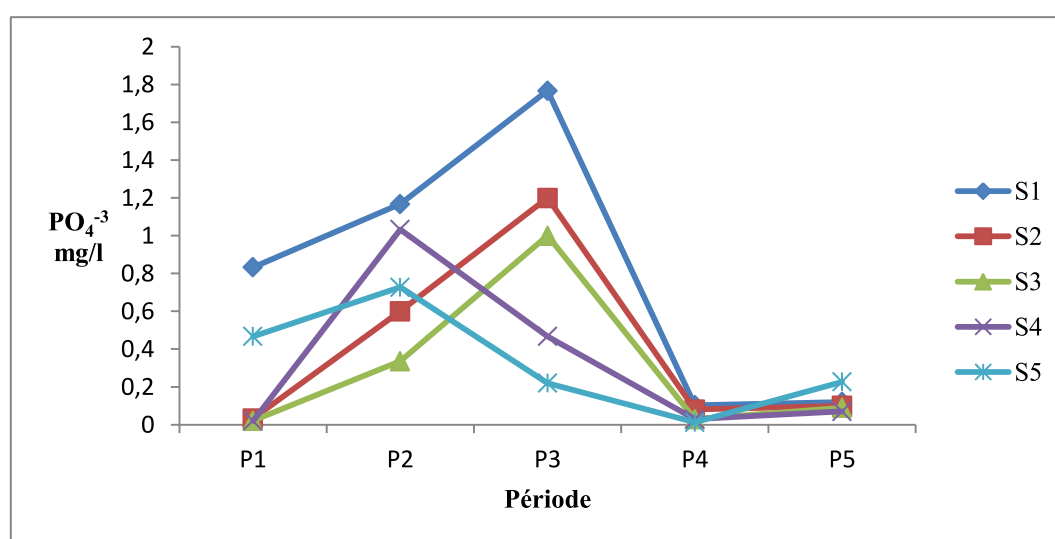


Figure 21 : Variation des valeurs de PO_4^{3-} des différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes de PO_4^{3-} des cinq sites sont présentés dans le tableau XIX.

L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences significatives entre les moyennes de PO_4^{3-} des cinq sites sauf pour les périodes : Avril 2012 et Avril 2013.

Tableau XIX : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au PO_4^{3-} des eaux usées.

Période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	4	1,608	0,402	2,54	0,105 ^{ns}
P2	4	1,3356	0,3339	5,64	0,012 ^{**}
P3	4	4,4898	1,1224	18,45	0,000 ^{***}
P4	4	0,017640	0,004410	17,76	0,000 ^{***}
P5	4	0,0455	0,0114	0,42	0,792 ^{ns}

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (^{***}) ; différences très hautement significatives, $P > \alpha = 0,05$: (^{ns}) ; différences non significatives.

1.1.10. Métaux lourds

La figure 22 représente les concentrations du Cd détectées durant notre étude. Les plus fortes concentrations ont été enregistrées au S1 avec des valeurs moyennes : $0.30 \pm 0.10 \mu\text{g/l}$, $0.596 \pm 0.004 \mu\text{g/l}$, $1.824 \pm 0.000 \mu\text{g/l}$ et $1.36 \pm 0.01 \mu\text{g/l}$. Les faibles concentrations ont été détectées à la sortie de la station avec des valeurs moyennes $0.10 \pm 0.00 \mu\text{g/l}$, 0.273 ± 0.046 , $1.63 \pm 0.01 \mu\text{g/l}$ et $0.480 \pm 0.00 \mu\text{g/l}$ et ceci pendant Avril 2012, Juillet 2012, Novembre 2012 et Février 2013 respectivement. Pendant Avril 2013 aucune trace du Cd n'a été détectée.

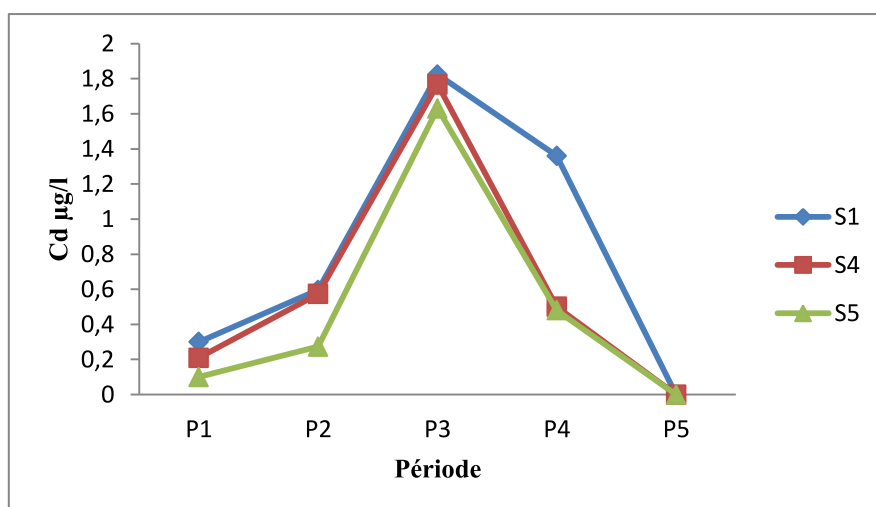


Figure 22 : Variation du taux du Cd dans les différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes de Cd des cinq sites sont présentés dans le tableau XX. L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences significatives entre les moyennes de Cd des cinq sites sauf pour le mois de Juillet 2012.

Tableau XX: Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au Cd des eaux usées.

période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	2	0,06020	0,03010	9,03	0,016 ^{**}
P2	2	0,0596	0,0298	2,06	0,209 ^{ns}
P3	2	0,19486	0,09743	39,18	0,000 ^{***}
P4	2	0,238050	0,119025	176,33	0,000 ^{***}
P5	/	/	/	/	/

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,01$: (^{**}) ; différences hautement significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (^{***}) ; différences très hautement significatives, $P > \alpha = 0,05$: (^{ns}) ; différences non significatives.

La figure 23 représente les concentrations du Pb dans les échantillons des eaux usées prélevées. Les plus fortes concentrations ont été enregistrées au site1 avec des valeurs moyennes : $2.13 \pm 0.03 \mu\text{g/l}$, $16.96 \pm 1.96 \mu\text{g/l}$, $4.34 \pm 0.34 \mu\text{g/l}$ et $3.10 \pm 0.90 \mu\text{g/l}$ pendant Avril 2012, Novembre 2012, Février 2013 et Avril 2013 respectivement. Aucune trace du Pb n'a été détectée à la sortie de la station sauf pendant Novembre 2012 avec une valeur moyenne de $3.38 \pm 0.28 \mu\text{g/l}$.

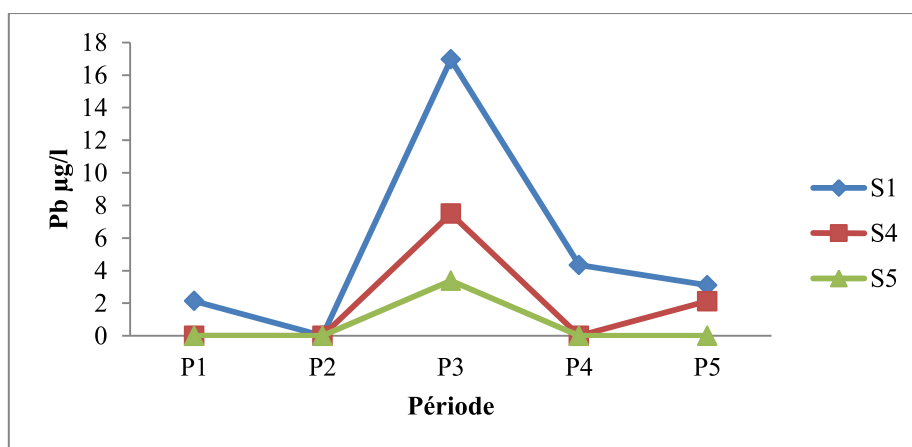


Figure 23 : Variation du taux du Pb dans les différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes de Pb des cinq sites sont présentés dans le tableau XXI.

L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences hautement significatives entre les moyennes de Pb des cinq sites et ceci quelle que soit la période d'étude.

Tableau XXI : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au Pb des eaux usées.

période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	2	9,073800	4,536900	15123,00	0,000***
P2	2	8366,54	4183,27	487,77	0,000***
P3	/	/	/	/	/
P4	2	37,6712	18,8356	488,81	0,000***
P5	2	15,065	7,532	27,68	0,001***

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (***) ; différences très hautement significatives.

La figure 24 représente les concentrations du Cu détectées dans les eaux usées testées. Les plus fortes concentrations ont été enregistrées au S1 avec des valeurs moyennes : $2.16 \pm 0.16 \mu\text{g/l}$, $2.143 \pm 0.957 \mu\text{g/l}$, $4.181 \pm 0.581 \mu\text{g/l}$, 3.123 ± 0.077 et $2.181 \pm 0.181 \mu\text{g/l}$. Les faibles concentrations ont été détectées à la sortie de la station avec des valeurs moyennes : $0.10 \pm 0.10 \mu\text{g/l}$, $0.106 \pm 0.011 \mu\text{g/l}$, $0.536 \pm 0.164 \mu\text{g/l}$, $0.078 \pm 0.135 \mu\text{g/l}$ et $0.106 \pm 0.110 \mu\text{g/l}$ et ceci pendant Avril 2012, Juillet 2012, Novembre 2012, Février 2013 et Avril 2013 respectivement.

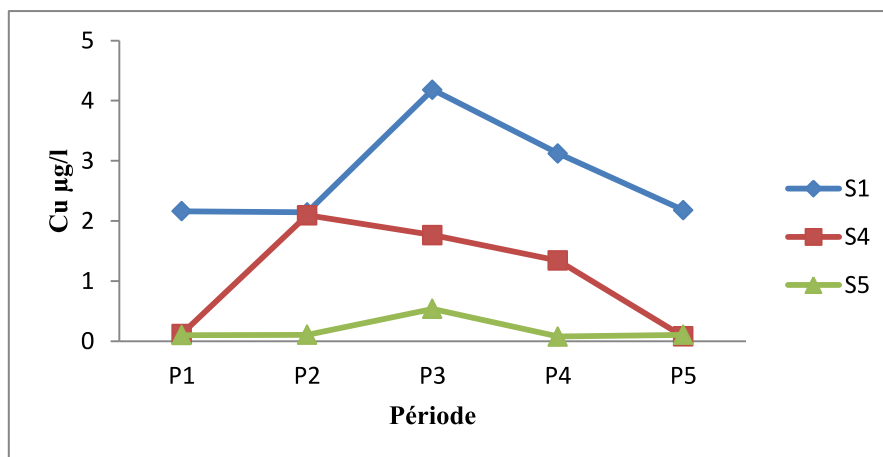


Figure 24 : Variation du taux du Cu dans les différents échantillons des eaux usées.

Les résultats de l'analyse statistique de la comparaison des moyennes de Cu des cinq sites sont présentés dans le tableau XXII.

L'examen des résultats de l'analyse de la variance montre qu'il existe des différences hautement significatives entre les moyennes de Cu des cinq sites et ceci quelle que soit la période d'étude, ceci est justifié par la concentration du Cu dans les boues activées au cours du traitement des eaux usées (Amir, 2010).

Tableau XXII : Résultats de l'analyse de la variance à un critère de classification appliquée au Cu des eaux usées.

période	ddl	SCE	CM	Fobs	P
P1	2	8,4056	4,2028	300,20	0,000***
P2	2	20,634	10,317	73,75	0,000***
P3	2	8,096	4,048	13,22	0,006**
P4	2	14,0438	7,0219	229,52	0,000***
P5	2	8,7178	4,3589	274,18	0,000***

ddl: degrés de liberté, SCE : somme des carrés des écarts, CM : carré moyen, Fobs : valeur observée de F de Fisher, P : probabilité de mettre en évidence des différences significatives, $P \leq \alpha = 0,05$: (*) ; différences significatives, $P \leq \alpha = 0,01$: (**) ; différences hautement significatives, $P \leq \alpha = 0,001$: (***) ; différences très hautement significatives, $P > \alpha = 0,05$: différences non significatives.

La présence des métaux lourds dans les échantillons d'eaux est un indicateur des activités anthropiques (Mico et al., 2006; Owensand Niemeyer, 2006). Les résultats obtenus ont montré que les rejets urbains notamment d'origine domestique et hospitalière constituent une source de cette pollution (Dieter et Reimann, 1989). La diminution du taux des métaux lourds au niveau du S4 indique que ces composés se concentrent dans les boues activées (Jolibois et al., 2009) et ceci due à une rétention par adsorption sur la matière organique, à la formation de complexe insoluble entre cette dernière et la fraction minérale et à la précipitation d'hydroxydes métalliques (Amir, 2010).

1.2. Paramètres bactériologiques

1.2.1. Dénombrement

Les résultats du dénombrement obtenus durant notre période d'étude montrent que les concentrations en GT, CT, CF et en SF enregistrées au niveau des échantillons d'eaux sont très importantes et varient respectivement entre l'entrée de la station, sortie du clarificateur et la sortie de la station.

1.2.1.1. Recherche et dénombrement des germes totaux

La flore mésophile aérobie totale est utilisée comme un indicateur de pollution globale. Cependant le dénombrement de ces germes nous donne une idée sur la charge en microorganismes dans les eaux usées traitées, il est également utilisé comme indicateur d'efficacité de traitement biologique (Fagrouch, 2010).

Les résultats du dénombrement des GT à 22°C et à 37°C des eaux usées prélevées sont présentés dans les figures 25 et 26. Les plus fortes concentrations des GT à 22°C ont été enregistrées au niveau du site S1 avec des valeurs comprises entre 10000 UFC/ml et 110000 UFC/ml tandis que les plus faibles concentrations ont été détectées au niveau du site S5, Ces valeurs varient entre 20 UFC/ml et 4900 UFC/ml.

Les teneurs les plus élevées des GT à 37°C ont été détectées au niveau du site S1 avec un nombre compris entre 10000 UFC/ml et 50000 UFC/ml, les plus faibles teneurs ont été enregistrées dans les eaux usées traitées avec des valeurs moyennes comprises entre 10 UFC/ml et 2080 UFC/ml.

Les résultats obtenus ont révélé une diminution de ces germes aux niveaux des sites 4 et 5 par rapport au S1 et ceci pendant toute la période d'étude. Cette diminution peut être due au système épuratif de la STEP. Cette constatation sur l'effet d'épuration des stations de traitement est en accord avec les observations d'Eddabra (2011) au Maroc.

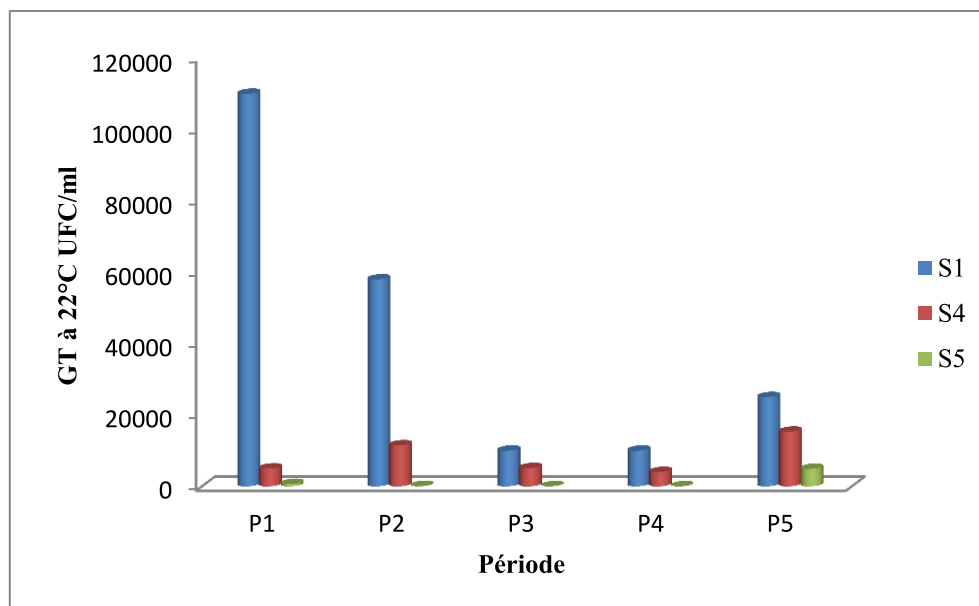


Figure 25 : Résultats du dénombrement des GT à 22°C.

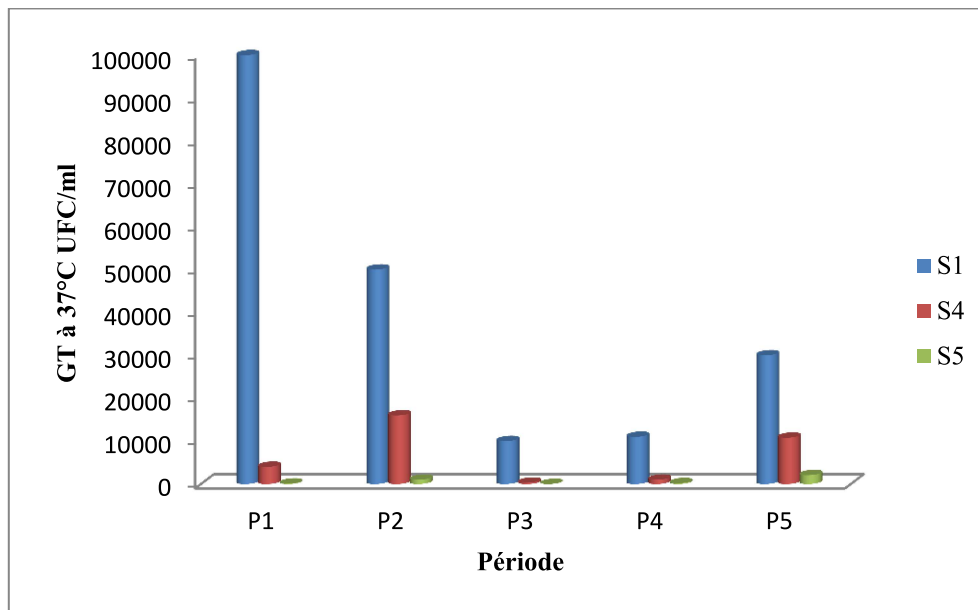


Figure 26 : Résultats du dénombrement des GT à 37°C.

1.2.1.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux

Les CT sont utilisés comme indicateurs de la qualité microbienne de l'eau, ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale (Archibald, 2000).

La figure 27 représente les résultats du dénombrement des CT. Les teneurs les plus élevées de ces germes ont été détectées au niveau du site S1 avec des valeurs comprises entre 24000 UFC/100ml et 240000 UFC/100ml, les valeurs minimales ont été obtenus dans les eaux usées traitées et elles varient entre 7000 UFC/100ml et 11000 UFC/100ml. Les fortes concentrations détectées au S1 montrent que les eaux brutes sont très chargées par les matières fécales humaines et animales. La diminution observée au niveau des sites S4 et S5 est due aux processus d'épuration utilisés au niveau de la STEP (George, 1997 ; Eddabra, 2011).

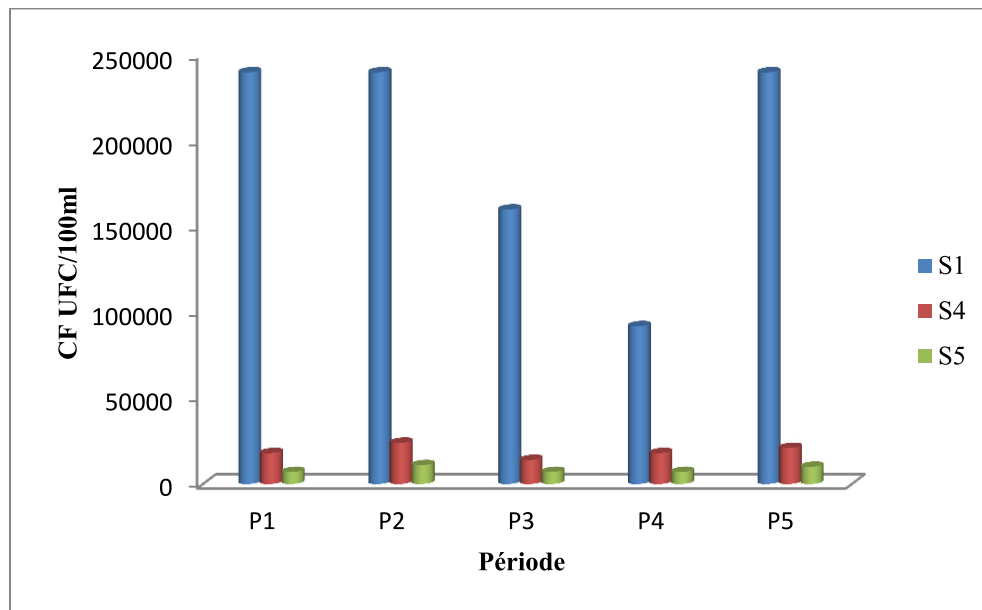


Figure 27 : Résultats du dénombrement des CT.

La figure 28 illustre les résultats des CF dans les différents échantillons. Les fortes concentrations de ces germes ont été détectées au niveau du site S1 avec des valeurs comprises entre 7000 UFC/100ml et 92000 UFC/100ml, les valeurs minimales ont été enregistrée dans les eaux usées traitées et elles varient entre 1000 UFC/100ml et 5000 UFC/100ml.

L'élimination des CF dans la STEP est due à la combinaison de plusieurs conditions qui leur sont défavorables et qui sont plus accentuées en été :

- La température du milieu à une action directe sur la survie des microorganismes (Mara, 1980), la vitesse d'élimination des bactéries augmenterait, selon Pearson et al., (1987) et Olukanni et Ducoste (2011), avec la température par augmentation de leur activité métabolique.
- Le rayonnement UV peut avoir une action directe sur l'élimination des germes indicateurs par leur action photochimique, induisant des dommages dans le matériel génétique des cellules, et empêchant ainsi leur reproduction (El Hachemi, 2005).

Les teneurs obtenues des CF dans les eaux usées traitées dépassent la concentration limite (1000germes/100 ml) recommandée par l'OMS pour la réutilisation de ces eaux traitées en irrigation (OMS, 1989).

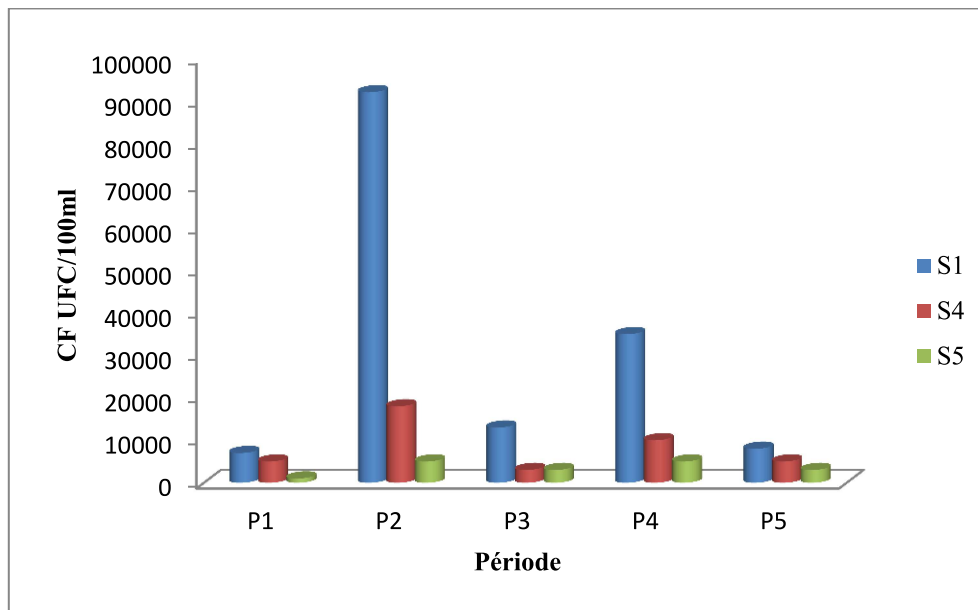


Figure 28 : Résultats du dénombrement des CF.

1.2.1.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux

Les streptocoques sont susceptibles de contaminer les eaux d'approvisionnement, ils sont typiques des déjections animales. Ils peuvent parfois être présents chez l'homme ou dans les végétaux (Bitton, 1999).

La figure 29 représente les résultats du dénombrement des SF des eaux usées prélevées. Les valeurs maximales de ces germes détectées sont comprises entre 18000 UFC/100ml et 240000 UFC/100ml au niveau du S1. Alors que les concentrations les moins élevées ont été enregistrées dans les eaux traitées. La forte concentration de streptocoques enregistrée au niveau du S1 traduit la résistance de ces germes dans le milieu aquatique contenant des rejets finaux (Gleeson et Gray, 1997). La diminution détectée de ces germes dans le S4 et S5 est due au système d'épuration (George, 1997 ; Eddabra, 2011).

La figure 30 illustre les résultats obtenus des streptocoques du groupe D. Une élimination de ces germes a été détectée à la sortie de la station et ceci pendant toute la période d'étude. Ceci est le résultat du traitement d'épuration (Eddabra, 2011).

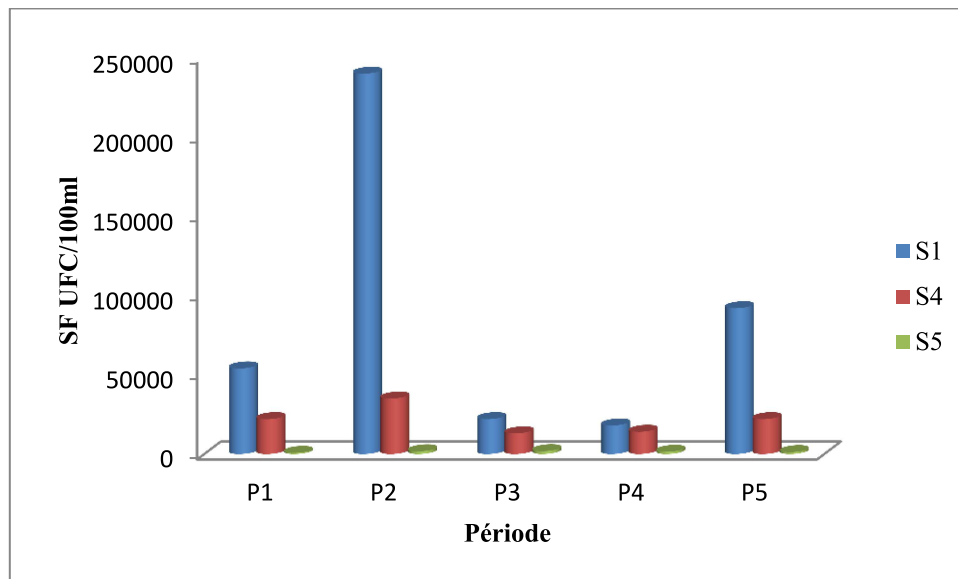


Figure 29 : Résultats du dénombrement des SF.

