

Université de Montréal

**Détermination du destin des nanoparticules d'argent dans
les eaux usées et dans les biosolides en utilisant la
microscopie en champ sombre et analyse hyperspectrale.**

par Trevor Théoret

Département de Chimie, Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
et postdoctorales en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Décembre 2016

© Trevor Théoret, 2016

Résumé

Les nanomatériaux sont une classe de produits contaminants émergents et qui sont présents en concentrations croissantes dans l'environnement. Dans les milieux environnementaux complexes, leur détection est souvent compliquée par les interférences provenant des matrices environnementales. L'objectif de ce travail était de voir si c'était possible de suivre et de comprendre le sort des nanoparticules d'argent dans les eaux usées à l'aide de microscopie améliorée en champ sombre (EDM) couplé à l'analyse/imagerie hyperspectrale (HSI). En effet, lorsqu'il est couplé à une analyse pixel par pixel, EDM peut être utilisée pour dépister la présence de nanoparticules, et pour localiser, identifier et suivre leur sort *in situ*. La transformation de plusieurs nanoparticules d'argent différentes (40, 80 et 100 nm) avec différents revêtements (citrate et polyvinylpyrrolidone) a été analysée dans des milieux complexes (eaux usées, biosolides). Les résultats ont montré que, lorsqu'ajouté dans des systèmes complexes contenant de la matière organique naturelle, certaines nanoparticules sont rapidement transformées (sur une période de 2 heures), comme indiqué par un changement de la longueur d'onde attribuée à leur résonance plasmonique (450-570 nm), conduisant à une diminution de l'intensité du signal de 95%. Sur la base de résultats complémentaires obtenus par diffusion de lumière dynamique (DLS) et de spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif de particules uniques (SP-ICP-MS), il a été possible d'attribuer les changements non à l'agrégation des particules ou la dissolution, mais plutôt à une modification de la nature des particules en raison de l'adsorption de la matière organique sur leur surface. Ce travail montrera que les propriétés des nanoparticules dans les systèmes complexes sont très différentes de celles des systèmes simples.

Mots-clés : nanoparticule d'argent, environnement, imagerie hyperspectrale, microscopie en champ sombre, spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif de particules unique.

Abstract

Nanomaterials are a class of emerging and increasingly produced contaminants that are present in increasing concentrations. In complex environmental media, their detection is often complicated by interferences from environmental matrices. The objective of this work was to follow the fate of silver nanoparticles in the wastewaters using enhanced darkfield microscopy (EDM) coupled with hyperspectral imaging (HIS). When coupled with a pixel by pixel analysis, EDM can be used to screen for the presence of nanoparticles, and to locate, identify, and follow their fate *in situ*. Transformation kinetics of several different silver nanoparticles (40, 80 and 100 nm) with different coatings (citrate and polyvinylpyrrolidone) were analysed in complex media (wastewater, biosolids). Results demonstrated that when spiked into complex systems containing natural organic matter, certain nanoparticles were rapidly transformed (over a period of 2 hours), as shown by a shift in the wavelength attributed to their plasmonic resonance (450 to 570 nm) leading to a decrease in signal intensity of 95%. Based upon complementary results obtained by dynamic light scattering (DLS) and single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry (SP-ICP-MS), it was possible to attribute the changes not to particle aggregation or dissolution as much as a change in the nature of the particles due to the adsorption of organic matter on their surface. This memoir will show that the properties of the nanoparticles in complex systems are very different from those in simple systems.

Keywords: silver nanoparticles, environment, hyperspectral imaging, darkfield microscopy, single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations et symboles.....	x
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. Les Ag NPs dans l'environnement	3
1.2. Stabilité des Ag NPs	6
1.3. Objectifs.....	9
Chapitre 2 : Théorie	11
2.1. Méthodes de caractérisation des nanoparticules	11
2.1.1. Introduction.....	11
2.1.2. Microscopie en champs sombres avec imagerie hyperspectrale (Cytoviva)	12
2.1.3. Spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif en mode de particules unique	15
2.2.4. Diffusion de lumière dynamique	18
Chapitre 3 : Optimisation et méthodologie.....	20
3.1. Création des bibliothèques spectrales	20
3.2. Optimisation de l'angle spectral cartographique	20
3.3. Introduction des nanoparticules dans les biosolides	21
Chapitre 4 : Article - Evaluation of enhanced darkfield microscopy and hyperspectral analysis to analyse the fate of silver nanoparticles in wastewater and biosolids.....	23
Chapitre 5 : Supporting information for Evaluation of enhanced darkfield microscopy and hyperspectral analysis to analyse the fate of silver nanoparticles in wastewater and biosolids	37

Chapitre 6 : EDM-HSI sur des sédiments d'un lac (L222) de la région expérimentale d'Ontario (ELA)	41
Chapitre 7 : Conclusion	53
Bibliographie.....	55

Liste des tableaux

Tableau I.	Classification des nanoparticules selon leur origine.....	1
Tableau II.	Limite de détection des différents éléments pour l'ICP-MS et d'autres techniques pour l'analyse.	16
Tableau III.	Physical diameters (determined by TEM), hydrodynamic diameters (determined by DLS), electrophoretic mobilities and surface areas for the Ag NP.	28
Tableau IV.	Transformation kinetics of the silver nanoparticles in wastewater by assuming a first order rate constant ($\ln[A] = \ln[A]_0 - kt$)..	32
Tableau V.	Characteristics of wastewater (WW) mixed liquor and effluent collected from La Prairie's wastewater treatment plant.	38
Tableau VI.	Distributions of the hydrodynamic diameters and physical diameters of different Ag NPs in filtered wastewater as determined by DLS and SP-ICP-MS after 9 min, 181 min. and 16 days.	40
Tableau VII.	Number of matched pixels for hyperspectral images corresponding to Ag NPs in the lake sediments of Lake 222 from station D3 and the Centre Buoy station and identified from spectral libraries SL-1 or SL-2.	50

Liste des figures

Figure 1.	Vue d'ensemble des transformations de l'argent déclenchées par les plastiques et les textiles biocides.....	3
Figure 2.	Schéma de quelques transformations et la mobilité des nanoparticules d'argent dans une eau douce	5
Figure 3.	A. Image du citrate (cit). B. Stabilisation des Ag NP(Cit) par répulsion électrostatique.	7
Figure 4.	A. Image du polyvinylpyrrolidone (PVP). B. Stabilisation des Ag NP(PVP) par forces stériques.....	7
Figure 5.	Distributions de tailles des différents types de colloïdes et des particules environnementales ainsi que plusieurs techniques analytiques utilisées pour les caractériser. 12	
Figure 6.	Condensateur du microscope en champ sombre.....	13
Figure 7.	Illustration de l'angle spectral cartographique (SAM)	15
Figure 8.	A. Spectre des acquisitions pris par SP-ICP-MS. B. Distribution de tailles des particules selon l'intégration du spectre A.....	17
Figure 9.	Profile spectral qui correspond aux libraires spectrales des Ag NP(cit) 40 nm avec un SAM de A. 0.080, B. 0.100 et C. 0.150.....	21
Figure 10.	Image hyperspectrale des biosolides à 20% de matières sèches et Ag NP(cit) 40 nm A. sans dilution et B. avec dilution 50 % dans MQW.....	22
Figure 11.	Spectral libraries generated for A) 40 nm Ag NPs (cit) B) 80 nm Ag NPs (cit) C) 100 nm Ag NPs (cit) D) 40 nm Ag NPs (PVP) E) 80 nm Ag NPs (PVP) F) 100 nm Ag NPs (PVP) in Milli-Q water.	29
Figure 12.	Hyperspectral image of A) unaltered wastewater B) filtered supernatant of wastewater without Ag NP C) Spectral libraries generated from Fig. 12A. D) Spectral library generated from Fig. 12B.	30
Figure 13.	(A) Hyperspectral image of 2 mg L ⁻¹ of the 40 nm Ag NP(cit) in filtered wastewater after 8 minutes. (B) Hyperspectral image of the same field of view after 180 minutes. (C) Spectral profile generated from points in Fig. 13A. (D) Spectral profile generated from points in Fig. 13B.....	30

Figure 14. A) Relative proportion of pixels where Ag NP are identified for 2 mg L⁻¹ of citrate coated silver nanoparticles in the wastewater as a function of exposure time; B) Identification of 2 mg L⁻¹ of polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles (Ag NP (PVP)) in wastewater as a function of exposure time. 31

Figure 15. Distributions of the physical diameters of the 40 nm Ag NP(cit) (0.100 µg L⁻¹) in the filtered wastewater as determined by SP-ICP-MS A) after 9 minutes; B) after 181 minutes; C) after 16 days..... 33

Figure 16. Distributions of hydrodynamic diameter of the 40 nm Ag NP(cit) in filtered wastewater as determined by DLS after A) 9 minutes ; B) 181 minutes; C) 16 days 33

Figure 17. Identification of 2 mg L⁻¹ of the 40 nm citrate coated Ag NP as function of particle concentration in the wastewater..... 34

Figure 18. Identification of 2 mg L⁻¹ of citrate coated silver nanoparticles (Ag NP (cit)) in Milli Q water as a function of exposure time. 38

Figure 19. Positively matched pixels of aging 40 nm Ag NP(cit) in a wastewater using different spectral libraries after 0, 45, 80 and 125 minutes. 39

Figure 20. A. Photo and major characteristics of lakes L221 and L222. B. Topography of lake L222 and site of the Ag NP addition..... 43

Figure 21. A. Hyperspectral image of the stock Ag NP samples. B-C) Zoom of several pixels that of the stock Ag NPs samples..... 45

Figure 22. A-F. Spectral profiles collected from the stock Ag NP suspensions 46

Figure 23. A. Hyperspectral image of the reference lake L221 after the application of the spectral library for the sediment matter (SL-3). B. Representative spectral profile of matching pixels corresponding to L221 sediment matter..... 47

Figure 24. A) Hyperspectral image of the diluted lake sediments. Ag NPs were identified using SL-1 and indicated by red points. B) Spectral profile of the pixels from the image that matched the Ag NP spectral library (SL-1). C) Hyperspectral image of matching pixels obtained from the spectral library (SL-3) that was generated for particulate matter (red points). 48

Figure 25. A. Hyperspectral image of the lake sediments after application of the spectral library for particulate matter (SL-3). B. Hyperspectral image of a diluted (10x) sample of the lake sediments using the applied spectral library for sediment matter (SL-3). In A and B,

sediment particles are identified by red coloring. C. Spectral profile of the pixels that matched the spectral library for sediment matter. 51

Liste des abréviations et symboles

Ag⁺	Argent ionique // Ionic silver
Ag₂S	Sulfure d'argent // Silver sulfide
Ag NPs	Nanoparticules d'argent // Silver nanoparticles
Ag NP(cit)	Nanoparticules d'argent avec un enrobage de citrate // Citrate coated silver nanoparticles
Ag NP(PVP)	Nanoparticules d'argent avec un enrobage de polyvinylpyrrolidone // Polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles
AgCl	Chlorure d'argent // Silver chloride
CCC	Concentration critique de coagulation // Critical coagulation concentration
DLS	Diffusion de la lumière dynamique // Dynamic light diffusion
DOC	Carbone organique dissous // Dissolved organic carbon
EDM	La microscopie améliorée en champ sombre // Enhanced darkfield microscopy
EM	Électromultiplicateur // Electromultiplier
HSI	Imagerie hyperspectrale // Hyperspectral imaging
K	Kelvin
LCF	Film de cristaux liquides // Liquid Crystal Film
m/z	Masse sur charge // Mass / charge
MQW	Eau ultra pure // Ultra pur water
NOM	Matière organique naturelle // Natural organic matter
NPs	Nanoparticules // Nanoparticles
NPM	Nanoparticules manufacturées // Manufactured nanoparticles
nm	Nanomètre // Nanometer
ORP	Potentiel d'oxydo-réduction // Oxidation-reduction potential
SAM	L'angle spectral cartographique // Spectral angle mapping
SL	Librairie spectrale // Spectral library
SP-ICP-MS	Spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif de particules unique // Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry
TEM	Microscopie électronique en transmission // Transmission electron microscopy
TOC	Carbone organique total // Total organic carbon

µg	Microgramme // Microgram
WWTP	Centres d'épuration des eaux usées // Wastewater treatment plant
XANES	Spectroscopie de structure près du front d'absorption de rayons X // X-ray absorption near edge structure
% w/v	Pourcentage poids/volume // Weight percentage / volume

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, Kevin J. Wilkinson. Merci de m'avoir permis de faire ma maîtrise dans ton groupe de recherche, sans son talent de pédagogue et de scientifique, je n'aurai jamais considéré la maîtrise.

Merci à Sébastien Maillette, Elise Morel et Justine-Anne Rowell d'avoir contribué au fait que le laboratoire et le bureau aient une ambiance chaleureuse et de m'avoir accepté dans mes nombreuses plaisanteries.

Merci également à Madjid Hadioui pour toute son aide et ses connaissances divines pour l'ICP-MS.

Un grand merci à Caroline Peyrot pour son aide et patience lors des nombreuses réparations du Cytoviva, ainsi que tous les autres membres du groupe Wilkinson pour votre support moral.

Je voudrais également remercier mes parents Stéphane Théoret et Nancy Rohar pour leur soutien et amour. J'espère qu'un jour je pourrai être capable d'en faire autant que vous un jour.

Finalement, je voudrais remercier Geneviève Granger pour m'avoir encouragé et supporter dans les moments les plus difficiles de la maîtrise. Je suis choyé de t'avoir comme partenaire de vie.

Chapitre 1 : Introduction

Les nanomatériaux sont une classe de produits contaminants émergents qui sont progressivement présents en concentrations croissantes. Santé Canada estime que toute substance ou tout produit fabriqué et toute matière constitutive ou structure ou tout ingrédient ou dispositif constitue un nanomatériau : s'il est à l'échelle nanométrique, ou dans les limites de celle-ci, dans au moins une dimension externe ou présente une structure interne ou en surface à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire 1 à 100 nanomètres (nm) y compris.¹ La consommation mondiale de nanomatériaux devrait croître en termes unitaires de près de 225060 tonnes en 2014 à près de 600000 tonnes en 2019, un taux de croissance annuel composé (TCAC) de 21,1% pour la période de 2014 à 2019.²

Les nanoparticules peuvent être d'origines naturelle ou anthropique, et de formes organique ou inorganique en plus d'avoir des formations différentes.³ Ainsi, selon cette description, il y a plusieurs différents types de nanoparticules. Le tableau 1, illustre très bien les différentes classifications des nanoparticules. En plus de la variété des différentes classifications des nanoparticules, celles qui sont conçues de façon anthropogénique vont posséder une grande variété d'enrobages qui sont impliqués directement dans la synthèse afin de leur permettre une stabilité en solution soit par stabilisation électrostatique ou stérique. En effet, ces enrobages vont avoir un grand impact sur la mobilité et le sort des nanoparticules dans l'environnement.⁴

Tableau I. Classification des nanoparticules selon leur origine (modifié de Nowack et Bucheli).³

		Formation		Exemples			Formation		Exemples
Natural	C-containing	Biogenic	Organic colloids	Humic, fulvic acids	Anthropogenic (manufactured, engineered)	C-containing	By-product	Combustion by-products	CNT
			Organisms	Viruses				Nanoglobules, onion-shaped nanospheres	
		Geogenic	Soot	Fullerenes			Engineered	Soot	Carbon Black
		Atmospheric	Aerosols	Organic acids					Fullerenes
		Pyrogenic	Soot	CNT				Functionalized CNT, fullerenes	
				Fullerenes				Polymeric NP	Polyethyleneglycol (PEG) NP
	Inorganic	Biogenic	Oxides	Nanoglobules, onion-shaped nanospheres		Inorganic	By-product	Combustion by-products	Platinum group metals
			Metals	Magnetite				Engineered	Oxides
		Geogenic	Oxides	Ag, Au			Metals		Ag, iron
			Clays	Fe-oxides			Salts		Metal-phosphates
		Atmospheric	Aerosols	Allophane			Zeolites, clays, ceramics		
				Sea salt					

Dans le cadre de mon projet, je me suis intéressé particulièrement aux nanoparticules d'argent (Ag NPs). Les Ag NPs sont surtout utilisées dans des produits domestiques tels les breuvages, les peintures, les compléments alimentaires ainsi que dans les textiles pour leurs propriétés antibactériennes.^{5,6} Due à l'augmentation de leur utilisation, une fraction significative de ces Ag NPs vont être relâchées dans les

égouts municipaux à cause de lessivage. Ainsi, une augmentation de leur concentration dans l'environnement et surtout dans les eaux usées devrait se produire dans les années à venir.⁷ Par ailleurs, les avancées technologiques et les applications des nanoparticules augmentent plus rapidement que les études portant sur leur impact et le risque de leur utilisation. De plus, les techniques fréquemment utilisées lors de l'analyse des métaux et des contaminants organiques ne sont pas adaptées à l'étude des nanomatériaux. Ainsi, il est important de développer de nouveaux outils pour faire la détection des Ag NPs provenant des centres d'épuration des eaux usées (WWTP) ainsi que dans les biosolides, là où il y a présence d'une grande concentration de matière organique et de particules inorganiques créant des matrices complexes. Présentement, il manque de techniques analytiques rigoureuses pour déterminer la concentration d'Ag NPs déversée dans les effluents de WWTP et dans les sols recevant les biosolides. Il est présentement impossible d'évaluer le risque de la décharge des Ag NPs provenant des WWTP et les risques qu'ils peuvent apporter aux récepteurs écologiques. Puis, il manque d'éclaircissement sur la rétention des Ag NPs par les WWTPs et comment faire pour augmenter leur rétention dans les WWTP. Pour adresser ces informations manquantes, les buts généraux de ce mémoire sont d'améliorer les techniques de détection afin de déterminer le sort des Ag NPs dans les eaux usées et dans les biosolides. Ainsi, toute cette information permettra d'évaluer s'il y a des conséquences environnementales négatives de la décharge des WWTPs en plus de mettre en place une réglementation adéquate afin de limiter leur utilisation et leur rejet si nécessaire.

La plupart des études existant caractérisent les Ag NPs avant et après une expérience, mais ils n'ont pas la capacité à suivre ces transformations au fil du temps surtout dans les milieux complexes.^{8,9} Ceci est problématique, car leur comportement varie beaucoup selon les conditions du milieu (pH, force ionique, type d'électrolyte et matière organique).^{4, 10} Ainsi, en analysant les Ag NPs de façon *in-situ* et en fonction du temps, il sera possible de déterminer la forme et l'état de ces particules lorsqu'elles sont accessibles aux organismes vivants (par exemple, dans des études de toxicité). En raison de la sensibilité des Ag NPs aux transformations environnementales (changements d'état d'agrégation, l'état d'oxydation, la précipitation des phases secondaires, sorption d'espèces organiques et inorganiques), il est important de considérer la toxicité des nanoparticules transformées ainsi que celles des solutions mère.¹¹ De plus, présentement les techniques analytiques établies pour la quantification de nanoparticules sont concentrées sur les produits synthétiques (milieu simple) et dans la plupart des cas ne conviennent pas pour des mélanges complexes, comme des échantillons environnementaux ou biologiques, qui ne sont en pas mesure de détecter des faibles concentrations.¹² C'est pour cette raison qu'il est important de développer de nouvelles techniques qui permettant la détection et caractérisation des Ag NPs sans changer leur milieu environnant.¹²

1.1. Les Ag NPs dans l'environnement

Les nanoparticules d'argent sont les nanoparticules manufacturées (NPM) les plus couramment utilisées dans les produits de consommation et le nombre de ces produits contenant Ag NPs, aux États-Unis, a augmenté de 23 en 2006 à 410 en 2014 (environ 16 fois).¹³ La figure 1 illustre très bien les transformations et la mobilité des Ag NPs dans les différentes sphères de l'environnement. Les environnements terrestre, atmosphérique et aquatique vont être affectés par les Ag NPs. De plus, selon cette figure, la grande majorité des Ag NPs finissent par se retrouver dans l'environnement aquatique, là où ils vont subir d'autres transformations. Or, l'environnement aquatique est l'un des milieux les plus intéressants pour faire des analyses de toxicité et de sort des Ag NPs.

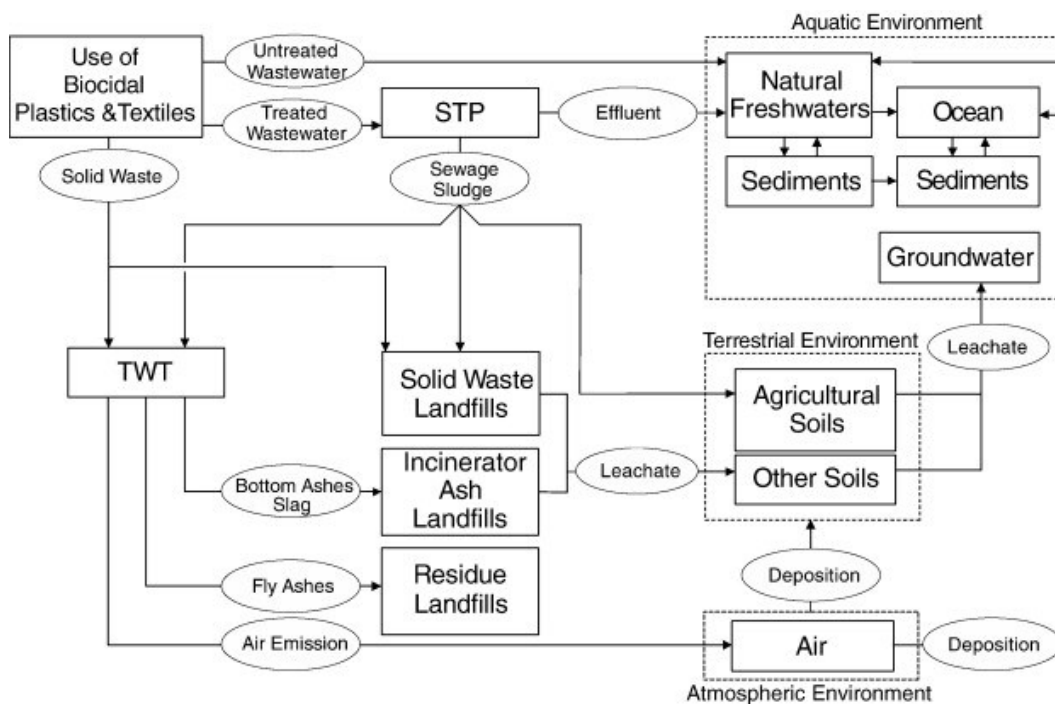


Figure 1. Vue d'ensemble des transformations de l'argent déclenché par les plastiques et les textiles biocides (tiré de Blaser et al.⁵). Les flèches représentent les flux d'argent; les lignes pointillées indiquent les différentes sphères de l'environnement; TWT signifie traitement thermique des déchets; STP signifie une usine de traitement des eaux usées.

