

中国城市污水处理厂内分泌干扰物控制优先性分析

隋倩, 黄俊, 余刚*

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要: 基于已报道的中国城市污水处理厂二级处理出水中内分泌干扰物的浓度, 分别在以出水最大浓度为背景的极端情景和以出水中位浓度为背景的一般情景下, 计算和分析了工业化学品、农药、天然雌激素、药物 4 类共 32 种内分泌干扰物的生态风险商和雌二醇当量浓度。结果表明, 在极端情景下, 分别有 12 种和 9 种物质具有生态风险和内分泌干扰性; 其中, 分别有 6 种和 5 种物质在一般情景下也具有生态风险和内分泌干扰性。在此基础上, 通过评分和排序得出在中国城市污水处理厂应当优先控制的 4 种污染物为炔雌醇、雌酮、壬基酚、双酚 A。

关键词: 内分泌干扰物; 生态风险; 雌激素活性; 污水处理

中图分类号: X83 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)02-0384-07

Priority Analysis for Controlling Endocrine Disrupting Chemicals in Municipal Wastewater Treatment Plants of China

SUI Qian, HUANG Jun, YU Gang

(Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Ecological risk quotients and estradiol equivalent concentrations of 32 endocrine disrupting chemicals (EDCs) in 4 categories were calculated and analyzed using reported concentrations in secondary effluents from municipal wastewater treatment plants in China, considering both extreme scenario for maximum concentration and moderate scenario for median concentration. These EDCs include industrial chemicals, pesticides, natural estrogens, and pharmaceuticals. In extreme scenario, 12 chemicals of ecological risk and 9 chemicals of estrogenicity were identified. While in moderate scenario, 6 chemicals of ecological risk and 5 chemicals of estrogenicity were identified. After further scoring and ranking, 4 priority EDCs have been suggested for control in municipal wastewater treatment plants in China, including 17 α -ethynylestradiol, estrone, nonylphenol, and bisphenol A.

Key words: endocrine disrupting chemicals; ecological risk; estrogenicity; wastewater treatment

内分泌干扰物是指干扰生物体内维持自稳性、调节生殖发育和其他行为的荷尔蒙的产生、代谢、结合、交互作用和排泄的外源性物质^[1]。近年来, 在河流、湖泊、海洋等天然水体中已检测出不同浓度的内分泌干扰物, 并导致部分地区水生生物出现雌性化、雌雄同体等异常现象^[2~6]。城市污水处理厂被认为是上述天然水体中内分泌干扰物的重要来源之一^[7]。现有城市污水处理厂的工艺设计和运行一般仅考虑氮、磷、化学需氧量等常规污染物的去除, 对部分内分泌干扰物的处理效果不理想^[8], 导致其随着出水排放到环境。因此, 将城市污水处理厂作为研究对象, 查明其中内分泌干扰物的存在、迁移转化情况, 开发针对内分泌干扰物的去除技术和工艺, 对预防大量内分泌干扰物进入环境有着重要的意义。然而, 由于内分泌干扰物种类繁多, 在当前条件下不可能一并对所有内分泌干扰物开展研究和控制, 需要根据内分泌干扰物在实际污水中的存在状况和现有污水处理工艺的去除效果对控制优先性加以分析。目前, 关于中国城市污水处理厂内分泌干扰物的

控制优先性分析的文献报道非常缺乏, 仅孙英^[9]分析了北京地区地表水中优先控制和监测的环境激素。该报道涉及了农药和工业化学品 2 大类内分泌干扰物, 未包括内分泌干扰性较强的天然雌激素和药物类内分泌干扰物; 同时, 缺乏内分泌干扰性的分析。因此, 本研究总结了已报道的中国城市污水处理厂二级处理出水中内分泌干扰物的浓度, 结合生态风险和内分泌干扰性, 分析了 4 大类 32 种内分泌干扰物的控制优先性。

