



ROME

Réseau d'observatoires
de microbiologie
environnementale intégrée

Protocoles de prélèvement et filtrations des
échantillons d'eaux et d'échantillonnage des huîtres
(version 4.0 du 2025-01-28)

Protocole Terrain (p3 à 6)

- Matériel à préparer – p3
- Protocole de prélèvement Eau – p4
- Protocole de prélèvement Coquillages – p5
- Arrivée au laboratoire – p6

Protocole Labo (p7 à 17)

- Vue globale des opérations du prélèvement d'eau ROME -
référencement des échantillons et filtres – p7
- Matériel nécessaire pour une session de filtration – p8
- Etiquetage des tubes – p9
- Etapes préliminaires à la filtration – p10
- Filtration 3 μ et 0,2 μ - p11
- Filtration 20 μ m – p12 & 14
- Découpe et stockage des filtres – p13 & 14
- Nettoyage du système – p15
- Blanc de filtration B1 et B2 – p16
- Nettoyage / Décontamination – p17 & 18

Matériel à préparer

Tous les 15 jours

- Bidons de 5L opaques :
 - 2 EL (Eau Large)
 - 2 EAA (Eau Apports Anthropiques)
 - Si possible: 2 bidons de secours 1 EL et 1 EAA
- Entonnoir identifié ROME dans un emballage propre
- Gants jetables neufs
- Thermo-salinomètre ou sonde Hydro
- Bouteille Hydrobios ou NISKIN 5 litres
- 1 étiquette ROME
- Glacières et blocs de froid

1 fois par mois (voir planning)

- 1 sachet plastique (15 huitres)
- 1 glacière



Protocole de prélèvement Eau des 2 sites « Eau »

Eau du Large (EL) et Eau Apports Anthropiques (EAA)

Bidon EL : ex. Bouzigues (a)

Bidon EAA : ex. Exutoire de la Vène

Pour chaque site:

- Mesure de la température et salinité en surface (-1m)
- Noter les mesures + heure sur étiquette ROME
- Mettre des gants jetables neufs
- Rincer 3 fois les 3 bidons de 5 L à l'eau de mer de surface
- Remplir les bidons avec la bouteille Hydro + entonnoir id ROME ou directement à la main
- Conserver les bidons au frais et à l'ombre



Ex. Positions des stations ROME eaux sur étang de Thau

Protocole de prélèvement du site « Coquillages »

- Prélever 15 huîtres sur le site de stabulation des coquillages :
 - Les rincer et détroquer avant de les mettre dans le sac
 - **⚠ Essayer de les mettre le plus à plat possible dans les sachets ⚠**
 - Conserver l'échantillon au frais
- Noter si présence de coquillages morts dans poche
 - Au retour: gestion du stock + fichier traçabilité du lot dédié ROME

