



ジブチルフォスフェートの
細菌を用いる
復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

【目 次】

	頁
要 約	1
緒 言	2
材料および試験方法	3
試験結果および考察	6
参 考 文 献	7
Tables 1～4	

【要 約】

ジブチルフォスフェートの変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvrA* を用い、用量設定試験は直接法および代謝活性化法のいずれも、0.5~5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で、本試験は直接法および代謝活性化法のいずれも 4.882~156.2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の用量で試験を実施した。

その結果、それぞれ2回実施した本試験において、用いた5種類の検定菌とも、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、ジブチルフォスフェートは、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）と判定された。

【 緒 言 】

OECD既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、ジブチルフォスフェートについて、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異⁽¹⁾、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異⁽²⁾を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接法と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化法とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年3月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）およびOECD化学品試験法ガイドライン：471, 472 に準拠し、化学物質GLP（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、改訂昭和63年11月18日、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に基づいて実施した。

【材料および試験方法】

〔検 定 菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvr* A
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の 4 菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、
から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvr*A 株は1979年 5 月 9 日に から分与を
受けた。

検定菌は、-80℃以下で凍結保存した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2 (OXOID, B-1674/1) を入れたL字型試験
管に種菌を接種し、37℃、10～12時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被 験 物 質〕

ジブチルフォスフェート (CAS No. 107-66-4、以下DBPと略) は、分子量 210の淡黄
色透明、比重 (20℃/20℃) 1.076 の液体である。純度 62.6%のもの (ロット番号：
) を から供与された。被験物質は、
使用時まで密栓して冷所に保管した。

DBPは、アセトン (ロット番号：DSR 3251、和光純薬工業(株)) を用いて 50 mg/ml
になるように調製した後、同溶媒で更に公比2ないし3で希釈したものを、速やかに試験
に用いた。なお、調製にあたって、純度および比重換算は行わなかった。

試験の開始に先立って、秦野研究所においてDBPのアセトン溶液中での安定性試験を
行った。すなわち、本試験および染色体異常試験 (H-92-202) における最高濃度 (108 mg/
ml) および最低濃度 (48.82 μg/ml) の 2 濃度について、室温遮光条件下で実施した。
その結果、調製後 4 時間における各 3 サンプルの平均含量は、それぞれ初期値 (0 時間)
の平均に対して、102および 109%であった。これらの値は、当研究所の基準を満たし
ていた (Appendix 1)。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、1562 μg/ml
溶液の含量は既定濃度に対し、107～108%、また、48.82 μg/ml 溶液は、95.0～
103%であった。これらの値も当研究所の基準を満たしていた (Appendix 2)。

以上の結果から、DBPはアセトン溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF-2 : フリルフラマイド	(上野製薬(株))	ロット番号 46,	純度99.9%
SA : アジ化ナトリウム	(和光純薬工業(株))	ロット番号 TWR3330,	純度>90%
9-AA : 9-アミノアクリジン	(Sigma Chem. Co.)	ロット番号 96F05641,	純度>98%
2-AA : 2-アミノアントラセン	(和光純薬工業(株))	ロット番号 DSF2950,	純度>90%

AF-2, 2-AA は DMSO (和光純薬工業(株)) に溶解したものを-20℃で凍結保存し、用時解凍した。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 混液の組成〕

1) トップアガー (TA菌株用)

下記の水溶液 (A) および (B) を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) バク7ガー (Difco)	0.6%	(B) L-ヒスタジン	0.5 mM
塩化ナトリウム	0.5%	ピオチン	0.5 mM

* : WP2 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2) 合成培地

培地は、日清製粉株式会社製の最少寒天培地 (用量設定試験においてはロット番号 : DJ030BH, 1992年5月14日製造、本試験においては、ロット番号 : DJ040IH, 1992年9月4日製造および DJ050JH, 1992年10月12日製造) を用いた。なお、培地 1 l あたりの組成は下記のとおりである。

硫酸マグネシウム・7水和物	0.2 g	リン酸水素アンモニウムナトリウム・4水和物	3.5 g
クエン酸・1水和物	2 g	グルコース	20 g
リン酸水素二カリウム	10 g	バク7ガー (Difco)	15 g

径 90 mm のシャーレ 1 枚あたり 30 ml を流して固めてある。

3) S9 混液 (1 ml 中下記の成分を含む)

S9 ^{**}	0.1 ml	NADH	4 μmol
塩化マグネシウム	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化カリウム	33 μmol	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 ml
グルコース・6リン酸	5 μmol		

