

Université de Montréal

Agglomération et hétéroagglomération des nanoparticules d'argent en eaux douces

par

Sébastien Maillette

Département de Chimie, Université de Montréal

Faculté des arts et des sciences

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

Avril, 2015

© Sébastien Maillette, 2015

Résumé

Les nanomatériaux sont une classe de contaminants qui est de plus en plus présent dans l'environnement. Leur impact sur l'environnement dépendra de leur persistance, mobilité, toxicité et bioaccumulation. Chacun de ces paramètres dépendra de leur comportement physicochimique dans les eaux naturelles (i.e. dissolution et agglomération). L'objectif de cette étude est de comprendre l'agglomération et l'hétéroagglomération des nanoparticules d'argent dans l'environnement. Deux différentes sortes de nanoparticules d'argent (nAg; avec enrobage de citrate et avec enrobage d'acide polyacrylique) de 5 nm de diamètre ont été marquées de manière covalente à l'aide d'un marqueur fluorescent et ont été mélangées avec des colloïdes d'oxyde de silice (SiO₂) ou d'argile (montmorillonite). L'homo- et hétéroagglomération des nAg ont été étudiés dans des conditions représentatives d'eaux douces naturelles (pH 7,0; force ionique 10⁻⁷ à 10⁻¹ M de Ca²⁺). Les tailles ont été mesurées par spectroscopie de corrélation par fluorescence (FCS) et les résultats ont été confirmés à l'aide de la microscopie en champ sombre avec imagerie hyperspectrale (HSI). Les résultats ont démontrés que les nanoparticules d'argent à enrobage d'acide polyacrylique sont extrêmement stables sous toutes les conditions imposées, incluant la présence d'autres colloïdes et à des forces ioniques très élevées tandis que les nanoparticules d'argent avec enrobage de citrate ont formées des hétéroagrégats en présence des deux particules colloïdales.

Mots-clés : Agglomération, hétéroagglomération, nanoparticule d'argent, spectroscopie de corrélation par fluorescence, imagerie hyperspectrale, microscopie en champ sombre.

Abstract

Nanomaterials are a class of contaminants that are increasingly found in the natural environment. Their environmental risk will depend on their persistence, mobility, toxicity and bioaccumulation. Each of these parameters will depend strongly upon their physicochemical fate (dissolution, agglomeration) in natural waters. The goal of this paper is to understand the agglomeration and heteroagglomeration of silver nanoparticles in the environment. Two different silver nanoparticles (nAg; citrate coated and polyacrylic acid coated) with a diameter of 5 nm were covalently labelled with a fluorescent dye and then mixed with colloidal silicon oxides (SiO₂) and clays (montmorillonite). The homo- and heteroagglomeration of the silver nanoparticles were then studied in waters that were representative of natural freshwaters (pH 7.0; ionic strength 10⁻⁷ to 10⁻¹ M of Ca²⁺). Sizes were followed by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and results were validated using enhanced darkfield microscopy with hyperspectral imaging (HSI). Results have demonstrated that the polyacrylic acid coated nAg was extremely stable under all conditions, including in the presence of other colloids and at high ionic strength, whereas the citrate coated nAg formed heteroaggregates in the presence of both natural colloidal particles.

Keywords : agglomeration, heteroagglomeration, silver nanoparticle, fluorescence correlation spectroscopy, hyperspectral imaging, darkfield microscopy.

Table des matières

Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations et symboles.....	x
Remerciements.....	xiii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. Préoccupation environnementale.....	1
1.2. Homoagglomération.....	3
1.3. Hétéroagglomération.....	5
1.4. Objectifs.....	8
Chapitre 2 : Théorie.....	10
2.1. Stabilisation des nanoparticules d'Ag.....	10
2.2. Méthodes de caractérisation des nanoparticules.....	13
2.2.1. Introduction.....	13
2.2.2. Spectroscopie de corrélation par fluorescence (FCS).....	14
2.2.3. Ultracentrifugation analytique (AUC).....	18
2.2.4. Microscopie en champs sombre avec imagerie hyperspectrale (Cytoviva).....	21
Chapitre 3 : Optimisation des techniques.....	24
3.1. Marquage des nanoparticules.....	24
3.1.1. Marquage par adsorption.....	24
3.1.2. Marquage covalent.....	25
3.2. Méthode de spectroscopie de corrélation par fluorescence.....	26
3.3. Méthode d'ultracentrifugation analytique.....	30
3.4. Méthode de microscopie en champ sombre couplée à l'imagerie hyperspectrale.....	31
Chapitre 4: Article - Heteroagglomeration of nanosilver with SiO ₂ and clay.....	33
4.1. Abstract.....	34
4.2. Introduction.....	35
4.3. Materials and methods.....	37
4.4. Results and discussion.....	39
4.5. Environmental relevance.....	48

4.6. Associated content	49
4.7. Author information	49
4.8. Acknowledgments.....	49
Chapitre 5: Supporting information for Heteroagglomeration of nanosilver with SiO ₂ and clay	50
5.1. Characterization of the colloidal suspensions.....	51
5.2. Labeling and characterization of the citrate stabilized nAg (nAg-cit).....	52
5.3. Labeling and characterization of nAg-PAA	55
5.4. Fluorescence intensity measurements.....	58
5.5. Heteroagglomeration at pH 5.....	58
5.6. Natural waters	59
5.7. Enhanced darkfield microscopy with hyperspectral imaging.....	60
5.8. Raw FCS data for the nAg-cit in the Des Prairies River	61
Chapitre 6 : Conclusion	63
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Table 1. Characterization of nanoparticles and colloids used in the initial FCS studies.	39
Table 2. Average size of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ nAg-cit at in Milli-Q water and in water from the Des Prairies River.	47
Table 3. Characterization of the Des Prairies River water	59

Liste des figures

Figure 1. Schéma des différentes spéciations et mobilité des nAg en eaux douces.	5
Figure 2. Concentration de particules dans les différents types d'eau ²⁹	6
Figure 3. Schéma de l'hétéroagglomération des nAg en milieu aquatique.	9
Figure 4. Stabilisation des nanoparticules.....	11
Figure 5. Équilibre chimique de l'acide polyacrylique.....	11
Figure 6. Équilibre chimique du citrate.	12
Figure 7. Techniques d'analyse avec leur domaine de taille respectif ²⁹	14
Figure 8. Schéma de fonctionnement du microscope confocal ¹¹	15
Figure 9. (A) Émission de photons par des nanoparticules marquées à l'intérieur du volume confocal; (B) Fluctuation d'intensité de fluorescence par rapport à la moyenne; (C) Courbe d'autocorrélation obtenue à partir des fluctuations d'intensité ¹¹	16
Figure 10. Distribution de taille ayant deux modes.	17
Figure 11. Profil de sédimentation de l'ultracentrifugation analytique ⁴⁸	19
Figure 12. Schéma de sédimentation de l'ultracentrifugation analytique.	20
Figure 13. Condenseur du microscope en champ sombre ⁵²	22
Figure 14. Structure des réactifs fluorescents (A) rhodamine red TM -X (Life Technologies Inc.); (B) Alexa Fluor® 488 (Life Technologies Inc.).	26
Figure 15. Spectre de fluorescence 2D pour (A) 10 mg L ⁻¹ de nAg-PAA marquées avec Alexa Fluor® 488 dans l'eau Milli-Q; (B) 1 mg L ⁻¹ de nAg-cit marquées avec rhodamine red TM -X dans l'eau Milli-Q.....	27
Figure 16. Fonction d'autocorrélation des nAg-PAA marquée en présence de 100 mg L ⁻¹ de SiO ₂ colloïdales (A) à 10 µg L ⁻¹ Ag de nAg-PAA; (B) à 25 µg L ⁻¹ Ag de nAg-PAA; (C) à 50 µg L ⁻¹ Ag de nAg-PAA; (D) à 100 µg L ⁻¹ Ag de nAg-PAA.....	29
Figure 17. Agglomération et hétéroagglomération de nAg-cit en absence (cercles gris) ou en présence de 100 mg L ⁻¹ de SiO ₂ colloïdales (figure 17A, carrés bleus) ou particules d'argile (figure 17B, losanges rouges) à pH 7,0. Les mesures ont été obtenues par FCS sur une grande gamme de concentration de calcium.	30

- Figure 18.** (A) Analyses HSI à 40 X des nAg-cit marquées avec la rhodamine red-X à 15 mg L⁻¹; (B) avec filtres de fluorescence Texas red (longueur d'onde d'excitation : 572 ± 23 nm; longueur d'onde d'émission de 600 à 650 nm). 32
- Figure 19.** Agglomeration and heteroagglomeration of nAg-cit in the absence (grey circles) or presence of 100 mg L⁻¹ of colloidal SiO₂ (Figure 19A, blue squares) or colloidal clay (Figure 19B, red diamonds) at pH 7.0. Measurements were obtained by FCS and represent the average sizes of the labelled nAg. For a given Ca concentration, significant differences (Student t-test, P<0.05) due to the addition of the colloidal particles were observed for all Ca concentrations except for 10⁻⁶ and 10⁻⁵ M (SiO₂, Figure 19A). 40
- Figure 20.** Role of the concentration of colloidal SiO₂ (blue circles) and colloidal montmorillonite (red squares) on the hydrodynamic diameters of a fluorescently labelled nAg-cit, obtained using FCS in the presence of 5×10⁻⁷ M Ca at pH 7.0. 42
- Figure 21.** (A) Hydrodynamic diameters of 50 µg of nAg-PAA at pH 7.0 over a large range of calcium concentrations in the absence (grey circles); presence (blue squares) of 100 mg L⁻¹ of SiO₂ particles and presence (red diamonds) of 100 mg L⁻¹ of clay particles. Colloidal SiO₂ were also measured by dynamic light scattering in the absence of nAg-PAA (brown diamonds). Similar data obtained at pH 5.0 can be found in the Supplementary Information (Figure 33). Results in Figure 21A were obtained under the assumption of a single component. (B) Reanalysis of the FCS data under the assumption of a two component system. Results generated for the hydrodynamic sizes of the minor component only, corresponding to less than 5% of the total particle numbers. 44
- Figure 22.** Darkfield microscopy and hyperspectral analyses of the citrate coated nAg (22 nm) and the colloidal clay: (A) stock solution at 1 g L⁻¹; (B) Spectral library built mainly from the blue particles observed in A; (C) Spectral library built from remaining particles. The two spectral libraries were combined for the mapping of nAg (library 1); (D) 100 mg L⁻¹ of colloidal clay in 1 mM Ca at pH 7.0; (E) Spectral library for the clay generated from Figure 22D (library 2); (F) Supernatant 1 mg L⁻¹ of nAg and 100 mg L⁻¹ of colloidal clay in 1 mM Ca at pH 7.0 after 3h of sedimentation; (G) Spectral library for the nAg generated from Figure 22F (library 3); (H and I) Mapping generated by assigning pink to pixels identified using library 2 (clays) and yellow to the pixels corresponding library 3 (nAg); (H) Mapping of 1 mg L⁻¹ of nAg and 100 mg L⁻¹ of colloidal clay in 1 mM Ca at

pH 7.0; (I) Mapping of 1 mg L ⁻¹ of nAg and 100 mg L ⁻¹ of colloidal clay in 50 mM Ca at pH 7.0.....	46
Figure 23. Darkfield microscopy and hyperspectral analyses of the nAg-cit (22 nm) spiked into the natural water at a concentration of 1.0 mg L ⁻¹ . (A) Darkfield microscopy of the natural water; (B) Darkfield microscopy of 1 mg L ⁻¹ of nAg in the natural water, using image enhancement (square root); to bring the nAg into near field; (C) Mapping of 1 mg L ⁻¹ of nAg and the colloidal particles in the natural water using libraries 2 and 3 (Figure 22E,G); (D) zoom of identified area in image C. In C and D, mapping was generated by assigning pink pixels to the particles matching the spectral library of the clays (library 2) and yellow to the pixels matching the spectral library of the nAg (library 1 and 3).	48
Figure 24. Particle size distributions (hydrodynamic diameters) for: (A) 100 mg L ⁻¹ of colloidal SiO ₂ at pH 7.0 and (B) 100 mg L ⁻¹ of the colloidal clay particles (montmorillonite) at pH 7.0.....	51
Figure 25. Hydrodynamic diameters (blue circles) and electrophoretic mobilities (yellow squares) as a function of added calcium concentrations for: (A) 100 mg L ⁻¹ of colloidal SiO ₂ at pH 7.0; (B) 100 mg L ⁻¹ of colloidal montmorillonite at pH 7.0.....	52
Figure 26. Synthesis of the rhodamine-labelled nAg-cit.	53
Figure 27. (A) TEM image of the citrate stabilized, rhodamine labelled nAg (homemade); (B) TEM distribution of the labelled nAg (N=55).....	54
Figure 28. (A) TEM image of the commercial, citrate stabilized nAg, (B) TEM of the rhodamine labelled nAg-citrate; (C) TEM distribution of the labelled nAg-citrate (N=200).....	55
Figure 29. Efficiency of the washing of the labelled nAg suspension used to remove excess fluorescent dye. “Before” corresponds to the number of moles of label that were measured before the use of the desalting column while “After” corresponds to the number of moles that remained in solution after the use of the desalting column. Each of the remaining data points indicates subsequent cycles of centrifugal ultrafiltration.	56
Figure 30. TEM and AUC on 5 mg L ⁻¹ of the nAg-PAA suspensions before and after labelling (A) TEM image of the nAg-PAA in Milli-Q water; (B) TEM image of the labelled nAg-PAA in Milli-Q water; (C) TEM size distribution of the unlabelled nAg-PAA (n=200); (D) TEM size distribution of the labelled nAg-PAA (n=200); (E) AUC distributions	

obtained using absorbance and interference detectors for the nAg-PAA in Milli-Q water and (F) AUC distributions using absorbance and interference detectors for the labelled nAg-PAA in Milli-Q water.	57
Figure 31. Electrophoretic mobility of unlabelled (grey circles) and labelled (yellow squares) nAg-PAA (5 mg L ⁻¹) as a function of pH.	57
Figure 32. (A) Fluorescence intensity of labelled nAg-cit in the absence (grey circles) or presence of 100 mg L ⁻¹ of colloidal SiO ₂ (blue squares) or colloidal clay (red diamonds) as function of added calcium at pH 7.0; (B) Fluorescence intensity of labelled nAg-PAA in the absence (grey circles) or presence of 100 mg L ⁻¹ of colloidal SiO ₂ (blue squares) or colloidal clay (red diamonds) as a function of added calcium at pH 7.0 (the experiment with colloidal clay was performed independently; the overall decrease in fluorescence intensity was likely due to laser output).	58
Figure 33. FCS determination of hydrodynamic diameters for 50 µg L ⁻¹ of nAg-PAA at pH 5.0, obtained over a large range of calcium concentrations: nAg-PAA only (grey circles); nAg-PAA in the presence of 100 mg L ⁻¹ of SiO ₂ (blue squares). The brown diamonds show the measured agglomeration of SiO ₂ alone, obtained using DLS.	59
Figure 34. (A) Mapping of nAg-cit in presence of clay particles in 1 mM Ca at pH 7.0; (B) Spectral signatures of nAg-cit that were detected in the mixtures.	60
Figure 35. (A) Mapping of nAg-cit in presence of colloidal SiO ₂ at 50 mM Ca; (B) Spectral signature of the nAg-cit that wasn't detected during nanoparticle mapping.	60
Figure 36. Darkfield microscopy and hyperspectral imaging analyses of the citrate coated nAg (22 nm) and the colloidal SiO ₂ : (A) 100 mg L ⁻¹ of colloidal SiO ₂ in 1 mM Ca at pH 7.0; (B) 100 mg L ⁻¹ of colloidal SiO ₂ in 50 mM of Ca at pH 7.0; (C) Spectral library for the SiO ₂ generated from images similar to Figure 36A; (D) 1 mg L ⁻¹ of nAg and 100 mg L ⁻¹ of colloidal SiO ₂ in 1 mM Ca at pH 7.0; (E) Spectral library of the nAg, generated in presence of the colloidal SiO ₂ ; (F) 1 mg L ⁻¹ of nAg and 100 mg L ⁻¹ of colloidal SiO ₂ in 50 mM Ca at pH 7.0.	61
Figure 37. Autocorrelation curves obtained for 50 µg L ⁻¹ of rhodamine red-X labelled nAg-cit in Milli-Q water (grey dots) and in a 0.4 µm of a filtered water sample of the Des Prairies River (blue squares).	62

Liste des abréviations et symboles

nAg	Nanoparticules d'argent
nAg-PAA	Nanoparticules d'argent avec enrobage d'acide polyacrylique
nAg-cit	Nanoparticules d'argent avec enrobage de citrate
AUC	Ultracentrifugation analytique
$\langle C \rangle$	Concentration moyenne
CCC	Concentration critique d'agglomération
D	Coefficient de diffusion
$[D]$	Concentration de fluorophore
d_H	Diamètre hydrodynamique
$\{D \cdot S\}$	Concentration de site marqué à la surface des nanoparticules
DLS	Diffusion de la lumière dynamique
DLVO	Théorie de Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek
FCS	Spectroscopie de corrélation par fluorescence
$F(t)$	Fluorescence au temps t
HSI	microscopie en champ sombre avec imagerie hyperspectrale
k	Constante de Boltzmann
K	Constante de marquage
η	Viscosité du milieu
η_s	Viscosité du solvant
ρ_p	Densité de particule
ρ_s	Densité du solvant
PAA	Acide polyacrylique
PVP	Polyvinylpyrrolidone
s	Coefficient de sédimentation
$\{S\}$	Concentration de site de marquage à la surface des nanoparticules
T	Température en kelvin
t	Temps d'acquisition
τ	Temps de retard

u	Vitesse de sédimentation
V	Volume confocal
$\omega^2 r$	Accélération centrifuge
ω_0	Largeur du volume confocal
z_0	Hauteur du volume confocal

Pour mes parents exceptionnels

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, Kevin J. Wilkinson, pour sa patience, son talent de pédagogue et de scientifique. Merci de m'avoir permis de faire ma maîtrise dans ton groupe de recherche. Je voudrais aussi remercier tous les financeurs de ce projet soit environnement Canada et le CRSNG.

Je voudrais remercier aussi mes parents de m'avoir encouragé tout au long de mes études, Stéphanie Poirier de m'avoir supporté pendant les années de ma maîtrise, Philippe El-akl de m'avoir donné du chocolat et d'avoir fait en sorte que la maîtrise ait été plus agréable. Merci à Elise Morel, Kim Proulx et Trevor Théoret d'avoir contribuer au fait que le laboratoire et le bureau aient une ambiance chaleureuse.

Un grand merci à Leosveys Diaz Lozada, Madjid Hadioui et Caroline Peyrot pour votre aide à l'ultracentrifugation analytique, à l'ICP-MS et au CytoViva®, ainsi que tous les autres membres du groupe Wilkinson pour votre support moral.

Je voudrais aussi les techniciens et techniciennes du programme de chimie de l'Université de Montréal pour leur gentillesse et leur enthousiasme ainsi que remercier tous ceux qui ont contribué à l'invention du chocolat. Puisque le chocolat a été d'un grand secours pendant toutes les heures de traitement de données.

1 **Chapitre 1 : Introduction**

2

3 Le nombre de produits commerciaux contenant des nanoparticules est en constante
4 croissance ¹. Ceci vient du fait que les nanomatériaux sont une classe de produits très versatile.
5 Ainsi, il est possible d'obtenir une grande gamme de propriétés différentes avec peu de
6 variation dans leur composition chimique ² et ces matériaux sont donc très avantageux pour
7 l'industrie. De plus, ils sont très faciles à produire en grande quantité. Due à l'augmentation de
8 leur utilisation, surtout dans les produits domestiques, une augmentation de leur concentration
9 dans l'environnement devrait se faire sentir au cours des prochaines années ³. Cependant, les
10 avancées technologiques des applications des nanoparticules augmentent plus rapidement que
11 les études portant sur leur impact et le risque de leur utilisation. Une des problématiques est
12 que les techniques normalement utilisées lors de la quantification des métaux et des
13 contaminants organiques ne sont pas adaptées à l'étude des nanomatériaux. Il faut donc
14 développer de nouvelles méthodes capables de les caractériser et de les quantifier en présence
15 de matrices complexes comme les milieux environnementaux. En le faisant, il sera possible de
16 mieux évaluer le risque environnemental lié à l'utilisation de la nanotechnologie afin d'établir
17 une réglementation adéquate pour limiter leur utilisation et leur rejet si le cas est nécessaire.

18 Beaucoup d'études sur la toxicité des nanoparticules ont été effectuées sans pour autant
19 caractériser l'état des nanoparticules une fois dans le milieu ⁴. Une problématique des
20 nanomatériaux est que leur comportement varie beaucoup selon le milieu dans lequel ils se
21 retrouvent. En ayant plus d'information sur ce comportement une fois relâchées dans des
22 conditions contrôlées, il sera ensuite possible d'estimer quelle(s) forme(s) peuvent
23 potentiellement être problématique(s) auprès des organismes vivants.

24

25 **1.1. Préoccupation environnementale**

26 L'argent, qui est un antibiotique connu depuis des siècles ⁵, est le matériel le plus
27 utilisé en terme de quantité de produits à base de nanoparticule ³. Il est donc probable de

28 retrouver cet élément en concentration grandissante dans l'environnement. Les nanoparticules
29 d'argent sont surtout utilisées dans les produits domestiques à cause de leurs propriétés
30 antimicrobiennes ^{5,6}. Par exemple, les savons, la peinture, les pots de plastique, la pâte à dent,
31 les onguents, etc ^{7,8} sont des produits à usage domestique susceptibles de contenir des
32 nanoparticules d'argent. En raison de ces sources de contamination, les nanoparticules
33 d'argent vont se retrouver dans l'environnement en passant à travers les systèmes de
34 traitement des eaux usées, où ils pourraient être concentrés. En effet, une étude a été effectuée
35 en Allemagne sur les eaux usées provenant de neuf usines d'épuration. Cette étude a quantifié
36 l'argent nanoparticulaire à l'entrée de la station ainsi qu'à la sortie de l'étape du traitement
37 mécanique et biologique ⁹. Deux méthodes analytiques différentes ont été utilisées, soit la
38 chromatographie à résine échangeuse d'ions et l'exclusion par nuage de points (« cloud point
39 extraction »). La quantification a été effectuée après chaque étape du traitement afin de savoir
40 quelle proportion de nanoparticules d'argent restait en suspension. Dans les affluents, il y avait
41 une concentration inférieure à 1,5 µg L⁻¹ de nAg. Après le traitement physique, seulement 35%
42 de cette concentration a été extraite tandis que le traitement biologique a extrait 95% de la
43 concentration restante. Ainsi, à la sortie du traitement biologique, la concentration en nAg
44 descendait à moins de 1,5 ng L⁻¹. Les conclusions de cette étude étaient que le rejet des nAg
45 n'était pas un problème de grande envergure puisqu'en calculant la quantité totale de
46 nanoparticules d'argent relarguée par jour, celle-ci était seulement de 4,4 g jour⁻¹ pour les
47 520 000 tonnes d'eaux passant par ces usines. Cependant, c'est loin d'être toutes les
48 municipalités qui possèdent des traitements biologiques pour les usines d'épuration et il faut
49 se rappeler que seulement 35% des nAg sont extraites avec le traitement mécanique. De
50 même, certaines municipalités n'ont pas la capacité de traiter toutes les eaux usées qu'elles
51 reçoivent et ainsi, l'excédent est directement rejeté dans l'effluent. Il est donc probable que la
52 concentration de ces nanoparticules soit plus élevée dans certaines régions du monde (selon le
53 traitement) et que globalement, il y aura une augmentation dans l'utilisation de ces matériaux
54 avec les années ³.