1 材料与方法

1.1 物质

内分泌干扰物种类繁多, 美国环保局^[10, 11]、日本环境省^[12]和世界自然基金会^[13]分别列出了 74、65 和 82 种内分泌干扰嫌疑物名单, 涉及工业化学品和

收稿日期: 2008-03-09; 修订日期: 2008-05-20

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(50625823)

作者简介: 隋倩(1983~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为水中内分泌干扰物的去除原理, E-mail: suiq02@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: yg-den@tsinghua.edu.cn

农药 2 大类.而近年来,内分泌干扰性较强的天然雌激素和药物类内分泌干扰物也受到越来越广泛的关注^[8].本研究以上述 4 类物质为基础,根据其在中国城市污水处理厂二级处理出水中的存在状况^[14~33],最终选择了 32 种内分泌干扰物作为控制优先性分析的对象.

1.2 生态风险

采用商值法表征各内分泌干扰物的生态风险.将实际监测的环境暴露浓度与表征物质危害程度的毒性数据相比较,计算风险商值,如式(1)所示^[34].

表 1 不同条件下用于计算预测无影响浓度的安全系数^[35]

毒性数据类型		毒性实验类型和数据量	安全系数
I	存在针对至少 3 个营养级类别生物的最大无观察效应浓度数据(通常为鱼、水蚤或其他咸水代表生物以及藻类)		10
II	存在针对 2 个营养级类别生物的最大无观察效应浓度数据(鱼、水蚤或其他咸水代表生物、藻类)		50
III	存在针对 1 个营养级类别生物的最大无观察效应浓度数据(鱼、水蚤或其他咸水代表生物)		100
IV	存在至少 1 个营养级类别的半数有效浓度数据		1 000

表 2 各物质的预测无影响浓度与雌二醇当量因子

物质	生态风险			内分泌干扰性	
	毒性数据类型	EC ₅₀ 或 NOEC/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	PNEC/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	EEF ⁽¹⁾	文献
工业化学品					
2, 4-二氯苯酚	I	150	15 000	2.00E-06	[47]
苯并(a) 芘	III	227	2 270	—	—
双酚 A	II	5.9	118	5.00E-02	[55]
邻苯二甲酸丁苄酯	I	60	6 000	3.30E-03	[43]
氯仿	I	3 400	340 000	—	—
邻苯二甲酸二丁酯	I	100	10 000	2.57E-05	[44]
邻苯二甲酸二乙酯	I	1 650	165 000	5.00E-07	[50]
邻苯二甲酸二辛酯	II	77	1 540	0.00	[50]
邻苯二甲酸二甲酯	I	3 200	320 000	1.10E-05	[50]
壬基酚	I	5	500	1.00E-02	[49]
壬基酚聚氧乙烯醚	—	—	—	2.50E-05	[42]
辛基酚	IV	13	13	6.50E-03	[47]
多氯联苯	II	25	500	5.50E-07	[37]
甲苯	II	1 000	20 000	—	—
药物					
己烯雌酚	III	10	100	8.00	[46]
炔雌醇	II	0.000 1	0.002	8.71	[44]
农药					
乙草胺	IV	1 380	1 380	—	—
艾氏剂	IV	0.36	0.36	8.50E-03	[52]
氯丹	III	0.015	0.15	1.50E-06	[37]
DDE	IV	0.3	0.3	9.10E-05	[42]
DDT	I	0.05	5	4.66E-02	[52]
狄氏剂	I	0.06	6	2.00E-02	[52]
硫丹	II	0.032	0.64	1.20E-04	[42]
异狄氏剂	III	0.12	1.2	—	—
六六六	IV	680	680	—	—
七氯	III	1.9	19	5.70E-03	[52]
七氯环氧	—	—	—	—	—
林丹	I	0.8	80	2.90E-07	[37]
五氯苯酚	I	5	500	—	—
天然雌激素					
雌二醇	III	100	1 000	1	—
雌三醇	III	0.075	0.75	0.26	[46]
雌激素酮	II	0.008	0.16	0.59	[44]