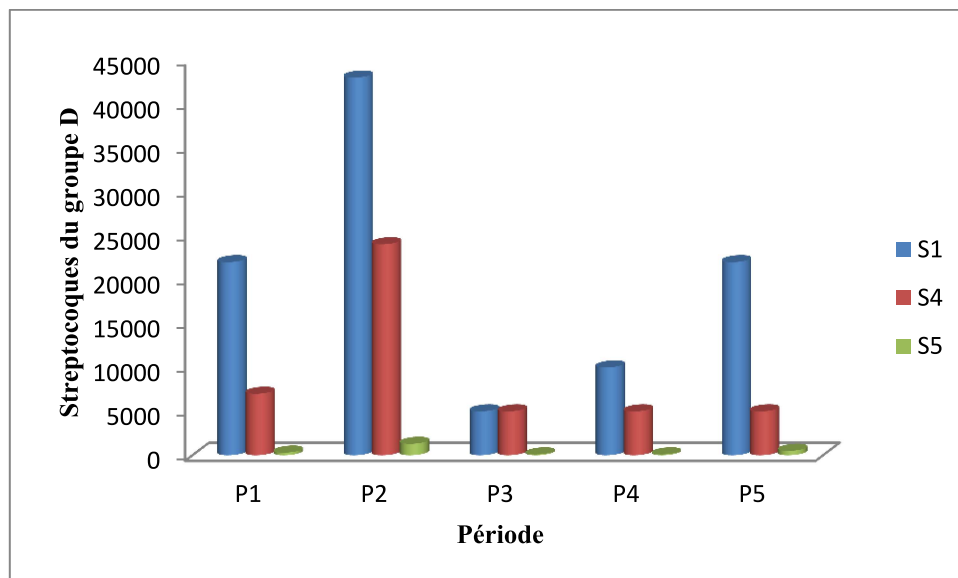


Figure 30 : Résultats du dénombrement des streptocoques du groupe D.

1.2.1.4. Détermination de l'origine de la contamination fécale

L'origine de la contamination fécale est déterminée par le rapport quantitatif $R = CF/SF$. Selon les critères définis par Borrego et Romero (1982), la contamination est d'origine animale si le rapport R est inférieur à 0,7, elle est d'origine humaine si R est supérieur à 4. L'origine de la contamination est mixte à prédominance animale si R est compris entre 0,7 et 1. Cette origine est incertaine si R est compris entre 1 et 2 et l'origine est dite mixte à prédominance humaine si R se situe entre 2 et 4 (Eddabra, 2011).

Les valeurs obtenues des rapports CF/SF sont présentées dans le tableau XXIII. Les résultats obtenus ont montré que l'origine de la contamination fécale est animale et ceci

pendant le mois de Novembre 2012 et le mois d'Avril 2013, elle est d'origine incertaine pendant Février 2013, elle est mixte à prédominance animale et ceci pendant le mois d'Avril 2012, tandis que pendant Juillet 2012, elle est à prédominance humaine.

Tableau XXIII : Origine de la contamination fécale des eaux usées brutes prélevées.

Période	CF/SF	Origine de la contamination
P1	0,12	Origine mixte à prédominance animale
P2	3,83	Origine mixte à prédominance humaine
P3	0,59	Origine animale
P4	1,94	Origine incertaine
P5	0,08	Origine animale

1.2.1.5. Recherche et dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs

Ces germes sont souvent considérés comme des témoins de pollution fécale. La forme spore, beaucoup plus résistante que les formes végétatives des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux, permettrait ainsi de détecter une pollution fécale ancienne ou intermittente (Rodier, 2009).

La figure 31 représente les résultats du dénombrement des ASR dans les échantillons d'eaux usées. Les valeurs maximales de ces germes sont détectées dans les eaux brutes et ceci quelle que soit la période d'étude. Une diminution observée dans le nombre de ces germes aux sites 4 et 5 est due au processus du traitement utilisé dans la STEP. La présence des ASR indique la présence de sulfite de fer, qui provoque l'apparition des mauvaises odeurs et peut être à l'origine de la corrosion des conduites (Rodier, 2005).

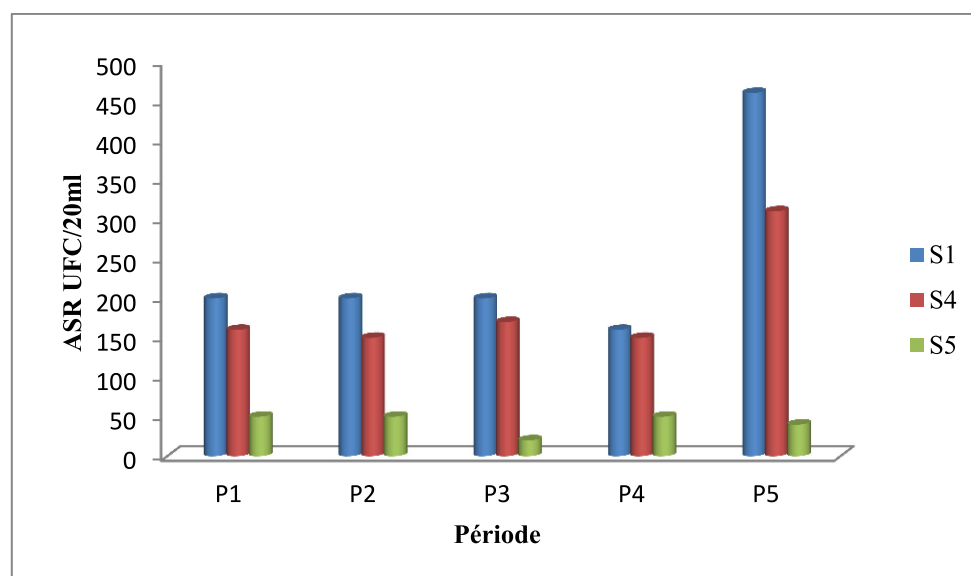


Figure 31 : Résultats du dénombrement des ASR.

1.2.1.6. Abattement des bactéries fécales

Les résultats des abattements enregistrés sont présentés dans le tableau XXIV. Ils sont de l'ordre de 92,39% à 97,08% pour les CT, de 62,5% à 94,56% pour les CF, de 44,44% à 87,03% pour les SF et de l'ordre de 68,75% à 91,3% pour les ASR. Les taux d'abattement pour les CT enregistrés, concordent avec les valeurs trouvées dans la littérature et qui montrent que les procédés biologiques permettent de réduire l'abondance des coliformes de 3 à 4 unités logarithmiques. Il est de l'ordre de 90% pour les boues activées, de 99% pour les boues activées en aération prolongée et pour les réacteurs à culture fixe (Audic, 1990), et de 99,9% pour le lagunage (George et al., 1997).

Tableau XXIV : Résultats d'abattement des bactéries fécales.

Période	Abattement des CT	Abattement des CF	Abattement des SF	Abattement des ASR
P1	97,08%	85,71%	87,03%	75%
P2	95,41%	94,56%	92,91%	75%
P3	95,62%	76,92%	63,63%	90%
P4	92,39%	85,71%	44,44%	68,75%
P5	95,83%	62,5%	86,95%	91,3%

1.2.1.7. Recherche et dénombrement des staphylocoques

La figure 32 représente les résultats du dénombrement des staphylocoques. La présence de ces germes dans les rejets est significative des déchets humains, salive, crachat et sécrétions nasales (CEAERQ, 2012). Les valeurs maximales de ces germes ont été enregistrées au niveau du S1 avec des valeurs comprises entre 26 UFC/ml et 150 UFC/ml, tandis que les valeurs minimales ont été enregistrées dans les eaux usées traitées, ces valeurs varient entre 3 UFC/ml et 26 UFC/ml. Une diminution a été enregistrée au niveau des sites 4 et 5, suite au processus du traitement d'épuration des eaux usées.

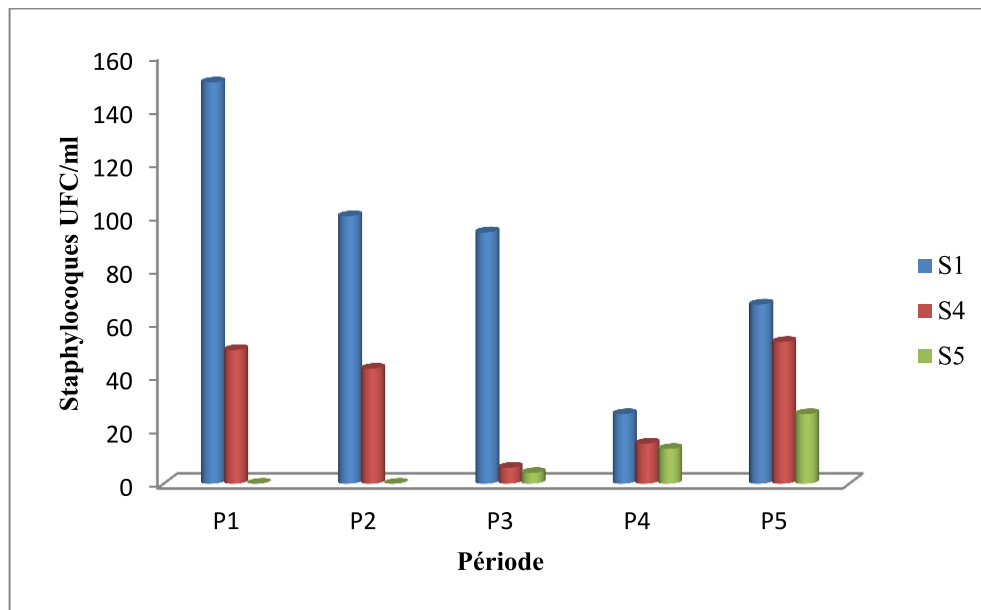


Figure 32 : Résultats du dénombrement des Staphylocoques.

1.2.1.8. Recherche et dénombrement des levures

La figure 33 représente les résultats du dénombrement des levures. Les teneurs les plus élevées de ces germes ont été détectées au niveau du S1 avec un nombre compris entre 15 UFC/ml et 74 UFC/ml tandis que les teneurs les plus faibles ont été enregistrées au niveau du site S5 avec des valeurs moyennes comprises entre 2 UFC/ml et 10 UFC/ml. Les résultats obtenus ont révélé une diminution de la teneur de ces germes au niveau des sites 4 et 5 et ceci par la concentration de ces germes dans les boues activées (Feix et Wiart, 1998).

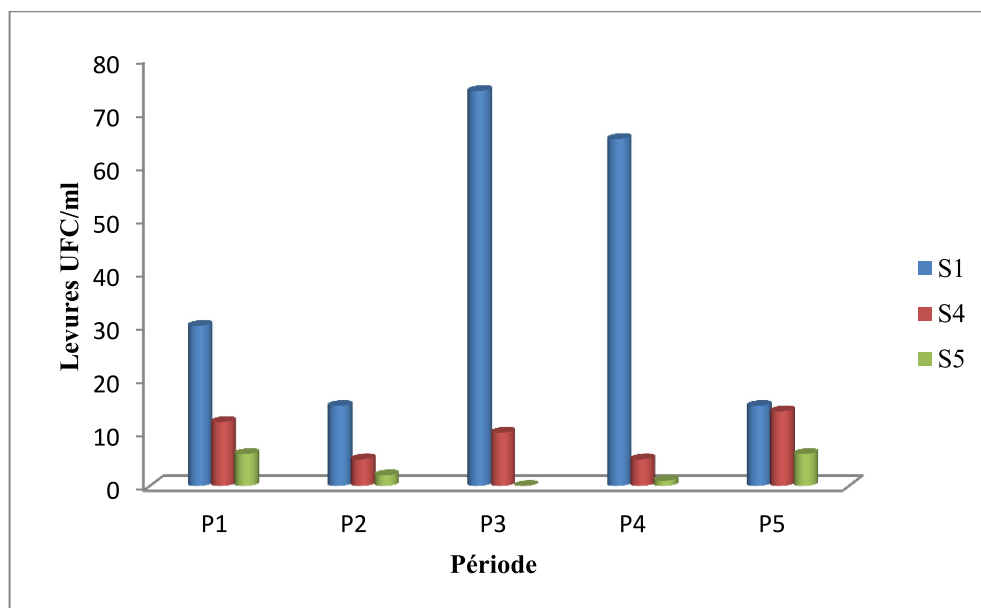


Figure 33 : Résultats du dénombrement des levures.

1.2.2. Identification des espèces bactériennes

La recherche des germes pathogènes est souvent justifiée par une présence de germes totaux en nombre très élevé.

Les résultats de l'identification des germes pathogènes sont présentés dans le tableau XXV. La majorité des espèces identifiées sont des bactéries à Gram négatif, les résultats de l'identification par les galeries Api 20E et Api 20NE ont montré la dominance de ce type de bactéries dans les échantillons des eaux usées et ceci pendant cette étude. Les résultats obtenus ont montré que les eaux usées brutes sont très chargées par les bactéries pathogènes notamment : *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*. La détection de certaines espèces pathogènes à la sortie de la STEP est due probablement à la résistance de ces espèces au processus du traitement. Les résultats obtenus peuvent s'expliquer par le fait que le traitement biologique utilisé dans la STEP favorise la croissance bactérienne pour dégrader la pollution carbonée ou azotée. De plus, l'eau usée est considérée comme le milieu optimal pour la prolifération microbienne (Ounoki, 2014).

Tableau XXV : Résultats de l'identification des espèces bactériennes.

Période	S1	S4	S5
P1	<i>Providencia rettgeri</i> <i>Providencia stuartii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Raoultella terrigena</i> <i>Pasteurella pneumotropica</i> <i>ochrobactrum anthropi</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Echerichia.coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Providencia stuartii</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Pantoea spp4</i> <i>Pseudomonas luteola</i> <i>Klebsiella pneumonie</i> <i>Pseudomonas aerogenosa</i> <i>Providencia stuartii</i>
P2	<i>Pseudomonas aerogenosa</i> <i>Pseudomonas stuartii</i> <i>Providencia rettgeri</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumonie</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Citrobacter freundii</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Aeromonas solmonicida</i> <i>Pseudomonas luteola</i> <i>Salmonella spp</i>	<i>Pantoea spp</i> <i>Providencia stuartii</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
P3	<i>Pseudomonas aerogenosa</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Citrobacter frendii</i> <i>Salmonella spp</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Pseudomonas luteola</i> <i>Pseudomans putida</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Pseudomonas luteola</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
P4	<i>Providencia stuartii</i> <i>Klebsiella pneumonie</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Shigella spp</i> <i>Enterobacter sakazakii</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Echerichia.coli</i>	<i>Cedecea lapagei</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pantoea spp1</i> <i>Citrobacter freundii</i>
P5	<i>Aeromona hydrophila</i> <i>Serratia odoribera</i> <i>Pseudomona flurescens</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Echerichia.coli</i>	<i>Pasteurela pneumotropica</i> <i>Citrobacter kanseri</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Citrobacter kanseri</i> <i>Providencia rettgeri</i>

2. Résultats des tests de génotoxicité

2.1. Test d'Ames

2.1.1. Confirmation des caractères génétiques

Les résultats des caractères génétiques des souches TA98 et TA100 sont présentés dans les figures (34, 35 et 36).

2.1.1.1. Réclamation de l'histidine

Après l'incubation, les deux souches poussent seulement sur les boîtes contenant le mélange his/biotine et non pas sur les boîtes contenant uniquement la biotine.

Ce résultat confirme que les souches sont auxotrophes à l'histidine donc elles possèdent la Mutation his G 46 chez la souche TA100 et la mutation his D3052 chez la souche TA98. La réversion de cette mutation, est d'ailleurs à la base des tests utilisés pour l'évaluation du pouvoir mutagène des substances chimiques (Maron et Ames, 1983 ; Mortelmans et Zeiger, 2000).

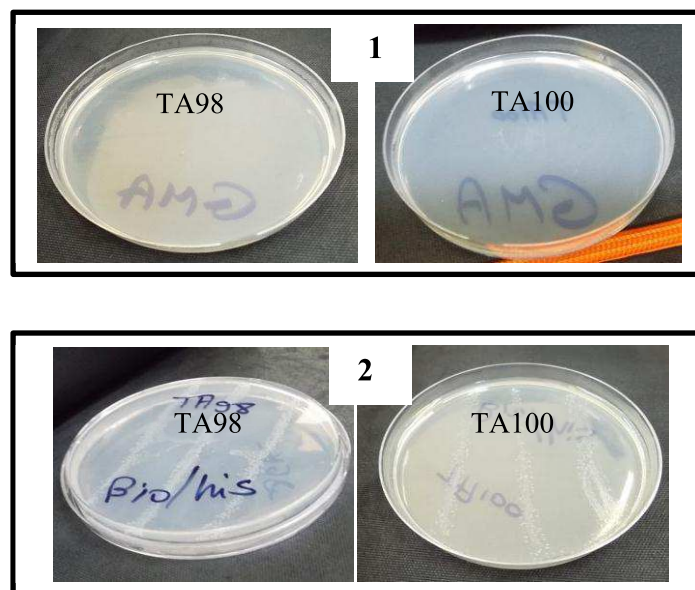


Figure 34 : Réclamation de l'histidine. (1) : Sans histidine et (2) : Avec histidine.

2.1.1.2. Sensibilité aux UV

Après l'incubation, les souches poussent uniquement dans la partie cachée par la plaque de verre tandis que la souche *S. typhimurium* sauvage pousse tout au long de la boîte même dans la partie exposée aux UV grâce à l'activité du système de réparation par excision (uvrA, uvrB et uvrC). Ces résultats se concordent avec les travaux d'Ames (1983). Ces résultats confirment que les deux souches TA98 et TA100 sont porteuses de la mutation uvrB

ce qui confère une augmentation de la sensibilité des souches à la détection des mutagènes. Même constatation dans les travaux de Mortelmans et Zeiger (2000).



Figure 35 : Effet des UV sur les souches d'Ames et la souche sauvage. (1) : TA98, (2) : TA100 et (3) : *S. typhimurium* sauvage.

2.1.1.3. La résistance à l'ampicilline et la sensibilité au CV

Les résultats de la résistance à l'ampicilline et la sensibilité au CV sont présentés dans les figures suivantes :

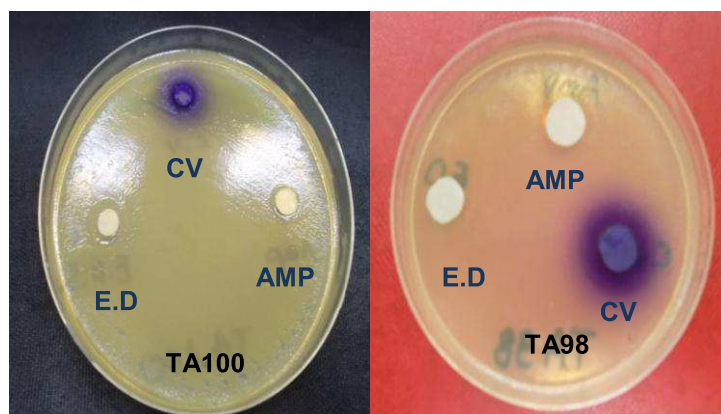


Figure 36 : Effet de l'Ampicilline et du CV sur les souches d'Ames (TA100/TA98).

On observe après l'incubation, une poussée des souches d'Ames autour des disques imbibés par l'Ampicilline et l'eau distillée et des zones claires autour des disques imbibés par le CV, ce dernier a traversé la membrane de ces souches d'où la formation de la zone d'inhibition. Ces résultats confirment que les deux souches sont porteuses à la fois du plasmide pKM101 qui confère à la souche le pouvoir de résistance à l'ampicilline et de la mutation Rfa, mutation qui permet d'augmenter la perméabilité des deux souches TA98 et

TA100 aux grandes molécules qui sont incapables de pénétrer dans la cellule normale. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par les travaux de Mortelmans et Zeiger (2000).

2.1.2. Résultats du test d'Ames

Les résultats obtenus du test d'Ames durant notre étude sont présentés dans le tableau XXVI.

Tableau XXVI : Résultats du test de mutagenèse (test d'Ames).

Traitement		Nombre de révertants His ⁺ moyenne $\pm$ SD [*]			
		TA98		TA100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
P1	S1	96,33 $\pm$ 7,37 ^{*m}	120,33 $\pm$ 11,5 ^{*m}	111 $\pm$ 10,14	140,33 $\pm$ 5,5 [*]
	S4	3236,66 $\pm$ 161,58 ^{*m}	3372 $\pm$ 197,61 ^{*m}	3416,3 $\pm$ 212,6 ^{*m}	3348,33 $\pm$ 238,76 ^{*m}
	S5	5279 $\pm$ 281,02 ^{*m}	4316,33 $\pm$ 196,01 ^{*m}	3520,33 $\pm$ 170,11 ^{*m}	3113,33 $\pm$ 100,16 ^{*m}
P2	S1	265 $\pm$ 24,51 ^{*m}	86,33 $\pm$ 11,86 ^{*m}	367,33 $\pm$ 11,84 ^{*m}	99,66 $\pm$ 3,51
	S4	248 $\pm$ 18,33 ^{*m}	248,33 $\pm$ 9,5 ^{*m}	252 $\pm$ 9,5 ^{*m}	357,33 $\pm$ 19,65 ^{*m}
	S5	226,33 $\pm$ 14,22 ^{*m}	229,66 $\pm$ 8,96 ^{*m}	565 $\pm$ 8,96 ^{*m}	543,33 $\pm$ 17 ^{*m}
P3	S1	527 $\pm$ 31,09 ^{*m}	490,66 $\pm$ 8,32 ^{*m}	790 $\pm$ 36,05 ^{*m}	696,66 $\pm$ 25,16 ^{*m}
	S4	226,66 $\pm$ 23,15 ^{*m}	244,66 $\pm$ 32,33 ^{*m}	233 $\pm$ 29,1 ^{*m}	260 $\pm$ 33,06 ^{*m}
	S5	534,66 $\pm$ 31,06 ^{*m}	551,66 $\pm$ 42,52 ^{*m}	463 $\pm$ 50,58 ^{*m}	436,66 $\pm$ 35,11 ^{*m}
P4	S1	966,66 $\pm$ 25,73 ^{*m}	946,33 $\pm$ 55,59 ^{*m}	1192 $\pm$ 13,85 ^{*m}	906,33 $\pm$ 37,28 ^{*m}
	S4	169,33 $\pm$ 16,28 ^{*m}	496,33 $\pm$ 50,4 ^{*m}	97,33 $\pm$ 7,5	95 $\pm$ 7,81
	S5	218,66 $\pm$ 21,38 ^{*m}	289,66 $\pm$ 45,72 ^{*m}	1005,33 $\pm$ 51,63 ^{*m}	1013,66 $\pm$ 80,37 ^{*m}
P5	S1	642,33 $\pm$ 39,92 ^{*m}	582,33 $\pm$ 29,56 ^{*m}	1246,66 $\pm$ 76,74 ^{*m}	871,66 $\pm$ 24,66 ^{*m}
	S4	152,33 $\pm$ 15,5 ^{*m}	165,66 $\pm$ 18,44 ^{*m}	89,66 $\pm$ 5,68 [*]	94 $\pm$ 8,71
	S5	94,00 $\pm$ 6 ^{*m}	94,33 $\pm$ 10,21 ^{*m}	128,33 $\pm$ 23,86	241,66 $\pm$ 20,20 ^{*m}
Contrôle négatif		23,33 $\pm$ 5,85	25,66 $\pm$ 3,78	107,33 $\pm$ 6,42	101 $\pm$ 3,6
SA-10 ^{cp} μ g/plate				1876.2 $\pm$ 109.34 [*]	
2AA-5 ^{cp} μ g/plate					2384.2 $\pm$ 102.32 [*]
2AF-200 ^{cp} μ g/plate			986.6 $\pm$ 71.15 [*]		
NPD-200 ^{cp} μ g/plate		1485.4 $\pm$ 134.61 [*]			

^{*}Résultat significatif ($p \leq 0,05$) (test Mann whitney), m : mutagène, SA: Sodium azide, 2AA: 2-aminoanthracene, 2AF: 2-aminofluorene, NPD: 4-nitro-o-phenylenediamine, cp : contrôle positif, SD : écart type.

L'évaluation des résultats du test d'Ames a été effectuée selon Mortelmans et Zeiger (2000), un potentiel mutagène est supposé, si la fréquence de révertants obtenus est le double (2 fois plus) que le nombre de révertants du contrôle négatif (Liman et al., 2010).

Les valeurs moyennes du nombre de révertants du contrôle négatif obtenues sont : $23,33 \pm 9,7$ pour TA98 et $107,33 \pm 6,42$ pour TA100 et ceci en absence de l'activation métabolique S9 mix. Par contre, en présence de S9mix, ces valeurs sont : $25,66 \pm 3,78$ et $101 \pm 3,6$, respectivement. Selon Mortelmans et Zeiger (2000), ce nombre de révertants spontanés est trouvé dans les valeurs normales pour les deux souches étudiées.

Le résultat de la présente étude a montré que tous les échantillons d'eau ont été trouvés être mutagènes pour *S. typhimurium* TA98 avec ou sans activation métabolique. D'autre part, tous les échantillons d'eau sauf ceux prélevés du S1 en Avril 2012, S1 en Juillet 2012 et S4 en Avril 2013 avec S9 Mix, S4 en Février 2013, et S4 et S5 en Avril 2013 sans S9 Mix ont été trouvés être mutagènes pour *S. typhimurium* TA100 avec ou sans S9 mix. L'utilisation de l'activation métabolique avec des souches TA98 et TA100 ne favorise pas la concentration de mutagènes pour la plupart des échantillons. Ces résultats sont en accord avec ceux de Hartmann et al. (1999) qui a montré que la génotoxicité des eaux usées hospitalières avec le test UmuC était indépendante de l'utilisation d'une activation métabolique S9. De même, White et Rasmussen (1998) indiquaient que les composés génotoxiques dans les eaux de surface et les déchets municipaux sont principalement à action directe, c'est à dire le S9 ne amplifie pas la réponse (Gupta et al., 2009). Cependant, une réponse positive a été observée au niveau du site S5 pour la souche TA100, pour le mois d'Avril 2013.

La variabilité des réponses obtenues au niveau des sites et pendant toute la période d'étude par le test d'Ames en présence et en absence d'activation métabolique (positivité relevée avec des souches de sensibilité différente, différences de proportion et d'intensité des réponses positives) tend à montrer une grande diversité des composés responsables de cette génotoxicité (Jolibois et al., 2009). Les échantillons des eaux usées induisent un décalage du cadre de lecture (Frameshifts) et une substitution dans les paires de base car les deux souches TA 98 et TA100 sont utilisées pour détecter ces deux mutations respectivement (Mortelmans et Zeiger, 2000). Comme déjà signalé, la présence de métaux lourds dans les échantillons testés comme le Cd qui est capable d'induire des lésions de l'ADN et des mutations telles que des mutations ponctuelles, délétions et insertion des bases, réarrangements et substitution de base (Castano and Becerril, 2004), par ailleurs le plomb et le cuivre peuvent induire des dommages oxydatifs dans l'ADN (Tabrez et Ahmed, 2011 ; Ben Salem et al., 2014) ainsi que l'interaction entre ces métaux pourrait conduire à un effet génotoxique (Castano and Becerril,

2004). Cependant, La recherche d'un lien de causalité entre la présence d'un ou de plusieurs composés chimiques dans les eaux usées et la génotoxicité observée est une tâche concrètement impossible. Les composés génotoxiques potentiellement présents dans les eaux usées sont multiples et variés, et la plupart d'entre eux n'ont, à de rares exceptions près, jamais été identifiés dans les eaux usées ou les eaux de surface. Dans notre étude, les eaux traitées par la station d'épuration sont exclusivement d'origine urbaine (domestique et hospitalière) et leur génotoxicité est difficilement explicable, même si les excréta humains (urines et fèces) ont pu être incriminés par certains auteurs (Jolibois et al., 2009). En effet, des études précédentes ont montré que les eaux usées hospitalières de Rouen présentaient une activité génotoxique par le test d'Ames (Abdil et al., 2013). À titre d'exemple, parmi les nombreuses molécules utilisées dans un hôpital et susceptibles d'être rejetées dans les eaux usées via les excréta des patients, on peut citer la ciprofloxacine, identifiée par Hartmann et al. (1999) comme une source de génotoxicité des eaux usées hospitalières allemandes. En effet, les échantillons prélevés à partir du site S5 présentaient un fort pouvoir mutagène et ceci peut être dû à la formation des sous-produits chlorés formés par l'interaction du chlore utilisé lors du traitement avec la matière organique (Zidane et al., 2011). L'augmentation observée dans le nombre de révertants au niveau du site S5 notamment pendant Novembre 2012 et Février 2013, indiquent que les eaux usées traitées par le chlore présentent un effet génotoxique. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Monarca et al., (2000).

