



**HAL**  
open science

## Impact des systèmes de traitement du lisier dans le transfert des perturbateurs endocriniens et des antibiotiques vers l'environnement naturel

S. Combalbert, M.J. Capdeville, A.M. Pourcher, H. Budzinski, P. Dabert, N. Bernet, H. Hernandez Raquet

### ► To cite this version:

S. Combalbert, M.J. Capdeville, A.M. Pourcher, H. Budzinski, P. Dabert, et al.. Impact des systèmes de traitement du lisier dans le transfert des perturbateurs endocriniens et des antibiotiques vers l'environnement naturel. 42èmes Journées de la Recherche Porcine, Paris., Feb 2010, Paris, France. p. 291 - p. 296. hal-00620670

**HAL Id: hal-00620670**

**<https://hal.science/hal-00620670>**

Submitted on 8 Sep 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Impact des systèmes de traitement du lisier dans le transfert des perturbateurs endocriniens et des antibiotiques vers l'environnement naturel

*Sarah COMBALBERT (1), Marion-Justine CAPDEVILLE (2), Anne-Marie POURCHER (3-4), Hélène BUDZINSKI (2), Patrick DABERT (3-4), Nicolas BERNET (1) et Guillermina HERNANDEZ-RAQUET (1)*

*(1) INRA UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, 11100 Narbonne*

*(2) Institut des Sciences Moléculaires, UMR 5255 CNRS Groupe de Physico- et Toxic-Chimie de l'environnement, Université Bordeaux 1, 33405 Talence*

*(3) Cemagref, UR GERE, F-35044 Rennes (4) Université Européenne de Bretagne*

## **Impact des systèmes de traitement du lisier dans le transfert des perturbateurs endocriniens et des antibiotiques vers l'environnement naturel**

L'épandage agricole du lisier porcin permet la fertilisation des sols et la valorisation du lisier. Cependant, ce dernier contient divers composés qui peuvent impacter négativement les organismes vivants. Parmi ces composés, on retrouve les hormones stéroïdes produites naturellement par les animaux ainsi que les antibiotiques utilisés pour lutter contre les infections microbiennes. Une fois transférés dans l'environnement, ces composés peuvent provoquer des altérations des fonctions de reproduction des organismes supérieurs ou la sélection de phénomènes de résistance chez les microorganismes du sol.

Les travaux réalisés ont pour objectif d'évaluer la dégradation des composés antibiotiques et perturbateurs endocriniens au travers des filières de gestion de lisiers porcins. Pour cela, nous avons analysé les hormones (GC/MS) et les antibiotiques (LC/MS/MS) dans deux modes de gestion des effluents porcins utilisés en France : la fosse de stockage et la filière de traitement biologique par boues activées. Également, l'abondance des entérobactéries présentant des antibiorésistances dans ces systèmes a été déterminée. Nos résultats montrent que, comparé à la fosse de stockage, la filière qui inclut un traitement aérobie apparaît comme une solution efficace pour limiter la dissémination des polluants chimiques et biologiques dans l'environnement via les pratiques d'épandage.

## **Impact of swine manure treatment systems on the transfer of endocrine disrupters and antibiotics to the natural environment**

Swine manure is generally disposed on agricultural soils as a fertilizer. However, these wastes contain different compounds that may have a negative effect on living organisms. Between these compounds, it is possible to find steroid estrogens, naturally produced by animals, as well as antibiotics, used for microbial disease control. In the environment, these compounds may alter reproductive functions in animals or the selection of microbial resistant organisms in soils microflora.

The objective of this study was to assess the degradation of antibiotics and endocrine disrupting compounds through different swine waste treatment facilities. For that, we have analysed steroid hormones (GC/MS) and antibiotics (LC/MS/MS) in the two different types of swine waste treatment processes used in France: the storage pit and the biological treatment by activated sludge. Simultaneously, we have determined the abundance of enterobacteria showing antibiotic resistance in these systems. Our results showed that, compared to the storage pits, the systems including biological aerobic treatment were more efficient to limit the dispersion of chemical and biological contaminants to the environment via manure spreading practices.