En effet, il est estimé que la majorité des Ag NPs, libérées de sources domestiques et industrielles, vont parcourir les réseaux d'égouts municipaux et atteindront les centres d'épuration des eaux usées.¹¹ Par exemple, les recherches de Geranio et al.¹⁴ ont démontré que la plupart de ces nanoparticules vont se lessiver des vêtements en seulement quelques lavages. Par ailleurs, les recherches de Shafer et al.¹⁵ ont démontré que les WWTPs se sont avérés très efficaces pour éliminer l'argent de l'eau traitée. En effet, plus de 94% de l'argent a été piégé dans les biosolides. De plus, d'autres résultats ont montré que suite à l'ajout de 125 g d'argent (85 µg/L) dans un WWTP, la majorité de la masse des Ag NPs injectée (85%) se retrouvait

dans les boues, 5% de la masse d'argent avait quitté la station d'épuration dans les effluents et que 5% sont restés dans les biosolides, après un traitement de 43 jours.¹⁶ Seulement, il est important de souligner que les analyses de film de cristaux liquides (LCF) des spectres de spectroscopie de structure près du front d'absorption de rayons X (XANES) ont relevé que 15% de la quantité d'argent présente dans les effluents était détectée sous la forme de Ag NPs métalliques non transformées, c'est-à-dire sous leur forme initiale alors que le reste se retrouvait sous forme de Ag₂S. Cependant, il faut considérer que ces pourcentages sont sujets à changer, car le taux de sulfidation va grandement être affecté par la concentration d'oxygène, de sulfure et surtout par la concentration de ligands naturels tels que la matière organique naturelle (NOM) qui est connue pour prévenir ou ralentir les processus de sulfidation.¹¹ Néanmoins, ces études ont ignoré un point clé. En effet, une forte dose (mg / L ou g / L) de Ag NPs utilisé dans les expériences en lots dans les bioréacteurs a un effet toxique sur les bactéries participant dans le traitement des eaux usées.¹⁷ D'autres recherches faites par Li et al.¹⁸, ont démontré que la rétention de Ag NPs va dépendre du type de traitement (installations structurelles mécaniques et/ou biologiques) au sein des WWTPs. En effet, avec une concentration initiale inférieure à 1,5 µg L⁻¹ d'Ag NPs, le traitement physique extrait seulement 35% de cette concentration tandis que le traitement biologique extrait 95% de la concentration restante. Malheureusement, ce n'est pas toutes les municipalités qui possèdent des traitements biologiques de même que certaines municipalités ayant des égouts mixtes n'ont pas la capacité de traiter toutes les eaux usées qu'elles reçoivent et ainsi, l'excédent est directement rejeté dans l'effluent. Ceci est souvent le cas de Montréal lors des journées pluvieuses.¹⁹ Il semble ainsi inévitable qu'une certaine quantité de Ag NPs non transformée peuvent traverser les WWTPs par les effluents municipaux et atteindre les eaux douces.

Lorsque les Ag NPs atteignent les eaux douces, ils vont avoir des transformations différentes dépendamment des conditions de la matrice, par exemple le pH, la force ionique, la concentration d'oxygène et de matière organique naturelle (NOM) et le type d'électrolyte. Effectivement, dès que les Ag NPs sont libérés dans l'environnement, ils commencent à se transformer ce qui modifie leurs propriétés influençant ainsi leur transport, leur sort et surtout leur toxicité envers les autres organismes vivants.^{20,21} La figure 2 illustre bien les transformations et spéciations plausibles des Ag NPs dans un milieu aquatique réel, soit la dissolution, l'agrégation puis sédimentation, la précipitation sous forme de complexes (AgCl ou Ag₂S) et l'adsorption de (ou sur) des espèces insolubles comme la NOM.

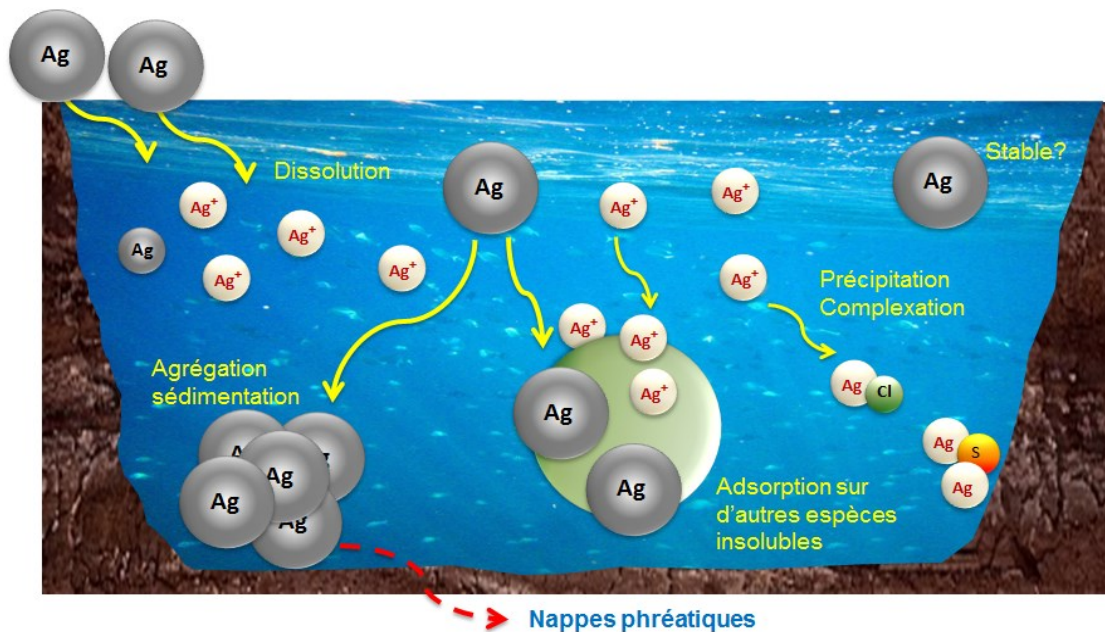


Figure 2. Schéma de quelques transformations et la mobilité des nanoparticules d'argent dans une eau douce (modifié de Madjid et al²²).

À la base, l'Ag se trouve sous forme élémentaire et dans divers minerais tels que argentite (sulfure d'argent, Ag_2S). L'Ag est insoluble dans l'eau, tandis que de nombreux sels d'Ag, tels que, AgNO_3 sont solubles dans l'eau. L'Ag se retrouve dans deux états d'oxydation dans des conditions environnementales: $\text{Ag}(0)$ et $\text{Ag}(I)$.²³ De plus, comme mentionné précédemment, lorsque l'Ag est introduit sous forme nanoparticulaire, il va avoir des propriétés différentes et donc introduire des mécanismes de toxicité différents qui ne sont pas reliés à l'argent ionique.^{24,25} Puis, les recherches de Sotiriou et al.²⁶ ont déterminé que l'activité antibactérienne des Ag NPs est dépendante de leur taille. Effectivement, l'activité antibactérienne est dominée par les ions lorsque les Ag NPs sont petites et qu'ils relâchent une bonne partie des ions d'Ag. Cependant, lorsque les Ag NPs sont de plus grande taille (>10 nm), il va avoir moins d'ions relâchées et ça va être les nanoparticules elles-mêmes qui vont influencer l'activité antibactérienne. Les procédés les plus importants pour la biodisponibilité de l'Ag NPs et les effets sur les organismes aquatiques comprennent l'agglomération ou l'agrégation des Ag NPs, l'oxydation d' $\text{Ag}(0)$ à Ag^+ , la dissolution subséquente d' Ag^+ , la spéciation et la solubilité d' Ag^+ en solution et les réactions qui vont modifier la réactivité des Ag NPs.²⁷ Les phases solides d' Ag^+ les plus importantes à prendre en considération pour la solubilité sont l' $\text{AgCl}_{(s)}$ et l' $\text{Ag}_2\text{S}_{(s)}$. La solubilité de ces deux phases solides doit être examinée avec soin dans des milieux expérimentaux pour des études des effets biologiques des Ag NPs et de l' Ag^+ , ainsi que pour leur comportement dans les systèmes naturels.

1.2. Stabilité des Ag NPs

Pour évaluer le sort des Ag NPs en milieu aqueux, il est essentiel de comprendre leur stabilité en ce qui concerne leur taille et leur dispersion colloïdale en fonction des propriétés du milieu (pH, force ionique, présence de ligands/substrats). De plus, la stabilité des Ag NPs est dictée, en grande majorité, par les propriétés de surface des Ag NPs. Effectivement, des enrobages sont utilisés pour améliorer la stabilité colloïdale des particules, or le choix du matériau de recouvrement utilisé pour protéger ou passiver la surface des nanoparticules est absolument crucial. Le choix d'enrobage va également avoir un impact sur la taille, la morphologie et même sur les applications ciblées en général et parfois même sur la dissolution et la toxicité des nanoparticules.²⁸ Typiquement, les enrobages stabilisent les Ag NPs en instaurant une charge électrique au niveau des surfaces des Ag NPs ou en limitant les interactions entre particules par augmentation des contraintes stériques.²⁹ Ainsi, il y a plusieurs choix d'enrobage pour stabiliser les Ag NPs contre l'aggrégation incluant les acides carboxyliques, les polymères, les polysaccharides et les surfactants.³⁰

Le citrate (cit) (Figure 3A) est l'acide carboxylique le plus répandu et le plus utilisé comme agent d'enrobage pour sa charge électrostatique, mais les acides carboxyliques avec des chaînes d'alkyle sont également utilisés.^{31,32} Le citrate est simplement adsorbé à la surface des Ag NPs puisque c'est un enrobage labile et donc n'est pas lié de manière covalente au noyau d'argent. Ainsi, lorsque les Ag NP(cit) sont dilués, ils vont subir une déstabilisation, car il est probable que le citrate se dissocie de la surface des nanoparticules.

La figure 3B montre la stabilisation de la NP causée par charge négative de la surface ainsi que la double couche électrique. La charge de surface est négative, car elle comprend les molécules de citrate (normalement déprotonés) qui sont adsorbées sur la surface des Ag NPs. La deuxième couche est composée d'ions qui sont attirés par la charge de surface (première couche) via la force de Coulomb, ce qui couvre électriquement la première couche. Ainsi, si la force ionique de la solution est trop élevée, causée par une haute concentration d'ions, la charge de surface des NPs peut être complètement écrantée, menant éventuellement à de l'agglomération (répulsion électrostatique trop faible). De plus, dans le cas du citrate, cette charge négative à la surface va être fortement dépendante du pH, ce qui peut causer de l'agglomération à faible pH.⁴ En effet, le citrate possède trois valeurs de pKa, soient 3.14, 4.76 et 6.40, et donc peut être déprotoné à trois endroits différents selon le pH, ce qui peut fortement affecter sa stabilité.³³ En somme, la stabilité des enrobages des Ag NP(cit) va grandement dépendre des conditions environnementales du milieu.

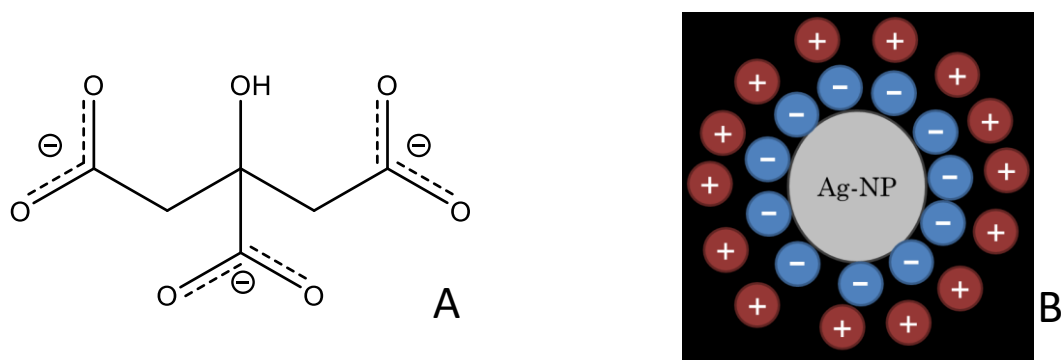


Figure 3. A. Image du citrate (cit). B. Stabilisation des Ag NP(Cit) par répulsion électrostatique.

Par ailleurs, parmi tous les polymères utilisés comme enrobage, les plus utilisés sont le polyvinylpyrrolidone (PVP), le poly(alcool vinylique) (PVAL), le polyacrylamide, le polyacrylate.³⁴ L'enrobage PVP s'est également avéré à être le polymère le plus efficace pour stabiliser les Ag NPs.³⁵ En fait, l'enrobage de PVP (Figure 4A) est un revêtement uniforme et dense qui limite l'agrégation surtout à cause de ses forces stériques. Le PVP va stabiliser les NPs à cause de leurs longues chaînes de polymères qui forme une capsule et emprisonne le noyau d'Ag, qui réduisent la possibilité d'agglomération en augmentant l'énergie requise au rapprochement des NPs (stabilisation stérique (Figure 4B)). Ces forces stériques vont également limiter l'adsorption de matière organique¹¹ en plus d'être très peu affectées par les changements de forces ionique.⁴

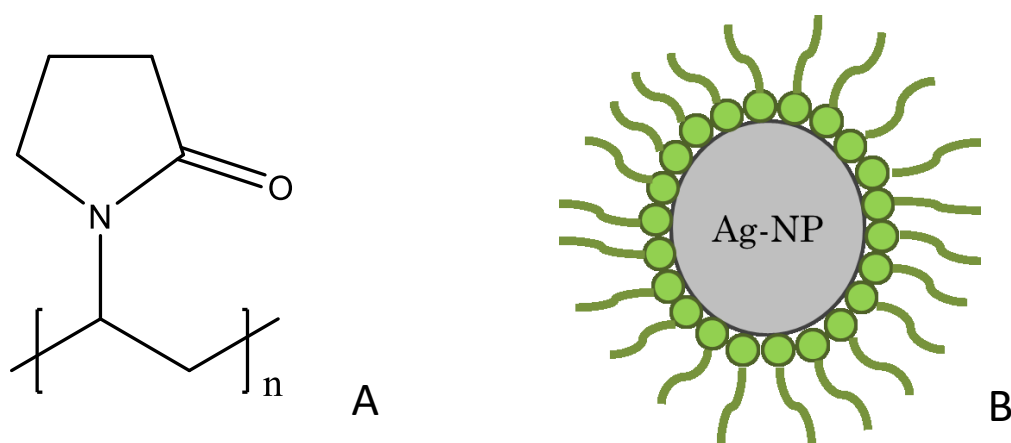


Figure 4. A. Image du polyvinylpyrrolidone (PVP). B. Stabilisation des Ag NP(PVP) par forces stériques.

Finalement, il y a également les polysaccharides qui sont utilisés comme enrobage pour stabiliser les NPs. Les polysaccharides les plus communs sont la gomme arabique (GA), sophorolipides (un glycolipide tensio-actif) et d'autres sucres.³⁶ Toutefois, ils n'ont pas été étudiés dans le cadre de ce projet.

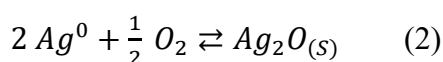
Comme mentionné précédemment, la taille des nanoparticules est très importante pour évaluer leur stabilité dans la colonne d'eau. Les Ag NPs de très petites tailles sont susceptibles d'être transportés avec la phase d'eau et d'interagir facilement avec les organismes. Cependant, il y a sédimentation si la taille des Ag NPs augmente par des processus d'agglomération et que le mouvement brownien n'est plus assez fort pour maintenir les particules en suspension.³⁷ Ainsi, les Ag NPs deviennent moins mobiles et auront une tendance à se déposer dans les sédiments ainsi deviennent donc moins disponibles pour les organismes dans la colonne d'eau. D'autres études ont démontré un lien clair entre l'agrégation de nanoparticules et la perte d'un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. En outre, des études sur l'écologie microbienne des sédiments estuariens ont conduit à l'hypothèse que l'agrégation atténue la toxicité potentielle des Ag NPs dans l'eau et qu'il n'y a pas d'effets sur les microbes.³⁸

Par la suite, pour toutes mesures de stabilité des Ag NPs, il est important de mesurer la force ionique de la solution, car elle a un grand impact sur l'agrégation des NPs. À une force ionique plus élevée, les suspensions de Ag NPs chargés sont déstabilisées, d'une manière similaire à celle d'autres colloïdes. Effectivement, Li et al.³⁹ ont mesurée par DLS l'agrégation des Ag NPs sans enrobage dans des eaux avec des compositions d'électrolytes différents à forces ioniques différents. Le changement initial dans le rayon hydrodynamique moyen des nanoparticules d'argent dans le temps (dr/dt) induite par les différentes solutions d'électrolyte a été calculé et lié à la constante de vitesse d'agrégation expérimentale (k_{exp}) en utilisant l'expression suivante⁴⁰:

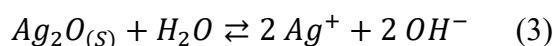
$$k_{exp} = \frac{1}{\alpha N r_0} \frac{dr}{dt} \quad (1)$$

où N est la concentration initiale des particules, r_0 est le rayon des particules initiales, et α est un facteur optique. Pour ces Ag NPs, les résultats ont démontré que les concentrations critiques de coagulation (CCC) étaient plus grandes que 10 mM pour les ions monovalents et plus grands que 1 mM, pour les ions divalents (40 mM pour le NaCl, 30 mM pour le NaNO₃, et 2 mM pour le CaCl₂) et va être très dépendant de la taille et de l'enrobage de la NP.³⁹

Ensuite, la dissolution est un facteur majeur de la toxicité des Ag NPs. L'argent élémentaire est sensible à la présence d'oxydants et dans des conditions oxygénées, l'Ag⁰ à la surface des nanoparticules peut être oxydé en Ag₂O qui forme une couche d'oxyde entourant la particule selon l'équation suivante⁴¹ :



Par la suite, la surface oxydée en Ag_2O peut se dissoudre pour libérer l'argent ionique selon l'équation 3 :



Cependant, dans une suspension aqueuse diluée de nanoparticules d'argent à l'équilibre avec l'oxygène atmosphérique, mais dépourvu d'autres électrolytes, la dissolution de la couche superficielle d' Ag_2O va être gênée en raison de l'absorption et l'accumulation d' Ag^+ à la surface des particules.

1.3. Objectifs

L'objectif général de ce projet de recherche est de mieux quantifier les nanoparticules rejetées par les usines de traitement des eaux usées et afin de définir leur exposition qui est une donnée essentielle pour évaluer leurs effets sur la santé publique et les effets environnementaux. Plus précisément, le but de ce projet est de déterminer le sort des nanoparticules d'argent dans les eaux usées et les biosolides. Ainsi, ce projet a un lien direct avec l'environnement, car il aborde l'évaluation de la vulnérabilité des eaux de source et les écosystèmes aquatiques de l'utilisation anthropique des nanoparticules, et vise à éclairer les décisions politiques sur la libération et admissibles niveaux de nanoparticules dans l'environnement aquatique. Les nanoparticules ont souvent des propriétés physico-chimiques distinctes et une toxicité élevée par rapport à leurs matériaux en vrac, et donc l'écosystème et les risques pour la santé humaine ne peuvent être traités par des cadres réglementaires actuels. De même, le risque environnemental des NP dépendra grandement de leur sort (adsorption, agglomération) ainsi que de leur taille puisque celles-ci définie leur mobilité et leur biodisponibilité dans l'environnement. En effet, la mobilité (dissolution ou sédimentation) est clé pour prévoir le risque potentiel des Ag NPs. Il est donc essentiel de mieux comprendre ce qui affecte leur stabilité afin de prévoir leur risque potentiel pour l'environnement.

Ainsi, l'objectif du projet est de comprendre le sort des nanoparticules d'argent dans l'environnement en utilisant la microscopie à champ sombre couplée avec l'imagerie hyperspectrale (EDM-HSI) et la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif par particule unique (SP-ICP-MS). La cinétique de transformation de plusieurs des nanoparticules d'argent de tailles différentes (20, 40, 80 et 100 nm) et avec des revêtements différents (polyvinylpyrrolidone, citrate) a été analysée dans des milieux complexes (eaux usées, biosolides). Le sort des nanoparticules a été validé par diffusion de lumière dynamique (DLS) afin de déterminer s'il y avait une augmentation de taille représentant une agglomération ou adsorption.