1) 各物质雌二醇当量因子为文献[37]~[57]报道的最大值

$$\text{风险商} = \frac{\text{出水物质浓度(MEC)}}{\text{预测无影响浓度(PNEC)}} \quad (1)$$

理论上,PNEC 应建立在大量慢性毒性数据基础上.然而,实际可获得的慢性毒性数据较为缺乏,故引入安全系数(表 1),实现不同毒性数据到 PNEC 的转化^[35].各物质的毒性数据来源于美国环保局 ECOTOX 数据库^[36].根据欧盟关于风险评价的导则,以最小的半数有效浓度(EC₅₀)或最大的无观察效应浓度(NOEC)值作为 PNEC 的基础数据^[35],如表 2 所示.

图 1 各内分泌干扰物的生态风险商

乏慢性毒性数据,仅能用急性毒性数据推测生态风险,因此在出水浓度不高的情况下也被列为具有生态风险的物种。根据安全系数设定的原则,所得的 PNEC 相对较低,因此在出水浓度不高的情况下也被列为具有生态风险的物种。

表 4 中国城市污水处理厂二级处理出水中内分泌干扰物的存在状况

Table 4 Occurrence of EDCs in secondary effluents of STPs of China				
物质	出水浓度/ng•L ⁻¹			文献
	最大值	最小值	中位值	
工业化学品				
2,4-二氯苯酚	0.5	n.d. ¹⁾	n.d.	[30]
苯并(a) 芘	3	n.d.	n.d.	[29 ~ 31]
双酚 A	1 180	n.d.	44.8	[15], [16], [20], [22], [28 ~ 30]
邻苯二甲酸丁苄酯	1 000	n.d.	312.5	[24 ~ 26], [29]
氯仿	1 207	0.8	603.9	[31], [33]
邻苯二甲酸二丁酯	15 660	n.d.	1 950	[16], [24 ~ 26], [29]
邻苯二甲酸二乙酯	3 100	n.d.	550	[24 ~ 26], [29]
邻苯二甲酸二辛酯	32 800	730	2 540	[16], [24 ~ 26], [29]
邻苯二甲酸二甲酯	155	n.d.	77.5	[26], [29]
壬基酚	7 649	4.4	1 151	[14 ~ 19], [23], [28 ~ 30]
壬基酚聚氧乙烯醚	43 968	766.8	32 869	[17 ~ 19]
辛基酚	60	2.9	51.2	[15], [16], [28]
多氯联苯	44.5	5.6	18	[29 ~ 31]
甲苯	40	n.d.	5.2	[29 ~ 30]
农药				
乙草胺	4 020	960	2 490	[22]
艾氏剂	n.d.	n.d.	n.d.	[21], [30]
氯丹	n.d.	n.d.	n.d.	[30]
DDE	1.8	n.d.	n.d.	[21], [29], [30]
DDT	n.d.	n.d.	n.d.	[21], [30]
狄氏剂	n.d.	n.d.	n.d.	[21], [30]
硫丹	1.5	n.d.	n.d.	[21], [30]
异狄氏剂	n.d.	n.d.	n.d.	[21], [30]
六六六	784	8.6	32.9	[21], [29 ~ 31]
七氯	1	n.d.	n.d.	[21], [29], [30]
七氯环氧	n.d.	n.d.	n.d.	[21]
林丹	42	2.4	5.5	[21], [29 ~ 31]
五氯苯酚	11	11	11	[23]
天然雌激素				
雌二醇	23	n.d.	0.3	[15], [16], [27], [30], [32]
雌三醇	19.5	n.d.	n.d.	[15], [27], [30], [32]
雌酮	28.1	1.6	2.1	[15], [16], [27], [30], [32]
药物				
己烯雌酚	4.9	n.d.	n.d.	[15], [30]
炔雌醇	19	n.d.	0.4	[15], [16], [27], [30], [32]

