



## Qualité microbiologique de Trois espèces de mollusques bivalves à intérêt commercial récoltées sur la côte méditerranéenne nord-est du Maroc (Microbiological quality of three bivalve mollusks species with commercial interest collected on the North-eastern coast of Morocco).

Belbachir C.<sup>1,2\*</sup>, Chafi A.<sup>4</sup>, Aouniti A.<sup>2</sup>, Khamri M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches d'Oujda (LRARO). Isly. B.P. 3136 - Oujda, Morocco

<sup>2</sup> LCAE-URAC-18, Faculte des Sciences, Université Mohammed Premier, Oujda, Morocco

<sup>3</sup> Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches d'Oujda (LRARO). Isly. B.P. 3136 - Oujda, Morocco

<sup>4</sup> Laboratoire d'Hydrobiologie et Ecologie Générale. Faculté des sciences, Université Mohammed 1er, Oujda, Morocco

Received 12 Sept 2013, Revised 20 Oct 2013, Accepted 20 Oct 2013.

\*Corresponding Author. E-mail: [chaouki\\_b@hotmail.com](mailto:chaouki_b@hotmail.com); Tel: (+212661222970)

### Abstract

The microbiological quality of three bivalves' mollusks species with commercial interest was given on the level of two zones located on the Mediterranean coast of the North-East of Morocco. A total of 77 samples of *Ruditapes decussatus*, 121 samples of *Chamelea gallina* and 60 samples of *Donax trunculus* were analyzed by the enumeration of *Escherichia coli* (*E. coli*), the search of *Salmonella* and *Vibrio cholerae*. The CF90 (*Escherichia coli* concentrations not exceeded in 90% of samples) recorded for different species was 690 *E. coli* / 100g for *Ruditapes decussatus* and *Chamelea gallina* and 7100 *E. coli* / 100g for *Donax trunculus*. No *Salmonella* or *Vibrio cholerae* were detected during the period studied. The presence of *E. coli* at important levels in mollusks bivalves indicates a fecal origin of pollution. Compared with 854/2004 and 2073/2005 regulations of European Union (EU) which set health standards governing the production and placing on the market of live bivalve mollusks, the results show that 74% of the samples (all species combined) have shown quality safe, 20% require relaying or treatment in a purification center, 5% require long-term relaying (at least two months) with or without purification, or after intensive purification and 1% of the samples are prohibited.

**Keywords:** bivalve molluscs - Microbiological Quality - Mediterranean - Morocco.

### Résumé

La qualité microbiologique de quatre espèces de mollusques bivalves à intérêt commercial a été déterminée au niveau de deux zones situées sur la côte méditerranéenne du nord-est du Maroc. Un total de 77 échantillons de palourdes (*Ruditapes decussatus*), 121 échantillons de praires (*Chamelea gallina*) et 60 échantillons d'haricots de mer (*Donax trunculus*) ont été analysés par le dénombrement des *Escherichia coli* (*E. coli*), la recherche de *Salmonella* et de *Vibrio cholerae*. La CF90 (concentration d'*Escherichia coli* non dépassée dans 90% des échantillons) relevée pour les différentes espèces était de 690 *E. coli* /100g pour la palourde et la praire et 7100 *E. coli* /100g Pour les haricots de mer. Aucune *Salmonella* ni *Vibrio cholerae* n'ont été détectés durant la période d'étude. La présence d'*E. coli* à des niveaux parfois important chez ces différentes espèces témoigne d'une pollution d'origine fécale. Par comparaison aux règlements 854/2004 et 2073/2005 de l'Union Européenne (UE) qui fixent les normes sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants, les résultats obtenus montrent que 74% des échantillons analysés (toute espèce confondue) se sont montrés de qualité salubre, 20% nécessitent un reparcage ou traitement dans un centre de purification, 5% nécessitent un reparcage de longue durée (deux mois au minimum) associé ou non à une purification, ou après une purification intensive et 1% des échantillons sont interdits.