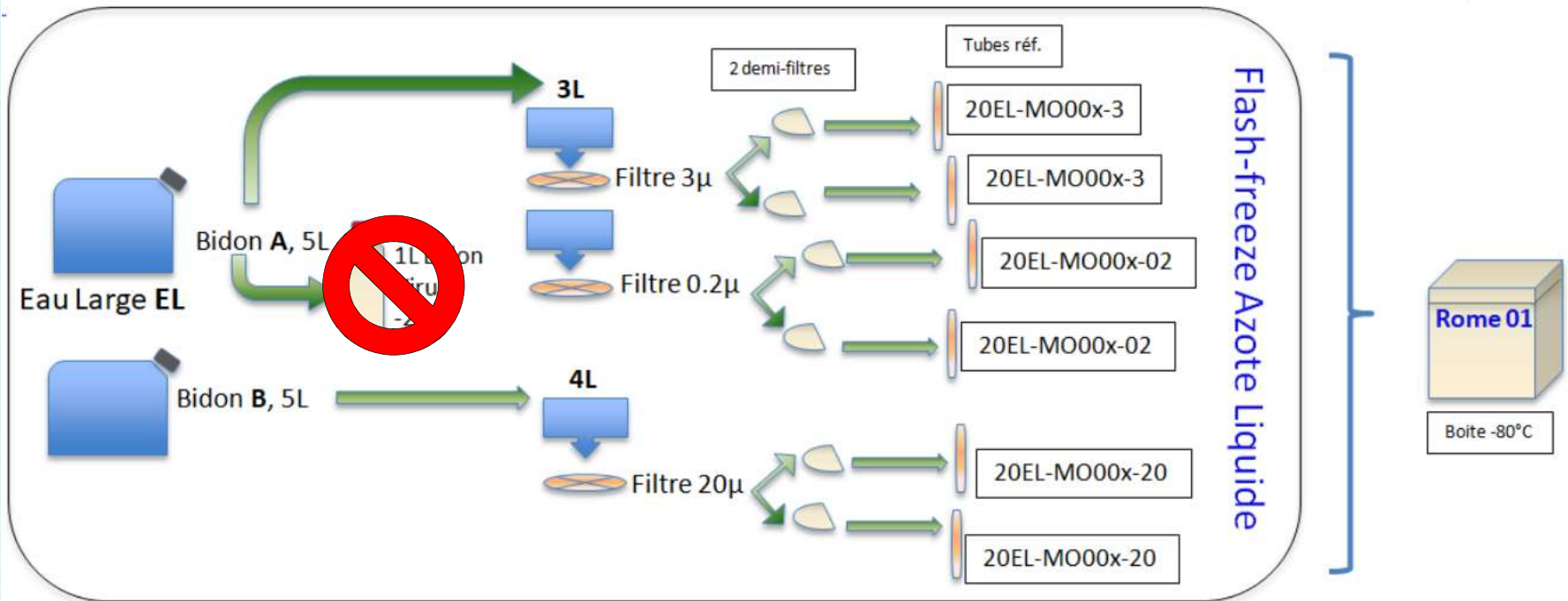


Ex: site Bouzigues « a » : cordes identifiées par marque jaune

Retour du terrain et arrivée au laboratoire

- Déposer dans l'armoire réfrigérée ou chambre froide les bidons de prélèvement et les coquillages (bac dédié)
- Déposer les étiquettes de prélèvement dans l'espace filtration ROME du laboratoire
- Prévenir les personnes chargées des opérations de filtrations et envoi des coquillages pour que l'eau soit filtrée dans le plus court délai (max 24h) et que les coquillages soient expédiés

Vue globale des opérations du prélèvement d'eau ROME et référencement des échantillons



- Millipore 0.2µM GTTP14250- 50 filtres polycarbonate, hydrophile, 142 mm
- Millipore 3µM TSTP14250- 50 filtres polycarbonate, hydrophile, 142 mm
- GVS 20µM 1215078- 100 filtres polycarbonate, 47 mm

Matériel nécessaire pour une session Filtration

- Système de filtration complet avec extrémités des tuyaux 'aspiration des bidons A et B coupées en biseau (évite le bouchage intempestif)
- 12L d'eau MilliQ stérile
- Pincés
- 4 planches (2 par point d'échantillonnage)
- Papier Alu neuf
- 6 Scalpels (stériles ou décontaminés)
- 2 bouteilles de 1L en plastique étiquetées
- 1 container avec azote liquide
- 1 Labtob cooler -80°C pour le transport des tubes
- Gants jetables
- Bidons terrain
- 2 éprouvettes ou béchers propres gradués
- 1 bac plastique dans le frigo pour réception huîtres
- Tubes à filtre étiquetés + date du jour (diapositive suivante)
- Pompe à vide manuelle
- Semaines coquillages: bon de transport / carton envoi

Décontaminés ou DNA free

Cf. diapo 17 pour la
préparation de l'eau MilliQ
stérile et du petit matériel

Etapes préliminaires à la filtration : étiquetage

Exemple : 21 EL - ET 007-3 b

- 21= Année
- EL =Eau du large (Bouzigues « a ») ou EAA =Eau Apport Anthropique (Crique de l'Angle – Exutoire La Vène) OU CG (Huîtres)
- -
- ET = site Etang de Thau
- N° de prélèvement national (ex 007 pour EL et 008 pou EAA 1ere semaine échantillonnage à Thau, puis 019 et 020 pour 2sd échantillonnage...)
- -
- Porosité du filtre: 02 (0,2 μ m), 3 (3 μ m), 20 (20 μ m)
- Puis annoter a, b, c... si **plusieurs filtres**



Etapes préliminaires à la filtration

Décontamination :

- Paillasse (sous trépied et celle de derrière) au spray 'RNase away'
- Préparer le « plan de travail » avec une feuille d'aluminium neuve si besoin

Etiqueter 12 tubes (diapositive suivante)