1) n.d. = 未检出,余同

2.3 内分泌干扰性

情景模式 I 和 II 下各物质的内分泌干扰性如图 2 所示。

在情景模式 I 条件下,炔雌醇、壬基酚、双酚 A、己烯雌酚、雌二醇、雌酮、雌三醇、邻苯二甲酸丁苄酯、壬基酚聚氧乙烯醚 9 种物质的雌二醇当量大于 1 ng/L。在情景模式 II 条件下,壬基酚、炔雌醇、双酚 A、雌酮、邻苯二甲酸丁苄酯具有 1 ng/L 以上的雌二醇当量。

上述 9 种高内分泌干扰性物质可以清晰地划分为 2 类:以炔雌醇、己烯雌酚、雌二醇、雌酮、雌三醇为代表的药物和天然雌激素的雌二醇当量因子较高,因此在出水浓度仅几个 ng/L 的条件下,仍表现出强烈的内分泌干扰性。而尽管以壬基酚、双酚 A、邻苯二甲酸丁苄酯、壬基酚聚氧乙烯醚为代表的工业化学品的雌二醇当量因子比第 1 类物质低 2 ~ 6 个数量级,但由于其出水浓度较大,也与第 1 类物质具有类似的内分泌干扰性。

同时注意到,在情景模式Ⅰ条件下,第1类物质占全部9种物质的55.6%,而在情景模式Ⅱ条件下,上述物质仅占全部5种物质的44%;并且,最大内分泌干扰性物质也由第1类物质炔雌醇变更为第2类物质壬基酚.这是由于相比第2类物质,第1类物

质在出水中的存在状况不稳定,浓度波动较大.以炔雌醇为例,出水浓度最大值为19 ng/L^[28],最小值低于检测限^[15,32],中位值仅为最大值的1/50左右,而壬基酚出水浓度的中位值为最大值的1/6左右,2种情景模式下内分泌干扰性相差较小.

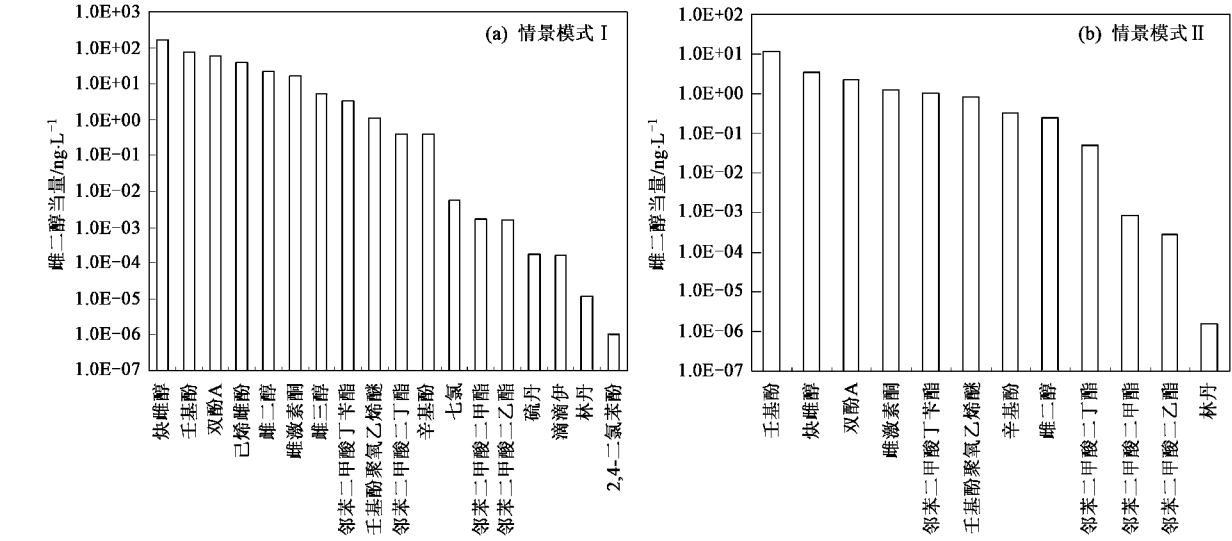


图2 各内分泌干扰物的雌二醇当量

Fig.2 EEQ of each EDC

2.4 评分和排序

对上述生态风险和内分泌干扰性进行评分,评分结果和排序见表5.