**Mots clés :** Mollusques bivalves – Qualité microbiologique – Méditerranée – Maroc.

### 1. Introduction

Le ramassage de mollusques bivalves sur la Côte Méditerranéenne Nord-Est du Maroc constitue une activité forte populaire qui permet aux riverains de se procurer une ressource alimentaire et économique très appréciée tout en maintenant vivante une pratique traditionnelle liée à la région. Cependant, la consommation de coquillages contaminés constitue un risque de santé publique majeur [1-3]. Le mode de nutrition des bivalves par filtration de l'eau de mer, conduit inévitablement à leur contamination par des bactéries, des virus, des

toxines et de substances chimiques toxiques présents dans leur environnement [4]. Les coquillages joueraient donc un rôle prépondérant dans la transmission de diverses affections tel que, la fièvre typhoïde et paratyphoïde, le cholera et l'hépatite virale de type A. De même que des infections chroniques telles que la giardiase, peuvent également être causées par l'ingestion de mollusques contaminés par des micro-organismes pathogènes [5]. Cet article présente les résultats d'étude de la qualité microbiologique des mollusques bivalves ramassés dans deux zones situées sur la côte méditerranéenne du nord-est du Maroc. Ces deux zones sont riches et diversifiées en fruits de mer. Et le ramassage des mollusques bivalves constitue une activité forte populaire au niveau de la région.

## 2. Matériel et méthodes

Les échantillons de mollusques bivalves ont été prélevés au niveau de deux zones étudiées sur la côte méditerranéenne du nord-est du Maroc (figure 1).

Zone I (ZI) : il s'agit de la lagune de Nador ( $35^{\circ}12'50$  N- $2^{\circ}52'50$  W), la principale espèce ramassée est la palourde (*Ruditapes decussatus*). La lagune vue sa position constitue un réceptacle de l'ensemble des rejets issus des différentes agglomérations riveraines entre autres les rejets de la ville de Nador qui sont traitées avant d'être évacuées dans la lagune [6].

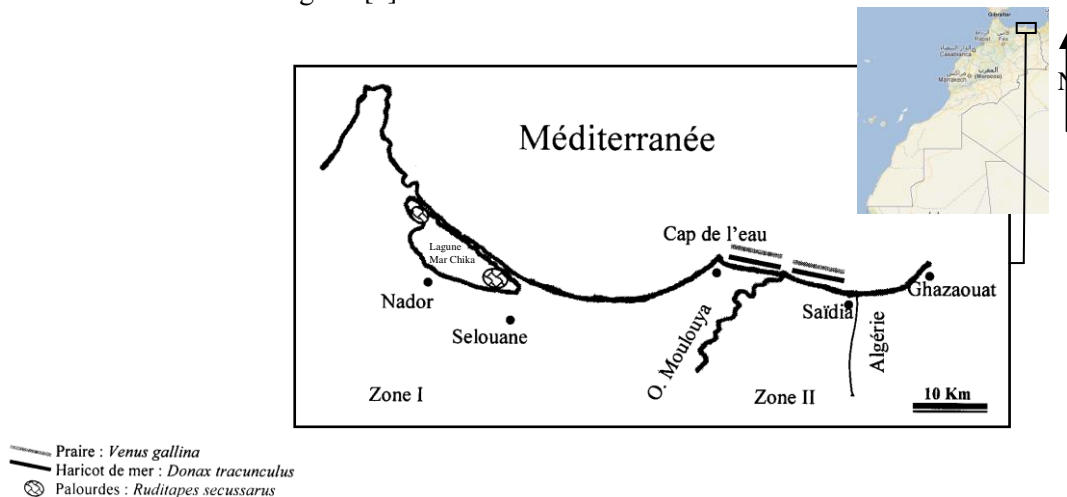


Figure 1 : Distribution spatiale des espèces de mollusques bivalves au niveau de la Zone I (Lagune de Mar Chika) et de la Zone II (Saïdia – Cap de l'eau)

La zone II (ZII) : la zone littorale située entre la ville de Cap de l'eau et la ville de Saïdia ( $35^{\circ}08'00$  N –  $2^{\circ}20'05$  W). Elle s'étend sur un plateau continental de 15 Km riche en coquillages, cette zone reçoit les eaux de l'Oued Moulouya et connaît une activité récréative importante pendant la période estivale. La praire *Chamelea gallina* et l'haricot de mer *Donax trunculus*, constituent les fruits de mer les plus fréquents dans la zone.

