



« Bacillus dans les surimis : état des lieux et incidence des conditions de conservation sur la croissance. »

Chef de file : Confédération des Industries de traitement des produits des Pêches Maritimes
44 rue d'Alésia, 75 682 paris cedex 14
Contact : Philippe DROIN
Tel : 01.53.91.44.64, **Fax :** 01.53.91.44.70 **e-mail :** pdroin@adepale.org

Partenaires : ADRIA NORMANDIE
ADRIA Développement

➤ **Situation du sujet et objectifs du projet**

Le marché des produits de la mer élaborés pasteurisés (surimi) est en pleine expansion et estimé à 47 100 tonnes en 2004. Les bâtonnets de surimi sont pasteurisés dans l'emballage (90 à 100°C à cœur) avant d'être distribués en linéaire réfrigéré avec des DLC relativement importantes (4 à 12 semaines en froid positif). Le traitement thermique appliqué permet de détruire la totalité de la flore végétative mais atteint peu ou pas (selon le barème pratiqué) la flore sporulée (*Bacillus*, *Clostridium*...).

Aussi, compte tenu des DLC longues, la flore sporulée résiduelle psychrotrophe est susceptible de germer et de se multiplier de façon importante. Cela se traduit par un dénombrement élevé en flore aérobie. Même si depuis le 1 janvier 2006, un taux élevé en flore totale n'est plus une non-conformité (disparition de ce critère dans les nouveaux critères microbiologiques en vigueur depuis le 01/01/2006), cette flore est importante à prendre en compte car elle peut être à l'origine d'une altération du produit et éventuellement d'un risque sanitaire.

Sur le plan des clostridies, des investigations ont été menées sur *Clostridium botulinum* de type E et la bibliographie est riche. En ce qui concerne le genre *Bacillus*, des questions restent posées sur la présence potentielle et la croissance de germes sporulés appartenant à ce genre et pouvant présenter d'une part, un risque sanitaire (*Bacillus cereus*) et/ou d'autre part, un risque au niveau de la qualité du produit fini (autres *Bacillus*).

L'objet du présent projet est de qualifier la nature des spores résiduelles (espèces de *Bacillus* rencontrées), leurs caractéristiques de destruction (thermorésistance : incidence de la pasteurisation), de développement durant la conservation (température / atmosphère protectrice).

➤ **Résultats obtenus**

La première partie de ce projet concernait la prévalence et la biodiversité des *Bacillus* dans les surimis.

L'analyse de 100 échantillons de surimi (bâtonnets, tapés et civelles) provenant de 5 usines montre qu'en début de conservation 98% des échantillons présentent une flore aérobie mésophile <100 UFC/g,

A durée de vie, après rupture de chaîne du froid (1/3 à 4°C et 2/3 à 8°C), 51 % des échantillons présentent une flore aérobie mésophile <100 UFC/g, 12 % étant compris entre 100 et 1000 UFC/g et 37 % présentant des taux supérieurs à 1000 UFC/g.

Une collection de 460 isolats de *Bacillus* présumés a été analysée par une approche de biologie moléculaire (RAPD-M13). Une importante biodiversité a été observée avec au moins 98 profils types différents dont 81 groupes de profils de taille variable contenant de 2 à 51 isolats. Le séquençage de l'ADNr 16 S de 47 souches représentatives des différents profils observés a été effectué. Sur l'ensemble des isolats, malgré une grande biodiversité de profils, la présence de 3 clusters principaux est observée (*B. simplex*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*). Pour les 34 échantillons présentant une FAM >10⁴ UFC/g à DLC, les espèces principales sont *Bacillus simplex*, *B. subtilis* et *Sporosarcina aquimarina*.

La seconde partie du projet a consisté à caractériser certains isolats d'intérêt. Ainsi, les aptitudes protéolytiques et amylolytiques ont été étudiées pour 40 souches représentatives des différentes espèces recensées au cours de l'étude de la biodiversité. 92,5% des souches ont une activité protéolytique, 80% des souches présentent une activité amylolytique et 75% sont à la fois protéolytique et amylolytique. Ces propriétés peuvent être à l'origine d'une altération des surimis; il est toutefois à noter qu'aucune altération importante à durée de vie n'a été observée au cours de l'analyse des produits à l'étape 1 du programme.

