1，2，4－トリメチルベンゼンの
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

材料および方法 …… 3

結果および考察 …… 7

結　　論 …… 8

特　記　事　項 …… 8

文　　献 …… 8

Tables　　1～3

【要　　約】

1,2,4-トリメチルベンゼンの変異原性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討し、陰性の結果を得た。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvr*A の5菌株を用い、S9 mix 無添加および添加の条件でプレート法により用量設定試験および本試験を行った。用量設定試験を 50～5000 μg/プレート の用量で行ったところ、S9 mix 無添加試験では TA100, TA98 および TA1537 は 150 μg/プレート 以上、TA1535 および WP2 *uvr*A は 500 μg/プレート 以上、S9 mix 添加試験では TA100, TA1535, WP2 *uvr*A および TA1537 は 500 μg/プレート 以上、TA98 は 1500 μg/プレート 以上の用量で抗菌性が認められた。また、TA1535 の S9 mix 無添加試験と TA1537 の S9 mix 添加試験では、本試験Ⅰで抗菌性のない用量が4用量に達しなかったため、本試験の用量を下げた。したがって、本試験では S9 mix 無添加試験を TA100, TA1535, TA98 および TA1537 は 7.81～250 μg/プレート、WP2 *uvr*A は 15.6～500 μg/プレート の範囲で、S9 mix 添加試験を TA1537 は 7.81～250 μg/プレート、TA100, TA1535 および WP2 *uvr*A は 15.6～500 μg/プレート、TA98 は 31.3～1000 μg/プレート の範囲で用量を設定して実施した。

その結果、2回の本試験とも、用いた5種類の検定菌のいずれの用量においても溶媒対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められなかったことから、1,2,4-トリメチルベンゼンは、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】

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、1,2,4-トリメチルベンゼンについて、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突然変異[(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突然変異[(2)]を指標とした変異原性の検出系である。

試験は、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 mix）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 S9 mix 添加試験と、被験物質をそのまま検定菌に作用させる S9 mix 無添加試験とからなっている。

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毒性試験ガイドライン：471、472」に準拠し、「化学物質GLP基準」（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ものを用い、各菌株の特性確認は、凍結保存菌の調製時に、アミノ酸要求性、UV感受性、および膜変異（rfa）とアンピシリン耐性因子pKM 101（プラスミド）の有無について行った。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.2（Oxoid）を入れたL字型試験管に解凍した種菌を一定量接種し、37℃で10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〕

1,2,4-トリメチルベンゼン（TMB、CAS No. 95-63-6）は、分子量 120.20 の無色透明液体である。構造式等は Appendix 1に示した。用いた被験物質は、

ロット番号　　純度 98.75%（不純物：不明）であり、　　から供与された。被験物質は、使用時まで室温遮光保管した。

ＴＭＢは、ジメチルスルホキシド（DMSO、ロット番号：KCL2807 および KCG5200、和光純薬工業㈱）に 50、10 または 2.5 mg/mℓ になるように溶解した後、同溶媒で公比約3ないし2で希釈し、速やかに試験に用いた。

ＴＭＢの DMSO 溶液中での安定性試験および含量測定試験を秦野研究所において実施した。安定性試験においては、低濃度（78.1 μg/mℓ）溶液は、当該試験の本試験Ⅱで調製したものについて、高濃度（60.0 mg/mℓ）溶液は、当研究所で実施した染色体異常試験（G-94-029）で調製したものについて、室温遮光条件下で、調製後4時間までの安定性を調べた。その結果、調製4時間後における各濃度の平均含量は、それぞれ初期値（0時間）の

平均値に対して、104 および 99.2%であった。これらの値は当研究所で規定している基準内（4時間後における平均含有量が初期値の90%以上）であった（Appendix 2、3)。

また、本試験Ⅱで調製した被験物質調製液について含量測定試験を行った結果、調製液の濃度は、いずれも当研究所の規定している基準内（溶媒中での平均含量が添加量の90～110%）であった（Appendix 4）。

〔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。

AF2	: 2-(2-ﾌﾘﾙ)-3-(5-ﾆﾄﾛ-2-ﾌﾘﾙ)ｱｸﾘﾙｱﾐﾄﾞ	(上野製薬㈱	ﾛｯﾄ番号 46,	純度99.9%)
SA	: ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	(和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度90%以上)
9AA	: 9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	(Sigma Chem. Co.	ﾛｯﾄ番号 96F05641,	純度98%以上)
2AA	: 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%以上)