## INTRODUCTION

Pendant la dernière décennie, la détection fréquente de composés pharmaceutiques et de perturbateurs endocriniens dans l'environnement a suscité une grande préoccupation scientifique et publique. En effet, ces micropolluants présentent un risque écotoxicologique envers les organismes vivants qui n'est pas complètement évalué.

Les rejets issus de l'élevage sont une source avérée de composés perturbateurs endocriniens et d'antibiotiques pour l'environnement. Les animaux d'élevage produisent des quantités non négligeables d'hormones, particulièrement estradiol, estriol et estrone (Langue et *al.*, 2002). Ces molécules présentent un très haut pouvoir œstrogénique et des concentrations de l'ordre du ng/L sont suffisantes pour induire des troubles de la reproduction chez diverses espèces de poissons et d'autres organismes aquatiques (Desbrow et *al.*, 1998). Egalement, dans les exploitations agricoles, des composés pharmaceutiques, principalement des antibiotiques, sont régulièrement utilisés afin d'améliorer l'état sanitaire des animaux, notamment en post sevrage. Ces composés et/ou leurs métabolites se retrouvent dans les déjections animales qui sont traditionnellement utilisées dans l'agriculture pour enrichir les sols en nutriments (C, N, P). A travers l'épandage des déchets agricoles, les hormones et les composés pharmaceutiques sont ainsi dispersés dans les sols et peuvent donc contaminer à la fois notre environnement aquatique et édaphique. Par exemple, les hormones présentes dans les eaux de surface proches des rejets de stations d'épuration urbaines sont responsables de la féminisation de certaines espèces de poissons (Routledge et *al.*, 1998). De même, la persistance des antibiotiques dans les eaux sélectionne des micro-organismes résistants aux antibiotiques (Kemper, 2008).

En Europe, la France est le troisième producteur de viande porcine. Ainsi, 28 millions de tonnes du lisier traité ou non sont épandus sur le sol français chaque année.

L'augmentation des capacités d'accueil et la concentration des exploitations agricoles dans certaines régions posent un problème de gestion d'effluents. Ainsi, pour satisfaire à la réglementation (Directive nitrate européenne 91/676/CEE) de nombreux élevages traitent leurs effluents à l'aide de procédés biologiques d'épuration (Levasseur et Lemaire, 2006). Ces systèmes permettent l'abattement de 70% de l'azote et l'exportation de jusqu'à 80% du phosphore des effluents hors des zones sensibles (Béline et *al.*, 2003). Ils permettent également une réduction des concentrations en germes pathogènes (Pourcher et *al.*, 2008). Cependant, à ce jour, ils n'ont pas été testés pour leur capacité à éliminer les micropolluants émergents tels que les hormones stéroïdes ou les composés pharmaceutiques. Les objectifs de cette étude sont d'évaluer les flux des composés œstrogéniques et pharmaceutiques issus des déchets d'élevage dans deux systèmes de gestion du lisier porcin : la fosse de stockage non agitée et la filière de traitement biologique par boues activées et de déterminer l'abondance des entérobactéries présentant des antibiorésistances dans ces systèmes.

## 1. MATERIEL ET METHODES

**Sites Etudiés.** Les prélèvements de lisier ont été effectués dans 6 élevages naisseur-engraisseur bretons de 150 à 300 truies. Pour trois élevages, les lisiers sont stockés dans des fosses sans

agitation durant quatre à six mois avant épandage (gestion type 1, par fosse de stockage). Pour les trois autres élevages, le lisier subit une première phase de séparation mécanique puis la phase liquide est traitée par un réacteur d'aération séquentiel (traitement de l'azote) suivi d'un ouvrage de décantation du lisier aéré qui permet un stockage séparé des boues (fosse à boues) et de la phase liquide issue du traitement (lagune) (gestion type 2, par traitement biologique). Les lisiers bruts ont été prélevés au niveau des bâtiments d'élevage et correspondent à un temps de stockage en préfosse de moins d'un mois. Les lisiers stockés ont été prélevés mensuellement pendant 5 mois dans les fosses de stockage après un brassage de 15 à 30 min à l'aide d'un homogénéisateur résident. Pour les filières de traitement biologique, les lisiers bruts et les boues activées ont été homogénéisés 20 à 30 min. Pour les boues stockées et les lagunes, quatre prélèvements ont été effectués en 4 zones différentes pour obtenir un échantillon représentatif.