La croissance en présence de CO₂ et la thermorésistance de 4 souches représentatives, appartenant aux espèces *B. simplex*, *B. cereus*, *B. subtilis* et *Sp. aquimarina*, ont également été étudiées. Deux souches (*B. simplex* et *B. subtilis*) s'avèrent très thermorésistantes avec des temps de réductions décimales à 96°C de l'ordre de 25 minutes, alors que les souches de *B. cereus* et *Sp. aquimarina* sont beaucoup plus sensibles à la chaleur (d_{96°C} de l'ordre de 5 minutes).

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en CO₂ montre que la sensibilité des 4 souches au CO₂ est très variable. Il n'y a pas d'inhibition totale de la croissance en présence de CO₂ mais l'augmentation de la concentration en CO₂ entraîne un ralentissement de la croissance. Pour *B. simplex* et *B. subtilis*, une concentration entre 40 et 50% de CO₂ permet de réduire leur taux de croissance d'un facteur 2. Pour *B. cereus*; le taux de croissance n'est diminué de moitié qu'à partir de 70% de CO₂ et jamais pour *Sp. aquimarina*. La souche *Sp. aquimarina* s'avère la moins sensible et la souche de *B. subtilis*, la plus sensible au CO₂.

La comparaison des taux de croissance en aérobiose et en anaérobiose montre que *Bacillus cereus* et *Sp. aquimarina* sont sensibles à l'absence d'oxygène. A l'inverse *B. simplex* et *B. subtilis* ne sont absolument pas sensibles à l'anaérobiose, par contre leur développement est réduit quand la concentration en CO₂ augmente.

Enfin, la détermination de valeurs cardinales de température (Tmin, Topt, Tmax) en condition d'anaérobiose en milieu liquide permet de simuler le comportement des 4 souches en condition de sous vide à différentes températures.

La troisième partie du travail a consisté à réaliser des tests de croissance (Challenge-tests) dans la matrice surimi. Ainsi, deux souches, *B. simplex*, très thermorésistant, et *B. cereus*, pour son intérêt sanitaire, ont été artificiellement inoculés dans des bâtonnets de surimi. Après conditionnement sous air, sous vide ou sous gaz, deux barèmes de pasteurisation (87°C – 60 min et 90°C – 90 min) ont été appliqués ; puis, les bâtonnets ont été conservés à +10 et + 25°C.

Les résultats obtenus ont permis de valider, pour les traitements thermiques, les taux de réduction microbienne prédits pour les 2 souches en tenant compte de leurs paramètres de thermorésistance.

En cours de conservation, les challenge-tests montrent que la croissance de *B. cereus* est plus importante sous air que sous vide. Grâce aux données obtenues au cours du projet, valeurs cardinales de *B. cereus* en anaérobiose et courbes de croissance dans l'aliment, il est possible par microbiologie prévisionnelle de simuler la croissance dans d'autres conditions de température.

En conclusion, le programme réalisé a permis de mettre en évidence la biodiversité de la flore sporulée aérobie des surimis. Les espèces prédominantes, *B. simplex* et *B. subtilis* se sont avérées très thermorésistantes. L'étude des CMI pour le CO₂ semble indiquer que l'utilisation de conditionnement sous vide ou en atmosphère protectrice constitue un levier potentiel pour la réduction de la croissance de ces flores. Enfin, les données obtenues au cours de la caractérisation des isolats d'intérêt et des challenge-tests permettront de simuler, par microbiologie prévisionnelle, l'impact de différents scénarios de production.

➤ Valorisation

Ce travail innovant sur la biodiversité et sur le comportement (thermorésistance et croissance) des *Bacillus* dans le surimi fera l'objet de publications scientifiques ou de présentations à des congrès professionnels ou scientifiques.

Les données de thermorésistance, de CMI pour le CO₂ ainsi que les valeurs cardinales déterminées en anaérobiose pourront alimenter le système Sym' Previus. Les professionnels pourront grâce au logiciel simuler l'impact des barèmes thermiques, du conditionnement et de la conservation sur le devenir des spores de *Bacillus* dans le surimi pour les 4 espèces étudiées.

L'espèce *Bacillus simplex*, qui semble être dominante dans le surimi, n'est pas décrite dans la littérature à partir d'autres aliments. Un projet de recherche visant à déterminer l'origine de cette espèce (matières premières, ingrédients) est envisageable.