2.2. Test d'*Allium*

Plusieurs études ont été menées en utilisant le test *Allium cepa* pour évaluer la génotoxicité des échantillons environnementaux, comme l'eau et les sols pollués et la plupart d'entre eux ont montré des résultats positifs. En ce qui concerne la pollution de l'eau, Smaka-Kincl et al. (1996) ont montré que l'essai *Allium cepa* est un test sensible pour évaluer la qualité de l'eau et ceci dans une étude visant à évaluer le potentiel génotoxique des effluents municipaux et des eaux de surface (Smaka et al., 1996 ; Leme et Marin-Morale, 2009).

La caractérisation de la cytotoxicité et de la génotoxicité des eaux usées prélevées a été surveillée par l'analyse de la longueur des racines, l'IM et par la fréquence des AC respectivement.

2.2.1. Longueur des racines

Les résultats de la longueur des racines exposées aux échantillons des eaux usées sont présentés dans le tableau (XXVII).

Les racines d'*Allium cepa* exposées au contrôle négatif avaient une longueur moyenne de 3.3 ± 0.67 cm. Une diminution dans la longueur des racines a été observée pour tous les échantillons des eaux usées notamment pour ceux prélevés à partir des sites S1 et S5 et ceci pendant toute la période d'étude. Des réductions significatives de la longueur des racines ont été enregistrées dans *Allium cepa* exposé aux échantillons des eaux usées prélevés du S4 (3.2 ± 0.27 cm) durant le mois de Novembre 2012, (3.2 ± 0.27 cm) durant le mois d'Avril 2012, (2.64 ± 0.21 cm) durant le mois d'Avril 2013 et concernant le S5, une différence significative a été observée durant le mois de Novembre 2012 avec une valeur de (2.5 ± 0.7 cm). L'inhibition de la croissance des racines détectée au cours de cette étude est associée à l'activité méristématique apicale et à l'allongement de la cellule au cours de la différenciation (Liman et al., 2010).

Tableau XXVII : Résultats de la longueur des racines d'*Allium cepa*.

Traitement	Moyenne de la longueur $\pm$ SD				
	Avril 2012 Moyenne $\pm$ SD	Juillet 2012 Moyenne $\pm$ SD	Novembre 2012 Moyenne $\pm$ SD	Février 2013 Moyenne $\pm$ SD	Avril 2013 Moyenne $\pm$ SD
S1	$2 \pm 0.35a$	$3 \pm 0.35a$	$1.7 \pm 0.44a$	$2.04 \pm 0.08a$	$2.04 \pm 0.28a$
S4	$3.2 \pm 0.27b$	$3.34 \pm 0.32a$	$3.2 \pm 0.27b$	$2.2 \pm 0.27a$	$2.64 \pm 0.21b$
S5	$2.5 \pm 0.7a$	$2.9 \pm 0.22a$	$2.5 \pm 0.7c$	$1.84 \pm 0.23a$	$1.74 \pm 0.25a$
Contrôle négatif	$3.3 \pm 0.67b$	$3.3 \pm 0.67a$	$3.3 \pm 0.67b$	$3.3 \pm 0.67b$	$3.3 \pm 0.67c$
MMS***	$1.1 \pm 0.22c$	$1.1 \pm 0.22b$	$1.1 \pm 0.22a$	$1.1 \pm 0.22c$	$1.1 \pm 0.22d$

* les moyennes qui ont la même lettre ne diffèrent pas statistiquement à $p \leq 0.05$, SD : écart type.

2.2.2. L'indice mitotique

Les résultats de l'IM des racines d'*Allium cepa* et du pourcentage des phases mitotiques sont présentés dans les tableaux XXVIII et XXIX.

L'IM, caractérisé par le nombre total des divisions des cellules dans le cycle cellulaire, a été utilisé en tant que paramètre à évaluer la cytotoxicité de plusieurs substances. Le niveau de cytotoxicité d'une substance peut être déterminé par l'augmentation ou la diminution du IM (Fernandes et al., 2007, Leme et Marin-Morale, 2009).

Une diminution dans l'IM a été enregistrée pour tous les échantillons d'eaux des différents sites et pendant toute la période d'étude et ceci par rapport au IM du contrôle négatif ($p \leq 0.05$). La valeur maximale de l'IM a été enregistrée pour le contrôle négatif (20.82 ± 1.07) tandis que la valeur minimale (6.81 ± 0.89) a été obtenue pour le contrôle positif MMS. Ces valeurs pour les eaux usées sont 18.16 ± 1.51 au S4 pendant Avril 2013 et 9.31 ± 1.12 au S1 pendant Avril 2012. La diminution de l'IM a montré des résultats

statistiquement significatifs (à $p \leq 0.05$) sauf pour les échantillons prélevés à partir du site 1 durant les cinq prélèvements, du site 4 durant le mois de Février 2013 et ceux prélevés du site 5 le mois de Juillet 2012.

Tous les échantillons des eaux usées testés pendant ce travail ont provoqué un changement dans le pourcentage des phases mitotiques et ceci par comparaison au contrôle négatif. Les valeurs du pourcentage des phases mitotiques du contrôle négatif étaient $74.64 \pm 5.02\%$ pour la prophase, $7.51 \pm 3.51\%$ pour la métaphase, $7.31 \pm 2.21\%$ pour l'anaphase et $10.53 \pm 3.65\%$ pour la télophase. Une diminution dans la prophase a été enregistrée ainsi que dans l'anaphase et ceci pour tous les sites durant ces périodes : Avril 2012, Février 2013 et Avril 2013, pour les sites 1 et 5 durant le mois de Novembre 2012, pour les sites 1 et 4 durant le mois de Juillet 2012 et pour les sites 4 et 5 et ceci durant le mois d'Avril 2013. Une augmentation significative a été observée pour la télophase pendant toute la période du travail sauf pour le site 1 durant les mois d'Avril 2012 et de Juillet 2012, pour le site 5 durant Juillet 2012 et Novembre 2012 et pour le site 4 durant le mois de Février.

Dans notre étude, la diminution de l'IM indique que la croissance et le développement des organismes exposés ont été affectés par les composés des échantillons testés (El Shahaby et al., 2003, Liman et al., 2010). Les métaux lourds tels que le cadmium et le cuivre, à titre individuel ou en combinaison avec d'autres métaux, peuvent exercer un effet inhibiteur puissant sur la division cellulaire (Knasmüller et al., 1998 ; Rank et Nielsen, 1998 ; Unyayar et al., 2006) ainsi que la présence de nitrate, nitrite, ammonium et du phosphate peut causer la diminution du MI (Radić et al., 2010).

La diminution significative de l'activité mitotique indique un effet mito-dépressif de métaux lourds, pourrait interférer avec le développement normal de la mitose, ce qui empêche un certain nombre de cellules de pénétrer dans la prophase et en bloquant le cycle de la mitose durant l'interphase (Yıldız et al., 2009). Cette constatation est détectée dans notre étude par la diminution du pourcentage de la prophase.

Tableau XXVIII : Effet des eaux usées sur l'IM des racines d'*Allium cepa*.

Traitement		NCC	IM± SD*
P1	S1	5286	9.31±1.12a
	S4	5212	13.06±1.19b
	S5	5509	13.71±1.13b
P2	S1	5238	13.47±1.42a
	S4	5391	16.83±1.9b
	S5	5253	14.05±0.53a
P3	S1	5556	14.28±0.8a
	S4	5245	15.99±1.39b
	S5	5196	16.45±1.22b
P4	S1	5150	14.71±1.04ab
	S4	5253	15.13±1.17a
	S5	5306	13.51±1.24b
P5	S1	5131	15.33±0.78a
	S4	5192	18.16±1.51b
	S5	5225	17.92±0.76b
Contrôle négatif		5183	20.82±1.07c
MMS		5194	6.81±0.89d

* les moyennes qui possèdent la même lettre ne diffèrent pas statistiquement à $p \leq 0.05$, NCC : nombre de cellules comptées, SD : écart type.

Tableau XXIX : Pourcentage des phases mitotiques des racines d'*Allium cepa*.

Traitement		NCC	Phases mitotiques (%) $\pm$ SD*			
			Prophase	Métaphase	Anaphase	Télophase
P1	S1	5286	58.29 $\pm$ 5.21a	8.45 $\pm$ 2.41a	11.34 $\pm$ 2.3a	21.95 $\pm$ 4.35a
	S4	5212	49.72 $\pm$ 3.16b	7.29 $\pm$ 1.93a	4.98 $\pm$ 0.74b	37.99 $\pm$ 2.37b
	S5	5509	47.12 $\pm$ 2.72b	6.65 $\pm$ 3.4a	5.02 $\pm$ 2.07b	41.19 $\pm$ 4.16b
Contrôle négatif		5183	74.64 $\pm$ 5.02c	7.51 $\pm$ 3.51a	7.31 $\pm$ 2.21b	10.53 $\pm$ 3.65c
MMS		5194	57.6 $\pm$ 5.65a	13.84 $\pm$ 3.8b	8.63 $\pm$ 3.56ab	19.9 $\pm$ 4.85a
P2	S1	5238	45.22 $\pm$ 3.9a	12.82 $\pm$ 1.99a	6.9 $\pm$ 1.76a	35.04 $\pm$ 2.63a
	S4	5391	46.85 $\pm$ 2.51a	6.61 $\pm$ 1.75b	5.74 $\pm$ 1.35a	40.79 $\pm$ 4.45b
	S5	5253	45.96 $\pm$ 1.52a	10.36 $\pm$ 1.79ab	7.25 $\pm$ 2.17a	36.43 $\pm$ 1.66ab
Contrôle négatif		5183	74.64 $\pm$ 5.02b	7.51 $\pm$ 3.51b	7.31 $\pm$ 2.21a	10.53 $\pm$ 3.65c
MMS		5194	57.6 $\pm$ 5.65c	13.84 $\pm$ 3.8a	8.63 $\pm$ 3.56a	19.9 $\pm$ 4.85d
P3	S1	5556	45.91 $\pm$ 2.76a	11.21 $\pm$ 1.25ab	5.8 $\pm$ 1.68a	37.07 $\pm$ 3.67a
	S4	5245	46.39 $\pm$ 2.94a	9.17 $\pm$ 2.23ab	7.86 $\pm$ 1.5a	36.57 $\pm$ 3.83a
	S5	5196	54.37 $\pm$ 3.39b	9.67 $\pm$ 1.16ab	6.19 $\pm$ 1.44a	29.75 $\pm$ 4.03c
Contrôle négatif		5183	74.64 $\pm$ 5.02c	7.51 $\pm$ 3.51a	7.31 $\pm$ 2.21a	10.53 $\pm$ 3.65d
MMS		5194	57.6 $\pm$ 5.65b	13.84 $\pm$ 3.8b	8.63 $\pm$ 3.56a	19.9 $\pm$ 4.85e
P4	S1	5150	50.45 $\pm$ 3.35a	4.17 $\pm$ 2.65a	3.48 $\pm$ 1.75a	41.89 $\pm$ 2.82ab
	S4	5253	49.91 $\pm$ 4.88a	9.43 $\pm$ 2.63ab	3.1 $\pm$ 1.36a	37.55 $\pm$ 4.38a
	S5	5306	41.79 $\pm$ 1.9b	7.65 $\pm$ 2.08a	6.27 $\pm$ 1.33ab	44.27 $\pm$ 2.95b
Contrôle négatif		5183	74.64 $\pm$ 5.02c	7.51 $\pm$ 3.51a	7.31 $\pm$ 2.21b	10.53 $\pm$ 3.65c
MMS		5194	57.6 $\pm$ 5.65d	13.84 $\pm$ 3.8b	8.63 $\pm$ 3.56b	19.9 $\pm$ 4.85d
P5	S1	5131	37.83 $\pm$ 1.14a	8.67 $\pm$ 1.42a	3.67 $\pm$ 1.16a	49.81 $\pm$ 1.24a
	S4	5192	46.47 $\pm$ 1.76b	6.58 $\pm$ 1.76a	2.72 $\pm$ 1.47a	44.21 $\pm$ 3.09b
	S5	5225	43.72 $\pm$ 3.23b	5.89 $\pm$ 2.01a	3.75 $\pm$ 1.15a	46.63 $\pm$ 2.59ab
Contrôle négatif		5183	74.64 $\pm$ 5.02c	7.51 $\pm$ 3.51a	7.31 $\pm$ 2.21b	10.53 $\pm$ 3.65c
MMS		5194	57.6 $\pm$ 5.65d	13.84 $\pm$ 6.8b	8.63 $\pm$ 3.56b	19.9 $\pm$ 4.85d

* les moyennes qui possèdent la même lettre ne diffèrent pas statistiquement à $p \leq 0.05$, SD : Ecart type, NCC : nombre de cellules comptées, SD : écart type.

2.2.3. Les aberrations chromosomiques

Les résultats des AC détectées dans les racines d'*Allium cepa* sont présentés dans le tableau XXX.

Les AC sont caractérisés par le changement soit dans le nombre total de chromosomes ou de la structure chromosomique qui se produisent en raison de l'exposition à des agents

chimiques ou physiques. Pour évaluer les différentes anomalies chromosomiques. Plusieurs types d'AC sont considérés à différents stades du cycle cellulaire (prophase, métaphase, anaphase et télophase). Les AC ont été regroupés en deux types, les aberrations clastogéniques et physiologiques. Les aberrations clastogéniques comprennent les ponts chromosomiques, la rupture chromosomique alors que les aberrations physiologiques comprennent chromosome retardataire et la condensation des chromosomes (Lemes et Mari-Morale, 2009 ; Khanna et Sharma, 2013).

Le pourcentage le plus élevé des anomalies chromosomique a été détecté pour le MMS avec une valeur moyenne de : 7.38 ± 0.61 % et le plus faible pourcentage observé était pour le contrôle négatif avec une valeur moyenne de : 3.66 ± 0.65 %.

Durant notre étude, l'anomalie la plus fréquente est la présence des ponts chromosomiques. Les autres aberrations : Condensation des chromosomes, perturbation anaphase-télophase (PAT) et chromosome vagabond sont observées avec des valeurs légèrement différentes à celles du contrôle négatif. L'effet des échantillons des eaux usées sur les racines était significatif et ceci pour le S5 durant Juillet 2012, Février 2013 et pour le S4 et le S5 durant le mois d'Avril 2013. L'observation de ces AC dans les racines traitées par les eaux usées peut être due à la présence des métaux lourds dans ces échantillons. Ces résultats sont en accord avec des études qui ont montré que les métaux lourds (Nickel, Aluminium, Manganèse, Lithium, Cu et Cd) peuvent induire des AC (Lemes et Mari-Morale, 2009). Ainsi, le Cd connu par son effet génotoxique dans les plantes, Borboa et de La Torre (1996) ont montré des effets clastogènes et aneugènes dans *Allium cepa* comme une conséquence de l'exposition au Cd (Monteiro et al., 2010). Les ponts chromosomiques peuvent se produire au cours de la translocation de l'inégalité d'échange de chromatides ou en raison de la présence du chromosome dicentrique ou de la rupture de la fusion des chromosomes et des chromatides. Ces ponts provoquent des mutations chromosomiques (El-Ghamery et al., 2000 ; Luo et al., 2004), l'apparition de cette aberration dans la présente étude peut être due à la présence de métaux lourds dans les échantillons et ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par Borboa et de La Torre (1996) qui ont observé l'apparition de ponts chromosomiques lors de l'ana-télophase de cellules méristématiques sur des racines d'*Allium cepa* exposées durant 20h à une concentration de 3.10^{-5} M de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Egalement, le cuivre peut provoquer des ponts chromosomiques (Foltete, 2010). Les autres AC observées, PAT et chromosome vagabond pourraient se produire par l'effet des échantillons des eaux usées sur la formation des microtubules, Ce dysfonctionnement peut survenir en raison de l'inhibition de la polymérisation de la tubuline (Liman et al., 2010). L'anomalie condensation des

chromosomes est considérée comme un signe d'effets toxiques irréversible sur les chromosomes menant probablement à la mort cellulaire. La condensation des chromosomes a été rapporté chez les racines d'*Allium* après traitement avec divers métaux lourds tels que le Cu (Michael et al., 2009 ; Radić et al., 2010).

Tableau XXX : Pourcentage des AC détectées dans les racines d'*Allium cepa*.

Traitement		Anaphase-Telophase Anomalies %					
		NCC	PAT	V	C	PC	AT± SD*
P1	S1	568	2.68	0.85	0.9	1.04	5.47±1.09a
	S4	547	1.49	0.91	0.17	1.81	4.38±0.61bc
	S5	576	1.05	0.31	-	3.66	5.02±0.36ac
Contrôle négatif		546	1.47	0.73	0.92	0.54	3.66±0.65b
MMS-****		586	4.21	0.7	0.84	1.63	7.38±0.61d
P2	S1	658	0.6	0.62	0.13	1.84	3.19±0.1a
	S4	552	0.72	0.56	0.36	1.62	3.26±0.51a
	S5	591	1.14	0.49	0.92	1.73	4.6±1.23b
Contrôle négatif		546	1.47	0.73	0.92	0.54	3.66±0.65ab
MMS-****		586	4.21	0.7	0.84	1.63	7.38±0.61d
P3	S1	611	1.05	1.15	-	1.8	4±0.96a
	S4	535	0.18	0.19	1.1	1.7	3.17±0.39a
	S5	541	1.47	0.35	0.76	1.11	3.88±0.3a
Contrôle négatif		546	1.47	0.73	0.92	0.54	3.66±0.65a
MMS-****		586	4.21	0.7	0.84	1.63	7.38±0.61b
P4	S1	583	0.53	0.33	1.02	1.2	3.08±0.26a
	S4	557	0.55	0.54	1.24	0.91	3.24±0.55a
	S5	641	0.44	1.11	1.55	1.23	4.32±0.42b
Contrôle négatif		546	1.47	0.73	0.92	0.54	3.66±0.65ab
MMS-****		586	4.21	0.7	0.84	1.63	7.38±0.61c
P5	S1	592	0.34	-	2.17	1.88	4.39±0.48a
	S4	575	-	0.3	1.31	1.53	3.13±0.39b
	S5	521	0.19	0.2	1.72	1.34	3.45±0.43b
Contrôle négatif		546	1.47	0.73	0.92	0.54	3.66±0.65b
MMS-****		586	4.21	0.7	0.84	1.63	7.38±0.61c

* les moyennes qui possèdent la même lettre ne diffèrent pas statistiquement à $p \leq 0.05$, NCC : nombre de cellules comptées, SD : écart type, PAT: Perturbation Anaphase-Telophase, V: Vagabond, C: Condensation des chromosomes, PC : Pont chromosomique, AT: Anomalies Totales.

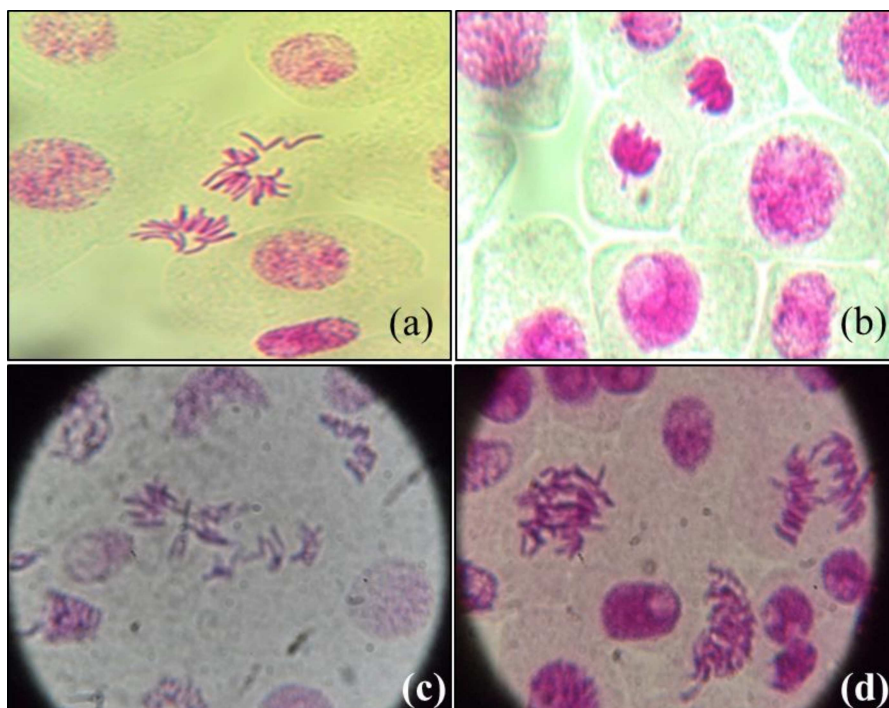


Figure 37 : Aberrations chromosomiques détectées dans les racines d'*Allium cepa*. (a) : chromosome vagabond, (b) : condensation des chromosomes, (c) : PAT et (d) : ponts chromosomiques.

2.3. Test de micronoyaux

Les résultats du test de micronoyaux sont résumés dans les tableaux XXXI et XXXII. Dans notre étude, seulement les cellules binucléées avec un micronoyau sont comptabilisées parce qu'aucune cellule binucléée avec 2 ou plusieurs MN_x n'a été observée.

Cette étude, réalisée *in vitro* sur lymphocytes humains avait pour but de comparer les effets génotoxiques de différents volumes d'eaux usées prélevées, et ceci en utilisant le test de numération des MN_x sur des lymphocytes humains *in vitro*. Avec cette méthode, les effets cytotoxiques des échantillons testés ont pu être évalués.

Les résultats obtenus ont montré que la plupart des échantillons testés induisent la formation de MN dans les cellules binucléées mais avec une différence dans sa fréquence. La valeur maximale de la fréquence de MN a été enregistrée au niveau du S1 ($0,048 \pm 0,01$) et ceci pour le volume 0,9 ml pendant le mois d'Avril 2012 tandis que la valeur minimale ($0,002 \pm 0,001$) a été obtenue au niveau du S1 et ceci pour le volume 0,3ml pendant Juillet 2012.

La formation de MN est affectée par la concentration des eaux usées testées. En effet, la fréquence de MN augmente avec le volume des échantillons testés et ceci pour la plupart des échantillons d'eaux usées. Ainsi, la fréquence de MN détectée dans les lymphocytes traités par les échantillons d'eaux prélevés du S1 et du S5 est plus élevée par rapport à celle

enregistré au niveau du S4. Des différences significatives ($P \leq 0,05$) dans la fréquence de MN a été enregistrée pendant Avril 2012 et Juillet 2012, et ceci en comparant avec la fréquence obtenue pour le contrôle négatif ($0,01 \pm 0,001$).

La détection de MN dans la présente étude est due à la présence des métaux lourds dans les eaux usées testées, ces résultats sont en accords avec ceux cités par Seoane et Dulout (2001) et Migliore et al. (2002). Les connaissances actuelles sur les mécanismes de génotoxicité des métaux suggèrent que plusieurs mécanismes pourraient expliquer leur potentiel génotoxique. Leur action principale semble être la formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène menant à la peroxydation lipidique, la formation d'adduits à l'ADN et l'interférence avec les mécanismes de réparation et / ou de réplication de l'ADN (El Asslouj, 2009 ; Darolles, 2010).

Tableau XXXI : Fréquence des MN_x dans les lymphocytes humains traités par différentes concentrations d'eaux usées.

Site		P1 Moyenne±SD	P2 Moyenne±SD	P3 Moyenne±SD	P4 Moyenne±SD	P5 Moyenne±SD
S1	0,3ml	0 ^{**}	0,002±0,001 ^{**}	0,013±0,01 ^{ns}	0,014±0,01 ^{ns}	0,007±0,001 ^{ns}
	0,6ml	0,0109±0,01 ^{**}	0,005±0,002 ^{**}	0,02±0,01 ^{ns}	0,0218±0,01 ^{ns}	0,0102±0,01 ^{ns}
	0,9ml	0,048±0,01 ^{**}	0,009±0,001 ^{**}	0,02±0,01 ^{ns}	0,0284±0,01 ^{ns}	0,029±0,01 ^{ns}
S4	0,3ml	0,02±0,02 ^{**}	00,000000 ^{**}	0,004±0,001 ^{ns}	0,0108±0,01 ^{ns}	0,04±0,02 ^{ns}
	0,6ml	0,011±0,01 ^{**}	0,011±0,01 ^{**}	0,012±0,01 ^{ns}	0,0119±0,01 ^{ns}	0,007±0,002 ^{ns}
	0,9ml	0,02±0,02 ^{**}	0,004±0,002 ^{**}	0,015±0,01 ^{ns}	/	0,016±0,01 ^{ns}
S5	0,3ml	0,013±0,01 ^{**}	0,016±0,01 ^{**}	0 ^{ns}	0,013±0,01 ^{ns}	0,012±0,01 ^{ns}
	0,6ml	0,008±0,001 ^{**}	0,017±0,01 ^{**}	0,014±0,01 ^{ns}	0,013±0,01 ^{ns}	0,023±0,02 ^{ns}
	0,9ml	0,01±0,01 ^{**}	0,02±0,01 ^{**}	0,02±0,01 ^{ns}	0,024±0,01 ^{ns}	0,022±0,02 ^{ns}
CN		0,01±0,001 ^{**}	0,01±0,001 ^{**}	0,01±0,001 ^{ns}	0,01±0,001 ^{ns}	0,01±0,001 ^{ns}

SD : écart type, * Résultat significatif, ** résultat très significatif, *** résultat hautement significatif, $p \leq 0,05$, CN : contrôle négatif.

Avec l'utilisation de la cytochalasine B dans le test de numération des MN_x, une estimation de la prolifération cellulaire est possible et traduit, *in vitro*, la cytotoxicité des produits étudiés. Durant notre étude, Une diminution dans l'IP a été enregistrée pour tous les différents sites et pendant toute la période d'étude sauf pour les échantillons prélevés du S1 et du S4 (0,3ml) pendant Juillet 2012 et du S1 (0,3ml) et ceci par rapport au IP du contrôle négatif. La valeur la plus élevée a été obtenue pour les échantillons prélevés à partir du S1 (0,3ml) durant Juillet 2012 et la valeur la plus faible a été observée au S1 (0,9ml) durant Avril

2012. La diminution de l'IP a montré des résultats statistiquement significatifs ($P \leq 0,05$) sauf pour les échantillons prélevés pendant Novembre 2012, Par conséquent, ces résultats indiquent l'effet inhibiteur des polluants des eaux usées sur la prolifération des lymphocytes (El Asslouj, 2009).

Les résultats obtenus ont montré l'existence d'une corrélation inverse entre l'IP et le taux des MN et ceci pour la plupart des échantillons testés. En effet lorsque le taux MN augmente, la vitesse de la division cellulaire est retardée, ceci est probablement dû à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire les checkpoint G1/S et G2/M en réponse aux lésions induites au niveau de l'ADN (Glouib et al., 2006) (Fig. 38, 39, 40, 41 et 42).