Pour l'analyse chimique, les échantillons liquides sont séparés des fractions solides par centrifugation (2 fois, 17 700 g, 20 min) dans un délai de 12h puis filtration (0,7µm) dans un délai maximum de 48h et conservés à -20°C. Les résultats présentés ici ne concernent que les phases liquides des lisiers, les phases solides étant toujours en cours d'analyse.

**Analyse des Hormones.** Les composés analysés sont : estrone (E1), 17α-estradiol (E2α), 17β-estradiol (E2β), estriol (E3), progestérone (Pg) et testostérone (T). Les hormones conjuguées, qui sont les formes d'excrétion présentes dans les urines, ont également été déterminées. Dans les échantillons liquides le pH est ajusté entre 3 et 5 et additionné de standards internes deutérés. L'extraction des hormones se fait par extraction en phase solide (SPE) avec des cartouches OASIS-HLB (Waters). L'élution des hormones conjuguées et libres se fait successivement, grâce à un mélange MeOH/eau 80:20 et TEA 5mM puis du MeOH 100%. La fraction conjuguée est déconjuguée successivement par hydrolyse chimique et enzymatique. Les hormones déconjuguées sont extraites à nouveau grâce à une étape de SPE sur cartouches OASIS-HLB. Les fractions libres et déconjuguées sont finalement purifiées sur colonnes LC-NH2 (Supelco). Le dosage des hormones se fait en chromatographie gazeuse (Perkin Elmer, Auto System XL) couplée à de la spectrométrie de masse (Perkin Elmer, Turbo Mass Gold). La colonne utilisée est Elite 5MS (Perkin Elmer, 30m x 0,25mm, 0,25µm) (Labadie et Budzinski, 2006 ; Muller et *al.*, 2008).

**Analyse des antibiotiques.** 52 antibiotiques sont analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS). Le pH des échantillons est ajusté à 7 et 2 mL d'une solution concentrée d'EDTA sont ajoutés (10 mM final) puis 30 µL d'une solution mélange d'étalon interne. Les antibiotiques sont extraits par SPE sur des cartouches Oasis HLB (Waters). Les extraits sont repris dans 300 µL d'un mélange 90/10 eau/ACN, correspondant au départ du gradient chromatographique. Les composés sont analysés par LC/MS/MS. Le spectromètre de masse est le triple quadropole 6410A de chez Agilent. La chaîne chromatographique est une chaîne 1200 de chez Agilent sur laquelle est montée une colonne SB-Zorbax C<sub>18</sub> (5 ou 10 cm ; 2,1mm de diamètre interne et de 1,8 µm de porosité)

**Antibiorésistance.** La présence de germes résistants aux antibiotiques a été évaluée par le dénombrement des *Enterobacteriaceae* qui font parti de la flore commensale des

porcs. Dans un premier temps, les concentrations d'antibiotique nécessaires à l'inhibition de la croissance des *Enterobacteriaceae* ont été déterminées à partir d'un lisier de porcs non traités par antibiothérapie. Une concentration inhibitrice a ainsi été déterminée. Le dénombrement des *Enterobacteriaceae* totales et résistantes a été obtenu par étalement de différentes dilutions des échantillons sur milieu sélectif sans ou avec 3 concentrations différentes d'antibiotique encadrant la concentration inhibitrice mesurée précédemment. La présence d'*Enterobacteriaceae* résistantes à la ciprofloxacine (0,03 ; 0,06 et 0,125 mg/L), à l'acide nalidixique (4 ; 8 et 16 mg/L) et à la tétracycline (32 ; 64 et 128 mg/L) a été recherchée pour 3 élevages et dans 4 matrices correspondant aux lisiers bruts, aux boues activées, aux boues stockées en fosse et aux eaux de lagunes issues du traitement.