Les étapes majeures effectuées de ce travail consistaient à :

- Établir des bibliothèques spectrales des différentes tailles et enrobages de nanoparticules d'argent dans l'eau ultra pure.
- Déterminer les transformations cinétiques des nanoparticules d'argent dans l'effluent des eaux usées avec et sans filtration.
- Caractériser les transformations physiques et chimiques des Ag NPs dans l'eau usée et de déterminer la relation d'efficacité d'élimination par les WWTPs.
- Étudier l'homoagglomération ainsi que l'hétérocoagulation des nanoparticules d'argent en présence de matière organique naturelle (NOM) par DLS et SP-ICP-MS.
- Étudier le sort des nanoparticules d'argent dans les sédiments d'un lac expérimental.
- Développer des techniques analytiques fiables pour caractériser la concentration et la distribution des tailles des Ag NPs dans une eau usée.

Chapitre 2 : Théorie

2.1. Méthodes de caractérisation des nanoparticules

2.1.1. Introduction

Pour surmonter les défis mentionnés précédemment, plusieurs techniques sont utilisées pour détecter et caractériser les Ag NPs dans l'environnement. Par exemple, il est important de déterminer leur taille, la concentration des échantillons fractionnés (les espèces dissoutes, agrégées, complexées ou adsorbées sur des espèces insolubles) ainsi que de caractériser ces transformations cinétiques. Il existe une grande variété de méthodes pour estimer la taille des Ag NPs (par exemple, la diffusion de la lumière dynamique (DLS), la microscopie électronique en transmission (TEM), la microscopie à force atomique (AFM), le débit fractionnement d'écoulement de champ d'écoulement (FIFFF), la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) et l'analyse de suivi de nanoparticules (NTA)), cependant il devient difficile de mesurer précisément les changements induits par l'environnement dans l'état d'agrégation des Ag NPs.¹² Ainsi, en combinant plusieurs forces des techniques mentionnées précédemment, il devient alors possible de mieux comprendre et caractériser les nanoparticules dans l'environnement ainsi que plusieurs autres composés organiques et inorganiques importants (Figure 5).

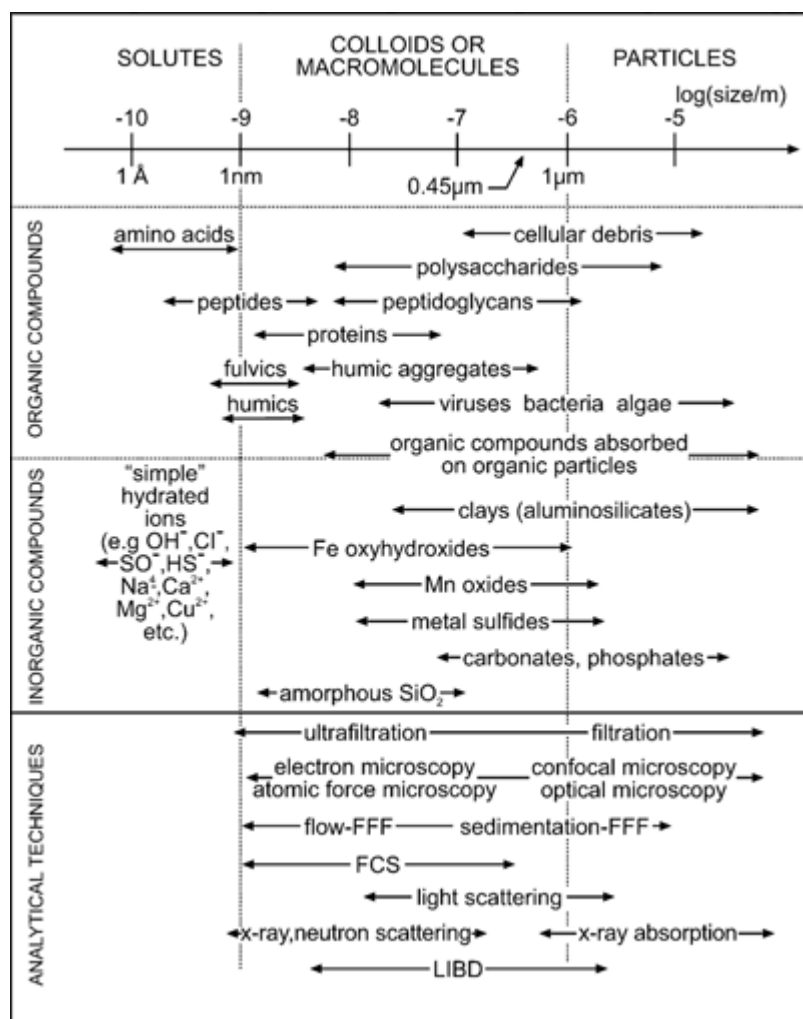


Figure 5. Distributions de tailles des différents types de colloïdes et des particules environnementales ainsi que plusieurs techniques analytiques utilisées pour les caractériser.⁶

2.1.2. Microscopie en champs sombres avec imagerie hyperspectrale (Cytoviva)

La microscopie en champ sombre se fonde sur le principe que la luminosité du milieu environnant est éliminée ou diminuée le plus possible afin d'augmenter le contraste entre l'échantillon et le vide. Le principe de la méthode est de mesurer la lumière qui est diffractée, réfléctée, réfractée ou bien provenant d'une source lumineuse très faible ⁴². Pour ce faire, un condensateur focalise une lumière fortement colmatée à des angles obliques à l'échantillon. En remplaçant le condensateur standard, il est possible d'améliorer le système d'éclairage. Ainsi, l'alignement, la mise au point du fond noir et l'éclairage d'angle oblique amélioré vont permettre l'obtention de signal sur bruit jusqu'à sept fois meilleures que celles des microscopies en champs sombres standards.⁴³ Le condensateur dirige un cône de lumière sur l'échantillon à hauts azimuts de sorte que la lumière initiale (sans changement de direction causé par l'échantillon) ne

pénètre pas directement la lentille frontale de l'objectif. Cependant, la lumière passant à travers l'échantillon est diffractée, réfléchiée ou réfractée par les particules de l'échantillon permettant à ces faibles rayons d'entrer dans l'objectif. Effectivement, la figure 6 démontre le parcours optique de la lumière à travers ce système. L'échantillon peut alors être visualisé comme un objet brillant sur un fond noir. Par conséquent, le contraste et la résolution de l'échantillon avec le milieu environnant sont grandement améliorés. De plus, les échantillons ne nécessitent aucune ou très peu de préparation pour faire l'analyse, ce qui conserve l'intégralité de l'échantillon *in situ*. Malheureusement, cette technique possède également des désavantages. Les objets qui ne sont pas dans la mise au point vont contribuer au signal de fond en réduisant le contraste et masquer les détails de l'échantillon. De plus, des artefacts tels que la poussière et les débris dans la chambre d'imagerie peuvent contribuer de manière significative à diminuer la qualité de l'image résultante. Il est également important de prendre des précautions particulières pour la préparation des lamelles de verre pour qu'elles soient exemptes de petites particules telles que la poussière, car celles-ci apparaîtront dans le cadre de l'image. De même, lors de l'application de l'huile sur le condenseur et/ou les lamelles de verre, il est important d'éviter toutes les bulles d'air puisque les bulles liquides provoquent la dégradation et de la distorsion des images en plus de diminuer le contraste et les détails de l'échantillon. Finalement, les objets très minces souffrent souvent de très faibles signaux, alors que les objets trop épais redirigent trop de lumière dans le chemin objectif, ce qui réduit l'efficacité de la technique. En somme, cette méthode permet d'observer des échantillons possédant un faible contraste et une faible taille tout en ayant un bon contraste et un signal-bruit amélioré. Ceci est la raison pour laquelle cette technique est très bien adaptée pour faire l'étude des nanomatériaux dans l'environnement.

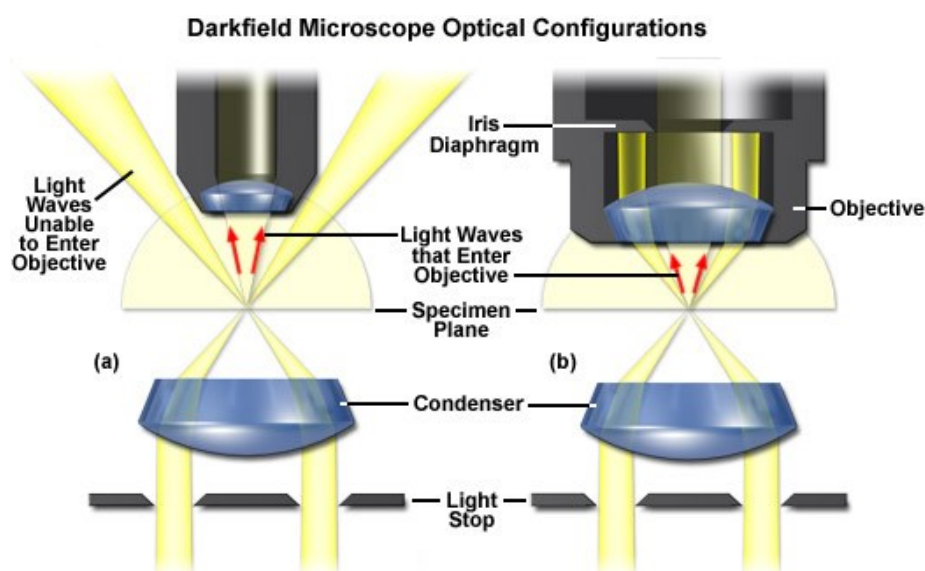


Figure 6. Condensateur du microscope en champ sombre ⁴⁴

Toutefois, lorsque la microscopie améliorée en champ sombre (EDM) est combinée avec l'imagerie hyperspectrale (HSI), cette méthode devient un instrument vraiment sensible en ce qui contemple la détection et la caractérisation des nanomatériaux³⁷. Effectivement, la caméra d'HSI recueille la lumière diffusée qui est directement incidente sur l'échantillon. La caméra Andor iXon3 capture une image de 512 par 512 pixels. Une étape automatisée permet l'imagerie d'un domaine (82 µm X 82 µm) choisi d'une ligne à la fois. Les données spatiales et spectrales (longueurs d'onde comprises entre 400 et 1000 nm) sont recueillies à 100x, ce qui entraîne une taille de pixel d'environ 160 nm X 160 nm. Une fois qu'une image a été créée, l'analyse est effectuée afin de déterminer l'emplacement d'un matériau d'intérêt sur la base de sa signature spectrale. Une bibliothèque de spectres de référence est créée par l'analyse d'une solution contenant des Ag NPs initiales, de même taille et revêtement, dans de l'eau Milli-Q (R>18,2 MΩ cm, carbone organique <2 µg C L⁻¹). La forme, la taille et la composition sont des facteurs qui vont modifier l'aspect de la signature spectrale. Théoriquement, il est aussi possible d'observer des changements de forme, de taille et de composition à l'aide des signatures spectrales.⁴⁵ Bien que les changements dans la taille des particules ou adsorption peuvent changer leur signature spectrale par des dixième de nm, des éléments tels que l'Ag et l'Au ont une bibliothèque spectrale très distincte (pic étroit) qui est souvent facile à identifier. L'algorithme du logiciel compare alors les spectres de la bibliothèque de référence avec ceux de l'échantillon inconnu afin de donner une image finale cartographiée qui est basée sur la correspondance des signatures spectrales.⁴⁶ La sensibilité de l'analyse dépend du réglage du seuil de l'angle spectral cartographique (SAM), qui représente une classification spectrale physique qui utilise un angle n-D pour faire correspondre les pixels aux spectres de référence. L'algorithme détermine la similarité spectrale entre deux spectres en calculant l'angle entre les spectres et en les traitant comme vecteurs dans un espace de dimensionnalité égale au nombre de bandes selon l'équation suivante :

$$\alpha = \cos^{-1} \left(\frac{\sum_{i=1}^{nb} t_i r_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^{nb} t_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{nb} r_i^2}} \right) \quad (4)$$

où nb est le nombre de bandes dans l'image, t est le spectre du pixel, r est le spectre de référence et α est l'angle spectral.⁴⁷ Ainsi, SAM compare l'angle entre le «endmember spectrum vector» et le vecteur de chaque pixel dans l'espace n-D. Les angles plus petits correspondent mieux au spectre de référence et les pixels plus loin que le seuil d'angle maximal spécifié en radians ne sont pas classifiés. Dans cette étude, une valeur SAM inférieure à 0,100 a été utilisée pour réduire la probabilité de faux positifs.

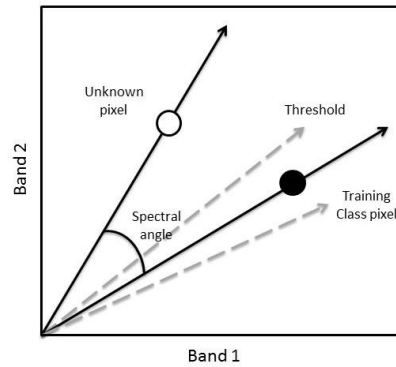


Figure 7. Illustration de l'angle spectral cartographique (SAM)

Finalement, il faut reconnaître que cette méthode est plus qualitative que quantitative. Par exemple, il est difficile de déterminer la concentration exacte ou le volume total d'une solution qui se retrouve dans un domaine d'imagerie choisi. De plus, des nanoparticules ayant un diamètre beaucoup plus petit 160 nm sont toutefois observables puisque la réfraction des nanoparticules est plus vaste, ainsi donnant un signal qui peut s'étendre sur quelques pixels. Par conséquent, il est possible que certaines nanoparticules se trouvent dans un même pixel, ce qui rend difficile de quantifier la concentration des nanoparticules. Une approche plus générale peut cependant être utilisée pour estimer la concentration des Ag NPs. Il suffit de calculer le nombre total de pixels qui correspondent aux bibliothèques spectrales pour une solution inconnue en le comparant aux autres valeurs de concentrations connues (0.1, 1, 2, 2.5 et 10 mg/L) des solutions de référence. Cependant, pour des solutions hétérogènes, il y a des problèmes avec cette approche puisque le nombre de pixels va grandement être influencé par les domaines d'imageries. En somme, l'EDM couplé avec l'HSI permet d'observer de faibles changements de taille et/ou de propriété de surface des Ag NPs *in situ* en faible concentration et dans des matrices complexes.

2.1.3. Spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif en mode de particules unique

La spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) est une technique couramment utilisée pour faire l'analyse de métaux à très faible concentration.⁴⁸ En effet, l'ICP-MS est une technique capable de détecter des métaux et quelques non-métaux à des concentrations au niveau du pg/L pour des solutions idéales avec un bruit de fond isotopique faible. Effectivement, selon le tableau 2, la limite de détection de l'argent est d'environ 90 pg/L.⁴⁹ Pour ce faire, l'échantillon est tout d'abord, introduit à l'aide d'un nébuliseur qui convertit le liquide en un aérosol qui est alors balayé dans le plasma pour créer les ions. Après que l'échantillon est injecté, la température extrême du plasma (de l'ordre de 10000 K) provoque l'échantillon à se séparer en atomes individuels (atomisation) qui sont ensuite ionisés dans le plasma ($M \rightarrow$

$M^+ + e^-$). Le plasma ionise partiellement le gaz d'argon ($Ar \rightarrow Ar^+ + e^-$) en pulsant un courant électrique alternatif dans les fils qui entourent le gaz d'argon. De plus, il y a quelques avantages à utiliser l'argon. Il y a un potentiel d'ionisation première supérieure à plusieurs autres éléments (ce qui fait en sorte que l'échantillon reste ionisé) et c'est un gaz rare qui est peu dispendieux. Le spectromètre de masse sépare les ions, à l'aide d'un analyseur quadripolaire, selon leur rapport masse sur charge (m/z) et un détecteur (une dynode du multiplicateur d'électron) reçoit un signal proportionnel à la concentration en ions.

Tableau II. Limite de détection ($\mu\text{g/L}$) des différents éléments pour l'ICP-MS et d'autres techniques pour l'analyse (tiré de PerkinElmer⁴⁹).

Element	Flame AA	Hg/Hydride	GFAA	ICP-OES	ICP-MS	Element	Flame AA	Hg/Hydride	GFAA	ICP-OES	ICP-MS
Ag	1.5		0.005	0.6	0.00009	Mo	45		0.03	0.5	0.00008
Al	45		0.1	1	0.0004 *	Na	0.3		0.005	0.5	0.0003
As	150	0.03	0.05	1	0.0004	Nb	1500			1	0.00004
Au	9		0.15	1	0.0001	Nd	1500			2	0.0003
B	1000		20	1	0.001	Ni	6		0.07	0.5	0.0002 *
Ba	15		0.35	0.03	0.00004	Os				6	0.00006
Be	1.5		0.008	0.09	0.0003	P	75000		130	4	0.04 *
Bi	30	0.03	0.05	1	0.00002	Pb	15		0.05	1	0.00004 *
Br					0.04	Pd	30		0.09	2	0.00003
C						Pr	7500			2	0.00003
Ca	1.5		0.01	0.05	0.0003 *	Pt	60		2.0	1	0.0001
Cd	0.8		0.002	0.1	0.00007	Rb	3		0.03	5	0.0002
Ce				1.5	0.00005	Re	750			0.5	0.0003
Cl					2	Rh	6			5	0.00004
Co	9		0.15	0.2	0.00006 *	Ru	100		1.0	1	0.0001
Cr	3		0.004	0.2	0.0003 *	S				10	0.9 *
Cs	15				0.00005	Sb	45	0.15	0.05	2	0.0002
Cu	1.5		0.014	0.4	0.0002 *	Sc	30			0.1	0.001
Dy	50			0.5	0.0002	Se	100	0.03	0.05	2	0.0003 *
Er	60			0.5	0.0001	Si	90		1.0	10	0.09
Eu	30			0.2	0.00007	Sm	3000			2	0.0002
F						Sn	150		0.1	2	0.0002
Fe	5		0.06	0.1	0.0005 *	Sr	3		0.025	0.05	0.00007
Ga	75			1.5	0.00008	Ta	1500			1	0.00001
Gd	1800			0.9	0.0003	Tb	900			2	0.00003
Ge	300			1	0.0006 *	Te	30	0.03	0.1	2	0.0003 *
Hf	300			0.5	0.0003	Th				2	0.00005
Hg	300	0.009	0.6	1	0.001	Ti	75		0.35	0.4	0.0002 *
Ho	60			0.4	0.00004	Tl	15		0.1	2	0.00001
I					0.003	Tm	15			0.6	0.00003
In	30			1	0.00008	U	15000			10	0.00002
Ir	900		3.0	1	0.00009	V	60		0.1	0.5	0.00007 *
K	3		0.005	1	0.001	W	1500			1	0.00003
La	3000			0.4	0.00004	Y	75			0.2	0.00002
Li	0.8		0.06	0.3	0.00005	Yb	8			0.1	0.0001
Lu	1000			0.1	0.00004	Zn	1.5		0.02	0.2	0.0007 *
Mg	0.15		0.004	0.04	0.0001	Zr	450			0.5	0.00007
Mn	1.5		0.005	0.1	0.0001 *						

All detection limits are given in micrograms per liter and were determined using elemental standards in dilute aqueous solution. All detection limits are based on a 98% confidence level (3 standard deviations).

Cependant, certaines combinaisons d'éléments isotopiques peuvent avoir la même m/z que l'élément à analyser, ainsi l'utilité de la cellule de collision/réaction. La cellule de collision/réaction est utilisée pour éliminer les ions interférents par des réactions neutres ou par ions. La cellule de réaction dynamique est située avant le quadripôle et remplit avec un gaz réactif ou de collision ou un mélange des deux, qui va réagir avec l'échantillon, ainsi éliminant une partie des interférences

Pour l'analyse de l'argent, il est mieux de mesurer l'isotope Ag-107 puisqu'il y a moins de possibilités d'interférents.⁵⁰ Cependant, en utilisant que l'ICP-MS de façon traditionnelle, il n'est pas possible de différencier entre les formes ioniques ou particulières d'Ag. Ainsi, cette technique est modifiée

en mode particule unique (SP-ICP-MS) pour mesurer les variations temporelles de l'ICP-MS afin de distinguer entre ioniques et particulaire en plus de déterminer la distribution de taille de ces particules.^{51, 52}
⁵³ Pour ce faire, il est important d'utiliser des solutions très diluées (dans l'ordre du ng/L) ainsi que d'optimiser le flux de l'échantillon et le temps d'acquisition (*dwel time* dans l'ordre du μ s-ms) de chacune des impulsions.⁵⁴ De ce fait, lorsqu'il n'y a pas de NP dans le temps d'acquisition, le détecteur va seulement mesurer l'argent ionique comme bruit de fond et il serait rare que plus qu'une NP sera détectée par temps d'acquisition. Lorsqu'il y a une NP dans le temps d'acquisition, elle va être ionisée créant une augmentation du signal équivalent à la masse de la NP. Suite à plusieurs milliers d'acquisitions de NP individuelles, une figure des intensités en fonction du temps est obtenue (Figure 8A). Par la suite, il est possible de déterminer la distribution de taille des particules (Figure 8B) à l'aide des équations suivantes :

$$C_p = \frac{f_p}{q_s N_{eff}} \quad (4) \quad m_p = \frac{q_s N_{eff} C_a}{q_{i,a}} n_{i,p} \quad (5) \quad d_p = \left(\frac{6m_p}{\pi\rho} \right)^{1/3} \quad (6)$$

où C_p est la concentration de particules, f_p est le flux de particules détectées dans le plasma, q_s est le taux de consommation des échantillons (mL/s), N_{eff} est l'efficacité de la nébulisation, C_a est la concentration de l'analyte dans un étalon dissous de l'analyte (g/mL), $q_{i,a}$ est le flux ionique mesuré pour la norme dissoute (s-1), $n_{i,p}$ est le nombre d'ions détectés dans une seule impulsion de l'SP-ICPMS, m_p est la masse d'analyte dans une particule et d_p est le diamètre d'une particule (sphère).

