

Université de Montréal

**Effets des nanoparticules d'argent sur les processus  
enzymatiques des sols**

par

Caroline Peyrot

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M. Sc.)  
en chimie  
option analytique environnementale

décembre 2012

© Caroline Peyrot, 2012

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effets des nanoparticules d'argent sur les processus  
enzymatiques des sols

Présenté par :  
Caroline Peyrot

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur	Dominic Rochefort
Directeur de recherche	Sébastien Sauvé
Membre du jury	Radu Iftimie

## Résumé

Les nanomatériaux sont de plus en plus présents dans les produits consommables du quotidien. L'argent est le métal le plus utilisé en nanotechnologie pour ses propriétés antimicrobiennes. Par différentes voies d'entrée, les nanoparticules d'argent (nAg) se retrouvent dans l'environnement en quantité significative, notamment dans les sols suite à la valorisation agricole des biosolides municipaux. Il est prévu qu'une interaction négative sur la communauté microbienne terrestre ait des répercussions sur la fertilité du sol et les processus biogéochimiques. Les mesures de l'activité enzymatique ont déjà montré leur efficacité et leur sensibilité dans la détection d'une perturbation physique et chimique du sol.

Les effets potentiels des nAg sur l'écosystème terrestre ont été évalués en mesurant l'activité des enzymes  $\beta$ -D-glucosidase (EC 3.2.1.21), leucine-aminopeptidase (EC 3.4.11.1), phosphomonoesterase (EC 3.1.3) et arylsulfatase (EC 3.1.6.1) intervenant dans les cycles des éléments essentiels C, N, P et S, respectivement. L'activité enzymatique est mesurée à l'aide d'une technique basée sur la fluorescence qui requière des substrats synthétiques liés à un fluorophore. Un sol de type sableux a été échantillonné au Campus Macdonald de l'Université McGill (Sainte-Anne-de-Bellevue, Qc) puis exposé aux nAg (taille  $\sim 20$  nm) ou à la forme ionique  $\text{Ag}^+$  (Ag-acetate) à des concentrations nominales de  $1,25 \times 10^{-3}$ ,  $1,25 \times 10^{-2}$ , 0,125, 1,25, 6,25 et 31,25 mg Ag  $\text{kg}^{-1}$  sol. De plus, le rôle de la matière organique (MO) a été évalué en effectuant un amendement du sol avec un compost de feuilles. Pour mieux comprendre les effets observés, des analyses de spéciation de l'Ag ont été réalisées. Les concentrations en Ag dissous ont été déterminées après filtration à travers des membranes de  $0,45 \mu\text{m}$  ou de 3 kDa ( $\sim 1$  nm, ultrafiltration) pour séparer la phase particulaire des ions dissous.

De façon générale, une inhibition de l'activité enzymatique a été observée pour les 4 enzymes en fonction de l'augmentation de la concentration en Ag (totale et dissoute) mais elle est significativement moins importante avec l'ajout de la MO. Les résultats suggèrent que l'inhibition de l'activité des enzymes aux faibles expositions

aux nAg est due aux nanoparticules puisqu'une très faible fraction des nAg est réellement dissoute et aucun effet significatif n'a été observé pour les sols traités à des concentrations similaires en  $Ag^+$ . Par contre, les effets mesurés aux concentrations plus élevées en nAg sont semblables aux expositions à l' $Ag^+$  et suggèrent un rôle de l'Ag colloïdale dans l'inhibition du processus enzymatique des sols.

**Mots-clés** : nanoparticules d'argent, enzyme, phosphomonoestérase,  $\beta$ -D-glucosidase, arylsulfatase, leucine-aminopeptidase, toxicité, spéciation, matière organique, sol

## Abstract

Nanomaterials are increasingly included in manufactured consumable products. Silver is the metal that is most often used in nanotechnology for its antimicrobial properties. By different pathways, silver nanoparticles (nAg) can end up in the environment, in significant quantities. They are especially expected to be found in soils due to the use of landfills. In the presence of silver (Ag) negative effects on the terrestrial microbial communities with a subsequent impact on soil fertility and biogeochemical processes are expected. Measurements of enzyme activity have already shown their effectiveness and sensitivity in the detection of chemical and physical disturbances of soils.

In this document, the potential effects of nAg on the terrestrial ecosystem have been evaluated by measuring the activities of the enzymes  $\beta$ -D-glucosidase (EC 3.2.1.21), leucine aminopeptidase (EC 3.4.11.1), phosphomonoesterase (EC 3.1.3) and arylsulfatase (EC 3.1.6.1), which are involved in the cycling of the essential elements C, N, P and S, respectively. The enzyme activity is measured using a fluorescence based technique that employs synthetic substrates linked to a fluorophore. A sandy soil was sampled at Macdonald Campus of McGill University (Ste-Anne-de-Bellevue, Qc) and then exposed to nAg (size  $\sim 20$  nm) or free silver ( $\text{Ag}^+$ , as Ag-acetate) at nominal concentrations of  $1.25 \times 10^{-3}$ ,  $1.25 \times 10^{-2}$ , 0.125, 1.25, 6.25 and 31.25 mg Ag kg<sup>-1</sup> soil. The role of organic matter (OM) was evaluated by adding leaf compost to the soil. The proportion of the toxicity that could be attributed to the nAg was evaluated by performing Ag speciation analyses in all soil samples. Dissolved Ag concentrations were determined after filtration through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane or a 3 kDa ultrafiltration membrane ( $\sim 1$  nm) in order to separate the particulate phase from the dissolved ions.

In general, inhibition of the enzyme activities was observed for the four enzymes as a function of increasing Ag concentrations (total and dissolved), however effects were significantly less dramatic in the OM-amended soil. The results suggested that the inhibition of enzyme activities at low-concentrations of nAg appeared to be due to the nanoparticles since a very small fraction of the nAg was actually dissolved

and no significant effect was observed for soils treated with similar concentrations of  $\text{Ag}^+$ . On the other hand, the effects measured at high concentrations of Ag were similar for the exposures to both nAg and  $\text{Ag}^+$ , suggesting that, at these concentrations, colloidal Ag may have played a role in the inhibition of the soil enzymatic processes.

**Keywords** : silver nanoparticles, soil enzymes, phosphomonoesterase,  $\beta$ -D-glucosidase, arylsulfatase, leucine-aminopeptidase, toxicity, speciation, organic matter

# Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES</b> .....	<b>XI</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1.1 MISE EN CONTEXTE .....	1
1.2 L'ÉLÉMENT ARGENT.....	3
1.2.1 <i>Propriétés physiques et chimiques</i> .....	3
1.2.2 <i>Sources et utilisations</i> .....	3
1.2.3 <i>Les nanoparticules d'argent</i> .....	4
1.2.3.1 Définition et propriétés .....	4
1.2.3.2 Sources et utilisations .....	4
1.3 VOIX DE REJETS DE L'ARGENT DANS L'ENVIRONNEMENT .....	5
1.4 ENZYMES DU SOL .....	8
1.4.1 <i>Généralités</i> .....	8
1.4.2 <i>Types d'enzymes</i> .....	10
1.4.2.1 La phosphomonoestérase ou phosphatase.....	10
1.4.2.2 La leucine-aminopeptidase (E.C 3.4.11.1).....	11
1.4.2.3 La $\beta$ -D-glucosidase (E.C 3.2.1.21) .....	11
1.4.2.5 L'arylsulfatase (E.C 3.1.6.1) .....	12
1.4.3 <i>Principe de la mesure de l'activité</i> .....	12
1.4.4 <i>Indicateur connu pour déterminer une contamination aux métaux (ex. Ag)</i> 13	
1.5 EFFETS DES NANOPARTICULES SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.....	14
1.5.1 <i>Effets de la taille</i> .....	15
1.5.2 <i>Effets de la partition</i> .....	15
1.5.3 <i>Nanoparticules d'argent</i> .....	17
1.6 DÉFIS DANS L'UTILISATION DES MESURES DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE AVEC LES NANOPARTICULES .....	18
1.6.1 <i>Essais enzymatiques</i> .....	18
1.6.2 <i>Caractérisation des nanoparticules</i> .....	19
1.7 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....	21

<b>CHAPITRE 2 . EFFETS DES NANOPARTICULES D'ARGENT SUR LE PROCESSUS ENZYMATIQUE DES SOLS AVEC ET SANS AJOUT DE MATIÈRE ORGANIQUE.....</b>	<b>23</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>24</b>
2.1 INTRODUCTION.....	24
2.2 MATERIALS AND METHODS.....	26
2.2.1 <i>Materials and reagents</i> .....	26
2.2.2 <i>Soil sampling and characterisation</i> .....	28
2.2.3 <i>Experimental design</i> .....	29
2.2.4 <i>Enzyme assays</i> .....	30
2.2.5 <i>Chemical analysis</i> .....	31
2.2.5.1 <i>Speciation of stock and working solutions of Ag</i> .....	31
2.2.5.2 <i>Soil samples</i> .....	32
2.2.6 <i>Data analysis</i> .....	32
2.3 RESULTS.....	33
2.3.1 <i>Chemical measurements of Ag</i> .....	33
2.3.1.1 <i>Stock and working solutions of nAg</i> .....	33
2.3.1.2 <i>Soil samples</i> .....	35
2.3.2 <i>Soil enzyme activities</i> .....	38
2.3.3 <i>Relative toxicity of nAg and Ag<sup>+</sup></i> .....	41
2.4 DISCUSSION.....	45
2.4.1 <i>Role of natural organic matter on Ag and nAg toxicity</i> .....	45
2.4.2 <i>Is toxicity due to Ag<sup>+</sup> or nAg?</i> .....	47
2.4.3 <i>Characterization techniques</i> .....	48
2.4.4 <i>Toxicological assays</i> .....	49
2.5 CONCLUSION.....	50
<b>SUPPORTING INFORMATION .....</b>	<b>52</b>
<b>CHAPITRE 3 CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXE 1 .....</b>	<b>80</b>
<b>ANNEXE 2 .....</b>	<b>87</b>



## Liste des tableaux

Table II-1. Soil enzymes evaluated with their corresponding synthetic substrates and the substrate concentrations employed in the experimental assays. ....	28
Table II-2. Total soil Ag concentrations in the non-amended soil and the organic matter amended soil, spiked with nAg or Ag <sup>+</sup> (as acetate). ....	36
Table II-3. Dissolved and ultrafiltered (3 kDa) Ag concentrations measured in the non-amended soil and the organic matter amended soil spiked with nAg and Ag <sup>+</sup> (as acetate). ....	37
Table II-4. Estimation of the Ag concentration that resulted in a 50% reduction of the enzymatic activity ( <i>EC</i> <sub>50</sub> ) as a function of: (i) the nominal Ag concentrations, (ii) total soil Ag, (iii) dissolved Ag (0.45 μm filtered) and (iv) truly dissolved Ag (3 kDa filtered) concentrations in the non-amended soil and the OM-amended soil spiked following treatments with nAg and Ag <sup>+</sup> (as acetate). ....	44
Table S1. Relative enzyme activities (%) measured in the non-amended and the OM-amended soils spiked with nAg and Ag <sup>+</sup> (as acetate) (mean ± SD; n=6). Groups with the same letter are not significantly different. ....	57
Table S2. Estimation of Ag concentrations that resulted in an enzymatic activity of 25% ( <i>EC</i> <sub>25</sub> ) as a function of the nominal Ag concentrations (added), total soil Ag, dissolved (0.45 μm) Ag and truly dissolved (3 kDa) Ag concentrations in the non-amended and the OM-amended soils spiked with nAg or Ag <sup>+</sup> (as acetate). ....	66

## Liste des figures

Figure 1.1. Schématisation du cycle de vie des nano-produits (modifié à partir de (Quadros and Marr, 2010)).....	6
Figure 1.2. Simulation des transferts des nAg aux États-Unis (tonnes/an). L'élimination ou l'accumulation dans chaque compartiment est noté par le nombre « dt » (Gottschalk et al., 2009).....	7
Figure 1.3. Schéma générale des interactions potentielles des nanoparticules au niveau biologique (Navarro et al., 2008).....	16
Figure 2.1. Concentrations of $\text{Ag}^+$ (a) measured in the nAg solutions using ISE (circles) and UF <3 kDa (triangles) and the corresponding proportion of $\text{Ag}^+$ (b). .....	34
Figure 2.2. Percentage of soil enzymes activities relative to control treatments (indicated by the horizontal line at 100%) after exposure to nAg and Ag-acetate ( $\text{Ag}^+$ ) for the non-amended soil (left) and for the soil amended with organic matter (right). For each set of bars, treatment numbers increased from left to right with corresponding nominal concentrations ( $\text{mg Ag kg}^{-1}$ ) given in the legend and in Table II-2. Error bars represent standard deviations (n=6). Treatments with the same letter were not significantly different ( $p < 0.05$ ).....	40
Figure 2.3. Linear regressions deriving $EC_x$ values for arylsulfatase activities in the non-amended soil after exposure to nAg and $\text{Ag}^+$ (as acetate). Data excluded from the regression are given by the open circles. The horizontal dashed lines represent the maximum (control soil) and the minimum parameters.....	43
Figure 2.4. Comparison of dissolved Ag concentrations between the non-amended soil (1.5% $C_{\text{org}}$ ) and the OM-amended soil (1.8% $C_{\text{org}}$ ). Soil solution of $\text{Ag}^+$ samples were filtered by 0.45 $\mu\text{m}$ only, instead of soil solution of nAg samples which were filtered by 0.45 $\mu\text{m}$ and 3 kDa (= 1 nm) successively (an arbitrary 1:1 linear regression is illustrated with the dash line). .....	46
Figure S1. Excitation (black) and emission (red) spectra of the fluorogenic molecules MUB (left) and AMC (right) in Na-acetate (10 mM, pH 6). Spectra were compared with the excitation and emission spectra of 10 $\mu\text{M}$ of 4-MUB-phosphate (left, dotted line), 500 $\mu\text{M}$ of 4-MUB-sulfate (left, long dashed line), 10 $\mu\text{M}$ of 4-MUB- $\beta$ -D-glucopyranoside (left, short dashed line) and 50 $\mu\text{M}$ of L-leucine-AMC (right, dashed line). .....	52
Figure S2. Calibration curves of MUB ( $R^2$ between 0.995 and 1.000) and AMC ( $R^2$ between 0.992 and 0.999) in the presence of different nAg concentrations in the soil	

solutions. Fluorescence intensities were measured using an excitation at $340 \pm 9$ nm and an emission at $460 \pm 20$ nm. ....	53
Figure S3. Calibration curve of silver ISE ( $I= 0.1$ M NaNO <sub>3</sub> ) obtained by dilution of a stock solution of AgNO <sub>3</sub> . Bars represent standard errors for replicate determinations (n=5).....	55
Figure S4. Ionic silver concentrations measured using the Ag ISE as compared to ultrafiltration over a 3 kDa membrane in nAg working solutions after the dilution to 1 mg Ag L <sup>-1</sup> . Bars represent standard errors (n=3).....	56
Figure S5. Linear regressions used to determine $EC_x$ values for <b>arylsulfatase</b> activity after exposure to nAg and Ag <sup>+</sup> (as acetate) in the <b>OM-amended soil</b> . Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters. ....	59
Figure S6. Linear regressions used to determine $EC_x$ values for <b>phosphomonoesterase</b> activity after exposure to nAg and Ag <sup>+</sup> (as acetate) in the <b>non-amended soil</b> . Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters. ....	60
Figure S7. Linear regressions used to determine $EC_x$ values for <b>phosphomonoesterase</b> activity after exposure to nAg and Ag <sup>+</sup> (as acetate) in the <b>OM-amended soil</b> . Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters. ....	61
Figure S8. Linear regressions used to determine $EC_x$ values for <b>β-D-glucosidase</b> activity after exposure to nAg and Ag <sup>+</sup> (as acetate) in the <b>non-amended soil</b> . Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters. ....	62
Figure S9. Linear regressions used to determine $EC_x$ values for <b>β-D-glucosidase</b> activity after exposure to nAg and Ag <sup>+</sup> (as acetate) in the <b>OM-amended soil</b> . Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters.....	63
Figure S10. Linear regressions used to determine $EC_x$ values for <b>leucine-aminopeptidase</b> activity after exposure to nAg and Ag <sup>+</sup> (as acetate) in the <b>non-</b>	

**amended soil.** Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters. ....64

Figure S11. Linear regressions used to determine  $EC_x$  values for **leucine-aminopeptidase** activity after exposure to nAg and  $Ag^+$  (as acetate) in the **OM-amended soil**. Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters. ....65

## Liste des abréviations, des sigles et des acronymes

Les significations des abréviations utilisées sont données par défaut en français. Pour certaines la signification est donnée en anglais (entre parenthèses).

GFAAS	Spectroscopie d'absorption atomique avec four graphite (atomic absorption spectrometry using pyrocoated graphite tubes)
AFM	microscopie à force atomique (atomic force microscope)
AMC	7-amino-4-methyl coumarin
ANOVA	Analyse de la variance (analysis of variance)
AUC	ultracentrifugeuse analytique (analytique ultracentrifugation)
BSA	Albumine bovine
C <sub>org</sub>	Carbone organique
CEC	Capacité d'échange cationique (cationic exchange capacity)
CRM	Matériau de référence certifié (certified reference material)
DL	Limite de détection (detection limit)
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering)
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DOC	Carbone organique dissous (dissolved organic carbon)
E.C.	Classification des enzymes (enzyme classification)
EC <sub>25</sub>	Concentration qui affecte 25% de l'activité enzymatique
EC <sub>50</sub>	Concentration qui affecte 50% de l'activité enzymatique
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
ENMs ou NMs	Nanomateriaux fabriqués (engineered nanomaterials)
FCS	spectroscopie par corrélation de fluorescence (fluorescence correlation spectroscopy)
4000×g	4000 fois la force de la gravité
<i>I</i>	Force ionique (ionic strength)
ICP-MS	Spectroscopie de masse avec plasma à couplage inductif (inductively coupled plasma mass spectrometry)

ISE	Électrode sélective (ion selective electrode)
IET	Résine échangeuse d'ions (ion exchange technique)
kDa	Kilo Dalton
$K_m$	Constante d'affinité de Michaelis-Menten
MALS	Diffusion statique de la lumière (multi angles light scattering)
MF	Microfiltration
$M^{z+}$	Ion métallique avec une charge positive z
MO ou OM	Matière organique (organic matter)
MUB	4-methylumbelliferone
nAg	Nanoparticules d'argent
nCu	Nanoparticules de cuivre
nFe	Nanoparticules de fer
nTiO <sub>2</sub>	Nanoparticules de dioxyde de titane
nZnO	Nanoparticules d'oxyde de zinc
PP	polypropylène
QC	Contrôle qualité (quality control)
rpm	Rotation par minute
SOM	Matière organique du sol (soil organic matter)
TEM	Microscope à transmission électronique (transmission electronic microscope)
TNase	Tryptophanase
UF	Ultrafiltration par centrifugation (centrifugal ultrafiltration)
$V_{max}$	Vitesse maximale d'une réaction avec un catalyseur (ex. enzyme)
WHC	Capacité de rétention d'eau (water hold capacity)

*A ma fille Clara,*

## Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de mémoire le Professeur Sébastien Sauvé pour m'avoir offert la possibilité de réaliser une maîtrise au sein de son laboratoire. Ce sujet de maîtrise a été fort intéressant, pertinent et motivant : un vrai défi. Avec le recul, je suis contente d'avoir choisi les enzymes et non les vers de terre! Je voudrais remercier le Professeur Kevin J. Wilkinson pour m'avoir guidé dans ma recherche et permis l'accès à son laboratoire et son équipement. Son expertise sur les nanoparticules m'a été d'une grande aide. Merci aux collègues du laboratoire du groupe de Sauvé comme du groupe de Wilkinson : vous êtes nombreux et j'en ai côtoyé du monde pendant ces années, je ne fais pas de liste mais je ne doute pas que vous vous reconnaissez. Des petits spéciaux pour Paul Fayad et Dana Simon «Votre soutien, votre présence et votre aide ont été indéniables, merci pour tout, tout, tout et encore j'en oublie!»

Enfin, il y a ma famille proche et lointaine (seulement des yeux!) qui m'ont soutenu et encouragé indéfectiblement dans ma reprise des études. J'ai commencé cette aventure il y a 7 ans après la naissance de ma fille, j'en ressors avec 3 diplômes en poche. Je pense qu'on avait tous hâte que je finisse!

Clara, « Tu as été mon pilier principal dans mes démarches et ton sourire chaque matin m'a donné les ailes nécessaire ».

Je termine mes remerciements pour celui qui partage au quotidien mes rires et mes humeurs « Tu es mon phare et ton amour infallible me pousse à aller toujours plus loin».



# Chapitre 1 INTRODUCTION

## 1.1 Mise en contexte

Les nanomatériaux sont considérés avec plus de précaution ces dernières années par les agences de réglementation comme Santé Canada et Environnement Canada. Ils ont été classés contaminants émergents suite à la croissance exponentielle de leur fabrication et leur utilisation. En effet, l'industrie des nanomatériaux a été inventoriée à 212 produits en 2006 avec une prédiction de 1600 produits en 2012 (Rejeski, 2011). L'ampleur de la commercialisation des nano-produits dépasse largement les recherches scientifiques sur ces nouveaux matériaux dont le devenir et la toxicité sont encore à ce jour mal connus. Par l'attrait des propriétés uniques offertes par la nanotechnologie, de nombreux domaines comme l'électronique, les textiles, la cosmétique, le milieu médical, ou encore la restauration des sols et le traitement des eaux y ont recourt. De dimensions très petites ( $< 100$  nm) et de composition organique (ex. tube de nano-carbone) ou inorganique (ex. argent, dioxyde de titane, tellurure de cadmium), les nanomatériaux nécessitent d'être étudiés pour mieux définir leurs effets nocifs potentiels sur l'environnement et sur la santé humaine (Handy et al., 2008; Klaine et al., 2008; Ray et al., 2009).

Parmi les différentes classes de nanomatériaux, on retrouve les nanoparticules d'argent (nAg) qui sont principalement utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes. L'argent est le métal le plus utilisé en nanotechnologie et il a été estimé qu'en 2009, sur environ 1000 nano-produits commercialisés, 25% contiennent des nAg (Rejeski, 2011). En conséquence de l'importante commercialisation des produits contenant des nAg, il est prévu de retrouver de plus en plus de nAg rejetées dans l'environnement. À ce jour, les recherches scientifiques montrent des lacunes dans les connaissances sur le comportement, le devenir et la toxicité de ces nouveaux matériaux (Navarro et al., 2008). L'évaluation de la toxicité des nAg sur les bactéries a révélé des effets négatifs spécifiques aux particules mais aussi provenant des ions  $\text{Ag}^+$

libérés des nAg. La réactivité des nAg et leurs propriétés microbiennes semblent être variables et dépendantes de la taille, de la forme chimique et géométrique, du mode de synthèse, des polymères de stabilisation utilisés et de la spéciation des particules (Bradford et al., 2009; Hansch and Emmerling, 2010; Morones et al., 2005; Sotiriou and Pratsinis, 2010). Cependant, ces recherches ont principalement été conduites en laboratoire en milieu aqueux et il a été prédit, à l'aide d'un modèle probabiliste, une concentration de nAg rejetée et accumulée potentiellement plus grande dans les sols suite à la valorisation agricole des biosolides municipaux (Gottschalk et al., 2009). Peu d'études ont été conduites dans l'environnement terrestre, un système physiquement et chimiquement complexe. Il est prévu qu'une interaction négative sur la communauté microbienne du sol ait des répercussions sur la fertilité du sol et les processus biogéochimiques. Plusieurs recherches ont essayé d'évaluer l'impact des polluants organiques et inorganiques sur les microorganismes en se basant sur leurs activités (ex. la respiration, la croissance et l'activité enzymatique) (Nannipieri et al., 2002). La mesure de l'activité enzymatique est considérée comme un bon indicateur de la diversité et de l'activité microbienne du sol, notamment la capacité métabolique du sol puisque les enzymes répondent plus rapidement à une perturbation physique et chimique naturelle ou anthropogénique (Dick, 1997).

L'objectif de ce chapitre d'introduction est de présenter les mesures de l'activité enzymatique comme une méthode potentielle pour évaluer un niveau de toxicité des nAg et ainsi prévenir une perturbation de l'écosystème terrestre. Dans une première étape, je vais récapituler quelles sont les propriétés et les sources de l'argent et des nAg, puis je ferai le survol des différentes voies d'émission de l'argent dans l'environnement. Par la suite, je donnerai une présentation générale des enzymes étudiées dans le sol. Ensuite, je décrirai la reconnaissance et l'utilisation des mesures de l'activité des enzymes comme indicateur dans les études de cas d'une contamination aux métaux. Quelques études avec des nanoparticules contenant des métaux ont démontré des effets sur l'activité enzymatique mais les concentrations utilisées ne sont pas toujours réalistes d'un point de vue environnemental ou l'explication et les causes des réponses ne sont pas toujours bien évaluées. Ce qui amène à terminer cette revue

avec les défis rencontrés dans l'étude des nanoparticules et les limitations des méthodes basées sur des mesures de l'activité enzymatique dans les sols.

## 1.2 L'élément argent

### 1.2.1 Propriétés physiques et chimiques

L'argent est un métal blanc, brillant, malléable et à l'état trace dans la croûte terrestre. Il est classé en 67<sup>ème</sup> position dans l'ordre d'abondance naturelle qui est estimée à 0,07 mg kg<sup>-1</sup> et il est principalement concentré dans les roches basaltiques et ignées. Une prédominance naturelle d'argent est trouvée dans le pétrole brut et dans l'eau des sources thermales et des cheminées de vapeurs (Howe and Dobson, 2002). L'argent peut être présent sous différents états d'oxydation : Ag<sup>0</sup>, Ag<sup>+</sup>, Ag<sup>2+</sup> et Ag<sup>3+</sup>. Les 2 premières espèces sont les plus communes. L'argent ionique, Ag<sup>+</sup>, va s'associer avec d'autres éléments organiques ou inorganiques pour former des sels ou des complexes (e.g. AgNO<sub>3</sub>, AgCl) solubles ou insolubles. L'argent métallique, Ag<sup>0</sup>, est insoluble dans l'eau à moins d'être dans un environnement très acide. Ce métal, dit noble, est exploité pour sa grande résistance à la corrosion en plus de sa haute conductivité thermique et électrique (Wijnhoven et al., 2009).

### 1.2.2 Sources et utilisations

La source première de l'argent est son extraction des gisements miniers contenant de l'argentite (Ag<sub>2</sub>S) ou en association avec d'autres éléments sulfurés (ex. nickel, cuivre). Une seconde source est le recyclage des produits manufacturés contenant de l'argent (Howe and Dobson, 2002). L'argent est utilisé en bijouterie, en photographie, à des fins industrielles (épuration d'eau, catalyseur, électricité et électrodéposition), fait office de monnaie d'échange et depuis l'antiquité il est connu pour ses vertus médicinales. La forme biodisponible, Ag<sup>+</sup>, a une toxicité limitée pour les humains et a démontré de bonnes propriétés antibactériennes et antivirales dont la médecine a eu recours pour des traitements de plaies, brûlures ou en cas d'infection bactérienne

jusqu'à la découverte des antibiotiques de synthèse (Luoma, 2008; Wijnhoven et al., 2009).