258 échantillons ont été prélevés avec une fréquence mensuelle et parfois bimensuelle et sont répartis entre 77 échantillons de palourde au niveau de la zone I (ZI). 121 échantillons de praires et 60 échantillons d'haricot de mer au niveau de la zone (ZII). Chaque prélèvement a été constitué d'une dizaine d'huître, 30 palourdes, 30 praires et 50 haricots de mer. Les prélèvements sont placés dans des sachets stériles et transportés dans une glacière le plus rapidement possible au laboratoire et analysés sans délai.

Les coquillages ont été soigneusement lavés de manière à éliminer les souillures externes. Après égouttage et un léger flambage, ils ont été ouverts à l'aide d'un couteau stérile conformément à la norme Internationale [7]. Après ouverture aseptique le contenu entier : chair plus liquide inter-valvaire, est soumis au broyage dans deux fois le volume d'une solution saline (dilution 1/3) par un broyeur type stomacher.

Le dénombrement des *Escherichia coli* s'est fait en milieu liquide (milieu au glutamate modifié) en ensemençant trois séries de cinq tubes avec 1 ml de la solution mère (1/3) et des dilutions décimales (1/30, 1/300) et confirmation sur gélose TBX. L'interprétation numérique est donnée par la méthode NPP « nombre le plus probable » d'*Escherichia coli* dans 100 g de coquillages et de liquide inter-valvaires [8] La limite inférieure de détection de la méthode NPP utilisée est de 1,78 (NPP=60).

La recherche de salmonelles s'est faite dans 25g de chair et de liquide inter-valvaire et nécessite quatre phases successives : un enrichissement en milieu non sélectif (eau peptonée tamponnée pendant 16 à 20 heures à 37°C, un enrichissement en milieu sélectif (bouillon Tetrathionate Muller Kaufman à la novobiocine à 37°C pendant 18 à 24 h et simultanément Rappaport vasilidis à 41,5°C pendant le même temps), isolement sur gélose au vert

brillant et rouge de phénol ainsi que le milieu XLD et incubation pendant 24 h à 37°C, puis confirmation des colonies suspectes sur galerie miniaturisé (BBL Crystal E/NF). Les résultats sont exprimés en termes de présence ou absence de salmonelle dans 25g d'échantillon [9].

La recherche de *Vibrio cholerea* s'est faite dans 10 g d'échantillon en trois phases : un enrichissement en eau peptonée salée et alcalin à 37°C pendant 10h suivi d'un isolement sur gélose TCBS pendant 18 à 24h à 37°C, puis confirmation des colonies suspectes sur galerie API 20 NE. Les résultats sont exprimés en termes de présence ou absence de *Vibrio cholerae* dans 10g d'échantillon.

### 3. Résultats et discussion

Le tableau I présente la répartition des fréquences cumulées relatives la CF90, la CF50 et l'intervalle de la contamination en *E. coli* des différentes espèces de mollusques bivalves au niveau des deux secteurs étudiés. La limite de détection est de 1,78 (NPP = 60). D'après ces résultats, on constate que les haricots de mer se sont montrés les plus contaminés avec une CF90 de 7100 *E. coli*/100g de chair et de liquide intervalvaire. Les praires et les palourdes se sont montrés moins contaminés par rapport aux haricots de mer avec une CF90 de 680 *E. coli*/100g de chair et de liquide intervalvaire.

De même en se référant à la fréquence de contamination des échantillons (tableau I) on constate que les palourdes se sont montrés les moins fréquemment contaminés avec 73% des échantillons qui ont une charge en *E. coli* inférieure à 60 *E. coli*/100g suivie des praires (66%) puis en fin les haricots de mer (26%) (Tableau I).