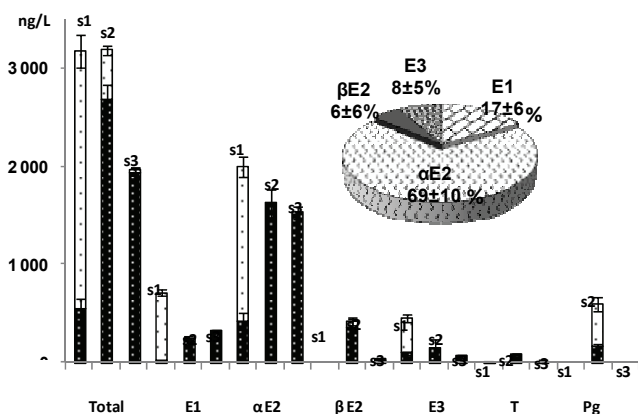
Pour chaque antibiotique, chaque concentration testée et chaque matrice, le pourcentage de bactéries résistantes a été estimé en comparant le nombre de bactéries présentes sur le milieu VRBG (nombre total) au nombre de bactéries présentes sur le milieu VRBG additionné d'antibiotique (nombre ATB).

% bactéries résistantes =  $100 \times (\text{nb ATB}) / (\text{nb total})$

Chaque dénombrement étant réalisé en duplicat, le pourcentage moyen de bactéries résistantes correspond à la moyenne des deux pourcentages obtenus pour chaque duplicat.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

**Devenir des Hormones.** Les concentrations totales en hormones mesurées dans la fraction liquide des lisiers bruts prélevés sur deux élevages différents et sur trois mois successifs (Figure 1) varient entre 3 000ng/L et 3 500ng/L.



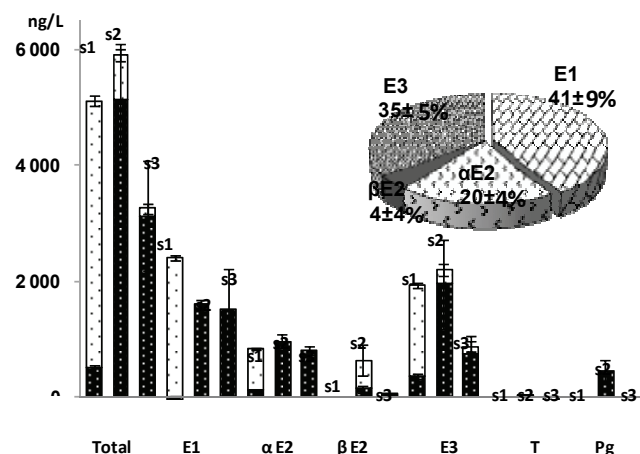
**Figure 1.** Concentrations en hormones mesurées dans la fraction liquide du lisier brut d'un bâtiment de post sevrage.

Les résultats sont reportés pour trois dates de prélèvement (s1): 8 juillet 2008, (s2): 28 juillet 2008 et (s3): 27 août 2008.

Les composés majoritairement et régulièrement présents sont E1, αE2 et E3. La présence de βE2, T et Pg est très aléatoire selon la date de prélèvement et les concentrations relevées sont faibles. Ces lisiers ont été prélevés dans les préfosse des bâtiments de post-sevrage et d'engraissement. La testostérone (hormone mâle sécrétée principalement dans les testicules) et la progestérone (sécrétée par les femelles gestantes) ne sont donc que très faiblement représentées. La contribution de la fraction conjuguée est extrêmement variable en fonction de la date de prélèvement.

Dans les lisiers stockés, les concentrations en hormones totales relevées pour 2 élevages et sur les trois dates de

prélèvement varient entre 3 000ng/L et 6 000ng/L (Figure 2), avec une tendance à la concentration par comparaison avec le Lisier Brut. βE2, T et Pg sont des composés marginaux sur les deux sites.



**Figure 2.** Concentrations en hormones dans la fraction liquide du lisier stocké d'un élevage naisseur engraisseur. Les résultats sont reportés pour trois dates de prélèvement (s1): 8 juillet 2008, (s2): 28 juillet 2008 et (s3): 27 août 2008.