55 **1.2. Homoagglomération**

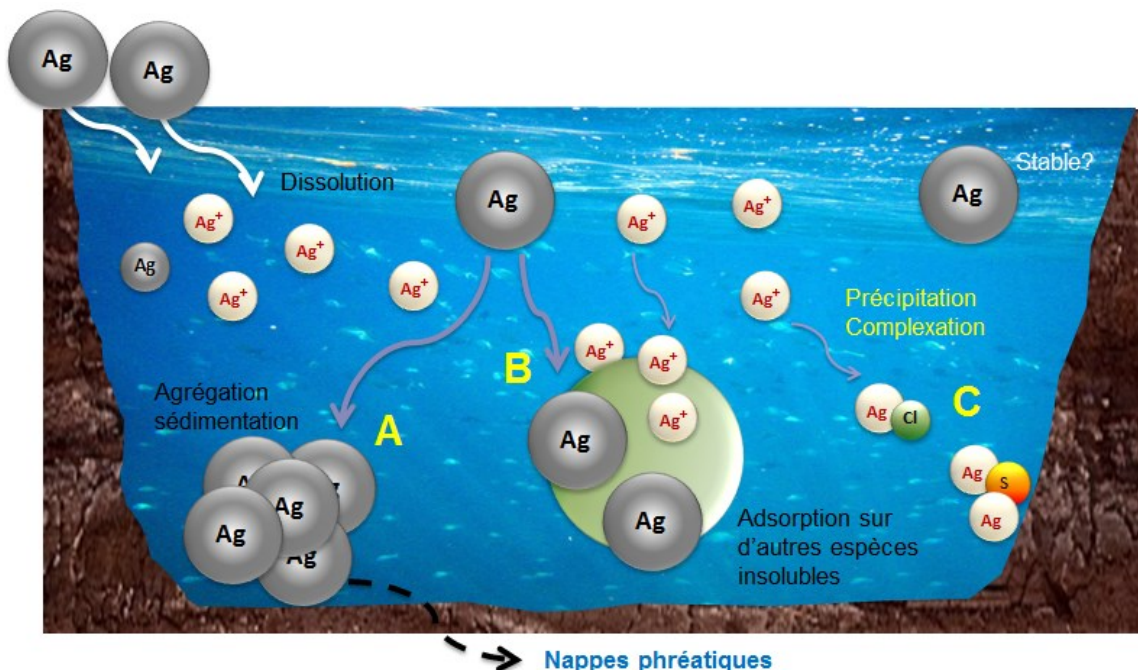
56 La mobilité des nanomatériaux est beaucoup influencée par la taille. Aussi, plus les
57 nanoparticules sont de petites tailles, plus leurs propriétés de surface deviennent importantes.
58 En effet, leur ratio surface/masse augmente lorsque la taille diminue. Par exemple, pour une
59 nanoparticule de 3 nm de diamètre, environ 50% de ses atomes sont à la surface tandis que
60 pour une nanoparticule de 30 nm, seulement 5% de ses atomes sont à la surface ¹⁰. Donc, les
61 interactions de surface et leur charge électrique vont fortement influencer la stabilité des
62 petites nanoparticules ¹¹.

63 L'agglomération correspond à un état instable des particules en suspension. La
64 première étape de l'agglomération est la formation de doublets de particule qui engendre par la
65 suite de plus gros agglomérats ¹². Lorsque les agglomérats formés sont trop dense et que le
66 mouvement brownien n'est plus assez fort pour maintenir les particules en suspension, il y
67 aura sédimentation. Il est intéressant de suivre l'agglomération des nanoparticules afin
68 d'obtenir de l'information à propos de leur stabilité selon différentes conditions.
69 L'agglomération des nanoparticules joue un rôle clé au niveau de leur biodisponibilité ainsi
70 que de leur mobilité. En formant des entités avec de faibles coefficients de diffusion,
71 l'agglomération diminue la toxicité en diminuant la quantité de nanoparticules qui sont en
72 contact avec l'organisme ¹³. En contraste, la dissolution des nanoparticules aurait pour effet
73 d'augmenter la dispersion et aussi la disponibilité des nanomatériaux avec leurs produits de
74 dissolution envers les microorganismes ¹⁴.

75 Le suivi de la taille des nanoparticules permet d'obtenir des informations sur leur
76 agglomération et dissolution en fonction de conditions environnementales variables telles que
77 la concentration en ion Na⁺ ou Ca²⁺, la présence de matière organique, ou la présence de
78 lumière, etc. En ce qui concerne les études sur les systèmes colloïdaux, la grande majorité
79 porte sur l'agglomération d'un seul type de nanoparticules, ou l'homoagglomération ¹⁴⁻¹⁸. Ces
80 études ont généralement pour objectif d'observer les effets du milieu et de la nature des
81 nanoparticules sur leur vitesse d'agglomération. Une forte majorité des études
82 d'homoagglomération ont été effectuées à des fortes concentrations (i.e. mg L⁻¹-g L⁻¹).

83 Malgré les concentrations élevées utilisées dans les études d'homoagglomération des
84 nanoparticules d'argent, de nombreux résultats pertinents ont pu être obtenus au cours des
85 dernières années. Par exemple, certains enrobages, comme le citrate, semblent limiter
86 l'agglomération tandis que d'autres (polyvinylpyrrolidone (PVP), acide polyacrylique (PAA),
87 etc.) limitent non seulement l'agglomération mais préviennent aussi la dissolution des
88 nanoparticules d'argent ^{14, 16, 19, 20}. Quelques unes de ces études^{16, 19} ont comparés leur valeur
89 expérimentale de concentration critique d'agglomération (CCC) avec la théorie de Derjaguin,
90 Landau, Verwey et Overbeek (DLVO) ^{12, 21}. Cette théorie est basée sur l'hypothèse que la
91 force totale entre les particules est obtenue en additionnant les forces van der Waals pour des
92 courtes distances avec les forces électriques de la double couche à longue distance ^{22, 23}.
93 Cependant, ce modèle ne tient pas compte des hétérogénéités du milieu tel que la
94 polydispersité des particules présentes ni de la répartition de charge inhomogène à la surface
95 de ces particules réelles ¹². De plus, les interactions hydrophobes intégrées dans la théorie
96 DLVO sont sous-estimées puisque l'agglomération observée réellement est plus importante
97 que celle donnée par ce modèle ²². Aussi, les forces de répulsion stérique ne s'appliquent pas
98 seulement aux enrobages à base de composés organiques. Une étude a montré qu'il pouvait y
99 avoir formation d'un gel d'acide silicique à la surface de la silice. Ce qui engendrait de la
100 répulsion stérique n'étant pas incluse par la théorie DLVO ²⁴.

101 En ce qui concerne les travaux sur l'homoagglomération des nanoparticules, la plupart
102 des systèmes étudiés n'étaient pas représentatifs d'un milieu environnemental. Par exemple,
103 les concentrations de nanoparticules utilisées pour effectuer ces analyses étaient souvent de
104 l'ordre de grandeur des mg L^{-1} , alors que les concentrations retrouvées dans l'environnement
105 sont beaucoup plus près des $\mu\text{g L}^{-1}$ soit au moins mille fois plus faibles que ce qui a été étudié.
106 De plus, dans l'environnement, d'autres particules naturelles ou des colloïdes de la matière
107 organique naturelle sont aussi présent ²⁵, souvent à des concentrations de l'ordre du mg L^{-1} à
108 des centaines de mg L^{-1} ¹⁴⁻²⁰.



109

110 **Figure 1.** Schéma des différentes spéciations et mobilité des nAg en eaux douces.

111

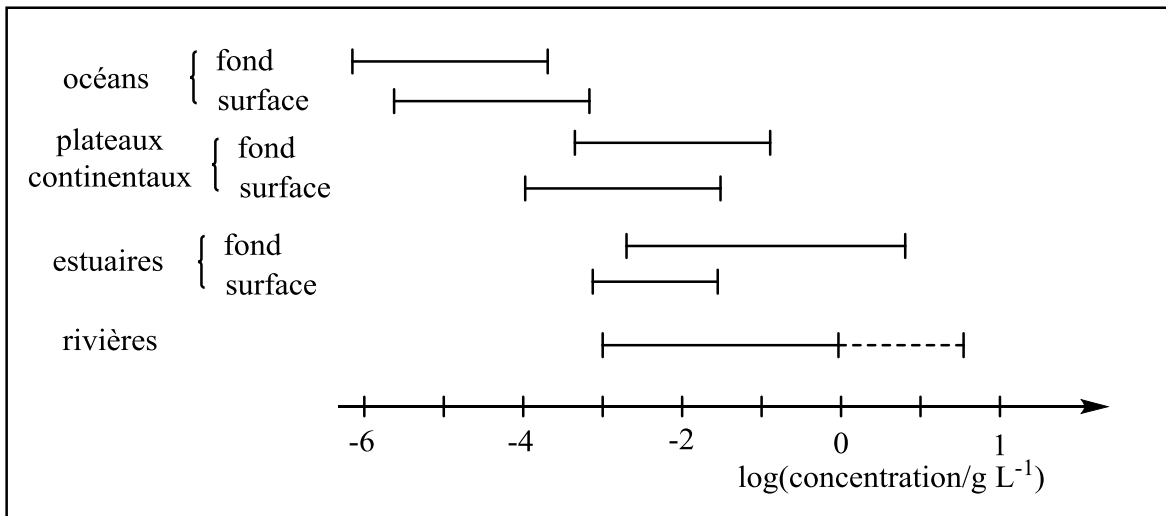
112 La figure 1 montre différents comportements qui sont possibles après l'introduction des
 113 nanoparticules d'argent dans l'environnement. Il est fort probable que plusieurs des
 114 comportements montrés dans la figure ci-dessus surviennent simultanément. En plus de
 115 l'homoagglomération (A dans la figure 1), les réactions de complexation (i.e. sa spéciation
 116 chimique, C dans la figure 1) ^{26, 27} peuvent fortement influencer la dissolution des
 117 nanoparticules (en déplaçant l'équilibre vers des espèces solubles). De plus, il y a relativement
 118 peu d'auteurs qui ont étudié l'hétéroagglomération de nanoparticules (B dans la figure 1).
 119 Bref, il reste de nombreuses questions sans réponse à propos du comportement des
 120 nanoparticules une fois relâchées dans l'environnement et leurs propriétés antimicrobiennes
 121 pourraient occasionner des problèmes pour certaines espèces aquatiques.

122

123 1.3. Hétéroagglomération

124 Plusieurs colloïdes et particules sont présents de manière naturelle dans les
 125 environnements aquatiques. Ces particules naturelles peuvent être regroupées en trois groupes

126 distincts. Le premier groupe correspond aux colloïdes inorganiques compactes qui proviennent
 127 généralement de l'érosion des sols et sont constitués des argiles ou des oxydes métalliques. Le
 128 deuxième groupe correspond aux biopolymères, souvent des macromolécules larges et rigides,
 129 tandis que le troisième groupe correspond à la matière organique dissoute telles que les
 130 substances humiques et leurs dérivés ²⁸. Il devient alors très pertinent de vérifier les
 131 interactions possibles des nanoparticules avec ces trois groupes de colloïdes qui risquent de se
 132 retrouver à des concentrations beaucoup plus élevées que celles des nanoparticules. La figure
 133 2 montre l'ordre de grandeur de la concentration des colloïdes inorganiques selon chaque type
 134 d'environnement aquatique.



135

136 **Figure 2.** Concentration de particules dans les différents types d'eau ²⁹.

137

138 Les eaux des estuaires et des rivières sont celles dont la concentration de particules en
 139 suspension est la plus élevée. La concentration montrée sur la figure correspond au groupe de
 140 colloïdes inorganiques compactes qui proviennent de l'érosion ²⁹. Leur concentration en
 141 particules dans l'eau est contrôlée par les organismes qui y vivent et aussi par la concentration
 142 en ions.

143 L'hétéroagglomération correspond à l'agglomération d'une nanoparticule avec au
 144 moins une particule d'une autre espèce. C'est seulement au cours des dernières années que les
 145 quelques études sur l'hétéroagglomération sont apparues ^{13, 30-39}. L'innovation de nouvelles

146 techniques ainsi que l'élaboration de logiciels de traitement de données plus efficaces ont
147 rendu possible l'étude de l'hétéroagglomération.

148 La plupart de ces études utilisait comme instrument la diffusion de la lumière
149 dynamique (DLS). À l'aide du DLS, la constante de vitesse d'hétéroagglomération peut être
150 comparée avec celle de l'homoagglomération. Dans les études d'hétéroagglomération,
151 l'homoagglomération sert de contrôle. L'inconvénient d'utiliser la diffusion de la lumière
152 dynamique (DLS) est que cette technique limite la concentration utilisée à des concentrations
153 supérieures à environ 1 mg L^{-1} , ce qui a pour effet que la plupart des études portant sur
154 l'hétéroagglomération de nanoparticules ont été effectués dans des conditions peu
155 représentatives d'un milieu environnemental ^{10, 27, 29-31}. Rappelons que les résultats dans les
156 eaux usées montrent plutôt une concentration de nanoparticules dans les $\mu\text{g L}^{-1}$ et moins ⁹.
157 D'autres études ont utilisé des nanoparticules de charge opposée ^{30, 32}, alors que les particules
158 organiques et inorganiques dans les systèmes aquatiques sont typiquement chargées
159 négativement ²⁸. Néanmoins, ces études ont observé une différence entre l'homoagglomération
160 et l'hétéroagglomération. Il est donc possible qu'une différence puisse aussi être observée à
161 faible concentration de nanoparticules en présence de colloïdes naturels.

162 Par exemple, une étude a récemment démontré que l'hétéroagglomération diminuait
163 l'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent ³¹. En effet, Khanh An Huynh et ses
164 collègues ³¹ ont conclu que la présence d'hétéroagglomération limitait l'accès aux nAg
165 jusqu'aux bactéries ainsi, la croissance de celles-ci n'était presque pas affectée. D'autres
166 études ont comparé le comportement d'agglomération des nanoparticules en absence et en
167 présence d'autres particules et ont conclu qu'il y avait bien une différence significative entre
168 l'homoagglomération et l'hétéroagglomération. Cependant, cette différence n'était parfois pas
169 constante. Par exemple, dans l'étude d'Afroz et ses collègues, ils ont remarqué deux types de
170 comportement en observant l'agglomération de nanosphères d'or en présence de nanotubes de
171 carbone à paroi unique modifiés avec de l'acide pluronique ¹³. Le premier se produisait à
172 faible force ionique, la présence de nanotubes de carbone influençait la distance
173 interparticulaire ce qui limitait l'agglomération des nanosphères d'or. Le deuxième
174 comportement se produisait à forte force ionique. Au niveau de la structure, les nanotubes de
175 carbone sont un bon modèle pour les polysaccharides aquatiques qui font partie du groupe de

176 colloïdes correspondant aux biopolymères larges et rigides ²⁸. Une autre étude a vérifié l'effet
177 du ratio de concentration de nanoparticules avec la concentration de nanotubes de carbone ³⁰.
178 Un effet similaire au précédent article a été observé. C'est-à-dire que les deux types de
179 comportement observés étaient encore présents. La concentration en nanoparticules est restée
180 constante pendant toute la durée de l'étude tandis qu'en augmentant la concentration en
181 nanotubes de carbone, une augmentation de l'hétéroagglomération par rapport à
182 l'homoagglomération a été observée. Ce phénomène était dû à la limitation de la diffusion des
183 nanoparticules en solution à cause de l'augmentation du nombre de sites d'interaction en
184 présence des nanotubes. D'autres études sur l'hétéroagglomération ont comparé leurs
185 observations avec la théorie DLVO ^{40, 41}. Lors de ces comparaisons, les observations étaient
186 souvent contradictoires avec ce modèle.

187 Les principales conclusions des études précédentes étaient que l'hétéroagglomération
188 avait pour effet de contrôler le transport des nanoparticules dans l'environnement. Ainsi, les
189 modèles de transport reliés aux colloïdes naturels pourraient être utiles dans la prédiction du
190 sort et transport de ces nanoparticules dans l'environnement ³⁷⁻³⁹. Étant donné que la
191 concentration des trois sous-groupes de colloïdes naturels dans l'eau est un facteur
192 déterminant, l'étude de l'hétéroagglomération devrait être un sujet prioritaire au niveau du
193 destin des nanoparticules une fois relâchées dans l'environnement. Il devient de plus en plus
194 avantageux d'effectuer ce type d'étude grâce à l'amélioration des techniques de caractérisation
195 qui permettent maintenant de séparer le signal des nanoparticules avec le reste de la matrice.
196 Cependant, les interactions entre les nanoparticules et les colloïdes naturels vont être beaucoup
197 influencées par la composition chimique des nanoparticules, y compris leur enrobage puisque
198 c'est la surface des nanoparticules qui détermine l'étendu de l'interaction des particules avec
199 d'autres surfaces, y compris les surfaces des colloïdes naturels.

200

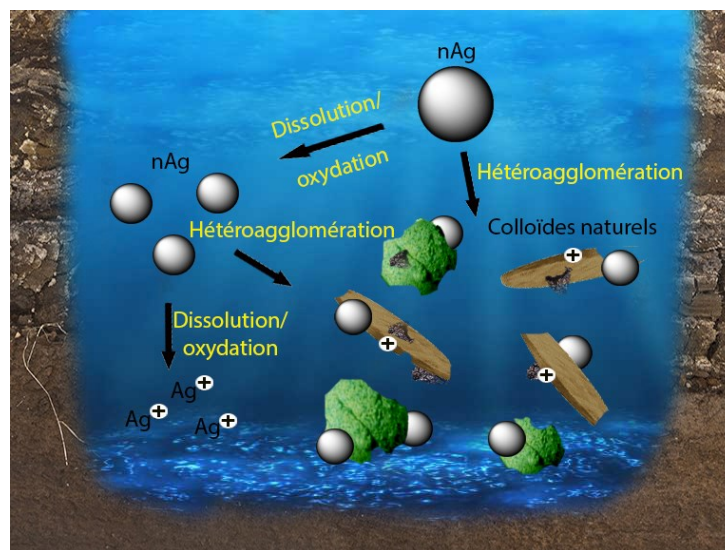
201 **1.4. Objectifs**

202 Les objectifs du projet étaient de mieux comprendre les processus
203 d'hétéroagglomération des nanoparticules d'argent dans des conditions représentatives de

204 l'environnement naturel (voir la figure 3). Les étapes majeures effectuées dans ce travail
205 consistaient à :

- 206 • Marquer de manière covalente les nanoparticules à une molécule fluorescente afin de
207 permettre leur détection dans des conditions relativement complexes et à faible
208 concentration en nanoparticules.
- 209 • S'assurer que ce marquage covalent n'a pas affecté les propriétés d'origine des
210 nanoparticules, soit principalement la taille et la charge à la surface de celles-ci.
- 211 • Déterminer une concentration de ces nanoparticules marquées pour laquelle la détection
212 dans un milieu complexe ne pose pas de problème tout en étant le plus près possible des
213 concentrations réelles de ce contaminant retrouvées dans l'environnement (de l'ordre des
214 $\mu\text{g L}^{-1}$).
- 215 • Étudier l'homoagglomération ainsi que l'hétérocoagulation des nanoparticules d'argent en
216 présence de colloïdes naturels (SiO_2 et argiles colloïdaux) afin de mieux comprendre le
217 destin des nanoparticules dans les eaux naturelles.

218 Le projet focalise beaucoup sur l'hétéroagglomération des nanoparticules d'argent
219 avec des colloïdes naturels puisque ceux-ci représentent une majeure partie des particules
220 présentes dans l'environnement.



221

222

Figure 3. Schéma de l'hétéroagglomération des nAg en milieu aquatique.

223

224 **Chapitre 2 : Théorie**

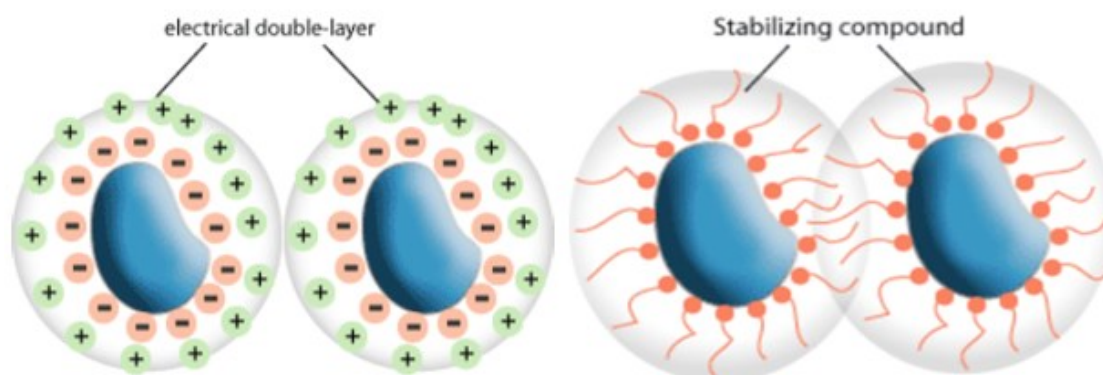
225

226 **2.1. Stabilisation des nanoparticules d'Ag**

227 Le mouvement brownien résulte de l'énergie thermique des particules et est manifesté
228 par une série de mouvements irréguliers engendrée par la collision des molécules de solvant
229 avec la nanoparticule. Dans ce cas, le phénomène de diffusion correspond au résultat de la
230 somme des mouvements irréguliers. De manière générale, les nanoparticules sont tellement
231 petites que leur mouvement brownien est suffisant pour les garder en suspension, i.e. leur
232 mouvement brownien est plus important que les forces de sédimentation ¹². Cependant, les
233 conditions du milieu peuvent avoir un impact majeur sur leur agglomération, ce qui peut
234 mener à la sédimentation. Par exemple, dans les eaux naturelles, puisque la plupart des
235 colloïdes en suspension et des nanoparticules sont chargés négativement, il devrait y avoir
236 répulsion (électrostatique) qui aura pour effet de diminuer l'agglomération ²⁸. Une particule
237 sédimente lorsque sa taille (ou celle de ses agglomérats) est trop élevée pour que le
238 mouvement brownien puisse la garder en suspension.

239 Il existe plusieurs façons de stabiliser les nanoparticules. Par exemple, dans cette étude,
240 le citrate et l'acide polyacrylique étaient utilisés pour modifier la surface du nAg. La figure 4
241 montre les deux types de stabilisation qui pourrait résulter de l'ajout de ces deux molécules.
242 La figure de gauche montre deux nanoparticules de charge négative ainsi que leur double
243 couche électrique (charge de surface négative et charge accumulée dans la couche de Debye).
244 Souvent, la répulsion électrostatique sera suffisante pour stabiliser le système colloïdal,
245 cependant, dans plusieurs eaux, la charge négative à la surface des nanoparticules peut être
246 écrantée par la présence de cations. Il va de soi que plus la concentration en cations (i.e. force
247 ionique) est élevée, plus la charge globale est écrantée, ce qui minimise la répulsion
248 électrostatique et pourrait faciliter l'agglomération. Dans le cadre de nos expériences,
249 certaines nanoparticules ont été stabilisées par l'adsorption de citrate qui augmente la charge
250 négative des particules. La partie droite de la figure montre des nanoparticules stabilisées à

251 l'aide de longues chaînes de polymères. Celles-ci réduisent la possibilité d'agglomération en
252 augmentant l'énergie requise au rapprochement des nanoparticules (stabilisation stérique) tout
253 en augmentant la répulsion électrostatique lorsque ces chaînes sont chargées.



254

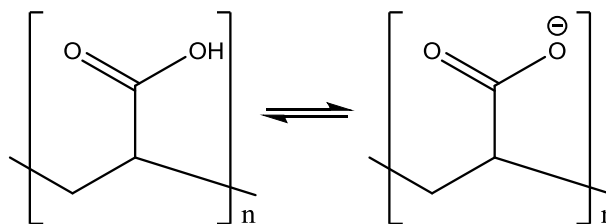
255

Figure 4. Stabilisation des nanoparticules.

256

257 La modification des nanoparticules utilisées dans cette étude a un effet majeur sur leur
258 stabilité. Par ailleurs, certains enrobages servent non seulement à prévenir l'agglomération,
259 mais aussi à limiter la dissolution et la toxicité des nanoparticules²⁰. La charge à la surface de
260 la nanoparticule et la protonation de ces molécules varient selon le pH. Pour l'acide
261 polyacrylique, le pK_a est de 4,3⁴² ce qui implique que lorsque le pH est à 4,3, la moitié des
262 groupements carboxyles sont chargés négativement (figure 5). L'acide polyacrylique des
263 nanoparticules d'argent forme une capsule de polymère hautement négative où l'argent est
264 emprisonné au centre de cette capsule. Puisqu'il est assez rare que le pH descende sous 4,3
265 dans l'environnement, il est très probable que ces nanoparticules soient chargées
266 majoritairement négatives dans la plupart des conditions environnementales d'intérêt.

267

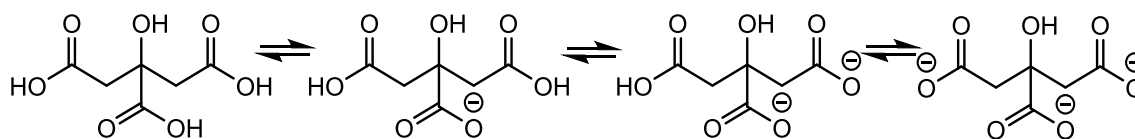


268

Figure 5. Équilibre chimique de l'acide polyacrylique.