** : 7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5、6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9 (キッコーマン株、ロット番号 RAA-280、1992年7月24日製造、RAA-284、1992年10月30日製造および RAA-285、1992年11月20日製造)を用いた。PBおよびBFの投与量は1日目 PB 30 mg/kg、2日目 PB 60mg/kg、3日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4日目 PB 60 mg/kg であり、いずれも腹腔内投与したものである。

[試験方法]

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトップアガー 2 ml、被験物質調製液 0.1 ml、リン酸緩衝液 0.5 ml (代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 ml)、検定菌液 0.1 ml を混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりにアセトン、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面上の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は抗菌性を認めたことから2回、本試験は同一用量について2回実施し、再現性の確認を行った。

[判定基準]

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する(陽性)と判定することとした。

【試験結果および考察】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

〔用量設定試験〕

結果を Tables 1、2 に示した。DBPについて、50～5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比3の5用量で試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法および代謝活性化法において、50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ 以上で抗菌性が認められた。そこで2回目の用量設定試験を最高 50 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ で実施したところ、すべての用量で抗菌性が認められなかった。

以上の結果から、本試験における最高用量は、5000 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ から公比2で希釈し、抗菌性の認める用量範囲の 156.2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ とした。なお、本試験では、4.882～156.2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ の範囲で公比2とし、直接法、代謝活性化法とも抗菌性を考慮して6用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Tables 3、4 に示した。DBPについて上記の用量範囲で試験を実施した。2回の試験を通して、用いた5種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、用量依存性のある変異コロニー数の増加は認められなかった。直接法および代謝活性化法の試験において、最高用量の 156.2 $\mu\text{g}/\text{プレート}$ において、抗菌性が認められた。

DBPについて実施した試験において、陽性対照群では、いずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、陰性対照群とともに計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、DBPは、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【参 考 文 献】

- (1) Maron, D.M. and Ames, B.N. : Mutation Research. 113: 173-215 (1983)
- (2) Green, M.H.L. : in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilby, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. (1984) pp.161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with Phosphoric Acid Di-n-butyl Ester

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)																
		Base - pair substitution type									Frameshift type							
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537				
S9 Mix (-)	0	103	104	115	13	8	12	26	14	13	29	26	29	8	9	8		
		(107 \pm 6.7)			(11 \pm 2.6)			(18 \pm 7.2)			(28 \pm 1.7)			(8 \pm 0.6)				
	50	106 *			11 *			8 *			19 *			8 *				
	150	94 *			7 *			4 *			17 *			4 *				
	500	94 *			7 *			14 *			20 *			0 *				
	1500	78 *			7 *			7 *			22 *			0 *				
	5000	0 *			0 *			9 *			2 *			0 *				
S9 Mix (+)	0	116	107	94	16	16	12	17	16	13	34	35	25	9	10	10		
		(106 \pm 11.1)			(15 \pm 2.3)			(15 \pm 2.1)			(31 \pm 5.5)			(10 \pm 0.6)				
	50	57 *			12 *			5 *			14 *			13 *				
	150	96 *			12 *			5 *			23 *			7 *				
	500	80 *			7 *			17 *			37 *			10 *				
	1500	98 *			4 *			12 *			33 *			5 *				
	5000	30 *			3 *			6 *			0 *			0 *				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA				
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80				
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA				
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2				
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	549	562	555	198	159	194	320	368	280	208	138	208	210	186	181		
		(555 \pm 6.5)			(184 \pm 21.5)			(323 \pm 44.1)			(185 \pm 40.4)			(192 \pm 15.5)				

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 2. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with Phosphoric Acid Di-n-butyl Ester

With (+) or without (-)	Test substance dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertants (number of colonies / plate, Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type									Frameshift type						
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9 Mix (-)	0	126	94	108	14	14	16	20	25	25	28	24	27	7	8	7	
		(109 \pm 16.0)			(15 \pm 1.2)			(23 \pm 2.9)			(26 \pm 2.1)			(7 \pm 0.6)			
	0.5	120			12			22			26			5			
	1.5	103			9			14			40			2			
	5	102			8			16			30			8			
	15	112			16			24			29			4			
	50	97			13			15			26			6			
S9 Mix (+)	0	117	130	112	9	21	16	29	20	23	37	38	45	6	15	18	
		(120 \pm 9.3)			(15 \pm 6.0)			(24 \pm 4.6)			(40 \pm 4.4)			(13 \pm 6.2)			
	0.5	100			20			17			35			13			
	1.5	111			16			23			36			9			
	5	119			9			23			33			9			
	15	96			13			28			37			10			
	50	106			14			28			34			11			
Positive control	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	526	539	577	262	245	237	185	187	161	571	623	645	3552	3559	3851	
		(547 \pm 26.5)			(248 \pm 12.8)			(178 \pm 14.5)			(613 \pm 38.0)			(3654 \pm 170.6)			
Positive control	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	699	746	781	176	171	181	343	463	421	292	273	280	122	114	115	
		(742 \pm 41.1)			(176 \pm 5.0)			(409 \pm 60.9)			(282 \pm 9.6)			(117 \pm 4.4)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with Phosphoric Acid Di-n-butyl Ester