Dans la filière de traitement biologique, les concentrations en hormones diminuent fortement après le bassin aérobie et lors

Composé	Lisier Brut	Bassin aérobie	Lagune
	ng/L	ng/L	ng/L
E1	3750	26	LD
E2	35	11	LD
E3	3827	18	3
E1c	16	LD	LD
E2c	LD	LD	LD
E3c	366	5	LD

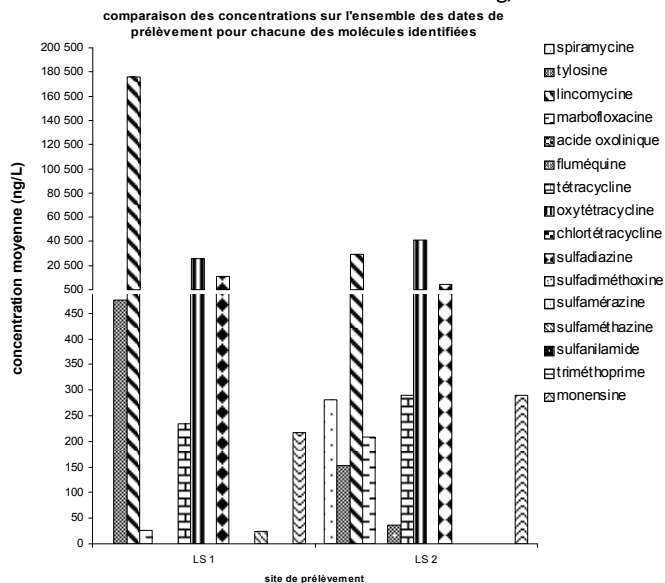
du lagunage (Tableau 1).

**Tableau 1 :** Concentrations des hormones mesurées dans la filière de traitement biologique des lisiers.

**Devenir des antibiotiques.** D'un point de vu qualitatif, sur les 23 ou 52 molécules recherchées dans les lisiers issus des filières simples de traitement, 16 ont été détectées. Il s'agit de la spiramycine, de la tylosine, de la lincomycine, de la marbofloxacine, de l'acide oxolinique, de la fluméquine, de la tétracycline, de l'oxytétracycline, de la sulfadiazine, de la sulfadiméthoxine, de la sulfanilamide, de la sulfaméthazine, de la sulfamérazine, du triméthoprime, du monensine et de la chlortétracycline mais avec un doute sur l'identification de ce dernier. Sur ces 16 composés, 3 sont détectés et quantifiés dans chacun des échantillons où ils ont été recherchés. L'oxytétracycline, la lincomycine et la sulfadiazine sont donc présents dans 100% des cas. Quatre autres molécules, sont également identifiées dans plus de 50% des cas, il s'agit de la tétracycline, de la tylosine, du monensine et de la marbofloxacine. Les huit derniers composés sont retrouvés de façon occasionnelle dans les échantillons.

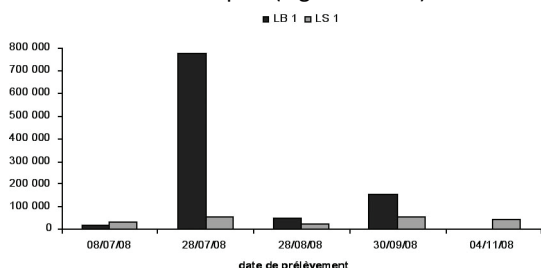
D'un point de vu quantitatif, si l'on s'attache aux concentrations mesurées dans les lisiers stockés qui représentent les valeurs les plus pertinentes d'un point de vu environnemental puisque ce sont ces lisiers qui sont épandus, on constate (Figure 3) que ce sont les 3 molécules les plus

fréquentes qui sont aussi les plus abondantes. Ces composés sont présents à des concentrations moyennes, sur l'ensemble des dates de prélèvement, proches ou supérieures à la dizaine de microgrammes par litre. Les autres molécules sont toutes dosées à des concentrations inférieures à 500 ng/L.

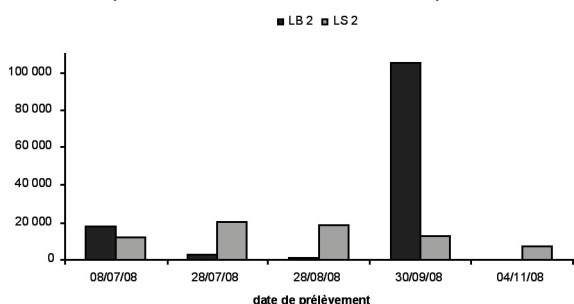


**Figure 3 :** Comparaison de l'abondance moyenne des antibiotiques détectés dans les lisiers stockés de trois élevages naisseurs engraisseurs sur 5 mois consécutifs

Enfin, l'intérêt du dosage à la fois du lisier brut et du lisier stocké est de voir si le stockage du lisier permet de diminuer les concentrations en antibiotiques avant épandage. Sur l'ensemble du suivi, en faisant une moyenne sur toutes les dates de prélèvement et tous les composés détectés, il semblerait que le stockage du lisier permet de réduire la concentration en antibiotiques (Figures 4 et 5).