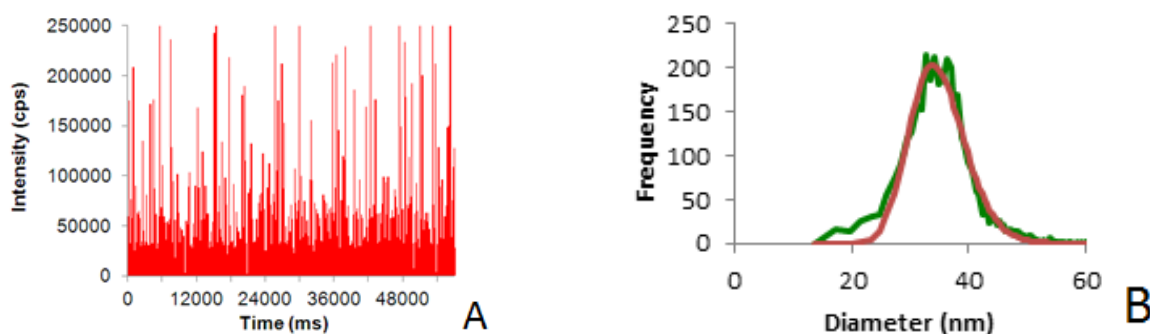


Figure 8. A. Spectre des acquisitions pris par SP-ICP-MS. B. Distribution de taille des particules selon l'intégration du spectre A.

Il y a plusieurs avantages à utiliser le SP-ICP-MS. Il permet de déterminer la distribution de taille de la solution, les espèces dissoutes, la concentration des particules (en nombre et en masse), est possible de distinguer des particules de différents éléments en plus d'effectuer des analyses isotopiques, mesure de très faibles concentrations (ng/L, pg/L), peut mesurer plusieurs échantillons à la fois et finalement peut être laissé sans surveillance.

Toutefois, le SP-ICP-MS possède également des limitations. Il doit avoir au minimum de 5 mL de solution, il n'est pas possible de travailler avec des solutions qui sont concentrées en matières particulaires (eaux usées), le développement de la méthode est parfois plus difficile que d'autres techniques, les solides sont limités dans l'échantillon. De plus, selon l'élément, il est difficile de distinguer les petites particules de l'ionique (la limite de taille pour la détection pour les Ag NPs est d'environ 8-10 nm).

2.2.4. Diffusion de lumière dynamique

La diffusion de lumière dynamique (DLS) est une technique d'analyse spectroscopique non destructive qui est utile pour déterminer la taille des particules en suspension. En effet, le DLS détermine le rayon hydrodynamique des particules en suspension, c'est-à-dire la taille effective de la particule détectée à partir de son mouvement brownien et qui aurait le même coefficient de diffusion que la particule considérée. Ainsi, la technique se fonde sur le principe du mouvement Brownien où les particules de petite taille vont se déplacer plus rapidement tandis que les particules de plus grande taille vont se déplacer plus lentement à cause de l'agitation thermique. Pour ce faire, ce système est muni d'un laser qui va sonder l'échantillon (qui a une polarisabilité différente de son entourage) qui est placé dans une cuvette. Lorsque la lumière atteint les particules, elle va se diffuser dans toutes les directions selon le principe de la diffusion de Rayleigh, c'est-à-dire que la longueur d'onde est beaucoup plus grande que la taille des particules diffusantes. De plus, l'intensité de la lumière diffuse va être en relation avec la direction de la polarisation de la lumière incidente, l'angle de diffusion et les paramètres de la solution.⁵⁵ Ainsi, pour déterminer le rayon hydrodynamique des particules, deux équations principales (7 et 8) sont utilisées pour déterminer le coefficient de diffusion et le rayon hydrodynamique.⁵⁶;

$$\frac{1}{\tau} = 2Dq^2 \quad (7) \qquad r_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta_s D} \quad (8)$$

où τ est le temps de relaxation, D est le coefficient de diffusion, q est le vecteur d'onde, r_H est le rayon hydrodynamique, k_B est la constante de Boltzmann, T est la température et η_s est la viscosité du milieu. Pour des temps de relaxations courts, la corrélation entre l'intensité diffusée des états initial et final est élevée. Les signaux sont pratiquement inchangés. La situation est sensiblement différente pour des temps de relaxations plus longs. Dans ce cas, le signal décroît exponentiellement. Ainsi, le temps pour que la fluctuation prenne place est le caractère du signal le plus important, car celle-ci informe sur les propriétés dynamiques des molécules en suspension. L'appareil utilisé, soit le Möbiuz permet également de mesurer la mobilité *Massively Parallel Phase Analysis Light Scattering* (MP-PALS) avec des faibles angles utilisent un détecteur complètement séparé des mesure de la taille (DLS) avec des angles élevés.

Cependant, les deux mesures utilisent bien sûr le même faisceau laser de haute qualité provenant d'un laser en mode longitudinal. De plus, il est également possible à partir de cette technique, de déterminer la mobilité électrophorétique (μ_e) de la solution, c'est-à-dire l'ensemble des mouvements des particules en suspension dans un liquide soumis à l'influence d'un champ électrique. Cette mesure de mobilité électrophorétique est un paramètre intéressant, car il est bon indicateur de la stabilité colloïdale des dispersions. Ainsi, cette technique possède plusieurs bénéfices, soient une facilité d'utilisation, la nécessité de faibles volumes d'analyte, est essentiellement très efficace à mesurer la taille des particules dans la gamme de 1 nm à 1000 nm avec une sensibilité de 0.1 mg/mL et possède une grande reproductibilité.

Cependant, cette technique possède également quelques limitations. En effet, cette technique va souvent surestimer la taille des particules par rapport à une mesure microscopique puisque elle mesure la particule entourée de sa couche d'eau. Cette technique aura également l'inconvénient d'être plus sensible à la présence des grosses particules au sein d'une population polydisperse, car celle-ci nécessite la connaissance de leur indice de réfraction complexe, rarement accessible. La présence d'impuretés ou d'agrégats est très visible même en très petit nombre. Le DLS possède une basse résolution, ainsi il est difficile de caractériser précisément un échantillon polydisperse avec des populations de taille qui sont étroitement espacées. Une source d'erreur peut être la diffusion multiple de la lumière, c'est-à-dire que la lumière dispersée par une particule est dispersée par une autre avant d'atteindre le détecteur ce qui compromet le calcul de taille des particules dans des échantillons plus concentrés.⁵⁷

Chapitre 3 : Optimisation et méthodologie

3.1. Création des bibliothèques spectrales

Lors des analyses de EDM-HSI, l'obtention d'une bibliothèque spectrale la plus complète possible et l'utilisation d'un seuil de l'angle spectral cartographique (SAM) conservatif (au plus bas) est idéal afin de minimiser les faux positifs. Pour créer une bibliothèque spectrale (SL), les nanoparticules d'intérêt doivent être placées entre deux lamelles de verre puisque l'objectif ($\times 100$) est à l'huile. Il est important de laisser la solution de NPs se reposer environ 30 minutes avant de prendre les images initiales, afin de laisser les NPs se fixer sur les lamelles. Autrement, le mouvement des NPs pendant l'acquisition va causer des lignes horizontales sur l'image. Dans ce travail, les paramètres idéaux pour des images où il y a le moins de diffraction lumineuse sont avec une source lumineuse à 60%, l'électromultiplicateur (EM) à $\times 50$, le pre-amp gain à $\times 1$ et un temps d'exposition de 250 ms. Lorsqu'une image est prise, la soustraction de la lampe doit toujours être appliquée afin d'éliminer tout signal de fond. Une fois l'image acquise, les pixels au centre des NPs sont sélectionnés puisque les extrémités peuvent parfois varier le profil spectral vers les plus longues ou courtes longueurs d'onde selon la diffraction lumineuse. Avec le logiciel de l'appareil, il y a un maximum de 150 profils spectraux qui peuvent être sélectionnés pour créer une SL. Lorsque les 150 (ou moins) profils spectraux sont choisis, il est important de filtrer ces spectres afin d'éliminer tous spectres qui divergent trop du total.

3.2. Optimisation de l'angle spectral cartographique

Tel que mentionné, la sensibilité de l'analyse va dépendre du réglage du seuil de l'angle spectral cartographique (SAM). Effectivement, l'algorithme du logiciel va comparer les spectres de la bibliothèque de référence avec celles de l'échantillon inconnu afin d'obtenir une image finale cartographiée qui est basée sur des signatures spectrales correspondant selon le SAM qui a été appliqué. Pour optimiser la valeur de SAM, plusieurs SAM entre 0.080 et 0.150 ont été appliquées sur une solution de Ag NP(cit) de 40 nm dans une eau ultra pure (MQW). Le SAM par défaut du logiciel est de 0,100 (Figure 9B), alors que cette valeur semble raisonnable, son utilisation peut mener à l'identification de faux positifs. Par exemple, on constate que pour des valeurs de SAM supérieures à 0.125 (Figure 9C) le logiciel peut associer des spectres plutôt différents ensemble et ainsi identifier des faux positifs. Effectivement, en comparant les spectres B et C de la figure 9, on aperçoit qu'un SAM de 0.150 ne prend pas compte l'élargissement du spectre en plus de son déplacement de plusieurs dixièmes de nm vers les plus hautes longueurs d'onde. Ce peut donc causer de

problèmes majeurs lors de l'analyse dans des matrices complexes où il peut y avoir plusieurs spectres différents qui ne correspondant pas nécessairement aux Ag NPs. Ainsi, dans cette étude, une valeur SAM inférieure à 0,100, soit entre 0.080 et 0.090 (Figure 9A) a été utilisée pour réduire la probabilité de faux positifs, afin de s'assurer que les pixels identifiés correspondent pratiquement parfaitement à celles de la librairie spectrale pour assurer la validité des résultats.

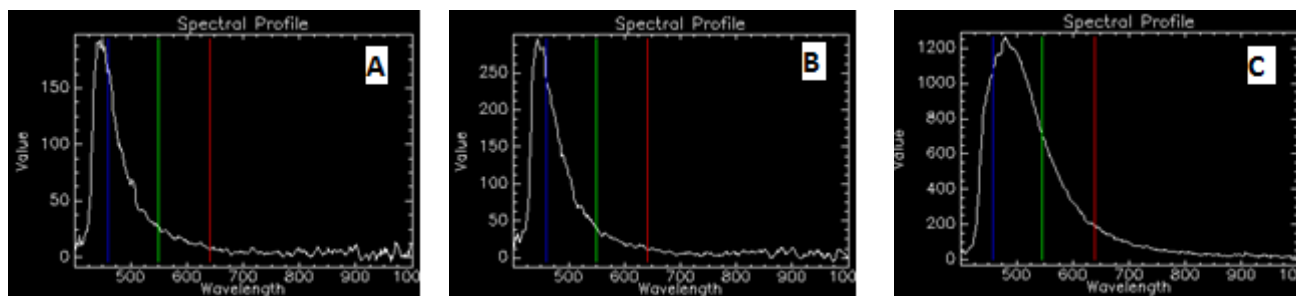


Figure 9. Profil spectral qui correspond aux libraires spectrales des Ag NP(cit) 40 nm avec un SAM de A. 0.080, B. 0.100 et C. 0.150

3.3. Introduction des nanoparticules dans les biosolides

Une grande partie du projet était focalisé sur l'analyse des Ag NPs dans des biosolides. Dans certaines expériences, une méthode adaptée a été utilisée afin de recréer un environnement où les Ag NPs se retrouveraient dans des biosolides (possible sulfidation des Ag NP⁵⁸). Ce processus comporte deux étapes: les biosolides sont mélangés avec une masse égale d'eau et placés dans un récipient fermé pendant trois jours pour créer une suspension anaérobie. Les NPs sont ajoutés, et la suspension de biosolides/NPs est « mûri » pendant encore 2 jours. Les périodes de vieillissement peuvent être modifiées selon les besoins. Pour sulfider les biosolides, il est important de dégazer l'eau Milli-Q avec un gaz inerte (Ar ou He) pendant environ 10 minutes. Par la suite, les biosolides à 20% de matières sèches étaient mélangés avec une masse égale d'eau dégazée dans une bouteille en polypropylène. Par la suite, la bouteille était scellée et vortexée pendant 30 secondes pour créer une suspension, la bouteille était couverte par une feuille d'aluminium et placée sous une hotte pendant 3 jours. Par la suite, les NP ont été introduites sous forme de dispersion (si les NPs étaient initialement sous forme de poudre). Pour ce faire, il faut agiter le flacon de biosolides vigoureusement pendant 30 secondes puis pipetter la dispersion de NPs dans la suspension de biosolides. Puis, il faut refermer la bouteille, vortexer pendant 30 secondes puis recouvrir la bouteille avec une feuille d'aluminium et laisser sous une hotte pendant 2 autres jours.

Lors des analyses EDM-HSI, il est parfois nécessaire de rediluer la solution de biosolides/NPs, car si la solution est beaucoup trop dense, il n'est pas possible d'obtenir une image accommodante. En effet, la figure 10A. démontre bien l'épaisseur de l'échantillon, d'où la difficulté de faire la mise au point sur le côté gauche de l'image ainsi qu'une couleur très foncée qui ne représente pas de l'eau sans particules. Cependant, lorsque suffisamment dilués, les biosolides diffractants et laisse passer suffisamment de lumière pour poursuivre des analyses EDM-HSI (Figure 10B). Il est important de noter que le noir qui entoure la particule de la Figure 10B est bien dû à de l'eau sans particules.

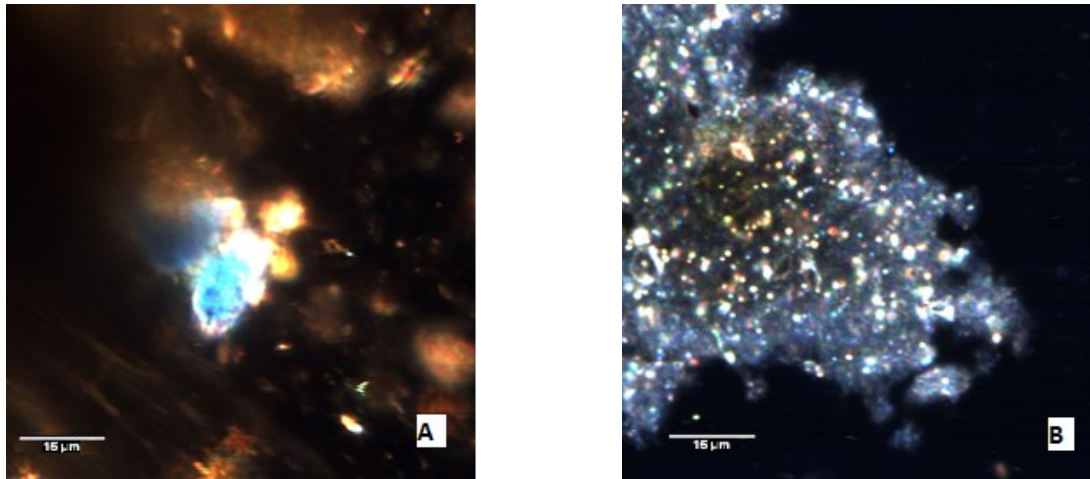


Figure 10. Image hyperspectrale des biosolides à 20% de matière sèche et Ag NP(cit) 40 nm A. sans dilution et B. avec dilution 50 % dans MQW.

Chapitre 4 : Article - Evaluation of enhanced darkfield microscopy and hyperspectral analysis to analyse the fate of silver nanoparticles in wastewater and biosolids

Trevor Théoret^a and Kevin J. Wilkinson^{a,†}

^a Biophysical Environmental Chemistry Group, Department of Chemistry, University of Montreal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montreal, QC, Canada H3C 3J7.

† corresponding author: kj.wilkinson@umontreal.ca

Electronic Supplementary Information (ESI) available: See DOI: 10.1039/x0xx00000x

Abstract

Nanomaterials are a class of emerging contaminants that are increasingly found in industry and the environment. In environmental media, their detection is often complicated by: their low concentration the presence of high concentrations of natural colloids and the complexity of the matrix. Enhanced darkfield microscopy (EDM) coupled to hyperspectral analysis (HSI) is a recently developed tool that can be used to facilitate the localization and identification of nanoparticles and follow their fate *in situ*. The objective of this work was to evaluate the capacity of EDM-HSI to evaluate the fate of silver nanoparticles in wastewaters and biosolids. By coupling EDM with a pixel by pixel spectral analysis, transformation kinetics of several different silver nanoparticles (40, 80 and 100 nm) with different coatings (citrate and polyvinylpyrrolidone) could be analysed on a particle by particle basis in complex media (wastewater, biosolids). Results demonstrated that when spiked into complex systems containing natural organic matter, many of the nanoparticles were rapidly transformed (over a period of 2 hours), as shown by a wavelength shift attributed to their plasmonic resonance (450 to 570 nm), which demonstrated a 95% decrease in signal intensity. Based upon complementary results obtained by dynamic light scattering (DLS) and single particle inductively coupled plasma spectrometry (SP-ICP-MS), it was possible to attribute the changes not to particle aggregation or dissolution but rather to the adsorption of natural organic matter to the particle surface. The paper demonstrates that the properties of the nanoparticles in complex systems are very different from those in simple systems.

Introduction

Silver nanoparticles (Ag NPs) are used increasingly for their antibacterial properties and are found in several different consumer products including bandages, clothing, textiles, paints, food packaging and surgical instruments.⁷ The release of Ag NPs to the environment can therefore not be completely avoided. Blaser et al.⁵ have shown that Ag NPs will likely attain wastewater treatment plants (WWTP), where depending on the type of treatment facility, only a fraction of the Ag NP will be removed before the effluent returns to the environment. The resulting increase in environmental concentrations will increase the potential risk to human⁵⁹ and environmental health.⁶⁰

The fate, bioavailability and toxicity of silver nanoparticles (NP) is directly related to the forms in which they are found.^{61,62} Changes in the particle activity are highly dependent on their size, particle shape, solubility and surface properties.⁶³ Hence, any determination of the risks associated with Ag NP must take into account the release of silver ions, their complexation (e.g. sulfides, chlorides), the sorption of organic matter to the NP surface, modifications to the NP oxidation state and agglomeration, among other important reactions.^{6,11} For example, several studies have shown that under anaerobic conditions, Ag NPs can be transformed from elemental Ag to Ag sulfides in biosolids⁶⁴ and the sulfidation kinetics under anaerobic conditions will be strongly influenced by the particle size.⁶⁵ Indeed, results from Kaegi et al.¹⁶ have shown that Ag NPs were nearly completely (>90%) transformed to Ag₂S within 2 hours when spiked in nonaerated liquor whereas they remain predominantly metallic Ag for at least 2 hours when spiked into aerated liquor. Nonetheless, the relationship between the surface properties of the Ag NPs and their environmental fate is still incomplete. Given that most Ag NPs may end up in wastewater biosolids or WWTP effluents, it is thus critical to better understand their behavior in these complex systems.

In this study, our objective was to evaluate the capacity of enhanced darkfield microscopy coupled to hyperspectral imaging (EDM-HSI) to follow, with a high temporal and spatial resolution, transformations of the Ag NP in wastewaters and biosolids. While, darkfield microscopy has been used for many years for the detection of live and unstained biological samples^{66, 67}, EDM-HIS is a fairly recent advancement that has recently been applied to the detection and characterization of engineered nanoparticles in environmental systems.⁸ EDM-HSI should, in principle, allow individual NP to be followed under minimally perturbing or *in situ* conditions.

In EDM, darkfield based illuminators are able to focus highly collimated light at oblique angles to the sample in order to obtain images with improved contrast and improved signal-to-noise. By collecting light that is scattered by the specimen, the technique results in bright objects on a black background. Analysis of the spectral signature of the scattered light (i.e. hyperspectral analysis) can provide some molecular information on the sample. For example, elements such as Ag and Au have distinct spectral libraries (narrow peaks) that are representative of the element and easy to identify. Furthermore, increases in particle size are known to cause a red shift of the spectral signature by tens of nm^{68, 69}. In contrast, ionic silver does not give a detectable peak by this technique.

In this study, EDM-HIS was used to characterize six Ag NPs in the presence or absence of a wastewater effluent. The influence of NP coatings and size on the spectral signature of the Ag NPs was examined. Dynamic light scattering (DLS) and single particle inductively coupled mass spectrometry (SP-ICP-MS) were used to obtain complementary information on these complex systems. Finally, transformations of the Ag NPs were evaluated as a function of time by following the shift in their spectral profiles.

Experimental

Sample preparation. Commercially available Ag NP (NanoXact silver, nanoComposix, USA) with sizes of 40, 80 and 100 nm and either a citrate (cit) or polyvinylpyrrolidone (PVP) coating were used for all experiments. Wastewater biosolids were collected from a wastewater treatment plant in Terrebonne, Quebec, Canada on June 9, 2015 and stored at 4°C until use. Experiments were performed with either the raw biosolids or by using the supernatant from the biosolids. The supernatant was collected by first lightly centrifuging the biosolids (4000 x g) in a Heraeus Multifuge 1 S-R centrifuge for 30 min. At the end of the centrifugation cycle, the supernatants were collected with a syringe and filtered through a 0.45 µm sterile nylon filter (Fisherbrand). Wastewater was spiked with Ag NP at a concentration of 2 mg L⁻¹. This concentration was selected in order to maximize the number of particles in each image (≥ 50) in order to ensure good statistical reproducibility in the data. Ten µL of a spiked wastewater was transferred onto a depression slide that was sealed with a cover slip in order to minimize sample drying.