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type						Frameshift type									
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9Mix (-)	0	159	141	149	13	9	14	19	18	21	16	21	21	6	3	7	
		(150 \pm 9.0)			(12 \pm 2.6)			(19 \pm 1.5)			(19 \pm 2.9)			(5 \pm 2.1)			
	4.882	139	127	131	16	17	14	19	20	12	26	21	25	5	4	5	
		(132 \pm 6.1)			(16 \pm 1.5)			(17 \pm 4.4)			(24 \pm 2.6)			(5 \pm 0.6)			
	9.765	106	147	112	15	13	16	9	16	15	27	20	21	8	7	8	
		(122 \pm 22.1)			(15 \pm 1.5)			(13 \pm 3.8)			(23 \pm 3.8)			(8 \pm 0.6)			
	19.53	122	125	150	17	11	14	7	18	11	30	19	24	3	3	5	
		(132 \pm 15.4)			(14 \pm 3.0)			(12 \pm 5.6)			(24 \pm 5.5)			(4 \pm 1.2)			
39.06	147	145	139	16	17	12	7	11	15	26	24	19	8	2	10		
	(144 \pm 4.2)			(15 \pm 2.6)			(11 \pm 4.0)			(23 \pm 3.6)			(7 \pm 4.2)				
78.12	134	125	130	11	17	15	11	14	12	20	22	19	8	9	7		
	(130 \pm 4.5)			(14 \pm 3.1)			(12 \pm 1.5)			(20 \pm 1.5)			(8 \pm 1.0)				
156.2	146 *	135 *	155 *	14 *	13 *	14 *	17 *	11 *	13 *	25 *	25 *	23 *	6 *	6 *	4 *		
	(145 \pm 10.0)			(14 \pm 0.6)			(14 \pm 3.1)			(24 \pm 1.2)			(5 \pm 1.2)				
S9Mix (+)	0	189	152	165	14	12	20	18	15	32	29	31	48	16	13	15	
		(169 \pm 18.8)			(15 \pm 4.2)			(22 \pm 9.1)			(36 \pm 10.4)			(15 \pm 1.5)			
	4.882	148	159	165	7	15	15	20	17	12	28	37	41	7	8	8	
		(157 \pm 8.6)			(12 \pm 4.6)			(16 \pm 4.0)			(35 \pm 6.7)			(8 \pm 0.6)			
	9.765	166	164	154	10	12	7	18	18	17	36	35	29	11	10	10	
		(161 \pm 6.4)			(10 \pm 2.5)			(18 \pm 0.6)			(33 \pm 3.8)			(10 \pm 0.6)			
	19.53	160	146	163	21	16	12	16	15	25	26	39	28	10	12	10	
		(156 \pm 9.1)			(16 \pm 4.5)			(19 \pm 5.5)			(31 \pm 7.0)			(11 \pm 1.2)			
39.06	165	166	176	12	12	16	12	19	16	26	34	28	7	12	8		
	(169 \pm 6.1)			(13 \pm 2.3)			(16 \pm 3.5)			(29 \pm 4.2)			(9 \pm 2.6)				
78.12	134	157	178	11	19	21	18	23	24	31	31	29	12	10	9		
	(156 \pm 22.0)			(17 \pm 5.3)			(22 \pm 3.2)			(30 \pm 1.2)			(10 \pm 1.5)				
156.2	105 *	135 *	144 *	16 *	13 *	15 *	24 *	20 *	21 *	30 *	32 *	36 *	15 *	9 *	5 *		
	(128 \pm 20.4)			(15 \pm 1.5)			(22 \pm 2.1)			(33 \pm 3.1)			(10 \pm 5.0)				
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (-)	Number of colonies / plate	768	756	765	273	254	261	111	129	119	634	622	579	2169	2032	2112	
		(763 \pm 6.2)			(263 \pm 9.6)			(120 \pm 9.0)			(612 \pm 28.9)			(2104 \pm 68.8)			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	735	928	833	231	231	242	269	373	282	257	334	281	246	161	190	
		(832 \pm 96.5)			(235 \pm 6.4)			(308 \pm 56.7)			(291 \pm 39.4)			(199 \pm 43.2)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 4. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with Phosphoric Acid Di-n-butyl Ester