AF2, 2AA 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。9AA は DMSO に、SA は純水に溶解し、速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 mix 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 *uvr*A 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㈱製の最少寒天培地（ロット番号：DJ030HJ、1994年8月11日製造、DJ040KJ、同年11月21日製造および DJ010BK、1995年2月6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	水酸化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.66g
ｸｴﾝ酸・1水和物	2g	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

ﾘﾝ酸一ｱﾝﾓﾆｳﾑ　　1.92 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 mix（１mℓ中下記の成分を含む）

S9**	0.1 mℓ	NADH	4 μmol
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化ｶﾘｳﾑ	33 μmol	ﾅﾄﾘｳﾑ-ﾘﾝ酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol
ｸﾞﾙｺｰｽ-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-309、1994年５月13日製造および RAA-317、同年10月27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、ラットの解剖および S9 の調製は５日目であった。

〔試 験 方 法〕

プレート法により、S9 mix 無添加試験および S9 mix 添加試験を行った。

小試験管中にトップアガー２mℓ、被験物質調製液 0.1 mℓ、リン酸緩衝液 0.5 mℓ（S9 mix 添加試験においては S9 mix 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使用溶媒、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各 Table 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、溶媒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、結果の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 S9 mix 無添加あるいは S9 mix 添加条件において、被験物質を含有する平板上における変異コロニー数の平均値が、溶媒対照

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。

【結果および考察】

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。ＴＭＢについて 50～5000 μg/プレート の範囲で公比を約３として、試験を実施したところ、S9 mix 無添加試験では、TA100, TA98 および TA1537 は 150 μg/プレート 以上、TA1535 および WP2 *uvr*A は 500 μg/プレート 以上の用量で抗菌性が認められた。また、S9 mix 添加試験では TA100, TA1535, WP2 *uvr*A および TA1537は 500 μg/プレート 以上、TA98 は 1500 μg/プレート 以上の用量で抗菌性が認められた。

したがって、本試験における最高用量は、S9 mix 無添加試験では 250 μg/プレート（TA1535 および WP2 *uvr*A は 500 μg/プレート）、S9 mix 添加試験では 500 μg/プレート（TA98 は 1000 μg/プレート）とした。

〔本試験〕

TA1535 の S9 mix 無添加試験と TA1537 の S9 mix 添加試験では、本試験Ｉにおいて抗菌性のない用量が４用量に達しなかったため、本試験における最高用量をともに 250 μg/プレート に下げた。

２回の本試験の結果をそれぞれ Table２、３ に示した。ＴＭＢの用量を、S9 mix 無添加試験では TA100, TA1535, TA98 および TA1537 は 7.81～250 μg/プレート、WP2 *uvr*A は 15.6～500 μg/プレート の範囲で、S9 mix 添加試験では TA1537 は 7.81～250 μg/プレート、TA100, TA1535 および WP2 *uvr*A は 15.6～500 μg/プレート、TA98 は 31.3～1000 μg/プレート の範囲で公比を２として試験を実施した。その結果、２回の試験のいずれも、用いた５種類の検定菌の S9 mix 無添加試験および添加試験において、溶媒対照値の２倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

ＴＭＢについて実施したすべての試験において、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、溶媒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、本試験系の有効性が確認された。

【結　　論】

以上の結果に基づき、1,2,4-トリメチルベンゼンは、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。

【特　記　事　項】

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。

【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 reverse mutation test of 1,2,4-trimethylbenzene ** on bacteria

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	95 100 111 (102± 8.2)	16 14 16 (15± 1.2)	24 22 21 (22± 1.5)	25 27 21 (24± 3.1)	10 7 12 (10± 2.5)	
	50	118	8	20	22	9	
	150	91 *	14	19	18 *	5 *	
	500	73 *	10 *	15 *	14 *	6 *	
	1500	83 *	10 *	25 *	26 *	4 *	
	5000	88 *	14 *	21 *	14 *	4 *	
S9mix (+)	0	102 93 115 (103± 11.1)	17 17 15 (16± 1.2)	27 21 27 (25± 3.5)	39 24 36 (33± 7.9)	17 14 17 (16± 1.7)	
	50	99	18	21	37	22	
	150	74	13	27	32	18	
	500	77 *	13 *	28 *	33	11 *	
	1500	93 *	16 *	28 *	29 *	15 *	
	5000	74 *	6 *	23 *	22 *	8 *	
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	542 539 556 (546± 9.1)	312 298 323 (311 ± 12.5)	130 137 122 (130± 7.5)	613 833 730 (725± 110.1)	648 610 640 (633± 20.0)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	1369 1337 1260 (1322± 56.0)	323 243 301 (289 ± 41.3)	1462 1479 1194 (1378± 159.9)	415 434 417 (422± 10.4)	323 320 320 (321± 1.7)	

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.