**Tableau I :** Charges en *E. coli* au niveau des quatre espèces de mollusques bivalves (Huîtres, Palourdes, Haricots de mer, Praires).

NPP/100g	Zone I		Zone II			
	Palourdes		Haricots de Mer		Praires	
	Unité	RCF	Unité	RCF	Unité	RCF
<60	56	73,0	15	25,8	80	65,8
60-570	11	86,5	26	67,5	26	87,2
600-1260	5	92,9	3	73,3	5	92,1
1290-1920	2	95,0	5	81,6		
2160-4500	1	96,4	1	84,1	2	93,7
4800-13800	1	97,8	4	90,8	5	97,4
15900-33000	1	99,2	5	99,1	2	98,6
36000-285000		100,0	1	100,0	1	100,0
Total échantillons:	77		60		121	
CF50 :	<60		231		<60	
CF90 :	690		7100		690	
Intervalle :	<60 ~ >48000		<60 ~ >48000		<60 ~ >48000	

**CF50 :** Concentration en *E. coli* (germe/100g de chair et de liquide intervalvaire) non dépassée dans 50% des échantillons analysés.

**CF90 :** Concentration en *E. coli* (germe/100g de chair et de liquide intervalvaire) non dépassée dans 90% des échantillons analysés.

**RCF :** Fréquence cumulée relative

Aucune salmonelle ni *Vibrio cholerae* n'ont été détectés durant la période d'étude. Dans ce sens et en accord avec nos résultats et bien qu'il aient enregistré des niveaux de contamination fécales non négligeables, Murilo et al., [10] n'ont pu détecter de *Vibrio cholerae* ni de *Salmonella* sur les 90 échantillons analysés d'huître sur les côtes brésiliennes. De même, Eyles and Davey [11] n'ont pas détecté de *Salmonella* dans les échantillons d'huîtres. D'autre part, *Vibrio sp.* a été isolé à partir de 48,4% des échantillons analysés par Ripabelli et al., [12], sur des mollusques bivalves récoltés sur la mer Adriatique. Les espèces les plus fréquemment isolées par ces auteurs étant *alginolyticus* V. (32,2%) et de *V. vulnificus* (17,7%), tandis que la contamination par *V. parahaemolyticus* (1,6%) et de *V. cholerae* (1,6%) était faible.

L'absence de ces deux germes dans les différentes espèces de coquillages au niveau des deux zones étudiées ne signifie pas automatiquement une absence de risques d'intoxication que peut engendrer la consommation crue de ces espèces. En effet un certain nombre d'études ont montré que les entérobactéries, en particulier les salmonelles, subissent une dérive des caractères phénotypiques dans l'eau de mer et aboutissent à des formes difficiles à retrouver par les techniques classiques de recherches et d'identification [13].

La présence d'*E. coli* à des niveaux parfois important dans nos échantillons témoigne d'une pollution d'origine fécale, toutefois le degré de cette contamination varie d'une zone à l'autre et au sein de la même zone d'une espèce à l'autre.

Au niveau de la zone II, les niveaux de contamination élevés enregistrés pour les haricots de mer peuvent être expliqués par la proximité des parcs de l'embouchure de oued Moulouya qui draine la totalité des contaminants issues des activités agricoles pratiquées le long du bassin versant (aviculture, élevage bovin et ovin...) ainsi que des rejets urbains des villes intérieures (Berkane, Zaïo). Ces apports sont plus importants pendant les périodes de crue. Dans ce sens [14] Catarina Almeida, Florbela Soares, 2012 ont montré que les pluies d'automne et d'hiver entraînent une augmentation du transport de contaminants dans les eaux de ruissellement, qui s'écoule dans la lagune de Ria Formosa (côte sud du Portugal) et augmente la contamination fécale. Par ailleurs le mode de vie de ces espèces à de faibles profondeurs et enfouie dans les sédiments qui constituent un véritable réservoir des bactéries, expliquerait leur forte charge en *E. coli*.