269

270 Il est aussi possible de stabiliser les nanoparticules avec le citrate (figure 6) qui possède
 271 trois valeurs de pK_a : 3,14; 4,76 et 6,40⁴³. Le citrate est un enrobage labile, c'est-à-dire qu'il
 272 n'est pas lié de manière covalente au noyau d'argent, il est adsorbé à la surface des nAg. De
 273 cette manière, il peut être considéré comme un agent stabilisant plutôt qu'un enrobage à cause
 274 des cycles d'adsorption-désorption. À cause de ces cycles, lorsque les nAg-cit sont diluées à
 275 de très faibles concentrations ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$), il est plus probable que le citrate se dissocie
 276 majoritairement de la surface des nanoparticules.



278 **Figure 6.** Équilibre chimique du citrate.

279

280 Non seulement le pH du milieu influence la charge globale des nanoparticules, mais il
 281 peut aussi avoir un impact direct sur leur agglomération. Le pH affecte de manière différente
 282 le comportement des nanoparticules en solution. Pour les oxydes, la protonation de la surface
 283 peut neutraliser ou même inverser la charge de surface. Pour des surfaces qui peuvent être
 284 protonées, la réduction de charge qui en résulte aura aussi pour effet d'augmenter les
 285 interactions interparticulaires, augmentant ainsi l'agglomération. Plusieurs études ont
 286 démontré que l'agglomération des nanoparticules d'argent augmentait lorsque le pH devenait
 287 plus acide¹⁵. Ceci dit, ces études sont souvent difficiles à interpréter puisque la dissolution des
 288 nAg augmente aussi en pH acide. En effet, il est connu que la dissolution de la plupart des
 289 métaux augmente lorsque que la valeur du pH diminue. Comme pour la force ionique, les ions
 290 H^+ pourraient aussi écranter la charge à la surface des nanoparticules, ce qui limite la répulsion
 291 électrostatique et augmente l'agglomération. Typiquement, l'effet du pH sur la dissolution des
 292 nanoparticules est plus important que l'effet sur leur agglomération.

293 Dans les eaux naturelles douces, on retrouve une variété de cations dont le sodium, le
 294 potassium, le magnésium et le calcium (voir tableau 3). À même concentration, les cations
 295 divalents seront plus efficaces pour écranter la charge à la surface des nanoparticules. Dans
 296 l'environnement, le calcium est le cation majoritairement responsable de l'écrantage de la

297 charge globale des colloïdes naturels à cause de sa divalence et de sa concentration en eaux
298 douces ²⁹. Par souci de reproduire des conditions environnementales, le calcium a été choisi
299 comme cation pour effectuer les expériences d'agglomération des nanoparticules d'argent.

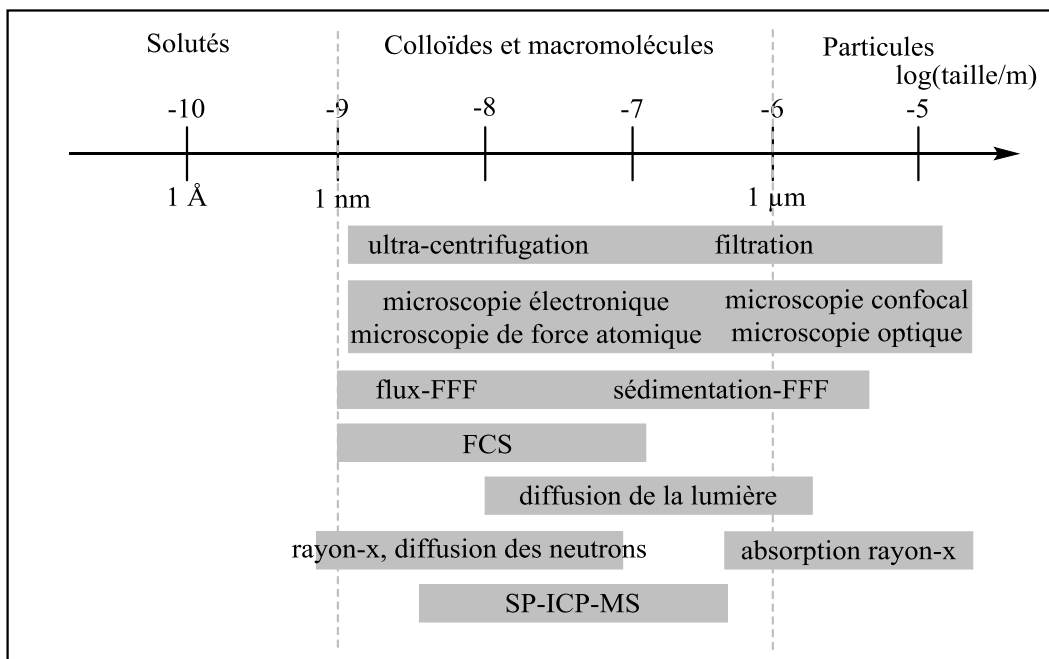
300 Souvent, lorsque des nanoparticules sont en présence de matière organique naturelle,
301 celle-ci prévient généralement l'agglomération des nanoparticules en augmentant la distance
302 interparticulaire ou la répulsion électrostatique ce qui va limiter les collisions entre
303 nanoparticules. L'augmentation de la stabilité des nanoparticules en solution résulte en une
304 augmentation de leur mobilité dans les milieux aquatiques ^{17, 18}.

305

306 **2.2. Méthodes de caractérisation des nanoparticules**

307 **2.2.1. Introduction**

308 L'innovation de techniques permettant l'étude des nanoparticules est un sujet
309 d'actualité. Certaines techniques comme la diffusion de la lumière dynamique ou la
310 microscopie électronique en transmission ont fait leur preuve dans ce domaine. Cependant, ces
311 techniques nécessitent souvent de trop grandes concentrations ou modifient les propriétés de
312 l'échantillon, ce qui limite leur importance pour les études appliquées en milieu
313 environnemental. Il est toujours préférable de combiner l'utilisation de plusieurs techniques
314 lors des analyses afin d'obtenir une meilleure compréhension des phénomènes observés ⁴⁴. La
315 plupart des méthodes, pour un même échantillon, peuvent fournir des informations
316 complémentaires puisqu'elles se basent sur des propriétés différentes lors de l'analyse.
317 Différentes techniques d'analyse sont présentées à la figure 7 selon le domaine de tailles
318 appropriées pour les différentes nanoparticules. Non seulement les techniques d'analyse de
319 nanoparticules ont des limites de concentration à respecter pour assurer une bonne mesure,
320 mais il faut aussi s'assurer que la taille des nanoparticules soit dans un domaine raisonnable
321 vis-à-vis de la méthode analytique.



322

323

Figure 7. Techniques d'analyse avec leur domaine de taille respectif²⁹.

324

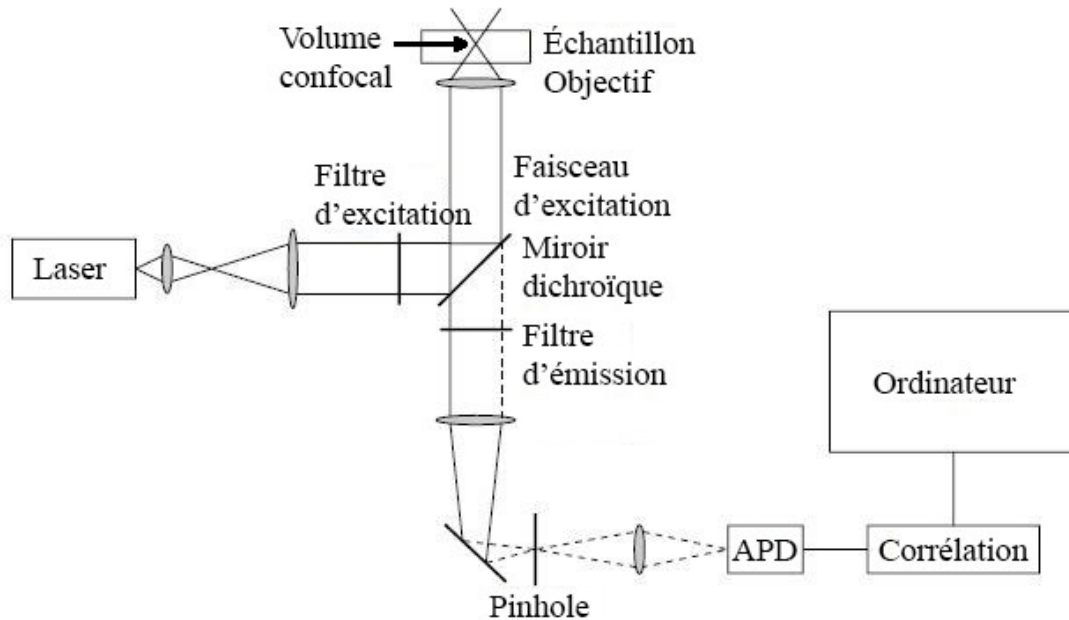
325 Dans ce travail, les méthodes qui ont été utilisées pour la caractérisation des
 326 nanoparticules d'argent possédaient un atout majeur, celui-ci était qu'elles permettent de
 327 séparer le signal de la nanoparticule du reste de la matrice et ainsi, faciliter la caractérisation
 328 des nanomatériaux. Les trois principales méthodes de caractérisation utilisées dans ce travail
 329 étaient la spectroscopie de corrélation par fluorescence qui mesure la taille à l'aide du
 330 coefficient de diffusion; l'ultracentrifugation analytique qui sert à obtenir la taille des
 331 nanoparticules en fonction de leur coefficient de sédimentation; et la microscopie en champ
 332 sombre avec imagerie hyperspectrale qui permet de vérifier les interactions entre les
 333 particules.

334

335 2.2.2. Spectroscopie de corrélation par fluorescence (FCS)

336 La spectroscopie de corrélation par fluorescence se base sur l'analyse des fluctuations
 337 d'intensité de fluorescence. Elle permet l'analyse de molécules uniques à travers un petit
 338 volume défini par un microscope confocal (volume confocal)^{11, 45}. Les sources d'excitation
 339 laser passent à travers plusieurs lentilles et filtres avant d'atteindre l'objectif où ils sont

340 focalisés pour former le volume confocal au niveau de l'échantillon. C'est à cet endroit que les
341 mesures de FCS auront lieu (voir la figure 8).



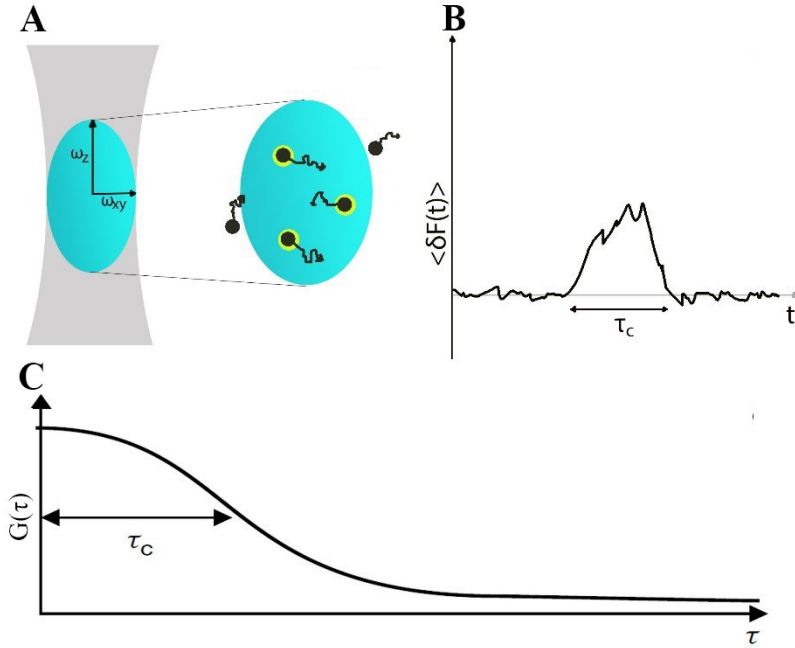
342

343

Figure 8. Schéma de fonctionnement du microscope confocal ¹¹.

344

345 Lorsque le composé à analyser (fluorescent) passe à travers le volume confocal, il est
346 excité avec un des lasers du microscope (figure 9A). Ensuite, l'émission fluorescente de la
347 molécule ou de la nanoparticule sera détectée après avoir repassé par le miroir dichroïque pour
348 atteindre le photomultiplicateur (ADP). L'émission fluorescente est suivie en fonction du
349 temps et les temps de diffusion sont obtenus à partir de l'autocorrélation dans les fluctuations
350 de fluorescence. Comme la technique est utilisée avec de petits nombres de particules, lorsque
351 la fluorescence dépasse la moyenne pour un temps donné, ceci indique qu'une particule est
352 passée à travers le volume confocal. Cette information est montrée à la figure 9B. La courbe
353 d'autocorrélation est par la suite construite à partir de ces informations.



354

355 **Figure 9.** (A) Émission de photons par des nanoparticules marquées à l'intérieur du volume
 356 confocal; (B) Fluctuation d'intensité de fluorescence par rapport à la moyenne; (C) Courbe
 357 d'autocorrélation obtenue à partir des fluctuations d'intensité ¹¹.

358

359 La fonction d'autocorrélation, $G(\tau)$, se traduit par l'équation suivante :

360
$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \times \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

361 Où $F(t)$ représente le signal de fluorescence au temps t , $\langle F(t) \rangle$ représente la valeur
 362 moyenne d'intensité de fluorescence tandis que $\delta F(t)$ correspond à la fluctuation de
 363 fluorescence au temps t et est décrit comme :

364
$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (2)$$

365 La fonction d'autocorrélation montrée à la figure 9C est obtenue en combinant les
 366 équations 1 et 2. À partir de cette fonction, il est possible de déterminer le coefficient de
 367 diffusion des nanoparticules avec l'aide d'un modèle Gaussian 3D :

368
$$G(\tau) = \left(\frac{1}{\pi \sqrt{\pi} \omega_0^2 z_0 \langle C \rangle} \right) \frac{1}{\left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_0^2} \right) \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{z_0^2}}} \exp \left[\frac{-(V\tau)^3}{\omega_0^2 z_0 \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_0^2} \right) \sqrt{1 + \frac{4D\tau}{z_0^2}}} \right] \quad (3)$$

390 échantillon mais plutôt une taille moyenne. Le logiciel permet néanmoins l'étude en supposant
391 que deux espèces sont présentes. Ainsi, il est possible d'identifier des distributions bimodales
392 comme le montre la figure 10. Dans ce cas, les deux tailles obtenues correspondent à une
393 composante majeure et une autre mineure. Ainsi, il est possible d'observer le comportement
394 de la plus faible portion des nanoparticules qui n'apparaît pas lorsque les analyses sont
395 effectuées en tenant compte de l'espèce majoritaire seulement. Ce type d'analyse fournit des
396 informations supplémentaires sur les plus gros agrégats ou hétéroagrégats qui se produisent
397 plus rarement.

398 Globalement, la méthode FCS est très bien adaptée au niveau de l'étude
399 d'hétéroagglomération. Cependant, les nanoparticules d'intérêt doivent être préalablement
400 marquées avec un marqueur fluorescent afin de faciliter leur détection. Le marquage ne doit
401 pas trop altérer les propriétés d'origine des nanoparticules puisque l'objectif est de mieux
402 comprendre la nature de la nanoparticule non-marquée. Ainsi, si le marquage modifie ces
403 propriétés, l'étude perd de sa pertinence. Ceci dit, en mesurant la mobilité électrophorétique et
404 la distribution de taille des nanoparticules avant et après marquage, il est possible de vérifier
405 l'impact qu'a eu le marquage sur les propriétés d'origine des nanoparticules. De même,
406 lorsqu'il y a présence de matière organique naturelle dans l'échantillon, le signal fluorescent
407 des nanoparticules peut être confondu avec celui provenant de la matière organique
408 fluorescente, ce qui pourrait engendrer de fausses interprétations.

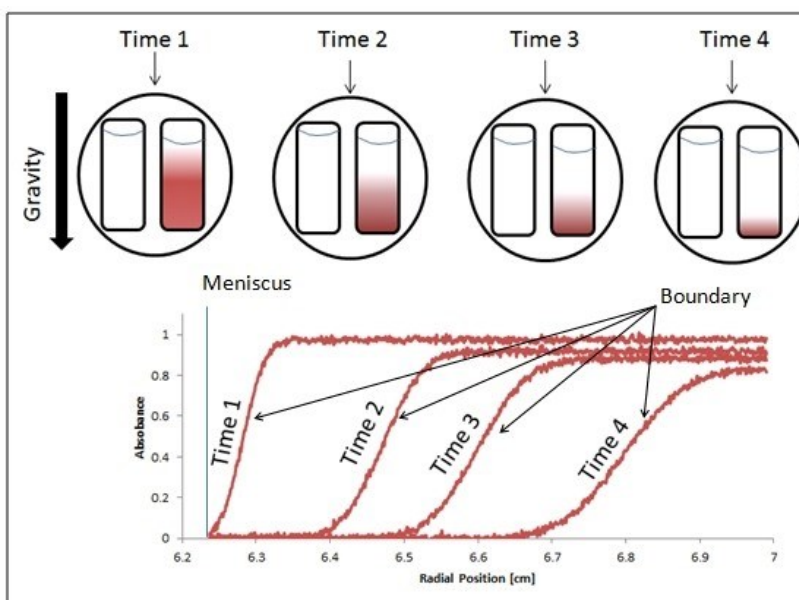
409

410 **2.2.3. Ultracentrifugation analytique (AUC)**

411 Dans l'ultracentrifugation analytique une force de centrifugation est appliquée sur les
412 particules en suspension, ce qui a pour objectif de forcer la sédimentation des nanoparticules.
413 Leur progression vers le bas de la cellule d'analyse est suivie en effectuant des mesures sur
414 une période de temps donné. Cette technique a été développée initialement à des fins
415 biomédicales. Le but était de séparer des protéines selon leur taille. Cependant, celle-ci s'avère
416 très utile dans la caractérisation de nanomatériaux⁴⁷ et surtout pour obtenir la distribution de
417 taille des nanoparticules. Pour l'utiliser, il faut cependant que leur concentration soit
418 suffisamment élevée afin qu'elles soient détectées pendant leur sédimentation. Par ailleurs, la
419 vitesse de rotation du rotor doit être optimisée selon la densité et la taille moyenne des

420 nanomatériaux étudiés. Cette technique ne nécessite pas d'étalonnage; les tailles peuvent être
421 calculées selon des considérations théoriques.

422 Expérimentalement, les mouvements de convection et les forces électrostatiques
423 doivent être négligeables et seulement la force centrifuge peut contribuer à la sédimentation
424 des particules. Chaque cellule d'échantillon est divisée en deux compartiments dont un
425 contient le solvant uniquement et l'autre contient l'échantillon. Lorsque le rotor commence sa
426 rotation à grande vitesse, il y a une réorganisation des molécules de solvant (*solvent meniscus*)
427 et la sédimentation des nanoparticules est observable une fois que le solvant est stabilisé. Le
428 compartiment contenant seulement le solvant est donc utilisé comme référence jusqu'à la
429 stabilisation du solvant ⁴⁷. Par exemple, la figure 11 montre un profil de sédimentation de
430 l'ultracentrifugation analytique. Le détecteur observe la sédimentation des particules dans
431 l'échantillon. Les plus grosses particules sédimentent avant les plus petites (figure 12). Il y a
432 une diminution de l'absorption au fil du temps due à la diminution de la concentration de
433 particules en suspension pendant l'analyse. À partir du profil, il est possible de déterminer le
434 coefficient de sédimentation pour la distribution de nanoparticules dans l'échantillon.



435

436 **Figure 11.** Profil de sédimentation de l'ultracentrifugation analytique ⁴⁸.

437

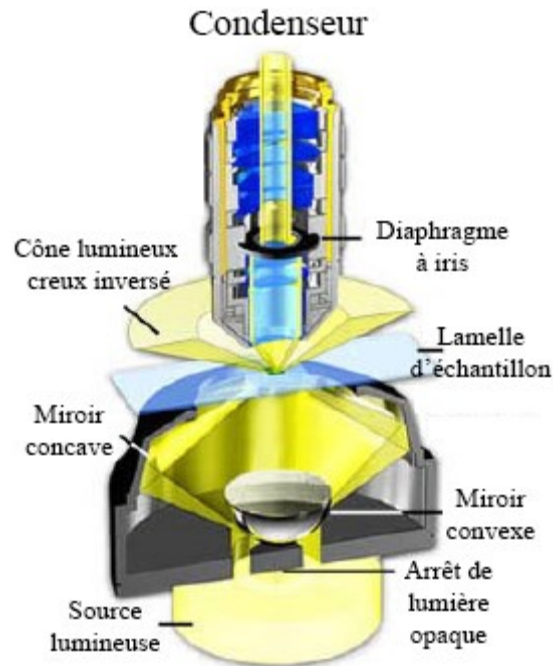
$$s = \frac{u}{\omega^2 r} \quad (5)$$

459 Il existe trois techniques de détection avec cet instrument : la détection par absorbance,
460 la détection par interférence et la détection par fluorescence. Pour les nanoparticules d'argent
461 marquées, les trois méthodes ont été utilisées afin de s'assurer que les résultats obtenus étaient
462 représentatifs. Le détecteur d'absorption peut être utilisé entre 200 et 800 nm. Le détecteur par
463 interférence Rayleigh fonctionne avec la variation de l'indice de réfraction et le détecteur de
464 fluorescence utilise un laser à 488 nm comme longueur d'onde d'excitation.

465

466 **2.2.4. Microscopie en champs sombre avec imagerie hyperspectrale** 467 **(Cytoviva)**

468 La microscopie conventionnelle (en champ clair) se fonde sur le principe que la
469 lumière passante à travers l'échantillon doit être modifiée suffisamment afin d'être capable
470 d'avoir une interférence destructive ou être absorbée, ce qui a pour effet de produire un
471 contraste. Par conséquent, si l'indice de réfraction de l'échantillon est trop semblable à celui
472 du milieu environnant ou qu'il n'absorbe pas, celui-ci ne sera pas observable⁵¹. L'objectif de
473 la microscopie en champ sombre est donc de diminuer voir retirer la luminosité du milieu
474 environnant afin d'augmenter l'apport de contraste provenant de l'échantillon. Ceci est
475 comparable à essayer d'observer les étoiles en plein jour au lieu de durant la nuit. Il est
476 beaucoup plus efficace d'observer des échantillons à faible intensité lumineuse et ayant de
477 faibles concentrations. Le principe de la méthode est de mesurer la lumière qui est diffractée,
478 reflétée, réfractée ou même provenant de source lumineuse très faible⁵². Le condenseur du
479 microscope en champ sombre est l'élément clé. La figure 13 montre cette partie de
480 l'instrument. Le miroir convexe près de la source permet de dévier la lumière transmise avec
481 un angle plus grand que ce qui est capté par l'objectif. Ainsi, seulement la lumière diffractée
482 ou diffuse par l'échantillon sera analysée tandis que le milieu environnant apparaîtra comme
483 étant noire puisqu'il ne diffuse pas de lumière. Par conséquent, le contraste et la résolution de
484 l'échantillon avec le milieu environnant sont de beaucoup augmentés.



485

486

Figure 13. Condenseur du microscope en champ sombre ⁵².

487

488 L'avantage de cette technique est qu'elle permet l'analyse de composantes non-
 489 absorbatives et avec des indices de réfraction proche du milieu sans grande perturbation de
 490 l'échantillon ⁵². En somme, cette méthode permet d'observer des échantillons possédant un
 491 faible contraste tout en ayant une bonne résolution ^{53, 54}.

492 Lorsque la microscopie en champ sombre est combinée avec l'imagerie hyperspectrale,
 493 elle devient un outil vraiment puissant en ce qui a trait à la détection et la caractérisation des
 494 nanomatériaux ⁵³. La partie imagerie hyperspectrale correspond surtout au fait que chaque
 495 pixel de l'image construite contient un spectre complet de réfraction entre 400 et 1000 nm. La
 496 forme, la taille et la composition sont des facteurs qui vont modifier l'aspect de la signature
 497 spectrale. Ainsi, puisque ce spectre est caractéristique d'un type de particules, il est possible
 498 de construire une librairie spectrale et ensuite, effectuer une cartographie de ces particules
 499 présentes dans l'échantillon. Il est aussi théoriquement possible d'observer les changements de
 500 forme, de taille et de composition à l'aide des spectres de réfraction ^{53, 55}. Par exemple,
 501 lorsqu'il y a des interactions entre les nanoparticules et les colloïdes naturels, un changement
 502 dans la signature spectrale peut être observé à cause du changement de taille et de forme, ce

503 qui a pour effet de modifier les propriétés de réfraction des particules. Néanmoins, cette
504 méthode est plutôt qualitative que quantitative, puisque par toute technique microscopique, il
505 est difficile de quantifier la concentration des nanoparticules. Sur notre appareil, un pixel sur
506 l'image représente environ 160 nm tandis que des nanoparticules ayant un diamètre beaucoup
507 plus petit que cette taille sont toutefois observables parce que la réfraction est plus grande que
508 la taille des nanoparticules. Par conséquent, plusieurs nanoparticules peuvent se trouver dans
509 le même pixel.