Enhanced darkfield microscopy (EDM)/ Hyperspectral Imaging (HSI). Optical images and hyperspectral images and data were captured using a research grade optical microscope (Olympus BX43) equipped with an advanced darkfield illumination system and integrated hyperspectral analysis (CytoViva). An Andor iXon3 camera was used to acquire images that were 512 by 512 pixels. Spatial and spectral data (wavelengths between 400 and 1000 nm) were collected at 100x, resulting in a pixel size of about 160 nm

X 160 nm. Detection of a NP occurs when the signal for the material in any given pixel is greater than the background noise. Analysis sensitivity depends upon the setting of the spectral angle mapping (SAM) threshold. Very small values (i.e. in the range of 0.05-0.10) indicate a highly conservative filter that will only identify particles with a spectral profile that is very similar to a given standard (reference spectral library), whereas higher values (typically in the range of 0.11-0.25) can be used to more easily identify particles, but with a greater probability of false positives. Except when otherwise stated, a SAM value of 0.08 was used in this study. Reference spectral libraries were created by analysing solutions containing the Ag NPs of interest (same size and coating) in Milli-Q water (18.2 M Ω cm, organic carbon <2 μ g C L⁻¹). Hyperspectral images were generated by comparing spectra from the reference library with those in an unknown sample in order to produce an image that is based on matching spectral signatures (for a given SAM value).

Single Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (SP-ICP-MS). Ag NPs were also measured by single particle inductively coupled plasma mass spectroscopy (SP-ICP-MS; PerkinElmer NexIon 300Q). SP-ICP-MS was used for the simultaneous measurement of dissolved Ag and nAg. The sample introduction system consisted of a quartz cyclonic spray chamber, type C0.5 concentric glass nebulizer and a quartz 2 mm bore injector. Time resolved signals were acquired in fast scan mode⁵⁴ using the Syngistix nano application module integrated into the NexION software (version 1.6 Build 1.6.4242.0). The theoretical basis of SP-ICP-MS, especially with respect to its ability to determine NP size distributions and for discriminating between dissolved and particulate metals has been described in the literature.^{70, 71}

Silver standards were prepared from a reference solution of 1000 mg L⁻¹ Ag in 2% HNO₃, purchased from Fisher Scientific. For SP-ICP-MS analysis, Ag NPs were spiked into a filtered wastewater at a concentration of 100 ng L⁻¹ (samples must be sufficiently diluted so that during a defined short detection interval (dwell time), only a single particle is measured). The non-acidified samples were analyzed for 15 seconds every five minutes over a period of 3 hours in order to follow the evolution of the Ag NP sizes and dissolution. Particles were discriminated from the background signal using a 3 σ methodology (Syngistix software) or using a value of $\sigma=3$ to 5 during manual processing (homemade software). In this work, data acquisition parameters in the single particle mode were as follows: 1 sweep per reading; 60000 readings per replicate; 500 μ s dwell time; ¹⁰⁷Ag. The size distributions of the Ag NPs were determined from a statistical distribution of their pulse intensities.

Dynamic Light Scattering (DLS). Hydrodynamic sizes of the nanoparticles were determined by dynamic light scattering (DLS) using a Mobius light scattering instrument (Wyatt Technology). In this case, Ag NPs were added to a filtered wastewater at a concentration of 1 mg L⁻¹. Samples were analyzed every minute for 1 hour and then every 5 minutes for the next 2 hours using an acquisition time of 5 seconds (repeated 4x). Phase analysis light scattering was used to determine the electrophoretic mobilities of the NP using an acquisition time of 20 seconds, an electric field frequency of 10.0 Hz and a voltage amplitude of 2.5 V. Samples were measured in triplicate at a fixed temperature of 20 °C. Dynamics 7.2.4 software was used for data acquisition and data treatment.

Transmission electron microscopy (TEM). Samples were characterised by TEM (JEOL; model JEM-2100F with a LaB6 electron gun operated at 200 kV) by placing a droplet of Ag NP with a total Ag concentration of 2.0 mg L⁻¹ (in Milli-Q water) on a carbon coated copper electron microscopy grid (Electron Microscopy Sciences), The grid was left to dry under indirect laminar flow for 24 h prior to imaging. Particle diameters were determined using ImageJ software on 50-70 particles. Surface areas were estimated directly from the TEM software (under the assumption of spherical particles).

Transformation kinetics by assuming a first order rate constant.

Rate constants for the transformation of silver nanoparticles in the wastewater were determined by assuming a first order kinetics. Only data points with >10% identified pixels with respect to the control were used in the calculations (n=4). A Student t-test was performed in order to determine if constants were significantly different from zero.

Results and Discussion

Characterization of the Ag NPs. The measured properties of the different Ag NPs are provided in Table 3. Sizes measured by both TEM and DLS were very close to the nominal values, although hydrodynamic diameters for the PVP coated Ag NPs were greater those observed for the citrate stabilized NP, likely due to the thickness of the organic coating. The observed high electrophoretic mobilities ($>\pm 2 \mu\text{m s}^{-1} \text{V}^{-1} \text{cm}$) are indicative of stable colloidal suspensions.

Tableau III. Physical diameters (determined by TEM), hydrodynamic diameters (determined by DLS), electrophoretic mobilities and surface areas for the Ag NP. Standard deviations are provided in parentheses (N=50 for TEM, 5 for DLS, 31 for EPM)

Ag NPs	Physical diameters (nm)	Hydrodynamic diameters (nm)	Electrophoretic mobilities ($\mu\text{m s}^{-1} \text{V}^{-1} \text{cm}$)
40 nm citrate	39 ± 5	42 ± 3	-3.06 ± 0.04
80 nm citrate	79 ± 8	81.2 ± 0.4	-2.48 ± 0.09
100 nm citrate	103 ± 10	106.5 ± 0.4	-3.0 ± 0.1
40 nm PVP	39 ± 5	54 ± 4	-3.1 ± 0.5
80 nm PVP	80 ± 9	91.6 ± 0.6	-2.8 ± 0.3
100 nm PVP	103 ± 11	117 ± 2	-2.2 ± 0.2

Reference spectral profiles in Milli-Q water. Reference spectral libraries were first generated from control solutions of Ag NP in Milli-Q water (Fig. 11). The spectral profile of the Ag NPs was highly distinctive, consisting of a single, thin peak resulting from Rayleigh scattering and amplified by surface plasmonic effects.⁷² As expected, based upon the literature^{68, 69}, the nanoparticles with the larger diameters had maximum intensities in their spectral profiles at higher wavelengths, independent of their coating. For example, the Ag NPs with both citrate and PVP coatings had maxima of 450, 465 and 500 nm for the 40, 80 and 100 nm Ag NP, respectively. When the NPs were followed over time, few changes were observed in the Milli-Q water. Indeed, the stability of the colloidal suspension could be quantified by applying the spectral profiles obtained for the original Ag NP (Fig. 11) to subsequent images that were generated as a function of time. Using the fairly conservative SAM value of 0.08, nearly 100% of the Ag NPs were detected after 5 hours (Fig. S18), indicating that NP size was constant and agglomeration was negligible in the Milli-Q water over this time frame.

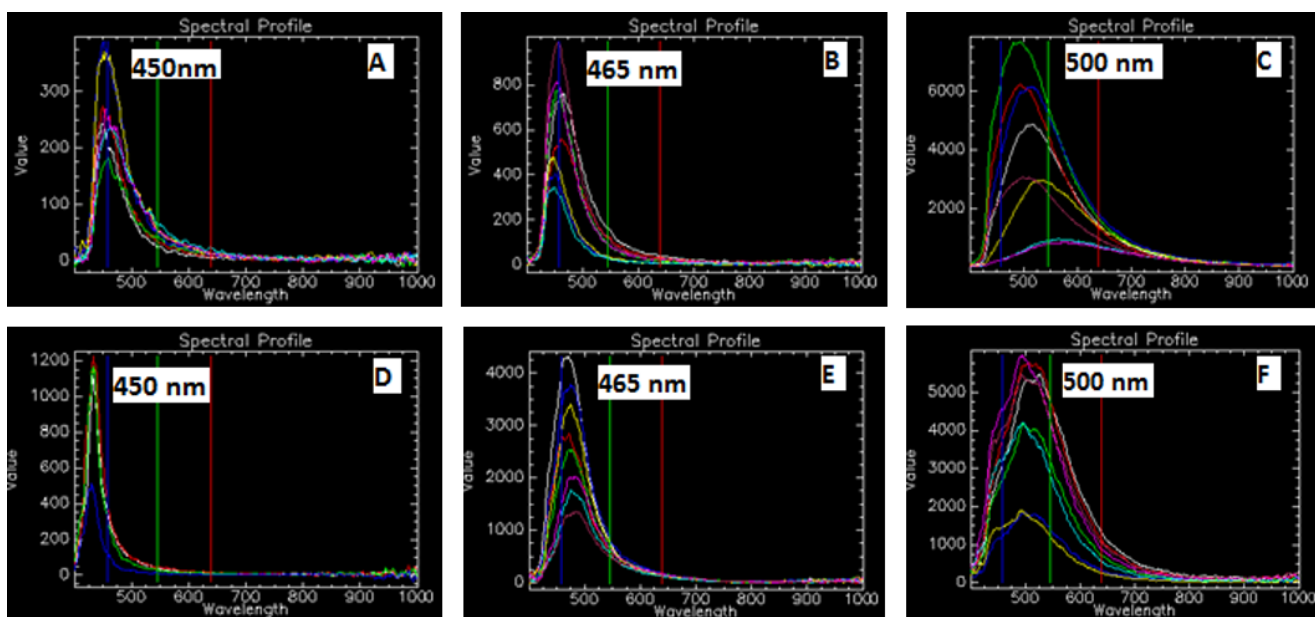


Figure 11. Spectral libraries generated for A) 40 nm Ag NPs (cit) B) 80 nm Ag NPs (cit) C) 100 nm Ag NPs (cit) D) 40 nm Ag NPs (PVP) E) 80 nm Ag NPs (PVP) F) 100 nm Ag NPs (PVP) in Milli-Q water.

Nanoparticle transformations in the wastewater. EDM HSI was performed to see if Ag NPs could be detected in the wastewater matrix. In the absence of added Ag NP, darkfield images (Fig. 12A, B) and their corresponding spectral profiles (Fig. 12C, D) were first acquired for the filtered or non-filtered wastewater. Clearly, the spectral peaks produced by the scattering of the biosolids were much wider and often less intense than those generated by the Ag NP. Application of the reference spectral libraries of the Ag NP (Fig. 11) to the wastewaters in Fig. 12 using a large SAM value of 0.15 generated no positive matches.

When Ag NPs were added to the filtered supernatant of the wastewater, both the color and the spectral profile of the Ag NP evolved with time, shifting to longer wavelengths (Figure 13). Indeed, both the images and the spectral profiles observed at 8 min. were significantly different from those observed after 180 min. Note that during these experiments, exposure of the Ag NP to light was minimized by turning off the microscope lamp between measurements (i.e. Ag NP are photosensitive^{73 74}). In addition, the experiment was performed using both sealed and non-sealed slides, where no significant signs of evaporation were observed.

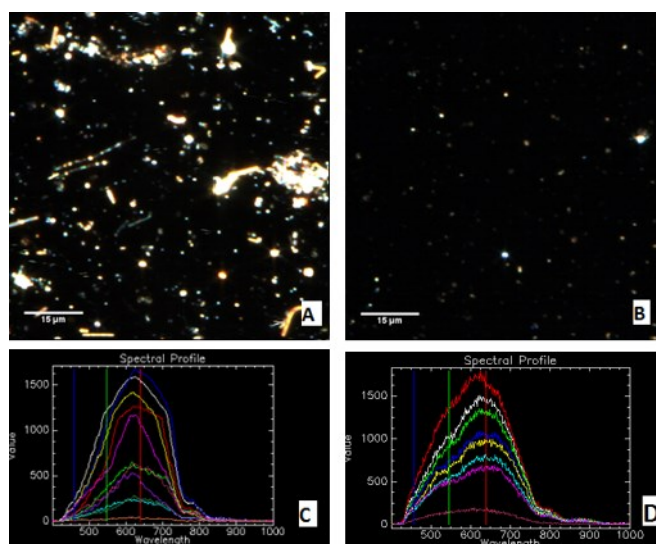


Figure 12. Hyperspectral image of A) unaltered wastewater B) filtered supernatant of wastewater without Ag NP C) Spectral libraries generated from Fig. 12A. D) Spectral library generated from Fig. 12B.

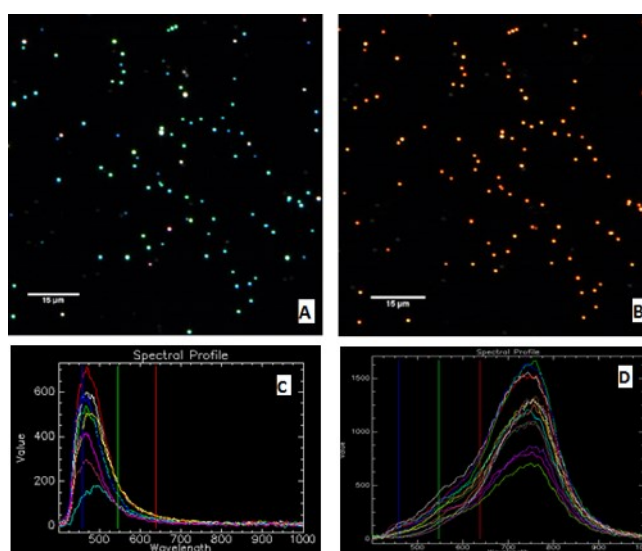


Figure 13. (A) Hyperspectral image of 2 mg L^{-1} of the 40 nm Ag NP(cit) in filtered wastewater after 8 minutes. (B) Hyperspectral image of the same field of view after 180 minutes. (C) Spectral profile generated from points in Fig. 13A. (D) Spectral profile generated from points in Fig. 13B.

Similar to the measurements performed in the Milli-Q water (Fig. S18), NP aging was evaluated by applying the spectral profiles obtained for the original Ag NP (Fig. 11) to the images generated in the wastewaters. The number of pixels detected as Ag NP were followed over time. For example, for the 40 nm citrate stabilized Ag NP, particles were no longer detectable following the first hour of exposure (Fig. 14A). A decrease in detected pixels could indicate several possible transformations: (i) dissolution of the Ag NP, either completely or below method detection limits (likely blue shift); (ii) growth or homoagglomeration of the Ag NP (likely red shift); (iii) modification of the surface properties

(aging/sorption) of the Ag NP (red or blue shift). Given the observed red shift in the spectra (Fig. 13), mechanism (i) was unlikely here. Interestingly, the transformations appeared to occur more rapidly for the smaller NP and for the Ag NP that were stabilized by citrate as opposed to those stabilized by PVP. Indeed, when applying the spectral profile for the corresponding Ag NP determined in Milli- Q water, all three sizes of PVP coated Ag NP could be detected over the entire 3 hour experiment (Fig. 14B).

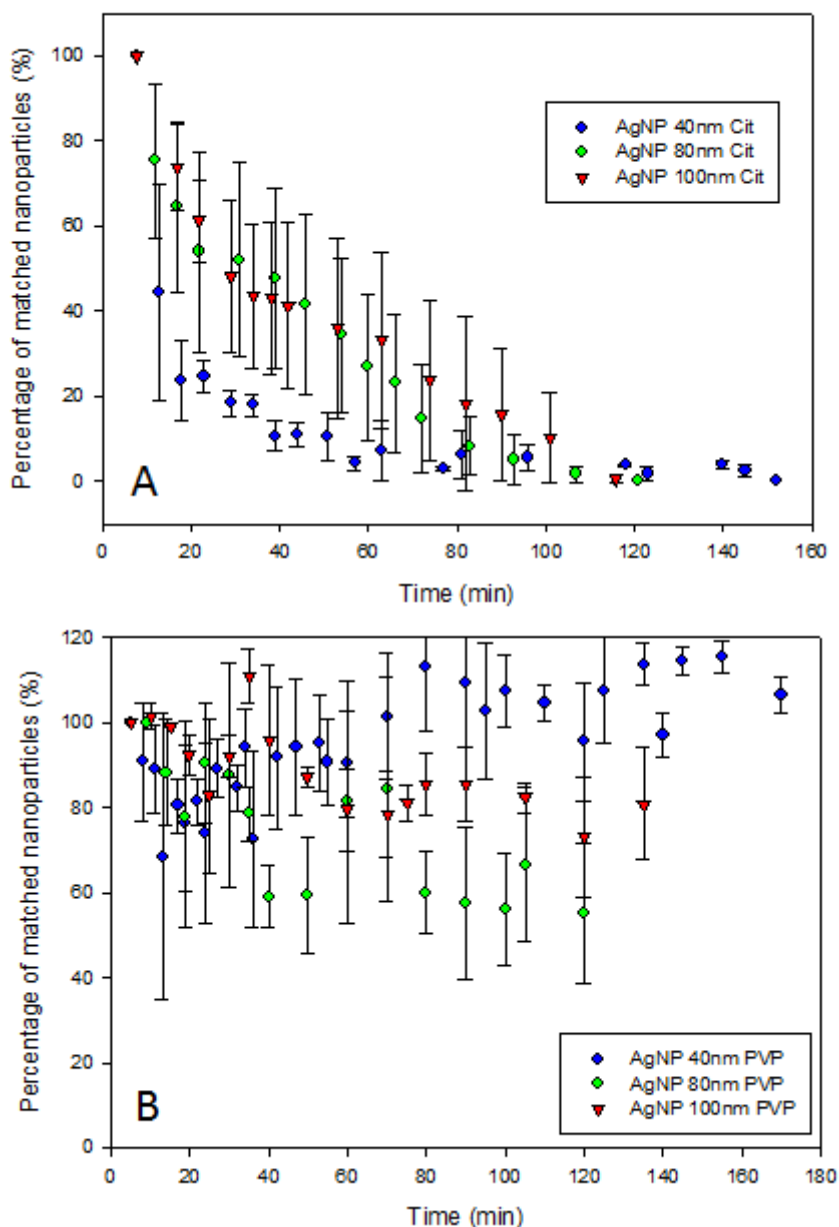


Figure 14. A) Relative proportion of pixels where Ag NP are identified (normalized to the initial number of positively identified pixels) for 2 mg L^{-1} of citrate coated silver nanoparticles in the wastewater as a function of exposure time ($n=6$); B) Identification of 2 mg L^{-1} of polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles (Ag NP (PVP)) in wastewater as a function of exposure time ($n=6$).

By assuming first order kinetics, it was possible to determine rate constants for the transformations of each of the NP (Table 4). As seen in Fig. 14, the rate constants for the citrate stabilized NP seem to have increased with decreasing size since larger surface areas are expected to lead to higher rates of adsorption. Indeed, specific surface areas were higher for the 40 nm NP (14.2 m²/g) as opposed to the 80 nm (7.1 m²/g) or 100 nm (6.5 m²/g) NP. For the 40 nm PVP stabilized NP, its constant was not significantly different from zero (t-test T<= t (0.21)), i.e. no significant changes were observed for the Ag NP (PVP) in the wastewater.

Tableau IV. Transformation kinetics of the silver nanoparticles in wastewater by assuming a first order rate constant ($\ln[A] = \ln[A]_0 - kt$). Only data points with >10% identified pixels with respect to the control were used in the calculations (n=4).

Type of Ag NP	1st order rate constant
40 nm Cit	k = 0.047 ± 0.002
80 nm Cit	k = 0.026 ± 0.009
100 nm Cit	k = 0.020 ± 0.003
40 nm PVP	k = -0.002 ± 0.02
80 nm PVP	k = 0.006 ± 0.001
100 nm PVP	k = 0.002 ± 0.001

Two lines of evidence were examined to discriminate between mechanisms ii and iii (above). First, particle sizes were determined with time in order to verify whether the red shift in the spectral profile was caused by an increase in particle size. SP-ICP-MS indicated that particle diameters were stable over long periods of time (up to 16 days; Fig. 15C) whereas DLS showed a small increase in particle size and a large increase in polydispersity (PDI; measurement of the heterogeneity of sizes of particles in a mixture) with time (Fig. 16C). Indeed, while physical particle diameters determined by SP-ICP-MS were constant at 37 nm for the Ag NP core, the average intensity-weighted hydrodynamic diameter of the Ag NP(cit) in the filtered wastewater increased from 43 nm to 55 nm to 61 nm for times of 9 minutes, 181 minutes and 16 days, respectively. Similar results were obtained with the other sized citrate coated Ag NPs (Table S6). Although both SP-ICP-MS and DLS are effective tools for determining nanoparticle size distributions, DLS determines a *hydrodynamic* diameter that reflects the size of the entire particle whereas SP-ICP-MS determines a *physical* size that is based upon the mass (core) of Ag. The results are therefore consistent with the adsorption of an (several nm thick) organic layer on the particles. Nonetheless, it should be noted that agglomeration cannot be excluded since different concentration ranges are probed with the two techniques (mg L⁻¹ ranges for DLS vs. ng L⁻¹- µg L⁻¹ for SP-ICP-MS). For lower Ag NP concentrations, less agglomeration¹⁰ and more dissolution is typically observed.⁷⁵

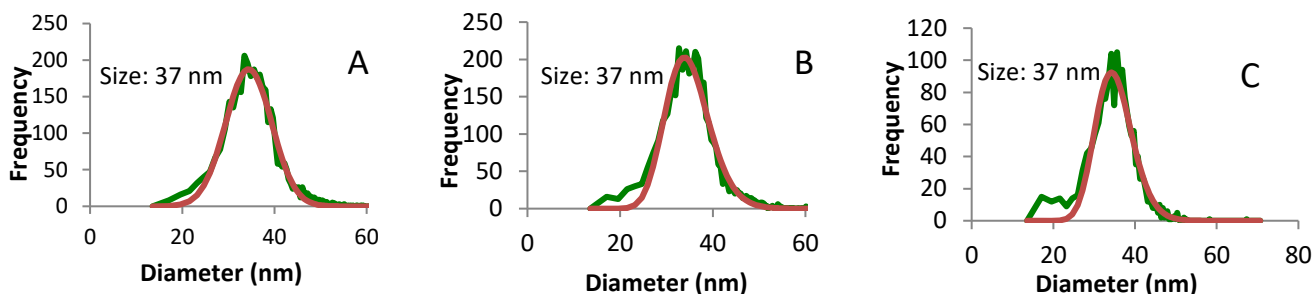


Figure 15. Distributions of the physical diameters of the 40 nm Ag NP(cit) ($0.100 \mu\text{g L}^{-1}$) in the filtered wastewater as determined by SP-ICP-MS A) after 9 minutes; B) after 181 minutes; C) after 16 days. The green line represents the frequency and the red line represents the average of the histogram.