Tableau XXXII : IP des lymphocytes humains traités par différentes concentrations des eaux usées.

Site		P1 moyenne±SD	P2 moyenne±SD	P3 moyenne±SD	P4 moyenne±SD	P5 moyenne±SD
S1	0,3ml	1,193±0,1 ^{**}	1,89±0,1 ^{**}	1,464 ±0,4 ^{ns}	1,187± 0,1 ^{***}	1,305±0,1 ^{**}
	0,6ml	0,939±0,1 ^{**}	1,691± 0,3 ^{**}	1,388±0,3 ^{ns}	1,235± 0,2 ^{***}	1,322±0,3 ^{**}
	0,9ml	1,041±0,02 ^{**}	1,745±0,2 ^{**}	1,269± 0,2 ^{ns}	1,2± 0,2 ^{***}	1,088±0,01 ^{**}
S4	0,3ml	1,109± 0,1 ^{**}	1,841±0,1 ^{**}	1,24± 0,2 ^{ns}	1,197± 0,1 ^{***}	1,025± 0,02 ^{**}
	0,6ml	1,098±0,01 ^{**}	1,095± 0,01 ^{**}	1,21± 0,2 ^{ns}	1,181± 0,1 ^{***}	1,148±0,1 ^{**}
	0,9ml	1,042±0,02 ^{**}	1,251±0,2 ^{**}	1,197±0,1 ^{ns}	/	1,06± 0,02 ^{**}
S5	0,3ml	1,152±0,10 ^{**}	1,392± 0,3 ^{**}	1,197± 0,1 ^{ns}	1,365±0,3 ^{***}	1,088±0,01 ^{**}
	0,6ml	1,244± 0,10 ^{**}	1,497 ±0,2 ^{**}	1,373±0,3 ^{ns}	1,164± 0,1 ^{***}	1,085±0,01 ^{**}
	0,9ml	1,119± 0,1 ^{**}	1,278 ±0,2 ^{**}	1,323±0,3 ^{ns}	1,132± 0,1 ^{***}	1,048±0,02 ^{**}
CN		1,40±0,2 ^{**}	1,4±0,2 ^{**}	1,40±0,2 ^{ns}	1,40±0,2 ^{***}	1,40±0,2 ^{**}

SD : Ecart type, ^{*} résultat significatif, ^{**} résultat très significatif, ^{***} résultat hautement significatif, $p \leq 0,05$, CN : contrôle négatif.

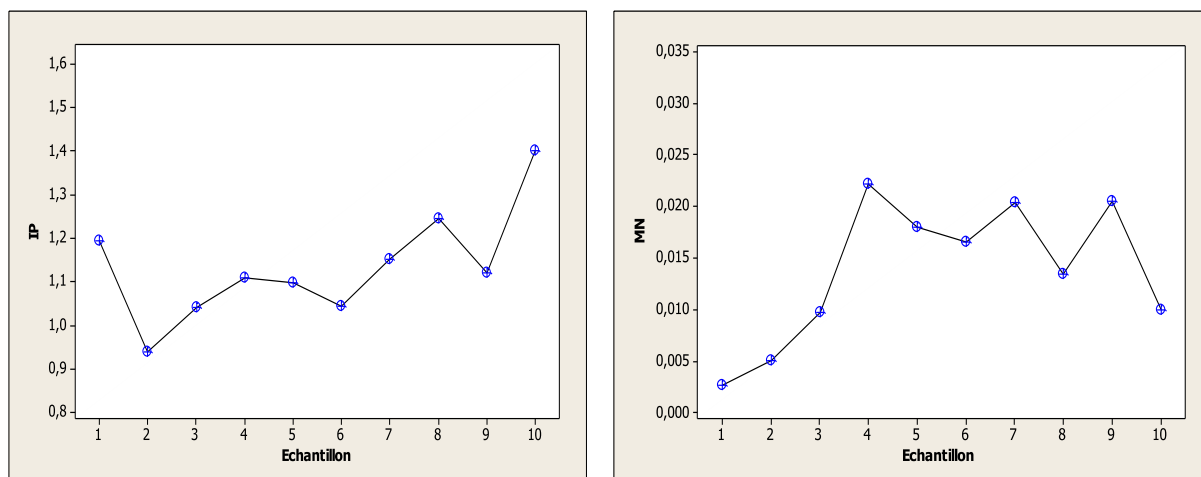


Figure 38 : IP et la fréquence des MN_x des lymphocytes traités pendant Avril 2012. (1, 2 et 3) : S1 (0,3ml, 0,6ml et 0,9ml), (4, 5 et 6) : S4 (0, 3ml, 0,6ml et 0,9ml), (7,8 et 9) : S5 (0, 3ml, 0,6ml et 0,9ml), (10) : Contrôle négatif.

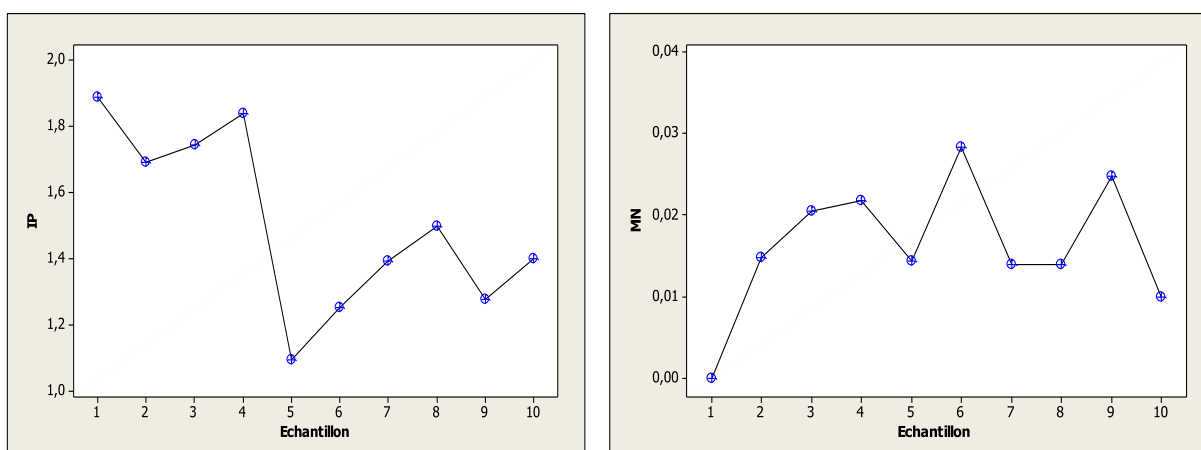


Figure 39 : IP et la fréquence des MN_x des lymphocytes traités pendant Juillet 2012. (1, 2 et 3) : S1 (0,3ml, 0,6ml et 0,9ml), (4, 5 et 6) : S4 (0, 3ml, 0,6ml et 0,9ml), (7,8 et 9) : S5 (0, 3ml, 0,6ml et 0,9ml) et (10) : Contrôle négatif.

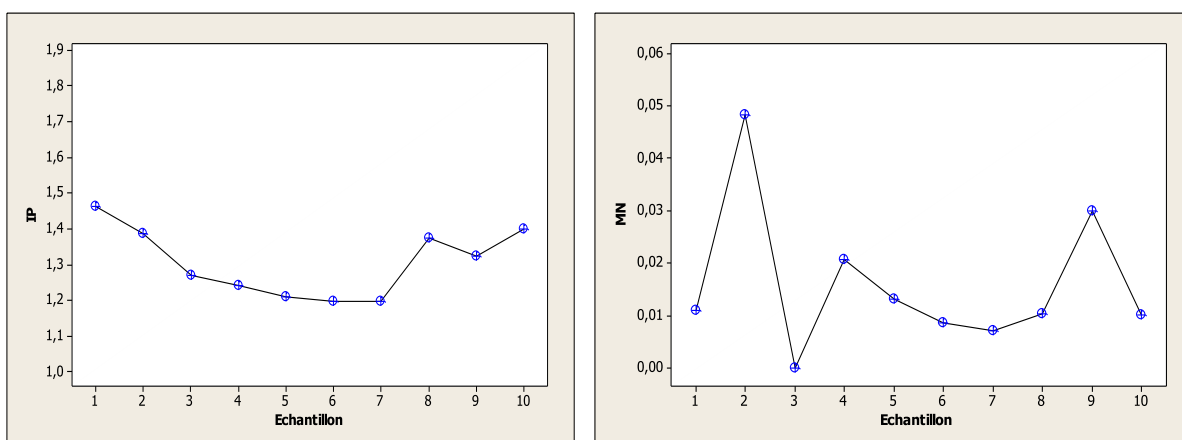


Figure 40 : IP et la fréquence des MN_x des lymphocytes traités pendant Novembre 2012. (1, 2 et 3) : S1 (0, 3ml, 0,6ml et 0,9ml), (4, 5 et 6) : S4 (0,3ml, 0,6ml et 0,9ml), (7,8 et 9) : S5 (0, 3ml, 0,6ml et 0,9ml) et (10) : Contrôle négatif.

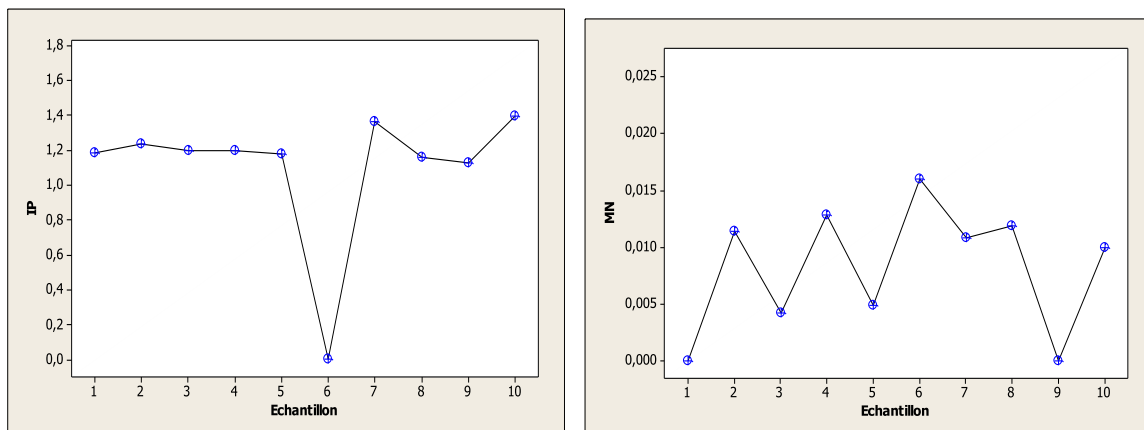


Figure 41 : IP et la fréquence des MN_x des lymphocytes traités pendant Février 2013. (1, 2 et 3) : S1 (0,3ml, 0,6ml et 0,9ml), (4, 5 et 6) : S4 (0,3ml, 0,6ml et 0,9ml), (7,8 et 9) : S5 (0,3ml, 0,6ml et 0,9ml) et (10) : Contrôle négatif.

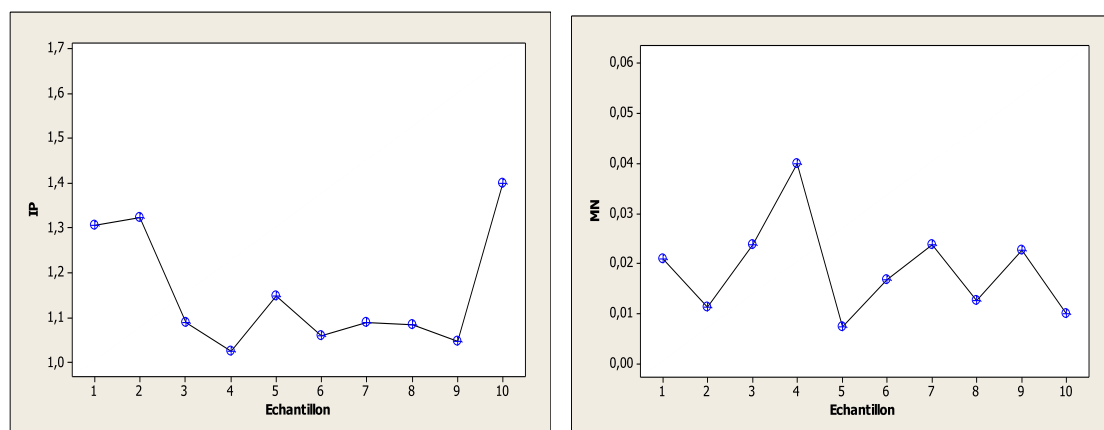


Figure 42 : IP et la fréquence des MN_x des lymphocytes traités pendant Avril 2013. (1, 2 et 3) : S1 (0,3ml, 0,6ml et 0,9ml), (4, 5 et 6) : S4 (0,3ml, 0,6ml et 0,9ml), (7,8 et 9) : S5 (0,3ml, 0,6ml et 0,9ml) et (10) : Contrôle négatif.

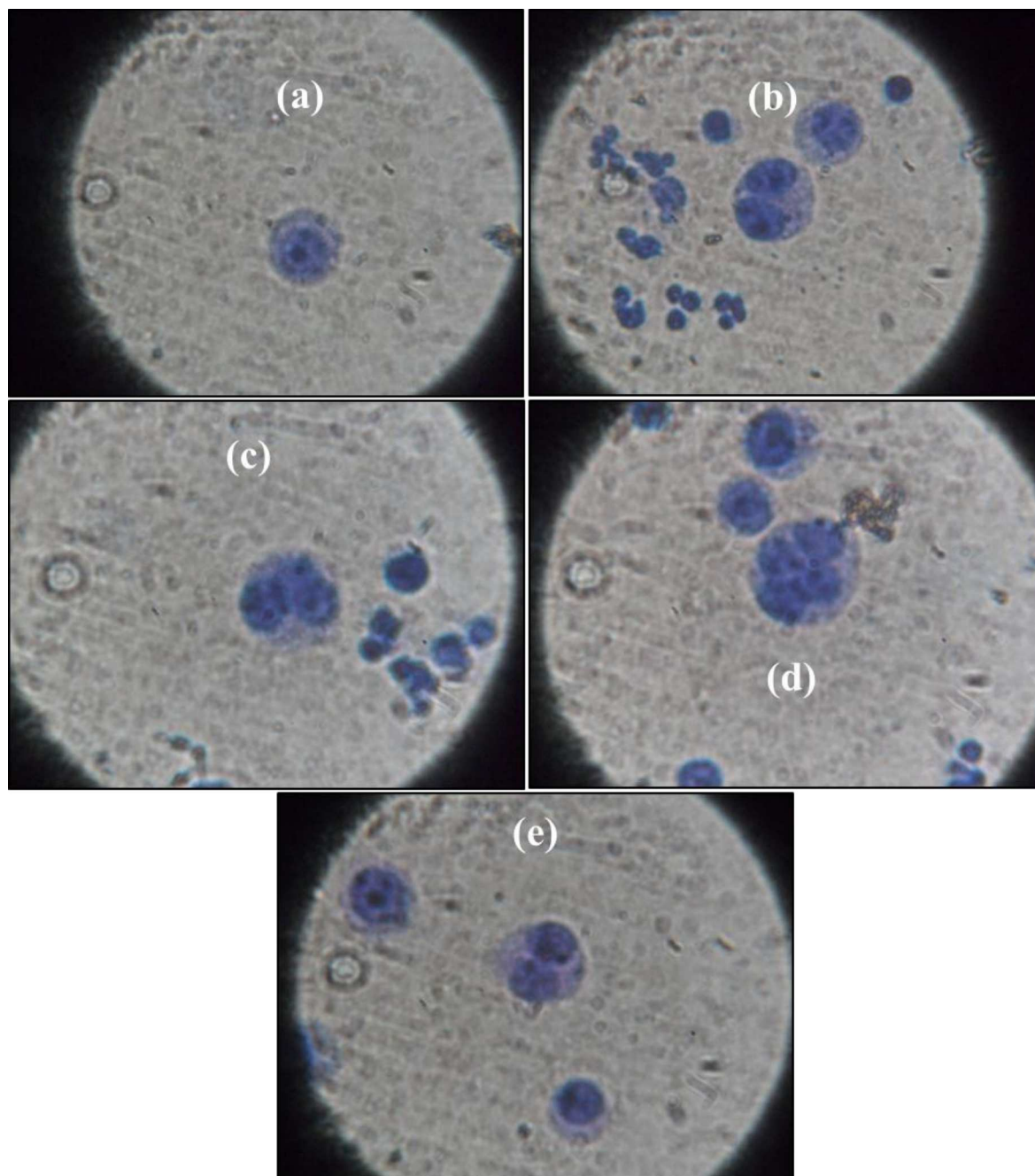


Figure 43 : Cellules lymphocytaires examinées. (a) : cellule mononuclée, (b) : cellule binuclée, (c) : cellule trinuclée, (d) : cellule tétranuclée et (e) : cellule binuclée avec MN.

CONCLUSION GENERALE

L'Algérie est classée dans la catégorie des pays pauvres en ressources hydriques au regard du seuil de rareté fixé par la banque mondiale à 1000 m³/habitant/an. La forte croissance démographique, l'urbanisation massive et le développement des activités industrielles ont généré une production importante d'eaux usées qui peuvent constituer une ressource en eau non négligeable suite à son recyclage.

Ce travail de thèse qui entre dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité du traitement d'épuration des eaux usées urbaines de la ville de Guelma avait plusieurs objectifs. Le premier était l'étude de l'évolution des différents paramètres de qualité physicochimique et microbiologique au niveau des différents sites choisis.

Les résultats des paramètres physicochimiques ont montré que les échantillons d'eaux usées sont pollués par de nombreux micropolluants organiques et inorganiques. La diminution significative dans les niveaux des paramètres étudiés (DCO, DBO₅, MES, NO₂⁻, NH₄⁺ et PO₄⁻³) est le résultat du traitement d'épuration notamment au niveau du bassin d'aération où il y a une dégradation de la matière organique par les microorganismes, sauf pour les nitrates et ceci peut être expliqué par l'oxydation bactérienne de l'ammonium. La diminution significative des métaux lourds (Cd, Pb et Cu) mesurés durant cette étude est due à la concentration de ceux-ci dans les boues activées. Les résultats d'analyses obtenus dans les eaux usées traitées au cours de cette étude présentent des valeurs qui sont en grande partie conformes aux normes internationales d'une eau d'irrigation.

Les résultats microbiologiques démontrent que les eaux usées brutes de la STEP sont fortement chargées en bactéries. Cependant le traitement de ces eaux a permis un abattement compris entre 44,44% et 97,08% pour la charge des coliformes fécaux, des entérocoques et des spores des bactéries sulfito-réductrices entre l'entrée et la sortie de la station. La détection des espèces pathogènes dans les eaux usées traitées est probablement liée à la résistance de ces espèces au processus d'épuration.

Le second objectif de cette étude était l'évaluation de l'effet génotoxique des eaux usées et ceci avec l'utilisation de différents tests biologiques. Nos résultats ont montré que les eaux usées testées dans notre étude possèdent un caractère génotoxique qui est clairement visible par les trois tests biologiques utilisés : test d'Ames, le test des aberrations chromosomiques dans les racines d'*Allium cepa* et le test de micronoyaux sur des lymphocytes humains et ceci pour les trois types d'eau testée : eau brute, eau clarifiée et eau traitée mais avec une différence dans l'intensité des réponses.

La génotoxicité détectée dans les eaux traitées peut être due aux produits chimiques présents dans ces eaux usées qui résistent au traitement et persistent dans les effluents de la station d'épuration et également l'utilisation du chlore au cours du traitement tertiaire peut causer la formation des sous-produits de chloration, qui peuvent provoquer des dommages dans l'ADN. Des études complémentaires doivent être prises dans le domaine d'analyse afin d'essayer d'identifier et de quantifier les composés responsables de cette génotoxicité.

Les résultats obtenus permettent d'affirmer que les eaux usées épurées de la station de Guelma peuvent être valorisées, leurs caractéristiques physicochimiques leur confèrent un potentiel d'utilisation. Cependant, les résultats obtenus des paramètres microbiologiques et génotoxiques ont montré l'inefficacité du traitement d'épuration de ces eaux, ce qui nécessite un traitement plus poussé par la station d'épuration de la ville de Guelma.

Dans cette étude, les essais conduits en matière de valorisation des eaux usées épurées au niveau de la STEP de Guelma sont encore limités, Des connaissances supplémentaires sont donc nécessaires pour éclairer les décisions publiques en matière de réglementations (traitements des eaux, irrigations, modes de suivis et de contrôle de la qualité des eaux, de l'efficacité des traitements et des risques de recontamination pendant le stockage ou le transport des eaux usées traitées). C'est pour cette raison que nous recommandons :

- De caractériser dans un ou plusieurs contextes de réutilisation d'eaux usées, le devenir des pathogènes à la surface des végétaux (évaluer la qualité sanitaire des cultures irriguées) et dans le sol suite à un ou plusieurs apports d'eau usée recyclée ;
- De déterminer les concentrations des nutriments et la détermination de leurs valeurs technologiques et nutritionnelles ;
- De déterminer le taux des autres micropolluants organiques et inorganiques dans les eaux et les végétaux irrigués ;
- et d'adapter un traitement d'épuration capable d'éliminer les effets génotoxiques des eaux usées tel que les UV et l'utilisation des microfiltres.

Références bibliographiques

- Abdel-Massih R. M., Melki P. N., Afif C., et Daoud Z. (2013).** Detection of genotoxicity in hospital wastewater of a developing country using SOS chromotest and Ames fluctuation test. *Journal of Environmental Engineering & Ecological Science*, doi:10.7243/2050-1323-2-4.
- Abouelouafa M., El Halouani H., Kharboua M. et Berrichi A. (2002).** Caractérisation physico-chimique et bactériologique des eaux usées brutes de la ville d'Oujda: canal principal et Oued Bounaïm, *Acte édition*, Rabat, vol 22 (23), 143-150.
- Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) (1996).** Equipements de tri et de conditionnement des matériaux recyclables. ADEME / Eco Emballages, ADEME Editions.
- Aissam H., (2003).** Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, 182.
- Alexandre O., Boutin C., Duchène P., Lagrange C., Lakel A., Liénard A. and Orditz D. (1997).** Filières d'épuration adaptées aux petites collectivités. Document technique FNDAE n°22. Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.
- Amahdar L., Anouar A., Ababou B., Verschaeve L. and Hilali A. (2009).** *In vitro* genotoxicity of Settat town landfill leachate, Morocco, *Arh Hig Rada Toksikol*, doi: 10.2478/10004-1254-60-1925, 60:179-184.
- Amir S. (2005).** Contribution à La Valorisation de boues de stations d'épuration par compostage : devenir des micropolluants métalliques et organiques et bilan humique du compost. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique De Toulouse, 341p.
- Archibald F (2000).** The presence of coliform bacteria in Canadian pulp and paper mill water systems: a cause for concern?. *Water Quality Research Journal of Canada*, 35(1), 1-22.
- Asano T. (1998).** Irrigation with reclaimed municipal wastewater : California experiences. CIHEAM Options Méditerranéennes, Bari (Italy). 119-132.
- Asano T. (1998).** Wastewater reclamation and reuse. Ed, Water quality management library, 1475 P.
- Audic J.M. (1990).** Evolution des technologies d'élimination des microorganismes. In: IFREMER – actes de colloques. 11:133-148.
- Aulicino E. A., Mastrantonio A., Orsini E., Bellucci C., Muscillo M. and Larosa G. (1996).** Enteric viruses in a wastewater treatment plant in Rome. *Water, Air, and Soil Pollution*, 91: 327-334.

- Ayers, R.S. et Westcot D.W. (1994).** Water quality for agriculture. FAO. *Irrigation and drainage paper*. N° 29 Rev. 1 FAO, Rome. 174 p.
- Barbosa J. S., Cabral T. M., Ferreira D. N., Agnez-Lima L.F. and Batistuzzode S.R. (2010).** Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 320–325.
- Baumont S., Camard J. P. et Lefranc A. (2009).** Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France, École nationale supérieure agronomique de Toulouse (ENSAT), 222p.
- Baumont S., Camard J.P., Lefranc, A. et Franconi A. (2004).** Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France. Observatoire Régional de Santé d'Île-de-France, 176 p.
- Belaid N. (2010).** Evaluation des impacts de l'irrigation par les eaux usées traitées sur les plantes et les sols du périmètre irrigué d'El Hajeb-Sfax: salinisation, accumulation et phytoabsorption des éléments métalliques, thèse de doctorat, Université de Limoges, 236p.
- Belgiorno V., Luigi R., Despo Fatta Claudio D. R., Giusy L., Anastasia N., Vincenzo N. and Sureyya M. (2007).** Review on endocrine disrupting emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse. *Desalination*, 215: 166–176.
- Ben Salem Z., Capelli N., Grisey E., Baurand P. E., Ayadi H., and Aleya L. (2014).** First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: The advantage of using the RAPD-PCR technique. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 101, 90–96.
- Benbraika A. et Ghedab R. (2013).** La tarification des couts relatifs à l'eau en Algérie. *Revue des Sciences Humaines*, 29, 7-21.
- Bengoumi M., Traoure A., Bouchriti N., Bengoumi D. et Hraiki A. (2004).** Qualite de l'eau ,en agriculture. *Revue trimestrielle d'information scientifique et technique* 3(1), 5-25.
- Bitton G. (1999).** Wastewater Microbiology. John Wiley & Sons, USA, 578 p.
- Bixio D., De Heyder B., Chikurel H., Muston M., Miska V., Joksimovic D., Schäfer A.I., Ravazzini A., Aharoni A., Savic D. and Thoeve C. (2005).** Municipal wastewater reclamation: where do we stand? An overview of treatment technology and management practice. *Water. Science. Technology*, 5(1) 77–85.
- Bixio D., Thoeve C., Wintgens T., Ravazzini A., Miska V., Muston M., Chikurel H., Aharoni A., Joksimovic D. and Melin T. (2008).** Water reclamation and reuse implementation and management issues. *Desalination*, 218, 13–23.

- Blanc R. and Nasser A. (1996).** Effect of effluent quality and temperature on the persistence of viruses in soil. *Water Science and Technology*, Volume 33, Issues 10-11, 237-242.
- Blumenthal U.J., Peasey A., Ruiz-Palacios G. and Mara D.D. (2000).** Guidelines for wastewater reuse in agriculture and aquaculture: recommended revisions based on new research evidence. WELL 128 Study, Task N°. 68 Part 1, London School of Hygiene & Tropical Medicine, UK WEDC, Loughborough University (UK). 67 p.
- Borboa L., and De La Torre C. (1996).** The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. *New Phytologist*, 134, 481–486.
- Borrego A.F. et Romero P. (1982):** Study of the microbiological pollution of a Malaga littoral area II. Relationship between fecal coliforms and fecal streptococci. VI^e journée étude pollutions, Cannes, France, 561-569p.
- Boswell F.C., Parker M.B. and Gaines T.P (1989).** Soil zinc and pH effects on zinc concentrations of corn plants. *Communications in soil science and plant analysis*, 20(15-16): 1575-1600.
- Bremond R. et Perrodon C. (1979).** Paramètres de la qualité des eaux, 2^eme édition. Ministère de l'Environnement et du Cadre de Vie. 259p.
- Campos C. (2008).** New perspectives on microbiological water control for wastewater reuse. *Desalination*, 218, 34–42.
- Carr R.M., Blumenthal U.J. and Mara D.D. (2004).** Health Guidelines for the Use of Wastewater in Agriculture: Developing Realistic Guidelines. In: Scott, C., N. Faruqi, and L.Raschid-Sally (ed.), *Wastewater Use in Irrigated Agriculture: Confronting the Livelihood and Environmental Realities*, CAB International, London.
- Castaño A. and Becerril C. (2004).** In vitro assessment of DNA damage after short-and long term exposure to benzo (a) pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line. *Mutation Research*, 552, 141–151.
- Cauchi H., Nakache, Schwartzbrod, Zagury, Baron, Carre, Courtois, Denis, Dernas, Seguret (1996).** La réutilisation des eaux usées après épuration. *Techniques, Sciences et méthodes*, 2:81-118.
- CEAERQ, (2012).** Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* : méthode par filtration sur membrane, Québec, 19p.
- Chafai D. (1996).** Micromycetes des sédiments d'oueds et effluents industriels de l'Est Algérien. Thèse de Doctorat, Université de Joseph Fourier, Grenoble I. France, 211 p.