510

511

512 **Chapitre 3 : Optimisation des techniques**

513

514 **3.1. Marquage des nanoparticules**

515 Le marquage fluorescent des nanoparticules est essentiel pour permettre leur détection
516 par FCS. Deux types de marquages sont fréquemment utilisés : le marquage par adsorption et
517 le marquage covalent. Ces deux techniques possèdent des avantages et désavantages
518 différents. Dans les deux cas, il faut que la méthode soit la moins perturbante possible, surtout
519 vis-à-vis les propriétés de surfaces (i.e. charge) des nanomatériaux.

520

521 **3.1.1. Marquage par adsorption**

522 Le marquage par adsorption peut s'avérer très avantageux lorsque le marqueur
523 fluorescent possède une bonne affinité (i.e. valeur de K , Eq. 7) avec la surface de la
524 nanoparticule. Puisque le marqueur n'est pas lié de manière permanente à la surface, les
525 conditions douces du marquage font en sorte que les propriétés de surface telles que la charge
526 et l'enrobage ne sont presque pas affectées. Il s'agit seulement de l'équilibre entre l'état
527 adsorbé et l'état en solution ⁵⁶. Par ailleurs, il est important de tenir compte de cet équilibre
528 lors du traitement de données, car il peut s'avérer difficile de distinguer le signal de
529 fluorescence du marqueur lié et non-lié à la nanoparticule. Les concentrations utilisées doivent
530 être très faibles afin de minimiser la proportion de marqueur libre en solution et de minimiser
531 l'effet sur la surface de la nanoparticule.

532
$$K = \frac{\{D \cdot S\}}{[D] \cdot \{S\}} \quad (7)$$

533 Dans l'équation 7, la constante de marquage K est définie par le rapport entre le
534 nombre de sites marqués à la surface des nanoparticules, $\{D \cdot S\}$, en fonction de la
535 concentration de fluorophore, $[D]$, et de la concentration de site de marquage à la surface, $\{S\}$.

536 Les avantages de la méthode d'adsorption sont qu'elle nécessite très peu de
537 manipulation et de préparation de l'échantillon. Cependant, cette méthode de marquage
538 dépend beaucoup de l'interaction que peut avoir la molécule fluorescente avec les
539 nanoparticules. Pour les échantillons qui contiennent plusieurs types de macromolécules ou de
540 particules, il est très probable que la molécule fluorescente ait aussi une affinité non
541 négligeable avec les autres particules présentes. Alors, dans un mélange hétérogène, il sera
542 difficile de différencier le signal des nAg de celui provenant des autres particules.

543 Une façon qui est utilisée afin d'améliorer cette technique de marquage est d'utiliser
544 deux marqueurs fluorescents qui ont des longueurs d'onde d'excitation et d'émission
545 différentes afin de permettre la discrimination, par traitement de données, des deux espèces.
546 Ainsi, les deux fluorophores sont excités par deux sources et détectés simultanément par deux
547 détecteurs différents dans un même volume d'échantillon ⁵⁶. Cette méthode est appelée
548 corrélation. Elle est plus sensible aux interactions moléculaires et permet d'observer les
549 particules sur lesquelles les deux marqueurs sont présents ⁵⁶.

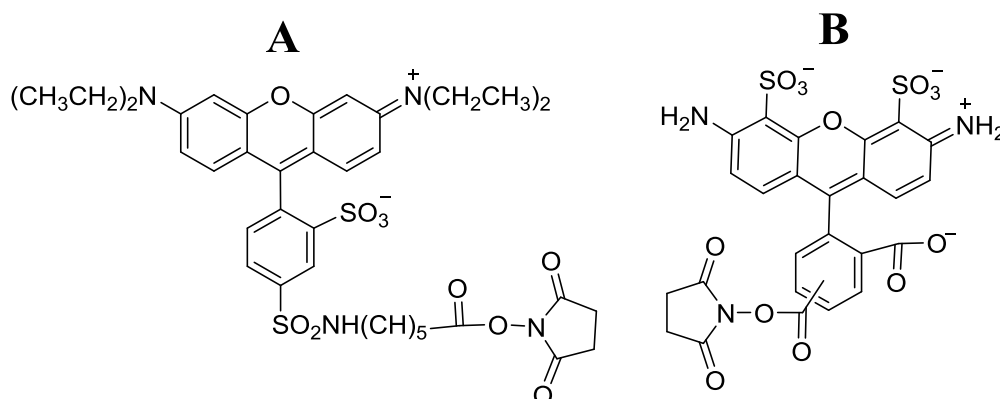
550

551 **3.1.2. Marquage covalent**

552 Dans le marquage covalent, le marqueur fluorescent est lié chimiquement par un lien
553 covalent à la surface de la nanoparticule. Ce marquage doit être effectué dans des conditions
554 de réaction douces afin de limiter les perturbations au niveau de la charge globale et de la
555 structure de l'enrobage des nanoparticules. Du fait que le marqueur fluorescent soit
556 uniquement présent sur les nanoparticules d'argent, il est possible de les introduire dans des
557 milieux plus complexes sans qu'il y ait dissociation du fluorophore.

558 Dans ce travail, le marquage covalent a été privilégié grâce aux avantages qu'il procure
559 au niveau du traitement de données mais surtout grâce à la possibilité d'étudier le
560 comportement des nAg en milieux hétérogènes ⁵⁶. Deux différents marquages covalents ont
561 été utilisés puisque les nanoparticules étudiées possédaient des compositions de surface
562 différentes. Pour les nanoparticules d'argent avec enrobage de citrate, le marqueur a été fixé
563 directement sur le noyau d'argent en fonctionnalisant d'abord les nanoparticules avec une
564 faible quantité de cystéamine. Ensuite, la rhodamine redTM-X (figure 14A) a été ajouté au

565 mélange et le groupe carboxyle du réactif fluorescent réagit avec l'amine des nanoparticules
566 fonctionnalisées. Pour les nanoparticules d'argent avec enrobage d'acide polyacrylique, le
567 groupe amide du réactif fluorescent (figure 14B) réagit avec le groupe carboxyle de
568 l'enrobage. L'objectif est qu'une faible proportion de la surface des nanoparticules ait été
569 marquée, ainsi la majeure partie de la surface reste intact après cette étape. Enfin, l'excès de
570 réactif des deux méthodes de marquage a été retiré à l'aide de plusieurs nettoyages. Les
571 protocoles marquages covalents seront abordés plus en détail dans le chapitre 5.



572

573 **Figure 14.** Structure des réactifs fluorescents (A) rhodamine red™-X (Life Technologies
574 Inc.); (B) Alexa Fluor® 488 (Life Technologies Inc.).

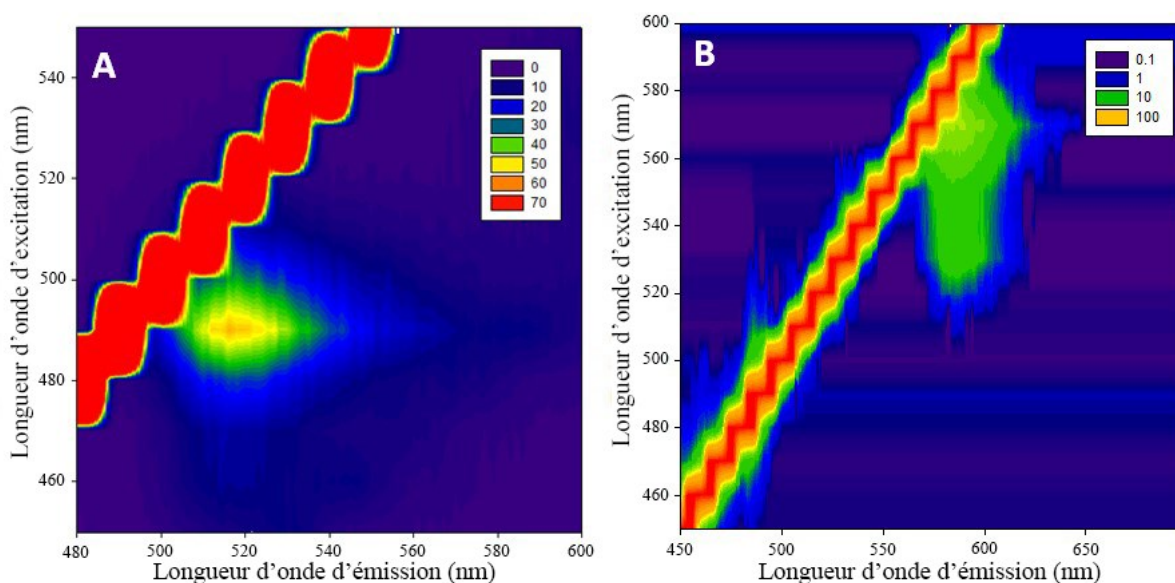
575

576 3.2. Méthode de spectroscopie de corrélation par fluorescence

577 Tous les échantillons étaient préparés 24 heures avant leur analyse afin de laisser le
578 temps aux nanoparticules de s'ajuster aux nouvelles conditions imposées. Les paramètres
579 d'acquisition étaient les mêmes peu importe les nanoparticules. L'instrument utilisé pour
580 effectuer les mesures FCS était un microscope confocal de type Leica TSC SP5. Le logiciel
581 servant aux analyses FCS était ISS Vista Fluorescence Correlation Spectrometer. La fréquence
582 d'acquisition de données suggérée par le manuel du logiciel était de 100 kHz avec un temps
583 d'acquisition de 50 secondes. Ce temps d'acquisition a effectivement été utilisé pour
584 l'étalonnage, mais il a été augmenté à 100 secondes pour les échantillons afin d'analyser un
585 plus grand nombre de particules. De plus, 10 acquisitions ont été prises pour chaque réplica et
586 trois réplicas ont été préparés pour chacune des concentrations étudiées. L'étalonnage sert à

587 déterminer les dimensions du volume confocal ⁵⁷. Il a été effectué à partir de concentrations
588 connues de rhodamine 123 puisque son coefficient de diffusion est bien documenté dans la
589 littérature ($D= 4,4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) ⁵⁷. L'étalonnage était répété après chaque série de six
590 échantillons afin de minimiser les fluctuations du volume confocal avec le temps.

591 Plusieurs molécules fluorescentes ont été utilisées lors du marquage covalent des
592 nanoparticules, le choix des lasers et leur intensité ont été optimisés de façon à maximiser le
593 rapport de signal sur bruit. Les nAg-cit étaient marquées avec de la rhodamine redTM-X (Life
594 Technologies Inc.) tandis que les nAg-PAA ont été marqué avec Alexa Fluor® 488 (Life
595 Technologies Inc.). La figure 14 montre des mesures de fluorescence en deux dimensions qui
596 ont été effectuées à partir des solutions contenant les nanoparticules d'argent préalablement
597 marquées.

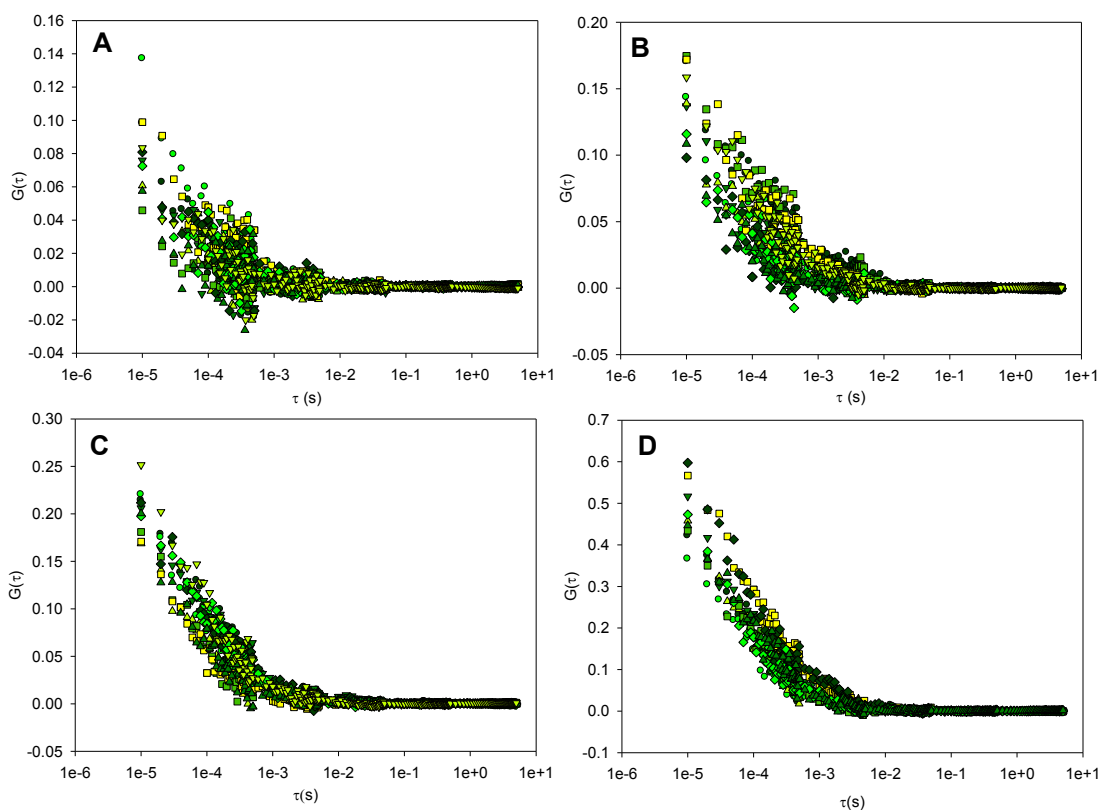


598
599 **Figure 15.** Spectre de fluorescence 2D pour (A) 10 mg L⁻¹ de nAg-PAA marquées avec Alexa
600 Fluor® 488 dans l'eau Milli-Q; (B) 1 mg L⁻¹ de nAg-cit marquées avec rhodamine redTM-X
601 dans l'eau Milli-Q.

602
603 En ce qui concerne les nAg-PAA (figure 15A), on constate que le laser de 488 nm est
604 un bon choix pour obtenir la fluorescence des nanoparticules avec l'émission correspondant au
605 canal 1 du détecteur (500 à 530 nm). Pour ce qui est des nAg-cit (figure 15B), le laser qui

606 convenait le mieux à leur excitation était celui de 561 nm avec une émission dans le canal 2 du
607 détecteur (607 à 683 nm). La puissance des lasers a ensuite été optimisée afin de rendre
608 possible la détection des nanoparticules sans toutefois être trop élevée et ainsi augmenter le
609 signal moyen de fluorescence (bruit de fond). Une augmentation du signal moyen aurait pour
610 effet de limiter la détection des plus petites particules. La puissance a été ajustée à 10% (de 20
611 mW) pour les nAg-cit puisqu'elles donnaient un fort signal de fluorescence, tandis que pour
612 les nAg-PAA, le laser utilisé a été ajusté à 50% (65 mW).

613 La concentration de nanoparticules a aussi un important effet sur la limite de détection
614 de cette méthode. La concentration en nanoparticules est déterminée par la concentration en
615 argent total obtenue à l'aide d'une digestion complète suivis d'une analyse par absorption
616 atomique. La digestion implique la transformation de l'argent zérovalent en argent ionique.
617 Les fonctions d'autocorrélation sont données pour les nAg-PAA marquées à différentes
618 concentrations en présence de 100 mg L⁻¹ de SiO₂ colloïdales (figure 16). Sur la figure 16A,B,
619 on constate que le bruit est assez important, mais il est toujours possible de déterminer la taille
620 moyenne des nAg-PAA pour des ajouts de 10 µg L⁻¹ et 25 µg L⁻¹. Cependant en augmentant la
621 concentration de nAg-PAA à 50 µg L⁻¹, le bruit diminue grandement et ainsi facilite de
622 beaucoup le traitement de données et la fiabilité des résultats. Par la suite, tous les autres
623 échantillons d'homoagglomération et d'hétéroagglomération ont été préparés en utilisant 50
624 µg L⁻¹ d'argent.

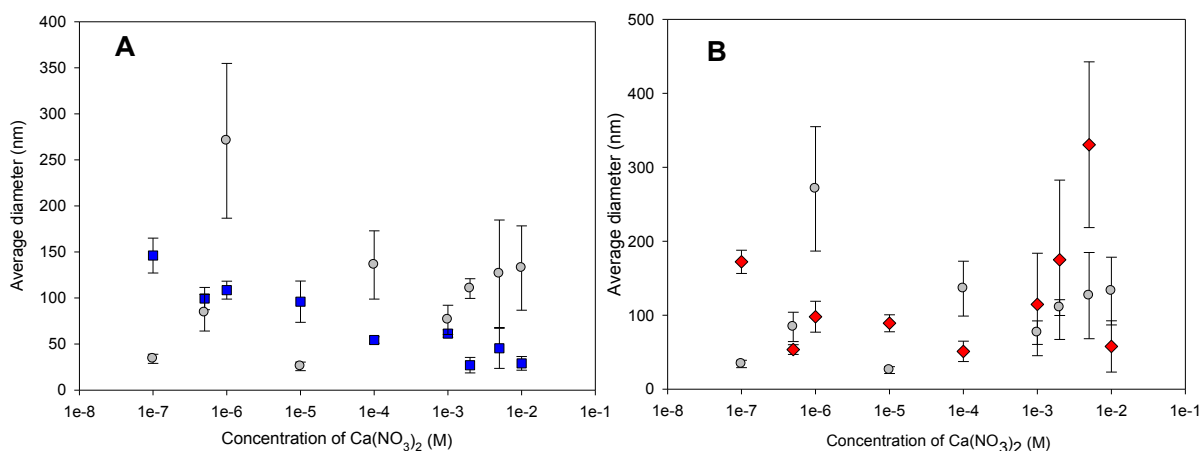


625

626 **Figure 16.** Fonction d'autocorrélation des nAg-PAA marquée en présence de 100 mg L⁻¹ de
 627 SiO₂ colloïdales (A) à 10 μg L⁻¹ Ag de nAg-PAA; (B) à 25 μg L⁻¹ Ag de nAg-PAA; (C) à 50
 628 μg L⁻¹ Ag de nAg-PAA; (D) à 100 μg L⁻¹ Ag de nAg-PAA.

629

630 Justement, dans la figure 17, on voit un exemple où trop de fluorophores libres étaient
 631 présents en solution. La présence de molécules fluorescentes libres a pour effet d'augmenter la
 632 variabilité des tailles mesurées puisqu'il est difficile de faire la distinction entre le coefficient
 633 de diffusion du fluorophore libre de celui accroché aux nanoparticules. Ainsi, il était
 634 impossible d'observer une tendance dans les résultats puisqu'il avait une combinaison de
 635 fluorophores libres, fluorophores sur les nanoparticules et fluorophores sur les colloïdes. Une
 636 meilleure purification après marquage est absolument nécessaire afin d'utiliser ces particules
 637 pour des études d'hétéroagglomération.



638
639

640 **Figure 17.** Agglomération et hétéroagglomération de nAg-cit en absence (cercles gris) ou en
641 présence de 100 mg L⁻¹ de SiO₂ colloïdales (figure 17A, carrés bleus) ou particules d'argile
642 (figure 17B, losanges rouges) à pH 7,0. Les mesures ont été obtenues par FCS sur une grande
643 gamme de concentration de calcium.

644

645 3.3. Méthode d'ultracentrifugation analytique

646 Cette méthode a été utilisée afin de vérifier la taille des nanoparticules avant et après le
647 marquage covalent. L'instrument utilisé lors des mesures d'ultracentrifugation analytique est
648 le Beckman Coulter ProteomeLab XL-1. Trois méthodes de détection ont été utilisées. La
649 méthode par interférence ne nécessite pas d'analyses préliminaires tandis que pour la détection
650 par absorbance et par fluorescence, des spectres d'absorption et d'émission ont été effectués
651 préalablement sur les nanoparticules d'argent dans le but de confirmer les longueurs d'onde
652 d'absorption, d'excitation et d'émission. Le programme utilisé pour faire le traitement de
653 données est Sedfit version 14.1. Les échantillons ont été préparés dans l'eau Milli-Q avec une
654 concentration connue en nanoparticule variant de 1 à 5 mg L⁻¹ Ag. Le compartiment A de la
655 cellule contenait le solvant soit de l'eau Milli-Q tandis que le compartiment B contenait
656 l'échantillon. Les cellules ont par la suite été pesées afin de bien balancer le contreponds. La
657 cellule Beckman a été utilisée comme étalon pour les analyses par interférence et par
658 absorbance tandis que pour les analyses de fluorescence une cellule standard de fluorescence a

659 aussi été utilisée. La densité des nAg-PAA a pu être estimée à $4,0 \text{ g cm}^{-3}$ puisque le fabricant
660 indique que la composition des nanoparticules contient 31% d'argent et le reste est de l'acide
661 polyacrylique tandis que la densité des nAg-cit peut être estimée à celle correspondant à
662 l'argent pure soit de $10,5 \text{ g cm}^{-3}$ puisque l'argent compose en majeure partie le volume et la
663 masse de la nanoparticule. La vitesse de rotation utilisée était de 10 000 RPM ($8064 \times g$) afin
664 de faire sédimenter les plus petites nanoparticules.

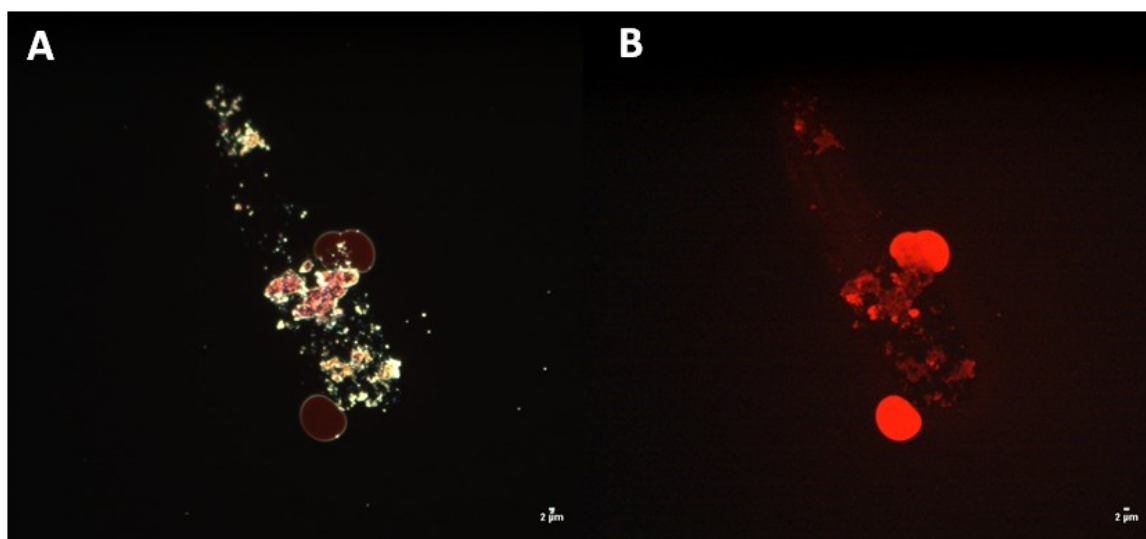
665

666 **3.4. Méthode de microscopie en champ sombre couplée à** 667 **l'imagerie hyperspectrale**

668 La microscopie en champ sombre couplée à l'imagerie hyperspectrale (CytoViva®) a
669 été utilisée comme méthode additionnelle à la caractérisation de l'hétéroagglomération des
670 nanoparticules d'argent avec les colloïdes naturels. Une librairie spectrale caractéristique aux
671 nAg dans les mêmes conditions que les échantillons (concentration, pH et force ionique) a été
672 construite. Tous les échantillons ont été préparés 24 heures avant leur analyse. Les conditions
673 étudiées étaient à des concentrations de calcium de 1 mM ou 50 mM et les solutions étaient
674 toutes ajustées à pH 7,0. Les concentrations de colloïdes naturels utilisées étaient les mêmes
675 que pour les analyses au FCS soit de 100 mg L^{-1} de SiO_2 colloïdales ou d'argile. Cependant, la
676 concentration de nanoparticules d'argent a dû être augmentée à 1 mg L^{-1} à cause des
677 limitations de la détection de la méthode. Seules les nAg-cit non-marquées ont pu être étudiées
678 à l'aide de cette méthode puisque les nAg-PAA étaient trop petites pour être détectées par la
679 méthode. Un objectif avec un grossissement de 100 X a été utilisé lors de ces mesures. Ainsi,
680 les changements observés au niveau de la signature spectrale peuvent être attribués à la
681 présence d'hétéroagglomération.