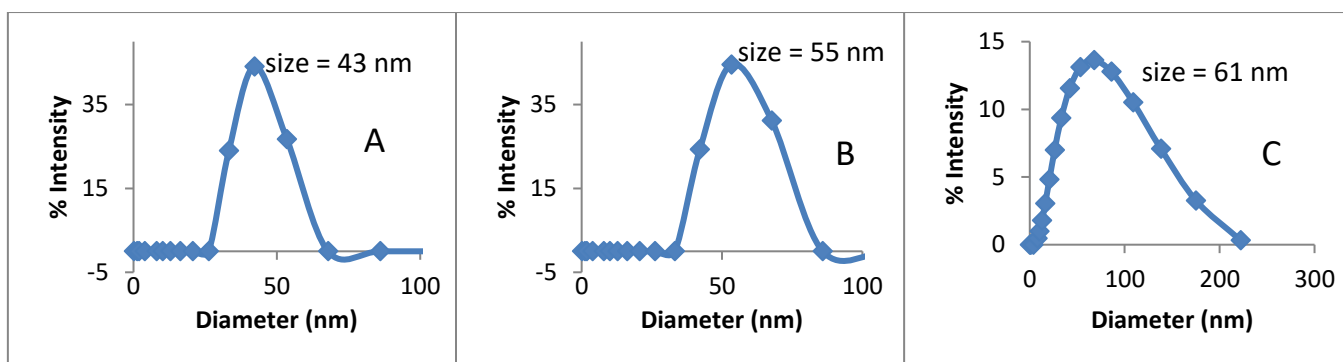


Figure 16. Distributions of hydrodynamic diameters (model Rayleigh spheres) of the 40 nm Ag NP(cit) (0.2 mg L^{-1}) in filtered wastewater as determined by DLS after A) 9 minutes (diameter $43 \pm 2 \text{ nm}$; polydispersity index = 23.7%); B) 181 minutes (diameter $55 \pm 2 \text{ nm}$; polydispersity index = 17.4%) C) 16 days (diameter $61 \pm 3 \text{ nm}$; polydispersity index = 61.5%).

Second, the rate of transformation was followed as a function of NP concentration (Fig. 17). As discussed above, homoagglomeration is likely to increase with increasing NP concentration, whereas given the increased NP surface area over which the organic ligands would be spread out, adsorption (i.e. heteroagglomeration⁷⁶) should decrease with increasing NP concentration (for a given concentration of organic macromolecules). Therefore, the observed increase in the rate of red shift that was observed for the lower concentrations of the NPs is consistent with the adsorption mechanism. Finally, the adsorption of organic matter is also consistent with the results observed in Fig. 14A/Table 4 where the rate of red shift was a function of particle size.

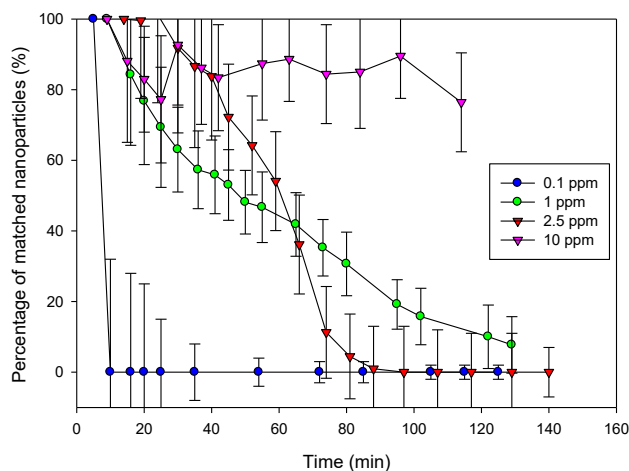


Figure 17. Identification of the 40 nm citrate coated Ag NP as function of particle concentration in the wastewater (n=3).

The above results show that in the wastewaters, the EDM HSI signal (i.e. red shift) was mainly affected by the adsorption of organic macromolecules onto the surface of the Ag NPs rather than by a particle agglomeration. Furthermore, the process was more likely for the citrate stabilized, as opposed to the PVP stabilized Ag NP. Citrate is a smaller and more weakly bound molecule³¹ than PVP. Even in its presence, it is likely that organic macromolecules from the wastewaters could be adsorbed to the Ag surface⁷⁷ via hydrophobic or van der Waals forces that could overwhelm the limited electrostatic repulsion. The spectral profile of the PVP coated Ag NP in the wastewater was more stable over time, in agreement with the more uniform and dense nature of the PVP, which not only limits agglomeration due to both steric and electrostatic repulsion but will also limit the adsorption of organic matter.¹¹ Indeed, PVP has previously been shown to be a highly effective polymer for stabilizing Ag NPs³⁵, which changes very little under different ionic strength regimes.⁴

Advantages and limitations of EDM HIS for the study of wastewaters

EDM HIS possesses a number of advantages for the detection of nanoparticles in unaltered, complex media, including wastewaters, soils, or biological media. Its application to environmental samples is obvious given its high sensitivity and the limited sample preparation that is required, especially when compared to transmission electron microscopy. The technique

typically achieves a signal to noise ratio that is up to seven times better than standard dark field microscopy⁴³, allowing visualization, even in very heterogeneous matrices. Spectral peaks generated by NPs of the noble metals are highly distinctive, especially with respect to the peaks that are produced by the scattering of colloidal or particulate matter in wastewaters. Furthermore, peaks for the noble metals are often less broad and more intense, which will limit the number of false positives.

Nonetheless, the technique is limited to detecting NP concentrations for concentrations $> \sim 0.1$ mg L⁻¹ (approx. one NP per field of view) and particle diameters ≥ 5 nm. Indeed, although the technique acquires information on individual nanoparticles, it would be difficult to get quantitative information on particle concentrations or transformations for statistically insignificant numbers of NP. Furthermore, given that it is a microscopic technique, out-of-focus objects in the background are sometimes able to mask the analytical signal by reducing contrast on the objects. Artifacts such as dust and debris in the imaging chamber can also contribute to a reduction in image quality. A final limitation of the technique is respect to the upper limit of particulate matter that can be present. In this study, it wasn't possible to detect Ag NPs in matrices containing $>80\%$ particulate matter since images acquired directly on the biosolids gave an analytical signal that was either too intense (too much scattering) or didn't let sufficient light pass in order to detect the Ag NPs.

Conclusions

We have described a quantitative validation of the EDM HSI technique for visualizing nanoparticles in complex matrices (in this case, wastewater effluent and wastewater biosolids). EDM HIS was able to follow some transformations (aging) of the NP in complex media. Based upon measurements made on individual Ag NPs, the presence of the wastewater greatly influenced their spectral properties. By using complementary data from SP ICP-MS and DLS, it could be concluded that adsorption of natural organic matter was likely responsible for the significant shifts in spectral properties. Although the peaks corresponding to Ag NP can shift according to their sizes, shapes, state of agglomeration and composition (including adsorbed substances), the profiles for the noble metals (Ag, Au) are highly distinctive and thus highly indicative of Ag NP. Although we ultimately found that the spectral properties of the Ag NP in the wastewaters were not as constant as we had originally hypothesized, our work demonstrated

that EDM HSI can be used for detecting and characterizing the transformations of the NP, a result that will be useful when quantifying NP aging or characterizing the NP in complex media.

Acknowledgements

Funding for this work was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Environment Canada and the *Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies*.

Chapitre 5 : Supporting information for Evaluation of enhanced darkfield microscopy and hyperspectral analysis to analyse the fate of silver nanoparticles in wastewater and biosolids

Trevor Théoret^a and Kevin J. Wilkinson^{a,†}

^a Biophysical Environmental Chemistry Group, Department of Chemistry, University of Montreal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montreal, QC, Canada H3C 3J7.

† corresponding author: kj.wilkinson@umontreal.ca

Tableau V. Characteristics of wastewater (WW) mixed liquor and effluent collected from La Prairie's wastewater treatment plant.

WW Sample	pH	Conductivity ($\mu\text{S/m}$)	ORP (mV)	DOC (mg/L)	TOC (mg/L)	Suspended solids (TSS) (mg/L)
Secondary aeration tank (WW mixed liquor)	7.13 \pm 0.01	1030 \pm 2	+257 \pm 1	39.7	2131.5	1823 \pm 60
Secondary settling tank (WW effluent)	7.28 \pm 0.01	1002 \pm 1	+264 \pm 2	8.85	34.7	10 \pm 4

Analysis of the measured parameters of wastewater from the La Prairie wastewater treatment plant was performed by Subhasis Ghoshal research group (the reference for this is Azodi et al., 2016 ES&T, ASAP, currently in Press).

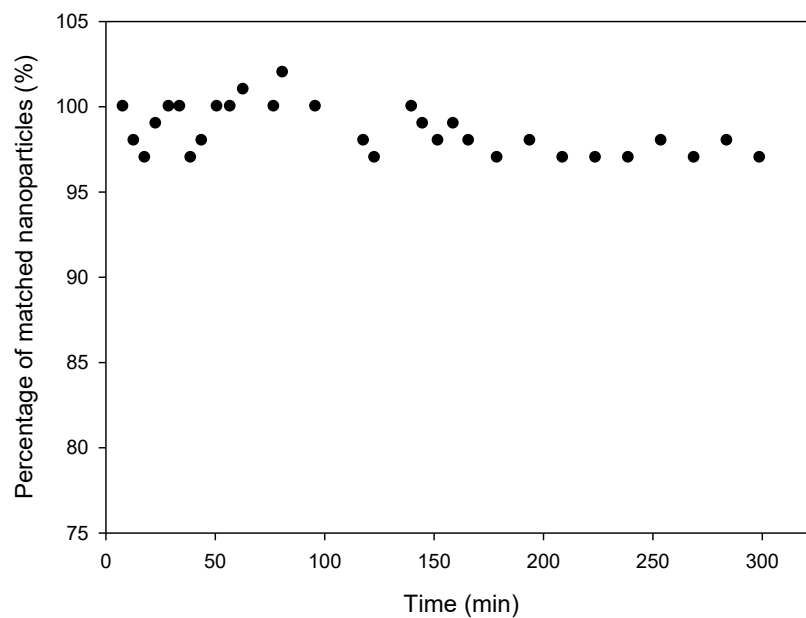


Figure 18. Identification of 2 mg L⁻¹ of citrate coated silver nanoparticles (Ag NP (cit)) in Milli Q water as a function of exposure time.

This test was performed in order to determine if the Ag NP undergo any changes in their spectral profile in a simple medium. In Milli-Q water, the spectral profile did not change significantly over the course of 5 hours, indicating that the NP were stable in Milli-Q water.

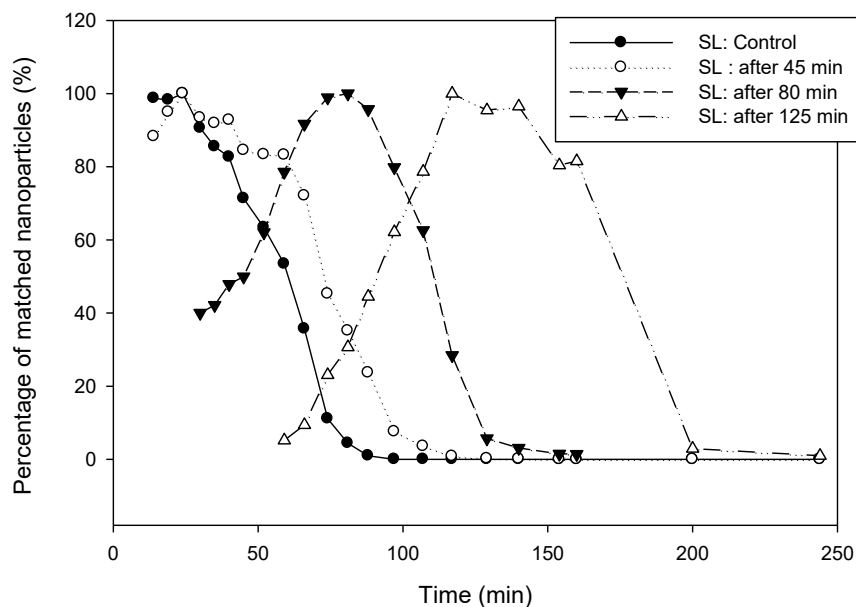


Figure 19. Positively matched pixels of aging 40 nm Ag NP(cit) in a wastewater using different spectral libraries after 0, 45, 80 and 125 minutes.

As shown in the main article (Fig. 13), the spectral profile of the Ag NP underwent a rapid transformation once the NP were immersed in the wastewater, to the point that the NP could not be detected when using spectra generated for the Ag in Milli Q water. Figure 19 show different spectral libraries taken for different contact times in the wastewater to furthermore demonstrate the spectral transformations of the Ag NPs.

Tableau VI. Distributions of the hydrodynamic diameters (model Rayleigh spheres) and physical diameters of different Ag NPs in filtered wastewater as determined by DLS (0.2 mg L^{-1}) and SP-ICP-MS ($0.10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) after 9 min, 181 min. and 16 days.

		Time			Time		
		9 min	181 min	16 days	9 min	181 min	16 days
Size (nm)	Coating	Hydrodynamic diameter (nm)			Physical diameter (nm)		
40	cit	43 ± 2	55 ± 2	66 ± 3	37.4 ± 0.4	37.9 ± 0.4	37.9 ± 0.4
40	PVP	54 ± 4	54 ± 3	58 ± 6	38.6 ± 0.2	38.8 ± 0.2	38.7 ± 0.3
80	cit	82 ± 2	90 ± 2	94 ± 5	73.2 ± 0.3	73.3 ± 0.2	73.2 ± 0.2
80	PVP	92 ± 2	91 ± 2	93 ± 4	75.1 ± 0.3	75.5 ± 0.3	75.8 ± 0.3
100	cit	107 ± 1	118 ± 2	125 ± 4	92.5 ± 0.4	92.4 ± 0.3	91.6 ± 0.3
100	PVP	117 ± 2	116 ± 3	121 ± 5	95.0 ± 0.4	95.2 ± 0.4	94.6 ± 0.4

Hydrodynamic (DLS) and physical diameters (SP-ICP-MS) for the different Ag NPs are presented here as a function of time. DLS results showed a slight increase in the hydrodynamic diameter, whereas SP-ICP-MS showed no significant changes in the physical diameter for any of the Ag NPs, suggesting that there was no homoagglomeration occurring.

Chapitre 6 : EDM-HSI sur des sédiments d'un lac (L222) de la région expérimentale d'Ontario (ELA)

Enhanced darkfield microscopy and hyperspectral imaging of the sediments from Lake L222

Trevor Théoret¹, Chris Metcalfe² and Kevin J. Wilkinson¹

University of Montreal¹

Trent University²

¹ *Biophysical Environmental Chemistry Group, Department of Chemistry, University of Montreal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montreal, QC, Canada H3C 3J7.*

² *Water Quality Centre, Trent University, Peterborough, Ontario, Canada K9J 7B8*

Overview

A team of researchers from Trent University and the International Institute for Sustainable Development (IISD) are presently conducting experiments (Lake Ecosystem Nanosilver (LENS) project) at the Experimental Lakes Area (IISD-ELA) in northwestern Ontario, with the goal of examining the ecosystem's response to the addition of nano silver. In June 2014, Lake 222 (stations D3 and the Centre Buoy) was spiked with around 5-10 ppb of Ag NP(PVP) 30-50 nm for comparison with a reference lake (Lake 221). The lakes in question are located in a sparsely populated area that should not be affected by human impacts. Sediment samples were collected in October 2015 and sent frozen to the University of Montreal with the goal of determining whether Ag NP could be detected under these real world conditions using enhanced darkfield microscopy coupled to hyperspectral imaging.

Introduction:

Nanomaterials, such as silver nanoparticles (Ag NP), possess unique physical and surface properties giving them great potential for use in many economic sectors, including consumer products, agriculture, medicine, transportation and energy and making them one of the largest and fastest growing category of NP. While Ag NPs have the potential to produce societal benefits, it is essential to better understand ecological risks that could occur following the release of nanomaterials into the environment. Unfortunately, very few data on the persistence of Ag NP are currently available for real-world conditions. We therefore investigated the behavior of Ag NP in sediments from a Ag NP spiked lake by enhanced darkfield microscopy and hyperspectral imaging (EDM-HSI) in order to determine if Ag NP could be detected following 16 months in the environment.

Methods:

Enhanced darkfield microscopy (EDM) coupled with hyperspectral imagery was performed to see if silver nanoparticles (Ag NPs) could be detected in the sediments of a spiked lake (Lake 222) and a reference lake (Lake 221). Sediment samples were collected from the sites D3 and the Center buoy station in L222 and from L221 by researchers at Trent University (Figure 20). Station D3 was about 75 meters from the point of Ag NP addition at a depth of approximately 4.5 meters. The Center buoy station was about 200 meters from the point of addition, at a depth of approximately 6 meters. Sediments were sampled in October 2015, approximately 16 months after Ag NP addition, immediately frozen and sent to the Université de Montréal. Once the sediments were thawed, 10 μ L of the overlying solution was immediately transferred onto depression slides, where it was sealed with a cover slip to minimize sample drying.

Optical and hyperspectral images, in addition to hyperspectral data were captured using a research grade optical microscope (Olympus BX43) equipped with an advanced darkfield illumination system that integrated the hyperspectral analysis (CytoViva). This system employs a novel darkfield-based illuminator that focuses a highly collimated light at oblique angles to the sample in order to obtain images with improved contrast and an improved signal-to-noise ratio. The hyperspectral imaging (HIS, Andor iXon3) camera collects scattered light that is

directly incident upon the sample. An automated stage allows the confluent imaging of a chosen field of view one line at a time. The spatial and spectral data (wavelengths between 400 and 1000 nm) were collected at 100x magnification (512 by 512 pixels), resulting in a pixel size of about 160nm X 160nm. Once an image was acquired, cartographic analysis could be performed in order to determine the location (within a given pixel) of a given material of interest, based upon its spectral signature.

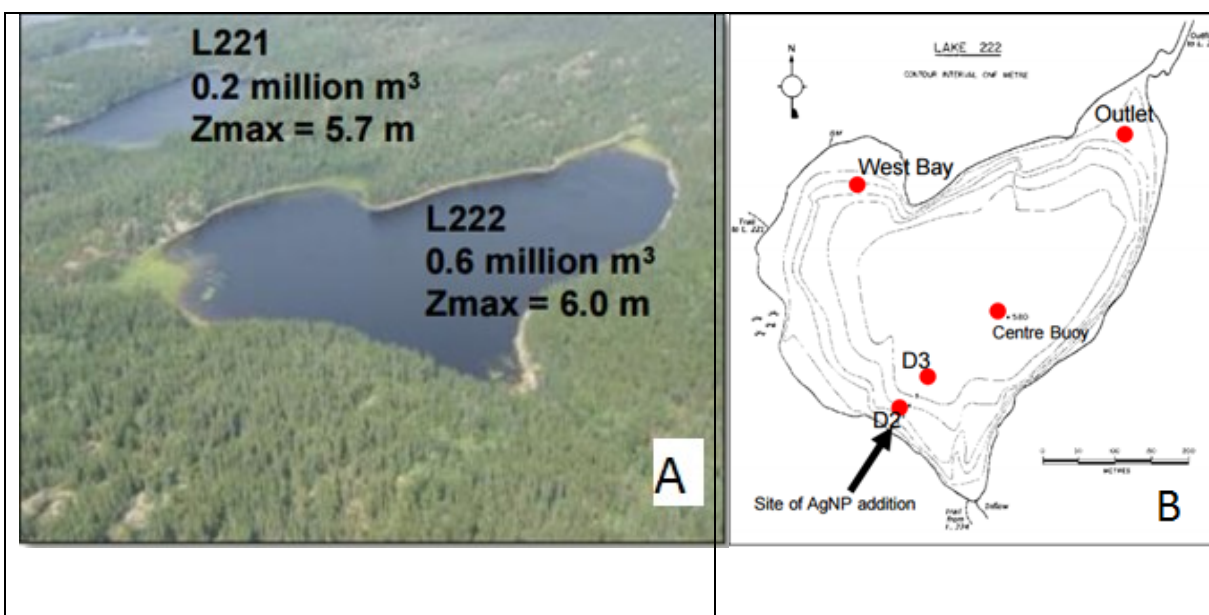


Figure 20. A. Photo and major characteristics of lakes L221 and L222. B. Topography of lake L222 and site of the Ag NP addition.