- Chandra S., Chauhan L. K., Murthy R. C., Saxena P. N., Pande P. N. and Gupta S. K. (2005).** Comparativ biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using the Allium test. *Science of the Total Environment*, 347, 46–52.
- Charland K. (2014).** Analyse des perspectives de réutilisation des eaux usées municipales au Québec, Essai présenté au Centre universitaire de formation en environnement et développement durable. Université de Sherbrooke, 78p.
- Cheriot S., 2007.** Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides, thèse de doctorat, life Sciences, Paris.
- Cigerci İ. H., Liman R., Özgül, E. and Konuk M. (2013).** Genotoxicity of indium tin oxide by Allium and Comet tests. *Cytotechnology*, doi: 10.1007/s10616-013-9673-0.
- Cotelle S. (1999).** Etude de la génotoxicité de matrices complexes à l'aide de plantes supérieures. Thèse de doctorat, Université de Metz, 257p.
- CPREA, (2007).** Contrôle et suivi de la qualité des eaux usées : protocole de détermination des paramètres physico-chimiques et bactériologiques, centre régional pour l'eau potable et l'assainissement, 52p.
- Darolles C. (2010).** Discrimination des effets chimiotoxiques et radiotoxiques de l'uranium: définition de marqueurs biologiques pour l'évaluation des risques professionnels dans l'industrie du nucléaire. Thèse de doctorat, Université de la méditerranée, Aix-Marseille Facultés de médecine et de pharmacie, Spécialité : environnement et santé, 459p.
- Debieche T. H. (2002).** Évolution de la qualité des eaux (salinite, azote et métaux lourds) sous l'effet de la pollution saline, agricole et industrielle. Thèse de doctorat, Université de Constantine, 235p.
- Devaux I. (1999).** Intérêts et limites de la mise en place d'un suivi sanitaire dans le cadre de la réutilisation agricole des eaux usées traitées de l'agglomération clermontoise. Thèse de doctorat, université J. Fourier, Grenoble (France). 257 p.
- Djabri L., Hani A., Laouar R., Mania J., Mudry J. and Louhi A. (2003).** Potential pollution of groundwater in the valley of the Seybouse River, north-eastern Algeria. *Environmental Geology*, 44, 738-744.
- Duchène P. and Vanier C. (2002).** Réflexion sur les paramètres de qualité exigés pour les rejets de stations d'épuration. *Ingénieries*. 29:3-16.
- Dugniolle H. (1980).** L'assainissement des eaux résiduaires domestiques, CSTC - revue n° 3-septembre, pp. 44-52.
- Ecosse D. (2001).** Techniques alternatives en vue de subvenir à la pénurie d'eau dans le monde. «Qualité et Gestion de l'Eau », Fac. Sciences, Amiens, 62 p.

- Edberg S. C., Rice E.W., Karlin R. J., Allen M. J. (2000).** *Escherichia coli*: The best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 106-116.
- Eddabra R. (2011).** évaluation de la contamination bactériologique des eaux usées des stations d'épuration du grand Agadir : isolement, caractérisation moléculaire et antibioresistance des espèces du genre *vibrio*, thèse en co-tutelle, de l'université ibn zohr faculté des sciences d'Agadir et de l'université de Strasbourg Ecole doctorale science de la vie et de la sante, 146p.
- El Asslouj J., Amahdar L., Glouib K., Kholtei S., El Amrani Paaza N., Verschaeve L. and Hilali A. (2009).** In vitro genotoxicity of wastewaters from the town of settat, morocco, *Arh Hig Rada Toksikol*, 60 : 289-296.
- El Guamri Y. et Belghyti D. (2006).** Etude de la qualité physico-chimique des eaux usées brutes de la commune urbaine de Saknia, rejetées dans le lac Fouarat (Kénitra, Maroc), *Journal Africain des Sciences de l'Environnement*, N° 1, 53-60.
- El Guamri Y., Belghyti D. Cisse K. El kharrim I. Sylla S., Raweh H., Barkia, Hassouni T. et Jamber A. (2006).** Etude physico-chimique et parasitologique des eaux usées destinées à l'irrigation du périmètre Périurbain de Fouarat (Kenitra, Maroc). *Agronomie Africaine*, 19 (3) : 251 – 261.
- EL Hachemi O. (2012).** Traitement des eaux usées par lagunage naturel en milieu désertique (oasis de figuig) : performances épuratoires et aspect phytoplanctonique. Thèse de doctorat, Université Mohammed Premier, 140p.
- El-Ghamery A. A., El-Nahas A. I. and Mansour, M. M. (2000).** The action of atrazine herbicide as an indicator of cell division on chromosomes and nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia*, 65, 277–287.
- El-Shahaby O. A., Abdel Migid H. M., Soliman M. I., and Mashaly I. A. (2003).** Genotoxicity screening for industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pakistan journal Biological Sciences*, 6, 23-28.
- Endamana D., I. M. Kengne, J. Gockowski, J. N., D. Wandji, J. Nyemeck, N. N. Soua and J.N. Bakwowi (2003).** Wastewater reuse for urban and periurban agriculture in Yaounde Cameroon : opportunities and constraints. International Symposium on Water, Poverty and Productive uses of Water at the Household Level, Muldersdrift, South Africa. 84 - 92.
- Evseeva T. I., Geraskin S. A., and Shuktomova. (2003).** Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium* test. *Journal of Environmental Radioactivity*, 68, 235–248.

- Fagrouch A., Amyay S., Berrahou A., El Halouani H., Abdelmoumen H. (2010).** Performances d'abattement des germes pathogènes en lagunage naturel sous climat aride : Cas de la filière de traitement des eaux usées de la ville de Taourirt. *Afrique Science* 6(3), 87-102.
- FAO, (2003).** L'irrigation avec des eaux usées traitées : Manuel d'utilisation. pp 73.
- FAO, (1985).** Water quality for agriculture. FAO Irrigation and drainage paper, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 174 p.
- FAO, (2000).** Water quality management and pollution control in the Near East : An overview. Regional workshop on water quality management and pollution control in the Near East. Cairo (Egypt).
- Feix I. et Wiart J. (1998).** Connaissances et maîtrise des aspects sanitaires de l'épandage des boues d'épuration des collectivités locales. 2^{ème} édition, 14p.
- Fenech M. (2010).** The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Physiology*, 98, 234-243.
- Fenech M., Morley A. A. (1985).** Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147, 29-36.
- Fernandes T. C. C., Mazzeo D. E. C. and Marin-Morales M. A. (2007).** Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 252-259.
- Fiskesjo G. (1985).** The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 99-112.
- Fiskesjo G. (1988).** The Allium test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, 197, 243-260.
- Fiskesjo G. (1981).** Allium test on copper in drinking water, *Vatten*, 37, 232-240.
- Foltete A. S. (2010).** Effets génotoxiques et systèmes de détoxication chez *Vicia faba* (*Fabaceae*) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués. Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine, Metz, 245.
- Foltete A. S. (2010).** Effets génotoxiques et systèmes de détoxication chez *Vicia faba* (*Fabaceae*) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués. Thèse de doctorat, 245p.
- Froese K. L. (1998).** Health effects associated with wastewater treatment, disposa land reuse. *Water Environ. Research*, 70(4):962-968.
- Gana J. M., Ordonez R., Zampini C., Hidalgo M., Meoni S., and Isla M.I. (2008).** Industrial effluents and surface waters genotoxicity and mutagenicity evaluation of a river of Tucuman, Argentina. *Journal of Hazardous Material*, 155, 403-406.

- Garban B., Ollivon D., Teil M.J., Blanchard M., Blanchoud H., Motelay-Massei A., Chesterikoff C., Hanselin L., Rolet J., Le Genti J. Et Chevreuil M. (2003).** Activités humaines et transferts de polluants organiques persistants (POP). Laboratoire Hydrologie et Environnement, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 36 p.
- Gennaccaro A.L., McLaughlin M.R., Quintero-Betancourt W., Huffman D.E. and Rose J.B. (2003).** Infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in final reclaimed effluent. *Application. Environment. Microbiology*. 69, 4983–4984.
- George I., Crop P. et Servais P. (1997).** Quantification des apports de coliformes en Seine par les rejets de stations d'épuration, Ecologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles, Belgique, 15p.
- Glanic R. et benetton J-P. (1989).** Caractérisation d'effluents d'assainissement individuel et essais de matériels d'assainissement autonome - TSM - L'eau - 84 année - N 11 – pp. 573 584.
- Gleeson, C. et Gray N. (1997).** The coliform index and waterborne disease. E & FN Spon, 194 p.
- Glouib K., Charaf B., El Kettani S. et Hilali A. (2006).** Induction des micronoyaux et indice de la prolifération cellulaire chez La population des mzamza exposée aux eaux usées, *Lebanese Science Journal*, Vol. 7, N° 2.
- Grant W. F. (1994).** The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutaiotn Research*, 310 : 175-185.
- Grover I. S. and Kaur S. (1999).** Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assay. *Mutation Research*, 426, 183–188.
- Gupta N., Khan D.K. and Snatra S.C (2007).** An assessment of heavy metal contamination in vegetables grown in wastewater irrigated areas of Titagarh, West Bengal, India. *Bull. Environnment. Contamination. Toxicologie*. 80 :115-118.
- Gupta P., Mathur N., Bhatnagar P., Nagar P., and Srivastava S. (2009).** Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1925–1932.
- Haddad H. et ghoualem H. (2014).** Caractérisation physico-chimique des eaux du Bassin hydrographique cotier algerois, *Larhyss Journal*, ISSN 1112-3680, n°18, pp. 155-167
- Hamoda M.F. (2004).** Water strategies and potential of water reuse in the south Mediterranean countries. *Desalination*, 165, 31-41

Harguinteguy C. A., Cirelli A. F. and Pignata M.L. (2014). Heavy metal accumulation in leaves of aquatic plant *Stuckenia filiformis* and its relationship with sediment and water in the Suquia river (Argentina). *Microchemical journal*, 114, 111-118.

Hartmann A., Alder A. C., Koller T. and Widmer R. M. (1998). Identification of fluoroquinolones antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 377-382.

Hartmann A., Golet E. M., Gartiser S., Alder A. C., Koller T. and Widmer R. M. (1999). Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 115–119.

Hassoune E. M. Bouzidi A., Koulali Y. and Hadarbach D. (2006). Effects of domestic and industrial effluent discharges on groundwater quality in the North of the City of Settat (Morocco). *Life Sciences*, 28, 61-71.

Hoshina M. M. and Marin-Morales M. A. (2009). Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 2090–2095.

Jiries N. G., Al Nasir F. M. and Beese F. (2002). Pesticide and heavy metals residue in wastewater, soil and plants in wastewater disposal site near Al-Lajoun Valley, Karak, Jordan. *Water, Air and Pollution*, 133:97-107.

Jolibois B. and Guerbet M. (2005). Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the Salmonella fluctuation test and the SOS Chromotest. *Mutation Research*, 565, 151-162.

Jolibois B., Guerbet M. and Vassal S. (2003). Detection of hospital wastewater genotoxicity with the SOS Chromotest and Ames fluctuation test. *Chemosphere*, 51, 539-543.

JORA. (2006). Valeurs limites des paramètres de rejets effluents liquides industriels. Journal

Jolibois B., Guerbet M., Goullé J. P. and Lacroix C. (2009). Effectiveness of two treatment plants to remove the genotoxicity of urban wastewater. *Hospital Technology*, 715, 63-68.

Khalid E. K., Driss B., Khadija E.K., Abdelouahed K., Mohamed C. and Rachid B. (2011). Caractérisation physico-chimique des eaux usées urbaines de la ville de Mechraa Belksiri (Gharb, Maroc). *La science en liberté*, Volume 3, N ° 110205, ISSN 2111-4706.

Khalid E.K., Driss B., Khadija E.K., Abdelouahed K., Mohamed C., and Rachid B. (2011). Caractérisation physico-chimique des eaux usées urbaines de la ville de Mechraa Belksiri (Gharb, Maroc). *La science en liberté*, Volume 3, N ° 110205, ISSN 2111-4706.

- Knasmuller S., Gottmann E., Steinkellner H., Fomin A., Pickl C., Paschke A., God R. and Kundi M. (1998).** Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutation Research*, 420, 37–48.
- Lazarova V., Gaid A., Rodriguez-Gonzales J., Alday Ansola J. (2003).** L'intérêt de la réutilisation des eaux usées : analyses d'exemples mondiaux. *Techniques, Sciences et Méthodes*, N° 9, p 64-85.
- Leme M. D. and Marin-Morales M. A. (2009).** *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682, 71–81.
- Liman R., Akyl D., Eren Y. and Konuk M. (2010).** Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and Allium test. *Chemosphere*, 80, 1056–1061.
- Luo L. Z., Werner K. M., Gollin S. M. and Saunders W. S. (2004).** Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. *Mutation Research*, 554, 375–385.
- Lupi S., Marconi S., Paiaro E., Fochesato A. and Gregorio, P. (2009).** Mutagenicity evaluation with Ames test of hydro-alcoholic solution of terpenes. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 50, 170-174.
- Ma T. H., Xu Z., Xu C., McConnell H., Rabago E. V., Arreola G. A. and Zhang H. (1995).** The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, 334, 185–195.
- Mara D. and Cairncross S. (1989).** Guidelines for the Safe Use of Wastewater and Excreta in Agriculture and Aquaculture, Organisation mondiale de la santé, Genève.
- Maron D. M. and Ames B. N. (1983).** Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113, 173-215.
- Maron M. D. and Ames B. N. (1982).** Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research*, 113 : 133-213.
- Marshuk A. (1937).** The effects of X rays on chromosomes in mitosis. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 23: 362-369.
- Masséna P.A. (2001).** Valorisation des eaux usées en irrigation localisée. Office International de l'Eau, 14 p.
- Mateuca R., Lombaert N., Aka P.V., Decordier I., Kirsch-Volders M. (2006).** Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 88, 1515-1531.

- Michael C., Ukaegbu and Peter G. C. O. (2009).** The Genotoxic Effect of Sewage Effluent on *Allium Cepa*. *Report and Opinion*, 1, 36-41.
- Mico C., Recatala L., Peris M. and Sanchez J. (2006).** Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere*, 65, 863–872.
- Migliore L., Cocchi L., Scarpato R. (1996).** Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence in situ hybridization: its application to the human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected aneugens. *Mutagenesis*, 11, 285-290.
- Ministère des Ressources en Eau (2001).** Les ressources en eau d'Algérie. Rapport de synthèse. MRE, Alger, Algérie. 73 p.
- Miquel G. (2003).** La qualité de l'eau et de l'assainissement en France. Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Tome I, 198 p.
- Mohammed Saïd M. (2012).** Élimination simultanée de la pollution azotée et phosphatée des eaux usées traitées, par des procédés mixtes. Cas de la Step Est de la ville de Tizi-Ouzou. Thèse de doctorat, Université mouloud mammeri de Tizi-Ouzou, 172p.
- Monarca S., Feretti D., Collivignarelli C., Guzzella L., Zerbini I., Bertanza G., and Pedrazzani R. (2000).** The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Research*, 34 (17), 4261-4269.
- Monteirono M. S., Rodriguez E., Loureiro J., Mann R. M., Soares A. M. V. M. and Santos C. (2010).** Flow cytometric assessment of Cd genotoxicity in three plants with different metal accumulation and detoxification capacities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1231–1237.
- Mortelmans K. and Zeiger E. (2000).** The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 445, 29–60.
- N'diaye A. D., Ould Sid'ahmed Ould Kankou M., Sarr A. D. et Lo B. (2011).** Contribution de l'analyse en composantes principales à l'évaluation de la couleur des effluents de la ville de Nouakchott, *Larhyss Journal*, ISSN 1112-3680, n° 09, pp. 139-147.
- OCDE (2007).** OCDE Guideline for Testing of Chemicals. No. 487. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (MNvit).
- Officiel de la République Algérienne, 23 Avril 2006, Algérie, 27 p.
- Olukanni D. O. and Ducoste J. J. (2011).** Optimization of waste stabilization ponds for developing nations using computation fluid dynamics, *Ecological Engineering*, 37 (2011): 1878-1888.

- OMS (1989).** L'utilisation des eaux usées en agriculture et aquiculture : recommandation a visées sanitaires. Organisation Mondiale de la Santé, Genève.
- OMS (1997).** Aspects sanitaires et nutritionnels des oligo-éléments et des éléments en traces. Editions de l'OMS, 366 p.
- OMS (2006).** WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater, volume II, Wastewater use in agriculture, 222p.
- ONA (2011).** Descriptif de fonctionnement et d'exploitation de la station d'épuration de Guelma, Ministère des Ressources en Eaux, Office National de l'Assainissement, Algérie, 64p.
- Ono Y., Somiya I., Kawaguchi T. and Mohri S. (1996).** Evaluation of toxic substances in effluents from a wastewater treatment plant. *Desalination*, 106, 255-261.
- Otokunefor T. V. and Obiukwu C. (2005).** Impact of refinery effluent on the physicochemical properties of a water body in the Niger delta. *Applied Ecology and Environmental Research*, 3 (1): 61 - 72.
- Ouanouki B., Abdellaoui N. and Ait Abdallah N. (2009).** Application in agriculture of treated wastewater and sludge from a treatment station. *European Journal of Scientific Research*, 27 (4), 602-619.
- Owens J. E. and Niemeyer E. D. (2006).** Analysis of chemical contamination within a canal in a Mexican border colonia. *Environmental Pollution*, 140, 506-515.
- Özkara A., Akyl D., Erdoğan S. F. and Konuk M. (2011).** Evaluation of germination, root growth and cytological effects of wastewater of sugar factory (Afyonkarahisar) using *Hordeum vulgare* bioassays. *Environmental Monitoring and Assessment*, 183, 517-524.
- Paulsrud B. et HARALDSEN S. (1993).** Experiences with the Norwegian approval system for small waste water treatment plants. *Water. Science. Technology.*, vol. 28, n° 10, 25-32.
- Pearson H. W., Mara D. D., Mills S. W. and Smallman D. L. (1987).** Factors determining algal population in waste stabilization ponds and the influence of algae on pond performance. *Water. Science. Technology.* 19 (12): 131-140.
- Peasey A., Blumenthal U., Mara D. and Ruiz-Palacios G. (2000).** A review of policy and standards for wastewater reuse in agriculture: A latin american perspective. *Well.* n° 68 part II. 74 p.
- Rabiet M. (2006).** Contamination de la ressource en eau par les eaux usées dans un bassin versant méditerranéen Apport des éléments majeurs, traces et terres rares, thèse de doctorat, Université Montpellier II, 368p.

- Radic S., Stipanicev D., Vujcic V., Rajcic M. M., Sirac S. and Pevalek-Kozlina B. (2010).** The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment*, 408, 1228–1233.
- Rank J. and Nielsen M. H. (1998).** Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase–telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research*, 418, 113–119.
- Reimann O. D (1989).** Heavy metals in domestic refuse and their Distribution in incinerator residues. *Waste Management & Research*, 7, 57-62.
- Rejsek F. (2002).** Analyse de l'eau : Aspects et règlementaire et technique, Ed : CRDP d'Aquitaine, France, 358 p.
- Rodier J. (1996).** L'analyse de l'eau, 8ème édition; DUNOD, Paris, 1383p.
- Rodier J. (2005).** L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 8^{ème}, édition. Dunod, Paris.
- Rodier J. (2009).** L'analyse de l'eau, 9ème édition; DUNOD, Paris, 1579p
- Saghir J., Schiffer M. and Woldu M. (2000).** Urban water and sanitation in the Middle East and North Africa: the way forward. The world Bank, MENA Infrastructure Development Group, 24 p.
- Salghi R., 2001.** Différentes filières de traitement des eaux, ed univ IZ Rabat, p.22.
- Saxena P. N., Chauhan L. K. S. and Gupta S. K. (2005).** Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology*, 216, 244–252.
- Schmid W., 1975.** The Micronucleus Test, *Mutation Research.*, 31, 9-15.
- Seoane, A.I., Dulout, F.N. (2001).** Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutation Research*, 490, 99-106.
- Sheikh B., Cooper R.C. and Israel K.E. (1999).** Hygienic evaluation of reclaimed water used to irrigate food crops: a case study. *Water Science and Technology*, 40(4-5)261-267.
- Shuval H. I., Avner A., Fattal B., El Yahu R. et Yakupiel P. (1986).** Enteric pathogens in wastewater and their survival in soil crops and in the air in wastewater irrigation in developing countries: Health effect and technological solution. World Bank studies in water supply and sanitation. The World Bank Washington DC. USA, 27-57p.
- Skiredje A. (2005).** Besoins des plantes en eau et en éléments nutritifs. Département d'Horticulture, Maroc, 10 p.

- Smaka-Kincl V., Stegnar P., Lovka M. and Toman M. J. (1996).** The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Research*, 368, 171–179.
- Stahl R. G. and J. R. (1991).** The genetic toxicology of organic compounds in natural water and wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22, 94–125.
- Suschka J., ferreira E. (1986).** Activated sludge respirometric measurements. *Water Research*, 20, 2, 137-144.
- Tabrez, S. and Ahmad M. (2011).** Oxidative stress-mediated genotoxicity of wastewaters collected from two different stations in northern India. *Mutation Research*, 726, 15– 20.
- Tamrabet L. (2011).** Contribution à l'étude de la valorisation des eaux usées en maraîchage. Thèse de doctorat. Université Hadj Lakhdar –Batna, Institut de Génie Civil, d'Hydraulique et d'Architecture, 147p.
- Tamrabet L. D., Goléa H., Bouzerzour (2002).** La réutilisation des eaux usées en agriculture: insuffisances et solutions des méthodes de traitement des effluents en Algérie, Monastir, Tunisie, 295-302p.
- Tarantini A. (2010).** Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges, Life Sciences, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 175p.
- Thomas P., Umegaki K., Fenech M. (2003).** Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 18, 187-194.
- Tipirdamaz R. Gömürgen, A. N., Olankaya D. and Doğan M., (2003).** Determination of Toxicity of Pulp-MIII Effluents by Using *Allium* Test. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 9 (1), 93-97.
- Toze S. (2006).** Reuse of effluent water benefits and risks; *Agricultural Water Management* 80, 147–159.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2004).** Guidelines for water use. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Center for Environmental Research Information, Cincinnati, Ohio (USA).
- Unyayar S., Celik A., Cekic F.O. and Gozel A. (2006).** Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis*, 21, 77–81.
- US NRC. (2012).** Water Reuse: Potential for Expanding the Nation's Water Supply Through Reuse of Municipal Wastewater, Washington, National Academies Press, 262 p.

- Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.
- Vedacovic Z., Tomic M. and Papes D. (1993).** Toxicity of waste Drilling Fluids in modified Allium test. *Water, Air and Soil Pollution*, 69, 413-423.
- Vega M. M., Fernandez T. B., Tarazona J. V. and Castano A. (1996).** Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain. *Environmental Pollution*, 93, 135–139.
- Ventura L., Giovannini A., Savio M., Donà M., Macovei A., Buttafava A., Carbonera D. and Balestrazzi A. (2013).** Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere*, 92, 1-9.
- Wanko A., Mose R. and Lienard A. (2005).** Capacities of infiltration-percolation processes for the treatment of a synthetic effluent. *Science. Eau*. 18:165-175.
- Werther J. and Ogada T. (1999).** Sewage sludge combustion. *Prog. Energy. Combustion. Science*. 25:55–116.
- White P. A. and Rasmussen J. B (1998).** The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research*, 410, 223–236.
- WHO. World Health Organization, Health, (1989).** Guidelines for the Use of Wastewater in Agriculture and Aquaculture. Technical Report Series No. 778. WHO, Geneva.
- Wintgens T. T. Melin A., Schäfer S. Khan M., Muston D., Bixio and Thoeue C. (2005).** The role of membrane processes in municipal wastewater reclamation and reuse. *Desal*. 178:1-11.
- Yang Y., Zhang F.S., Li H.F. and Jiang R.F. (2008).** Accumulation of cadmium in the edible parts of six vegetable species grown in Cd-contaminated soils. *Environnement. Management*, 90 :1117–1122.
- Yazid B. (2014).** Évaluation de la toxicité des eaux usées traitées par la station d'épuration de Guelma et son impact sur l'oignon « *Allium cepa* ». Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar, 158p.
- Yildiz M., Hakkı C. I., Konuk M., Fatih F. A. and 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.
- Zidane F., Cheggari K., Blais J. F., Khlil N., Drogui P. and Bensaid J. (2012).** Effect of chlorination on trihalomethanes formation in feed water of Casablanca in Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 3, 99-108.

Annexe I

Préparation des solutions des tests de génotoxicité

Solution CV (1g/ml)

C.V.....	0.1 g
L'eau distillé stériles	10 ml

Solution d'ampicilline (10mg/ml)

Amp.....	1g
H ₂ O distillé	100 ml

Gélose minimale agar

Agar.....	15g
H ₂ O distillé.....	930ml
VOGEL-BONNERE(V.B).....	20 ml
Glucose 40%.....	50 ml

Milieu histidine/ biotine

Agar	15g
H ₂ O distillé.....	9.4ml
50×V.B.....	20ml
40% glucose	50ml
Histidine.....	100mg (2g/400ml H ₂ O)
Biotine.....	6g

Solution biotine

Biotine.....	0.0013g
H ₂ O distillé.....	100g

Master Black (HBA)

Agar	15g
Glucose.....	20%
B.V×50.....	20ml
Histidine.....	10ml
Biotine (0.5Mm).....	6ml
H ₂ O distillé.....	860ml
(0.8/0.02 NaoH) Amp.....	3150μl

Solution de Glucose

Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	20g
H ₂ O distillé.....	100ml

Milieu VOGEL- BONNERE (50×)

Magnesium sulfate ($MgSO_4H_2O$).....	10 g
Citric acid monohydrate.....	100 g
Potassium phosphate, dibasic, anhydrous (K_2HPO_4)	500 g
Sodium ammonium phosphate ($Na_2NH_2PO_4H_2O$).....	175 g
H ₂ O distillé	670ml

Solution d'histidine

Histidine.....	0.5g
H ₂ O	100ml

Solution biotine

Biotine	0.0013g
H ₂ O	100ml

Solution NaOH/Amp

NaOH	0.002g
Amp.....	0.8g
H ₂ O distillé.....	100ml

Colorant Feulgen

Fushine basique.....	0,25g
H ₂ O distillée.....	50ml
HCl.....	5ml
K ₂ S ₂ O ₅	0,5g

Solution Carnoy

Acide Acétique glacial.....	1V
Ethanol 100%.....	3V

Solution Ethanol 70%

H ₂ O Distillée.....	1V
Ethanol 100%.....	70ml

Solution d'acide acétique glacial 45%

Utilisé durant la préparation des lames

Acide Acétique glacial.....	45ml
H ₂ O Distillée.....	55ml

Solution HCl 1N

Utilisé durant la préparation des lames

HCl.....	8,172ml
H ₂ O Distillée.....	100ml

Milieu Ham F10

Milieu de culture préparé RPMI 1640	500ml
Sérum de veau fœtal SVF15%	75ml
Phytohémagglutine (PHA)1%.....	10ml/5mg
Antibiotiques.....	3,96ml

Cytochalasine B

Cyto B.....	1mg
DMSO.....	0, 5ml
RPMI.....	6,165
Conservation à -20°C	

KCl

KCl.....	5,6g
H ₂ O.....	1000ml

Colorant Giemsa5%

Giemsa.....	5ml
H ₂ O.....	95ml

Annexe II

Méthodes d'analyses physicochimiques

1. Détermination des MES

1.1. Principe

L'eau est filtrée et le poids de matières retenues par le filtre est déterminé par pesée différentielle.