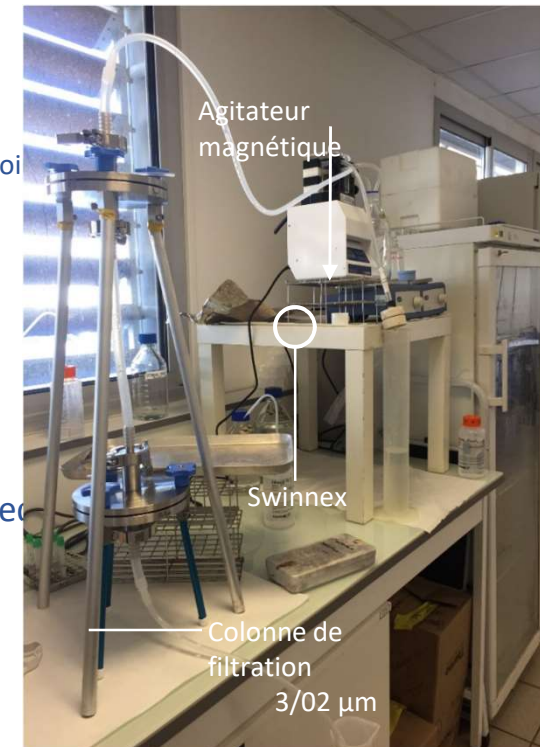
Selon les sites, disposer sur la paillasse:

- Azote Liquide &/ou Labtob cooler -80°C
- Petit matériel (cf. diapo précédente)

Rinçage des systèmes

- Repositionner les joints souples, grilles, portes filtres sur système trépied
- Fermer la colonne de filtration et le Swinnex
- Insérer les tubes dans la bouteille d'eau MilliQ stérile de 2 litres
- Essuyer le système pour noter s'il y a des fuites
- Faire circuler l'eau en purgeant bien le système (pincer extrémité tuyau)
- Filtrer jusqu'à vider la bouteille d'eau MilliQ

Homogénéiser les bidons A et B par retournements (au moins 5x)



Installation filtrations 3µm et 0,2µm -> système trépied

~15-30 minutes

- Placer le tuyau dans le bidon A
- A l'aide de pinces stériles, placer les filtres sur le système trépied:
 - 3 µm dans le système de filtration du **haut**
 - 0,2 µm dans le système de filtration du **bas**
- Fermer les systèmes
 - Serrer les molettes bleues sur le couvercle
 - Laisser la valve de sortie d'air ouverte (cf. photo 1)
 - Allumer la pompe
 - Laisser la **valve du haut** ouverte jusqu'à ce que de l'eau sorte par le tuyau de purge
 - La fermer (cf. photo 2)
 - Idem pour la **valve du bas**

Quand cela est possible, démarrer les filtrations avec EL, puis EAA



1. Valve ouverte



2. Valve fermée



Utiliser cette clé pour fermer le système

Installation filtration 20 μm -> Swinnex

~30 minutes

- Placer le tuyau d'aspiration dans le bidon B
- A l'aide d'une pince stérile positionner un filtre 20 μm (47mm \varnothing) dans le Swinnex
- A la sortie du Swinnex placer une éprouvette graduée

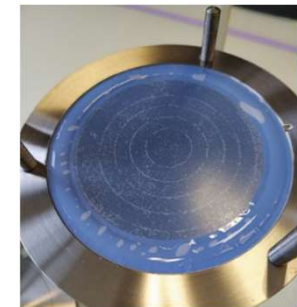
⚠ Démarrer la pompe péristaltique à la vitesse de 44 RPM quand tous les systèmes 3 & 0,2 μm sont prêts ⚠

- **Noter l'heure de démarrage de la pompe sur le cahier de paillasse**



Filtrations

- Après démarrage de la pompe :
 - Laisser filtrer **3L** ou jusqu'à colmatage à partir du bidon A (système 3-0,2 µm)
 - Après avoir retiré le tuyau d'aspiration du bidon A, laisser la pompe tourner ~10-15 minutes pour vider le système et assécher les filtres
 - Pour finaliser l'assèchement, positionner la pompe à vide manuelle sur le tuyau d'évacuation de la colonne 3-0,2µm et aspirer
 - Filtrer **4L** ou jusqu'à colmatage à partir du bidon B (système 20µm)
 - Laisser la pompe tourner ~ 5 minutes pour vider le système et assécher le filtre
 - Mesurer le volume filtré total pour chaque filtre et noter l'heure de fin de filtration (avant assèchement du dispositif ~ 5 minutes)
- Après assèchement du système :
 - Ouvrir les valves de prise d'air afin de faciliter l'ouverture du système
 - Ouvrir le système et récupérer dans l'ordre avec des pinces stériles les filtres 0,2µm puis 3µm, puis 20µm
 - Noter le volume résiduel filtré total
 - Découper les filtres : diapo suivante