表5 各内分泌干扰物评分结果和排序

Table 5 Scoring & sorting of each EDC

排序	化学品名	评分结果		
		生态风险	内分泌干扰性	总分
1	炔雌醇	2	2	4
1	雌酮	2	2	4
1	壬基酚	2	2	4
4	双酚 A	1	2	3
5	雌三醇	1	1	2
5	辛基酚	2	0	2
5	邻苯二甲酸二辛酯	2	0	2
5	乙草胺	2	0	2
5	邻苯二甲酸丁苄酯	0	2	2
10	雌二醇	0	1	1
10	壬基酚聚氧乙烯醚	0	1	1
10	己烯雌酚	0	1	1
10	邻苯二甲酸二丁酯	1	0	1
10	硫丹	1	0	1
10	六六六	1	0	1
10	DDE	1	0	1

可以看出,炔雌醇、雌酮、壬基酚和双酚 A 的评分排名居于前列,应当优先控制.

3 结论

(1) 按照生态风险商和雌二醇当量排序,初步筛选出4种应优先控制的污染物:炔雌醇、雌酮、壬基酚、双酚 A.

(2) 目前有关中国城市污水处理厂二级处理出水中内分泌干扰物存在状况的文献报道数量有限,同时各物质毒性数据和雌二醇当量因子的文献报道结果有一定的差异,因此基于上述数据所得的筛选结果也具有一定的局限性.

参考文献:

[1] US Environmental Protection Agency (USEPA). Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis [R]. Washington, DC: Office of Research and Development, 1997. 13-14.

[2] Colborn T, Dumanoski D, Myers J P 著.唐艳鸿译.我们被偷走的未来[M].长沙:湖南科学技术出版社, 2001.1-12.

[3] Gimeno S, Gerritsen A, Bowmer T, et al. Feminization of male carp [J]. Nature, 1996, 384(6606): 221-222.

[4] Gross-Sorokin M Y, Roast S D, Brighty G C. Assessment of feminization of male fish in English rivers by the Environment Agency of England and Wales[J]. Environ Health Pers, 2006, 114(1):

147-151.

[5] Pinto B, Garritano S, Realì D. Occurrence of estrogen-like substances in the marine environment of the Northern Mediterranean Sea[J]. *Mar Pollut Bull*, 2005, **50**(12): 1681-1685.

[6] Li D H, Kim M, Oh J R, *et al.* Distribution characteristics of nonylphenols in the artificial lake Shihwa, and surrounding creeks in Korea[J]. *Chemosphere*, 2004, **56**(8): 783-790.

[7] Johnson A C, Sumpter J P. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works [J]. *Environ Sci Technol*, 2001, **35**(24): 4697-4703.

[8] Khanal S K, Xie B, Thompson M L, *et al.* Fate, transport and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems[J]. *Environ Sci Technol*, 2006, **40**(21): 6537-6546.

[9] 孙英.北京地区地表水环境激素污染现状与环境风险性评价[D].北京:中国农业大学, 2004.54-69.

[10] ILEPA. Endocrine Disruptors Strategy [R]. Springfield: Illinois Environmental Protection Agency, 1997. 15-16.

[11] USEPA. Draft list of initial pesticide active ingredients and pesticide inerts to be considered for screening under the federal food, drug, and cosmetic act [EB/OL]. <http://epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/prioritysetting/draftlist.htm>, 2007-11-02.

[12] 日本環境庁環境保健部.内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質[EB/OL]. http://www.env.go.jp/chemi/kurohon/http1998/html/speed_hyo3.html, 2003-02-18.

[13] World Wildlife Fund. Widespread Pollutants with Endocrine-disrupting Effects[EB/OL]. <http://www.ourstolenfuture.org/Basics/chemist.htm>, 2008-01-03.

