トリプロピレングリコール
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 …… 8

Tables　　1～5

【要　　約】

トリプロピレングリコール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、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験では 50～5000 μg/プレート、本試験は 312.5～5000 μg/プレート の用量で試験を実施した。

その結果、2回実施した本試験において、用いた5種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の再現性のある増加が認められなかったことから、トリプロピレングリコールは、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、トリプロピレングリコールについて、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 *uvrA* 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, Lot 番号 B-1674/1 および B-1674/2）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〕

トリプロピレングリコール（CAS No. 24800-44-0、以下ＴＰＧと略）は、分子量 192.26 の無色透明の液体である。純度98%以上のもの（ロット番号：

）を　　から供与された。被験物質は、使用時まで冷暗所にて保管した。

ＴＰＧは、蒸留水に 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、純度換算は行わなかった。

秦野研究所においてＴＰＧの蒸留水中での安定性試験を高濃度（50 mg/mℓ）および低濃度（3 mg/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、99.6および 101%であった。これらの値は、当研究所で規定した許容範囲内にあった（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、50 mg/mℓ溶液の含量は既定濃度に対し、102〜104%、3.125 mg/mℓ 溶液は、106〜107%であった。これら

の値も当研究所の規定した許容範囲内であった（Appendix 2）。

以上の結果から、ＴＰＧは水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㈱	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㈱	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㈱	ﾛｯﾄ番号	DSF2950,	純度>90%）

AF-2, 2-AA は DMSO（和光純薬工業㈱）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) ﾊﾞｸﾄ・ｱｶﾞｰ (Difco)	0.6%	(B) L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5%	ﾋﾞｵﾁﾝ	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：DJ030EH, 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、再現性試験においては、ロット番号：DJ050JH, 1992年10月12日製造）を用いた。なお、培地１ℓあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ・7水和物	0.2ｇ	ﾘﾝ酸水素ｱﾝﾓﾆｳﾑﾅﾄﾘｳﾑ・4水和物	3.5ｇ
ｸｴﾝ酸・1水和物	2 ｇ	ｸﾞﾙｺｰｽ	20ｇ
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10ｇ	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ (Difco)	15ｇ

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㈱、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 60 mg/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蒸留水、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1回、本試験は同一用量について2回実施し、さらに再現性試験を行い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の平均値が、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 Table 1 に示した。ＴＰＧについて、50～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で公比約３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抗菌性は認められなかった。

以上の結果から、本試験における最高用量を直接法、代謝活性化法ともにすべての検定菌で 5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ とし、公比２で５用量を設定することとした。

〔本試験〕

ＴＰＧについて、直接法、代謝活性化法ともに 312.5～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で２回の試験を実施した。結果を Table 2、3 に示した。１回目の試験においては、TA1535 の直接法の最高用量の 5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ および TA1537 の代謝活性化法の 312.5 および 2500 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量において、陰性対照群の２倍を超える変異コロニー数が計測された。その他の検定菌については、直接法、代謝活性化法のいずれにおいても変異コロニー数の増加は認められなかった。

２回目の試験においては、TA1535 の直接法の 312.5 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量においてのみ陰性対照値の２倍を超える変異コロニーが計測された。その他の検定菌については、直接法、代謝活性化法のいずれにおいても変異コロニー数の増加は認められなかった。

〔再現性試験〕

２回の本試験で TA1535 の直接法および TA1537 の代謝活性化法で認められた陰性対照値の２倍を超える変異コロニーの出現については、再現性試験を実施した。TA1535 の直接法においては、異なった用量で陰性対照群の２倍を超える変異コロニー数が認められたことから、２回の再現性試験を実施した。結果を Table 4、5 に示す。その結果、TA1535 の直接法および TA1537 の代謝活性化法のいずれの用量においても、陰性対照群の２倍を超える変異コロニーの増加は認められなかった。

以上の結果から、本試験における陰性対照値の2倍を超える変異コロニーの出現には用量依存性が認められず、また再現性も得られなかったことから、陰性対照値の低いことによる偶発的なものであると考えられた。

ＴＰＧ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、ＴＰＧ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." Kilbey, 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 tripropylene glycol

