

TP n°3

Extraction et purification d'antibiotiques produits par *Bacillus*

1. Introduction

Les antibiotiques jouent un rôle crucial dans la lutte contre les infections bactériennes, et leur découverte a révolutionné la médecine moderne. Parmi les micro-organismes producteurs d'antibiotiques, les bactéries du genre *Bacillus* se distinguent par leur capacité à synthétiser une vaste gamme de métabolites secondaires ayant des propriétés antimicrobiennes.

2. But du travail

Ce travail pratique vise à explorer les méthodes d'extraction et de purification des antibiotiques issus de cultures de *Bacillus*, en mettant l'accent sur les techniques de chromatographie et d'analyse spectroscopique.

3. Matériel et réactifs

- *Bacillus* (souche productrice d'antibiotiques).
- Milieu de culture liquide (bouillon nutritif).
- Équipement de laboratoire standard (flacons autoclaves, agitateurs, centrifugeuse, bain-marié...etc).
- Solvants pour extraction (méthanol, dichlorométhane).
- Colonne de chromatographie.
- Silice gel (pour chromatographie sur colonne).
- Spectrophotomètre UV-visible.

4. Procédure

1. Préparation du milieu de culture :

- Préparer un milieu de culture liquide (pH neutre, environ 7). Un bouillon nutritif standard peut être utilisé.
- Inoculer le milieu avec la souche de *Bacillus* et incubé à 30-37 °C pendant 7 jours avec agitation.

2. Collecte du supernatant :

- À la fin de la période d'incubation, centrifuger le milieu de culture à 4000 rpm pendant 20 minutes pour récupérer les cellules.
- Récupérer le supernatant, qui contient les antibiotiques.

3. Extraction des antibiotiques :

- Ajouter un volume égal de solvant (méthanol) au supernatant pour extraire les antibiotiques.
- Agiter vigoureusement pendant 30 minutes pour favoriser l'extraction dans une ampoule à décanter.
- Laisser reposer pour permettre la séparation des phases, puis centrifuger à nouveau pour récupérer la phase supérieure contenant les antibiotiques. Répéter l'extraction 2 fois pour maximiser le rendement.
- 4. Concentration de l'extrait :**
 - Utiliser un bain-marie à basse température (par exemple, 30-40°C) pour aider à évaporer le méthanol. Assurez-vous de maintenir une bonne ventilation.
- 5. Purification par chromatographie sur colonne:**
 - Préparer une colonne chromatographique avec de la silice gel.
 - Dissoudre l'extrait concentré dans un petit volume de solvant approprié (dichlorométhane) et appliquer sur la colonne.
 - Éluer avec une série de solvants de polarité croissante (un mélange de dichlorométhane et de méthanol) pour séparer les composés.
 - Collecter les fractions et surveiller la séparation par chromatographie sur couche mince.
- 6. Analyse des fractions :**
 - Analyser les fractions par spectroscopie UV-Visible. Les antibiotiques peuvent avoir des longueurs d'onde d'absorption caractéristiques, généralement autour de 200-300 nm.
 - Identifier les fractions contenant des antibiotiques en utilisant les résultats de chromatographie sur couche mince et de spectroscopie UV-Visible.

Précautions

- L'extraction et la purification d'antibiotiques produits par des bactéries comme Bacillus nécessitent une approche méthodique en laboratoire. Assurez-vous de surveiller attentivement le processus pour éviter la dégradation des antibiotiques.
- Respecter les normes de sécurité et de travailler dans un environnement de laboratoire approprié.

5. Compte rendu du travail

- Quelle est l'importance de l'étude des antibiotiques produits par des micro-organismes comme Bacillus ?
- Quelles techniques de séparation supplémentaires auriez-vous pu envisager pour améliorer la purification ?
- Comment la purification des antibiotiques pourrait-elle être adaptée pour une production à plus grande échelle ?

- Quelles étaient les longueurs d'onde d'absorption observées lors de l'analyse UV-visible ? Que signifient ces résultats ? Que pourraient-elles indiquer ?
- Comment vos résultats se comparent-ils à ceux décrits dans la littérature ?
- D'après la bibliographie, quelles informations avez-vous trouvées concernant les types d'antibiotiques que *Bacillus* pourrait produire ?