**: Purity was 98.75%.

Table 2. Results of reverse mutation test (I) of 1,2,4-trimethylbenzene ** on bacteria

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	136 138 152 (142 ± 8.7)	5 14 14 (11 ± 5.2)	19 32 26 (26 ± 6.5)	18 34 24 (25 ± 8.1)	5 5 9 (6 ± 2.3)
	7.81	133 121 127 (127 ± 6.0)	6 12 12 (10 ± 3.5)	ND	15 26 29 (23 ± 7.4)	7 11 4 (7 ± 3.5)
	15.6	132 126 123 (127 ± 4.6)	12 7 8 (9 ± 2.6)	12 30 15 (19 ± 9.6)	23 27 19 (23 ± 4.0)	13 6 3 (7 ± 5.1)
	31.3	131 142 134 (136 ± 5.7)	20 15 9 (15 ± 5.5)	21 16 16 (18 ± 2.9)	25 25 31 (27 ± 3.5)	6 3 6 (5 ± 1.7)
	62.5	121 97 115 (111 ± 12.5)	9 14 8 (10 ± 3.2)	19 18 22 (20 ± 2.1)	25 23 24 (24 ± 1.0)	16 5 9 (10 ± 5.6)
	125	102 * 91 * 106 * (100 ± 7.8)	7 * 9 * 18 * (11 ± 5.9)	23 17 24 (21 ± 3.8)	22 * 20 * 17 * (20 ± 2.5)	5 * 6 * 12 * (8 ± 3.8)
	250	86 * 86 * 79 * (84 ± 4.0)	12 * 6 * 14 * (11 ± 4.2)	14 * 20 * 24 * (19 ± 5.0)	30 * 20 * 11 * (20 ± 9.5)	6 * 6 * 5 * (6 ± 0.6)
	500			24 * 20 * 15 * (20 ± 4.5)		
S9mix (+)	0	117 130 139 (129 ± 11.1)	14 14 16 (15 ± 1.2)	25 21 26 (24 ± 2.6)	36 29 41 (35 ± 6.0)	19 18 32 (23 ± 7.8)
	7.81	ND	ND	ND	ND	14 21 17 (17 ± 3.5)
	15.6	136 155 147 (146 ± 9.5)	19 23 22 (21 ± 2.1)	15 26 33 (25 ± 9.1)	ND	22 18 14 (18 ± 4.0)
	31.3	136 154 145 (145 ± 9.0)	15 12 9 (12 ± 3.0)	25 23 26 (25 ± 1.5)	45 43 40 (43 ± 2.5)	17 15 13 (15 ± 2.0)
	62.5	130 146 168 (148 ± 19.1)	12 18 20 (17 ± 4.2)	23 24 23 (23 ± 0.6)	39 23 43 (35 ± 10.6)	15 20 18 (18 ± 2.5)
	125	141 112 109 (121 ± 17.7)	10 13 9 (11 ± 2.1)	25 29 25 (26 ± 2.3)	33 26 37 (32 ± 5.6)	14 * 10 * 17 * (14 ± 3.5)
	250	91 * 116 * 121 * (109 ± 16.1)	13 * 11 * 11 * (12 ± 1.2)	24 26 19 (23 ± 3.6)	42 24 31 (32 ± 9.1)	12 * 11 * 9 * (11 ± 1.5)
	500	105 * 91 * 104 * (100 ± 7.8)	9 * 7 * 9 * (8 ± 1.2)	25 * 15 * 12 * (17 ± 6.8)	25 * 33 * 20 * (26 ± 6.6)	
	1000				20 * 19 * 15 * (18 ± 2.6)	
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	770 678 696 (715 ± 48.8)	142 171 162 (158 ± 14.8)	135 112 123 (123 ± 11.5)	756 803 831 (797 ± 37.9)	742 764 624 (710 ± 75.3)
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	1417 1332 1306 (1352 ± 58.1)	333 332 325 (330 ± 4.4)	1435 1465 1409 (1436 ± 28.0)	389 369 355 (371 ± 17.1)	222 198 195 (205 ± 14.8)

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.