Silver nanoparticles have a unique spectral signature due to the high quantum yield of their Rayleigh scattering which is amplified by surface plasmonic effects that makes them fairly easy to identify by EDM. Detection of a NP occurs when the signal for the material in any given pixel (ca. 165 nm x 165 nm) is greater than the background noise. Since the technique measures scattered light, entire pixels are illuminated in the electron multiplying charge coupled detector, which gives particles a broader appearance than their original size. Thus, the technique is most useful for identifying nanoparticles in a sample, whereas it is not appropriate for nanoparticle sizing.

Two reference spectral libraries (SL-1 and SL-2) were created by analysing a solution containing the initial Ag NP(PVP) 30-50 nm in Milli-Q water ($R > 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, organic carbon

$<2 \mu\text{g C L}^{-1}$). As will be seen below, NP in the initial stock solutions were fairly heterogeneous with peak maxima occurring over a wide range of wavelengths. Arbitrarily, SL-1 was used to collect the peaks with maxima in the range of 530-560 nm, whereas SL-2 re-grouped peaks from at higher wavelengths (575-675 nm). The sediment spectral library (SL-3), previously acquired for the identification of Ag NPs in a Montréal wastewater effluent was also used for comparative purposes. Although changes in particle size or adsorption may shift peak maxima by 10s of nm, elements such as Ag and Au have nonetheless a very distinct spectral signature (narrow peak) that is often easy to identify. Detection of the NP is accomplished by using the software algorithm to compare spectra from one of the reference libraries with those in the unknown sample. The algorithm determines the spectral similarity between two spectra by calculating the angle between the spectra and treating them as vectors in a space with dimensionality equal to the number of bands. Positive matches are used to give a final mapped image based on matching spectral signatures. The sensitivity of the identification depends upon the setting of the spectral angle mapping (SAM) threshold, which represents a physically-based spectral classification used to match pixels to reference spectra. SAM compares the angle between the endmember spectrum vector and each pixel vector in n-D space. Smaller angles result in much closer matches to the reference spectrum. Pixels that are farther away than the specified maximum angle threshold in radians are not classified. In this study, a SAM value less than or equal to 0.125 was used in order to reduce the probability of false positives.

Images from the samples of L222 were very heterogeneous and thus it was necessary to acquire a substantial number of images for each sample, in this case, 30. Prior to image analysis, images were corrected by first subtracting the signal caused by the lamp. A smoothing of the spectral profile was also performed in order to eliminate as much noise as possible. Finally, spectral libraries were filtered by eliminating spectra that could not detect particles in the stock samples.

Results:

Ag NP standards. A hyperspectral image of the stock particles (Figure 21A), with a zoom on two separate pixels (Figure 21B, C) shows some of the heterogeneity of the initial Ag NP suspension. Indeed, different colours indicate that different spectra are likely to best describe the Ag NP. When generating the initial spectral libraries, it was apparent that the Ag NP signals

resulted both from individual Ag NPs (of variable sizes, e.g. Figure 22 A, B, C) and nanoparticle agglomerates (e.g. Fig. 22 D,E,F). Agglomerates were assumed to occur for either the presence of a broad peak or two separate peaks, which would be caused by the simultaneous signal of two or more nanoparticles located within the same pixel. Consequently, in order to be representative, it was important to generate a large number of spectra of characteristic Ag peaks, found in the range of 525 nm to 675 nm.

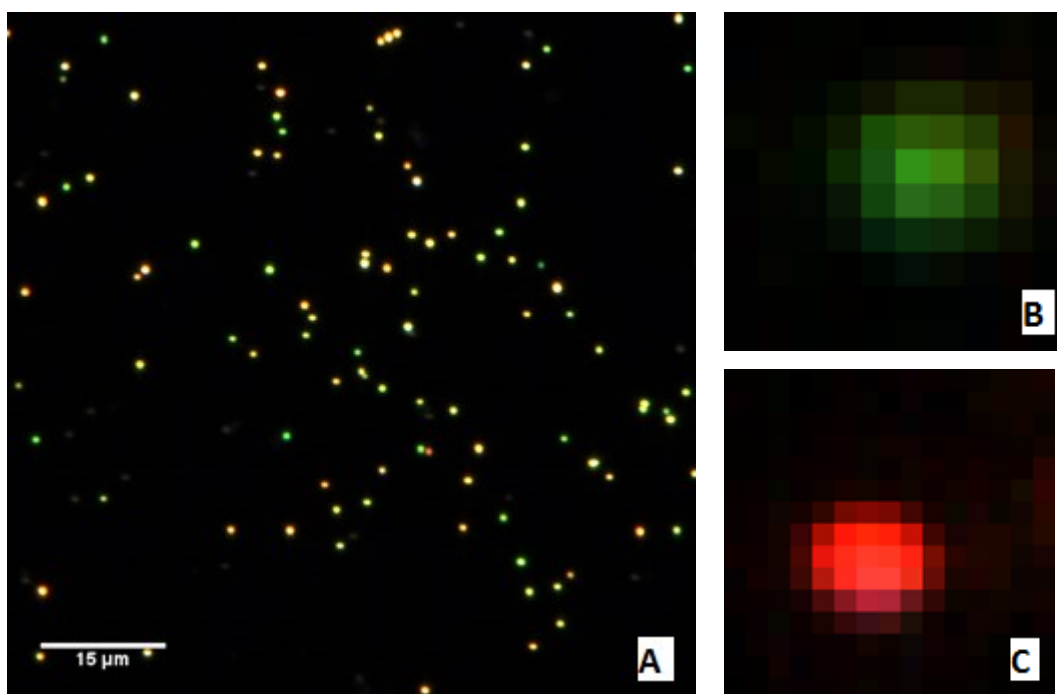


Figure 21. A. Hyperspectral image of the stock Ag NP samples. B-C) Zoom of several pixels that of the stock Ag NPs samples.

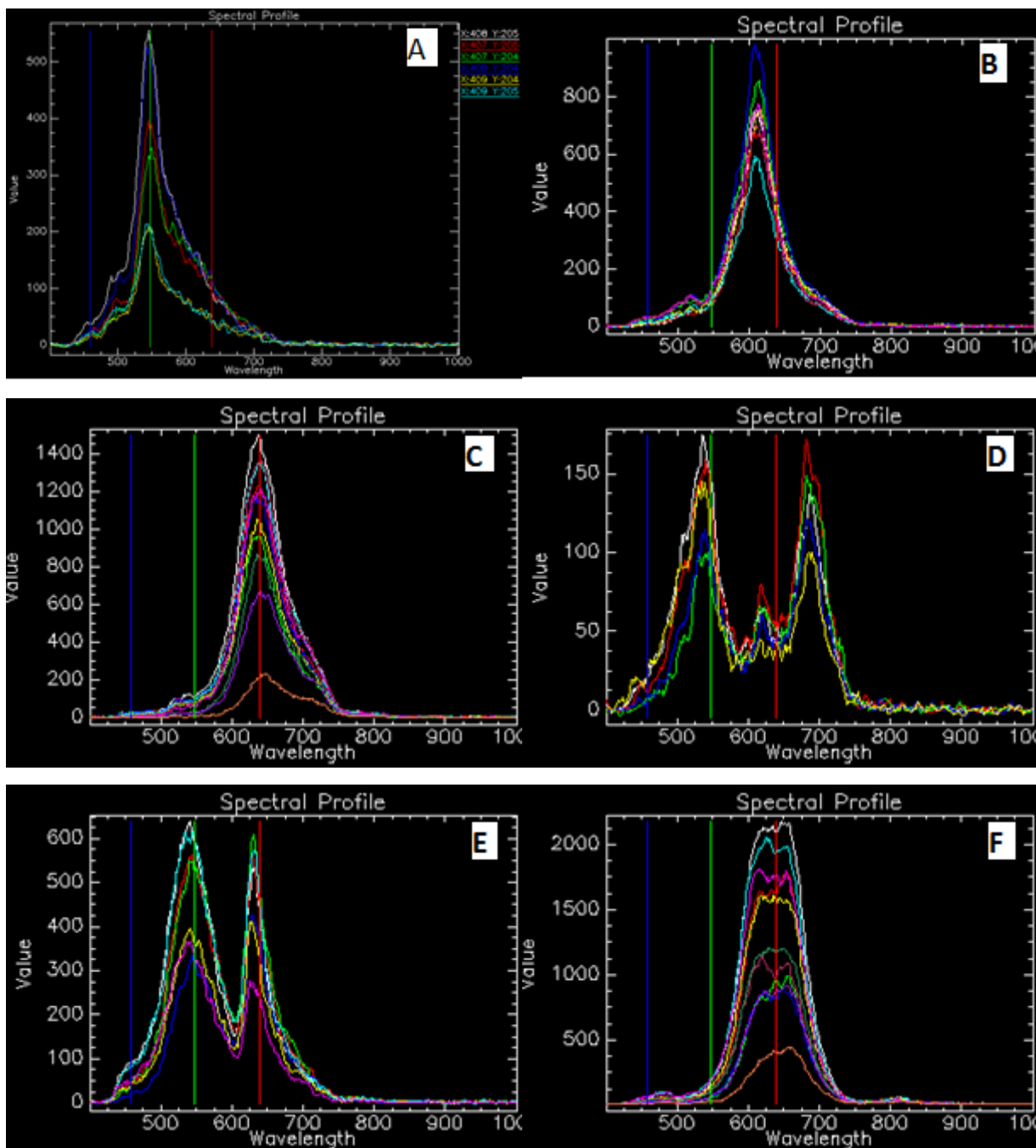


Figure 22. A-F. Spectral profiles collected from the stock Ag NP suspensions (A: SL-1; B-C: SL-2; D-F: examples of Ag NP aggregation). Although the spectra have been divided into 6 sub-figures, this was simply to demonstrate the large variety of responses that were obtained from the pixels generated from the NP of a stock solution. Each curve corresponded to the analysis of a single pixel.

Reference (Lake 221) samples for evaluation of background signal. The characteristics of L221 are very similar to L222 (i.e. sufficient depth to allow stratification and transient hypoxia in the hypolimnion, pH <7, DOC at 3-9 mg L⁻¹, phosphorus high enough for sufficient productivity, the presence of forage and predatory fish species, close proximity). When analysing the sediments from Lake 221, it was rapidly apparent that the spectral signals resulting from the particulate matter in the lake were very intense and broad (Figure 23B). Indeed, application of a spectral library (SL-3) that had been previously generated from a wastewater biosolid⁷⁸, resulted in a large proportion of positively identified pixels (198399 pixels or 76% of the image) (Figure 23A). On the other hand, when spectral libraries determined from the Ag NP in Milli-Q water (i.e. SL-1, SL-2) were applied to the samples from L221, no positive matches were obtained.

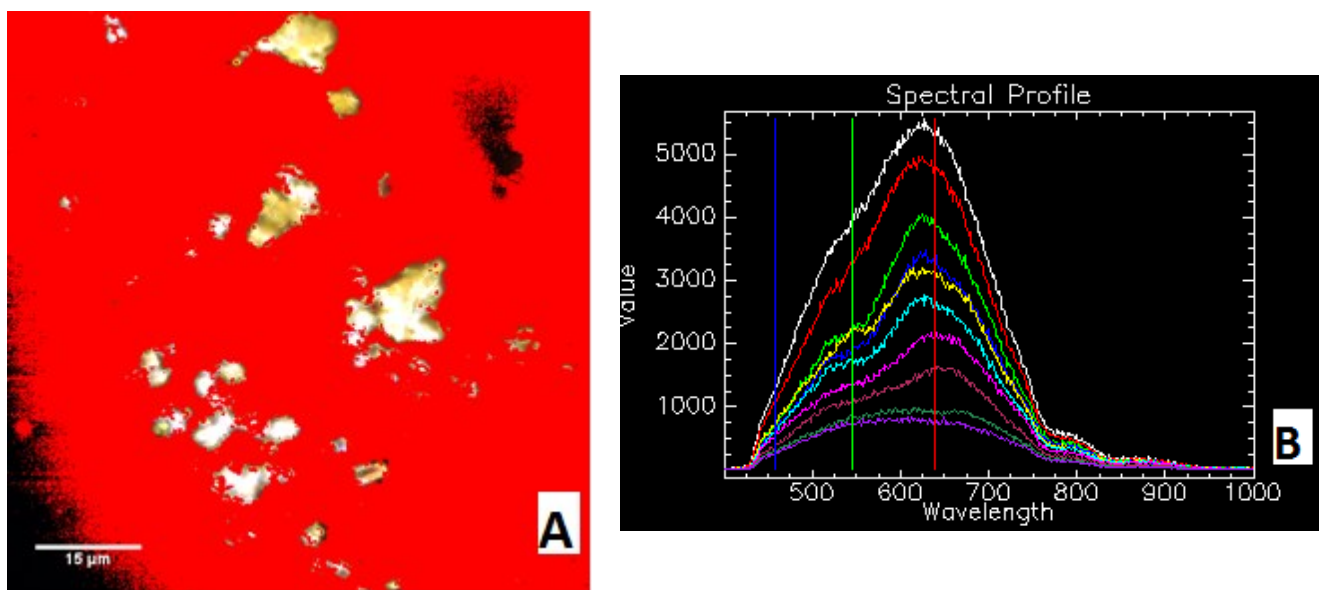


Figure 23. A. Hyperspectral image of the reference lake L221 after the application of the spectral library for the sediment matter (SL-3). B. Representative spectral profile of matching pixels corresponding to L221 sediment matter.

Hyperspectral images of L222 station D3. Hyperspectral images were taken for slightly diluted (30%) sediment samples obtained from station D3. Images of the lake sediments that were acquired from station D3 confirmed that Ag NPs were present. Indeed, application of the spectral library SL-1 (Figure 24B) resulted in the positive identification of a several Ag NPs (Figure 24A). For example, when SL-1 was applied to the hyperspectral image with a threshold

of 0.125, 19 pixels (0.007%) had a matching spectral signature. A similar result was obtained for SL-2 (9 pixels, 0.003%). As expected, when mapping for sediment particles using SL-3, numerous positive matches occurred (Figure 24C).

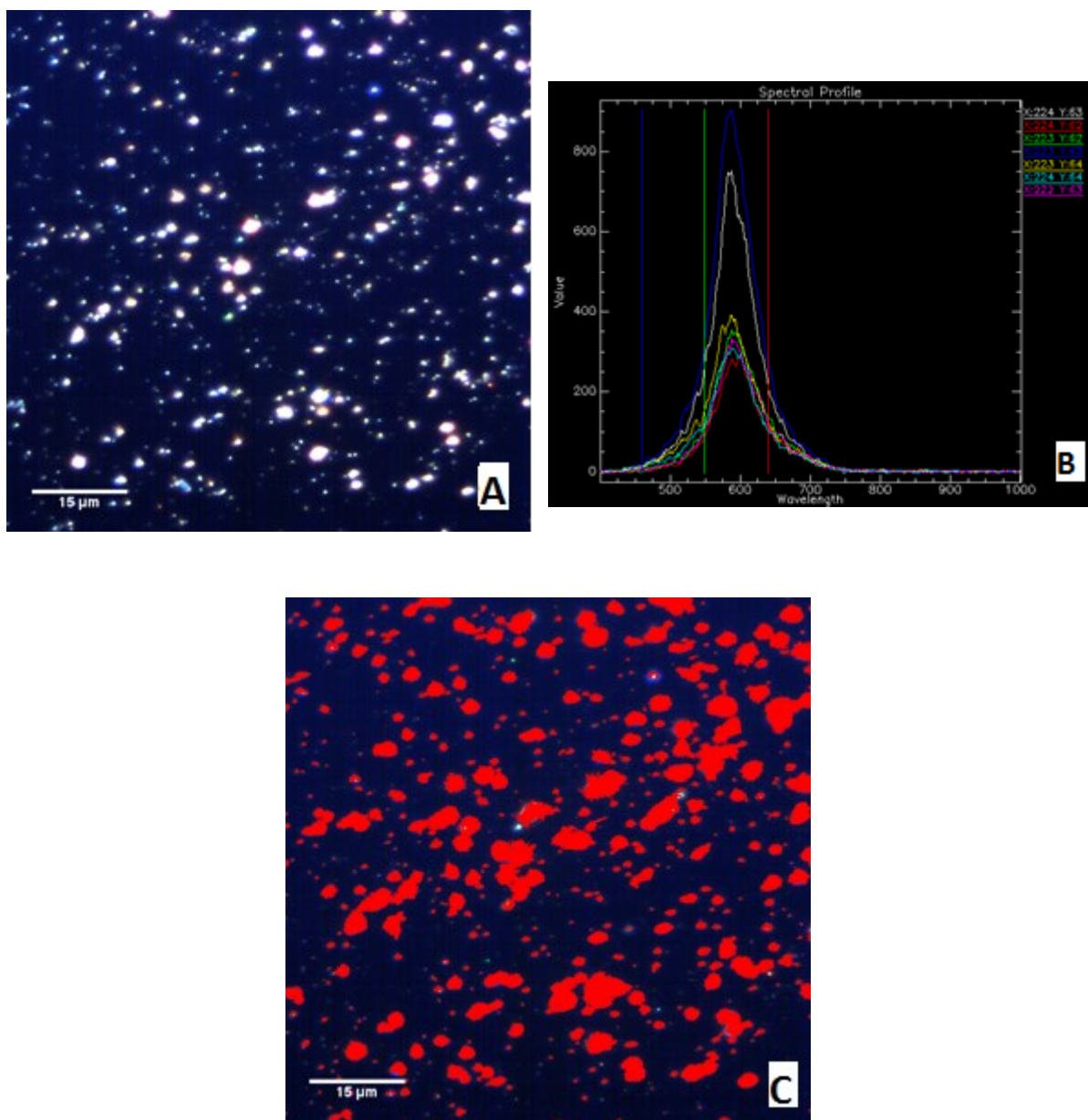


Figure 24. A) Hyperspectral image of the diluted lake sediments. Ag NPs were identified using SL-1 and indicated by red points. B) Spectral profile of the pixels from the image that matched the Ag NP spectral library (SL-1). C) Hyperspectral image of matching pixels obtained from the spectral library (SL-3) that was generated for particulate matter (red points).

Lake 222 samples from the Centre Buoy station. Images of the lake sediments from the Centre Buoy station also confirmed the presence of Ag NPs in the lake sediments. Application of the spectral libraries SL-1 and SL-2 on 30 images resulted in the positive identification of numerous Ag NPs when a threshold of 0.125 was applied (Table 7). The low number of positive matches at *both* stations resulted mainly from: the low concentration of Ag NPs in the sediments; the long delay between addition of the Ag NP and the collection of the sediments; the use of a conservative SAM value and the use of fairly restrictive spectral libraries. As was observed above using SL-1, numerous Ag NP could be detected in the sediments using either spectral library (Table 7). Although hyperspectral analysis is a semi-quantitative technique at best, somewhat surprisingly, there were a larger number of Ag NP detected at the Centre Buoy station as compared what was observed at station D3, even if the point of addition was closer to the D3 station by 125 meters. One potential explanation for the higher Ag NP data from the Centre Buoy station is that these sediments were taken from the depositional zone of the lake.

Tableau VII. Number of matched pixels for hyperspectral images corresponding to Ag NPs in the lake sediments of Lake 222 from station D3 and the Centre Buoy station and identified from spectral libraries SL-1 or SL-2. Note that several of the initial data points in Table 7 (*) were taken on the bulk sample, prior to a sample dilution of 30%, making them too dense for hyperspectral analysis. For other samples (**, 12-15, 29-30; D3), more extensive dilution (i.e. sample concentration <5%) resulted in the absence of detectable NP.

Image #	D3 station			Centre Buoy station		
	# Matched Pixels (SL#1)	# Matched Pixels (SL#2)	Sum of matched pixels (SL#1 and #2)	# Matched Pixels (SL#1)	# Matched Pixels (SL#2)	Sum of matched pixels (SL#1 and #2)
1	0*	0*	0*	0*	0*	0*
2	0*	0*	0*	0*	0*	0*
3	0*	0*	0*	0*	0*	0*
4	17	13	30	0*	0*	0*
5	0	5	5	35	3	38
6	7	11	18	29	5	34
7	8	3	11	33	16	49
8	19	9	28	12	0	12
9	15	2	17	0	3	3
10	0	0	0	25	0	25
11	3	1	4	34	0	34
12	0	5	5	33	17	50
13	0**	0**	0**	3	0	3
14	0**	0**	0**	7	3	10
15	0**	0**	0**	25	0	25
16	15	23	38	0	0	0
17	4	7	11	0	6	6
18	10	12	22	15	23	38
19	1	4	5	24	4	28
20	3	7	10	4	7	11
21	9	18	27	28	2	30
22	10	2	12	37	0	37
23	7	0	7	48	0	48
24	4	8	12	11	5	16
25	2	9	11	32	0	32
26	6	14	20	0	14	14
27	1	2	3	33	5	38
28	5	8	13	15	8	23
29	0**	0**	0**	16	0	16
30	0**	0**	0**	5	0	5

Although the hyperspectral analysis is not entirely quantitative, several key points should be noted. First, ionic silver does not give a detectable peak by this technique and thus the NP appear

to be quite persistent. Second, the spectral profile of Ag NPs is highly distinctive, consisting of a single, thin peak, whereas the spectral peak produced by the scattering of the sediment matter is much wider and often less intense, thus limiting the possibility of false positives (SL-3, Figure 25C). Images were also taken in the sediment bulk material (Figure 25A), however, in that case, the signal from the sediment matter peak was much too intense (245937 pixels or 94%) and much too dense (didn't let the light pass) to detect Ag NPs. It therefore wasn't possible to detect Ag NPs in the non-diluted bulk matrices (containing >80% particulate matter) or in very dilute samples (<5% particulate matter, because of the low particle count (Figure 25B)). Thus, only a limited range of concentrations of sediment could be used in this study (between 5 and 80%). Application of SL-3 to the initial sample (Figure 24C confirmed that a large proportion of pixels (43759 pixels or 17% of the image) could be attributed to particulate matter.