[14] 郝瑞霞,梁鹏,周玉文.城市污水处理过程中壬基酚的迁移转化途径研究[J].*中国给水排水*, 2007, **23**(1): 105-108.

[15] 金士威,徐盈,惠阳,等.污水中8种雌激素化合物的定量测定[J].*中国给水排水*, 2005, **21**(12): 94-97.

[16] Wang Y, Hu W, Cao Z, *et al.* Occurrence of endocrine-disrupting compounds in reclaimed water from Tianjin, China[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, **383**(5): 857-863.

[17] Shao B, Hu J, Yang M. Nonylphenol Ethoxylates and their biodegradation intermediates in water and sludge of a sewage treatment plant[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2003, **70**(3): 527-532.

[18] Ding W, Tzing S H. Analysis of nonylphenol polyethoxylates and their degradation products in river water and sewage effluent by gas chromatography-ion trap (tandem) mass spectrometry with electron impact and chemical ionization[J]. *J Chromatogr A*, 1998, **824**(1): 79-90.

[19] 侯绍刚,孙红文.NPnEO在中国北方四城市污水处理厂的污染研究[J].*环境科学研究*, 2006, **19**(3): 61-66.

[20] Liu J F, Liang X, Jiang G B, *et al.* Evaluation of an on-line coupled continuous flow liquid membrane extraction and precolumn system as trace enrichment technique by liquid chromatographic determination of bisphenol A[J]. *Talanta*, 2003, **60**(6): 1155-1161.

[21] 陈明,任仁,王子健,等.城市污水处理厂水样中有机氯农药残留分析[J].*环境科学与技术*, 2006, **29**(8): 37-39.

[22] 陈明,任仁,王子健,等.北京市工业废水和城市污水中有机氮、有机磷类农药残留分析[J].*安全与环境工程*, 2005, **12**(2): 45-48.

[23] 徐艳玲,程水清,秦华宇,等.有机微污染物在污水处理过程中的变化研究[J].*环境污染与防治*, 2006, **28**(11): 804-817.

[24] 林兴桃,陈明,王小逸,等.污水处理厂中邻苯二甲酸酯类环境激素分析[J].*环境科学与技术*, 2004, **27**(6): 79-81.

[25] 贾宁,许恒智,胡亚丽,等.固相萃取-气相色谱法测定北京市水样中的邻苯二甲酸酯[J].*分析实验室*, 2005, **24**(11): 18-21.

[26] 郑晓英,周玉文,王俊安.城市污水处理厂中邻苯二甲酸酯的研究[J].*给水排水*, 2006, **32**(3): 19-22.

[27] Chen C, Wen T, Wang G, *et al.* Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Sci Total Environ*, 2007, **38**(3): 352-365.

[28] 沈钢.城市污水处理厂中烷基酚和双酚 A 的存在状况与去除机制[D].北京:清华大学, 2006.28-37.

[29] 杜兵,张彭义,张祖麟,等.北京市某典型污水处理厂中内分泌干扰物的初步调查[J].*环境科学*, 2004, **25**(1): 114-116.

[30] 王淑娟.典型水处理过程中有毒有机物质的污染和去除[D].北京:北京林业大学, 2006.21-59.

[31] 徐艳玲.再生水处理工艺对有机微污染物去除效果的研究[D].西安:西北工业大学, 2006.56-83.

[32] 张海峰.环境中雌激素高灵敏度分析方法的建立及其在污水处理厂中的行为研究[D].北京:北京大学, 2004.25-29.

[33] Sun Q, Deng S B, Huang J, *et al.* Contributors to estrogenic activity in wastewater from a large wastewater treatment plant in Beijing, China[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2008, **25**: 20-26.

[34] European Environment Agency. Environmental risk assessment-approaches, experiences and information source [R]. London: European Environment Agency, 1998. 68-86.

[35] European Commission. Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) No. 1488/94 on risk assessment for existing substances [R]. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 1996. 328-334.

[36] US Environmental Protection Agency. Ecotox Database System[EB/OL]. <http://cfpub.epa.gov/ecotox>, 2007-11-27.