La praire (*Chamelea gallina*) espèce de l'étage infra-littoral et qui présente également un mode de vie enfouie dans les sédiments a présenté également des charges bactériennes en coliformes fécaux importantes. Cependant, ces charges restent inférieures à celles des haricots de mer (*Donax trancunculus*). Ceci pourrait être attribué à l'éloignement des parcs du rivage (500 à 1000 m du rivage) et donc à une diminution de la contamination de l'eau de mer suite à la forte dilution de la masse bactérienne au niveau de l'embouchure (phénomène de dilution dispersion, sédimentation). Dans ce sens, Aubert et al. [15] ont montré que les bactéries rejetées en mer au niveau des embouchures se fixent en majeure partie à des particules de faibles dimensions et sont entraînées par des courants au niveau des couches superficielles de la mer. Ces bactéries sous l'action de mécanismes physiques et biologiques (rayonnement solaire, température, dilution, salinité, prédateurs...), une grande partie des bactéries est éliminée rapidement en quelques heures. De son côté Attarassi, [16] a montré que en plus des phénomènes physiques, l'inactivation biologique exercée par l'eau de mer sur les bactéries (stress salin, faibles concentration en matière organique et en sels nutritifs...) contribue très remarquablement à la réduction des charges bactériennes dans l'eau de mer.

Au niveau de la zone I, des charges élevées ont été enregistrées pour la Palourde. En effet, et à l'instar de la praire et des haricots de mer, le mode de vie de la palourde (*Ruditapes secussarus*) enfouie dans les sédiments, la rend plus susceptible à la contamination. Cette contamination peut être expliquée par l'emplacement des parcs d'élevage de la palourde qui sont situés à de faibles profondeurs et non lointaines des sources de pollution. Les activités industrielles qui ne cessent de se développer sur les abords de la lagune ainsi que l'abondance des débris ménagers occasionnés par les populations riveraines paraissent contribuer majoritairement à la contamination des parcs des palourdes particulièrement pendant les périodes pluvieuses. Dans ce sens, Mabrouk [6] a rapporté des observations similaires dans des parcs non loin des nôtres. Au niveau de la lagune de Oualidia située sur le littoral atlantique, Bouchriti et al. [17] a rapporté que les eaux de pluie en lessivant les terres agricoles avoisinantes de la lagune, véhiculent l'ensemble des germes telluriques et fécaux vers la lagune ce qui se traduit par une contamination plus importante des huîtres pendant ces périodes.

Afin de s'assurer de la salubrité des différentes espèces de mollusques bivalves étudiées, et puisque les quatre espèces sont destinées particulièrement au marché européen, nous avons confronté nos résultats avec les règlements [18] (CE) 854/2004 et [19] (CE) 20073/2005 qui fixent les normes sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants (tableau II).

**Tableau II** : critères de salubrité fixés par les règlements de l'UE :

<i>E. coli</i> /100 g	Zone	Résultats	Règlements UE
<230	A	Salubre consommation humaine sans danger	Règlement 2073/2005 Règlement 854/2004
230<x<4600	B	Traitement Purification ou reparcage jusqu'à < 230 <i>E. coli</i> /100 g	Règlement 854/2004
4600<x<46000	C	Reparcage ou traitement purification longue durée jusqu'à < 230 <i>E. coli</i> /100 g	Règlement 854/2004

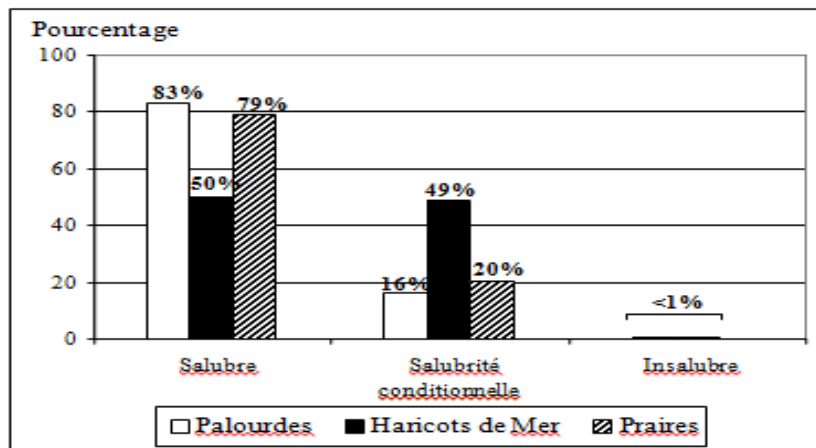
Sur la base de ces règlements on constate que 83% des échantillons de palourdes se sont montrés salubre (NPP inférieur à 230 *E. coli*/100g) et leur consommation sur le plan microbiologique ne présente aucun danger pour la santé humaine. Elles sont suivies des praires avec 79% (tableau III). Les haricots de mer par contre se sont montrés dans la majorité des cas (49,1%) à salubrité conditionnelle (230<NPP< 4600 :35,8% et 4600<NPP<46000 :13,3%) (Figure 2).