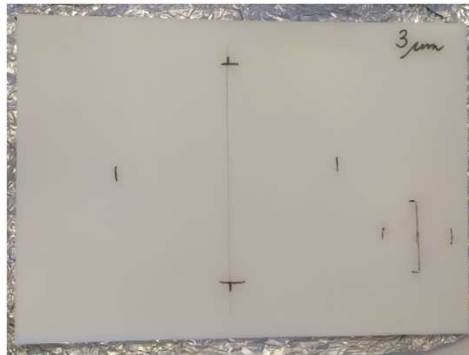


Heure démarrage Filtration : 15H25

Bidon A (Trépier)			Bidon B (Swinnex)		
Opération	Heure	Volume mesuré	Opération	Heure	Volume mesuré
démarrage	15H25			15H32	1L
	15H33	1L		15H39	1,01
sortie tube	15H39	1L		15h 46	1L
je dévite!	15H55	0,36L	sortie tube	15H53	1,1
				16H01	0,04 L
Durée filtration (sans décantation) = 14'			Durée filtration (sans décantation) = 28'		
Volume total filtré (après décantation) = 2,36			Volume total filtré (après décantation) = 5,15		
Pour opération, préciser si besoin Fin filtration (= FF) ou fin de décantation (= FD)					
20 EL - EAA - 28					

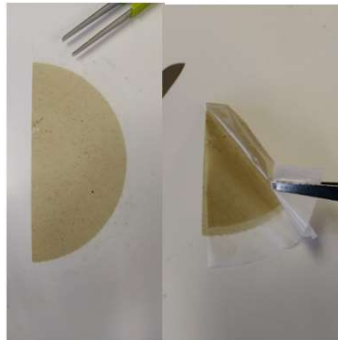
Découpe et stockage des filtres

Découpe des filtres :



Placer le filtre sur la planche à découper (décontaminée) en suivant les marques, face chargée vers le haut

Découper le filtre en deux parties égales avec un scalpel stérile neuf.



A l'aide d'une pince stérile plier/rouler le filtre face chargée vers l'intérieur, de telle sorte à ce qu'il entre dans le cryotube.

⚠ Tube étiqueté + date du jour en avance ⚠

Flash freezer immédiatement le tube ou à défaut le stocker dans de la glace au maximum 5 min avant flash freezing

Répéter les étapes pour les autres filtres

Flash freezing :

- Transférer de l'azote liquide dans un Dewars et Flash-freezer les tubes (minimum 1 minute)

⚠ Utiliser des lunettes et les gants adaptés ⚠



- Utiliser le Labtob cooler -80°C pour les transports/transferts des tubes flash-freezés vers le congélateur ou pour tout déplacement/transfert des tubes après congélation
- Stocker les tubes dans les boîtes identifiées dans le congélateur -80°C

Nettoyage-décontamination entre 2 points (EL et EAA) pour chaque session

- Rinçage des systèmes de filtration

- Refermer la colonne et le carter Swinnex
- Plonger les 2 tubes d'aspiration (A et B) dans une bouteille d'eau **MilliQ stérile (2L)** pour rincer le système ainsi que les tuyaux de prise d'air par purge/débordement suite au pincage de l'extrémité basse
- **Décontamination Javel** : Passer l'ensemble du dispositif de filtration à l'**eau de Javel 1%**, 0.5L, laisser agir **10 minutes**, puis encore 0.5L, purger
- Rincer le système à l'**eau MilliQ (2L)** ainsi que les tuyaux de prise d'air par purge/débordement

Après traitement des échantillons, à la fin des filtrations de la journée :