682 La figure 18 a été obtenue à partir des nanoparticules d'argent marquées ayant une
683 importante concentration de fluorophore libre (même source de nAg que pour la figure 17).
684 Lorsque le signal de fond de la figure 18A est comparé avec celui de la figure 18B, on observe
685 que la figure de droite est teintée de rouge tandis que la figure de gauche a un aspect normal
686 (fond noir). L'utilisation de filtres de longueurs d'onde d'excitation et d'émission a permis

687 d'observer la fluorescence des marqueurs libres. En somme, ces images confirment les
688 observations obtenues par FCS ci-dessus.



689

690 **Figure 18.** (A) Analyses HSI à 40 X des nAg-cit marquées avec la rhodamine red-X à 15 mg
691 L⁻¹; (B) avec filtres de fluorescence Texas red (longueur d'onde d'excitation : 572 ± 23 nm;
692 longueur d'onde d'émission de 600 à 650 nm).

693

694 **Chapitre 4: Article - Heteroagglomeration of nanosilver**
695 **with SiO₂ and clay**

696

697 Sébastien Maillette¹, Caroline Peyrot¹, Tapas K. Purkait², Muhammad

698 Iqbal², Jonathan G.C. Veinot² and Kevin J. Wilkinson^{1,*}

699

700 ¹Biophysical Environmental Chemistry Group, Department of Chemistry, University of

701 Montreal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montreal H3C 3J7, Canada

702 ²Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2G2

703

704 *Corresponding author: Phone: +1-514 343 6741; fax: +1-514 343 7586;

705

706 KEYWORDS: agglomeration, heteroagglomeration, silver nanoparticle, fluorescence

707 correlation spectroscopy, darkfield microscopy, hyperspectral imaging

708

709 Submitted to: *Environmental Science & Technology*

710 **4.1. Abstract**

711 Nanomaterials are a class of contaminant that are increasingly found in the natural
712 environment. Like other contaminants, their environmental risk will depend on their
713 persistence, mobility, toxicity and bioaccumulation. Each of these parameters is related to
714 their fate (especially dissolution, agglomeration). The goal of this paper was to understand the
715 heteroagglomeration of silver nanoparticles in natural waters. Silver nanoparticles (nAg;
716 polyacrylic acid and citrate stabilized) were covalently labelled with a fluorescent dye and
717 then mixed with colloidal silicon oxides (SiO₂) and clays. Homo- and heteroagglomeration of
718 the nAg were initially studied in controlled synthetic waters that were representative of natural
719 freshwaters (low concentrations of nAg; pH 7.0; ionic strength 10⁻⁷ to 10⁻¹ M Ca) by following
720 the sizes of the nAg by fluorescence correlation spectroscopy (FCS). The polyacrylic acid
721 coated nanosilver was extremely stable under all conditions, including in the presence of other
722 colloids and at high ionic strengths. On the other hand, the citrate coated nanosilver formed
723 heteroaggregates in presence of both colloidal SiO₂ and clay particles. FCS and enhanced
724 darkfield microscopy were then used to demonstrate heteroagglomeration of the citrate coated
725 nAg in a natural (river) water.

726

727

728 **4.2. Introduction**

729 The use of nanomaterials in consumer products is constantly increasing, leading to an
730 increased environmental risk that is strongly related to their fate (dissolution, agglomeration,
731 etc.). A number of studies have evaluated the homoagglomeration of nanosilver (nAg) in
732 natural waters^{1, 14-20}, providing valuable information on the important factors affecting
733 nanoparticle stability. Generally speaking, increased ionic strength and/or water hardness will
734 increase agglomeration^{14, 16, 17, 19}, organic matter content has been observed to both increase
735 and decrease agglomeration^{17, 18, 28} and the nature of the particle coating plays a critical role in
736 particle stability^{14, 16, 19, 20}. Nevertheless, due to analytical constraints, most studies have been
737 performed at relatively high particle concentrations, especially when compared to the sub ppb
738 levels that are expected in natural waters^{4, 9}. In addition, natural waters contain a large variety
739 of colloidal particles²⁸ at concentrations that are usually orders of magnitude higher than the
740 nanoparticles, i.e. from ca. 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (marine environments) to 10 g L^{-1} (rivers)²⁹. Since both
741 agglomeration and dissolution depend upon particle concentration⁵⁸, it is critical to
742 understand particle fate for the low concentrations and low nanoparticle: colloid ratios that are
743 likely to be found in natural waters. Based upon the above, nanoparticles are more likely to
744 interact with natural colloids or organic matter (i.e. heteroagglomeration) than with other
745 similar nanoparticles (i.e. homoagglomeration)^{25, 35, 37, 39, 59}. Indeed, it was suggested recently
746 that the heteroagglomeration of nAg was responsible for a decrease in its microbial activity³¹.
747 Therefore, the goal of this study was to evaluate the importance of heteroagglomeration in
748 natural systems by focusing on low nanoparticle to colloid ratios (1:200) and nanoparticle
749 concentrations that are likely to be typical of natural waters.

750 Most of the available literature on heteroagglomeration has employed dynamic light
751 scattering (DLS) and/or transmission electron microscopy (TEM)^{30, 31, 35, 60}, often using fairly
752 high concentrations of nanoparticles (which will increase particle-particle contacts) and high
753 nanoparticle: colloid ratios. Emerging techniques such as fluorescence correlation
754 spectroscopy (FCS)^{56, 61} or enhanced darkfield microscopy with hyperspectral analysis (HSI)
755⁵³ offer the possibility of discriminating the nanoparticles with a high sensitivity, even within
756 relatively complex environmental matrices. In FCS, fluorescence intensity fluctuations are
757 used to measure the diffusion of labelled molecules or particles through an optically defined

758 confocal volume (10^{-15} L) ⁵⁶. Diffusion coefficients are determined by fitting an
759 experimentally determined autocorrelation function with a 3D Gaussian model ^{46, 56, 61} and
760 hydrodynamic diameters are calculated from the diffusion coefficients using the Stokes-
761 Einstein equation ^{12, 46, 61, 62}. Enhanced darkfield microscopy with hyperspectral analysis (HSI)
762 is a non-invasive technique that measures the light scattered by particles, including
763 nanoparticles ^{53, 55, 63}. The measured spectral signature of the scattered light (determined on a
764 pixel by pixel basis) can then be used to determine the nature, size and the shape of particles.
765 Spectral signatures can also be used to build a database that can be used to identify
766 nanoparticles in a given sample.

767 **4.3. Materials and methods**

768 **Particles.** Two different types of silver nanoparticles were studied. Ultra-small (< 10
769 nm) polyacrylic acid coated nanosilver (nAg-PAA) was purchased from Sciventions whereas a
770 citrate coated nanosilver (nAg-cit) was purchased from Nanocomposix or produced in-house.
771 The nAg were covalently labelled with a fluorescent dye to allow their detection at low
772 concentrations using FCS (labelling protocols and particle characterization after labelling are
773 providing in the Supporting Information). The nAg-PAA was labelled on the carboxylic acid
774 functional groups with Alexa Fluor 488® while the nAg-cit was labelled on the particle
775 surface using rhodamine red. Quantification of the stock solutions of labelled silver
776 nanoparticles was performed using flame atomic absorption spectroscopy after digestion in
777 concentrated HNO₃.

778 A 25% (w/w) dispersion of colloidal SiO₂ was obtained from U.S. Research
779 Nanomaterials Inc. Clay particles (SWy-2: Na-rich, montmorillonite) were purchased from the
780 Clay Minerals Society³⁵. The colloidal clay dispersion was prepared by adding a large excess
781 of montmorillonite to Milli-Q water, shaking rigorously and then allowing the large particles
782 and aggregates to sediment (4 months). The concentration of colloidal clay in the supernatant
783 was obtained by gravimetric analysis by first drying it for 24 h at 37 °C and then placing it in a
784 desiccator for 24 h. Hydrodynamic diameters of the colloids were measured using DLS at a
785 concentration of 100 mg L⁻¹ whereas the initial sizes of silver nanoparticles were determined
786 by TEM (Supporting Information).

787 Water from the Des Prairies River was sampled on April 13, 2015 and filtered over
788 0.45 µm sterile nylon membrane filters (Fisherbrand, 09-719D) in order to remove the large
789 particles. The major characteristics of the water (major ions, organic carbon, pH) are provided
790 in the Supplementary Information (Table 3).

791 **Sample Preparation.** Synthetic media used in the experiments were prepared by
792 diluting stock solutions of the colloids or nanoparticles into a pH and ionic strength adjusted
793 medium and then letting the samples equilibrate overnight. pH was re-adjusted, if necessary,
794 by adding small quantities of 0.1 M HNO₃ or 0.1 M NaOH. Ionic strength was adjusted using
795 calcium nitrate tetrahydrate (99 %, Sigma Aldrich). Unless otherwise noted, nanoparticle

796 samples were added at a concentration of 50 $\mu\text{g Ag L}^{-1}$ and colloidal suspensions were used at
797 a 100 mg L^{-1} .

798 **Fluorescence correlation spectroscopy.** FCS measurements were performed on a
799 Leica TCS SP5 confocal microscope using a 63X objective. Rhodamine 123 (5, 10 nM) was
800 freshly prepared before measurements and used to calibrate the confocal volume based upon
801 its known diffusion coefficient of $4.40 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ⁵⁷. Calibration was repeated every six
802 samples. Each sample was measured 10 times using a 100 second acquisition time. Data from
803 the ten measurements were combined in order to determine a single value of the diffusion
804 coefficient using a 3D Gaussian model (ISS Vista 3.0). Means and standard deviations were
805 determined from independently prepared triplicate samples.

806 **Enhanced darkfield microscopy with hyperspectral analysis.** A visible-near
807 infrared spectrophotometer (Cytoviva Hyperspectral Imaging system, Auburn AL) integrated
808 onto a darkfield transmission optical microscope (Olympus BX43) was used in order to verify
809 the presence of heteroagglomerates. Images were collected (Andor Ixon3 camera) using a
810 100X objective and processed using ENVI 4.8 software using the following steps: 1)
811 correction of specimen spectra for lamp effects; 2) collection of spectra from pure samples
812 (nAg, SiO₂, clay) to develop spectral libraries; 3) determination and localisation of
813 nanoparticles and colloids in samples using a spectral angle mapper classification algorithm
814 (SAM=0.25). When performing darkfield microscopy, nanoparticle concentrations were
815 increased to 1 mg L^{-1} to facilitate their detection (added colloids remained at 100 mg L^{-1}). A
816 commercially available citrate stabilized nAg (22 nm) was obtained from Nanocompositix
817 (AGCB20) and used in its unlabeled form for the darkfield microscopy or in its labeled form
818 (Supplementary Information) for FCS experiments. Nanoparticles were added to the
819 suspensions of natural colloids then equilibrated overnight with gentle agitation.

820 **Electrophoretic mobility (EPM) and Dynamic light scattering (DLS).** EPM and
821 DLS were performed simultaneously using a Mobius light scattering instrument (Wyatt
822 Technology). DLS measurements were used to characterize hydrodynamic diameters of the
823 natural colloids while electrophoretic mobilities were measured for both the nanoparticles and
824 colloids. The DLS acquisition time was 5 seconds, using an electric field frequency of 10.0 Hz
825 and a voltage amplitude of 2.5 V. Phase analysis light scattering was used to determine
826 electrophoretic mobilities using an acquisition time of 15.0 seconds. Samples were measured

827 in triplicate at a fixed temperature of 20 °C. Light scattering was performed at 100 mg L⁻¹ for
828 the colloidal particles and 5 mg L⁻¹ for the nAg. Dynamics 7.2.4 software was used for data
829 acquisition and data treatment.

830

831 **4.4. Results and discussion**

832 **Particle labelling.** In order to isolate the signal of the nanoparticle from that of the
833 natural colloids, it was first necessary to covalently label the nAg using a method that was as
834 minimally perturbing as possible (Figure 26). Since FCS is a single molecule detection
835 technique, only a small amount of fluorescent dye was required on the nanoparticle surface. A
836 covalent label was used in order to ensure that the fluorescent label did not simply re-
837 equilibrate with other colloidal surfaces. Physical diameters and electrophoretic mobilities
838 were determined on the natural colloids (Table 1; Figures 24, 25) and the labelled nAg (Table
839 1; Figures 27-31).

840

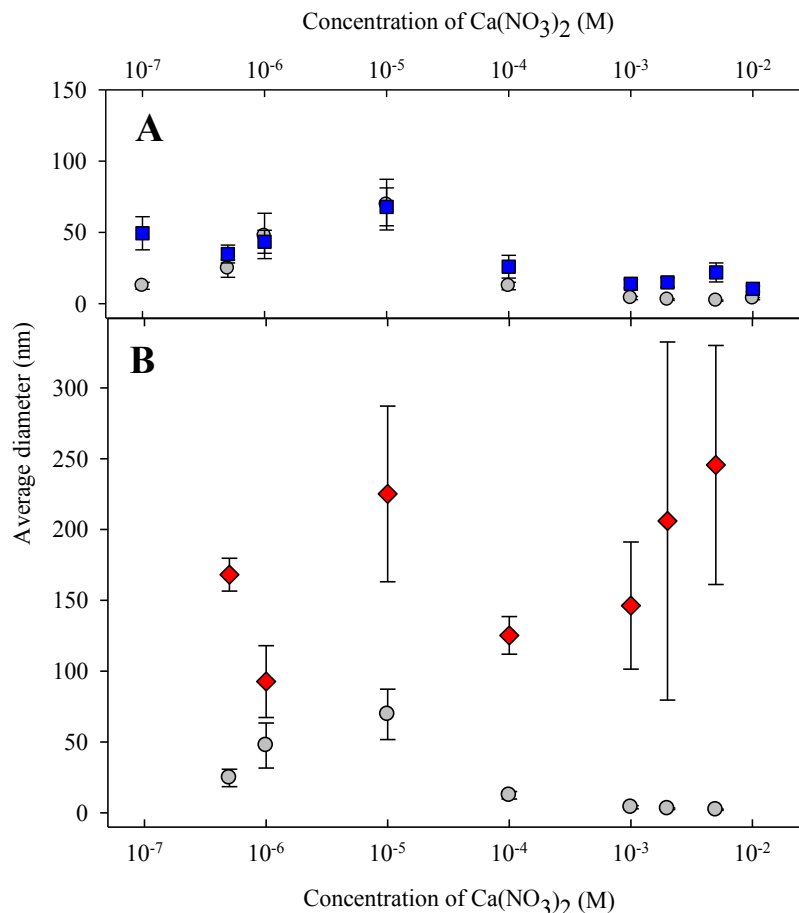
841 **Table 1.** Characterization of nanoparticles and colloids used in the initial FCS studies.

Particle	Average diameter (nm)	Electrophoretic mobility (10 ⁻⁸ m ² s ⁻¹ V ⁻¹)
SiO ₂	18.5 ± 0.4	-2.3 ± 0.2
Clay	550 ± 23	-1.7 ± 0.1
labelled nAg-cit	3.5 ± 0.3	-1.6 ± 0.2
labelled nAg-PAA	2.7 ± 0.3	-3.4 ± 0.3

842

843 **Heteroagglomeration of the nAg-cit.** Hydrodynamic diameters of the nAg-cit (50 µg
844 Ag L⁻¹) were measured by FCS over a wide range of added Ca concentrations, in the presence
845 or absence of 100 mg L⁻¹ of colloidal SiO₂ or clay particles (Figure 19). At pH 7.0, in the
846 absence of the colloidal particles (homoagglomeration; grey circles, Figure 19), the sizes of
847 the nAg-cit increased from 10⁻⁷ M Ca to 10⁻⁵ M Ca. Above 10⁻⁴ M Ca, the overall size of the
848 nAg decreased, but this was likely due to increased sedimentation of the nAg (as observed by

849 a decrease in the overall fluorescent signal; Figure 32A). Indeed, the overall fluorescence
 850 intensity in the nanoparticle suspensions decreased by 63% as the ionic strength increased
 851 from 10^{-7} M Ca to 10^{-2} M Ca.

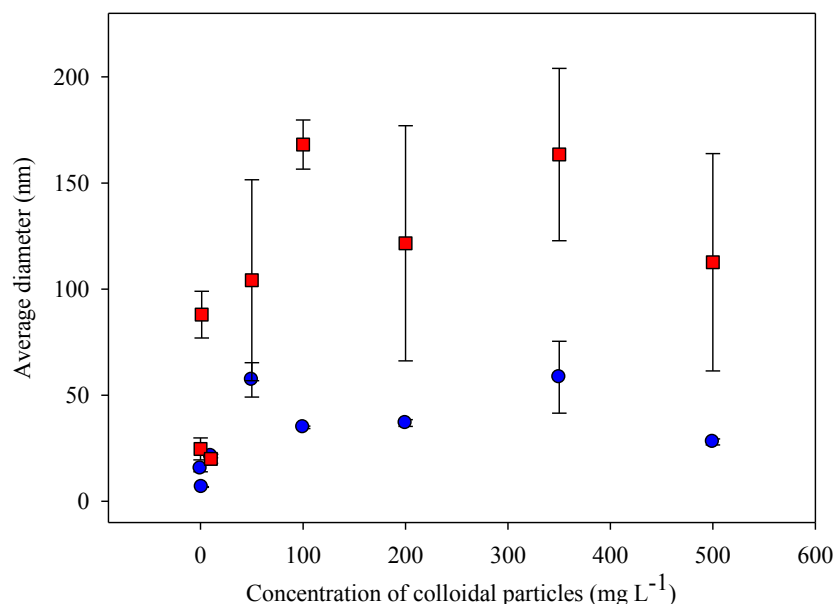


852
 853 **Figure 19.** Agglomeration and heteroagglomeration of nAg-cit in the absence (grey circles) or
 854 presence of 100 mg L^{-1} of colloidal SiO_2 (Figure 19A, blue squares) or colloidal clay (Figure
 855 19B, red diamonds) at pH 7.0. Measurements were obtained by FCS and represent the average
 856 sizes of the labelled nAg. For a given Ca concentration, significant differences (Student t-test,
 857 $P < 0.05$) due to the addition of the colloidal particles were observed for all Ca concentrations
 858 except for 10^{-6} and 10^{-5} M (SiO_2 , Figure 19A).

859
 860 When 100 mg L^{-1} of colloidal SiO_2 was added to the nAg (blue squares), a similar
 861 result was observed. Generally, average particle sizes were slightly larger in the presence of
 862 SiO_2 (significant differences observed for all Ca concentrations except for 10^{-6} and 10^{-5} M;

863 Student t-test, $P < 0.05$). When the larger clay particles were added to similar suspensions of
864 nAg, clear and significant (Student t test, significant at $P < 0.05$ for all Ca concentrations)
865 increases to the particle sizes were observed, although because of the larger polydispersity of
866 the clay colloids, larger error bars were also associated with the sizes of the
867 heteroagglomerates. In summary, the colloidal stability of the nAg-cit decreased as the water
868 hardness increased and in the absence of colloidal particles, there was evidence for both
869 particle (homo)agglomeration and sedimentation, even at the low particle concentrations of 50
870 $\mu\text{g Ag L}^{-1}$ that were examined here. Increased particle destabilization, across all values of
871 water hardness, was observed when colloidal particles were added to the waters.

872 In order to confirm the importance of the natural colloids on heteroagglomeration, the
873 size of the fluorescent nAg was followed for a single hardness ($[\text{Ca}] = 5 \times 10^{-7} \text{ M}$) but for an
874 increasing concentration of colloidal particles (Figure 20). Measured sizes of the nAg
875 increased when both colloidal SiO_2 (blue circles) and colloidal clay (red squares) were added.
876 For example, the hydrodynamic diameters of the nAg-cit increased from 25 nm (absence of
877 colloids) to 57 nm in the presence of 50 mg L^{-1} SiO_2 and 104 nm in the presence of 50 mg L^{-1}
878 of the clays. Average sizes did not appear to vary further for increasing additions of either of
879 the colloidal particles above ca. 50 mg L^{-1} , likely due to the low nanoparticle to colloid ratios
880 that would be present at these concentrations (e.g. approximately 1 nAg for 27 SiO_2 ; estimates
881 based upon particle densities and Stokes-Einstein equation)⁶⁴.



882

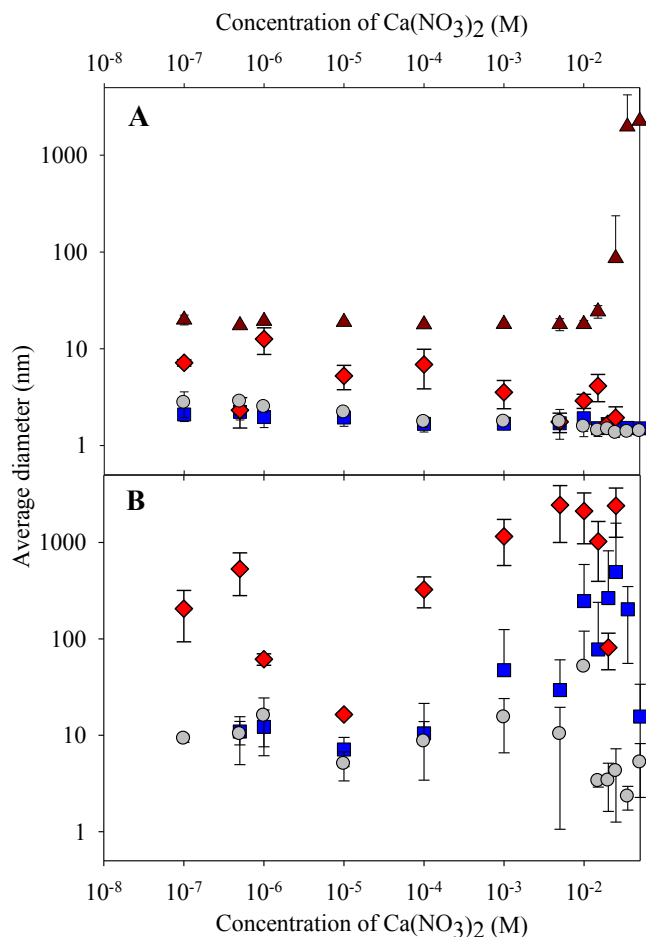
883 **Figure 20.** Role of the concentration of colloidal SiO₂ (blue circles) and colloidal
 884 montmorillonite (red squares) on the hydrodynamic diameters of a fluorescently labelled nAg-
 885 cit, obtained using FCS in the presence of 5×10^{-7} M Ca at pH 7.0.

886

887 **Heteroagglomeration of the nAg-PAA.** The stability of a second labelled nAg was
 888 examined over a large range of added Ca concentrations, in the presence or absence of 100 mg
 889 L⁻¹ of SiO₂ or 100 mg L⁻¹ of clay particles. As above, hydrodynamic diameters were
 890 determined for 50 µg Ag L⁻¹ of the labelled nAg-PAA. On the other hand, in contrast to the
 891 nAg-cit, no increase in hydrodynamic diameter was observed across the entire range of
 892 examined Ca concentrations (10^{-7} -0.3 M Ca; grey circles, Figure 21A). Furthermore, in the
 893 presence of colloidal SiO₂, no decrease in nanoparticle stability was observed (blue squares,
 894 Figure 21A), even though there was visible agglomeration (homoagglomeration) and
 895 sedimentation of the SiO₂ (brown triangles, Figure 21A) above 10^{-2} M Ca⁵⁹. In other words,
 896 the observed homoagglomeration of the colloidal SiO₂ under these conditions appeared to be
 897 independent of the (highly stabilized) nAg. Even at extremely high (and no longer
 898 environmentally relevant) Ca concentrations, where significant screening of the particle
 899 charge would occur, the nanoparticles were predominantly found as isolated nanoparticles.

900 Similar results were observed at pH 5.0 where the nanoparticle charge is less important
901 (Supporting information, Figure 33). While we have no other literature data on these specific
902 nAg-PAA, the observations are consistent with data obtained for particle shells (allospheres)
903 from the same manufacturer, where it was shown that they were extremely stable over a wide
904 range of ionic strengths (20-1000 mM) and pH (5.0-8.0)^{49, 65}.