**Tableau III** : Pourcentage de contamination des quatre espèces de mollusques bivalves en fonction des niveaux fixés par les règlements de l'UE :

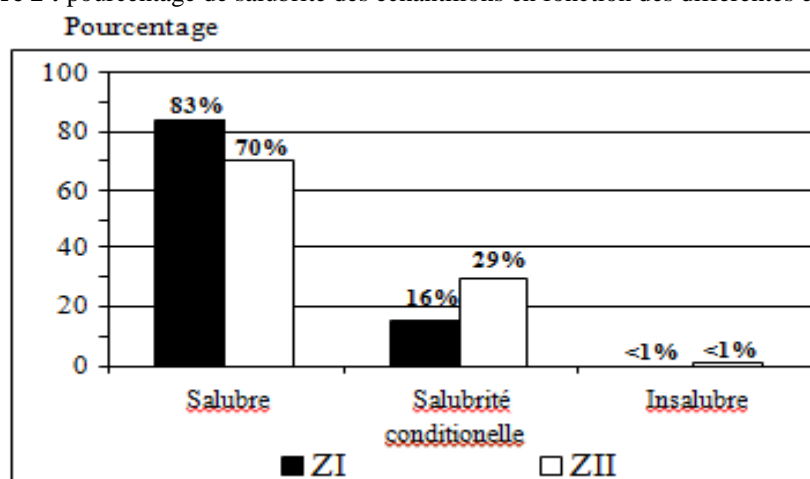
NPP/100g	Zone I		Zone II			
	Palourdes		Haricots de Mer		Praires	
	Unité	%	Unité	%	Unité	%
<230	64	83	30	50	96	79
230<x<4600	10	13,5	21	35,8	20	16,5
4600<x<46000	2	2,8	8	13,3	4	3,7
>46000	1	0,7	1	0,8	1	0,8

La comparaison des deux zones étudiées a montré que les échantillons (toute espèces confondue) issus de la zone I se sont montrés plus salubre (83%) que les échantillons de la zone II (70%) (Figure 3).

D'une manière générale, 74% des échantillons de mollusques bivalves analysés (toute espèce confondue) se sont montrés de qualité salubre, 25% sont à salubrité conditionnelle dont 20% nécessitent un reparcage ou traitement dans un centre de purification et 5% nécessitent un reparcage de longue durée (deux mois au minimum) associé ou non à une purification, ou après une purification intensive. En fin moins de 1% seulement (toute espèce confondue) des échantillons se sont montrés insalubres et sont interdits à toute consommation humaine (Figure 4).



**Figure 2** : pourcentage de salubrité des échantillons en fonction des différentes espèces



**Figure 3** : pourcentage de salubrité des échantillons en fonction des zones de prélèvement

- Salubre : NPP<230 E. coli/100g CLI
- Salubrité conditionnelle :
  - 230 CF/100g<NPP<4600 E. coli/100g CLI [Reparcage ou traitement]
  - 4600 CF/100g<NPP<46000 E. coli/100g CLI [Reparcage ou traitement longue durée]
- Insalubre : NPP> 46000 E. coli/100g CLI