### 1.2.3 Les nanoparticules d'argent

#### 1.2.3.1 Définition et propriétés

Les nanomatériaux manufacturés sont caractérisés comme des matériaux de forme contrôlée et avec au moins une dimension de l'ordre du nanomètre et sont les produits de la nanotechnologie. Les nanoparticules sont des nanomatériaux avec au moins 2 dimensions de moins de 100 nm (ASTM, 2006). Un nano-produit est défini comme un produit commercialisé contenant des nanomatériaux (ASTM, 2006; Luoma, 2008; Wijnhoven et al., 2009). Les nanomatériaux ont des propriétés physico-chimiques uniques et bien spécifiques par rapport aux matériaux de plus larges dimensions. La taille nanométrique confère une plus grande surface de contact pour un volume donné, ce qui se traduit par une plus grande réactivité. De plus les nanoparticules ont des capacités optiques, électriques et magnétiques grâce à l'effet quantique (Luoma, 2008; Wijnhoven et al., 2009). Les nanoparticules d'argent, pouvant regrouper environ 20-15 000 atomes d'argent (Wijnhoven et al., 2009), ont montré les mêmes propriétés physico-chimiques et activités biologiques que l'argent, en plus des propriétés uniques des nanoparticules.

#### 1.2.3.2 Sources et utilisations

Les nanoparticules peuvent être générées naturellement (ex. éruption volcanique, érosion) ou bien par l'activité humaine (ex. émissions et rejets industriels, fabrication contrôlée) (Handy et al., 2008). Les nanoparticules d'argent manufacturées sont produites soit à partir du métal naturel qui est réduit physiquement en particules ultrafines, soit à partir de l'argent ionique qui est électrochimiquement réduit puis stabilisé en particules (Tolaymat et al., 2010). On les retrouve par exemple dans les emballages alimentaires, dans les textiles tels que les chaussettes ou les vêtements sportifs pour qu'ils aient une résistance aux mauvaises odeurs, dans les filtres traitant

l'eau ou bien pour leurs propriétés de fluorescence en imagerie biomédicale (Wijnhoven et al., 2009).

### 1.3 Voies de rejets de l'argent dans l'environnement

Les émissions d'argent dans les différents compartiments environnementaux sont majoritairement anthropiques. Les principales voies d'entrée de l'argent dans les réservoirs aquatique, terrestre et atmosphérique sont liées au cycle de vie des produits contenant de l'argent et sont comparables pour les formes particulières et non particulières de l'argent. Le cycle de vie simplifié des nano-produits est représenté dans la Figure 1.1. Les concentrations en nAg déversées, éliminées ou accumulées dans les compartiments environnementaux ont été estimées par modélisation pour la Suisse, l'Europe et les États-Unis (Figure 1.2) à partir des résultats observés par certaines recherches scientifiques (Gottschalk et al., 2009).

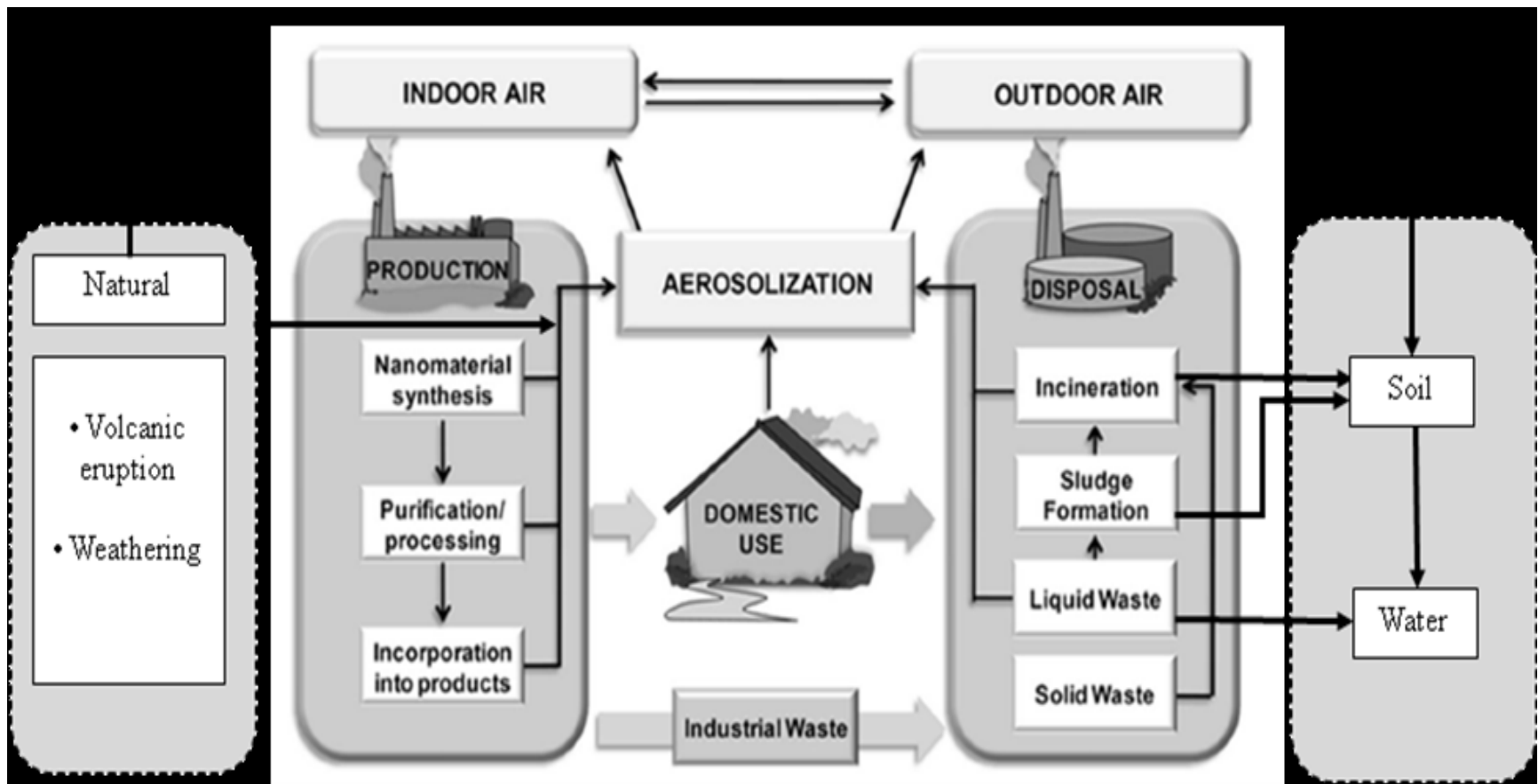


Figure 1.1. Schématisation du cycle de vie des nano-produits (modifié à partir de (Quadros and Marr, 2010)).

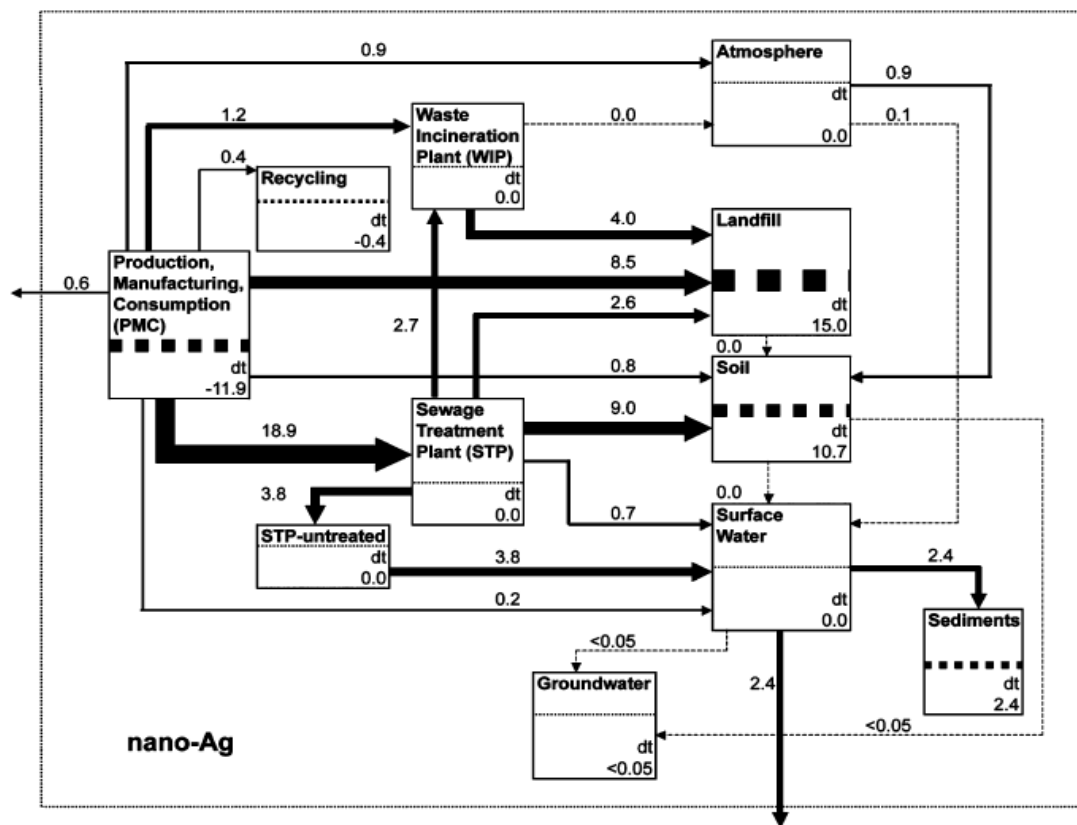


Figure 1.2. Simulation des transferts des nAg aux États-Unis (tonnes/an). L'élimination ou l'accumulation dans chaque compartiment est noté par le nombre « dt » (Gottschalk et al., 2009).

Avant les années 2000, la source principale de contamination de l'argent était due aux industries photographiques, d'électrodéposition et à l'imprimerie dont les rejets se retrouvaient dans les égouts. Cependant avec l'essor de la photographie digitale, une nette diminution d'émission d'argent est observée mais une rehausse depuis 2008 serait reliée à la croissance de la nanotechnologie (Howe and Dobson, 2002; Neal, 2008). Les usines de traitements des eaux usées municipales et industrielles réussissent avec un processus secondaire à retenir 95% de l'argent sous forme de sulfite dans les boues d'épuration (Howe and Dobson, 2002; Kiser et al., 2010). Les émissions des particules aérosols argentées peuvent provenir des usines de purification et de transformation de

l'argent ou bien de l'activité d'incinération des déchets. Le compartiment atmosphérique est à moindre risque que les autres puisqu'il est attendu à ce qu'il y ait une dilution par son grand volume et le temps de résidence des particules est estimé à 10 jours donc elles sont rapidement déposées par précipitation (Gottschalk et al., 2009). Les résidus incinérés ainsi que les boues d'épuration peuvent être répandus sur des sols ou des champs agricoles pour une revitalisation des déchets mais par fortes pluies il est possible de mobiliser les nAg vers les eaux de surface ou souterraines. L'argent ionique est connu pour son affinité avec la matière organique et son adsorption sur les argiles. Pour les nAg, une étude a observé que la présence d'argile dans un sol a tendance à retenir les particules mais il n'y a pas de corrélation avec la teneur en carbone organique dissous contrairement à l'argent dissous (Cornelis et al., 2010). Dans l'eau, l'argent tend vers une forme colloïdale selon la présence de matière organique dissoute et d'anions (ex.  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ), et les gros colloïdes ( $>1 \mu\text{m}$ ) peuvent sédimenter vers le bas de la colonne d'eau et s'accumuler dans les sédiments. Le modèle représenté en Figure 1.2 prédit une accumulation des nAg plus importante dans les boues d'épuration. La concentration médiane est évaluée à  $1,55 \text{ mg Ag kg}^{-1}$  ( $Q_{15}$ :  $1,29 \text{ mg Ag kg}^{-1}$  et  $Q_{85}$ :  $5,86 \text{ mg Ag kg}^{-1}$ ) (Gottschalk et al., 2009). Par la suite, les boues vont servir d'amendement et la teneur dans les sols va accroître de  $662 \times 10^{-6} \text{ mg Ag kg}^{-1}$  par an ( $Q_{15}$ :  $526 \times 10^{-6} \text{ mg Ag kg}^{-1} \text{ an}^{-1}$  et  $Q_{85}$ :  $2380 \times 10^{-6} \text{ mg Ag kg}^{-1} \text{ an}^{-1}$ ). Le milieu terrestre semble donc celui qui est le plus exposé.

## 1.4 Enzymes du sol

### 1.4.1 Généralités

La biodiversité d'un sol est en partie maintenue par les communautés microbiennes qui sont responsables des processus biogéochimiques comme le cycle du carbone, de l'azote, du soufre et du phosphore. La qualité d'un sol se définit par le recyclage des nutriments essentiels à la vie, conditionné par le bon fonctionnement des activités enzymatiques du sol (Tabatabai and Dick, 2002). Les enzymes retrouvées dans le sol



sont des protéines agissant comme catalyseurs qui accélèrent la vitesse des réactions biochimiques sans être détériorées. Elles sont spécifiques à un type de réaction mais elles ont la fonction commune de dégrader des macromolécules en molécules plus petites et assimilables pour les microorganismes. Tous les organismes vivants contiennent des enzymes dans leurs cellules, définies comme intracellulaires, mais elles peuvent aussi être retrouvées dans les eaux et dans le sol à l'extérieur des cellules cytoplasmiques, on parle alors d'enzymes *abiontic*. Les enzymes dites *abiontic* sont par définition des enzymes secrétées directement dans le sol, nommées extracellulaires, ou bien des enzymes intracellulaires qui se retrouvent dans le sol après cytolysse. Elles peuvent être libres en solution ou immobilisées par la matrice solide du sol (Tabatabai and Dick, 2002). Il est assumé que les enzymes proviennent majoritairement de la communauté microbienne mais il est aussi possible que les racines des plantes en relâchent dans la rhizosphère (Dick and Kandeler, 2005). Il a été mis en évidence dès la fin du 19<sup>e</sup> siècle que la survie des enzymes *abiontic* est liée à la formation d'un complexe organo-minéral qui confère aux enzymes une certaine protection contre la dégradation biologique et physico-chimique (Tabatabai and Dick, 2002). Par contre les mécanismes de la stabilité des enzymes dans le sol ne sont mieux compris que depuis quelques années. Pour cela des études ont été conduites en milieux abiotiques simplifiés portant sur les interactions des enzymes et des protéines avec les surfaces des constituants du sol en utilisant des minéraux purs ou des complexes organo-minéraux synthétiques (Quiquampoix et al., 2002). Les expériences faites à l'aide de l'albumine bovine (BSA) comme exemple de protéine ont conclu qu'un changement de conformation de la protéine adsorbée sur la surface des argiles (ex. montmorillonite) est fortement relié au pH du sol. Les expériences avec des enzymes ont montré une diminution de l'activité catalytique des enzymes lorsqu'elles sont adsorbées ainsi qu'un déplacement du pH optimal de l'activité vers des valeurs plus alcalines. Ces observations peuvent être expliquées par l'implication de forces électrostatiques et d'interactions hydrophobiques entre les enzymes- composées d'acides aminés et les argiles (Quiquampoix et al., 2002). Lammirato et al. ont confirmé que la nature des surfaces minérales a une influence sur l'immobilisation des enzymes et par conséquence sur le niveau d'inhibition de l'activité enzymatique (Lammirato et al.,

2010). Plus l'attraction entre l'enzyme et la surface des constituants du sol sera forte plus l'activité de l'enzyme va diminuer. Les hypothèses- validées expérimentalement, expliquant la diminution de l'activité enzymatique lorsque les enzymes sont adsorbées sont 1) la non-accessibilité du site actif de l'enzyme et 2) une modification de la conformation de l'enzyme (Lammirato et al., 2010). Par conséquent, l'activité mesurée n'est pas attribuée à l'action d'une seule enzyme mais certainement à un mélange de réactions biochimiques qui se produisent à différents niveaux dans le sol (enzymes libres en solution, enzymes adsorbées) et à différentes vitesses (Nannipieri et al., 2002).

#### 1.4.2 Types d'enzymes

Une centaine d'enzymes ont été identifiées dans les sols, et les classes d'enzymes qui font l'objet de recherches en enzymologie des sols sont principalement les hydrolases, les transférases et les oxydoréductases. La nomenclature des enzymes consiste en les 2 lettres « E.C. » suivies d'une série de 4 chiffres (IUBMB, 1992). Les enzymes étudiées pour cette étude sont :

##### 1.4.2.1 La phosphomonoestérase ou phosphatase

Il existe plusieurs types de phosphatases. L'activité enzymatique mesurée est la moyenne de l'activité de toutes les phosphatases retrouvées dans le milieu. Dans un milieu basique, la phosphatase basique (E.C 3.1.3.1) prédomine en activité (pH optimal de 8 – 9), contrairement à la phosphatase acide (E.C 3.1.3.2) qui va montrer une activité maximale dans un sol acide (pH optimal de 4 – 5). Elles ont en commun la propriété de catalyser les réactions d'ordre générale suivantes qui sont impliquées dans la minéralisation du P (Tabatabai, 1994) :



La phosphatase basique est inhibée par des agents chélatants et par la présence de phosphates inorganiques mais cette enzyme contient dans sa structure du Zn et du Mg

dont la présence dans le milieu environnant favoriserait son activation (Reid and Wilson, 1971). La phosphatase acide voit son activité réduite en présence des anions  $F^-$  et  $MoO_4^{2-}$  ainsi que  $PO_4^{3-}$  (Torriani, 1960).

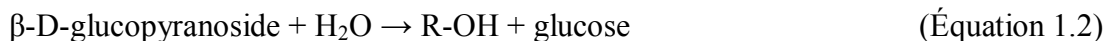
#### 1.4.2.2 La leucine-aminopeptidase (E.C 3.4.11.1).

On retrouve plusieurs types d'aminopeptidases appartenant aux familles de peptidases M1 ou M17 (Boulila-Zoghliami et al., 2011; Matsui et al., 2006). Ce sont des exopeptidases c'est-à-dire qu'elles hydrolysent les oligopeptides N-terminal et ce sont des métalloprotéines à Zn. Les leucine-aminopeptidases ne sont pas spécifiques à la leucine et peuvent aussi intervenir dans l'hydrolyse d'amides aliphatiques (ex. acétamide  $CH_3-CO-NH_2$ ). Un pH basique favorise l'activité maximale de l'aminopeptidase et la présence de Mg ou de Mn est essentielle à son activité. Leur rôle dans les microorganismes et les plantes, en plus du recyclage des éléments azotés, serait relié à la régulation de la croissance et à une réponse au stress. Les réactifs chimiques connus comme des inhibiteurs des aminopeptidases sont l'hydrochloride bestatine, EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) EGTA (acide éthylène glycol-bis 2-aminoéthyléther-N,N,N',N'-tétraacétique, 1,10-phénanthroline monohydraté et E-64 (L-3-carboxy-trans-2,3-époxy-propionyl-L-leucine-4-guanidinobutylamine). De plus certains cations  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $Co^{2+}$ , à  $0,1 \times 10^{-3}$  M, causent une inhibition de l'activité. Cependant la présence de  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  et  $Co^{2+}$  permet de restaurer à l'enzyme une activité suite à une exposition à EDTA (Chen et al., 2012a). Une recherche a, par contre, rapporté une activation significative de l'activité de la leucine aminopeptidase après une exposition à 30 et  $300 \times 10^{-6}$  M Cd (Boulila-Zoghliami et al., 2011).

#### 1.4.2.3 La $\beta$ -D-glucosidase (E.C 3.2.1.21)

Les glucosidases jouent un rôle dans le cycle du C en dégradant les grosses molécules constituant la matière organique (MO) comme la cellulose et la chitine. La  $\beta$ -D-glucosidase hydrolyse spécifiquement la  $\beta$ -D-glucopyranoside dans l'étape finale

de dégradation de la cellulose pour un pH optimal variant entre 5 et 6 (Tabatabai, 1994) :



Cette enzyme est retrouvée en plus grande abondance dans les sols comparativement à d'autres enzymes participants au recyclage du C (ex.  $\alpha$  et  $\beta$  –galactosidase), ce qui suggère que les produits de l'hydrolyse impliquant la  $\beta$ -D-glucosidase sont une source d'énergie importante pour les micro-organismes des sols.

#### 1.4.2.5 L'arylsulfatase (E.C 3.1.6.1)

Les sulfatases sont classées selon le type d'esters de sulfate organique qu'elles hydrolysent. Elles sont impliquées dans la minéralisation du S. L'arylsulfatase catalyse la réaction suivante (pH optimal de 6) (Tabatabai, 1994) :



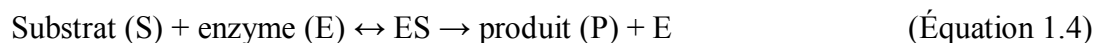
Certains éléments traces inhiberaient l'activité de cette enzyme et une inhibition compétitive est observée en présence des anions  $\text{MoO}_4^{2-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$  et  $\text{PO}_4^{2-}$  (Tabatabai, 1994).

#### 1.4.3 Principe de la mesure de l'activité

Le principe d'un essai enzymatique dans un sol consiste à mesurer l'activité des enzymes endogènes produites dans le sol par les micro-organismes. Dans le cas d'une étude écotoxicologique, une procédure expérimentale consiste à surcharger des échantillons d'un même sol avec des concentrations croissantes du contaminant d'intérêt puis de laisser ces échantillons quelques semaines pour permettre un équilibre chimique entre le contaminant et les différents constituants du sol (ex. argile, minéraux, phyllosilicates, MO) avant de mesurer l'intensité de la réponse représentant

l'activité enzymatique (Chaperon and Sauve, 2007; Murata et al., 2005) . Il n'y a pas d'ajout d'enzymes.

La détermination de l'activité des enzymes est basée sur leur cinétique de réaction avec un substrat donné. Le mécanisme d'action des enzymes est proposé par Michaelis et Menten en 1913 et peut être décrit par la réaction suivante (Tabatabai, 1994) :



L'enzyme agit sur un substrat pour former un complexe (ES) qui va donner un produit et l'enzyme initiale. La formation du complexe (ES) engendre potentiellement un changement de conformation de l'enzyme. La réaction peut être exprimée mathématiquement par l'équation Michaelis-Menten (Equation 1.5) qui relie la vitesse de réaction,  $v$ , à la concentration du substrat,  $[S]$ , en incluant la vitesse maximale,  $V_{\max}$ , et une constante d'affinité,  $K_m$ , qui est spécifique à l'enzyme et au substrat sous des conditions expérimentales définies.

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Équation 1.5})$$

Les constantes de Michaelis-Menten,  $K_m$ , sont déterminées pour caractériser une enzyme en particulier. Il a été observé que  $K_m$  est différent selon que l'enzyme est libre en solution ou immobilisée. Ce changement permet d'avoir une idée de l'état de l'enzyme, de rechercher des possibles compétitions, et de comprendre les facteurs influençant l'activité de l'enzyme (Tabatabai, 1994; Tabatabai and Dick, 2002).

#### 1.4.4 Indicateur connu pour déterminer une contamination aux métaux (ex. Ag)

Les métaux sont reconnus pour être toxiques aux organismes et pour inhiber les fonctions du sol. La communauté microbienne est particulièrement sensible à une contamination aux métaux et l'activité des enzymes retrouvées dans le sol est désignée comme un bon indicateur de surveillance et d'évaluation du degré de pollution (Dick,

1997). Par exemple l'étude de Chaperon et Sauvé (2007) a déterminé des effets de l'argent sur l'enzyme intracellulaire déshydrogénase avec une concentration affectant 50% de l'activité de l'enzyme,  $EC_{50}$ , à  $53,6 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  Ag dissous dans un sol forestier contenant 21% de matière organique (MO) et une  $EC_{50}$  à  $25,9 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  Ag dissous pour un sol agricole contenant 6% MO, après 1 mois d'équilibre chimique. De même, un effet significatif a été observé dès  $1,7 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  Ag dissous pour un sol au pH similaire et une teneur en carbone de  $4,1 \text{ g kg}^{-1}$  (soit 0,3 % MO) après 3 semaines d'exposition (Murata et al., 2005). L'enzyme  $\beta$ -glucosaminidase qui joue un rôle dans le cycle de l'azote et du carbone, a été inhibée entre 20 à 73% en présence de  $500 \text{ mg Ag kg}^{-1}$ , 1 heure après le dopage (Ekenler and Tabatabai, 2002). Chaperon et Sauvé (2007) ont aussi observé des effets de l'argent sur l'enzyme uréase (cycle N) avec une  $EC_{50}$ , à  $120 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  Ag dissous dans le sol forestier et une  $EC_{50}$  à  $221 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  Ag dissous pour un sol agricole. Une autre étude a mesuré une  $EC_{50}$  de  $7,7 \text{ mg Ag kg}^{-1}$ , après 1 mois d'équilibre chimique, sur l'activité potentielle de dénitrification d'un sol arable (Throback et al., 2007). Les études faites en laboratoires sont conduites dans des conditions contrôlées avec un ajout de métal à des concentrations croissantes. Les différentes procédures de laboratoire, les différentes structures des sols et certainement la variation dans la communauté microbienne rendent les essais enzymatiques plus ou moins sensibles à la toxicité des métaux. Cependant, la synthèse des résultats mentionnés précédemment met en évidence un rôle de protection de la MO contre les effets néfastes de l'Ag sur différentes enzymes du sol.

## 1.5 Effets des nanoparticules sur l'activité enzymatique

Les organismes interagissant directement avec leur milieu environnant sont possiblement plus affectés par la présence d'un contaminant. Du fait que les nAg sont connues comme agent biocide, il est prévu de trouver des effets négatifs sur les microorganismes du sol (Figure 1.3). Les effets biologiques des nanoparticules peuvent

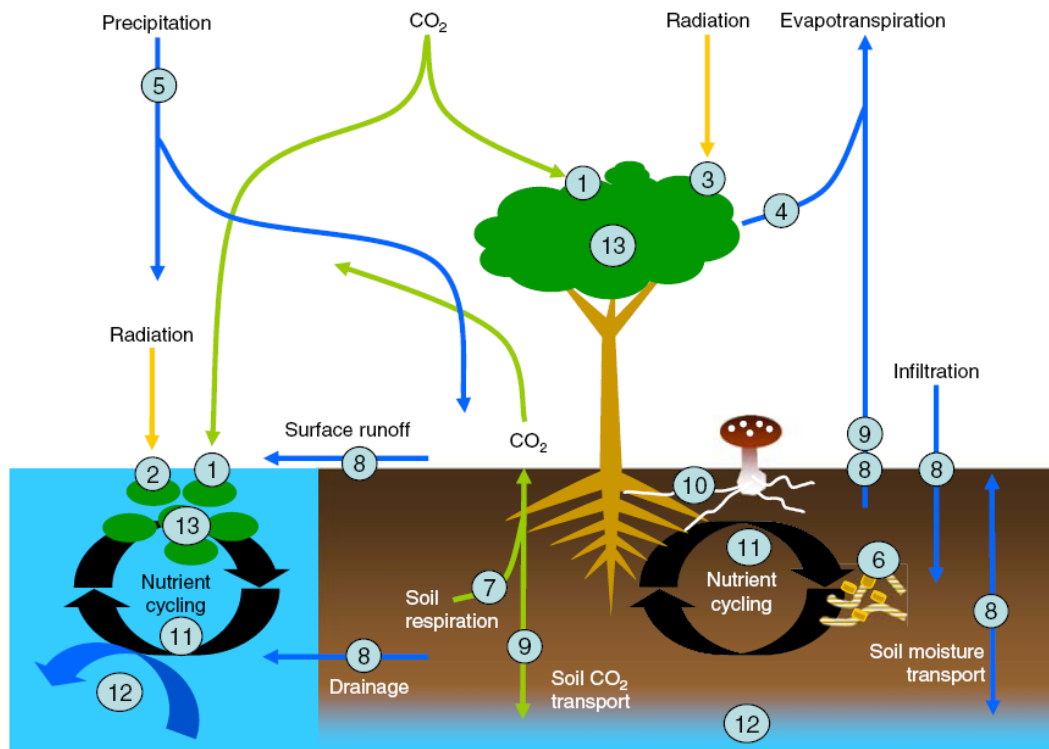
varier selon la forme, l'enrobage et la taille des particules mais aussi selon la spéciation chimique.