**Figure 4.** Suivi saisonnier des concentrations moyennes en antibiotiques des lisiers bruts et stockés prélevés sur le site 1.



**Figure 5.** Suivi saisonnier des concentrations moyennes en antibiotiques des lisiers bruts et stockés prélevés sur le site 2.

Cependant, des mesures sont en cours pour déterminer si cette diminution est liée à une dégradation des composés dans la fosse de stockage ou à une dilution d'un lisier brut particulièrement chargé en antibiotiques par l'apport d'autre lisier moins chargé lors du brassage dans la fosse.

Des expériences complémentaires en réacteur de laboratoire, sous conditions contrôlées, nous permettront de répondre à cette question.

En ce qui concerne les filières de traitement biologique du lisier, entre le lisier brut et les eaux prélevées dans la lagune, les concentrations en antibiotiques diminuent fortement (Tableau 2) à l'exception de l'oxytétracycline dont la décroissance n'est pas marquée. Ceci peut être dû à des changements de répartition des molécules entre les phases solide, particulaire et dissoute au cours des différents processus de traitement ou à des phénomènes d'effet matriciel qui empêchent une bonne quantification dans les lisiers brut plus fortement chargés en matière organique.

**Tableau 2 :** Concentrations de certains antibiotiques (ng/L) dans les filières de traitement biologique des lisiers (LB : lisier brut ; BA : boue activée ; BE : boue d'épandage ; Lag : lagune).

Site 1	LB	BA	BE	Lag
<b>Lincomycine</b>	162 965	21 228	9 641	118
<b>Sulfadiazine</b>	5 279	247	850	321
<b>Oxytétracycline</b>	773	1 822	1 185	530
Site 2	LB	BA	BE	Lag
<b>Lincomycine</b>	239 926	41 223	92 848	892
<b>Sulfadiazine</b>	1 407	25	123	55
<b>Oxytétracycline</b>	1 159	5 341	351	1 529

**Antibiorésistance.** La concentration moyenne en entérobactéries dans les lisiers bruts, les boues activées ou stockées et les lagunes des trois élevages possédant une filière de traitement biologique a été estimée à : LB,  $2,9 \pm 0,9 \times 10^4$  germes/g ; Boues activées ou stockées,  $1,4 \pm 0,7 \times 10^3$  germes/g et lagune  $18 \pm 21$  germes/g. La proportion de bactéries résistantes aux antibiotiques dans ces effluents est significativement plus élevée que celle observée dans le lisier brut "test" de porcs n'ayant pas subi d'antibiothérapie. A titre d'exemple, pour la ciprofloxacine (0,125 mg/L) et l'acide nalidixique (8 mg/L), aucune croissance bactérienne n'a été observée pour le lisier "test", conduisant à des proportions de bactéries résistantes inférieures à 0,1%. Dans les mêmes conditions, le pourcentage de bactéries résistantes atteint 73% pour les deux antibiotiques et les trois élevages étudiés (non montré).

Concernant la filière de traitement (Figure 6), alors que la concentration en entérobactéries totales diminue d'une unité logarithmique entre le lisier brut et les boues et qu'elle est inférieure à  $10^2$  bactéries/mL dans les lagunes, le traitement biologique et le stockage des boues ne semblent pas avoir d'influence sur la proportion de bactéries résistantes aux antibiotiques.

En revanche, la proportion de bactéries résistantes diffère de manière importante d'un élevage à l'autre (Figure 6). Ainsi, si l'on ne tient compte que des valeurs obtenues pour les concentrations en antibiotiques les plus élevées, le pourcentage de bactéries résistantes n'excède pas 4% dans les effluents du premier élevage alors qu'il fluctue entre 19 et 74% dans les effluents des deux autres élevages. Il est donc possible que ces différences soient dues aux quantités d'antibiotiques administrées aux animaux. Cette dernière hypothèse pourra être confirmée par la mesure des concentrations en antibiotiques dans les effluents des trois élevages.