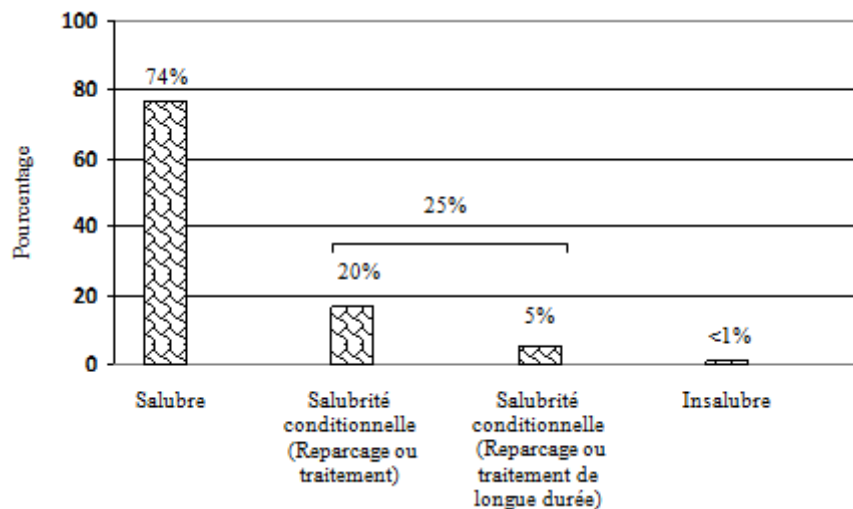


Figure 4 : Qualité microbiologique des mollusques bivalves toute espèce confondue

### Références

1. Plusquellec A., Beucher M., Legal Y., *Ifremer*, 3 (1986) 541
2. Prieur D., Mevel G., Nicolas J.L., Plusquellec A. et Vigneulle M., *Océanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 28 (1990) 277-352.
3. Valentin A., Tremblay T., Gagnon F. et Cartier J.F., *Régie régionale de la santé et des services sociaux de la Côte-Nord, Direction de la santé publique*, (2000) 90 p. + annexes.
4. Oliveira J., Cunha A., Castilho F., Romalde J.L., Pereira M.J., *A mini-review. Food Control*, 22 (2011) 805-816.
5. Livingstone, D.R. & S. Gallacher, *In: Encyclopaedia of Food Sciences and Nutrition, 2nd Edit. (Edit.-in-Chief B. Caballero)*, (2003) 5228-5245. Academic Press.
6. Mabrouk A., *in FAO (Food and Agriculture Organisation) MEDRAP II*, 95/35 (1995) 27-30.
7. ISO (International Standard Organization) 6887-3, *ISO copyright office* (2003) 16p.
8. ISO 16649-3, *ISO copyright office* (2005) 13p
9. ISO 6579/A1, *ISO copyright office* (2007) 13p
10. Murilo A.P., Márcia M.N., Leonardo N., Denys S., Cleide R., Vieira B., *Brazilian Journal of Microbiology*, 37 (2006) 159-163.
11. Eyles M.J., Davey G.R., *Int. J. Food Microbiol.*, 6 (1988) 207-218.
12. Ripabelli G.; Sammarco M.L., Grasso G.M., Fanelli I., Caprioli A., Luzzi I., *Int. J. Food Microbiol.*, 49 (1999) 43-48.
13. Bakhrouf A., Zaafrane S., Mzoughi R., Maatoug K., Gauthier M.J., *Mar. Life* 4(2) (1994) 3-8.
14. Catarina A., Florbela S., *Marine Pollution Bulletin*, 64 (2012) 252-262.
15. Aubert M., *Rev. Inst. D'océanogr. Méd.*, (1990) 6-9.
16. Attarassi B.; Saggi M.; Belabed A.; Flatau G., *Cytobios*, (1996).
17. Bouchriti N., El Marrakchi A., Fahim A., *Hydroécol. Appl.*, 4,12 (1992) 189-202.
18. Règlement (CE) 854, *Journal officiel de l'Union européenne*, L 226 (2004) 83-127
19. Règlement (CE) 20073, *Journal officiel de l'Union européenne*, L 338 (2005) 1-26

(2014) ; <http://www.jmaterenvironsci.com>