#### 1.5.1 Effets de la taille

Quelques recherches ont été faites avec des nanoparticules inorganiques sur différentes enzymes intra- et extracellulaires. Des effets sur l'activité enzymatique impliquant la taille des particules ont été démontrés, par exemple, les nanoparticules de dioxyde de titane ( $n\text{TiO}_2$ ) d'environ 60 nm ont montré des effets significatifs d'inhibition sur l'enzyme pepsine (endoprotéase digestive) par rapport aux plus larges particules (environ 200 nm) (Zhu et al., 2010). Les différents mécanismes d'action sont explicitement démontrés dont une distorsion de la structure secondaire de l'enzyme en présence des nanoparticules.

#### 1.5.2 Effets de la partition

Des effets impliquant la spéciation des particules ont été observés, par exemple pour les enzymes dégradant la cellulose ( $\beta$ -glucosidase, cellobiohydrolase et  $\beta$ -xylosidase) une diminution de l'activité a été mesurée due aux cations  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Fe}^{2+}$  ainsi qu'en présence des nanoparticules de cuivre ( $n\text{Cu}$ ) et de fer ( $n\text{Fe}$ ) (Shah et al., 2010). Seul l'enzyme cellobiohydrolase montre une inhibition plus grande avec la forme particulaire. Du et al. ont évalué des effets sur la croissance des plants de blé et sur certaines enzymes des sols (protéase, uréase, catalase et peroxidase) suite à une exposition aux nanoparticules d'oxyde de zinc ( $n\text{ZnO}$ ) et  $n\text{TiO}_2$  (Du et al., 2011). En règle générale, ces enzymes, excepté l'uréase, ont montré une inhibition d'activité en présence des nanoparticules. L'uréase a, au contraire, montré une légère stimulation à l'ajout de  $n\text{TiO}_2$ . Une forte accumulation de Zn a été mesurée dans les divers tissus du plant de blé mais aucune particule  $n\text{ZnO}$  n'a été observée au microscope à transmission électronique (TEM). La cause de la toxicité a été donc attribuée à la dissolution des  $n\text{ZnO}$  en ions  $\text{Zn}^{2+}$ . Cependant, les  $n\text{TiO}_2$ , connus pour être peu solubles, n'ont été retrouvées que sur la surface des racines. La cause des effets des  $n\text{TiO}_2$  sur les enzymes a été évaluée aux particules même.



**Fig. 4** Simplified scheme of some terrestrial and aquatic ecosystem processes. Among other impacts, ENPs' effects on photosynthetic organisms may reduce the fixation of CO<sub>2</sub> (1); ENPs adsorbed (2) or deposited (3) on photosynthetically active surfaces might reduce light availability or gas exchange (4) and thus photosynthesis; ENPs present in the atmosphere might increase the nuclei available for raindrop formation (5), thus altering precipitation; ENPs' impacts on

bacteria, fungi, and other edaphic fauna (6) might affect soil respiration (7), and other soil-texture-related processes such as transport of liquids (8) or gases (9), also modifying symbiotic relationships (10). Together, this might lead to impairments in three key services provided by ecosystems, i.e., nutrient cycling (11), water depuration (12), and biomass production (13)

Figure 1.3. Schéma générale des interactions potentielles des nanoparticules au niveau biologique (Navarro et al., 2008)



### 1.5.3 Nanoparticules d'argent

Au meilleur de mes connaissances, une seule étude à ce jour à évalué les effets des nAg sur la biomasse et l'activité microbienne directement dans le sol (Hansch and Emmerling, 2010). Les nanoparticules nAg ont été appliquées sous forme d'aérosol pour obtenir des concentrations de  $3,2 \times 10^{-3}$  mg Ag kg<sup>-1</sup> sol sec,  $32 \times 10^{-3}$  mg Ag kg<sup>-1</sup> sol sec et 0,32 mg Ag kg<sup>-1</sup> sol sec, selon les indications du vendeur. Après 4 mois, des effets négatifs ont été observés, avec l'augmentation de la concentration en Ag, sur la biomasse et par conséquent sur le quotient métabolique. Aucune réponse significative et claire n'a été mesurée sur l'activité enzymatique et sur la minéralisation nette de l'azote. Les chercheurs concluent simplement que les effets sont attribués à une toxicité directe sur les microorganismes et à une réduction de l'efficacité métabolique. Plusieurs lacunes sont à noter dans cette étude qui ne présente aucune vérification de la quantité d'argent dans les échantillons ainsi que d'un manque de caractérisation des nAg et leur partition dans le milieu. En contrepartie, des effets inhibitoires sur la nitrification ont été montrés (Choi and Hu, 2009) à 86% en présence des nAg (taille moyenne de 25 nm) et à 46% avec Ag<sup>+</sup> pour une concentration de 1 mg Ag L<sup>-1</sup>. L'argent est connu pour son affinité avec les groupements thiols qui sont concentrés dans les structures des enzymes (Howe and Dobson, 2002) et il est attendu de retrouver la même caractéristique pour les nAg. L'affinité des nAg (taille d'environ 30 nm) avec les protéines de la bactérie *E. Coli* a été investiguée et il en a résulté que 65% des protéines se liant fortement aux nAg étaient des enzymes (Wigginton et al., 2010). Une enzyme en particulier a montré une plus forte affinité avec les nAg : l'enzyme intracellulaire tryptophanase (TNase). Les nAg avec enrobage ont donné une inhibition de l'activité moins importante que les nAg nues mais cette inhibition demeure significative avec une diminution de 50% et de 95% de l'activité TNase pour les nAg enrobées et nues, respectivement. Le mécanisme d'action n'est pas connu mais une altération par distorsion de la structure tertiaire de l'enzyme est proposée.

## 1.6 Défis dans l'utilisation des mesures de l'activité enzymatique avec les nanoparticules

Les conditions des tests en laboratoire sont rarement proches de celle retrouvées dans l'environnement. Les essais sont développés dans des systèmes simples pour un meilleur contrôle des paramètres (température, pH, force ionique) et il est évident qu'il faut développer des outils assez sensibles qui évalueront adéquatement les réponses des organismes aux contaminants traces dans les conditions ambiantes. Les concentrations en nAg libérées dans l'environnement sont prédites dans l'ordre du  $10^{-6}$  mg kg<sup>-1</sup> dans les sols (Gottschalk et al., 2009). Les études de toxicité *in vitro* sont souvent rapportées pour des effets aigus avec des concentrations « accidentelles » ( $\geq$  mg kg<sup>-1</sup>) et létales (Morones et al., 2005; Shah et al., 2010; Zhu et al., 2010). Il est tout aussi important et adéquate d'évaluer les effets potentiels à des concentrations environnementales ( $M^{z+} \leq 10^{-6}$  M ou  $< 1$  mg kg<sup>-1</sup>) (Bradford et al., 2009; Hansch and Emmerling, 2010).

### 1.6.1 Essais enzymatiques

Les méthodes les plus populaires pour mesurer l'activité enzymatique sont basées sur la colorimétrie. Cette technique n'est pas assez sensible pour répondre aux problèmes environnementaux des nanoparticules. Récemment une méthode employant des substrats liés à des fluorophores pour détecter une activité enzymatique a été proposée (Marx et al., 2001). Une comparaison entre les 2 techniques a confirmé une meilleure sensibilité pour la méthode par fluorescence, prometteuse dans l'utilisation de petits échantillons de sol et/ou des sols à faible activité. Les substrats liés à des fluorophores ont montré une affinité ( $K_m$ ) 2 fois plus grande que pour les substrats utilisés en colorimétrie. De plus, il est possible de déterminer des paramètres de cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  pour 2 enzymes indépendantes qui hydrolyseraient le même substrat mais avec des affinités différentes (Marx et al., 2005; Marx et al., 2001). Cependant cette nouvelle méthode ne fait encore l'unanimité et il est difficile de se référer dans la littérature à un ordre de grandeur des activités des enzymes étudiées.

L'utilisation de la méthode de mesures enzymatiques dans une étude de cas de contamination de sols aux métaux est délicate. Les essais sont préférentiellement faits au pH optimal de l'activité de l'enzyme sélectionnée pour obtenir des conditions maximales de réaction mais, comme il a déjà été démontré dans le passé, un changement de pH va affecter l'équilibre chimique, et les proportions des différentes espèces du métal vont varier de la forme libre (présumée biodisponible) aux formes complexées, le plus souvent inertes (Sauvé, 2002). Si l'intérêt est de comprendre les effets d'une contamination dans les conditions ambiantes il est recommandé d'ajuster le pH et la force ionique à ceux du sol.

L'interprétation des mesures de l'activité des enzymes doit se faire avec précaution. L'activité mesurée en laboratoire n'est pas nécessairement représentative de ce qui se passe dans l'environnement. Les paramètres employés en laboratoire contrôlant la réaction sont optimisés, notamment la température d'incubation qui est menée en laboratoire à 30°C alors que le sol affiche une température moyenne de 10°C sur le terrain sous notre climat. De même, les incubations sont menées avec des concentrations saturées en substrats alors que dans le milieu naturel de telles conditions ne sont jamais rencontrées. Les réponses obtenues sont des activités potentielles (Wallenstein and Weintraub, 2008). Il est aussi important de relier les effets observés avec une bonne caractérisation du milieu pour mieux comprendre les causes.

### 1.6.2 Caractérisation des nanoparticules

Il a été montré que l'activité biocide des nAg était variable selon la taille, la forme et la spéciation chimique des particules (Bradford et al., 2009; Hansch and Emmerling, 2010; Morones et al., 2005; Sotiriou and Pratsinis, 2010). Il n'est pas clair dans les études actuelles, quelles sont les mécanismes de toxicité des nAg. Certaines études ont évalué des effets biologiques aux ions libérés des particules, d'autres ont trouvé un effet unique aux nanoparticules. Si un effort est produit dans la caractérisation des particules utilisées, celle-ci n'est pas toujours appropriée. Par exemple, l'étude de l'impact des nAg sur la diversité bactérienne dans des sédiments marins (Bradford et al., 2009) a seulement proposé une caractérisation des nAg utilisées dans la solution

stock qui est à un pH, une force ionique ( $I$ ) et dans un milieu différent des sédiments. Il en est de même pour la recherche de l'influence des nFe et nCu sur les enzymes dégradant la cellulose et la lignine (Shah et al., 2010) qui présente une mesure de la taille des particules à une concentration 20 fois plus grande et dans une solution tampon différente du milieu d'exposition. Aussi, le rôle de la spéciation des nZnO et nTiO<sub>2</sub> sur certaines enzymes du sol (Du et al., 2011) a été déduit des observations TEM et de la mesure de la bioaccumulation dans les plants de blé. Un complément de mesure de spéciation chimique dans le sol aurait appuyé les résultats concernant les effets sur les enzymes. Comme le montre Fabrega et al., le comportement des nanoparticules métalliques dans le milieu est dépendant du pH, de la force ionique et de la présence de chélatants organiques et inorganiques, et ces facteurs contrôlent la spéciation chimique des particules donc la disponibilité et la toxicité vis-à-vis des microorganismes et des enzymes (Fabrega et al., 2009). Il est donc important d'appuyer les données de toxicité observées à une caractérisation adéquate des NMs pour une meilleure interprétation.

Les techniques utilisées pour caractériser les nanoparticules métalliques sont nombreuses et complémentaires. Il n'existe pas de technique idéale et une approche multi-méthodes apporte une discussion plus éclairée dans le comportement des nanoparticules dans leur environnement (Domingos et al., 2009). Ces méthodes sont classées selon qu'on désire mesurer la dissolution ou bien l'agrégation des particules (Bandyopadhyay et al., 2012). L'ultrafiltration et l'ultracentrifugation permettent de séparer les espèces chimiques, c'est à dire de déterminer la proportion d'espèces dissoutes qui inclut le métal libre et ses complexes par rapport à la proportion d'espèces particulaires. La séparation avec l'ultrafiltration va dépendre de la taille des pores de la membrane choisie. Classiquement, dans les études des systèmes colloïdaux, une filtration à 0,45  $\mu\text{m}$  permet de distinguer les phases dissoutes et particulaires mais dans le cas des nanoparticules une séparation à 1 ou 3 kDa ( $\sim 1$  nm) est nécessaire pour obtenir la « vraie » phase dissoute, sans nanoparticules (Lead and Wilkinson, 2007). Le principe de séparation de l'ultracentrifugation est basé sur la sédimentation des particules qui est reliée à leur taille et leur densité. Certaines techniques permettent de

mesurer directement la concentration en métal libre,  $M^{Z+}$ , comme l'électrode sélective (ISE) et les résines échangeuses d'ions (IET). L'agglomération des nanoparticules peut être suivie par des techniques spectroscopiques comme le TEM, la microscopie à force atomique (AFM), la diffusion dynamique ou statique de la lumière (DLS ou MALS), l'ultracentrifugeuse analytique (AUC) et la spectroscopie de corrélation fluorescente (FCS). La taille n'est pas toujours directement déterminée mais calculée, par exemple d'après un coefficient de diffusion (FCS, DLS) ou d'un coefficient de sédimentation (AUC). La taille peut être dérivée d'une masse ( $d_w$ ), d'un nombre ( $d_n$ ) ou d'une aire de surface ( $d_z$ ) (Domingos et al., 2009). La difficulté d'utiliser ces 3 dernières techniques avec un échantillon environnemental est de pouvoir dissocier les nanoparticules ciblées des éléments constituant l'échantillon naturel qui est très hétérogène (ex. particules de sols, argiles, oxydes, matière organique colloïdale), de plus il se peut que dans le cas d'échantillons poly-disperses seulement une moyenne soit obtenue. Pour affiner les résultats il faudrait au préalable faire un préfractionnement de l'échantillon mais cette étape pourrait aussi influencer les propriétés physico-chimiques de l'échantillon donc amener à une interprétation non réaliste.

## 1.7 Objectifs de l'étude

L'objectif principal de cette maîtrise a été d'évaluer les effets potentiels des nAg sur les micro-organismes du sol en mesurant l'activité des 4 enzymes présentées précédemment (l'arylsulfatase, la phosphomonoestérase, la  $\beta$ -D-glucosidase et la leucine-aminopeptidase). Le processus enzymatique des sols a été mesuré à l'aide de la technique novatrice impliquant des marqueurs fluorescents ce qui a demandé dans un premier temps une optimisation de la méthode selon les conditions choisies. L'objectif principal a pu être complété en conduisant des expériences avec les nAg et en les comparant à des traitements avec l'Ag<sup>+</sup> pour déterminer la proportion de la toxicité selon la spéciation de l'Ag. La spéciation de l'Ag dans les sols et dans les solutions mères a été déterminée en utilisant l'ultrafiltration et l'ISE. Le deuxième

objectif a été d'évaluer le rôle de la MO du sol sur la toxicité de l'Ag en menant ces expériences dans 2 sols contenant une teneur en MO différente.

## **Chapitre 2 . Effets des nanoparticules d'argent sur le processus enzymatique des sols avec et sans ajout de matière organique.**

La recherche bibliographique sur la problématique des NMs et sur la science des enzymes des sols, le choix de la technique analytique pour les mesures du processus enzymatique, l'échantillonnage du sol, la préparation des échantillons de sols dopés avec l'argent et les manipulations en laboratoire ont été effectués par moi-même. J'ai réalisé en grande partie les analyses physico-chimiques à l'exception des analyses à l'ICP-MS faites par le Dr Madjid Hadioui. Les coauteurs ont agi à titre de conseillers tout au long de cette étude ainsi que pour la rédaction de cet article.

L'article et l'information supplémentaire ont été soumis au journal *Environmental Toxicology and Chemistry* sous la référence suivante :

*Effects of silver nanoparticles on soil enzyme activities with and without added organic matter.*

Caroline Peyrot, Kevin J. Wilkinson, Sébastien Sauvé

Department of Chemistry, Université de Montreal, P.O. Box 6128 Downtown,  
Montreal, Québec, Canada, H3C 3J7.

## Abstract

There is a need to understand and assess the effects of silver nanoparticles (nAg) on terrestrial ecosystems. Cationic silver,  $\text{Ag}^+$ , is well known to be toxic for bacteria, however, it is not clear to what extent the presence of nano-scale Ag species will result in negative effects to biota in soils. While the release of nAg to the terrestrial environment is likely to have direct impacts on soil microorganisms, it could also have indirect effects through its actions on soil enzymes with repercussions felt among numerous biogeochemical processes. In this paper, potential effects of nAg were investigated in soils by the measuring activities of the enzymes phosphomonoesterase, arylsulfatase,  $\beta$ -D-glucosidase and leucine-aminopeptidase under conditions that were as similar as possible to natural conditions. The toxicity of nAg was compared with ionic Ag and the role(s) of soil organic matter were evaluated. To this end, two soils, with different organic matter (OM) contents, were spiked with either nAg or Ag-acetate at equivalent total Ag concentrations. In general, enzyme activities were inhibited as a function of the Ag concentration in the soil. In the nAg exposures, only a small fraction of the nAg was actually “truly dissolved” (less than 1 nm), suggesting that the particulate forms of nAg resulted in a significant inhibition of the soil enzymes. The addition of OM to the soils showed less inhibition to enzyme activities, however the mechanism of its action is not clear given that dissolved Ag concentrations were similar in both the OM-amended and non-amended soils.

## 2.1 Introduction

The nanotechnology industry has grown exponentially over the past decade, with an estimated inventory 1750 types of engineered nanomaterials (ENMs) identified in 2012 as compared to 212 product types in March 2006 (Rejeski, 2011). Nano-scale sizes, high surface areas and quantum effects can give the nanoparticles unique properties which lead to their uses in a wide range of applications including electronic devices, cosmetics, biomedical applications, soil remediation, textiles and the energy



industry (nanoRoad, 2005). As a consequence, it is expected that we will eventually observe an increased environmental release of the ENMs (Navarro et al., 2008). Indeed, ENMs are classified as emerging pollutants by the U.S. Environmental Protection Agency, Environment Canada and the European Union. Nonetheless, the environmental and human health risks associated with the ENMs need to be better elucidated in order to establish regulatory guidelines.

Among the large number of potential ENMs, silver nanoparticles (nAg) are often used for their antibacterial and antiviral properties. Cationic silver,  $\text{Ag}^+$ , is a well-known bactericide and its use in nano-scale products may also lead to an increase in negative effects on microscopic biota (Neal, 2008; Wijnhoven et al., 2009). Studies on nAg toxicity to bacteria have shown contrasting results. Although most studies have concluded that the  $\text{Ag}^+$  released from the nanoparticles is the main chemical species contributing to toxicity, several studies have attributed specific effects to the nanoparticles. Nonetheless, for both types of study, the general lack of comparable and unambiguous nanoparticle characterization techniques has prevented clear conclusions from being drawn (Domingos et al., 2009). The reactivity and bactericidal properties of the nAg depend on the size, shape and speciation of the nAg (Bradford et al., 2009; Hansch and Emmerling, 2010; Morones et al., 2005; Sotiriou and Pratsinis, 2010). Furthermore, few toxicological studies on nAg have been performed directly in the terrestrial environment, which is a chemically and physically complex system. Silver is known to have a high affinity for soil organic matter (SOM) and thiol compounds (Jacobson et al., 2005), which suggests that nAg will have direct impacts upon soil microorganisms, but could also have indirect effects through its actions on soil enzymes, composed of amino acids (Wigginton et al., 2010). The overall consequences of nAg contamination in soils are likely to be felt in numerous biogeochemical processes, including nutrient cycling and a large majority of microbial mediated processes.

Soil enzyme assays have demonstrated their potential for the early detection of anthropogenic or natural disturbances and have proven their sensitivity in evaluating

the effects of trace metals in contaminated soils (Chaperon and Sauvé, 2007; Zhang et al., 2010). Measurements of enzymatic activities can thus improve our understanding of the impacts nAg can have on soil microbial processes. Various type of enzymes are found in soils- intracellular enzymes found within live organisms and released or accumulated extracellular enzymes which may occur either free in the soil solution or bound to soil components (Tabatabai and Dick, 2002). Since the presence of enzymes is an index of microbial diversity in the soils, enzyme activity measurements should be representative of the different metabolic processes at work in the soils (Nannipieri et al., 2002).

Therefore, the main objective of this work was to investigate the effects of nAg in soil ecosystems by measuring enzyme activities. The hydrolases: phosphomonoesterase, arylsulfatase,  $\beta$ -D-glucosidase and leucine-aminopeptidase, which are involved in the hydrolysis of P, S, C and N compounds, respectively, were chosen for study principally because they are well documented and have been studied for years. Hydrolases are relatively simple enzyme systems that have been shown to be resistant to a wide range of physical factors in soil environments (Tabatabai and Dick, 2002). The measurement of enzyme activities was based on a sensitive fluorometric technique. Enzyme assays were applied to agricultural soil samples that were amended or not with a leaf compost in order to specifically investigate the role of SOM. Soil samples were treated with nAg and  $\text{Ag}^+$  (as acetate) at equivalent total soil Ag concentrations. The proportion of the toxicity that was attributed to nAg was evaluated by determining total and dissolved Ag in the soil and soil solutions in addition to a number of measurements of  $\text{Ag}^+$  speciation.

## 2.2 Materials and methods

### 2.2.1 Materials and reagents

All polymer ware and glass containers were soaked in 0.1%  $\text{HNO}_3$  (certified ACS Plus grade, Fisher) at least for 24 hours, then rinsed copiously with ultrapure water ( $\rho$

>18 M $\Omega$  cm and total organic carbon <2  $\mu\text{g C L}^{-1}$ ) (Millipore). A stock solution of nAg (1 g Ag L<sup>-1</sup>) was purchased as an aqueous suspension of nAg stabilised by a polyacrylate coating (purchased from Vive Crop Protection, formerly Vive Nano Inc.). Both the manufacturer and a previous study (Peulen and Wilkinson, 2011) have confirmed a particle size distribution between 2 and 10 nm. The concentration of the polyacrylate was estimated to be 4.0 g L<sup>-1</sup> by gravimetry while total Ag was measured as 1.10  $\pm$  0.27 g L<sup>-1</sup> by atomic absorption spectrometry using pyrocoated graphite tubes and a Zeeman background correction system (AAS-GF, Varian GTA 120-AA 240Z-PSD 120, Agilent Technologies, Mississauga, ON). Silver concentrations were determined after a 48 hour acid digestion with HNO<sub>3</sub> (trace metal grade, Fisher) at 100 °C in 50 mL polypropylene (PP) tubes. A 5.01 g Ag L<sup>-1</sup> stock solution of ionic silver, Ag<sup>+</sup>, was prepared from silver acetate CH<sub>3</sub>COOAg (99.99% trace metal free, Aldrich) in Milli-Q water with 3 drops of glacial acetic acid CH<sub>3</sub>COOH (ACS HPLC, Fisher). Aqueous working solutions of Ag<sup>+</sup> (as acetate) and nAg were prepared at 0.1, 5.0 and 50.0 mg Ag L<sup>-1</sup>. The choice of CH<sub>3</sub>COOAg (Ag-acetate) instead of the more commonly used salts (AgNO<sub>3</sub> or Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) was made in order to avoid biasing the N and S activities by adding nitrate or sulphate. Acetate was not expected to be a target for the glucosidase enzyme studied here, although this point was tested in control studies (below).

The activities of phosphomonoesterase, arylsulfatase,  $\beta$ -D-glucosidase and leucine-aminopeptidase were determined using the fluorescent substrates 4-methylumbelliferone-phosphate (MUB-phosphate), 4-methylumbelliferone-sulfate (MUB-sulfate), 4-methylumbelliferone-glucopyranoside (MUB-glucopyranoside) and L-leucine-7-amino-4-methyl coumarin (L-leucine-AMC), respectively (Table II-1). Substrates were all obtained from Glycosynth (Cheshire, England) in high purity powders. The fluorophores 4-methylumbelliferone (MUB) and 7-amino-4-methyl coumarin (AMC) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Five mM stock solutions of MUB and AMC were prepared in DMSO (dimethylsulfoxide) and found to be stable for at least 6 months (4 °C, dark). Stock solutions of the MUB-substrates and L-leucine-AMC were prepared in DMSO at 30.0 mM and 15.0 mM, respectively, and

were stable for at least 2 months (4 °C, dark). Solutions of 10 mM sodium acetate at pH ~6 (CH<sub>3</sub>COONa, Trace select, Fluka) were used to extract the enzymes. Working solutions of the MUB/AMC (50.0, 10.0 and 1.0 µM) and the MUB/AMC-substrates (1.0 and 0.1 mM) were prepared in the extracting solution. Working solutions contained no more than 3.4% (v/v) DMSO and were kept for a maximum of 2 weeks (4 °C, dark).

Table II-1. Soil enzymes evaluated with their corresponding synthetic substrates and the substrate concentrations employed in the experimental assays.

<b>Enzyme</b>	<b>EC*</b>	<b>Substrate (<i>concentration</i>)</b>
Phosphomonoesterase	3.1.3.2	MUB-phosphate ( <i>50 µM</i> )
Arylsulfatase	3.1.6.1	MUB-sulfate( <i>500 µM</i> )
β-D-glucosidase	3.2.1.21	MUB-glucopyranoside ( <i>100 µM</i> )
Leucine-aminopeptidase	3.4.11.1	L-leucine-AMC ( <i>50 µM</i> )

\* EC corresponds to the enzyme classification as published by International Union for Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB, 1992).

### 2.2.2 Soil sampling and characterisation

A sandy soil was collected from the surface layer of an agricultural field at the Macdonald Campus of McGill University (Sainte-Anne-de-Bellevue, QC). The soil was air-dried, gently crushed with a wooden rolling pin and sieved ( $\leq 2$  mm). The soil was characterized as 88% sand, 10% loam and 2% clay (Kroetsch and Wang, 2008) with a soil organic matter (SOM) content of  $14.7 \pm 1.2$  g C kg<sup>-1</sup> (Tiessen and Moir, 1993); a dissolved organic carbon concentration (DOC) of  $110 \pm 14$  mg C L<sup>-1</sup>; a 30% water hold capacity (WHC) (ISO, 1993); a pH of  $6.55 \pm 0.07$  (water) and  $5.70 \pm 0.07$  (0.01 M CaCl<sub>2</sub>) (Hendershot et al., 1993b); an electrolytic conductivity of  $61.1 \pm 6.2$  µS cm<sup>-1</sup> (Janzen, 1993) and a cationic exchange capacity (CEC) of  $10.7 \pm 0.9$  cmol<sub>(+)</sub> kg<sup>-1</sup>

(Hendershot et al., 1993a). Measurements of pH were made using a Radiometer ion analyzer PHM250 (Radiometer Copenhagen, Lyon, France) with an epoxy body pH combination electrode using a calomel reference (Accumet, Fisher) while electrolytical conductivity was measured using an YSI model 85 conductivity meter (YSI, Yellow Spring, OH).

An aliquot of the soil was amended by the addition of 1% (w/w) of a leaf compost, collected from a rural location (Ithaca, NY) (Sauvé et al., 1998). This amendment resulted in an increase of the SOM to  $17.8 \pm 0.1 \text{ g C kg}^{-1}$  and the DOC to  $156.3 \pm 4.3 \text{ mg C L}^{-1}$  with a small concurrent increase of the soil pH (0.01 M  $\text{CaCl}_2$ ) to  $5.96 \pm 0.07$ .