1.2. Matériel

- Dispositif de filtration sous vide ou sous pression (rampe).
- Membranes de filtration.

1.3. Mode opératoire

- mettre les membranes filtrantes dans une étuve à 105°C pendant 20 min.
- laisser refroidir dans le dessiccateur.
- ensuite les peser soit P1 : poids des membranes avant filtration.
- placer les membranes dans la rampe à filtration et faire passer 200 ml d'eau à analyser à travers.
- Rendre les membranes à l'étuve (à 105°C) afin de les sécher pendant 20 min.
- Les laisser refroidir au dessiccateur puis les peser une 2^{ème} fois. Soit P2 = poids des membranes après filtration.

1.4. Expression des résultats

$$\text{MES (mg/l)} = (P2-P1) \times 5 \times 1000.$$

2. Dosage des nitrates NO_3^-

2.1. Méthode au salicylate de sodium

2.1.1. Principe

En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitrosalicylate de sodium, coloré en jaune et susceptible d'un dosage colorimétrique.

2.1.2. Réactifs

- Solution de salicylate de sodium à 0.5% (renouveler toutes les 24 heures): 0.5 gr de salicylate de sodium dans 100 ml d'eau distillée.
- Solution d'hydroxyde de sodium 30%: 30 gr de NaOH dans 100ml d'eau distillée.
- H_2SO_4 concentré.
- Tartrate double de sodium et de potassium.
- Hydroxyde de sodium NaOH 400 g.
- Tartrate de sodium et de potassium 60 g.

-Eau distilléeqsp 1000 ml.

Laisser refroidir avant de compléter à 1000 cc. Cette solution doit être conservée dans un flacon de polyéthylène.

- solution mère d'azote d'origine nitrique à 1000 mg/l

-Nitrate de potassium anhydre 0.722 g.

-Eau distillée 1000 ml.

-Chloroforme 1ml.

- Solution fille d'azote d'origine nitrique à 5 mg/l.

2.1.3. Mode opératoire

- Prendre 10 ml de l'échantillon à analyser.

-Ajouter 2 à 3 gouttes de NaOH à 30%.

-Ajouter 1 ml de salicylate de sodium.

-Evaporer à sec au bain marie ou à l'étuve 75-88°C.

- Reprendre le résidu avec 2 ml H₂SO₄ laissé reposer 10 mn.

- Ajouter 15 ml d'eau distillée.

-Ajouter 15 ml de tartrate double de sodium et de potassium puis passer au spectrophotomètre au 415 nm.

2.1.4. Expression des résultats

Le résultat est donné directement en mg/l à une longueur d'onde de 415 nm.

3. Dosage des ions nitrites

3.1. Principe

Les ions nitrites réagissent en milieu acide (PH = 1.9) avec la sulfamilade en formant sel de diazonium (diazotation) qui forme avec le N-(1-naphyl)-éthylènediamine-dichlorohydraté un colorant azoïque rouge. $\lambda_{\text{max}} = 543 \text{ nm}$.

3.2. Réactifs

- Solution de nettoyage : Solution d'acide chlorhydrique (à d=1.12g = 25%).

- Solution du réactif (réactif mixte):

20g de Sulfamide, (C₆H₈N₂O₂S) à dissoudre dans un mélange de 50ml d'acide phosphorique (d=1.71 g/ml = 85% de masse) et 250ml d'eau distillée.

Dans cette solution dissoudre 1g de N-(1-naphtyl)-éthylènediamine-dichlorohydraté (C₁₂H₁₆Cl₂N₂), Compléter avec de l'eau distillée dans une fiole jaugée à un volume de 500ml, cette solution est stable pendant un mois si elle est gardée à l'obscurité (bouteille en verre marron bien fermée) et 4°C.

- Solution d'acide phosphorique :

Dans une fiole jaugée de 250 ml, dissoudre 25ml d'acide phosphorique ($d = 1.71 \text{ g/ml}$ = 85% en masse) dans 150ml d'eau distillée. Après refroidissement à la température ambiante, on complète à l'eau distillée à 250ml.

- Solution standard de 100 mg/l

Dissoudre $0.4926 \text{ g} \pm 0.0002$ de nitrites de sodium (NaNO_2), sécher pendant 2 heures à 105°C dans 750 ml d'eau distillée compléter à 1l. $1\text{ml} = 100 \text{ gr} = 0.1 \text{ mg}$ de $\text{NO}_2\text{-N}$. Cette solution est stable pendant 1 mois à l'obscurité et à 4°C .

3.3. Mode opératoire

- Prendre 50 ml d'eau à analyser

- Ajouter 1 ml du réactif mixte ; l'apparition de la coloration rose après 10minutes indique la présence des NO_2^- .

3.4. Expression des résultats

Le résultat est donné directement en mg/l à une longueur d'onde de 543nm.

4. Dosage de l'ammonium

4.1. Principe

Mesurage spectrométrique du composé bleu formé par réaction de l'ammonium avec les ions salicylate et hypochlorite en présence de nitrosopentacyanoferrate (III) de sodium (nitroprussiate de sodium).

4.2. Réactifs

1. Eau exempte d'ammonium
2. Réactif coloré (RII): Peser 13g + ou – 1g de salicylate de sodium, 13g + ou – 1g de citrate trisadique dihydraté et 0.097g de sodium nitropentacyanoferrate (III) dihydraté à dissoudre dans 100ml d'eau distillée. Conserver dans un récipient en verre brun.
Cette solution est stable pendant 2 semaines.
3. Dichloroisocyanurate de sodium : prendre 3.2g d'hydroxyde de sodium dans 50ml d'eau distillée, + 0.2g + ou – 0.002g de dichloroisocyanurate dihydraté. Dissoudre dans 100 ml d'eau distillée. Conserver dans un récipient en verre brun.
4. utions étalons : Chlorures d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou le sulfate d'Ammonium.

4.3. Mode opératoire :

- Prendre 40 ml d'eau à analyser

- Ajouter 4 ml du réactif I

- Ajouter 4 ml du réactif II et ajuster à 50 ml avec H_2O distillée et attendre 1h.30

L'apparition de la coloration verdâtre indique la présence de : NH_4^+ .

4.4. Expression des résultats :

Le résultat est donné directement en mg/l.

5. Dosage de la DCO

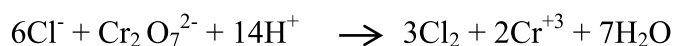
5.1. Principe :

Cette détermination comprend deux étapes :

1^{ère} étape : oxydation chimique des matières réductrices contenues dans l'eau, par excès de dichromate de potassium.

Cette oxydation se réalise en milieu sulfurique (H₂SO₄), en présence de sulfate d'argent (Ag₂SO₄) à ébullition à reflux pendant 2h dans un ballon ou dans un tube muni d'un réfrigérant. Les conditions d'oxydation à chaud et en milieu sulfurique permettent également d'oxyder de nombreux constituants organiques et elle permet aussi l'oxydation de constituants minéraux réduit comme les sulfites, chlorures.

Dans le cas de chlorures :



2^{ème} étape : dosage de l'excès de dichromate de potassium par le sel de mohr après refroidissement.

La fin du dosage est détectée par la feroine indicateur redox. Sa forme oxydée est de couleur bleu-vert en présence de l'oxydant et la première goutte de sel de mohr en excès entraine un changement de coloration de la feroine qui devient rouge borique (forme réduite).

Selon la réaction suivante :



5.2. Mode opératoire :

-Etalonnage de la solution de sel de mohr à environ 0,12mol/l La solution de sel de mohr s'oxyde facilement d'où la nécessité de la titrer quotidiennement.

-Prélever 5ml de solution K₂Cr₂O₇ 0 à 0,040 mol /l et diluer à 100ml avec H₂SO₄ à 4mol/l.

-Titrer avec la solution de sel de mohr en présence de 2à 3 gouttes de ferroine.

-Déterminer la concentration molaire du sel de mohr à partir des équations des réactions.

5.3. Préparation de l'essai :

Avant le prélèvement de la prise d'essai. L'échantillon doit être soigneusement homogénéisé par agitation du flacon.

-Dans un tube à fond plat de DCO introduire :

-10ml d'eau à analyser.

-5ml de $K_2Cr_2O_7$.

Si la valeur de la DCO est supposée excéder 700mg/l, procéder à une dilution de manière à obtenir une valeur comprise entre 350 et 700mg/l.

-Ajouter quelques granules régulateurs d'ébullition et homogénéiser.

-Ajouter lentement et avec précaution 15ml d'acide sulfurique sulfate d'argent en agitant soigneusement le tube et en le refroidissant sous un courant d'eau froid ou dans un bain de glace de façon à éviter toute perte de substance organique volatile.

5.4. Expression des résultats :

La demande chimique en oxygène DCO exprimé en mg d'O₂/l, est donnée par la formule de la norme :

$$DCO = -8000.C_{ef} (V_T - V_e)/E$$

C_{ef} : c'est la concentration exprimée en mole par litre de la solution de sel de mohr déterminée par étalonnage.

E : volume prise d'essai en ml.

6. Dosage de la DBO₅

6.1. Principe:

La DBO est mesurée au bout de 5jours à 20°C (T° favorable à l'activité des microorganismes consommateurs d'oxygène) et à l'obscurité (afin d'éviter toute photosynthèse parasite).

2 échantillons sont nécessaires : le 1 sert à la mesure de la concentration initiale en O₂, et le second à la mesure de la concentration résiduaire en O₂ au bout de 5 jours. La DBO₅ est la différence entre les deux concentrations. Les mesures seront effectuées sur un même

volume et le second échantillon sera conservé 5 jours à l'obscurité et à 20°C. En effet une eau abandonnée à elle-même dans un flacon fermé consommera rapidement le dioxygène dissous.

6.2. Protocole opératoire :

6.2.1. Préparation de l'eau de dilution :

Mettre la vielle de prélèvement, dans un récipient de 10l de l'eau du robinet dans laquelle on plonge pendant 24h un aérateur pour la saturation en O₂ laisser reposer 12h. Le facteur de dilution pour une eau usée et de 50 à 100 (DBO moyen= 300mg/l pour un effluent domestique).

6.2.3. Mesure de temps :

Doser l'O₂ dissous dans 1 flacon d'échantillon dilué (T° en mg/l).

6.2.3. Incubation

Placer les 2 flacons restant au thermostat DBO5 20°C et à l'obscurité pendant 5 jours.

6.2.4. Mesure au temps 5 jours :

Doser l'O₂ dans le flacon d'échantillon dilué (T5 en mg/l).

6.2.5. Résultat :

La lecture se fait comme suit :

$$DBO = F (T_0 - T_5).$$

7. Orthophosphates

Les orthophosphates sont dosés selon la méthode de Murphy et Riley (1962). La détermination de leur concentration est basée sur la formation d'un complexe antimoine-phosphate-molybdate. Ce complexe est réduit par l'acide ascorbique en composé fortement coloré en bleu. La densité optique est lue à une longueur d'onde de 882 nm. Une courbe étalon est réalisée à partir d'une solution de KH₂PO₄ à des concentrations comprises entre 5 et 10 mg de PO₄³⁻

7.1. Principe :

Formation en milieu acide d'un complexe avec le molybdate d'ammonium et le tartrate double d'antimoine et de potassium. Réduction par l'acide ascorbique en un complexe coloré en bleu qui présente deux valeurs maximales d'absorption (l'une vers 700 nm, l'autre plus importante à 880 nm).

Annexe III

Tableau I : Les valeurs limites des paramètres de rejet dans un milieu récepteur et de rejet pour l'irrigation (JORA, 2006 ; Yazid, 2014).

Paramètre	Valeurs limites de rejet dans le milieu récepteur	Valeurs limites de rejet pour l'irrigation (FAO*, 2003 ; OMS**,1989)	Unité
Température	30	35	°C
pH	6,5 à 8,5	6,5-8,4 *	-
Conductivité	1,2	3 *	ms/cm
MES	35	<30 **	mg /l
DBO ₅	35	<25 *	mg /l
DCO	120	< 40 **	mg /l
NO ₃ ⁻	/	50 **	
NO ₂ ⁻	/	< 3 *	
NH ₄ ⁺	/	< 3 *	
PO ₄ ³⁻	/	< 0,94 **	
Azote kjeldahl	30	/	mg /l
Azote total	/	< 50	
Phosphore total	02	/	mg /l
Phosphates	10	< 02	mg /l
Cyanures	0,1	/	mg /l
Aluminium	03	5.0 *	mg /l
Cadmium	0,2	1.0 *	mg /l
Fer	03	5.0 *	mg /l
Manganèse	01	0.2 *	mg /l
Plomb total	0,01	5.0 *	mg /l
Cuivre total	0,5	0.2 *	mg /l
Mercure total	0,5	/	mg /l
Nickel total	0,5	0.2 *	mg /l
Zinc total	03	/	mg /l
Huiles et Grasses	20	< 20	mg /l
Hydrocarbures totaux	10		mg /l
Indice phénols	0,3		mg /l
Fluor et composés	15		mg /l
Chrome total	0,5		mg /l
Chrome III+	03		mg /l
Chrome VI+	0,1		mg /l
Solvants organiques	20		mg /l
Chlore actif	1,0		mg /l
PCB	0,001		mg /l
Détergents	2		mg /l
Tensioactifs anioniques	10		mg /l
Composés organiques chlorés	05		mg /l
Etain total	02		mg /l

Tableau II : Résultats du dénombrement des germes.

Germes		Germes totaux à 22°C	Germe totaux à 37°C	Coliform es totaux	Coliformes fécaux	SF	Strepto groupe D	ASR (10 ⁻¹)	Staphylocoques	levures
Avril 2012	S1	110000	10000	24000	7000	54000	22000	200	150	30
	S4	1100	4000	18000	5000	22000	7000	160	50	30
	S5	650	100	7000	1000	700	300	50	9	6
Juillet 2012	S1	58000	50000	24000	92000	240000	43000	200	100	15
	S4	11500	16000	24000	18000	35000	24000	130	43	5
	S5	31000	1000	11000	5000	1700	1300	50	3	2
Novembre 2012	S1	10000	10000	160000	13000	22000	5000	200	94	74
	S4	500	300	14000	3000	13000	5000	170	6	10
	S5	40	10	7000	5000	1800	100	20	4	0
Février 2013	S1	10000	11000	92000	35000	18000	10000	160	26	65
	S4	300	1000	18000	10000	1400	5000	150	15	5
	S5	20	200	7000	5000	1000	140	50	15	15
Avril 2013	S1	10000	30000	240000	8000	92000	22000	460	67	15
	S4	15300	10800	21000	5000	22000	5000	310	53	14
	S5	4900	2080	10000	3000	1200	500	40	26	6

Tableau III : Table de NPP

1 X 50 ml	5 X 10 ml	5 X 1 ml	Nombre caractéristique	Limites de confiance	
				Inférieure	Supérieure
0	0	0	<1		
0	0	1	1	<0,5	4
0	0	2	2	<0,5	6
0	1	0	1	<0,5	4
0	1	1	2	<0,5	6
0	1	2	3	<0,5	8
0	2	0	2	<0,5	6
0	2	1	3	<0,5	8
0	2	2	4	<0,5	11
0	3	0	3	<0,5	8
0	3	1	5	<0,5	13
0	4	0	5	<0,5	13
1	0	0	1	<0,5	4
1	0	1	3	<0,5	8
1	0	2	4	<0,5	11
1	0	3	6	<0,5	15
1	1	0	3	<0,5	8
1	1	1	5	<0,5	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	<0,5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	59
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	100
1	4	5	43	15	120
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	100
1	5	2	54	18	140
1	5	3	92	27	220
1	5	4	160	39	450
1	5	5	>240		

Résumé

L'eau usée traitée représente une eau renouvelable non conventionnelle, qui pourrait être une source attrayante et bon marché à employer en agriculture. Toutefois, en raison de la nature variable de la composition de cette eau (sa charge en constituants minéraux, organiques et biologiques); sa réutilisation devrait être gérée soigneusement, surveillée et contrôlée par des spécialistes, afin de vérifier les risques et menaces potentiels sur les usagers, le sol et les cultures irriguées, ainsi que sur l'environnement dans son ensemble.

Cette étude porte d'une part, sur la caractérisation physicochimique et microbiologique des eaux usées prélevées à partir de la station d'épuration de la ville de Guelma et d'autre part, sur l'évaluation de la génotoxicité de ces eaux.

Des prélèvements instantanés durant une année des eaux usées urbaines sont réalisés au niveau de la station. Des analyses physicochimiques et microbiologiques des eaux usées prélevées ont été effectuées. L'évaluation de l'effet mutagène et génotoxique de ces eaux a été effectuée à l'aide de trois tests biologiques : test d'Ames en utilisant deux souches de *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100 en absence et en présence d'activation métabolique S9 mix, le test des aberrations chromosomiques dans les racines d'*Allium cepa* et le test de micronoyaux dans des cellules lymphocytaires humaines.

Les résultats des analyses physicochimiques et microbiologiques ont montré une diminution dans les valeurs de différents paramètres mesurés, ceci est due probablement à l'efficacité du traitement d'épuration. La plupart des échantillons révèlent une activité mutagène vis-à-vis les souches TA98 et TA100. Une diminution dans le l'indice mitotique a été observée dans les cellules d'*Allium cepa* traitées. Les aberrations chromosomiques : pont chromosomique, chromosome vagabond, perturbation anaphase-télophase et condensation des chromosomes ont été également observées. Les résultats du test de micronoyaux obtenus ont montré une diminution dans l'indice de prolifération des lymphocytes avec une augmentation dans la fréquence des micronoyaux. Cette étude nous a permis d'évaluer l'efficacité du traitement d'épuration des eaux urbaines de la ville de Guelma et les risques qu'elles entament durant leur utilisation en agriculture.

Mots clés : Eaux usées, pollution, épuration, qualité physicochimique, qualité microbiologique, activité génotoxique.

Abstract

The treated wastewater represents an unconventional renewable water which could be an attractive and cheap source to use in agriculture. However, because of the variable nature of its composition (liable to mineral organic and biological constituent), its reuse should be carefully managed, monitored and controlled by experts to verify the potential risks and threats over users, soil and irrigated plants and the environment in general .

This study focuses on the one hand, on the physicochemical and microbiological characterization of wastewater collected from the treatment plant of the city, Guelma. On the other hand, it focuses on the evaluation of the genotoxicity of these waters.

Samples for one year snapshots of urban wastewater are produced at the station. Snapshots of physicochemical and microbiological analyses of wastewaters have been done. The evaluation of the mutagenic and genotoxic effect of these waters has been conducted using three biological assays: Ames test using two strains of *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 in the absence and presence of S9 metabolic activation mix, the test for chromosome aberration in *Allium cepa* root and micronucleus test in human lymphocyte cells.

The results of physicochemical and microbiological analyses showed a decrease in the values of various measured parameters, this is probably due to the efficiency of the purification treatment. Most samples reveal mutagenic activity in the TA 98 and TA 100. A decrease in the mitotic index was observed in the treated *Allium cepa* cells. Chromosomal aberrations: Bridge, vagabond chromosome, disturbed and stickiness are also observed. The results of the micronucleus test obtained showed a decrease in the lymphocyte proliferation index with an increase in the frequency of micronuclei. This study allowed us to evaluate the effectiveness of urban wastewater treatment in the city of Guelma and to be aware of the risks they can cause during their use in agriculture.

Key words: Wastewater, pollution, purification, physicochemical quality, microbiological quality, genotoxic activity.

الملخص

تعتبر مياه الصرف الصحي المعالجة مصدرا مهما في الإستعمال الزراعي ، و نظرا لتركيبية هذه المياه (المكونات المعدنية ، العضوية و البيولوجية) فإن إعادة إستعمالها يستدعي متابعة و مراقبة من قبل مختصين لتفادي الأخطار التي قد تصيب المستعملين ، التربة ، المحاصيل الزراعية و البيئة.

ترتكز دراستنا على الخصائص الفيزيوكيميائية والميكروبيولوجية للمياه المستعملة التي تم جمعها من محطة معالجة مياه الصرف الصحي لمدينة قالمة من جهة ، و من جهة أخرى على تقييم السمية الوراثية لهذه المياه.

تم تقييم خصائص مياه الصرف الصحي للمناطق الحضرية على مدار سنة وذلك من خلال أخذ عينات من محطة معالجة المياه المستعملة حيث أجريت لها تحاليل فيزيوكيميائية وميكروبيولوجية.

كما تم عملية تقييم السمية الوراثية لهذه المياه من خلال ثلاثة اختبارات بيولوجية: إختبار على الخلايا البكتيرية باستخدام بكتيريا من سلالة : *Salmonella typhimurium* ، إختبار الأليوم في جذور البصل (*Allium cepa*) وإختبار النواة الصغرى في الخلايا للمفاوية للإنسان.

وقد أظهرت نتائج التحاليل الفيزيوكيميائية والميكروبيولوجية إنخفاض في قيم هذه الخصائص وهذا راجع إلى فعالية المعالجة.

أما إختبارات السمية الوراثية قد أظهرت عند أغلبية العينات نتائج إيجابية وهذا من خلال إنخفاض في مؤشر الإنقسام الخلوي للخلايا للمفاوية وخلايا جذور البصل و ظهور نواة صغرى بالإضافة إلى ظهور تشوهات صبغية .

سمحت لنا هذه الدراسة تقييم فعالية معالجة المياه المستعملة لولاية قالمة و تقييم مخاطر إستعمالها في الزراعة.

الكلمات المفتاحية: مياه الصرف الصحي، التلوث، المعالجة، خصائص فيزيوكيميائية، خصائص ميكروبيولوجية، السمية الوراثية.

Mutagenic and genotoxic effects of Guelma's urban wastewater, Algeria

Mouna Tabet, Ahlem Abda, Djamel E. Benouareth, Recep Liman, Muhsin Konuk, Messaouda Khallel & Ali Taher

Environmental Monitoring and Assessment

An International Journal Devoted to Progress in the Use of Monitoring Data in Assessing Environmental Risks to Man and the Environment

ISSN 0167-6369

Volume 187

Number 2

Environ Monit Assess (2015) 187:1-13
DOI 10.1007/s10661-015-4281-4

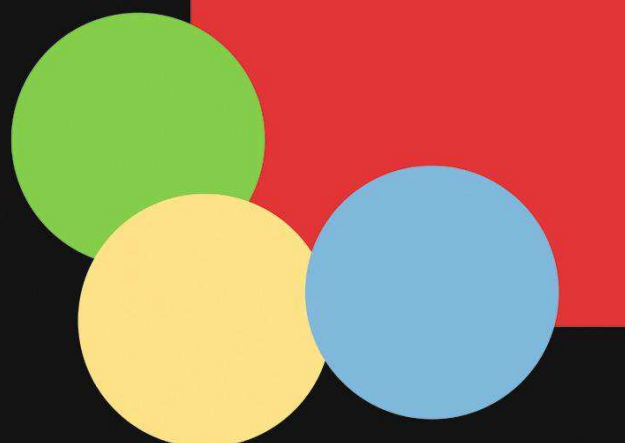
ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT

An International Journal devoted to progress in the use of monitoring data in assessing environmental risks to Man and the environment.

ISSN 0167-6369
CODEN EMASDH

Editor: G. B. Wiersma

Volume 186 No. 12 December 2014



 Springer

 Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer International Publishing Switzerland. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Mutagenic and genotoxic effects of Guelma's urban wastewater, Algeria

Mouna Tabet · Ahlem Abda · Djamel E. Benouareth ·
Recep Liman · Muhsin Konuk · Messaouda Khallef ·
Ali Taher

Received: 3 July 2014 / Accepted: 6 January 2015
© Springer International Publishing Switzerland 2015

Abstract Assessment of water pollution and its effect upon river biotic communities and human health is indispensable to develop control and management strategies. In this study, the mutagenicity and genotoxicity of urban wastewater of the city of Guelma in Algeria were examined between April 2012 and April 2013. For this, two biological tests, namely Ames and chromosomal aberrations (CA) test in *Allium cepa* root tips were employed on the samples collected from five different sampling stages (S1–S5). In Ames test, two strains of *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 with or without metabolic activation (S9-mix) were used. All water samples were found to be mutagenic to *S. typhimurium*

TA98 with or without S9-mix. A significant decrease in mitotic index (MI) was observed with a decrease in the percentage of cells in the prophase and an increase in the telophase. Main aberrations observed were anaphase bridges, disturbed anaphase-telophase cells, vagrants and stickiness in anaphase-telophase cells. All treatments of wastewater in April 2012, at S5 in July 2012, at S1 and S5 in November 2012, at S5 in February 2013, and at S1 in April 2013 induced CA when compared to the negative control. Some physicochemical parameters and heavy metals (Cd, Pb, and Cu) were also recorded in the samples examined.

Keywords Mutagenicity · Genotoxicity · Urban wastewater · Ames test · *Allium* test

M. Tabet · A. Abda · D. E. Benouareth · M. Khallef
Biology Department, Faculty of Natural and Life Sciences,
Earth and Universe Sciences, University 8 Mai 1945 Guelma,
BP 401, Guelma 24000, Algeria

R. Liman
Molecular Biology and Genetics Department, Faculty of Arts
and Sciences, Uşak University,
64300 Uşak, Turkey

M. Konuk (✉)
Molecular Biology and Genetics Department, Faculty of
Engineering and Natural Sciences, Üsküdar University,
Haluk Türksoy Sok, No. 14, Altunizade, 34662 Istanbul,
Turkey
e-mail: mkonuk@gmail.com

A. Taher
Biology Department, Faculty of Sciences, University Badji
Mokhtar,
Annaba BP 12 Annaba 23000, Algeria

Introduction

Human activities are provoking great impacts on aquatic ecosystems. Discharges of industrial and domestic effluents in the rivers/streams are the most common pollution source of chemical compounds in this ecosystem (Stahl 1991; Vega et al. 1996; Hoshina and Marin-Morales 2009). However, such effluents can still carry harmful substances with long-term mutagenic/genotoxic or phytotoxic effects (Gana et al. 2008; Jolibois et al. 2009). Biological tests to evaluate the effect of wastewater treatment process and ascertain the quality of effluent routed in Seybouse River were performed on water samples from the wastewater treatment plant (WWTP) of the city of Guelma. The

Seybouse River is an important source of water used mainly for irrigation of large agricultural areas extending from the Guelma region to Annaba city (Djabri et al. 2003).

Ames test, or the so-called Salmonella/microsome test, is widely used in investigating the mutagenic effects of chemicals. It is not only one of the most reliable short-term bacterial test systems but also cheap and results very rapidly (Maron and Ames 1983; Mortelmans and Zeiger 2000).