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)										
		Base - pair substitution type						Frameshift type				
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0	133	114	126	13	9	13	20	14	14	21	26	14	9	6	7
		(124 ± 9.6)			(12 ± 2.3)			(16 ± 3.5)			(20 ± 6.0)			(7 ± 1.5)		
	50	110			13			7			21			13		
	150	104			8			7			22			6		
	500	121			11			14			21			2		
	1500	108			19			8			17			4		
	5000	152			17			10			11			3		
S9Mix (+)	0	123	148	141	20	14	18	13	11	9	35	32	24	11	10	6
		(137 ± 12.9)			(17 ± 3.1)			(11 ± 2.0)			(30 ± 5.7)			(9 ± 2.6)		
	50	142			12			28			23			18		
	150	119			22			27			29			15		
	500	147			13			17			30			11		
	1500	129			15			26			44			12		
	5000	136			15			20			18			18		
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	535	533	501	205	181	196	174	176	190	504	523	487	3239	3430	3577
		(523 ± 19.1)			(194 ± 12.1)			(180 ± 8.7)			(505 ± 18.0)			(3415 ± 169.5)		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	481	424	456	277	228	191	421	425	422	240	202	208	151	174	194
		(454 ± 28.6)			(232 ± 43.1)			(423 ± 2.1)			(217 ± 20.4)			(173 ± 21.5)		

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

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with tripropylene glycol

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)										
		Base - pair substitution type						Frameshift type				
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0	151	169	164	12	11	8	25	14	18	26	19	27	11	11	10
		(161 ± 9.3)			(10 ± 2.1)			(19 ± 5.6)			(24 ± 4.4)			(11 ± 0.6)		
	312.5	149	164	149	22	16	16	25	22	17	26	16	13	14	9	7
		(154 ± 8.7)			(18 ± 3.5)			(21 ± 4.0)			(18 ± 6.8)			(10 ± 3.6)		
	625	159	139	140	17	15	12	17	28	26	14	31	25	6	11	8
		(146 ± 11.3)			(15 ± 2.5)			(24 ± 5.9)			(23 ± 8.6)			(8 ± 2.5)		
	1250	171	151	160	13	26	8	23	18	21	26	21	25	15	10	8
		(161 ± 10.0)			(16 ± 9.3)			(21 ± 2.5)			(24 ± 2.6)			(11 ± 3.6)		
	2500	161	147	146	11	12	11	19	22	20	24	29	23	10	8	8
		(151 ± 8.4)			(11 ± 0.6)			(20 ± 1.5)			(25 ± 3.2)			(9 ± 1.2)		
	5000	123	142	154	21	20	19	20	19	22	26	25	25	9	9	11
		(140 ± 15.6)			(20 ± 1.0)			(20 ± 1.5)			(25 ± 0.6)			(10 ± 1.2)		
S9Mix (+)	0	157	156	153	20	19	18	20	20	20	27	26	27	8	7	6
		(155 ± 2.1)			(19 ± 1.0)			(20 ± 0.0)			(27 ± 0.6)			(7 ± 1.0)		
	312.5	133	142	131	20	16	11	22	34	20	46	30	35	19	11	17
		(135 ± 5.9)			(16 ± 4.5)			(25 ± 7.6)			(37 ± 8.2)			(16 ± 4.2)		
	625	174	150	173	14	13	20	26	28	21	44	27	43	9	11	9
		(166 ± 13.6)			(16 ± 3.8)			(25 ± 3.6)			(38 ± 9.5)			(10 ± 1.2)		
	1250	156	169	159	18	19	11	18	15	17	31	31	34	8	15	12
		(161 ± 6.8)			(16 ± 4.4)			(17 ± 1.5)			(32 ± 1.7)			(12 ± 3.5)		
	2500	145	164	159	16	12	18	21	23	32	33	40	38	14	17	13
		(156 ± 9.8)			(15 ± 3.1)			(25 ± 5.9)			(37 ± 3.6)			(15 ± 2.1)		
	5000	144	145	155	15	9	15	19	24	24	29	40	47	10	12	12
		(148 ± 6.1)			(13 ± 3.5)			(22 ± 2.9)			(39 ± 9.1)			(11 ± 1.2)		
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	646	612	613	152	185	154	232	251	211	620	647	672	2837	2633	2595
		(624 ± 19.3)			(164 ± 18.5)			(231 ± 20.0)			(646 ± 26.0)			(2688 ± 130.1)		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	615	667	602	154	151	165	749	773	721	195	181	143	146	179	190
		(628 ± 34.4)			(157 ± 7.4)			(748 ± 26.0)			(173 ± 26.9)			(172 ± 22.9)		