### 2.2.3 Experimental design

Low-end concentrations of added nAg were based upon reports of expected concentrations of Ag in the environment (Gottschalk et al., 2009; Luoma, 2008) while high-end concentrations were selected in an attempt to better explore dose-response relationships. Both the original and amended soils were spiked with nAg or Ag-acetate using stock and working aqueous solutions that were prepared 24 hours before use. For experiments using Ag-acetate, sodium acetate (Na-acetate, pH ~6) was added to some treatments in order to ensure that all treatments had the same acetate concentration. In addition, one sample with an extremely high Ag concentration ( $\sim 750 \text{ mg Ag kg}^{-1}$ ) was used as the positive (biocide) control (Chaperon and Sauvé, 2007; Qureshi et al., 2003; Tate III Robert L., 2002).

Soil samples were wetted at 92% WHC and then shaken by hand. They were covered with a geo-textile membrane and stored until dry, for at least one week, at room temperature (Temperature  $\sim 22^\circ\text{C}$  and humidity  $\sim 54\%$ ), in order to allow the added metals to attain pseudo-equilibrium with the soil. This wet-dry cycle was repeated twice (for a total of three cycles). Then, after adding water corresponding to  $2 \times \text{WHC}$ , samples supported by a geo-textile membrane on commercial sand (wash sand for playground, Appalache Valley, S. Boudrias Inc., QC) were drained overnight. Finally, the samples were covered by the geo-textile membrane and left an additional 3

weeks at room temperature. Air-dried soil samples were transferred into plastic bags and kept sealed at room temperature until processing for chemical analysis and enzyme assays. The entire equilibration procedure reduced enzyme activities by half (data not shown); however, this was necessary to simulate the aging process. Control samples and spikes to the same soil were treated simultaneously in order to control experimental variability.

#### 2.2.4 Enzyme assays

Enzyme activities were conducted on soil slurries samples using fluorogenic substrates, using a protocol developed by Marx et al. (2001) and described in an ISO/TS 22939 report (ISO, 2010). Sample suspensions were prepared by adding 2.00 g of an air-dried soil to 50 mL of 10 mM Na-acetate (pH ~6). The precise pH and ionic strength ( $I$ ) of the Na-acetate solution were determined from the characteristics of the soil so that enzyme activities could be measured under conditions that were as similar as possible to natural conditions. The natural buffer capacity of the soil (in addition to the 10 mM acetate) was sufficient to maintain pH constant (over time and among treatments) in the enzyme assays (see Supporting Information). Samples were homogenized for 3 min with a Power Gene 125 (10 mm\*95 mm) homogenizer (Fisher Scientific). Homogenization was performed using an intermediate speed and an ice-bath in order to avoid excessive heating, which can result in alterations to enzyme activities. Samples were subsequently placed in a refrigerated ultrasonic bath for 5 min (Bransonic 5510, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT). The samples were then centrifuged for 2 min at  $4000\times g$  (Multifuge 1 S-R, Heraeus, DJB labcare Ltd, Buckinghamshire, England). Fifty  $\mu\text{L}$  of the resulting supernatant were pipetted into 96-well microplates (black flat bottom, PP, Greiner Bio One) in three technical replicates. After addition of enzyme substrates (Table II-1) and the Na-acetate solution, each well of the microplate contained 200  $\mu\text{L}$  of solution. Multi-well plates were then covered with an aluminum sealer and incubated for 24 hours at 30 °C while being shaken at 110 rpm (Innova 4230, New Brunswick Scientific, Edison, NJ). Fluorescence intensities were measured using an excitation wavelength of  $330 \pm 9$  nm for MUB and

360 ± 9 nm for AMC with a fluorescent emission of 460 ± 20 nm (Infinite M200, Tecan, Durham, NC) (see Figure S1). Note that the nAg did not emit at these wavelengths used here (data not shown). Standard calibrations of MUB and AMC (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 4, 6, 10, and 20 µM) were performed using three technical replicates in the same plate. Each enzyme assay was compared with a standard curve that was prepared with an identical sample matrix (see Figure S2). Background wells were also included, which consisted of triplicate working solutions of the substrate at its final concentration for each enzyme. The results were calculated by subtracting the average signal of both the blanks (soils) and the background wells (substrates, no soils) from the sample. Enzyme activities were expressed as nmol MUB or AMC g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> and normalization was performed against the corresponding non-spiked sample (control) in order to obtain percentage (%) of enzyme activity.

### 2.2.5 Chemical analysis

#### 2.2.5.1 Speciation of stock and working solutions of Ag

Concentrations of free ionic Ag in the nAg working solutions that was used to spike the soil were measured using an ion analyzer PHM250 with a silver ion selective electrode (ISE, Thermo Scientific) following adjustment of the ionic strength to 0.1 M using NaNO<sub>3</sub> (sodium nitrate, Trace select, Fluka). The ISE measurements were compared with centrifugal ultrafiltration (UF) performed with a 3 kDa modified polyethersulfone membrane (Microsep centrifugal devices, Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI). The ultrafiltration technique is explained below. In addition, in order to evaluate the effect of dilution on the dissolution of the nAg, additional ISE and ultrafiltration measurements were made with nAg solutions (0.1, 5.0, 20.0, 50.0, 500.0 and 1000.0 mg Ag L<sup>-1</sup>) diluted to 1.0 mg Ag L<sup>-1</sup> in water. In that case, measurements were performed in the hour following solution preparation and after 48 hours of equilibration (ISE only). Solutions were kept at 4 °C.

### 2.2.5.2 Soil samples

Total soil Ag concentrations were determined using GFAAS and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, NexION 300x, Perkin Elmer, Woodbride, ON) following acid digestion of about 1.00 g of soil with 10 mL HNO<sub>3</sub> using a heated digester DK 42/26 (VELP Scientifica, Usmate, Italia) and 26\*300 mm glass digest tubes, at 95 °C, overnight. A certified soil (CRM 027 050, Resource Technology Corporation, Laramie, WY) with an Ag concentration of 5.98 ± 0.28 mg kg<sup>-1</sup> was used as the quality control (QC) for the acid digestion. In addition, a laboratory internal QC standard was made from a fresh spike of 1.0 mg nAg kg<sup>-1</sup> in the non-spiked soil.

Dissolved Ag was analysed in microfiltration (MF) and UF extracts using GFAAS and ICP-MS. Soil samples (2.00 g air-dried soil in 50 mL of 10 mM Na-acetate, pH ~6) were shaken overnight on a reciprocal shaker and then centrifuged for 2 min at 4000×g. The resulting supernatants were filtered through 0.45 µm cellulose acetate membranes (Whatman International Ltd). In a second step, 0.45 µm filtrates of the nAg samples were passed through 3 kDa ultrafiltration membranes by centrifuging at 4000×g for 20 min. This second molar mass cut-off allowed for the determination of the “truly dissolved Ag” (<1 nm) (Aiken et al., 2011). In order to reduce adsorption (increase recoveries) of the dissolved Ag, MF and UF membranes were pre-treated with 0.1 M Cu<sup>2+</sup>(Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, Anachemia Chemicals Ltd, Montréal, Qc) followed by a rinse with ultrapure water (Cornelis et al., 2010). Ultrafiltration devices were also post-washed with 10% HNO<sub>3</sub> overnight. Prior to analysis, MF filtrates and UF particulates of the nAg samples were digested for 48 h at 100 °C with pure HNO<sub>3</sub> in 15 mL PP tubes.

### 2.2.6 Data analysis

Results for the enzyme assays are presented as the mean ± standard deviation obtained from six independent replicates. Chemical measurements were duplicated or triplicated and were also presented as a mean ± standard deviation. Experimental data



were analysed using a one-way ANOVA (SigmaPlot 11.0). In cases of a significant  $F$ -statistic ( $p < 0.05$ ), a Newman-Keuls test was used to distinguish differences among the means at 3 different levels ( $p < 0.1$ ,  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ ). Effective concentration values ( $EC_{50}$  and  $EC_{25}$ ) were derived from linear regressions of data which were not in the plateau regions (Sauvé et al., 2002). Plateau regions occurred either at low-end concentrations where no inhibition was observed or at high-end concentrations where inhibition was complete.

## 2.3 Results

### 2.3.1 Chemical measurements of Ag

Soil samples were spiked with either  $Ag^+$  (Ag-acetate) or nAg in order to distinguish their effects on soil enzyme activities. Since oxidation of the nAg will contribute  $Ag^+$  to the experimental solutions of nanoparticles (Liu and Hurt, 2010), it is essential to measure Ag speciation under the precise experimental conditions that were employed for the enzyme assays. Two methods were used to determine Ag speciation. The ISE measures ionic  $Ag^+$  with an excellent linearity and a low-activity range can be obtained when the titration of  $Ag^+$  is made in the presence of halogen ions such as iodide ( $pAg \sim 14$ ) (Koch et al., 2012). For unbuffered standards (as was the case here), an experimental detection limit (DL) of ca.  $10^{-7}$  M  $Ag^+$  was determined (Figure S3), as reported in the User guide (Silver/sulfide ion selective electrode; Thermo Fisher Scientific Inc.) using the direct calibration procedure. The UF protocol determines free Ag and its small complexes ( $< 3$  kDa) with a DL that is set by the ICP-MS analysis (ca.  $\sim 10^{-10}$  M or 25 ng L<sup>-1</sup> of Ag).

#### 2.3.1.1 Stock and working solutions of nAg

Using the ISE, an  $Ag^+$  concentration of  $20.1 \pm 1.8$  mg L<sup>-1</sup> ( $1.86 \times 10^{-4}$  M) was determined for the nAg stock solution, which corresponded to 2.0% of the total Ag.

Working solutions of 0.1, 5.0 and 50.0 mg nAg L<sup>-1</sup> gave free Ag determinations of  $0.061 \pm 0.005$ ,  $0.39 \pm 0.03$  and  $3.04 \pm 0.47$  mg L<sup>-1</sup>, respectively, which corresponded to 61%, 7.8% and 6.1% of the total Ag. Significantly less Ag was found in the ultrafiltrate of the centrifugal UF procedure than was determined by the ISE for nominal nAg concentrations >5 mg L<sup>-1</sup> (Figure 2.1). Furthermore, there was no evidence to suggest that diluted solutions of nAg were not at equilibrium since dilution of several nAg stock solutions (5.0, 20.0, 50.0, 500.0 and 1000.0 mg Ag L<sup>-1</sup>) to 1 mg Ag L<sup>-1</sup> followed by their immediate or equilibrated (48 h) measurement gave ca.  $\sim 0.1$  mg Ag<sup>+</sup> L<sup>-1</sup> in all cases (see Figure S4).

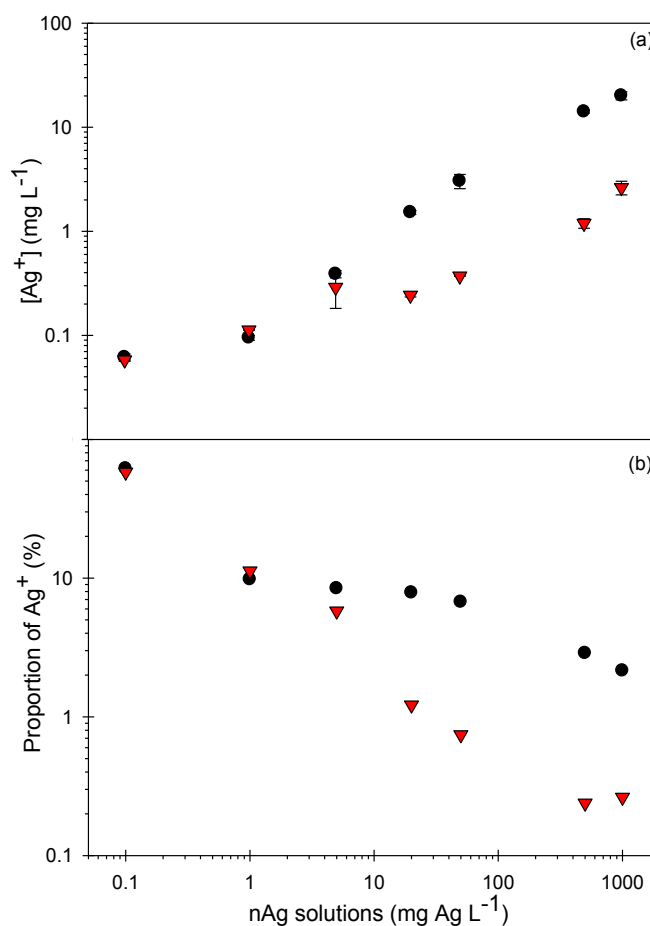


Figure 2.1. Concentrations of Ag<sup>+</sup> (a) measured in the nAg solutions using ISE (circles) and UF <3 kDa (triangles) and the corresponding proportion of Ag<sup>+</sup> (b).

### 2.3.1.2 Soil samples

Determinations of the total soil Ag in the reference samples were very close to expected values with  $5.87 \pm 0.09 \text{ mg kg}^{-1}$  found in the certified soil CRM (expected Ag concentration of  $5.98 \pm 0.28 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and  $1.05 \pm 0.08 \text{ mg kg}^{-1}$  measured in the internal nAg QC standard (expected value of  $1.0 \text{ mg Ag kg}^{-1}$ ). Total Ag concentrations determined in the spiked soils are shown in Table II-2. In the treatments with the smallest Ag spikes (treatments 1, 2, 3 and 4), measured Ag concentrations were higher than nominal concentrations due to the high Ag concentration ( $0.059 \pm 0.006 \text{ mg kg}^{-1}$ ) of the non-spiked soil. Similarly, an increase to  $0.091 \pm 0.004 \text{ mg Ag kg}^{-1}$  was observed in the amended soil, which can be attributed to the leaf compost itself, which contained  $2.26 \pm 0.32 \text{ mg Ag kg}^{-1}$ . In both the OM-amended and non-amended soils, it was impossible to distinguish among the total Ag concentrations in treatments 1 to 3. In treatments 4 to 7, the total silver concentrations in the soils varied from 0.2 to  $30 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Ag concentrations in the filtered ( $0.45 \mu\text{m}$ ) extracts (named *dissolved* Ag) were also similar, varying between  $4.0 \times 10^{-9}$  and  $11.2 \times 10^{-9} \text{ M}$  in treatments 1 to 5 for both the nAg and  $\text{Ag}^+$  (as acetate) treatments and for both types of soil (Table II-3). Dissolved Ag concentrations were higher in treatments 6 and 7, and not statistically different for the different added Ag forms at a given treatment level. Similar dissolved Ag concentrations were found in the OM-amended and non-amended soil, with the exception of the highest Ag treatment 7, for which the OM-amended soil contained significantly more Ag than the non-amended soil. Soil extracts of the nAg samples were also ultrafiltered through a 3 kDa membrane corresponding roughly to a 1 nm pore size ("*truly dissolved*" Ag). Silver concentrations in ultrafiltrates 1 to 5 were similar, between  $2.2 \times 10^{-9}$  and  $3.6 \times 10^{-9} \text{ M}$ , whereas significantly higher concentrations of truly dissolved Ag were observed in treatments 6 and 7.

Table II-2. Total soil Ag concentrations in the non-amended soil and the organic matter amended soil, spiked with nAg or Ag<sup>+</sup> (as acetate).

Treatment #	Total Ag concentrations in soil (mg Ag kg <sup>-1</sup> )			
	<i>Non-amended soil (1.5% C<sub>org</sub>)</i>		<i>OM-amended soil (1.8% C<sub>org</sub>)</i>	
Added Ag form	<b>nAg</b>	<b>Ag<sup>+</sup> (as acetate)</b>	<b>nAg</b>	<b>Ag<sup>+</sup> (as acetate)</b>
(mg Ag kg <sup>-1</sup> )	<sup>a</sup> pH = 5.69 ± 0.06	<sup>a</sup> pH = 5.72 ± 0.07	<sup>a</sup> pH = 5.92 ± 0.05	<sup>a</sup> pH = 6.00 ± 0.08
(1) none	<sup>b</sup> 0.059 ± 0.006		<sup>b</sup> 0.091 ± 0.004	
(2) 0.00125	0.054 ± 0.014	0.057 ± 0.012	0.091 ± 0.002	0.091 ± 0.008
(3) 0.0125	0.067 ± 0.004	0.077 ± 0.008	0.145 ± 0.004	0.10 ± 0.01
(4) 0.125	0.23 ± 0.04	0.20 ± 0.06	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.01
(5) 1.25	1.58 ± 0.04	1.35 ± 0.01	1.31 ± 0.04	1.34 ± 0.04
(6) 6.25	6.51 ± 0.30	6.06 ± 0.17	6.47 ± 0.25	5.93 ± 0.04
(7) 31.25	28.1 ± 1.6	29.8 ± 0.7	27.5 ± 0.4	28.1 ± 0.5
Biocide (~750 mg Ag kg <sup>-1</sup> )	718 ± 29		639 ± 1	

<sup>a</sup>mean soil pH value in 0.01 M CaCl<sub>2</sub>; <sup>b</sup>average Ag concentration of non-spiked soil

Table II-3. Dissolved and ultrafiltered (3 kDa) Ag concentrations measured in the non-amended soil and the organic matter amended soil spiked with nAg and Ag<sup>+</sup> (as acetate).

Treatment #	Dissolved [Ag] ( $\times 10^{-9}$ M)							
	<i>Non-amended soil (1.5% C<sub>org</sub>)</i>			<i>OM-amended soil (1.8% C<sub>org</sub>)</i>				
Added Ag form	nAg		Ag <sup>+</sup> (as acetate)	nAg		Ag <sup>+</sup> (as acetate)		
(mg Ag kg <sup>-1</sup> )	<0.45 $\mu$ m	<3 kDa	<sup>a</sup> % Ag	<0.45 $\mu$ m	<0.45 $\mu$ m	<3 kDa	<sup>a</sup> % Ag	<0.45 $\mu$ m
(1) none	<sup>b</sup> 5.33 $\pm$ 0.83	<sup>b</sup> 3.61 $\pm$ 1.07	67.7	<sup>b</sup> 5.33 $\pm$ 0.83	<sup>b</sup> 6.02 $\pm$ 1.40	<sup>b</sup> 3.37 $\pm$ 0.67	55.4	<sup>b</sup> 6.02 $\pm$ 1.40
(2) 0.00125	9.43 $\pm$ 0.44	3.37 $\pm$ 0.32	35.7	5.50 $\pm$ 0.26	10.2 $\pm$ 0.7	2.33 $\pm$ 0.44	22.7	10.7 $\pm$ 2.2
(3) 0.0125	7.79 $\pm$ 1.01	3.04 $\pm$ 0.21	39	4.09 $\pm$ 0.23	7.21 $\pm$ 0.47	2.87 $\pm$ 0.73	39.7	6.75 $\pm$ 0.51
(4) 0.125	7.43 $\pm$ 0.76	2.27 $\pm$ 0.16	30.6	4.26 $\pm$ 0.31	7.06 $\pm$ 0.54	2.51 $\pm$ 0.28	35.6	5.30 $\pm$ 0.46
(5) 1.25	11.2 $\pm$ 0.8	3.01 $\pm$ 0.52	26.9	7.07 $\pm$ 0.42	9.84 $\pm$ 1.14	3.38 $\pm$ 0.32	34.4	5.64 $\pm$ 0.46
(6) 6.25	24.2 $\pm$ 1.8**	5.69 $\pm$ 0.93**	23.5	18.3 $\pm$ 1.4*	31.0 $\pm$ 4.0***	4.73 $\pm$ 0.34**	15.3	23.0 $\pm$ 1.6
(7) 31.25	160 $\pm$ 9***	13.3 $\pm$ 2.1***	8.4	197 $\pm$ 16***	280 $\pm$ 15***	17.6 $\pm$ 0.1***	6.3	307 $\pm$ 23***
Biocide (~750 mg Ag kg <sup>-1</sup> )	19300 $\pm$ 1070			13300 $\pm$ 1500				

<sup>a</sup> proportion of ultrafiltered or “truly dissolved” Ag (<3 kDa / <0.45 $\mu$ m) for nAg samples

<sup>b</sup> average [Ag] of non-spiked soil

\**p*-value < 0.1; \*\* *p*-value < 0.05; \*\*\* *p*-value < 0.001

### 2.3.2 Soil enzyme activities

Effects on the enzymatic processes were determined on four enzymes: phosphomonoesterase, arylsulfatase,  $\beta$ -D-glucosidase and leucine-aminopeptidase and results have been normalized to the corresponding control, which were assumed to have an activity of 100%. In general, an inhibition of the enzyme activities was observed as a function of Ag concentrations in the soil, with less inhibition being observed for the organic matter amended soil (Figure 2.2). No effects were detected due to the added acetate, except for a significant ( $p < 0.05$ ) lower activity of 10% which was observed for phosphomonoesterase. Similarly, the amendment with organic matter had no significant effect on the activities of the control samples. As expected, treatment with the Ag biocide resulted in the highest inhibition for all of the recorded enzyme activities, acting as an effective positive control.

Arylsulfatase showed sensitivity to the Ag treatments - no arylsulfatase activity was measured in the soils where biocide concentrations of Ag were added and arylsulfatase activities decreased in proportion to the nominal concentrations of added Ag (Figure 2.2). In the soil treatment without the organic matter amendment, inhibition was observed in all of the nAg and  $\text{Ag}^+$  (as acetate) treatments with the greatest decrease in enzyme activity observed in treatments 4 to 7, where activities were approximately 30% of control values. In contrast, in the OM-amended soils, the enzyme activity was significantly inhibited only for the highest Ag treatment (7) (for both  $\text{Ag}^+$  - as acetate- and nAg) and for the biocide sample.

Phosphomonoesterase appeared to be the least affected enzyme since activities in the biocide samples were 29.5% of the control in the non-amended soil and 48.6% of the control in the OM-amended soil. Furthermore, no significant effect was observed as a result of the  $\text{Ag}^+$  (as acetate) treatments in either soil. For the highest treatment concentrations of nAg ( $6.25 \text{ mg Ag kg}^{-1}$ ) phosphomonoesterase activity decreased to 32.9% of the control values in the non-amended soil and to 49.2% of the control values in the OM-amended soil.

Similarly, no significant effect due to  $\text{Ag}^+$  (as acetate) was observed for  $\beta$ -D-glucosidase activity in either soil except for the biocide samples. In the non-amended soil, a decrease in the  $\beta$ -D-glucosidase activity to 43% of the control was observed for the highest concentration of added nAg, whereas no effect was observed in the OM-amended soil.

The activity of the leucine-aminopeptidase was not significantly affected by the addition of  $\text{Ag}^+$  (as acetate) in either soil except in the presence of the biocide, where an activity close to zero was observed. On the other hand, for an addition of 1.25 mg  $\text{kg}^{-1}$  of nAg (treatment 5) to the non-amended soil, leucine-aminopeptidase activities decreased significantly to 53.8% of the control value. Surprisingly, an apparently hormesis-like increase of the activity was observed for treatment 6 (6.25 mg  $\text{Ag kg}^{-1}$  added) in the non-amended soil. Although this increase is not statistically different from the control, the apparent stimulation yielded an activity that was significantly higher than neighbouring values (Figure 2.2).

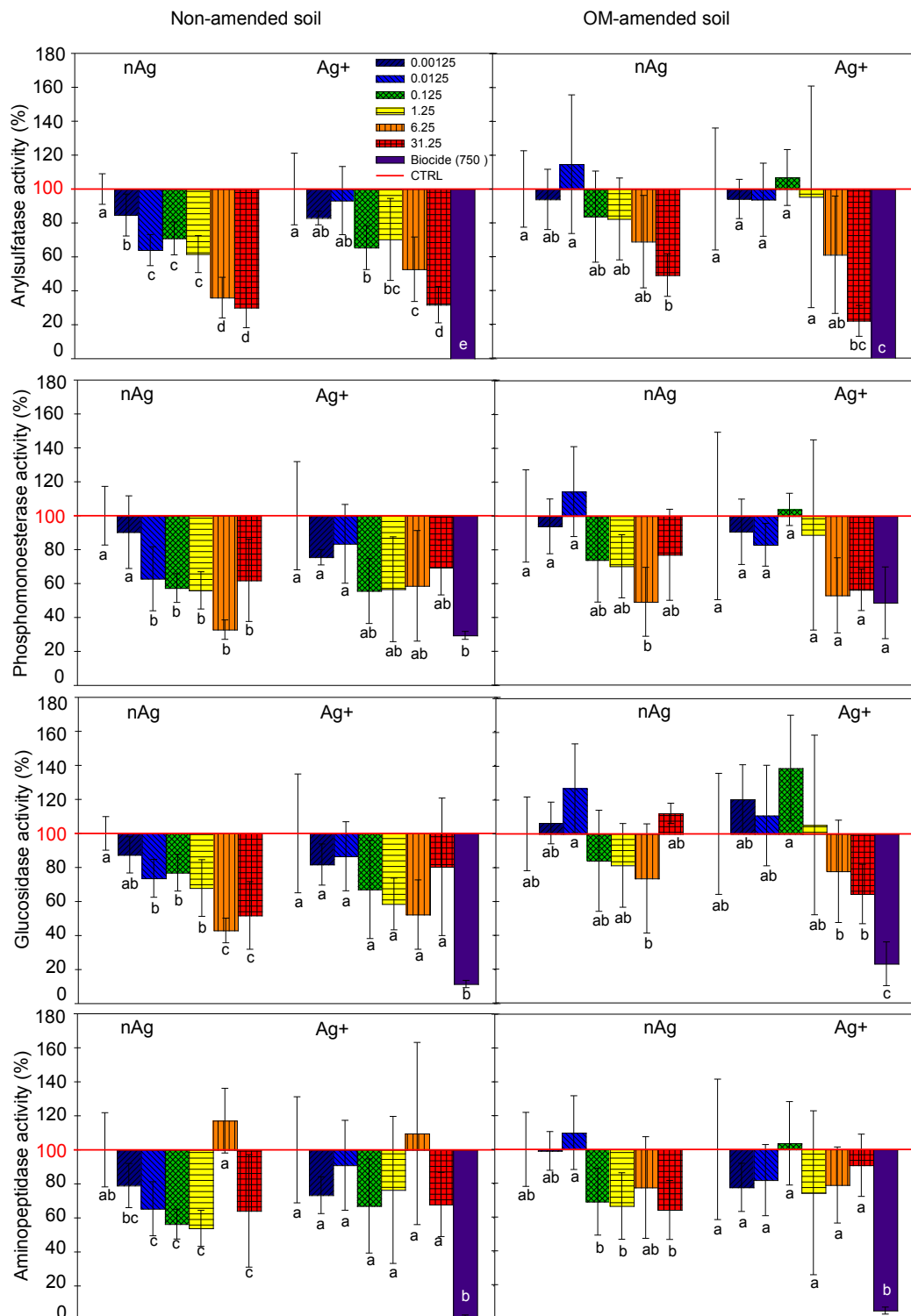


Figure 2.2. Percentage of soil enzymes activities relative to control treatments (indicated by the horizontal line at 100%) after exposure to nAg and Ag-acetate (Ag<sup>+</sup>)



for the non-amended soil (left) and for the soil amended with organic matter (right). For each set of bars, treatment numbers increased from left to right with corresponding nominal concentrations ( $\text{mg Ag kg}^{-1}$ ) given in the legend and in Table II-2. Error bars represent standard deviations ( $n=6$ ). Treatments with the same letter were not significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 2.3.3 Relative toxicity of nAg and $\text{Ag}^+$

It is admittedly difficult to determine effective concentration values which affect 25% or 50% of the enzyme activities (i.e.  $EC_{25}$  or  $EC_{50}$  values) from these data. Concentrations were determined in different manners- nominal, total, filtered and ultrafiltered and while enzyme activities generally decreased with increasing Ag, several examples of stimulation were also observed (ca. aminopeptidase activity, Figure 2.2). When statistically significant differences were observed among treatments,  $EC_{25}$  and  $EC_{50}$  values were determined from linear regressions by excluding data that were found in the plateau regions by using the following equations (e.g. Figure 2.3 for arylsulfatase activities and Figures S5-S11):

$$\log EC_{25} = \frac{\left[ \max - \left( \frac{\max - \min}{4} \right) \right] - b}{m} \quad (\text{Equation 2.1})$$

$$\log EC_{50} = \frac{\left[ \max - \left( \frac{\max - \min}{2} \right) \right] - b}{m} \quad (\text{Equation 2.2})$$

where max and min are the mean responses obtained for treatment 1 (max) and the treatment showing the smallest activity (min),  $m$  is the slope of the linear regression and  $b$  is the intercept.