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean \pm S.D.)															
		Base - pair substitution type						Frameshift type									
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537			
S9 Mix (-)	0	152	112	122	13	17	10	18	17	21	21	13	18	10	17	15	
		(129 \pm 20.8)			(13 \pm 3.5)			(19 \pm 2.1)			(17 \pm 4.0)			(14 \pm 3.6)			
	4.882	116	127	129	16	11	17	27	29	33	14	16	20	18	19	17	
		(124 \pm 7.0)			(15 \pm 3.2)			(30 \pm 3.1)			(17 \pm 3.1)			(18 \pm 1.0)			
	9.765	118	124	111	21	15	19	21	23	33	20	17	20	15	16	12	
		(118 \pm 6.5)			(18 \pm 3.1)			(26 \pm 6.4)			(19 \pm 1.7)			(14 \pm 2.1)			
	19.53	121	133	121	18	16	11	23	23	30	17	25	25	14	14	18	
		(125 \pm 6.9)			(15 \pm 3.6)			(25 \pm 4.0)			(22 \pm 4.6)			(15 \pm 2.3)			
S9 Mix (+)	39.06	101	128	142	22	14	21	29	31	23	14	18	9	15	17	15	
		(124 \pm 20.8)			(19 \pm 4.4)			(28 \pm 4.2)			(14 \pm 4.5)			(16 \pm 1.2)			
	78.12	136	111	109	19	20	11	29	22	35	23	15	18	12	15	21	
		(119 \pm 15.0)			(17 \pm 4.9)			(29 \pm 6.5)			(19 \pm 4.0)			(16 \pm 4.6)			
	156.2	123 *	126 *	124 *	15 *	21 *	23 *	21 *	26 *	22 *	26 *	13 *	20 *	21 *	7 *	17 *	
		(124 \pm 1.5)			(20 \pm 4.2)			(23 \pm 2.6)			(20 \pm 6.5)			(15 \pm 7.2)			
S9 Mix (+)	0	129	136	137	22	18	13	27	14	20	29	27	24	22	23	13	
		(134 \pm 4.4)			(18 \pm 4.5)			(20 \pm 6.5)			(27 \pm 2.5)			(19 \pm 5.5)			
	4.882	153	118	121	11	19	19	32	21	19	25	35	24	17	20	12	
		(131 \pm 19.4)			(16 \pm 4.6)			(24 \pm 7.0)			(28 \pm 6.1)			(16 \pm 4.0)			
	9.765	154	137	143	15	21	17	28	22	25	30	27	27	11	21	17	
		(145 \pm 8.6)			(18 \pm 3.1)			(25 \pm 3.0)			(28 \pm 1.7)			(16 \pm 5.0)			
	19.53	151	135	135	11	16	17	26	30	26	29	22	31	14	17	21	
		(140 \pm 9.2)			(15 \pm 3.2)			(27 \pm 2.3)			(27 \pm 4.7)			(17 \pm 3.5)			
S9 Mix (+)	39.06	134	106	139	17	20	17	32	23	33	38	30	24	23	21	18	
		(126 \pm 17.8)			(18 \pm 1.7)			(29 \pm 5.5)			(31 \pm 7.0)			(21 \pm 2.5)			
	78.12	126	124	123	15	14	23	25	20	28	33	32	30	18	19	16	
		(124 \pm 1.5)			(17 \pm 4.9)			(24 \pm 4.0)			(32 \pm 1.5)			(18 \pm 1.5)			
	156.2	134 *	147 *	139 *	15 *	10 *	12 *	29 *	25 *	25 *	20 *	33 *	24 *	22 *	23 *	22 *	
		(140 \pm 6.6)			(12 \pm 2.5)			(26 \pm 2.3)			(26 \pm 6.7)			(22 \pm 0.6)			
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA			
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80			
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA			
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	625	614	554	169	150	153	127	148	121	673	644	631	2010	1990	2020	
		(598 \pm 38.2)			(157 \pm 10.2)			(132 \pm 14.2)			(649 \pm 21.5)			(2007 \pm 15.3)			
S9 Mix (+)	Number of colonies / plate	486	485	487	194	236	219	664	651	912	171	147	166	224	187	163	
		(486 \pm 1.0)			(216 \pm 21.1)			(742 \pm 147.1)			(161 \pm 12.7)			(191 \pm 30.7)			

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

*: Inhibition was observed against growth of the bacteria. #: Precipitant was observed on the surface of agar plates.