905 Although average nanoparticle sizes did not increase across the entire range of Ca
906 concentrations, Figure 21A was analysed under the assumption of a single particle size. In
907 FCS, more polydisperse systems can also be examined using a minor component analysis,
908 which focuses on the tail of the particle size distributions. Although these data are necessarily
909 less accurate due the smaller numbers of analysed particles, analysis indicated that a small
910 proportion of the nanoparticles (<5%) were significantly larger in the presence of the both the
911 SiO₂ (blue squares, Figure 21B) and the colloidal clay (red diamonds, Figure 21B) as
912 compared to their absence (grey circles, Figure 21B). These results suggest that for a small
913 fraction of the nAg, some heteroagglomeration was occurring, but that it was not
914 quantitatively important and only observed at extremely high Ca concentrations (>10⁻² M) in
915 the presence of high colloidal SiO₂ concentrations (100 mg L⁻¹). Minor component analysis
916 also showed that a quantitatively small interaction was occurring with the colloidal clay
917 particles, as a small proportion of the nAg-PAA were much larger than the results observed for
918 the suspensions without clays. Nonetheless, for this nanoparticle, the vast majority of the
919 particles were highly stabilized, at pH 5.0 or 7.0 and across a wide range of ionic strengths.



920

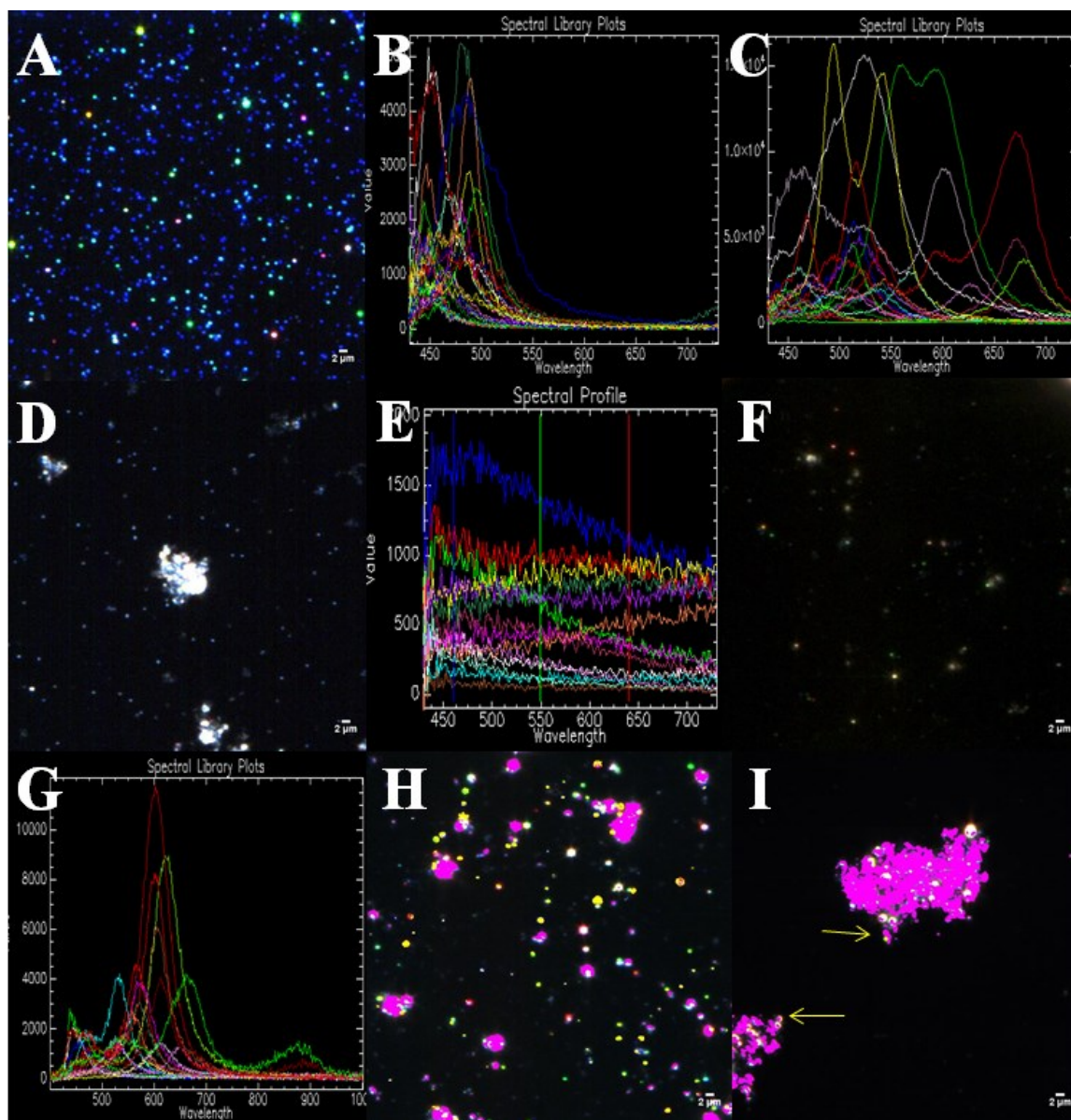
921 **Figure 21.** (A) Hydrodynamic diameters of 50 μg of nAg-PAA at pH 7.0 over a large range of
 922 calcium concentrations in the absence (grey circles); presence (blue squares) of 100 mg L^{-1} of
 923 SiO_2 particles and presence (red diamonds) of 100 mg L^{-1} of clay particles. Colloidal SiO_2
 924 were also measured by dynamic light scattering in the absence of nAg-PAA (brown
 925 diamonds). Similar data obtained at pH 5.0 can be found in the Supplementary Information
 926 (Figure 33). Results in Figure 21A were obtained under the assumption of a single component.
 927 (B) Reanalysis of the FCS data under the assumption of a two component system. Results
 928 generated for the hydrodynamic sizes of the minor component only, corresponding to less than
 929 5% of the total particle numbers.

930

931 **Darkfield microscopy.** In order to confirm that heteroagglomeration was occurring
 932 among the nAg-cit and the colloidal particles, some further analysis was performed using
 933 darkfield microscopy using hyperspectral analysis^{53, 54, 66}. Although darkfield microscopy is a

934 powerful technique for the pixel by pixel localisation of nanoparticles of the noble metals, the
935 small particles employed above were below the detection limits of the instrument. Therefore, a
936 larger (hydrodynamic diameter of 22 ± 2 nm), commercially available, citrate coated nAg was
937 employed (Figure 22A). Numerous spectra (each corresponding to a single pixel of ca. 160 nm
938 x160 nm) were obtained (Figure 22B,C, library 1). As seen previously^{66, 67} the distinct, fairly
939 narrow spectral peaks of the Ag result from an enhancement of the scattered light due to its
940 plasmonic resonance, which has been shown to shift to longer wavelengths (Figure 22C) with
941 increasing particle size^{53, 63}. Darkfield images and hyperspectral libraries were also obtained
942 for the clay colloids alone (Figure 22D,E, library 2) and for the nAg in the presence the clay
943 colloids by first allowing large agglomerates to settle over 3 hours (Figure 22F,G, library 3).
944 In the latter case, narrow spectral peaks, strongly indicative of the nAg, could again be
945 observed, however, when the spectral library for the nAg (library 1) was used on the mixtures
946 of nanoparticles and colloids at 1 mM (Figure 22H) or 50 mM Ca (Figure 22I), only a few
947 nAg could be identified. The presence of peaks that were clearly nAg, but that could not be
948 identified using the reasonably conservative SAM values used here (0.25) is a strong
949 indication that the optical properties of the nAg changed due to an interaction with the
950 colloidal montmorillonite (Figure 34, 35). A similar result was observed for the nAg-cit in the
951 presence of SiO₂, except that even fewer points corresponding to the nAg were observed
952 following the mixing of the two particle types (Figure 36). Results from the darkfield
953 microscopy clearly indicated that interactions were taking place between the nAg and the
954 colloids: (i) spectra were clearly different and usually red-shifted with respect to spectra
955 obtained in the absence of the colloids; (ii) spectra in the presence of the (polydisperse) clays
956 indicated far greater variation of the wavelength of the peak maxima (Figure 22G) than what
957 was observed in the presence of the SiO₂ (Figure 36E); (iii) when the spectral libraries from
958 the mixture supernatants (library 3) were used to map the nAg, particles appeared to closely
959 co-exist with the colloidal clays (Figure 22H,I).

960



961

962 **Figure 22.** Darkfield microscopy and hyperspectral analyses of the citrate coated nAg (22 nm)
 963 and the colloidal clay: (A) stock solution at 1 g L^{-1} ; (B) Spectral library built mainly from the
 964 blue particles observed in A; (C) Spectral library built from remaining particles. The two
 965 spectral libraries were combined for the mapping of nAg (library 1); (D) 100 mg L^{-1} of
 966 colloidal clay in 1 mM Ca at $\text{pH } 7.0$; (E) Spectral library for the clay generated from Figure
 967 22D (library 2); (F) Supernatant 1 mg L^{-1} of nAg and 100 mg L^{-1} of colloidal clay in 1 mM Ca
 968 at $\text{pH } 7.0$ after 3h of sedimentation; (G) Spectral library for the nAg generated from Figure
 969 22F (library 3); (H and I) Mapping generated by assigning pink to pixels identified using

970 library 2 (clays) and yellow to the pixels corresponding library 3 (nAg); (H) Mapping of 1 mg
971 L⁻¹ of nAg and 100 mg L⁻¹ of colloidal clay in 1 mM Ca at pH 7.0; (I) Mapping of 1 mg L⁻¹ of
972 nAg and 100 mg L⁻¹ of colloidal clay in 50 mM Ca at pH 7.0.

973

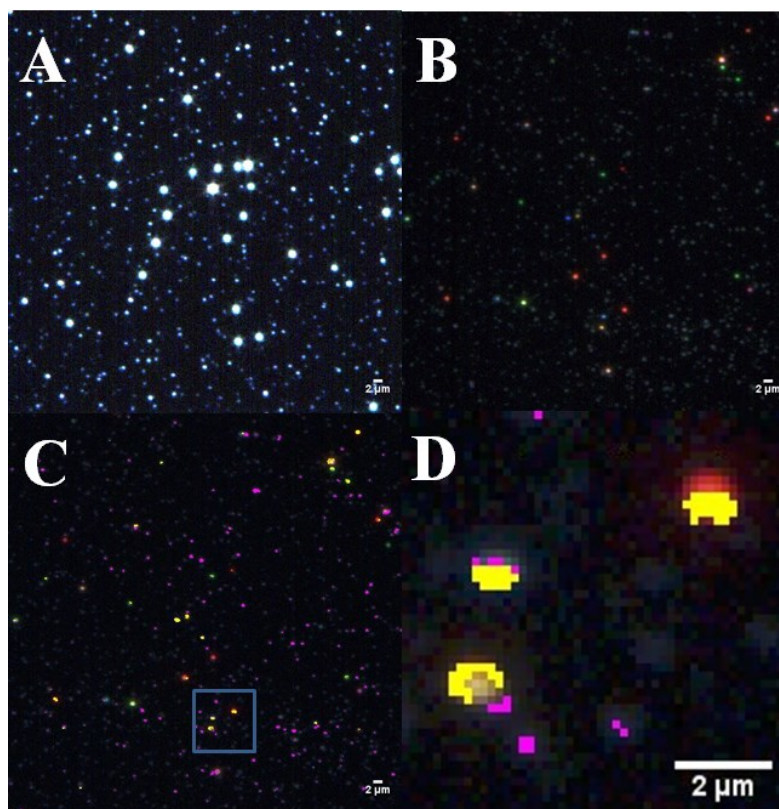
974 **Natural waters.** Finally, a small volume of the nAg-cit was spiked into a filtered (0.4
975 μm) water sample taken from a Des Prairies River. For 50 μg L⁻¹ of fluorescently labelled
976 nAg-cit, nanoparticle sizes obtained in the natural waters were clearly larger than those
977 obtained in Milli-Q water (Table 2, Figure 37), a result that could admittedly be attributed to
978 either homo- or heteroagglomeration of the nAg-cit. On the other hand, when 1 mg L⁻¹ of the
979 nAg was added to the natural water (Figure 23A), it was possible to distinguish the nAg, either
980 by image enhancement (Figure 23B) or by using the spectral library that was generated
981 previously from the nAg in the supernatant of the colloidal montmorillonite (i.e. library 3). As
982 above, clay (and/or SiO₂ particles) were often found in close proximity to the nAg particles in
983 the natural samples (Figure 23C,D). The observations of the larger sizes (FCS) and nAg-clay
984 interactions (darkfield microscopy) strongly indicated that heteroagglomeration rather than
985 simply homoagglomeration was occurring in the natural water.

986

987 **Table 2.** Average size of 50 μg L⁻¹ nAg-cit at in Milli-Q water and in water from the Des
988 Prairies River.

Water type	Average hydrodynamic diameter determined by FCS (nm)
Milli-Q water	16 ± 3
Natural water	28 ± 3

989



990

991 **Figure 23.** Darkfield microscopy and hyperspectral analyses of the nAg-cit (22 nm) spiked
 992 into the natural water at a concentration of 1.0 mg L^{-1} . (A) Darkfield microscopy of the natural
 993 water; (B) Darkfield microscopy of 1 mg L^{-1} of nAg in the natural water, using image
 994 enhancement (square root); to bring the nAg into near field; (C) Mapping of 1 mg L^{-1} of nAg
 995 and the colloidal particles in the natural water using libraries 2 and 3 (Figure 22E,G); (D)
 996 zoom of identified area in image C. In C and D, mapping was generated by assigning pink
 997 pixels to the particles matching the spectral library of the clays (library 2) and yellow to the
 998 pixels matching the spectral library of the nAg (library 1 and 3).

999

1000 4.5. Environmental relevance

1001 The environmental risk of the nanomaterials is strongly linked to their agglomeration
 1002 and dissolution in the environment, which will directly affect their mobility and
 1003 bioavailability. For low nanoparticle concentrations and low nanoparticle to colloid ratios,
 1004 heteroagglomeration rather than homoagglomeration is most likely to control particle fate.

1005 Nanoparticle sizes were generally larger in the presence of natural colloids, resulting from the
1006 interaction of multiple particle types, which could potentially lead to their sedimentation in
1007 receptor environments^{37-39, 59}. Nonetheless, as shown above, the particle coatings of these
1008 novel materials is expected to play an important role in their physicochemical stability^{14, 16, 19,}
1009 ²⁰. In the case of nAg-PAA, they remained extremely stable in the water column, even in the
1010 presence of an important agglomeration of the surrounding colloidal system. Although the role
1011 of the chemical reactivity of the nanoparticles (e.g. sulfidation, adsorption of natural organic
1012 matter) was not studied here, these transformations will also clearly play a role in modulating
1013 their interactions with the colloidal particles and will need to be studied further⁶⁸. It is clear
1014 that nanoparticle behaviour and fate cannot be understood without taking into account the
1015 roles of many of the important natural components of the natural systems.

1016

1017 **4.6. Associated content**

1018 Labelling process, nanoparticle and colloidal particle characterization and additional
1019 information about heteroagglomeration are available in the Supporting Information. This
1020 material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

1021

1022 **4.7. Author information**

1023 **Corresponding Author**

1024 *Tel.: +1 514 343 674. Fax: +1 514 343 7586

1025

1026 **4.8. Acknowledgments**

1027 Funding for this work was provided by the Natural Sciences and Engineering Research
1028 Council of Canada and the *Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies*.

1029 **Chapitre 5: Supporting information for**
1030 **Heteroagglomeration of nanosilver with SiO₂ and clay**

1031

1032 Sébastien Maillette¹, Caroline Peyrot¹, Tapas K. Purkait², Muhammad Iqbal²,

1033 Jonathan G. C. Veinot² and Kevin J. Wilkinson^{1,*}

1034

1035 ¹Biophysical Environmental Chemistry Group, Department of Chemistry, University of

1036 Montreal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montreal H3C 3J7, Canada

1037 ²Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2G2

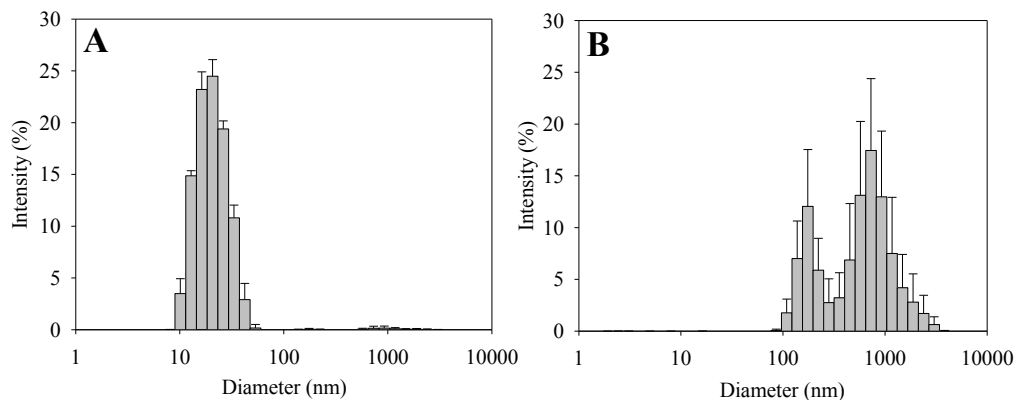
1038

1039 *Corresponding author: Phone: +1-514 343 6741; fax: +1-514 343 7586;

1040

1041 **5.1. Characterization of the colloidal suspensions**

1042 Particle size distributions were first measured for 100 mg L⁻¹ of the colloidal
1043 suspensions (SiO₂, montmorillonite) in the absence of calcium at pH 7.0 (Figure 24).
1044 Simultaneous measurements of their diffusion coefficients (hydrodynamic size) and
1045 electrophoretic mobilities were performed at several calcium concentrations (Figure 25).



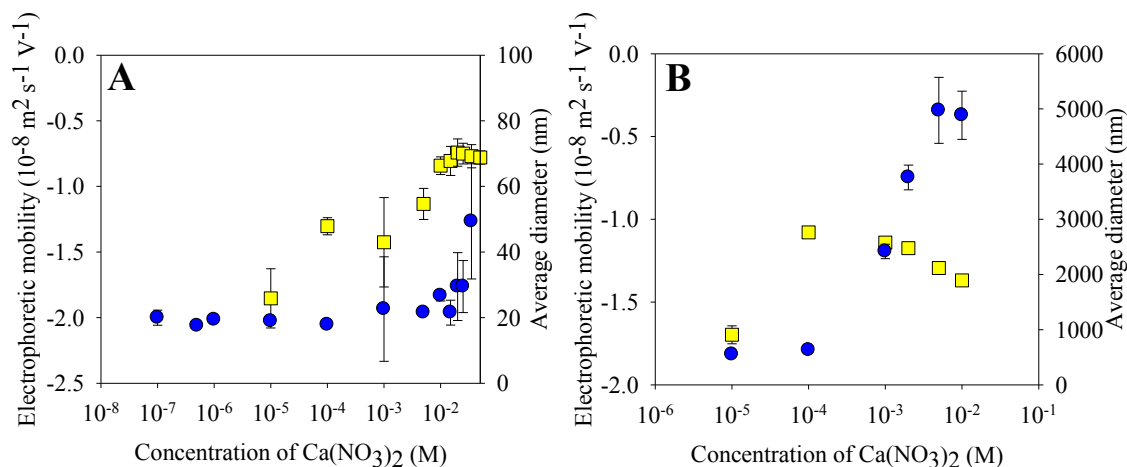
1046

1047 **Figure 24.** Particle size distributions (hydrodynamic diameters) for: (A) 100 mg L⁻¹ of
1048 colloidal SiO₂ at pH 7.0 and (B) 100 mg L⁻¹ of the colloidal clay particles (montmorillonite) at
1049 pH 7.0.

1050

1051 In Figure 24A, the size distribution obtained for colloidal SiO₂ showed a normal
1052 dispersion with a small portion of very large particles, whereas dynamic light scattering for the
1053 clay particles gave a bimodal dispersion at much larger particle sizes. At pH 7.0, both colloids
1054 were negatively charged across a wide range of Ca concentrations, although both colloids
1055 showed evidence for charge screening or Ca adsorption at the higher Ca concentrations
1056 (Figure 25, yellow squares). When the average diameters were plotted as a function of calcium
1057 concentrations, some agglomeration was observed at the higher ionic strengths for both of the
1058 colloidal particles (Figure 25, blue circles). For SiO₂, agglomeration primarily occurred for Ca
1059 concentrations of 35 mM and above (Figure 25A). Agglomeration of the clay particles started
1060 at much lower Ca concentrations of 0.1 mM and increased until the upper tested limit of Ca
1061 concentrations (10 mM; Figure 25B). The observed agglomeration of the montmorillonite, in
1062 spite of an overall negative EPM, can likely be attributed to interactions between the edge and

1063 surface sites⁶⁹. The observed decrease in electrophoretic mobilities at higher Ca
1064 concentrations can likely be explained by the sedimentation of some of the larger particle
1065 agglomerates.



1066

1067 **Figure 25.** Hydrodynamic diameters (blue circles) and electrophoretic mobilities (yellow
1068 squares) as a function of added calcium concentrations for: (A) 100 mg L⁻¹ of colloidal SiO₂ at
1069 pH 7.0; (B) 100 mg L⁻¹ of colloidal montmorillonite at pH 7.0.

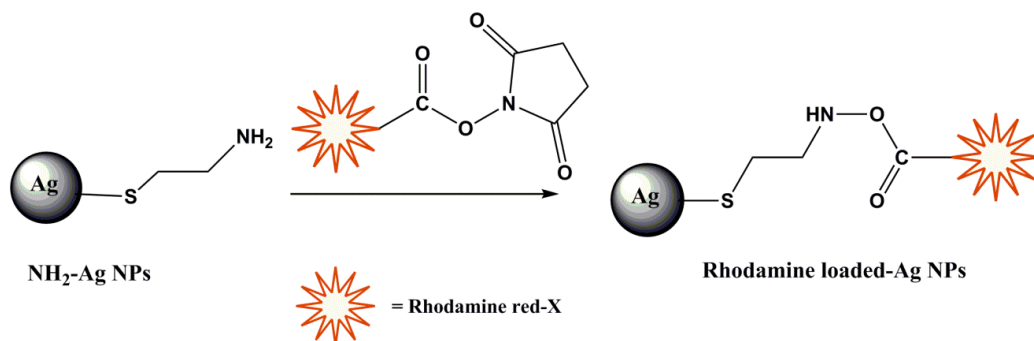
1070

1071 **5.2. Labeling and characterization of the citrate stabilized nAg** 1072 **(nAg-cit)**

1073 **Preparation of the nAg.** Citrate stabilized Ag nanoparticles (nAg-cit) were either
1074 synthesized in house or purchased commercially. In the first case, nAg were synthesized from
1075 10 mg of silver nitrate (AgNO₃, 99%, Aldrich), dissolved in 250 mL of deionized (DI) water
1076 (R>18 MΩ cm⁻¹) containing 9.0 mM citric acid (50 mg, 99%, Aldrich). Two drops of 4 M
1077 NaOH were added to the solution and it was heated to 70 °C for 1 h. The yellow/green solution
1078 that was formed was centrifuged in a 50 mL centrifuge tube at 12000 rpm (20000×g) for 30
1079 min. A dark yellow/green precipitate was collected and redispersed in DI water to give the
1080 stock solution of nAg. The commercial citrate stabilized nAg (ca. 22 nm) were purchased from
1081 Nanocomposix (AGCB20) and used as received.

1082 **Synthesis of amine-terminated silver nanoparticles.** Amine-terminated nAg were
1083 prepared by adding 100 μL of a 0.13 M aqueous cysteamine solution (cysteamine
1084 hydrochloride, 99%, Aldrich) in 10 μL increments to 25 mL of the nAg-cit dispersion (0.1 g L⁻¹).
1085 The solution was stirred overnight at room temperature and then centrifuged at 12000 rpm
1086 (20000 \times g) for 30 min prior to redispersion in 5 mL of DI water.

1087 **Conjugation of the rhodamine red-X with the NH₂-terminated nAg.** Twenty-five
1088 mg of rhodamine redTM-X, succinimidyl ester, 5-isomer (Life Technologies Inc.) was
1089 dissolved in 1.4 mL of dry DMSO. One mL of the aqueous NH₂-terminated nAg (above), 0.7
1090 mL of demineralized water and 7.5 mL of sodium tetraborate buffer (pH 8.5) were added to
1091 the rhodamine solution and the reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature (see
1092 Figure 26). The reaction mixture was centrifuged at 12000 rpm (20000 \times g) for 30 min and
1093 particles were re-dispersed in DI water. A purified rhodamine labelled nAg was obtained after
1094 repeating the centrifugation step 3 \times . The labelled nAg-cit was dispersed in 5 mL DI water in
1095 order to obtain a final Ag concentration of 0.1 g L⁻¹.