The  $EC_{50}$  values determined for each enzyme and for both soils have been summarized in Table II-4. The coefficient of determination ( $R^2$ ) and the  $EC_{25}$  values

have been given in the Supplementary Information (Table S2). Linear regressions for the enzyme activities as a function of the truly dissolved Ag (<3 kDa) (Figure 2.3d) were quite difficult to perform given that the data for the treatments 2 to 5 were shifted to the left of the control values (i.e. treatment 1). In that case, data points were therefore not included in the linear regression (see Figure 2.3d). Threshold  $EC_{50}$  values were generally smaller for nAg treatments than for  $Ag^+$  (as acetate) treatments for both soils. In addition, the amendment of SOM appeared to decrease the Ag toxicity.

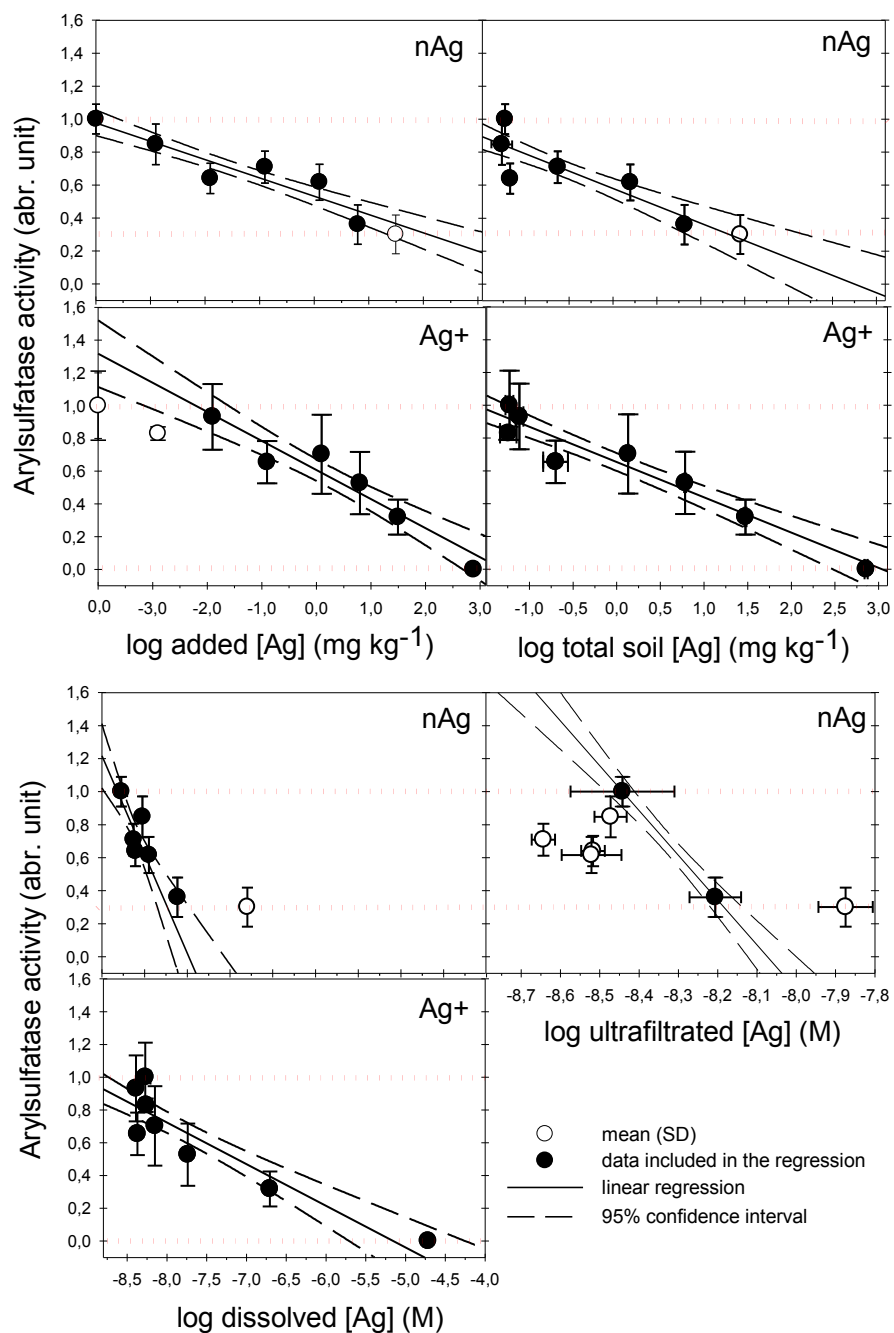


Figure 2.3. Linear regressions deriving  $EC_x$  values for arylsulfatase activities in the non-amended soil after exposure to nAg and  $Ag^+$  (as acetate). Data excluded from the regression are given by the open circles. The horizontal dashed lines represent the maximum (control soil) and the minimum parameters.

Table II-4. Estimation of the Ag concentration that resulted in a 50% reduction of the enzymatic activity ( $EC_{50}$ ) as a function of: (i) the nominal Ag concentrations, (ii) total soil Ag, (iii) dissolved Ag (0.45  $\mu\text{m}$  filtered) and (iv) truly dissolved Ag (3 kDa filtered) concentrations in the non-amended soil and the OM-amended soil spiked following treatments with nAg and  $\text{Ag}^+$  (as acetate).

**Effective concentration values for 50% inhibition  
of enzyme activities ( $EC_{50}$ )**

	Added Ag (mg Ag $\text{kg}^{-1}$ )		Total soil Ag (mg Ag $\text{kg}^{-1}$ )		Dissolved Ag ( $\times 10^{-9}$ M)		Ultrafiltered Ag ( $\times 10^{-9}$ M)	
	nAg	$\text{Ag}^+$	nAg	$\text{Ag}^+$	nAg	$\text{Ag}^+$	nAg	
<i>Non-amended soil</i>								
Arylsulfatase	0.09	3.96	0.46	5.18	9.42	78.2	4.86	
Phosphomonoesterase	0.009	0.55	0.07	2.36	8.64	44.1	4.74	
$\beta$ -D-glucosidase	0.07	97.3	0.42	92.9	9.53	1012	4.74	
L-leucine-aminopeptidase	0.002	70.6	0.06	67.4	7.3	639	-	
<i>OM-amended soil</i>								
Arylsulfatase	1.6	11.6	2.55	11.6	33.7	126	5.98	
Phosphomonoesterase	0.43	ND	0.87	ND	13.4	ND	3.99	
$\beta$ -D-glucosidase	ND	29.3	ND	38.4	ND	275	ND	
L-leucine-aminopeptidase	ND	129	ND	113	ND	1649	ND	

ND: not determined given the lack of statistically significant differences among treatments.

## 2.4 Discussion

### 2.4.1 Role of natural organic matter on Ag and nAg toxicity

Clearly, the role of the chemical speciation of Ag on its effects in soils is extremely important- for both nAg and  $\text{Ag}^+$  (as acetate) additions to the soil, the addition of the OM compost clearly reduced the negative effect of Ag on soil enzyme activities (Figure 2.2). Generally, the addition of OM resulted in higher dissolved Ag as compared to the non-amended soil (Figure 2.4); this was especially the case for treatments containing the higher Ag concentrations. The increase can be explained by an increase in the dissolved organic matter content (DOM) of the soil, in part due to the slightly higher pH of the amended soil (Table II-2). At  $\text{pH} > 5$ , the desorption of SOM is favoured due to the deprotonation of functional groups on both the organic matter (*e.g.*, -ROH, -COOH) and the inorganic surfaces sites of the soil (Ekstrom et al., 2011; You et al., 1999). Although the mean pH difference between the non-amended and OM-amended soil was only about 0.3 pH, Kalbitz et al. calculated that an increase of 0.5 units in the soil pH would lead to an increase of about 50% in the amount of mobilized OM (Kalbitz et al., 2000). Furthermore, Satomi et al. recently investigated the role of pH on the binding of Ag to a mor layer and to a peat material and confirmed that the soluble Ag concentrations increased above pH 4 as a function of DOC (Satomi et al., 2011). This result was attributed to the formation of dissolved Ag-organic complexes. Ionic Ag is known to have a high affinity to soil particles and OM, partly because of its positive charge (Jacobson et al., 2005), whereas significant electrostatic repulsion should occur for the carboxylate coated nAg. Indeed, based upon sequential extractions of nAg (citrate capped) and Ag ( $\text{AgNO}_3$ ) in two soils with contrasting OM content (a mineral and an organic soil with 1.5% and 14.2%  $\text{C}_{\text{org}}$ , respectively) Coutris et al. (2012) showed that over 70 days,  $\text{Ag}^+$  from the  $\text{AgNO}_3$  was more strongly sorbed to the soils than nAg. Furthermore, they showed that both pools of Ag were nearly totally recovered by dissolution using strong mineral acids, oxidizing or reducing agents. The main difference was that in the mineral soil, the nAg were associated to reducible materials (Mn/Fe oxide) about 10 times more than it was associated to the

organic material, whereas the affinity of the  $\text{AgNO}_3$  was only about 1.5 times greater, after 35 days of contact time (Coutris et al., 2012). Given the complexity of the soil matrix, other parameters such as the organic or inorganic matter found in the soil solutions may influence the apparent binding affinity of the Ag.

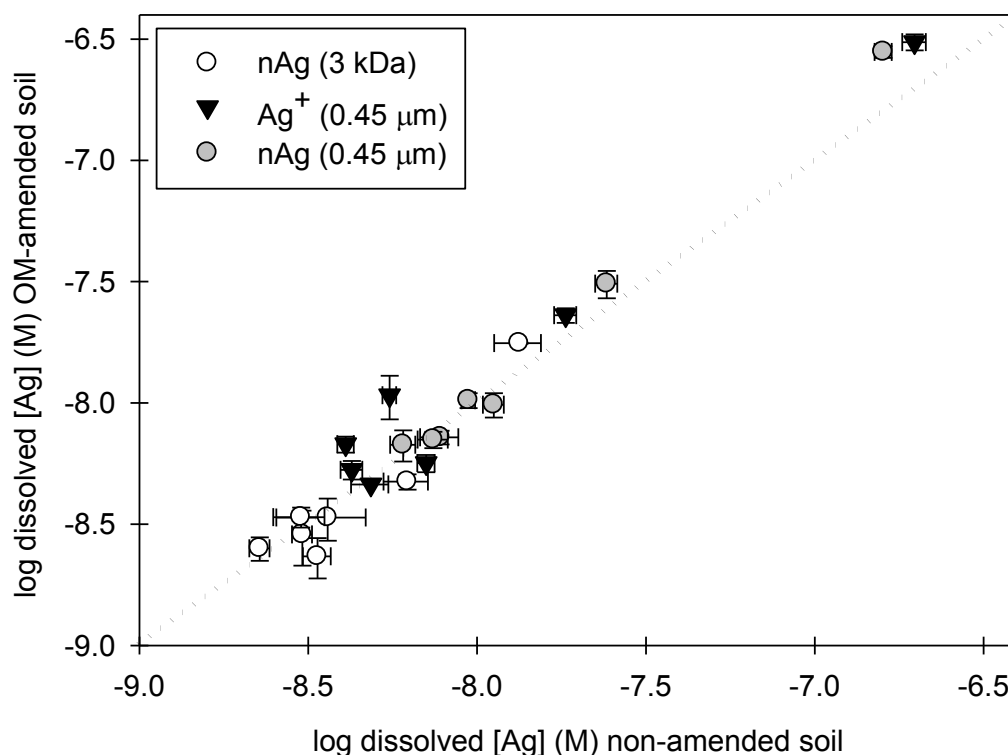


Figure 2.4. Comparison of dissolved Ag concentrations between the non-amended soil (1.5%  $C_{\text{org}}$ ) and the OM-amended soil (1.8%  $C_{\text{org}}$ ). Soil solution of  $\text{Ag}^+$  samples were filtered by 0.45  $\mu\text{m}$  only, instead of soil solution of nAg samples which were filtered by 0.45  $\mu\text{m}$  and 3 kDa (= 1 nm) successively (an arbitrary 1:1 linear regression is illustrated with the dash line).

Chen et al. have recently investigated the binding of trace levels of  $\text{Ag}^+$  to humic acids using 2 methods, the equilibrium ion-exchange technique and equilibrium dialysis (Chen et al., 2012b). Ionic silver activities were measured for  $1 - 300 \times 10^{-9}$  M Ag in solutions containing  $5 \text{ mg C L}^{-1}$ . Their results were similar for both methods and demonstrated that below  $7 \times 10^{-9}$  M of total Ag, no  $\text{Ag}^+$  was detected, but above this concentration,  $\text{Ag}^+$  corresponded to 61% of the total Ag in solution. Our results were consistent with these results with determinations of 67.7% of truly dissolved Ag for the non-amended soil and 55.4% for the OM-amended soil (Table II-3). Nonetheless, in our case, a negative non-linear correlation was noted between the proportion of truly dissolved  $\text{Ag}^+$  and the total nAg. This increasing proportion of dissolved Ag for decreasing nAg concentrations has also been observed in other recent studies (Hadioui et al., 2013; Sotiriou and Pratsinis, 2010).

#### 2.4.2 Is toxicity due to $\text{Ag}^+$ or nAg?

An admittedly high variability was obtained for the enzyme assays in spite of having aged the samples for a month and having measured 6 independent replicates for each treatment. Enzyme activities in the OM-amended soil were even more variable and can be partly attributed to an incomplete homogenisation of the leaf compost and the resulting heterogeneity of OM distribution in the soil. While biological variability is a challenging part of working with soil enzymes, greater inhibition was observed for the enzymes when measured in the presence of nAg as opposed to  $\text{Ag}^+$  (as acetate), in both soils (Figure 2.2). If we exclude the biocide sample, negative effects on the enzyme activities were statistically significant for nAg for all of the tested enzymes, whereas for similar concentrations of added  $\text{Ag}^+$  (as acetate), a significant correlation between Ag concentration and enzyme was only observed for arylsulfatase. In the nAg treatments, measurements of colloidal Ag (less than  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ ) were slightly greater than for the  $\text{Ag}^+$  (as acetate) treatments. In addition, only a small fraction of the nAg was actually “truly dissolved” (Table II-3 and Figure 2.4), suggesting that the observed toxicity to the soil enzymes could be attributed to the nAg (rather than the ionic Ag).

### 2.4.3 Characterization techniques

Nanoparticles are by nature dynamic systems subject to agglomeration, dissolution and redox reactions (Domingos et al., 2009; Hadioui et al., 2013). Particle characterization techniques will therefore record different analytical signals depending upon the physicochemical principle of the technique, the concentration of the sample and the time scale of the measurement, among other factors (Bandyopadhyay et al., 2012; Domingos et al., 2009; Liu et al., 2012). Two methods, ISE and UF, were used here to quantify nanoparticles dissolution. The ISE technique is easy to manipulate and fast, but it is limited to systems of controlled ionic strength and high total metal concentrations (although in buffered systems the ISE can have exceptional detection limits) (Avdeef et al., 1983; Koch et al., 2012; Rachou et al., 2007). The UF devices require more complex manipulations and have detection limits that depend on the capacity of ICP-MS used for quantification of the filtrates ( $10^{-10}$  M or  $25 \text{ ng L}^{-1}$  Ag, in our case). Since there are no known Ag binding ligands in the nAg stock solutions, equal Ag concentrations were expected for the two techniques, *when performed on experimental solutions of nAg prior to mixture with the soils*. Contrary to expectations (Figure 2.1), significant differences were observed between the results generated by the two techniques, suggesting that either the UF technique underestimated or that the ISE overestimated  $\text{Ag}^+$ . When stock solutions were prepared from the Ag-acetate,  $\text{Ag}^+$  determinations made by ISE corresponded to ca. 100% of the total Ag. Furthermore, for low nAg concentrations ( $<5 \text{ mg Ag L}^{-1}$ ), there was strong agreement between the two techniques. While losses of  $\text{Ag}^+$  to the UF membrane could result in an *underestimation of Ag in the permeate*, the effect should be more important at low total Ag concentrations. In addition, prior to filtration of the nAg samples, the membrane was pre-saturated with  $\text{Cu}^{2+}$ , which has been shown to greatly reduce  $\text{Ag}^+$  adsorptive losses (Cornelis et al., 2010). Nonetheless, mass balances comparing the initial Ag of a filtered nAg solution ( $<0.45 \text{ }\mu\text{m}$ ) with the sum of the UF permeate and retentate suggested that typically 10-30% of the Ag (both  $\text{Ag}^+$  and nAg) was retained on the ultrafiltration membrane (Cornelis et al., 2010). Mass balances obtained when the acid washed UF membrane was also considered ( $\Sigma \text{ UF extract} + \text{UF particulate} + \text{acid}$



wash/MF extract) resulted in mass balances that were between 73 and 126%. While an overestimation of the ISE could also lead to similar results (Figure 2.1), there was no indication that this occurred here.

#### 2.4.4 Toxicological assays

Soil enzyme activities appear to be a highly relevant biomarker that can be used to evaluate a potential contamination with nAg. Nonetheless,  $EC_{50}$  values determined from the total soil concentrations were mainly at non-environmental relevant concentrations of Ag, i.e. mg Ag kg<sup>-1</sup> soil, whereas nAg concentrations in the environment are expected to be in the range of µg kg<sup>-1</sup> (Gottschalk et al., 2009; Luoma, 2008). The β-D-glucosidase enzyme assay, while affected by nAg concentrations, was very sensitive to the organic matter content of the soil, as shown by the clearly greater glucosidase activities that were observed in the OM-amended soil (Figure 2.2). Indeed, a significant positive correlation between β-D-glucosidase activity and C availability has been demonstrated previously (Fernandez-Calvino et al., 2010; Lagomarsino et al., 2011; Ros et al., 2006). The leucine-aminopeptidase enzyme assay apparently showed a bimodal response (up then down) at high concentrations of Ag. Such a response might be attributed to the fact that this is a metallo-enzyme, which responds to oxidative stress. It is possible that the enzyme may be up-regulated in response to a metal stress, thus provoking an initial boost to the response to a *sustainable* metal stress, but at higher metal concentrations that exceed the resilience of the system, the response becomes detrimental and is decreased. For example, an up-regulation of leucine-aminopeptidase in cadmium-treated tomato roots has been observed recently (Boulila-Zoghalmi et al., 2011), with similar bimodal changes in aminopeptidase activities being recorded as a function of total Cd concentrations in mineral solutions varying between 0 and 300 µM. The arylsulfatase enzyme was clearly the most sensitive enzyme that was analysed here. Responses to Ag<sup>+</sup> and nAg were similar, suggesting that the enzyme may have mainly been reacting to nAg dissolution and thus this enzyme would likely not be a useful biomarker for discriminating nAg and Ag<sup>+</sup>. Acid phosphomonoesterase is known for having a poor sensitivity to the presence of

Cd, (Renella et al., 2004) Cr, Ni and Cu (Warman and Munroe, 2010), even when subjected to relatively high contamination levels (i.e.  $\text{g kg}^{-1}$  soil). In this study, phosphomonoesterase activities decreased significantly and rapidly when exposed to small concentrations of nAg, however increasing amounts of nAg did not seem to have any further additive effects. The assay appeared to distinguish between nAg and  $\text{Ag}^+$  - a sensitive, negative response was observed for soils contaminated with nAg, whereas in the presence of  $\text{Ag}^+$  (as acetate), inhibition was mainly observed for the higher soil concentrations. This characteristic could potentially be explored in order to distinguish a contamination due to  $\text{Ag}^+$  from one associated more specifically with nanoparticles.

## 2.5 Conclusion

This paper shows that the negative effects on the enzyme activities are significant in presence of nAg for the enzymes phosphomonoesterase,  $\beta$ -D-glucosidase, arylsulfatase and leucine-aminopeptidase. The Ag chemical speciation measurements suggested that the nAg caused greater toxic effects to the soil enzymes at the low Ag concentrations. For the higher concentrations of total soil Ag, causes of the negative effects on enzyme activities are less obvious but suggest that colloidal forms of Ag are playing a role. Addition of OM to the soils seemed to enhance enzyme activities but its protective role could not necessarily be attributed to the complexation of free Ag since concentrations of dissolved Ag were similar in both amended and non-amended soils. Further evaluations of the role(s) of soil microbes in the cycling of nAg are necessary with careful attention given to measurements of pH, SOM and soil texture. In addition, longer assays could be used in order to assess the tolerance of microbial communities to nAg in soils. Furthermore, it is possible to expand the choice of the tested soil enzymes and include complementary analyses such as measurements of microbial biomass and respiration. It is important to keep in mind that laboratory measurements of enzyme activities can only provide an estimate of what occurs under natural conditions and can never provide the real rates of *in situ* enzymatic reactions. New techniques involving genomic and metaproteomic tools are emerging and will enable

measurements of *in situ* activity of soil enzymes, however, these methods are still at their infancy and require significant resources and instrumentation. The fluorescent-based measurement of soil-based enzyme activities is currently an efficient bioindicator of stress due to these novel emerging contaminants.

## Supporting Information

### Control of pH during enzyme assay.

Sample suspensions were prepared by adding 2.00 g of air-dried soil to 50 mL of 10 mM Na-acetate at pH 6.12. The pH of the soil solution, measured after centrifugation of the soil was 6.30. For the enzyme assay, 5 mL of the soil supernatant was pipette into 20 mL of Na-acetate. The pH measured at the beginning of the incubation was 6.12 and after 24 h was 6.13. A further pH control after the addition of substrate showed no further variation in pH.

### Selection of excitation and emission wavelengths

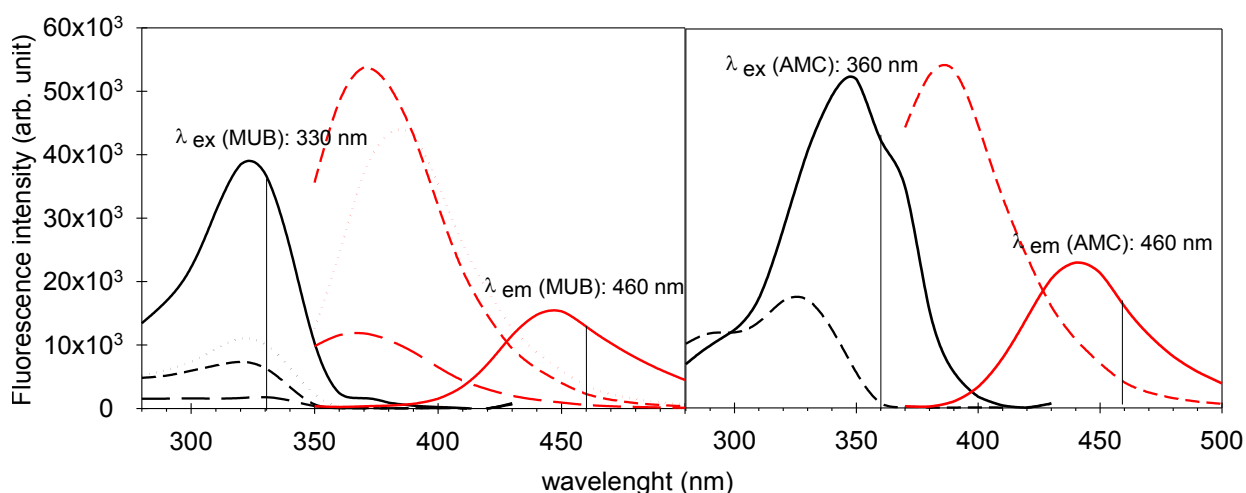


Figure S1. Excitation (black) and emission (red) spectra of the fluorogenic molecules MUB (left) and AMC (right) in Na-acetate (10 mM, pH 6). Spectra were compared with the excitation and emission spectra of 10  $\mu$ M of 4-MUB-phosphate (left, dotted line), 500  $\mu$ M of 4-MUB-sulfate (left, long dashed line), 10  $\mu$ M of 4-MUB- $\beta$ -D-glucopyranoside (left, short dashed line) and 50  $\mu$ M of L-leucine-AMC (right, dashed line).

*Decrease of MUB or AMC fluorescence intensity with the increasing concentrations of nAg*

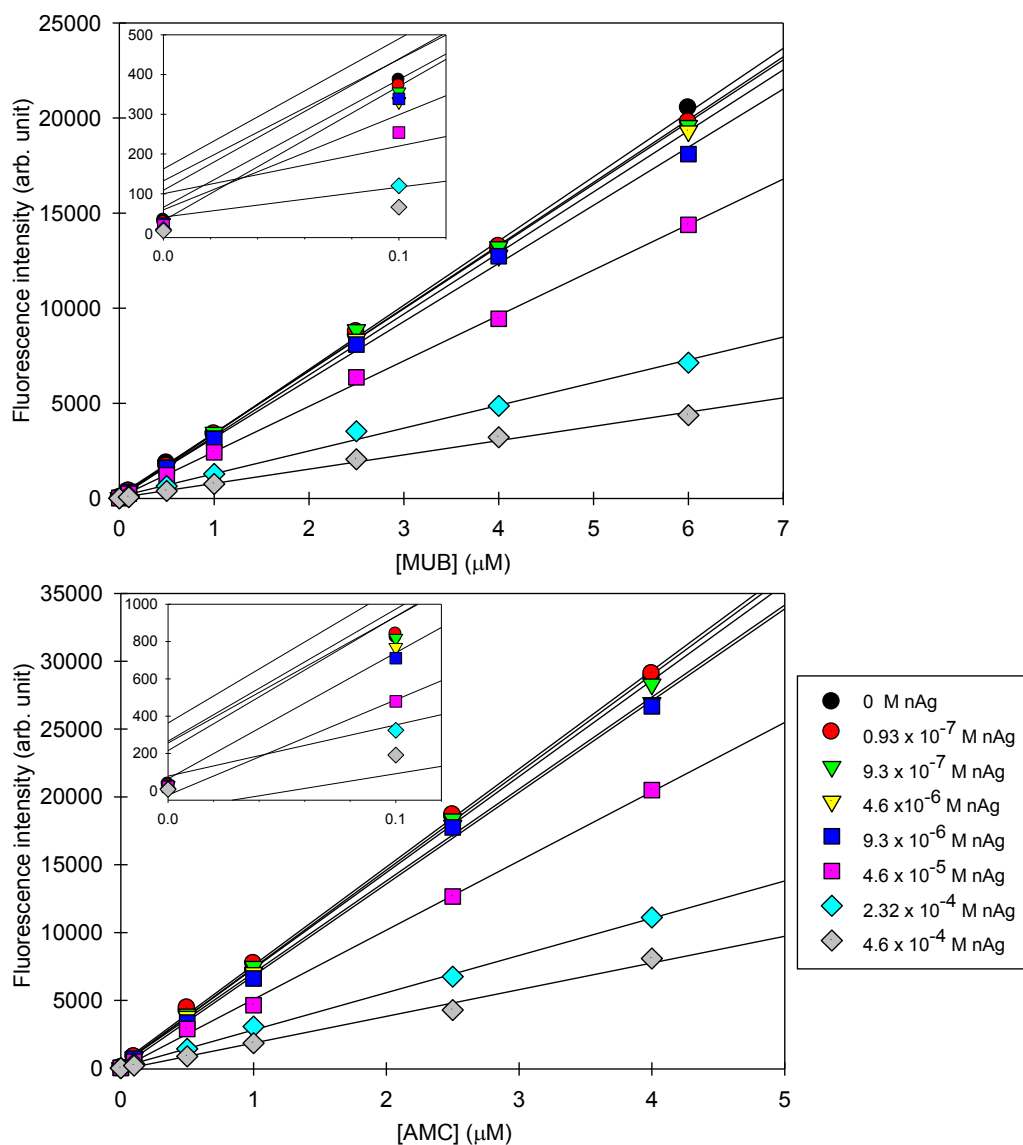
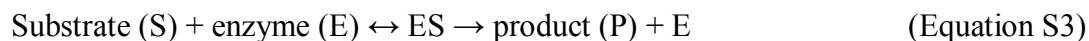


Figure S2. Calibration curves of MUB ( $R^2$  between 0.995 and 1.000) and AMC ( $R^2$  between 0.992 and 0.999) in the presence of different nAg concentrations in the soil solutions. Fluorescence intensities were measured using an excitation at  $340 \pm 9$  nm and an emission at  $460 \pm 20$  nm.