- Nettoyage et décontamination des systèmes de filtration

- Rincer le système à l'**eau MilliQ (2L)**
- Passer l'ensemble du dispositif de filtration à l'**eau de Javel 1%**, 0.5L, laisser agir **10 minutes**, puis encore 0.5L, purger
- Rincer le système à l'**eau MilliQ (2L)** ainsi que les tuyaux de prise d'air par purge/débordement suite au pincage de l'extrémité basse puis passer **de l'éthanol à 96% (1L)** pour sécher le système
- Bien vérifier qu'il ne reste pas de résidu, **laisser tourner pour assécher 15 minutes** puis si possible, **purger le système colonne en créant une dépression avec une pompe à vide** manuelle positionnée au point bas de l'évacuation pour finaliser le séchage
- **Démonter tout le système**, séparer les carters, supports en inox et grilles, Swinnex, joints souples
- **Laisser sécher à l'abri** en entourant le matériel d'aluminium
- Renseigner le tableau de suivi des échantillons à transmettre à la personne qui supervise la coordination ech. ADNe

1 seul Blanc de filtration B2 (session S1, tous les deux mois)

**Frise chrono.
des actions**

Sessions ...	S1	S2	S3	S4	S1'	S2'	S3'	S4'	S1'' ...
blanc	B2				B2'				B2''
filtration	EL	EL	EL	EL	EL	EL	EL	EL	EL
<u>déconta.</u>	javel	javel	javel	javel	javel	javel	javel	javel	javel
filtration	EAA	EAA	EAA	EAA	EAA	EAA	EAA	EAA	EAA

A chaque Session- Entre les filtrations EL et EAA du jour et après le rinçage avec 2L d'eau MilliQ, faire une **décontamination des systèmes à la Javel (cf. diapo15)**

En Session1, tous les 2 mois, Juste avant les filtrations EL et EAA, faire le Blanc filtration B2

Réaliser le blanc - B2

- **Filtrer 2L eau MilliQ pour chaque filtre 0.2µm et 20µm** - laisser tourner pour assécher 15 minutes
- Découper les filtres sur une planche décontaminée selon le protocole habituel
- Placer chaque demi-filtre dans un tube identifié et daté (ex. identifiant: aaEQ-ETxx-02B2 ou aaEQ-ETxx-20B2)

XX= nombre à incrémenter au fur et à mesure des filtrations

Préparation de la session de filtration suivante: nettoyage et décontamination

Préparation de l'eau MilliQ stérile:

- soit eau MilliQ produite le jour des filtrations et conditionnée dans un contenant stérile
- soit eau MilliQ préalablement préparée => eau MilliQ stérilisée par autoclavage immédiatement après production puis stockée

Décontamination et préparation et du matériel pour la session suivante:

Planches, pinces et scalpels – *plusieurs options selon les équipements disponibles :*

- au spray 'RNase away' : laisser agir au moins 15 minutes, rinçage à l'eau MilliQ stérile, séchage puis conditionnement stérile (en entourant d'aluminium ou boîte stérile, etc)
- ou rinçage à l'eau, bain de javel 1% pendant minimum 15 minutes, puis rinçage à l'eau MilliQ stérile, laisser sécher puis conditionnement stérile (en entourant d'aluminium ou boîte stérile, etc)
- ou nettoyage à la machine à laver, puis stérilisation à l'autoclave

Bidons et entonnoirs:

- après chaque campagne de filtration: rinçage à l'eau, puis à l'eau MilliQ stérile, puis séchage à l'éthanol 96% (200 mL par bidon)
- **tous les 2 mois:** rinçage à l'eau, décontamination à la Javel à 1% pendant minimum 15 minutes, rinçage à l'eau MilliQ, puis séchage à l'éthanol 96% (200 mL par bidon)

Nettoyage et décontamination: tubulure et inox

Tous les 2 mois, remplacer l'ensemble des tubulures par un nouveau jeu préalablement décontaminé

Décontamination de l'ancien jeu par trempage dans des bains:

1. de Javel à 1% pendant minimum 15 minutes,
2. d'eau MilliQ stérile,
3. d'éthanol 96% puis emballage stock en aluminium

Autant que de besoin, traitement des points de rouille sur les pièces inox:

- Préparer dans un bidon de 3 à 4L une solution d'acide phosphorique (H_3PO_4) dilué à 10% en eau distillée ou MilliQ
- Tremper les pièces dans cette solution dans une bassine dédiée pendant 10 à 15 minutes. Au besoin, frotter avec une brosse à dent les tâches de rouille tenaces. Eliminer la solution d'acide selon le circuit des déchets chimiques
- Rinçage du matériel à l'eau chaude, décontamination par spray 'RNase away'
- Trempage dans l'eau MilliQ stérile, puis séchage à l'éthanol 96%