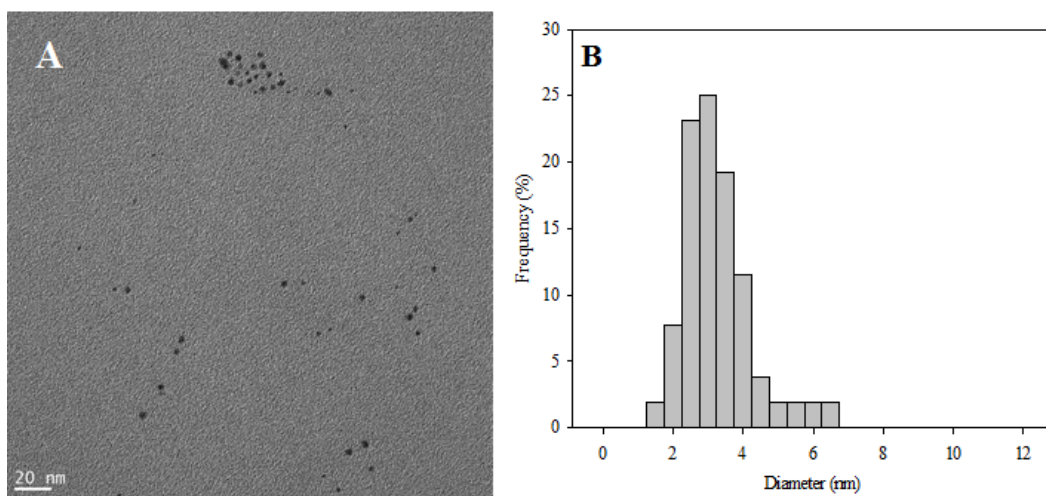


1096

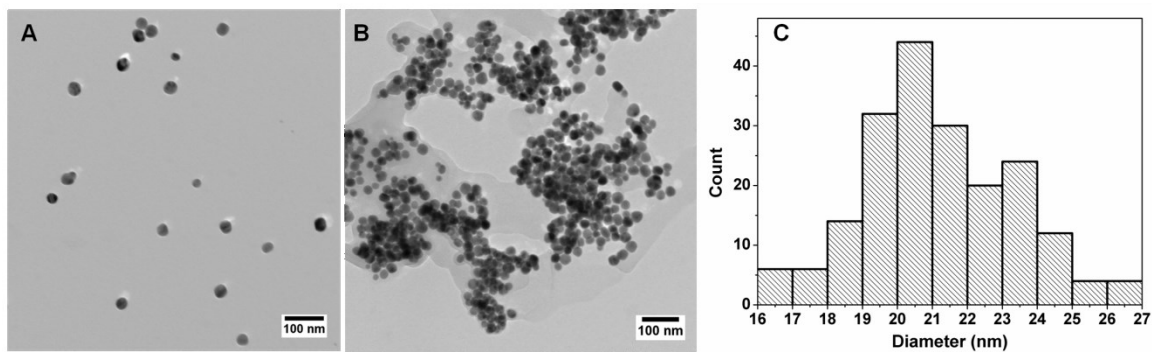
1097 **Figure 26.** Synthesis of the rhodamine-labelled nAg-cit.

1098 **Characterization.** Particles were characterized by transmission electron microscopy
1099 (TEM), UV-Vis absorption and photoluminescence (PL) emission spectroscopy, before and
1100 after the dye labelling. Samples were imaged with a JOEL 2011TEM with a LaB6 electron
1101 gun using an accelerating voltage of 200 kV. TEM samples were prepared by depositing a
1102 droplet of the aqueous suspension of nAg onto a carbon coated copper grid. UV-Vis
1103 absorption spectra and PL emission spectra of the nAg-cit and dye in dilute aqueous solutions
1104 were measured using a Carry 400 UV-Vis spectrometer and a Carry Eclipse
1105 spectrophotometer.

1106 Following labelling of the homemade nAg-citrate, TEM images showed small nAg
1107 (Figure 27A) with an average diameter of 3.5 nm (Figure 27B). When the commercial nAg-cit
1108 was labelled, TEM images showed a monodisperse population of particles, with an average
1109 diameter of 21 ± 2 nm (Figure 28B,C) that were very similar to their initial sizes (Figure 28A).
1110 Nonetheless, there was some evidence for agglomeration (Figure 28B) and significant
1111 unbound fluorophore was found in the dissolved phase of the suspensions of the commercial
1112 particles. Particles were therefore extensively washed using a centrifugal ultrafiltration device
1113 (Amicon® Ultra-4 tubes, 3 kDa, Merck Millipore). The purification successfully removed
1114 excess fluorophore, but simultaneously reduced the average particle sizes of the labelled nAg
1115 to 16 nm. All of the labelled nAg-cit had a significant negative charge on their surface, as
1116 demonstrated by their negative electrophoretic mobilities of $-1.6 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ (in house 3
1117 nm nAg-cit); $-2.5 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ (commercial 21 nm nAg-cit) and $-1.8 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$
1118 (commercial 16 nm nAg-cit following purification). The final covalently labelled nAg-cit that
1119 were used for the FCS experiments were fairly monodisperse suspensions of small particles (3
1120 or 16 nm), containing no measurable unbound fluorophore.



1121
1122 **Figure 27.** (A) TEM image of the citrate stabilized, rhodamine labelled nAg (homemade); (B)
1123 TEM distribution of the labelled nAg (N=55).



1124

1125

1126

Figure 28. (A) TEM image of the commercial, citrate stabilized nAg, (B) TEM of the rhodamine labelled nAg-citrate; (C) TEM distribution of the labelled nAg-citrate (N=200).

1127

1128 5.3. Labeling and characterization of nAg-PAA

1129

1130

1131

1132

1133

1134

Materials. Cross-linked, polyacrylic acid coated nanosilver (<10 nm) were purchased from Scivation (108SI). Quantification of the silver in the nanoparticles was performed using atomic absorption spectroscopy (Varian, Spectra A55). Sodium bicarbonate (>99.7%, Aldrich) was used to buffer the pH during the labeling process. Alexa Fluor® 488 NHS Ester (succinimidyl ester) was purchased from Invitrogen (A-20100) and used to label the carboxylic groups in the nanoparticle shell.

1135

1136

1137

1138

1139

1140

1141

1142

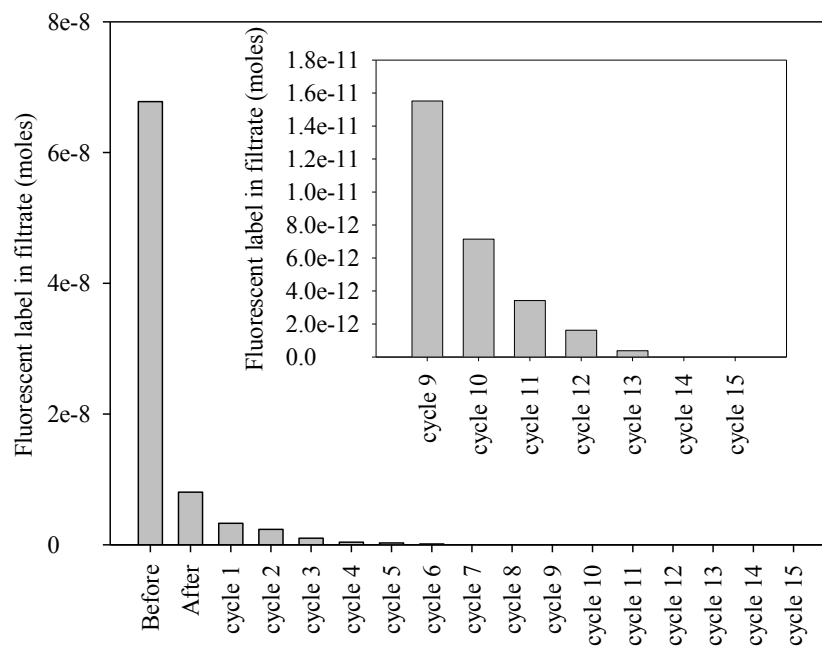
1143

1144

1145

1146

Conjugation of Alexa Fluor® 488 NHS Ester with the nAg-PAA. Due to a low reaction efficiency, an excess of fluorescent dye (ca. 32 molecules of fluorescent dye per nAg) was used to label the carboxylated nanoparticles. Alexa Fluor® 488 NHS ester (succinimidyl ester) was added, with stirring, to a 2 g L⁻¹ suspension of nAg in 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.3). After 2 hours of mixing, excess reactive was removed by first passing the suspension over a desalting column (Figure 29, compare ‘before’ and ‘after’). The remaining fluorescent dye was removed using centrifugal ultracentrifugation (Amicon® Ultra-4 tubes, 3 kDa, Merck Millipore). Fluorescence in the filtrate decreased and became negligible after fifteen wash cycles. Silver was also quantified in the filtrate during the wash cycles with results showing that it was below quantification limits for graphite furnace atomic absorption spectrometry (ca. 0.5 µg L⁻¹). Indeed, the major Ag loss occurred during the initial wash on the desalting column and was at least partly associated with the adsorption/entrapment of particles by the column.



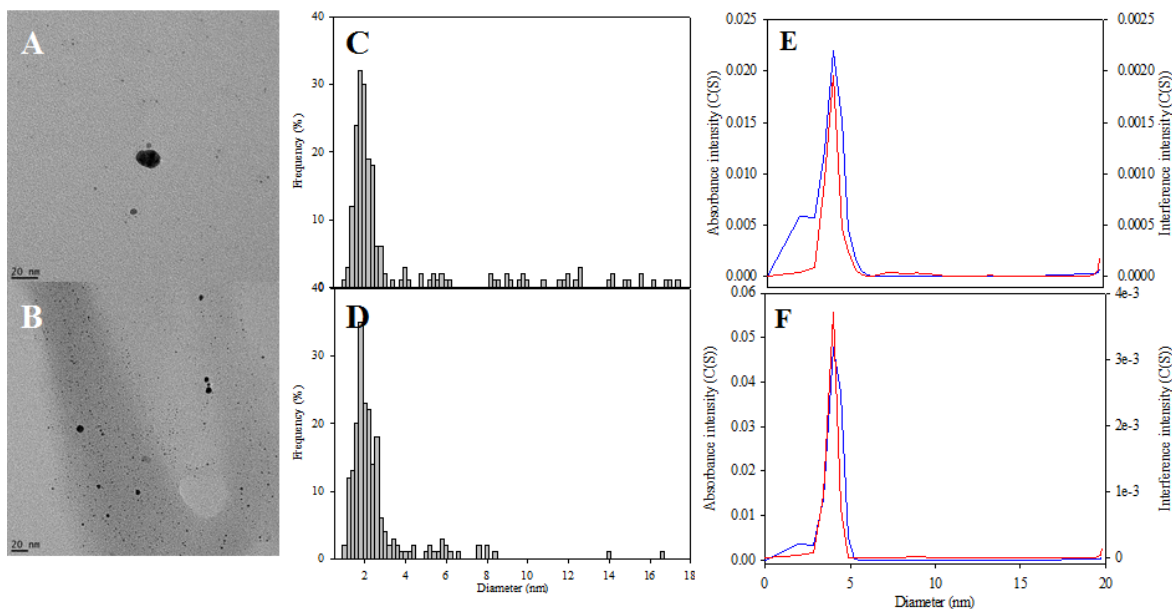
1147

1148 **Figure 29.** Efficiency of the washing of the labelled nAg suspension used to remove excess
 1149 fluorescent dye. “Before” corresponds to the number of moles of label that were measured
 1150 before the use of the desalting column while “After” corresponds to the number of moles that
 1151 remained in solution after the use of the desalting column. Each of the remaining data points
 1152 indicates subsequent cycles of centrifugal ultrafiltration.

1153

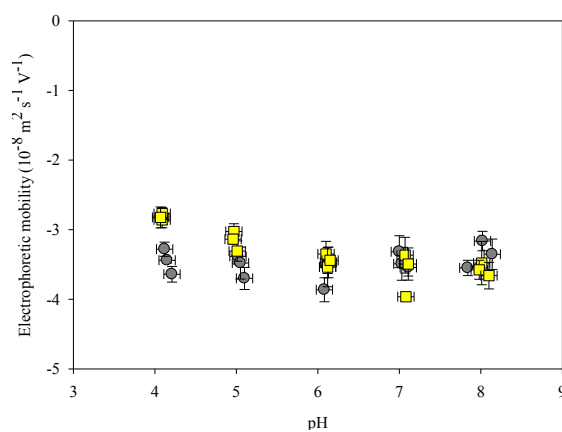
1154 **Characterization.** Size distributions of unlabelled and labelled nanosilver were
 1155 determined using transmission electronic microscopy (TEM) and analytical ultracentrifugation
 1156 (AUC). Average sizes of the nAg measured before and after the labeling process were similar
 1157 (Figure 30). Electrophoretic mobilities were measured for unlabeled and labeled nAg. No
 1158 significant changes in the EPM were observed due to the presence of the fluorescence dye on
 1159 the particle surface (Figure 31) except at pH 4.0 (where no analysis was performed).

1160 Of the two labelling techniques that were used, the labelling of the carboxylic acids on
 1161 the particle stabilizer appeared to be the least perturbing, since the labelling and purification of
 1162 the nAg-cit particles resulted in an apparent dissolution of the nAg. On the other hand, this
 1163 direct labelling of the Ag surface is likely to be more applicable to a greater number of nAg
 1164 particle types.



1165

1166 **Figure 30.** TEM and AUC on 5 mg L^{-1} of the nAg-PAA suspensions before and after labelling
 1167 (A) TEM image of the nAg-PAA in Milli-Q water; (B) TEM image of the labelled nAg-PAA
 1168 in Milli-Q water; (C) TEM size distribution of the unlabelled nAg-PAA ($n=200$); (D) TEM
 1169 size distribution of the labelled nAg-PAA ($n=200$); (E) AUC distributions obtained using
 1170 absorbance and interference detectors for the nAg-PAA in Milli-Q water and (F) AUC
 1171 distributions using absorbance and interference detectors for the labelled nAg-PAA in Milli-Q
 1172 water.



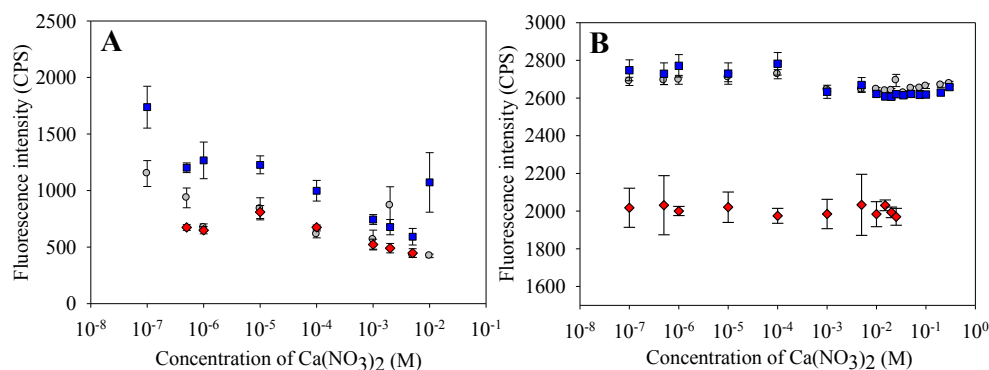
1173

1174 **Figure 31.** Electrophoretic mobility of unlabelled (grey circles) and labelled (yellow squares)
 1175 nAg-PAA (5 mg L^{-1}) as a function of pH.

1176

1177 5.4. Fluorescence intensity measurements

1178 Fluorescence intensity measurements in the confocal volume were also followed over
1179 time under the assumption that a loss in particles due to sedimentation would result in a
1180 decrease in fluorescence intensity. As anticipated, based upon the results obtained for the
1181 diffusion coefficients, fluorescence decreased with increasing Ca for the nAg-cit. In contrast,
1182 for the PAA stabilized nAg, fluorescence was constant across the entire range of measured Ca
1183 concentrations, reinforcing the observation that the nAg-PAA were extremely stable.



1184

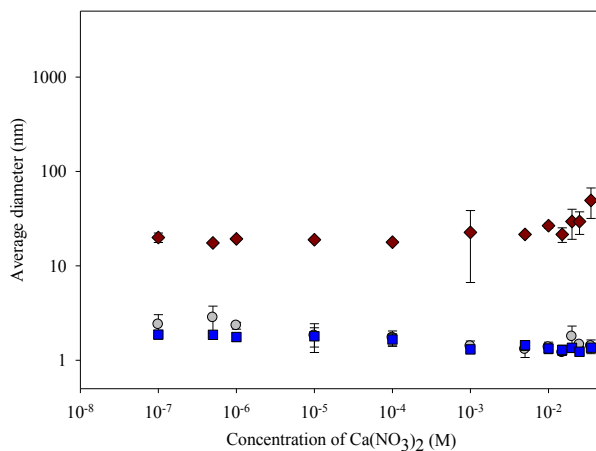
1185 **Figure 32.** (A) Fluorescence intensity of labelled nAg-cit in the absence (grey circles) or
1186 presence of 100 mg L^{-1} of colloidal SiO_2 (blue squares) or colloidal clay (red diamonds) as
1187 function of added calcium at pH 7.0; (B) Fluorescence intensity of labelled nAg-PAA in the
1188 absence (grey circles) or presence of 100 mg L^{-1} of colloidal SiO_2 (blue squares) or colloidal
1189 clay (red diamonds) as a function of added calcium at pH 7.0 (the experiment with colloidal
1190 clay was performed independently; the overall decrease in fluorescence intensity was likely
1191 due to laser output).

1192

1193 5.5. Heteroagglomeration at pH 5

1194 In addition to the heteroagglomeration experiments at pH 7.0 (Figure 21), several
1195 experiments were also performed with the labelled nAg-PAA at pH 5.0 in the presence of the
1196 colloidal SiO_2 . As seen above (Figure 25), pH had a small effect on the electrophoretic
1197 mobilities of the nAg-PAA above pH 4.0. No homoagglomeration of the nAg was observed

1198 for added Ca ranging from 0.1 μM to 100 mM. Furthermore, addition of colloidal SiO_2 had no
 1199 impact on the sizes of the nAg -PAA. The stability of the nAg was in sharp contrast with that
 1200 of the colloidal SiO_2 , which showed increased particle sizes, attributed to agglomeration, for
 1201 Ca additions above 10 mM.



1202

1203 **Figure 33.** FCS determination of hydrodynamic diameters for $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of nAg-PAA at pH
 1204 5.0, obtained over a large range of calcium concentrations: nAg-PAA only (grey circles); nAg-
 1205 PAA in the presence of 100 mg L^{-1} of SiO_2 (blue squares). The brown diamonds show the
 1206 measured agglomeration of SiO_2 alone, obtained using DLS.

1207

1208 5.6. Natural waters

1209

Table 3. Characterization of the Des Prairies River water

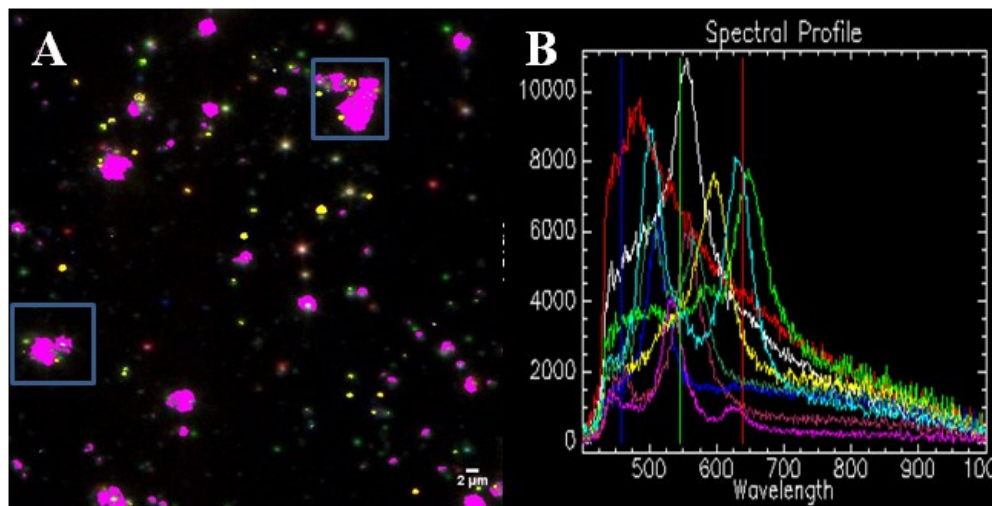
Component	Concentration
pH	6.5
TOC*	$6.9 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$
Ca	$20.8 \pm 0.8 \text{ mg L}^{-1}$
K	$1.73 \pm 0.07 \text{ mg L}^{-1}$
Mg	$6.0 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$
Na	$15.2 \pm 0.7 \text{ mg L}^{-1}$

1210

*TOC = total organic carbon

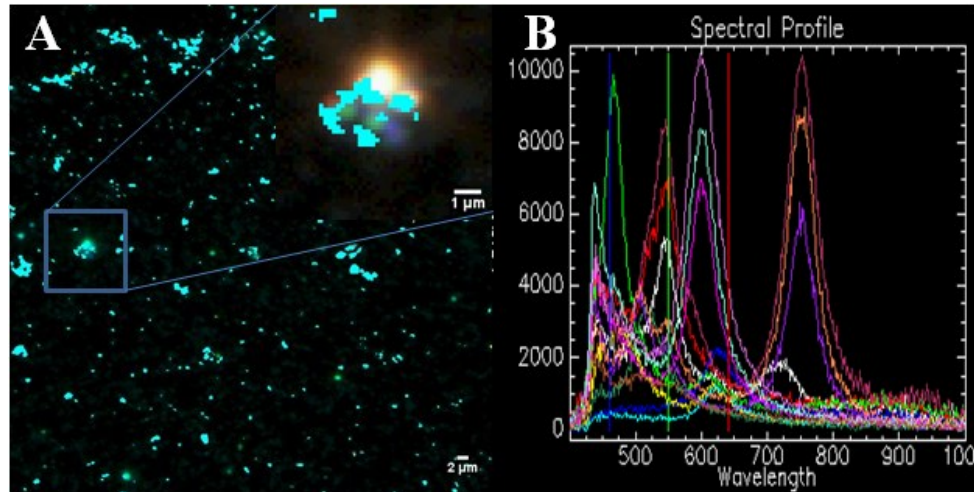
1211

1212 5.7. Enhanced darkfield microscopy with hyperspectral imaging



1213

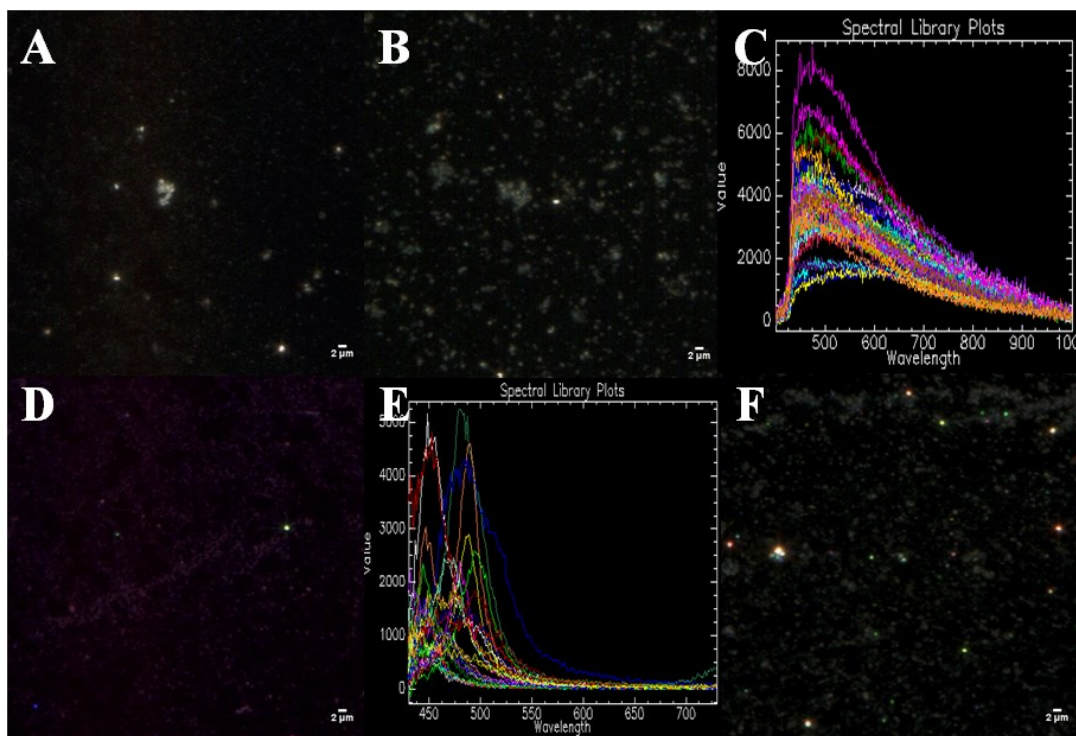
1214 **Figure 34.** (A) Mapping of nAg-cit in presence of clay particles in 1 mM Ca at pH 7.0; (B)
1215 Spectral signatures of nAg-cit that were detected in the mixtures.