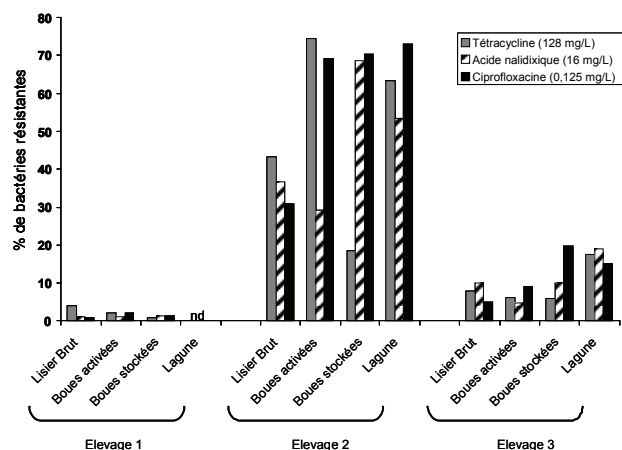


Figure 6. Suivi de l'antibiorésistance dans la filière de traitement biologique de lisier.

## CONCLUSIONS

Nos résultats montrent que pendant le stockage du lisier porcin dans des fosses non-aérées, les hormones ne sont pas éliminées, au contraire, on observe une augmentation de la concentration totale mesurée dans la fraction liquide du lisier.

Des mesures complémentaires sur la fraction solide (actuellement en cours) nous permettront de déterminer si

cette augmentation est due aux changements de répartition entre les fractions liquide-solide du lisier. Concernant les antibiotiques dans les fosses de stockage, nos résultats montrent des résultats contradictoires : une diminution dans la teneur des antibiotiques est observée dans le site 1, mais ce comportement n'est pas confirmé dans le site 2. Une analyse détaillée du devenir de chaque composé est nécessaire afin de déterminer le devenir de ces composés.

Les résultats obtenus dans la filière de traitement biologique du lisier montre une claire diminution de la teneur en hormones suite au traitement par boues activées et une diminution en antibiotique si on considère la filière dans son ensemble.

Néanmoins des mesures complémentaires, notamment de la phase solide, sont nécessaires pour tenter d'expliquer l'augmentation en antibiotique observée entre les lisiers issus du traitement par boues activées et ceux issus de la fosse de décantation.

## REMERCIEMENTS.

Les auteurs remercient les membres de la station expérimentale de l'IFIP de Romillé (35) pour la fourniture d'un lisier de porcs non traités par antibiothérapie.

Les travaux présentés bénéficient d'un financement ANR SEST et ADEME.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Béline, F., Daumer, M.L., Guiziou, F. 2003 Traitement biologique aérobie du lisier de porcs: performances des systèmes de séparation de phases et caractéristiques des co-produits, *Ingénieries-EAT*, 34, 25–33.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P. and Waldock, M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology* 32(11): 1549-1558.
- Kemper, N. 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* 8:1-13
- Labadie, P. and Budzinski, H. 2005. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381: 1199-1205.
- Lange, I. G., Daxenberger, A., Schiffer, B., Witters, H., Ibarreta, D., and Meyer, H. H. D. 2002. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta*, 473(1-2):27-37
- Levasseur P. et Lemaire N., 2006. Etat des lieux du traitement des lisiers en France. *Techniporc* vol. 29, n°1, p29-31.
- Muller, M., Rabenoelina, F., Balaguer, P., Patureau, D., Lemenach, K., Budzinski, H., Barcelo, D., De Alda, M. L., Kuster, M., Delgenes, J. P., and Hernandez-Raquet, G. 2008. Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(8):1649-1658.
- Pourcher, AM, Fravallo P., Dabert P. 2008. Impact du traitement biologique du lisier de porcs sur les germes d'intérêt sanitaire : exemple de 17 élevages bretons. *Journées Recherche Porcine*, 40, 19-24.
- Routledge, E.J. and Sumpter, J.P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 241-248.