Determination of the final substrate concentrations during the enzyme assays.

According to Michaelis and Menten kinetics, a general chemical reaction involving a particular enzyme with a particular substrate (Equation S3) may be described mathematically by (Equation S4):



$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Equation S4})$$

which show that the reaction rate,  $v$ , is a function of a particular substrate concentration,  $[S]$ , a maximum velocity,  $V_{\max}$ , and a constant,  $K_m$ , that indicates the affinity of this enzyme with the substrate.

In order to measure a valid rate during an enzyme assay,  $[S]$  should be much greater than  $[E]$ . Under the enzyme assay conditions used in our study, an overlap of the substrate's emission spectrum on the emission spectra of the (MUB/AMC) products (Figure S1) was observed at high concentrations, leading to an artefact in the determination of the fluorescence intensity at 460 nm. In order to reduce the interference on the fluorescence emission, final substrate concentrations were selected to be as low as possible, i.e. 50  $\mu\text{M}$  for 4-MUB-phosphate, 500  $\mu\text{M}$  for 4-MUB-sulfate, 100  $\mu\text{M}$  for 4-MUB- $\beta$ -D-glucopyranoside and 50  $\mu\text{M}$  for L-leucine-AMC.

The ISE measurements.

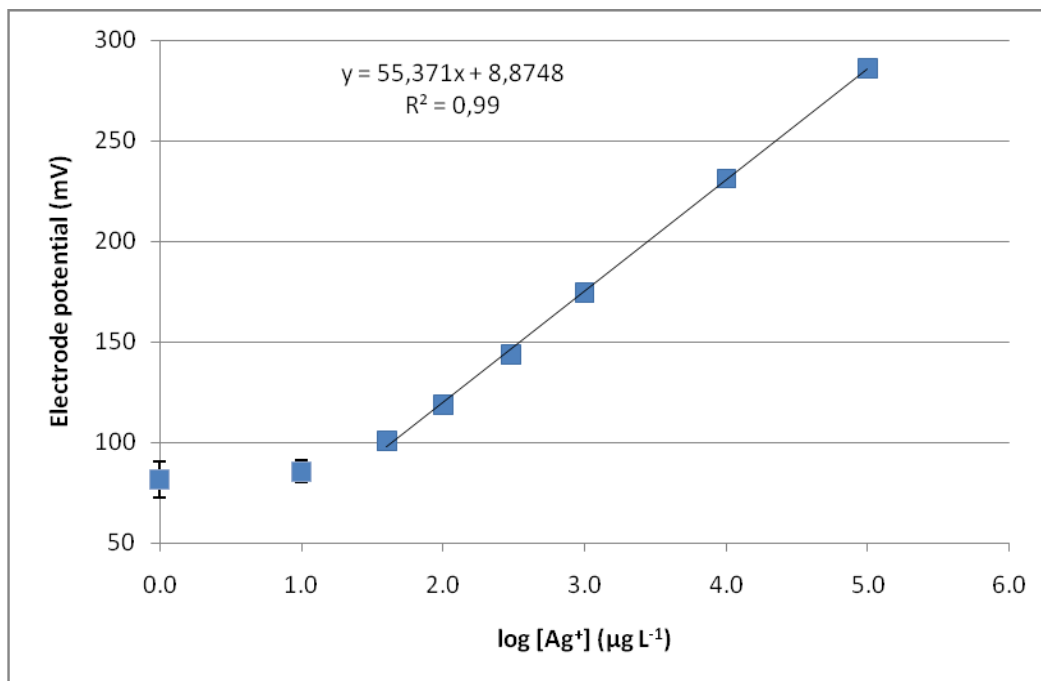


Figure S3. Calibration curve of silver ISE ( $I= 0.1 \text{ M NaNO}_3$ ) obtained by dilution of a stock solution of  $\text{AgNO}_3$ . Bars represent standard errors for replicate determinations ( $n=5$ ).

To be sure that the electrode is correctly operating, the slope of the curve should be between 54 and 60 mV (User guide Silver/Sulfide Ion Selective Electrode, Thermo Fisher Scientific Inc., theoretical slope derived from the Nernst equation= 59.2 mV for a monovalent cation).

The detection limit (DL) was calculated using Equation S5:

$$DL = (3 \times \sigma_b) + \text{mean}_b \quad (\text{Equation S5})$$

where  $\sigma_b$  is the standard error of the blank and  $\text{mean}_b$  is the mean of the blank.

Based upon the measurements made when calibrating using a serial dilution of an Ag salt, an experimental DL of  $62.8 \mu\text{g L}^{-1}$  or  $5.8 \times 10^{-7} \text{ M Ag}^+$  was determined.

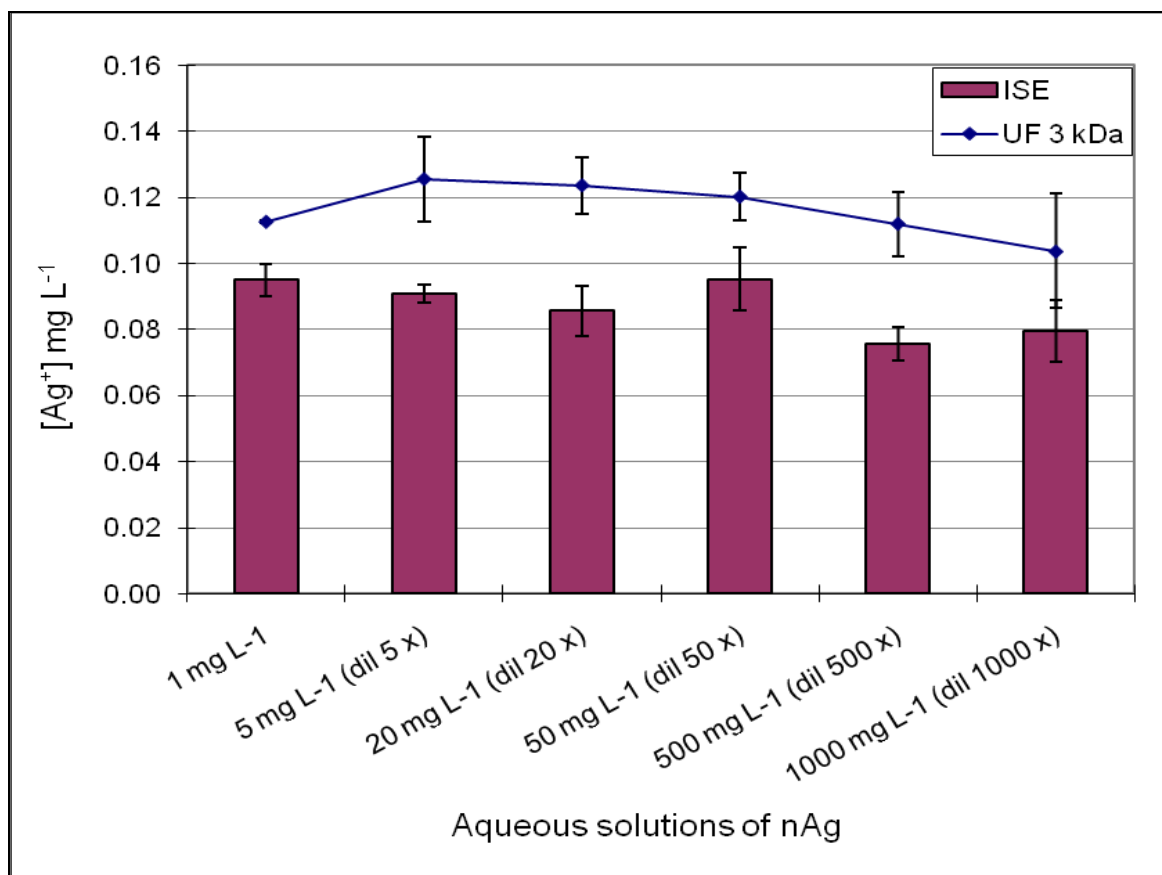


Figure S4. Ionic silver concentrations measured using the Ag ISE as compared to ultrafiltration over a 3 kDa membrane in nAg working solutions after the dilution to 1  $mg\ Ag\ L^{-1}$ . Bars represent standard errors (n=3).

Measurements were also performed 48 h later and were not significantly different.



Table S1. Relative enzyme activities (%) measured in the non-amended and the OM-amended soils spiked with nAg and Ag<sup>+</sup> (as acetate) (mean ± SD; n=6). Groups with the same letter are not significantly different.

nAg	<i>Non-amended soil (1.5% C<sub>org</sub>)</i>								
	#	Arylsulfatase		Phosphomono- esterase		β-D-glucosidase		L-leucine- aminopeptidase	
	1	100.0 ± 9.0	a	100.0 ± 17.3	a	100.0 ± 9.9	a	100.0 ± 21.8	ab
	2	84.7 ± 12.4	b	90.3 ± 21.4	a	87.4 ± 10.6	ab	79.0 ± 13.0	bc
	3	64.0 ± 9.2	c	62.9 ± 18.9	b	73.6 ± 11.1	b	65.4 ± 15.9	c
	4	70.9 ± 9.7	c	57.4 ± 8.4	b	76.9 ± 10.8	b	56.3 ± 8.8	c
	5	61.6 ± 10.9	c	56.0 ± 11.0	b	67.9 ± 16.7	b	53.8 ± 10.6	c
	6	36.0 ± 12.0	d	32.9 ± 5.7	b	43.0 ± 7.2	c	117.1 ± 19.0	a
	7	30.1 ± 11.8	d	61.9 ± 24.3	b	51.8 ± 19.9	c	64.1 ± 33.0	c
Ag <sup>+</sup>	#	Arylsulfatase		Phosphomono- esterase		β-D-glucosidase		L-leucine- aminopeptidase	
	1	100.0 ± 21.1	a	100.0 ± 31.9	a	100.0 ± 34.9	a	100.0 ± 31.2	a
	2	83.0 ± 4.0	ab	75.5 ± 4.5	a	81.7 ± 12.1	a	73.3 ± 10.8	a
	3	93.2 ± 20.1	ab	83.4 ± 23.2	a	86.6 ± 20.3	a	90.9 ± 26.4	a
	4	65.5 ± 13.0	b	55.7 ± 19.2	ab	67.0 ± 28.8	a	67.0 ± 27.7	a
	5	70.3 ± 24.2	bc	56.7 ± 30.9	ab	58.5 ± 15.2	a	76.4 ± 43.2	a
	6	52.7 ± 19.0	c	58.6 ± 32.6	ab	52.3 ± 20.4	a	109.6 ± 53.5	a
	7	31.8 ± 10.7	d	69.4 ± 16.1	ab	80.4 ± 40.4	a	67.9 ± 18.8	a
	Biocide	0.0 ± 0.0	e	29.5 ± 2.3	b	11.5 ± 2.1	b	1.9 ± 1.0	b

<b>nAg</b>								
<i>OM-amended soil (1.8% C<sub>org</sub>)</i>								
#	Arylsulfatase		Phosphomono- esterase		$\beta$ -D-glucosidase		L-leucine- aminopeptidase	
1	100.0 $\pm$ 22.6	a	100.0 $\pm$ 27.3	a	100.0 $\pm$ 21.8	ab	100.0 $\pm$ 21.9	ab
2	93.8 $\pm$ 17.8	ab	93.9 $\pm$ 16.2	a	106.5 $\pm$ 12.3	ab	99.1 $\pm$ 11.4	ab
3	114.7 $\pm$ 41.0	a	114.4 $\pm$ 26.6	a	127.0 $\pm$ 26.2	a	109.9 $\pm$ 21.8	a
4	83.7 $\pm$ 27.0	ab	74.0 $\pm$ 24.9	ab	84.1 $\pm$ 29.9	ab	69.1 $\pm$ 19.8	b
5	82.3 $\pm$ 24.2	ab	70.3 $\pm$ 18.7	ab	81.4 $\pm$ 24.8	ab	66.5 $\pm$ 19.6	b
6	68.8 $\pm$ 27.4	ab	49.2 $\pm$ 20.4	b	73.6 $\pm$ 32.3	b	77.5 $\pm$ 30.1	ab
7	49.0 $\pm$ 12.6	b	77.1 $\pm$ 26.9	ab	112.1 $\pm$ 6.0	ab	64.2 $\pm$ 17.4	b
<b>Ag<sup>+</sup></b>								
#	Arylsulfatase		Phosphomono- esterase		$\beta$ -D-glucosidase		L-leucine- aminopeptidase	
1	100.0 $\pm$ 36.1	a	100.0 $\pm$ 49.6	a	100.0 $\pm$ 35.8	ab	100.0 $\pm$ 41.6	a
2	94.1 $\pm$ 11.6	a	90.7 $\pm$ 19.3	a	120.4 $\pm$ 20.5	ab	77.5 $\pm$ 14.3	a
3	93.7 $\pm$ 21.6	a	82.9 $\pm$ 12.6	a	110.8 $\pm$ 29.7	ab	81.8 $\pm$ 21.1	a
4	106.8 $\pm$ 16.5	a	103.9 $\pm$ 9.5	a	138.9 $\pm$ 31.3	a	103.6 $\pm$ 24.7	a
5	95.4 $\pm$ 65.5	a	88.8 $\pm$ 56.3	a	105.3 $\pm$ 53.1	ab	74.3 $\pm$ 48.5	a
6	61.1 $\pm$ 34.7	ab	53.1 $\pm$ 22.2	a	77.8 $\pm$ 30.3	b	78.9 $\pm$ 22.5	a
7	22.0 $\pm$ 9.2	bc	56.3 $\pm$ 12.2	a	64.4 $\pm$ 17.6	b	90.6 $\pm$ 18.4	a
Biocide	0.0 $\pm$ 0.0	c	48.6 $\pm$ 21.2	a	23.2 $\pm$ 12.9	c	4.6 $\pm$ 2.1	b

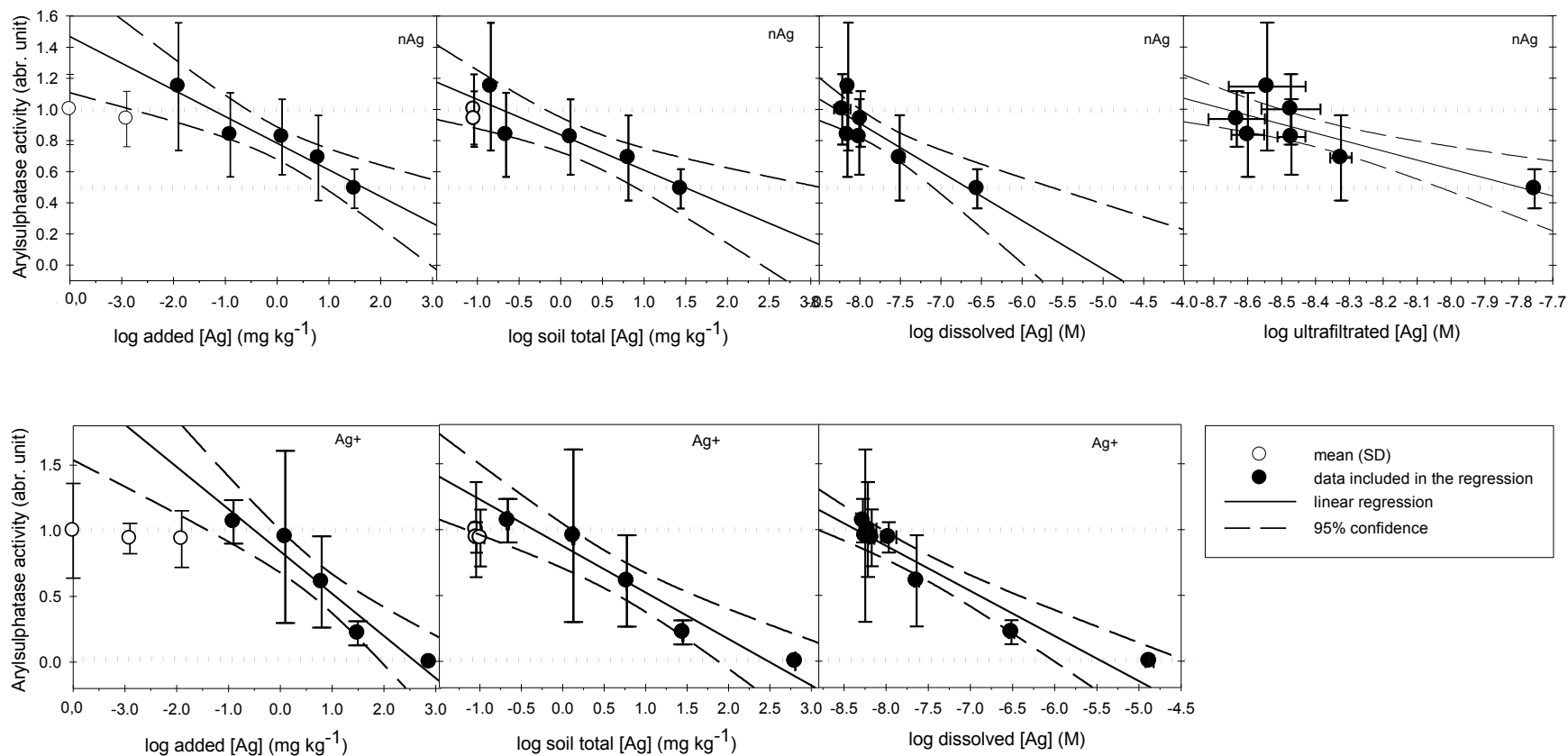


Figure S5. Linear regressions used to determine  $EC_x$  values for **arylsulfatase** activity after exposure to nAg and  $Ag^+$  (as acetate) in the **OM-amended soil**. Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters.

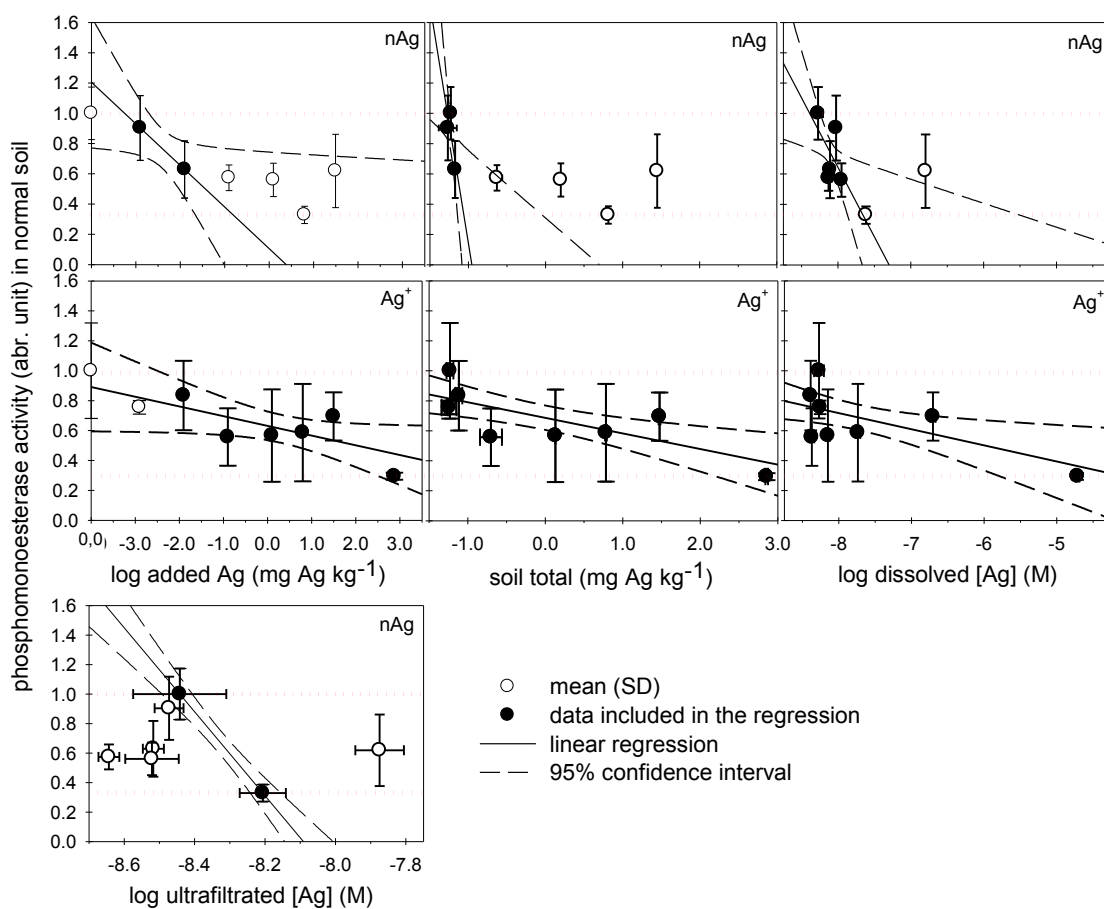


Figure S6. Linear regressions used to determine  $EC_x$  values for **phosphomonoesterase** activity after exposure to nAg and Ag<sup>+</sup> (as acetate) in the **non-amended soil**. Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters.

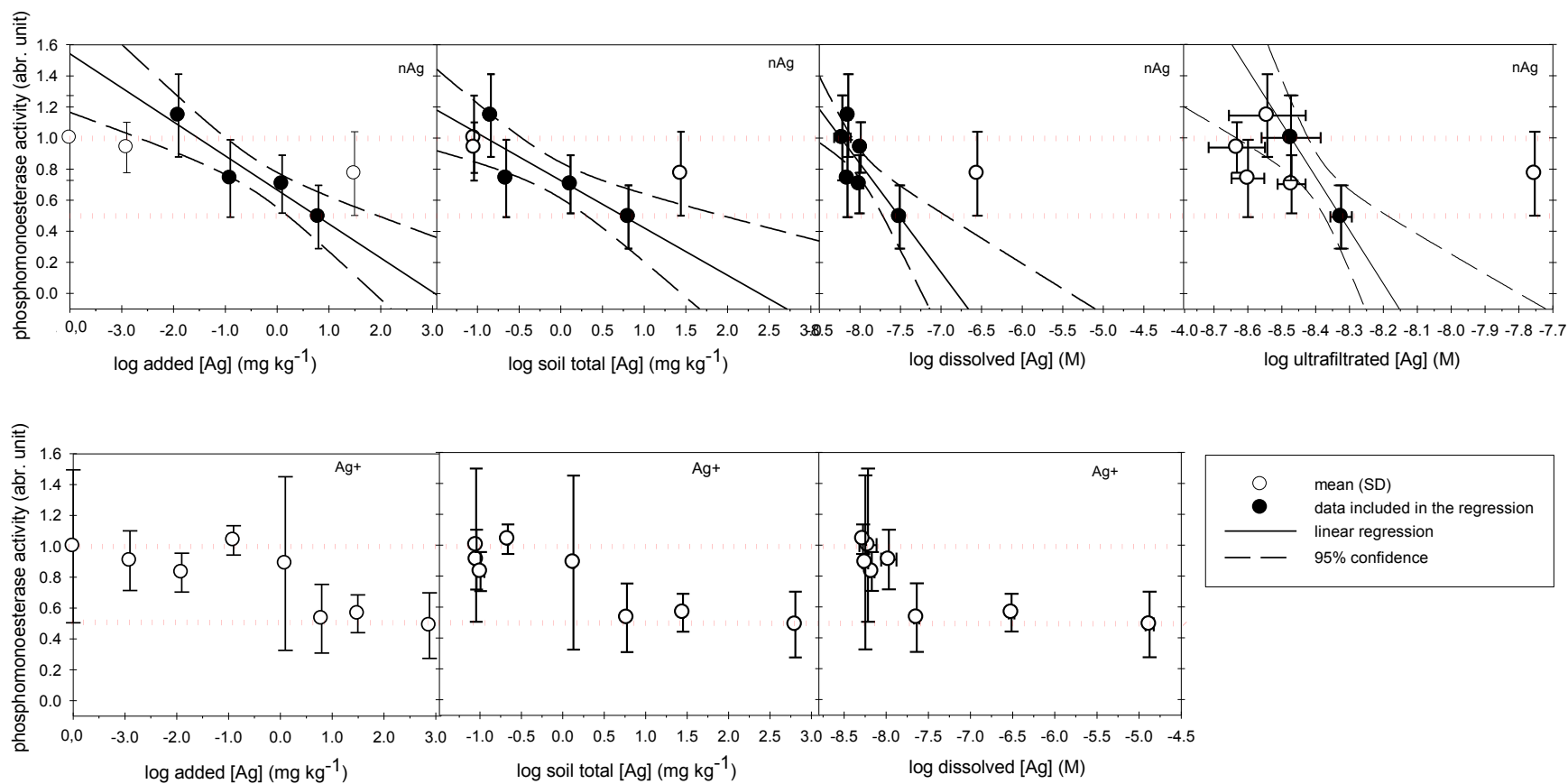


Figure S7. Linear regressions used to determine  $EC_x$  values for **phosphomonoesterase** activity after exposure to nAg and  $Ag^+$  (as acetate) in the **OM-amended soil**. Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters.