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

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with tripropylene glycol

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)										
		Base - pair substitution type						Frameshift type				
		TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
S9Mix (-)	0	139	134	158	11	12	8	16	19	16	28	30	27	9	9	11
		(144 ± 12.7)			(10 ± 2.1)			(17 ± 1.7)			(28 ± 1.5)			(10 ± 1.2)		
	312.5	133	154	143	19	23	18	19	16	25	24	33	31	5	13	13
		(143 ± 10.5)			(20 ± 2.6)			(20 ± 4.6)			(29 ± 4.7)			(10 ± 4.6)		
	625	131	114	145	22	15	20	17	23	21	25	28	22	14	16	11
		(130 ± 15.5)			(19 ± 3.6)			(20 ± 3.1)			(25 ± 3.0)			(14 ± 2.5)		
	1250	144	135	150	24	16	17	27	22	17	31	26	29	24	12	7
		(143 ± 7.5)			(19 ± 4.4)			(22 ± 5.0)			(29 ± 2.5)			(14 ± 8.7)		
	2500	122	136	137	13	23	21	21	16	19	30	37	28	12	13	11
		(132 ± 8.4)			(19 ± 5.3)			(19 ± 2.5)			(32 ± 4.7)			(12 ± 1.0)		
	5000	127	146	134	17	11	20	32	22	25	29	24	27	4	7	7
		(136 ± 9.6)			(16 ± 4.6)			(26 ± 5.1)			(27 ± 2.5)			(6 ± 1.7)		
S9Mix (+)	0	125	149	152	21	16	10	19	28	19	38	51	34	18	9	15
		(142 ± 14.8)			(16 ± 5.5)			(22 ± 5.2)			(41 ± 8.9)			(14 ± 4.6)		
	312.5	183	192	134	19	12	21	27	27	26	37	52	39	13	11	13
		(170 ± 31.2)			(17 ± 4.7)			(27 ± 0.6)			(43 ± 8.1)			(12 ± 1.2)		
	625	139	150	146	23	28	22	19	16	19	40	53	50	13	15	11
		(145 ± 5.6)			(24 ± 3.2)			(18 ± 1.7)			(48 ± 6.8)			(13 ± 2.0)		
	1250	152	165	133	16	12	18	27	21	22	47	39	42	12	11	8
		(150 ± 16.1)			(15 ± 3.1)			(23 ± 3.2)			(43 ± 4.0)			(10 ± 2.1)		
	2500	151	165	137	18	19	17	21	17	19	36	48	41	11	12	14
		(151 ± 14.0)			(18 ± 1.0)			(19 ± 2.0)			(42 ± 6.0)			(12 ± 1.5)		
	5000	155	164	156	9	16	20	17	21	22	44	52	39	18	21	14
		(158 ± 4.9)			(15 ± 5.6)			(20 ± 2.6)			(45 ± 6.6)			(18 ± 3.5)		
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2			SA			AF2			AF2			9AA		
	Dose (μg /plate)	0.01			0.5			0.01			0.1			80		
	Number of colonies / plate	586	617	614	308	293	274	192	185	179	639	612	604	2840	2998	3240
		(606 ± 17.1)			(292 ± 17.0)			(185 ± 6.5)			(618 ± 18.3)			(3026 ± 201.5)		
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA			2AA			2AA			2AA			2AA		
	Dose (μg /plate)	1			2			10			0.5			2		
	Number of colonies / plate	889	769	794	283	239	280	676	518	615	321	361	366	209	188	199
		(817 ± 63.3)			(267 ± 24.6)			(603 ± 79.7)			(349 ± 24.7)			(199 ± 10.5)		

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

Table 4. Results of bacterial reverse mutation assay (confirmation test I) with tripropylene glycol

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0		17 19 16 (17± 1.5)				
	312.5		17 20 13 (17± 3.5)				
	625		17 9 12 (13± 4.0)				
	1250		14 10 14 (13± 2.3)				
	2500		15 14 15 (15± 0.6)				
	5000		14 11 16 (14± 2.5)				
S9Mix (+)	0					10 13 8 (10± 2.5)	
	312.5					9 16 7 (11± 4.7)	
	625					9 14 12 (12± 2.5)	
	1250					13 14 16 (14± 1.5)	
	2500					19 13 14 (15± 3.2)	
	5000					13 11 20 (15± 4.7)	
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate		161 178 163 (167± 9.3)				
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate					316 306 283 (302± 16.9)	

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

Table 5. Results of bacterial reverse mutation assay (confirmation test II) with tripropylene glycol

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0		20 11 9 (13 ± 5.9)				
	312.5		15 14 20 (16 ± 3.2)				
	625		13 17 13 (14 ± 2.3)				
	1250		12 9 9 (10 ± 1.7)				
	2500		10 15 17 (14 ± 3.6)				
	5000		15 9 12 (12 ± 3.0)				
S9Mix (+)							
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate		155 141 166 (154 ± 12.5)				
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate						

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