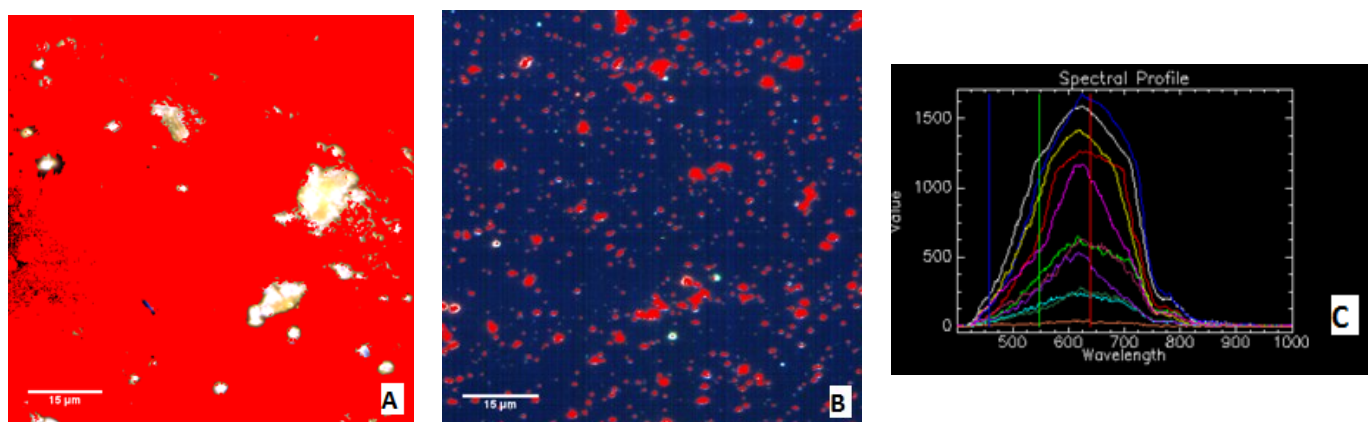


Figure 25. A. Hyperspectral image of the lake sediments after application of the spectral library for particulate matter (SL-3). B. Hyperspectral image of a diluted (10x) sample of the lake sediments using the applied spectral library for sediment matter (SL-3). In A and B, sediment particles are identified by red coloring. C. Spectral profile of the pixels that matched the spectral library for sediment matter.

Conclusion:

From the spectral profiles, it could be concluded that there was a great likelihood that Ag NP were present in the L222 sediments of both stations whereas they could not be identified in the L221 samples. Although the nature of the peaks corresponding to Ag NP can shift according to their sizes, shapes, state of agglomeration and composition (including adsorbed substances), the profiles for the noble metals (Ag, Au) are highly distinctive and thus highly indicative of Ag

NP. These results confirm the potential of Enhanced Darkfield Microscopy coupled with hyperspectral imaging (EDM-HSI) as a semi-qualitative method for the detection of Ag NP in sediments.

Acknowledgements

Funding for this work was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Environment Canada and the *Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies*.

Chapitre 7 : Conclusion

En résumé, cette étude a décrit une méthode microscopique rapide pour visualiser les interactions entre Ag NP et des particules naturelles. La technique ne perturbe pas l'échantillon puisqu'elle est basée sur la résonance de la diffusion de la lumière de ces particules lorsqu'elles sont vues en EDM-HSI. Cette étude a également confirmé, que la nature d'un enrobage et la taille des nanoparticules joue un rôle primordial dans le comportement des nanoparticules testées, et en conséquence leur sort dans l'environnement. L'EDM-HSI a été utilisée pour déterminer les transformations cinétiques de différentes tailles de Ag NPs avec différents revêtements (cit et PVP). La DLS et la SP-ICP-MS ont été utilisées pour confirmer ces résultats. La DLS est certainement la technique la plus rapide et plus facile pour analyser des concentrations élevées de ces Ag NPs dans les eaux usées. Cependant, cette technique a des limites de détection élevés et n'arrive pas à distinguer des NP de sa matrice. SP-ICP-MS a délivré l'information la plus quantitative (taille des particules et taux de dissolution) avec la variabilité la plus faible. Cependant, la gamme dynamique de la technique a été limitée à de faibles concentrations de Ag NPs. Ni DLS, ni SP-ICP-MS ne peuvent analyser Ag NPs dans les eaux usées sans la modifier en raison de la forte concentration et grande taille de matière particulière et ne peuvent mesurer que la moyenne de l'échantillon. D'autre part, EDM couplé avec HSI va suivre les mêmes Ag NPs en fonction du temps directement dans les eaux usées ce qui va grandement aider à la compréhension du sort et des transformations de ces nanoparticules, puisqu'il est physiquement possible de suivre les transformations d'une seule NP.

Des profils spectraux pris par EDM-HSI, ont également conclu que la présence de Ag NPs était extrêmement probable dans les sédiments des deux stations du lac L222 alors qu'ils n'étaient pas présents dans les échantillons du lac L221. Un temps considérable a également été consacré au choix et à l'approfondissement de techniques pour la création des bibliothèques spectrales afin d'obtenir des résultats fiables et reproductibles sur leur détection.

Néanmoins, à partir des profils spectraux, on pourrait conclure que la présence d'eaux usées va grandement influencer les propriétés des Ag NPs. Néanmoins, nos résultats montrent que les changements dans les profils spectraux ne peuvent pas simplement être liés à la taille des particules. D'autres phénomènes tels que l'adsorption de la matière organique naturelle (NOM)

doivent être pris en considération. SP-ICP-MS a confirmé que les Ag NPs avec un revêtement de citrate étaient très stables dans le temps sans homoagglomération observée, ce qui suggère une altération de leurs spectres de diffraction suivant l'adsorption de NOM. Alors que les Ag NPs avec un revêtement de PVP, démontre moins d'interaction avec la matière organique. Par conséquent, la stabilisation de la suspension à travers l'utilisation de revêtements peut affecter profondément les propriétés de surface des Ag NPs, modifiant ainsi leur transformation cinétique. Cette information va grandement aider la compréhension du sort et le transport de Ag NPs ainsi qu'un procédé de détection directement des Ag NPs dans des matrices environnementales complexes.

Bien que nous avons finalement trouvé que la relation entre les Ag NPs et les eaux usées n'a pas été aussi directe que nous avons initialement émi l'hypothèse, notre travail démontre toutefois l'utilisation expérimentale de EDM-HSI pour détecter et caractériser les transformations cinétiques des Ag NPs dans les eaux usées. Ce résultat pourrait être utile pour une caractérisation plus poussée de l'activité des Ag NPs dans les milieux complexes ou pour suivre leurs interactions antibactériens.

Pour les directions futures de ce travail, il serait intéressant d'effectuer des études sur les risques de résistance bactérienne générés par l'utilisation des Ag NPs. De plus, puisque les Ag NPs peuvent pénétrer dans l'environnement aquatique ou dans le sol par l'intermédiaire des boues d'épuration, il devient donc nécessaire de déterminer leur toxicité chez les organismes aquatiques, terrestres et éventuellement chez les humains. Ainsi, il peut s'avérer intéressant d'analyser par EDM-HSI des sols qui ont été en contact avec des boues d'épuration pendant une longue période de temps.

Bibliographie

1. NanoQuébec, Nanotechnologies : Regulations. www.nanoquebec.ca (05/13/2016),
2. bbcResearch Global Markets for Nanocomposites, Nanoparticles, Nanoclays, and Nanotubes. <http://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/nanocomposites-market-nan021f.html>
3. Nowack, B.; Bucheli, T. D., Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* **2007**, *150*, (1), 5-22.
4. Badawy, A. M. E.; Luxton, T. P.; Silva, R. G.; Scheckel, K. G.; Suidan, M. T.; Tolaymat, T. M., Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental Science & Technology* **2010**, *44*, (4), 1260-1266.
5. Blaser, S. A.; Scheringer, M.; MacLeod, M.; Hungerbühler, K., Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment* **2008**, *390*, (2), 396-409.
6. Klaine, S. J.; Alvarez, P. J.; Batley, G. E.; Fernandes, T. F.; Handy, R. D.; Lyon, D. Y.; Mahendra, S.; McLaughlin, M. J.; Lead, J. R., Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2008**, *27*, (9), 1825-1851.
7. Ahamed, M.; Alsalhi, M. S.; Siddiqui, M., Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta* **2010**, *411*, (23), 1841-1848.
8. Badireddy, A. R.; Wiesner, M. R.; Liu, J., Detection, characterization, and abundance of engineered nanoparticles in complex waters by hyperspectral imagery with enhanced darkfield microscopy. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, (18), 10081-10088.
9. Trefalt, G.; Szilagy, I.; Borkovec, M., Measuring particle aggregation rates by light scattering. In 2013.
10. Baalousha, M., Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: influence of particle concentration, pH and natural organic matter. *Science of the Total Environment* **2009**, *407*, (6), 2093-2101.
11. Levard, C.; Hotze, E. M.; Lowry, G. V.; Brown Jr, G. E., Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, (13), 6900-6914.
12. Domingos, R. F.; Baalousha, M. A.; Ju-Nam, Y.; Reid, M. M.; Tufenkji, N.; Lead, J. R.; Leppard, G. G.; Wilkinson, K. J., Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*, (19), 7277-7284.
13. Royce, S. G.; Mukherjee, D.; Cai, T.; Xu, S. S.; Alexander, J. A.; Mi, Z.; Calderon, L.; Mainelis, G.; Lee, K.; Li, P. J., Modeling population exposures to silver nanoparticles present in consumer products. *Journal of Nanoparticle Research* **2014**, *16*, (11), 1-25.
14. Geranio, L.; Heuberger, M.; Nowack, B., The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*, (21), 8113-8118.
15. Shafer, M. M.; Overdier, J. T.; Armstrong, D. E., Removal, partitioning, and fate of silver and other metals in wastewater treatment plants and effluent-receiving streams. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1998**, *17*, (4), 630-641.

16. Kaegi, R.; Voegelin, A.; Sinnet, B.; Zuleeg, S.; Hagendorfer, H.; Burkhardt, M.; Siegrist, H., Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, (9), 3902-3908.
17. Choi, O.; Deng, K. K.; Kim, N.-J.; Ross, L.; Surampalli, R. Y.; Hu, Z., The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water research* **2008**, *42*, (12), 3066-3074.
18. Li, L.; Hartmann, G.; Döblinger, M.; Schuster, M., Quantification of nanoscale silver particles removal and release from municipal wastewater treatment plants in Germany. *Environmental science & Technology* **2013**, *47*, (13), 7317-7323.
19. Godmaire, H.; Demers, A., Eaux usées et fleuve Saint-Laurent: problèmes et solutions. *Union Saint-Laurent Grands Lacs et Eau Secours* **2009**.
20. Ratte, H. T., Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1999**, *18*, (1), 89-108.
21. Navarro, E.; Baun, A.; Behra, R.; Hartmann, N. B.; Filser, J.; Miao, A.-J.; Quigg, A.; Santschi, P. H.; Sigg, L., Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* **2008**, *17*, (5), 372-386.
22. Hadioui, M.; Wilkinson, K.; Stephan, C., Assessing the Fate of Silver Nanoparticles in Surface Water using Single Particle ICP-MS. *PerkinElmer Application Note* **2014**.
23. Behra, R.; Sigg, L.; Clift, M. J.; Herzog, F.; Minghetti, M.; Johnston, B.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B., Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. *Journal of The Royal Society Interface* **2013**, *10*, (87), 20130396.
24. Fabrega, J.; Fawcett, S. R.; Renshaw, J. C.; Lead, J. R., Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*, (19), 7285-7290.
25. Yin, L.; Cheng, Y.; Espinasse, B.; Colman, B. P.; Auffan, M.; Wiesner, M.; Rose, J.; Liu, J.; Bernhardt, E. S., More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, (6), 2360-2367.
26. Sotiriou, G. A.; Pratsinis, S. E., Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environmental Science & Technology* **2010**, *44*, (14), 5649-5654.
27. Lowry, G. V.; Gregory, K. B.; Apte, S. C.; Lead, J. R., Transformations of nanomaterials in the environment. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, (13), 6893-6899.
28. Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S. L., Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, (46), 13940-13941.
29. Powers, C. M.; Badireddy, A. R.; Ryde, I. T.; Seidler, F. J.; Slotkin, T. A., Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition. *Environ Health Persp* **2011**, *119*, (1), 37.
30. Tolaymat, T. M.; El Badawy, A. M.; Genaidy, A.; Scheckel, K. G.; Luxton, T. P.; Suidan, M., An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment* **2010**, *408*, (5), 999-1006.
31. Huynh, K. A.; Chen, K. L., Aggregation kinetics of citrate and polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, (13), 5564-5571.
32. Shoults-Wilson, W. A.; Reinsch, B. C.; Tsyusko, O. V.; Bertsch, P. M.; Lowry, G. V.; Unrine, J. M., Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms (*Eisenia fetida*). *Nanotoxicology* **2011**, *5*, (3), 432-444.

33. ChemWare, K. Acids and Bases: pKa and pKb. http://www.sanderkok.com/techniques/laboratory/pka_pkb.html (25 august 2016),
34. Stebounova, L. V.; Guio, E.; Grassian, V. H., Silver nanoparticles in simulated biological media: a study of aggregation, sedimentation, and dissolution. *Journal of Nanoparticle Research* **2011**, *13*, (1), 233-244.
35. Kvittek, L.; Panáček, A.; Soukupova, J.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pucek, R.; Holecova, M.; Zboril, R., Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles (NPs). *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, (15), 5825-5834.
36. Singh, S.; Patel, P.; Jaiswal, S.; Prabhune, A.; Ramana, C.; Prasad, B., A direct method for the preparation of glycolipid–metal nanoparticle conjugates: sphorolipids as reducing and capping agents for the synthesis of water re-dispersible silver nanoparticles and their antibacterial activity. *New Journal of Chemistry* **2009**, *33*, (3), 646-652.
37. Hu, M.; Novo, C.; Funston, A.; Wang, H.; Staleva, H.; Zou, S.; Mulvaney, P.; Xia, Y.; Hartland, G. V., Dark-field microscopy studies of single metal nanoparticles: understanding the factors that influence the linewidth of the localized surface plasmon resonance. *Journal of materials chemistry* **2008**, *18*, (17), 1949-1960.
38. Bradford, A.; Handy, R. D.; Readman, J. W.; Atfield, A.; Mühling, M., Impact of silver nanoparticle contamination on the genetic diversity of natural bacterial assemblages in estuarine sediments. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*, (12), 4530-4536.
39. Li, X.; Lenhart, J. J.; Walker, H. W., Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Langmuir* **2010**, *26*, (22), 16690-16698.
40. Virden, J. W.; Berg, J. C., The use of photon correlation spectroscopy for estimating the rate constant for doublet formation in an aggregating colloidal dispersion. *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, *149*, (2), 528-535.
41. Henglein, A., Colloidal silver nanoparticles: photochemical preparation and interaction with O₂, CCl₄, and some metal ions. *Chemistry of Materials* **1998**, *10*, (1), 444-450.
42. Jean-Francois, M. Spectroscopie Analytique. https://studium.umontreal.ca/pluginfile.php/792835/mod_resource/content/1/CHM6160_Microscopie_complet_v2.pdf (5 mars 2016),
43. Cytoviva illuminating the future - Enhanced Darkfield Microscopy. <http://www.cytoviva.com/> (08/05/2016),
44. Rottenfusser, R. Education in Microscopy and Digital Imaging. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/contrast.html> (5 mai 2016),
45. Patskovsky, S.; Bergeron, E.; Rioux, D.; Simard, M.; Meunier, M., Hyperspectral reflected light microscopy of plasmonic Au/Ag alloy nanoparticles incubated as multiplex chromatic biomarkers with cancer cells. *Analyst* **2014**, *139*, (20), 5247-5253.
46. Roth, G. A.; Tahiliani, S.; Neu-Baker, N. M.; Brenner, S. A., Hyperspectral microscopy as an analytical tool for nanomaterials. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2015**, *7*, (4), 565-579.
47. Rashmi, S.; Addamani, S.; Ravikiran, S., Spectral Angle Mapper Algorithm for Remote Sensing Image Classification. *IJISSET–International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology* **2014**, *50*, (4), 201-205.
48. Degueldre, C.; Favarger, P. Y.; Rosse, R.; Wold, S., Uranium colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta* **2006**, *68*, (3), 623-628.

49. PerkinElmer World leader in AA, ICP-OES and ICP-MS. https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_WorldLeaderAAICPMSICPMS.pdf (22 august),
50. Pace, H. E.; Rogers, N. J.; Jarolimek, C.; Coleman, V. A.; Gray, E. P.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F., Single Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: A Performance Evaluation and Method Comparison in the Determination of Nanoparticle Size. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, (22), 12272-12280.
51. Krystek, P.; Ulrich, A.; Garcia, C. C.; Manohar, S.; Ritsema, R., Application of plasma spectrometry for the analysis of engineered nanoparticles in suspensions and products. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2011**, *26*, (9), 1701-1721.
52. Mitrano, D. M.; Leshner, E. K.; Bednar, A.; Monserud, J.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F., Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2012**, *31*, (1), 115-121.
53. Mitrano, D. M.; Leshner, E. K.; Bednar, A.; Monserud, J.; Higgins, C. P.; Ranville, J. F., Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2012**, *31*, (1), 115-121.
54. Hineman, A.; Stephan, C., Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2014**, *29*, (7), 1252-1257.
55. Berne, B. J.; Pecora, R., *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation: 1976.
56. Pecora, R., *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. Springer Science & Business Media: 2013.
57. Brar, S. K.; Verma, M., Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2011**, *30*, (1), 4-17.
58. Levard, C.; Reinsch, B. C.; Michel, F. M.; Oumahi, C.; Lowry, G. V.; Brown Jr, G. E., Sulfidation processes of PVP-coated silver nanoparticles in aqueous solution: impact on dissolution rate. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, (12), 5260-5266.
59. Kim, S.; Choi, J. E.; Choi, J.; Chung, K.-H.; Park, K.; Yi, J.; Ryu, D.-Y., Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in vitro* **2009**, *23*, (6), 1076-1084.
60. Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R.; Odzak, N.; Sigg, L.; Behra, R., Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* **2008**, *42*, (23), 8959-8964.
61. Franci, G.; Falanga, A.; Galdiero, S.; Palomba, L.; Rai, M.; Morelli, G.; Galdiero, M., Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules* **2015**, *20*, (5), 8856-8874.
62. Leclerc, S.; Wilkinson, K. J., Bioaccumulation of Nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii* □ Nanoparticle or the Free Ion? *Environmental Science & Technology* **2013**, *48*, (1), 358-364.
63. Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M., Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73*, (6), 1712-1720.
64. Impellitteri, C. A.; Harmon, S.; Silva, R. G.; Miller, B. W.; Scheckel, K. G.; Luxton, T. P.; Schupp, D.; Panguluri, S., Transformation of silver nanoparticles in fresh, aged, and incinerated biosolids. *Water Research* **2013**, *47*, (12), 3878-3886.

65. Kaegi, R.; Voegelin, A.; Ort, C.; Sinnet, B.; Thalmann, B.; Krismer, J.; Hagendorfer, H.; Elumelu, M.; Mueller, E., Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. *Water Research* **2013**, *47*, (12), 3866-3877.
66. Macnab, R. M., Examination of bacterial flagellation by dark-field microscopy. *Journal of Clinical Microbiology* **1976**, *4*, (3), 258-265.
67. Dubochet, J.; Ducommun, M.; Zollinger, M.; Kellenberger, E., A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. *Journal of Ultrastructure Research* **1971**, *35*, (1-2), 147-167.
68. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C., The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, (3), 668-677.
69. Jensen, T. R.; Malinsky, M. D.; Haynes, C. L.; Van Duyne, R. P., Nanosphere lithography: tunable localized surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, (45), 10549-10556.
70. Degueldre, C.; Favarger, P.-Y., Colloid analysis by single particle inductively coupled plasma-mass spectroscopy: a feasibility study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2003**, *217*, (1), 137-142.
71. Laborda, F.; Jiménez-Lamana, J.; Bolea, E.; Castillo, J. R., Selective identification, characterization and determination of dissolved silver (I) and silver nanoparticles based on single particle detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2011**, *26*, (7), 1362-1371.
72. Mock, J.; Barbic, M.; Smith, D.; Schultz, D.; Schultz, S., Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics* **2002**, *116*, (15), 6755-6759.
73. Han, L.; Wang, P.; Zhu, C.; Zhai, Y.; Dong, S., Facile solvothermal synthesis of cube-like Ag@ AgCl: a highly efficient visible light photocatalyst. *Nanoscale* **2011**, *3*, (7), 2931-2935.
74. Nanocomposix. www.nanocomposix.com/pages/nanotoxicology-experimental-use (10/05/2016),
75. Hadioui, M.; Leclerc, S.; Wilkinson, K. J., Multimethod quantification of Ag⁺ release from nanosilver. *Talanta* **2013**, *105*, 15-19.
76. Peyrot, C.; Purkait, T.; Iqbal, M.; Veinot, J.; Wilkinson, K., Heteroagglomeration of nanosilver with colloidal SiO₂ and clay. *Environmental Chemistry* **2016**.
77. Tejamaya, M.; Römer, I.; Merrifield, R. C.; Lead, J. R., Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, (13), 7011-7017.
78. Theoret, T. W., Kevin J., Evaluation of enhanced darkfield microscopy and hyperspectral analysis to analyse the fate of silver nanoparticles in wastewater and biosolids *Analytical Methods* **2017**.