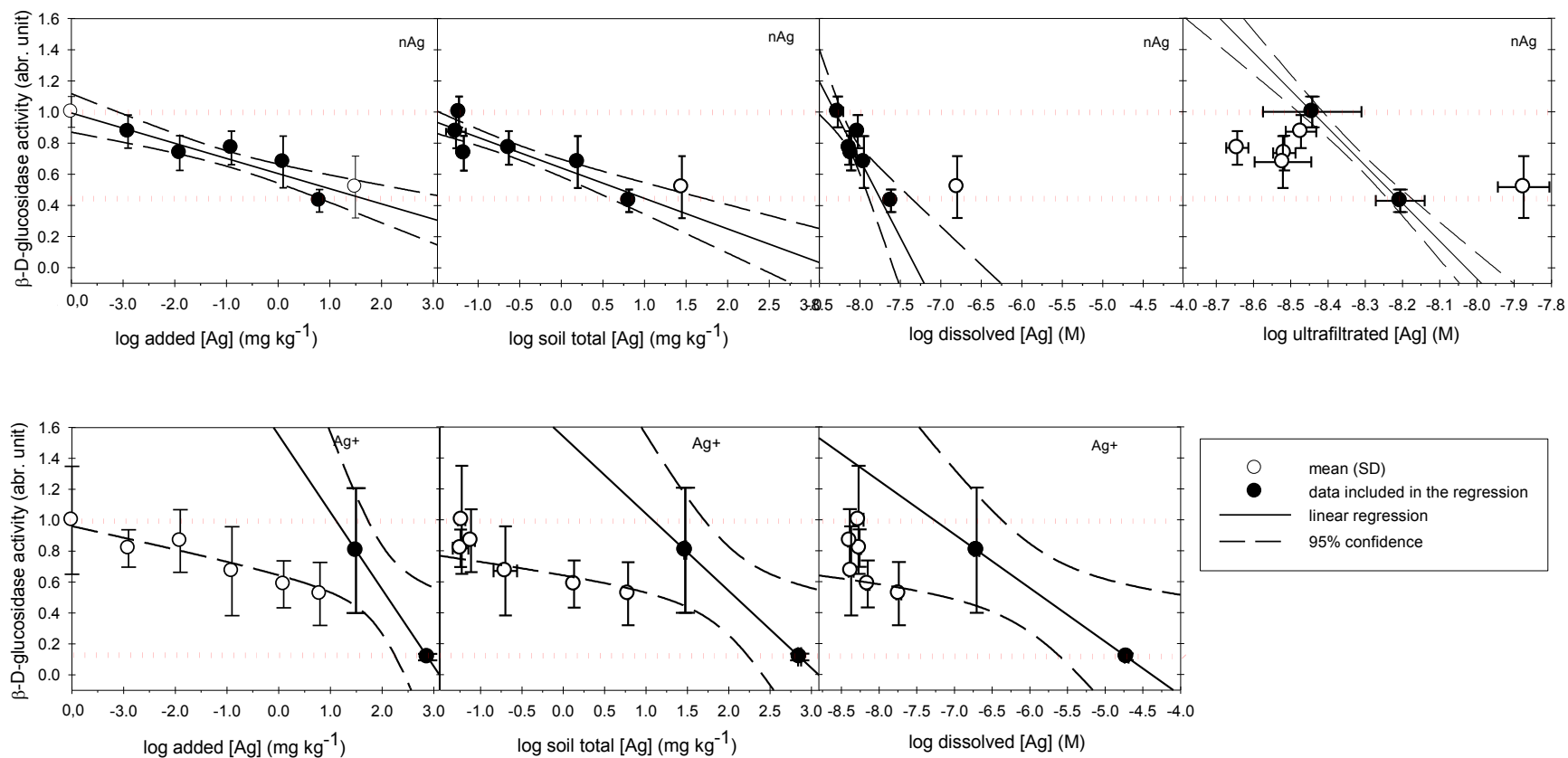


Figure S8. Linear regressions used to determine  $EC_x$  values for  $\beta$ -D-glucosidase activity after exposure to nAg and  $Ag^+$  (as acetate) in the **non-amended soil**. Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters.

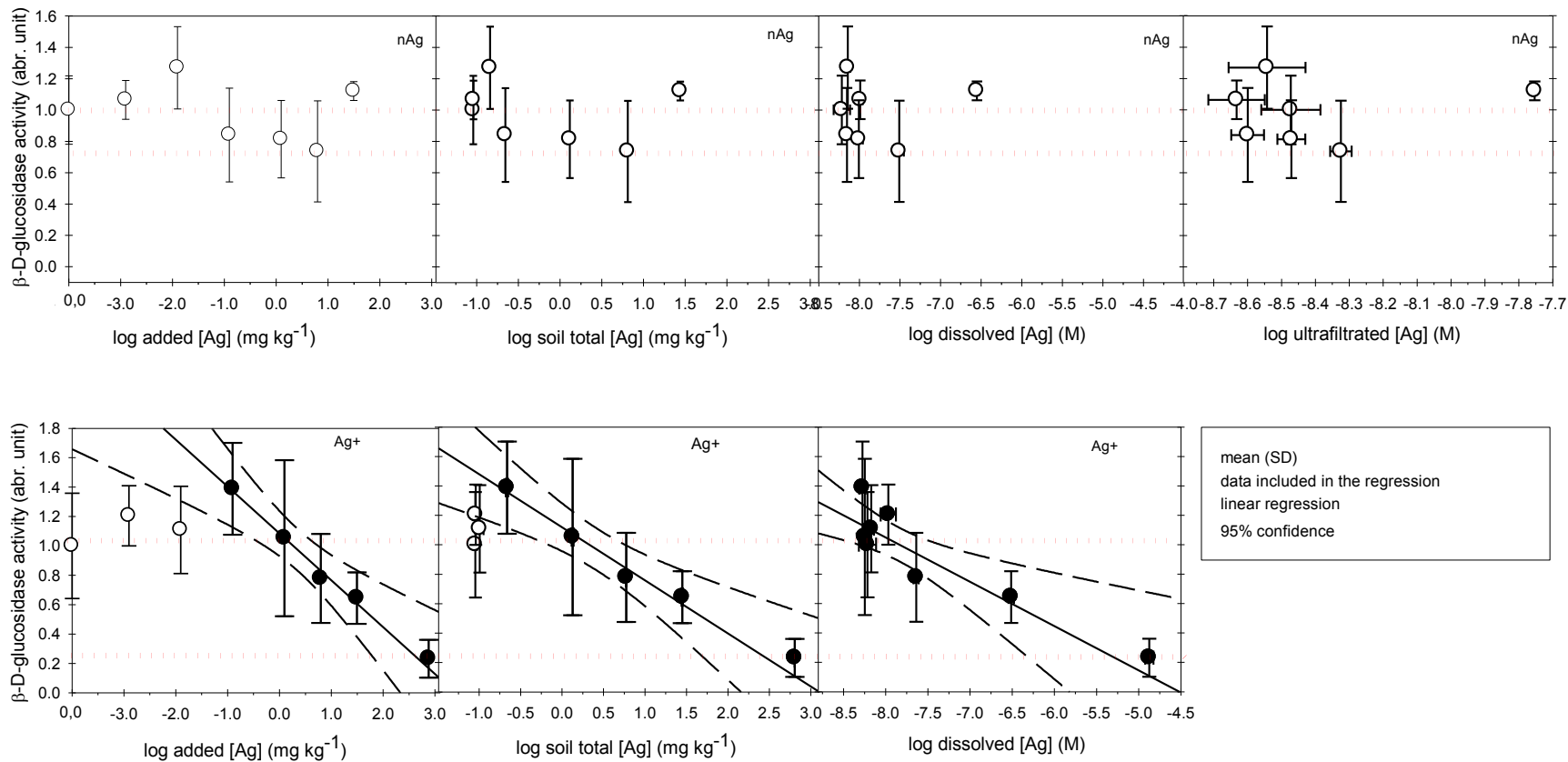


Figure S9. Linear regressions used to determine  $EC_x$  values for  $\beta$ -D-glucosidase activity after exposure to nAg and  $\text{Ag}^+$  (as acetate) in the **OM-amended soil**. Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters

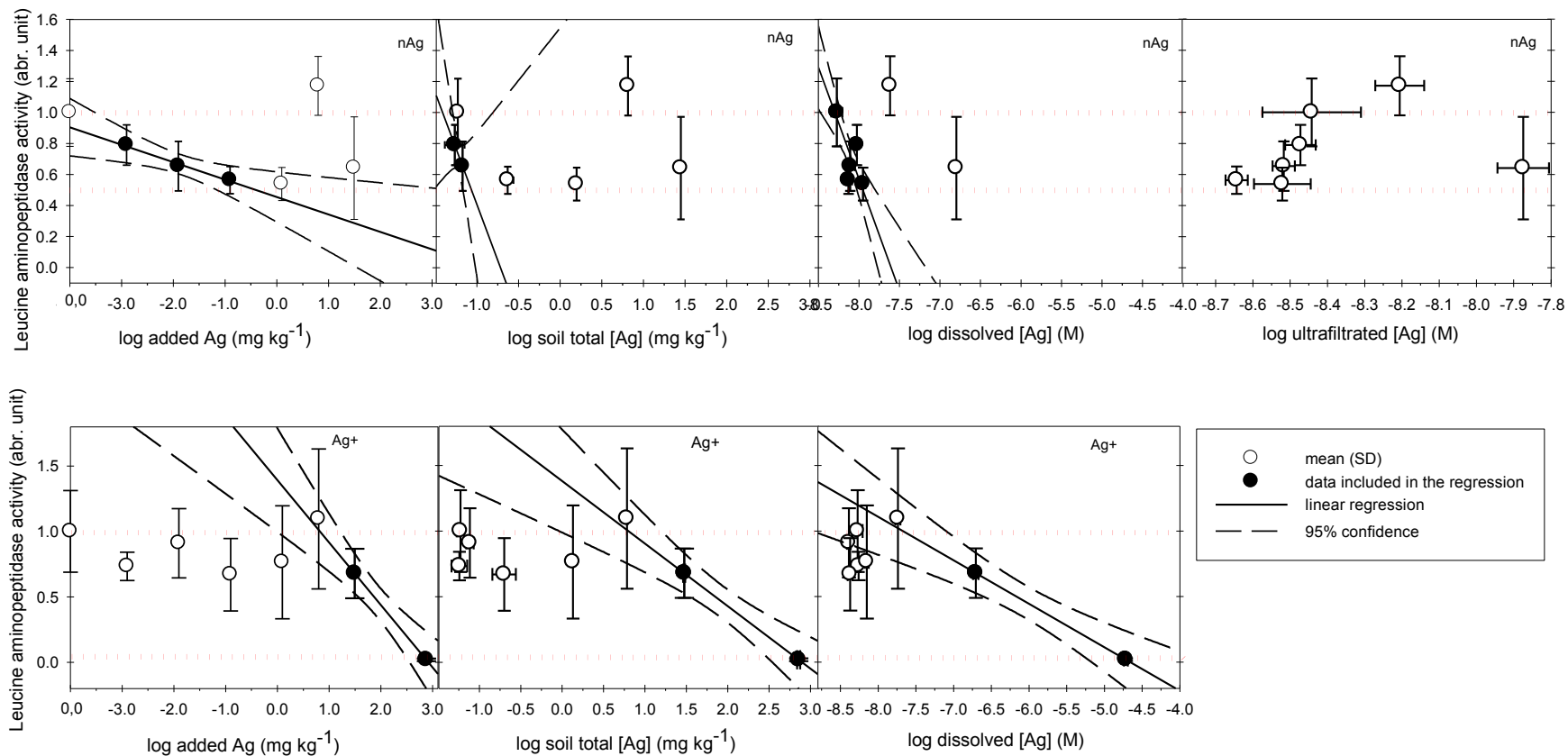


Figure S10. Linear regressions used to determine  $EC_x$  values for **leucine-aminopeptidase** activity after exposure to nAg and  $Ag^+$  (as acetate) in the **non-amended soil**. Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters.



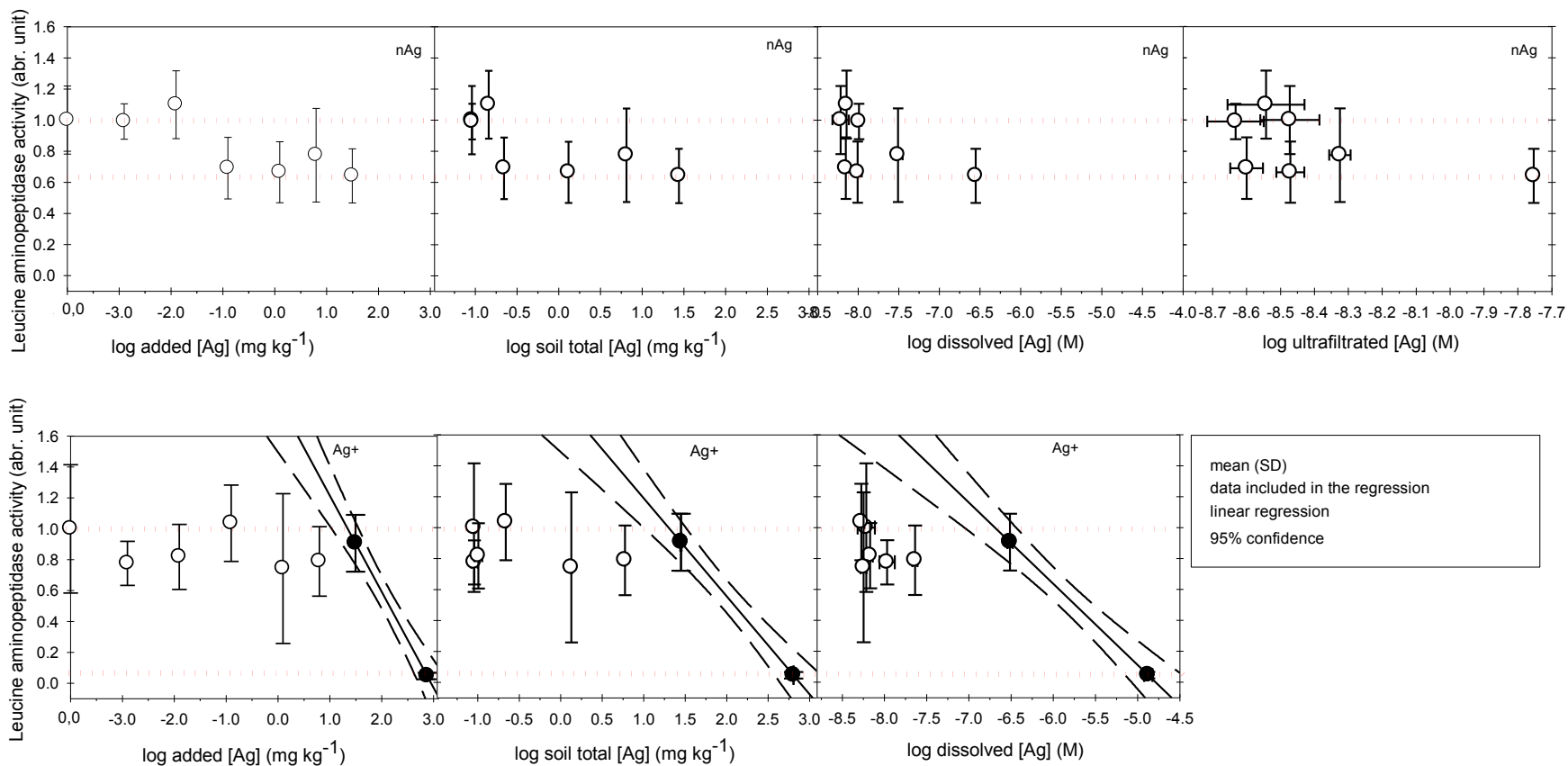


Figure S11. Linear regressions used to determine  $EC_x$  values for **leucine-aminopeptidase** activity after exposure to nAg and Ag<sup>+</sup> (as acetate) in the **OM-amended soil**. Excluded data points are represented by the open circles (see discussion). Horizontal dashed lines represent the maximum (max.; CTRL= 100%) and the minimum (min., minimum observed value) parameters.

Table S2. Estimation of Ag concentrations that resulted in an enzymatic activity of 25% ( $EC_{25}$ ) as a function of the nominal Ag concentrations (added), total soil Ag, dissolved ( $0.45 \mu\text{m}$ ) Ag and truly dissolved ( $3 \text{ kDa}$ ) Ag concentrations in the non-amended and the OM-amended soils spiked with nAg or  $\text{Ag}^+$  (as acetate).

[Ag]	Effective concentration values, $EC_{25}$							
	<i>Non-amended soil (1.5% <math>C_{org}</math>)</i>				<i>OM-amended soil (1.8% <math>C_{org}</math>)</i>			
	nAg		$\text{Ag}^+$		nAg		$\text{Ag}^+$	
	$EC_{25}$	$R^2$	$EC_{25}$	$R^2$	$EC_{25}$	$R^2$	$EC_{25}$	$R^2$
<b>Arylsulfatase</b>								
Added Ag ( $\text{mg Ag kg}^{-1}$ )	0.002	0.7	0.16	0.68	0.30	0.40	1.94	0.53
Total soil Ag ( $\text{mg Ag kg}^{-1}$ )	0.07	0.57	0.36	0.71	0.70	0.36	2.28	0.54
Dissolved Ag ( $\times 10^{-9} \text{ M}$ )	6.73	0.64	8.11	0.62	13.1	0.34	23.5	0.52
Truly dissolved Ag ( $\times 10^{-9} \text{ M}$ )	4.19	0.92	-	-	3.59	0.29	-	-
<b>Phosphomonoesterase</b>								
Added Ag ( $\text{mg Ag kg}^{-1}$ )	0.002	0.36	0.001	0.13	0.11	0.52	-	-
Total soil Ag ( $\text{mg Ag kg}^{-1}$ )	0.06	0.27	0.05	0.22	0.33	0.43	-	-
Dissolved Ag ( $\times 10^{-9} \text{ M}$ )	6.52	0.55	1.02	0.15	8.81	0.33	-	-
Truly dissolved Ag ( $\times 10^{-9} \text{ M}$ )	4.14	0.89	-	-	3.67	0.58	-	-
<b><math>\beta</math>-D-glucosidase</b>								
Added Ag ( $\text{mg Ag kg}^{-1}$ )	0.03	0.51	40.0	0.58	-	-	11.2	0.46
Total soil Ag ( $\text{mg Ag kg}^{-1}$ )	0.28	0.58	38.2	0.58	-	-	16.3	0.45
Dissolved Ag ( $\times 10^{-9} \text{ M}$ )	8.79	0.52	281	0.58	-	-	98.7	0.23
Truly dissolved Ag ( $\times 10^{-9} \text{ M}$ )	4.58	0.93	-	-	-	-	-	-
<b>L-leucine-aminopeptidase</b>								
Added Ag ( $\text{mg Ag kg}^{-1}$ )	0.0001	0.37	21.7	0.83	-	-	53.4	0.91
Total soil Ag ( $\text{mg Ag kg}^{-1}$ )	0.05	0.21	20.6	0.83	-	-	47.6	0.91
Dissolved Ag ( $\times 10^{-9} \text{ M}$ )	6.05	0.58	116	0.83	-	-	579	0.91
Truly dissolved Ag ( $\times 10^{-9} \text{ M}$ )	-	-	-	-	-	-	-	-

## Chapitre 3 CONCLUSION GÉNÉRALE

L'invasion des NMs dans notre vie courante est devenue un sujet d'actualité. Ces matériaux de très petites tailles, de formes et de compositions variées se retrouvent dans de nombreux produits commercialisés et suscitent des préoccupations. Est-ce que ces petites particules sont un risque pour la santé humaine et environnementale? Une partie de la communauté scientifique internationale cherche à comprendre le devenir de ces NMs une fois qu'ils se retrouvent dans les différents compartiments de l'environnement et à prédire leurs effets sur les organismes vivants. Les nAg sont utilisés principalement pour leurs propriétés antimicrobiennes. Les données portant sur l'évaluation de la toxicité des nAg sur des bactéries ont révélé des effets négatifs spécifiques aux particules mais aussi provenant des ions  $\text{Ag}^+$  libérés des nAg. L'écosystème terrestre est souvent le récepteur premier et le dépôt des nAg sur les sols risque d'entraîner un impact direct sur les microorganismes terrestres mais peuvent aussi avoir des effets indirects sur les enzymes des sols et par conséquent sur les processus biogéochimiques.

Le chapitre d'introduction de ce mémoire a présenté l'efficacité des mesures de l'activité enzymatique et de son emploi comme indicateur de surveillance et d'évaluation du degré de contamination. À ce jour, les nAg sont estimées dans l'environnement terrestre à des concentrations de l'ordre du  $10^{-6} \text{ mg kg}^{-1}$  ( $\text{M}^{z+} \leq 10^{-6} \text{ M}$ ). Ces concentrations sont beaucoup plus faibles que celles utilisées dans les études toxicologiques classiques d'où l'importance d'employer dans le cas des nanoparticules des conditions analytiques pertinentes qui reflètent les conditions réelles de l'environnement et d'une caractérisation des nanoparticules dans les conditions précises des expériences pour mieux évaluer la toxicité relative des nanoparticules. Les objectifs de la recherche de ce mémoire ont été, en premier lieu, d'évaluer les effets des nAg sur l'écosystème terrestre en mesurant les processus enzymatiques et en les comparant aux effets des ions  $\text{Ag}^+$ . La sélection de tests enzymatiques choisie

(phosphomonoestérase,  $\beta$ -D-glucosidase, arylsulfatase et leucine-aminopeptidase) reflète leur implication dans le cycle des éléments essentiels P, C, S et N. Dans un deuxième temps, l'objectif a été de déterminer à partir des résultats de la mesure de l'activité enzymatique si ce bioessai a un potentiel pour différencier la pollution aux nAg par rapport aux autres formes d'Ag et ainsi prévenir une perturbation spécifique aux nanoparticules.

Les résultats ont montré des effets négatifs sur les activités des enzymes plus importantes en présence de nAg pour les enzymes phosphomonoestérase,  $\beta$ -D-glucosidase, arylsulfatase et leucine-aminopeptidase. Les analyses de la spéciation chimique des nAg suggèrent que la forme particulaire cause de plus grands effets toxiques pour les enzymes du sol surtout à des faibles concentrations totales en Ag. À de plus grandes concentrations totales en Ag ( $\geq 1 \text{ mg kg}^{-1}$ ), les causes des effets négatifs sur les activités enzymatiques sont moins évidentes et suggèrent un rôle de l'Ag colloïdal. Le rôle de la MO dans les sols a été évalué en amendant une partie du sol échantillonné avec un compost de feuilles. Cet ajout de matière organique a montré que l'Ag a moins d'effets sur les activités enzymatiques mais puisque les concentrations en Ag dissous n'étaient significativement pas différentes entre les 2 types de sol, cet effet doit être attribué à une modification de la spéciation chimique de l'Ag présent en solution. La comparaison des effets toxiques suite à une exposition aux nAg et aux ions  $\text{Ag}^+$  ont révélé que seule l'enzyme phosphomonoestérase a répondu plus sensiblement aux nAg et pourrait avoir le potentiel de détecter une contamination des sols aux nanoparticules d'argent.

L'évaluation des processus microbiens du sol en présence de nAg nécessite d'être poursuivie et approfondie. Des études sur des sols avec des caractéristiques physico-chimiques variées comme le pH, la teneur en MO et la texture du sol permettrait de mieux comprendre l'influence de ces paramètres sur la toxicité des nAg. La tolérance des communautés microbiennes vis-à-vis des nAg peut être déterminée sur des études à long terme et on pourrait inclure des analyses complémentaires telles que la biomasse microbienne et la respiration pour mieux cadrer l'activité microbienne

lors des essais. Il est important de garder à l'esprit que, malgré tous les efforts de procéder dans les conditions les plus réelles, les mesures de l'activité enzymatique faites en laboratoire sont des activités potentielles et surestiment habituellement les taux réels *in situ* des réactions enzymatiques. Comme cela a déjà été mentionné dans le chapitre d'introduction de ce mémoire, les essais biologiques en laboratoire sont optimisés en contrôlant la température d'incubation qui est menée en laboratoire à 30°C alors que le sol affiche une température moyenne de 10°C sous notre climat. De même, les incubations sont menées avec des grandes concentrations en substrats alors que dans le milieu naturel de telles conditions ne sont jamais rencontrées. La tendance actuelle est de mieux comprendre les processus enzymatiques *in situ* afin de pouvoir valoriser ces réactions et pouvoir, à l'avenir, inclure les taux de décomposition de la MO du sol à des modèles biogéochimiques. De nouvelles techniques impliquant des outils génomiques font leur apparition pour développer les mesures de l'activité des enzymes *in situ* mais ces méthodes sont encore à un âge précoce et les instruments sont coûteux en capital et ressources humaines spécialisées.

## **Bibliographie**

Aiken, G.R., Hsu-Kim, H., Ryan, J.N., 2011. Influence of Dissolved Organic Matter on the Environmental Fate of Metals, Nanoparticles, and Colloids. *Environmental Science & Technology* 45, 3196-3201.

ASTM, 2006. Standard terminology relating to nanotechnology. E 2456-06. American Society for testing and materials, West Conshohocken.

Avdeef, A., Zabronsky, J., Stuting, H.H., 1983. Calibration of Copper-ion Selective Electrode Response to pCu 19. *Analytical Chemistry* 55, 298-304.

Bandyopadhyay, S., Peralta-Videa, J.R., Hernandez-Viezcas, J.A., Montes, M.O., Keller, A.A., Gardea-Torresdey, J.L., 2012. Microscopic and Spectroscopic Methods Applied to the Measurements of Nanoparticles in the Environment. *Applied Spectroscopy Reviews* 47, 180-206.

Boulila-Zoghalmi, L., Gallusci, P., Holzer, F.M., Basset, G.J., Djebali, W., Chaibi, W., Walling, L.L., Brouquisse, R., 2011. UP-regulation of leucine aminopeptidase-A in cadmium-treated tomato roots. *Planta* 234, 857-863.

Bradford, A., Handy, R.D., Readman, J.W., Atfield, A., Muhling, M., 2009. Impact of Silver Nanoparticle Contamination on the Genetic Diversity of Natural Bacterial Assemblages in Estuarine Sediments. *Environmental Science & Technology* 43, 4530-4536.

Chaperon, S., Sauvé, S., 2007. Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 39, 2329-2338.

Chen, X., Wu, G.P., Cai, Q.F., Liu, G.M., Osatomi, K., Su, W.J., Cao, M.J., 2012a. Biochemical characterisation of an aminopeptidase with highest preference for lysine from Japanese flounder skeletal muscle. *Food Chemistry* 130, 679-686.

Chen, Z., Campbell, P.G.C., Fortin, C., 2012b. Silver Binding by Humic Acid as Determined by Equilibrium Ion-Exchange and Dialysis. *The Journal of Physical Chemistry A*.

Choi, O.K., Hu, Z.Q., 2009. Nitrification inhibition by silver nanoparticles. *Water Science and Technology* 59, 1699-1702.

Cornelis, G., Kirby, J.K., Beak, D., Chittleborough, D., McLaughlin, M.J., 2010. A method for determination of retention of silver and cerium oxide manufactured nanoparticles in soils. *Environmental Chemistry* 7, 298-308.

Coutris, C., Joner, E.J., Oughton, D.H., 2012. Aging and soil organic matter content affect the fate of silver nanoparticles in soil. *Science of the Total Environment* 420, 327-333.

Dick, R.P., 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health, In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*. Cab International, New York, pp. 121-156.

Dick, R.P., Kandeler, E., 2005. Enzymes in Soils, In: Hillel, D. (Ed.), *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier Academic Press, Oxford, pp. 448-456.

Domingos, R.F., Baalousha, M.A., Ju-Nam, Y., Reid, M.M., Tufenkji, N., Lead, J.R., Leppard, G.G., Wilkinson, K.J., 2009. Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science & Technology* 43, 7277-7284.

Du, W., Sun, Y., Ji, R., Zhu, J., Wu, J., Guo, H., 2011. TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. *Journal of Environmental Monitoring* 13, 822-828.

Ekenler, M., Tabatabai, M.A., 2002. Effects of trace elements on beta-glucosaminidase activity in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 1829-1832.