[37] Houtman C J. Tracing endocrine disruptors: Identification and effects of endocrine disrupting compounds in the aquatic environment[D]. Amsterdam: Vrije University, 2007. 37-50.

[38] Houtman C J, van Oostveen A M, Brouwer A, *et al.* Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay directed fractionation [J]. *Environ Sci Technol*, 2004, **38**(23): 6415-6423.

[39] Korner W, Spengler P, Bolz U, *et al.* Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. biological analysis[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2001, **20**(10): 2142-2151.

[40] Gaido K W, Leonard L S, Lovell S, *et al.* Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, **143**(1): 205-212.

[41] Coldham N G, Dave M, Sivapathasundaram S, *et al.* Evaluation of a

- recombinant yeast cell estrogen screening assay[J]. Environ Health Pers, 1997, **105**(7): 734-742.
- [42] Andersen H R, Andersson A M, Arnold S F, *et al.* Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals[J]. Environ Health Pers, 1999, **107**(1): 89-108.
- [43] Kuiper G M, Carlsson B, Grandien K, *et al.* Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β [J]. Endocrinology, 1997, **138**(3): 863-870.
- [44] Waller C L, Oprea T I, Chae K, *et al.* Ligand-based identification of environmental estrogens[J]. Chem Res Toxicol, 1996, **9**(8): 1240-1248.
- [45] Fang H, Tong W, Perkins R, *et al.* Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities[J]. Environ Health Pers, 2000, **108**(8): 723-729.
- [46] Gutendorf B, Westendorf J. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens[J]. Toxicology, 2001, **166**(1-2): 79-89.
- [47] Tanaka H, Yakou Y, Takahashi A, *et al.* Comparison between estrogenicities estimated from DNA recombinant yeast assay and from chemical analyses of endocrine disruptors during sewage treatment [J]. Water Sci Technol, 2001, **43**(2): 125-132.
- [48] Folmar L C, Hemmer M J, Denslow N D, *et al.* A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor *in vivo* and *in vitro* [J]. Aquat Toxicol, 2002, **60**(1-2): 101-110.
- [49] Legler J, Zeinstra L M, Schuitemaker F, *et al.* Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity[J]. Environ Sci Technol, 2002, **36**(20): 4410-4415.
- [50] Murk A J, Legler J, Lipzig M V, *et al.* Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays [J]. Environ Toxicol Chem, 2002, **21**(1): 16-23.
- [51] Legler J, Dennekamp M, Vethaak A D, *et al.* Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using *in vitro* reporter gene assays[J]. Sci Total Environ, 2002, **293**(1-3): 69-83.
- [52] Okoumassoun L E, Averill-Bates D, Gagne F, *et al.* Assessing the estrogenic potential of organochlorine pesticides in primary cultures of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using vitellogenin as a biomarker[J]. Toxicology, 2002, **178**(3): 193-207.
- [53] Heisterkamp I, Gandrass J, Ruck W. Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC-MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples[J]. Anal Bioanal Chem, 2004, **378**(3): 709-715.
- [54] Van den Belt K, Berckmans P, Vangenechten C, *et al.* Comparative study on the *in vitro/in vivo* estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol[J]. Aquat Toxicol, 2004, **66**(2): 183-195.
- [55] Schultis T, Metzger J W. Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase)[J]. Chemosphere, 2004, **57**(11): 1649-1655.
- [56] Beck I, Bruhn R, Gandrass J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen [J]. Chemosphere, 2006, **63**(11): 1870-1878.
- [57] Houtman C J, van Houten Y K, Leonards P E, *et al.* Biological validation of a sample preparation method for ER-CALUX bioanalysis of estrogenic activity in sediment using mixtures of xeno-estrogens [J]. Environ Sci Technol, 2006, **40**(7): 2455-2461.
- [58] Metcalfe C D, Metcalfe T L, Kiparissis Y, *et al.* Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka[J]. Environ Toxicol Chem, 2001, **20**(2): 297-308.