1216

1217 **Figure 35.** (A) Mapping of nAg-cit in presence of colloidal SiO₂ at 50 mM Ca; (B) Spectral
1218 signature of the nAg-cit that wasn't detected during nanoparticle mapping.

1219



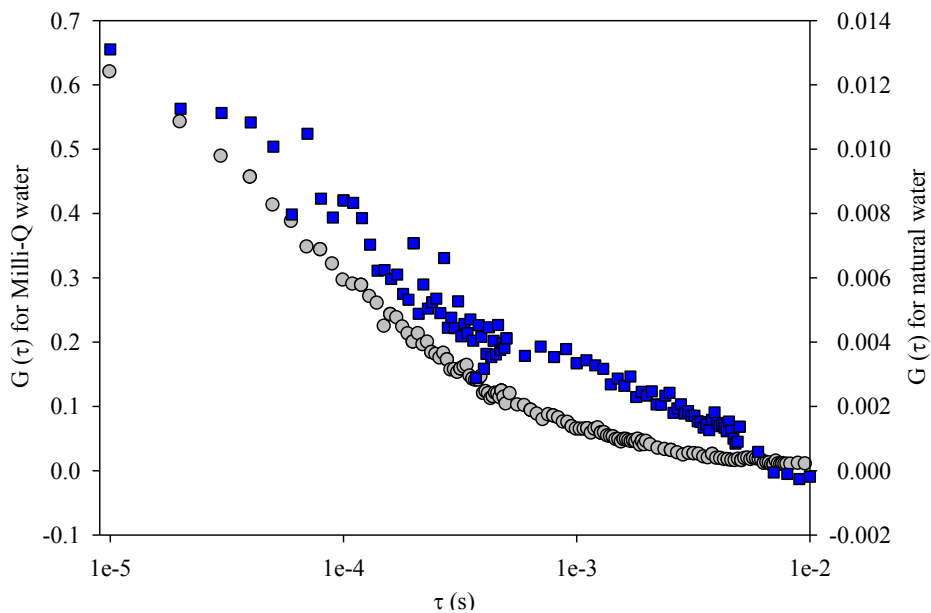
1220

1221 **Figure 36.** Darkfield microscopy and hyperspectral imaging analyses of the citrate coated nAg
 1222 (22 nm) and the colloidal SiO₂: (A) 100 mg L⁻¹ of colloidal SiO₂ in 1 mM Ca at pH 7.0; (B)
 1223 100 mg L⁻¹ of colloidal SiO₂ in 50 mM of Ca at pH 7.0; (C) Spectral library for the SiO₂
 1224 generated from images similar to Figure 36A; (D) 1 mg L⁻¹ of nAg and 100 mg L⁻¹ of
 1225 colloidal SiO₂ in 1 mM Ca at pH 7.0; (E) Spectral library of the nAg, generated in presence of
 1226 the colloidal SiO₂; (F) 1 mg L⁻¹ of nAg and 100 mg L⁻¹ of colloidal SiO₂ in 50 mM Ca at pH
 1227 7.0.

1228

1229 **5.8. Raw FCS data for the nAg-cit in the Des Prairies River**

1230 Based upon the data used for the autocorrelation function, it is clear that diffusion
 1231 times for the nAg in the river water were dramatically shifted to the right (longer times), a
 1232 result that is clearly indicative of larger particle sizes.



1233

1234 **Figure 37.** Autocorrelation curves obtained for $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of rhodamine red-X labelled nAg-cit
 1235 in Milli-Q water (grey dots) and in a $0.4 \mu\text{m}$ of a filtered water sample of the Des Prairies
 1236 River (blue squares).

1237 **Chapitre 6 : Conclusion**

1238 En résumé, cette étude a permis de mieux comprendre le comportement des
1239 nanoparticules d'argent en présence de colloïdes naturels en fonction du type d'enrobage, de la
1240 nature des autres colloïdes et de la concentration en calcium. En observant la différence
1241 d'agglomération des nanoparticules d'argent en absence et en présence de colloïdes naturels,
1242 les interactions qui se produisent entre ces derniers ont pu être caractérisées. Deux types de
1243 nanoparticules d'argent ont été étudiés lors de ce travail, soit celles avec enrobage de citrate et
1244 celles avec enrobage d'acide polyacrylique. En effet, une différence significative a été
1245 observée pour un type de nanoparticules d'argent ayant un enrobage de citrate. Cependant, les
1246 nanoparticules d'argent avec enrobage d'acide polyacrylique n'ont pas montré signe
1247 d'homoagglomération ni d'hétéroagglomération aux concentrations de calcium étudiées. Une
1248 étude approfondie des résultats obtenus avec les nanoparticules d'argent avec enrobage
1249 d'acide polyacrylique a montré qu'une très faible proportion des particules avait des
1250 interactions avec les SiO₂ colloïdales et les particules d'argile. La mobilité de ces
1251 nanomatériaux peut être déduite à partir de ces informations concernant la stabilité et le
1252 potentiel d'interaction avec l'environnement pour les deux types de nanoparticules étudiés.
1253 Ainsi, les nAg-cit qui interagissent avec les colloïdes naturels pourraient présenter une
1254 mobilité similaire à ces derniers tandis que les nAg-PAA, qui n'ont pas montré d'interaction
1255 avec les colloïdes naturels, risquent de se déplacer plus rapidement une fois dans
1256 l'environnement^{33,37,39}.

1257 Le marquage covalent des nanoparticules est une étape nécessaire à la méthode FCS.
1258 Surtout lorsque les expériences se veulent représentatives d'un milieu environnemental, il faut
1259 que la détection des nanoparticules d'intérêt puisse s'effectuer dans une matrice plus complexe
1260 par exemple en présence d'ions en solution, à différentes forces ioniques, différents pH, en
1261 présence de colloïdes naturels et en présence de matière organique naturelle. Cependant, le
1262 marquage doit conserver le plus possible les propriétés de surface d'origine des nanoparticules
1263 afin que l'information obtenue sur leur stabilité soit le plus représentative de la stabilité réelle
1264 une fois dans l'environnement. En somme, le marquage covalent est l'étape limitante de cette

1265 méthode bien qu'elle permette la détection des nanoparticules dans des matrices complexes à
1266 de faibles concentrations.

1267 La concentration des nanoparticules est aussi un facteur clé de cette étude. En limitant
1268 la concentration à 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ d'argent, les conditions expérimentales sont beaucoup plus
1269 représentatives des conditions environnementales qu'à plus haute concentration de
1270 nanoparticules. Puisqu'il est connu que la concentration des nanoparticules d'argent dans
1271 l'environnement est très faible (de l'ordre des faibles $\mu\text{g L}^{-1}$ ou moins), les interactions
1272 possibles entre nanoparticules sont très limitées tandis que les interactions entre nanoparticules
1273 et autres colloïdes naturels ou autres composantes d'un milieu environnemental sont plus
1274 fréquentes et par le fait même favorisées ^{25, 37, 39, 70}.

1275 Le pH est aussi connu pour son influence sur l'agglomération des nanoparticules ¹⁵. La
1276 plupart des expériences montrées dans cette étude ont été effectuées à pH 7,0 tandis que peu
1277 d'expérience à pH 5,0 sont montrées. En effet, un manque de nanoparticules marquées a forcé
1278 de terminer les expériences à pH 7,0 au détriment des expériences à pH 5,0.

1279 La méthode FCS est très prometteuse en ce qui a trait à l'étude de particules marquées.
1280 Les autres méthodes d'étude concernant l'hétéroagglomération pourrait orienter leur technique
1281 d'approche de façon similaire à la méthode FCS et ainsi pourrait bénéficier d'une sensibilité
1282 accrue. La principale difficulté des milieux environnementaux est qu'il faut une méthode
1283 capable de bien travailler à de très faibles concentrations. Même si la méthode FCS nécessite
1284 de modifier chimiquement la surface des nanoparticules, elle peut facilement être combinée à
1285 d'autres techniques d'analyse afin d'approfondir les observations et ainsi obtenir une
1286 conclusion plus représentative du comportement réel des nanoparticules dans l'environnement.
1287 Par exemple, les résultats obtenus avec la méthode de microscopie en champ sombre couplée à
1288 l'imagerie hyperspectrale ont été comparés avec ceux de la méthode FCS. Cette méthode est
1289 quant à elle aussi très prometteuse surtout au niveau de l'étude de la modification chimique
1290 des nanoparticules ^{53, 55, 63}. À partir de la librairie spectrale construite avec les échantillons de
1291 matrice, il est possible de faire la cartographie des signaux correspondant aux nanoparticules.
1292 Ainsi, cette technique permet de vérifier les différentes interactions ayant lieu dans
1293 l'échantillon. À partir des images obtenues, l'agglomération de nAg-cit a été observée. Des
1294 signaux correspondants aux nanoparticules d'argent ont été observés près de signaux

1295 correspondants aux colloïdes naturels. Dans ces images, il y avait aussi présence
1296 d'homoagglomération probablement causée par la concentration de nAg-cit qui était plus
1297 grande que celle utilisée avec la méthode FCS due à une limitation de la technique.

1298 Les analyses effectuées en eaux naturelles ont permis de confirmer les observations
1299 effectuées obtenues à partir d'échantillons fabriqués en laboratoire. Les conditions idéales
1300 pour une étude d'hétéroagglomération seraient que tous les échantillons soient préparés à
1301 partir d'eau naturelle. Ainsi, il serait certain que les conditions sont bel et bien représentatives
1302 d'un milieu environnemental. Cependant, pour un même environnement, il est rare que les
1303 conditions soient les mêmes, puisque l'environnement est un milieu très hétérogène. Par
1304 conséquent, ce type d'analyse procure des informations pour seulement une condition à la fois.

1305 Puisque la plupart des nanoparticules d'argent retrouvées dans l'environnement passe à
1306 travers le traitement des eaux usées, il serait intéressant d'effectuer des études
1307 d'hétéroagglomération similaires avec des nanoparticules d'argent ayant subies le même
1308 traitement chimique utilisé dans les stations de traitement des eaux usées.

1309

Bibliographie

1. Bradford, A.; Handy, R. D.; Readman, J. W.; Atfield, A.; Muehling, M., Impact of Silver Nanoparticle Contamination on the Genetic Diversity of Natural Bacterial Assemblages in Estuarine Sediments. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*, (12), 4530-4536.
2. Cao, G., *Nanostructures and Nanomaterials*. Imperial College Press: University of Washington, USA, 2004.
3. Rejeski, D., T. Kuiken, and E. Pauwels, Nanotech-enable Consumer Products Continue to Rise. In 2011.
4. Krug, H. F., Nanosafety Research-Are We on the Right Track? *Angewandte Chemie-International Edition* **2014**, *53*, (46), 12304-12319.
5. Yamanaka, M.; Hara, K.; Kudo, J., Bactericidal actions of a silver ion solution on Escherichia coli, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, *71*, (11), 7589-7593.
6. Feng, Q. L.; Wu, J.; Chen, G. Q.; Cui, F. Z.; Kim, T. N.; Kim, J. O., A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, *52*, (4), 662-668.
7. Benn, T. M.; Westerhoff, P., Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science & Technology* **2008**, *42*, (11), 4133-4139.
8. Chopra, I., The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2007**, *59*, (4), 587-590.
9. Li, L. X. Y.; Hartmann, G.; Doblinger, M.; Schuster, M., Quantification of Nanoscale Silver Particles Removal and Release from Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany. *Environmental Science & Technology* **2013**, *47*, (13), 7317-7323.
10. Dowling, A., *Nanoscience and Nanotechnology : Opportunities and Uncertainties*. The Royal Society & The Royal Academy of Engineering: London, 2004.
11. Wilkinson, K. J.; Lead, J. R., *Environmental Colloids and Particles*. John Wiley and Sons: England, 2007; Vol. 10, p 687.

12. Holthoff, H.; Schmitt, A.; FernandezBarbero, A.; Borkovec, M.; CabrerizoVilchez, M. A.; Schurtenberger, P.; HidalgoAlvarez, R., Measurement of absolute coagulation rate constants for colloidal particles: Comparison of single and multiparticle light scattering techniques. *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, *192*, (2), 463-470.
13. Afrooz, A. R. M. N.; Khan, I. A.; Hussain, S. M.; Saleh, N. B., Mechanistic Heteroaggregation of Gold Nanoparticles in a Wide Range of Solution Chemistry. *Environmental Science & Technology* **2013**, *47*, (4), 1853-1860.
14. Li, X.; Lenhart, J. J., Aggregation and Dissolution of Silver Nanoparticles in Natural Surface Water. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, (10), 5378-5386.
15. Elzey, S.; Grassian, V. H., Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments. *J. Nanopart. Res.* **2010**, *12*, (5), 1945-1958.
16. Li, X.; Lenhart, J. J.; Walker, H. W., Aggregation Kinetics and Dissolution of Coated Silver Nanoparticles. *Langmuir* **2012**, *28*, (2), 1095-1104.
17. Baalousha, M.; Nur, Y.; Roemer, I.; Tejamaya, M.; Lead, J. R., Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. *Science of the Total Environment* **2013**, *454*, 119-131.
18. Furman, O.; Usenko, S.; Lau, B. L. T., Relative Importance of the Humic and Fulvic Fractions of Natural Organic Matter in the Aggregation and Deposition of Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* **2013**, *47*, (3), 1349-1356.
19. El Badawy, A. M.; Scheckel, K. G.; Suidan, M.; Tolaymat, T., The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Science of the Total Environment* **2012**, *429*, 325-331.
20. Zook, J. M.; Halter, M. D.; Cleveland, D.; Long, S. E., Disentangling the effects of polymer coatings on silver nanoparticle agglomeration, dissolution, and toxicity to determine mechanisms of nanotoxicity. *J. Nanopart. Res.* **2012**, *14*, (10).
21. Gregor Trefalt; Borkovec, M. Overview of DLVO Theory. <http://www.colloid.ch/index.php?name=dlvo>

22. Eric Balnois; Georg Papastavrou; Wilkinson, K. J., Force Microscopy and Force Measurements of Environmental Colloids. In *Environmental Colloids and Particles*, Lead, K. J. W. a. J. R., Ed. John Wiley & Sons: 2007; Vol. 10.
23. Cosgrove, T., *Colloid Science: Principles, Methods and Applications*. 2e ed. ed.; United Kingdom, 2010.
24. Vigil, G.; Xu, Z. H.; Steinberg, S.; Israelachvili, J., INTERACTIONS OF SILICA SURFACES. *Journal of Colloid and Interface Science* **1994**, *165*, (2), 367-385.
25. Ian G. Droppo; Gary G. Leppard; Steven N. Liss; Milligan, T. G., *Flocculation in natural and engineered environmental systems*. CRC Press: United States of America, 2005.
26. Gitipour, A.; El Badawy, A.; Arambewela, M.; Miller, B.; Scheckel, K.; Elk, M.; Ryu, H.; Gomez-Alvarez, V.; Domingo, J. S.; Thiel, S.; Tolaymat, T., The Impact of Silver Nanoparticles on the Composting of Municipal Solid Waste. *Environmental Science & Technology* **2013**, *47*, (24), 14385-14393.
27. Angel, B. M.; Batley, G. E.; Jarolimek, C. V.; Rogers, N. J., The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere* **2013**, *93*, (2), 359-365.
28. Buffle, J.; Wilkinson, K. J.; Stoll, S.; Filella, M.; Zhang, J. W., A generalized description of aquatic colloidal interactions: The three-colloidal component approach. *Environmental Science & Technology* **1998**, *32*, (19), 2887-2899.
29. Buffle, J.; Leeuwen, H. P. v., *Environmental Particles*. Lewis publishers, inc.: United-States, 1992; Vol. 1, p 554.
30. Khanh An, H.; McCaffery, J. M.; Chen, K. L., Heteroaggregation of Multiwalled Carbon Nanotubes and Hematite Nanoparticles: Rates and Mechanisms. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, (11), 5912-5920.
31. Khanh An, H.; McCaffery, J. M.; Chen, K. L., Heteroaggregation Reduces Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles: Evidence for Nanoparticle–Cell Proximity Effects. *Environmental Science & Technology* **2014**, 361-366.
32. Lin, W.; Kobayashi, M.; Skarba, M.; Nu, C. D.; Galletto, P.; Borkovec, M., Heteroaggregation in binary mixtures of oppositely charged colloidal particles. *Langmuir* **2006**, *22*, (3), 1038-1047.

33. Quik, J. T. K.; Velzeboer, I.; Wouterse, M.; Koelmans, A. A.; van de Meent, D., Heteroaggregation and sedimentation rates for nanomaterials in natural waters. *Water Research* **2014**, *48*, 269-279.
34. Yu, W. L.; Matijevic, E.; Borkovec, M., Absolute heteroaggregation rate constants by multiangle static and dynamic light scattering. *Langmuir* **2002**, *18*, (21), 7853-7860.
35. Zhou, D.; Abdel-Fattah, A. I.; Keller, A. A., Clay Particles Destabilize Engineered Nanoparticles in Aqueous Environments. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, (14), 7520-7526.
36. Praetorius, A.; Labille, J.; Scheringer, M.; Thill, A.; Hungerbuhler, K.; Bottero, J. Y., Heteroaggregation of Titanium Dioxide Nanoparticles with Model Natural Colloids under Environmentally Relevant Conditions. *Environmental Science & Technology* **2014**, *48*, (18), 10690-10698.
37. Therezien, M.; Thill, A.; Wiesner, M. R., Importance of heterogeneous aggregation for NP fate in natural and engineered systems. *Science of the Total Environment* **2014**, *485*, 309-318.
38. Quik, J. T. K.; van de Meent, D.; Koelmans, A. A., Simplifying modeling of nanoparticle aggregation-sedimentation behavior in environmental systems: A theoretical analysis. *Water Research* **2014**, *62*, 193-201.
39. Tian, Y.; Gao, B.; Silvera-Batista, C.; Ziegler, K. J., Transport of engineered nanoparticles in saturated porous media. *Journal of Nanoparticle Research* **2010**, *12*, (7), 2371-2380.
40. Pelley, A. J.; Tufenkji, N., Effect of particle size and natural organic matter on the migration of nano- and microscale latex particles in saturated porous media. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *321*, (1), 74-83.
41. Song, J. E.; Phenrat, T.; Marinakos, S.; Xiao, Y.; Liu, J.; Wiesner, M. R.; Tilton, R. D.; Lowry, G. V., Hydrophobic Interactions Increase Attachment of Gum Arabic- and PVP-Coated Ag Nanoparticles to Hydrophobic Surfaces. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, (14), 5988-5995.

42. Kurkuri, M. D.; Lee, J. R.; Han, J. H.; Lee, I., Electroactive behavior of poly(acrylic acid) grafted poly(vinyl alcohol) samples, their synthesis using a Ce-(IV) glucose redox system and their characterization. *Smart Materials & Structures* **2006**, *15*, (2), 417-423.
43. Sodium citrate tribasic dihydrate. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Fluka/Datasheet/71404dat.pdf>
44. Domingos, R. F.; Baalousha, M. A.; Ju-Nam, Y.; Reid, M. M.; Tufenkji, N.; Lead, J. R.; Leppard, G. G.; Wilkinson, K. J., Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*, (19), 7277-7284.
45. Golmohamadi, M. Quantifying diffusion in biofilms: from model hydrogels to living biofilms. University of Montreal, Montreal, 2012.
46. Peulen, T.-O.; Wilkinson, K. J., Diffusion of Nanoparticles in a Biofilm. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, (8), 3367-3373.
47. Schuck, P.; Balbo, A.; Brown, P. H.; Zhao, H., *Analytical ultracentrifugation*. R.A. Meyers ed.; John Wiley & Sons: United States of America, 2010.
48. Pharma, C. Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation (SV-AUC). [http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/analytical-ultracentrifugation-\(sv-auc\)/](http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/analytical-ultracentrifugation-(sv-auc)/)
49. Diaz, L.; Peyrot, C.; Wilkinson, K. J., Characterization of Polymeric Nanomaterials Using Analytical Ultracentrifugation. *Environmental Science & Technology* **2015**, *49*, (12), 7302-7309.
50. Carney, R. P.; Kim, J. Y.; Qian, H.; Jin, R.; Mehenni, H.; Stellacci, F.; Bakr, O. M., Determination of nanoparticle size distribution together with density or molecular weight by 2D analytical ultracentrifugation. *Nature Communications* **2011**, *2*.
51. Omoto, C. K. Using Darkfield Microscopy To Enhance Contrast: An Easy and Inexpensive Method. <http://public.wsu.edu/~omoto/papers/darkfield.html> (November 10),
52. Masson, J.-F. Spectroscopie Analytique. https://studium.umontreal.ca/pluginfile.php/792835/mod_resource/content/1/CHM6160_Microscopie_complet_v2.pdf

53. Gary A. Roth; Sahil Tahiliani; Nicole M. Neu-Baker; Brenner, S. A., Hyperspectral microscopy as an analytical tool for nanomaterials. *Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2015**.
54. Weinkauff, H.; Brehm-Stecher, B. F., Enhanced dark field microscopy for rapid artifact-free detection of nanoparticle binding to *Candida albicans* cells and hyphae. *Biotechnology Journal* **2009**, *4*, (6), 871-879.
55. Patskovsky, S.; Bergeron, E.; Rioux, D.; Simard, M.; Meunier, M., Hyperspectral reflected light microscopy of plasmonic Au/Ag alloy nanoparticles incubated as multiplex chromatic biomarkers with cancer cells. *Analyst* **2014**, *139*, (20), 5247-5253.
56. Nicolas Fatin-Rouge; Buffle., J., Study of Environmental Systems by Means of Fluorescence Correlation Spectroscopy. In *Environmental Colloids and Particles*, Lead, K. J. W. a. J. R., Ed. 2007; Vol. 10.
57. Gendron, P. O.; Avaltroni, F.; Wilkinson, K. J., Diffusion Coefficients of Several Rhodamine Derivatives as Determined by Pulsed Field Gradient-Nuclear Magnetic Resonance and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Journal of Fluorescence* **2008**, *18*, (6), 1093-1101.
58. Hadioui, M.; Leclerc, S.; Wilkinson, K. J., Multimethod quantification of Ag⁺ release from nanosilver. *Talanta* **2013**, *105*, 15-19.
59. Labille, J.; Harns, C.; Bottero, J. Y.; Brant, J. A., Heteroaggregation of titanium dioxide nanoparticles with natural clay colloids. *Environ Sci Technol* **2015**.
60. Jian Zhao; Feifei Liu; Zhenyu Wang; Xuesong Cao; Xing., B., Heteroaggregation of Graphene Oxide with Minerals in Aqueous Phase. *Environmental Science & Technology* **2015**.
61. Aladdin Pramanik; Widengren., J., Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). In *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, 2006.
62. Tcherniak, A.; Prakash, A.; Mayo, J. T.; Colvin, V. L.; Link, S., Fluorescence Correlation Spectroscopy of Magnetite Nanocrystal Diffusion. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, (3), 844-848.
63. Mortimer, M.; Gogos, A.; Bartolome, N.; Kahru, A.; Bucheli, T. D.; Slaveykova, V. I., Potential of Hyperspectral Imaging Microscopy for Semi-quantitative Analysis of

Nanoparticle Uptake by Protozoa. *Environmental Science & Technology* **2014**, *48*, (15), 8760-8767.

64. Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q., Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2007**, *58*, (1), 3-7.

65. Petosa, A. R.; Oehl, C.; Rajput, F.; Tufenkji, N., Mobility of nanosized cerium dioxide and polymeric capsules in quartz and loamy sands saturated with model and natural groundwaters. *Water Research* **2013**, *47*, (15), 5889-5900.

66. Leclerc, S.; Wilkinson, K. J., Bioaccumulation of Nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii*-Nanoparticle or the Free Ion? *Environmental Science & Technology* **2014**, *48*, (1), 358-364.

67. Sonnichsen, C.; Reinhard, B. M.; Liphardt, J.; Alivisatos, A. P., A molecular ruler based on plasmon coupling of single gold and silver nanoparticles. *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, (6), 741-745.

68. Johnson, A. C.; Jurgens, M. D.; Lawlor, A. J.; Cisowska, I.; Williams, R. J., Particulate and colloidal silver in sewage effluent and sludge discharged from British wastewater treatment plants. *Chemosphere* **2014**, *112*, 49-55.

69. Ruehrwein, R. A.; Ward, D. W., Mechanism of clay aggregation by polyelectrolytes. *Soil Science* **1952**, *73*, (6), 485-492.

70. Zhou, D. X.; Abdel-Fattah, A. I.; Keller, A. A., Clay Particles Destabilize Engineered Nanoparticles in Aqueous Environments. *Environmental Science & Technology* **2012**, *46*, (14), 7520-7526.