Assays with higher plants are being used to evaluate the genotoxicity of dangerous/harmful chemicals for years (Fiskesjo 1985; Saxena et al. 2005; Hoshina and Marin-Morales 2009; Ventura et al. 2013). These assays are very useful to test complex environmental samples such as domestic and industrial sewage (Grover and Kaur 1999; Hoshina and Marin-Morales 2009). Different *Allium* species are used to evaluate environmental pollution, *Allium cepa* being the most often used due to the knowldgment of its cell cycle duration and its reaction in the presence of many known mutagenic agents (Evseeva et al. 2003). The chromosome aberration (CA) test in *A. cepa* provides a fast test to screen genotoxic effects of chemical substances that are present in the environment (Smaka-Kincl et al. 1996; Leme and Marin-Morales 2009; Hoshina and Marin-Morales 2009; Cigerci et al. 2013).

The aim of this study was to assess the efficiency of the treatment carried out by wastewater treatment plant of the Guelma city (northeast of Algeria) regarding to its ability/capacity to eliminate genotoxic ingredients might be present in the influent by using both Ames and *A. cepa* anaphase-telophase test.

Materials and methods

Chemicals

S9 from liver from rat (Sprague-Dawley), 2-aminoanthracene (2AA, CAS No. 613-13-8), methyl methanesulfonate (MMS, CAS No.67-27-3), and basic fuchsin were purchased from Sigma-Aldrich. 4-Nitro-o-phenyldiamine (NPD, CAS No. 99-56-9) and 2-aminofluorene (2AF, CAS No. 153-78-6) were purchased from Fluka (European export). L-Histidine HCl, D-biotin, ampicillin trihydrate, and D-glucose 6-phosphate were

purchased from Biochem Chemopharma (France). Citric acid monohydrate, potassium chloride, sodium chloride, and sodium hydroxide were purchased from Coprochim Eurl (Algeria). Sodium azide (SA, CAS No. 26628-22-8) was purchased from Riedel (European export).

Description of the WWTP

Raw sewage arriving at the WWTP (Fig. 1) from two lift stations SR1 (powered by Oued Maiz) and SR2 (powered by Oued Skhoun), which push back directly to the treatment plant. The latter is located near Guelma-Heliopolis Bridge on the National Highway connecting Guelma-Annaba, with an area of 7.8 ha. The treatment consists of a pretreatment (screening, grit removal, and oil removal), primary treatment by decantation, secondary biological treatment by activated sludge, and tertiary treatment by chlorination. Effluents from the station are routed to Oued Seybouse which is used as a source of water for irrigation.

Sampling methods

Wastewater samples were collected during the following periods: April 2012, July 2012, November 2012, February 2013, and April 2013; the samples were taken after each level of processing. S1–S5 is used for physicochemical parameters, and other parameters (heavy metals and genotoxicity tests) were examined in three levels of treatment stages [the station entrance (S1), the clarifier (S4), and the station exit (S5)].

Physicochemical parameters

Conservation of samples of wastewater was performed by general guide to the preservation and handling of samples according to ISO 5667/3.

The pH, temperature, and conductivity were determined using a multiparameter analysis Eutech instrument type. Biological oxygen demand (BOD5) was determined by the breathing method using a BOD meter (INOLAB) according to the technique described by Norme Française Technique (NFT 90-103). Chemical oxygen demand (COD) was determined according to the technique (NF T 90-101). Total suspended solids (TSS) were

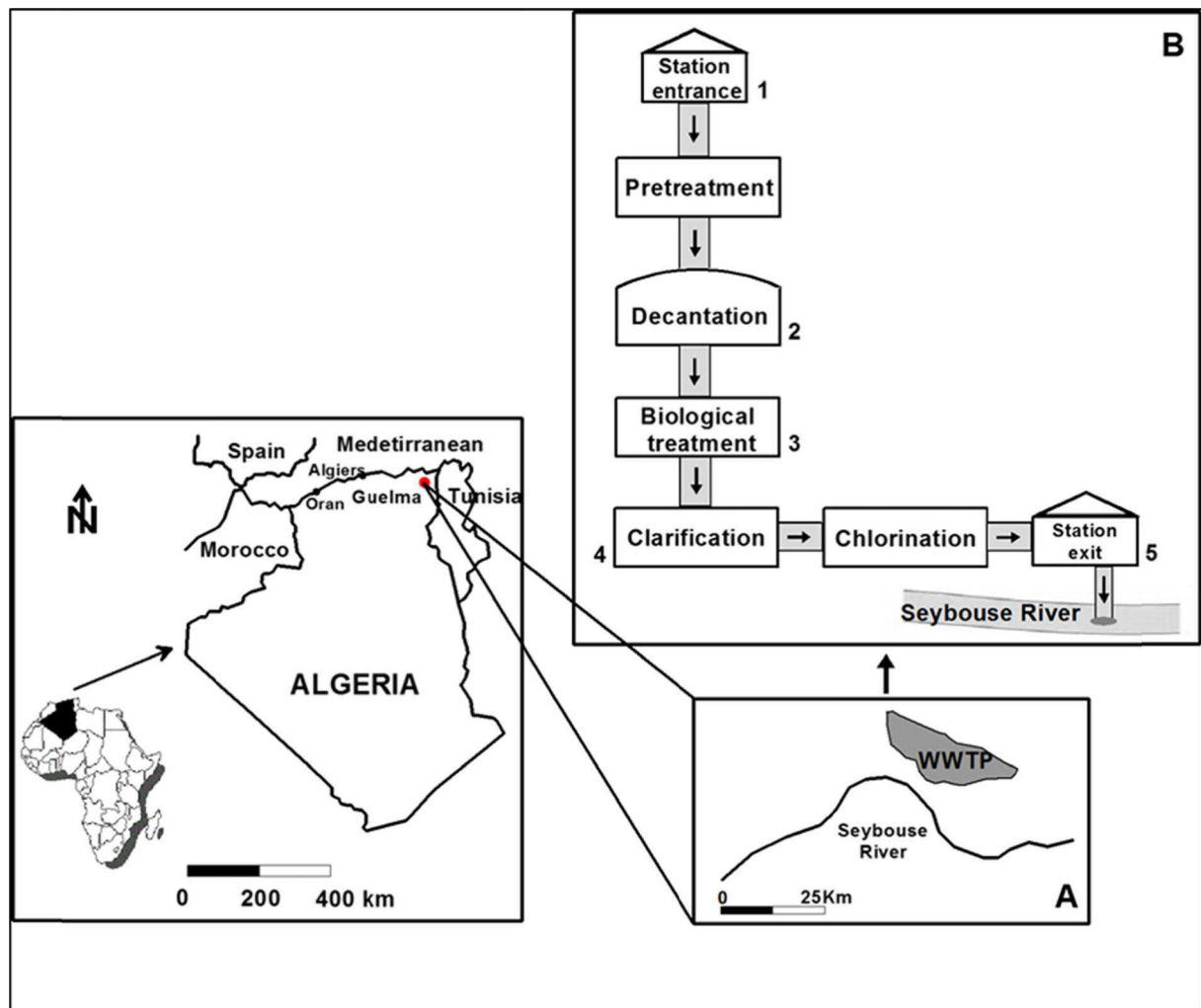


Fig. 1 Localization of the study area (latitude 36° 28' 45.67" N, longitude 7° 26' 30.8" E). **a** Situation of wastewater treatment plant (WWTP). **b** Collection sites inside the station (S1, S2, S3, S4, and S5)

determined by filtering a volume of wastewater through a cellulose filter (0.45 μm) as NFT 90-105. The orthophosphates, nitrates, nitrites, and ammonium were determined by the colorimetric method (ISO 6878), the photometric method sodium salicylate (NFT 90-012), the photometric method (ISO 5667), and the ISO 7150 methods, respectively.

Determination of heavy metals

The levels of cadmium, copper, and lead were determined by inductively coupled plasma (ICP). Immediately after collection, water samples were acidified through nitric acid. Samples were then submitted to

acid digestion and subsequent concentration (Barbosa et al. 2010).

Ames test

The *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100 were obtained from Prof. M Konuk, Turkey. They are used for determining the frameshift and the base pair exchange type of mutations, respectively. Preparation of the stock *S. typhimurium* TA98 and TA100 strains, the histidine requirement, presence of the *rfa* and *uvrB* mutations, and R-factor genetics of these strains were determined according to the method of Maron and Ames (1983) and kept at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. After recuperation, samples were immediately filtered through filter

0.45 μm with acetate cellulose to remove particles that may disturb the measurements and are frozen at $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in pending the implementation of the test (Jolibois et al. 2009). The Ames test was performed as a standard preincubation assay with *S. typhimurium* strains TA98 and TA100 with or without S9-mix (Mortelmans and Zeiger 2000; Lupi et al. 2009). Five hundred microliters of S9-mix (or 500 μl phosphate buffer), 100 μl of filtered samples of wastewater, and 100 μl of a cell suspension from an overnight culture ($1\text{--}2\times 10^9$ cells/ml) were added to tubes and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min, then added to 2-ml top agar that contains histidine and biotine (kept at $45\text{ }^{\circ}\text{C}$) and vortexed 3 s. The entire mixture was overlaid on the minimal agar plate. After incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 72 h, the His⁺ revertants are then counted. The sterile distilled water is used as a negative control. NDP and 2AF were used as positive controls for TA98, and SA and 2AA were used as positive controls for TA100 in the absence and presence of S9-mix, respectively (Liman et al. 2010). Samples were tested on triplicate plates in two independent parallel experiments.

A. cepa anaphase-telophase test

The test of *A. cepa* was used according to the protocol based from Fiskesjo (1985) and Liman et al. (2010). Small bulbs of *A. cepa* ($2n=16$) were purchased from a local supermarket and planted in distilled water for 48 h in darkness. The bulbs that have size of 2 to 2.5 cm are put in contact with the wastewater samples taken this during 24 h. After exposure, the roots were cut and fixed in Carnoy's fixative (ethanol, glacial acetic acid 3v/1v) for 24 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and stored in 70 % ethanol. After fixing, the roots are hydrolyzed in 1 N HCl at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 8 min and were stained in the dark with Feulgen dye (20–30 min). MMS (10 ppm) is used as a positive control, and distilled water is used as negative control. The mitotic index (MI) and CA were determined according to Saxena et al. (2005) and Liman et al. (2010). For MI, the different phases of mitosis were counted in a total of 5000–6000 cells (1000 cells/plate) and expressed in percentage. For chromosomal aberrations, 100–150 anaphase-telophase cells per slide were examined.

Statistical analysis

Statistical analysis of the physicochemical parameters was performed by MINITAB software 16, using a

comparison test factor analysis of variance (ANOVA). The Ames and *Allium* test results were statistically analyzed using SPSS 18 for Windows. Mann-Whitney test was performed for Ames test. The data of MI and CA were expressed as percentages, and the levels of significance in different treatment groups were analyzed by Duncan multiple range tests by using one-way ANOVA.

Results

Physicochemical analysis

Water quality indices of test water samples are presented in Table 1. A diminution in the mean values of physicochemical parameters has been observed after each level of treatment process during all period of study except for nitrates where there is a significant increase during treatment. The results are in correlation with the degree of water sample load. The pH values of water samples were neutral and varied between 7 ± 0.1 and 7.736 ± 0.148 . The temperature values varied 11.467 ± 0.569 and $24.333\pm 0.577\text{ }^{\circ}\text{C}$, and electrical conductivity values varied between 1.106 ± 0.101 and $1.620\pm 0.158\text{ }\mu\text{S/cm}$. COD, DOB5, and TSS of wastewater samples were significantly found higher than raw waters and this during all period of study compared to other water samples. The highest concentrations of other chemical indications (nitrites, ammonium, and orthophosphates) were detected in raw water samples whatever the period of study; however, the highest concentrations of nitrate were registered at treated water level.

Table 2 presents the dosage results of heavy metals in the different samples of wastewaters. The chemical analysis of different heavy metals appropriated between April 2012 and April 2013 shows their presence in most tested samples and whose concentration is different. The maximum values for Cd ($1.824\text{ }\mu\text{g/l}$), Pb ($16.96\pm 1.96\text{ }\mu\text{g/l}$), and for Cu ($4.181\pm 0.581\text{ }\mu\text{g/l}$) were detected in November 2012 at S1. A decrease in heavy metal rate was observed in the appropriated samples of S4 in relation to raw water, and this during all period of study.

Ames test

The results of Ames test with and without S9-mix are given in Table 3. The evaluation of Ames test results were performed according to Mortelmans and Zeiger (2000), and a mutagenic potential is assumed if the

Table 1 Physicochemical properties of wastewater samples collected from WWTP

Parameter		April 2012	July 2012	November 2012	February 2013	April 2013
pH ($\pm$ SD)	S1	7.63 $\pm$ 0.20*	7.43 $\pm$ 0.05	7.52 $\pm$ 0.02*	7.73 $\pm$ 0.14	7.66 $\pm$ 0.2
	S2	7.16 $\pm$ 0.15*	7.21 $\pm$ 0.21	7.24 $\pm$ 0.21*	7.70 $\pm$ 0.17	7.30 $\pm$ 0.5
	S3	7.03 $\pm$ 0.05*	7.14 $\pm$ 0.12	7.05 $\pm$ 0.05*	7.45 $\pm$ 0.21	7.40 $\pm$ 0.36
	S4	7.00 $\pm$ 0.10*	7.11 $\pm$ 0.12	7.15 $\pm$ 0.05*	7.40 $\pm$ 0.26	7.40 $\pm$ 0.3
	S5	7.06 $\pm$ 0.15*	7.27 $\pm$ 0.06	7.24 $\pm$ 0.04*	7.53 $\pm$ 0.05	7.43 $\pm$ 0.32
T ($^{\circ}$ C $\pm$ SD)	S1	16.60 $\pm$ 0.65*	24.33 $\pm$ 0.57***	16.9 $\pm$ 0.17	11.9 $\pm$ 0.17*	20.93 $\pm$ 1
	S2	17.16 $\pm$ 0.15*	21.30 $\pm$ 0.60***	16.13 $\pm$ 1.2	11.9 $\pm$ 0.17*	20.96 $\pm$ 0.05
	S3	17.33 $\pm$ 0.66*	20.10 $\pm$ 0.10***	16.23 $\pm$ 0.49	12.43 $\pm$ 0.46*	20.66 $\pm$ 0.57
	S4	17.46 $\pm$ 0.55*	20.43 $\pm$ 0.51***	15.93 $\pm$ 0.95	12.33 $\pm$ 0.28*	20.33 $\pm$ 0.57
	S5	16.13 $\pm$ 0.23*	24.66 $\pm$ 0.40***	15.46 $\pm$ 0.28	11.46 $\pm$ 0.56*	21.03 $\pm$ 0.057
Cond (μ S/cm $\pm$ SD)	S1	1.27 $\pm$ 0.09	1.21 $\pm$ 0.02*	1.28 $\pm$ 0.15*	1.37 $\pm$ 0.18	1.62 $\pm$ 0.15***
	S2	1.20 $\pm$ 0.01	1.23 $\pm$ 0.03*	1.52 $\pm$ 0.06*	1.39 $\pm$ 0.04	1.31 $\pm$ 0.08***
	S3	1.26 $\pm$ 0.03	1.13 $\pm$ 0.02*	1.21 $\pm$ 0.10*	1.38 $\pm$ 0.09	1.21 $\pm$ 0.06***
	S4	1.20 $\pm$ 0.03	1.05 $\pm$ 0.03*	1.26 $\pm$ 0.03*	1.25 $\pm$ 0.03	1.22 $\pm$ 0.01***
	S5	1.18 $\pm$ 0.02	1.10 $\pm$ 0.1*	1.19 $\pm$ 0.06*	1.28 $\pm$ 0.02	1.17 $\pm$ 0.07***
COD (mg/l $\pm$ SD)	S1	435.7 $\pm$ 40.10***	440.3 $\pm$ 62.30***	333.5 $\pm$ 149.30 *	455.83 $\pm$ 11.060***	429.90 $\pm$ 20.60***
	S2	43 $\pm$ 6.08***	62.33 $\pm$ 6.81***	249.3 $\pm$ 44*	359.7 $\pm$ 36.2 ***	337.30 $\pm$ 33.3***
	S3	32 $\pm$ 1.00***	24.67 $\pm$ 5.03***	188 $\pm$ 58.6*	321.30 $\pm$ 18.70***	77.67 $\pm$ 16.77***
	S4	7.93 $\pm$ 2.76***	28.33 $\pm$ 2.89***	58.00 $\pm$ 8.54*	56.67 $\pm$ 4.93***	43.33 $\pm$ 2.52***
	S5	1.80 $\pm$ 0.26***	27.33 $\pm$ 2.52***	11.07 $\pm$ 3.41*	35.69 $\pm$ 2.55***	29.26 $\pm$ 1.55***
BOD5 (mg/l $\pm$ SD)	S1	247.67 $\pm$ 16.17***	214 $\pm$ 4.58***	247 $\pm$ 52.70***	279.96 $\pm$ 10.76 ***	220 $\pm$ 11.36 ***
	S2	37.67 $\pm$ 3.21 ***	15.67 $\pm$ 4.04***	37 $\pm$ 7***	148 $\pm$ 20.7 ***	122.33 $\pm$ 2.08***
	S3	15 $\pm$ 5.00 ***	11.66 $\pm$ 1.52***	14.33 $\pm$ 5.13***	32.67 $\pm$ 8.74***	24.00 $\pm$ 3.61***
	S4	18 $\pm$ 2.65***	11 $\pm$ 3***	9.66 $\pm$ 1.15***	19.67 $\pm$ 5.51***	26.00 $\pm$ 1.00***
	S5	17.50 $\pm$ 0.86***	9.66 $\pm$ 1.15 ***	12.66 $\pm$ 1.52***	16.87 $\pm$ 2.73***	20.53 $\pm$ 2.34 ***
TSS (mg/l $\pm$ SD)	S1	349.3 $\pm$ 27.2 ***	273 $\pm$ 42.8***	202.3 $\pm$ 73.3***	223.33 $\pm$ 11.37***	519.30 $\pm$ 18.00 ***
	S2	42.00 $\pm$ 2.00***	43.33 $\pm$ 2.89***	69 $\pm$ 1***	70.30 $\pm$ 19.50***	234.00 $\pm$ 2.00***
	S3	17.00 $\pm$ 1.00***	26.67 $\pm$ 2.08***	45.33 $\pm$ 3.21***	38.00 $\pm$ 2.65***	50.33 $\pm$ 9.50 ***
	S4	10.67 $\pm$ 2.31***	14.67 $\pm$ 3.06***	25.33 $\pm$ 2.31***	21.00 $\pm$ 2***	25.00 $\pm$ 3***
	S5	3.83 $\pm$ 1.76 ***	9.33 $\pm$ 4.73***	11.33 $\pm$ 2.08***	15.00 $\pm$ 3***	11.00 $\pm$ 3***
NO ₂ ⁻ (mg/l $\pm$ SD)	S1	3.10 $\pm$ 3.38	2.033 $\pm$ 0.89***	1.00 $\pm$ 1	49.00 $\pm$ 2***	1.60 $\pm$ 0.1
	S2	0.25 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.07***	0.50 $\pm$ 0.1	12.00 $\pm$ 4***	1.16 $\pm$ 0.35
	S3	0.03 $\pm$ 0.05	0.06 $\pm$ 0.11***	1.00 $\pm$ 0.2	9.00 $\pm$ 1***	5.00 $\pm$ 3
	S4	1.78 $\pm$ 0.20	0.07 $\pm$ 0.02***	1.50 $\pm$ 0.20	7.33 $\pm$ 3.51***	4.4 $\pm$ 0.10
	S5	0.83 $\pm$ 0.57	0.14 $\pm$ 0.21***	0.40 $\pm$ 0.34	2.50 ***	4.00 $\pm$ 3
NO ₃ ⁻ (mg/l $\pm$ SD)	S1	4.00 $\pm$ 20.00***	3.83 $\pm$ 1.25***	1.20 $\pm$ 0.10***	5.20 $\pm$ 0.10*	2.00 $\pm$ 1.00*
	S2	3.46 $\pm$ 0.25***	3.70 $\pm$ 0.20***	6.70 $\pm$ 0.30***	5.00 $\pm$ 2.00*	1.2 $\pm$ 0.00*
	S3	2.00 $\pm$ 10.00***	2.40 $\pm$ 0.40***	3.00 $\pm$ 1.00***	10.00 $\pm$ 4.00*	8.67 $\pm$ 3.51*
	S4	1.30 $\pm$ 0.20***	10.00 $\pm$ 20.00***	4.00 $\pm$ 1.00***	10.70 $\pm$ 0.10*	5.00 $\pm$ 3.00*
	S5	16.00 $\pm$ 20.00***	13.83 $\pm$ 0.76***	11.33 $\pm$ 0.57***	12.10 $\pm$ 0.30*	10.33 $\pm$ 3.06*
NH ₄ ⁺ (mg/l $\pm$ SD)	S1	47.20 $\pm$ 7.54***	33.67 $\pm$ 3.21***	55.49 $\pm$ 5.28***	41.67 $\pm$ 6.66***	24.19 $\pm$ 1.83***
	S2	32.40 $\pm$ 0.40***	15.00 $\pm$ 30.00***	27.45 $\pm$ 0.55***	29.00 $\pm$ 4.00 ***	20.33 $\pm$ 2.52***
	S3	26.40 $\pm$ 0.40***	1.30 $\pm$ 0.30***	1.32 $\pm$ 0.77***	10.00 $\pm$ 4.00***	14.00 $\pm$ 50***
	S4	5.20 $\pm$ 0.10***	0.79 $\pm$ 0.29***	0.92 $\pm$ 0.00***	3.20 $\pm$ 0.00***	10.3 $\pm$ 0.70***

Table 1 (continued)

Parameter		April 2012	July 2012	November 2012	February 2013	April 2013
OPO ₄ ⁻³ (mg/l±SD)	S5	3.33±0.57***	1.30±0.60***	1.87±1.44***	2.83±0.28***	2.53±1.62***
	S1	0.83±0.76	1.16±0.35*	1.76±0.03***	0.10±0.01***	0.12±0.02
	S2	0.03±0.05	0.6±0.30*	1.20±0.10***	0.08±0.02***	0.10±0.01
	S3	0.02±0.01	0.33±0.15*	1±0.50***	0.03±0.01***	0.09±0.03
	S4	0.02±0.02	1.03±0.05*	0.46±0.20***	0.03±0.02***	0.07±0.01
	S5	0.46±0.45	0.72±0.23*	0.22±0.00***	0.01±0.005***	0.22±0.36

SD standard deviation, Cond conductivity, S1 station entrance, S2 release decanter, S3 exit basin ventilation, S4 clarifier exit, S5 station exit
 * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, statistically significant (ANOVA)

revertant frequency is 2.0 or higher over the negative control or dose-related increase in the number of revertant colonies in one or more strains. The average revertant colony numbers of the negative control were 23.33 ± 9.7 for TA98 and 107.33 ± 6.42 for TA100 in the absence of S9-mix. Additionally, in the presence of S9-mix, these numbers were as 25.66 ± 3.78 and 101 ± 3.6 , respectively. Spontaneous revertants were found within normal values for both studied strains. The highest value observed with S9-mix was in the TA98 at S5 (4316.33 ± 196.01) in April 2012, and the lowest value observed without S9-mix was in the TA98 at S5 (94 ± 6) in April 2013. The result of the present study showed that all water samples were found to be mutagenic to *S. typhimurium* TA98 with or without S9-mix. On the other hand, all water samples except S1 in April 2012, S1 in July 2012 and S4 in April 2013 with S9, S4 in February 2013, and S4 and S5 in April 2013 without S9-mix were found to be mutagenic to

S. typhimurium TA100 with or without S9-mix. The use of S9-mix with TA98 and TA100 strains does not favor mutagen concentration for most samples.