Ekstrom, S.M., Kritzberg, E.S., Kleja, D.B., Larsson, N., Nilsson, P.A., Graneli, W., Bergkvist, B., 2011. Effect of Acid Deposition on Quantity and Quality of Dissolved Organic Matter in Soil-Water. *Environmental Science & Technology* 45, 4733-4739.

Fabrega, J., Fawcett, S.R., Renshaw, J.C., Lead, J.R., 2009. Silver Nanoparticle Impact on Bacterial Growth: Effect of pH, Concentration, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology* 43, 7285-7290.

Fernandez-Calvino, D., Soler-Rovira, P., Polo, A., Diaz-Ravina, M., Arias-Estevez, M., Plaza, C., 2010. Enzyme activities in vineyard soils long-term treated with copper-based fungicides. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 2119-2127.

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environmental Science & Technology* 43, 9216-9222.

Hadioui, M., Leclerc, S., Wilkinson, K.J., 2013. Multimethod quantification of Ag<sup>+</sup> release from nanosilver. *Talanta* 105, 15-19.

Handy, R.D., Owen, R., Valsami-Jones, E., 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 17, 315-325.

Hansch, M., Emmerling, C., 2010. Effects of silver nanoparticles on the microbiota and enzyme activity in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 173, 554-558.

Hendershot, W.H., Lalande, H., Duquette, M., 1993a. Ion exchange and exchangeable cations, In: Carter, M.R. (Ed.), *Soil Sampling and Methods Analysis*. Lewis Publishers, Ottawa, pp. 167-176.

Hendershot, W.H., Lalande, H., Duquette, M., 1993b. Soil reaction and exchangeable acidity, In: Carter, M.R. (Ed.), *Soil Sampling and Methods Analysis*. Lewis Publishers, Ottawa, pp. 141-145.



- Howe, P.D., Dobson, S., 2002. Silver and silver compounds: Environmental Aspects. World Health Organisation, Geneva, p. 42.
- ISO, 1993. Soil Quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction. Annex C., ISO 11268-2, Geneva.
- ISO, 2010. Soil quality - Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using fluorogenic substrates in micro-well plates, ISO/TS 22939, Geneva.
- IUBMB, 1992. Enzyme Nomenclature. Academic Press, San Diego.
- Jacobson, A.R., McBride, M.B., Baveye, P., Steenhuis, T.S., 2005. Environmental factors determining the trace-level sorption of silver and thallium to soils. *Science of the Total Environment* 345, 191-205.
- Janzen, H.H., 1993. Soluble salts, In: Carter, M.R. (Ed.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Lewis Publishers, Ottawa, pp. 161-166.
- Kalbitz, K., Solinger, S., Park, J.H., Michalzik, B., Matzner, E., 2000. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: A review. *Soil Science* 165, 277-304.
- Kiser, M.A., Ryu, H., Jang, H.Y., Hristovski, K., Westerhoff, P., 2010. Biosorption of nanoparticles to heterotrophic wastewater biomass. *Water Research* 44, 4105-4114.
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1825-1851.
- Koch, M., Kiefer, S., Cavelius, C., Kraegeloh, A., 2012. Use of a silver ion selective electrode to assess mechanisms responsible for biological effects of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 14.
- Kroetsch, D., Wang, C., 2008. Particle size distribution, In: Carter, Gregorich (Eds.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Lewis, Ottawa, pp. 713-725.

Lagomarsino, A., Mench, M., Marabottini, R., Pignataro, A., Grego, S., Renella, G., Stazi, S.R., 2011. Copper distribution and hydrolase activities in a contaminated soil amended with dolomitic limestone and compost. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 2013-2019.

Lammirato, C., Miltner, A., Wick, L.Y., Kaestner, M., 2010. Hydrolysis of cellobiose by beta-glucosidase in the presence of soil minerals - Interactions at solid-liquid interfaces and effects on enzyme activity levels. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 2203-2210.

Lead, J.R., Wilkinson, K.J., 2007. Environmental Colloids and Particles: Current Knowledge and Future Developments, In: Lead, J.R., Wilkinson, K.J. (Eds.), *Environmental Colloids and Particles: Behavior, Separation and Characterisation*. John Wiley & Sons Ltd, England, pp. 1-15.

Liu, J.-f., Yu, S.-j., Yin, Y.-g., Chao, J.-b., 2012. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 33, 95-106.

Liu, J., Hurt, R.H., 2010. Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. *Environmental Science & Technology* 44, 2169-2175.

Luoma, S.N., 2008. Silver nanotechnologies and the Environment: old problems or new challenges?, The project on Emerging nanotechnologies. Woodrow Wilson International Center for Scholars and The Pew chaitable Trusts, Washington, p. 72.

Marx, M.C., Kandeler, E., Wood, M., Wermbter, N., Jarvis, S.C., 2005. Exploring the enzymatic landscape: distribution and kinetics of hydrolytic enzymes in soil particle-size fractions. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 35-48.

Marx, M.C., Wood, M., Jarvis, S.C., 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 1633-1640.

Matsui, M., Fowler, J.H., Walling, L.L., 2006. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biological Chemistry* 387, 1535-1544.

Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T., Yacaman, M.J., 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16, 2346-2353.

Murata, T., Kanao-Koshikawa, M., Takamatsu, T., 2005. Effects of Pb, Cu, Sb, In and Ag contamination on the proliferation of soil bacterial colonies, soil dehydrogenase activity, and phospholipid fatty acid profiles of soil microbial communities. *Water Air and Soil Pollution* 164, 103-118.

Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil, In: Burns, R.G., Dick, R. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-34.

nanoRoad, 2005. Overview on Promising nanomaterials for Industrial Applications, Germany.

Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.J., Quigg, A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17, 372-386.

Neal, A.L., 2008. What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology* 17, 362-371.

Peulen, T.-O., Wilkinson, K.J., 2011. Diffusion of Nanoparticles in a Biofilm. *Environmental Science & Technology* 45, 3367-3373.

Quadros, M.E., Marr, L.C., 2010. Environmental and Human Health Risks of Aerosolized Silver Nanoparticles. *Journal of the Air & Waste Management Association* 60, 770-781.

Quiquampoix, H., Servagent-Noinville, S., Baron, M.-H., 2002. Enzyme Adsorption on Soil Mineral Surfaces and Consequences for the Catalytic Activity, In: Burns, R.G., Dick, R. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 285-306.

Qureshi, S., Richards, B.K., Hay, A.G., Tsai, C.C., McBride, M.B., Baveye, P., Steenhuis, T.S., 2003. Effect of microbial activity on trace element release from sewage sludge. *Environmental Science & Technology* 37, 3361-3366.

Rachou, J., Gagnon, C., Sauvé, S., 2007. Use of an ion-selective electrode for free copper measurements in low salinity and low ionic strength matrices. *Environmental Chemistry* 4, 90-97.

Ray, P.C., Yu, H., Fu, P.P., 2009. Toxicity and environmental risks of nanomaterials: Challenges and future needs. *Journal of Environmental Science and Health Part C* 27, 1-35.

Reid, T.W., Wilson, I.B., 1971. *E. coli* Alkaline Phosphatase, In: Boyer, P.D. (Ed.), *The Enzymes - Hydrolysis: Other C-N bonds, Phosphate esters*. Academic Press, New York and London, pp. 373-447.

Rejeski, D., 2011. *Nanotechnology Consumer Product Inventory*. Washington, DC: Project on Emerging Nanotechnologies Woodron Wilson International Center for Scholars, Washington.

Renella, G., Mench, M., van der Lelie, D., Pietramellara, G., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Nannipieri, P., 2004. Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 443-451.

Ros, M., Pascual, J.A., Garcia, C., Hernandez, M.T., Insam, H., 2006. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 3443-3452.

Satomi, S., Kleja, D.B., Persson, I., Gustafsson, J.P., 2011. Binding of silver to isolated fulvic acid and organic soils, ICOBTE 2011: 11th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Florence, Italy

Sauvé, S., 2002. Speciation of metals in soils, In: Allen, E.A. (Ed.), *Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants*. SETAC Press, Pensacola, pp. 7-68.

Sauvé, S., Hendawi, M., Brousseau, P., Fournier, M., 2002. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52, 21-29.

Sauvé, S., McBride, M., Hendershot, W., 1998. Soil solution speciation of lead(II): Effects of organic matter and pH. *Soil Science Society of America Journal* 62, 618-621.

Shah, V., Dobiasova, P., Baldrian, P., Nerud, F., Kumar, A., Seal, S., 2010. Influence of iron and copper nanoparticle powder on the production of lignocellulose degrading enzymes in the fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials* 178, 1141-1145.

Sotiriou, G.A., Pratsinis, S.E., 2010. Antibacterial Activity of Nanosilver Ions and Particles. *Environmental Science & Technology* 44, 5649-5654.

Tabatabai, M.A., 1994. Soil Enzymes, In: Weaver, R.W., Angle, J.S., Bottomly, P.S. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2 - Microbiological and Biochemical Properties*. SSSA Book series number 5, Madison.

Tabatabai, M.A., Dick, W.A., 2002. Enzymes in Soil: Research and Developments in Measuring Activities, In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications* Marcel Dekker, New York, pp. 567-596.

Tate III Robert L., 2002. Microbiology and Enzymology of Carbon and Nitrogen Cycling, In: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 227-248.

Throback, I.N., Johansson, M., Rosenquist, M., Pell, M., Hansson, M., Hallin, S., 2007. Silver (Ag<sup>+</sup>) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. *Fems Microbiology Letters* 270, 189-194.

Tiessen, H., Moir, J.O., 1993. Total organic carbon, In: Carter, M.R. (Ed.), *Soil Sampling and Methods Analysis*. Lewis, Ottawa, pp. 187-200.

Tolaymat, T.M., El Badawy, A.M., Genaidy, A., Scheckel, K.G., Luxton, T.P., Suidan, M., 2010. 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* 408, 999-1006.

Torriani, A., 1960. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. *Biochimica Biophysica Acta* 38, 460-469.

Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N., 2008. Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 2098-2106.

Warman, P.R., Munroe, M.D., 2010. The effects of high metal concentrations in soil-compost mixtures on soil enzymes. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 45, 633-638.

Wigginton, N.S., De Titta, A., Piccapietra, F., Dobias, J., Nesatty, V.J., Suter, M.J.F., Bernier-Latmani, R., 2010. Binding of Silver Nanoparticles to Bacterial Proteins Depends on Surface Modifications and Inhibits Enzymatic Activity. *Environmental Science & Technology* 44, 2163-2168.

Wijnhoven, S.W.P., Peijnenburg, W., Herberts, C.A., Hagens, W.I., Oomen, A.G., Heugens, E.H.W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Van de Meent, D., Dekkers,

S., De Jong, W.H., Van Zijverden, M., Sips, A., Geertsma, R.E., 2009. Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 3, 109-138.

You, S.J., Yin, Y.J., Allen, H.E., 1999. Partitioning of organic matter in soils: effects of pH and water/soil ratio. *Science of the Total Environment* 227, 155-160.

Zhang, F.P., Li, C.F., Tong, L.G., Yue, L.X., Li, P., Ciren, Y.J., Cao, C.G., 2010. Response of microbial characteristics to heavy metal pollution of mining soils in central Tibet, China. *Applied Soil Ecology* 45, 144-151.

Zhu, R.R., Wang, W.R., Sun, X.Y., Liu, H., Wang, S.L., 2010. Enzyme activity inhibition and secondary structure disruption of nano-TiO<sub>2</sub> on pepsin. *Toxicology in Vitro* 24, 1639-1647.

## **Annexe 1**



Dans l'annexe 1 est reproduit une étude préliminaire présentée sous forme de poster au 15<sup>e</sup> Colloque annuel du Chapitre Saint-Laurent qui s'est déroulé les 26 et 27 mai 2011 à Montréal (Qc).

## **Effet des nanoparticules d'argent sur l'activité enzymatique des sols**

Caroline Peyrot et Sébastien Sauvé

Laboratoire de Chimie Environnementale, Département de Chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, succ Centre-Ville, Montréal, Qc, H3C 3J7

### **Introduction**

L'argent est le métal le plus utilisé en nanotechnologie pour ses propriétés antimicrobiennes. En 2009, 25% des nano-produits commercialisés contenaient des nanoparticules d'argent (nAg)<sup>1</sup>. Il a été prédit qu'une plus grande concentration de nAg, rejetées dans l'environnement, s'accumulerait dans les sols suite à l'application des bio-solides<sup>2</sup>. Les nAg pourraient avoir une interaction négative sur la communauté microbienne avec des répercussions sur la fertilité du sol et les processus biogéochimiques.

Les essais enzymatiques ont déjà montrés leur efficacité et sensibilité dans la détection d'une perturbation physique et chimique du sol<sup>3</sup>. Les effets potentiels des nAg sont évalués en mesurant l'activité des enzymes du sol tout en évaluant le rôle de l'argent ionique ( $\text{Ag}^+$ ). En effet, les expériences avec les nAg sont comparées à des traitements avec l' $\text{Ag}^+$  (acétate d'argent) pour déterminer la proportion de la toxicité selon la spéciation de l'Ag. Les enzymes  $\beta$ -D-glucosidase, leucine-aminopeptidase, phosphomonoestérase et arylsulfatase sont sélectionnées en fonction de leurs rôles respectifs dans les cycles des éléments C, N, P et S.

### Matériels & Méthodes

Le processus enzymatique des sols est mesuré à l'aide d'une technique impliquant des marqueurs fluorescents. Cette méthode a l'avantage de mesurer les essais directement dans une plaque de 96 puits.

1) Extraction des enzymes dans un tampon d'acétate de sodium à pH 6,0 et à force ionique (FI) de 10 mM (2 g de sol dans 50 mL)

2) Surcharge de la solution du sol à des concentrations totales en nAg de 0,005 mg/L à 25 mg/L et en Ag<sup>+</sup> de 0,005 mg/L à 5 mg/L.

3) Incubation avec le substrat lié à un fluorophore, pendant 24 h, à 30°C, sous une agitation de 110 rpm.

4) Mesures des intensités fluorescentes à  $\lambda_{ex}$  335 nm et  $\lambda_{em}$  450 nm.

5) Mesures de l'Ag total et l'Ag dissous. Une filtration à 0,45  $\mu$ m (cellulose acetate) puis une centrifugation à travers une membrane de 3 kDa (polyethersulfone modifié) pour séparer l'Ag particulaire de l'Ag dissous est nécessaire pour les nAg. Après une digestion acide, l'argent est analysé par spectrométrie d'absorbance atomique<sup>4</sup>.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard (n = 6). Une courbe "dose-réponse" est déterminée sur la base du modèle d'équation:

$$y = \max + \frac{\min - \max}{1 + \exp[(\log x - \log EC_{50})]} \quad (\text{Equation A1})$$

Tableau AI-1. Caractéristiques physico-chimiques du sol et des nanoparticules d'argent.

<i>Matériels</i>	<i>Caractéristiques</i>		
<b>Sol</b> – Campus Macdonald, Sainte-Anne-de-Bellevue	pH <sub>CaCl2</sub> : 5,81 pH <sub>H2O</sub> : 6,54 EC: 61,3 µS/cm	% C <sub>org</sub> : 1,47 ± 0,12 % MO : 2,53 ± 0,21	2 % argile 10 % limon 88 % sable
<b>nAg</b> - ViveNano	Taille ~ 20 nm, stabilisées avec polyacrylate de Na		31 % Ag w/w

### Résultats & Discussion

Il semble que dans plusieurs cas, la toxicité de nAg soit inférieure à une exposition équivalente d'argent ionique (Figure A1-1). En effet, les enzymes aminopeptidase et  $\beta$ -D-glucosidase semblent être moins affectées par la présence des nAg dans leur environnement que par l'Ag<sup>+</sup>. L'explication la plus probable pourrait être que pour les nAg, une portion de l'argent dissous est sous forme colloïdale peu toxique dans le cadre de cette exposition. Possiblement qu'avec une exposition plus prolongée ces colloïdes auraient une chance de se dissoudre et de libérer l'Ag<sup>+</sup>. Cette hypothèse concorde avec les analyses préliminaires obtenues pour évaluer la spéciation chimique de l'Ag dans les sols<sup>5</sup>.

Dans le cas de l'arylsulfatase, on observe une diminution de l'activité en présence des nAg similaire à une exposition à l'Ag<sup>+</sup>. Cette enzyme est la plus sensible à l'Ag avec une concentration qui affecte 50% de l'activité (EC<sub>50</sub>) d'environ 5 µg/L Ag dissous. La phosphomonoestérase est l'enzyme la moins affectée par l'Ag (Figure A1-2).

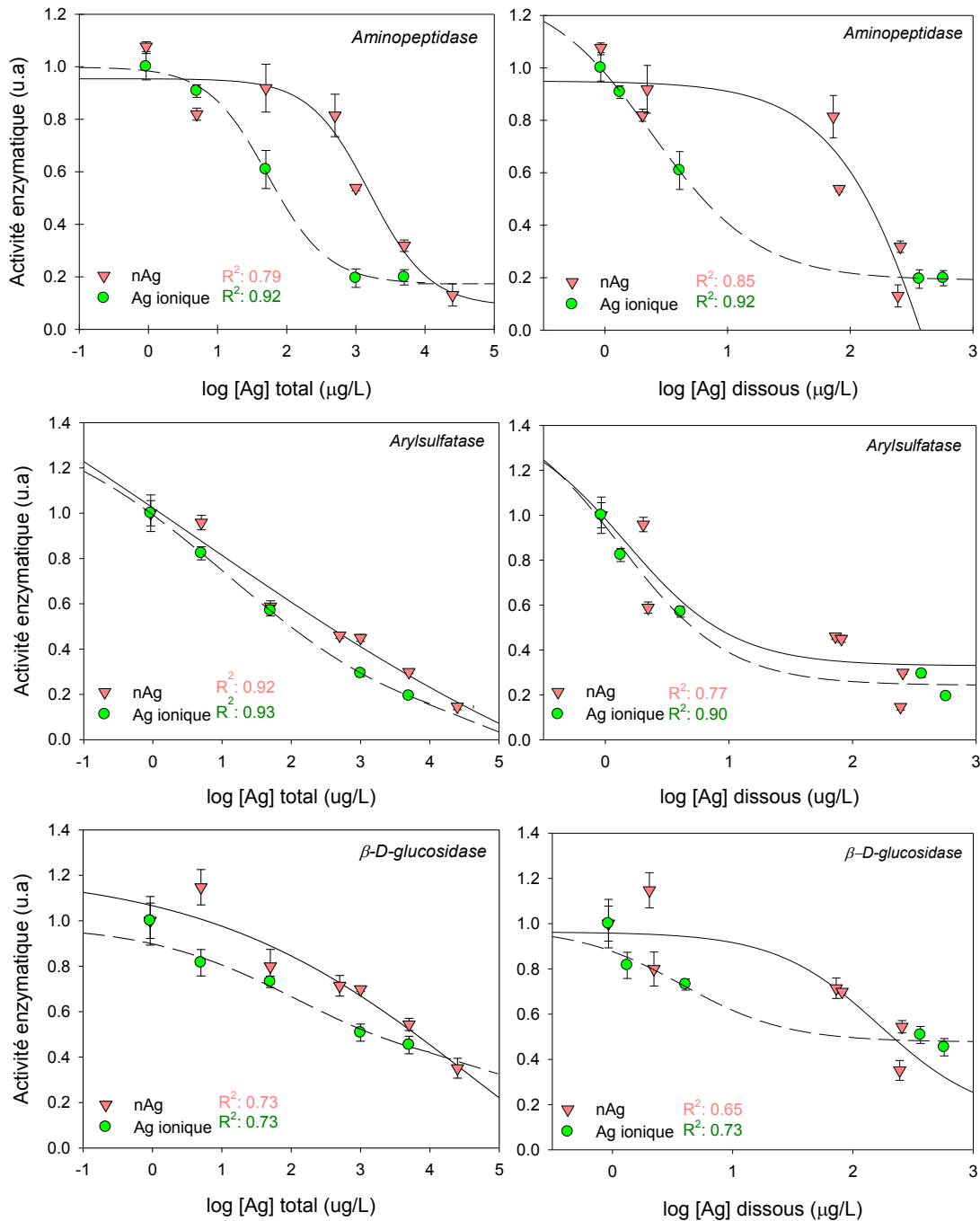


Figure A1-1. Courbes « dose-réponse » représentant les activités enzymatiques en fonction de la concentration en Ag total (à gauche) et de la concentration en Ag dissous (à droite) après une exposition aux nAg (triangles) et à l'Ag<sup>+</sup> (cercles).

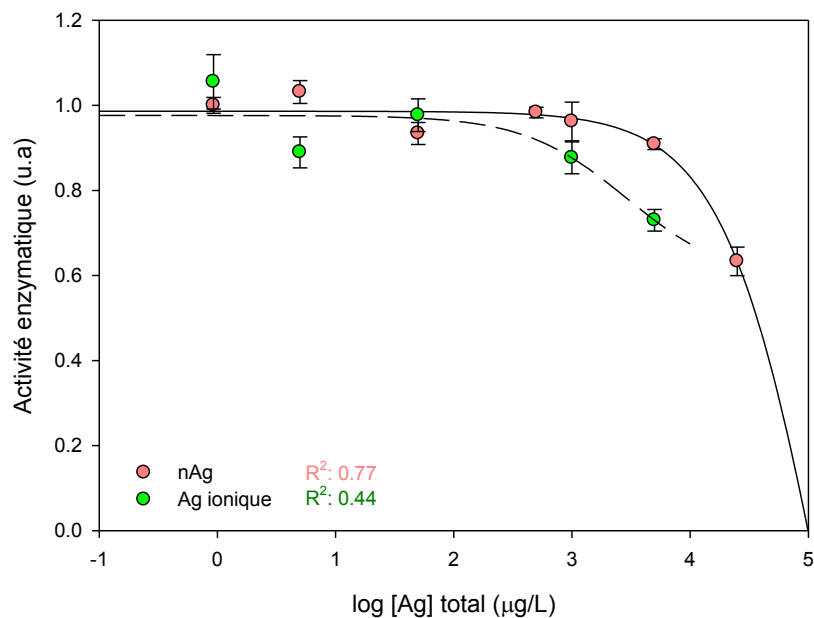


Figure A1-2. Courbes « dose-réponse » représentant l'activité enzymatique de la phosphomonoestérase en fonction de la concentration en Ag total après une exposition aux nAg (triangles) et à l'Ag<sup>+</sup> (cercles).

### Futurs travaux

- 1) Vérifier les effets à des concentrations entre 10 µg/L et 50 µg/L Ag dissous.
- 2) Mesures des processus enzymatiques sur les sols dopés avec les nAg et Ag<sup>+</sup> à 7 et 30 jours.

### Conclusion

Suite à une exposition aux nAg, les réponses des activités des enzymes,  $\beta$ -D-glucosidase, leucine-aminopeptidase, phosphomonoestérase et arylsulfatase, ont montré que les effets sont similaires ou moins nocifs que l'Ag<sup>+</sup>. Cependant, les traitements ont été conduits sur 24 h et il serait intéressant de vérifier ces effets à plus

long terme. De plus, la collaboration avec une étude portant sur la spéciation des nAg dans les sols permettra de mieux expliquer les effets observés.

### Remerciements

Ce projet a été réalisé grâce au support financier d'une subvention FQRNT-Équipe.

### Références

1. Rejeski, D. Nanotechnology Consumer Product Inventory. Washington, DC: Project on Emerging Nanotechnologies.  
<http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>.
2. Gottschalk, F. et al., *Env. Sc. Tech.*, 2009, 43, (24), 9216-9222.
3. Dick, R. P., Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In *Biological Indicators of Soil Health*, Pankhurst, C. E.; Doube, B. M.; Gupta, V. V. S. R., Eds. Cab International: New York, 1997; pp 121-156.
4. Cornelis, G et al., *Env. Chem.* 2010, 7, (3), 298-308.
5. Benoit R. *et al.*, Speciation of silver nanoparticles in the environment. Présentation d'un poster au 15e Colloque annuel du Chapitre Saint-Laurent, 26 et 27 mai 2011.

## **Annexe 2**

Dans l'annexe 2 est présenté un complément de l'étude préliminaire décrite dans l'annexe 1 suite à des questions soulevées concernant les effets du polyacrylate stabilisant les nanoparticules d'argent.

### **Matériels & Méthodes**

Un échantillon d'acide polyacrylate (PAA) a été fourni gracieusement par la compagnie Vive Crop Protection (anciennement Vive Nano Inc.). Les essais enzymatiques ont été réalisés directement dans une plaque de 96 puits et sur le même sol que décrit dans l'annexe 1.

- 1) Extraction des enzymes dans un tampon d'acétate de sodium à pH 6,0 et à force ionique (FI) de 10 mM (2 g de sol dans 50 mL)
- 2) Surcharge de la solution du sol à des concentrations totales en PAA de 0,002 mg/L à 5 mg/L.
- 3) Incubation avec le substrat lié à un fluorophore, pendant 24 h, à 30°C, sous une agitation de 110 rpm.
- 4) Mesures des intensités fluorescentes à  $\lambda_{\text{ex}} = 330$  nm (MUF) ou  $\lambda_{\text{ex}} = 360$  nm (AMC) et à  $\lambda_{\text{em}} = 450$  nm.

### **Résultats & Discussion**

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type ( $n = 2$ ) dans la Figure A2-1. Les activités enzymatiques ne semblent pas affectées par la présence d'acide polyacrylate à des concentrations maximales de 5 mg/L (125 mg/kg). Les pentes des régressions ne sont pas statistiquement différentes de zéro ( $p > 0.05$ ) à l'exception de l'enzyme aminopeptidase ( $p = 0.028$ ) qui affiche une légère augmentation de l'activité aux plus hautes concentrations en PAA.



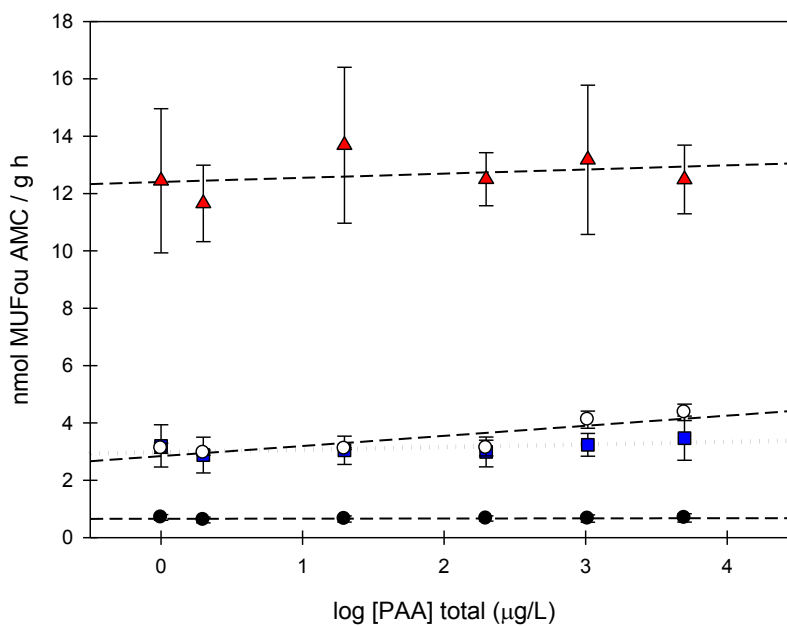


Figure A2-1. Activités des enzymes phosphomonoestérase (triangles), aminopeptidase (cercles blancs), glucosidase (carrés) et arylsulfatase (cercles noirs) en fonction de la concentration en PAA total. L'activité enzymatique est exprimée en nmol MUF ou AMC produits par gramme de sol par heure.