**: Purity was 98.75%.

ND : Not done

Table 3. Results of reverse mutation test (II) of 1,2,4-trimethylbenzene ** on bacteria

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	115 106 120 (114 ± 7.1)	16 15 12 (14 ± 2.1)	25 26 36 (29 ± 6.1)	32 23 21 (25 ± 5.9)	7 8 6 (7 ± 1.0)	
	7.81	105 128 105 (113 ± 13.3)	13 8 11 (11 ± 2.5)	ND	22 25 21 (23 ± 2.1)	5 6 7 (6 ± 1.0)	
	15.6	93 113 117 (108 ± 12.9)	13 14 11 (13 ± 1.5)	25 17 17 (20 ± 4.6)	19 23 29 (24 ± 5.0)	9 3 13 (8 ± 5.0)	
	31.3	101 107 97 (102 ± 5.0)	16 22 15 (18 ± 3.8)	26 27 27 (27 ± 0.6)	22 23 26 (24 ± 2.1)	3 9 7 (6 ± 3.1)	
	62.5	125 106 109 (113 ± 10.2)	12 10 12 (11 ± 1.2)	20 14 20 (18 ± 3.5)	26 26 22 (25 ± 2.3)	7 7 6 (7 ± 0.6)	
	125	95 * 108 * 84 * (96 ± 12.0)	5 * 13 * 12 * (10 ± 4.4)	17 22 25 (21 ± 4.0)	16 * 16 * 16 * (16 ± 0.0)	5 * 4 * 6 * (5 ± 1.0)	
	250	55 * 82 * 62 * (66 ± 14.0)	6 * 6 * 8 * (7 ± 1.2)	17 * 16 * 19 * (17 ± 1.5)	17 * 7 * 14 * (13 ± 5.1)	0 * 6 * 3 * (3 ± 3.0)	
	500			13 * 14 * 14 * (14 ± 0.6)			
S9mix (+)	0	129 117 119 (122 ± 6.4)	16 11 10 (12 ± 3.2)	39 26 27 (31 ± 7.2)	37 31 35 (34 ± 3.1)	15 7 15 (12 ± 4.6)	
	7.81	ND	ND	ND	ND	18 20 18 (19 ± 1.2)	
	15.6	111 89 111 (104 ± 12.7)	10 7 11 (9 ± 2.1)	31 30 29 (30 ± 1.0)	ND	18 19 19 (19 ± 0.6)	
	31.3	109 118 105 (111 ± 6.7)	6 9 11 (9 ± 2.5)	32 25 54 (37 ± 15.1)	23 34 31 (29 ± 5.7)	16 15 18 (16 ± 1.5)	
	62.5	102 106 120 (109 ± 9.5)	13 10 16 (13 ± 3.0)	23 30 30 (28 ± 4.0)	27 25 29 (27 ± 2.0)	21 14 18 (18 ± 3.5)	
	125	117 96 107 (107 ± 10.5)	8 14 10 (11 ± 3.1)	22 30 21 (24 ± 4.9)	35 31 25 (30 ± 5.0)	9 20 24 (18 ± 7.8)	
	250	88 * 103 * 81 * (91 ± 11.2)	10 10 16 (12 ± 3.5)	23 26 18 (22 ± 4.0)	32 33 25 (30 ± 4.4)	13 * 21 * 21 * (18 ± 4.6)	
	500	95 * 108 * 89 * (97 ± 9.7)	12 * 15 * 16 * (14 ± 2.1)	22 * 19 * 22 * (21 ± 1.7)	21 * 18 * 32 * (24 ± 7.4)		
	1000				20 * 20 * 14 * (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	754 769 582 (702 ± 103.9)	158 173 156 (162 ± 9.3)	188 185 105 (159 ± 47.1)	825 866 908 (866 ± 41.5)	1052 1228 1133 (1138 ± 88.1)	
Positive control S9 mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	1100 1146 1128 (1125 ± 23.2)	315 292 311 (306 ± 12.3)	1364 1438 1356 (1386 ± 45.2)	298 300 295 (298 ± 2.5)	299 266 221 (262 ± 39.2)	

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.

**: Purity was 98.75%.

ND : Not done