A. cepa anaphase-telophase test

Characterization of cytotoxicity and genotoxicity of appropriated wastewaters was investigated through analysis of MI and CA frequency, respectively. The effect of wastewater on MI and mitotic phases in the root meristematic cells of *A. cepa* is summarized in Table 4. At all, wastewater significantly decreased MI compared to negative control during all period of study ($p < 0.05$). The highest value was obtained from the control group (20.82 ± 1.07), and the lowest one 10 ppm of MMS (6.81 ± 0.89). These values for wastewater are 18.16 ± 1.51 at S4 in April 2013 and 9.31 ± 1.12 at S1 in April 2012. All wastewater samples examined

Table 2 Heavy metals concentrations of wastewater Samples Collected from WWTP

Parameter (µg/l)		April 2012	July 2012	November 2012	February 2013	April 2013
Cd±SD	S1	0.30±0.10*	0.596±0.004***	1.824±0.000	1.36±0.01***	0
	S4	0.21±0.00*	0.573±0.073***	1.767±0.208	0.50±0.00***	0
	S5	0.10±0.00*	0.273±0.046***	1.63±0.01	0.480±0.00***	0
Pb±SD	S1	2.13±0.03***	0	16.96±1.96 ***	4.34±0.34***	3.10±0.90**
	S4	0.00±0.00***	0	7.493±0.508***	0.00±0.00***	2.12±0.08**
	S5	0.00±0.00***	0	3.38±0.28***	0.00±0.00***	0.00±0.00**
Cu±SD	S1	2.16±0.16***	2.143±0.957*	4.181±0.581***	3.123±0.077***	2.181±0.181***
	S4	0.12±0.08***	2.0933±0.0503*	1.765±0.235***	1.34±0.26***	0.080±0.052***
	S5	0.10±0.10***	0.106±0.011*	0.536±0.164***	0.078±0.135***	0.106±0.110***

SD standard deviation, S1 station entrance, S4 clarifier exit, S5 station exit

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, statistically significant (ANOVA)

Table 3 Mutagenicity of wastewater toward *S. typhimurium* TA98 and TA100 strains with or without S9-mix

Treatments		Number of His+revertants/plate (mean±standard deviation)			
		TA98		TA100	
		–S9	+S9	–S9	+S9
April 2012	S1	96.33±7.37* m	120.33±11.5* m	111±10.14	140.33±5.5*
	S4	3236.66±161.58* m	3372±197.61* m	3416.3±212.6* m	3348.33±238.76* m
	S5	5279±281.02* m	4316.33±196.01* m	3520.33±170.11* m	3113.33±100.16* m
July 2012	S1	265±24.51* m	86.33±11.86* m	367.33±11.84* m	99.66±3.51
	S4	248±18.33* m	248.33±9.5* m	252±9.5* m	357.33±19.65* m
	S5	226.33±14.22* m	229.66±8.96* m	565±8.96* m	543.33±17* m
November 2012	S1	527±31.09* m	490.66±8.32* m	790±36.05* m	696.66±25.16* m
	S4	226.66±23.15* m	244.66±32.33* m	233±29.1* m	260±33.06* m
	S5	534.66±31.06* m	551.66±42.52* m	463±50.58* m	436.66±35.11* m
February 2013	S1	966.66±25.73* m	946.33±55.59* m	1192±13.85* m	906.33±37.28* m
	S4	169.33±16.28* m	496.33±50.4* m	97.33±7.5	95±7.81
	S5	218.66±21.38* m	289.66±45.72* m	1005.33±51.63* m	1013.66±80.37* m
April 2013	S1	642.33±39.92* m	582.33±29.56* m	1246.66±76.74* m	871.66±24.66* m
	S4	152.33±15.5* m	165.66±18.44* m	89.66±5.68*	94±8.71
	S5	94.00±6* m	94.33±10.21* m	128.33±23.86	241.66±20.20* m
Control		23.33±5.85	25.66±3.78	107.33±6.42	101±3.6
SA-10 (µg/plate)				1876.2±109.34*	
2AA-5 (µg/plate)					2384.2±102.32*
2AF-200 (µg/plate)			986.6±71.15*		
NPD-200 (µg/plate)		1485.4±134.61*			

* $p<0.05$, statistically significant (Mann-Whitney test)

m mutagen, *SA* sodium azide, *2AA* 2-aminoanthracene, *2AF* 2-aminofluorene, *NPD* 4-nitro-o-phenylenediamine, *S1* station entrance, *S4* clarifier exit, *S5* station exit

during this study have caused a percentage change in mitotic phases compared to negative control. The percentage values of mitotic phases of negative control were 74.64±5.02 % for the prophase, 7.51±3.51 % for the metaphase, 7.31±2.21 % for the anaphase, and 10.53±3.65 % for the telophase. The characteristic effect caused by wastewater was a decrease of prophase index and a simultaneous increase of telophase index when compared to control. These changes also showed statistically significant results ($p<0.05$). Since metaphase and anaphase frequency formed as a result of cell division, their numbers also varied as increase or decrease. Some of the increased and decreased phase index showed statistically significant results at S1 (12.82±1.99 %) in July 2012 for metaphase index, at S1 (11.34±2.3 %) in April 2012, S1 (3.48±1.75 %) and S4 (3.1±1.36) in

February 2013, and all of the sites in July 2012, November 2012, and April 2013 for anaphase index ($p<0.05$). Table 5 presents the CA detected in *A. cepa* meristematic cells. Four types of aberrations (anaphase bridges (especially at S5 in April 2012), disturbed anaphase-telophase cells, vagrants, and stickiness) were observed in anaphase-telophase cells. While the lowest anomalies were observed to be 3.08±0.26 % at S1 February 2013, the highest ones were observed to be 7.38±0.61 % at MMS. Analysis of the chromosomes showed that all treatments of wastewater in April 2012, at S5 in July 2012, at S1 and S5 in November 2012, at S5 in February 2013, and at S1 in April 2013 induced chromosomal aberrations, but others decreased chromosomal aberrations compared to the negative control and found lower than MMS. The effect of wastewater on CA was found significantly different at S4 (4.38±0.61) in

Table 4 The effects of wastewater on mitotic index and mitotic phases in the root tips of *A. cepa*

Treatments		CCN	MI±SD	Mitotic phases (%)±SD			
				Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophase
April 2012	S1	5286	9.31±1.12 a	58.29±5.21 a	8.45±2.41 a	11.34±2.3 a	21.95±4.35 a
	S4	5212	13.06±1.19 b	49.72±3.16 b	7.29±1.93 a	4.98±0.74 b	37.99±2.37 b
	S5	5509	13.71±1.13 b	47.12±2.72 b	6.65±3.4 a	5.02±2.07 b	41.19±4.16 b
	Negative control	5183	20.82±1.07 c	74.64±5.02 c	7.51±3.51 a	7.31±2.21 b	10.53±3.65 c
	MMS (10 ppm)	5194	6.81±0.89 d	57.6±5.65 a	13.84±3.8 b	8.63±3.56 ab	19.9±4.85 a
July 2012	S1	5238	13.47±1.42 a	45.22±3.9 a	12.82±1.99 a	6.9±1.76 a	35.04±2.63 a
	S4	5391	16.83±1.9 b	46.85±2.51 a	6.61±1.75 b	5.74±1.35 a	40.79±4.45 b
	S5	5253	14.05±0.53 a	45.96±1.52 a	10.36±1.79 ab	7.25±2.17 a	36.43±1.66 ab
	Negative control	5183	20.82±1.07 c	74.64±5.02 b	7.51±3.51 b	7.31±2.21 a	10.53±3.65 c
	MMS (10 ppm)	5194	6.81±0.89 d	57.6±5.65 c	13.84±3.8 a	8.63±3.56 a	19.9±4.85 d
November 2012	S1	5556	14.28±0.8 a	45.91±2.76 a	11.21±1.25 ab	5.8±1.68 a	37.07±3.67 a
	S4	5245	15.99±1.39 b	46.39±2.94 a	9.17±2.23 ab	7.86±1.5 a	36.57±3.83 a
	S5	5196	16.45±1.22 b	54.37±3.39 b	9.67±1.16 ab	6.19±1.44 a	29.75±4.03 b
	Negative control	5183	20.82±1.07 c	74.64±5.02 c	7.51±3.51 a	7.31±2.21 a	10.53±3.65 c
	MMS (10 ppm)	5194	6.81±0.89 d	57.6±5.65 b	13.84±3.8 b	8.63±3.56 a	19.9±4.85 d
February 2013	S1	5150	14.71±1.04 ab	50.45±3.35 a	4.17±2.65 a	3.48±1.75 a	41.89±2.82 ab
	S4	5253	15.13±1.1 a	49.91±4.88 a	9.43±2.63 ab	3.1±1.36 a	37.55±4.38 a
	S5	5306	13.51±1.24 b	41.79±1.9 b	7.65±2.08 a	6.27±1.33 ab	44.27±2.95 b
	Negative control	5183	20.82±1.07 c	74.64±5.02 c	7.51±3.51 a	7.31±2.21 b	10.53±3.65 c
	MMS (10 ppm)	5194	6.81±0.89 d	57.6±5.65 d	13.84±3.8 b	8.63±3.56 b	19.9±4.85 d
April 2013	S1	5131	15.33±0.78 a	37.83±1.14 a	8.67±1.42 a	3.67±1.16 a	49.81±1.24 a
	S4	5192	18.16±1.51 b	46.47±1.76 b	6.58±1.76 a	2.72±1.47 a	44.21±3.09 b
	S5	5225	17.92±0.76 b	43.72±3.23 b	5.89±2.01 a	3.75±1.15 a	46.63±2.59 ab
	Negative control	5183	20.82±1.07 c	74.64±5.02 c	7.51±3.51 a	7.31±2.21 b	10.53±3.65 c
	MMS (10 ppm)	5194	6.81±0.89 d	57.6±5.65 d	13.84±6.8 b	8.63±3.56 b	19.9±4.85 d

Means with the same letter do not differ statistically at the level of 0.05

SD standard deviation, CCN counting cell numbers, S1 station entrance, S4 clarifier exit, S5 station exit

April 2012, at S5 (4.6±1.23) in July 2012, at S5 (4.32±0.42) in February 2013, and at S4 (3.13±0.39) and S5 (3.45±0.43) in April 2013 compared to the negative control.

Discussion

The results of physicochemical parameter analysis show the influence of season on the variation of water quality, notably concerning the temperatures which varied from one season to another. This meant that temperature varies between hot season and cold season (Zidane et al. 2012). BOD, COD,

and TSS are often used as measures of pollution load in wastewater and natural waters. The high levels of these parameters at the station entrance suggest the presence of organic and inorganic micropollutants in these waters (Tabrez and Ahmad 2011). The significant diminution in the level of the study parameters is the result of treatment process notably at the level of the aeration basin where there is a degradation of organic matter by microorganisms (Hassoune et al. 2006), except for nitrates, and this can be explained by the nitrogen component metabolism, the transformation of ammonium into nitrate (Khalid et al. 2011). The presence of heavy metals in water

Table 5 Percentage of chromosome aberrations of wastewater in different seasons obtained for the *A. cepa* anaphase-telophase test

Treatments		Anaphase-telophase anomalies %					
		CCN	DAT	V	S	AB	TA±SD
April 2012	S1	568	2.68	0.85	0.9	1.04	5.47±1.09 a
	S4	547	1.49	0.91	0.17	1.81	4.38±0.61 bc
	S5	576	1.05	0.31	–	3.66	5.02±0.36 ac
	Negative control	546	1.47	0.73	0.92	0.54	3.66±0.65 b
	MMS (10 ppm)	586	4.21	0.7	0.84	1.63	7.38±0.61 d
July 2012	S1	658	0.6	0.62	0.13	1.84	3.19±0.1 a
	S4	552	0.72	0.56	0.36	1.62	3.26±0.51 a
	S5	591	1.14	0.49	0.92	1.73	4.6±1.23 b
	Negative control	546	1.47	0.73	0.92	0.54	3.66±0.65 ab
	MMS (10 ppm)	586	4.21	0.7	0.84	1.63	7.38±0.61 d
November 2012	S1	611	1.05	1.15	–	1.8	4±0.96 a
	S4	535	0.18	0.19	1.1	1.7	3.17±0.39 a
	S5	541	1.47	0.35	0.76	1.11	3.88±0.3 a
	Negative control	546	1.47	0.73	0.92	0.54	3.66±0.65 a
	MMS (10 ppm)	586	4.21	0.7	0.84	1.63	7.38±0.61 b
February 2013	S1	583	0.53	0.33	1.02	1.2	3.08±0.26 a
	S4	557	0.55	0.54	1.24	0.91	3.24±0.55 a
	S5	641	0.44	1.11	1.55	1.23	4.32±0.42 b
	Negative control	546	1.47	0.73	0.92	0.54	3.66±0.65 ab
	MMS (10 ppm)	586	4.21	0.7	0.84	1.63	7.38±0.61 c
April 2013	S1	592	0.34	–	2.17	1.88	4.39±0.48 a
	S4	575	–	0.3	1.31	1.53	3.13±0.39 b
	S5	521	0.19	0.2	1.72	1.34	3.45±0.43 b
	Negative control	546	1.47	0.73	0.92	0.54	3.66±0.65 b
	MMS (10 ppm)	586	4.21	0.7	0.84	1.63	7.38±0.61 c

Means with the same letter do not differ statistically at the level of 0.05

SD standard deviation, CCN counting cell numbers, DAT disturbed anaphase-telophase, V vagrant, S stickiness, AB anaphase bridge, TA total anomalies, S1 station entrance, S4 clarifier exit, S5 station exit

samples is an indication of anthropic activities (Mico et al. 2006; Owens and Niemeyer 2006; Barbosa et al. 2010; Harguinteguy et al. 2014). In our study, we have investigated three heavy metals: cadmium, copper, and lead. The results obtained showed that urban wastes, especially domestic ones and hospital wastewater, constitute a source to this pollution (Reimann 1989). The heavy metal rate diminution at level of S4 indicates that these components are concentrated in activated sludge of WWTP (Jolibois et al. 2009), and this due to retention by adsorption onto organic matter in the formation of insoluble complex between the latter and the mineral fraction and

precipitation of metal from a certain pH (Amir 2005). The presence of these pollutants in water constitutes a serious threat for the health of exposed organisms. Heavy metals are toxic agents and can cause DNA damage and cancer (Valko et al. 2006; Barbosa et al. 2010).

Mutagenicity/genotoxicity test of surface waters or industrial effluents using a variety of bioassays demonstrates that these mixtures contain many unidentified and unregulated toxicants that may pose risks and carcinogenicity of unknown magnitude (Gana et al. 2008). In our study, a wastewater genotoxicity evaluation carried out Ames test in *S. typhimurium* TA98 and TA100 with or without S9-mix and CA test in *A. cepa* root

meristematic cells. These tests have shown that the majority of wastewater samples presented a genotoxic character and this for all periods of study. The variability of the positive results obtained at site level during all period of study through Ames test with or without S9-mix (positivity noted down with different sensitivity strains, proportion, and intensity differences of positive responses) is inclined to show a big diversity of the components responsible for this genotoxicity (Jolibois et al. 2009). The wastewaters samples induced frameshift and the base pair exchange type of mutations. However, we can conclude that wastewater is more sensitive to frameshift mutations than base pair exchanges; this result confirmed that strain TA98 is more sensitive to chlorinated wastewater, as demonstrated with the study of Monarca et al. (2000). In the presence of heavy metals in the tested samples, the Cd may induce DNA lesions and mutations such as punctual mutations, deletions and insertion of bases, rearrangements, and base substitution (Castaño and Becerril 2004); in other respects, lead and copper may induce oxidative damage in the DNA (Tabrez and Ahmad 2011; BenSalem et al. 2014); added to this, the interactions between these metals may also lead to genotoxic effect (Castaño and Becerril 2004). However, the quest for a causality link between the presence of one or several chemical components in wastewaters and the genotoxicity observed is a task concretely impossible. Genotoxic components potentially present in wastewaters are multiple and various, and most of them, but for a few exceptions, have never been identified in wastewater or surface water. In our study, the waters treated by the WWTP are exclusively of urban origin (domestic and hospital wastewaters) and their genotoxicity is difficult to explain, even if the human excreta (urines and fecal matter) have been incriminated by some scientists (Ono et al. 1996; Jolibois et al. 2009). In fact, previous studies (Jolibois et al. 2003) have shown that wastewater from the hospital of Rouen presented a genotoxic activity to Ames test (Abdel-Massih et al. 2013). For instance, among the many molecules used in a hospital and liable to be thrown in wastewaters via patients' excreta, we can cite ciprofloxacin, identified by Hartmann et al. (1998) as a genotoxicity source of German hospital wastewaters. In fact, the appropriated samples from S3 presented a high mutagenic power and this may be due to the formation of chlorinated by-products generated by the interaction of chlorine used in the treatment of organic matter (Zidane et al. 2012),

and this is notably during November 2012 and February 2013 for two strains and during summer for TA100 where we observed a decrease in the number of revertants at S4 followed by an increase of this number at S5 level with a reduction in organic matter, and these results indicate that chlorine-treated wastewaters present a genotoxic effect (Monarca et al. 2000). The use of S9 with TA98 and TA100 strains does not favor mutagen concentration for most samples. These results are in agreement with those of Hartmann et al. (1999), who showed that hospital wastewater genotoxicity in the umuC test was independent of the use of S9 metabolic activation. Similarly, White and Rasmussen (1998) indicated that the putative genotoxins in both surface waters and municipal wastewaters are primarily direct acting. S9 addition does not enhance the response (Gupta et al. 2009).

Several studies have been carried out using *A. cepa* test to evaluate environmental samples' genotoxicity, such as water and soil samples from polluted areas, and most of them showed positive results (Fiskesjö 1985, Fiskesjö 1988; Ma et al. 1995; Smaka-Kincl et al. 1996; Jolibois and Guerbet 2005). Smaka-Kincl et al. (1996) showed that the *A. cepa* test is a sensitive test to evaluate the water quality in a study to assess the genotoxic potential of industrial and municipal effluents, surface water, and groundwater of an industrialized and urban area. The cytotoxicity level of a test compound can be determined based on the increase or decrease in the MI (Fernandes et al. 2007). In the present study, the MI diminution indicates that the growth and development of exposed organisms were affected by the tested sample components (Tipirdamaz et al. 2003; El-Shahaby et al. 2003; Gana et al. 2008; Liman et al. 2010). The heavy metals detected in our study, such as cadmium and copper, either individually or in combination with other metals, can exert a powerful inhibiting effect on the cellular division (Knasmüller et al. 1998; Rank and Nielsen 1998; Unyayar et al. 2006). It may suggest that a decrease in mitotic activity indicates that mito-depressive effect of heavy metals could interfere with the normal development of mitosis, thus preventing a number of cells from entering the prophase and blocking the mitosis cycle during interphase (Yıldız et al. 2009), and this was detected in our study through the prophase percentage diminution. The presence of nitrate, nitrite, ammonium, and phosphate can also cause the MI diminution (Tipirdamaz et al. 2003; Radic et al. 2010). The MI is considered to reliably

identify the presence of cytotoxic pollutants in the environment (Smaka-Kincl et al. 1996; Grover and Kaur 1999; Chandra et al. 2005). The tested wastewater samples caused a change in the CA frequency in comparison to the negative control, especially the anaphase bridge anomaly. The reason for such an effect could be the fact that toxic substance in wastewater may disturb the division, causing relatively high number of aberrations (Vedacovic et al. 1993; Tipirdamaz et al. 2003; Özkara et al. 2011). In the present study, the presence of heavy metals may cause these aberrations. Fiskesjo (1981) showed positive results for this metal in the *A. cepa* test, while studying the contamination of drinking water by copper. Later, in 1988, this same author carried out a study with different metal ions (Hg, Cu, Ni, Cd, Be, Al, Mn, Li) and showed that some of them induced specific CA (Leme and Marin-Morales 2009). In the present study, the appearance of the anaphase bridges may be due to the presence of heavy metals in the samples and these results are in concordance with other studies (Borboa and De La Torre 1996; Monteiro et al. 2010; Foltete 2010). This aberration may cause structural chromosome mutations (El-Ghamery et al. 2000; Luo et al. 2004). Disturbed anaphase-telophase and chromosome laggards could occur by the effect of wastewater samples on microtubule formations. Such spindle malfunctioning and the occurrence of chromosome laggards at anaphase may occur inhibition of tubulin polymerization and the failure of the chromosomes or acentric chromosome fragments to move to either of the pole, respectively (Liman et al. 2010). Stickiness indicates highly irreversible type toxic effect of wastewater components such as heavy metals (Michael et al. 2009; Radic et al. 2010), and its occurrences during the study could be because of subchromatid linkage between chromosomes (Liman et al. 2010).

Conclusion

Wastewater was found to be mutagenic in Ames test especially in TA98. It has a cytotoxic effect by decreasing MI, and it also has a genotoxic effect by significantly increasing the CA frequency at S4 in April 2012, at S5 in July 2012, at S5 in February 2013, and at S4 and S5 in April 2013 in the root meristem of *A. cepa* compared to the negative control. Therefore, both the metals detected in our study and other classes of environmental

contaminants are likely the agents that induce genetic toxicity in the study area.

Acknowledgments Special thanks due to wastewater treatment plant workers of the city of Guelma and to Gueroui Yacine, for his help in the realization of the map figure.

References

- Abdel-Massih, R. M., Melki, P. N., Afif, C., & Daoud, Z. (2013). Detection of genotoxicity in hospital wastewater of a developing country using SOS chromotest and Ames fluctuation test. *Journal of Environmental Engineering & Ecological Science*. doi:10.7243/2050-1323-2-4.
- Amir, S. (2005). Contribution A La Valorisation De Boues De Stations D'épuration Par Compostage: Devenir Des Micropolluants Metalliques Et Organiques Et Bilan Humique Du Compost. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique De Toulouse.
- Barbosa, J. S., Cabral, T. M., Ferreira, D. N., Agnez-Lima, L. F., & Batistuzzode, S. R. (2010). Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 320–325.
- BenSalem, Z., Capelli, N., Grisey, E., Baurand, P. E., Ayadi, H., & Aleya, L. (2014). First evidence of fish genotoxicity induced by heavy metals from landfill leachates: the advantage of using the RAPD-PCR technique. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 101, 90–96.
- Borboa, L., & De La Torre, C. (1996). The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. *New Phytologist*, 134, 481–486.
- Castaño, A., & Becerril, C. (2004). In vitro assessment of DNA damage after short-and long term exposure to benzo (a) pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line. *Mutation Research*, 552, 141–151.
- Chandra, S., Chauhan, L. K., Murthy, R. C., Saxena, P. N., Pande, P. N., & Gupta, S. K. (2005). Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using the Allium test. *Science of the Total Environment*, 347, 46–52.
- Ciğerci, İ. H., Liman, R., Özgül, E., & Konuk, M. (2013). Genotoxicity of indium tin oxide by Allium and Comet tests. *Cytotechnology*. doi:10.1007/s10616-013-9673-0.
- Djabri, L., Hani, A., Laouar, R., Mania, J., Mudry, J., & Louhi, A. (2003). Potential pollution of groundwater in the valley of the Seybouse River, north-eastern Algeria. *Environmental Geology*, 44, 738–744.
- El-Ghamery, A. A., El-Nahas, A. I., & Mansour, M. M. (2000). The action of atrazine herbicide as an indicator of cell division on chromosomes and nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia*, 65, 277–287.
- El-Shahaby, O. A., Abdel Migid, H. M., Soliman, M. I., & Mashaly, I. A. (2003). Genotoxicity screening for industrial wastewater using the Allium cepa chromosome aberration assay. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6, 23–28.

- Evseeva, T. I., Geraskin, S. A., & Shuktomova. (2003). Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of Allium-test. *Journal of Environmental Radioactivity*, 68, 235–248.
- Fernandes, T. C. C., Mazzeo, D. E. C., & Marin-Morales, M. A. (2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of Allium cepa exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 252–259.
- Fiskesjo, G. (1981). Allium test on copper in drinking water. *Vatten*, 37, 232–240.
- Fiskesjo, G. (1985). The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102, 99–112.
- Fiskesjo, G. (1988). The Allium test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, 197, 243–260.
- Foltete, A.S. (2010). Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez Vicia faba (Fabaceae) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués. Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine, Metz.
- Gana, J. M., Ordóñez, R., Zampini, C., Hidalgo, M., Meoni, S., & Isla, M. I. (2008). Industrial effluents and surface waters genotoxicity and mutagenicity evaluation of a river of Tucuman, Argentina. *Journal of Hazardous Material*, 155, 403–406.
- Grover, I. S., & Kaur, S. (1999). Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assay. *Mutation Research*, 426, 183–188.
- Gupta, P., Mathur, N., Bhatnagar, P., Nagar, P., & Srivastava, S. (2009). Genotoxicity evaluation of hospital wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1925–1932.
- Harguinteguy, C. A., Cirelli, A. F., & Pignata, M. L. (2014). Heavy metal accumulation in leaves of aquatic plant *Stuckeniafliformis* and its relationship with sediment and water in the Suquiariver (Argentina). *Microchemical Journal*, 114, 111–118.
- Hartmann, A., Alder, A. C., Koller, T., & Widmer, R. M. (1998). Identification of fluoroquinolones antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 377–382.
- Hartmann, A., Golet, E. M., Gartsier, S., Alder, A. C., Koller, T., & Widmer, R. M. (1999). Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36, 115–119.
- Hassoune, E. M., Bouzidi, A., Koulali, Y., & Hadarbach, D. (2006). Effects of domestic and industrial effluent discharges on groundwater quality in the North of the City of Settat (Morocco). *Life Sciences*, 28, 61–71.
- Hoshina, M. M., & Marin-Morales, M. A. (2009). Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (Allium cepa) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 2090–2095.
- Jolibois, B., & Guerbet, M. (2005). Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the Salmonella fluctuation test and the SOS Chromotest. *Mutation Research*, 565, 151–162.
- Jolibois, B., Guerbet, M., & Vassal, S. (2003). Detection of hospital wastewater genotoxicity with the SOS Chromotest and Ames fluctuation test. *Chemosphere*, 51, 539–543.
- Jolibois, B., Guerbet, M., Goullé, J. P., & Lacroix, C. (2009). Effectiveness of two treatment plants to remove the genotoxicity of urban wastewater. *Hospital Technology*, 715, 63–68.
- Khalid, E.K., Driss, B., Khadija, E.K., Abedelouahed, K., Mohamed, C., & Rachid, B. (2011). Caractérisation physico-chimique des eaux usées urbaines de la ville de MechraaBelksiri (Gharb, Maroc). *La science en liberté, Volume 3, N° 110205, ISSN 2111-4706*.
- Knasmüller, S., Gottmann, E., Steinkellner, H., Fomin, A., Pickl, C., Paschke, A., God, R., & Kundi, M. (1998). Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutation Research*, 420, 37–48.
- Leme, M. D., & Marin-Morales, M. A. (2009). Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation Research*, 682, 71–81.
- Liman, R., Akyıl, D., Eren, Y., & Konuk, M. (2010). Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and Allium test. *Chemosphere*, 80, 1056–1061.
- Luo, L. Z., Werner, K. M., Gollin, S. M., & Saunders, W. S. (2004). Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. *Mutation Research*, 554, 375–385.
- Lupi, S., Marconi, S., Paiaro, E., Fochesato, A., & Gregorio, P. (2009). Mutagenicity evaluation with Ames test of hydroalcoholic solution of terpenes. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 50, 170–174.
- Ma, T. H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E. V., Arreola, G. A., & Zhang, H. (1995). The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, 334, 185–195.
- Maron, D. M., & Ames, B. N. (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*, 113, 173–215.
- Michael, C., Ukaegbu, & Peter, G. C. O. (2009). The genotoxic effect of sewage effluent on Allium cepa. *Report and Opinion*, 1, 36–41.
- Mico, C., Recatala, L., Peris, M., & Sanchez, J. (2006). Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere*, 65, 863–872.
- Monarca, S., Feretti, D., Collivignarelli, C., Guzzella, L., Zerbini, I., Bertanza, G., & Pedrazzani, R. (2000). The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. *Water Research*, 34(17), 4261–4269.
- Monteirono, M. S., Rodriguez, E., Loureiro, J., Mann, R. M., Soares, A. M. V. M., & Santos, C. (2010). Flow cytometric assessment of Cd genotoxicity in three plants with different metal accumulation and detoxification capacities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1231–1237.
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 445, 29–60.
- Ono, Y., Somiya, I., Kawaguchi, T., & Mohri, S. (1996). Evaluation of toxic substances in effluents from a wastewater treatment plant. *Desalination*, 106, 255–261.
- Owens, J. E., & Niemeyer, E. D. (2006). Analysis of chemical contamination within a canal in a Mexican border colonia. *Environmental Pollution*, 140, 506–515.
- Özkara, A., Akyıl, D., Erdoğan, S. F., & Konuk, M. (2011). Evaluation of germination, root growth and cytological

- effects of wastewater of sugar factory (Afyonkarahisar) using *Hordeumvulgare* bioassays. *Environmental Monitoring and Assessment*, 183, 517–524.
- Radic, S., Stipanicev, D., Vujcic, V., Rajcic, M. M., Sirac, S., & Pevalek-Kozlina, B. (2010). The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment*, 408, 1228–1233.
- Rank, J., & Nielsen, M. H. (1998). Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase–telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research*, 418, 113–119.
- Reimann, O. D. (1989). Heavy metals in domestic refuse and their distribution in incinerator residues. *Waste Management & Research*, 7, 57–62.
- Saxena, P. N., Chauhan, L. K. S., & Gupta, S. K. (2005). Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. *Toxicology*, 216, 244–252.
- Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M., & Toman, M. J. (1996). The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Research*, 368, 171–179.
- Stahl, R. G., Jr. (1991). The genetic toxicology of organic compounds in natural water and wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 22, 94–125.
- Tabrez, S., & Ahmad, M. (2011). Oxidative stress-mediated genotoxicity of wastewaters collected from two different stations in northern India. *Mutation Research*, 726, 15–20.
- Tipirdamaz, R., Gömürgen, A. N., Olankaya, D., & Doğan, M. (2003). Determination of toxicity of pulp-MIII effluents by using *Allium* test. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 9(1), 93–97.
- Unyayar, S., Celik, A., Cekic, F. O., & Gozel, A. (2006). Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis*, 21, 77–81.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.
- Vedacovic, Z., Tomic, M., & Papes, D. (1993). Toxicity of waste drilling fluids in modified *Allium* test. *Water, Air, and Soil Pollution*, 69, 413–423.
- Vega, M. M., Fernandez, T. B., Tarazona, J. V., & Castano, A. (1996). Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain. *Environmental Pollution*, 93, 135–139.
- Ventura, L., Giovannini, A., Savio, M., Donà, M., Macovei, A., Buttafava, A., Carbonera, D., & Balestrazzi, A. (2013). Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere*, 92, 1–9.
- White, P. A., & Rasmussen, J. B. (1998). The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research*, 410, 223–236.
- Yıldız, M., HakkıCigerci, I., Konuk, M., Fatih Fidan, A., & 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.
- Zidane, F., Cheggari, K., Blais, J. F., Khilil, N., Drogui, P., & Bensaid, J. (2012). Effect of chlorination on trihalomethanes formation in feed water of Casablanca in Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science*, 3, 99–108.